

# ニシン卵の受精の研究. VI. 裸卵の受精について

柳 町 隆 造  
(北海道大学理学部動物学教室)

Studies of fertilization in *Clupea pallasii*—VI.  
Fertilization of the egg deprived of the membrane

Ryuzo YANAGIMACHI  
(Zoological Institute, Hokkaido University, Sapporo)

## まえがき

魚卵は正常な条件の下では、通常1個の精子しか受け入れない。ニシン卵もこの例外ではない(柳町 '57 c)。では、この1個の精子しか受け入れないと云う機構は卵のどこに存在するのだろうか。もし卵の原形質にこのような機構があるならば、卵は卵膜の有無に関係なく1個の精子しか受け入れない筈である。又もし卵膜の方にこのような機構があるならば、卵から卵膜を除去してしまえば1個以上の精子が入る、即ち多精現象が起る筈である。筆者はこれらの点を明らかにするため二、三の実験を行なつてみた。

## 方 法

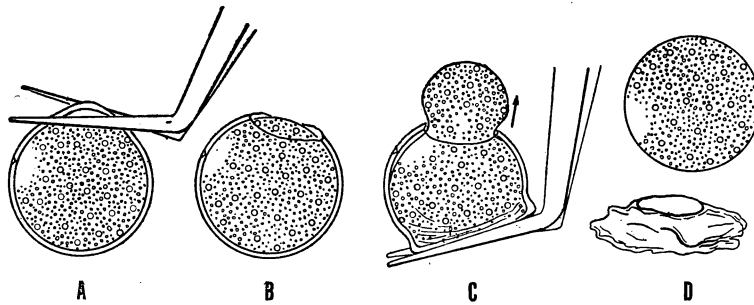
**実験媒液：** 前報(柳町 '53, '57 a)で述べたように、ニシンの未受精卵は等張リンゲル液中で長時間受精力を保ち、しかもこの中で正常に受精し発生することができる。それで、卵の処理や媒精は一切この溶液中で行うようにした。用いた等張リンゲル液の組成は、M/4.5 NaCl 100部+M/4.5 KCl 3.5部+M/6.7 CaCl<sub>2</sub> 1.5部+M/6.7 MgCl<sub>2</sub> 2.4部で、そのpHは7.6(少量のNaHCO<sub>3</sub>で調整)であつた。

**卵膜を除去する方法：** 眼科用の鉗を使つて未受精卵の卵膜の一部を切りとつてから卵を静かに圧迫し、卵体を卵膜の切れ目から押しだした(Fig. 1)。なれないうちは、操作の途中で卵の表層に傷をつけてしまつたが、なれるに従い多数のものを無傷のまま取りだせるようになった。操作の途中で傷を受けた卵は、数分以内に表層変化(表層胞の崩壊)を起すが、無傷のまま取りだされたものは外部から刺戟を与えない限り、いつまでも表層変化を起さないでいた。受精卵や賦活卵も、上に述べたと同じ方法で裸にすることができた。この場合には卵膜と卵体の間に隙間(囲卵腔)があるので、操作は非常に楽であつた。裸卵を一つの容器から他の容器に移すには、先の太いピペットを用いた。

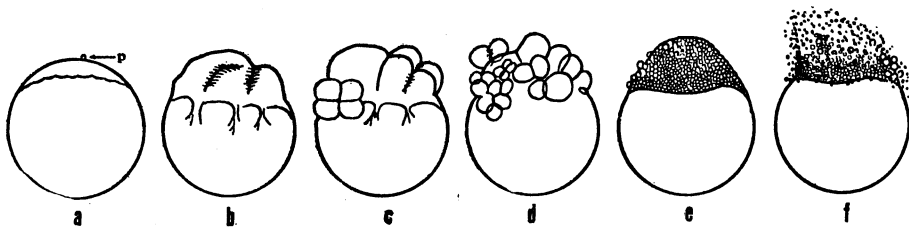
## 結 果

1. 未受精卵の場合 上に述べた方法で裸にした未受精卵、数個を精子浮游液(等張リンゲル液に新鮮な精子を約1/2,000の濃度にとかしたもの)に移したところ、卵は間もなく表層変化\*

\* 表層胞の崩壊開始は、対照の正常卵では媒精後約3分目(10°Cにて)であつたが、裸卵の場合には卵によつてかなりの変異がみられた。早いものは対照卵と同じく約3分目に、遅いものは10~20分目に初めて崩壊を開始した。しかし、何れの場合にも表層胞の崩壊が始まるのは動物極で、終るのは植物極であつた。



**Fig. 1.** Removal of the egg-membrane by the use of iridectomy scissors. An unfertilized egg was put in a Petri-dish containing isotonic Ringer's solution; the egg became firmly attached to the bottom of the dish owing to the adhesiveness of the membrane. Then, the membrane of the egg was partially cut off by the use of iridectomy scissors (A—B), and the egg proper was forced out of the membrane through the cut (C—D). The egg-membrane of the fertilized egg could be removed by the same method.



**Fig. 2.** Development of the egg, fertilized after removal of the membrane (in isotonic Ringer's solution, at about 12° C.).  
 a : 30 minutes after insemination; the 2nd polar body (p) was extruded. b—d : 3—5 hours after insemination; egg displayed irregular cleavages characteristic of polyspermy.  
 e : 18 hours after insemination; egg developed into apparently normal blastula but development did not progress far. f : 3—4 days after insemination; egg began to disintegrate.

を始め、30分後には第2極体を放出、2時間～3時間後には卵割を始めた。しかし卵割は非常に不規則であり、第1回目の卵割で3つ以上の割球を生ずるようなものばかりであった。これらの卵は胞胚期まで進んだが、それ以上は進まず3～4日後には細胞崩壊を起してしまつた(以上 Figs. 2～3 参照)。現在までに調べた総数118個の卵について云うと、囊胚にならずに胞胚期で死んだものが98個で全体の約85%、胚楕形成期まで進んだが完全な胚体を形成するに至らなかつたものが約10%、外見上正常と思われる胚(心臓搏動期まで飼育を続けた)になつたものは、わずかに3%であつた。その他媒精に全く反応しなかつたものが約2%あつた。

このように、裸卵の大部分は異常な発生をするが、これは1つの卵に多数の精子が入る、即ち多精現象が起るためであることがわかつた。媒精後5分～15分目の卵数個をROMEIS氏液で固定し、切片としてFEULGEN染色をして調べたところ、卵原形質中に多数の精子が入つてゐることがわかつた。精子が入つてゐるのは動物極だけでなく、植物極の方にもみられた。媒精後40～60分目の卵を同じく固定し染色したところ、1個の卵の中に数個の雄性前核がみられた。筆者は、これらの前核のうち何個が卵核と融合するか調べていないが、卵が異常な卵割や発生をしたのは多数の精子が入つたためと結論してよいであろう。

以上は卵を完全に裸にして媒精した場合であるが部分的に裸にした場合はどうであろうか。このことを知るため Fig. 4 a のような卵を作り、これに媒精してみた。Fig. 4 b, c, d は媒精後7分, 40分, 3 時間後の卵を示す。このように媒精の結果生じた2つの胚盤のうち、卵膜の内側にできたものは規則的な卵割をしていたが、卵膜の外側にできたものは不規則な(多精的)卵割をしていた。このことは前に述べた完全裸卵の受精と共に、卵膜が如何に多精現象を防ぐ上に重要な働きをしているかを示しているように思われる。多精現象を防ぐ一義的なものは卵膜中であつて卵原形質中になく思われる。

なお、媒精時に於ける精子の行動について一言触れたい。前報(柳町 '57 b, c)で述べたように、ニシンの精子は他の多くの海産魚の精子と違って海水やリンゲル液に触れただけでは殆んど活潑にならず成熟卵の卵門附近に来て始めて活潑になる。この精子を賦活するものは卵門の周りの卵膜にだけあつて卵の原形質中にはない(柳町 '57 d, e)。それで卵膜をもたない裸卵の表面では精子は全く活潑にならない。たとえ、卵表に衝突しても運動を始める徴候を示さない。筆者は、精子がどのようにして卵に入つて行くか、まだよく観察してはいないが、尾を全く振らずに静かに卵原形質中に埋没して行く精子を数例観察した。恐らく精子の頭と卵原形質は元来一種の親和性をもっており、一旦適当な角度で接触すれば、たとえ精子が運動しなくても容易に融合するものと思われる。

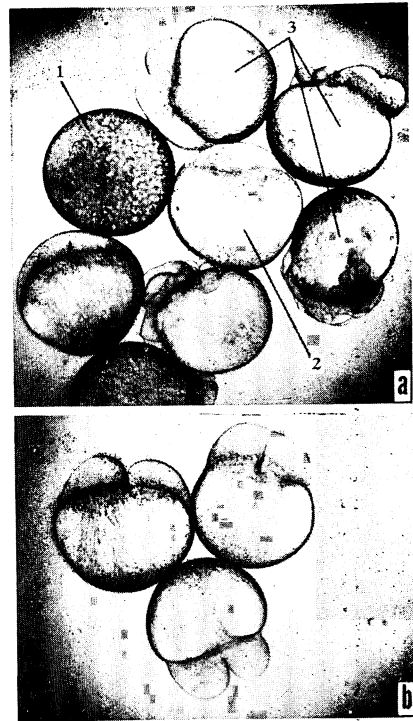


Fig. 3. Photomicrographs of the denuded eggs.  $\times 15$ . a: Eggs which were deprived of their investing membranes and then inseminated; (1) egg just after insemination (2) egg forming blastodisc (3) eggs undergoing irregular cleavage characteristic of polyspermy. b: Eggs which were normally fertilized and then deprived of the membranes (control).

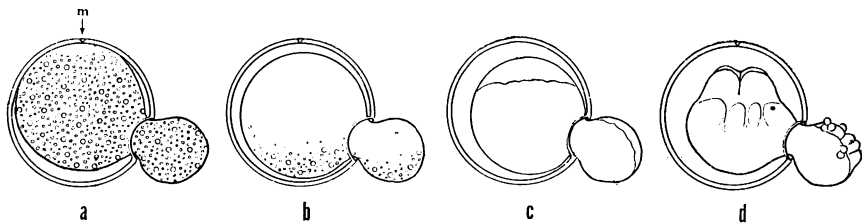


Fig. 4. Egg with a protrusion, before and after fertilization.

Membrane of an egg was partially cut off and the egg was pressed in such a way that a protrusion was formed (a). When such an egg was inseminated, two blastodiscs were formed (b-c). Note that the blastodisc formed in the protrusion showed irregular cleavage characteristic of polyspermy (d). m, micropyle.

2. 受精卵の場合 正常な条件下で受精した卵は、その後どんな濃い精子をかけられても受精しない。しかし、前項の実験が暗示するように余分の精子を防ぐ機構が卵膜にあるとすると、卵膜を除いてから精子を加えれば再度の受精が起る筈である。現在のところ、この種の実験を系

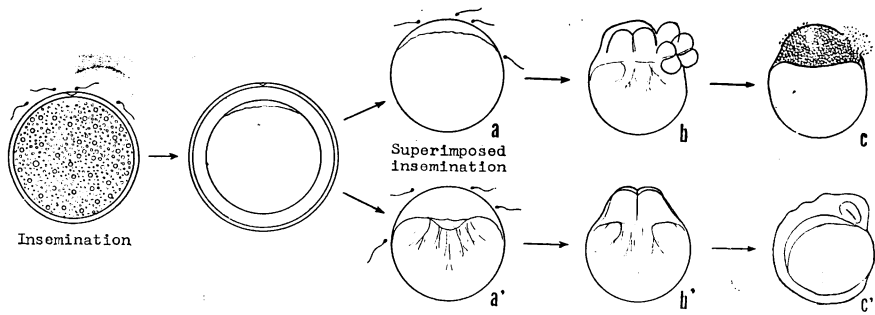


Fig. 5. Effect of superimposed insemination upon the development of the egg. The eggs which had been normally fertilized were deprived of the membrane and inseminated again. When this procedure was carried out at 10–20 minutes after fertilization, the majority of the eggs, if not all, displayed irregular cleavages characteristic of polyspermy (a–c). This fact indicates that spermatozoa penetrated into the previously fertilized eggs at the time of superimposed insemination and participated in cleavage. When the superimposed insemination was carried on at about 60 minutes after fertilization, practically all the eggs showed no irregularity in cleavage and produced normal embryos (a'–c'). This fact may be taken as indicating that the spermatozoa did not enter the eggs at the time of superimposed insemination or even if they entered that they could not take part in the mitotic process of the eggs.

統的には行なっていないが、受精後しばらくの間であれば再受精することがわかった。Fig. 5a–c は卵を受精後 10–20 分目に裸にして再媒精した場合で、この時には多数の精子が入り卵の発生が異常になったことを示している。a'–c' は受精後約 1 時間目に再媒精した場合で、この時には殆んど再媒精の影響が現われず卵の大部分が正常な発生をしたことを示している。恐らく、この場合にも精子は入ったのであろうが、卵の原形質が既にかなり変化しているのので、彼等はたとえ卵に入ったとしても発生を乱すには至らなかつたものと思われる。

3. 賦活卵の場合 ニシン卵は硝子針による刺傷によつて賦活され、受精されたときのように表層胞の崩壊や胚盤の形成をする(狩野 '53)。Fig. 6 は卵膜を除去せずに媒精、或は除去して

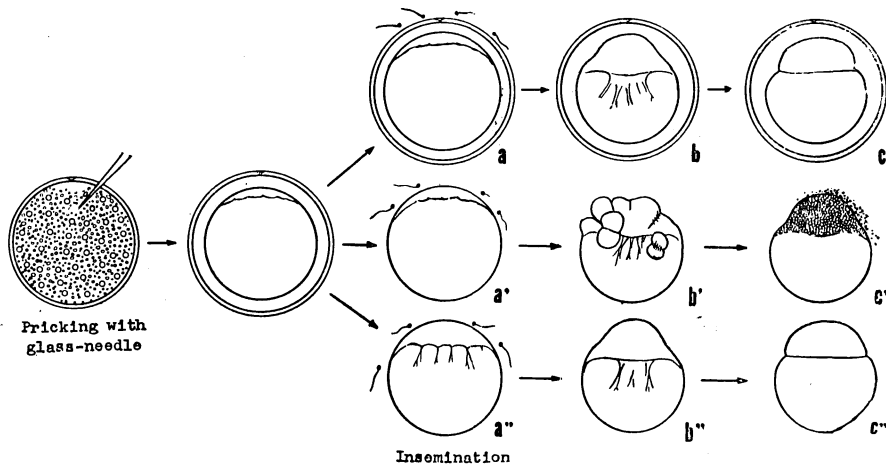


Fig. 6. Response of the artificially activated eggs to insemination. The eggs which had been activated by pricking were deprived of the membrane and then inseminated. When this procedure was performed at about 10–20 minutes after activation, the majority of the eggs underwent irregular cleavage characteristic of polyspermy and gave rise to more or less irregular blastulae (a'–c'). However, when the procedure was carried on at about 60 minutes after activation, none of the eggs showed cleavage (a'–c''). (a–c) are the control eggs which were inseminated without removal of the membrane; they never displayed cleavage.

から媒精した場合の結果を示す。a—d は卵膜を除去せずに媒精した場合で、全く卵割しなかつたことを示している。a'—d' は賦活後 10—20 分目に卵膜を除いて媒精した場合で、多数のものが不規則(多精的)な卵割をしながら胞胚期まで進んだことを示している。筆者は賦活卵に精子が実際に入つたか否か切片上で調べなかつたが、卵は刺傷しただけでは卵割することがないので媒精の結果起つた卵割は精子が入つた結果とみてよいであろう。a''—d'' は賦活後約 1 時間目に卵膜を除去して媒精したもので、この場合には殆んど全部の卵が卵割をしなかつた。恐らく、この場合にも精子は入つたのであろうが、卵原形質が既にかなり変化しているので精子としての働きをしないで終つたものと思われる。

## 論 議

最近、狩野・山本('57)はサケの卵の卵膜を酸性リンゲル液及びパンクレアチンで溶解することに成功している。彼等によると、このようにして得た裸卵もやはり多精現象を起すと云う。この事実は本報で述べた結果と共に、卵膜が多精現象を防ぐのに如何に重要な働きをしているかを示しているように思われる。云い換えれば、魚卵に於ける単精機構の一義的なものは、卵原形質中にはなくて卵膜にあることを暗示しているように思われる。

では、魚類以外の卵ではどうであろうか。受精の研究の最も行きとどいているウニ卵について云うと、この卵は本報で述べたニシン卵と違い、たとえ卵膜を除去されて裸になつても正常に受精されると云われている(HULTIN '48 等)。又一旦受精或は賦活した卵は、特殊な処理をしない限り、たとえ卵膜を除いても再受精しないことが知られている(LOEB '16, p. 85 ; MOORE '16, '17 ; LILLIE '19, p. 161 and 167 ; 石田・中埜 '47, '50 ; 梶山 '47, '51 等)。これは 1 個の精子が卵に接触すると同時に、その精子を中心にしてある変化が卵の原形質の表面を伝播し、これが余分の精子の入るのを妨げるためと考えられている。勿論、卵膜にも余分な精子を防ぐ機能があると考えられているが、卵原形質の方にも重要な機構があると云うことに諸家の意見が一致している。

振りかえつてニシン卵の場合をみると、既に述べたように卵膜を除いてしまうと典型的な多精現象を起す。一旦受精或は賦活した卵でさえ、卵膜を除去されると多数の精子を受け入れるようになる。即ち、ウニ卵の場合と違つて、受精後でも卵原形質に余分な精子を防ぐ機構ができ上つていない。できていたとしても局部的なものか、不完全なものか、或はその完成速度の非常に遅いものと云わねばならない。しかし、こゝで注意しなければならないことは、卵の構造がウニとニシンとでは非常に違つていることである。ニシン卵はウニ卵と違い、精子を受け入れる点が卵門と云う一個所に限定されているので、卵門直下の原形質にだけウニ卵に起るような変化が現われれば、それで余分な精子全部を防ぐに充分と云うことになる。恐らく、1 個の精子が卵門を通過して卵原形質に突入すると或る物質が卵原形質から遊離し、これが卵門の下端に或る変化(恐らく閉塞)を与えるのであろう。卵膜はそれ自身、精子に対し不透過であるから卵門に変化が起れば、もはや 1 個の精子も卵に入れないことになる。卵原形質の全表面を一瞬の中に余分な精子に対し不透過にしてしまうような変化は起らないと考えられる。たとえ起つたとしても、それは卵門直下のごく限られた範囲にだけ起るもので他の部分には伝播しない、或は伝播したとしても非常に速度の遅いものと考えられる。

## 要 約

ニシン卵は正常な条件下では 1 個の精子しか受け入れない。しかし、卵膜を除去してから媒

精すると多数の精子が入るようになる。一旦受精或は賦活した卵でさえ、卵膜を除去されると多数の精子を受け入れるようになる。これらの事実は卵膜が余分な精子の進入を防ぐ上に非常に重要な役割を演じていることを示しているように思われる。

### 引用文献

- 1) HULTIN, T. 1948: Species specificity in fertilization reaction. 1. The rôle of the vitelline membrane of sea-urchin eggs in species specificity. *Arkiv Zool.*, 40 A, No. 12, 1-9.
- 2) ISHIDA, J. and E. NAKANO 1947: The fertilization of the activated sea urchin eggs deprived of the fertilization membrane. *Zool. Mag.*, lvii, 117-120.  
(石田寿老・中堂栄三)
- 3) ————— 1950: Fertilization of activated sea urchin eggs deprived of fertilization membrane by washing with Ca-Mg-free media. *Annot. Zool. Jap.*, xxiii, 43-48.
- 4) KANO, Y. 1953: Ueber den japanischen Hering (*Clupea pallasii* Cuvier et. Valenc.). 2. Veränderung im Ei bei der Befruchtung oder Aktivierung. *Cytologia*, xviii, 67-79.  
(狩野康比古)
- 5) KANO, Y. and T. S. YAMAMOTO 1957: Removal of the membrane of the dog salmon egg by means of proteolytic enzymes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, xxiii, 166-172.  
(狩野康比古・山本 正)
- 6) LILLIE, F. R. 1919: "Problems of fertilization." Chicago Univ. Press, Chicago.
- 7) LOEB, J. 1916: "The organism as a whole." Putnam's Sons, N. Y.
- 8) MOORE, C. R. 1916: On the superposition of fertilization on parthenogenesis. *Biol. Bull.*, xxxi, 137-179.
- 9) ————— 1917: On the capacity for fertilization after initiation of development. *Biol. Bull.*, xxxiii, 258-295.
- 10) SUGIYAMA, M. 1947: Some experiments to refertilize the sea urchin eggs which were once fertilized. *Zool. Mag.*, lvii, 121-123.  
(楢山正雄)
- 11) ————— 1951: Re-fertilization of the fertilized eggs of the sea urchin. *Biol. Bull.*, ci, 335-344.
- 12) YANAGIMACHI, R. 1953: Effect of environmental salt concentration on fertilizability of herring gametes. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ.*, Ser. VI. (Zool.), xi, 481-486.  
(柳町隆造)
- 13) ————— 1957 a: Studies of fertilization in *Clupea pallasii*. 1. Extension of fertilizable life of the unfertilized eggs by means of isotonic Ringer's solution. *Zool. Mag.*, lxvi, 218-221.
- 14) ————— 1957 b: *Ibid.* 2. Structure and activity of spermatozoa. *Zool. Mag.*, lxvi, 222-225.
- 15) ————— 1957 c: *Ibid.* 3. Manner of sperm entrance into the egg. *Zool. Mag.*, lxvi, 226-233.
- 16) ————— 1957 d: *Ibid.* 4. Some properties of the sperm-stimulating factor in the micropyle area of the mature egg. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, xxiii, 81-85.
- 17) ————— 1957 e: Some properties of the sperm-activating factor in the micropyle area of the herring egg. *Annot. Zool. Jap.*, xxx, 114-119.

### Résumé

1) The fertilization of the *Clupea* egg is monospermic under normal conditions. It has been found that if the unfertilized egg is deprived of its membrane (cf. Fig. 1) and then inseminated, numerous spermatozoa penetrate into the egg and take part in the mitotic process of the egg. The cleavage and ensuing development of such an egg is therefore almost invariably abnormal (cf. Figs. 2 and 3).

2) The egg, once fertilized, cannot be fertilized again. However, if the membrane of the fertilized egg is removed, the egg becomes refertilizable. Spermatozoa penetrate into the previously fertilized egg and participate in the formation of the mitotic figures producing irregular cleavages characteristic of polyspermy (cf. Fig. 5).

3) The artificially activated egg is incapable of fertilization under normal conditions. It has been shown that if the membrane of the egg is removed, the egg can be fertilized. Spermatozoa enter and cleavage takes place similar to that characteristic of polyspermy (cf. Fig. 6).

4) In view of these findings it seems justifiable to consider that the egg-membrane prevents entrance of supernumerary spermatozoa and constitutes the principal mechanism for prevention of polyspermy.