HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	メダカの排卵前後における卵濾胞，特に顆粒膜細胞の電顕ならびに酵素組織化学的観察
Author(s)	香川, 浩彦; 高野, 和則
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 30(3), 191-204
Issue Date	1979-08
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/23688
Type	bulletin (article)
File Information	30(3)_P191-204.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北大水産彙報
30(3), 191–204. 1979.

メダカの排卵前後における卵濾胞，特に顆粒膜細胞の電顕ならびに酵素組織化学的観察

香川浩彦*・高野和則*

Ultrastructure and Histochemistry of Granulosa Cells of Pre- and Post-Ovulatory Follicles in the Ovary of the Medaka, *Oryzias latipes*

Hirohiko KAGAWA* and Kazunori TAKANO*

Abstract

The granulosa cells of pre- and post-ovulatory follicles in ovaries of the medaka, *Oryzias latipes*, kept under constant temperature (25±1°C) and artificial light cycle (14 hrs. light, 10 hrs. dark) were examined ultrastructurally and histochemically.

The granulosa cells of the oocytes in the tertiary yolk stage (0–8 hours after lighting) contained rough endoplasmic reticulum arranged in parallel, mitochondria with lamellar cristae, and well-developed Golgi apparatus. In the granulosa cells of the oocytes which had attained the late phase of the tertiary yolk stage and the pre-maturation stage (12–16 hours after lighting), the mitochondria with ill-developed cristae decreased in size, and the cisternae of the rough endoplasmic reticulum mostly assumed either a rod-shaped or a vesicular form. In the maturation stage just before ovulation (20 hours after lighting), most prominent alterations in the granulosa cells were a dilatation of vesicular cisternae of the rough endoplasmic reticulum and an appearance of the mitochondria with tubular cristae. In addition, four types of lysosome-like bodies with different inner structures were observed during the course of the final phase of oocyte maturation.

In the post-ovulatory follicles, immediately after lighting, the granulosa cells markedly hypertrophied, and possessed numerous microvilli projecting into the follicular lumen. These cells were characterized by having many lysosome-like bodies and lipid droplets in addition to other cell organelles. Between 4 and 8 hours after lighting, follicular lumen was crushed, and the granulosa cells formed an irregular clump of cells. These cells were characterized by the presence of many cytolysomes and by a decrease in the amount of vesicular rough endoplasmic reticulum. Thereafter, the granulosa cells rapidly degenerated in association with an increase of lysosome-like bodies and a disappearance of other cell organelles. It was difficult to detect the granulosa cells in the ovaries examined between 16 and 20 hours after lighting.

Histochemical reaction for Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) was detected in the granulosa cells of all of the pre-ovulatory follicles examined

* 北海道大学水産学部淡水増殖学講座
(*Laboratory of Fresh-Water Fish-Culture, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

in the present study. The granulosa cells of post-ovulatory follicles also showed 3β-HSD activity. However, response for 3β-HSD disappeared from the granulosa cells of post-ovulatory follicles 8 hours after lighting.

緒　　言

卵黄形成を完了した魚類の卵母細胞は，胚胞の崩壊を起こして成熟を終え，排卵される。この一連の過程において，卵濾胞が重要な役割を果している可能性については古くから注目されて来たが，これまでになされた組織学的研究は，主に卵母細胞を対象としており，卵濾胞に関する知見は付随的，断片的に留まる例が多い。卵母細胞の，特に成熟と排卵において卵濾胞細胞が果す役割については，最近，生体外培養法を用いた研究によって次第に明らかにされつつある[1-4]。一方，これらの卵濾胞細胞の役割を機能形態学的な視点から解明するためには，電子顕微鏡による観察が有力な手法となるにもかかわらず，卵黄形成の終了から排卵に至る過程における濾胞細胞の微細構造的研究はなお極めて少ない[5-8]。

また，排卵後の卵巣に残存する濾胞組織が，その種の産卵回数や経産魚であるか否かの判別に重要な指標となることはよく知られている。しかし，これらが消滅するまでの形態的変化と消失時期についての詳しい知見は極めて乏しく，わずかに限られた魚について電顕的な観察がなされているに過ぎない[8)9)]。

本研究では，ほぼ24時間周期で規則的に卵巣卵の発達と産卵を繰り返すメダカを用いて，卵成熟と排卵の過程における卵濾胞，特に顆粒膜細胞の微細構造の変化を観察し，さらに排卵後濾胞の消滅過程を経時的に追跡した。また，これらの一連の過程で，Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) 活性の酵素組織化学的な検索により，卵巣におけるホルモンの産生部位を調べ，本種の卵成熟，排卵および排卵後における卵濾胞の機能を明らかにするための基礎的知見を得ようとした。

稿を進めるに先立って，終始適切な御助言を賜った北海道大学水産学部高橋裕哉教授に深謝する。

材 料 お よ び 方 法

実験には北海道大学水産学部の屋外池で飼育していたメダカ *Oryzias latipes* を用いた。材料魚は6月下旬の実験開始時に水温 25±1°C，午前8時に明期が始まる14時間明期，10時間暗期の人工光周期下に移した。容量 60 *l* のガラス水槽を4分画に仕切り，その各々に雌雄一対のメダカを収容した。あらかじめこれらの雌が，毎日，点灯後1時間以内に産卵していることを確認した後，明期開始時から4時間間隔で計6回，各回雌8尾ずつ採集した。このうち各3尾を光顕および電顕観察に，残りの2尾は 3β-HSD の所在を組織化学的に検出するために用いた。

光顕観察のために，摘出した卵巣はブアン液で固定した。通常のパラフィン法により 10 μm の切片を作製して，ヘマトキシリン-エオシンの二重染色を施した。電顕観察用の試料として，摘出した卵巣の一部を 4% パラフォルムアルデヒド-5%グルタールアルデヒド混液で固定後，1% オスミウム酸で後固定し，通常の方法でエポン・エポキシ樹脂に包埋した。試料はガラスナイフで 500～800Å の超薄切片とし，酢酸ウラニル-クエン酸鉛の二重染色を施した後，日立 HS-7 型電子顕微鏡を用いて観察した。同時に，エポン包埋試料から 1 μm 切片を作製し，メチレンブルーで染色して光顕による観察を行った。

3β-HSD の組織化学的検出は以下の手順で行った。材料魚から摘出した卵巣をアルミ箔で包み，ドライアイスで冷却したアセトンに浸漬して凍結した。これをクリオスタット内で 15～20 μm の切片とし，Takikawa と Matsuzawa[10)] の方法に従って，冷アセトン (15～20時間) および冷エチルエーテル (1～2時間) で脱脂処理し，85% 冷アセトンで洗浄した後，室温で 15～20 分間乾燥した。この後，Rubin ら[11)] の方法に準じて作製した反応液に切片を入れ，37°C で 1～2 時間反応させた。同時に対照

切片を基質（デヒドロエピアンドロステロン）を除いた液で反応させた。反応を終了した切片は10%中性フォルマリンで固定し，エタノールで脱水後，樹脂封入剤で封入して観察した。これらの処理と並行して，凍結切片の一部にヘマトキシリン-エオシンの二重染色を施し，比較観察を行った。

結　　果

排卵前の顆粒膜細胞

人工的な長日光周期下，一定水温で飼育したメダカは，毎日，点灯時からほぼ1時間以内に産卵するようになった。このようなメダカの卵巣卵の成熟から排卵に至る過程で見られる顆粒膜細胞の形態的変化は，微細構造的に以下の3段階に分けられた。

点灯後0～8時間： 最も発達した卵群の卵母細胞は第三次卵黄球期の初期にあり，卵径は約800μmを示す。卵母細胞の大部分は一塊の卵黄球で満たされているが，周辺部には表層胞，油球のほかに小形の卵黄球も存在していた。電子密度の異なる内，外2層から成る卵膜には多数の管孔（pore canal）が貫通し，卵細胞と顆粒膜細胞層とを連絡していた（図1）。顆粒膜細胞の細胞間隙には付着糸が存在し，これらは植物極に特に多く認められた。しかし，顆粒膜細胞自体には両極で形態的な差異は見られなかった。

この時期の顆粒膜細胞の核は分葉状を呈して細胞のほぼ中央に位置し，その周りを取り囲んで層板状の粗面小胞体が豊富に存在していた。ミトコンドリアは円形または棒状で，クリスタは一部小管状を示すものも認められたが，多くは棚状を呈する。良く発達したゴルジ体が核の近傍に存在し，しば

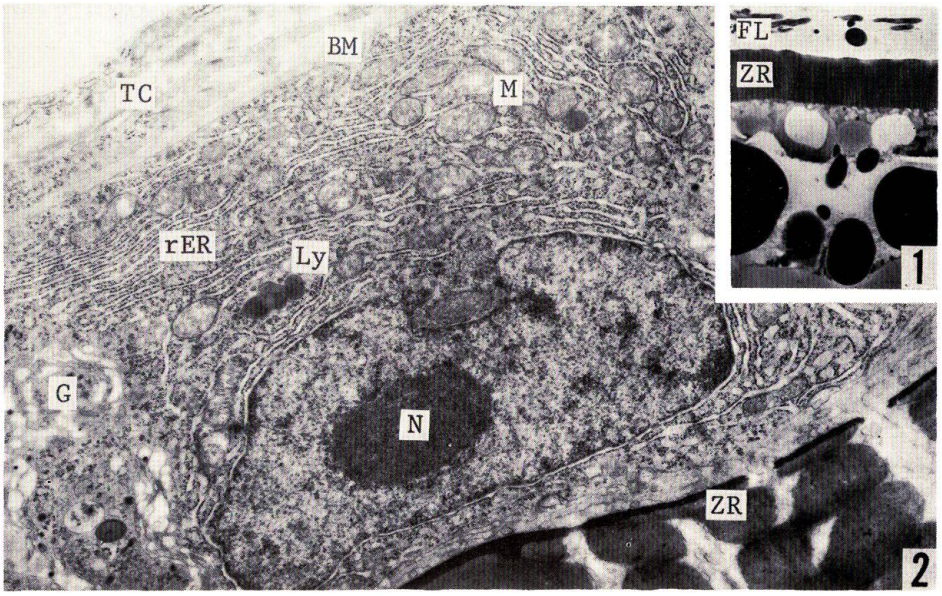


Fig. 1. Light-microscopic figure of Epon section (1 μm) of follicle layers and a peripheral part of oocyte at the early phase of the tertiary yolk stage (immediately after lighting). FL, follicle layers: ZR, zona radiata. Methylene blue stain. ×885.

Fig. 2. Electron micrograph of a granulosa cell at the early phase of the tertiary yolk stage. Note many rough endoplasmic reticulum (rER) and well-developed Golgi apparatus (G). BM, basement membrane: Ly, lysosome-like body: M, mitochondrion: N, nucleus: TC, theca cell: ZR, zona radiata. × 10,000.

しば弓状に配列したゴルジ嚢の一部が拡張していた。ゴルジ体の近辺には，電子密度の高い 85 nm 程度の顆粒も認められた（図2)。このほかに2型のライソゾーム様構造，すなわち電子密度の均一な基質の一部に，さらに電子密度の高い物質を含む小体（a型）と，電子密度のやや低い均一な基質のみから成る小体（b型）が観察された（図3)。

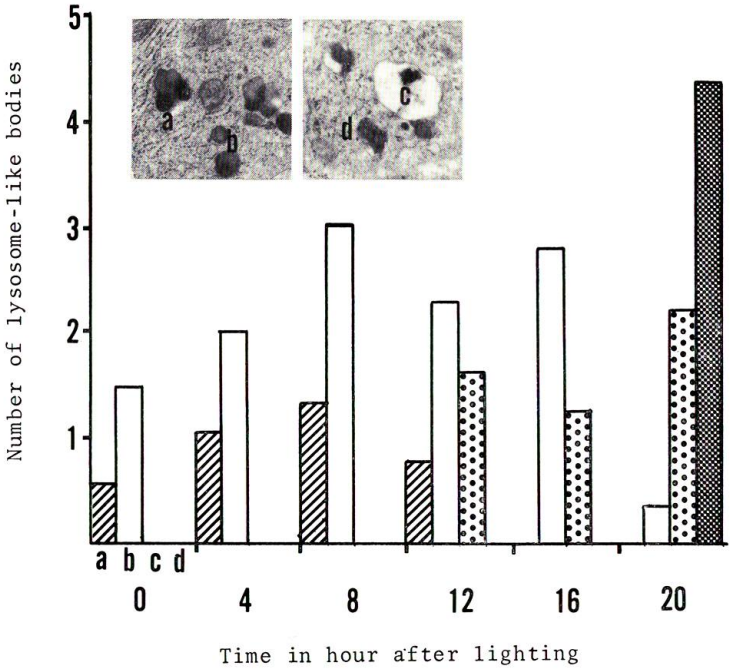
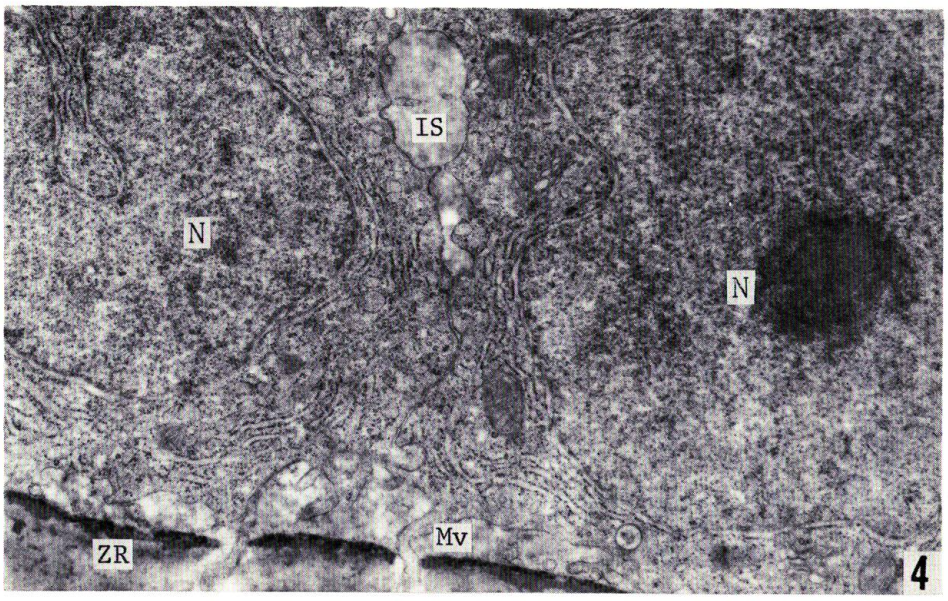
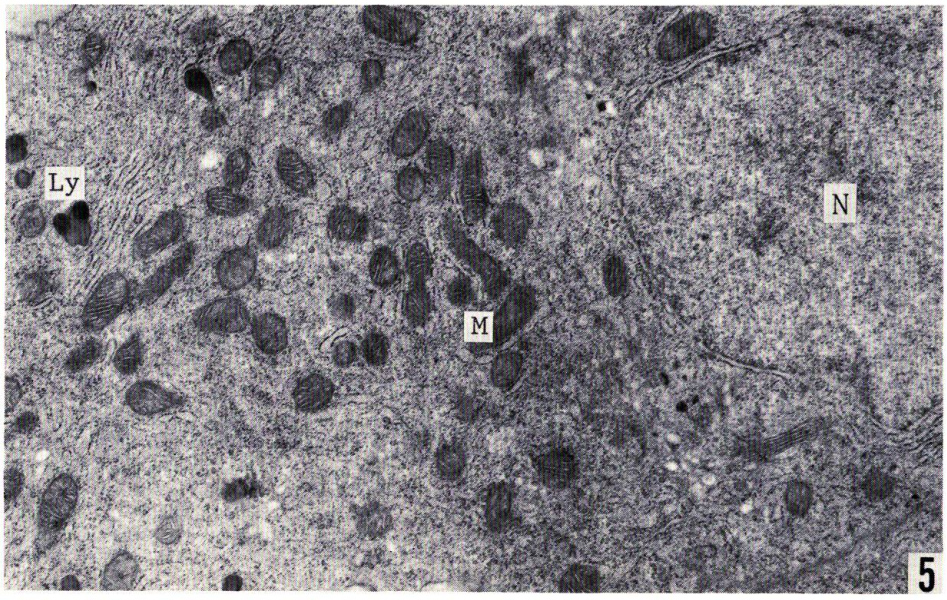


Fig. 3. Changes in the average numbers of lysosome-like bodies per section in the granulosa cell during the course of final maturation. Letter symbols, a, b, c, and d, indicate different types of lysosome-like bodies respectively.

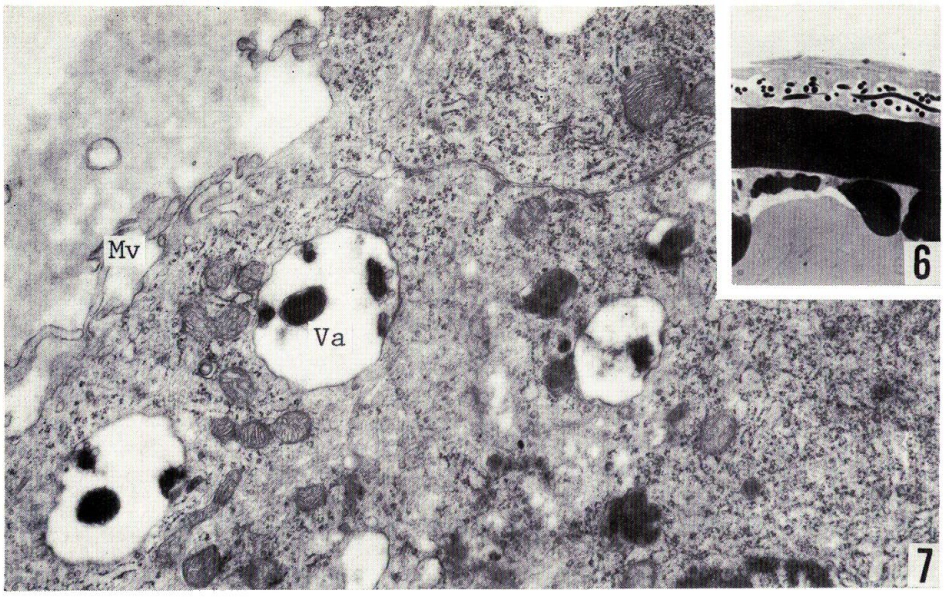
点灯後 12～16 時間: この間に卵母細胞は，卵黄蓄積を完了する第三次卵黄球期の末期から前成熟期に達し，卵径は 900～1000 μm を示す。この時期になると，卵膜と顆粒膜細胞の間の接着が緩み，顆粒膜細胞の細胞間隙も広くなり，これらの間隙は電子密度の低い物質で満たされている（図4)。ミトコンドリアは前の時期に比べて小形化し，楕円形を呈するものが多くなり，クリスタは一般に棚状で発達が悪い。粗面小胞体は層板状の配列を乱して，幾分拡張した小管状または胞状を呈していた(図5)。多くのゴルジ体では，ゴルジ嚢が扁平となり，直線的な配列を示していた。また，前の時期まで見られたa型のライソゾーム様構造が減少し，これに代って内部に電子密度の高い物質を含む空胞状の小体（図3, c型）が認められるようになった。

点灯後 20 時間: 卵母細胞は 1100～1200 μm の卵径を有し，成熟期に達している。この時期になると濾胞細胞層は卵から剝離し，卵膜の管孔も消失している（図6)。電顕的にも顆粒膜細胞は卵膜から完全に剝離していたが，細胞同士は互いに接着斑によって密着していた。しかし，顆粒膜細胞の細胞間隙は前の時期よりもさらに拡張し，またその間隙に存在していた電子密度の低い物質は，ほとんど消失していた（図7)。核は一般に莢膜細胞側に位置するようになる。ミトコンドリアの多くは小管状のクリスタを豊富に有し，大形で円形または楕円形を呈する。ゴルジ体は前の時期と変らず，扁平で





Figs. 4 and 5. Electron micrographs of a portion of a granulosa cell at the late phase of the tertiary yolk stage (12 hours after lighting). Microvilli (Mv) are somewhat withdrawn from zona radiata (ZR) and intercellular space (IS) between granulosa cells is filled with low electron-dense material (Fig. 4). Mitochondria (M) with poor lamellar cristae decreased in size (Fig. 5). G, Golgi apparatus: N, Nucleus: Ly, lysosome-like body. Fig. 4, ×10,500; Fig. 5, ×7,300.



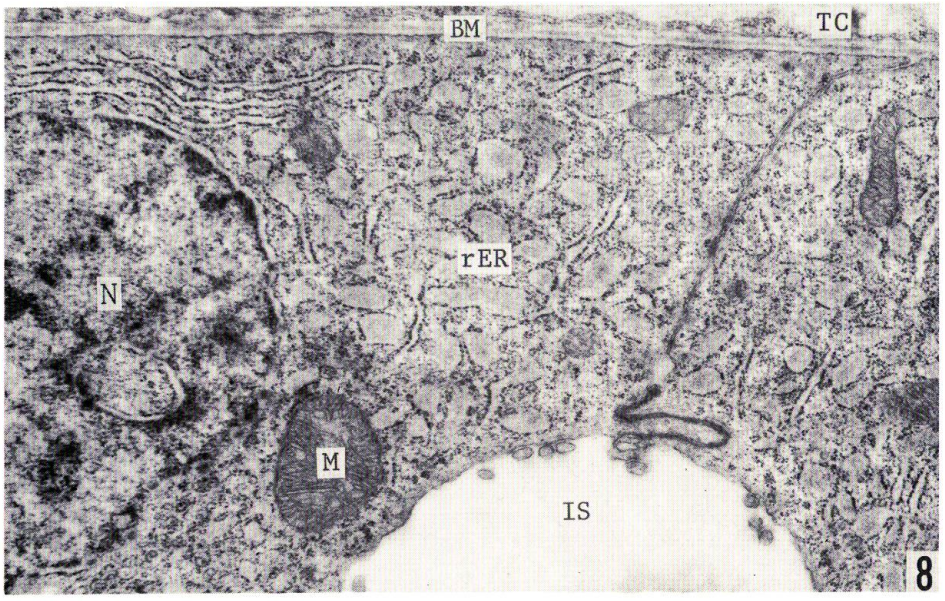
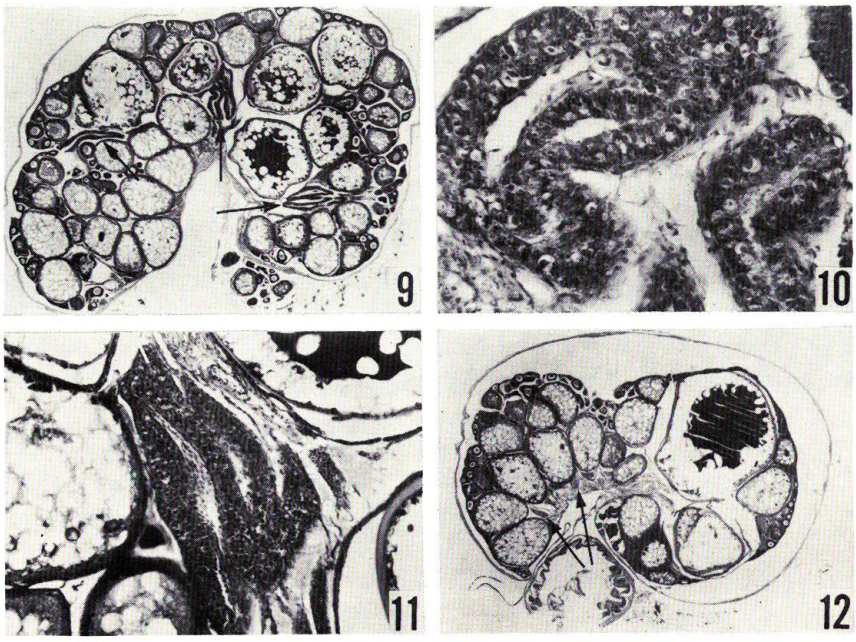


Fig. 6. Light-microscopic figure of Epon section (1 μm) of follicle layers and a peripheral part of oocyte at the maturation stage (20 hours after lighting). Pore canals disappeared from zona radiata. × 885.

Figs. 7 and 8. Electron micrographs of a portion of a granulosa cell at the maturation stage. Microvilli (Mv) are completely withdrawn from zona radiata, and many vacuolated lysosome-like bodies (Va) are seen in the cytoplasm (Fig. 7). Mitochondria (M) with tubular cristae and dilated rough endoplasmic reticulum (rER) filled with low electron-dense material are seen in the cytoplasm. Intercellular space (IS) between granulosa cells becomes markedly wide (Fig. 8). BM, basement membrane: N, nucleus: TC, theca cell. Fig. 7, ×12,500; Fig. 8, ×18,000.

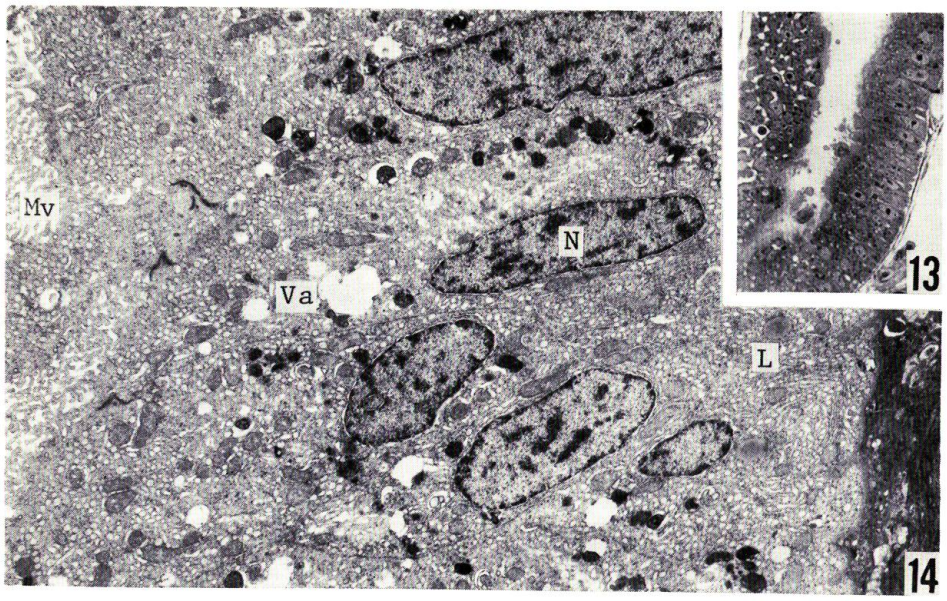
直線的な配列を示すゴルジ嚢から成っていた。また，粗面小胞体は拡張し，その腔内に電子密度の低い物質を満たしていた（図8）。点灯後8時間目まで観察されたa, b型のライソゾーム様構造がさらに減少したのに対し，c型の空胞状小体に加えて，特にこの時期には，電子密度の高い顆粒塊状のライソゾーム様構造（d型）が多数出現した（図3）。



Figs. 9–12. Light-microscopic figures of parts of ovaries after ovulation. Hematoxylin-eosin stain. Fig. 9, the ovary of fish immediately after lighting, containing post-ovulatory follicles (arrows); Fig. 10, post-ovulatory follicle 8 hours after lighting; Fig. 11, post-ovulatory follicle 12 hours after lighting, showing crushed follicular lumen; Fig. 12, degenerated post-ovulatory follicles (arrows) 20 hours after lighting. Figs. 9 and 12, ×50; Fig. 10, ×700; Fig. 11, ×220.

排卵後の顆粒膜細胞

点灯直後（0時間）： 排卵後濾胞は，第三次卵黄球期初期以下の段階にある多くの卵巣卵の間に，卵細胞の排出口を卵巣腔に向けて存在している（図9）。これらの排卵後濾胞は，ほとんどが明瞭な濾胞腔を有していた。顆粒膜細胞は高さ18～25 μm で，排卵前に比べて著しく肥厚し，円柱状もしくは立方状を呈していた（図13）。顆粒膜細胞の遊離面には多数の細胞質突起が認められ，また，細胞はその頂端部付近で接着斑によって互いに結合し，細胞間隙はほとんど消失していた。長楕円形の核が細胞の基底部寄りに位置し，さらにこの部位には，排卵前にほとんど見出せなかった油球も認められた。これらのほかに，排卵前に見られた空胞状の小体やミエリン様構造も存在していた（図14）。リボゾームの付着の少ない拡張した小胞状の粗面小胞体が細胞の大部分を占めているが，周辺細胞質中にはなお層板状の粗面小胞体も観察された。ミトコンドリアは円形もしくは楕円形で，その内槽は電子密度が高く，クリスタは明瞭な小管状を呈していた。ゴルジ体は弓状に配列した扁平なゴルジ嚢から成り，核の付近に位置していた（図15）。



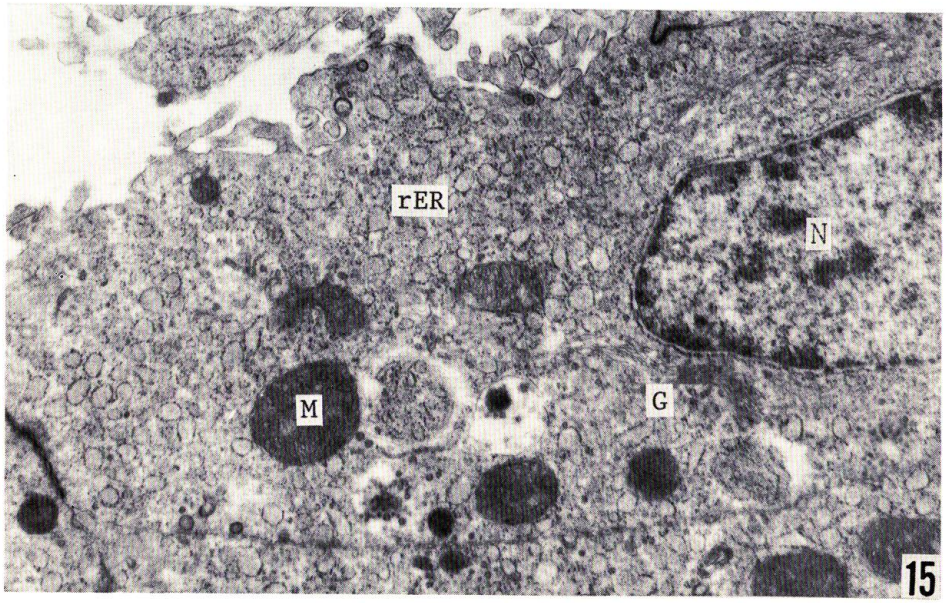
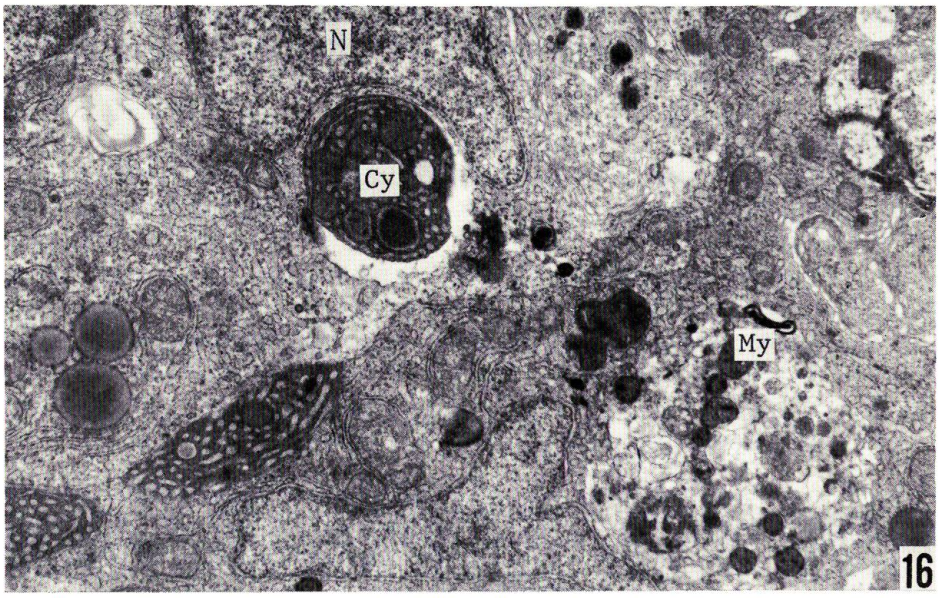


Fig. 13. Light-microscopic figure of Epon section (1 μm) of a part of a post-ovulatory follicle immediately after lighting. Methylene blue stain. × 885.

Fig. 14. Electron micrograph of a portion of a post-ovulatory follicle immediately after lighting. Hypertrophied granulosa cells with numerous microvilli (Mv) contain lipid droplets (L) and many vacuolated lysosome-like bodies (Va) in the cytoplasm. N, nucleus. × 3,300.

Fig. 15. Electron micrograph of a portion of a granulosa cell in the same post-ovulatory follicle as above. Note mitochondria (M) with tubular cristae and dilated rough endoplasmic reticulum (rER). G, Golgi apparatus: N, nucleus. ×12,800.



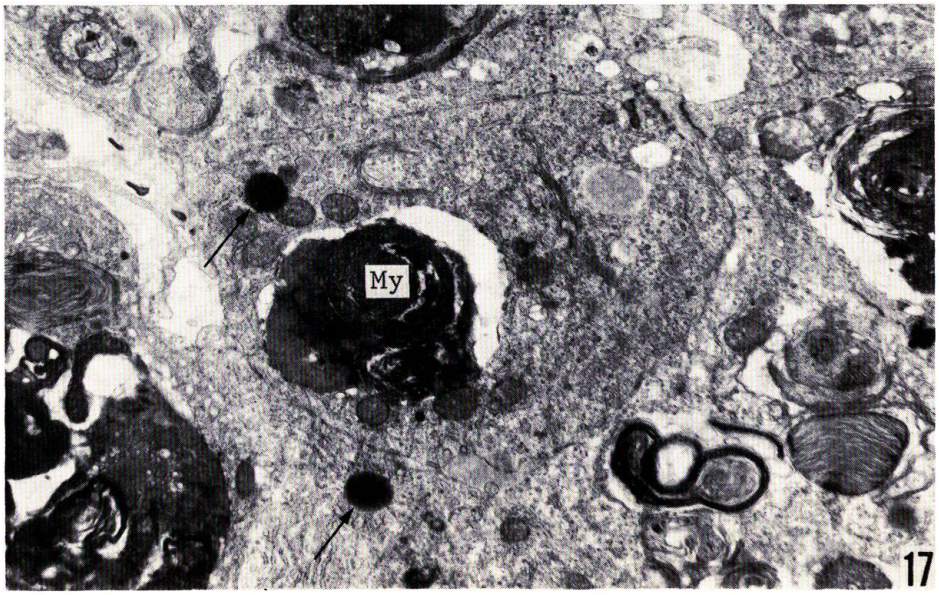


Fig. 16. Electron micrograph of a portion of a granulosa cell of a post-ovulatory follicle 8 hours after lighting. Many cytolysomes (Cy) and myelinated bodies (My) are observed in the cytoplasm. N, nucleus. × 8,000.

Fig. 17. Electron micrograph of a portion of a granulosa cell of a post-ovulatory follicle 12 hours after lighting. Note electron-dense granular materials (arrows) and myelinated bodies (My) in the cytoplasm. ×12,000.

点灯後 4～8 時間: 卵細胞の排出口は既に閉鎖して濾胞腔も潰れ，顆粒膜細胞は不規則に密集した細胞塊をなしている（図 10)。電顕観察によれば，この時期，二重膜によってミトコンドリアやリボゾームをその内側に包む自己貪食液胞 (cytolysome) などのライソゾーム様構造も増加して，細胞退縮が進行していることを示している。一方，拡張した粗面小胞体は少なくなり，これに代って小管状の小胞体が多数認められるようになった（図 16)。

点灯後 12 時間: 排卵後濾胞の多くは卵巣の腹側正中部に集中している。点灯後 8 時間のものと比べてさらに退縮が進み，濾胞腔はほぼ完全に消失していた（図 11)。顆粒膜細胞内でもミエリン様構造がその多くの部分を占めるようになり，退行が著しく進行している様相を呈していた。細胞質の全域にわたって電子密度の高い顆粒様物質が認められた。細胞内小器官はその形態が不明瞭になり，細胞質中に占める割合も減少した（図 17)。

点灯後 16～20 時間: 排卵後濾胞は点灯後 12 時間目と同様，卵巣の腹側正中部に位置しているが，その数は著しく減少し，結合組織との区別が困難になる（図 12)。顆粒膜細胞の大部分はミエリン様構造によって占められるようになり，ミトコンドリアなどの細胞内小器官は著しくその数を減じていた。また，点灯後 12 時間目に見られた電子密度の高い顆粒様物質も減少していた（図 18)。

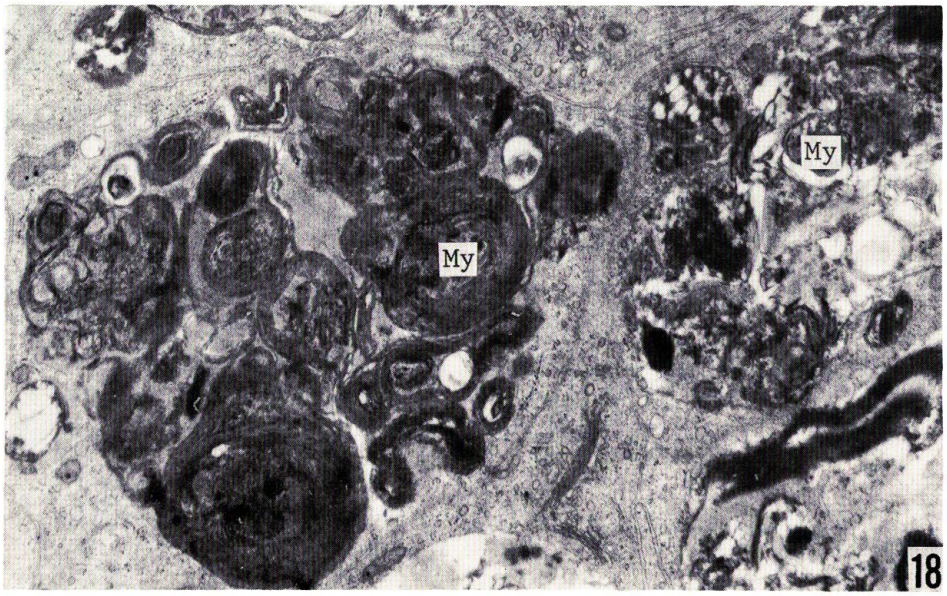


Fig. 18. Electron micrograph of a portion of a granulosa cell of a post-ovulatory follicle 16 hours after lighting. Numerous myelinated bodies (My) are seen in the cytoplasm. × 12,300.

排卵前後における 3β-HSD 活性

排卵前，第三次卵黄球期の初期から成熟期にかけて，卵濾胞の顆粒膜細胞に 3β-HSD 活性が検出された。また，排卵後濾胞の顆粒膜細胞にも 3β-HSD 活性が認められたが，点灯後 8 時間以降はこの活性が検出されなかった。なお，莢膜細胞層には排卵前後を通じてどの時期にも 3β-HSD 活性を見出すことは出来なかった。

考　　察

メダカを人工光周期下，一定水温 (25±1°C) で飼育すると，毎日，点灯時からほぼ1時間以内に産卵するようになり，卵巣卵の発達や排卵もこれに同調して規則的に起こることが知られている[12]。同じような条件下でメダカを飼育した今回の実験においても，卵巣卵が明瞭なリズムを示すことが確かめられた。このようなメダカの卵巣卵の発達，成熟および排卵に伴う卵濾胞，特に顆粒膜細胞の形態的変化を経時的に調べた結果，微細構造的にこの過程が3段階に別けられた。

その第1段階は，点灯後12時間までで，この時期に最も発達した卵群は第3次卵黄球期にあって，活発に卵黄蓄積を行っている。この時期の顆粒膜細胞は豊富な層板状の粗面小胞体，良く発達したゴルジ体を有する。このような細胞内小器官の特徴は，卵巣卵が同様の発達段階にあるメダカ[6]やキンギョ[9]の顆粒膜細胞で報告されているところと似ており，卵黄形成に関連した活発な代謝活性を示唆している。第2段階は点灯後12時間から16時間までで，この間に卵巣卵は第三次卵黄球期の末期から前成熟期に達する。この時期に顆粒膜細胞と卵膜との接着が緩み，その細胞内ではミトコンドリアの小形化，粗面小胞体の小管状または胞状への形態変化，さらにはゴルジ嚢の扁平化が認められる。このような微細構造上の変化は，この時期に卵巣卵が卵黄蓄積を完了することから，顆粒膜細胞の卵黄形成に係わる機能の低下を示しているものと思われる。しかし，この時期にはなお卵径の増大が見られること，および従来の研究結果から，この時期の卵巣卵が水[1]，もしくは有機物質以外の物質[2]の取り込みを行っていること，また少くとも点灯後16時間までは卵成熟のために濾胞細胞層が必要であること[2]，などの事実から，卵黄形成とは別に，この時期の顆粒膜細胞が卵成熟の最終段階において不可欠の，何らかの積極的な役割を果しているものと推察される。第3段階は点灯後20時間前後で，卵膜の管孔の消失，濾胞細胞層の剝離などが起こり，また顆粒膜細胞では，粗面小胞体の著しい拡張，小管状のクリスタを有する大形のミトコンドリアの出現などと共に，空胞状あるいは顆粒状のライソゾーム様構造の出現が注目された。今回と同様の実験条件下で飼育されたメダカでは，点灯の5.5時間前に胚胞の崩壊が始まり[13]，2時間前ごろから排卵が起こる[12]ことから，上記の微細構造的変化は，直接間接に排卵に係わる現象であると解される。

このようなメダカの卵成熟から排卵に至るまでの過程で，顆粒膜細胞の細胞内小器官のうち，特に粗面小胞体，ライソゾームおよびミトコンドリアの変化が注目された。今回の観察では，まず卵黄形成完了時に粗面小胞体はそれまでの層板状の配列を乱し，小管状または小胞状に変化した。この粗面小胞体の形態的変化は，前述のように顆粒膜細胞の卵黄形成に関連した代謝活性状態から，卵成熟の最終段階への機能的変化を示唆するものであろう。その後，排卵直前の点灯後20時間前後には粗面小胞体の顕著な拡張が認められた。これまでも同じメダカで排卵直前に粗面小胞体が典型的な槽状を呈することが知られている[6]が，その意義については十分に明らかにされていない。一方，シクリッド科の *Cichlasoma nigrofasciatum* では，排卵直前に見られる粗面小胞体の拡張が卵の粘着物質の産生と関係しているという[8]。卵が粘性付着毛を有するメダカで，粗面小胞体に同様の変化が観察されたことは興味深いが，本種ではその後この構造に特に著しい変化が見られないことから，その機能的意義についてはなお問題を残している。

排卵前の顆粒膜細胞で，ライソゾーム様構造の変化が観察された（図3）。卵黄形成が活発に行われている点灯直後（0時間）から8時間目までに見られたa，b2型のライソゾーム様構造は，卵黄形成が終了する点灯後12時間から排卵直前にかけて減少し，これに代って空胞状の小体（c型）が明らかにその数を増した。従ってa，b2型のライソゾーム様構造とc型のそれとは何らかの関連を持つものと考えられる。排卵直前の顆粒膜細胞でライソゾーム様構造が急に減少あるいは消失することは，すでにキンギョ[5]やメダカ[1)6]で知られており，それぞれ排卵に直接関与する物質の出現との関連が示唆されている。しかし，これらのライソゾーム様構造が具体的に排卵の機序にどのような係りを持つかについては，本研究でも明らかにすることは出来なかった。また，点灯後20時間目に見られた電

子密度の高い顆粒状のライソゾーム様構造（d 型）は，排卵後に起こる顆粒膜細胞の退縮に関連する構造とも考えられるが，前述の3型のライソゾーム様構造の消長と併せて，その機能的意義については今後の解明が期される。また，これらのライソゾーム様構造の変化と同時に，卵黄形成の終了時から排卵時にかけて，ミトコンドリアにも顕著な形態的変化が認められた。排卵前に起こるこのようなミトコンドリアの変化については，これまで知られておらず，その意義は不明である。

今回の観察では，排卵が近付くに従って顆粒膜細胞の細胞間隙が拡張し，卵黄形成終了時にこれらの細胞間隙を満たしていた電子密度の低い物質が，排卵直前にはほとんど消失していた。このように排卵前に細胞間隙が拡張する事実は，すでにメダカ[6)7)]やキンギョ[5)]でも報告されている。Yamamoto と Yamazaki[5)] はキンギョでこれらの細胞間隙に在る濾胞液の吸水が濾胞破裂の引金になると推察している。また，Pendergrass と Schroeder[7)] は同じメダカで莢膜細胞中の microfilament の収縮が排卵に重要な働きをしていることを示唆しており，一方ドジョウでは排卵の過程に蛋白分解酵素が重要な役割を果しているという[14)]。このように排卵現象には多くの物理，化学的要因が関与していることは明らかであるが，この過程を十分に説明するにはなお多くの知見が必要である。

一般に卵生硬骨魚の卵濾胞は，排卵後急速に退行し吸収されると考えられているが，これまでこの吸収過程を経時的に詳しく観察した報告はほとんどない。メダカの顆粒膜細胞は産卵後4～8時間経つと不規則な細胞塊をなし，細胞内には自己貪食液胞などライソゾーム様構造の増加が認められ，この時すでに細胞退縮が進行していることを示している。その後，排卵後濾胞が卵巣の腹側正中部へ移動するとともにこれらの細胞は急速に退縮し，16～20時間には著しくその数を減じる。一方，莢膜細胞は排卵後の時間経過とともに卵巣の結合組織と区別が困難になるが，これらの細胞が顆粒膜細胞と同様に退縮し吸収されるかどうかは不明である。いずれにせよ，排卵後濾胞の顆粒膜細胞が退縮，減少し，莢膜細胞の識別が難しくなった時点を本種の排卵後濾胞の消滅時期とすれば，それは点灯後16～20時間，排卵後少くとも24時間以内である。

排卵前後のメダカ卵濾胞における 3β-HSD 活性の所在を調べたところ，まず排卵前の顆粒膜細胞に弱いながら明瞭な活性が認められた。しかしこれらの細胞には，微細構造的にステロイド産生細胞の一般的特徴とされる豊富な滑面小胞体，小管状のクリスタを有するミトコンドリア，油球などの存在は必ずしも認められず，むしろ形態的には 3β-HSD 活性が見出されないキンギョ[9)]の同段階の顆粒膜細胞に類似している。ゼブラフィッシュ[15)]やキンギョ[9)]では，莢膜細胞のうちの特殊な細胞が酵素組織化学的にも，微細構造的にもステロイド産生細胞であることが知られている。これに対して顆粒膜細胞に 3β-HSD 活性が見出されることは，これまでもいくつかの魚種で報告されている[16~18)]にもかかわらず，これを裏付ける微細構造的な知見は極めて少ない。このような 3β-HSD 活性を有する顆粒膜細胞がステロイド産生細胞であることを裏付けるためには，電顕的な酵素組織化学的手法などを用いた，多くの魚種での比較検討が必要であろう。

今回観察したメダカでは，排卵後の顆粒膜細胞でも排卵前と同様に明瞭な 3β-HSD 活性が認められた。これまでも多くの魚種で排卵後の顆粒膜細胞に 3β-HSD 活性が見出されており[9)19~21)]，排卵後濾胞でステロイドの生合成が行われている可能性が示されている。メダカの排卵後の顆粒膜細胞は，排卵前に比べて，小管状のクリスタを有するミトコンドリアに加えてリボゾームの付着の少ない小胞体が増え，新たに油球が出現するなど，ステロイド産生細胞様の特徴を見せる。しかし，一方ではライソゾーム様構造も急速にその数を増して退縮的な傾向を強め，点灯後8時間には 3β-HSD の反応を見せなくなる。従って本種の排卵後の顆粒膜細胞がステロイドを産生しているとしても，その期間は極めて短い。

Lam ら[22)]はトゲウオ科の *Gasterosteus aculeatus* L., form *trachurus* で，排卵後黄体がステロイドを産生分泌し，これが卵巣上皮からの液分泌を促すことによって，卵巣腔中の卵の維持に働いていると考えている。さらに彼らは，これまでに得られている知見から排卵後黄体と生殖行動との関係に

ついて論じ，ゼブラフィッシュやキンギョなど生殖行動が比較的単純なものではステロイド産生活性の期間が短かく，これに対して生殖行動が複雑な *Cichlasoma nigrofasciatum* やギンザケではその期間が長いという。しかし，これらのステロイドが，特に雌魚において果している具体的な役割については，なお明らかにされておらず，排卵後濾胞におけるステロイド生合成機能そのものの検討と併せて，さらに研究を要する興味深い問題である。

要　　約

人工的な長日光周期下，一定水温 (25±1°C) で飼育され，毎日，点灯直後に規則的に産卵しているメダカを用い，排卵前および排卵後の卵濾胞，特に顆粒膜細胞の形態的変化を光顕，電顕的に観察し，同時に Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) 活性の酵素組織化学的な検索を行って，以下の結果を得た。

1. 活発な卵黄蓄積が行われている第三次卵黄球期（点灯後12時間まで）に，顆粒膜細胞は豊富な層板状の粗面小胞体，良く発達したゴルジ体を有していた。卵黄形成終了時の第三次卵黄球期末期から前成熟期（点灯後12～16時間）にかけて，粗面小胞体の小管状または胞状への形態的変化，ミトコンドリアの小形化，ゴルジ嚢の扁平化が観察された。さらに卵巣卵が成熟期（点灯後20時間）に達すると，すでに卵膜から剝離した顆粒膜細胞では粗面小胞体の拡張が起こり，小管状のクリスタを有する大形のミトコンドリアが出現した。この卵成熟から排卵に至る過程で，顕著なライソゾーム様構造の消長が観察された。

2. 排卵後濾胞は，点灯後4～8時間で濾胞腔が潰れ，顆粒膜細胞は不規則な細胞塊をなした。この時すでにその細胞質には自己貪食液胞やミエリン様構造が出現していた。その後，経時的にミエリン様構造が増えて細胞質のほとんどを占めるようになり，細胞は急速に退縮した。排卵後濾胞の消滅時期は点灯後16～20時間，すなわち排卵後少くとも24時間以内であった。

3. 排卵前後を通して，3β-HSD 活性は顆粒膜細胞にのみ検出された。排卵後濾胞におけるこの酵素活性は，点灯後8時間で消失した。また，この排卵前後を通して 3β-HSD 活性を示した顆粒膜細胞のすべてに共通した，明瞭な電顕的特徴を見出すことは出来なかった。

文　　献

1) 広瀬慶二 (1973). 魚類の排卵の内分泌支配. 東海水研報 **74**, 67–81.
2) 山内晧平 (1974). メダカ卵の胚胞崩壊に対する濾胞細胞層の効果. 北大水産彙報 **24**, 145–149.
3) Iwamatsu, T. (1974). Studies on oocyte maturation of the medaka, *Oryzias latipes*. II. Effects of several steroids and calcium ions and the role of follicle cells on *in vitro* maturation. *Annot. Zool. Japon.* **47**, 30–42.
4) Jalabert, B. (1976). In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Carassius auratus*). *J. Fish. Res. Board Can.* **33**, 974–988.
5) Yamamoto, K. and Yamazaki, F. (1967). Hormonal control of ovulation and spermiation in goldfish. *Gunma Symp. Endocr.* **4**, 131–145.
6) Hirose, K. (1972). The ultrastructure of the ovarian follicle of medaka, *Oryzias latipes*. *Z. Zellforsch.* **123**, 316–329.
7) Pendergrass, P. and Schroeder, P. (1976). The ultrastructure of the thecal cell of the teleost, *Oryzias latipes*, during ovulation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **47**, 229–233.
8) Nicholls, T. J. and Maple, G. (1972). Ultrastructural observations on possible sites of steroid biosynthesis in the ovarian follicular epithelium of two species of cichlid fish, *Cichlasoma nigrofasciatum* and *Haplochromis multicolor*. *Z. Zellforsch.* **128**, 317–335.

9) Nagahama, Y., Chan, K. and Hoar, W. S. (1976). Histochemistry and ultrastructure of pre- and post-ovulatory follicles in the ovary of the goldfish, *Carassius auratus*. *Can. J. Zool.* **54**, 1128–1139.

10) Takikawa, H. and Matsuzawa, T. (1967). Simplified procedure for the histochemical demonstration of dehydrogenase activity in rat ovaries. *Endocrinol. Japon.* **14**, 276–278.

11) Rubin, B. L., Deane, H. W. and Hamilton, J. A. (1963). Biochemical and histochemical studies on Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the adrenal glands and ovaries of diverse mammals. *Endocrinology* **73**, 748–763.

12) 高野和則・春日清一・佐藤 茂 (1974). 人工光周期下におけるメダカの生殖日周期. 北大水産彙報 **24**, 91–99.

13) Yamauchi, K. and Yamamoto, K. (1973). *In vitro* maturation of the oocyte in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.* **46**, 144–153.

14) Oshiro, T. and Hibiya, T. (1975). Presence of ovulation-inducing enzymes in the ovarian follicles of loach. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **41**, 115.

15) Yamamoto, K. and Onozato, H. (1968). Steroid-producing cells in the ovary of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Annot. Zool. Japon.* **41**, 119–128.

16) Lambert, J. G. D. (1970). The ovary of guppy, *Poecilia reticulata*. The granulosa cells as sites of steroid biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **15**, 464–476.

17) Livni, N. (1971). Ovarian histochemistry of the fishes *Cyprinus carpio*, *Mugil capito* and *Tilapia aurea* (Teleostei). *Histochem. J.* **3**, 405–414.

18) Bara, G. (1974). Location of steroid hormone production in the ovary of *Trachurus mediterraneus*. *Acta Histochem.* **51**, 90–101.

19) ——— (1965). Histochemical localization of Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the ovaries of a teleost fish, *Scomber scomber* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **5**, 284–296.

20) Iwasaki, Y. (1973). Histochemical detection of Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase in the ovary of medaka, *Oryzias latipes*, during annual reproductive cycle. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **23**, 177–184.

21) Lambert, J. G. D. and van Oordt, P. G. W. J. (1974). Ovarium hormones in teleosts. *Fortschr. Zool.* **22**, 340–349.

22) Lam, T. J., Nagahama, Y., Chan, K. and Hoar, W. S. (1978). Overripe eggs and postovulatory corpora lutea in the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., form *trachurus*. *Can. J. Zool.* **56**, 2029–2036.