



Title	メダカ卵の胚崩壊に対する濾胞細胞層の効果
Author(s)	山内, 皓平; YAMAUCHI, Kouhei
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 24(4), 145-149
Issue Date	1974-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23499
Type	departmental bulletin paper
File Information	24(4)_P145-149.pdf



メダカ卵の胚胞崩壊に対する濾胞細胞層の効果

山内 皓平*

The Effects of the Follicle Layers on the Germinal
Vesicle Breakdown in the Medaka Oocytes

Kouhei YAMAUCHI*

Abstract

In order to determine the effects of the follicle layers on their germinal vesicle breakdown, oocytes of Medaka, *Oryzias latipes*, were taken out from the fish reared under artificial photoperiod, and were maintained in *in vitro* condition.

In the case of medium 199 incubation, the oocytes obtained from the fish at 14 to 7 hours before lighting revealed a germinal vesicle breakdown at the rate of 100%. At the incubation in Ringer's solution, the oocytes obtained before 10 and 9 hours of lighting showed a germinal vesicle breakdown of 94 and 100%, respectively. On the other hand, the oocytes with removed follicle layers and put in medium 199 or Ringer's solution, exhibited no germinal vesicle breakdown by 10 hours before lighting but all oocytes obtained at 8 hours before lighting displayed a germinal vesicle breakdown.

The egg diameter of the oocytes obtained from the fish at 16 hours before lighting were incubated in various culture media. The oocytes which were maintained in the medium 199 or Earle's solution for 24 hours increased their diameter, measuring about 1.3 or 1.2 mm, respectively, and they showed maturation, whereas, in the case of Ringer's solution the oocytes remained unchanged in diameter.

緒 言

一般に魚類では卵黄形成を終了した卵母細胞は胚胞の崩壊を起して成熟を終え、排卵される。魚類におけるこれら一連の卵成熟の過程を生体外で誘起する試みは、古くはドジョウを用いて川村・元永¹⁾、灘光²⁾によってなされており、近年では Sundararaj & Goswami³⁾らは catfish の卵巣卵を用い、また広瀬⁴⁾はメダカの卵巣卵を用いて行っている。その結果から彼らは生体外での卵成熟或いは排卵の誘起には脳下垂体系ホルモンやステロイドホルモンが有効であると報じている。

著者らもメダカ卵の成熟の過程を研究し、リングル液中に保持したものでは胚胞の崩壊の始まる4.5時間前、また199液に保持したものでは8.5時間前に既に卵巣卵に成熟の慣性が生じそれ以後は脳下垂体系ホルモンが必要でない事を明らかにした⁵⁾⁶⁾が、本研究は濾胞細胞層が卵の成熟にどのような役割を演じているかを知る目的で行われた。

本文に入るに先立って、本研究について終始御懇篤なる御指導を賜わった北海道大学水産学部、山本喜一郎教授に厚く御礼申し上げる。

* 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)

材料および方法

一定の発達した卵巣卵を得るために、函館市郊外で捕らえられた野生メダカを14時間明期、10時間暗期の人工光周期に設置した実験室内の水温25°Cの水槽中で飼育した。本実験に用いた卵巣卵は点灯後30分以内に毎日規則的に産卵した個体から得た(詳細はYamauchi & Yamamoto⁶⁾を参照)。

卵巣卵の生体外維持には時計皿法を採用し、培養液には魚類用リンゲル液⁷⁾、20%仔牛血清を含んだ199液、それにアール液(NaCl 6.80 g/l, KCl 0.40 g/l, CaCl₂ 0.20 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.20 g/l, NaH₂PO₄·H₂O 0.14 g/l, NaHCO₃ 2.20 g/l, Glucose 1.00 g/l)を用いた。これらの溶液中で維持された卵巣卵は25°Cの恒温室中に24時間保持された後、成熟の有無が観察された。卵濾胞細胞の剝離はあらかじめ1%のトリプシン溶液に浸漬後ピンセットを用いて行った。

結 果

卵母細胞の生体外維持

卵巣卵を点灯前14時間から7時間迄の各時間に無菌的に剔出し、一部は合成培地199液と魚類用リンゲル液に移した。他のものは1%トリプシン液に5分間浸漬した後リンゲル液に移して洗滌し、それらの濾胞細胞層を人為的に剝離した後、上記の各液に移し維持した。上記の卵巣卵は生体外維持開始後24時間目に取り出し、胚胞の崩壊と排卵を観察した。Table 1にその結果を示した。

199液中に維持された卵母細胞は点灯前14時間から7時間の間に採取された全ての実験卵で100%の胚胞の崩壊を示し、またあるものは排卵していた。これらのうち50%以上の排卵率を示したものは点灯前14時間、10時間、7時間に199液維持を開始した卵であり、14時間のものは90%、7時間のそれは100%の高率を示した。これに反し、点灯前8時間に維持されたものは11%の排卵率をなし、11時間のものは全く排卵しなかった。以上のように生体外に維持された卵の排卵率は必ずしも維持開始時間と正比例せず、早く体外に取り出した卵巣卵でも高い排卵率を示すものがあったし、また遅く体外に取り出したものでも低い排卵率を示すものが見られた。しかし胚胞の崩壊は起したが排卵しなかった卵はピンセットで人為的に濾胞細胞層を剝離し、媒精すると非常に高い率で受精した。この結果、受精卵数は点灯前9時間のものを除いて全て排卵数より多かった。点灯前11時間のものは全く排卵しなかったが、濾胞細胞層を除去すると胚胞の崩壊をした卵の87%が受精した。このことは生体外で維持された卵母細胞は胚胞の崩壊をしたものでは濾胞内で既に受精可能な状態に達している事を示している。一方、リンゲル液中に維持された卵母細胞は点灯前13時間までは全く胚胞の崩壊を示さないが点灯前12時間、11時間ではそれぞれ13%、86%が胚胞崩壊を示し、更に10時間で94%、9時間では100%の卵母細胞は胚胞の崩壊を示した。しかしながら、これらの内で排卵したのは点灯前8時間、7時間のもので少数認められた。それらの卵を199液のそれと同様にして濾胞細胞を除去し媒精したが、受精率は199維持の場合より遙かに悪かった。

濾胞細胞層を剝離され、199液或いはリンゲル液の何れかの液中で維持された卵母細胞は点灯前10時間のものまで両者の液の何れのものも全く胚胞の崩壊を示さなかった。しかし点灯前9時間のものでは199液で41%、リンゲル液で33%の胚胞崩壊率を示した。そして点灯前8時間、7時間では両者とも100%胚胞は崩壊したが、これらの卵の中には自然付活されて卵膜扛挙していた卵が多数見られた。そして、その受精率は余り良くなかった。

生体外で維持された卵母細胞の卵径の変化

上記のように、点灯前13時間或いは14時間に199液中に維持された卵母細胞は成熟するがリンゲル液中のそれは成熟しない。卵母細胞がこの二つの溶液中で起す生理的变化を知る一つの手掛りとして、点灯前16時間に種々の溶液中で維持された卵母細胞の卵径を経時的に測定した。培養液には199液、

山内: 卵成熟に対する濾胞細胞層の効果

Table 1. Results of incubation of oocytes with an intact follicle layer and of oocytes without a follicle layer (W-) in the medium 199 or in fish Ringer's solution.

Time at start (Hours before lighting)	Medium	No. of oocytes incubated	No. of oocytes survived	No. of oocytes showing GVBD (%)	No. of oocytes ovulated (%)	No. of oocytes fertilized (%)	No. of fry obtained
14 hrs	199	12	10	10(100)	9(90)	10(100)	2
	Ringer	10	9	0	-	-	-
	W-199	11	10	0	-	-	-
	W-Ringer	9	9	0	-	-	-
13 hrs	199	22	22	22(100)	8(36)	20(91)	1
	Ringer	23	23	0	-	-	-
	W-199	25	25	0	-	-	-
	W-Ringer	32	17	0	-	-	-
12 hrs	199	14	12	12(100)	4(33)	8(67)	0
	Ringer	16	15	2(13)	0	1(50)	0
	W-199	11	8	0	-	-	-
	W-Ringer	12	12	0	-	-	-
11 hrs	199	16	15	15(100)	0	13(87)	1
	Ringer	17	14	12(86)	0	6(50)	0
	W-199	12	8	0	-	-	-
	W-Ringer	9	7	0	-	-	-
10 hrs	199	15	14	14(100)	7(50)	11(79)	3
	Ringer	17	16	15(94)	0	4(27)	0
	W-199	9	9	0	-	-	-
	W-Ringer	8	8	0	-	-	-
9 hrs	199	13	11	11(100)	11(100)	9(82)	5
	Ringer	19	14	14(100)	0	0	-
	W-199	17	17	7(41)	-	0	-
	W-Ringer	12	12	4(33)	-	0	-
8 hrs	199	20	19	19(100)	2(11)	8(42)	2
	Ringer	22	20	20(100)	1(5)	4(20)	0
	W-199	17	9(7)*	9(100)	-	0	-
	W-Ringer	15	13	13(100)	-	5(38)	0
7 hrs	199	19	15	15(100)	9(60)	10(67)	1
	Ringer	22	20	20(100)	2(10)	4(20)	0
	W-199	26	11(15)	11(100)	-	1(9)	0
	W-Ringer	20	15(3)	15(100)	-	4(27)	0

*: These oocytes activated during incubation.

199 液の基本液であるアール液, それにリングル液の三種類用いた。それらの結果は Table 2 に示した。

リングル液中で維持された卵母細胞は維持開始時に 1.09 mm の大きさであったが, 24 時間後にもその卵径は殆んど変わらず 1.10 mm であった。他方, 199 液中のそれは維持開始時に 1.11 mm であったものが漸次卵径を増大し, 18 時間後には 1.23 mm にまで達したがその後は変化しなかった。アール液中でも卵母細胞の卵径は維持開始時の 1.10 mm から 18 時間後 1.21 mm に達し, 24 時間後には 1.22 mm にまで増大した。199 液及びアール液中に維持された卵母細胞の示す 1.22~1.23mm は魚体

Table 2. Changes in the diameter of oocytes obtained from fish at 16 hours before lighting after incubation in various culture media.

Medium	Oocyte diameter (mm)				
	Hours after incubation				
	0	6	12	16	24
199	1.10	1.18	1.20	1.23	1.23
Earle	1.09	1.14	1.18	1.21	1.22
Ringer	1.09	1.08	1.10	1.10	1.10

内で自然排卵された卵と殆んど変りない大きさであった。199液、アール液中で維持された卵は100%の胚胞崩壊を起し、それらのあるものは排卵した。これらの卵をTable 1に示した実験と同様にして媒精すると高い率で受精した。

考 察

濾胞細胞層を有する卵母細胞が点灯前14時間から7時間までの各時間に199液に入れられて維持されると全ての時間で100%の胚胞崩壊を起した。しかし濾胞細胞層を剝離した卵母細胞を199液或いはリングル液中で維持すると点灯前10時間以前では全く胚胞の崩壊を示さない。そして点灯前9時間では各々41%, 33%の崩壊を示し、8時間では両者の液のものとも100%の崩壊を示した。従って濾胞細胞層は卵成熟に何らかの役割を演じているものと思われる。この濾胞細胞層の役割について、広瀬³⁾はメダカ卵でサケのゴナドトロピンとコルチゾールは濾胞細胞層を有する卵母細胞の排卵の誘起に有効であるが、濾胞細胞層を剝離された卵には有効ではなかったことから濾胞細胞層はそれらのホルモンが排卵に有効に働くために必要であると述べている。点灯前8時間以後は濾胞細胞層を剝離した卵でも199液およびリングル液中で100%の胚胞の崩壊が起った。従って点灯前8時間(胚胞崩壊の2.5時間前)以後はメダカの卵母細胞は濾胞細胞層の影響を受けなくとも卵自身で成熟を遂行できる慣性をもつことが推察される。

199液およびアール液中に維持された卵母細胞はTable 2に見られる様に卵径を増大し、且つ胚胞が崩壊し、その多くのは受精可能であった。これに反しリングル液に維持した卵は卵径の増大が見られず胚胞の崩壊も認められなかった。従ってこの際の卵径の増大は卵の成熟と深い関係があるものと推察される。この卵径の増大は卵が培養液中から卵内へ何か物質を取り込んでいるためと思われる。無機塩類と少量のグルコースから作られているアール液中で維持された卵母細胞がアミノ酸、核酸誘導体、ビタミンや仔牛血清などの栄養類を含んでいる199液のものと同様にその卵径を増大したことは卵母細胞が卵内へ取り込んでいる物質は殆んど有機物以外のものである可能性が考えられるが、広瀬⁴⁾は排卵前のメダカ卵の卵径の増大は吸水による事を示唆している。生体外で維持された卵母細胞の卵径の増大にはリングル液よりも同じ無機塩溶液であるアール液の方が良好であった。岩松⁵⁾は胚胞崩壊前に取り出したメダカ卵の成熟に有効であるとした塩類溶液の組成はリングル液と類似しており、リングル液とはNaCl, KClおよびCaCl₂の含量が異なる。今回はこの両液の卵母細胞の維持に対する適、不適は両液の浸透圧の相違によるか、また含有塩の作用の相違によるか明らかに出来なかったが、今後解明を要する重要問題と考える。

要 約

人工光周期下で飼育して卵巣卵の発達を制御したメダカから点灯前16時間から7時間までの各時間に剔出した卵母細胞を種々の培養液中で生体外維持し、次の結果を得た。

山内： 卵成熟に対する濾胞細胞層の効果

1. 199 液中に維持された濾胞細胞層を有する卵母細胞は行われた全ての時間で 100% の胚胞の崩壊を示した。リングル液のものは点灯前 13 時間のものまで全く胚胞の崩壊を示さないが、点灯前 10 時間、9 時間で各々 94%、100% のそれを示した。
2. 濾胞細胞層を剝離した卵母細胞の生体外維持では 199 液、リングル液とも点灯前 10 時間のものまで胚胞の崩壊を全く起さないが、8 時間以後のものでは 100% の卵が胚胞の崩壊を示した。
3. 点灯前 16 時間には生体外に維持された卵母細胞はリングル液中では殆んどその卵径を変えないが、199 液およびアール液中では卵径 1.11~1.09 mm のものが各々 1.23~1.22 mm にまで増大し、それらの全ての卵が胚胞の崩壊を起した。

References

- 1) 川村智治郎・元永妙子 (1950). シマドジョウの人工排卵について. 魚類学雑誌 1, 1-7.
- 2) Nadamitsu, S. (1961). Studies on *in vitro* ovulation in vertebrates III. *In vitro* ovulation in the fish. *J. Sci. Hiroshima Univ.* 2, 1-10.
- 3) Sundararaj, B.I. and Goswami, S.V. (1971). Effects of deoxycorticosterone and hydrocortisone singly and various combinations on *in vitro* maturation of oocytes of the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Gen. Comp. Endocrinol.* 17, 570-573.
- 4) 広瀬慶二 (1973). 魚類の排卵の内分泌支配. 東海水研報 74, 67-81.
- 5) 山内皓平・山本喜一郎 (1972). 生体外で維持されたメダカ卵の胚胞崩壊に対する濾胞細胞層の効果. 動物学雑誌 81, 283-284.
- 6) Yamauchi, K. and Yamamoto, K. (1973). *In vitro* maturation of the oocytes in the medaka, *Oryzias latipes*. *Annot. Zool. Japon.* 46, 144-153.
- 7) Yamamoto, T. (1939). Changes of the cortical layer of the egg of *Oryzias latipes* at the time of fertilization. *Proc. Imp. Acad. Tokyo.* 15, 269-271.
- 8) Hirose, K. (1972). Biological study on ovulation *in vitro* of fish-V. Induction of *in vitro* ovulation in *Oryzias latipes* oocytes removed from their follicular tissues. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 38, 1091-1096.
- 9) 岩松鷹司. メダカ卵母細胞の培養液の改良. 魚類学雑誌(投稿中).