

Japanese Journal of Ichthyology

Volume VII, Nos. 2/3/4

December 25, 1958

魚 類 学 雜 誌

第 7 卷 第 2/3/4 号

1958 年 12 月 25 日発行

Published by the Nippon Gyogaku Shinkokai

Tsukiji 5-chome, 1-banchi, Kyobashi,

Tokyo, Japan

ニシン卵の受精の研究

VIII. 未熟卵の受精反応について

柳 町 隆 造

(北海道大学理学部動物学教室)

Studies of fertilization in *Clupea pallasii*

VIII. On the fertilization reaction of the under-ripe eggs

Ryuzo YANAGIMACHI

(Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo)

緒 言

前報(柳町・狩野'53; 柳町'57 c, d, e)で述べたように成熟したニシン卵の卵門附近には同種の精子を活潑にし卵内への侵入を導びく特殊な要因がある。精子は受精の際、この精子付活要因に強く刺戟され卵門を通つて卵内に侵入する。一方、精子の侵入を受けた卵は2~3分後に表層変化を始め、次いで囲卵腔の形成—胚盤の隆起—卵割と云う一連の変化を起す(狩野'53)。これらの事実に関連して著者は未熟卵の卵門域にも精子付活要因が存在するかどうか、また未熟卵はどのような受精反応を呈するか調らべてみる必要があると思つた。幸い今までに二つの異なる成熟段階にある未熟卵を入手でき、これらの受精について若干知ることができたので茲にその概要を述べる。

稿を進めるに当り、材料の採集その他に多大の御援助を賜つた北海道区水産研究所の北浜仁技官並びに同研究所嘱託乳井善蔵氏に心からお礼申し上げる。

材 料

卵：本研究の材料とした未熟卵は1955年4月中旬、北海道区水産研究所の一調査船が留萌地方の沖合で捕獲した数匹の雌魚から得たものである。著者の入手した雌魚は全部で5尾であるが、その内3尾は俗に“未熟”他の2尾は“半熟”と呼ばれていた。“未熟”と“半熟”の相違はそれらの腹部を強く圧するとき卵を排出するか否かにある。即ち、前者では1個の卵も排出しないに反し

後者では少数ながら半透明な卵を排出する。著者は卵巣内に於ける卵の状態を調らべるため“未熟”及び“半熟”と呼ばれるものの中から各1尾をより出し、解剖顕微鏡の下でこれらの卵巣を観察したところ“未熟”の方では全部の卵がまだ濾胞上皮に包まれており、一方“半熟”の方では大部分の卵が既に濾胞上皮から脱落して卵巣腔に出ていることがわかった。更に、卵巣の一部を固定の上、切片にして調べたところによると*、‘未熟’魚のもつ卵は第Ⅰ成熟分裂中期乃至第Ⅱ成熟分裂中期のいろいろな段階の核をもつているが、‘半熟’の方ではすべての卵が第Ⅱ成熟分裂中期の核をもつていた。既に狩野（'49）が述べているように完熟したニシン卵の核は脊椎動物一般の例にもれず第Ⅱ成熟分裂中期の状態にあるから、本報で材料にする未熟卵は核学的にだけ言えば完熟した或は完熟に近いものであると云える。

Table 1. “未熟卵”と“半熟卵”の性質（完熟卵との比較）

	卵巣内における状態	核の状態	卵径 (mm)	卵の色及び透明度	卵膜の粘着性	受精率 ⁺
“未熟卵”	濾胞上皮に包まれている	第Ⅰ成熟分裂中期～第Ⅱ成熟分裂中期	1.3±0.5	淡い澄黄色 不透明	殆んどない	0 %
“半熟卵”	濾胞上皮から離れ卵巣腔に出ている。少数のものは濾胞上皮から脱落中	第Ⅱ成熟分裂中期	1.4±0.5	淡い橙黄色 半透明	微 弱	25 %
完熟卵	濾胞上皮から離れ卵巣腔に出ている	第Ⅱ成熟分裂中期	1.5±0.5	淡い黄色 透明	強 い	100 %

⁺ 濾胞上皮に包まれているものは濾胞上皮から出し、海水又は等調リンゲル液中で媒精。媒精 15～30 分後に受精反応（表層胞の崩壊、囲卵腔の形成）を示しているものの全卵に対する割合を求めた。

Table 1 は“未熟”及び“半熟”と呼ばれる雌魚のもつ卵の性質を完熟卵のそれと比較して示したものである。この表では便宜上未熟雌魚のもつ卵を“未熟卵”、半熟雌魚のもつ卵を“半熟卵”としてあるが、この表現は本報全体を通じて用いることにする。

精子： 媒精に用いた精子はすべて完熟した雄魚から取つたもので、実験に先立ち完熟卵にかけてみて 100 % 或はそれに近い受精率を与えることを確かめてから用いた。媒精時に於ける精子の濃度には特に留意しなかつたが通例 1/1000～1/2000 ($0.3\sim 0.7\times 10^8$ 個/ml.) であつた。

猶、実験はすべて 10°～15°C の室温で行なつた。

結果と考察

1) “未熟卵”の受精

“未熟”と呼ばれる雌魚からとり出した卵巣を鋏で細分の上、その一片をピンセットでつまみながら海水或は等調リンゲル液** 中で激しく振盪したところ若干の卵が濾胞上皮を破つて海水(或はリンゲル液)中に脱落した。著者はこのような卵を約 50 個集め、これらに新鮮な精子を加えて受精されるかどうかを見たが 1 個も受精されなかつた。対照として完熟した雌魚からとつた卵 50 個に同じ精子を加えてみたが、これらは全部直ちに受精反応（表層胞の崩壊—囲卵腔の形成）を起し発生を開始した。

* Romeis 液で 1 時間固定し、パラフィン法で切片とした上 Feulgen 染色をした。

** 組成：M/4.5 NaCl 100+M/4.5 KCl 3.5+M/6.7 CaCl₂ 1.5+M/6.7 MgCl₂ 2.4 (pH は少量の NaHCO₃ で 7.6 に調整) (柳町 '57 a)。

媒精された卵の卵門附近を観察すると、対照の完熟卵の方では顕著な精子付活が起つており多数の精子が卵門に群がっているのが見られた。一方、“未熟卵”の方では精子の付活が全く起つておらず1個の精子も卵門に群がっていないことがわかつた。

ニシンの精子は既に前報(柳町'57 b)で述べた如く、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あまり活発にならないと云う性質があるので、卵門域で付活されない限り動かない儘でいるわけである。従つて“未熟卵”に受精の起らない第一の理由は精子が卵門で付活されない、即ち卵門域に精子付活要因が存在しない為であると云うことができる。勿論、他の総ての条件が揃つているとは考えられないが、少なくとも第一の原因は卵門域にまだ精子付活要因が現われていない為と結論してよいであろう。

2) “半熟卵”の受精

この卵は上述の“未熟卵”とは違い既に濾胞上皮から脱落し卵巣腔に出ており、核の状態も完熟卵と同じく第Ⅱ成熟分裂中期にあるから完熟に非常に近い状態にあるわけであるが、卵膜が不透明であり又強い附着性に欠けている点で完熟卵とは容易に弁別することができる。著者は“半熟”と呼ばれていた雌魚1尾からこのような卵約250個をとり出し、等調リンゲル液の中で媒精してみた。その結果、これらの卵の卵門域では完熟卵に於けると同程度の強い精子付活が起つており多数の精子が卵門に群がっているのが見られた。処が受精反応(表層胞の崩壊—卵腔の形成)を起したものは全体のわずか25%で、残りの75%は何時までたつてももとの儘であつた。では、この75%の卵には精子が入っていないのであろうか。それとも精子は入っているが受精反応を起せないでいるのであろうか。この事を確かめるため卵門域を更に注意して見たところ、明らかに1個の精子が卵門直下の卵細胞質内に侵入しているのが見られた*。即ち“半熟卵”の75%は確かに精子

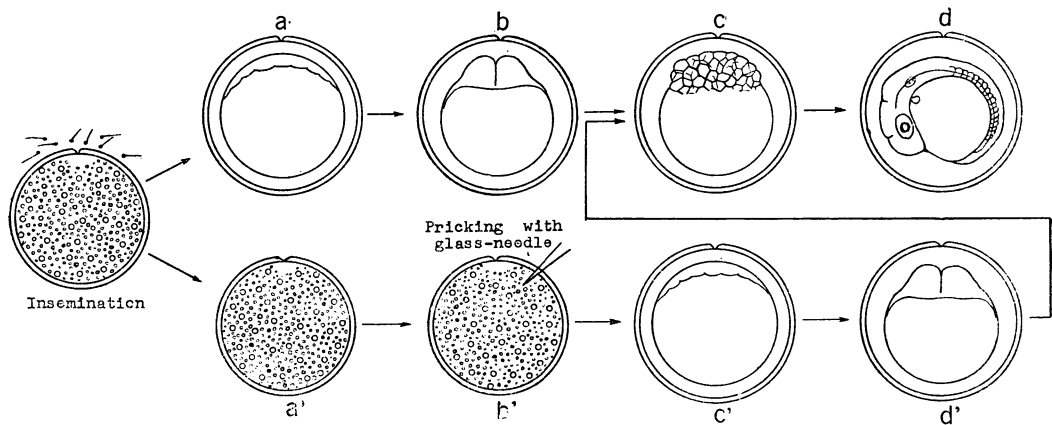


Fig. 1. Fertilization reaction of the eggs which have been recently ovulated.

When the eggs are inseminated in sea water or in isotonic Ringer's solution, some of them manifest cortical change and develop regularly (a-d). The majority of the inseminated eggs, however, do not show any sign of activation, remaining unchanged for a number of hours (a'). On pricking with a glass needle, however, all of these eggs are activated and begin to develop (b'-d').

* 卵細胞質内に入った精子の頭部は光つた小球として認められ、或るものではそれが微かに振動しているのが見られた。稀に1個の精子のほかに1~2個の余分な精子が卵門の細胞質内に入っているのが認められた。狩野('53)によると、このような余分の精子の侵入は正常受精の際にも起ることがあると云う。彼によると、これら余分の精子は卵の深部には進入できず卵から排除されるらしい。

を受け入れていながら受精反応を起せないでいることがわかる。

では、このような媒精に反応できなかつた卵は精子以外の刺戟にも反応できないであろうか。それで著者は媒精に反応しなかつた卵だけ 60 個を集めこれらを先端の直径約 20 μ の硝子針で刺傷してみた。すると、これらの卵は全部刺傷に反応し 2~3 分後には表層胞の崩壊を始め、次いで囲卵腔の形成、胚盤の隆起を起し、更に 2~3 時間後には 38 個即ち約 60 % のものが綺麗な卵割を始めた (Fig. 1 a'-d' 参照)。その後これらの卵は規則的な卵割を行い正常と思われる胚にまで発育した。刺傷された 60 個の卵の内 22 個即ち約 40 % は胚盤の隆起まで正常に行つたが卵割するには至らなかつた。ニシンの卵は狩野 ('53) が述べているように刺傷されただけで付活し胚盤の隆起まで行なうが卵割するには至らないので、上述の実験に於ける刺傷に引きつづいて起つた卵割や発生は既に卵内に入つていた精子が発生に関与した為と考えてよいであろう。

ここで以上述べた半熟卵を精子及び硝子針による刺傷に対する反応から分類してみると次の 3 群に分けることができる。即ち、(A) 完熟卵と同様に精子に反応しその後の発生も正常に進むもの：(B) 完熟卵と同様に精子を卵内に受け入れるが受精反応を起すことができず、硝子針による刺傷のような追加的刺戟を受けて始めて付活され発生を始めるもの：(C) B と同じように、精子を卵内に受け入れるが受精反応を起せず硝子針による追加的刺戟を受けて始めて付活される。しかし B とは異り卵割や発生はできない。これら (A) (B) (C) の各卵に見られる差異は恐らく本質的なものでなく熟度の差によるものであろう。ニシンの卵は卵巣内に於て大体同じ速度で成熟するものと思われるが、個々の卵の間では多少の差があるものと考えられる。恐らく (A) (B) (C) のうち (C) が一番未熟な段階にあり、次ぎが、(B)、(A) は最も熟度の進んだものであると考えられる。

猶、(A) (B) (C) の卵のうち、生理的に最も興味ある (B) に属する卵について若干の考察を加えてみたい。山本 (時) ('44 a, b, '56, '58) は成熟魚卵の受精過程を主にメダカ *Oryzias latipes* を材料として詳細に分析した結果、次のような一つの連鎖反応が含まれていることを発見した。即ち、精子が卵原形質に侵入すると先づ刺戟が成立し次いで精子の侵入点を中心にして或る不可視的な波が卵表全体を伝播し、それが原因となつて表層原形質中に埋没している表層胞が崩壊する。そして、その内容物が卵膜と卵表層原形質の間に放出されて卵膜の扛挙が起る。彼は表層胞崩壊の前提となる不可視的な伝導性の前駆的变化を受精波 fertilization wave と名付け、これは精子のほか種々の人為的刺戟剤で起し得ることを明らかにしている。

ここで、受精波の概念をニシンの“半熟卵”(B)の受精に適用してみると次のようになるのではなからうか。即ち、この卵は精子を卵内に受け入れることはできるが被刺戟性の閾値がまだ充分高くない為に精子がたとえ卵原形質に入つても“刺戟”が成立せず、従つて受精波が起らない。硝子針による刺傷のような強い作因によつて初めて刺戟及び受精波が成立し爾後の発生が進むようになる。或はまた次のように考えられるのではなからうか。即ち“半熟卵”(B)の原形質中には何か欠けるものがあり、或は何か阻害物質(条件)がある為に例え精子が原形質中に侵入しても“刺戟”或は受精波が成立しない。硝子針による刺傷は“刺戟”及び受精波の成立に必要なものを生じ或はその成立を阻止しているものを除去するので卵の発生は開始されるようになる。

著者は現在の処、ニシン以外の魚卵に於ても上述のような現象がみられるかどうかよく知らないが、サケ *Oncorhynchus keta* の成熟卵は或る条件の下で上述の“半熟卵”(B)に似た状態を呈すると云われている。サケの卵は自然環境の下では淡水中に放出され、その中で受精し発生しているが人為的に体液と等調なリンゲル液 (M/7) に入れその中で媒精してみると全く受精反応を起さない。ところが、この卵を淡水或は低調なリンゲル液に移してみると直ちに受精反応を起し正常な発

生を開始する(久佐 '50, 山本(喜)'51)。久佐, 山本両氏はいろいろな実験及び観察から, 精子は等調リングル液中で媒精したとき既に卵に入っているが, 卵自体が付活しない為に発生が一時的に停止(抑制)されていると考えている。つまり, サケ卵を等調リングル液に入れると云うことはニシンの“半熟卵”(B)に似た状態を惹き起すことになり, 淡水或は低調のリングル液に移すと云うことがニシンの場合の硝子針による刺傷に相当する刺戟を与えることになる。

最近, 著者(未発表)はニシンの完熟卵を雌の体内から取り出し硝子器に入れ乾燥しないようにして常温(8°~15°C)で1昼夜以上放置しておくで細胞崩壊を起す前に“半熟卵”(B)に似た状態を呈することを知った。つまり, 精子を受け入れることが出来るにかかわらず発生を開始することができず, 硝子針による刺傷のような追加的刺戟を与えられて始めて発生を始める。また狩野(未発表)によるとニシンの完熟卵は予めある温度で処理されると媒精されても受精反応を起さず硝子針などで更に刺戟されて初めて受精反応及びそれに引き続く発生を始めると云う。これは熟処理によつて一度完全に成熟した卵が“半熟卵”に似た状態に引き戻された為ではないかと想像される。恐らく, これらの現象の原因は共通したものと思われるが, その本性については将来の検討に俟たねばならない。

要 約

1) 第I成熟分裂を行ないつつある卵はまだ濾胞上皮に包まれている。このような卵を濾胞上皮からとり出し海水或は等調リングル液中で媒精してみると1個の卵も受精されない。これはこれらの卵の卵門域にニシンの受精に不可欠な精子付活要因がまだ現われていない為である。

2) 卵巣内の卵は第II成熟分裂の中期で卵巣腔に出る。このような卵の卵門域には精子付活要因が現われている。従つて媒精の際, 精子はこれらの卵門域で強く付活される。

卵巣腔に入つて間もないと思われる卵を海水又は等調リングル液中で媒精してみると, あるもの(約25%)は完熟卵と同様に受精反応を起し発生するが, 多数のもの(約75%)は精子を単精的に表層原形質内に受け入れているにかかわらず受精反応を全く起せないでいる。硝子針で刺傷すると, これらの卵は直ちに受精反応を起し(付活し), その後の発生は正常に進む。即ち, 卵巣腔に出て間もないと思われる卵の大部分に於ては, 精子を受け入れる機構が出来上つているにかかわらず発生を開始することが出来ない。これは卵の細胞質がまだ生理的に完熟していない為に被刺戟性の閾値が低い, 或は細胞質内に発生開始に必要なものが欠けているか又は発生開始を阻害するものがあつて, これが硝子針による刺傷によつて生産若しくは除去される為と考えられる。

文 献

KANQH, Y. (狩野康比古) 1949 : Ueber den japanischen Hering. I. Morphologie des reifen Eies. *Cytologia*, xv, 138.

————— 1953 : Ueber den japanischen Hering. II. Veränderung im Ei bei der Befruchtung oder Aktivierung. *Cytologia*, xviii, 67.

KUSA, M. (久佐 守) 1950 : Physiological analysis of fertilization in the eggs of the salmon, *Oncorhynchus keta*. I. Why are the eggs not fertilized in isotonic Ringer's solution? *Annot. Zool. Jap.*, xxiv, 22.

YAMAMOTO, K. (山本喜一郎) 1951 : Activation of the egg of the dog salmon by water and associated phenomena. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VII (Zool.)*, x, 303.

YAMAMOTO, T. (山本 時男) 1944a : Physiological studies on fertilization and activation of fish

- eggs. I. Response of the cortical layer of the egg of *Oryzias latipes* to insemination and artificial stimulation. Annot. Zool. Jap., xxii, 109.
- _____ 1944b : Physiological studies on fertilization and activation of fish eggs. II. The conduction of the "fertilization wave" in the egg of *Oryzias latipes*. Annot. Zool. Jap, xxii, 126.
- _____ 1956 : The physiology of fertilization in the medaka (*Oryzias latipes*). Exp. Cell. Res., x , 387.
- _____ 1958 : "魚卵の受精生理", 発生生理の研究 (培風館), pp. 73—135.
- YANAGIMACHI, R. and Y. KANO (柳町 隆造・狩野康比古) 1953 : Manner of sperm entry in herring egg with special reference to the role of calcium ions in fertilization. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI (Zool.), xi, 487.
- YANAGIMACHI, R. (柳町 隆造) 1957a : Studies of fertilization in *Clupea pallasii*. I. Extension of the fertilizable life of the unfertilized eggs by means of isotonic Ringer's solution. Zool. Mag. (Tokyo), lxvi, 218.
- _____ 1957 b : Studies of fertilization in *Clupea pallasii*. II. The structure and activity of spermatozoa. Zool. Mag. (Tokyo), lxvi, 222.
- _____ 1957 c : Studies of fertilization in *Clupea pallasii*. III. Manner of sperm entrance into the egg. Zool. Mag. (Tokyo), lxvi, 226.
- _____ 1957 d : Studies of fertilization in *Clupea pallasii*. IV. Some properties of the sperm-stimulating factor in the micropyle area of the mature egg. Bull. Jap. Sci. Fish., xxiii, 81.
- _____ 1957 e : Some properties of the sperm-activating factor in the micropyle area of the herring egg. Annot. Zool. Jap., xxx, 114.

Résumé

1) The eggs undergoing the first maturation division are still surrounded by follicular epithelium. When such eggs are forced from the epithelium and inseminated in sea water or in an isotonic Ringer's solution, none of them is fertilized. The principal cause of the failure of fertilization is that the micropyle area of these eggs does not contain the sperm-activating factor which is an essential requirement for normal fertilization of the eggs.

2) Ovulation, i. e. liberation of the eggs from the follicular epithelium, takes place after the eggs have reached the second maturation division metaphase. The micropyle area of the ovulated eggs contains the sperm-activating factor. It has been found that when the recently ovulated eggs are inseminated in sea water or in an isotonic Ringers solution about 25 per cent of them are activated and begin to cleave at the proper time. All of these eggs develop regularly (cf. Fig. 1 a—d). The remaining 75 per cent of the eggs, on the other hand, do not show any sign of activation in spite of the fact that they are penetrated by spermatozoa. These eggs remain unchanged for a number of hours. When such eggs are additionally stimulated by artificial means (pricking with a glass needle) all of them are activated at once and begin to develop (cf. Fig. 1 a'—d').

Some discussion was presented on this curious phenomenon on the basis of the "fertilization wave" concept proposed by T. YAMAMOTO ('44 a, b, '56, '58).