



Title	エゾメバル雌特異血清蛋白の免疫学的検索
Author(s)	原, 彰彦; HARA, Akihiko; 竹村, 明洋 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 37(2), 101-110
Issue Date	1986-05
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/23911">https://hdl.handle.net/2115/23911</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	37(2)_P101-110.pdf



エゾメバル雌特異血清蛋白の免疫学的検索\*

原 彰彦\*\*・竹村明洋\*\*\*  
松原孝博\*\*\*・高野和則\*\*\*

**Immunochemical Identification of Female-specific Serum Proteins  
in a Viviparous Fish, the White-edged Rockfish (*Sebastes  
taczanowskii*), during Vitellogenesis and Pregnancy,  
and after Estrogen Treatment\***

Akihiko HARA\*\*, Akihiro TAKEMURA\*\*\*, Takahiro MATSUBARA\*\*\*  
and Kazunori TAKANO\*\*\*

**Abstract**

Female-specific serum proteins were identified in the serum obtained from viviparous white-edged rockfish, *Sebastes taczanowskii* by immunoelectrophoresis.

Four female-specific serum proteins were found by precipitin reaction in the serum of vitellogenic and pregnant females, using antiserum against mature female serum absorbed with male serum. On the other hand, five female-specific serum proteins were detected in the same serum tested by antiserum against egg extract absorbed with male serum. Moreover, some of these multiple female-specific serum proteins, varying in number from one to three in different individuals, occurred in the serum of immature females which had ovaries containing oocytes at the oil drop stage. In the serum of estrogen-treated males, multiple female-specific serum proteins similar to those of vitellogenic females were induced to appear 3 days after injection. Based on the identification of iron-binding capacity, at least one of the female-specific serum proteins was defined to be the vitellogenin of this species.

これまで多くの魚類で、成熟に伴って血中に出現する雌特異蛋白 (female-specific serum protein (s), vitellogenin) について報告されている (Wallace, 1978; Wallace & Selman, 1981; Wiegand, 1982)が、海産魚、特に胎生魚における知見は比較的少ない (Korsgaard & Petersen, 1979; Korsgaard, 1982, 1983; de Vlaming *et al.*, 1983)。

現存の硬骨魚類およそ 18,000 種のうち、14 科 510 種が胎生魚であり、特にフサカサゴ科 Scorpaenidae には 110 種と、最も多くの胎生種が集中して見られる (Wourms, 1981)。この科の胎生魚は一般に胎仔の数が多く、また胎仔には特別な栄養吸収器官の発達が見られず、専ら卵黄に依存して発生する、比較的胎生の特化のレベルが低いグループとみなされている。

\* 北海道大学水産学部白尻水産実験所業績第 40 号 (Contribution No. 40 from the Usujiri Fisheries Laboratory, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

\*\* 養殖研究所栄養代謝部代謝研究室 (Fish Nutrition Division, National Research Institute of Aquaculture)

\*\*\* 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)

エゾメバル *Sebastes taczanowskii* は北海道沿岸に生息するフサカサゴ科の胎生魚である。この研究では本種の生殖の生理学的特性を明らかにする目的で、雌特異血清蛋白の免疫学的検索を行うと共に、成熟過程と妊娠期に見られるこの蛋白の性状についても基礎的な検討を行った。またエストロゲン処理によって血中に誘導された雌特異蛋白についても観察したので、併せてその結果を報告する。

## 材 料 と 方 法

**材料** 実験に用いたエゾメバル *Sebastes taczanowskii* は、函館近郊の白尻沿岸で釣獲した未熟、成熟開始、卵黄形成、妊娠の各期の個体で、これらの体長は 10.9-23.5 cm, 体重は 18-258 g の範囲にあった。

採血は尾柄部切断または注射針を用いて尾静脈から行った。血液は室温で 30 分放置後、3,000 rpm, 15 分間遠心して血清を分離した。血清は使用時まで -40°C で保存した。また、卵黄蛋白の抽出液を得るため、卵黄形成期の雌から卵巣の一部を摘出し、同様に保存した。

**抗血清** 卵黄形成期の雌血清に対する抗血清はプールの血清 0.5 ml を等量の Freund's complete adjuvant と共に家兎背部に皮下注射することにより、1 週間おきに計 4 回免疫して作製した。

卵黄蛋白に対する抗血清は、卵黄形成期の個体の卵巣 1.35 g を 0.9% NaCl で洗浄後、0.9% NaCl を 4 ml 加え、ポッター式ホモジナイザーで均質にし、12,000 rpm/min で 1 時間遠心した後、沈殿と表面脂肪層との中間の清澄な溶液 ( $A_{280} = 39$ ) を得、これを上記と同様に家兎に免疫して作製した。

各々作製した抗血清は、さらに 1/4 量のプール雄血清を加え、一晚放置した後遠心により沈殿を除いて上清を得た。これらの雄血清で吸収した抗雌血清および抗卵抽出液血清を雌特異蛋白の検索に用いた。

**電気泳動法** 1.2% アガロースを用いた免疫電気泳動法は、原ら (1984) に準じて行った。また放射性同位元素  $^{59}\text{FeCl}_3$  を用いた免疫電気泳動法によるオートラジオグラフィも前報 (Hara *et al.*, 1983) と同様に行った。

**組織学的方法** 用いた材料魚の雌雄および成熟度を組織学的に確かめるため、生殖腺の小片をブアン液で固定した後、通常のパラフィン法で 7  $\mu$  切片を作製し、デラフィルドのヘマトキシリン・エオシン染色を行って検鏡した。

**エストロゲン処理実験** エストロゲン処理には雄魚を用い、魚体重 100 g あたり 0.1 mg のエストラジオール-17 $\beta$  を 50% エタノールに溶解し、腹腔内に単一注射した。処理後 1, 3, 5, 7, 9, 11 日にそれぞれ全血を採取し、血清を分離した。

## 結 果

### 雌特異蛋白の同定

プール雄血清、卵黄形成中のプール雌血清および卵巣抽出液の免疫電気泳動パターンを図 1 に示した。抗体の溝には、卵黄形成期の雌血清に対する抗血清を雄で吸収処理した抗血清 (ab. aF) と、卵黄形成期の雌の卵巣から調製した卵黄蛋白に対する抗血清を同様に吸収処理した抗血清 (ab. aE) を交互に入れた。2つの吸収抗血清は、いずれもプール雄血清とは全く反応せず、吸収操作が完全であったことを示している。

プール雌血清は、ab. aF に対して 4 本の沈降線を、ab. aE に対してはさらに 1 本の弱く反応す

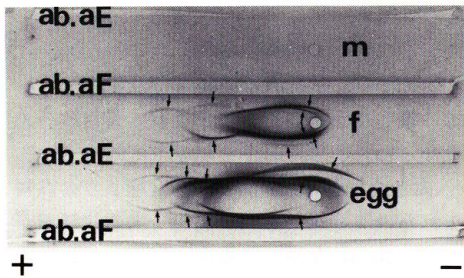


Fig. 1. Immunoelectrophoresis of serum and egg yolk proteins of white-edged rockfish. Four or five precipitin lines (arrows) were observed in female serum and egg yolk extracts but not in male serum. m: pooled mature male serum; f: pooled mature female serum; egg: egg yolk proteins extracted with 0.9% NaCl; ab. aF: rabbit anti-mature female serum after absorption with male serum; ab. aE: rabbit anti-egg yolk extracts after absorption with male serum.

る沈降線を含めて5本の沈降線を形成した。これらは易動度からほぼ3分画の蛋白成分に分けられた。すなわち、陰極よりの試料穴付近に形成された沈降線、最も陽極よりに移動した沈降線、およびこれらの中間位に生じた沈降線である。これらの沈降線は、互いに交叉するもの、スパーを形成するもの、さらに1つの沈降線の外側を覆うような形で出現するものなど様々である。

卵巣抽出液については、ab. aF に対して4本、ab. aE に対しては5本の沈降線が観察された。これらの沈降線の相互の関係は、プール雌血清で見られたのと同様であるが、試料穴付近で ab. aE に強く反応して形成された沈降線は、ab. aF に対しては形成されなかった。これらの結果から、2つの吸収抗血清を用いることにより、雌に特異的な蛋白の検索が可能であることが確認された。

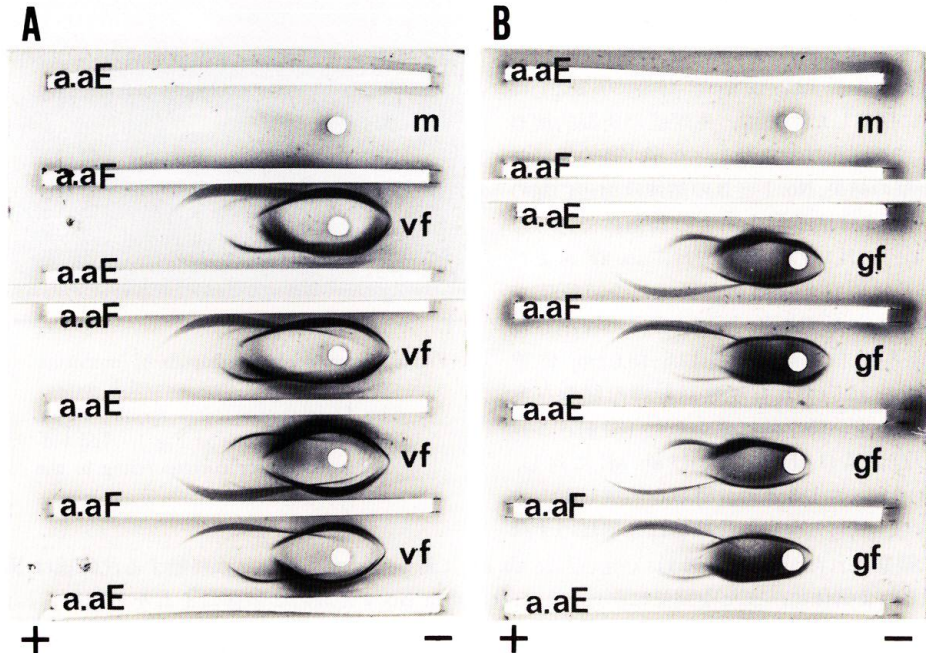


Fig. 2. Immunoelectrophoresis of vitellogenic female serum (A) and gestational female serum (B). m: mature male serum; vf: vitellogenic female serum; gf: gestational female serum; a. aF and a. aE: same as ab. aF and ab. aE in Fig. 1, respectively.

成熟過程と妊娠期に見られる雌特異血清蛋白

図2には卵黄形成期(12月)および妊娠期(5月)に採取した雌血清の免疫電気泳動パターンを個体別に示した。両期の泳動パターンには、沈降線の濃さや大きさなどで示される蛋白成分の量的な差違は見られたが、定性的な違いは認められなかった。

卵黄形成期の雌(図2A)ではab. aFに対し、陽極へ大きく移動した沈降線と、陰極よりの試料穴近くの位置に形成された明瞭な沈降線に加えて、これらの沈降線の中間に弱い1本の沈降線が観察された。一方、ab. aEに対しては陰極よりの沈降線がab. aFを用いた場合と同様に明瞭に観察され、さらにその外側(溝側)にも弱い沈降線が認められた。またab. aFに対して両極の中間位に形成された沈降線は、ab. aEを用いた場合、より明瞭な沈降線として観察された。しかし、ab. aFに対して出現した最も陽極よりの大きな沈降線は、ab. aEに対してはほとんど認められなかった。

妊娠期の雌における電気泳動パターン(図2B)は、定性的にはほぼ卵黄形成期の雌で観察されたのと同様であったが、ab. aFとab. aEの両抗血清に共通して認められた試料穴付近の沈降線はアークが細く小さくなり、卵黄形成期に比べてこの成分が量的に減少していることを示していた。

図3には未熟魚の血清の免疫電気泳動パターンを個体別に示した。このうちNo. 1-3の3尾(体長12.2-12.8 cm, 体重30-36 g)は8月に採集したもので、生殖腺の肉眼的観察では雌雄判別はできなかったが、後の組織学的観察の結果、No. 1と3の個体は周辺仁期の雌、No. 2は精子形成途上の雄個体であった(図4)。これらの未熟雌では、ab. aFおよびab. aEに対して雄血清と同様に全く反応を示さなかった(図3)。一方、1月に採集したNo. 4-6の未熟雌(体長12.8-13.6 cm, 体重34-42 g)はいずれも油球期の卵母細胞を有することを組織学的に確かめた(図4)。これらの雌血清はab. aFおよびab. aEに対し、個体によって1-3本の沈降線を形成した。すなわち、試料穴付近の沈降線は3個体のすべてに観察されたが、成魚(図1)で見られたab. aFに対して最も陽極よりに移動する沈降線はNo. 4と6の2個体に、また中間位に形成される沈降線はNo. 4と5の2個体にそれぞれ認められた(図3)。

エストロゲン処理魚の雌特異血清蛋白

エストラジオール-17βで処理した雄魚血清の免疫電気泳動パターンを図5に示した。処理1

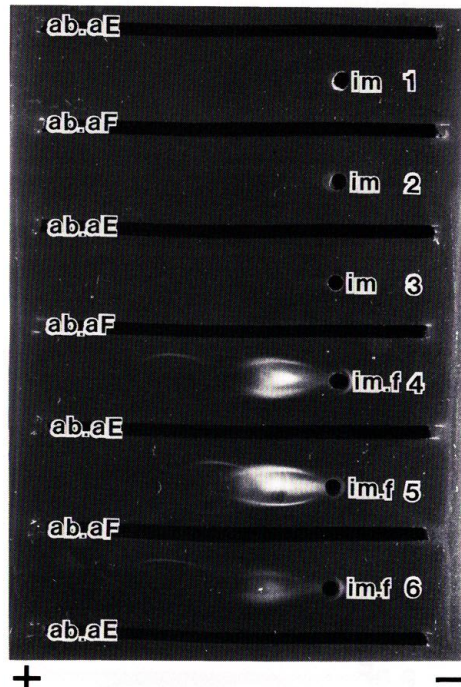


Fig. 3. Immuno-electrophoresis of immature fish serum. im: immature fish serum; im. f: immature female serum; ab. aF and ab. aE: same as Fig. 1. Individual numbers are corresponding to the numbers of Fig. 4.

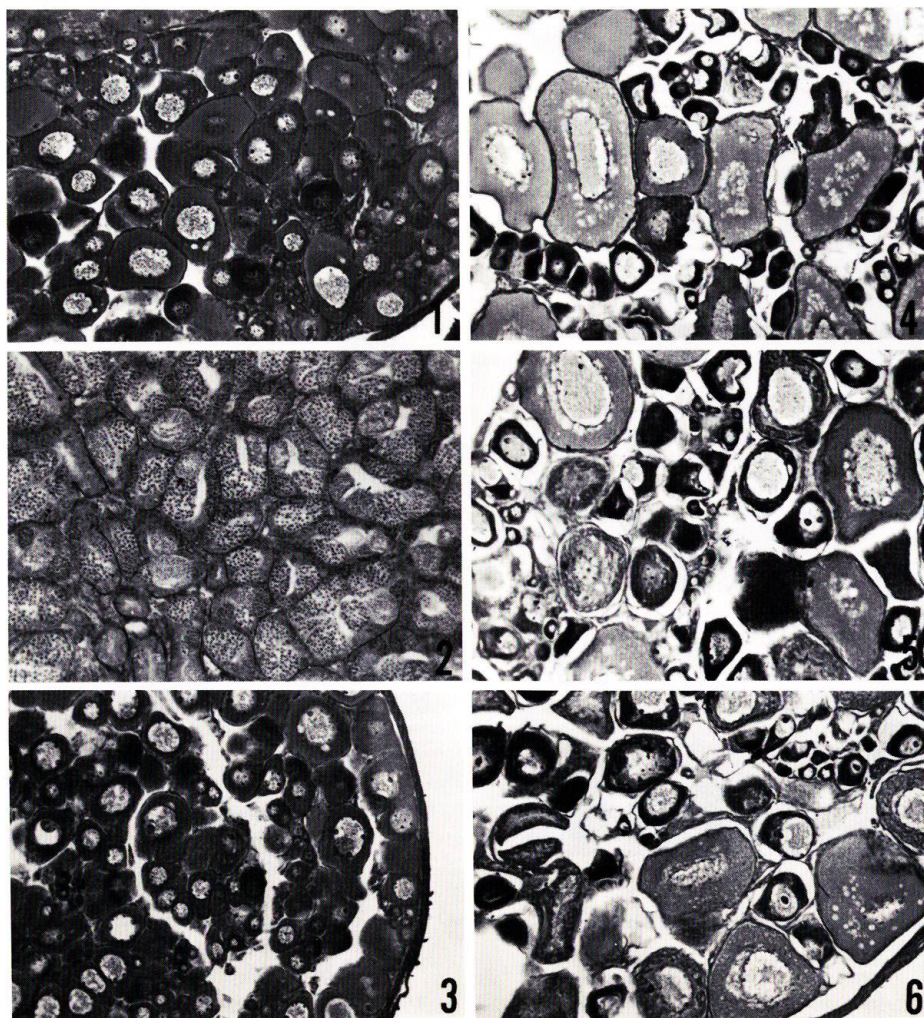


Fig. 4. Histology of gonads of various individuals.  $\times 110$ . Individual numbers correspond to the numbers in Fig. 3. Oocytes of immature fish, No. 1 and 3, were at the perinucleolus stage. Oocytes of immature female fish, with one to three female-specific serum proteins (Fig. 3), were at the oil drop stage. Gonad of immature fish, No. 2, was a testis.

日後の個体で既に ab. aF および ab. aE に対し、陰極よりに 1 本の沈降線が観察された。この沈降線は 5 日後を境に、次第に不明瞭になった。これを除いて、3 日後に形成された沈降線は卵黄形成期のプール雌血清に見られた泳動パターン (図 1) とほぼ同様であり、その後 11 日まで特別な変化は認められなかった。

#### 雌特異血清蛋白の鉄結合性

図 6 に成熟雄および雌血清の免疫電気泳動パターンとそのオートラジオグラフィーの結果を示

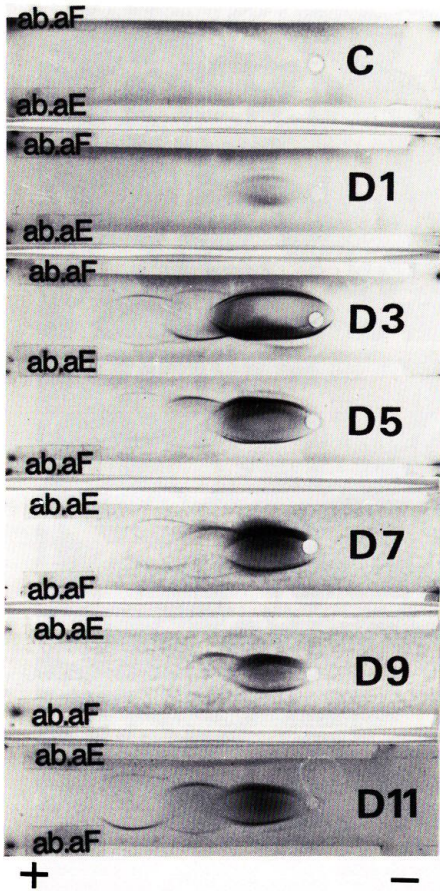


Fig. 5. Immunoelectrophoresis of estrogen-treated male fish. The antigen wells were filled with the serum collected from fish 0(C), 1(D1), 3(D3), 5(D5), 7(D7), 9(D9) and 11(D11) days after administration of estradiol-17 $\beta$ . ab. aF and ab. aE: same as Fig. 1.

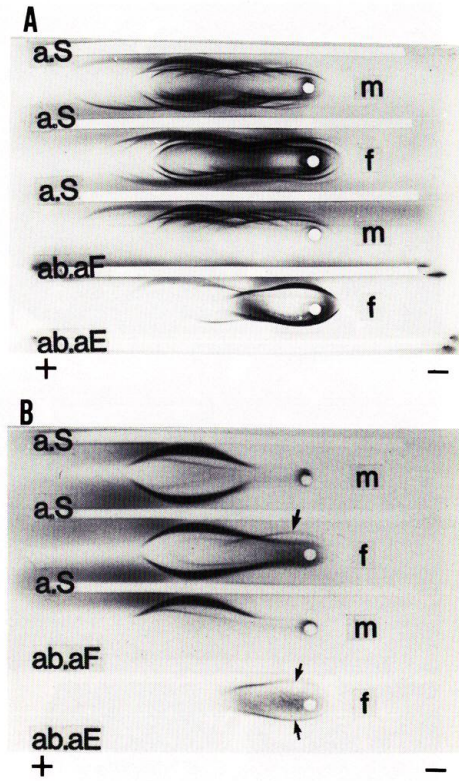


Fig. 6. Immunoelectrophoresis (A) and its autoradiography (B) of mature male and female sera mixed with  $^{59}\text{FeCl}_3$ . One iron-binding female-specific serum protein, but not transferrin, was observed in female serum (arrows). a. S: rabbit antiserum against mature female serum; m, f, ab. aF and ab. aE: same as Fig. 1.

した。オートラジオグラフィーのパターンでは雌雄血清に共通して、抗雌血清に対して形成された2本の沈降線が認められた。このうちの1本は血清トランスフェリンと思われる濃く太い明瞭な沈降線であり、もう1本はその内側の弱い沈降線である。これらの雌雄共通の沈降線に加えて、雌ではさらにもう1本の鉄結合性を有する蛋白が観察された。図6のAとBの泳動パターンを対比することにより、この沈降線が、ab. aFとab. aEに対して反応する雌特異的な沈降線のうち、試料穴付近に形成されるものと一致することが明らかにされた。

図7には雄、未熟雌、卵黄形成期の雌、妊娠期の雌およびエストロゲン処理雄の各血清、並びに卵巣抽出液の免疫電気泳動パターンとそのオートラジオグラフィーの結果をまとめて示した。卵黄形成期の雌血清に、ab. aFとab. aEに対して1成分の鉄結合性蛋白が観察されることは図6

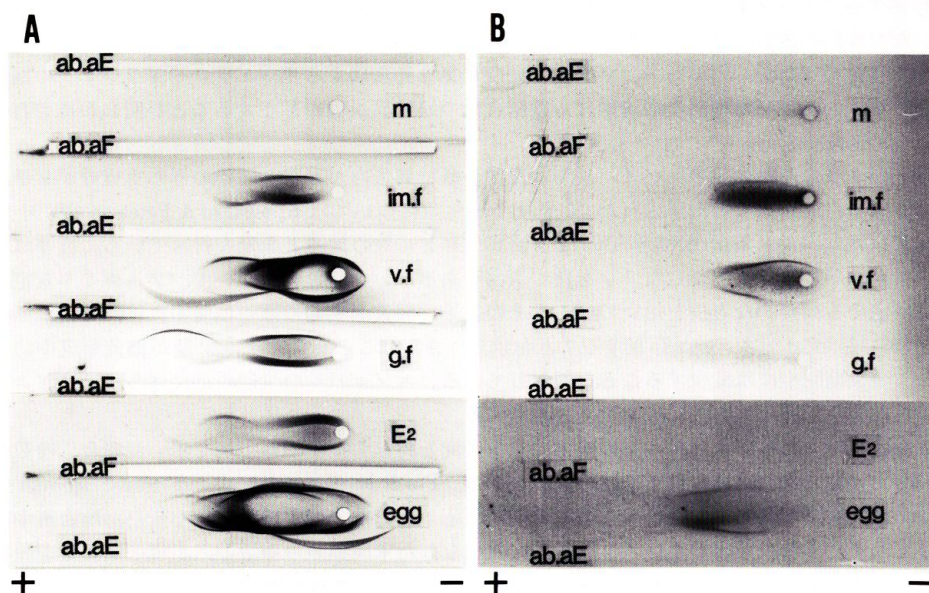


Fig. 7. Immunoelectrophoresis (A) and its autoradiography (B) of male serum, female serum at various stages and egg yolk extracts. One iron-binding female-specific protein was observed also in immature female serum. m, egg, ab. aF and ab. aE: same as Fig. 1; vf, gf: same as Fig. 2; im. f: same as Fig. 3; E: estrogen-treated fish.

に示したが、未熟雌においてもこれとほぼ同位置に形成された沈降線が鉄結合性を示すことが確かめられた。また卵巣抽出液中にも鉄結合性蛋白が少なくとも1成分存在することが認められた。なお今回の観察では、妊娠期の雌とエストロゲン処理雄に見られた雌特異蛋白には、明瞭な鉄結合能を持つ蛋白成分を見いだすことができなかった。

## 考 察

卵黄形成期のエゾメバル雌血清および同期の卵巣の抽出液を免疫して得た抗血清を、雄血清で吸収した吸収抗血清を用いることにより、本種の雌血清中に複数の雌特異蛋白が存在することを明らかにした。すなわち、卵黄形成期の雌血清中には、雄血清に全く見られない4-5成分の蛋白が認められ、さらに妊娠期の雌血清中にも同様な複数の雌特異蛋白が出現した。また、エストロゲン処理をした雄血清にも処理3日後から卵黄形成期の雌と同様な複数の特異蛋白が誘導された。先に報告したメダカ (Hara *et al.*, 1983) では3成分の雌特異血清蛋白が検出され、その鉄結合能を調べた結果、このうち2成分が鉄結合性の蛋白であることを確認し、ニジマス・サケ (Hara, 1976) およびニホンウナギ (Hara *et al.*, 1980) のピテロゲニンと同様の性質を有することを指摘した。今回観察したエゾメバルでも卵黄形成期および油球期の雌の血清中に、上記と同様の鉄結合能を有する雌特異蛋白が1成分存在した。免疫電気泳動法で、この鉄結合性蛋白は試料穴付近に見られ、先のニジマス、サケ、ニホンウナギにおけるピテロゲニンと電気泳動の易動度においても同様の性質を持つと推察された。またこの蛋白は、免疫電気泳動法での沈降線のアークが ab. aF および ab. aE に対して同一形状を示すこと (図 6, 7)、さらに卵巣抽出液にも鉄結合性の蛋白

が存在すること (図 7) から、卵黄蛋白の前駆物質 (ピテロゲニン) であることが強く示唆された。なお今回の観察では、妊娠期およびエストロゲン処理魚においてこの雌特異鉄結合性蛋白は明示できなかったが、別に行ったロケット免疫電気泳動法によるオートラジオグラフィーの結果から、エストロゲン処理魚の血清中にも鉄結合性の雌特異蛋白が存在することが明らかにされている (未発表)。

以上のように、胎生魚のエゾメバルでは複数の雌特異蛋白が存在し、そのうち 1 成分がピテロゲニン様蛋白であることが示された。これまで胎生魚については Korsgaard & Petersen (1979) がゲンゲ科の blenny, *Zoarces viviparus* で血清ピテロゲニンの検索と測定を行っている。彼等はピテロゲニンがアルカリ不安定なリンを持つ蛋白であるという性質に基づいて、アルカリ不安定リンを測定する間接的な方法を用いている。その結果、卵黄形成期の雌の血清中には、雄には無いリン蛋白 (ピテロゲニン) が存在することを示し、さらにこのピテロゲニン量が卵黄形成中に上昇し、妊娠期間中には減少することを報告している。エゾメバルの生殖周期に伴うピテロゲニンの消長とその意義については機を改めて報告する。

雌特異蛋白またはピテロゲニンの検索に、本研究と同じ免疫学的な手法を用いた場合、複数の蛋白が見いだされた例はこれまでも幾つかある。Plack *et al.* (1971) は cod, *Gadus morhua* で卵抽出液に対する抗血清を用い、この抗血清に反応した卵抽出液中の 2 成分の蛋白が雄血清中には存在せず、また成熟雌およびエストロゲン処理をした未成熟魚の血清中に出現することを免疫電気泳動法によって示した。Aida *et al.* (1973) はアユにおいて成熟雌血漿で免疫した抗血清を雄血漿で吸収した抗血清を作製し、これを用いた免疫電気泳動法により、成熟雌血漿中に 2 つの特異蛋白が存在し、卵巣抽出液にもこの抗血清と反応する 3 成分の蛋白があることを報告している。さらに Le Menn (1979) も同じ手法により、*Gobius niger* において卵巣抽出液で免疫して得た抗血清を雄肝臓で吸収した抗血清を用いて、卵黄形成中の雌の肝臓、卵抽出液および血清中に 2 つの新たな蛋白が出現することを明らかにしている。一方、de Vlaming *et al.* (1980) はキンギョにおいてピテロゲニン様蛋白が蛋白分解を受けやすいことを指摘している。ニジマス・サケ (Hara, 1976) およびアママス (原ら, 1984) では 2 成分の雌特異蛋白のうち、1 成分はピテロゲニン分子、他の 1 成分はピテロゲニンのフラグメントであることが示唆された。このうちのフラグメント分子は、確かに血清保存中に電気泳動の易動度に変化を生じたものの、血清中には元々 2 成分が存在し、フラグメントが保存中にピテロゲニンの分解によって新たに生じたとは考えられなかった (原ら, 1984)。前述のメダカでも採血直後の試料中に 3 成分の雌特異蛋白が認められ、これらが分解産物ではないことを示した (Hara *et al.*, 1983)。このように雌特異蛋白の構成と性状の同定にはかなり綿密な検討を要するが、同時に、魚種によって従来のピテロゲニンを含む複数の雌特異蛋白が存在することも事実である。

今回、エゾメバルの雌特異血清蛋白の検索には、卵黄形成期の雌血清および卵巣抽出液に対する抗血清を雄血清で吸収した 2 つの抗血清を用いた。雌血清および卵巣抽出液はこれら 2 つの抗血清に対して一部異なった泳動パターンを示した。卵黄形成期と妊娠期の雌血清のパターンで特徴的な ab. aF にのみ強く反応した陽極よりの成分は、卵巣抽出液中には認められなかった (図 2)。しかし卵黄形成期の雌プール血清では同位置に極めて弱いながら ab. aE に対して反応した沈降線が存在した (図 1)。これらが同じ抗原性を持つ成分であるか否か、現段階では定かでないが、かなり血清に特異性の高い蛋白であると思われる。この点に関しては ab. aF, ab. aE を卵巣抽出液および雌血清でそれぞれ吸収処理を行った上で、さらに検討する必要がある。一方、この逆に、卵巣抽出液のパターンでは ab. aE にのみ強く反応した沈降線が陰極よりに出現したことが注目される (図 1)。サケ科魚類ではピテロゲニンが卵に取り込まれる際に 2 つの卵黄蛋白に解裂されることが免疫学的に証明されている (Hara & Hirai, 1978; 原ら, 1984)。エゾメバルでも卵にのみ

出現する成分の存在は否定できず、ビテロゲニンの取り込みから卵黄蛋白の構築の過程については今後の研究に待たねばならない。

一般にビテロゲン様蛋白は卵黄形成期に特徴的に出現する蛋白と考えられているが、エゾメバルでは先のメダカ (Hara *et al.*, 1983) と同様、卵黄形成期に先立つ油球期の雌に既に特異蛋白が出現した。これらの特異蛋白はエストロゲン処理によっても誘導されることから、ビテロゲニンと同様に、肝臓で合成され血中に分泌される蛋白であることが示唆された。詳細は今後の免疫組織学的研究によって明らかにされると思われるが、この特性は血液による新たな雌雄判別の手法にもつながる興味深い課題である。

## 要 約

海産胎生魚、エゾメバル *Sebastes taczanowskii* の生殖生理学的研究の一環として、雌特異血清蛋白の挙動を明らかにするため、免疫学的手法を用いて基礎的な検討を行った。

卵黄形成期の雌血清および同期の卵巣の抽出液をそれぞれ家兎に免疫して得た抗血清を、雄血清で吸収した吸収抗血清を作製し、これを用いて雌特異血清蛋白の同定と検索を行った。免疫電気泳動法による泳動パターンから、卵黄形成期および妊娠期の雌血清中には4-5成分の特異蛋白の存在が認められた。さらに卵巣卵が油球期にある未熟雌でも、個体によって1-3成分の特異蛋白が観察された。一方、エストロゲン処理した雄においても、卵黄形成期の雌と同様の複数の特異蛋白が誘導された。これらの複数の雌特異血清蛋白のうち、1成分は鉄結合能を有するビテロゲン様蛋白であることを明らかにした。

## 謝 辞

この研究を行うにあたり、実験魚の採集に多大の御協力を賜った北海道大学水産学部付属白尻水産実験所山本弘敏博士並びに野村潔、嵐田洋悦両技官に厚く御礼申し上げる。また、本研究に対し適切な御助言を賜った同学部高橋裕哉教授に深謝する。なお本研究の一部は文部省科学研究費補助金によってなされた。

## 文 献

- Aida, K., Ngan, P.-V. and Hibiya, T. (1973). Physiological studies on gonadal maturation of fishes-I. Sexual difference in composition of plasma protein of ayu in relation to gonadal maturation. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**, 1091-1106.
- de Vlaming, V.L., Wiley, H.S., Delahunty, G. and Wallace, R.A. (1980). Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: Induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**, 613-623.
- de Vlaming, V.L., Baltz, D., Anderson, S., Fitzgerald, R., Delahunty, G. and Barkely, M. (1983). Aspects of embryo nutrition and excretion among viviparous embiotocid teleosts: Potential endocrine involvements. *Comp. Biochem. Physiol.* **76A**, 189-198.
- Hara, A. (1976). Iron-binding activity of female-specific serum proteins of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochim. biophys. Acta* **427**, 549-557.
- Hara, A. and Hirai, H. (1978). Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.* **59B**, 339-343.
- Hara, A., Takano, K. and Hirai, H. (1983). Immunochemical identification of female-specific serum protein, vitellogenin, in the medaka, *Oryzias latipes* (teleosts). *Comp. Biochem. Physiol.*

76A, 135-141.

- Hara, A., Yamauchi, K. and Hirai, H. (1980). Studies on female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.* **65B**, 315-320.
- 原 彰彦・松原孝博・実吉峯郎・高野和則 (1984). アメマスのビテログニンと卵黄蛋白. 北大水産彙報 **35**, 144-153.
- Korsgaard, B. (1982). Changes in activity levels of glutamate dehydrogenase and two transaminases of maternal liver during reproduction and after administration of oestradiol and progesterone in *Zoarces viviparus* (L.). *J. Fish. Biol.* **20**, 445-454.
- Korsgaard, B. (1983). The chemical composition of follicular and ovarian fluids of the pregnant blenny (*Zoarces viviparus* (L.)). *Can. J. Zool.* **61**, 1101-1108.
- Korsgaard, B. and Petersen, I. (1979). Vitellogenin, lipid and carbohydrate metabolism during vitellogenesis and pregnancy, and after hormonal induction in the blenny *Zoarces viviparus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **63B**, 245-251.
- Le Menn, F. (1979). Some aspects of vitellogenesis in a teleostean fish: *Gobius niger* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **62A**, 495-500.
- Plack, P.A., Pritchard, D.J. and Fraser, N.W. (1971). Egg proteins in cod serum: Natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate. *Biochem. J.* **121**, 847-856.
- Wallace, R.A. (1978). Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. p. 469-502. In Jones, R.E. (ed.), *The Vertebrate Ovary*. 853 p. Plenum, New York.
- Wallace, R.A. and Selman, K. (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* **21**, 325-343.
- Wiegand, M.D. (1982). Vitellogenesis in fishes. p. 136-146. In Richter, C.J.J. and Goos, H.J. Th. (eds.), *Proceedings of the International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. **256** p. Wageningen.
- Wourms, J.P. (1981). Viviparity: The maternal-fetal relationship in fishes. *Am. Zool.* **21**, 473-515.