



Title	海産カジカ科魚類に見られる体内配偶子会合型の繁殖様式に関する生理学的、微細構造学的研究
Author(s)	古屋, 康則
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	甲第3087号
Issue Date	1992-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3060672
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49797
Type	doctoral thesis
File Information	000000249637.pdf



主 論 文

海産カジカ科魚類に見られる
体内配偶子会合型の繁殖様式に関する
生理学的、微細構造学的研究

古 屋 康 則

平成4年

①

海産カジカ科魚類に見られる体内配偶子会合型の
繁殖様式に関する生理学的、微細構造学的研究

北海道大学大学院水産学研究科
水産増殖学専攻

古屋康則

1992年

目 次

I	緒言	1
II	卵巢組織の微細構造	5
	1. 材料と方法	5
	1) 実験魚	5
	2) 組織学的観察	5
	a. 光学顕微鏡による観察	5
	b. 透過電子顕微鏡による観察	5
	3) トレーサー実験	6
	a. トレーサーの注射	6
	b. HRP の光顕的検出	6
	c. HRP の電顕的検出	6
	2. 結果	7
	1) ニジカジカの卵巢の形態	7
	2) ニジカジカ雌の生殖周期	7
	a. 生殖腺体指数 (GSI) の変化	7
	b. 卵巢卵の変化	7
	3) ニジカジカにおける卵巢壁上皮細胞および卵巢薄板 上皮細胞の微細構造の季節変化	12
	a. 回復期	12
	a-1. 卵巢薄板上皮細胞	12
	a-2. 卵巢壁上皮細胞	15
	a-3. 血管系	19
	b. 産卵期	19
	b-1. 卵巢薄板上皮細胞	19
	b-2. 卵巢壁上皮細胞	23
	b-3. 血管系	27
	c. 退縮期	27
	c-1. 卵巢薄板上皮細胞	27
	c-2. 卵巢壁上皮細胞	31
	c-3. 血管系	31
	4) ニジカジカおよびスジアイナメにおける血液卵巢腔 関門の機能変化	31
	a. ニジカジカ	31
	a-1. 回復期	31
	a-2. 産卵期	37
	a-3. 退縮期	37
	b. スジアイナメ	43
	b-1. 産卵期の卵巢の形態	43
	b-2. 産卵期の卵巢壁および卵巢薄板上皮細胞の 形態	43
	b-3. 産卵期における血液卵巢腔関門	46
	5) 卵巢内での精子貯留とその消失過程	46

a. 産卵期	46
b. 退縮期	50
c. 回復期	59
3. 考察	59
III 付活および受精によるニジカヅカ卵の微細構造的変化	69
1. 材料と方法	69
1) 実験魚	69
2) 組織学的観察	69
2. 結果	69
1) 精子の形態	69
2) 未交尾魚の未受卵の形態	71
3) 受精による卵の変化	77
a. 海水移行による卵の変化と初期発生過程	77
b. 海水移行による卵の組織学的変化	81
c. 受精卵における卵門内精子の消失過程	81
4) 受精における卵および精子の微細構造的変化	85
a. 海水移行前	85
b. 海水移行 5 秒後	85
c. 海水移行 10~15 秒後	85
d. 海水移行 20~30 秒後	90
e. 海水移行 1~2 分後	95
f. 海水移行 3 分後	95
g. 海水移行 5~10 分後	101
5) 海水移行による未交尾魚の未受精卵の表層変化	101
a. 海水移行 10~30 秒後	101
b. 海水移行 60 秒後	101
c. 海水移行 90 秒後	101
3. 考察	105
IV 体内配偶子会合型における、卵、精子、および配偶子会合環境の生理的特性	114
1. 材料と方法	114
1) 実験魚	114
2) 血清、精漿、および卵巣腔液の採取	114
3) 血清、精漿、および卵巣腔液の分析	115
4) 卵の付活率および受精率の計測	115
5) 精子の運動活性の測定	116
2. 結果	116
1) 卵巣腔液の性状	116
a. 陽イオン濃度	116
b. 浸透圧	118
c. pH	118
2) 精子の運動活性	118
a. 精漿の性状	118

b.	精漿および卵巣腔液中での精子の状態	120
c.	浸透圧と精子の運動活性	120
d.	イオンに対する精子の運動活性の特性	122
e.	pH に対する精子の運動活性の特性	122
f.	人工卵巣腔液中での精子の運動活性	122
g.	その他の魚種の精子の運動活性	124
3)	卵の付活および受精に必要な環境特性	127
a.	浸透圧に関する特性	127
b.	2 価陽イオンに関する特性	130
c.	卵内への Ca^{2+} の透過およびその阻害と受精 および付活	132
d.	イソバテング卵の受精に対する浸透圧および 2 価陽イオンの影響	132
e.	スジアイナメ卵の受精に対する浸透圧および Ca^{2+} の影響	136
3.	考察	138
V	ニジカジカの受精に関わる卵および精子表面の糖鎖	150
1.	材料と方法	150
1)	実験魚	150
2)	レクチンによる受精阻害実験	150
3)	レクチンによる精子の凝集反応	150
4)	組織学的観察	151
2.	結果	151
1)	レクチンによる受精の阻害	151
a.	未交尾魚卵	151
b.	既交尾魚卵	153
2)	レクチンによる精子の凝集	153
3)	卵および精子のレクチン結合部位の電顕的検索	153
a.	卵のレクチン結合部位	153
b.	精子のレクチン結合部位	157
3.	考察	157
VI	総合論議	163
VII	要約	176
VIII	参考文献	181

I 緒言

カジカ科魚類は世界の温帯から寒帯にかけての淡水域から深海域まで広く分布する底生性魚類で、その生息域の多様性と相まって著しい種分化を遂げている（矢部，1988）。日本では、九州中部以北から北海道にかけての沿岸域、および一部の河川に生息し、これまでに 110 種以上が報告されている（益田ら，1984）。しかもカジカ類は種数が多いのみならず、特に北日本沿岸にはその生息数が極めて多く、沿岸漁業の重要な対象魚種の一つとなっている。

このように、我が国ではカジカ科魚類は食用魚としてよく利用されているにもかかわらず、その繁殖生物学、特に生殖生理学的知見は極めて少ない。これまでの生態学的研究から、カジカ科魚類の繁殖様式については通常の体外受精に加えて、Clinocottus recalvus (Morris, 1952)、Oligocottus snyderi (Morris, 1956)、Synchirus gilli (Krejsa, 1964)、アサヒアナハゼ Pseudoblennius cottoides (塩垣・道津, 1974; 四宮, 1985)、アナハゼ Pseudoblennius percoides (四宮, 1985)、サラサカジカ Furcina ishikawae (四宮, 1985)、ニジカジカ Alcichthys alcicornis (宗原・三島, 1986) など、多くの種が特殊な体内受精の繁殖様式を取ることが示唆されてきた。これらの魚種については、実際に卵巣内で受精が起こるのか否かは確認されないまま長い間、体内受精に疑いが差し挟まれることはなかった。しかし最近、交尾行動が確認されたニジカジカで、卵巣内では雌雄の配偶子の会合のみが起き、受精は産卵後に体外の環境水中で開始されることが組織学的観察から明らかにされた (Munehara et al., 1989)。Munehara et al. (1989) は、このような特殊な繁殖様式を「体内配偶子会合型」(internal gametic association) と呼び、一般の卵生と区別している。その後、この体内配偶子会合型の繁殖様式はケムシカジカ Hemitripterus villosus (宗原, 1988a)、およびイソバテング Blepsias cirrhosus (Munehara et al., 1991) でも認められ、これまで体

内受精とされてきたカジカ類の多くが、実際には体内配偶子会合型の繁殖様式をとっている可能性が示されている。

カジカ類に見られる体内配偶子会合型の繁殖様式については、ニジカジカで生態学的にかなり詳しく調べられている (Munehara, 1988; Munehara et al., 1990; 宗原ら, 1991) が、この様式についての生理学的な解明はほとんどなされていない。本研究は、繁殖の生態学的側面がよく知られているニジカジカをモデルに、この繁殖様式に関わる卵と精子の特徴を組織学的に明らかにし、さらにこの様式の生理学的な成り立ちを解明することを主な目的とした。

体内配偶子会合型の繁殖様式では、精子が交尾により卵巢内に送り込まれ、ある期間卵巢内に貯留される。卵巢内での精子の貯留に関しては、これまで主に胎生魚で微細構造的に観察されている (Gardiner, 1978; 林, 1990) が、体内配偶子会合型では光顕レベルで観察した 1 例 (四宮, 1985) があるに過ぎない。また、雌にとって異物である卵巢内の精子がどのようにして排除を免れ、卵巢腔内に維持されているのかについては全く知られていない。本研究では、ニジカジカ卵巢内の精子の貯留形態を観察すると共に、精子を免疫系から隔絶する機構として、卵巢腔に面する上皮細胞の細胞間結合による血液卵巢腔関門の存在について注目し、その構造の生殖周期に伴う変化を調べた。また、上皮細胞自体の微細構造についても観察し、産卵期に卵巢内で配偶子の会合の場としての重要な役割を果たす、卵巢腔液の起源についても考察した。

本研究では、ニジカジカにおける体内での配偶子の会合と、海水中での受精反応の開始および初期過程を微細構造レベルで明らかにした。魚類で正常な受精反応を微細構造的に観察することは、魚卵の持つ生理的特性 (Yamamoto, 1961) から極めて困難とされ、これまでの受精反応に関する報告は、精子と卵の膜融合 (Brummett et al., 1985; Kudo and Sato, 1985; Wolenski and Hart, 1988a; Ohta, 1991)、卵の表層変化 (Brummett and Dumont, 1979; Kudo, 1980, 1983; Iwamatsu and Ohta, 1981; Kobayashi and Yamamoto,

1981; Kudo and Sato, 1985)、核膜の消失 (Ohta and Iwamatsu, 1983) などの各段階の断片的な観察結果であり、一連の反応過程を連続的に観察した例はない。体内配偶子会合型の卵は、卵巢内では配偶子の会合のみを起こし、海水に浸漬されると一斉に受精反応を開始するという特徴を持つことから、受精の初期過程の観察とその解析のための実験には極めて適した材料である。このように本研究の目的の一つである体内配偶子会合型の繁殖様式における受精、初期発生過程の特性について明らかにすることは、取りも直さず硬骨魚類の正常受精過程の解明にも繋がることと考えた。また、併せてこれまでに魚類ではほとんど調べられていない、配偶子の相互認識、即ち卵表面の精子受容体の有無についても、若干の基礎的な検討を加えた。

本研究ではまた、ニジカジカを含む 4 種のカジカ科魚類を用い、精子の運動活性の特性、卵の受精に必要な環境要因、および配偶子の会合環境である卵巢腔液の生理的特性を調べ、卵巢内で如何にして円滑に配偶子の会合が起き、受精が抑制されているかなど、体内配偶子会合型の成立要件を生理的に浮き彫りにすることを試みた。

カジカ科が属するカサゴ目の魚類は、その生息環境の多様性に伴い卵生から胎生まで、繁殖様式に著しい特化の跡がうかがえる (Wourms, 1991)。一般に魚類における胎生は卵生から生じたものと考えられている (Matthews, 1955)。カジカ類の繁殖様式に見られる体内配偶子会合型の繁殖様式は、卵生から胎生への進化過程における、いわば過渡的あるいは中間的な様式を示すものと考えられ、卵生から胎生への進化的道筋をたどるうえで極めて興味深い繁殖様式である。本研究では、体内配偶子会合型への特化の段階が異なると目される数種のカジカ類について、卵巢内での精子貯留形態、配偶子および卵巢腔液の生理的特性を示し、これまでに報告されているカジカ類の繁殖生態と対比しながら、カジカ上科魚類における卵生から体内配偶子会合型、さらには胎生への進化の過程を推察した。

稿を進めるにあたり、本研究に終始御懇切なる御指導を賜った北海道大学水産学部・高橋裕哉教授、並びに本研究に対して種々な有益な御助言を賜り、また、本論文の御校閲をいただいた同学部・山崎文雄教授、山内皓平助教授に深甚なる謝意を表す。実験を行うに際し種々の示唆ならびに多くの御助言を賜った元北海道大学水産学部・高野和則助教授（現、琉球大学熱帯海洋科学センター教授）、北海道大学水産学部・足立伸次氏、同学部北洋研究施設・宗原弘幸博士に心から感謝申上げる。また、実験魚の採集および飼育に際し御協力下さった北海道大学水産学部白尻水産実験所・山本弘敏助教授、嵐田洋悦技官、野村潔技官を始め事務官の諸氏、ならびにアサヒアナハゼを提供して下さった鹿児島大学水産学部・四宮明彦講師に厚く御礼申上げる。さらに本研究を行うにあたり、多大な御助言と御協力をいただいた北海道立水産孵化場・太田博巳博士、水産庁北海道区水産研究所・松原孝博博士、琉球大学熱帯海洋科学センター・竹村明洋博士、米国バージニア大学・Lou Ya-Huan博士、フィリッピン東南アジア水産振興社・Gerald F. Quinitio 博士、米国カリフォルニア大学・山田英明博士、国立基礎生物学研究所・三浦猛博士、ならびに北海道大学水産学部淡水増殖学講座の征矢野清氏、堀田公明氏、嵯峨堅氏、東藤孝氏、持田和彦氏、斎藤寿彦氏を始め大学院学生および4年目学生諸氏に深く感謝申上げる。

II 卵巣組織の微細構造

1. 材料と方法

1) 実験魚

実験には交尾型卵生種のニジカジカ *Alcichthys alcicornis* および比較対象として真卵生種のスジアイナメ *Hexagrammos octogrammus* を用いた。魚は 1987 年から 1991 年の 3 月から 7 月、および 9、10 月に北海道函館市近郊の南茅部町白尻沖で、三枚網および釣りにより捕獲したものを、北海道大学水産学部白尻臨海実験所の 1 t 水槽で自然光周期下で飼育し、適宜材料として用いた。

2) 組織学的観察

a. 光学顕微鏡による観察

魚から取り出した生殖腺を Bouin 氏液で固定した後、通常のパラフィン法により 5 μ m の切片とした。これに Delafield のヘマトキシリン-エオシンの二重染色を施し、観察に供した。

b. 透過型電子顕微鏡による観察

組織を 0.2 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 4%パラフォルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド混合液で 5 時間固定した後、0.1 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した。次に氷冷した 0.1 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 1%オスミック酸で 2 時間の後固定を行い、エタノールで脱水した後、常法によりエポン樹脂に包埋した。超薄切片には酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を施し、日立 H-7000 型電子顕微鏡により

観察した。また、それぞれのエポン包埋試料について、厚さ $1\mu\text{m}$ の準超薄切片を作成し、トルイジンブルー染色を施して光顕で観察し、電顕像と比較した。

3) トレーサー実験

a. トレーサーの注射

ニジカジカおよびスジアイナメの雌魚を MS-222 で麻酔した後、トレーサーとして西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP Type II, Sigma 社製) を 0.7% NaCl 水溶液に溶解し、魚体重 1 g 当り 0.18 mg をニジカジカについては胸部を切開して心臓内に、また、スジアイナメについては尾静脈内に注射し、注射後約 8 時間目に卵巢を取り出した。

b. HRP の光顕的検出

卵巢を Bouin 氏液により 4°C で 8 時間固定し、 4°C に冷やした 0.1 M リン酸緩衝塩類溶液 (PBS, pH 7.4) で一晚洗浄した後エタノールで脱水し、パラフィンに包埋して $5\mu\text{m}$ の切片とした。標本は脱パラフィン後、ジアミノベンチジン (DAB) の酸化重合反応による発色を行った。

c. HRP の電顕的検出

卵巢を 0.2 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 4% パラフォルムアルデヒド-2.5% グルタルアルデヒド混合液で 5 時間固定した後、 4°C に冷やした 0.1 M PBS (pH 7.4) で洗浄した。次に DAB による酸化重合反応を行い、さらに 0.1 M PBS で洗浄した後、氷冷した 0.1 M PBS (pH 7.4) に溶解した 1% オスミック酸で後固定して DAB による重合物の電子密度を高め、電顕での観察が可能な状態にした。その後、常法に従いエポンに包埋し、超薄切片を作成し、染色を施さずに観察に供した。

2. 結果

1) ニジカジカの卵巢の形態

産卵期のニジカジカの卵巢は、卵巢間膜によって腹腔内に懸垂される一対の嚢状器官で、左右の卵巢は中央よりやや後方で融合し、単一の生殖輸管に連なっている(図 1-a)。卵巢の背側には卵巢動脈および卵巢静脈が縦走する(図 1-b)。卵巢内には背方からひだ状に広がる卵巢薄板が発達し、その腹側には卵巢腔が位置する(図 2-a)。卵巢薄板は結合組織および卵濾胞からなり、その自由縁は単層に配列する上皮細胞(卵巢薄板上皮細胞)に覆われている(図 2-c)。卵巢を包む被膜は外側から扁平上皮、膠原繊維と平滑筋の層からなり、さらに卵巢腔に面する卵巢被膜の内側は、単層に配列した上皮細胞(卵巢壁上皮細胞)に覆われている(図 2-b)。排卵された完熟卵は粘性の高い卵巢腔液と共に卵巢腔に貯留される(図 1-b)。

2) ニジカジカ雌の生殖周期

a. 生殖腺体指数(GSI)の変化

ニジカジカの GSI 値の変化を図 3 に示した。本種の GSI は、産卵期の 4 月では平均で約 9% と高値を示す。その後、5 月から 7 月にかけて急激な減少を見せ、以後 11 月まで 1% 以下の低値に留まるが、1 月には増加を始め、3 月には 5% 前後の値をとる。

b. 卵巢卵の変化

7 月の卵巢は産卵期のそれと比較して極めて小さい。卵巢薄板は直径が約 $5\mu\text{m}$ の染色仁期から直径が $60\sim 180\mu\text{m}$ の周辺仁期の卵母細胞で占められる(図 4-a, b)。

10 月の卵巢の横断面を図 5-a に示した。この時期の卵巢は外見的には

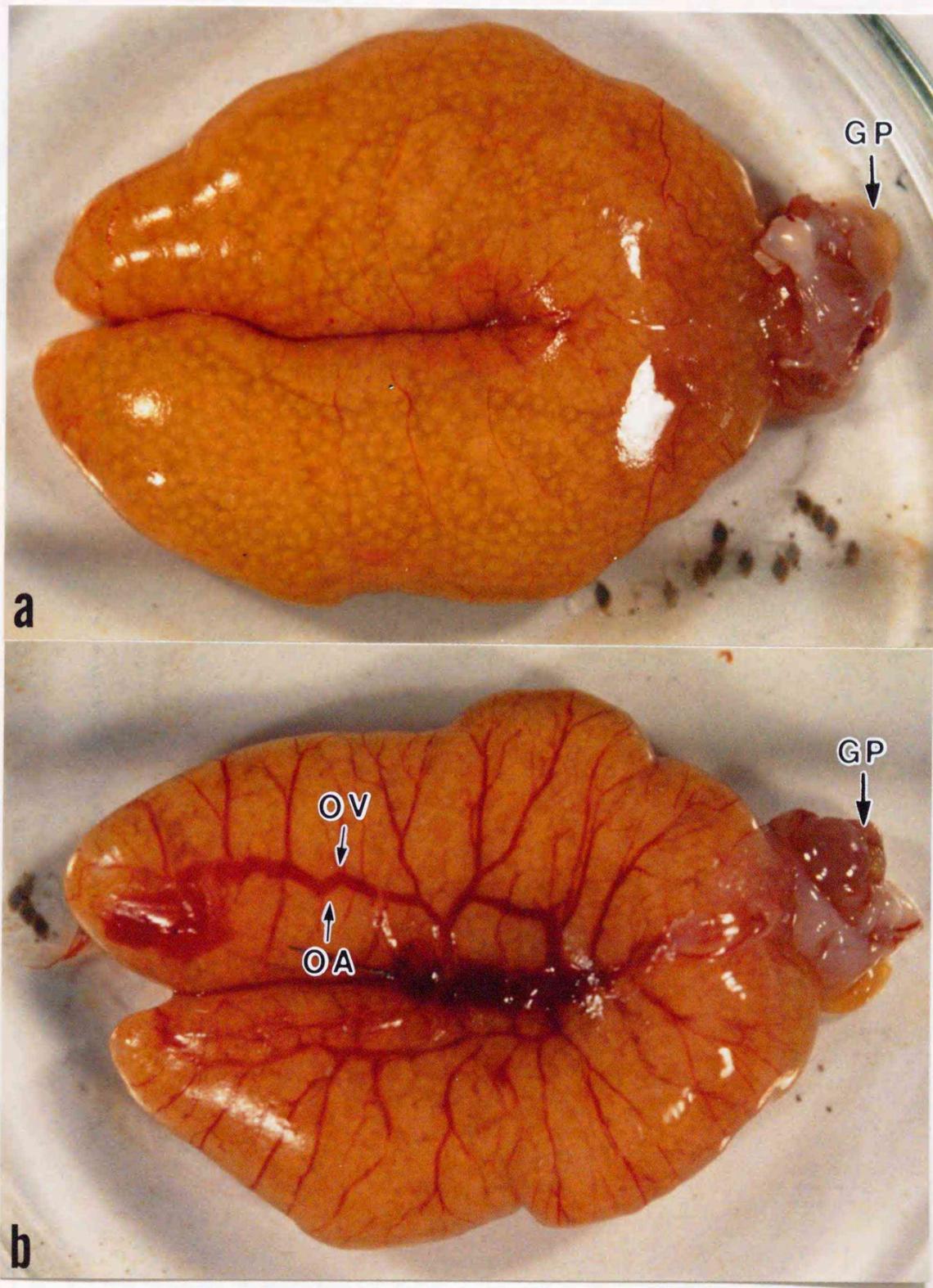


図1. ニジカジカ卵巢の外部形態.

GP, 生殖孔. OA, 卵巢動脈. OV, 卵巢静脈.

- a. 腹側から見た卵巢. 排卵された卵が卵巢腔液と共に卵巢腔に貯留されている. X 2
- b. 背側から見た卵巢. 卵巢動脈と卵巢静脈が縦走する. X 2

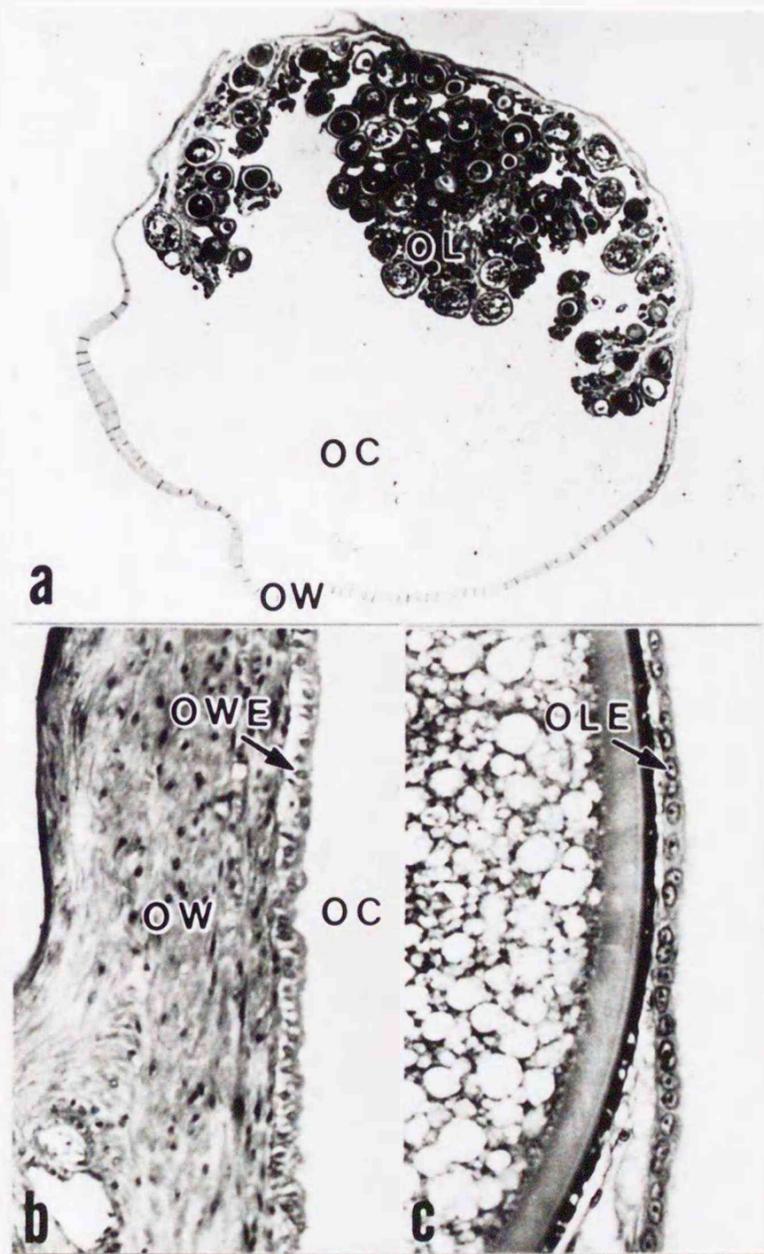


図2. 産卵期の卵巣の組織像。
 OC, 卵巣腔. OL, 卵巣薄板. OLE, 卵巣薄板上皮. OW, 卵巣壁. OWE, 卵巣壁上皮。
 a. 産卵期の卵巣の横断面. X 7
 b. 卵巣壁の組織像. X 200
 c. 卵巣薄板の組織像. X 410

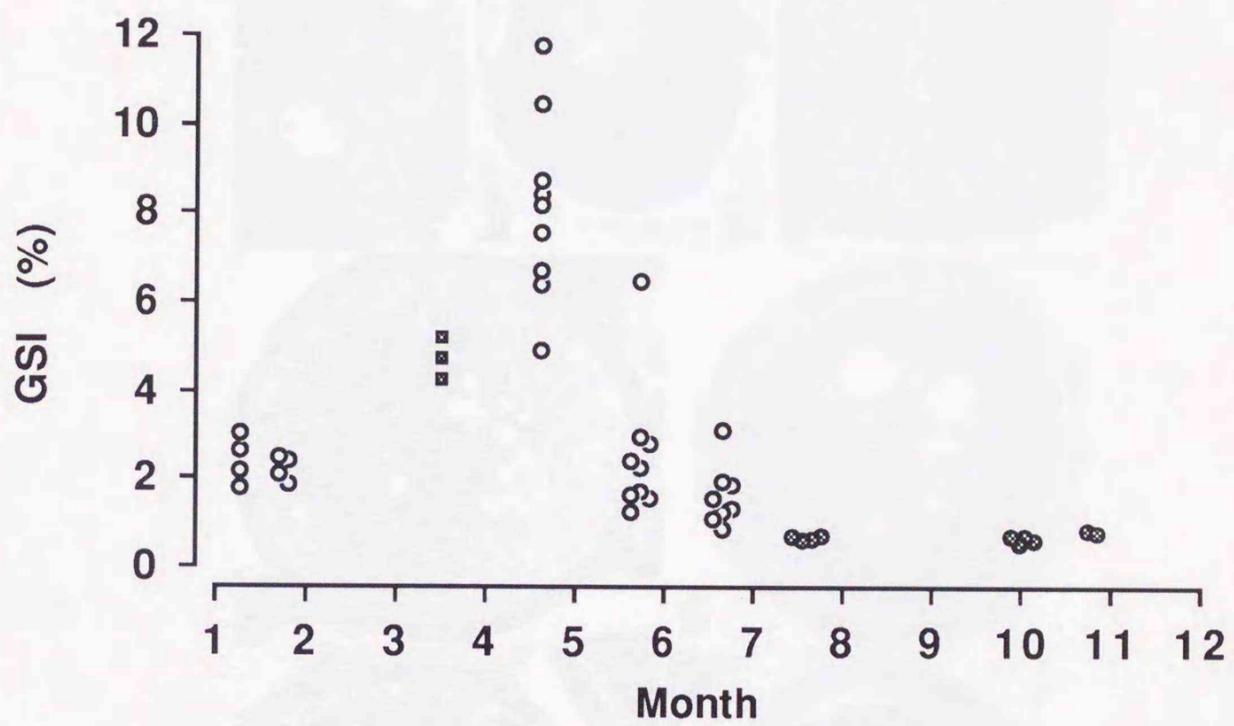


図 3. ニジカジカ雌の生殖腺体指数 (GSI) の季節変化.
 ○; 1985年, ●; 1990年, ■; 1991年.

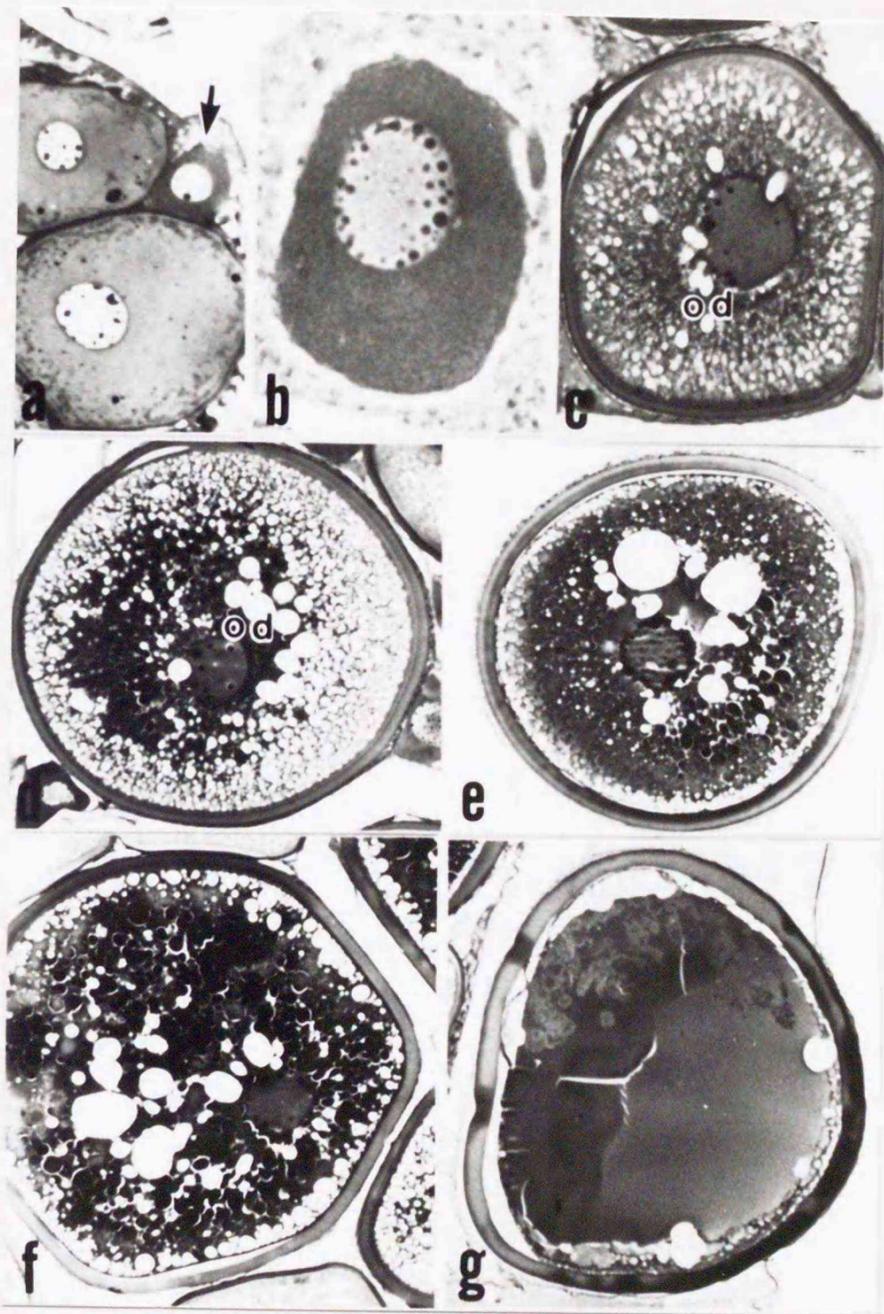


図4. ニジカジカの卵母細胞の組織像.

- a. 染色仁期 (矢印) および周辺仁期の卵母細胞. エボン切片. X 230
- b. 周辺仁期の卵母細胞. X 470
- c. 卵黄胞期の卵母細胞. 核の周辺細胞質に油球 (od) が認められる. X 125
- d. 卵黄球前期の卵母細胞. 油球 (od) が増大し、卵黄胞は細胞質の表層に並ぶ. X 100
- e. 卵黄球後期の卵母細胞. X 80
- f. 核移動期の卵母細胞. X 80
- g. 完熟卵. X 54

7月と比べて大きさに顕著な変化を見せないが、卵母細胞には周辺仁期のものに加えて直径が $170\sim 200\mu\text{m}$ の卵黄胞期のものが多く認められるようになる(図4-c)。

産卵期直前の3月の卵巢(図5-b)は、外見的には産卵期の未排卵の卵巢と同程度の大きさになる。卵母細胞の直径は $400\sim 500\mu\text{m}$ と増大し、大部分は活発な卵黄蓄積を行っている(図4-d,e)。また、周辺仁期および卵黄胞期の卵母細胞も認められる。

産卵期の4~5月の卵巢はおもに卵黄形成途上の卵母細胞、核移動期(図4-f)、および完熟卵(図4-g)からなるが、周辺仁期および卵黄胞期の卵母細胞も認められる(図2-a)。また、排卵した個体では卵巢腔が完熟卵で充満し、卵巢は周年を通じて最も肥大した状態となる(図1-a)。

産卵期が終了した5~6月には卵巢は縮小し、卵巢薄板内には染色仁期および周辺仁期の卵母細胞に加えて卵黄形成途上で退行したと思われる退化濾胞が数多く認められるようになる(図5-c)。また、卵巢腔内にはしばしば残留卵が存在する。

以上のニジカジカにおける卵巢卵の季節的变化に基づいて、本種の生殖周期を便宜的に回復期(7~3月)、産卵期(4~5月)、退縮期(5~6月)の3期に分け、以下の観察における指標として用いた。

3) ニジカジカにおける卵巢壁上皮細胞および卵巢薄板上皮細胞の微細構造の季節変化

a. 回復期

a-1. 卵巢薄板上皮細胞

回復期初期の7月の卵巢薄板上皮細胞の電顕像を図6に示した。卵巢薄板上皮は卵濾胞の外側の結合組織を隔てる基底膜上に、複数の細胞が重なり

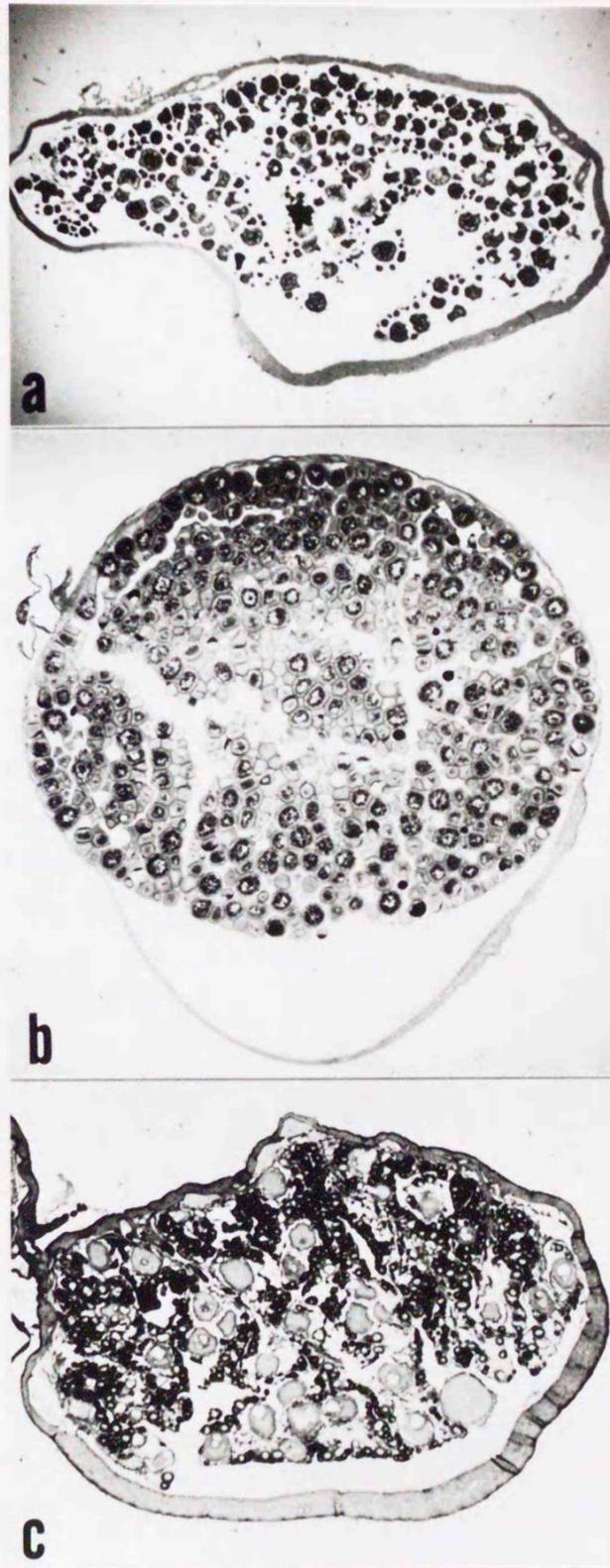


図5. ニジカジカ卵巢の組織像.

- a. 10月の卵巢. X 10
- b. 3月の卵巢. X 5.4
- c. 5月の卵巢. X 11



図6. 回復期（7月）の卵巢薄板上皮細胞の電顕像。
 m, ミトコンドリア. n, 核. O, 卵母細胞. OC, 卵巢腔.
 基底下の結合組織を隔てる基底膜（bm）上に数個の細胞が重なって
 いる。細胞は接着斑（d）により結合している。退行状態を示す細胞
 （矢印）が認められる。X 10,000

合って構成されている。細胞は高さ $4\mu\text{m}$ 、幅 $7\mu\text{m}$ と、概ね扁平な形態を呈する。隣接する上皮細胞は接着斑によって数箇所では結合している。上皮細胞の自由縁には短い微絨毛がまばらに存在し、まれに纖毛を有する細胞も認められる（図 7-a）。細胞内には不定形の核がほぼ中心に位置し、それを比較的薄い細胞質が取り囲んでいる。この時期の上皮細胞の中には、退行状態を示すものもしばしば認められる（図 6）。このような細胞では、細胞内の微細纖維およびリボソームが少なく細胞質の電子密度が低い。細胞内には膨張したミトコンドリアや空胞が認められる。また、核は周辺部で染色質の凝縮を起こしている。

10 月になると卵巢薄板上皮細胞は基底膜上にほぼ単層に並ぶようになるが、細胞の微細形態には 7 月と比べて大きな差異は認められない（図 7-b）。回復期の卵巢薄板上皮細胞の細胞質内には、電子密度の高い基質と基質内顆粒を有するミトコンドリアが多数認められ、これらのミトコンドリアが分裂、増殖している像も見られる。細胞質全体には多くの遊離リボソームが分布している。自由縁側の細胞質にはやや発達したゴルジ装置および滑面の小胞が認められ、これらの滑面小胞がしばしば卵巢腔に向って開口している（図 7-a, b）。これらの開口像の出現頻度は回復期間中を通じてやや増加する傾向を見せる。回復期後期の 3 月になると、細胞質の基底部側に粗面小胞体が発達してくる（図 8）。

卵巢薄板上皮細胞の細胞質内にはこの時期を通じて多くの微細纖維が見られるのが特徴的である。また、これらの纖維は主に核の周辺に存在するが、小さな細胞質塊を中心に渦巻き状に集合している像もしばしば認められる（図 7-a, b）。

a - 2. 卵巢壁上皮細胞

回復期前期（7~10 月）の卵巢壁上皮細胞は上皮下の結合組織を隔てる基底膜上に単層に並ぶ（図 9）。細胞は高さが約 $6\mu\text{m}$ 、幅 $5\mu\text{m}$ の立方状の

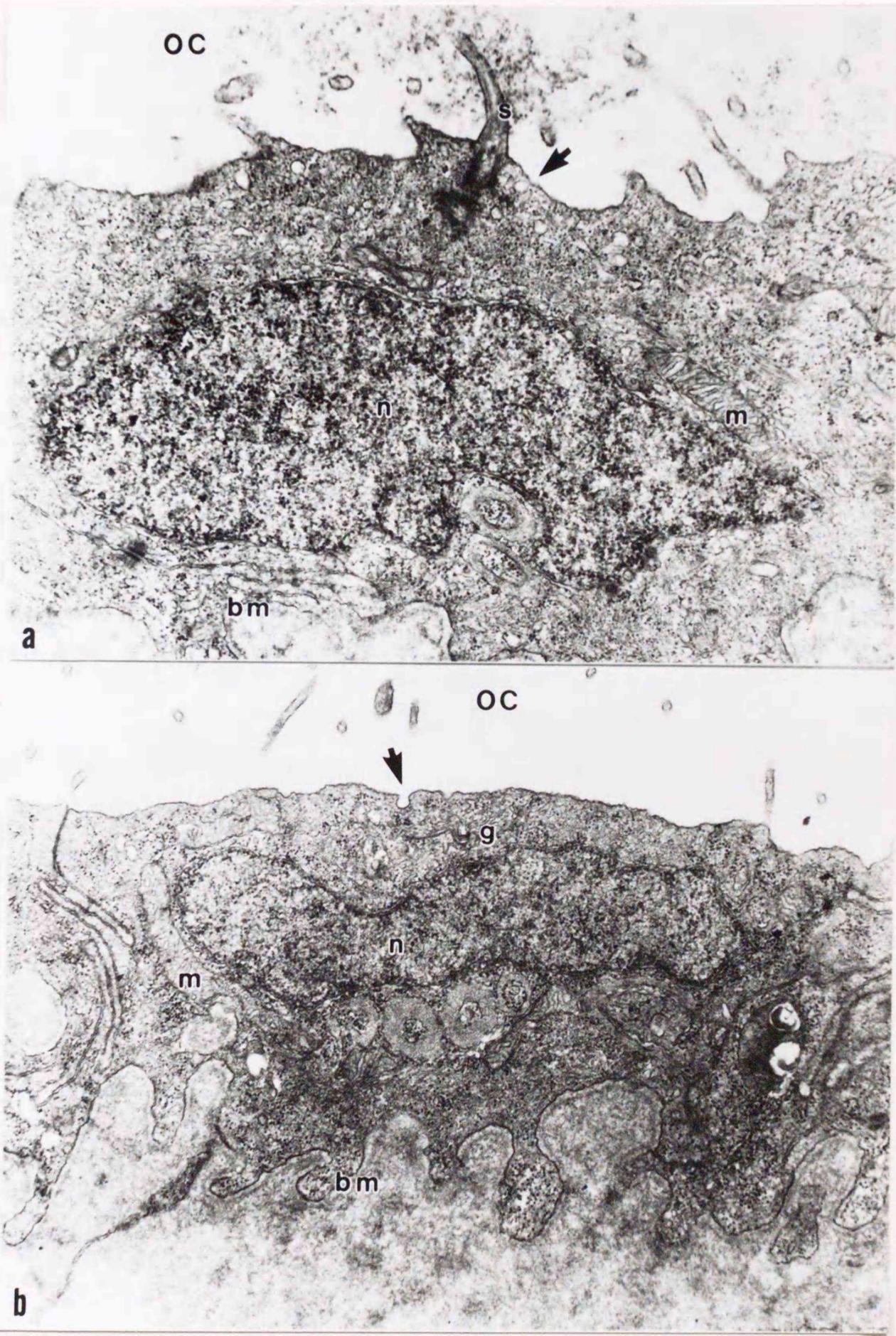


図7. 回復期の卵巢薄板上皮細胞の電顕像.

bm, 基底膜. g, ゴルジ装置. m, ミトコンドリア. n, 核.

OC, 卵巢腔. s, 繊毛. 自由縁で滑面の小胞が開口している (矢印).

a. 7月の卵巢薄板上皮細胞. X 20,000

b. 10月の卵巢薄板上皮細胞. X 20,000

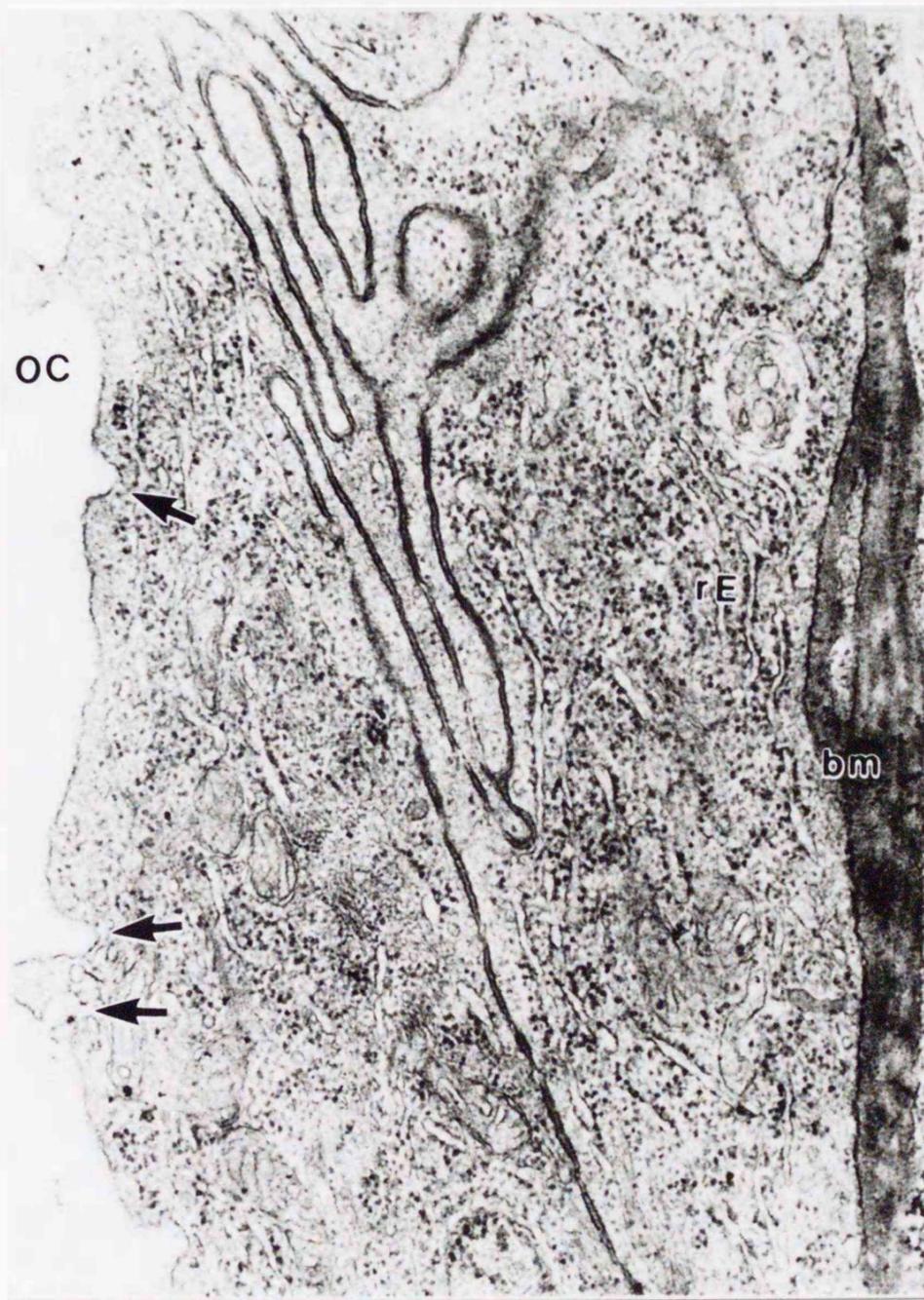


図8. 回復期（3月）の卵巢薄板上皮細胞の電顕像.
bm, 基底膜. OC, 卵巢腔. rE, 粗面小胞体.
自由縁に滑面小胞の開口像が認められる（矢印）. X 40,000

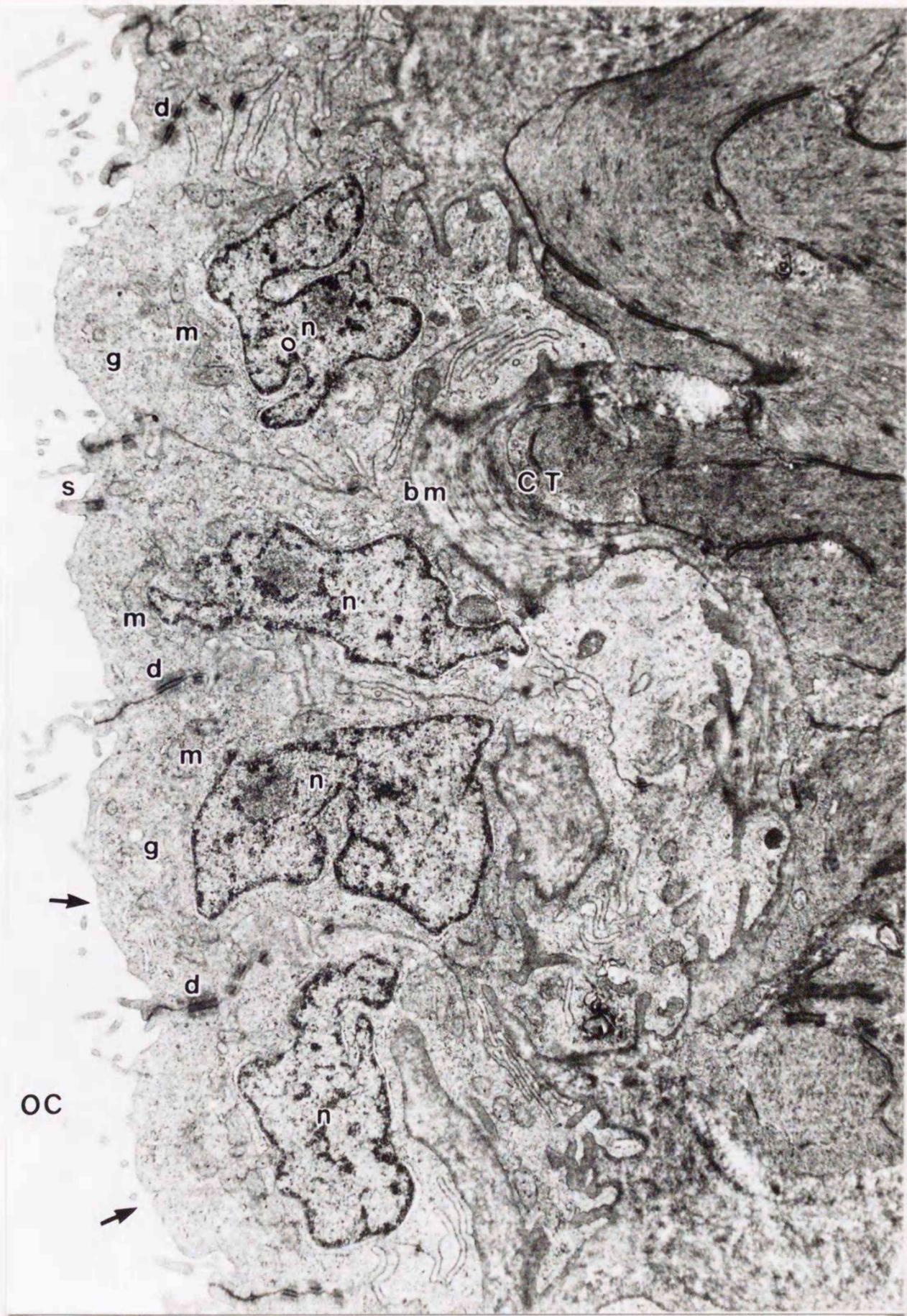


図9. 回復期（7月）の卵巣壁上皮細胞の電顕像。
 bm, 基底膜. CT, 結合組織. d, 接着斑. g, ゴルジ装置.
 m, ミトコンドリア. n, 核. OC, 卵巣腔. s, 繊毛.
 自由縁に滑面小胞の開口像（矢印）が認められる。X 10,000

形態を呈する。隣接する細胞は接着斑によって互いに結合している。細胞の自由縁には短い微絨毛がまばらに存在し、まれに繊毛も認められる。細胞のほぼ中心に位置する核は複雑な陥入を見せ、しばしば多葉状を呈する。細胞内には基質内顆粒を有するミトコンドリアが多数認められ、多くの遊離リボゾームが細胞質全体に分布する。細胞質の自由縁側にはゴルジ装置が認められ、滑面の小胞が自由縁で開口している像が若干認められる。また、細胞の基底部および側縁部でも、細胞の外側に向って滑面の小胞が開口している。

回復期後期の3月になると、卵巢壁上皮細胞は高さが約 $10\mu\text{m}$ と肥厚する(図10)。細胞の自由縁には多数の微絨毛が認められる。細胞内にはやや基底よりに不定形の核が位置する。細胞質内には多数のミトコンドリアおよびゴルジ装置と共に、粗面小胞体が著しく発達している。また、自由縁での滑面小胞の開口像が増加傾向を見せる。上皮細胞の基底部および側縁付近では滑面の小胞がそれぞれ基底膜および細胞間隙に向って開口している像が認められる。

a-3. 血管系

図11-aに3月の卵巢薄板の結合組織中の毛細血管の断面を示した。毛細血管は回復期の全期間を通じて卵濾胞の外側を取り巻く結合組織中、および卵巢壁の平滑筋組織内に認められる。毛細血管内皮細胞の細胞質の周縁部には多くの小胞状の構造が見られる。また、これらの小胞が血管内腔、および血管の周囲の基底膜に向って開口している像が認められる(図11-b)。

b. 産卵期

b-1. 卵巢薄板上皮細胞

産卵期の卵巢薄板上皮細胞の電顕像を図12に示した。この時期の卵巢薄板上皮細胞は基底下の結合組織を隔てる基底膜上に単層に並ぶ。細胞の外形



図10. 回復期（3月）の卵巢壁上皮細胞の電顕像。
 bm, 基底膜. CT, 結合組織. d, 接着斑. g, ゴルジ装置. m, ミトコ
 ンドリア. n, 核. OC, 卵巢腔. rE, 粗面小胞体.
 基底部に小胞の開口像（矢印）が認められる. X 20,000



図11. 回復期の卵巢薄板中の毛細血管の電顕像。
 CT, 結合組織. et, 毛細血管内皮細胞. LE, 卵巢薄板上皮細胞.
 a. 3月の毛細血管の電顕像. X 5,250
 b. 7月の毛細血管内皮細胞の電顕像. 細胞質中に小胞が認められ、細胞の周囲に向かって開口（矢印）している.
 X 20,000

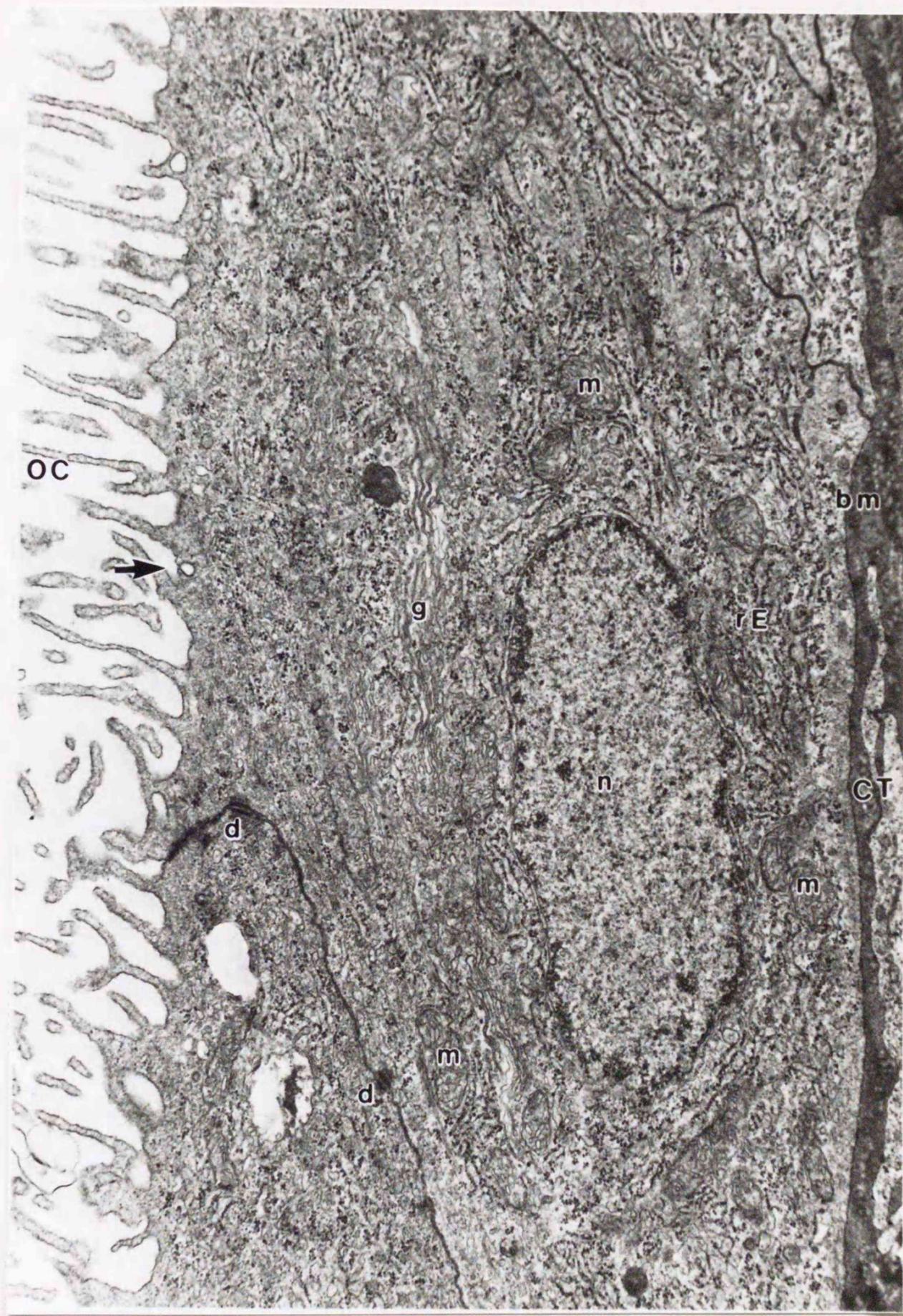


図12. 産卵期の卵巢薄板上皮細胞の電顕像。
 bm, 基底膜. CT, 結合組織. d, 接着斑. g, ゴルジ装置. m, ミトコ
 ンドリア. n, 核. OC, 卵巢腔. rE, 粗面小胞体.
 自由縁に滑面小胞の開口像(矢印)が認められる. X 20,000

は高さ $6\mu\text{m}$ 、幅 $9\mu\text{m}$ と比較的扁平なものから、高さ $12\mu\text{m}$ 、幅 $5\mu\text{m}$ と回復期に比べ高さを増し立方状を呈するものまでが認められる。隣接する上皮細胞は接着斑によって結合している。卵巢腔に面する自由縁には部位によって多少の差はあるが、かなり発達した微絨毛が見られ、まれに纖毛を持つ細胞が観察される (図 14-b)。核は回復期に比べやや丸みを帯び、細胞の中心よりやや基部側に位置する。細胞質内にはすでに回復期から発達していたミトコンドリア、ゴルジ装置に加え、粗面小胞体が著しい発達を見せる (図 12)。

細胞の基部および側縁部では細胞の外側に向って開口している滑面小胞の数が増加している (図 13-a, b)。これらの滑面小胞の近傍には発達した粗面小胞体が認められ (図 13-c)、粗面小胞体からは滑面の小胞が突出している。自由縁側の細胞質内にはゴルジ装置が発達し、粗面小胞体から分離したと思われる滑面の小胞がゴルジ層板と融合しており (図 13-d)、さらに、電子密度のやや高いゴルジ小胞がゴルジ層板から放出されている像も認められる (図 13-d)。これらのゴルジ小胞は細胞の自由縁付近で互に融合して空胞状の構造を呈し、卵巢腔に面した自由縁で開口している像が認められる (図 14-a)。この時期の細胞質内では、遊離リボソームが数個集合してポリソームを形成し、細胞質のほぼ全域に分布する (図 12)。自由縁付近の細胞質はポリソームなどの細胞内小器官をあまり含んでおらず、電子密度は比較的低い (図 14-b)。また、自由縁に多数見られる微絨毛も電子密度が低く、これらの先端部はしばしばポリープ状に膨らみ、それらが離断して卵巢腔に浮遊しており (図 14-b)、黒住 (1965) の分泌形態の分類に従うとミクロアポクリン分泌の形態を呈する。

b-2. 卵巢壁上皮細胞

産卵期の卵巢壁上皮細胞の電顕像を図 15 に示した。卵巢壁上皮細胞は基底下の平滑筋および結合組織の層を隔てる基底膜上に単層に並び、高さ約

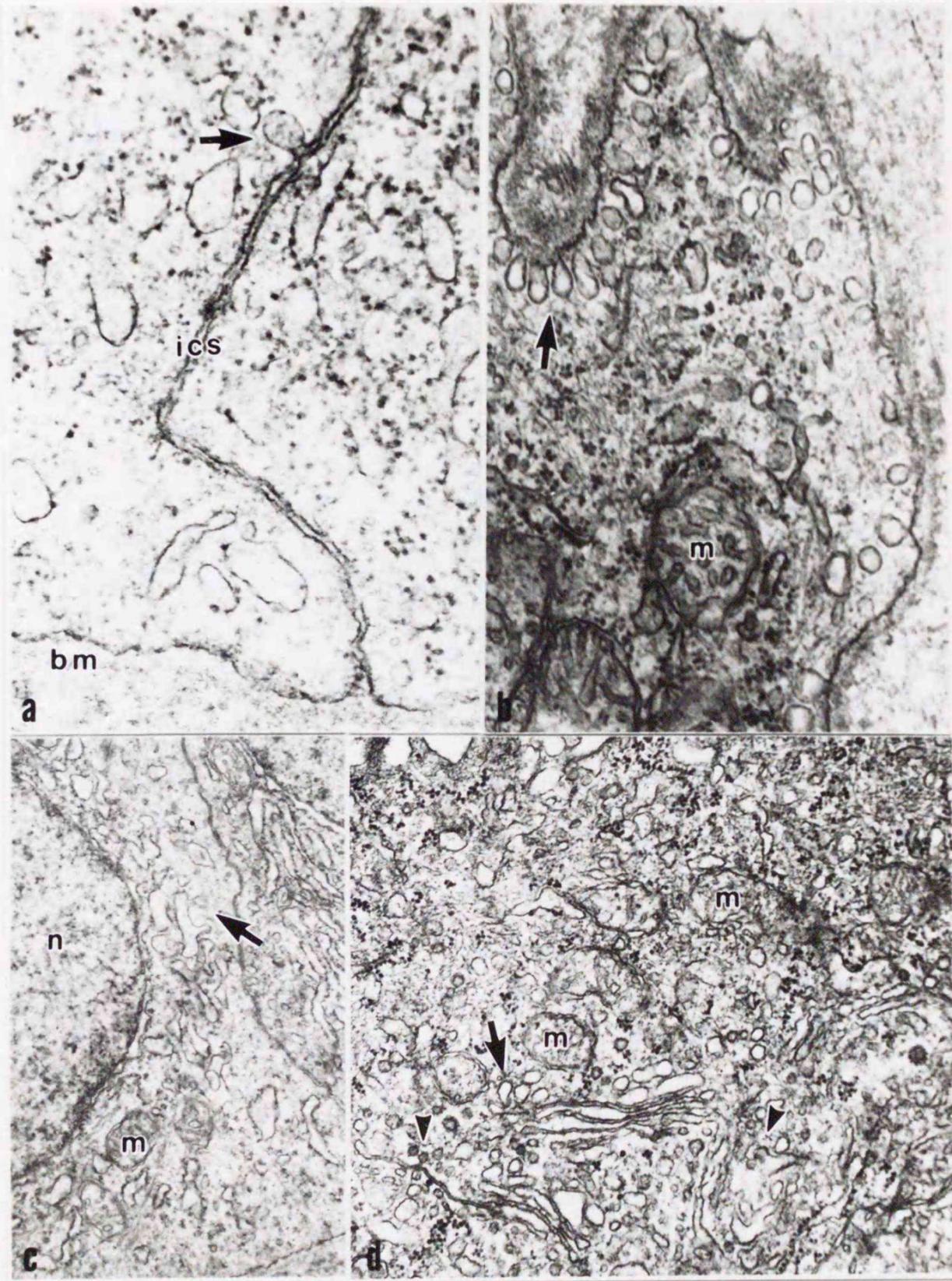


図13. 産卵期の卵巢薄板上皮細胞の電顕像.

bm, 基底膜. ics, 細胞間隙. m, ミトコンドリア. n, 核

- a. 細胞間隙に開口する滑面小胞 (矢印). 滑面小胞の近傍に粗面小胞体が存在する. X 60,000
- b. 基底部に開口する滑面小胞 (矢印). 滑面小胞の近傍に粗面小胞体が存在する. X 40,000
- c. 粗面小胞体から分離途上の滑面の小胞 (矢印). X 15,000
- d. 粗面小胞体から放出されたとと思われる滑面の小胞がゴルジ層板と融合している (矢印). ゴルジ層板からは電子密度の高いゴルジ小胞 (矢尻) が放出されている. X 30,000

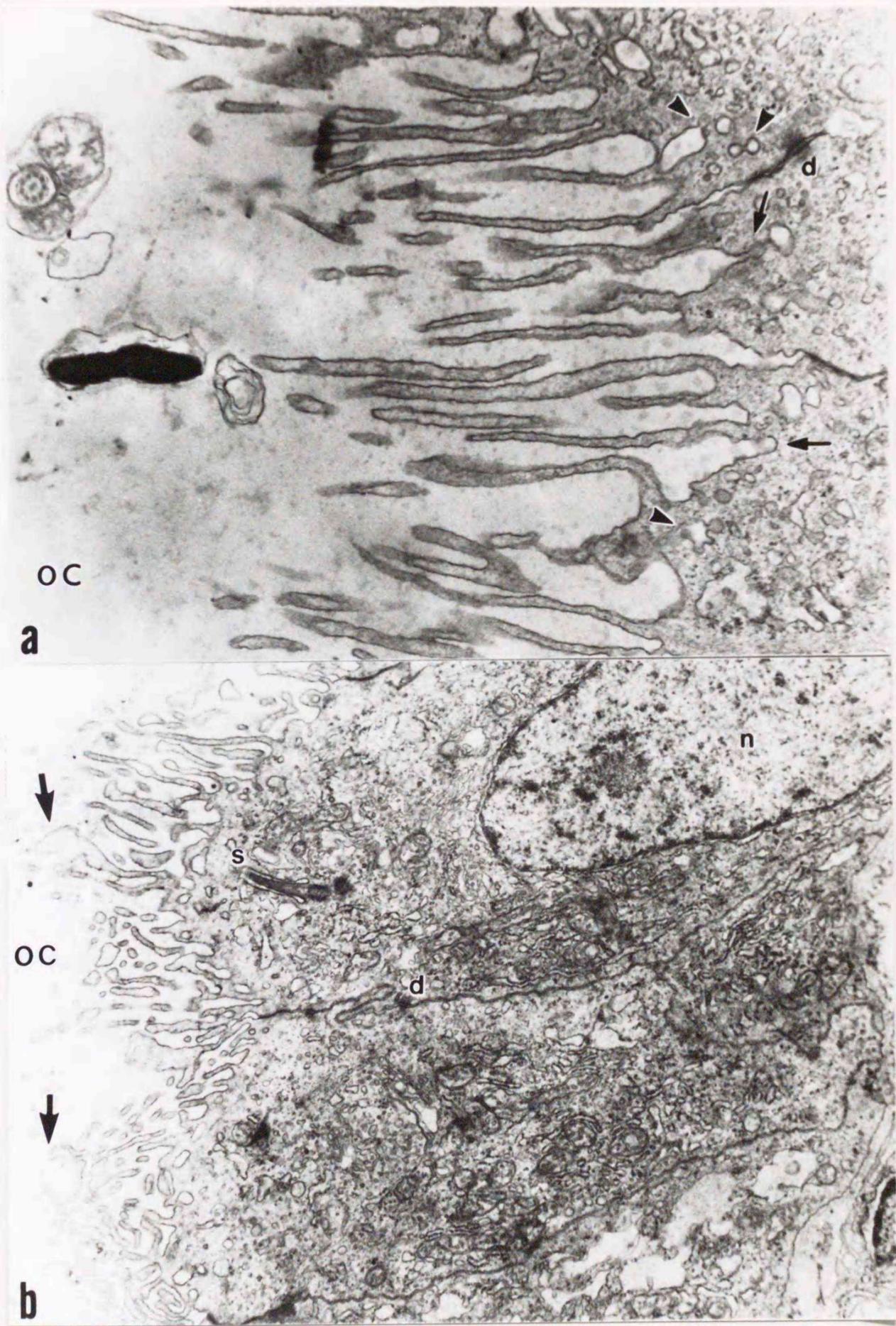


図14. 産卵期の卵巣薄板上皮細胞の自由縁付近の電顕像.

d, 接着斑. n, 核. OC, 卵巣腔.

- a. 滑面の小胞が融合して空胞状の構造を取り (矢尻), 自由縁で開口する (矢印). 卵巣腔には精子が認められる. X 20,000
- b. 自由縁に見られる微絨毛の先端からのマイクロポクリン分泌像 (矢印). 中心体を伴う繊毛 (s) が認められる. X 12,000

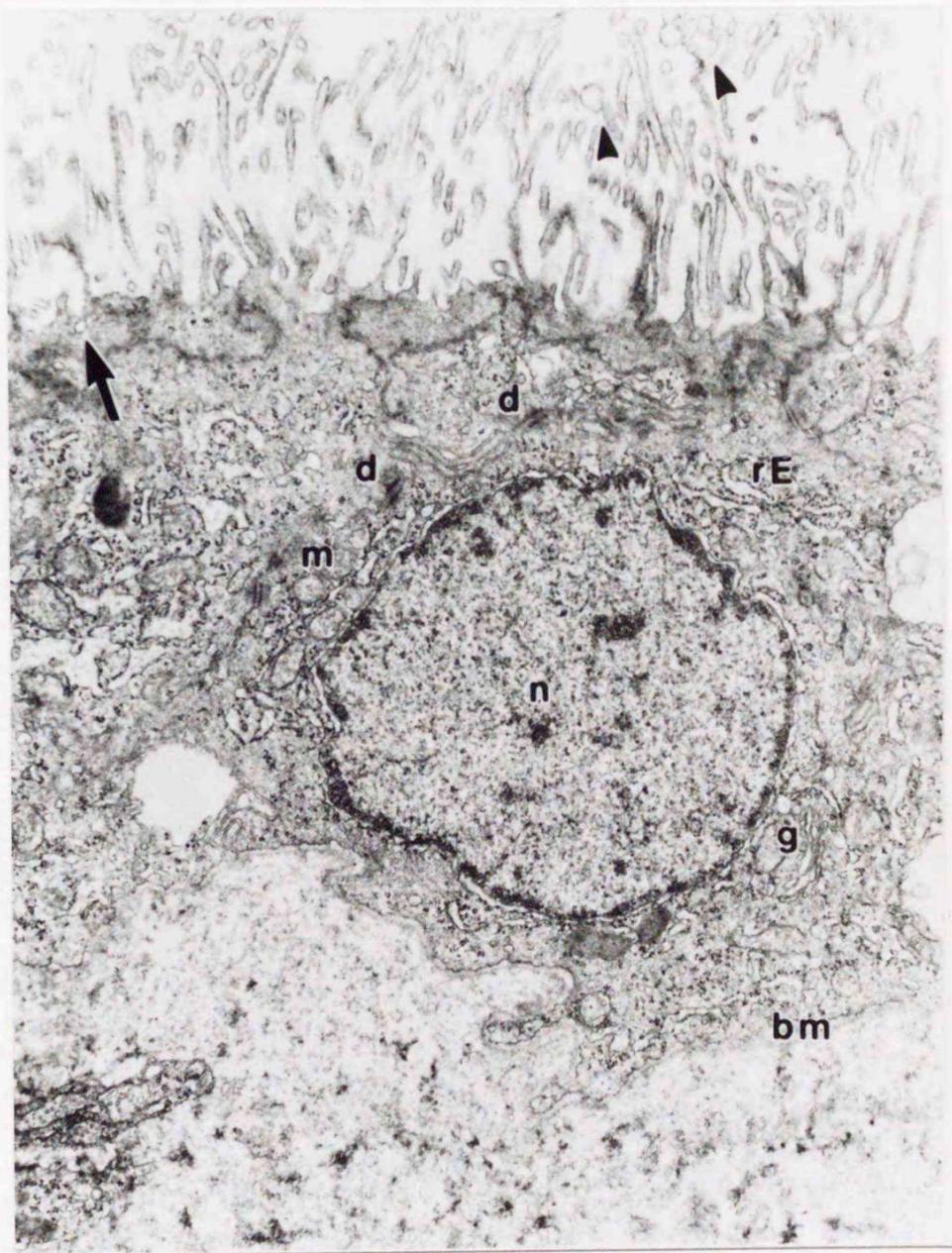


図15. 産卵期の卵巢壁上皮細胞の電顕像。
 bm, 基底膜. d, 接着斑. g, ゴルジ装置. m, ミトコンドリア.
 n, 核. rE, 粗面小胞体.
 自由縁では開口像(矢印)、および微絨毛先端からのマイクロアポクリン分泌像(矢尻)が認められる. X 12,500

10 μ m、幅約 5 μ m の立方状を呈する。細胞の形態的特徴はこの時期の卵巢薄板上皮細胞と同様で、ポリソーム、粗面小胞体、およびゴルジ装置が発達している。自由縁には滑面小胞の開口像が認められ、微絨毛の先端部ではマイクロポクリン分泌像が見られる。

b-3. 血管系

産卵期の卵巢薄板上皮細胞層の基底下の結合組織内を走る毛細血管の内皮細胞の電顕像を図 16 に示した。産卵期に入ると、毛細血管内皮細胞の細胞質周縁部には極めて多くの小胞が認められるようになる。これらの小胞の多くは毛細血管内腔、および内皮細胞の周囲を取り巻く基底膜に向かって開口しており、血管内腔と周囲の組織との間の物質の移動が活発なことをうかがわせる。

c. 退縮期

c-1. 卵巢薄板上皮細胞

退縮期の卵巢薄板上皮細胞の電顕像を図 17 に示した。この時期の卵巢薄板上皮細胞は産卵期と同様に基底膜上に単層に配列しているが、一部では単層の配列を乱し、数個の細胞が重なった状態のものも認められる。細胞の形態は概ね扁平なものが多く、隣接する細胞は接着斑によって結合している。この時期の細胞にはなお粗面小胞体、ゴルジ装置などの細胞内小器官がよく発達しており、高い分泌活性を有するものも認められる。これらの分泌の形態は多様で、産卵期と同様な開口分泌（図 17）、および微絨毛先端からのマイクロポクリン分泌（図 18-a）に加えて、多胞体と目される小胞を多数含んだ大型の空胞状構造物をアポクリン分泌によって卵巢腔に放出する像などが認められる（図 18-b）。この時期の上皮細胞の中には、細胞質の電子密度が低く、拡張したミトコンドリア以外には細胞内小器官をほとんど欠き、退行状態にあることを示すものも認められ、さらにこれらの細胞が卵巢腔に向かって突出し、上皮

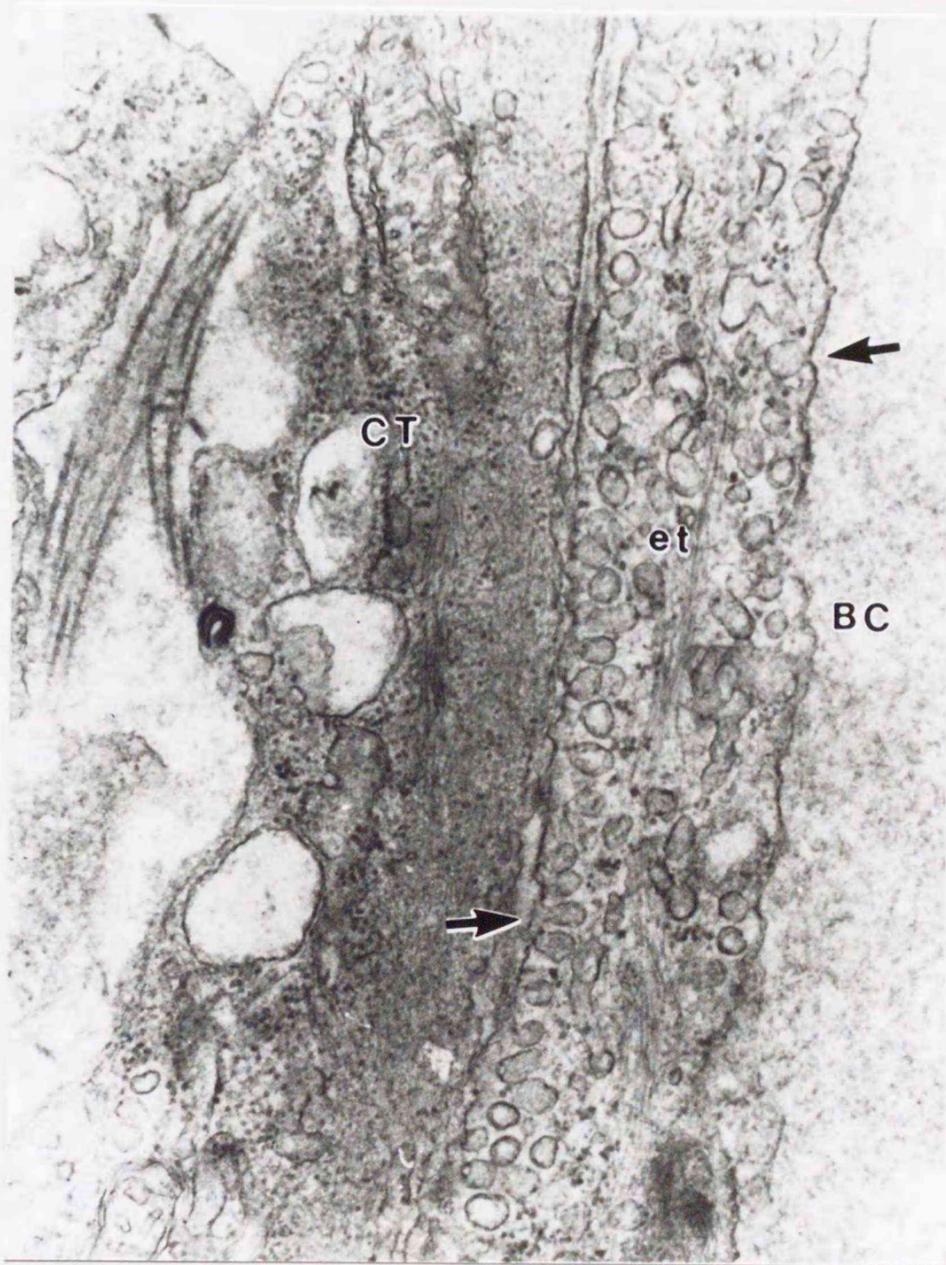


図16. 産卵期の卵巣薄板内の毛細血管内皮細胞の電顕像.
BC, 毛細血管内腔. CT, 結合組織. et, 内皮細胞.
多数の滑面小胞が血管内腔、および血管外の組織に向かって開口している (矢印). X 40,000

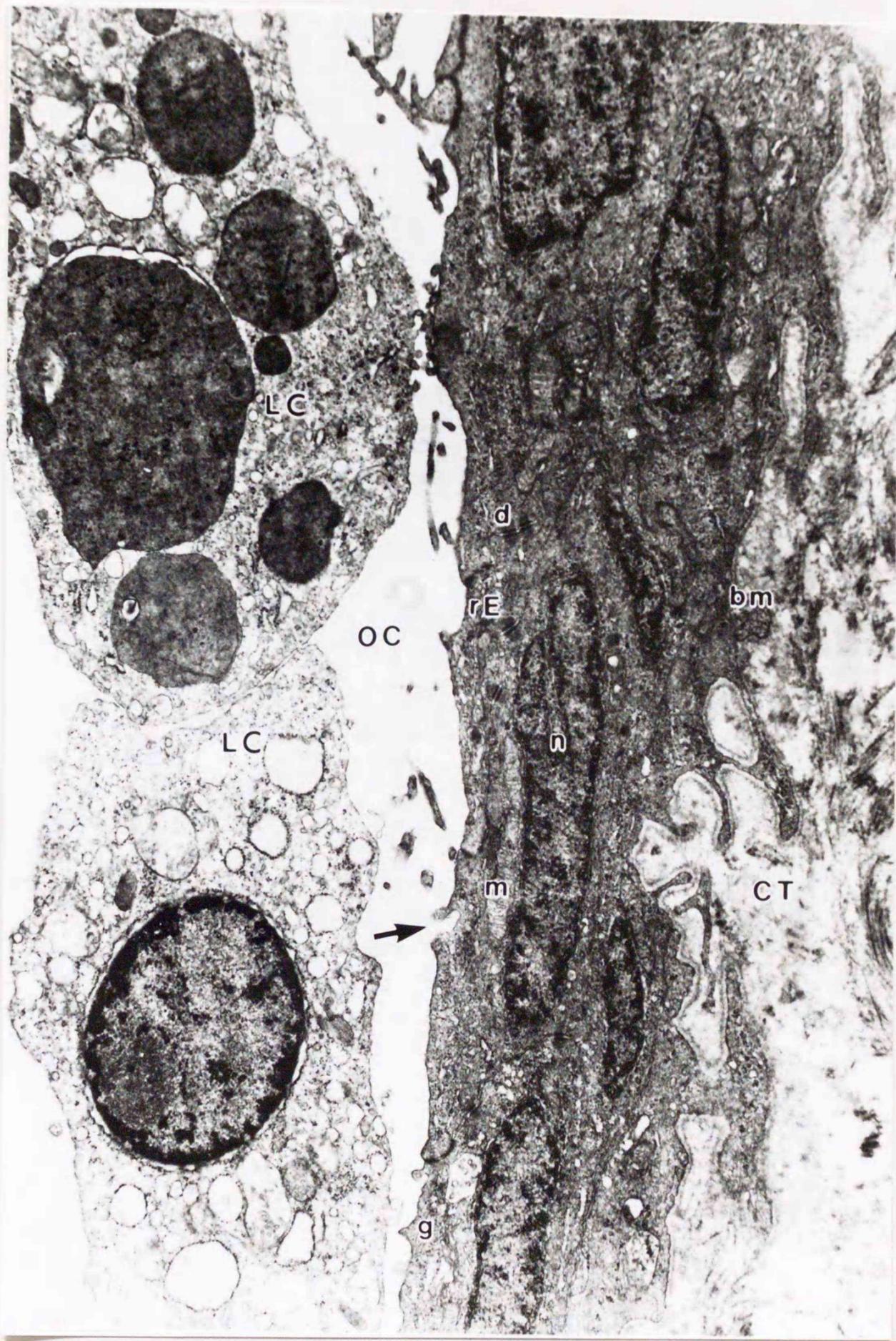


図17. 退縮期の卵巢薄板上皮細胞の電顕像。
 bm, 基底膜. CT, 結合組織. d, 接着斑. g, ゴルジ装置. m, ミトコン
 ドリア. n, 核. rE, 粗面小胞体. 基底膜上に数個の細胞が
 重なり合っている. 自由縁には滑面小胞の開口像が認められる (矢印).
 卵巢腔 (OC) にはリンパ球 (LC) が侵入している. X 15,000

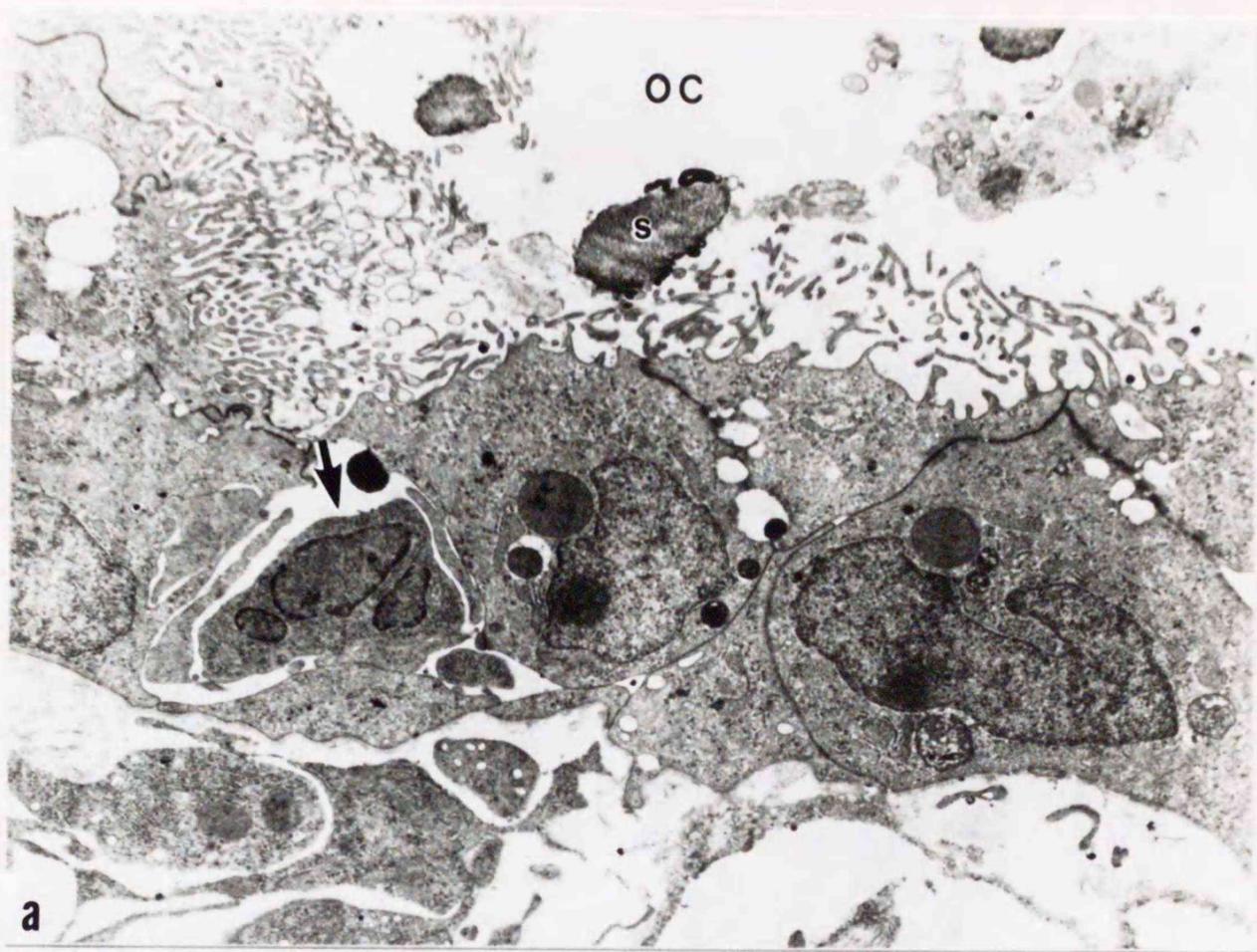


図18. 退縮期の卵巢薄板上皮細胞の電顕像。
 a. 微絨毛先端にはマイクロアポクリン分泌像が認められる。卵巢腔(OC)には異常な形態を示す精子(s)が見られる。細胞間隙には分葉状の核を持つ単球(矢印)が認められる。X 7,000
 b. 自由縁に多数の小胞を含む多胞体様の構造物が突出している(矢印)。X 20,000

組織から分離するという崩壊過程を示唆する像も認められる (図 19)。

c - 2 . 卵巢壁上皮細胞

退縮期の卵巢壁上皮細胞の電顕像を図 20 に示した。この時期の卵巢壁上皮細胞は基底膜上に単層に並び、産卵期と比較して高さがやや減少している。自由縁には微絨毛が見られ、その先端ではミクロアポクリン分泌像が認められるが、その頻度は低い。細胞内のミトコンドリアは基質の電子密度が高く、基質内顆粒を持っている。自由縁付近の細胞質にはゴルジ装置が発達している。細胞内にはまれに大型の空胞が認められ、これらの空胞が自由縁で卵巢腔に向かって大きく突出している像が認められる (図 21)。

c - 3 . 血管系

図 22 に退縮期の毛細血管の電顕像を示した。この時期の毛細血管内皮細胞には産卵期と同様に物質の移動を示唆する小胞が認められるが、その数は産卵期と比較して少ない。

4) ニジカジカおよびスジアイナメにおける血液卵巢腔関門の機能変化

a . ニジカジカ

a - 1 . 回復期

図 23-a は HRP を投与された 10 月の個体の卵巢薄板上皮細胞の電顕像である。HRP は上皮細胞基底下の結合組織中に広く分布しており、さらに上皮細胞基底下の基底膜を透過し、上皮細胞の間隙に侵入している。細胞間隙に侵入した HRP は自由縁に近い部位まで到達しているが、卵巢腔には入っていない。HRP の侵入が停止している部位を高倍率で観察すると、自由縁に最も近い接着斑の、さらに卵巢腔寄りに閉鎖帯結合が存在し、HRP はこの閉鎖帯結合

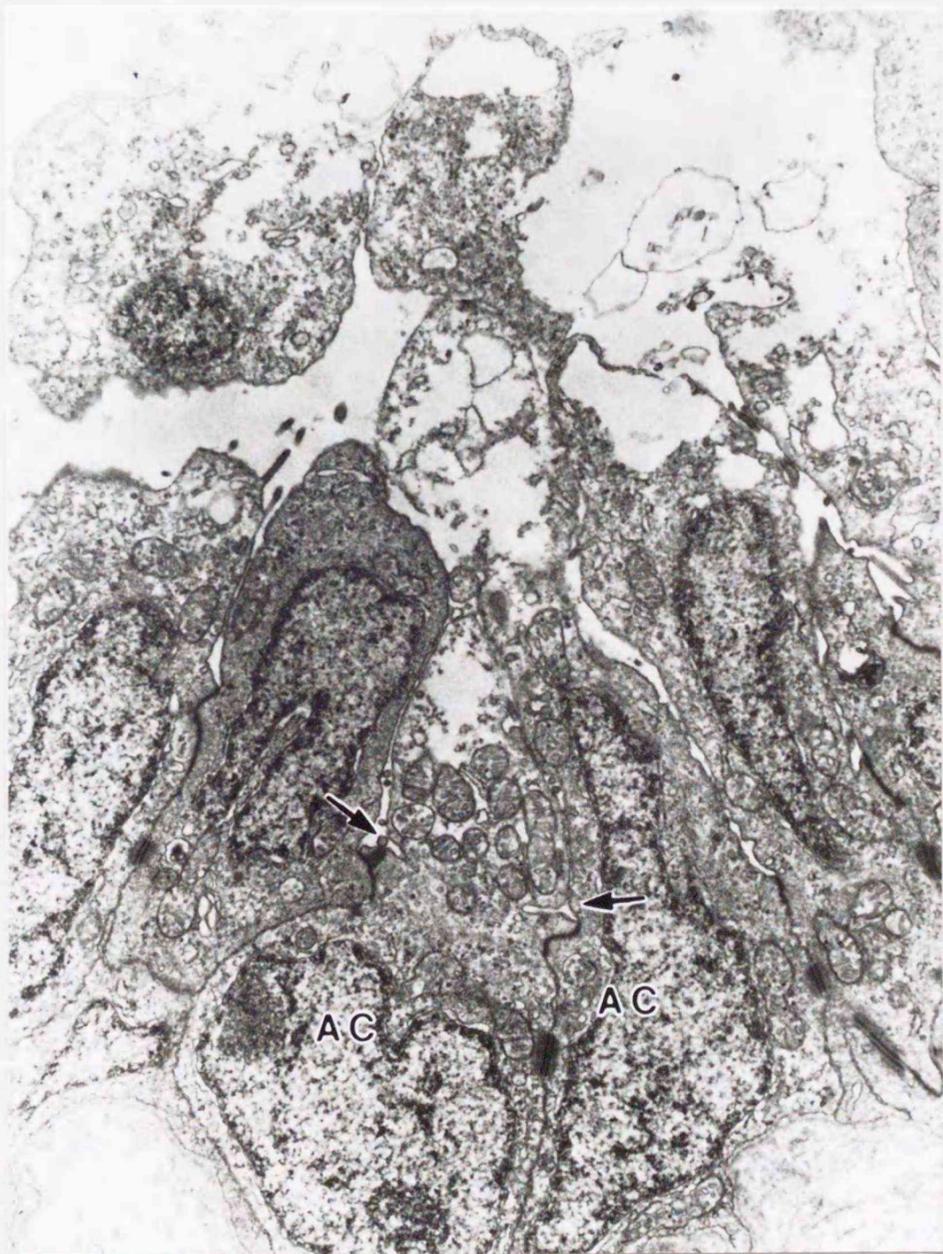


図19. 退縮期の卵巣薄板上皮細胞の電顕像。
退行状態を示す細胞（AC）が卵巣腔に突出している。細胞質にくびれ（矢印）が生じている。上皮細胞から分離して卵巣腔に浮遊している細胞質も認められる。 X 10,000

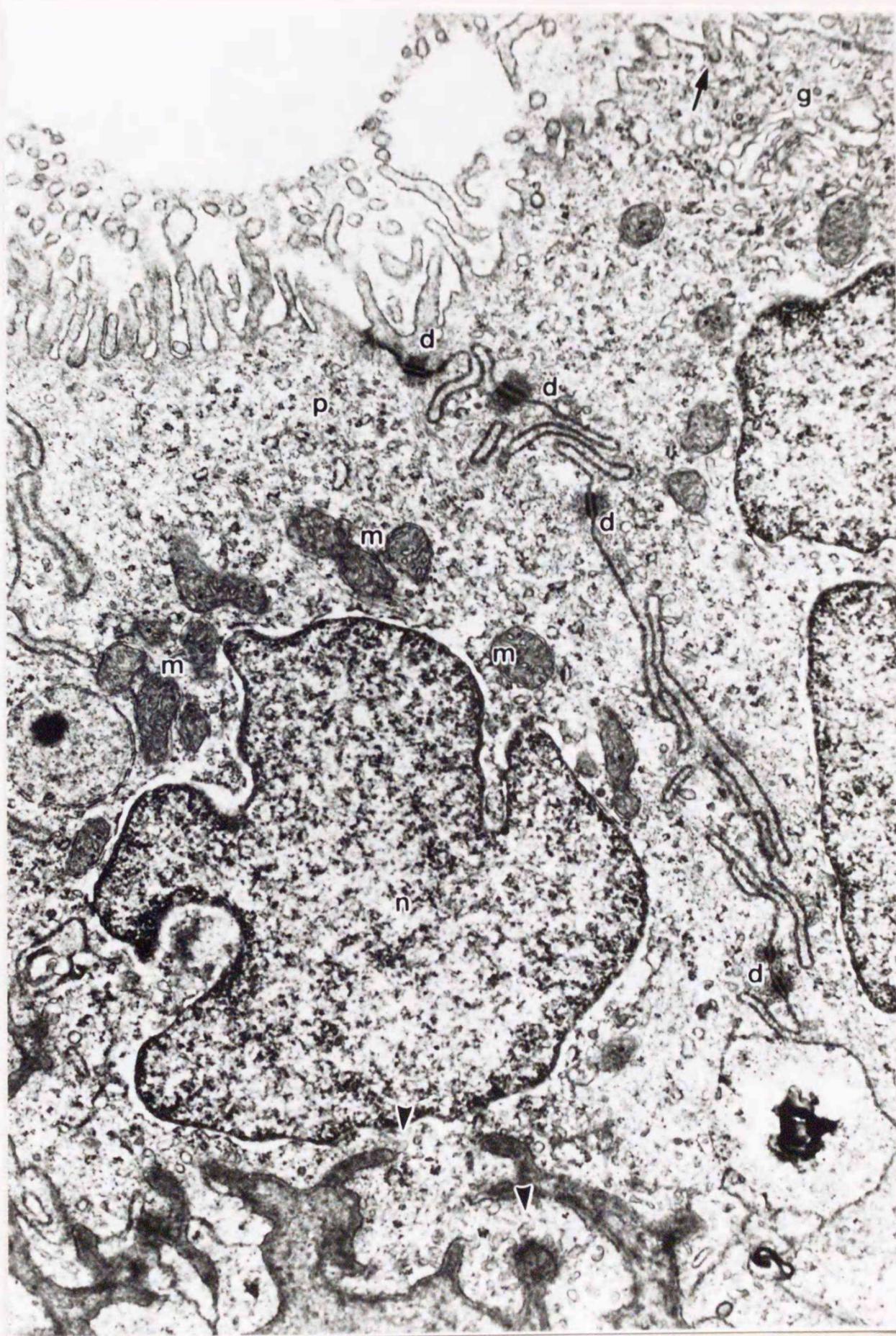


図20. 退縮期の卵巣壁上皮細胞の電顕像。
 d, 接着斑. g, ゴルジ装置. m, ミトコンドリア. n, 核. p, ポリソーム.
 基底部には電子密度の高い小胞が開口している (矢尻). 自由縁では
 滑面小胞の開口像が認められる (矢印). 微絨毛先端からはマイクロ
 ポクリン分泌像が認められる. X 20,000

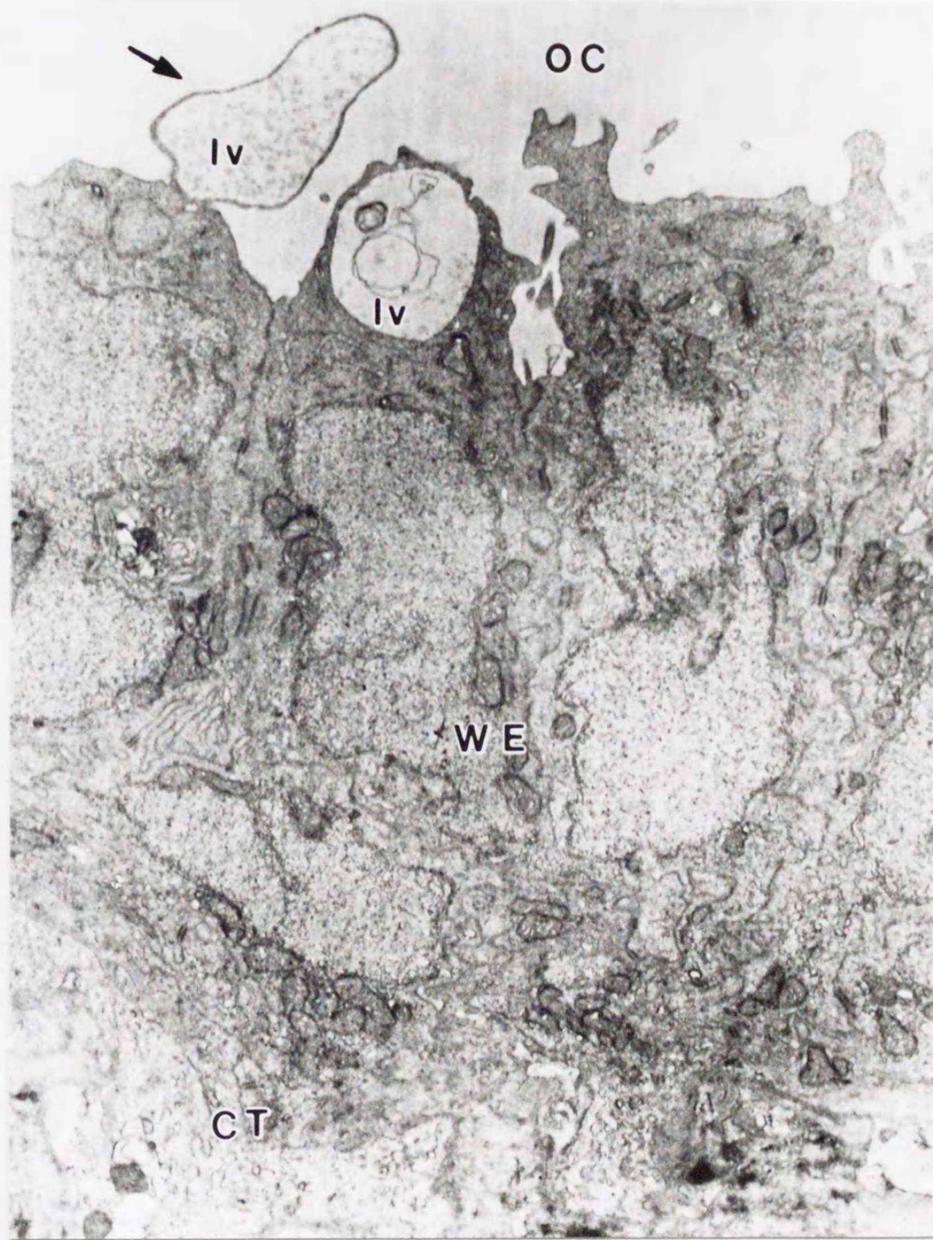


図21. 退縮期の卵巢壁上皮細胞の電顕像。
CT, 結合組織. OC, 卵巢腔. WE, 卵巢壁上皮細胞。
細胞質中に大型の空胞(lv)が見られる。これらの空胞が卵巢腔に
突出している(矢印)。 X 10,000

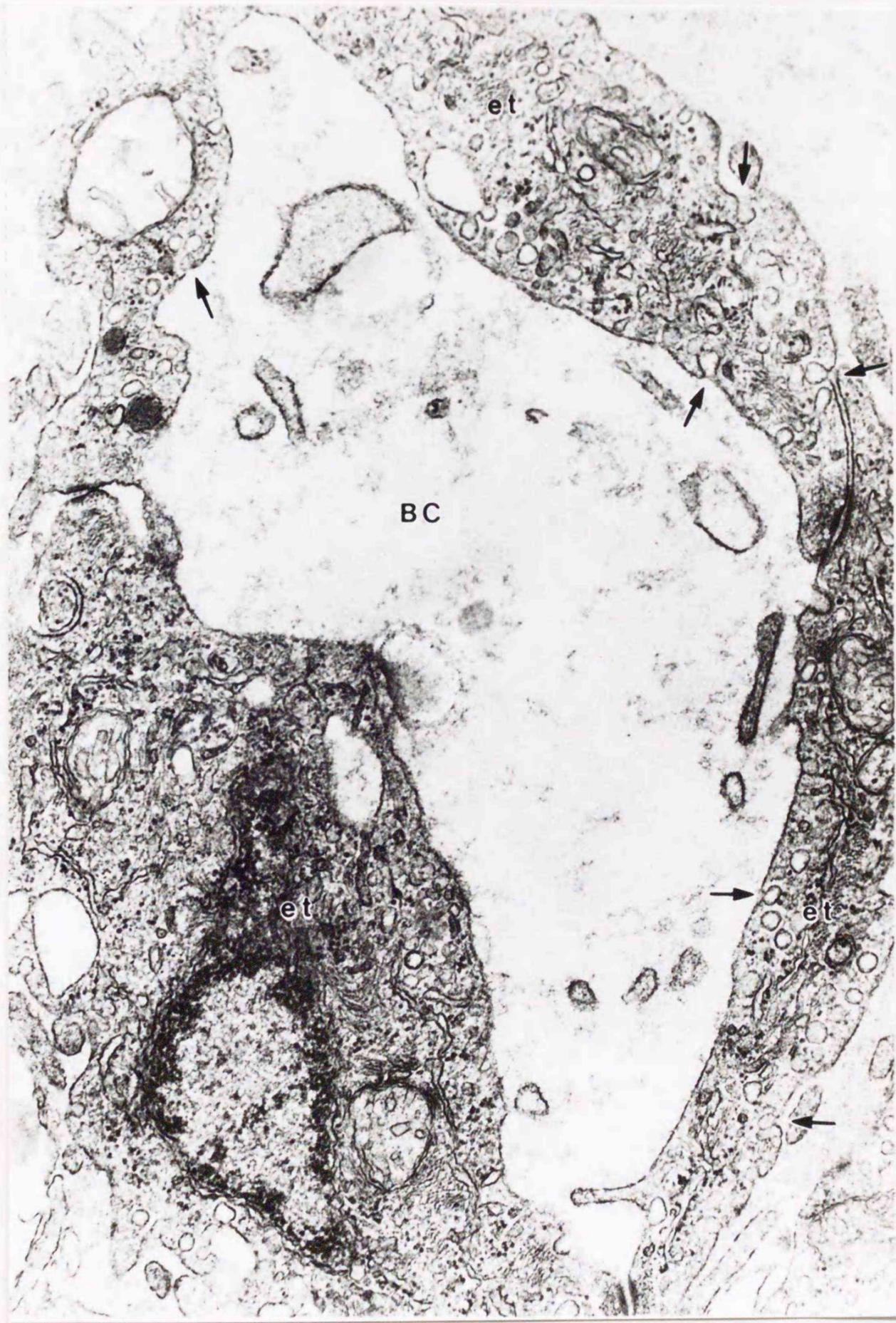


図22. 退縮期の卵巣薄板内の毛細血管の電顕像。
 BC, 毛細血管内腔. et, 内皮細胞。
 内皮細胞内に滑面の小胞が認められる。これらの小胞が血管内腔、
 および周囲の結合組織に向かって開口している(矢印)。X 40,000

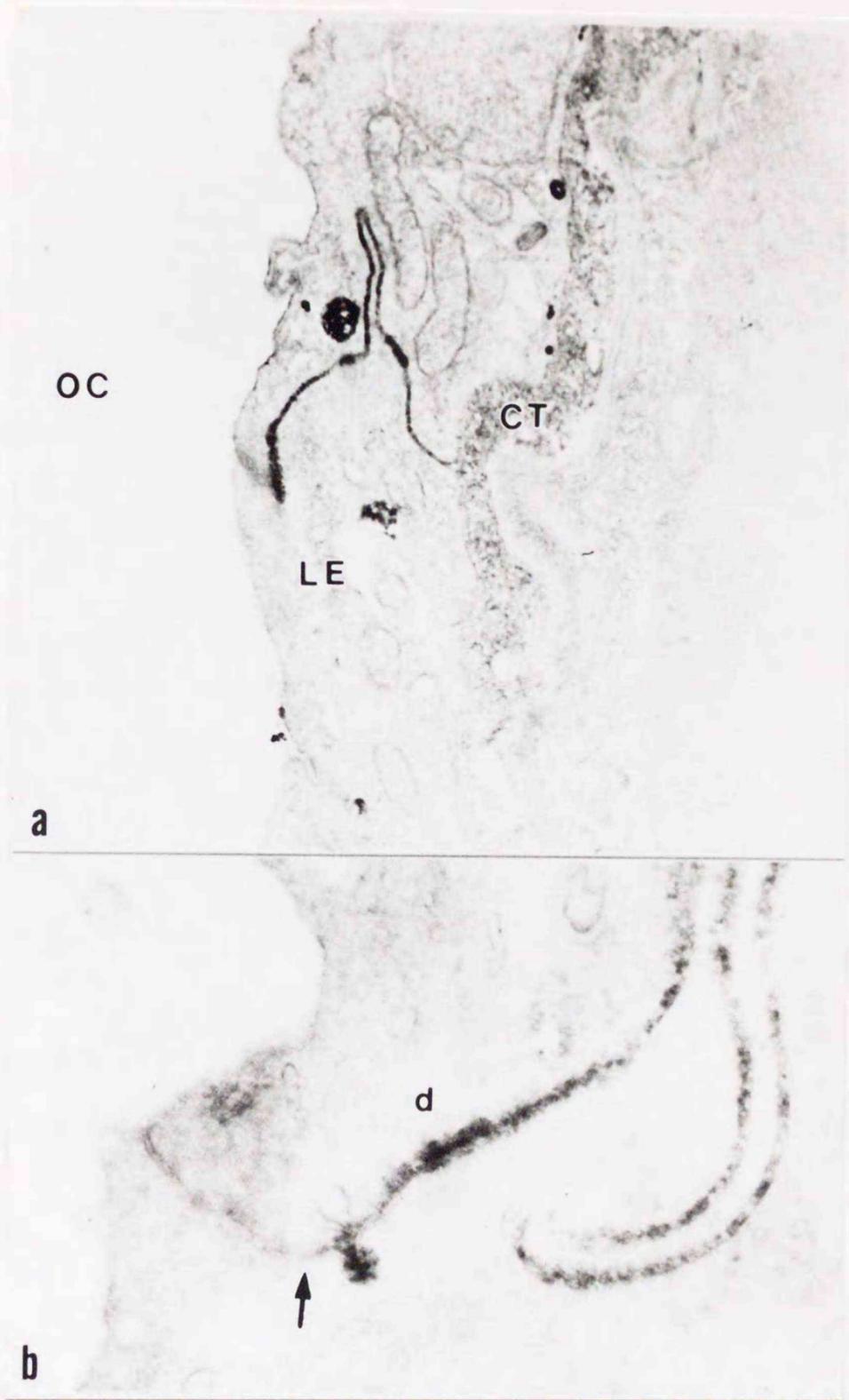


図23. HRPを投与された回復期(10月)の個体の卵巢薄板上皮細胞の電顕像.
 CT, 結合組織. d, 接着斑. LE, 卵巢薄板上皮細胞. OC, 卵巢腔.
 a. HRPは結合組織と卵巢薄板上皮細胞の間隙に認められる. X 15,000
 b. 細胞間隙に侵入したHRPは自由縁近くまで到達しているが, 閉鎖帯結合(矢印)によって侵入を阻止され, 卵巢腔にまでは到達していない. X 60,000

によって卵巣腔への侵入を阻止されている（図 23-b）。また、この時期の卵巣壁上皮細胞でも卵巣薄板上皮細胞と同様に、HRP は自由縁の近くに位置する閉鎖帯結合によって卵巣腔への侵入を阻止されていた（図 24）。このことから回復期の卵巣薄板上皮細胞、および卵巣壁上皮細胞には閉鎖帯結合による血液卵巣腔関門が存在することが示された。

a - 2 . 産卵期

図 25 は HRP を注射した産卵期のニジカジカの卵巣の光顕像である。HRP による重合反応物は、卵巣薄板内の主に結合組織中に多く見出される。また、毛細血管内にもしばしば認められるが、卵濾胞内、および卵巣腔内には全く認められない。

図 26 は同じく HRP 処理後の卵巣薄板上皮細胞付近の電顕像である。HRP は上皮細胞基底下の結合組織の層に認められ、さらに基底膜を透過して卵巣薄板上皮細胞の間隙にも認められる。図 27 は卵巣薄板上皮細胞の自由縁付近を拡大した電顕像である。細胞間隙に進入した HRP は、回復期と同様に上皮細胞の自由縁に最も近い部位の接着斑の外側に存在する閉鎖帯結合によって卵巣腔への進入を阻止されている。このことから回復期に見られた血液卵巣腔関門は産卵期においても存在することが明らかとなった。

卵巣薄板上皮細胞の基底部および側縁部で、細胞の外側に向って開口している滑面小胞内に HRP が認められ、さらに、これらの滑面小胞に由来すると思われる上皮細胞周縁部の滑面小胞内にも電子密度の高い HRP の沈殿が形成された（図 26）。このことから、細胞の周縁部に存在する滑面の小胞は飲小胞であることが確認された。

a - 3 . 退縮期

図 28-a は退縮期の卵巣薄板上皮細胞付近の電顕像である。この時期に

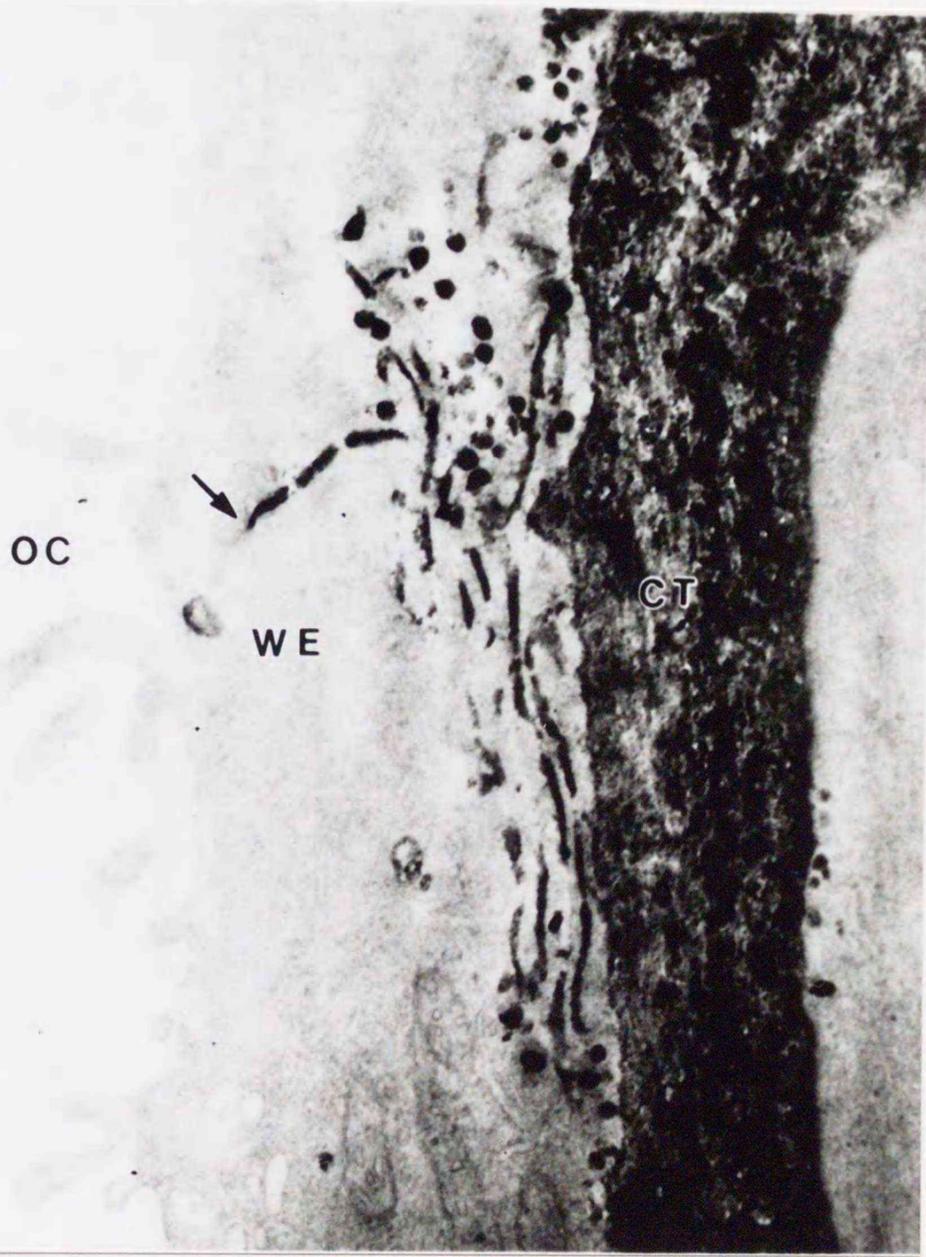


図24. HRPを投与された回復期（10月）の個体の卵巢壁上皮細胞の電顕像。

CT, 結合組織. WE, 卵巢壁上皮細胞. OC, 卵巢腔.
 HRPは卵巢壁上皮細胞基底下の結合組織中に認められる. 卵巢壁上皮細胞の間に侵入したHRPは自由縁近くの閉鎖帯結合（矢印）によって卵巢腔への侵入を阻止されている. X 30,000

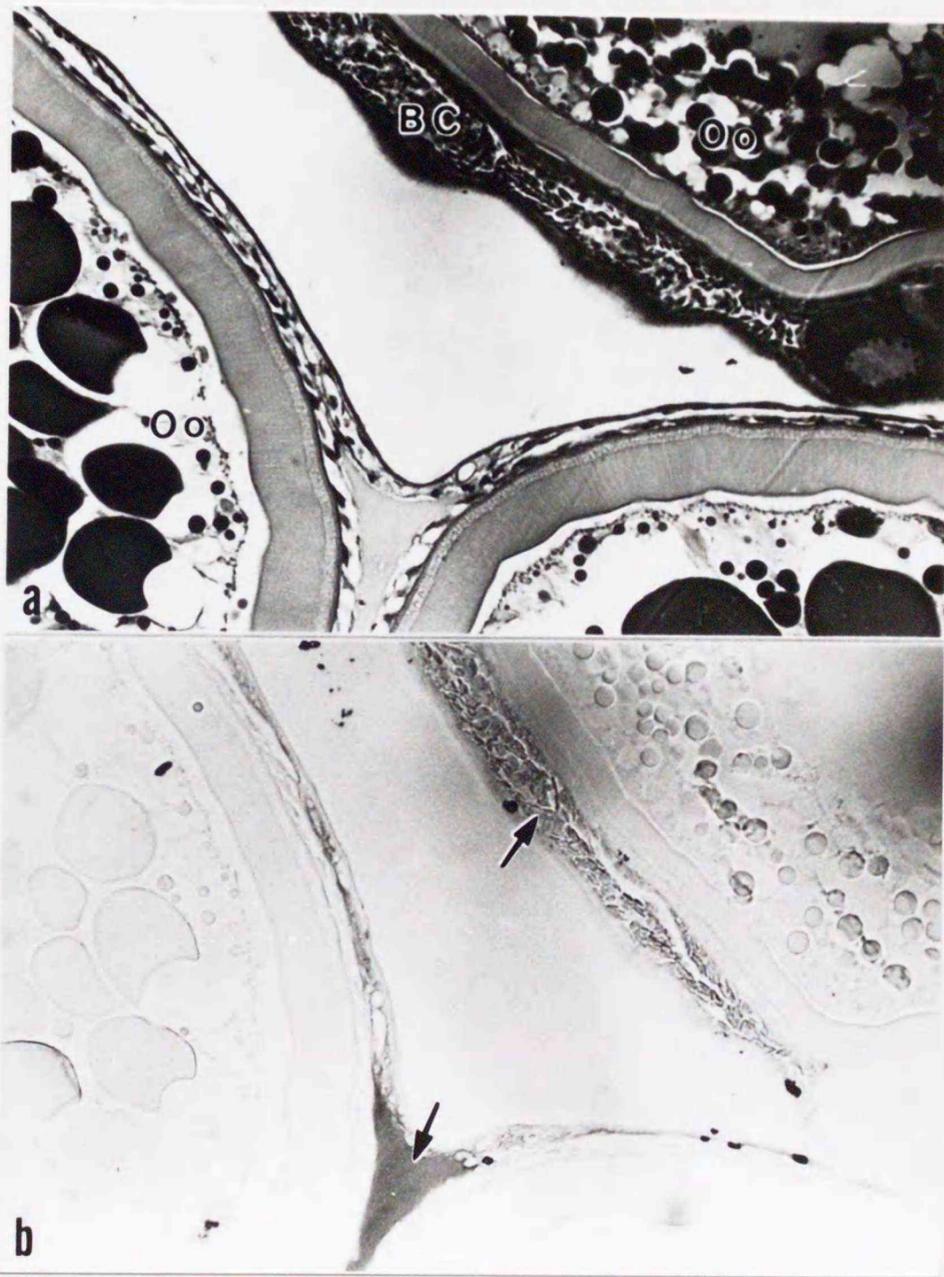


図25. HRPを投与された産卵期の個体の卵巣の組織像。
 BC, 毛細血管. OC, 卵巣腔. Oo, 卵母細胞.
 a. ヘマトキシリン-エオシン染色. X 240
 b. DAB染色. HRPは卵巣薄板上皮の基底下の結合組織中(矢印),
 および毛細血管内に認められる. X 240

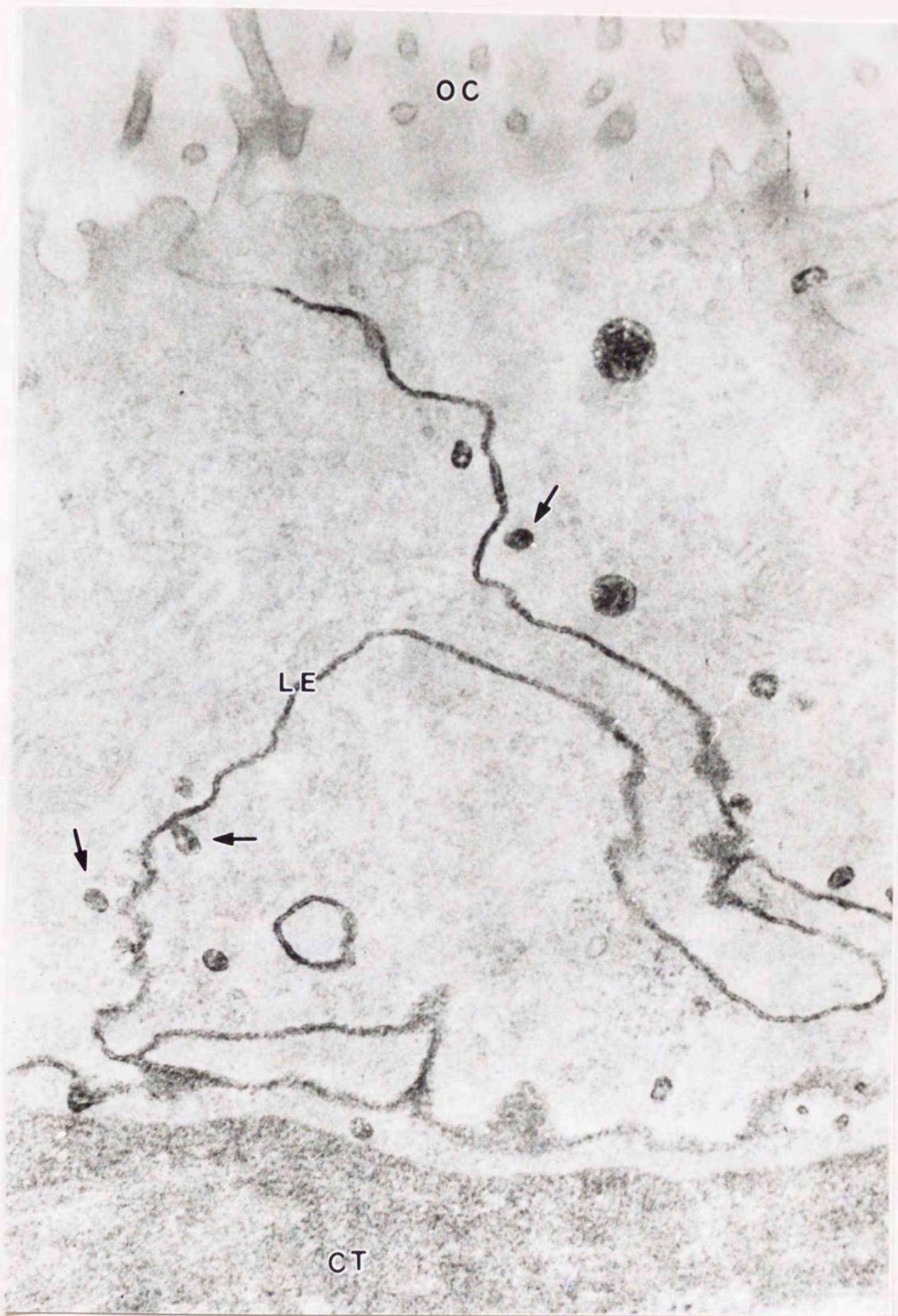


図26. HRPを投与された産卵期の個体の卵巢薄板上皮細胞の電顕像。
 CT、結合組織。 LE, 卵巢薄板上皮細胞。 OC, 卵巢腔。
 HRPは卵巢薄板上皮細胞基底下の結合組織と細胞間隙に認められる
 が、卵巢腔には到達していない。細胞間隙および基底下に向かって
 開口する小胞内にもHRPが認められる(矢印)。 x 40,000



図27. HRPを投与された産卵期の個体の卵巢薄板上皮細胞の電顕像.
d, 接着斑. OC, 卵巢腔. t, 閉鎖帯結合.
細胞間隙に侵入したHRPは自由縁付近の閉鎖帯結合にまで到達している. X 80,000

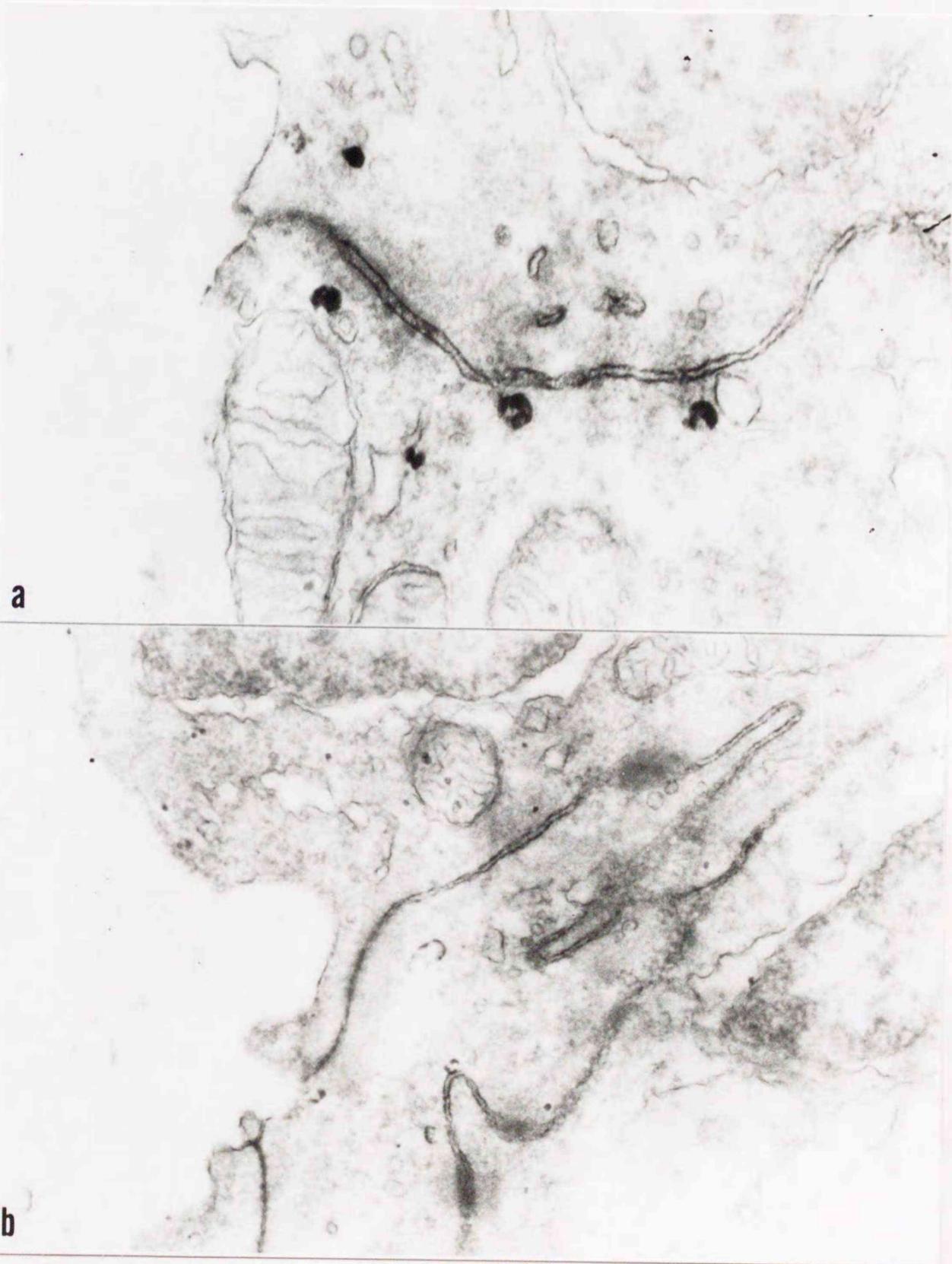


図28. HRPを投与された退縮期の個体の卵巢薄板上皮細胞の電顕像.
HRPは卵巢腔にまで到達している.

- a. 既交尾個体の卵巢薄板上皮. X 60,000
- b. 未交尾個体の卵巢薄板上皮. X 40,000

なると HRP は卵巢薄板上皮細胞の細胞間隙を通過して卵巢腔にまで到達しており、上皮細胞自由縁の原形質膜上には HRP による重合物の沈着が認められる。自由縁付近の細胞間隙に面して接着斑は存在するが、閉鎖帯結合は認められない。また、産卵期以前に雄から隔離して未交尾の状態産卵期を過ぎた雌個体においても、退縮期には同様に閉鎖帯結合が消失し、HRP は卵巢腔にまで到達していた（図 28-b）。

一方、卵巢壁上皮細胞では細胞間隙に進入した HRP は自由縁に最も近い接着斑のさらに卵巢腔よりに存在する閉鎖帯結合にまでは達するものの、卵巢腔には侵入しておらず（図 29）、依然として血液卵巢腔関門として機能していることが示された。

以上のことから、退縮期においては卵巢壁上皮細胞には閉鎖帯結合が存在するが、卵巢薄板上皮細胞では閉鎖帯結合が消失し、血液卵巢腔関門がなくなることを示された。また、この状態は回復期初期の 7 月にも観察された。

b. スジアイナメ

b-1. 産卵期の卵巢の形態

スジアイナメの卵巢は一对の嚢状器官で、左右の卵巢は中央よりやや後方で融合し、単一の生殖輸管に連なっている（図 30）。卵巢基部側にはひだ状に卵巢薄板が発達し、その反対側の腹側には卵巢腔が広がっている（図 30-a）。卵巢薄板は様々な発達段階の卵濾胞を含み、卵巢腔に面する自由縁は単層の卵巢薄板上皮細胞に覆われている（図 30-b）。卵巢壁は外側から扁平上皮、膠原繊維および平滑筋の層からなり、卵巢腔に面する卵巢被膜の内側は、単層に配列した上皮細胞（卵巢壁上皮細胞）で覆われている（図 30-c）。

b-2. 産卵期の卵巢壁および卵巢薄板上皮細胞の形態

図 31 にスジアイナメの卵巢壁上皮細胞の電顕像を示した。卵巢壁上皮



図29. HRPを投与された退縮期の個体の卵巣壁上皮細胞の電顕像.
細胞間隙に侵入したHRPは閉鎖帯結合(矢印)により卵巣腔への侵入
を阻止されている. X 60,000

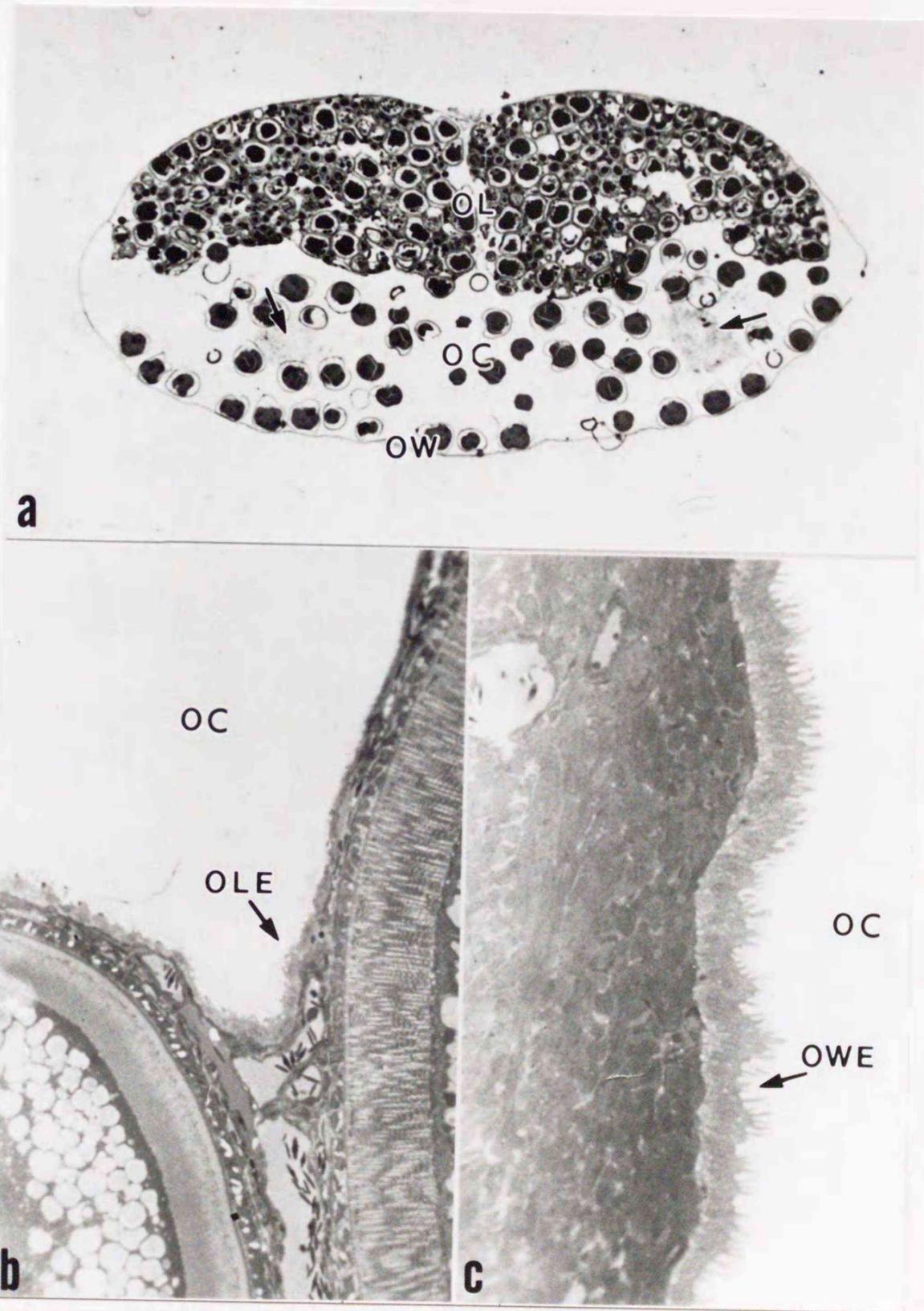


図 30. 産卵期のスジアイナメ卵巢の組織像。
 OC, 卵巢腔. OL, 卵巢薄板. OLE, 卵巢薄板上皮. OW, 卵巢壁.
 OWE, 卵巢壁上皮。
 a. 左右一対の卵巢の融合部の横断面. 卵巢腔には排卵された完熟卵と
 卵巢腔液 (矢印) が認められる. X 3.2
 b. 卵巢薄板の組織像. X 370
 c. 卵巢壁の組織像. X 370

細胞は基底下の結合組織および筋肉層を隔てる基底膜上に単層に配列する。細胞の高さは部位によりかなり異なるが、概ね $15\sim 30\mu\text{m}$ 、幅は $3\sim 5\mu\text{m}$ である。細胞内には核が中央よりやや基部側に存在し、自由縁には微絨毛の発達が著しい。隣り合う細胞は数箇所では接着斑により結合している。

産卵期の卵巢薄板上皮細胞は基底下の卵濾胞を隔てる基底膜上に単層に配列し、その微細形態的特徴は卵巢壁上皮細胞とほぼ同様である。

b-3. 産卵期における血液卵巢腔閉門

図 32 は HRP を注射された個体の卵巢薄板上皮細胞の電顕像である。HRP は上皮細胞基底下の結合組織層から基底膜を透過して卵巢薄板上皮細胞の間隙に広く浸透している。しかし、卵巢薄板上皮細胞の自由縁近くで侵入を阻止され、卵巢腔にまでは到達していない。図 33 は卵巢薄板上皮細胞の自由縁付近を拡大した電顕像である。細胞間隙に侵入した HRP は、上皮細胞の自由縁に最も近い部位の接着斑の外側に存在する閉鎖帯結合によって卵巢腔への侵入を阻止されている。このことから産卵期のスジアイナメの卵巢薄板上皮細胞もニジカジカと同様な血液卵巢腔閉門としての機能を有することが明らかとなった。

一方、HRP を投与された個体の卵巢壁では、卵巢壁内を通る毛細血管の内腔に HRP が検出されたのみで、周囲の組織内には HRP による沈殿物は検出されなかった。

5) 卵巢内での精子貯留とその消失過程

a. 産卵期

ニジカジカの産卵期の卵巢に見られる著しい特徴として、卵巢腔内に精子が貯留されていることがあげられる。卵巢内に送り込まれた精子は卵巢腔内

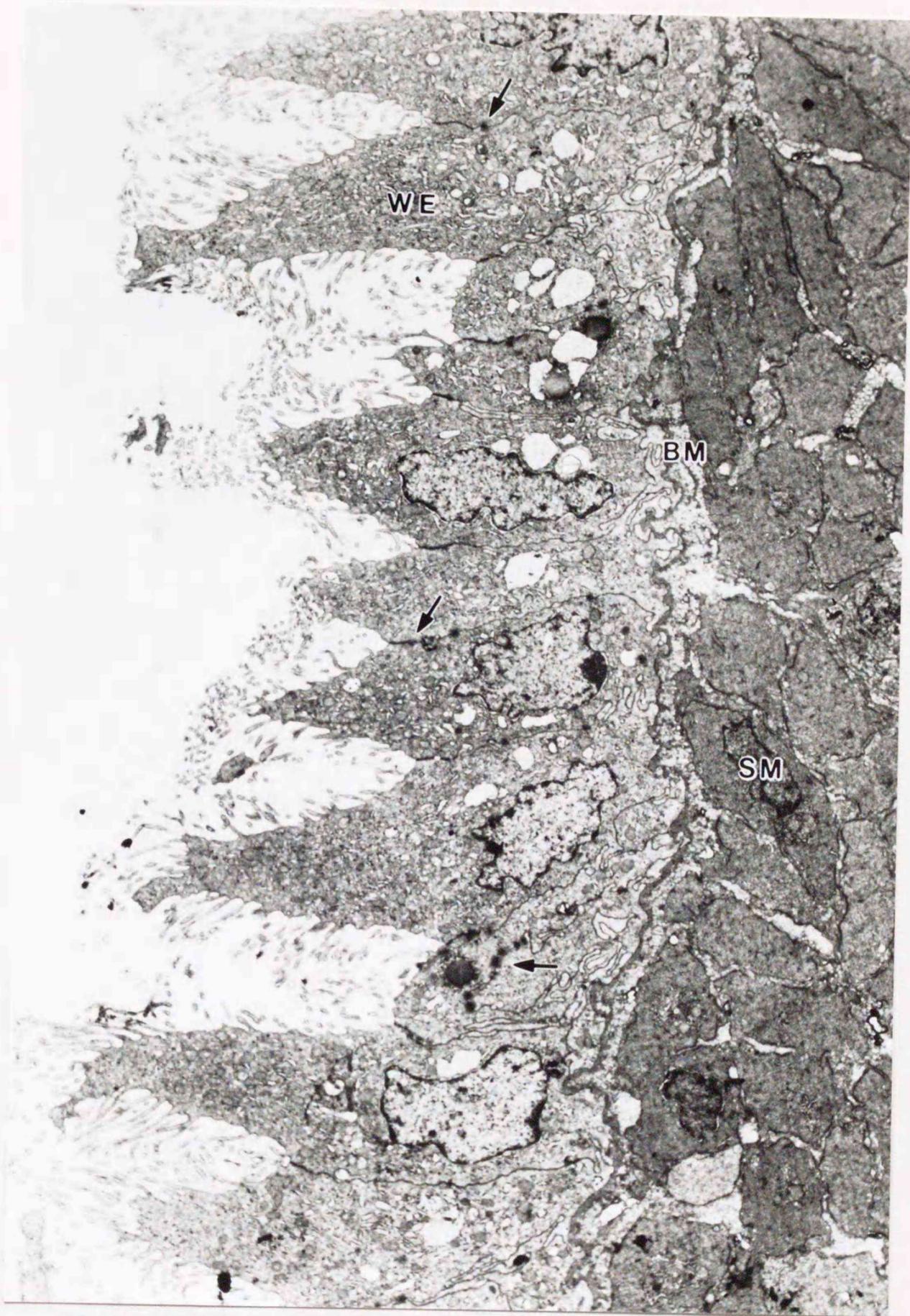


図 31. 産卵期のスジアイナメ卵巢壁上皮細胞の電顕像.
BM, 基底膜. SM, 平滑筋細胞. WE, 卵巢壁上皮細胞.
卵巢壁上皮細胞は基底膜上に単層に配列する. 隣接する上皮細胞は
接着斑 (矢印) により結合している. X6,000



図 32. HRP を投与された産卵期のスジアイナメ卵巢薄板上皮の電顕像.
BM, 基底膜. SM, 平滑筋細胞層. OL, 卵巢薄板上皮細胞層.
HRP は基底部から上皮細胞の間隙に進入しているが, 自由縁近くで進入を
阻止されており (矢印), 卵巢腔には進入していない. X6,000

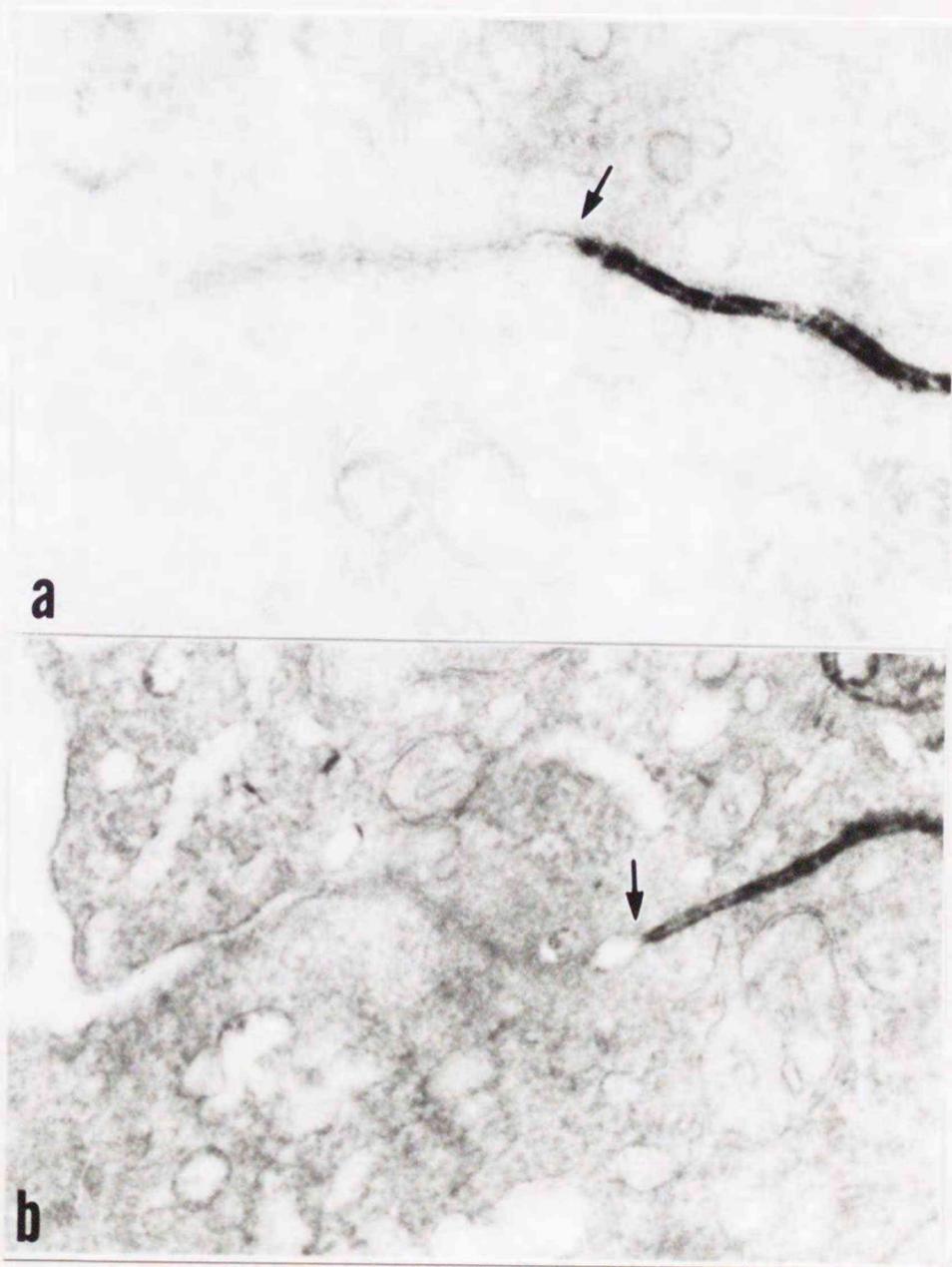


図 33. HRP を投与されたスジアイナメ卵巢薄板上皮細胞の細胞間隙の電顕像。
HRP は上皮細胞の閉鎖帯結合 (矢印) により卵巢腔への侵入を阻止されている。 a, b, X60,000

に広く分布するが、主として卵巢薄板が皺曲してできた間隙などに多数が集塊をなし（図 34）、卵巢腔に浮遊した状態で貯留されている。まれに精子が卵巢腔上皮細胞に接している場合でも、卵巢薄板上皮および卵巢壁上皮の細胞には精子が定着するような特別な保留機構は認められない（図 35）。また、これらの精子の微細構造は、雄の輸精管から搾出した直後の状態と変わらない。

b. 退縮期

退縮期の卵巢では、卵巢腔内に精子はほとんど見られない。まれに観察された例でも、その精子の形態はすでに正常なものではなかった（図 36-a, b）。精子の頭部から中片にかけての原形質膜は寸断され、さらには電子密度の高い層板状のひも状構造を呈し、露出した染色質に付着している。また、核染色質自体も脱凝縮し、その電子密度を著しく低下させている。しかし、精子尾部はなお比較的正常な状態に残っている。

退縮期の卵巢内には様々な形態を示す白血球が散見される（図 37）。これらの細胞は微細形態的特徴から、細胞質内に拡張した粗面小胞体と空胞状の構造を持つリンパ球（図 38）、分葉状の核を持ち細胞内に多くの顆粒を含む顆粒球（図 39）、および不定形の核と伸長した仮足を有し様々な活性段階にある単球系の細胞（図 40）の 3 種に識別できる。この時期の卵巢薄板上皮細胞の間隙などには、これらの白血球が侵入している像がしばしば認められる（図 18-a）。

すでに精子が完全に消失した個体の卵巢腔内には、主としてマクロファージが認められる。これらのマクロファージの細胞質内には、層板状の膜構造を包んだ大小の空胞が数多く含まれ貪食作用が活発なことをうかがわせる。この空胞内に見られる層板状の膜構造物の中には、卵巢腔内で退行し異常な形態を示す精子の頭部に付随している膜構造に由来すると思われるものが認められる（図 41）。巨大化したマクロファージや様々な種類の白血球が集塊をなし



図 34. 産卵期の卵巣腔内の精子.
OC, 卵巣腔. OLE, 卵巣薄板上皮細胞. Oo, 卵母細胞. S, 精子.
精子は卵巣薄板の間隙に多数が集塊をなして貯留されている.
X 650

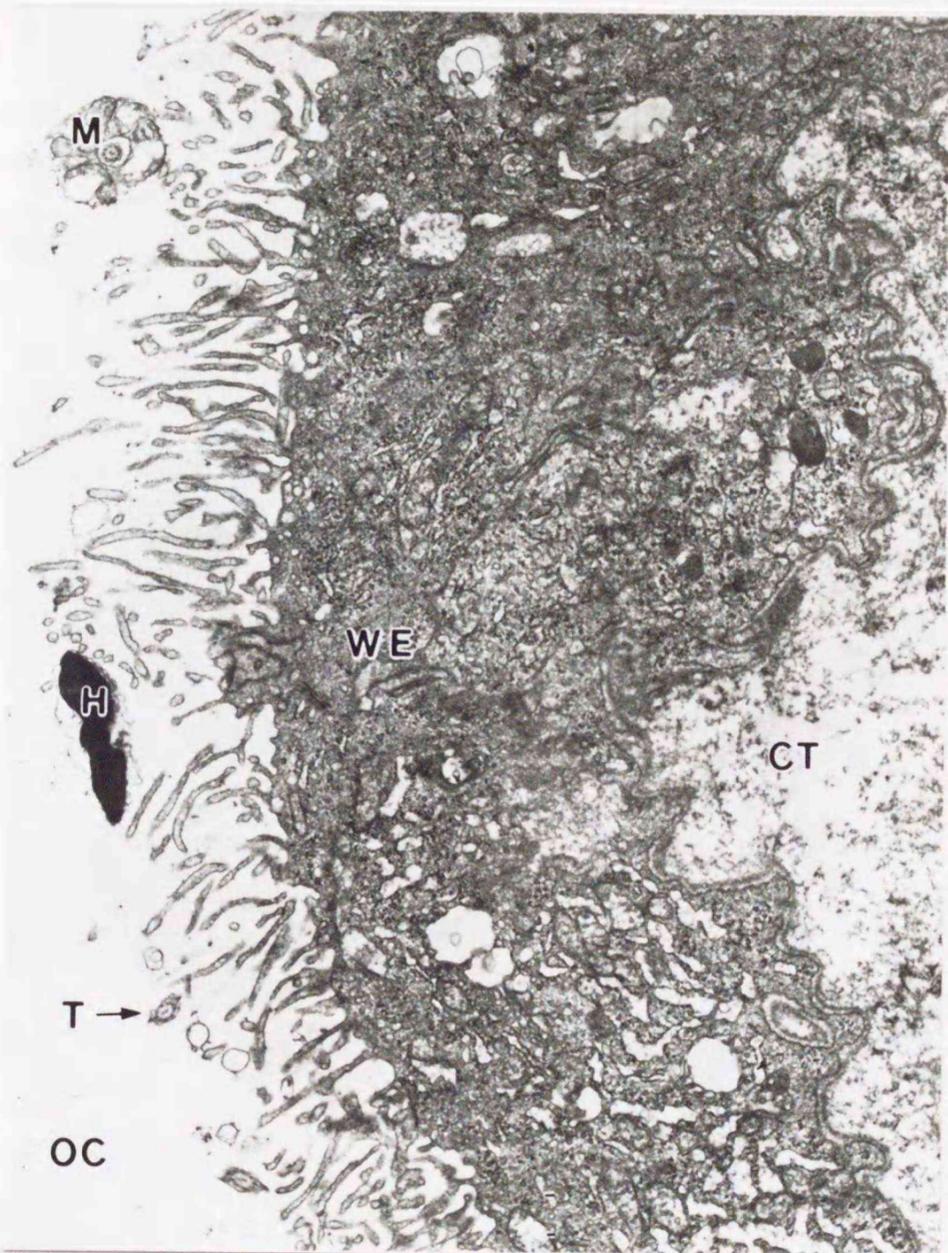


図 35. 産卵期の卵巢壁上皮細胞と卵巢腔内の精子。
 CT, 結合組織. H, 精子頭部. M, 精子中片部. OC, 卵巢腔.
 T, 精子尾部. WE, 卵巢壁上皮細胞.
 精子と卵巢壁上皮細胞との間に特別な構造はなく、精子はわずかに
 微絨毛に接する程度である. X 10,000

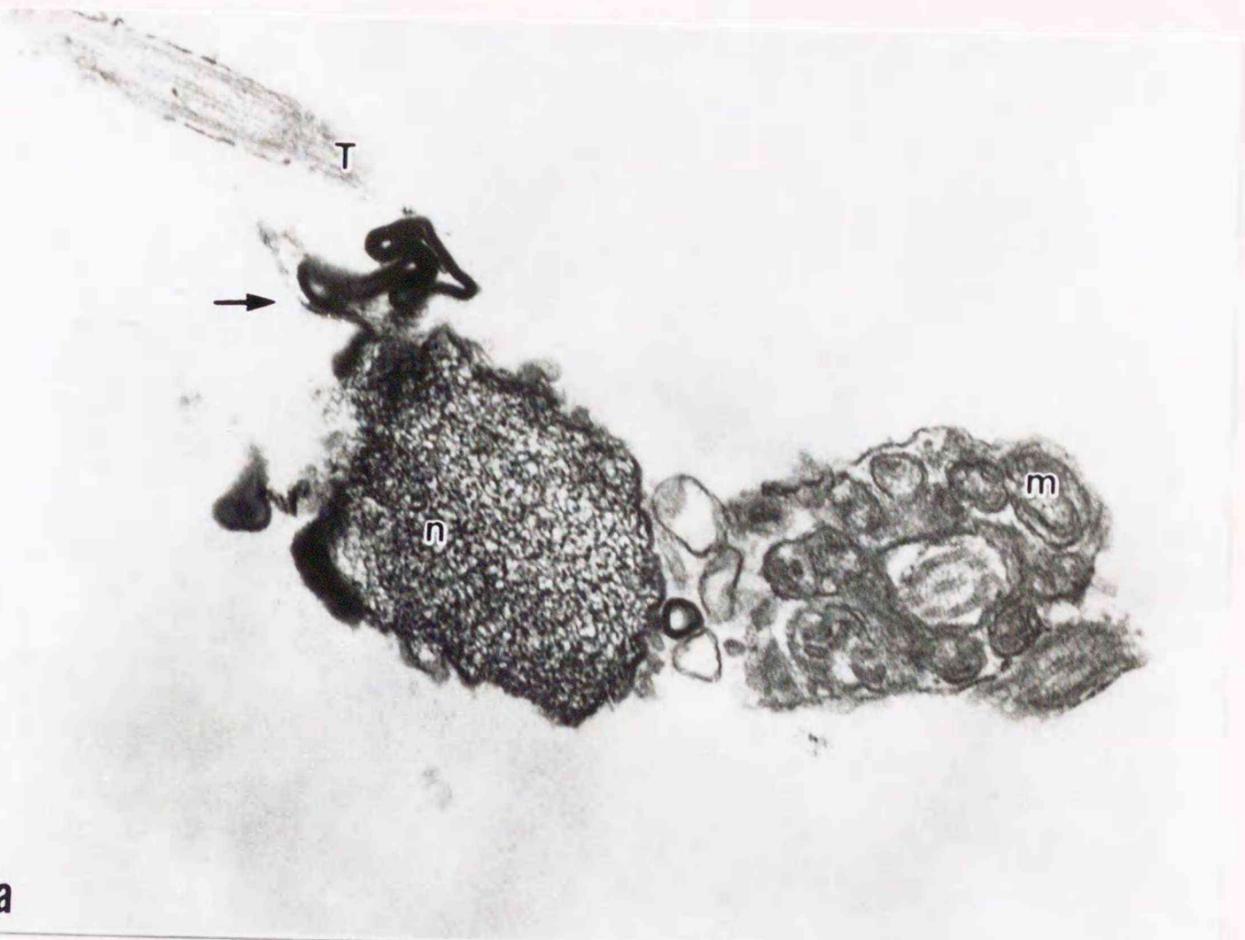


図 36. 退縮期の卵巣腔内に見られた異常な形態を示す精子の電顕像.
 m, 精子中片部のミトコンドリア. n, 精子核. T, 精子尾部.
 精子頭部に電子密度の高いひも状を呈する膜構造物 (矢印) が付随
 している. a. X 40,000; b. X 40,000

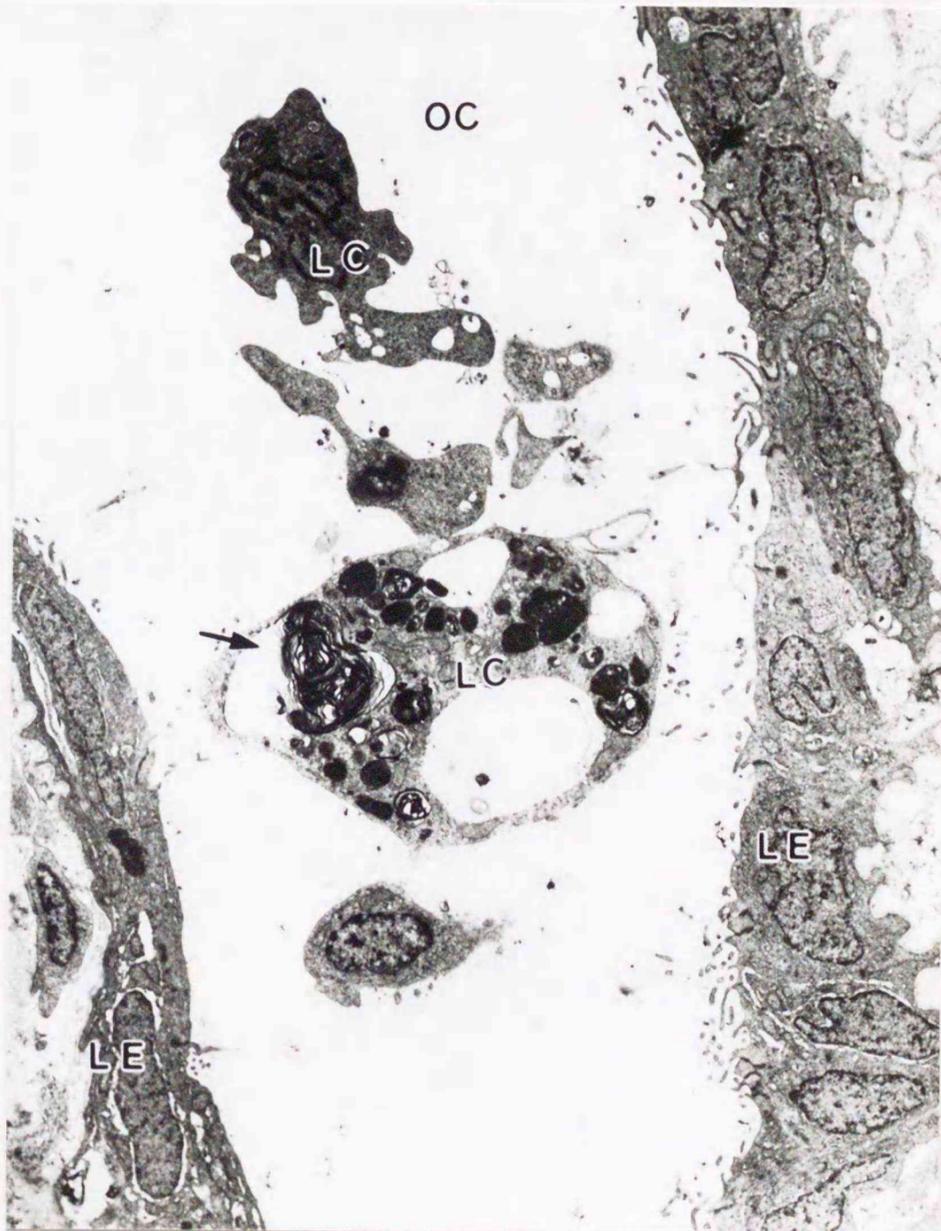


図 37. 退縮期の卵巢腔内に見られる白血球の電顕像.
LC, 白血球. LE, 卵巢薄板上皮細胞. OC, 卵巢腔.
細胞内には層板状の膜構造を含んだ空胞 (矢印) が認められる.
X 5,000

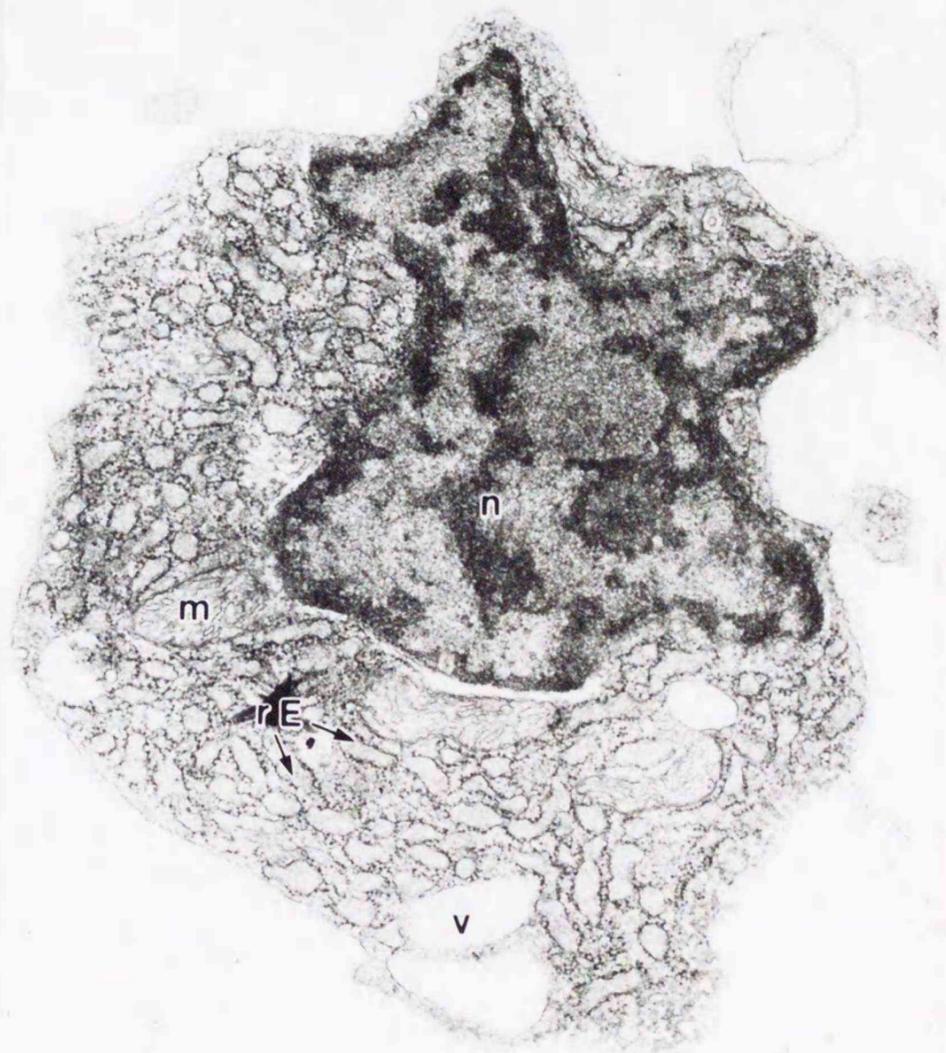


図 38. 退縮期の卵巣腔内に見られるリンパ球.
m, ミトコンドリア. n, 核. rE, 粗面小胞体. v, 空胞.
粗面小胞体が拡張し、蛋白合成が盛んなことをうかがわせる. X 20,000

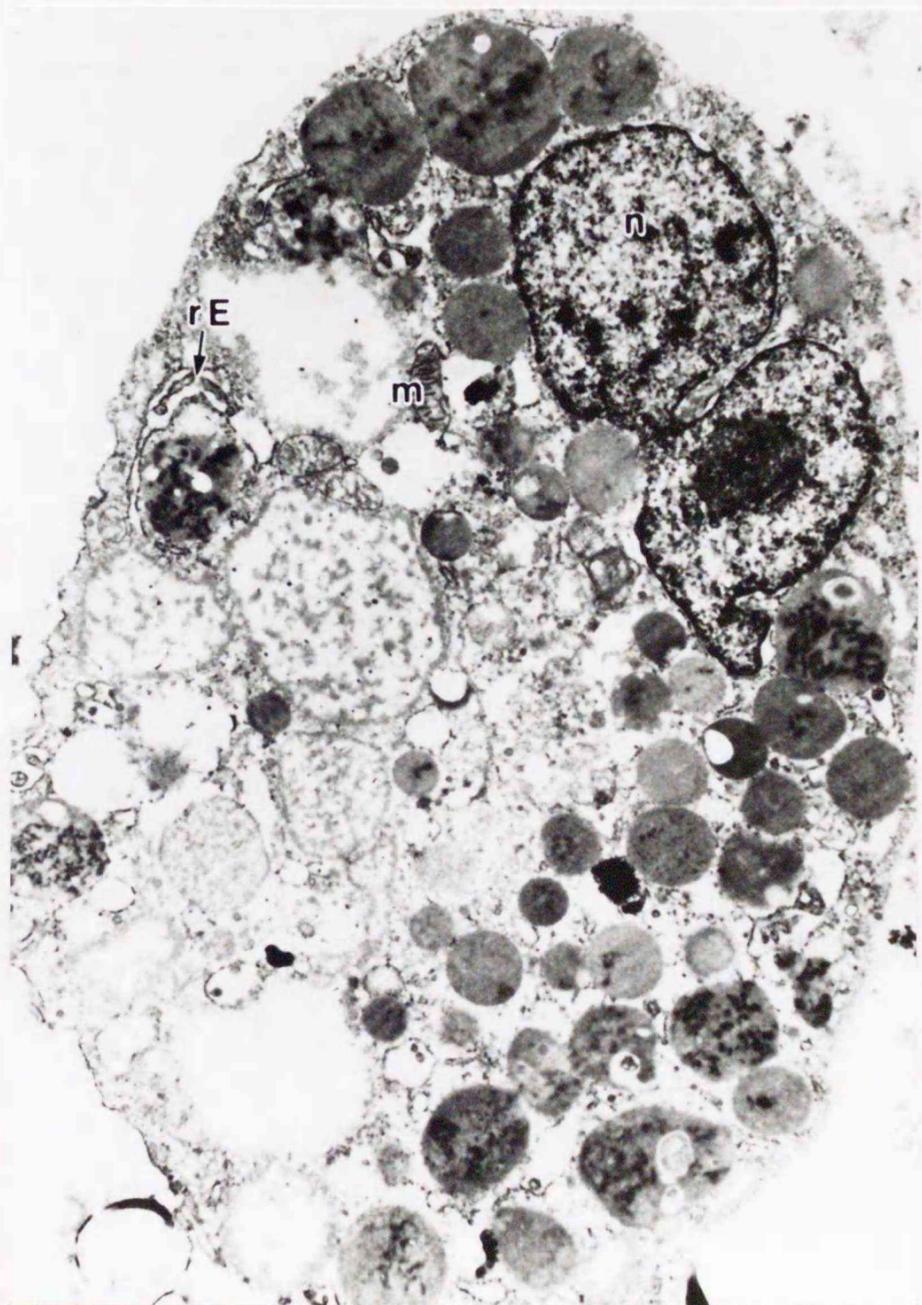


図 39. 退縮期の卵巣腔内に見られる顆粒球の電顕像.
m, ミトコンドリア. n, 核. rE, 粗面小胞体.
細胞内に数多くの顆粒が認められる. X 10,000



図 40. 退縮期の卵巣腔に見られる単球.
m, ミトコンドリア. n, 核.
細胞内には多くの遊離リボソームを含む. 食作用は見られない. 仮足
(矢印)の伸展が認められる. X 24,000

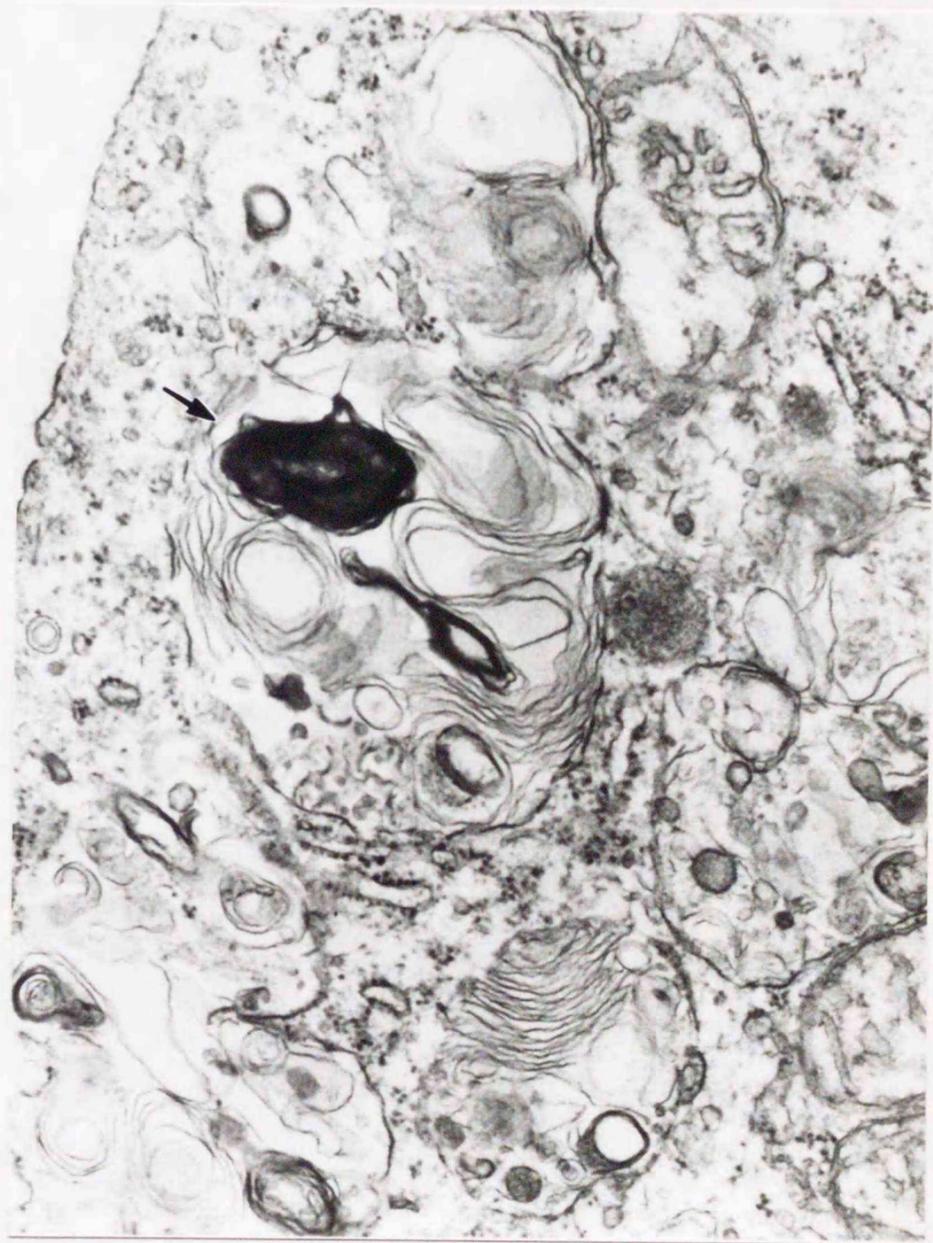


図 41. 退縮期の卵巣腔内に見られるマクロファージの電顕像。
細胞質内には膜構造を含む大小の空胞が認められ、食作用が活発
なことをうかがわせる。矢印は精子に由来すると思われる膜構造。
X 40,000

ている像もしばしば認められる (図 42)。

c. 回復期

回復期の 7 月の卵巢腔内には、退縮期よりもさらに多くのマクロファージが集塊をなしている像が認められる (図 43)。これらの細胞集塊は Adams (1976) が定義している肉芽腫に相当するものと見なされる。マクロファージの細胞質内には多数のリソソームが認められ、その中には層板状の膜構造や電子密度の高い均質な顆粒状の物質が含まれている。10 月の卵巢腔内にはこのような肉芽腫状構造や白血球は全く認められない。

3. 考察

本研究ではまず、卵巢組織を形態学的に観察することにより、体内配偶子会合型の繁殖様式にかかわる特徴を見出すことを試みた。

魚類の卵巢はその外部形態から一般に裸状卵巢型と嚢状卵巢型の 2 つに大別されており (Hoar, 1957)、このうち嚢状卵巢型は、卵巢の組織学的特徴からさらに 2 型に分けられている (高野, 1987)。ニジカジカの卵巢は、腹腔内に独立して懸垂された嚢状の器官で外側を平滑筋より成る卵巢被膜によって覆われているという特徴から、高野 (1987) の卵巢構造の類別に従うと嚢状型-II に属する。この型に属する魚種としてはこれまでにナイルティラピア *Oreochromis niloticus*、ニシン *Clupea pallasii* (山本, 1955)、エゾトミヨ *Pungitius tymensis* (T. S. Yamamoto, 1963)、およびイサザ *Chaenogobius isaza* (Takahashi, 1981) のほか、カサゴ目のフサカサゴ科に属するクロソイ *Sebastes schlegeli* (山本, 1955)、エゾメバル *Sebastes taczanowskii* (林, 1990) およびアイナメ科に属するスジアイナメ (宗原, 1989) などが報告され

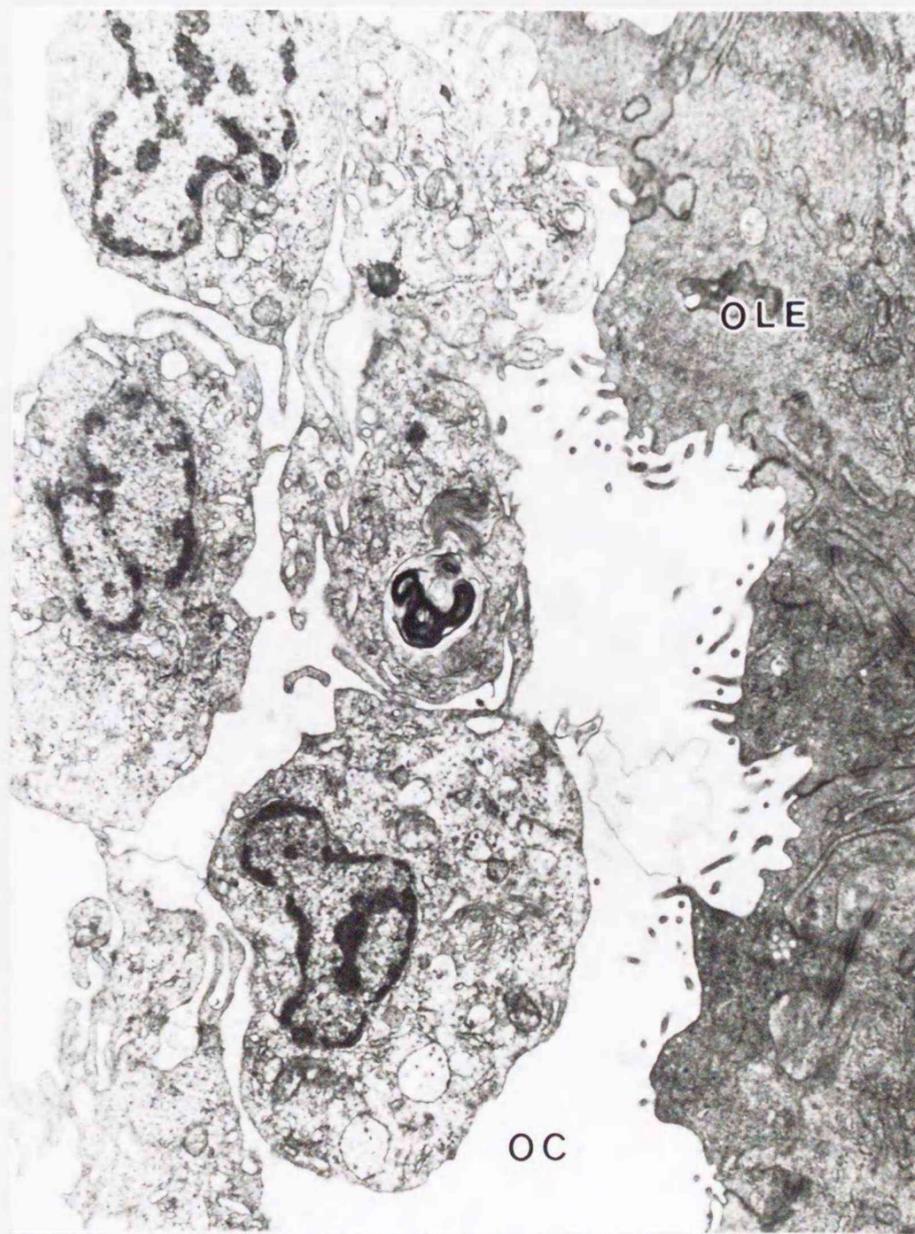


図 42. 退縮期の卵巣の電顕像。
OC, 卵巣腔. OLE, 卵巣薄板上皮細胞。
卵巣腔にマクロファージや白血球が集塊をなしている。
X 10,000

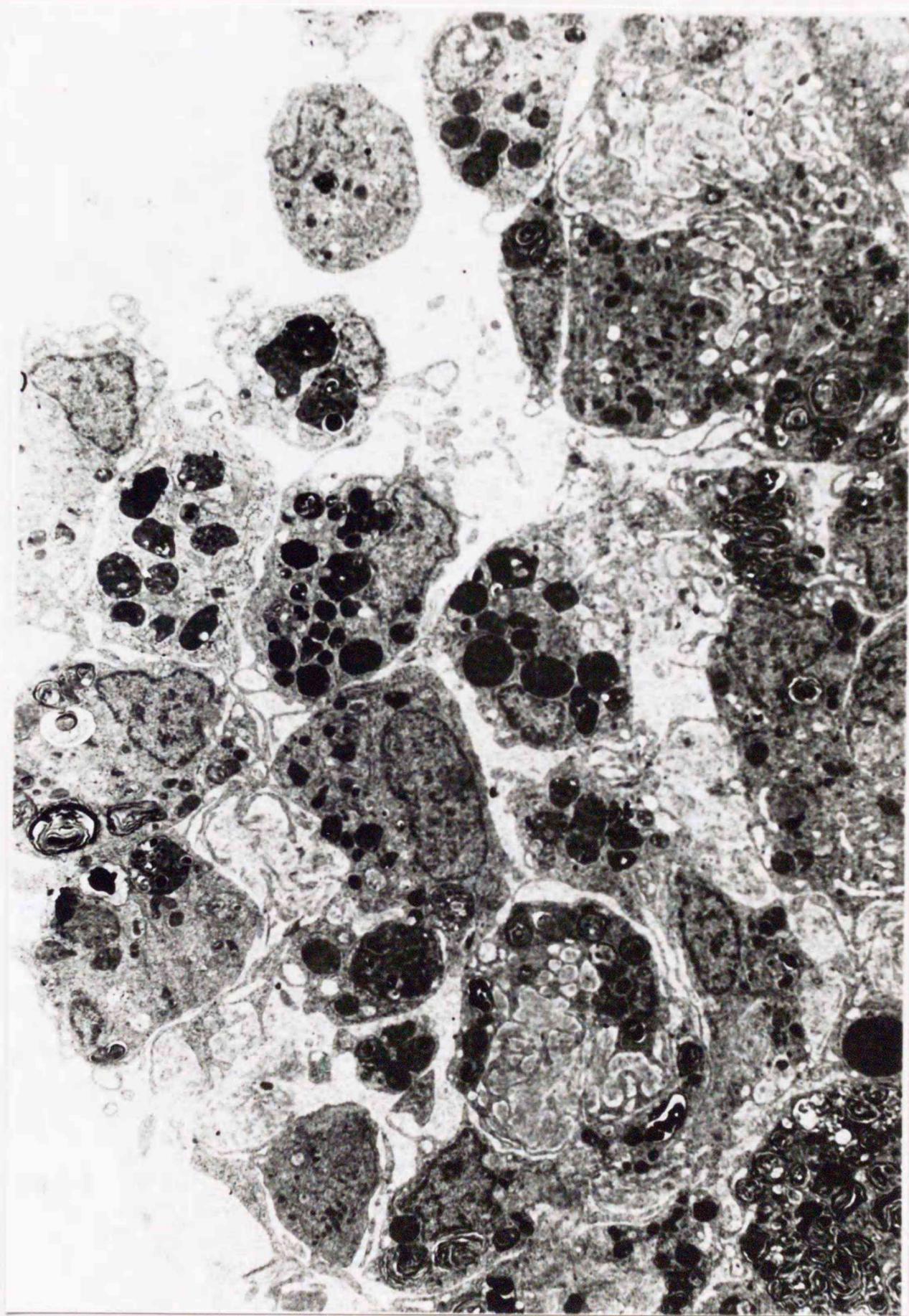


図 43. 回復期（7月）の卵巣腔内に見られる肉芽腫の電顕像。
肉芽腫を形成するマクロファージの細胞内には電子密度の高い顆粒状
の構造、および膜構造を含んだ空胞が多数認められる。 X 4,500

ており、カジカ科の属するカサゴ目の魚種では嚢状型 - II の卵巢構造は一般的なものであると思われる。

ニジカジカでは産卵期に既に交尾を行なった個体の卵巢腔には、多くの精子が認められる。これは交尾を行なう卵生および胎生の魚種に見られる大きな特徴である。このように卵巢内に入った精子の貯留形態に関してはおもに胎生魚でいくつかの報告がなされている。胎生魚の *Cymatogaster aggregata* では交尾から排卵までの約 6 か月にわたって精子が、卵巢薄板の褶曲部に形成された sperm pocket に入り、その上皮に頭部を挿入して貯留される

(Gardiner, 1978)。同じく胎生魚のエゾメバルでは、11 月に交尾によって卵巢内に送り込まれた精子は、その後数か月にわたって卵巢内に蓄えられる (Takemura et al., 1987)。これらの精子は卵巢薄板の間の空隙に分散しているが、電顕的な観察からその多くは卵巢薄板上皮細胞に接するか、その微絨毛に包まれた状態で貯留されていることが明らかにされている (林, 1990)。一方、ニジカジカと同じく体内配偶子会合型のカジカ科魚であるアナハゼ、アサヒアナハゼ、およびサラサカジカでは、精子が卵巢後端部の卵巢薄板間にみられる放射状の卵巢腔で頭部を卵巢腔上皮細胞に向けて整列している像が光顕的に観察されている (四宮, 1985)。今回観察したニジカジカでは、卵巢内に貯留された精子は微細構造レベルにおいても卵巢腔に面する上皮細胞と特に密接な関わりを持たず、多くの胎生魚や他の体内配偶子会合型の種 (アナハゼ、アサヒアナハゼ、サラサカジカ) とは異なって、精子貯留のための特別な卵巢構造を備えていないという点が特徴的であった。

硬骨魚類の卵巢内には排卵された卵を浸漬している液性物質が存在することが多くの魚種で知られており、この液は、裸状型の卵巢では体腔液、嚢状型の卵巢では卵巢腔液と呼ばれている。産卵期のニジカジカの卵巢内にはやや粘性を帯びた卵巢腔液が存在し、後述するように本種の体内配偶子会合を成立させる上で極めて重要な役割を演じている。

体腔液および卵巢腔液の起源、およびその産生機序についてはこれまでに多くの研究がなされてきている。嚢状卵巢型の魚種では K.Yamamoto (1963) がメダカの卵巢において、卵巢腔壁を形成する 3 層の細胞層のうち最内層の上皮が卵巢成熟の進行に伴って肥厚し、卵巢腔に液状の物質を分泌することを光顕的に示した。また、T.S.Yamamoto (1963) はエゾトミヨにおいて、卵巢被膜の内側の上皮細胞が排卵時に劇的な変化を見せることから、この細胞がこの種に特有のゼリー様物質を分泌することを示唆している。*Ameca splendens* (Lombardi and Wourms, 1985)、スジアイナメ (宗原, 1989) およびエゾメバル (林, 1990) でも卵巢腔に面する上皮細胞の微細構造が観察されており、上皮細胞の細胞内小器官の発達状態と自由縁での分泌像との関連から、卵巢腔液の成分となる物質がこの上皮細胞に由来する可能性が指摘されている。松原 (1988) は裸状卵巢型のサクラマス *Oncorhynchus masou* で排卵直前の体腔上皮および卵巢間膜上皮の細胞内に、蛋白合成に関与する粗面小胞体およびゴルジ体がよく発達しており、さらに体腔液特異蛋白を含む顆粒が蓄積されていることを電顕免疫組織化学的手法で明らかにした。

本研究におけるニジカジカでの観察でも、卵巢腔に面する卵巢壁上皮、および卵巢薄板を覆う上皮の細胞が生殖周期に伴って著しい形態的变化を示した。これらの上皮細胞では、卵巢の成熟に伴って粗面小胞体およびポリソームがよく発達し、また、粗面小胞体—ゴルジ装置経由の蛋白合成過程を示唆する像、およびゴルジ層板から分離したゴルジ小胞が互いに融合して空胞状の構造を作り、それが自由縁で開口して内容物を放出している像が認められた。さらに、最も活性の高い産卵期には、上皮細胞の自由縁に発達した微絨毛の先端からのミクロアポクリン分泌を示す像も認められた。今回の観察では、ミクロアポクリン分泌による分泌物の合成から分泌に至る経路に関しては十分解明できなかったが、分泌活性の最も高い時期にはゴルジ装置関与の濃縮、融合、蓄積の過程を経ずに、より漿液に近い物質が活発に分泌される可能性が想定される。

いずれにせよ原料物質の輸送に関しては、回復期から産卵期にかけて卵巣内の毛細血管内皮細胞での物質輸送の活性化を示唆する小胞が細胞質内に増加し、同時に上皮細胞の基底部および側縁では飲小胞による細胞内への取り込みがトレーサーを用いた観察から明らかにされた。以上の観察結果から考えられる卵巣薄板および卵巣壁上皮の細胞での卵巣腔液成分の合成および分泌の経路を図44に模式的に示した。

卵巣腔上皮の分泌形態に関してはこれまでも若干の報告がある。Takano (1968) は産卵期のメダカの卵巣壁上皮細胞を電顕的に観察し、上皮細胞質の自由縁から黒住 (1965) が類別した分泌形態のうち、マクロアポクリン型に相当する分泌空胞を卵巣腔に向って突出させていることを示している。さらにキンギョ *Carassius auratus* (Takahashi and Takano, 1972)、およびタイリクバラタナゴ *Rhodeus ocellatus ocellatus* (松原, 1982) でも、卵巣腔壁の上皮細胞によるアポクリン分泌が確認されている。一方、宗原 (1989) はカサゴ目アイナメ科に属するスジアイナメで、ゼリー状の卵巣腔液の成分の一部が卵巣壁上皮細胞のみならず卵巣薄板上皮細胞からも分泌されることを電顕的に明らかにした。また、その分泌様式も細胞によって、ミクロアポクリン分泌と開口分泌の2態があることを観察し、細胞の活性に伴って分泌様式が変化する可能性を指摘している。産卵期のニジカジカの卵巣においても、スジアイナメ (宗原, 1989) と同様に卵巣壁上皮細胞と卵巣薄板上皮細胞の双方に、ミクロアポクリン分泌と開口分泌の2態の分泌形態が確認された。しかし、ニジカジカではスジアイナメと異なり同一の細胞で同時期に2態の分泌像が認められたことから、産卵期のニジカジカの卵巣内の上皮細胞は少なくとも2種類の物質を分泌しているものと思われる。Kurosumi and Kawabata (1976) はヒトの耳道腺の腺細胞が開口分泌とアポクリン分泌の2態の分泌を行なっていることを示した。さらに、開口分泌による分泌物は分泌顆粒に由来する加水分解酵素を含み、アポクリン分泌による分泌物の分解に働くことを示唆している。

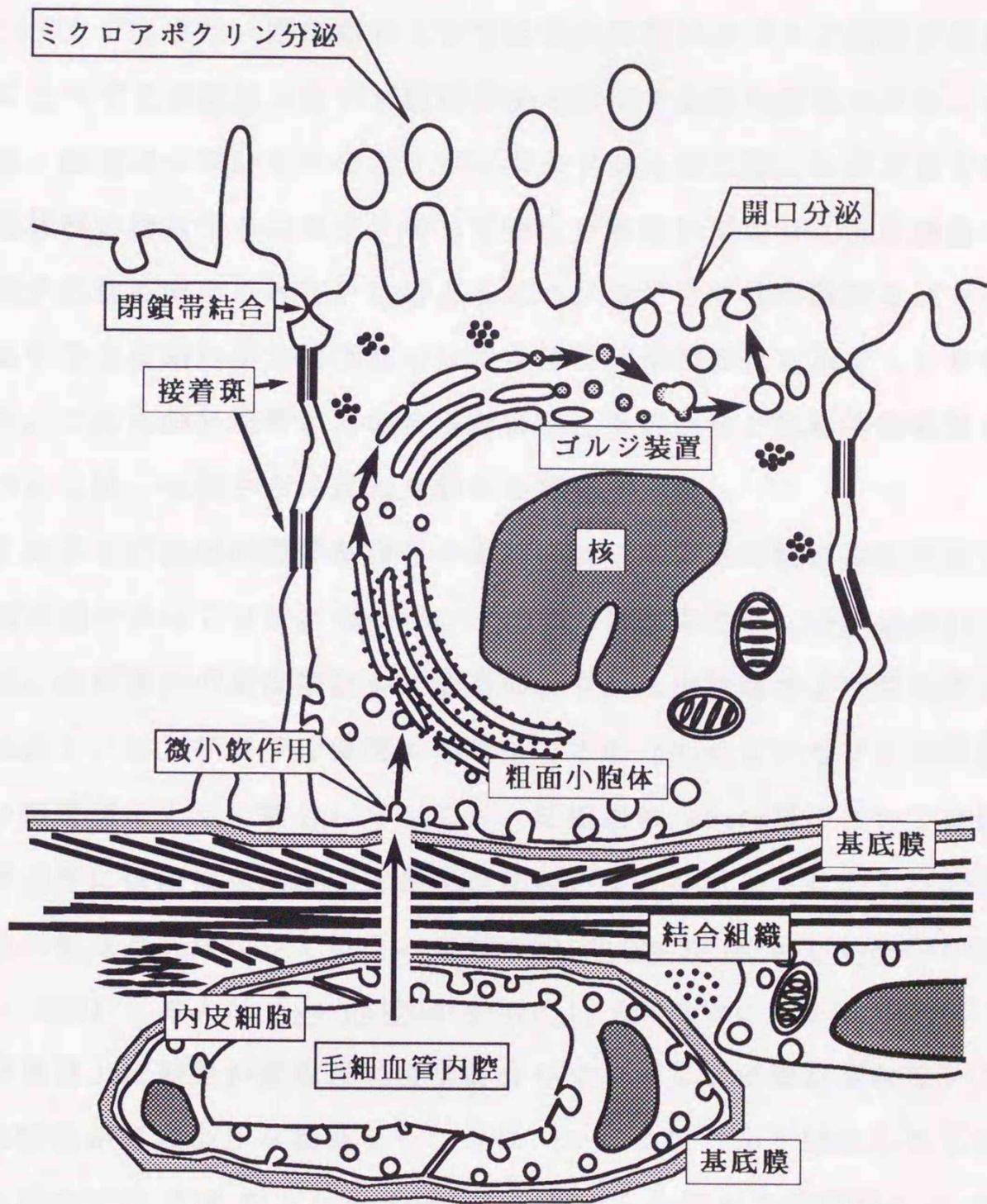


図 44. 産卵期のニジカジカの卵巢薄板上皮細胞および卵巢壁上皮細胞における毛細血管からの物質の取り込み、物質合成、および外分泌経路の模式図.

ニジカジカの卵巢腔に面する上皮細胞に見られた 2 態の分泌形態に由来する分泌物も、これと同様の機序により卵巢腔液成分を形成しているのかもしれない。

ニジカジカでは、回復期からすでに上皮細胞にはゴルジ装置が発達し、産卵期に比べてその数は少ないが開口分泌を示唆する像も認められた。また退縮期には、頻度は少ないもののミクロアポクリン分泌と開口分泌が見られる一方、多胞体様の構造物が卵巢腔に向って突出し離脱しており、上皮細胞の崩壊過程を示す形態も認められた。このようにニジカジカでは産卵期をピークに卵巢腔に面する上皮細胞が分泌活性の変化を伴う周年的変化を示すことが明らかとなった。これらの分泌物がどのような物理化学的性質と生物学的機能を持つのかについては、今後さらに詳細な解析を要する。

これまでに数種の硬骨魚類で卵巢腔に面する上皮細胞の細胞間結合を観察した例が報告されている。Gardiner (1978) は胎生魚の *Cymatogaster aggregata* の卵巢内の上皮細胞が妊娠期の終りから出産期および交尾期にかけての phase I、および精子貯留期から受精までの phase II においては閉鎖帯結合および接着斑によって結合しているが、妊娠期の phase III においては数箇所の接着斑以外には密接な細胞間結合をみせないことを示し、このような変化を卵巢腔液の形成と関連づけている。また、*Fundulus heteroclitus* (Brummett et al., 1982)、および *Syngnathus scovelli* (Begovac and Wallace, 1987) では、卵巢壁上皮細胞が接着斑により結合していることが確認されているが、細胞間の結合がどのような機能をもつかについてはほとんど触れられていない。

本研究では HRP をトレーサーとして用い、血管から卵巢腔への HRP の透過を調べた。その結果、産卵期のニジカジカの卵巢では、HRP は卵巢腔に面する卵巢壁上皮および卵巢薄板上皮の細胞間隙に侵入したが、自由縁に最も近い閉鎖帯結合で侵入を阻止され卵巢腔にまでは到達しないことが明らかとなった。このことから、産卵期の卵巢腔は、卵巢壁上皮細胞および卵巢薄板上皮細

胞の閉鎖帯結合によって体液環境と隔絶され、いわば血液卵巢腔関門を備えていることが示された。

ニジカヅカを始めとする体内配偶子会合型を含む交尾型卵生魚、および胎生魚の卵巢内に貯留されている精子は、雌にとっては自己の細胞と異なる、いわゆる異物であるため、雌の免疫系に触れると体内から排除されることが考えられる。しかし、これらの魚類の精子が受精能を保持しつつ長期間卵巢内に生存し得ることは明らかである。産卵期のニジカヅカの卵巢に認められる血液卵巢腔関門は、卵巢内の精子を雌の免疫系から隔絶し、卵巢内での精子の生存を保証するという、体内配偶子会合型の種にとって不可欠な構造として働いているものと考えられる。さらに比較対象の目的で観察した真卵生種のスジアイナメにおいても、産卵期の卵巢に血液卵巢腔関門が存在することが明らかとなった。このことは、血液卵巢腔関門が必ずしも交尾を行なう魚種に特異的なものではないことを示している。産卵期の魚類の卵巢では、卵巢腔は産卵の際に生殖輸管を通じて体外環境に開放される空間である。従って、血液卵巢腔関門は魚類一般で体内環境と体外環境とを遮断するための構造として機能しているのかもしれない。

ニジカヅカの卵巢薄板上皮細胞では、退縮期に入ると閉鎖帯結合が消失し、それに伴って血液卵巢腔関門も消失することが示された。この時期の卵巢薄板上皮の細胞間隙には白血球が侵入しており、また卵巢腔にも多くの白血球が認められた。卵巢腔内の残留精子はすでに退行状態にある形態を呈しており、やがて卵巢腔から消失するに至った。

Lou and Takahashi (1989a) はティラピア *Oreochromis niloticus* の雄成魚に人為的に精巢の自己免疫反応を誘導し、抗原としての精巢物質に対して生じた自己抗体の作用によって血液精巢関門が崩壊することを示唆した。一方、ニジカヅカの退縮期の卵巢で見られた血液卵巢腔関門の消失においては、産卵期の卵巢内の精子が雌の免疫系に触れることは困難であること、また卵巢

内に精子を貯留していない未交尾の個体でも血液卵巢腔関門の消失が認められたことなどから、この変化は免疫反応によって惹起される変化ではなく、繁殖期終了後の卵巢組織の修復に伴う生理的な変化であると考えられる。

退縮期のニジカジカの卵巢内で退行した精子の周辺には多数のリンパ球および活性化しつつある単球が認められた。これらのリンパ球は細胞質内に内腔が拡張した粗面小胞体、および空胞を多数持っており、活発な蛋白質合成の状態にあることを示していた。また、卵巢腔内に見られたマクロファージの細胞質内には、退行した精子に由来するものと思われる層板状の膜構造物が多数認められた。Lou and Takahashi (1987) は人為的に自己免疫を起こさせたティラピアの精巢で、輸精小管と精小嚢に侵入したマクロファージが正常な精子を貪食すると共に、リンパ球もある種の細胞毒物質を分泌してその周囲の精子を死亡させることを示唆している。ニジカジカにおいてもリンパ球による細胞毒物質の分泌による精子の死亡を示唆する像が認められた。しかし、マクロファージは正常な精子ではなくすでに死亡したと見られる精子を貪食していた。このようなマクロファージによる精子の貪食は、単なる死細胞の排除作用であると思われるが、リンパ細胞によって産生された抗体を仲介としたオプソニン効果による可能性も否定できない。この点に関しては、免疫学的な手法によりさらに詳細な機構を調べる必要がある。

III 付活および受精によるニジカジカ卵の微細構造的変化

1. 材料と方法

1) 実験魚

実験に用いたニジカジカの採集と飼育の方法は前述した通りである。あらかじめ雌魚から採取した卵巣腔液中の精子の有無を検鏡により確認し、また搾出した少数の卵をそのまま海水に浸漬した後の卵割の有無を調べて、雌を未交尾魚と既交尾魚に分けて飼育し、適宜実験に用いた。

2) 組織学的観察

光顕用ならびに透過電顕用の試料の作成と観察は第II章に述べた手順によって行った。また走査電顕による観察には、試料を0.2 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) に溶解した4%パラフォルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド混合液で5時間固定した後、0.1 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、次いでエタノールで脱水し酢酸イソアミルに浸漬した後、液体CO₂で臨界点乾燥を行なった。乾燥後の試料には金蒸着を施し、日立S-2300型走査電子顕微鏡により観察を行なった。

2. 結果

1) 精子の形態

ニジカジカの精子は、頭部と中片がほぼ同じ太さで連なっているために、走査電子顕微鏡による外形観察では両部の区別がつけにくい (図 45-a, b)。

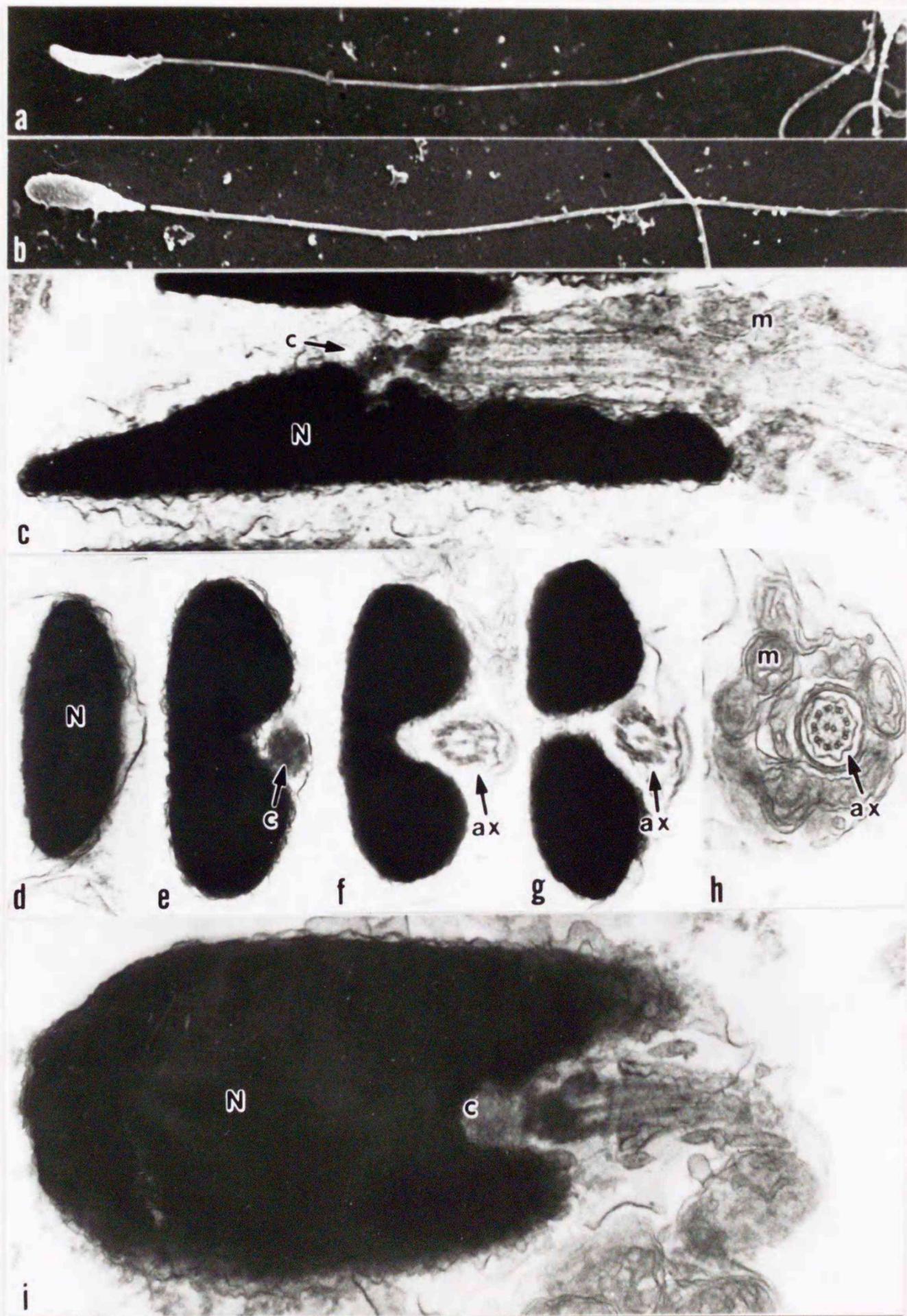


図 45. ニジカジカ精子の電顕像

ax, 軸糸 ; C, 中心体 ; m, ミトコンドリア ; N, 核

a. 側面から見た走査電顕像 . b. 背面から見た走査電顕像 . c. 正中縦断面像 .

d~h. 頭部および中片部の横断面像 . i. 頭部の水平断面像 .

a, b $\times 4,100$. c~i $\times 40,000$.

精子の全長は約 $37 \mu\text{m}$ で、透過電顕像によると頭部は長さ $2.9 \mu\text{m}$ 、幅 $1.4 \mu\text{m}$ 、厚さ $0.8 \mu\text{m}$ で、やや肉厚なへら状を呈する。頭部の精子核は均質に凝集した染色質より成り、先体を欠く（図 45-c, i）。扁平な頭部の一側には中央よりやや後方に 2 個の中心小体が位置し、そのうち遠位中心体から精子核に沿って軸系が伸びている（図 45-c~h）。この側では核の後端よりも前方から軸系に沿ってミトコンドリアが見られ、反対側では核の後縁から後方にミトコンドリアが分布する（図 45-c, 46-a）。頭部後方の中片内には軸系を取り囲むように比較的小型で数多く（10 個以上）のミトコンドリアが縦に連なっているのが特徴的である（図 46-a, b）。中片の後端では原形質が襟状に伸びている（図 46-a）。本種の精子の鞭毛は、周辺に並ぶダブレット微小管と 1 対の中心微小管からなり、典型的な 9+2 型の構造をとる（図 46-c）。

2) 未交尾魚の未受精卵の形態

ニジカジカの排卵された卵の直径は約 1.2mm で、中心を一個の大きな卵黄塊が占め、その周囲の卵細胞質表層には表層胞が並び、さらにその外側を厚さ約 $40 \mu\text{m}$ の卵膜が覆っている（図 47-a）。卵膜は 3 層から成る（図 47-b）。このうち外層は厚さ約 $4.5 \mu\text{m}$ 、内層は最も厚く約 $28 \mu\text{m}$ で、共に同心円状に規則的に並ぶ濃淡の重層構造を示し、中層は厚さが約 $8 \mu\text{m}$ で、ほぼ垂直方向に入組んだやや粗い繊維状の構造からなる（図 48-a）。外層のさらに外側には厚さが約 $0.13 \mu\text{m}$ と極めて薄く、電子密度が比較的高い微細な顆粒が沈着した層が認められる（図 48-b）。また、この層のさらに外側には極めて微細な粒子状の構造がまばらに分布し、これらは微細な繊維状の構造によって卵膜の最外層と繋がりを持っている（図 48-b）。さらにこの微細な粒子は、卵門管の内部表面にも認められる（図 48-c）。

卵膜の動物極に開口する卵門は、直径約 $70 \mu\text{m}$ のなだらかに窪んだ卵門前庭部と、その中心部に開口している卵門管からなる（図 49-a, 50-a）。

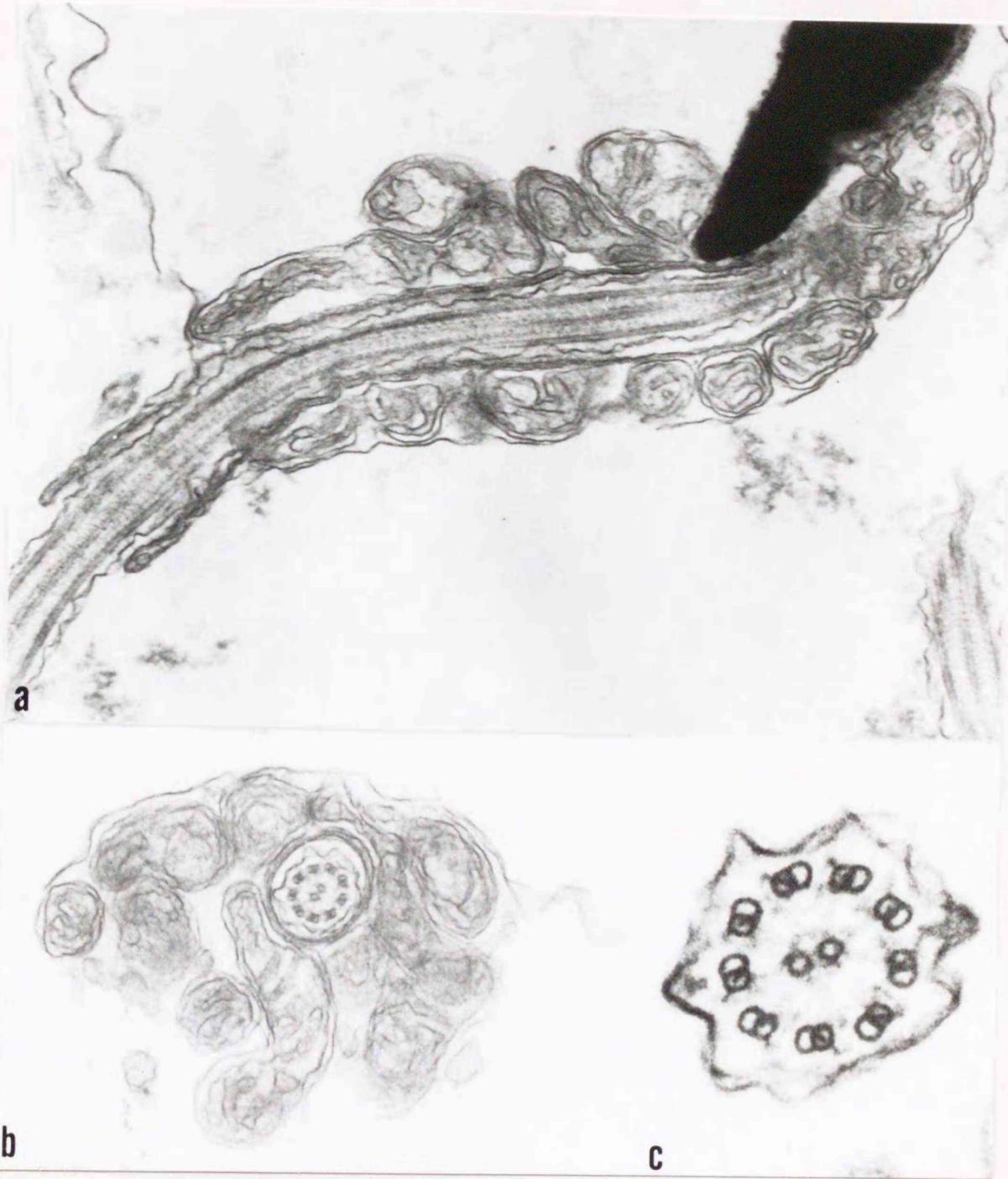


図 46. ニジカジカ精子の透過電顕像

a. 中片の縦断面. 多数のミトコンドリアが見られる. $\times 40,000$

b. 中片の横断面. 多数のミトコンドリアが見られる. $\times 40,000$

c. 尾部の横断面. 軸糸は 9+2 構造を取る. $\times 133,000$

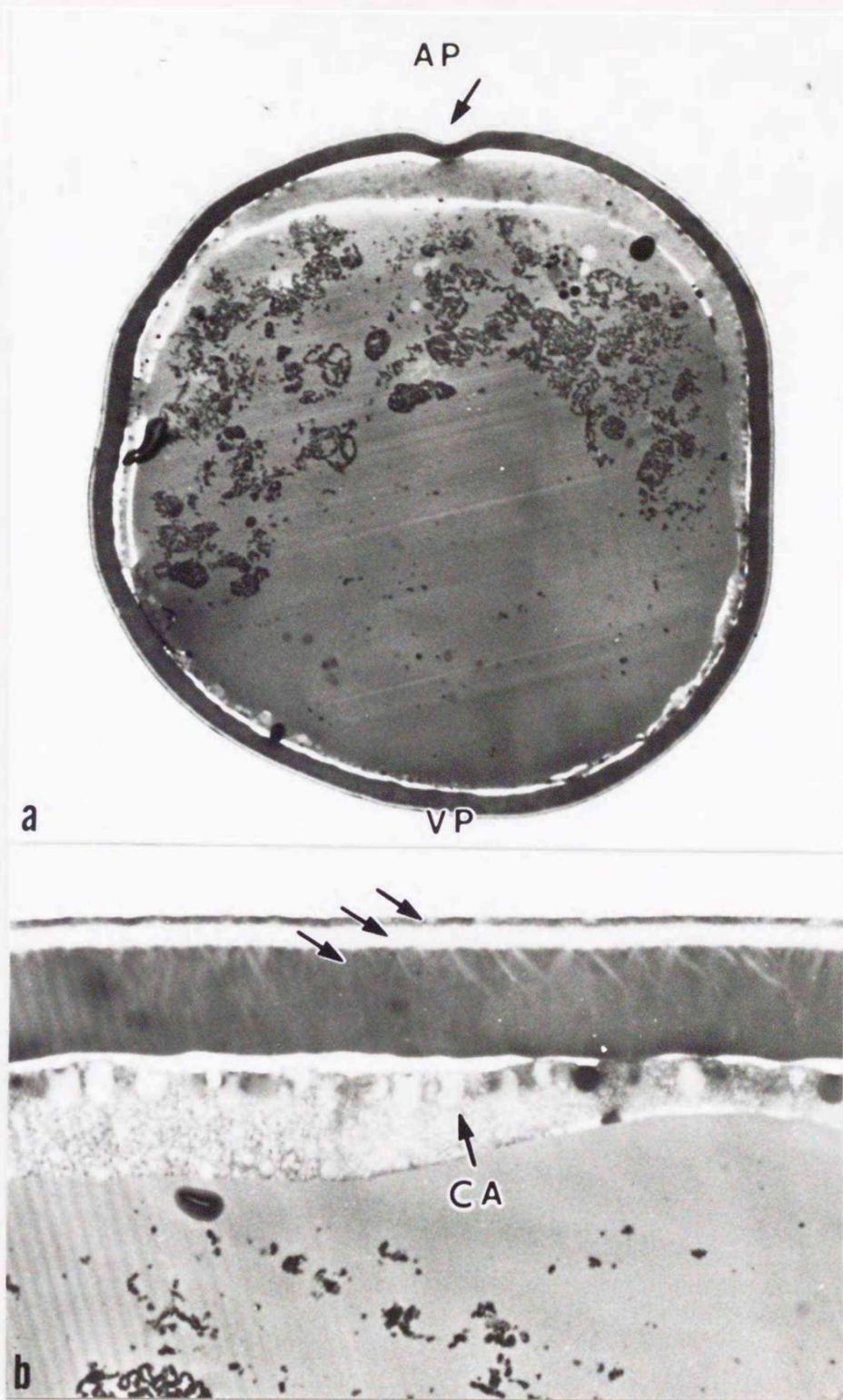


図 47. ニジカジカ未受精卵の光顕像。
 a. 卵の断面。 AP, 動物極 ; VP, 植物極 ; 矢印は卵門部を示す。 × 75
 b. 卵表層の光顕像。 卵膜は 3 層 (矢印) に区別できる。 細胞質表層には多くの表層胞 (CA) が認められる。 × 410

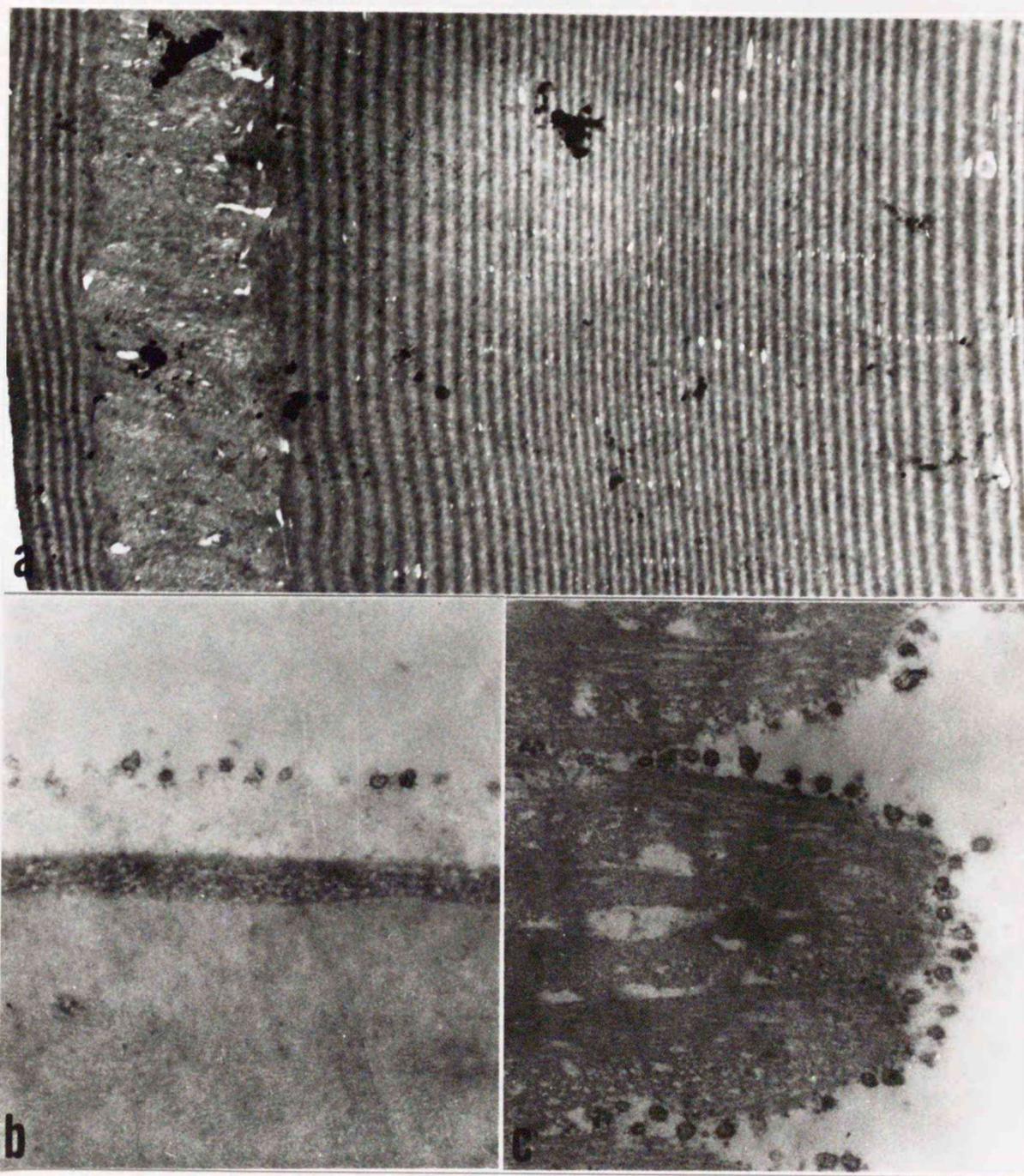


図 48. ニジカジカ卵の卵膜の電顕像.

a. 卵膜. 構造の異なる 3 層が認められる. $\times 4,000$

b. 卵膜表層部の拡大像. 表面には微細な粒子状の構造が認められる.
 $\times 45,000$

c. 卵門管内壁. 内壁表面に微細な粒子状の構造が認められる. $\times 45,000$

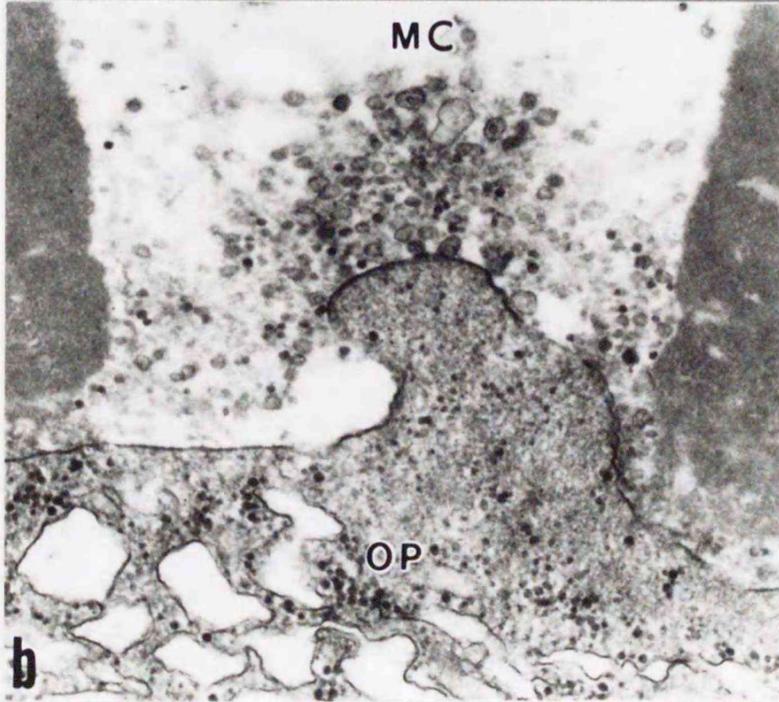
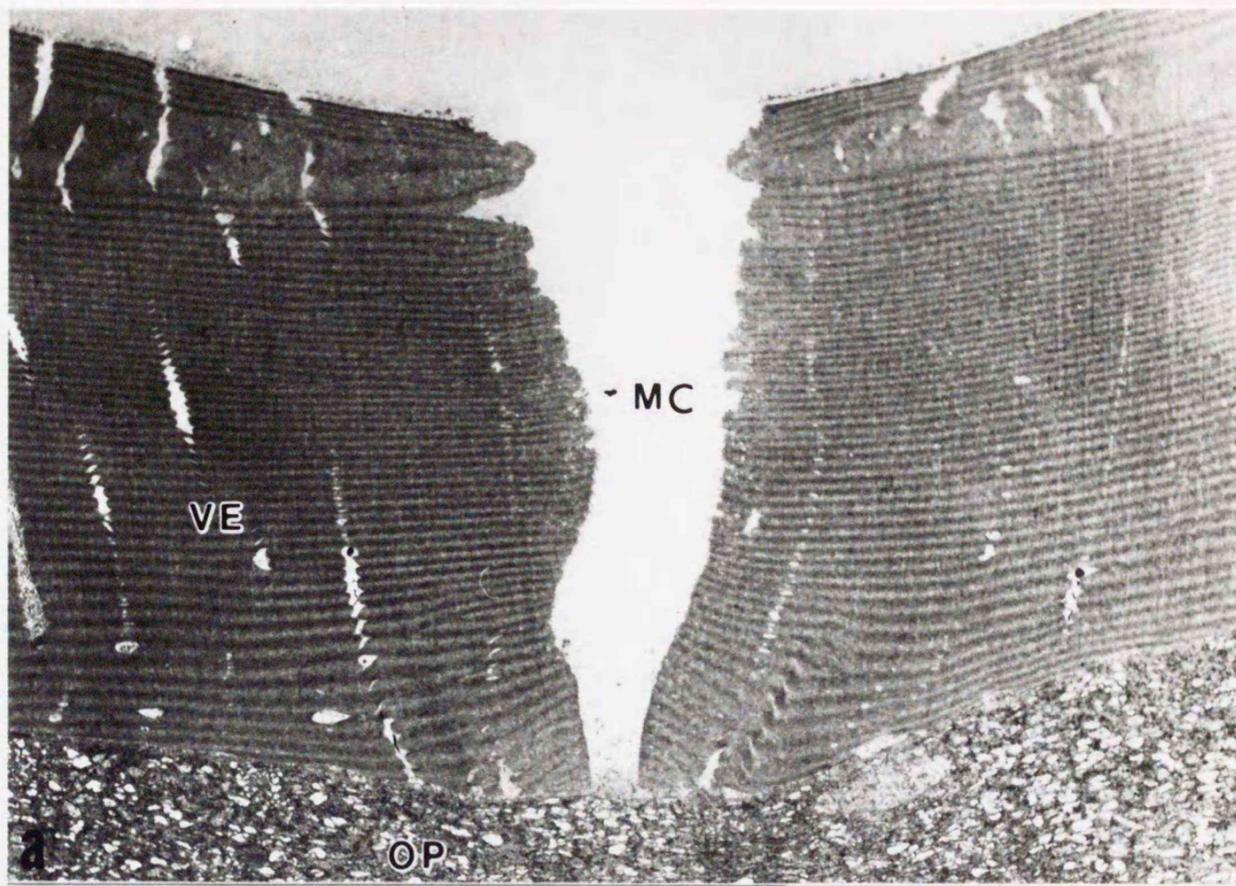


図 49. ニジカジカ未受精卵の卵門部の透過電顕像。
 MC, 卵門管 ;
 OP, 卵原形質 ; VE, 卵膜
 a. 卵門. $\times 3,000$
 b. 卵門管内端部の拡大像.
 卵原形質は卵門かに向って
 隆起している. $\times 40,000$

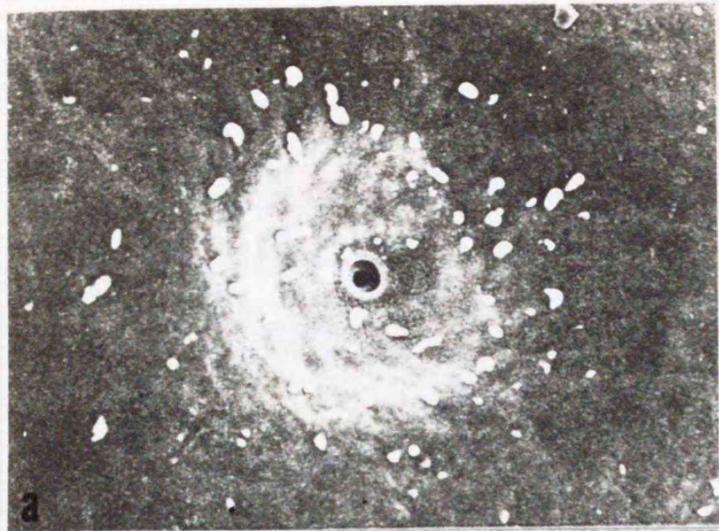


図 50. ニジカジカ卵の卵門部の走査電顕像。

a. 未交尾魚から取り出した卵の卵門部。矢印は卵門外側口を示す。× 480

b. 未交尾魚から取り出した脱卵膜卵の卵門部の卵原形質表面。矢印は卵門直下を示す。× 715

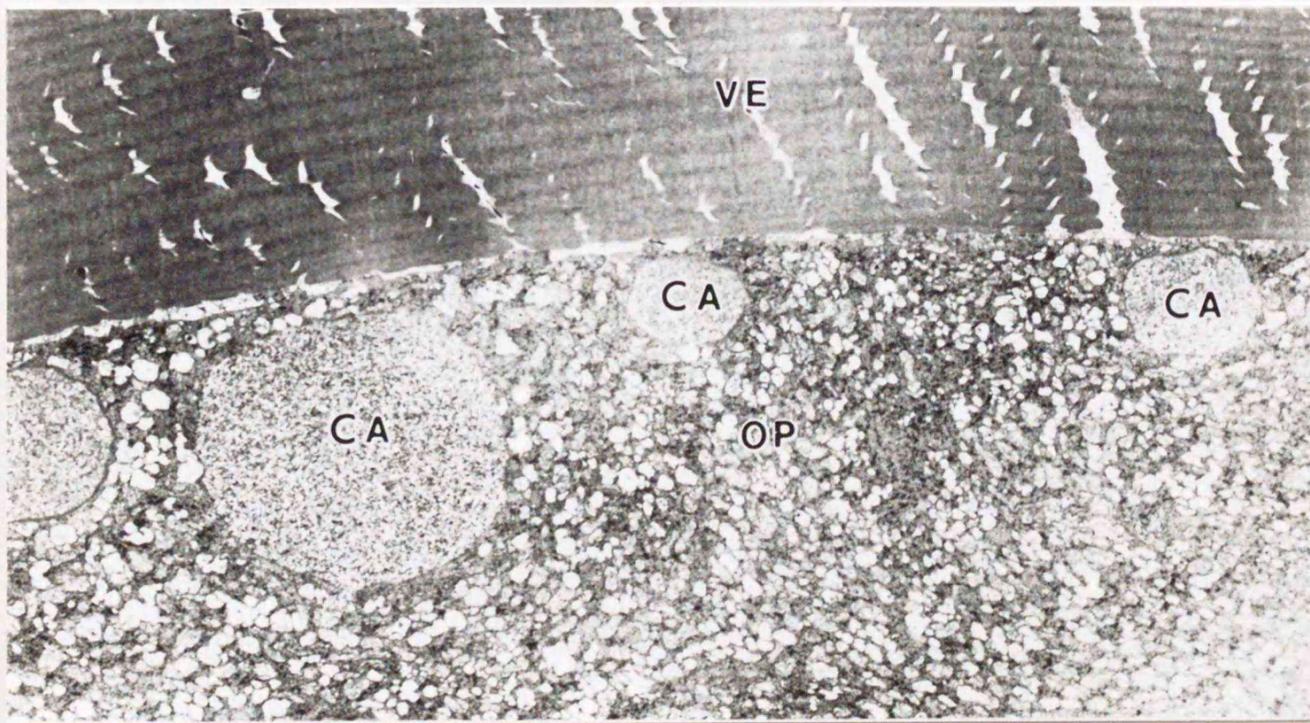


図 51. ニジカジカ未受精卵の透過電顕像。OP, 卵原形質 ; VE, 卵膜原形質表層には表層胞 (CA) が認められる。× 3000

卵門部の卵膜は前庭部で卵の内側に向って窪み、また、卵門管の内底を中心に円錐状に突出して、これに密接する卵原形質表面も円錐状に窪んでいる（図49-a, 50-b）。卵門部の卵膜も3層から成るが、中層が約28 μm と薄くなり、全体の厚さも他の部分に比べやや薄い。卵門管は外側の開口部の直径がおよそ5.5 μm で、内底に向けて次第に細くなる。卵原形質に面する卵門管の先端部の直径はおよそ1.4 μm で、1個の精子のみが通過できる大きさである。卵門管先端部の卵原形質表面には、高さ約0.6 μm 、少数のリボゾームを含む電子密度の低い原形質突起が卵門管内に突出している（図49-b）。

本種の未受精卵の卵原形質表層には多数の表層胞が認められる（図47-b, 51）。多くの表層胞は微細な顆粒をほぼ均一に含む電子密度の低い内容物からなるが、表層胞被膜に沿って微細顆粒が集積して、三日月状やリング状を呈するものから、ほぼ全体に電子密度が高いものまで、その形状は様々である（図52-a~f）。

3) 受精による卵の変化

a. 海水移行による卵の変化と初期発生過程

既交尾のニジカジカの雌から搾出した卵をそのまま海水に浸漬すると、やがて胚発生を開始する。海水に移された卵は、個体により差はあるが、18~23時間後にはその多くが桑実期に達していた（表1）。一方、卵巢から取り出した卵を卵巢腔液に浸したままの状態では全く変化が起らなかった（表1）。このことはニジカジカの卵が、卵巢腔液中では何らかの要因によって受精および付活を抑制されており、産卵環境の海水に接して初めて受精反応を開始することを示唆している。

ニジカジカの卵を海水に浸漬した後の、初期発生過程を図53に示した。水温10℃では、接水後10分で卵膜の収縮が始まり、囲卵腔の形成が開始される。1時間後には囲卵腔の形成が終了し、卵表層の細胞質は動物極側に移動

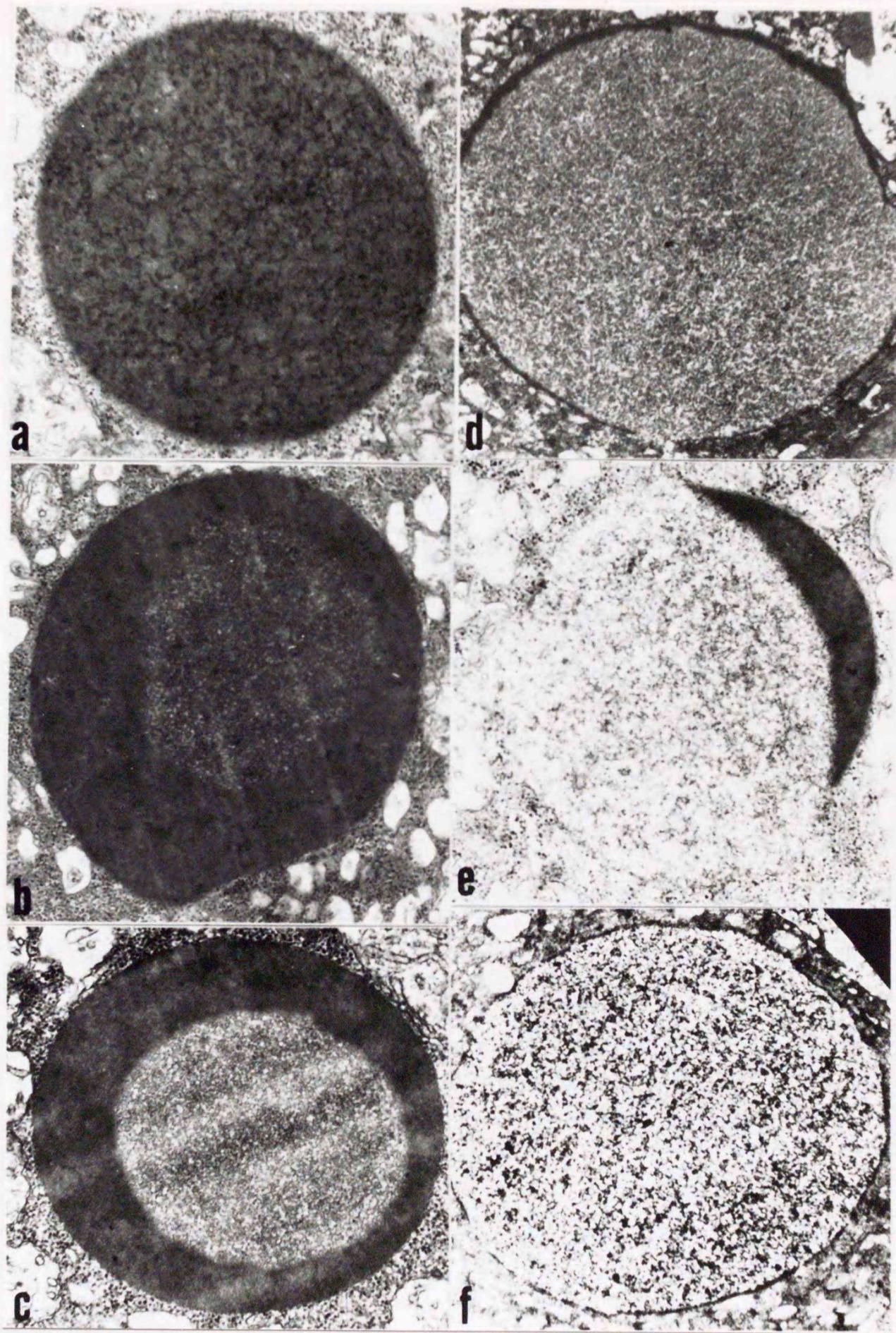


図 52. ニジカジカの表層胞の透過電顕像。
 a~f. ニジカジカ卵原形質中に見られた内部の電子密度を異にする多型の表層胞。 a. $\times 16,400$, b. $\times 17,800$, c. $\times 23,300$, d. $\times 1,000$, e. $\times 20,000$, f. $\times 56,000$

表 1. 既交尾ニジカジカ卵の海水および卵巣腔液浸漬による 18~23 時間後の状態. 数字は卵数を示す.

		全卵数	桑実期	異常卵割	胚盤形成	無変化
海水	個体 1	141	123	0	13	5
	個体 2	97	87	0	6	4
	個体 3	90	47	13	19	11
卵巣腔液		53	0	0	0	53

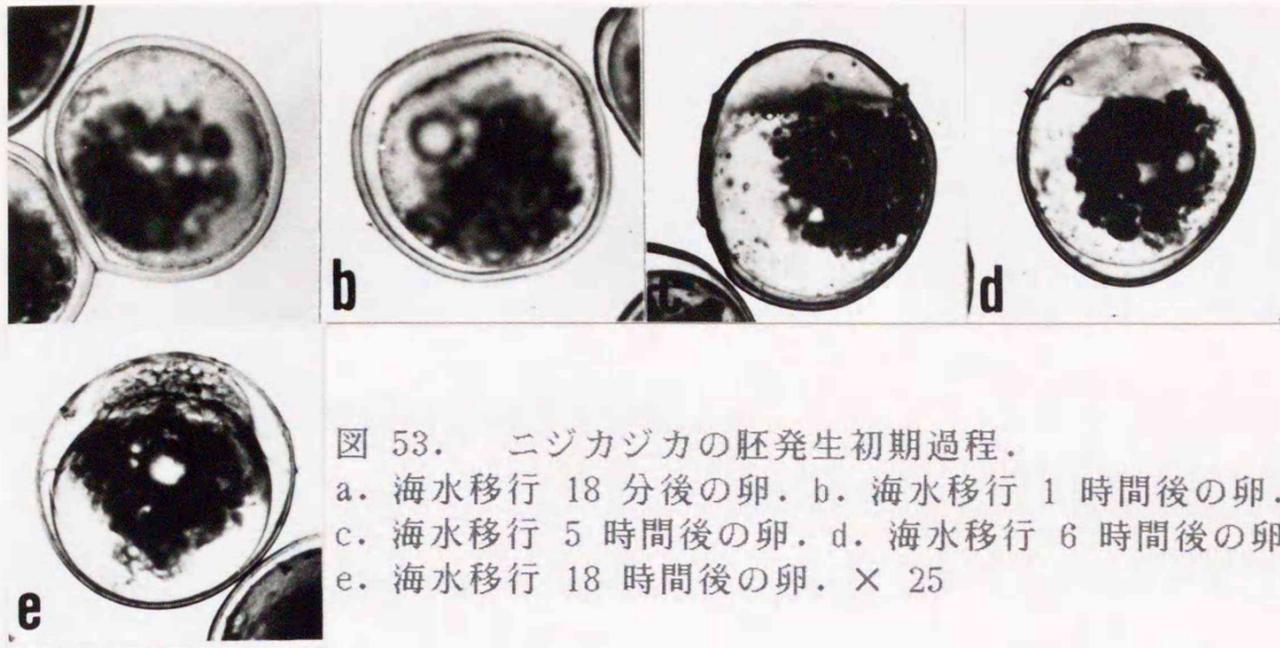


図 53. ニジカジカの胚発生初期過程。
 a. 海水移行 18 分後の卵. b. 海水移行 1 時間後の卵.
 c. 海水移行 5 時間後の卵. d. 海水移行 6 時間後の卵.
 e. 海水移行 18 時間後の卵. × 25

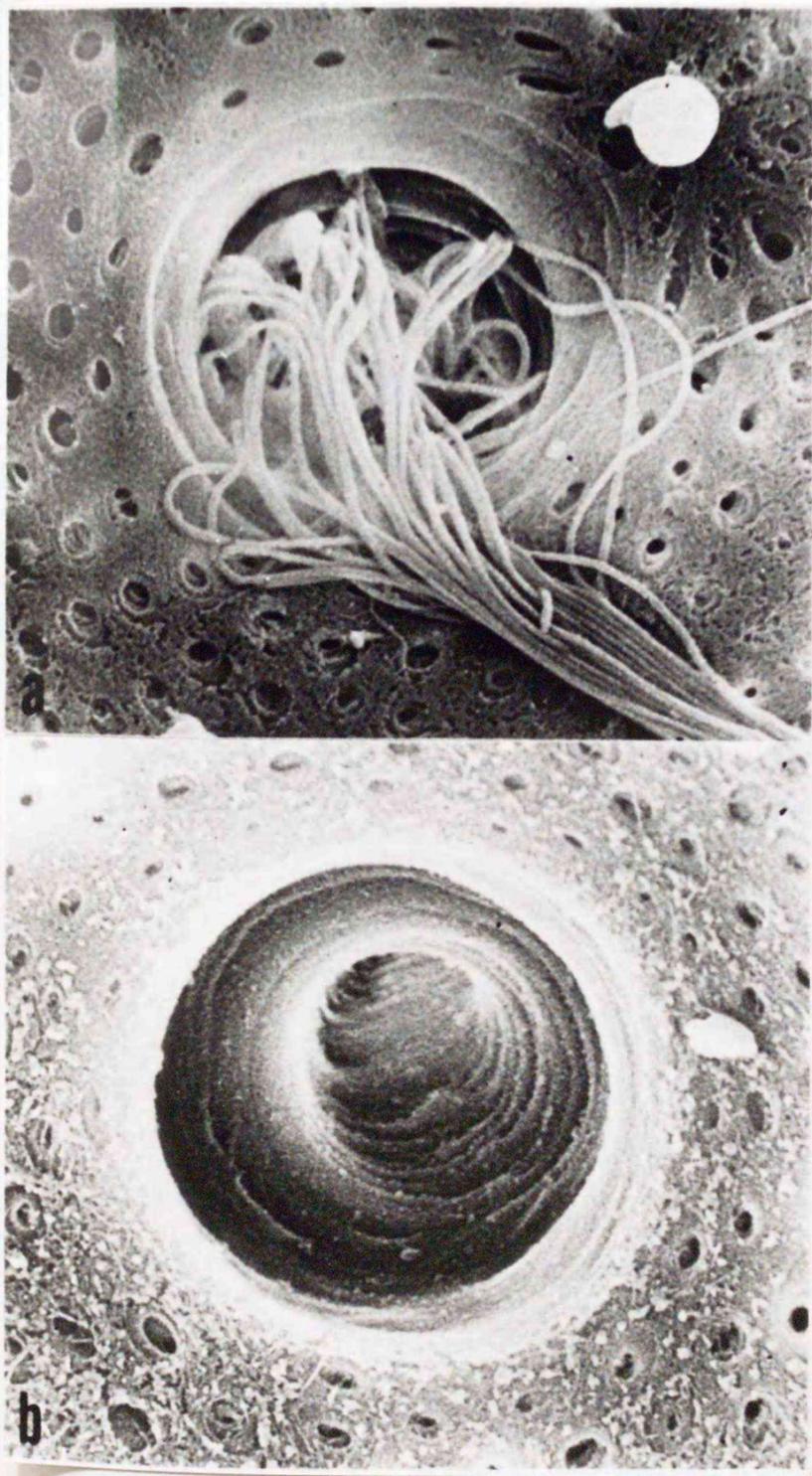


図 54. ニジカジカ卵の卵門部の走査電顕像。
 a. 既交尾魚の卵の卵門. 多数の精子が卵門内に見られる. × 5,800
 b. 未交尾魚の卵の卵門. × 5,800

し始め、約 2 時間後には動物極に胚盤が形成される。第 1 卵割は海水に浸漬してから 5 時間後に認められ、卵は 2 細胞期となる。6 時間後には 4 細胞期の卵が観察され始め、18 時間後には卵は桑実胚期に達する。

b. 海水移行による卵の組織学的変化

既交尾の雌から搾出した卵では、卵門の周辺および卵門管内に多数の精子が存在する（図 54-a）。これに対して未交尾魚から搾出した卵では卵門部に精子が全く認められない（図 54-b）。既交尾魚から取り出した卵の卵門管の内腔には極めて多くの精子が侵入しており、卵門管先端部にまで達しているが、卵原形質内には侵入していない（図 55）。このように卵門内に精子が侵入している卵でも、卵原形質表層には未交尾魚の卵と同様に多くの表層胞が認められ、それらはまだ崩壊を起こしていない。また、卵門付近の卵原形質中に第 2 減数分裂中期の染色体が認められ、その直上部の卵原形質表面には第 1 極体が認められる（図 55）。これらのことから既交尾魚の卵巢腔内に排卵された卵では、既に配偶子の会合が起きているが、受精は起きていないことが示唆された。

ニジカジカの卵を海水に浸漬すると、5 分後には卵原形質中に精子頭部が認められた（図 56）。さらに 60 分後には、卵門付近の卵原形質中に光顕的に明瞭な星状体を伴う雄性前核が認められ（図 57）、雌性前核との融合の途上にあることが示唆された。このことから本種の卵は海水に接することにより受精反応を開始することが明らかとなった。

c. 受精卵における卵門内精子の消失過程

既交尾魚から搾出された卵を海水に移行した後の、卵門管内の精子の有無を光顕により経時的に観察した結果を表 2 に示した。海水移行後 5 分には卵門管内から精子が消失した卵が出現し始めた。その後、時間の経過と共に卵

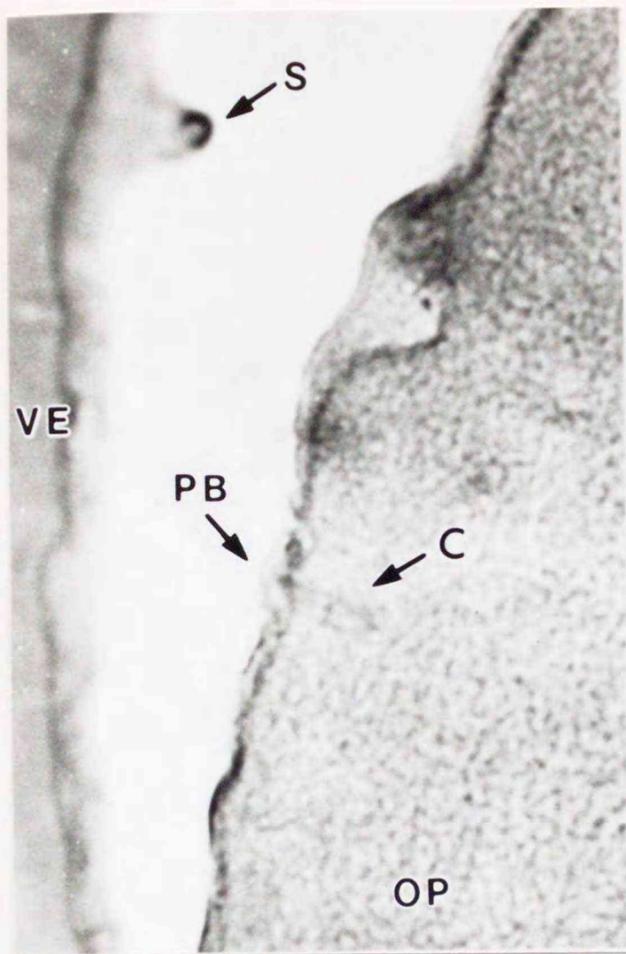


図 55. 海水移行前のニジカジカ卵の卵門付近の光顕像。
 C, 第 2 減数分裂中期の染色体 ; OP, 卵原形質 ; PB, 第 1 極体 ; S, 精子 ; VE, 卵膜。
 卵門内端部に精子, 卵原形質中には第 2 減数分裂中期の染色体, 卵原形質表層には第 1 極体が見られる。× 220



図 56. 海水移行 5 分後のニジカジカ卵の光顕像
 OP, 卵原形質。
 矢印は卵原形質中に陥入している精子を示す。
 × 2,000



図 57. 海水移行 60 分後のニジカジカ卵の動物極付近の光顕像。

OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔
雄性前核 (矢印) が認められる。× 3,200

表 2. ニジカジカ卵の海水移行による卵門管内精子の有無.
数字は卵数を表す.

	海水移行後の 経過時間 (分)	卵門管内の 精子の有無	
		有	無
未交尾魚	0	0	17
既交尾魚	0	12	0
	1	10	0
	2	18	0
	3	10	0
	5	9	3
	10	7	5
	20	9	4
	60	0	13

門管内から精子が消失した卵の割合が増加した。海水移行 60 分後には、観察した全ての卵で卵門管内には精子が見られなくなった。

4) 受精における卵および精子の微細構造的変化

a. 海水移行前

既交尾魚から搾出された卵の卵門管の先端部には、受精に関わると思われる 1 個の精子が、卵原形質表面の細胞質突起に頭部を直接接着させている (図 58)。このような卵の卵膜を取り除いて、卵門部の原形質表面を走査電子顕微鏡で観察しても、精子は見られない (図 59)。また、高倍率で精子膜と卵原形質膜を観察しても、膜融合を起こしている像は認められない (図 60-a, b)。これらのことから、既交尾魚の卵巣内では、精子は卵原形質膜と単に緩く接着した状態にあるにすぎないと思われる。

b. 海水移行 5 秒後

海水移行前に卵門管内端部の卵原形質突起に接着していた精子は、海水移行の 5 秒後にはまだ特別な変化をみせず、頭部を卵原形質突起に接着させた状態にある。観察した卵の中には原形質突起を欠き、平坦な原形質膜表面に直接精子頭部を接着させているものも認められたが、このような場合でも精子はまだ卵原形質膜との膜融合を起していなかった (図 61-a~c)。

卵の動物極付近の表層胞も、まだ崩壊を起こしてはいないが、卵原形質膜と表層胞の限界膜は接した状態にあり、崩壊直前にあると思われる。

c. 海水移行 10~15 秒後

受精に関わる精子は、頭部のおよそ 1/2 を卵原形質に陥入させている。精子頭部の先端付近の膜と卵原形質膜は部分的に融合して小胞を形成する胞状化を起こし、膜融合の開始を示す (図 62 a~d)。胞状化した精子膜の内側に



図 58. 海水移行前のニジカジカ卵の卵門部の透過電顕像。
受精に関わる精子が卵原形質突起（矢印）に頭部を接着させている。
× 20,000

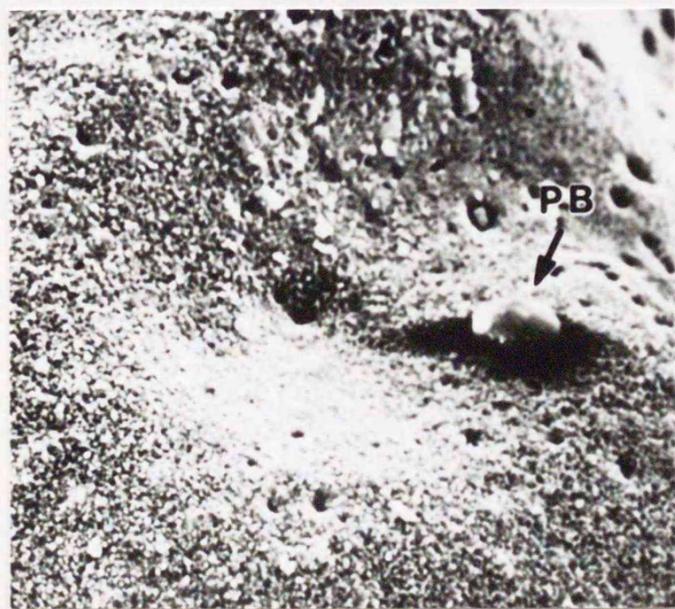


図 59. 海水移行前の既交尾ニジカジカから取り出した卵の卵門部の卵原形質表面の走査電顕像。
PB, 極体
矢印は卵門直下を示す。× 710

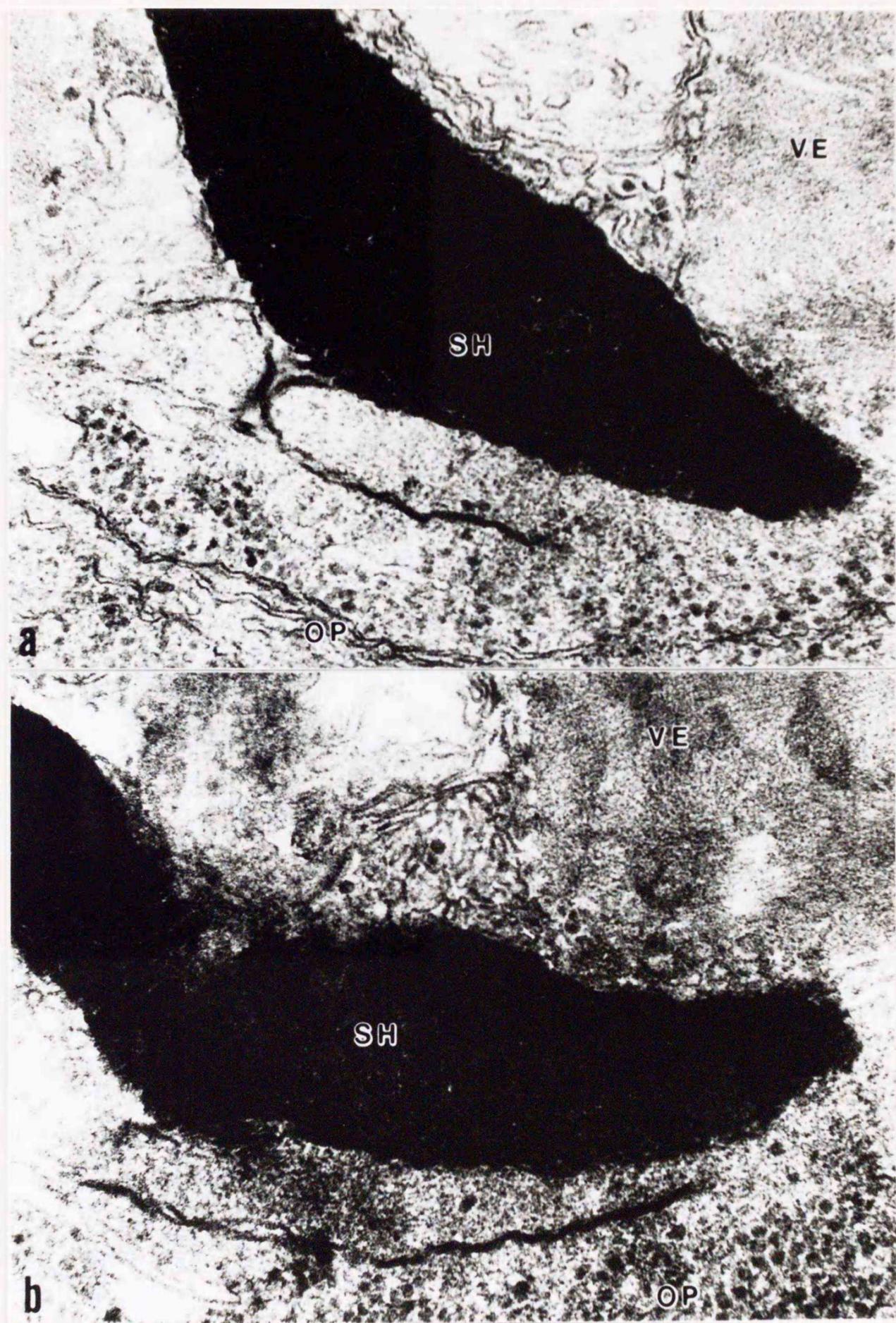


図 60. 海水移行前のニジカジカ卵の卵門管内端部に見られる精子頭部の高倍率透過電顕像。 OP, 卵原形質 ; SH, 精子頭部 ; VE, 卵膜
 a, b. 精子頭部と卵原形質突起の膜は直接接着しているが, 膜融合は起きていない。 × 90,000

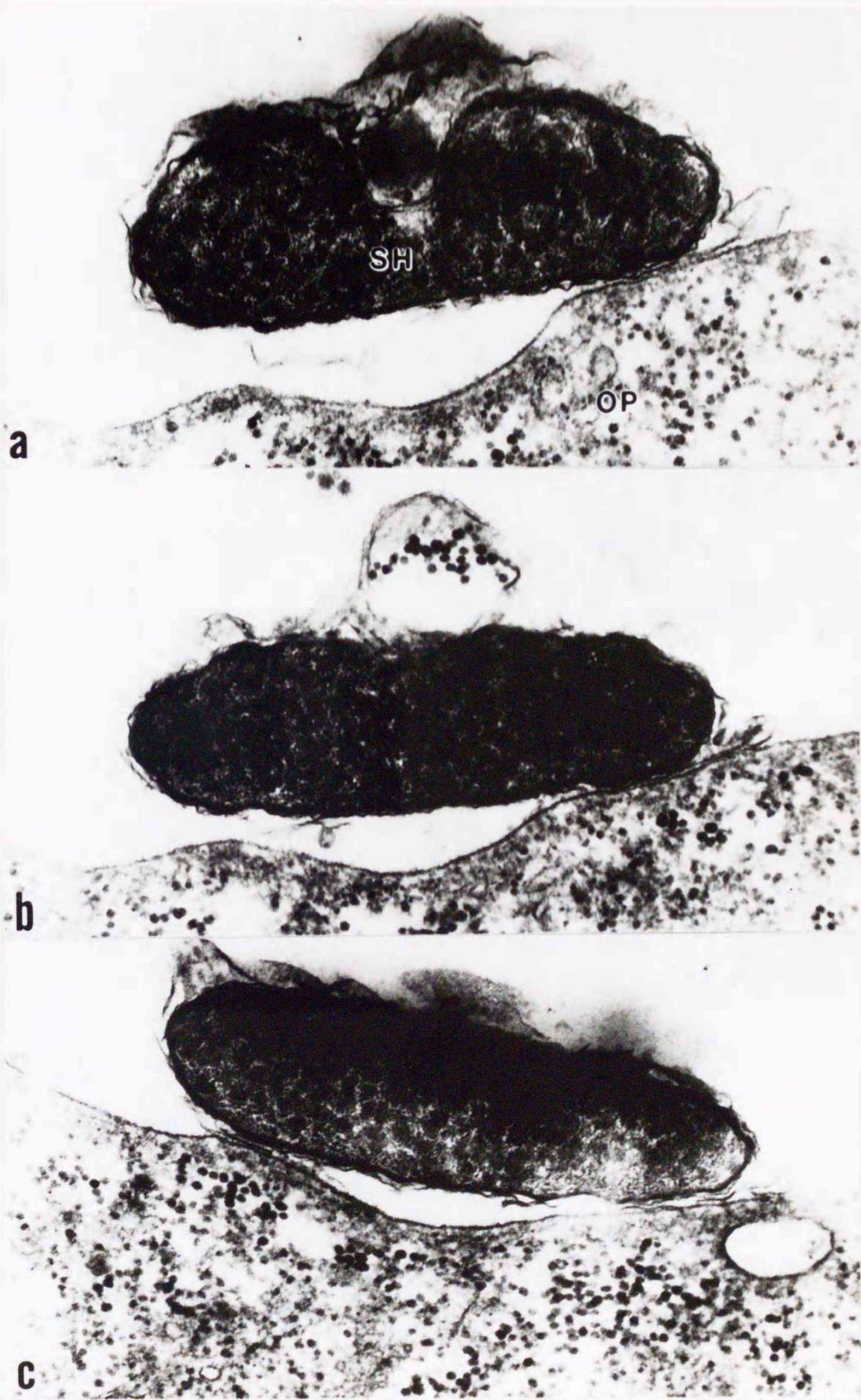


図 61. 海水移行 5 秒後のニジカヅカ卵の卵門直下の卵原形質表面に見られた精子頭部の高倍率透過電顕像。 OP, 卵原形質; SH, 精子頭部
 a~c. 受精に関わると思われる精子頭部の連続切片像。精子頭部と卵原形質膜は直接接着しているが, 膜融合は起きていない。卵原形質突起は認められない。× 60,000

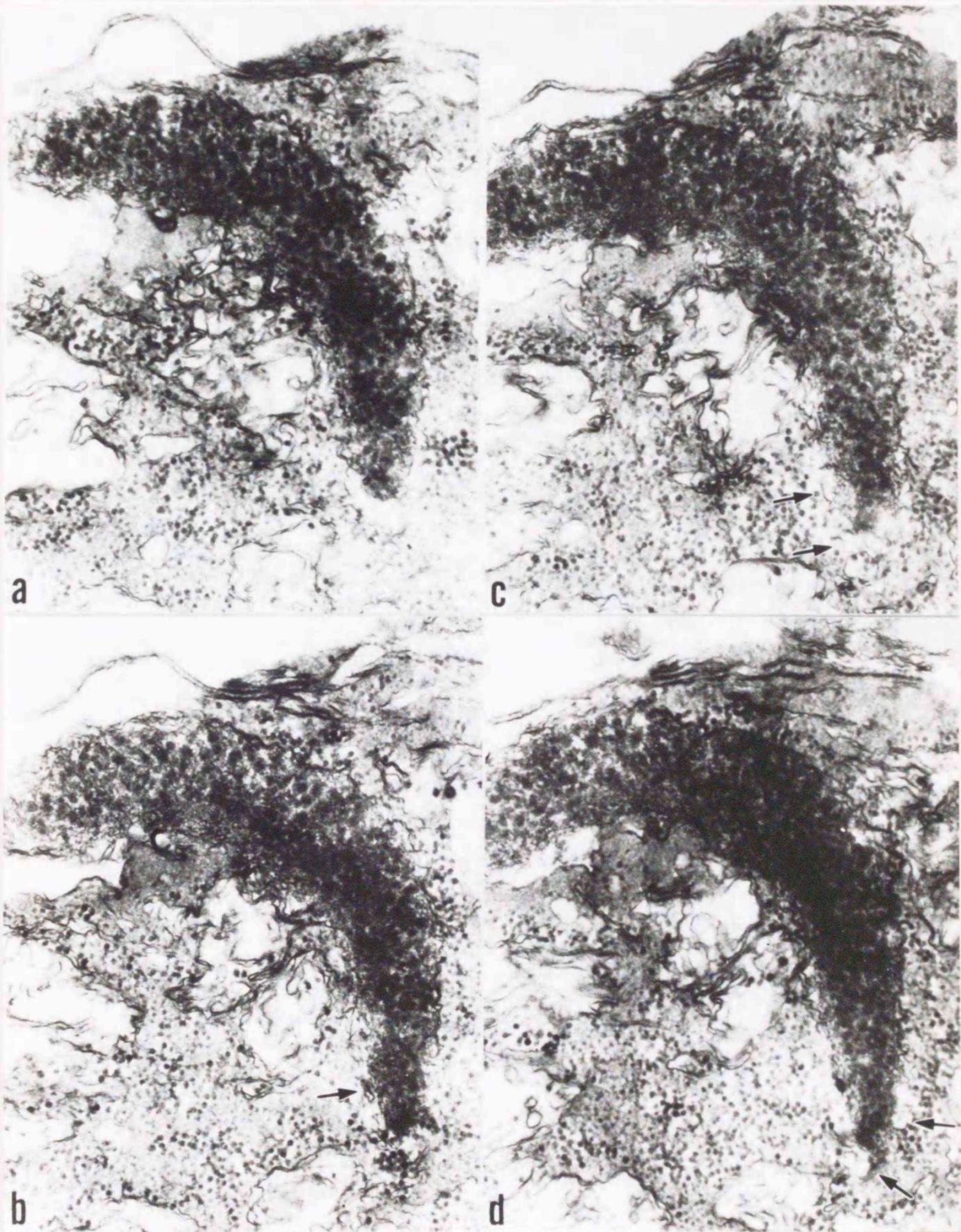


図 62. 海水移行 10 秒後のニジカジカ卵の卵門管内端部の透過電顕像。
 a~d. 卵原形質に陥入している精子頭部の連続切片像。精子頭部先端部の膜が卵原形
 質膜と胞状化している（矢印）。× 40,000

は精子頭部の核膜が存在する。さらに膜融合が進むと、精子膜は完全に消失し、精子は核膜を卵原形質に露出させた状態になる（図 63）。これらの精子頭部周辺の卵原形質内には胞状化した精子膜と卵原形質膜に由来するとみなされる小胞状の膜構造が認められる。精子陥入部の卵原形質は未陥入部分の精子頭部に沿って隆起している（図 63）。

精子陥入部付近の卵原形質には、リボゾームが比較的少なく電子密度の低い領域が認められるようになる（図 63）。卵の動物極付近の表層胞は、その限界膜を卵原形質膜と融合させて卵膜と卵細胞質との間に開口し、表層胞の内容物を放出する（図 64）。

d. 海水移行 20~30 秒後

受精過程にある精子は、すでに頭部の 1/2 以上を卵原形質に陥入させている（図 65-a,b）。この精子の頭部原形質膜は完全に消失し、精子陥入部の卵原形質内には、胞状化によって生じたと思われる多数の小胞状の膜構造が認められる（図 66-a,b）。この部位の卵原形質は細胞内小器官をほとんど含まず、精子頭部の未陥入部分に向かって隆起し、いわゆる受精突起を形成している（図 65-b）。

この時期の精子の尾部では、正常精子に見られる 9+2 型の微小管構造が消失し、縦断面では、多数の繊維状の構造が尾部の前方から後方へと密に走っているように見え（図 65-b）、横断面で見ると、尾部の内部は電子密度の低い微細な粒子状の構造が充満している（図 67）。また、このような形態の変化は受精に伴って起き、中片の中部よりも後方の微小管で起きるようである。

卵門付近の表層胞はすでに崩壊しているが（図 65-a）、卵門から少し離れた部位では、表層胞は卵原形質膜に接して開口直前にある像が観察される（図 68）。観察した卵の中には、受精に関わる精子以外にも、囲卵腔内に侵入した精子が認められた例があった。これらの精子は頭部を卵原形質膜に接着

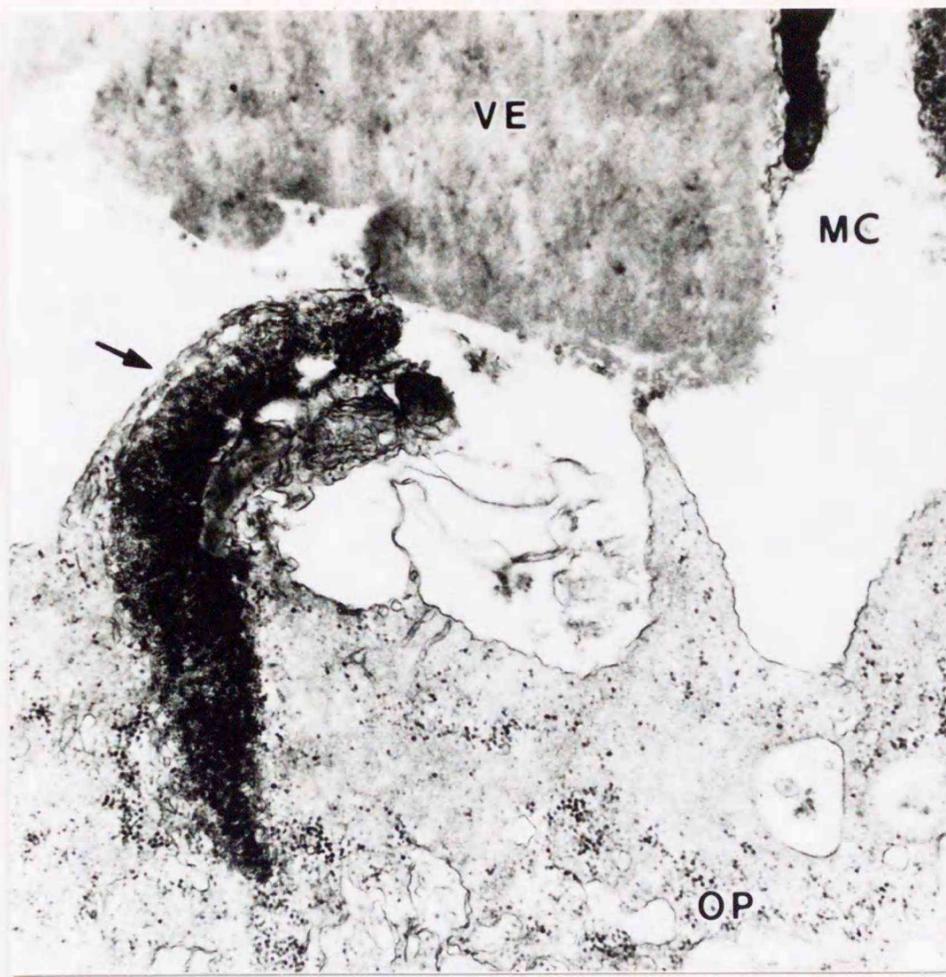


図 63. 海水移行 10 秒後のニジカジカ卵の卵門部の透過電顕像。
MC, 卵門管 ; OP, 卵原形質 ; VE, 卵膜
卵原形質に陥入している精子頭部の周辺には, 小胞状の膜構造が認められる。精子頭部周辺の卵原形質には電子密度の低い領域が見られる。未陥入部分の精子頭部に沿って, 卵原形質が隆起 (矢印) している。× 20,000

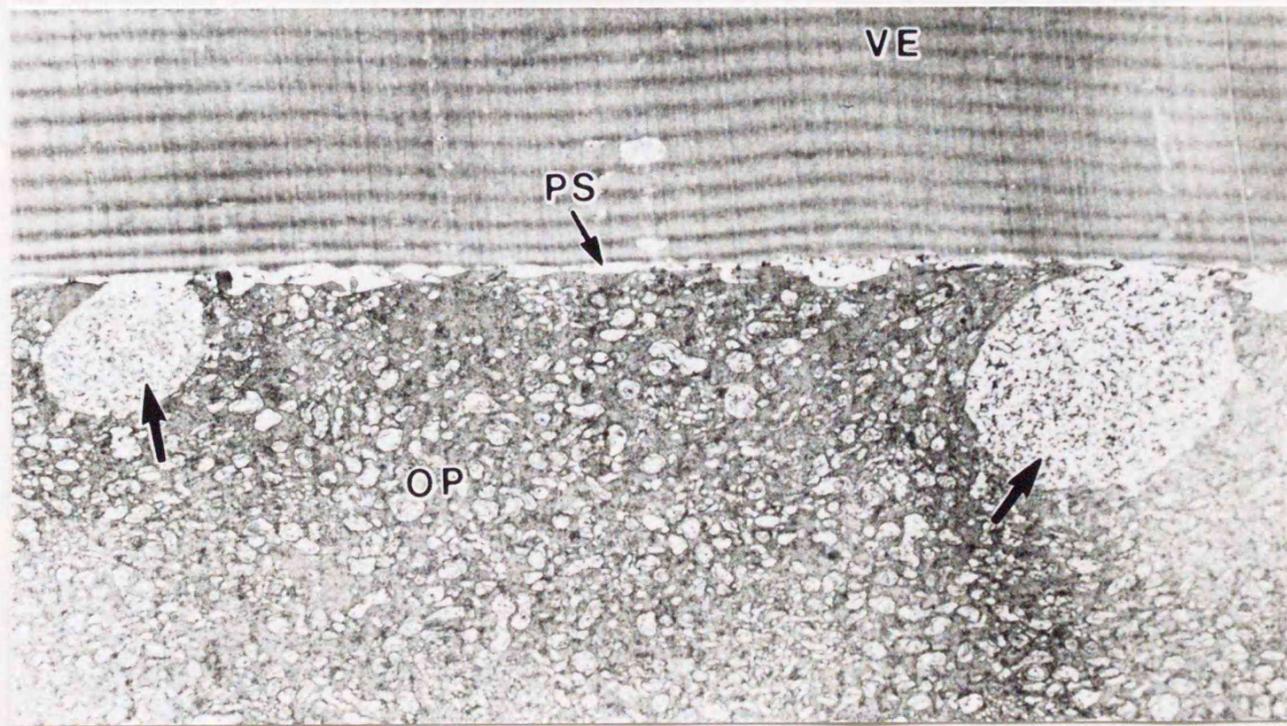


図 64. 海水移行 10 秒後のニジカジカ卵の卵門付近の原形質表層の透過電顕像。 OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔 ; VE, 卵膜
表層胞 (矢印) は崩壊を開始している。× 4,000

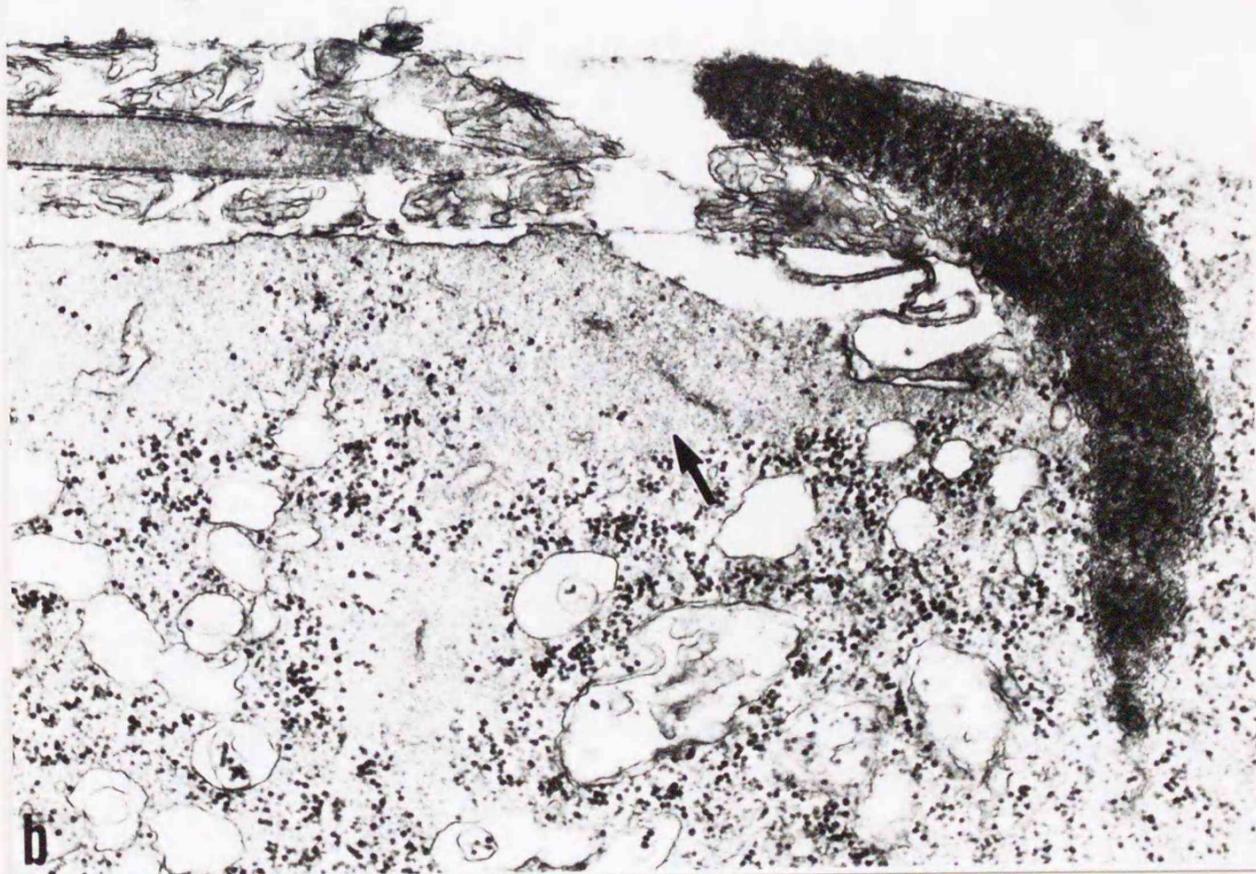
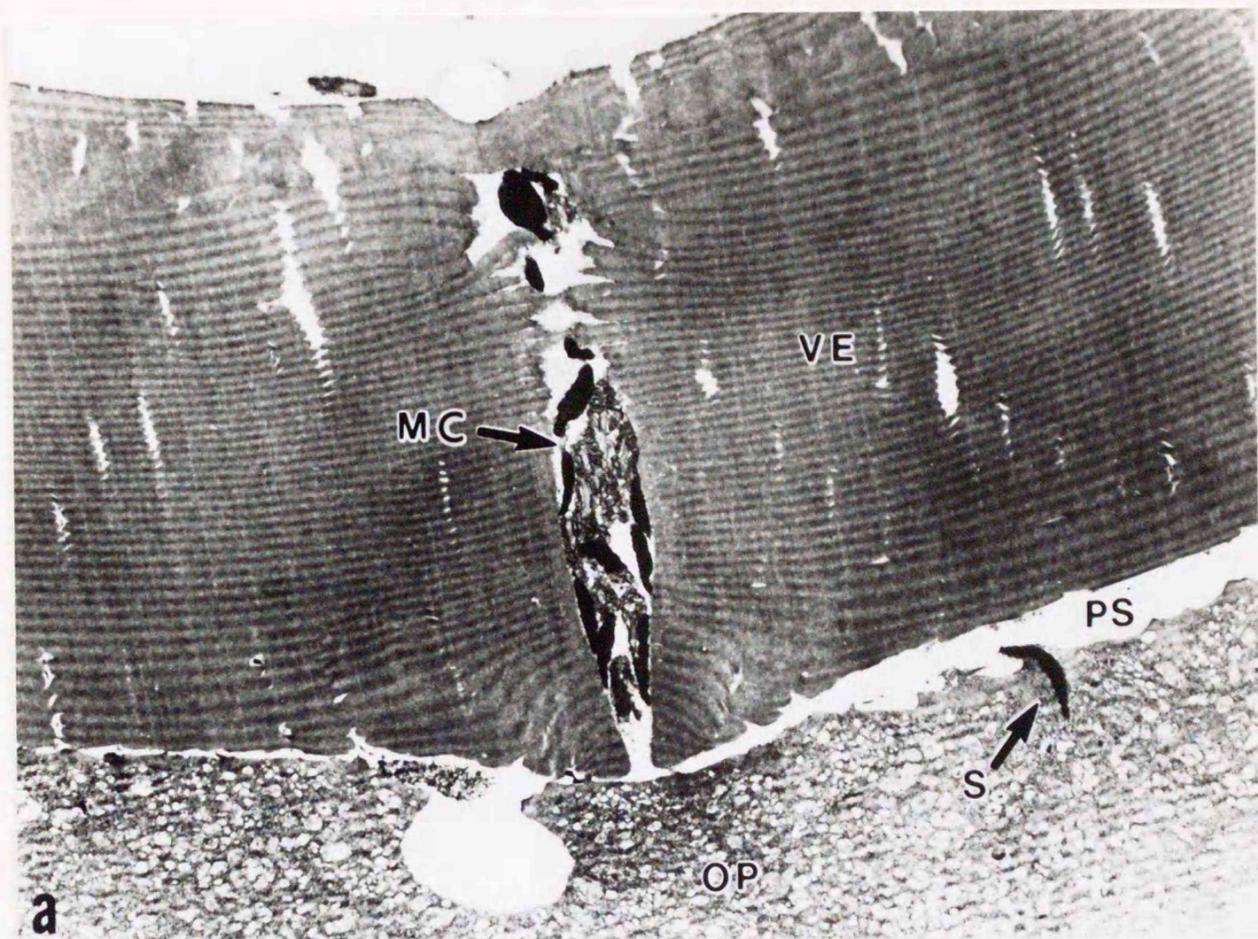


図 65. 海水移行 30 秒後のニジカジカ卵の卵門付近の透過電顕像。
 MC, 卵門管 ; OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔 ; S, 精子 ; VE, 卵膜
 a. 精子は頭部のおよそ 1/2 を卵原形質に陥入させている。表層胞は崩壊し、
 内容物を囲卵腔に放出している。× 3,000
 b. 受精している精子の頭部の細胞膜は消失している。尾部の軸糸は微細な織
 維状の構造を取る。卵原形質は精子頭部に沿って隆起している。矢印は細胞
 内小器官をほとんど含まない領域を示す。× 30,000

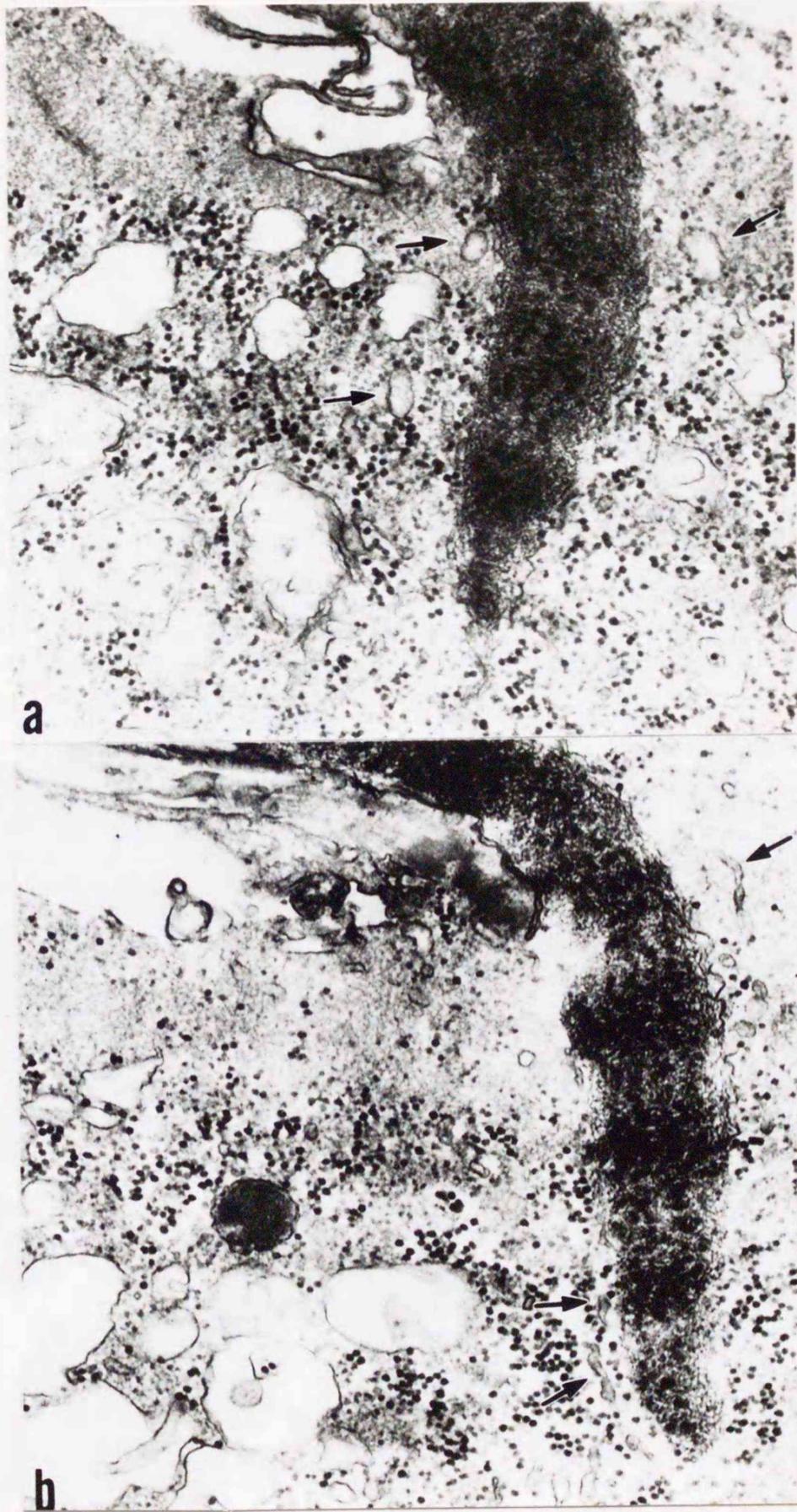


図 66. 海水移行 30 秒後のニジカジカ卵の卵門付近に見られた受精している精子の透過電顕像。
 a, b. 卵原形質中に陥入している精子頭部の周辺には小胞状の構造（矢印）が認められる。× 40,000



図 67. 海水移行 10 秒後のニジカジカ卵の卵門内端部に見られた受精していると思われる精子の透過電顕像。中片部の軸糸に 9+2 構造が見られない (矢印)。
× 80,000

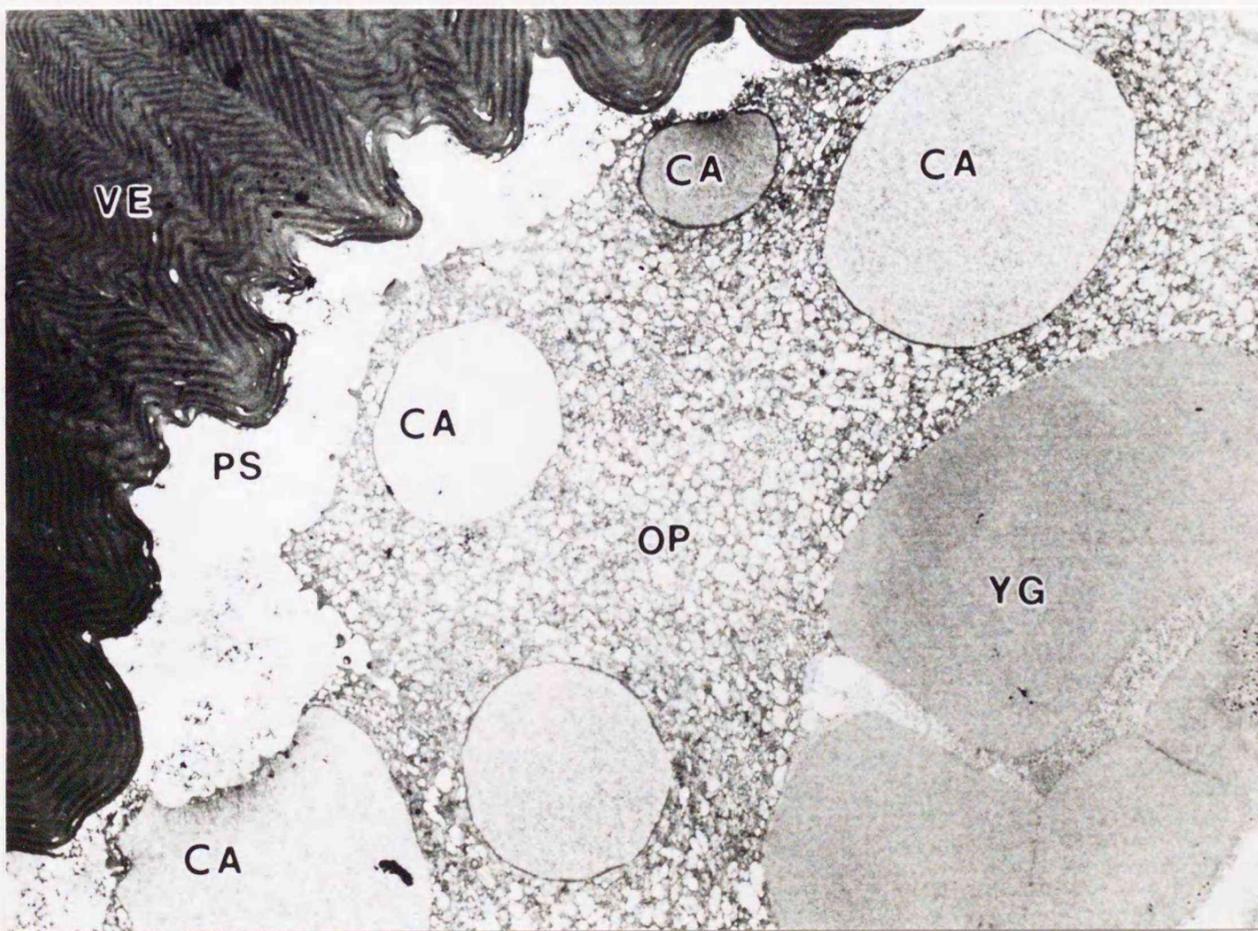


図 68. 海水移行 30 秒後のニジカジカ卵の透過電顕像。
CA, 表層胞 ; OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔 ; VE, 卵膜 ; YG, 卵黄
× 2,000

させていたが、卵原形質中への陥入は起こしていなかった。

e. 海水移行 1~2 分後

精子は、その中片部までを完全に卵原形質中に陥入させている（図 69-a, b）。その付近の卵原形質中には、前述の精子の陥入過程で生じたと見なされる小胞が一行に並んでいる（図 70-a, b）。卵原形質中には、精子中片のミトコンドリア、軸糸、および核膜に包まれた核が露出している。この時期の精子の若干では核の染色質がやや顆粒状を呈している。精子陥入部付近の卵原形質表層で、ほとんどリボゾームのみを含む領域が明瞭なデルタ状の電子緻密層を形成している（図 69-a, b）。

表層胞の崩壊はさらに進み、走査電顕による観察では開口部にしばしば表層胞の内容物が球状を呈して認められる（図 71-a）。卵原形質表層には既にその内容物を放出した後と思われる窪みが見られ（図 71-b）、また囲卵腔には表層胞内容物が放出されたままの球形、あるいはそれが拡散した状態で存在する（図 71-c）。しかし、卵原形質中にはまだ埋没した表層胞も数多く残留している。

f. 海水移行 3 分後

卵原形質中にさらに深く陥入した精子では（図 72-a）、先端部付近の核膜が分離し、胞状化を起こしている（図 72-b）。このように核膜が離脱した部位では既に染色質も小さな顆粒状をなして分散し始めている（図 72-b）。また、すでに核膜が完全に消失した後には（図 73-a）、卵原形質中に顆粒状を呈した精子の染色質と中心体、および軸糸の基部が観察される（図 73-b）。中心体付近には分離した核膜の一部と見なされる膜構造が認められる（図 73-b, c）。

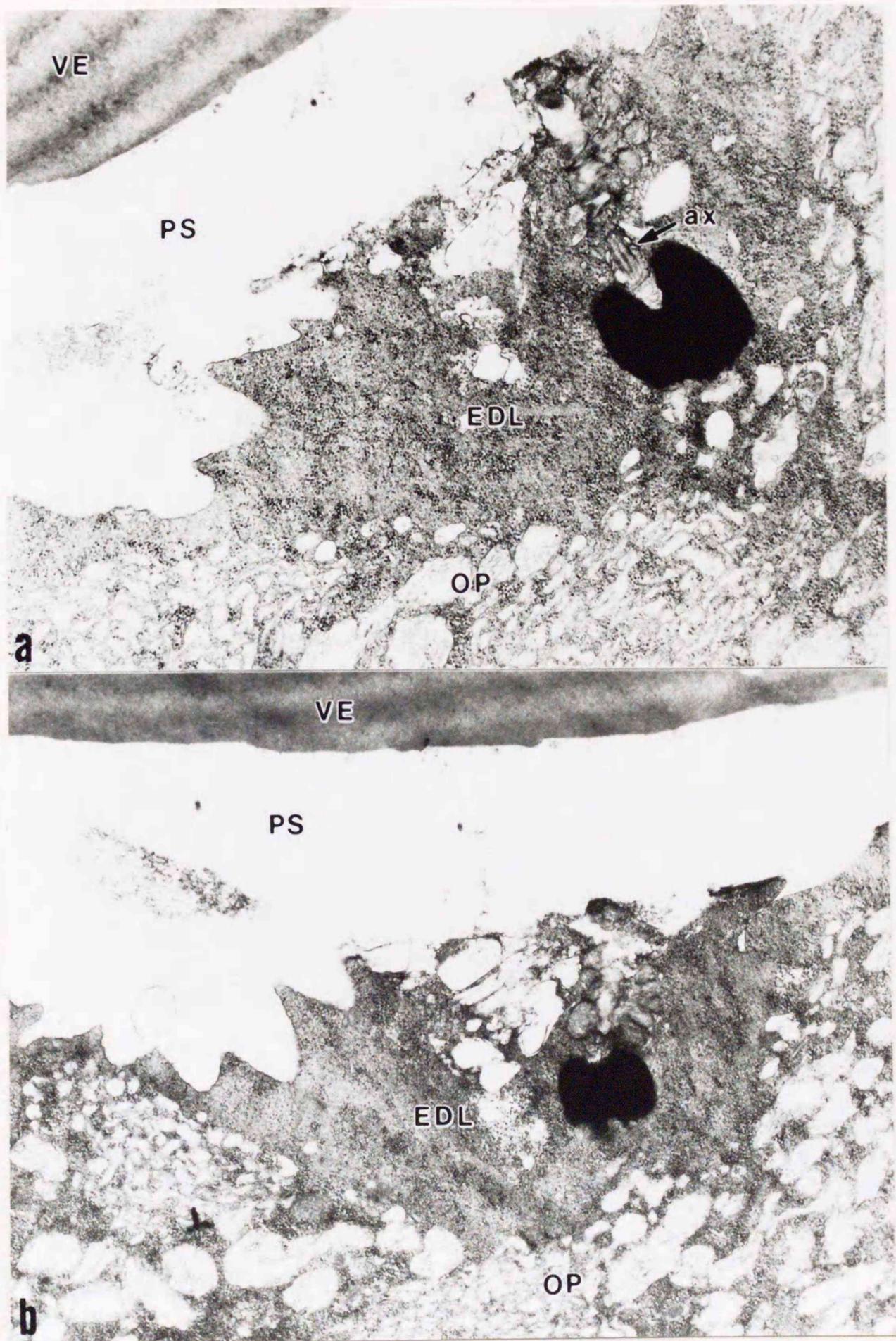


図 69. 海水移行 2 分後のニジカヅカ卵の卵原形質の透過電顕像。
 ax, 軸糸 ; EDL, 電子緻密層 ; OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔 ; VE, 卵膜
 a, b. 精子は中片までが卵原形質に陥入している。陥入部には電子緻密層が認められる。 a. $\times 12,000$. b. $\times 16,000$



図 70. 海水移行 2 分後のニジカジカ卵の卵原形質中に陥入している精子の透過電顕像. ax, 軸糸; c, 中心体; m, ミトコンドリア; n, 精子核
 a, b. 卵原形質中に陥入している精子の原形質膜は消失しており, 核膜に包まれた核, 中心体, および軸糸が見られる, 周辺には膜融合によってできたと思われる小胞状の膜構造 (矢印) が一列に並んで認められる. $\times 60,000$

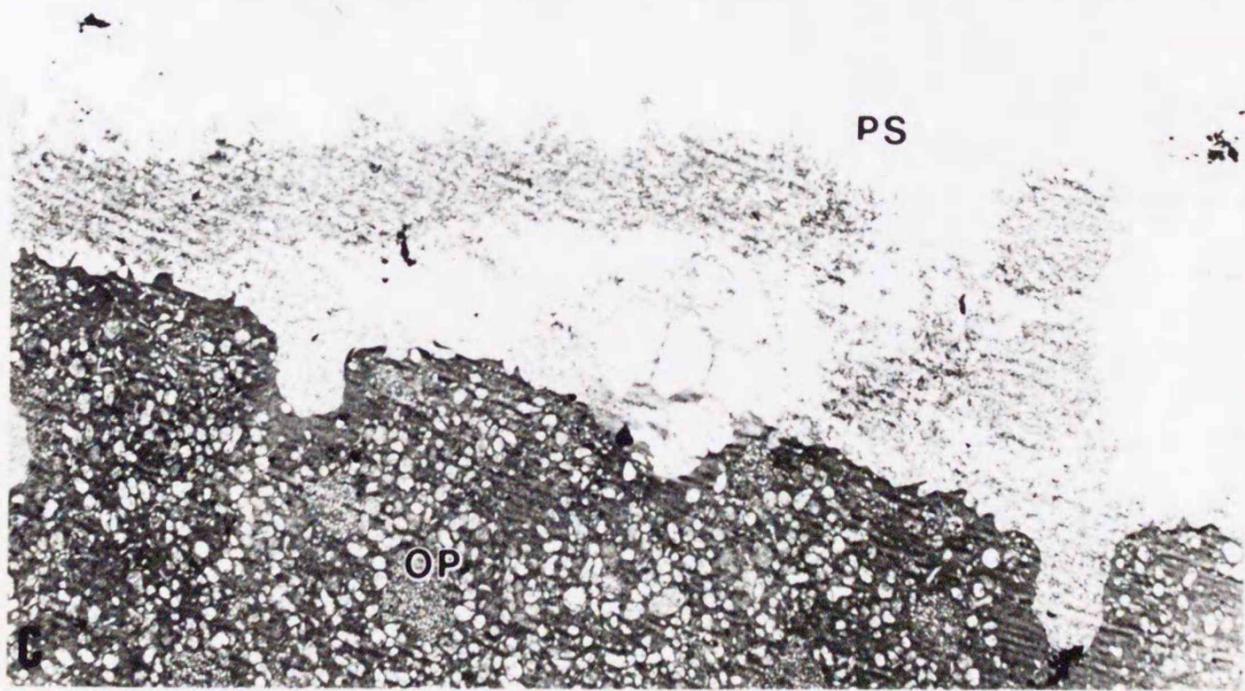
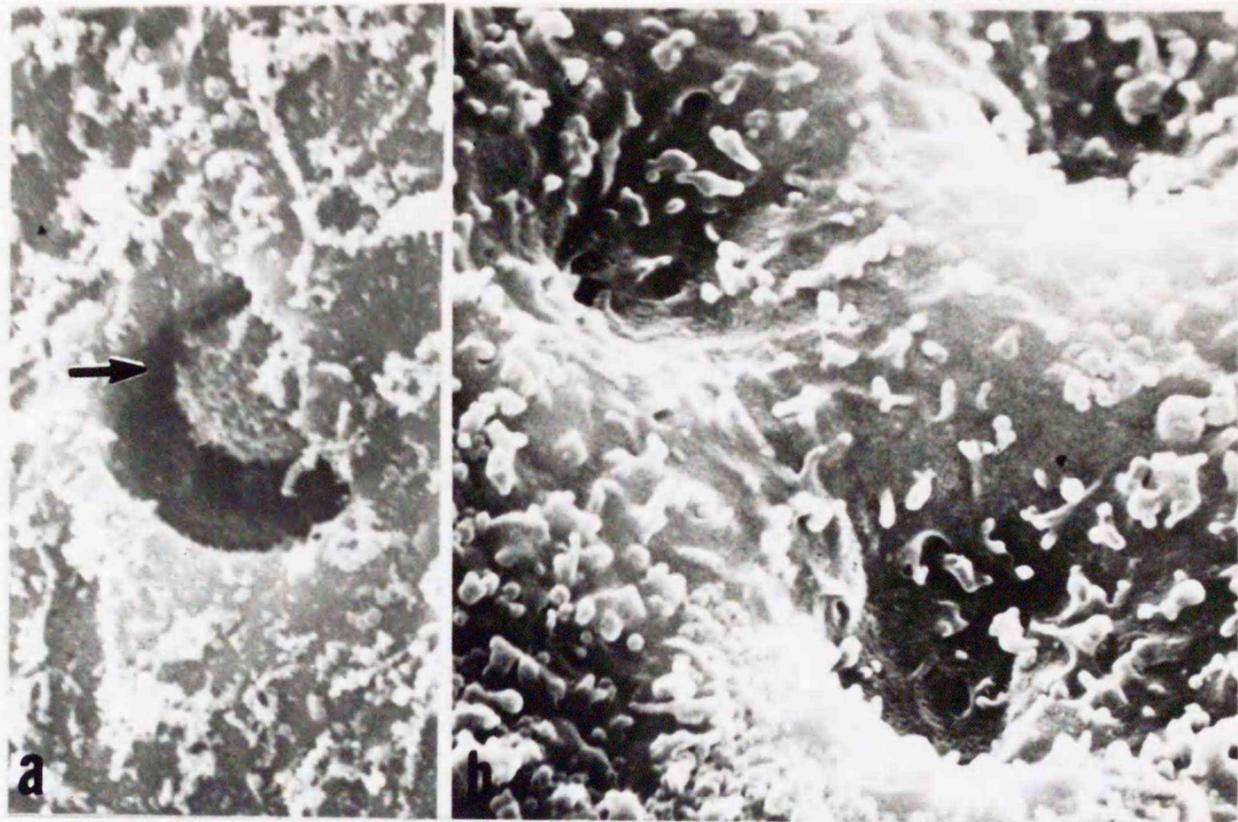


図 71. 海水移行 2 分後のニジカジカ卵の卵原形質表層の電顕像。
 OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔
 a. 卵原形質表面の走査電顕像。表層胞が開口し、内容物が球状を呈して認められる (矢印)。× 5,700
 b. 卵原形質表面の走査電顕像。表面には表層胞の崩壊によってできたと思われる窪みが認められる。× 7,100
 c. 動物極付近の卵原形質の透過電顕像。囲卵腔には表層胞物質が認められる。× 2,000



図 72. 海水移行 3 分後のニジカジカ卵の卵原形質の透過電顕像。
 FS, 精子 ; ne, 精子核膜 ; OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔 ; VE, 卵膜
 a. 卵原形質中に深く陥入している精子像。× 8,000
 b. 精子の核膜が胞状化を起こしている像。矢印は胞状化した精子核膜を示す。× 90,000

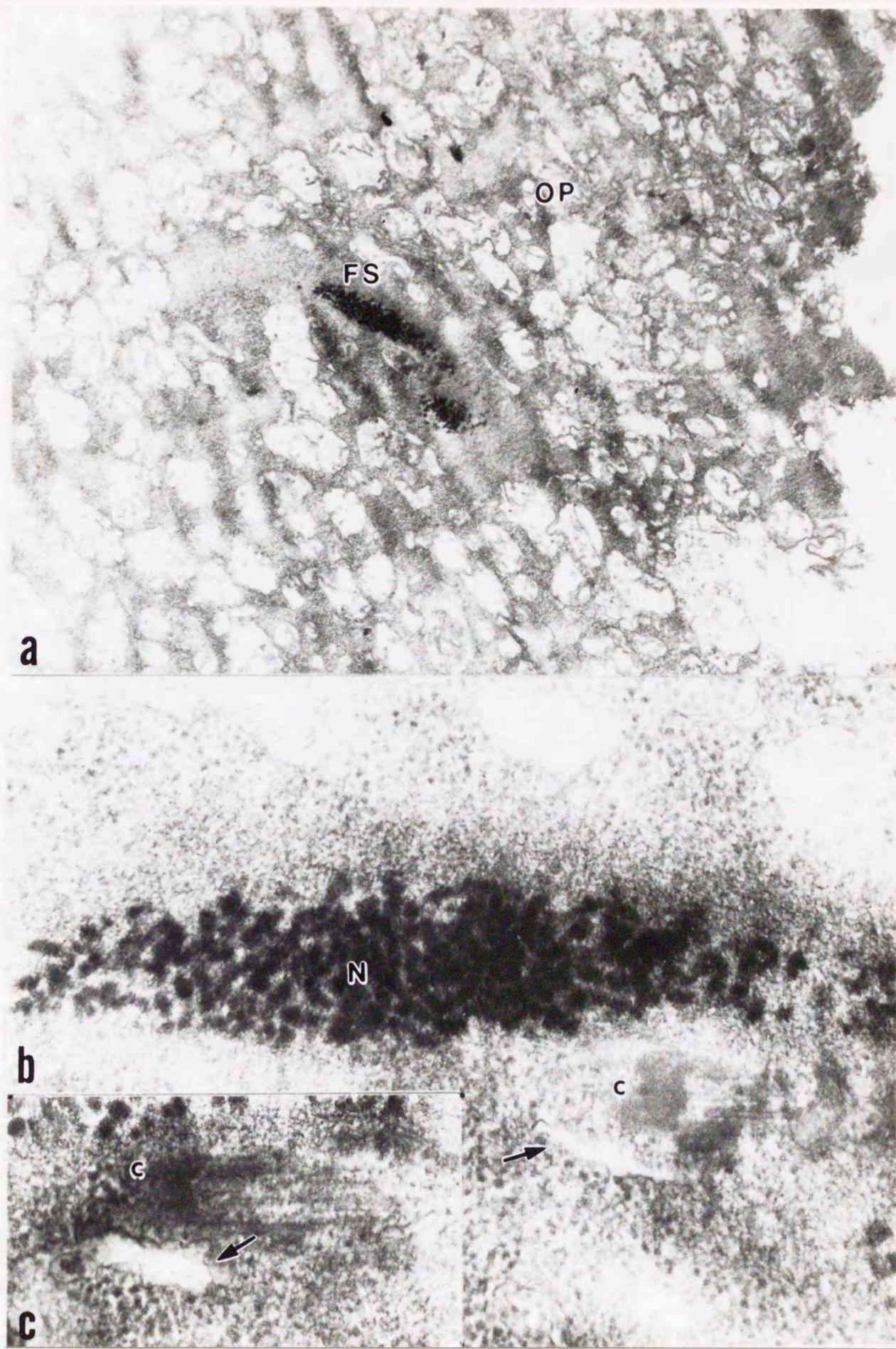


図 73. 海水移行 3 分後のニジカジカ卵の原形質の透過電顕像。
 c, 中心体 ; FS, 精子 ; N, 精子核 ; OP, 卵原形質
 a. 核膜がほとんど消失した精子像。× 10,000
 b. 同上。矢印は中心体近傍の胞状化した精子核膜を示す。× 60,000
 c. b の隣接切片の中心体部位。胞状化した核膜（矢印）が認められる。
 × 60,000

g. 海水移行 5~10 分後

海水移行 5 分後の受精卵では電顕的に卵細胞質中に精子を確認することはできなかつた。卵門付近の囲卵腔には減数第 2 分裂によって生じつつある第 2 極体が認められる (図 74-a)。第 2 極体は卵細胞質から隆起し、その細胞質は複雑に褶曲している。細胞質間橋には微小管の束が縦走している (図 74-b)。

海水移行 5 分後の卵門管内にはまだ多数の精子が認められる (図 75-a) が、10 分後の卵では卵門管内の精子の数は少なく、既に全く消失しているものも認められた (図 75-b) ことから、海水移行 5~10 分の間には卵門管からの精子の放出が開始されるものと思われる。

5) 海水移行による未交尾魚の未受精卵の表層変化

a. 海水移行 10~30 秒後

卵門直下の卵原形質は卵門管に向って隆起しており (図 76-a)、海水移行前と比べて形態的に変化は認められない。卵門付近の卵原形質中には表層胞が認められ、まだ崩壊は起きていない。

b. 海水移行 60 秒後

卵門直下の卵原形質の突起はやや小さくなっている (図 76-b)。卵門付近の卵原形質中の表層胞は、卵原形質膜に接しており開口直前の状態にある。

c. 海水移行 90 秒後

卵門直下の卵原形質には、突起状の構造は認められない (図 76-c)。卵門付近の表層胞が囲卵腔に向って開口している像が認められる。

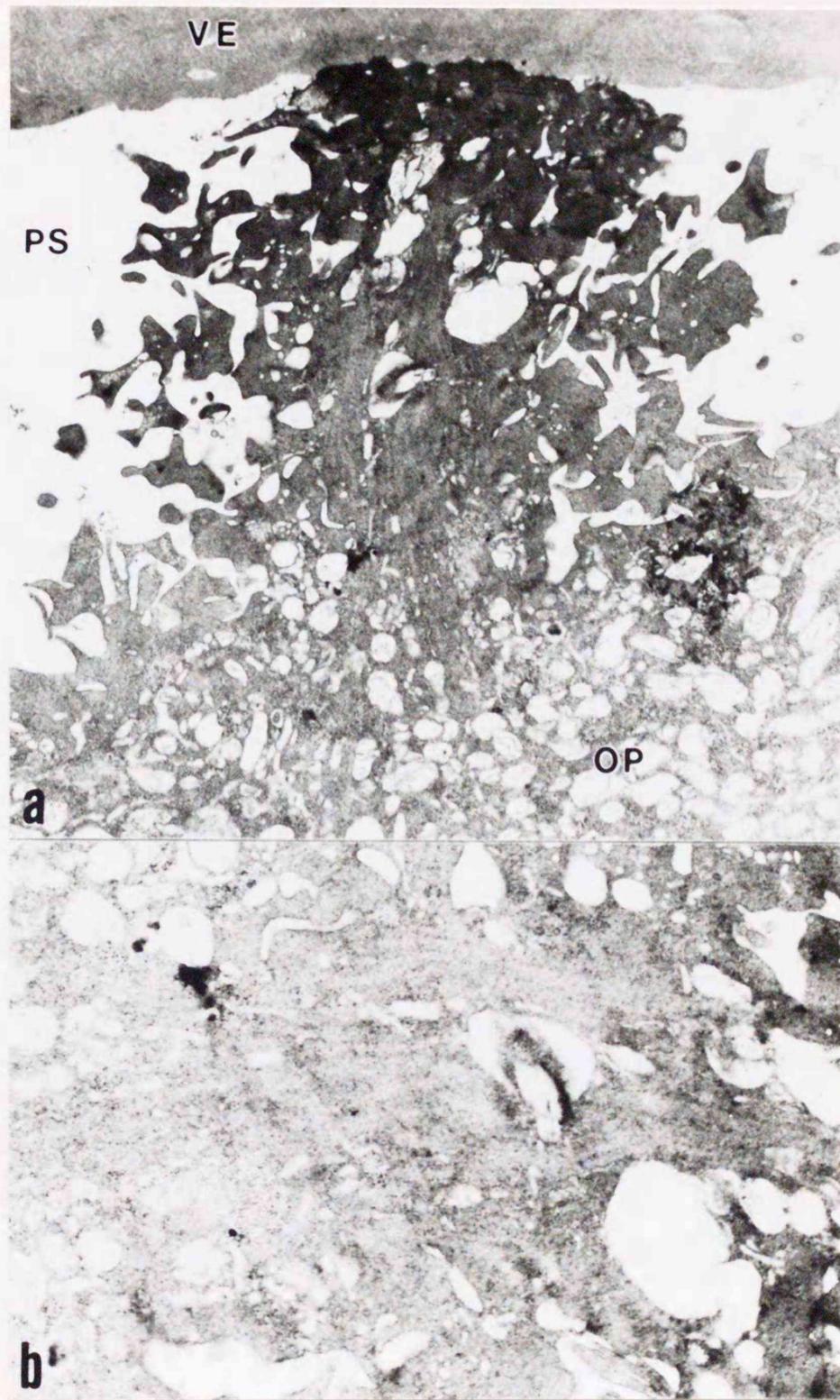


図 74. 海水移行 5 分後のニジカジカ卵の動物極に見られた第 2 極体分裂途上の透過電顕像。
 OP, 卵原形質 ; PS, 囲卵腔 ; VE, 卵膜
 a. 分裂途上の第 2 極体. $\times 8,000$
 b. 細胞質間橋の拡大像. $\times 16,000$

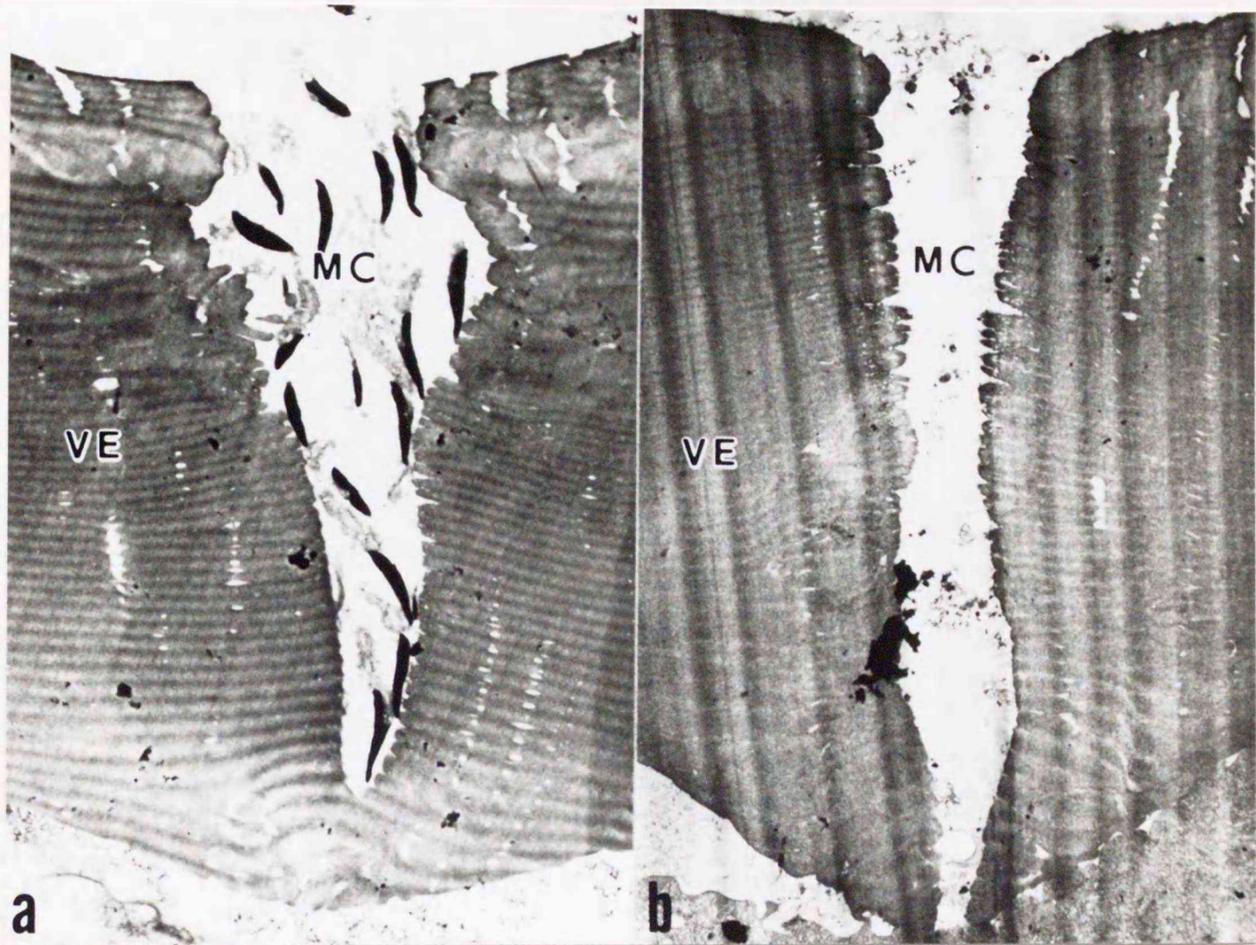


図 75. 海水移行後のニジカジカ卵の卵門部の透過電顕像。

MC, 卵門管 ; VE, 卵膜

a. 海水移行 5 分後の卵門. 卵門管内に精子が見られる. $\times 3,000$

b. 海水移行 10 分後の卵門. 卵門管内に精子は見られない. $\times 3,000$

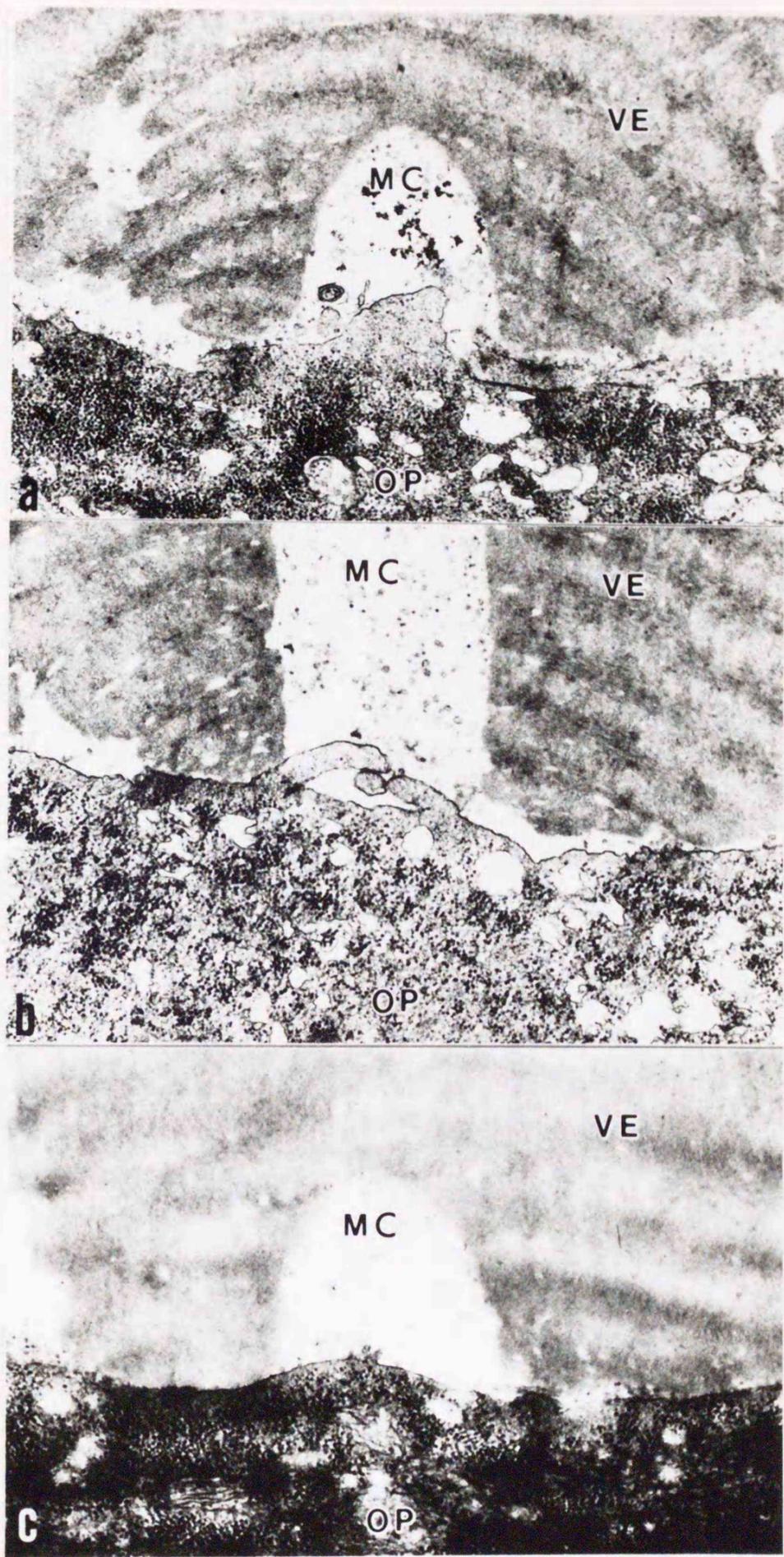


図 76. 海水移行後のニジカジカ未受精卵の卵門直下の透過電顕像.

MC, 卵門管 ; OP, 卵原形質 ; VE, 卵膜

a. 海水移行 10 秒後. $\times 20,000$

b. 海水移行 60 秒後. $\times 20,000$

c. 海水移行 90 秒後. $\times 20,000$

3. 考察

多くの硬骨魚類の卵は、環境水中では短時間のうちに受精能を失い、等張液中では比較的長時間受精能を保つが媒精すると直ちに受精反応の発現あるいは精子の卵内侵入を生ずる (T. Yamamoto, 1961) などの理由から、受精反応の初期過程を微細構造レベルで観察することが一般に極めて困難であった。従って、硬骨魚卵での正常受精における微細構造学的な変化を調べたこれまでの研究 (メダカ; Iwamatsu and Ohta, 1981: *Fundulus heteroclitus*; Brummett and Dumont, 1979: コイ; Kudo, 1980: アユ; Kudo, 1983: タイリクバラタナゴ; Ohta and Iwamatsu, 1983, Ohta, 1991: サケ; Kobayashi and Yamamoto, 1987: ゼブラフィッシュ, *Brachydanio rerio*; Wolenski and Hart, 1987, 1988a) の多くは、いずれも受精過程を断片的に観察したものであった。また、Iwamatsu and Ohta (1978) は、メダカ卵の受精における精子の陥入から雄性前核の形成までを連続的に観察しているが、卵膜を除去した卵で人為的に多精受精を起こさせており、正常受精の初期過程の観察ではない。

本研究に用いた体内配偶子会合型のニジカジカでは、すでに交尾を行なった個体から搾出した卵は配偶子の会合を終えており、これを海水に移すと一斉に受精反応を開始することから、本種の卵はこれまで困難とされてきた硬骨魚類における正常受精の微細構造レベルでの観察に極めて適した材料であるといえる。

一般に硬骨魚類の精子は、先体を欠く共通点を除いて、種によりその形態が様々である。魚種による精子の形態の差異は頭部および中片に最も顕著に現れることが多い (高橋, 1989)。ニジカジカの精子は、伸長したやや扁平な頭部の一側に、頭部中央部付近から始まる比較的長い中片を持つ。同様の形態はカジカ科に属する *Oligocottus maculosus* (Stanley, 1969)、カンキョウカジカ *Cottus hangiongensis* およびハナカジカ *C. nozawae* (Quinitio,

1989) の精子でも観察されていることから、このような形態はカジカ科魚類に共通した特徴であるのかもしれない。また、Poeciliidae や Anablepidae などの胎生魚類の精子でも頭部および中片の伸長が著しい(高橋, 1989) ことから、体内配偶子会合型のニジカジカの精子は、卵生魚よりはむしろ胎生魚に近い形態を有していることが示された。

一般に、精子中片のミトコンドリアは呼吸、解糖などの代謝系により、精子の運動に必要なエネルギー源である ATP を生産し鞭毛に供給していると考えられている(森沢・石田, 1987)。卵生硬骨魚類の精子が持つミトコンドリアの大きさおよび数については、*Fundulus* では大型で 2、3 個(Brummett and Dumont, 1979)、タイリクバラタナゴでは大型で 1 個(Ohta and Iwamatsu, 1983)、ゼブラフィッシュでは数個(Wolenski and Hart, 1987) テラピア *Oreochromis niloticus* では 8~10 個(Lou and Takahashi, 1989b)、カジカ科魚類の *O. maculosus* (Stanley, 1969)、およびカンキョウカジカ(Quinitio, 1989) では大型で 2 個などの報告がある。ニジカジカの精子のミトコンドリアは、上記の卵生魚種でのそれと比較すると小型であるが数は極めて多いのが特徴的であった。このような特徴は、後述するように本種の精子の運動時間が長いことに関係しているものと思われる。

これまで多くの魚種で、卵門直下の卵原形質表面に、精子が接着するための形態的に特殊化した構造物が存在することが知られている。Brummett and Dumont (1979) は *Fundulus* の未受精卵の卵門直下の卵原形質表面に、1~3 μm の突起があることを走査電顕で確認し、受精に関わる精子はこの部位で卵原形質への陥入を起こすことを示した。Kudo (1982a) はコイ、アユ、およびウグイ *Tribolodon hakonensis* の未受精卵の卵門直下の卵原形質表面に、それぞれ形態の異なる特殊化した微細な構造を見出し、この構造が正常受精時に精子の標的器官となることから、この部位が "sperm-receptor" (精子受容体) として機能していることを示した。このような形態的に特殊化した構造はシロ

サケ (Kobayashi and Yamamoto, 1981)、タイリクバラタナゴ (Ohta and Iwamatsu, 1983)、ゼブラフィッシュ (Hart and Donovan, 1983) などでも観察されている。しかし、メダカ卵にはこのような構造はない (Iwamatsu and Ohta, 1981)。未交尾のニジカヅカから搾出した未受精卵の卵門直下の卵原形質表面には、細胞質内に少数のリボゾームを含む電子密度の低い突起が認められた。また、既交尾の個体から搾出した未受精卵では、受精に関わる 1 個の精子がこの原形質突起に頭部を接着させていた。このことからニジカヅカでも、正常受精の際に精子と結合する構造が卵表面に存在する可能性が考えられる。しかし、本種ではこのような突起様の構造は卵門直下に限らず、卵門付近の卵原形質表面にしばしば観察された。本研究ではニジカヅカの卵門直下の卵原形質突起が実際に精子受容体としての特別な機能を有しているか否かは確認していない。卵膜を除去した卵では多精が起きる (メダカ, Iwamatsu and Ohta, 1978; タイリクバラタナゴ, Ohta, 1985) ことから、もしニジカヅカの卵もこれらの卵と同様な性質を持っているならば、卵門直下に見られた構造に特別な機能はないことも考えられる。

一般に硬骨魚類の卵膜の動物極側には、受精の際に精子が卵内へ侵入するための卵門と呼ばれる 1 個の小孔が開口している。卵門の形態は魚種によって様々であるが、多くの魚種では卵門管内口の直径は 1 個の精子が通過できる程度の広さであることから、単精機構の第 1 関門としての役割を果たしていると考えられている (高野, 1989)。しかし、コイの卵では、卵門管内口の直径は 2 個以上の精子が同時に侵入できる広さがあるため、精子受容体が単精機構に働いていることが示唆されている (Kudo, 1980)。ニジカヅカでは卵門管内口の直径からみて一度に 2 個以上の精子の通過は不可能であると思われる。従って、本種の単精機構においては卵門管内口の大きさが一義的な役割を果たしているものと思われる。

ニジカヅカの大きな特徴として、既交尾魚から搾出した卵では、受精に

関わる精子は卵門管の先端部にまで侵入し卵原形質表面の細胞質突起に頭部を接着させているが（配偶子会合）、両者の膜融合（受精開始）を起こしてはいないことが挙げられる。このことから、交尾によって卵巢腔内に送り込まれて蓄えられていた精子は、排卵された卵を浸している卵巢腔液中で運動し卵門管に侵入するが、受精には至らないものと思われる。卵巢内で受精が起きない理由については次章で詳しく考察する。卵巢内で配偶子会合を完了した卵の卵膜を除去して走査電顕で観察した結果、卵門先端部の卵原形質表面側には精子が認められなかったことから、卵巢内での精子と卵の接着は比較的緩いものであることが示唆された。マウス卵の受精では、精子が先体反応を起こす以前の精子と卵の間関係には「接着」および「結合」という 2 つの段階があり、「接着」は比較的緩く非特異的なものであるが「結合」は比較的強固で種特異的なものであるといわれている（Wassarman, 1987）。ニジカジカに見られた卵巢内での雌雄配偶子の緩い接着は、哺乳類の受精における非特異的な「接着」に相当するものなのかも知れない。

卵と精子の膜融合の過程は、これまでに様々な動物種において観察されている。数種の海産無脊椎動物では、先体突起を覆う先体内膜が卵細胞膜と融合することが知られている（Colwin and Colwin, 1961; Franklin, 1965; Longo et al., 1988）。一方、哺乳類では膜融合は、先体反応を起こした精子の post-nuclear cap の領域の原形質膜と卵表面の微絨毛を形成している原形質膜との間で起き（Yanagimachi and Noda, 1970a, b; Anderson et al., 1975; Noda and Yanagimachi, 1976）、先体内膜の領域では起きない。精子が先体を持たない硬骨魚類における精子と卵の膜融合の微細構造的観察は、メダカ（Iwamatsu and Ohta, 1978）、タイリクバラタナゴ（Ohta and Iwamatsu, 1983; Ohta, 1985, 1991）、*Fundulus*（Brummett et al., 1985）、コイ（Kudo and Sato, 1985）、ゼブラフィッシュ（Wolenski and Hart, 1988a）などで観察されているが、膜融合が配偶子会合後比較的短時間で起きることから、

他の動物種に比べるとその知見には不十分なものが多い。Iwamatsu and Ohta (1978) は、卵膜を除去し多精を起こさせたメダカ卵を用いて、硬骨魚類では初めて電顕的に膜融合を観察した。彼らの報告によるとメダカでは、媒精後 1 分以内で精子頭部の数箇所にあたって卵原形質膜との融合が起きる。最近 Ohta (1991) はタイリクバラタナゴで精子と卵の膜融合のごく初期の段階を観察した。彼はタイリクバラタナゴの精子の中心体を覆う部分の原形質膜に、特殊な配列をみせる膜内粒子が存在することを凍結切断法で確認し、この付近の精子膜と卵門直下の卵原形質膜の精子受容部位とが、媒精後 10 秒以内に融合することを明らかにした。

今回のニジカジカ卵での観察では、配偶子会合を完了した卵を海水に移行して 10 秒後には精子頭部の先端が卵原形質に陥入し精子頭部先端部で膜融合を開始していた。膜融合は精子頭部の先端部の精子膜と卵原形質膜との胞状化によって始まり、これが次第に陥入精子頭部表面に広がって行くものと思われた。ニジカジカの精子では、中心体の位置は精子頭部のほぼ中央部であることから、タイリクバラタナゴのそれとは異なり膜融合の開始部位は中心体の位置と関わりを持たないものと思われた。

これまでに数種の硬骨魚類で、精子が卵へ陥入する際に、精子陥入部の卵原形質が精子による刺激に反応して、受精突起と呼ばれる隆起を生ずることが知られており、それが多精拒否および精子の卵原形質への陥入に働くと考えられている (Brummett and Dumont, 1979; Kudo, 1980, 1983; Iwamatsu and Ohta, 1981; Kobayashi and Yamamoto, 1981; Kudo and Sato, 1985)。ニジカジカでは、膜融合を起こした精子は時間の経過と共にさらに深く卵原形質へ陥入するが、その際、精子陥入部の卵原形質は未陥入部分の精子頭部に向かって隆起し、いわゆる受精突起様の形態を示した。しかし、この卵原形質の隆起は他の魚種に見られるような顕著なものではなかった。精子陥入部付近の卵原形質は初め細胞内小器官をほとんど欠き、比較的均質な構造であったが、精子の

卵原形質への陥入が進むに従って、この領域はリボソームを集積しながら卵原形質内部に向ってデルタ状に拡大していった。さらにこの領域には、陥入中の精子核の近傍に、胞状化した精子膜と卵原形質膜によって形成された小胞が卵原形質内部に向って一列に並んでいた。一方、ニジカジカの未受精卵を海水に移した時に起きる付活反応では、卵門直下の卵原形質に大きな変化は認められなかった。これらの観察結果は、精子が卵原形質に陥入する際に、卵原形質が精子を巻き込むような運動を起こしていることを示唆している。

Wolenski and Hart (1988b) はサイトカラシン処理がゼブラフィッシュ卵の受精に与える影響を調べた結果、サイトカラシン B および D は、受精卵の受精突起の形成には影響を与えなかったが、精子の陥入を阻害することを示した。ニジカジカでも、配偶子会合を完了した卵をサイトカラシン B で処理した後、海水に移すと、受精率が著しく低下した（データ未記載）。精子の陥入に際して精子を迎へ入れる原形質の運動の詳細については、今回の研究では明らかにできなかったが、ニジカジカの受精卵に見られたような精子を巻き込むような卵原形質の動きにマイクロフィラメントが関係している可能性は十分考えられる。

ニジカジカでは海水移行 3 分後に、卵原形質中で精子の核膜の内層と外層が胞状化を起こし、一部の精子では既に核膜も消失していた。核膜の胞状化は精子頭部の先端付近の数箇所始まり、ほぼ完全に核膜が消失したものでは中心体の近くに核膜を残すのみとなっていた。人為的に多精受精させたメダカ卵でも、精子の核膜が精子核の側面に沿って数箇所胞状化を起こし、中心体のある頸部では他の部位よりも核膜の消失が遅れることが観察されている (Iwamatsu and Ohta, 1978)。また、タイリクバラタナゴの正常受精における精子核膜の消失過程では、精子頭部の先端部から後方に向って胞状化が進むことが観察されている (Ohta and Iwamatsu, 1983)。このように核膜の消失過程は魚種によって異なり、胞状化の開始部位は必ずしも精子の陥入の際の膜

融合開始部位とは関係がないようである。

ニジカジカの卵を海水に移行して 30 秒後に、受精している精子の尾部に軸系の 9+2 構造が消失するという微細構造的に顕著な退行変化が認められた。精子の尾部の微小管は精子の鞭毛運動に欠くことのできないものであることから、この変化はすでにこの段階で精子が運動能を喪失していることを示している。これまで受精に関わる精子の核を除く細胞器官がどのような運命を辿るかについてはほとんど知られていない。このような精子の変化の詳細な過程は、これが硬骨魚類、さらには他の動物種に共通した現象であるか否かを含めて、興味深い問題である。

硬骨魚類の未受精卵は、減数第 2 分裂中期の状態に核分裂を停止しているが、受精反応が始まると直ちに核分裂を再開し、やがて第 2 極体を放出する。硬骨魚類の第 2 極体の放出過程は人為的に付活させたタイリクバラタナゴの卵で観察されている (Ohta, 1986)。タイリクバラタナゴ卵では付活後 15 分で第 2 極体が隆起し始め、30 分後に分離を完了する。分離途上の第 2 極体は細胞間橋で卵原形質と連絡しており、細胞間橋には多くの微小管が観察されている (Ohta, 1986)。今回、ニジカジカで正常受精における放出途上の第 2 極体を確認された。ニジカジカでは受精開始後 5 分で既に第 2 極体の隆起が始まり、細胞間橋には多くの微小管の束が認められ、このように正常受精においても概ね Ohta (1986) の観察結果と同様の極体放出過程がみられることが確認できた。

一般に、魚卵の表層胞は正常な受精や人為的付活によって崩壊を起こし、その過程は動物極に始まり植物極で終る (Yamamoto, 1961)。硬骨魚類では表層胞の内容物は、囲卵腔の形成と共に、余分な精子を凝集させることによって多精拒否に働き (Ginsburg, 1961)、卵膜表面に沈着して受精膜を形成し (Kudo, 1982b) さらに受精膜に抗菌作用を持たせる (Kudo and Inoue, 1986, 1989) など様々な機能を持つことが明らかにされてきている。卵門付近の表

層胞が、精子の卵原形質への陥入開始後に崩壊を起こすことが数種の硬骨魚類で確認されており (Kudo, 1980; Ohta and Iwamatsu, 1983; Wolenski and Hart, 1987; Kobayashi and Yamamoto, 1987)、さらにこれが卵原形質への精子の陥入による刺激に反応して起きることが示唆されているが、精子と卵原形質の膜融合が直接の引金になっているか否かは確かめられていない

(Kobayashi, 1985)。ニジカジカでは、受精による表層胞の崩壊は、精子と卵の融合が認められた海水移行 10 秒後以降に動物極付近で認められた。また、海水移行 10 秒後でも膜融合が起きていない卵では表層胞の崩壊は認められなかった。このことから、ニジカジカでは表層胞崩壊の引金は、精子と卵の融合である可能性が高いといえる。受精卵を海水に移行してから 30 秒後の卵では囲卵腔内に精子の侵入が認められたが、これらはもはや卵原形質膜と接着しても、卵原形質内へは陥入していなかった。Ginsburg (1963) は *Salmo trutta* の精子が囲卵腔液で凝集を起こすことを示した。ニジカジカでも同様に囲卵腔液による精子凝集によって余分な精子の卵原形質への陥入を妨げている可能性は否定できない。ニジカジカでは多精拒否に機能的に働くような受精突起は認められなかったことから、卵門管の内径に次いで、表層胞の崩壊が多精拒否の第 2 の関門としての重要な役割を担っていることは十分に考えられる。

受精は、雌雄配偶子の融合と、それに続く二つの配偶子の核の結合であると定義されている (Balinsky, 1970)。本研究では、ニジカジカの精子が卵巢内で卵の卵門に侵入し卵原形質膜に接着はするが、膜融合は海水中に産卵されてから起きることが明らかにされた。このような特殊な繁殖様式を真の卵生と区別して「体内配偶子会合型」 (Munehara et al., 1989) と呼ぶことは生物学的に重要な意義を持つ。魚類における受精の初期過程の微細構造的変化に関する研究は、特に近年盛んに行なわれており、雌雄配偶子の融合から雄性前核形成までの過程が断片的な知見の組み立てによってほぼ明らかにされている。本研究により、少なくとも受精過程における精子と卵の膜融合から精子染色質

の拡散に至る微細構造的変化の詳細を明らかにし得た。さらにその結果を加味して既往の研究結果を再構築すると共に、精子陥入の際の卵原形質の動態および陥入後の精子尾部の運命を示唆することができた。魚類では他の動物種と比較すると、配偶子の相互認識の機構を含めて受精過程の全容の解明までにはなお程遠い現状にあるが、本研究で得られた知見はこれに重要な形態学的基盤を与え得ると思われる。

IV 体内配偶子会合型における、卵、精子、

および配偶子会合環境の生理的特性

1. 材料と方法

1) 実験魚

本研究には、体内配偶子会合型の繁殖様式を取るカジカ科のニジカジカ *Alcichthys alcicornis*、イソバテング *Blepsias cirrhosus*、アサヒアナハゼ *Pseudoblennius cottoides*、およびベロ *Bero elegans* を用いた。さらに、カジカ科と同じくカサゴ目のアイナメ科に属する真卵生種のスジアイナメ *Hexagrammos octogrammus* も比較対照の目的で実験に用いた。アサヒアナハゼを除く 4 種は北海道南茅部町白尻付近で捕獲し、北海道大学水産学部附属白尻水産実験所の水槽で自然水温、自然日照下で飼育して、適宜実験に使用した。また、アサヒアナハゼは、鹿児島県出水郡東町諸浦付近の浅海において捕獲されたものを空輸して実験に用いた。

2) 血清、精漿、および卵巣腔液の採取

実験魚を 4-アミノ安息香酸エチルで麻酔し、ニジカジカとスジアイナメでは尾静脈より注射器で、またイソバテングでは尾柄部を切断して、ハマトクリット管を用いて採血した。採取した血液は自然凝固させた後に、注射器で採取したものは 3000 rpm で 15 分間、ハマトクリット管で採取したものは 12000 rpm で 5 分間、それぞれ遠沈した後に血清を分離した。次いで魚を開腹し、生殖腺を取り出した。卵巣はまわりの水分を十分拭き取った後に卵巣壁を切開し、卵巣腔液をハマトクリット管で吸い取って集めた。精巣は輸精管部を切断し、流出した精液をハマトクリット管に採取した。いずれの液も 12000

rpm で 15 分間遠沈して卵巣腔液の上澄と精漿を分離し、血清と共に分析に供するまで -40°C で凍結保存した。

3) 血清、精漿、および卵巣腔液の分析

各試料の主な陽イオンである Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、および Mg^{2+} の濃度を測定した。日立 518 型原子吸光光度計を使用して Na^+ と K^+ は炎光分析で、 Ca^{2+} と Mg^{2+} は原子吸光分析により測定した。その際、炎光分析用標準液（血清用、第一化学社）を各イオンについて 4~5 段階に適宜希釈し、その測定値から検量線を作成し、それに基づいて試料の値を算出した。各試料は Na^+ と K^+ についてはそれぞれ蒸留水で 1001 倍に、 Mg^{2+} については蒸留水で 201 倍に、また、 Ca^{2+} については 10% の塩化ランタン水溶液で 101 倍に希釈した。

浸透圧は KNAUER semimicro-osmometer により氷点降下度から測定した。

卵巣腔液と精漿の pH はニジカジカについてのみ測定を行なった。測定には compact pH-meter C-1（堀場製作所）を用いた。

4) 卵の付活率および受精率の計測

実験に際して、捕獲したニジカジカ雌魚を第三章で述べた方法により未交尾個体と既交尾個体とに分け、適宜使用した。

各実験では、未交尾魚と既交尾魚から搾出した卵をそれぞれ後述する試験液に移した後、 $8\sim 10^{\circ}\text{C}$ で約 20 時間静置し、その後、実体顕微鏡下で付活卵と受精卵の有無を調べた。付活は囲卵腔の形成を、また受精は卵割をもってその指標とした。

卵内への Ca^{2+} の透過およびその阻害に関する実験には、生体膜における Ca^{2+} の透過性を誘導するカルシウムイオノフォア A23187（Sigma 社製）、およびカルシウムチャンネル阻害剤であるベラパミル塩酸塩（ベラパミル、和

光純薬)を用いた。A23187 は予め濃度が 0.5 mg/ml となるようにジメチルスルホキシドで溶解し、ベラパミルは濃度が 5 mM/l となるようにエタノールに溶解して用いた。

5) 精子の運動活性の測定

精子の活性試験にはスライドグラス上に下記の試験液を 100 μ l 取り、ハマトクリット管の先を溶封したガラス棒で少量の精液を試験液中に移してよく混合し、顕微鏡下で視野内の全ての精子が運動を停止するまでの時間を測定した。実験は室温で行なった。

試験溶液には浸透圧濃度を変えた (100~1000 mOsm) NaCl、KCl、およびマニトール水溶液を用いた。特にニジカジカについては、運動活性の高かった 400 mOsm の浸透圧条件で、 Na_2SO_4 、 CaCl_2 、 MgCl_2 、 MgSO_4 、および LiCl の各水溶液、ならびに pH を変えた (5.9~9.0) 400 mOsm の NaCl 水溶液を用いて、精子運動に及ぼすイオンおよび pH の影響について調べた。pH を変えた水溶液以外は全て HEPES-NaOH buffer で pH を 7.4 に調整した。また、pH の変更には、MES (5.5~6.5)、HEPES (7.0~8.0)、および TAPS (8.5~9.0) を用いた。

2. 結果

1) 卵巣腔液の性状

a. 陽イオン濃度

体内配偶子会合型のニジカジカとイソバテング、真卵生種のスジアイナメについて、卵巣腔液および雌血清中の 4 種の陽イオン濃度を測定した (表 3)。これらのうち Na^+ 濃度が、3 魚種のいずれにおいても最も高かった。卵

表 3. 雌血清および卵巣腔液の主な陽イオンの濃度, および浸透圧.

	N	Na ⁺ (mM/kg)	K ⁺ (mM/kg)	Ca ²⁺ (mM/kg)	Mg ²⁺ (mM/kg)	Osmolality (mOsmole/kg)
<i>Alcichthys alcicornis</i>						
female serum	10	190±3.4	3.5±0.38	6.00±0.14	1.07±0.14	375±9.2
ovarian fluid	5	190±4.4	7.4±0.53*	0.41±0.11*	1.52±0.46	347±6.7
<i>Blepsias cirrhosus</i>						
female serum	7	166±2.7	4.0±0.61	3.40±0.32	1.02±0.09	317±17
ovarian fluid	7	171±3.0	8.4±0.33*	0.31±0.10*	1.14±0.04	289±22
<i>Hexagrammos octogrammus</i>						
female serum	6	199±3.2	7.3±0.18	7.3±0.48	1.64±0.09	403±11.0
ovarian fluid	5	169±7.1*	7.8±0.92	1.6±0.20*	1.28±0.44	376±10.2

(平均値 ± 標準誤差). *は血清との間に有意差(p<0.01)が認められることを示す.

巢腔液の Na^+ 濃度はニジカジカとイソバテングでは血清と類似し、スジアイナメでは血清よりも有意に低い値を示した。卵巢腔液の K^+ 濃度は、ニジカジカとイソバテングでは血清より有意に高く、これに対してスジアイナメでは血清と類似した値を示した。3 魚種とも卵巢腔液の Ca^{2+} 濃度は血清と比べて有意に低かったが、特にニジカジカとイソバテングではそれぞれ 0.41 mM、0.31 mM と、スジアイナメの 1.61 mM と比べても著しく低いのが特徴的であった。 Mg^{2+} 濃度は 3 魚種とも血清と卵巢腔液で類似した値を示した。

b. 浸透圧

3 魚種ともに卵巢腔液の浸透圧は血清のそれと比べてやや低い傾向を見せた (表 3)。

c. pH

卵巢腔液の pH はニジカジカについてのみ測定した。測定した 10 例中 9 例は排卵した個体で、卵巢腔液の pH は 7.53~7.89 であったが、未排卵の 1 個体では 7.42 とやや低い値を示した。

2) 精子の運動活性

a. 精漿の性状

ニジカジカ、イソバテング、およびスジアイナメについて、雄血清と精漿の主な陽イオン濃度を測定した (表 4)。精漿および雄血清の Na^+ 濃度は、3 魚種とも測定した陽イオン中最も高く、精漿の値が血清のそれより低い傾向を示した。精漿の K^+ 濃度は、3 魚種とも雄血清のそれに比べて有意に高く、血清の濃度の 4~8 倍に達していた。精漿の Ca^{2+} 濃度は魚種によって異なり、ニジカジカとスジアイナメでは血清のそれと比べて有意な差を見せなかったが、イソバテングでは有意に低かった。これに対して精漿の Mg^{2+} 濃度は、3 魚種

表 4. 雄血清および精漿の主な陽イオンの濃度, および浸透圧.

	N	Na ⁺ (mM/kg)	K ⁺ (mM/kg)	Ca ²⁺ (mM/kg)	Mg ²⁺ (mM/kg)	Osmolality (mOsmole/kg)
<i>Alcichthys alcicornis</i>						
male serum	5	179±3.5	1.7±0.27	3.19±0.36	0.68±0.10	363.2±9.88
seminal plasma	5	164±3.7	16.3±0.07*	4.62±0.98	1.76±0.36*	325.6±4.97*
<i>Blepsias cirrhosus</i>						
male serum	5	175±4.5	4.5±0.24	3.35±0.27	0.89±0.06	309±14
seminal plasma	5	129±7.4*	18.5±0.78*	0.47±0.06*	2.28±0.14*	286#
<i>Hexagrammos octogrammus</i>						
male serum	5	193±13.4	3.1±0.56	2.49±0.16	1.27±0.38	349.2±11.5
seminal plasma	5	165±8.6*	20.3±4.35*	1.92±0.37	4.05±0.22*	333±5.9

(平均値 ± 標準誤差). *は血清との間に有意差(p<0.01)が認められることを示す.
#は6尾分をプールした試料の値である.

とも血清に比べ有意に高い値を示した。

精漿の浸透圧は、ニジカジカとイソバテングで血清より有意に低い値を示したが、スジアイナメでは血清とほぼ同じ値であった（表 4）。

精漿の pH はニジカジカ 3 個体でのみ調べた。その値はそれぞれ 6.84、7.18、および 7.20 であった。

b. 精漿および卵巣腔液中での精子の状態

ニジカジカの精子は輸精管から採取した精液中ですでに活発な運動を示した。その運動時間は極めて長く、同一条件を維持しつつ測定することはできなかったが、少なくとも 2 日以上は活発な運動が続いた。また、このような精漿中での精子の長時間にわたる運動は、イソバテング、ベロ、アサヒアナハゼ、およびスジアイナメでも観察された。ニジカジカの精液を卵巣腔液で希釈した場合にも少なくとも 2 日以上の運動が観察され、また、既交尾の雌魚から取り出した卵巣腔液中でも常に運動している精子が観察された。

c. 浸透圧と精子の運動活性

ニジカジカの精子の運動活性と媒質浸透圧の関係を調べた結果を図 77 に示した。NaCl 溶液中では 300 mOsm 以上の浸透圧で精子の運動が見られ、特に卵巣腔液と等張な 300~400 mOsm での運動活性が高かった。また海水と等張な 1000 mOsm でも約 2.5 分間の運動が見られ、海水中での運動時間である 3 分に近い値を示した。KCl 溶液中でも 300 mOsm 以上の濃度で精子の運動が見られたが、運動活性は NaCl 中でよりも著しく低かった。一方、非電解質のマニトール溶液中では、いずれの浸透圧でも精子は全く運動性を示さず、またその他の還元糖、グルコース、ソルビトール、レブロースの 400 mOsm 溶液中でも同様に運動は見られなかった。

以上の結果から、本種の精子は電解質溶液中で、しかも浸透圧が体液と

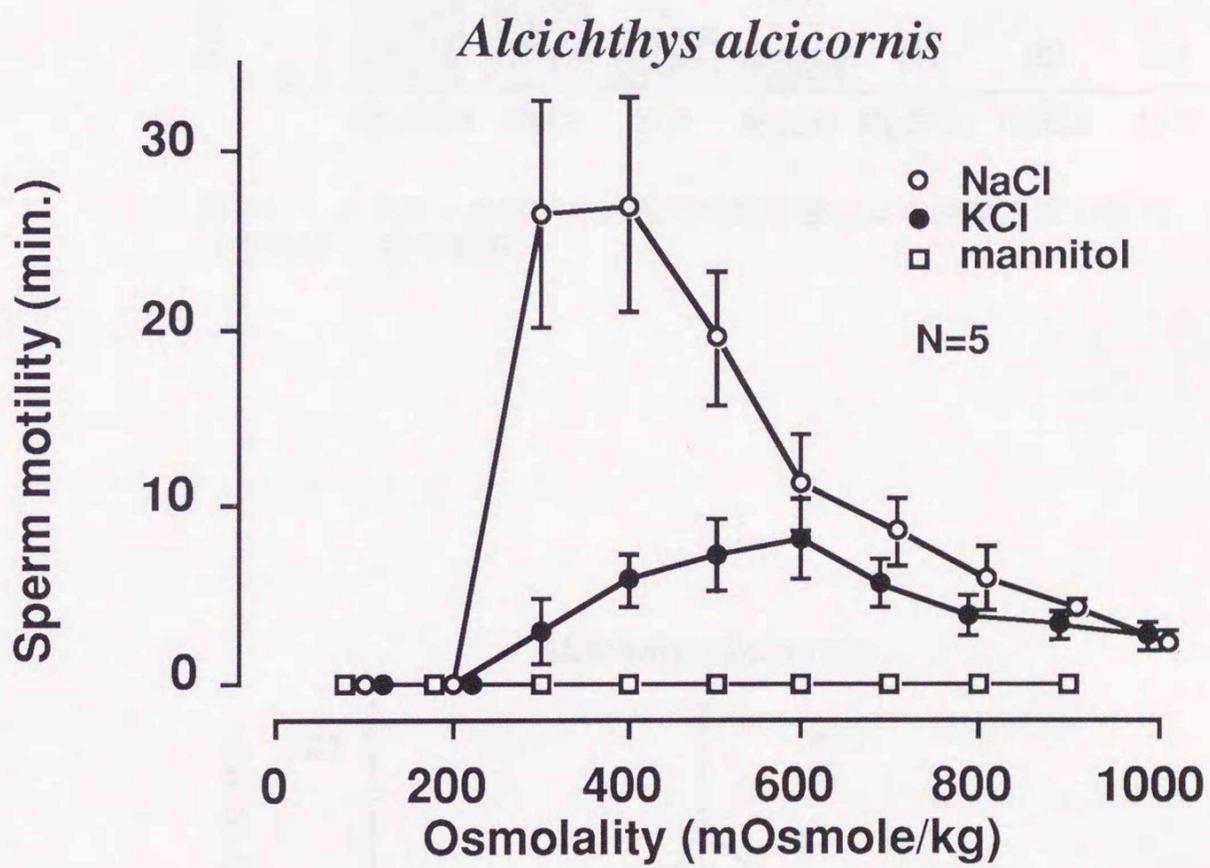


図 77. ニジカジカ精子の浸透圧による運動活性の変化.
(平均値 ± 標準誤差)

等張な条件下で高い運動活性を示し、また海水と等張の条件下でも短いながら運動することが示された。

d. イオンに対する精子の運動活性の特性

浸透圧を 400 mOsm に調製した各種の電解質溶液中における、精子の運動活性を調べた結果を図 78 に示した。ニジカジカの精子は、 Na_2SO_4 と NaCl 溶液中で、他の溶液よりも有意に高い運動活性を示した。 KCl と MgCl_2 では、運動活性は見られたが、その運動時間は Na_2SO_4 や NaCl でのそれに比べ有意に低かった。これに対して MgSO_4 、 CaCl_2 、および LiCl では運動性が全く認められなかった。

以上の結果から、本種の精子は Na^+ の存在下で高い運動活性を示すことが明らかにされた。

e. pH に対する精子の運動活性の特性

pH によるニジカジカの精子の運動活性の変化を図 79 に示した。本種の精子は、pH 6.0 では殆ど運動活性を示さないが、pH が上昇するに従って運動活性を増加させ、7.5 で最高値を示し、pH 8.0~9.0 でも最高値と同程度の運動活性を示した。このことから、本種の精子は中性から弱アルカリ性の範囲で高い運動活性を示すことが明らかとなった。

f. 人工卵巣腔液中での精子の運動活性

ニジカジカの卵巣腔液の主な陽イオン組成、浸透圧（表 3）、および pH から、人工卵巣腔液（AOF： NaCl , 171 mM； KCl , 8.4 mM； CaCl_2 , 0.41 mM； MgCl_2 , 1.52 mM；HEPES, 20 mM；浸透圧 365 mOsm；pH 7.7）を調製した。細胞培養フラスコ（容量 50 ml）に AOF を 10 ml 入れ、個体別に採取した精液各 10 μl を加えて軽く攪拌し、緩く蓋を閉めた状態で 10°C に保った。24 時

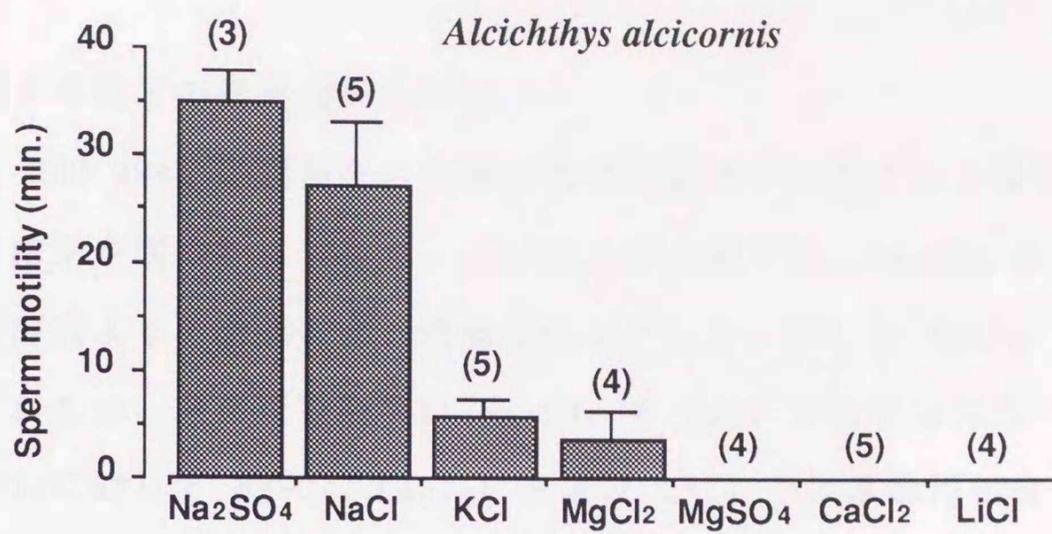


図 78. ニジカジカ精子の各種電解質溶液による運動活性の変化.
(平均値 ± 標準誤差)

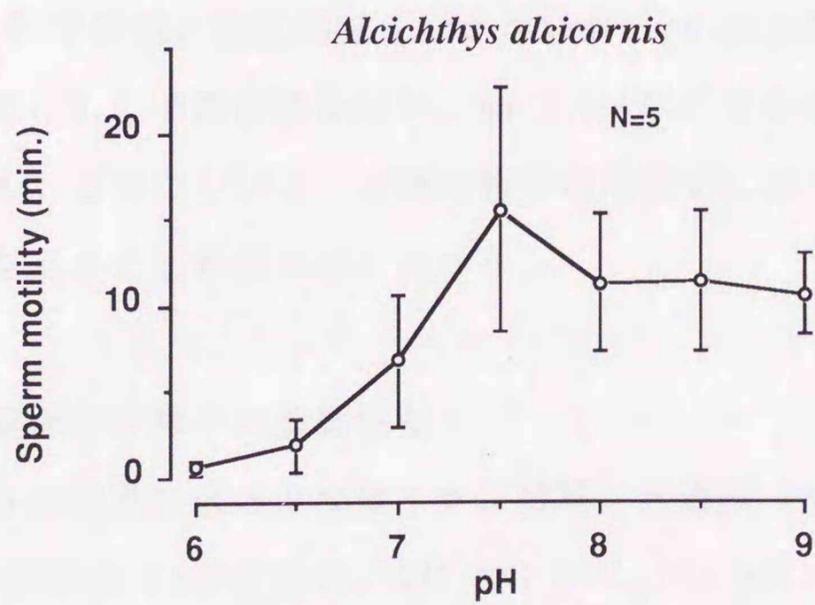


図 79. ニジカジカ精子の pH による運動活性の変化
(平均値 ± 標準誤差)

間毎にフラスコ内の精子を顕微鏡下で観察し、運動活性の有無を調べた。その結果、AOF 中では精子は上記の他の溶液と比べて遙かに長く運動を続けることが知られた(表 5)。運動日数は短い例で 7 日、長い例では 14 日に及んだ。このことから本種の卵巣腔液は浸透圧、イオン組成、および pH だけに限っても、精子の運動に対して極めて適した液環境であることが裏付けられた。

g. その他の魚種の精子の運動活性

イソバテング、アサヒアナハゼ、ベロ、およびスジアイナメの精子の運動活性に対する浸透圧の影響を調べた。

体内配偶子会合型のイソバテングの精子は精漿および卵巣腔液中でニジカジカのそれと同様に長い時間(1 時間以上)運動を続けた。浸透圧を変えた試験溶液を用い精子の運動活性と浸透圧の関係を調べた結果を図 80 に示した。NaCl 溶液では 300 mOsm 以上の濃度で運動活性が見られた。運動活性は 600 mOsm で最高値を示した。KCl 溶液でも NaCl 溶液と同様な傾向が見られたが、運動活性は全体的に低かった。本種の精子はニジカジカとは異なり、マニトール溶液でも 400~500 mOsm の濃度で高い運動活性を示した。また NaCl および KCl 溶液では海水とほぼ等張な 1000 mOsm でもなお比較的高い運動活性を示したが、海水中では運動活性を示さず、わずかに首振り運動が見られただけであった。

同じく体内配偶子会合型と目されるベロの精子は、浸透圧が 300~700 mOsm の溶液で運動活性を見せた。NaCl 溶液では 300 mOsm、KCl 溶液では 600 mOsm、マニトール溶液では 400 mOsm で運動活性は最も高かった。特に NaCl 溶液では 200~400 mOsm の範囲で KCl およびマニトール溶液に比べ精子の運動活性は有意に高かった(図 81)。また、海水中では精子は全く運動活性を示さなかった。

アサヒアナハゼの精子の運動に対する浸透圧の影響を調べた結果を

表 5. ニジカジカ精子の人工卵巣腔液中での運動時間(日数).

Fish No.	Duration (day)
1	8
2	14
3	7
4	13
5	12

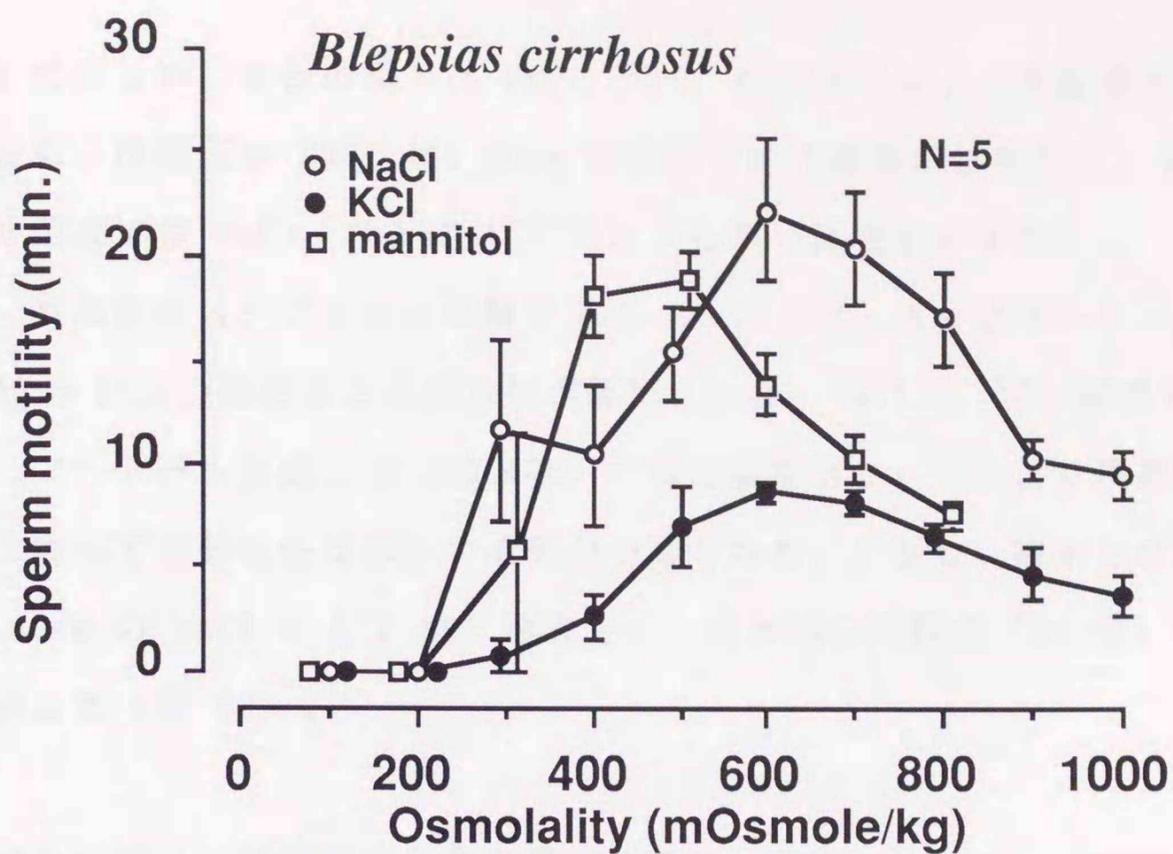


図 80. イソバテング精子の浸透圧による運動活性の変化. (平均値 ± 標準誤差)

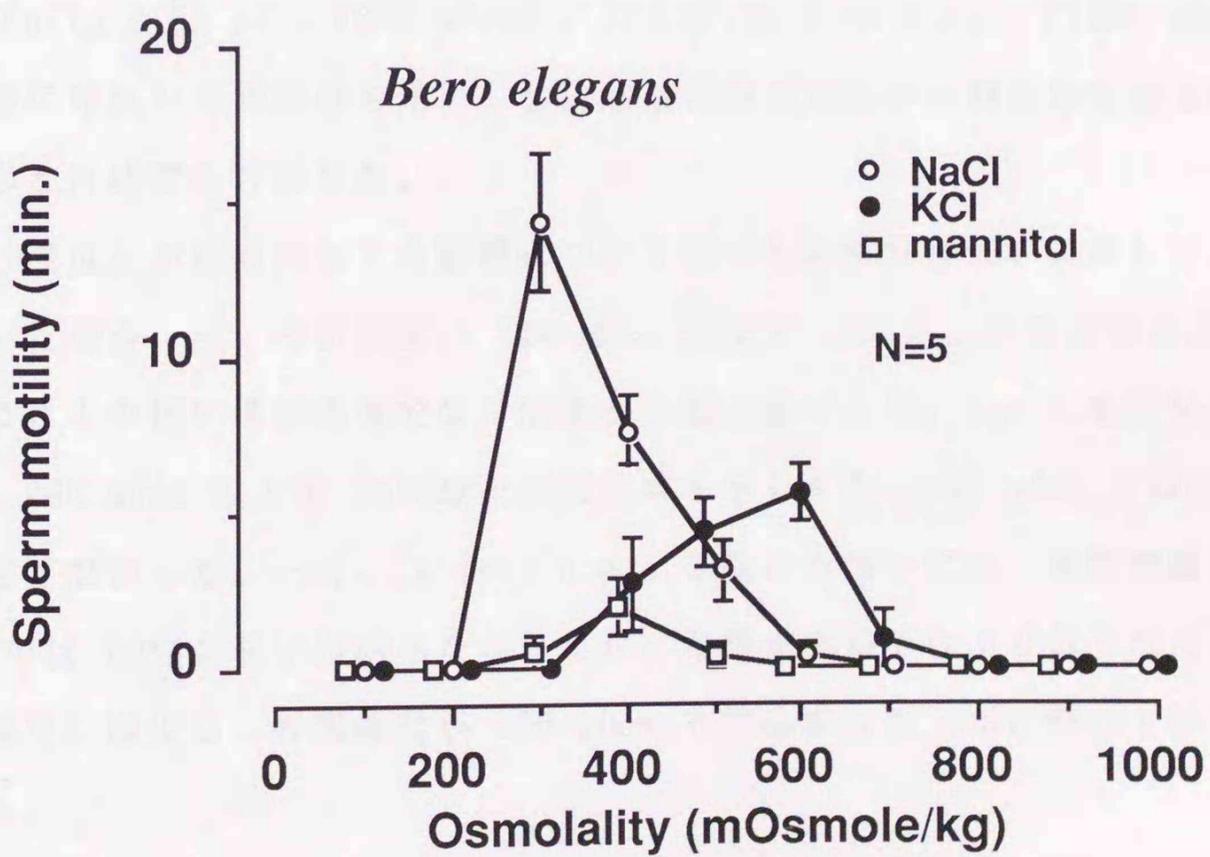


図 81. ベロ精子の浸透圧による運動活性の変化. (平均値 ± 標準誤差)

図 82 に示した。本種の精子は NaCl、KCl、およびマニトール溶液のいずれにおいても、浸透圧が 300~400 mOsm の範囲でのみ運動活性を示し、またマニトール溶液では NaCl、および KCl でよりも高い活性をみせた。

真卵生魚スジアイナメの精子では NaCl、KCl、およびマニトール溶液の 300 mOsm 以上の浸透圧で運動活性が認められた。NaCl と KCl 溶液では 400 mOsm、マニトール溶液では 500 mOsm で最高値を示し、それより浸透圧が高くなるに従って運動活性は減少する傾向が見られた。しかし、海水とほぼ等張な 1000 mOsm の NaCl および KCl 溶液でも、海水内と同程度（20 分）の運動活性を示した（図 83）。

3) 卵の付活および受精に必要な環境特性

a. 浸透圧に関する特性

海水（940 mOsm）、平衡塩類溶液（b.s.s.; NaCl 58.44 g/l, KCl 2.09 g/l, CaCl₂ 2.52 g/l; 1860 mOsm）、および Ca-free b.s.s.（1820 mOsm）を数段階に希釈した試験液を用い、各試験液に既交尾魚から搾出した卵を移し、受精率と付活率を計測した。

浸透圧が付活に与える影響について調べた結果を図 84 に示した。海水を用いた場合には、希釈濃度が 110 mOsm 以上で 60%以上の付活率を示したが、これより低い希釈濃度では付活率が急激に減少した。b.s.s.を用いた場合には、260 mOsm 以上で 70%以上の付活率を示したが、120 mOsm では付活が全く起きなかった。一方、Ca-free b.s.s.を用いた場合には、希釈濃度が 910 mOsm では 80%の高い付活率を示したが、希釈濃度がそれより低くなると付活率は徐々に減少し、希釈濃度が 460 mOsm で付活率は約 4%と極めて低い値を取った。

浸透圧が受精に与える影響について調べた結果を図 85 に示した。海水を用いた場合では、希釈濃度が 310 mOsm 以上で 70%以上の受精率を示した

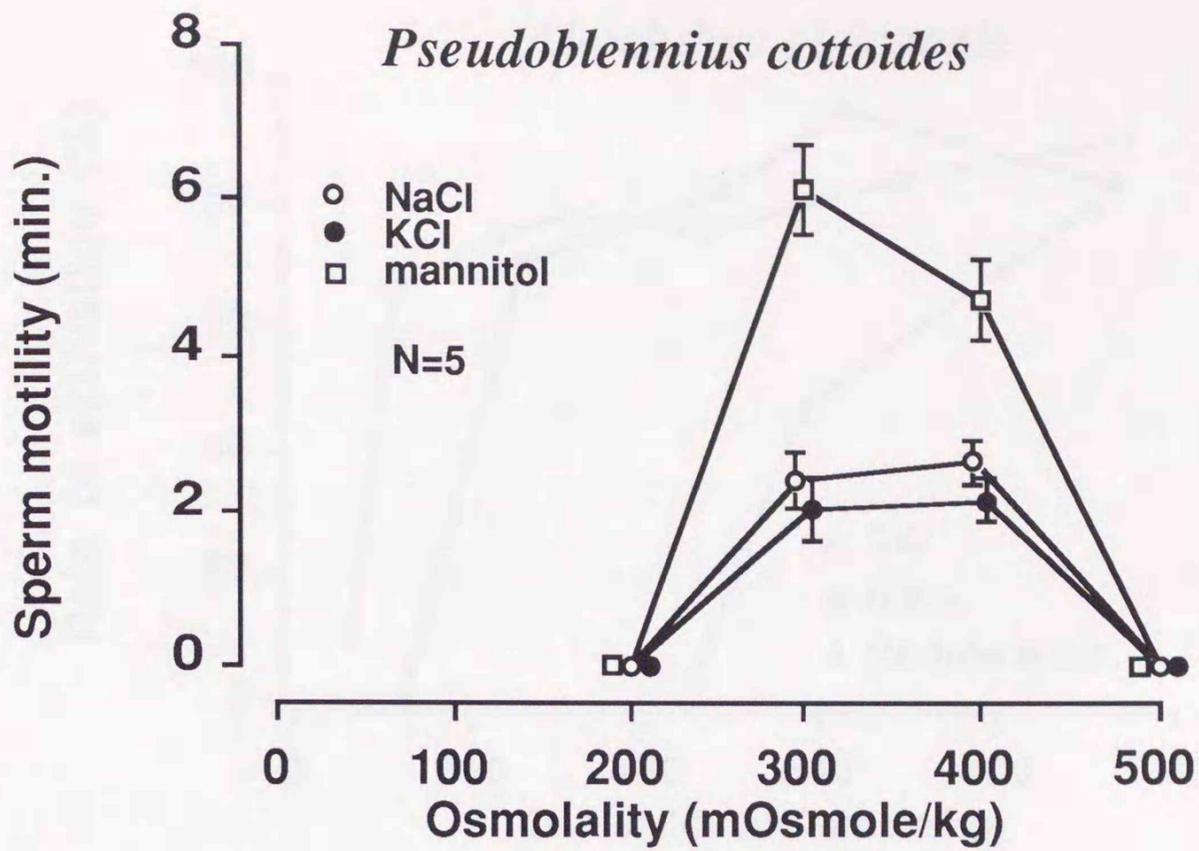


図 82. アサヒアナハゼ精子の浸透圧による運動活性の変化.
(平均値 ± 標準誤差)

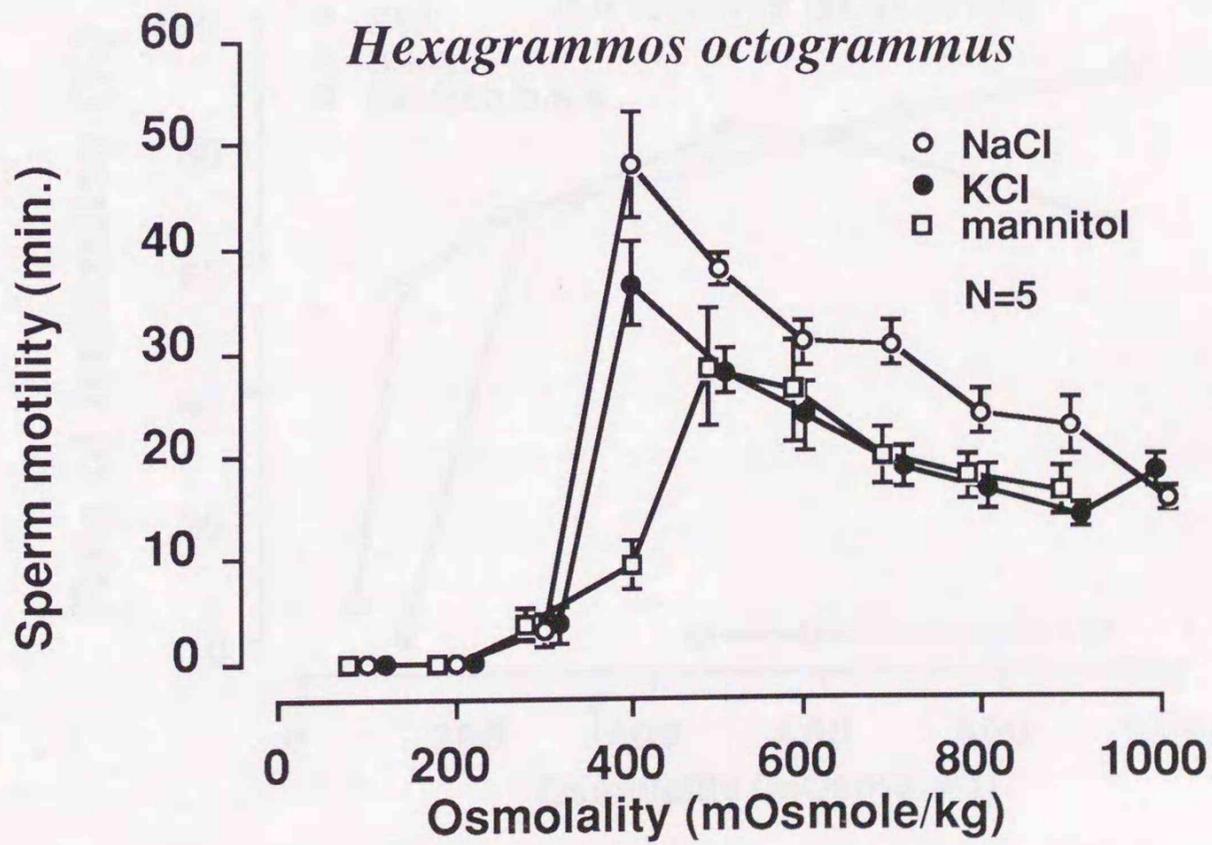


図 83. スジアイナメ精子の運動活性と浸透圧の関係.
(平均値 ± 標準誤差)

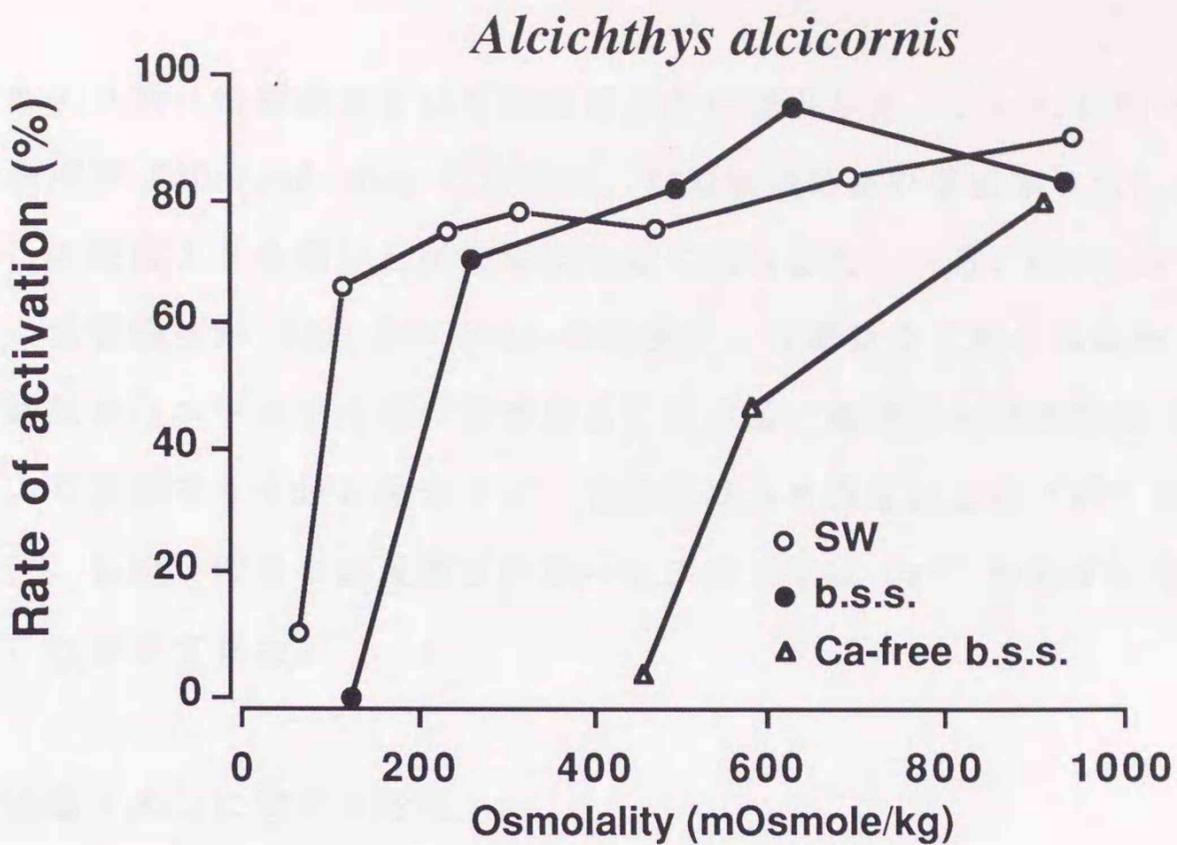


図 84. 希釈海水(SW), 平衡塩類溶液 (b. s. s.), および Ca-free b. s. s. を用いた浸透圧と付活率の関係.

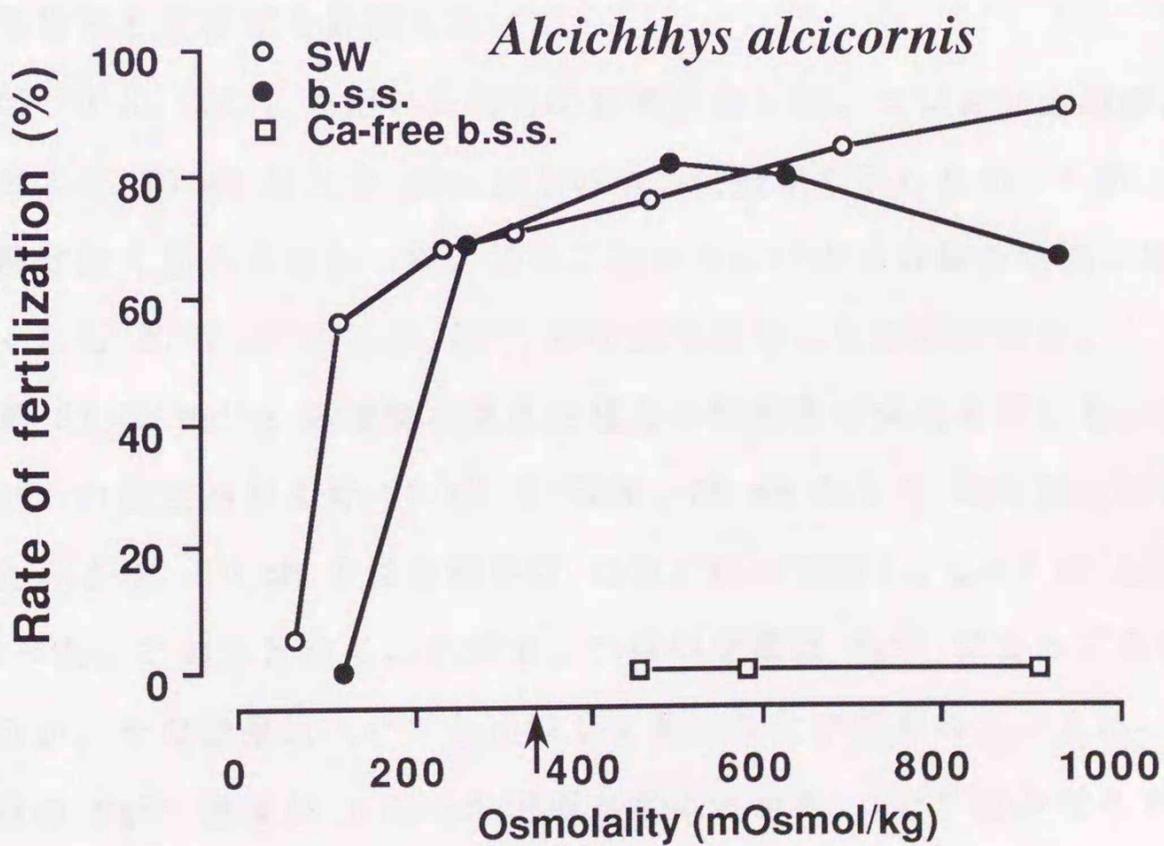


図 85. 希釈海水(SW), 平衡塩類溶液 (b. s. s.), および Ca-free b. s. s. を用いた浸透圧と受精率の関係. 矢印は卵巣腔液の浸透圧を示す.

が、これより低い希釈濃度では受精率は急激に減少した。b.s.s.を用いた場合は希釈濃度が 930~260 mOsm の溶液で、70%前後の高い受精率を示し、希釈濃度がこの範囲よりも低いと受精率は急激に減少した。一方、Ca-free b.s.s. 中では、希釈濃度が 910~460 mOsm の範囲で、受精は全く見られなかった。以上の結果からニジカジカ卵の受精および付活は、浸透圧が卵巣腔液 (347 mOsm) より低張でも十分に起きるが、受精にはある濃度以上の Ca^{2+} が必要であること、しかし付活には浸透圧が高い条件の下では Ca^{2+} が必ずしも必要ではないことが示された。

b. 2 価陽イオンに関する特性

付活および受精に対する 2 価の陽イオンの影響を調べるため、体液とほぼ等張である 300 mOsmol/kg の NaCl 水溶液に、 CaCl_2 または MgCl_2 を様々な濃度になるように加えた試験溶液を用い、既交尾魚から搾出された卵を浸漬して受精率と付活率を計測した。

図 86 に CaCl_2 を用いた場合の結果を表した。ニジカジカの卵は Ca^{2+} 濃度がおよそ 10 mM 以上で 80%以上の高い受精率を示したが、0.57 mM 以下では受精は全く起こらなかった。このことからニジカジカ卵の受精には媒質中に少なくとも 0.57 mM 以上の Ca^{2+} が必要であることが示された。

図 87 に MgCl_2 の濃度を変えた場合の受精率の変化を示した。本種の卵は Mg^{2+} の濃度がおよそ 25 mM で 50%、50 mM 以上で 80%以上の受精率を示した。また、10 mM では受精率は 15%と極めて低く、2.63 mM 以下では 0%であった。このことから、ニジカジカ卵の受精は Mg^{2+} によっても引き起こされるが、その効果は Ca^{2+} と比較して弱いことが示された。また、本種の卵巣腔液の Mg^{2+} 濃度が 1.52 mM であったことから、 Ca^{2+} のみならず Mg^{2+} の濃度においても、卵巣腔液は受精に必要な条件を満たしていないことが示された。

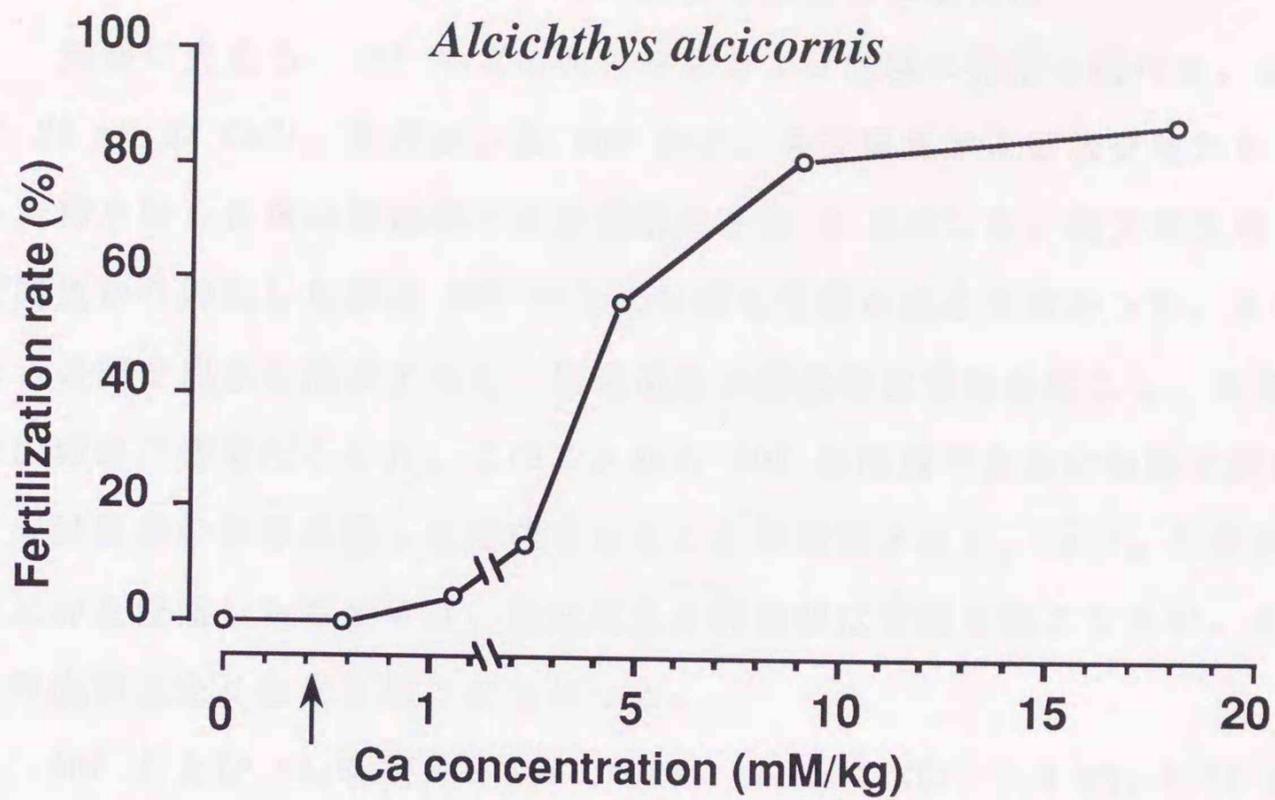


図 86. ニジカジカ卵における Ca^{2+} 濃度と受精率の関係.
 矢印は卵巣腔液中の Ca^{2+} 濃度を示す.

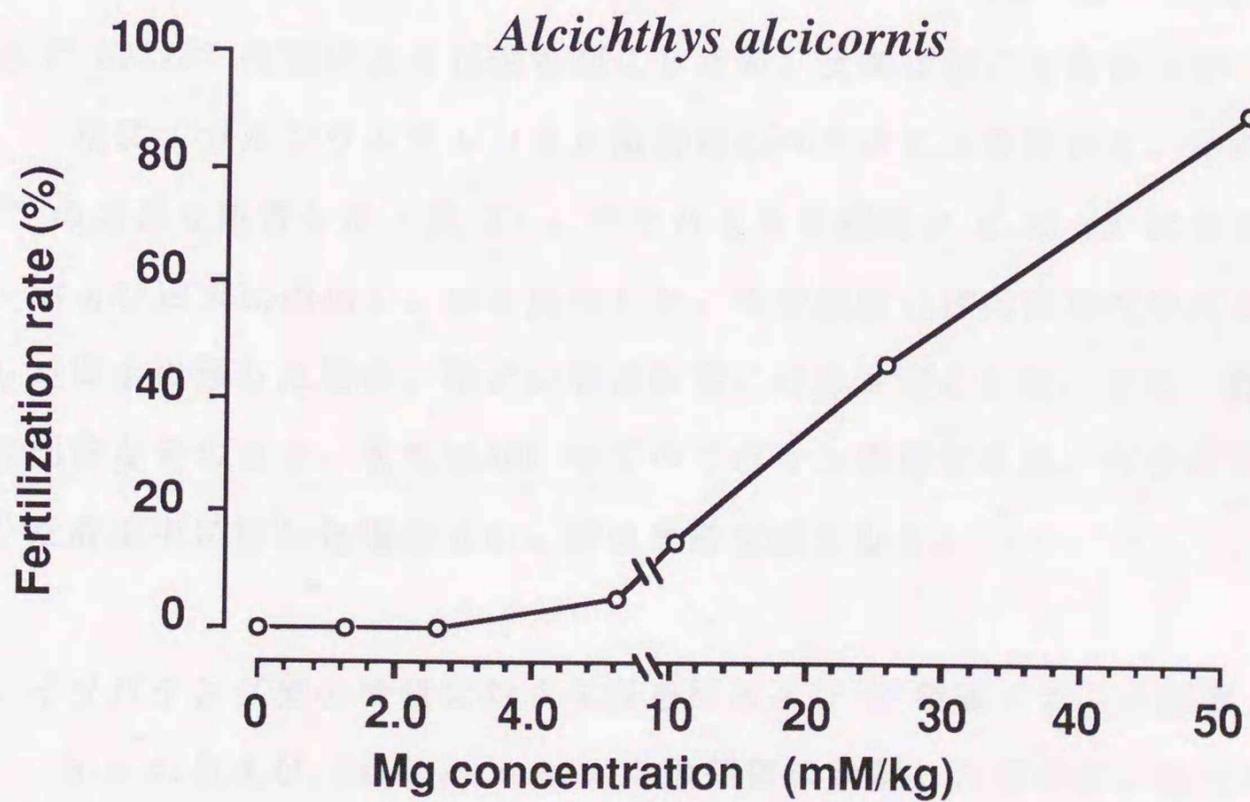


図 87. ニジカジカ卵における Mg^{2+} 濃度と受精率の関係.

c. 卵内への Ca^{2+} の透過およびその阻害と受精および付活

実験に先立ち、AOF 中での卵の付活および受精の有無を調べた。AOF および 20 mM の CaCl_2 を添加した AOF 中に、未交尾魚および既交尾魚から搾出した卵を移した後の付活率および受精率を表 6 に示した。既交尾魚および未交尾魚から搾出した卵は AOF 中では付活も受精も起こさなかった。また、これらの卵を海水に浸漬すると、既交尾魚の搾出卵は受精を起こし、未交尾魚の搾出卵は付活を起こした。このことから AOF は配偶子会合の有無に関わらず、未受精卵の保存に適した溶液であることが確認された。 CaCl_2 を添加した AOF に卵を浸漬した場合には、既交尾魚の搾出卵は受精を起こしたが、未交尾魚の搾出卵は全く変化を起こさなかった。

AOF および Ca, Mg-free AOF (NaCl, 171 mM; KCl, 8.4 mM; EDTA 2Na, 0.2 mM; HEPES, 20 mM; pH 7.7) 中で、カルシウム透過担体の A23187 を濃度が $5 \mu\text{g/ml}$ となるように希釈した液を用いて卵内に Ca^{2+} を透過させた場合、既交尾魚および未交尾魚のいずれの搾出卵も、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の有無に関わらず A23187 処理により付活を起こしたが、受精は起こさなかった (表 6)。

次に、カルシウムチャンネル阻害剤のベラパミルを用いて、卵内への Ca^{2+} の透過を阻害した (表 7)。ベラパミルを濃度が 0.05 mM になるように AOF および海水に添加し、卵を処理した。未交尾魚の搾出卵をベラパミルを溶解した海水に移した場合、殆どの卵は正常に付活を起こした。また、既交尾魚の搾出卵をそのまま、または AOF 中でベラパミル処理した後、ベラパミルを添加した海水中に移した場合でも、卵は受精を起こした。

d. イソバテング卵の受精に対する浸透圧および 2 価陽イオンの影響

b.s.s. および Ca-free b.s.s. を数段階に希釈した液中に、既交尾のイソバテング卵を浸漬したときの受精率および付活率を図 88 に示した。b.s.s. を用いた場合には、希釈濃度が 930 mOsm では受精率および付活率は共におよ

表 6. Ca ionophore A23187 処理によるニジカジカ卵の受精率
および付活率.

	Immersing solution	No. of eggs examined	Activated egg (%)	Fertilized egg (%)
Eggs from uncopulated fish	AOF	53	0 (0)	—
	AOF+A23187	57	96 (55)	—
	Ca,Mg-free AOF	75	0 (0)	—
	Ca,Mg-free AOF +A23187	53	100 (53)	—
	SW	59	100 (59)	—
Eggs from copulated fish	AOF	93	13 (12)*	13 (12)*
	AOF+A23187	92	100 (92)	10 (9)*
	Ca,Mg-free AOF	88	10 (9)*	10 (9)*
	Ca,Mg-free AOF +A23187	82	100 (82)	13 (11)*
	SW	109	93 (101)	78 (85)

* 印は壊卵の混入により付活および受精を起こしたものである.

表 7. ベラパミル処理によるニジカジカ卵の受精率および付活率.

	Washing solusion	Immersing solution	No. of eggs examined	Activated egg (%)	Fertilized egg (%)
Eggs from uncopulated fish	—	AOF	53	0 (0)	—
	—	SW	59	100 (59)	—
	—	SW +verapamil	72	100 (72)	—
Eggs from copulated fish	—	AOF	93	13 (12)*	13 (12)*
	AOF +verapamil	SW	102	100 (102)	99 (101)
	AOF +verapamil	SW +verapamil	104	100 (104)	99 (103)
	—	SW	100	100 (100)	100 (100)

* 印は壊卵の混入により付活および受精を起こしたものである.

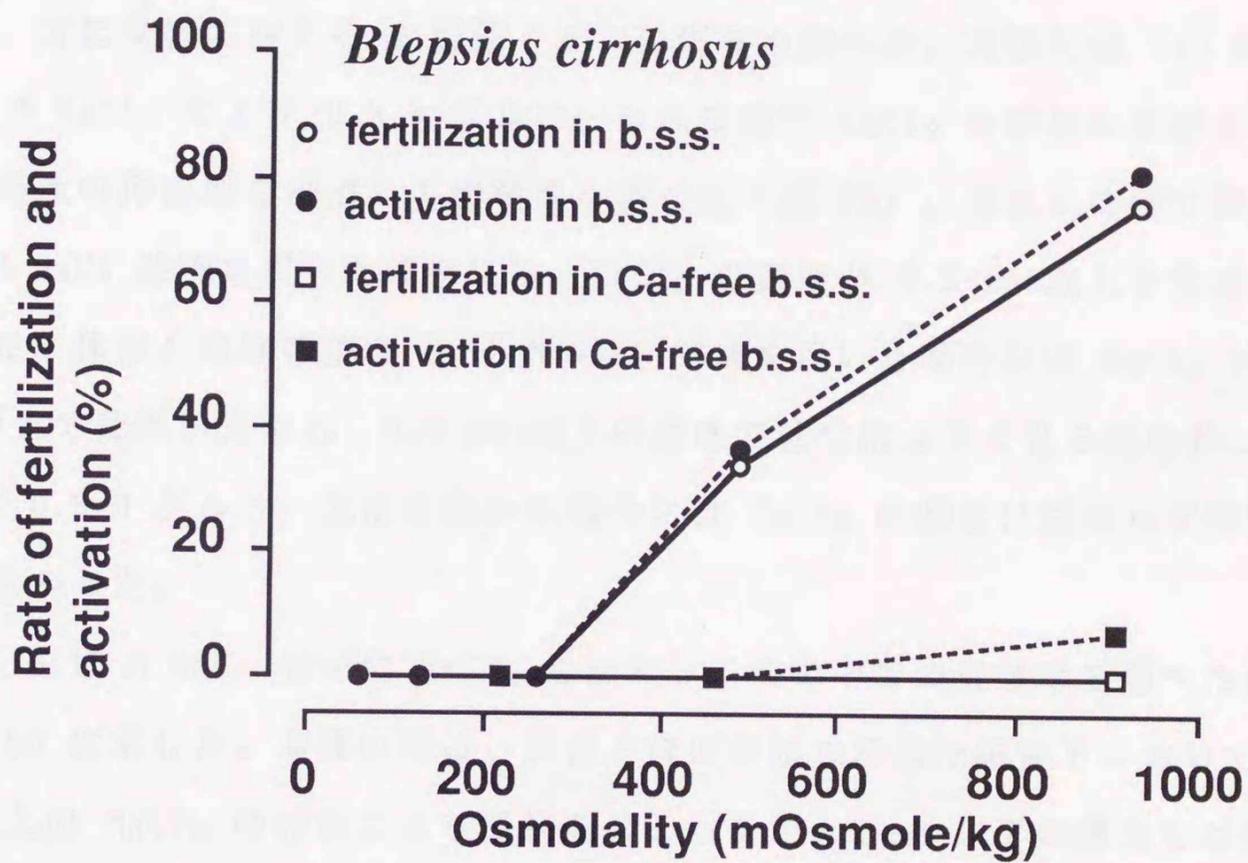


図 88. 希釈平衡塩類溶液(b. s. s.)および Ca-free b. s. s. 中でのイソバテング卵の受精率および付活率.

そ 80%と高値を示したが、希釈濃度が 470 mOsm では受精率および付活率はおよそ 35%に減少し、さらにそれ以下の希釈濃度では受精も付活も全く起きなかった。一方、Ca-free b.s.s.を用いた場合には、どの希釈濃度においても受精は起きず、希釈濃度 910 mOsm でわずか 9%の付活が見られたのみであった。これらの結果から、イソバテングの卵の受精および付活には Ca^{2+} の存在に加えて、体液と等張かそれ以上の浸透圧条件が必要であることが示された。

次に受精に対する 2 価陽イオンの影響を調べた。実験には 0.5 M NaCl、0.15 M NaCl、および 0.3 M グルコース水溶液に CaCl_2 を添加した液を用い、既交尾魚の搾出卵を浸漬して受精率を調べた (図 89)。海水とほぼ等張な 0.5 M NaCl 溶液を用いた場合には、 CaCl_2 の濃度が 0.5 mM 以上で受精が見られた。体液とほぼ等張な 0.15 M NaCl 溶液を用いた場合には CaCl_2 が 1.0 mM 以上で受精が見られ、0.5 mM 以下の濃度では受精は全く見られなかった。一方、0.3 M グルコース液を用いた場合には CaCl_2 の濃度に関わらず受精は起きなかった。

0.15 M NaCl 液中に MgCl_2 を添加し、その中での受精率を調べた結果を図 90 に示した。本種の卵は、体液とほぼ等張な浸透圧条件下において 4 mM 以上の MgCl_2 の存在により受精を起こしたが、2 mM 以下の濃度では受精を起こさなかった。

以上の結果から、イソバテング卵の受精には、卵巣腔液と等張な浸透圧環境では少なくとも 0.5 mM 以上の Ca^{2+} または 2 mM 以上の Mg^{2+} が必要であることが示された。本種の卵巣腔液中の Ca^{2+} 濃度が 0.31 mM、また、 Mg^{2+} 濃度が 1.14 mM であったことから、 Ca^{2+} および Mg^{2+} の濃度が低いことによって卵巣内での受精が抑制されているものと考えられた。

e. スジアイナメ卵の受精に対する浸透圧および Ca^{2+} の影響

スジアイナメの卵は、搾出後卵巣腔液に浸ったままの状態で媒精した後

Blepsias cirrhosus

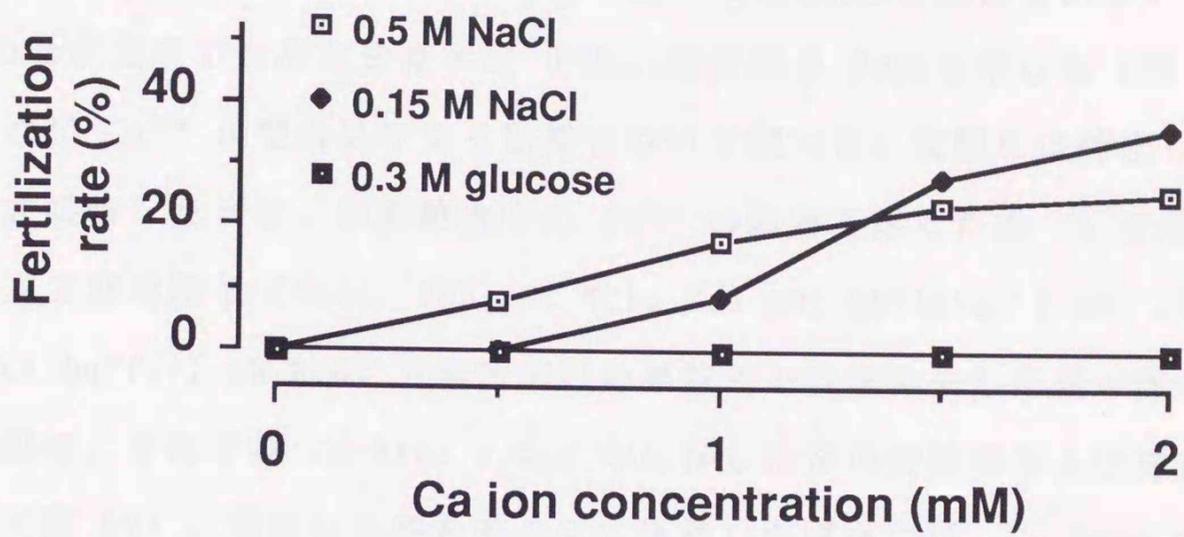


図 89. イソバテング卵における Ca^{2+} 濃度と受精率の関係.

Blepsias cirrhosus

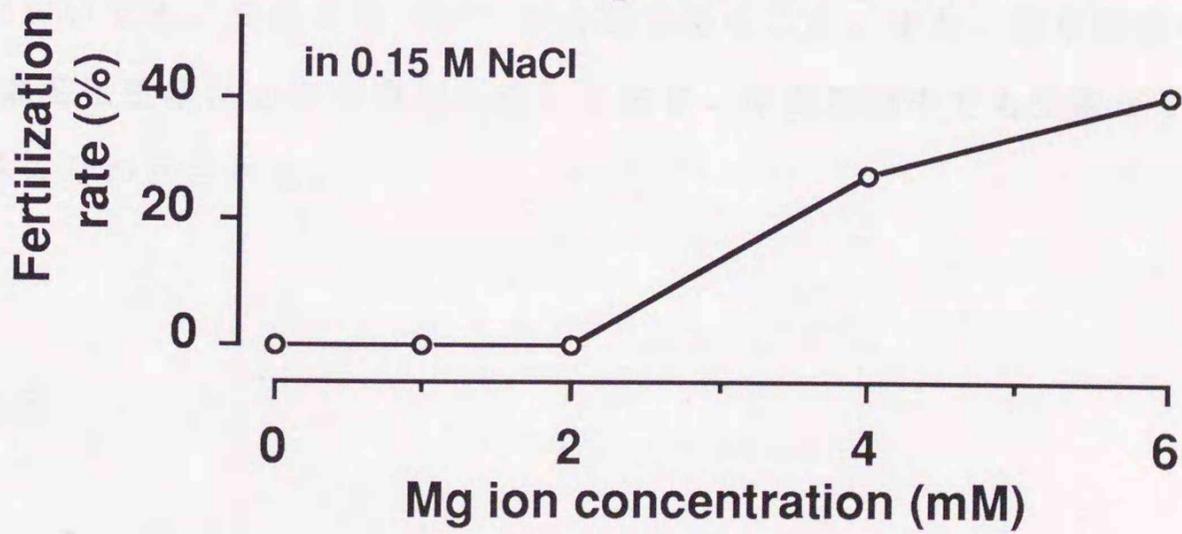


図 90. イソバテング卵における Mg^{2+} 濃度と受精率の関係.

に海水に移した場合 100%受精を見せたが、海水に移さず卵巣腔液内に留めて置いて高い割合(約 80%)で受精した。そこでまず浸透圧が受精に及ぼす影響を調べた。搾出した卵を媒精した後、希釈した b.s.s. 中に移すと、希釈濃度が 210 mOsm 以上で受精率、付活率共に 80%以上の高値を示し、100 mOsm の希釈濃度でもなお受精率は 65%、付活率は 90%を示した(図 91)。

次に Ca^{2+} が受精に与える影響について調べた。実験には搾出した卵をそのまま媒精した群と、卵巣腔液中の Ca^{2+} の影響を除くため Ca 欠如スジアイナメ人工卵巣腔液 (NaCl, 165 mM; KCl, 7.8 mM; EGTA2Na, 1 mM; 20 mM Tris-HCl buffer; pH 8.0) で卵表面の卵巣腔液を洗浄除去した後に媒精した群とを設け、それぞれ Ca-free b.s.s. 中に移した後の受精率および付活率を調べた(図 92)。搾出した卵をそのまま媒精した場合には、Ca-free b.s.s. の希釈濃度が 910 mOsm では受精率は 35%と低かったが、それ以外の希釈濃度では 70~90%と高い受精率を示した。また、付活率は全ての希釈濃度でほぼ 100%に近い値を示した。しかし卵を洗浄後媒精し、Ca-free b.s.s. に移したものでは、全ての希釈濃度で 40~90%の付活率が得られたが、受精はどの希釈濃度においても全く見られなかった。以上の結果から真卵生種のスジアイナメにおいても、受精には Ca^{2+} が必要であること、また、卵巣腔液中の Ca^{2+} 濃度は受精に必要な濃度に達しており、卵巣腔液中でも受精が十分可能であることが示された。

3. 考察

本研究に用いたニジカジカをはじめ体内配偶子会合型の繁殖様式を取る種では、すでに交尾を行った雌の卵巣内では、精子が排卵された卵の卵門内に侵入するが、それに続く受精反応は起きない (Munehara et al., 1989;

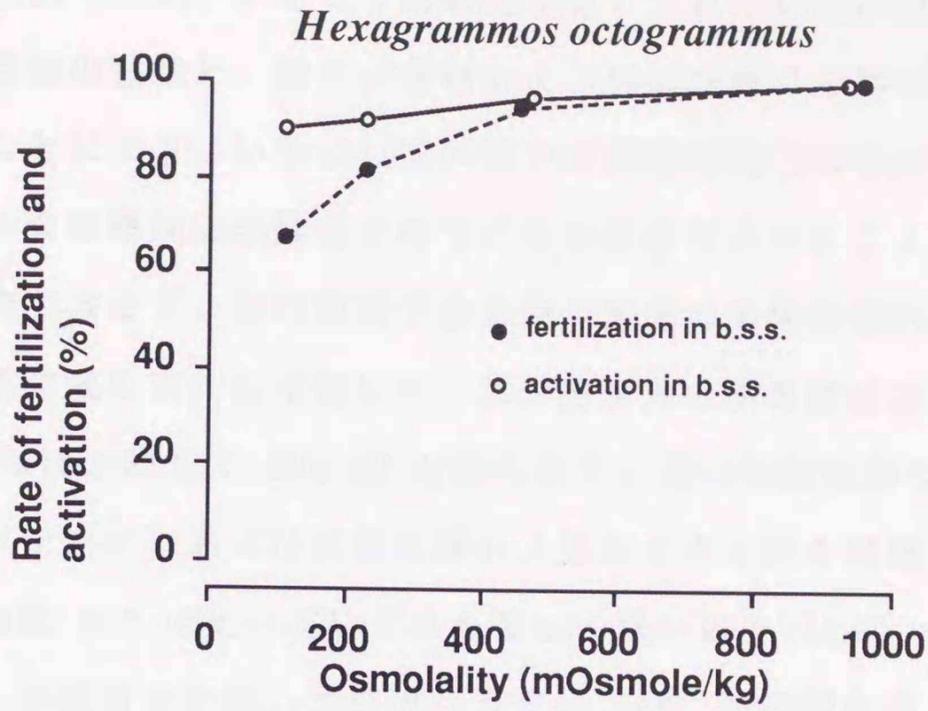


図 91. スジアイナメ卵の希釈平衡塩類溶液 (b. s. s.) 中での受精率および付活率の関係.

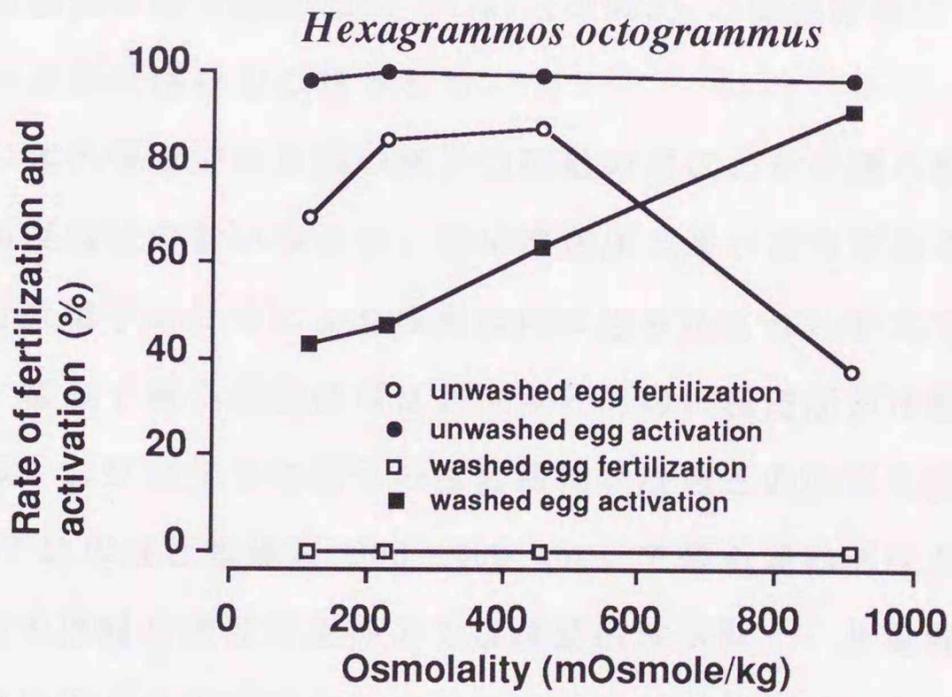


図 92. スジアイナメの卵の希釈 Ca-free b. s. s. 中での受精率および付活率の関係.

Munehara et al., 1991)。そこで本研究では、これらの種の配偶子会合の環境である卵巣腔液の性状と、精子の運動および卵の受精に必要な生理的条件を明らかにすることにより、いかにして卵巣内で雌雄配偶子の会合が円滑に行われ、次に起こるべき受精反応が抑制されているのかを明らかにしようと試みた。

本研究ではまず、体内配偶子会合型の魚種の卵巣腔液の性状を調べ、真卵生種の卵巣腔液のそれと比較した。ニジカジカの卵巣腔液の主な陽イオンのうち Na^+ は血清と同じく 190 mM と最も多く、この特徴は同じ体内配偶子会合型のイソバテング、および真卵生種のスジアイナメでも同様であった。その他の陽イオンは Na^+ に比べていずれも著しく低い値を示したが、これらのうち特に Ca^{2+} が注目された。ニジカジカでは Ca^{2+} が同種血清と比べて 1/15 と少ないのみならず、スジアイナメの卵巣腔液と比べても 1/4 と低かった。同様にイソバテングでも卵巣腔液の Ca^{2+} 濃度は、スジアイナメと比較して著しく低い値を示した。このような卵巣腔液の性状が、海産カジカ科魚類、特に体内配偶子会合型の種 (Munehara et al., 1989) の卵巣腔液に共通した特徴であるか否かは興味深いところである。

一般に体外受精型の魚類の精子の運動の場は、その種の繁殖環境に応じて体液よりも浸透圧の低い淡水か、逆に浸透圧の高い海水である。体内配偶子会合型の種では精子は交尾により卵巣腔内に送り込まれ、そこで排卵された卵と会合する。従って精子運動の場は胎生魚と同様に浸透圧が体液と等張な卵巣腔液中である。ニジカジカで精子の運動活性と浸透圧の関係を調べた結果、NaCl 溶液中では体液と等張な 300~400 mOsm で最も運動活性が高かった。一方、KCl 溶液では同じ浸透圧条件下では運動活性が低く、非電解質のマニトール溶液中ではいずれの浸透圧でも全く運動活性を示さなかった。さらにニジカジカの精子の運動活性に対する各種イオンの影響について調べた結果からも、精子の運動活性が他のイオンよりも Na^+ の存在下で有意に高められることが明らかとなった。これらの結果は本種の精子が体液浸透圧下で特に Na^+ に強

く依存する液環境で運動可能であることを示している。

pH については、7.5 以上で精子の運動活性が高かった。ニジカジカの卵巣腔液の pH が約 7.7 であったことから、本種の卵巣腔液が精子の運動に適した環境であると言えよう。さらにこのことを裏付けるため、AOF 中での精子の運動時間を調べた結果、精子は 7 日から 14 日もの間運動を続けた。この運動継続時間は雑菌の繁殖による環境の悪化によって大きく左右され、もし雑菌の繁殖がなければさらに長い時間運動を続ける可能性もある。このことからニジカジカの卵巣腔液は、そのイオン組成、浸透圧、および pH が精子の活性維持に極めて適したものであることが確かめられた。交尾によって卵巣内に送り込まれた精子は、もし卵巣腔液が産卵期間中絶えず分泌されているとすれば、その期間の大部分を運動し続けるであろうし、また他の卵生種で示唆されているように排卵の度毎に卵巣腔液の分泌のピークが繰り返される (T. S. Yamamoto, 1963) とすれば、その排卵間期には卵巣腔内の液環境中の何らかの要因の変化によって不動化されているのかもしれない。

一方、ニジカジカでは初回産卵、即ち未交尾の雌が産卵する際には、産卵直後に行われる交尾によって雄から放出される精子で体外受精をすることが知られている (Munehara, 1988)。今回の観察で、本種の精子は海水の浸透圧下でも約 3 分間の運動を行うことが確かめられた。このことは、交尾後の体内での配偶子会合の成立に加えて、環境水中でも配偶子会合と受精が可能である本種の特異な繁殖様式の成立を裏付けるものである。

イソバテングは、ニジカジカと同様に体内配偶子会合型の繁殖様式を取ることが最近明らかにされた種である (Munehara et al., 1991)。本種の精子の運動活性を調べた結果、運動活性の高い浸透圧は体液よりもやや高張な 400~600 mOsm にあったが、NaCl 溶液では体液浸透圧で十分に運動可能であることが示された。しかし、海水とほぼ等張な 1000 mOsm の NaCl および KCl 溶液でも運動が観察されたにもかかわらず、海水中では精子は全く運動し

なかった。このことと、非電解質溶液中でも高い運動活性を示したことから、イソバテングの精子の運動を保証する条件についてはなお問題が残された。しかし、少なくとも本種ではニジカジカのように海水中でも配偶子会合が起きることはなく、専ら体内で配偶子会合が行われるものと推察された。

ニジカジカの近縁種であるベロは、まだ繁殖生態が明らかにされていない種であるが、産卵期の卵巢内に精子が存在し、雌から搾出した卵を海水に浸漬することにより受精が起き胚発生が進むことが確認されたことから、体内配偶子会合型であることが明らかとなった。本種の精子の運動活性のピークは NaCl 溶液中で 300 mOsm、KCl 溶液中では 600 mOsm にあり、海水中では運動は見られなかった。このことから、本種も専ら交尾により卵巢内で配偶子会合を起こす可能性が示された。

アサヒアナハゼはカジカ科魚類の中でも繁殖生態がよく知られている種である。四宮（1985）によると、本種は産卵期に入る前に交尾を行なうという。また、アサヒアナハゼの卵巢腔内に排卵された卵を顕微鏡により観察した結果、精子は卵門内に侵入しているが卵原形質内には陥入していないこと、動物極には第 2 減数分裂中期の染色体、および第 1 極体が認められたことから、既交尾のニジカジカの場合と同じく、体内配偶子会合型であることが確認された。本種の精子の運動活性と浸透圧の関係を調べた結果、NaCl、KCl、およびマニトール溶液のいずれにおいても、精子は体液と等張な 300~400 mOsm のみ運動を行ない、配偶子の会合が卵巢内でしか起こらないことが示唆された。

以上のように、体内配偶子会合型の繁殖様式を取る種ではいずれも、精子は体液と等張な浸透圧条件下で高い運動活性を示す。特にニジカジカ精子は浸透圧のみならずイオンおよび pH についても卵巢内での運動に適した性質をもつことが明らかにされた。浸透圧に対するこのような精子の性質が必ずしも体内配偶子会合種のみに見られる特性ではないことは、真卵生種のスジアイナメの精子が体液と等張な浸透圧で高い運動活性を示したことから分かる。し

かし、体内配偶子会合型への特化の特徴として、精子の運動可能な浸透圧が体液と等張な範囲へと狭まって行く傾向がニジカジカ、ベロ、およびアサヒアナハゼを通じて示唆された。

本研究で精子活性を調べたカサゴ目カジカ科のニジカジカ、イソバテング、ベロ、アサヒアナハゼ、およびアイナメ科のスジアイナメの精子は、輸精管から取り出した精液中で既に運動しており、しかもその運動時間は極めて長い。一般に魚類の精子は精漿中では運動を抑制されており、環境水に接して初めて運動を開始することが知られている（森沢，1984）。このような現象は、ニシン科の *Clupea pallasii*（柳町，1957a）、サケ科の *Oncorhynchus keta*、*Oncorhynchus masou*、*Salmo gairdneri*、および *Salvelinus leucomaenis*（森沢・石田，1987）、カダヤシ科の *Poecilia reticulata*、*Gambusia affinis*、コイ科の *Cyprinus carpio*、*Tribolodon hakonensis*、*Carassius auratus*、*Carassius carassius*、カレイ科の *Limanda yokohamae*、*Microstomus achne*、*Kareius bicoloratus*、フグ科の *Fugu niphobles*、タラ科の *Gadus morrhua*（Morisawa and Suzuki, 1980）、カワカマス科の *Esox lucius*、ハタ科の *Dicentrarchus labrax*、タイ科の *Sparus auratus*（Billard, 1978）など、多くの魚種で報告されている。一方、精漿中で精子の運動が確認されている種は、カジカ科のカンキョウカジカ *Cottus hangiongensis*（太田ら，1984）、アサヒアナハゼ（平井，1986）、ダンゴウオ科のホテイウオ *Aptocyclus ventricosus* などがあり、これらの魚種が全てカサゴ目に属していることは興味深い。

魚類の精漿のイオン組成はこれまでに多くの種について調べられており、一般に Na^+ が血清よりも低く、高濃度の K^+ を含むことが知られている（Morisawa et al., 1983a,b; Steyn and Van Vuren, 1986）。サケ科魚種ではこの高濃度の K^+ が精漿中での精子の運動を抑制している（Morisawa and Suzuki, 1980）。しかし、他の魚種では K^+ の働きについては明らかにされて

いない。ニジカジカ、イソバテング、およびスジアイナメの精漿も多くの魚種と同様に Na^+ が血清と比較して少なく、 K^+ が高い値を示しており、このような特徴は魚類の精漿に共通したものであると考えられる。今回使用した魚種ではいずれも、精漿中で精子が運動を行なうことから、 K^+ が直接精子の運動の抑制に働いている可能性はない。また、これらの魚種では輸精管内で精子が運動を停止しているか否かは明らかにはできなかったが、もし輸精管内で精子が運動を停止しているとすれば、その運動の開始にはこれまでの魚類の精子では知られていない全く別の機構（酸素分圧、二酸化炭素分圧、pH の変化など）が働いているものと思われる。これらの魚種の精子の運動開始機構の解明については今後の研究課題として残された。

交尾を経験したニジカジカの卵巢内での受精の抑制現象にかかわる要因を明らかにするため、受精に必要な浸透圧と Ca^{2+} 濃度を調べた。その結果、希釈海水および希釈 b.s.s. では浸透圧が約 300 mOsm 以上で高い受精率を示したが、Ca-free の希釈 b.s.s. では受精は全く起きなかった。また、 Ca^{2+} 濃度については 10 mM 以上で高い受精率がみられ、0.57 mM 以下では全く受精しなかった。ニジカジカの卵巢腔液の浸透圧は平均 347 mOsm であり、上記の結果から浸透圧からみる限り受精に必要な条件は満たされている。しかし、卵巢腔液の Ca^{2+} 濃度は 0.41 mM で、受精に必要な 0.57 mM を下回っている。このことからニジカジカの卵巢内で受精を抑制している主な要因は、卵巢腔液に含まれている Ca^{2+} の濃度にあることが明らかとなった。実際の産卵では卵が海水中に放出され、卵外の Ca^{2+} 濃度が上昇する（約 11 mM）ことによって受精反応が始まるのであろう。

ニジカジカと同じく体内配偶子会合型のイソバテングでは、希釈 b.s.s. の浸透圧がおおよそ 930 mOsm では高い割合で受精が見られたが、470 mOsm では受精率はかなり低下し、260 mOsm では全く受精しなかった。イソバテングの卵巢腔液の浸透圧はおおよそ 290 mOsm であったことから、この種では卵巢腔

液の浸透圧そのものも受精を起こすのに十分な条件にはないものと思われる。さらに受精に必要な Ca^{2+} 濃度を調べた結果、体液と等張な浸透圧の NaCl 溶液では 1.0 mM 以上で受精が見られ、0.5 mM では受精は全く起こらなかった。イソバテングの卵巣腔液中の Ca^{2+} 濃度はニジカジカと同様に血清と比較して極めて少なく、0.31 mM であった。このことからイソバテングでは、卵巣腔液の浸透圧と Ca^{2+} 濃度が共に受精に必要な値に達していないことが卵巣内での受精抑制の要因となっているものと思われる。

一方、真卵生種のスジアイナメでは卵巣腔液中で卵に人為的に媒精すると受精が起きる。本種の卵の受精に必要な浸透圧を調べた結果、希釈 b.s.s. の浸透圧が約 100 mOsm でも受精が起こり、受精可能な浸透圧の範囲は体内配偶子会合型の種よりも広い。しかし、本種の卵を Ca-free b.s.s. で洗浄した後に媒精すると、いかなる浸透圧条件下でも受精は全く起きず、受精には Ca^{2+} が必須であることが示された。以上のことから、受精における浸透圧および Ca^{2+} に対する体内配偶子会合型の卵の性質は、スジアイナメなど真卵生種の卵と基本的に類似していることが示された。従って体内配偶子会合型の繁殖様式を成立させる上で、卵巣腔液中の Ca^{2+} 濃度が受精に必要な値に達していないことが極めて基本的な要因となっているものと思われる。

受精に関わる Ca^{2+} の働きに関しては、これまでも多くの報告がある。棘皮動物および哺乳類では精子の先体反応に Ca^{2+} が不可欠であることが知られている（石原，1980）が、精子が先体を欠く硬骨魚類でも、受精および付活における Ca^{2+} の必要性に関していくつかの報告がなされている（Ginsburg, 1963; T. Yamamoto, 1954; Gilkey, 1981; Iwamatsu et al., 1985）。T. Yamamoto (1961) はメダカ卵での実験結果に基づいて、 Ca^{2+} が受精の第 1 段階（刺激の受容）に必要であるのみならず、第 2 段階（受精波ないし表層胞の崩壊、またはその双方）にも必要か少なくとも有効であると述べている。このことは、 Ca^{2+} が受精反応の各段階でそれぞれ異なった作用を持つことを

示しており、受精における Ca^{2+} の働きを調べる上で、配偶子の会合から融合までの段階と、表層胞の崩壊に代表される卵の付活とは、切り離して考える必要があることを暗示している。

既交尾のニジカジカの卵巣から取り出した卵を電顕で観察した結果では、受精に関わる精子は卵門管の先端部に達しており、卵原形質膜に緩く接着した状態にあった。このような配偶子会合を完了した卵は卵巣腔液または AOF に浸漬したままでは全く変化を起こさない。これらの卵は海水または Ca^{2+} 濃度を高くした AOF に移されることにより受精を起こした。配偶子会合を完了した卵を AOF 中でカルシウムイオン透過担体 (A23187) により処理した場合には受精は起きないことから、細胞内 Ca^{2+} の増加は受精には直接作用しないことが示唆された。ニジカジカの受精には、細胞外での Ca^{2+} による何らかの働きが必要であるものと思われる。Iwamatsu et al. (1985) はメダカ卵の受精には細胞外の Ca^{2+} が必要であるとし、この細胞外の Ca^{2+} が精子の卵原形質膜への接着から膜融合までの段階に関わっていることを示唆している。ニジカジカでもこれと同様なことが示唆された。このような受精反応開始時における細胞外の Ca^{2+} の働きは、ニジカジカに限らず硬骨魚類における受精反応開始の機構を明らかにする上で非常に興味深い問題である。

一方、魚卵の付活における Ca^{2+} の作用機序を調べる上で、未受精卵を A23187 で処理することにより付活を誘導する試みは、これまでに数多くなされておき (Gilkey et al., 1978; Holland, 1980; Picard and Doree, 1982; Iwamatsu et al., 1985)、卵の付活には細胞内 Ca^{2+} の増加が必要であることが示されている。Gilkey (1981) は Ca^{2+} の存在下で放光するエクオリンを用い、メダカ卵で付活中に遊離 Ca^{2+} が急増することを見出し、これに基づいて微量の外部 Ca^{2+} が卵に働き卵内の Ca^{2+} の放出を引き起こして、さらには付活現象の引金を引く機構を明らかにした。Iwamatsu et al. (1985) はメダカの未受精卵が、細胞外液中の Ca^{2+} の有無に関わらず A23187 処理により付

活されることを示した。さらに彼等は、Ca, Mg-free の等張液中で媒精した卵を Ca チャンネル阻害剤であるベラパミルで処理しても表層胞の崩壊を完全に阻害できないことを示し、細胞外からの Ca^{2+} の流入が卵の付活に直接関与していないことを示唆している。また、Iwamatsu (1989) はメダカ卵に種々の薬物を微量注射し、表層胞の崩壊が起こるまでの薬物間の時間差を測定して、精子受容体への精子の結合が一連の酵素反応を活性化させて細胞質 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出を惹起し、この局所的な細胞内 Ca^{2+} の増加が表層胞の崩壊に直接関わる Ca^{2+} 結合物質を活性化させると共に次の酵素反応系を活性化させることを示した。ニジカジカでは、配偶子の会合を起こしていない卵を A23187 を含む AOF または Ca, Mg-free AOF 中に浸漬すると付活が起きることが示された。また、未受精卵をベラパミルで処理した後、ベラパミルを含んだ海水に移しても付活は全く阻害されないことが示された。これらの結果から、ニジカジカの卵でも A23187 処理によって局所的な細胞内 Ca^{2+} の増加が起き、Ca 刺激性の Ca 放出によって表層胞の崩壊が伝播するという、メダカと同様な機構 (Gilkey, 1981) が働いていることが十分に考えられ、さらにベラパミルによる付活の阻害が見られなかったことから、 Ca^{2+} の細胞外からの流入は直接付活に働いてはいないことが示唆された。

哺乳類および棘皮動物のウニなどでは特に受精に関する多くの研究がなされている。Wassarman (1987) はマウス卵の受精過程を 1) 精子と卵の接着、2) 精子と卵の結合、3) 精子の先体反応、4) 精子の卵膜への陥入、5) 精子と卵の膜融合、および 6) 卵の表層反応という 6 つの段階に分けている。この受精過程を、本研究で観察したニジカジカ卵の受精反応の初期過程と比較して考えると、魚類の受精反応の経路は 1) 精子と卵の接着、2) 精子と卵の結合、3) 精子の卵原形質膜への陥入および膜融合、4) 卵の表層反応の 4 つの段階が考えられる。ニジカジカでは精子と卵の接着は卵巣内で完了しており、これは本研究で『配偶子会合』として位置付けている段階である。走査電子顕微鏡

による観察から、この接着は比較的緩いものであることが分った。魚類の卵の受精においては、先体を持たない精子は卵膜に開口した卵門から比較的容易に卵原形質表面に達することができ、この点が哺乳類や棘皮動物の受精と大きく異なる。魚類では異種間の受精を妨げるための機構に関してはまだよく知られていないが、哺乳類やウニなどでみられるような精子が卵原形質膜表面に至るまでのいくつかの種特異的な反応段階は、魚類では欠けている。従って、精子と卵の種特異的な反応段階が魚類にも存在するとすれば、それは精子膜と卵原形質膜との結合の段階にあると思われる。卵巢内で配偶子会合を完了したニジカジカの卵では、精子と卵の結合以降の段階は卵が海水中に産卵されることにより始まる。従って、細胞外の Ca^{2+} は精子と卵の結合以降の段階に働いていることが考えられる。

本研究から、体内配偶子会合型の種では、配偶子会合を完了した卵と精子は、卵巢腔液の Ca^{2+} 濃度が受精に必要な値に達していないために、卵巢内では受精反応を起こさないことが示された。ニジカジカおよびイソバテングの卵が等張液中で受精可能となる生理的な特性は、Yamamoto (1961) のいう *Oryzias* type などの真卵生魚の卵と基本的に異なるところはない。しかし、精子の浸透圧に対する運動活性の特性には、一般的な卵生魚の精子と異なり、体内配偶子会合型への特化の過程がうかがえる。また、本研究の結果から、体内配偶子会合型の繁殖様式を成立させる上で卵巢腔液、特に Ca^{2+} が果す役割が極めて大きいことが明らかとなった。カジカ科魚類の卵巢腔液の Ca^{2+} 濃度が体内配偶子会合型への特化の過程で低下してきた可能性を探ることは生態学的にも興味深い点である。

細胞間接着因子としての Ca^{2+} の働きに関して、Pagano and Takeichi (1977) はチャイニーズハムスターに由来する腫瘍性の繊維芽細胞の接着に Ca^{2+} 依存性の機構が存在することを示している。この Ca^{2+} 依存機構は極く微量のトリプシンで失活するが、接着基が Ca^{2+} と反応すると何らかの構造変

化を引き起こしトリプシン抵抗性となるという。また、ウニの卵膜表面の精子受容体蛋白は、糖残基の特異的配列を認識して結合することから、レクチンの一種であることが明らかにされている (Glabe et al., 1982)。レクチンと特異糖との結合、およびレクチンの持つ凝集作用の活性化には Ca^{2+} や Mn^{2+} などの金属イオンが必要であるため (Sharon and Lis, 1972)、細胞外の Ca^{2+} はレクチン様の精子受容体の活性化に働いていることも十分考えられる。魚類の受精における精子と卵の種特異的認識がレクチン様物質によって仲介されているのか否かは魚類の卵の精子受容体、および精子表面の卵結合蛋白の分離と、それらの生理的性質に関する今後の解明により明らかにされよう。

V ニジカジカの受精に関わる卵および精子表面の糖鎖

1. 材料と方法

1) 実験魚

本研究には、ニジカジカを用いた。実験魚は第II章に述べたように採集、飼育されたものを用いた。魚から卵および精子を搾出し、以下の実験に供した。

2) レクチンによる受精阻害実験

実験には Con A、WGA、RCA₆₀、および LFA の 4 種のレクチンを用いた。各レクチンは予め濃度が 1 mg/ml となるように、AOF で溶解し、適宜希釈して用いた。

シャーレに 10 ml のレクチン溶液を入れ、未交尾魚から搾出した卵を約 100 粒添加した後よく攪拌し、さらに精液を 20 μ l 加え、約 5 分間静置した。次にレクチン溶液を捨て、卵を海水で 2 回洗浄した後、最終的に海水に浸漬し 10°C で約 20 時間静置した。その後、実体顕微鏡下で受精、未受精の識別を行なった。受精は卵割を指標とした。

既交尾魚から搾出した卵については、10 ml のレクチン溶液に約 5 分間浸漬した後、海水で 2 回洗浄し、海水に浸漬した状態で 10°C、20 時間静置し、上記と同様に受精、未受精を識別した。

3) レクチンによる精子の凝集反応

搾出された精液をレクチン液で希釈し、顕微鏡下で精子の運動と凝集の有無を確認した。

4) 組織学的観察

実験に先立ち、ペルオキシダーゼで標識された Con A (p-Con A) および WGA (p-WGA) を濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ となるように AOF に溶解した。精子、および未交尾魚から搾出した卵を p-Con A および p-WGA 溶液に約 30 分間浸漬した後、AOF で数回洗浄した。次に試料を 0.2 M カコジレート緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 4%パラフォルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド混合液で 5 時間固定した後、 4°C に冷やした 0.1 M PBS (pH 7.4) で洗浄した。その後 DAB による酸化重合反応を行ない、さらに 0.1 M PBS で洗浄した後、氷冷した 0.1 M PBS (pH 7.4) に溶解した 1%オスミック酸で 2 時間後固定して、DAB による酸化重合物の電子密度を高め、電顕での観察を可能な状態にした。試料を常法によりエポン樹脂に包埋し、超薄切片を作成し、染色を施さずに観察に供した。

2. 結果

1) レクチンによる受精の阻害

a. 未交尾魚卵

未交尾魚から搾出した卵を $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度のレクチンで処理したときの受精率を図 93 に示した。用いた 4 種のレクチンのうち、Con A、および WGA が対照群と比較して低い受精率を示した。特に WGA では受精率はわずか 2%であって、受精はほぼ完全に阻害された。RCA₆₀ および LFA では受精率は対照群とほとんど変らなかった。このことから Con A および WGA はニジカジカの受精に対して阻害効果を持つことが示された。

次に、受精阻害に効果の見られた Con A および WGA について、様々な濃度条件での受精率を調べた。

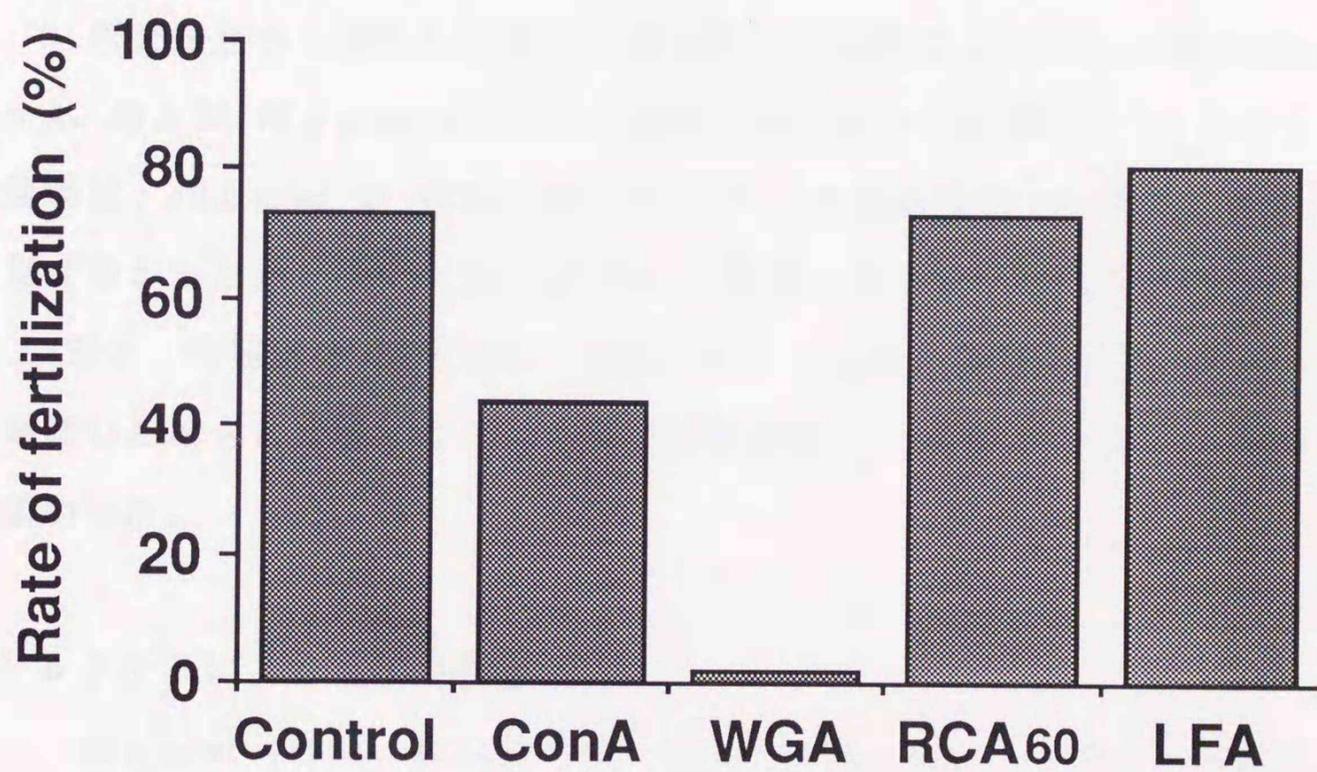


図 93. 配偶子会合前のニジカジカ卵における種々のレクチン処理による受精率の変化.

図 94 に Con A の濃度と受精率の関係を示した。Con A の濃度が 0.01 ~ 1 $\mu\text{g/ml}$ の時には受精率の低下は認められなかったが、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上で受精率の低下が認められ、100 $\mu\text{g/ml}$ では 4% にまで低下した。

WGA の濃度と受精率の関係を図 95 に示した。WGA の濃度が 0.01 ~ 0.1 $\mu\text{g/ml}$ では受精率は低下を見せなかったが、1 $\mu\text{g/ml}$ では約 10% にまで低下し、10 $\mu\text{g/ml}$ では 1% に満たなかった。

b. 既交尾魚卵

既交尾魚から搾出した卵を、受精阻害に効果の見られた 100 $\mu\text{g/ml}$ の Con A、および 10 $\mu\text{g/ml}$ の WGA で処理したときの受精率を図 96 に示した。受精率は、10 $\mu\text{g/ml}$ の RCA₆₀ および LFA による処理では対照群との間に差を見せなかったが、Con A および WGA で処理したものではそれぞれ 48% および 67% と、対照群の 87% に比べ低かった。しかし、未交尾魚から搾出した卵を処理した場合と比較すると、受精の阻害効果は Con A および WGA 処理ともに低かった。

2) レクチンによる精子の凝集

10 $\mu\text{g/ml}$ の WGA、RCA₆₀、LFA、および 100 $\mu\text{g/ml}$ の Con A 溶液による精子の凝集の有無を観察した結果を表 8 に示した。用いた 4 種のレクチンのうち WGA だけが精子を強く凝集させた。また、その際精子は運動を行っていないことが確認された。他の 3 種のレクチン液中では精子は凝集せず、運動も正常であった。

3) 卵および精子のレクチン結合部位の電顕的検索

a. 卵のレクチン結合部位

図 97 に p-Con A で処理された卵の卵門付近の電顕像を示した。

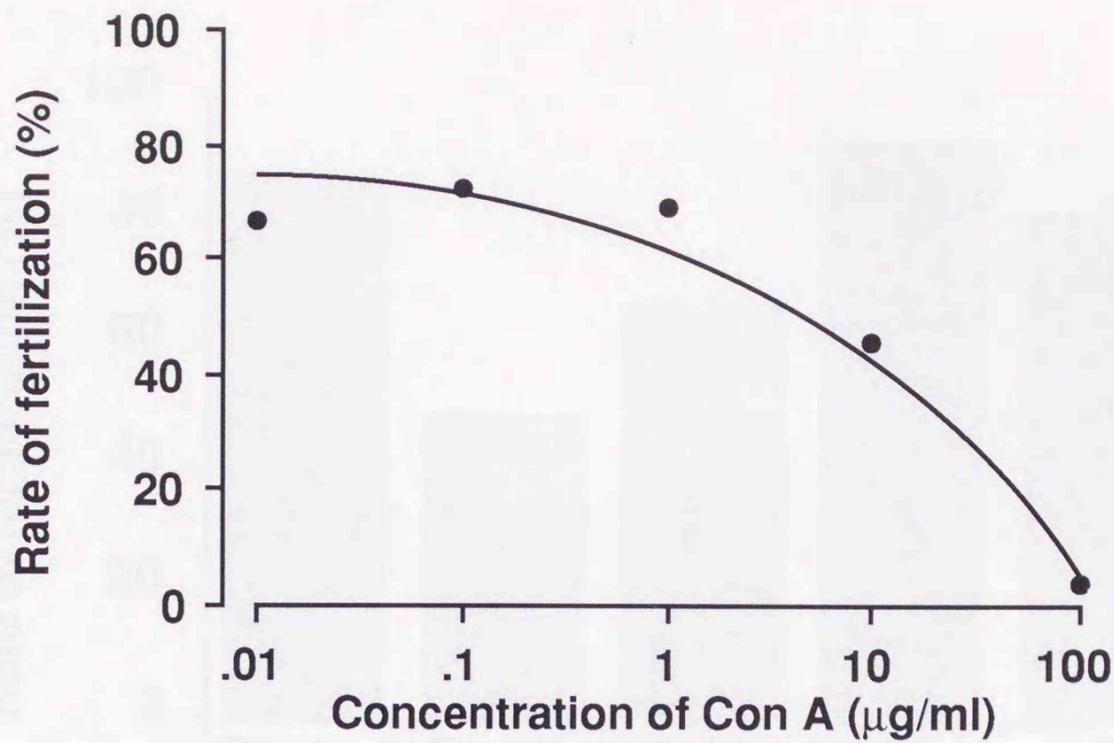


図 94. ニジカジカ卵における Con A 処理濃度と受精率の関係.

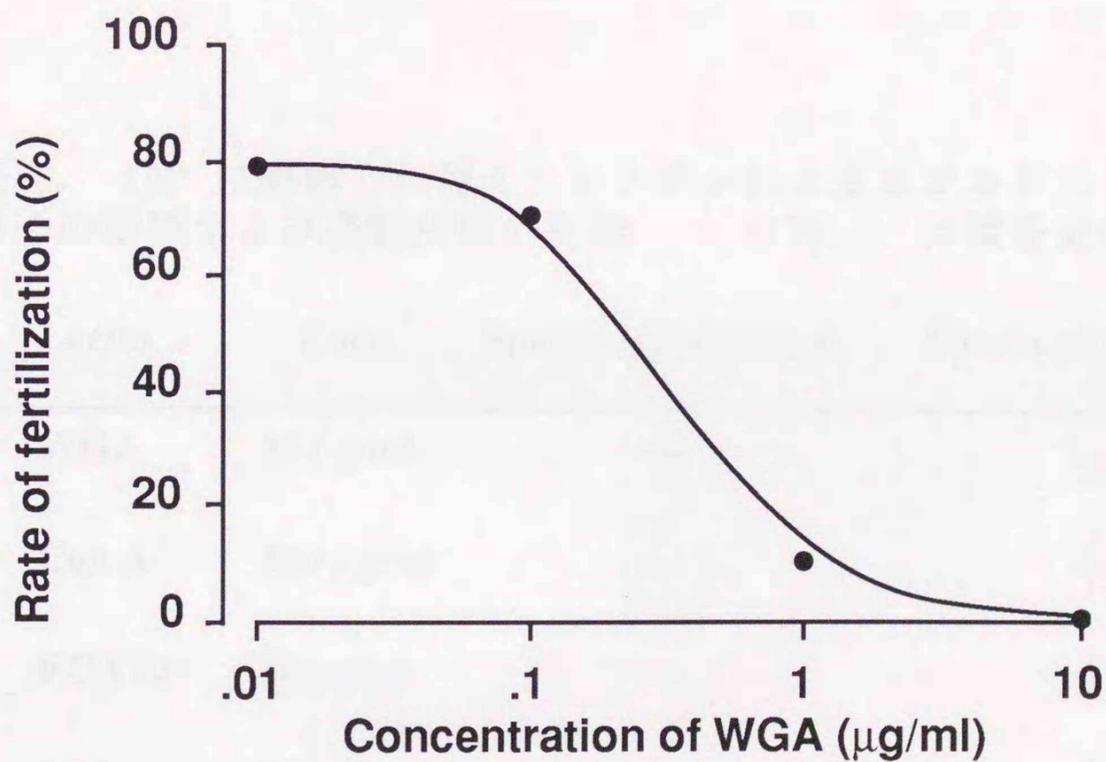


図 95. ニジカジカ卵における WGA 処理濃度と受精率の関係.

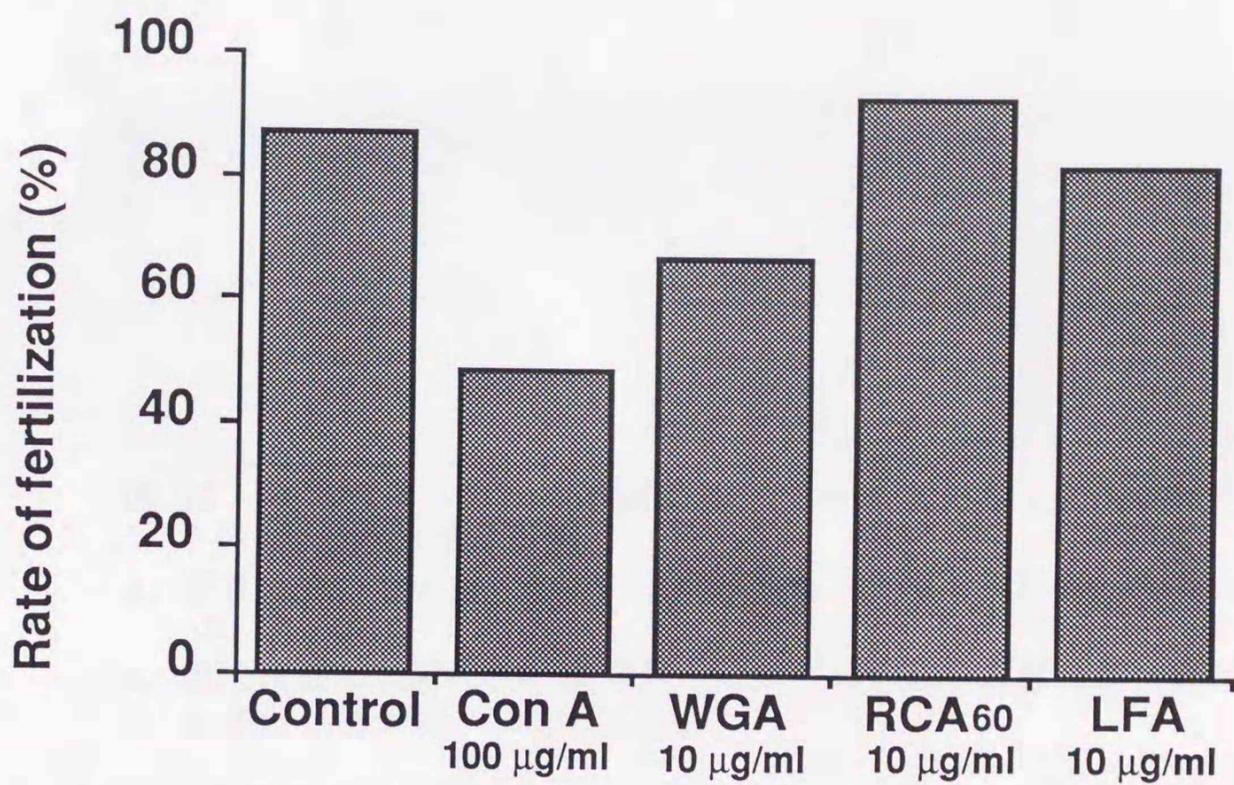


図 96. 配偶子会合完了後のニジカジカ卵における種々のレクチン処理による受精率の変化.

表 8. AOF に溶解した種々のレクチンによるニジカジカ精子の凝集および運動活性の有無. + は有, - は無を表す.

Lectin	Conc.	Sperm agglutination	Sperm motility
WGA	10 µg/ml	+	-
Con A	100 µg/ml	-	+
RCA 60	10 µg/ml	-	+
LFA	10 µg/ml	-	+

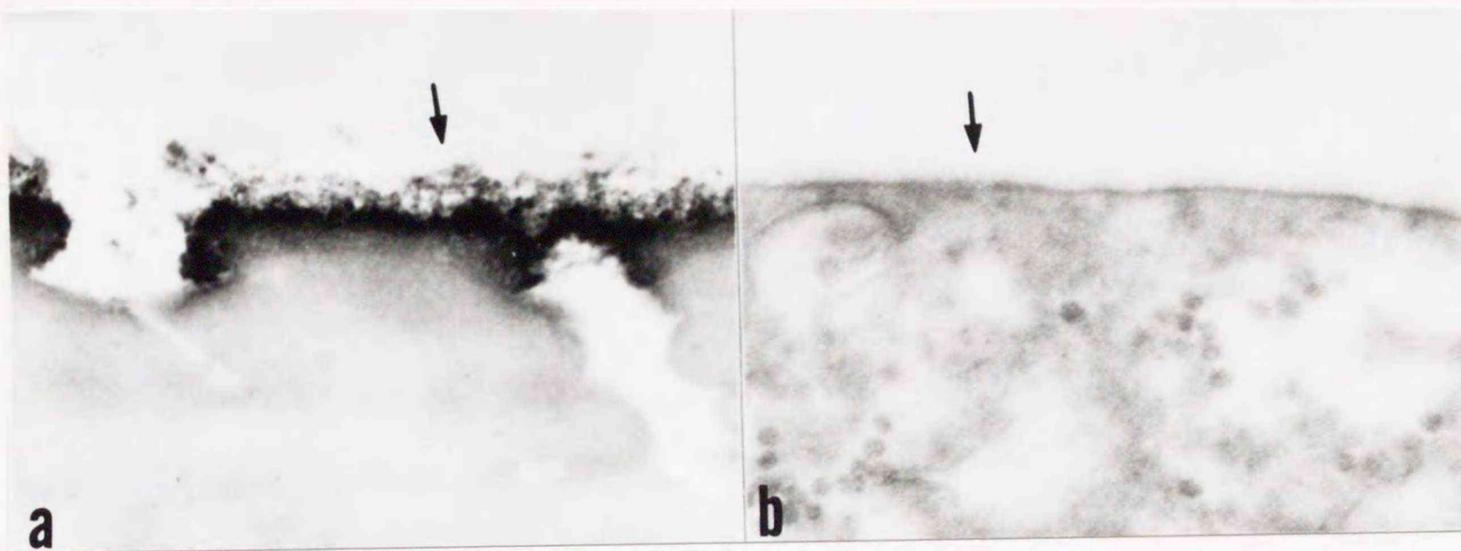


図 97. パルオキシダーゼ標識された Con A で処理した卵の卵門
 付近の透過電顕像。
 a. 卵膜表面の電顕像. Con A は卵膜表面 (矢印) に結合している.
 × 27,000
 b. 卵門付近の卵原形質の電顕像. Con A は卵原形質膜表面 (矢印)
 に結合している. × 80,000

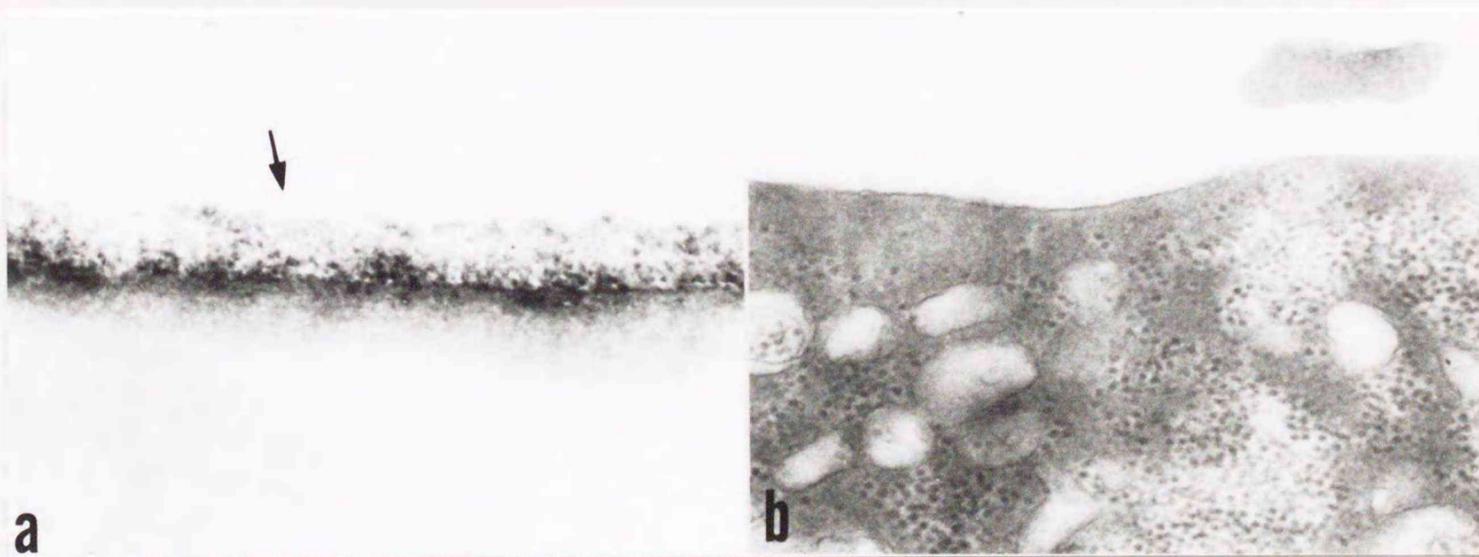


図 98. パルオキシダーゼ標識された WGA で処理した卵の卵門
 付近の透過電顕像。
 a. 卵膜表面の電顕像. WGA は卵膜表面 (矢印) に結合している.
 × 40,000
 b. 卵門付近の卵原形質の電顕像. 卵原形質膜表面には WGA の結合
 は見られない. × 40,000

p-Con Aの結合による沈殿物は主に卵膜の表面に見られた。この部位をさらに拡大して観察すると、卵膜の最外層のさらに外側に見られる微細な繊維状の構造を取る層に p-Con A による沈殿物が沈着していた (図 97-a)。また、卵門付近の卵原形質膜上にも p-Con A の結合による沈殿物が認められた (図 97-b)。

p-WGA 処理による沈殿物もまた、p-Con A と同様に主に卵膜の最外層の外側にある微細な繊維状の層に沈着していた (図 98-a)。しかし、卵原形質膜表面には p-WGA の結合は認められなかった (図 98-b)。

b. 精子のレクチン結合部位

図 99 に p-Con A、および p-WGA で処理された精子の電顕像を示した。精子表面には p-Con A の結合は認められなかった (図 99-a)。しかし、p-WGA で処理された精子では頭部表面に電子密度の高い沈殿が認められ (図 99-b)、p-WGA が精子表面に結合することが示された。

3. 考察

無脊椎動物および脊椎動物の多くの動物種で、受精において重要な働きを持つ蛋白性の物質が配偶子表面に存在することが確かめられている。棘皮動物では、卵表面を覆うゼリー層中に精子の先体反応を誘起する物質が存在し (遠藤, 1971; 星ら, 1987; Suzuki, 1990)、卵膜表面および卵原形質表面には先体反応を起こした精子の先体内膜と結合する精子受容体が存在することが知られている (Glabe and Vacquier, 1977; Rossignol et al., 1984; Bravo and Lennarz, 1986)。また、哺乳類においても、卵表面を覆う透明層に精子と特異的に結合する精子受容体蛋白が存在する (Shur and Hall, 1982; Bleil

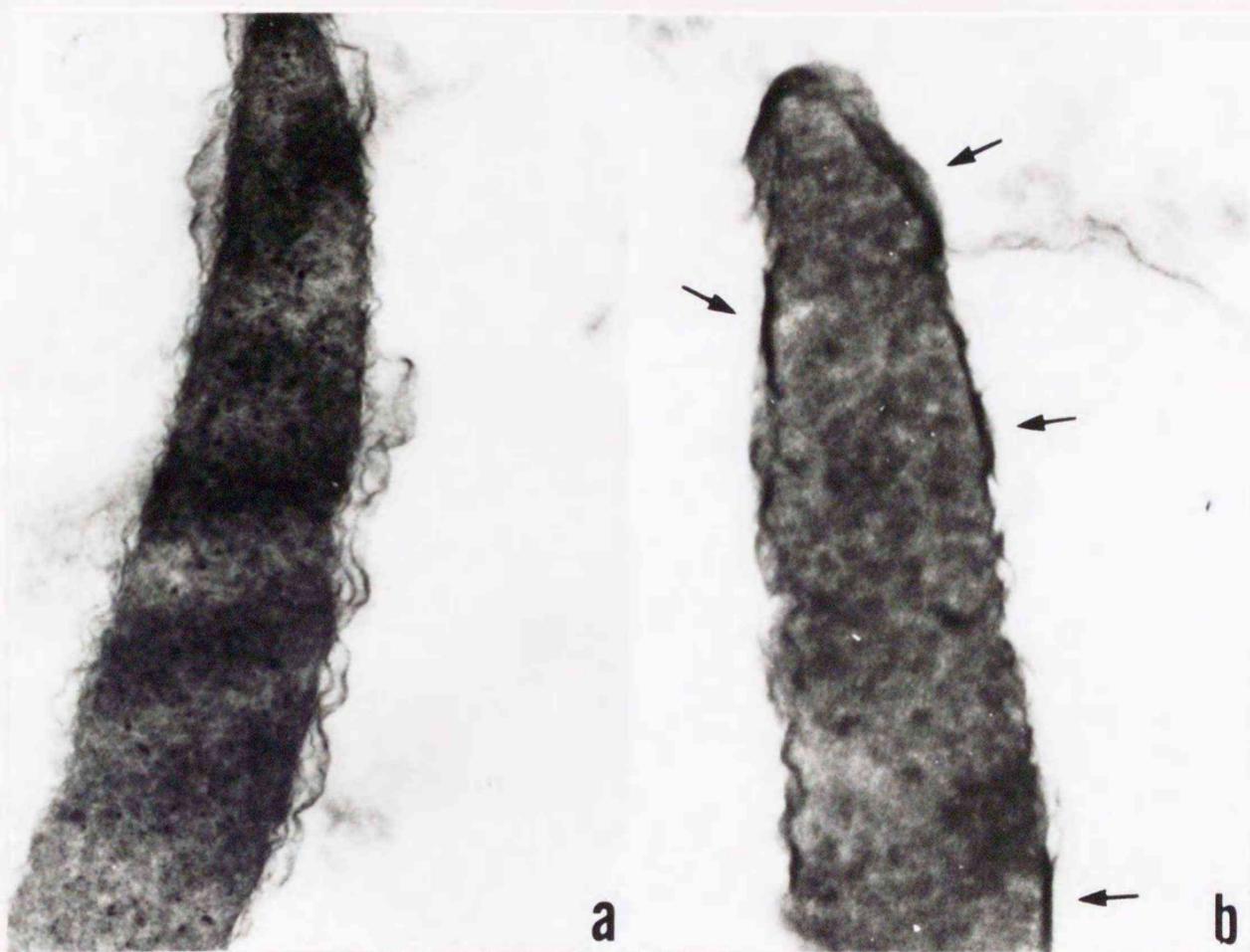


図 99. ペルオキシダーゼで標識されたレクチンで処理した精子の透過電顕像.

a. p-Con A 処理精子の電顕像. 精子表面には Con A の結合は認められない. $\times 67,000$

b. p-WGA 処理精子の電顕像. 精子膜表面に WGA の結合 (矢印) が認められる. $\times 80,000$

and Wassarman, 1980)。一方、精子の側にも卵表面の精子受容体と特異的に結合する物質として、ウニではバインディンと呼ばれる分子量 30,500 の糖蛋白質が (Vacquier and Moy, 1977)、また哺乳類でもウニ精子のバインディンに相当する物質の候補としていくつかの異なる種類の蛋白質が報告されている (Wassarman, 1987)。これらの配偶子間の相互認識を行なう蛋白質の多くは糖蛋白質であり、特に特異的な認識を行なう部位として糖鎖が重要な働きを持つことが報告されている (Florman et al., 1984; Shalgi et al., 1986; Boldt et al., 1989)。

魚類の卵と精子の相互作用に関しては、卵が精子を活性化する物質を持つことがニシン (柳町, 1957b; Ohtake et al., 1990) や数種のコイ科魚 (Suzuki, 1958) などで知られている程度であり、精子と卵の相互認識に関する報告はほとんどない。本研究では、体内配偶子会合型の種の卵が AOF 中で比較的長時間受精能を失わず、さらに媒精しても海水に移すまでは受精反応が起きないなど、受精以前での様々な薬品処理に適しているという利点を持つことから、ニジカジカの卵を用いて魚類の配偶子の相互認識、特に精子受容体の有無を明らかにすることを目的として、種々の実験と観察を行なった。

まず、魚類の配偶子膜表面にも他の動物種のそれと同様な相互認識を行なう糖蛋白質性の物質が存在するという仮定の下で、ニジカジカの卵および精子を種々のレクチンで処理した結果、Con A および WGA による処理が受精率を著しく低下させることが確かめられ、Con A および WGA が精子および卵表面のいずれかに結合することにより受精を阻害することが示唆された。

レクチンの結合により受精が阻害される原因としては、卵または精子表面の配偶子認識部位へのレクチンの結合、およびレクチンによる精子の凝集の双方が考えられる。本研究では、用いた 4 種のレクチンのうち WGA のみがニジカジカ精子に対し強い凝集活性を有していること、およびこの WGA が精子膜表面に結合することが明らかにされた。このことから、WGA 処理による受精

率の低下の原因は精子の凝集による運動性の障害にあるものと考えられた。また、配偶子会合を完了した卵を WGA で処理した場合に受精の障害効果が著しく低下したことも、WGA 処理による受精の障害が精子の凝集によることを裏付けていた。WGA は N-アセチル-β-D-グリコサミンおよびシアル酸と特異的に結合するレクチンであるので、精子膜表面にはこれらの糖鎖の双方、またはいずれかが存在することが示された。サクラマスおよびティラピアでは、精子膜にいくつかの糖脂質が含まれていることが知られている (Lou et al., 1990; Lou, 1990)。また、Lou (1990) はティラピアの精子膜に糖蛋白が含まれていることを示唆している。これらの報告は、ニジカジカの精子膜表面に糖鎖の存在が示唆されたことと一致する。

一方、Con A によっては精子の凝集活性が全く認められず、また、電顕による観察から Con A は卵にのみ結合することが示された。このことから、配偶子を Con A で処理した際に見られた受精率の低下は、Con A の卵表面への結合に起因しているものとみなされた。受精の際の卵原形質膜と精子との相互作用については、これまでに十分な知見は得られていない。ウニでは卵膜に加えて卵原形質膜にも Con A に対する結合部位が存在し、卵膜除去卵ではこの Con A の存在により受精が障害されるという報告があり (Veron and Shapiro, 1977)、卵原形質膜と精子の相互作用の存在が示唆されている。魚類ではコイの卵原形質膜表面に Con A 結合部位が存在するという報告はある (Kudo, 1982c) が、その働きについてはほとんど調べられていない。本研究により、ニジカジカの卵原形質膜表面に Con A が結合することにより受精が障害されることが硬骨魚類で初めて示された。このことは、ニジカジカの卵原形質膜表面に存在する Con A 結合部位が、受精の際に重要な働きを持つことを示唆している。魚類の精子受容体が卵原形質膜表面に存在するとすれば、ニジカジカの卵原形質膜にある Con A 結合性の糖蛋白質が精子受容体としての働きを持つことは十分考えられる。

配偶子会合を完了した卵を Con A で処理した場合にも、配偶子会合前に処理した場合ほど顕著ではなかったが、受精の阻害効果が認められた。このことは、卵巣内で配偶子会合を完了した卵においても、配偶子の相互認識はまだ十分にはなされていないことを示唆している。配偶子会合を完了した卵を海水、または Ca^{2+} を多く含んだ等張液に移すと受精反応が始まることから、卵巣内では低濃度の Ca^{2+} により卵と精子の相互認識の段階が阻害されていることが考えられた。

ニジカジカでは、卵膜表面にも Con A および WGA に対する結合部位が存在した。卵膜に卵門を持つもの以外の多くの動物種では、先体反応を起こした精子が最初に卵と結合する部位は卵膜の表面である。これらの動物種では、卵膜の表面に精子受容体が存在することが知られている（棘皮動物：Aketa, 1967; Glabe and Vacquier, 1977; 原索動物：Santis and Pinto, 1987; 哺乳類：Shur and Hall, 1982; Bleil and Wassarman, 1986）。硬骨魚類の受精の際には、精子は卵膜に開口している卵門に進入し卵原形質膜表面に直接結合出来るので、卵膜の表面に精子と結合する物質が存在する必然性は考えにくい。

数種の硬骨魚類では、卵膜を構成する成分の中に糖蛋白質が含まれていることが知られている（Iuchi and Yamagami, 1976; Begovac and Wallace, 1989）。ニジカジカで見られたレクチン結合部位は、卵膜を構成する糖蛋白質の糖鎖であったのかもしれない。特にレクチンの結合部位は卵膜の表層に極在していたので、卵膜の表層には糖蛋白成分が多量に存在しているのかもしれない。一方、粘着性の卵の卵膜表層に接着物質が存在することはニシン（狩野, 1949; Ohta, 1984）、ギンポ類（Russell, 1976）、クロガシラガレイ（山本, 1951）およびスジアイナメ（宗原, 1989）などで知られている。ニジカジカの卵は沈性の粘着卵であり（宗原・三島, 1986）、卵膜の表層には接着物質と目される微細な繊維状の構造が見られた。レクチンは主にこの層に結合していたことから、卵膜表層のレクチン結合部位は接着物質中に含まれる糖鎖である可

能性が高い。

ニジカジカを用いた今回の実験から、魚類の卵において初めて精子受容体の存在の可能性が示され、魚類においても他の動物種と同様に配偶子の相互認識機構が存在することが示唆された。魚類の卵で精子受容体の分離、精製、存在部位の検証などを行うためには、今後、卵膜および卵原形質膜に関してさらに詳細な生化学的分析を行なう必要がある。ニジカジカなどの体内配偶子会合型魚種の卵は、様々な試験結果を比較し易いことも含めて、これらの研究の材料として極めて有用であると思われる。

VI 総合論議

これまでに数種の硬骨魚類で、卵の受精反応を微細構造学的に解明する試みがなされてきているが、その多くは受精反応のいくつかの段階を断片的に観察した報告 (Kobayashi and Yamamoto, 1981; Ohta and Iwamatsu, 1983; Ohta, 1991; Brummett et al., 1985; Kudo and Sato, 1985; Wolenski and Hart, 1988a) か、または卵膜を除去した卵で人為的に多精受精を起こさせた結果についての報告 (Iwamatsu and Ohta, 1978; Ohta, 1985) であり、正常な受精反応における卵と精子の変化を経時的に捉えたものはない。これは、硬骨魚類の卵の多くが接水により短時間に受精能を失い、また魚種によっては等張液中でも受精反応もしくは精子の卵内への侵入を起こす (Yamamoto, 1961) ため、接水後の卵を経時的に固定しても、受精反応の各段階を必ずしも同調的には観察できないことに起因している。

本研究に用いた体内配偶子会合型のニジカヅカでは、交尾を行った個体から搾出した全ての卵で精子は卵門管の内端部まで侵入して卵原形質に頭部を接着させた状態で停止している。このような卵は海水に移行されると直ちに受精反応を開始することから、受精反応の初期過程を経時的に観察するには極めて適した材料である。本研究の結果、精子と卵の膜融合から精子の染色質の拡散に至る一連の微細構造的変化を、硬骨魚類の卵で初めて明らかにすることができた。これを模式的に示すと図 100 のようになる。

海水に移行する前の卵では、精子は卵門管内端部の卵原形質突起に頭部を接着させた状態にあり、膜融合は起こしていない (図 100-a)。このような状態の卵を海水に移行すると、5 秒後には精子が接着している部分の卵原形質は比較的平坦になり原形質突起が消失する (図 100-b)。このことは、卵を海水に移行した直後に、卵原形質表層に何等かの動きが生じることを示唆してい

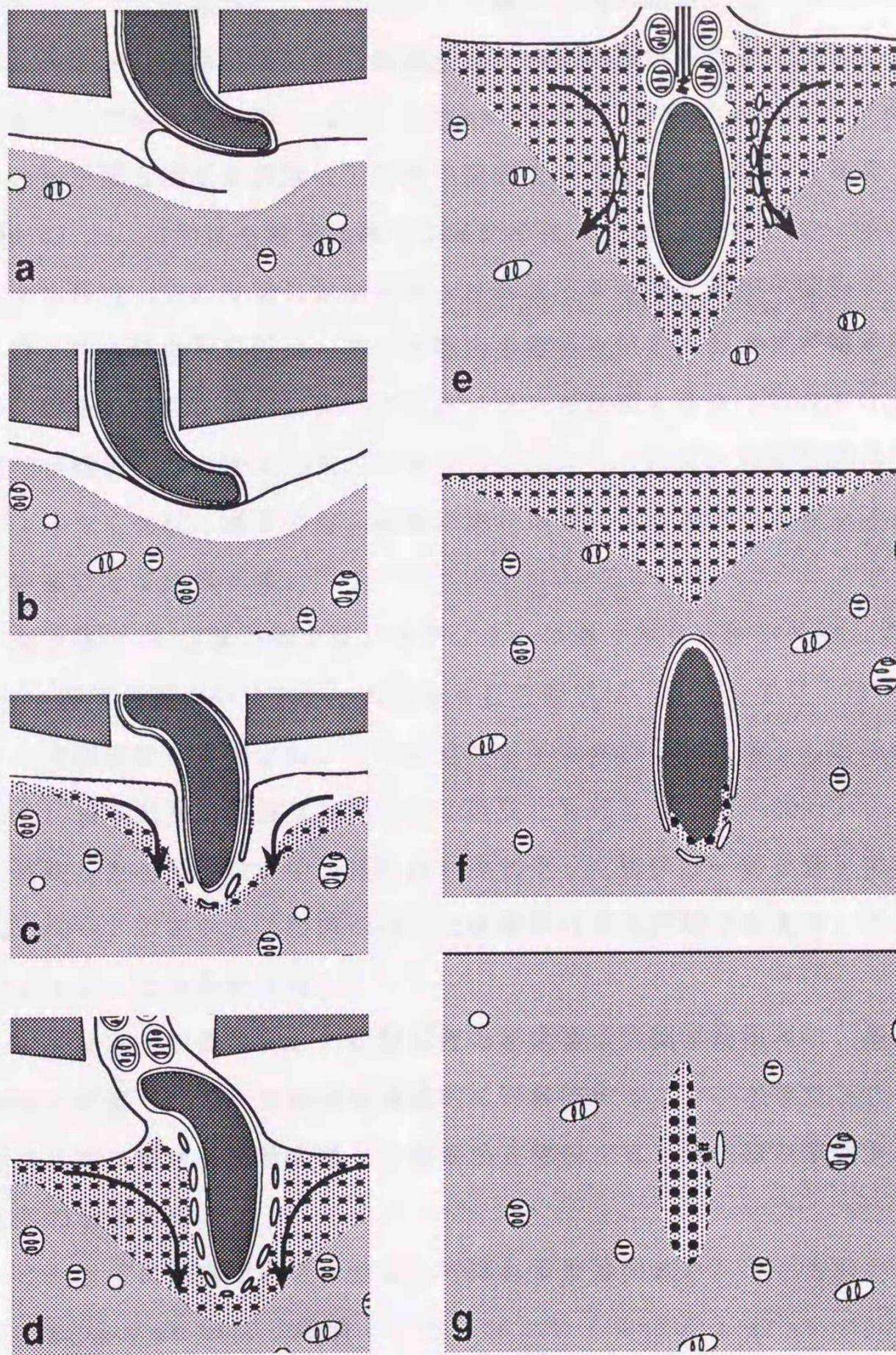


図 100. ニジカジカ卵における受精の初期過程の微細構造的変化の模式図.
 a: 海水移行前, b: 5秒後, c: 10~15秒後, d: 20~30秒後, e: 1~2分
 後, f: 3分後, g: 3分後.

る。海水移行 10 秒後では、受精に関わる精子は頭部のおよそ 1/2 を卵原形質中に陥入させ、頭部の先端付近の精子膜と卵原形質膜との間で胞状化を起こし、膜融合を開始する（図 100-c）。次いで海水移行 30 秒後までに、陥入した部分の精子膜と卵原形質膜は数箇所胞状化を起こして、膜融合を完了する（図 100-d）。この間にも精子は徐々に卵原形質へ陥入してゆく。

海水移行 1~2 分後には精子の中片部までが卵原形質中に陥入する。陥入中の精子周辺の卵原形質は、初め細胞内小器官をほとんど含まず電子密度も低い。精子の陥入の進行に伴ってリボゾームを集積するようになり、この特異な領域が精子頭部の侵入方向にデルタ状に拡大して行く。卵原形質に見られるこのような変化は、精子の陥入の際に卵原形質による精子の巻き込み運動が起きていることを暗示する。

海水移行 3 分後の卵では、精子はさらに深く卵原形質中に陥入する（図 100-e）。卵原形質中のリボゾームのみを含む領域は、陥入している精子の位置よりも表層側に取り残され、この時点で精子本体の陥入は終了したものとみなされる。精子頭部の核膜は先端付近で胞状化を起こし（図 100-f）、核膜が完全に消失したもので、中心体付近に胞状化した核膜の一部を残すのみとなる（図 100-g）ことから、核膜の胞状化は精子頭部の先端で始まり、中心体付近で終了することが示唆された。

以上のような受精反応の初期過程の超微構造的観察結果から、既往の研究で断片的に得られていた結果を連続的に再構築することができた。これは今後、硬骨魚類における受精を様々な側面から解明する上で重要な形態学的基盤となるものと思われる。

これまでに体内配偶子会合型と呼ばれる繁殖様式が、カジカ科のニジカジカ（Munehara et al., 1989）、イソバテング（Munehara et al., 1991）、ケムシカジカ *Hemitripterus villosus*（宗原, 1988a）、およびクダヤガラ科のクダヤガラ *Aulichthys japonicus*（沖山・赤川, 1990）などで知られてい

る。この繁殖様式の特徴として、交尾により卵巣内へ送り込まれた精子は、排卵された卵の卵門管内に進入はするが、受精反応は産卵環境である海水中に排卵されるまでは開始されないこと、また、精子が卵巣内で比較的長期にわたって受精能を維持し続けることが挙げられる。本研究では、体内配偶子会合型に見られるこのような特異な現象を組織学的に確認するとともに、その成立要因を雌雄配偶子、配偶子会合環境である卵巣腔液、および卵巣構造の生理的特性から明らかにした。

ニジカジカの雌雄配偶子と卵巣内液環境の持つ生理的特性に基づいて、体内配偶子会合の成り立ちをまとめると、図 101 のようになる。交尾により卵巣内に送り込まれた精子は、浸透圧、 Na^+ 、および pH によって保証された液環境である卵巣腔液中で運動を行なう。交尾を行ったニジカジカの雌の卵巣内には多くの精子が認められ、搾出された卵の卵門管内には多くの精子が進入している。これらの卵では卵門付近の卵原形質中に第 2 減数分裂中期の状態の染色体が認められ、さらにその直上部に第 1 極体を持つ。精子は卵門管内端部の卵原形質に見られる突起に頭部を接着させているが、卵との膜融合は起こしていない。この受精反応は、卵巣腔液中の Ca^{2+} 濃度が受精に必要な値に達していないため、起こり得ない。受精は卵巣内で配偶子会合を完了した卵が海水中に産卵されることにより開始される。

体内配偶子会合型のニジカジカとイソバテングの卵巣腔液は、浸透圧が体液とほぼ等張かやや低張であり、主な陽イオンのうち Na^+ が大部分を占める。また、ニジカジカの卵巣腔液の pH は約 7.7 で、ややアルカリ側に偏している。これらの浸透圧、および陽イオン濃度に関しては、本研究で用いた真卵生種のスジアイナメをはじめ、既往の報告にあるサケ科魚類（松原, 1988）、キュウリウオ、ワカサギ、およびウグイの生殖腔液（松原, 1982）でも同様の特徴が認められ、硬骨魚類の生殖腔液の性状として極く一般的なものであると言える。また、pH に関してもサケおよびサクラマスではアルカリ側に偏った

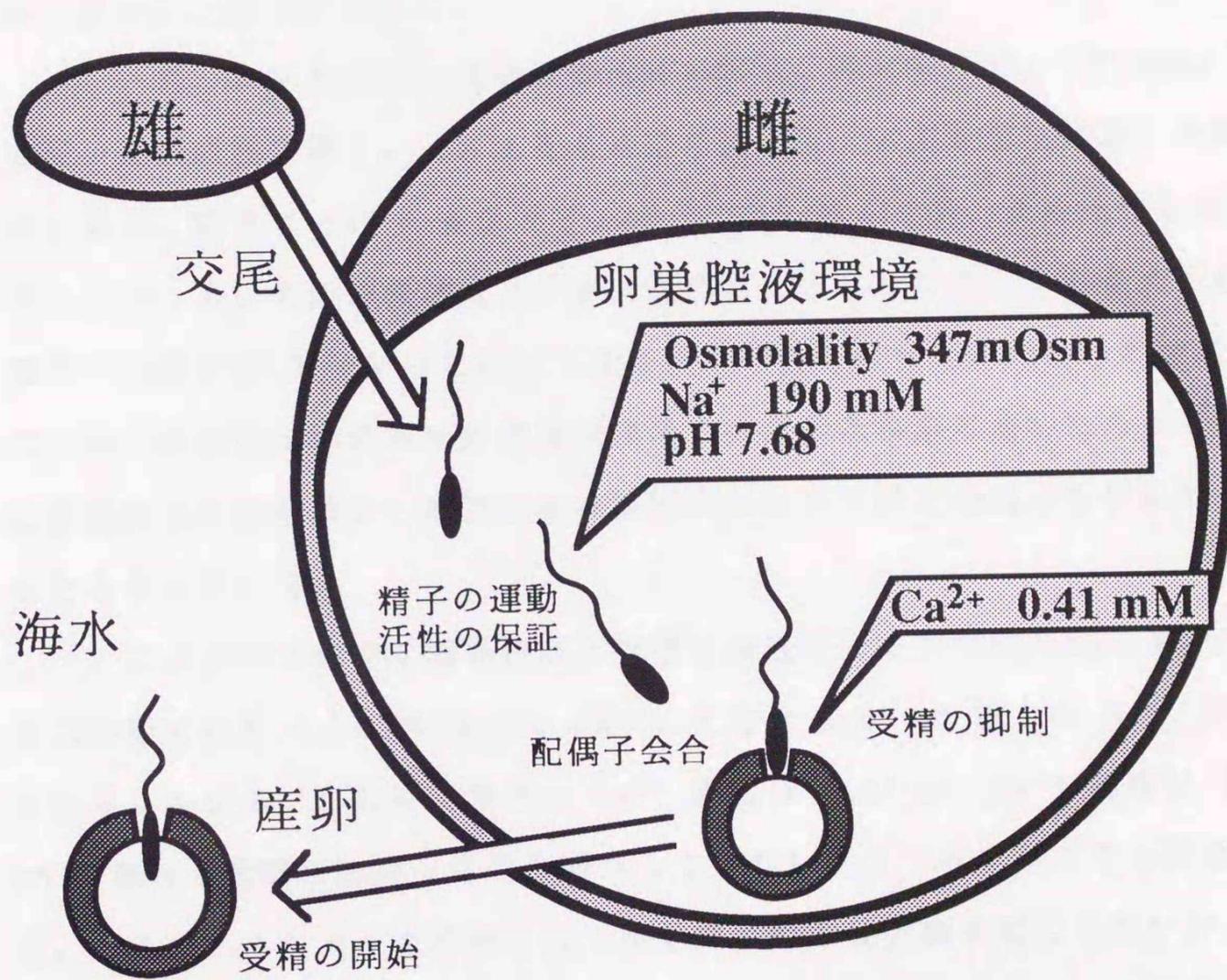


図 101. 体内配偶子会合型のニジカジカの繁殖様式の生理的成り立ちを表わした模式図.

値を示しており（松原，1988）生殖腔液として特異なものではない。しかし、 Ca^{2+} 濃度はニジカジカで 0.41 mM、イソバテングで 0.31 mM と、スジアイナメ（1.60 mM）や他の卵生魚（1.1~5.4 mM；松原，1982，1988）に比べても極めて低いことが注目された。

一方、ニジカジカの精子は浸透圧が体液と等張な 300~400 mOsm で最も高い運動活性を示し、それよりも高張な浸透圧では運動活性は著しく低下した。また、精子は Na^+ の存在下で、pH は 7.5 以上で高い運動活性を示した。さらにニジカジカの卵巢腔液とイオン組成および pH を等しくした人工卵巢腔液中では精子は 7~14 日と極めて長時間の運動を示した。これらの結果は、ニジカジカの精子の特性が卵巢腔液環境での運動に極めて適したものであることを裏付けると同時に、卵巢腔液が長期間にわたる精子の維持を保証していることを示している。

ニジカジカの卵は卵巢腔液と等張な浸透圧の下で受精を起こすが、それには少なくとも 0.57 mM 以上の Ca^{2+} 、または 2.63 mM 以上の Mg^{2+} が必要である。ニジカジカの卵巢腔液の Ca^{2+} 濃度は 0.41 mM、 Mg^{2+} 濃度は 1.52 mM であって受精に必要な条件を満たしていない。イソバテングでも同様である。さらに、ニジカジカの卵は人工卵巢腔液中では受精を起こさないが、人工卵巢腔液に Ca^{2+} を添加すると受精を起こす。このように体内配偶子会合型の種では、卵巢腔液中の 2 価陽イオンが受精に必要な値に達していないために、卵巢内での受精反応の開始を抑制されている。

交尾によって卵巢内に送り込まれた精子は、主に卵巢薄板の間隙などの卵巢腔内に浮遊した状態で貯留されている。これらの精子は産卵期間中、長いものでは約 1 か月ほど卵巢内に留まり、排卵されてくる卵とその都度会合する（宗原，私信）。精子は雌にとって異物であるにも拘らず、雌の免疫系によって排除されることなく、長期間受精能を保持し続けるためには、精子が免疫系から何らかの方法で隔絶されていることが必要である。ニジカジカの卵巢腔

は単層の卵巢薄板上皮細胞および卵巢壁上皮細胞によって取り囲まれている。トレーサーとしての HRP は、産卵期の卵巢では卵巢薄板上皮細胞および卵巢壁上皮細胞の間隙にまで進入できたが、上皮細胞の自由縁の近くにある閉鎖帯結合により卵巢腔への進入を妨げられた。このことは、産卵期の卵巢薄板上皮細胞および卵巢壁上皮細胞が血液卵巢腔関門としての機能を持ち、卵巢腔を体液環境とは隔絶された空間としていることを示している。卵巢腔内の精子は、少なくとも産卵期間中は雌の免疫系から隔絶された状態で、異物として認識されることなく貯留されているのであろう。

魚類の生殖様式は卵生と胎生に大別され、胎生は卵胎生という中間段階を経て、卵生から生じたものと考えられている (Matthews, 1955)。胎生現象は現存する硬骨魚類約 18,000 種のうち、14 科にまたがる 510 種に認められ、種数の上からはその多くがメダカ目とカサゴ目に集中している (Wourms, 1981)。カサゴ目は 20 科 250 属、約 1000 種が属する、真骨魚類中 4 番目に大きな目であり、単一系統と見られる 2 つの亜目、即ちカサゴ亜目とカジカ亜目からなる (Washington et al., 1984)。このうち、胎生種の多くはカサゴ亜目に属するフサカサゴ科に見られ、カジカ亜目ではこれまでに Comephorus 属の 2 種が知られているにすぎない (Washington et al., 1984)。このような繁殖様式の分化には、卵生の繁殖様式を取るカサゴ目魚類の祖先種から、カジカ亜目とカサゴ亜目という生息環境の異なる 2 群が分岐し、底性産卵型のカジカ亜目魚類は極く一部の種を除いて卵生を保つ一方、浮性産卵型のカサゴ亜目魚類の一部が繁殖戦略の上から胎生へと特化したという、生息および産卵環境の分化が関係していると考えられている (Wourms, 1991)。

一般に、カジカ類のほとんどは卵生の繁殖様式を取る。しかし、現存するカジカ類の中には、胎生への特化の過渡的な段階と見なされる交尾を行なう種がこれまでに 12 属 15 種で確認されており (宗原, 1988b)、さらに雄が

生殖突起を持つことから交尾型の可能性が考えられている種も多数存在する。本研究の結果、交尾を行なう体内配偶子会合型の種の中にも配偶子および卵巢腔液の生理的性質に差異が見られ、種によって特化の段階が異なる可能性が示唆された。これらの結果と、これまでに得られている生殖生物学および系統分類学的研究の結果を基に、カジカ類における真卵生から体内配偶子会合型、さらには胎生への進化の過程を以下に推察してみる。

後藤（1989）による、カジカ属魚類の祖先種の繁殖様式を以下の論議ではカジカ類の祖先種として参考にする。体内配偶子会合型への特化の前適応段階として交尾行動が挙げられる。これは、祖先種が既にペア産卵という比較的密接な産卵行動をとっていたとすると、そこからさらに密接な産卵行動である交尾へと適応してきたことは十分に考えられる。このように、繁殖行動の面での特化が起き卵巢内に精子が送り込まれるようになると、次には卵巢内の液環境と雌雄配偶子の生理的特性が繁殖様式の分化に重大な影響を与える。

卵巢内に送り込まれた精子が排卵されてきた卵との会合を起こすためには、卵巢腔液中で運動を行なう必要がある。カジカ類の祖先種が非交尾型の体外受精種であったと考えると（後藤，1989）、その精子の運動活性は海水と等張な条件下で高いものと思われる。しかし、今回比較対照として用いた真卵生種スジアイナメでも精子の運動活性は体液と等張な浸透圧条件で高いことが示された。また、太田ら（1984）は淡水産の真卵生種であるカンキョウカジカの精子が体液と等張な液中で運動を行なうことを示している。本研究に用いた4種の体内配偶子会合型カジカでは精子はいずれも卵巢腔液と等張な浸透圧条件下で高い運動活性を示した。これらの結果から、体液と等張な液中で高い運動活性を持つ精子の性質がカジカ類のみならずカサゴ目魚類に共通した性質であるとすれば、非交尾型体外受精種であるカジカ類の祖先種の精子もすでに同様の性質を持っていたと思われる。体内配偶子会合型への進化の第1段階である交尾行動の特化によって卵巢内に送り込まれた精子は、その生理的特性を変

化させることなく体内での配偶子会合を起こし得たのであろう。

ニジカジカの精子は体液と等張な浸透圧条件の下で高い運動活性を示し、体液よりも高張な浸透圧下では運動活性は極めて低い。この傾向はペロやアサヒアナハゼではさらに顕著であり、これらの種の精子は高張な浸透圧下では運動できない。ニジカジカでは産卵期の初回の産出卵は体外で配偶子会合を起こすことが知られており (Munehara, 1988)、体内配偶子会合型の中でも特化の段階が比較的低い種であると考えられる。これに対しアサヒアナハゼは体内でのみ配偶子会合を行なう種であることから (四宮, 1985)、特化の段階はニジカジカに比べ高いといえる。両魚種の精子の運動活性の特性はこのことをよく反映している。このように体内配偶子会合型では特化が進むに従って、精子の運動に適した浸透圧が体液と等張な範囲に狭まる傾向が認められる。また、精子の運動活性はニジカジカでは Na^+ に強く依存しており、同様の現象はペロにも認められる。しかし、アサヒアナハゼにはこのような現象は全く認められない。

以上の事実から、精子の運動活性の特性における特化の過程を類推すると、次のようになる。海産のカジカ科魚類の祖先種の精子は、スジアイナメに見られるように、体液から海水までの幅広い浸透圧条件下で運動活性を示し、この運動活性は主に浸透圧に依存していた。卵巢内に精子が送り込まれるようになると、精子は体液と等浸透圧の条件下での運動活性をそのまま維持し、高浸透圧下での運動活性は低くなる。また、この運動活性はなお特定のイオン濃度に強く依存している (ニジカジカ型)。次に、体外での配偶子会合を起こすことがなくなると、精子は浸透圧が体液と等張な条件下での運動活性のみを維持し、海水と等張な条件下での運動活性を失い、そのイオン濃度に対する依存性をやや弱める (ペロ型)。さらに、精子はイオン濃度に対する依存性を失い、体液と等張な浸透圧条件下でのみ運動活性を示し、それ以外の浸透圧下での運動活性を完全に失う (アサヒアナハゼ型)。

一方、イソバテングの精子は浸透圧が体液と等張な条件下で運動活性を示すが、最も高い運動活性は電解質溶液では体液よりも高張な 600 mOsm に、また非電解質溶液では 400~500 mOsm にあった。矢部 (1988) によるカジカ類の系統分類によると、イソバテングはニジカジカなどが属するカジカ科とは異なるカジカ上科のケムシカジカ科に属する種類である。ケムシカジカ科に属する種の体内配偶子会合現象についてはまだ多くの問題が残されているが、イソバテングの精子がニジカジカ、ベロ、およびアサヒアナハゼの精子とは異なった特性を持つことは、ケムシカジカ科のなかでイソバテングが体内配偶子会合型を独自に特化させてきたことを示唆しているのかもしれない。

卵巣内に精子が送り込まれ、精子が卵巣内で運動活性を持ち体内での配偶子会合が可能になれば、次には卵巣内で受精が起きるか否かが問題となる。体内配偶子会合型では卵巣腔液の Ca^{2+} 濃度が受精に必要な値に達していないため、受精は起きない。このような性質が卵巣内環境の特化によるものか、あるいはカジカ類の卵巣腔液に元来備わっていたものなのかは不明であるが、カジカ類には既知の体内受精種、すなわち胎生種が 2 種のみであることから考えて、カジカ類の卵巣腔液の Ca^{2+} 濃度は元来低かった可能性が高い。おそらくカジカ類にみられる胎生種は、その進化の過程で卵巣腔液中の Ca^{2+} 濃度を高めるか、あるいは卵の生理的特性を変化させるような形で特化を起こしたのであろう。

カジカ類の祖先種が一夫一妻であったのか一夫多妻であったのかは特定できないが (後藤, 1989)、交尾行動を行うようになると、卵巣内で精子間の競合が起きることは十分に考えられる。宗原ら (1991) は DNA フィンガープリント法により産出卵の父親判定を行うことにより、卵巣内での精子間競合の存在を明らかにした。また、雌の初回産卵時の交尾が雄にとって子孫を残すのに有利である可能性も示唆されている。従って、雄はできるだけ早く成熟し、産卵期の早い時期に雌と交尾をすることが代替戦略的に有利であるといえる。

このような雄の代替戦略が発展すると、産卵行動の前に交尾行動をとることが有利になるであろうし、さらに雌の成熟が起きる以前に雄が成熟し交尾を行うアサヒアナハゼ型の繁殖様式（四宮，1984）が特化したのかも知れない。

ニジカジカの卵巢の形態には真卵生種のそれとの違いは認められず、特化の特徴はうかがえない。しかし、精子の貯留に関しては体内配偶子会合型の種の間で違いがあるようである。即ち、ニジカジカの卵巢内には精子を捕捉するような特別な機構は認められなかったが、アサヒアナハゼ（四宮，1984）では卵巢腔上皮の陥入部分に精子が集中しており、これらの精子は上皮細胞に頭部を挿入していることが明らかにされている。産卵行動と交尾行動が連続しているニジカジカ（Munehara，1988）では、精子が卵巢内に貯留される期間は産卵期間内に限られる。しかし、交尾が産卵期の前に行なわれるアサヒアナハゼでは、精子は産卵期までの数か月間、卵巢内に貯留される（四宮，1984）。アサヒアナハゼでは、精子の卵巢内貯留期間の延長が卵巢組織に精子を積極的に保持する構造の特化を引き起こすに至ったと考えられる。逆にニジカジカでは卵巢内での精子貯留期間が短いことに加えて、産卵の都度交尾により精子が補充されるため、精子の捕捉機構を特化させる必要がなかったのかもしれない。

以上に述べたカジカ類における非交尾型卵生から体内配偶子会合型、さらには胎生への特化の過程の可能性を図 102 にまとめた。現存するカサゴ目魚類の繁殖様式は、卵生、体内配偶子会合型、さらには胎生と多様性に富んでいる。このような多様性は、繁殖行動および雌雄配偶子の生理的特性の多様性に基づいており、さらにその背景にはこれに働く巧妙な内分泌機構があると考えられている（高野，1988）。本研究では、フサカサゴ科に見られる卵生から胎生への特化系列（Wourms，1991）とは別に、カジカ上科での非交尾型卵生から交尾型の体内配偶子会合型に至る特化の道筋の一端について、主に生理学的側面からの試論を提示した。カジカ類に見られる体内配偶子会合型の繁殖様式は、卵生から胎生への過渡的あるいは中間的な繁殖様式であり、カサゴ目魚類

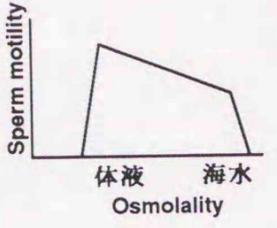
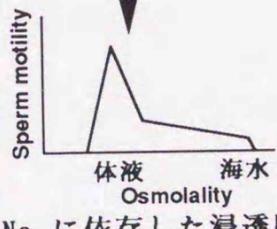
繁殖様式	種名	生理的特性				生態的特性
		精子の運動活性	卵の受精条件	卵巣腔液の性状	卵巣構造	繁殖行動
体内配偶子会合型	真卵生 海産祖先種		浸透圧: 体液~海水条件 Ca に依存	体液と等調. Ca 濃度が低い	一般の卵生種 と同様	ペア産卵 ↓ 産卵, 交尾 連続型 (産卵後交尾) ↓ ?
	ニジカジカ		↓	↓	↓	↓
	ベロ		↓	↓	↓	↓
	アサヒアナハゼ		↓	↓	↓	↓
	(?) 胎生 Comephorus		↓	↓	↓	↓

図 102. カジカ類における繁殖様式の進化に伴う生理的要因の特化の過程。
? 印は現時点では不明または推測の域を出ない事柄を示す。

に見られる繁殖様式の進化過程およびその原点を探る上でも極めて重要な情報を提供しているといえよう。

VII 要約

海産カジカ科魚類に見られる体内配偶子会合型の繁殖様式の生理的成立機構と受精機構を明らかにする目的で、ニジカジカ (*Alcichthys alcicornis*) を主とする数種について卵巢組織、卵巢内での配偶子会合、および海水中での受精の初期過程を微細構造的に観察すると共に、雌雄配偶子および卵巢腔液の生理的特性を調べ、以下の結果を得た。

1. ニジカジカの卵巢腔は結合組織を隔てる基底膜上に単層に配列する卵巢薄板上皮細胞および卵巢壁上皮細胞に覆われており、産卵期にはそれらの細胞が卵巢腔液の成分となる蛋白性の物質を活発に放出していることが確かめられた。この分泌物は、毛細血管から上皮細胞に取込まれた物質を原料に粗面小胞体で合成され、ゴルジ装置を経て分泌空胞内に蓄積され、開口分泌によって卵巢腔に放出されることが示唆された。上皮細胞にはアポクリン型分泌像も認められたが、その分泌物の合成経路は明確ではなかった。

2. 卵巢薄板および卵巢壁上皮細胞の分泌活性は産卵期の4月に最も高かった。退縮期の5~6月には分泌活性はやや減少し、回復期の7月には若干の開口分泌像をみせるのみであった。回復期の10~3月にかけては開口分泌活性はやや増加する傾向を示したが、アポクリン分泌は認められなかった。卵巢薄板および卵巢壁上皮細胞の形態は、これらの分泌活性の変化とよく一致した変化をみせた。回復期から産卵期にかけて細胞の高さが増し、回復期の後期から産卵期にかけては粗面小胞体が著しい発達を見せた。回復期に複雑な陥入を有していた核は、産卵期には比較的丸みを帯びるに至り、退縮期にはまた複雑に陥入した形態を呈していた。また、退縮期から回復期前期にかけて退行状態を示す上皮細胞が認められた。

3. 産卵期のニジカジカの卵巢は特別な精子貯留構造を持たず、精子は

卵巣腔液に浮遊した状態で貯留されていた。血管から卵巣腔への物質の透過性を西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) をトレーサとして調べた結果、産卵期の卵巣壁上皮細胞と卵巣薄板上皮細胞には閉鎖帯結合が存在し、血管から卵巣腔への HRP 侵入を阻止することが確認された。この閉鎖帯結合は、産卵期に卵巣内に貯留される精子を雌の免疫系から隔絶する血液卵巣腔関門として機能していると推定された。カジカ科と近縁なアイナメ科の卵生種スジアイナメにおいても産卵期に卵巣腔に面する上皮細胞に閉鎖帯結合が認められたことから、卵巣腔に面する上皮細胞の閉鎖帯結合は、魚類の卵巣における一般的な構造特性である可能性が示唆された。また、この閉鎖帯結合は、卵巣壁上皮細胞では周期的に認められたが、卵巣薄板上皮細胞では退縮期から回復期前期に至る期間には消失していた。退縮期には卵巣腔内に残留した精子は退行状態にあった。退縮期の卵巣腔には多くのマクロファージなどの免疫細胞が侵入しており、退行した精子を取り込み除去することが示唆された。

4. 卵巣内で配偶子会合を終えたニジカジカ卵では、受精にかかわる精子は卵門管の先端部に見られる卵原形質突起に頭部を接しているのみで、精子と卵の膜融合および精子の卵原形質膜への陥入は起きていなかった。また、動物極付近の卵表層には第 2 減数分裂中期の状態にある染色体が認められ、その直上部には第 1 極体が存在した。以上の観察結果から、卵巣内では配偶子の会合のみが起き、受精反応は抑制された状態にあることが確認された。

5. 配偶子会合を終えた卵を海水に移し、その後起こる受精の初期過程を経時的に観察した。海水移行 10 秒後には精子の頭部の約半分が卵原形質に陥入し、精子頭部の先端付近の精子膜と卵原形質膜は融合を開始していた。膜融合は海水移行 30 秒後までに完了し、精子は徐々に陥入を続けた。海水移行 3 分後には精子の中片部までが卵原形質中に陥入し、精子の核膜の胞状化と核染色質の分離が起き始め、すでに核膜が完全に消失したものでは核染色質が粒子状を呈していた。海水移行 5 分後には分裂途上の第 2 極体が認められ

た。精子の卵原形質中への陥入に先立ち、卵原形質突起が消失した。また、陥入した精子の頭部周辺の卵原形質は初め細胞内小器官を欠き電子密度の低い状態を呈していたが、その後リボゾームのみを含む領域が精子頭部の先端前方から卵表層にかけてデルタ状に広がった。さらに、精子膜と卵原形質膜の胞状化に由来するとみられる小胞状の膜構造が、しばしば精子頭部の側方に一列に並んでいた。これらの観察結果から、精子の卵原形質への陥入の際には、卵原形質が精子を巻き込むような運動を起こすことが示唆された。

6. 配偶子会合を終えたニジカジカ卵を海水に移すと、精子と卵の膜融合開始と同時に、それ以前には全く認められなかった表層胞の崩壊が起こった。また、配偶子の会合を起こしていない卵を海水に移した場合、卵の付活による表層胞の崩壊は 90 秒後に初めて認められた。このことから、受精による表層胞の崩壊は、付活によるそれとは異なり、精子による刺激に反応して開始されることが示唆された。

7. ニジカジカの卵巢腔液は pH 7.7 で、 Na^+ が主な陽イオンの大部分を占め、 Ca^{2+} が卵生種のスジアイナメのそれと比較して極めて少ないことが特徴的であった。また、他の体内配偶子会合型のイソバテングの卵巢腔液にも同様の特徴が認められた。ニジカジカの精子は、 Na^+ を主成分とし浸透圧が体液と等張で pH が 7.5 以上の条件下で高い運動活性を示した。また、イオン組成および pH が卵巢腔液のそれと等しい人工卵巢腔液中では、精子は 7~14 日間運動を続けた。このことからニジカジカの卵巢腔液は精子の運動を保証する無機組成条件を満たしていることが明らかとなった。また、卵巢内に送り込まれた精子が産卵期中を通じて卵巢腔内で運動を継続している可能性が示唆された。さらに、ニジカジカの精子は海水、または海水と等張な浸透圧条件下でも十分に運動活性を示すことが確かめられた。このような精子運動の特性から、ニジカジカが体内および体外の両環境で雌雄配偶子の会合を起こし得ることが裏付けられた。

8. ニジカジカおよびイソバテングの精漿の主な陽イオン組成は、血清のそれに比べて Na^+ が低く K^+ が高く、既知の硬骨魚類の精漿に見られる傾向と一致した。また、ニジカジカのほか体内配偶子会合型のイソバテング、ベロ、アサヒアナハゼ、および卵生のスジアイナメの精子は精漿中でも運動をみせた。このような特徴はカサゴ目魚類が共有するものである可能性が示された。

9. 配偶子会合を完了したニジカジカの卵を希釈海水、平衡塩類溶液 (b.s.s.)、および Ca-free b.s.s.に移すと、海水および b.s.s.では直ちに受精が起きたが、Ca-free b.s.s.では受精が起きなかった。また、ニジカジカ卵の受精には、少なくとも 0.57 mM 以上の Ca^{2+} または 2.63 mM 以上の Mg^{2+} を要することが明らかとなった。これらのことから、卵巢内で受精を抑制している要因は、卵巢腔液中の 2 価陽イオンの低濃度 (Ca^{2+} , 約 0.41 mM.; Mg^{2+} , 約 1.52 mM) にあることが示唆された。イソバテングでも同様の要因が受精を抑制することが示唆された。また、卵の受精における Ca^{2+} の必要性は卵生のスジアイナメでも認められた。このことから、体内配偶子会合型の種の卵の生理的特性は、卵生種のものとは変わらないことが示された。

10. 配偶子会合を終えたニジカジカ卵を人工卵巢腔液中でカルシウム透過担体で処理したところ、付活は誘導されたが、受精は起こらなかった。このことから、卵細胞外の Ca^{2+} 濃度が受精に必要な値に達していない場合には、卵内への Ca の透過が起きても付活が起こるのみで受精には至らないことが示された。

11. 配偶子会合前のニジカジカの卵をレクチンの一種である Con A で処理した後、媒精して海水に移したところ、受精が阻害された。この阻害効果は Con A の濃度に依存し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でほぼ完全に受精が阻害された。Con A は精子には結合せず精子の運動には影響を与えなかった。また、Con A は卵の卵膜表面および卵原形質膜表面に結合することが細胞化学的観察により示された。以上の結果から、卵原形質膜表面には Con A と特異的に結

合する糖鎖が存在し、この糖鎖に Con A が結合することにより受精が阻害されると推定された。卵原形質膜表面の Con A 結合糖鎖は、精子と卵との相互認識に働いている可能性が示唆された。配偶子会合を完了した卵でも Con A 処理により受精が阻害され、この段階でも精子と卵の相互認識が不完全であるとみられた。また、ニジカジカの卵の受精の際に、卵細胞外に必要とされる Ca^{2+} は、雌雄配偶子の相互認識の段階に働いている可能性が示唆された。

12. 体内配偶子会合型のカジカ科魚類は、カジカ類の祖先種が持っていたと考えられる卵巢構造、雌雄配偶子、および卵巢腔液の基本的な生理的特性の多くをそのまま保持した状態で、この繁殖様式を成立させていることが示唆された。体内配偶子会合型を卵生から胎生への過渡的あるいは中間的な繁殖様式であると考え、カジカ類における真卵生から胎生への進化の過程について試論を提示し詳細に考察した。

VIII. 参考文献

- Adams, D. O. (1976) . The granulomatous inflammatory response.
Amer. J. Pathol., 84, 164-191.
- Aketa, K. (1967) . On the sperm-egg bonding as the initial step of fertilization in the sea urchin. Embryologia, 9, 238-245.
- Anderson, E., Hoppe, P. C., Whitten, W. K. and Lee, G. S. (1975) . In vitro fertilization and early embryogenesis: a cytological analysis. J. Ultrastruct. Res., 50, 231-252
- Balinsky, B. I. (1970) . An introduction to embryology.
W. B. Saunders, Co., Philadelphia, Pennsylvania.
- Begovac, P. C. and Wallace, R. A. (1987) . Ovary of the pipefish, Syngnathus scovelli. J. Morphol., 193, 117-133.
- Begovac, P. C. and Wallace, R. A. (1989) . Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and are associated with the ZP3 layer. J. Exp. Zool., 251, 56-73.
- Billard, R. (1978) . Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. Aquaculture, 14, 187-198.
- Bleil, J. D. and Wassarman, P. M. (1980) . Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida.
Develop. Biol., 76, 185-202.
- Boldt, J., Howe, A. M., Parkerson, J. B., Gunter, L. E. and Kuehn, E. (1989) . Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice.
Biol. Reprod., 40, 887-896.
- Bravo, N. R. and Lennarz, W. J. (1986) . Isolation and characterization of proteolytic fragments of the sea urchin sperm receptor that retain species specificity. Develop. Biol., 118, 202-208.
- Brummett, A. R. and Dumont, J. N. (1979) . Initial stages of sperm penetration into the egg of Fundulus heteroclitus.
J. Exp. Zool., 210, 417-434.
- Brummett, A. R., Dumont, J. N. and Larkin, J. R. (1982) . The ovary of Fundulus heteroclitus. J. Morphol., 173, 1-16.

- Brummett, A. R., Dumont, J. N. and Richter, C. S. (1985) . Later stages of sperm penetration and second polar body and blastodisc formation in the egg of Fundulus heteroclitus.
J. Exp. Zool., 234, 423-239.
- Colwin, A. L. and Colwin, L. H. (1961) . Changes in the spermatozoon during fertilization in Hydroides hexagonus (Annelida).
II. Incorporation with the egg.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 10, 255-274.
- 遠藤善之 (1971) . ウニの受精. 細胞, 3, 22-32.
- Florman, H. M., Bechtol, K. B. and Wassarman, P. M. (1984) . Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. Develop. Biol., 106, 243-255.
- Franklin, L. (1965) . Morphology of gamete membrane fusion and of sperm entry into oocytes of the sea urchin. J. Cell Biol., 25, 81-100.
- Gardiner, D. M. (1978) . Cyclic changes in fine structure of the epithelium lining the ovary of the viviparous teleost, Cymatogaster aggregata (Perciformes: Embiotocidae).
J. Morph., 156, 367-380.
- Gilkey, J. C. (1981) . Mechanisms of fertilization in fishes.
Amer. Zool., 21, 359-375.
- Gilkey, J. C., Jaffe, L. F., Ridgway, E. B. and Reynolds, G. T. (1978) . A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, Oryzias latipes. J. Cell Biol., 76, 448-466.
- Ginsburg, A. S. (1961) . The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli).
J. Embryol. Exp. Morph., 9, 173-190.
- Ginsburg, A. S. (1963) . Sperm-egg association and its relationship to the activation of the egg in salmonid fishes.
J. Embryol. Exp. Morph., 11, 13-33.
- Glabe, C. G. and Vacquier, V. D. (1977) . Isolation and characterization of the vitelline layer of sea urchin eggs.
J. Cell Biol., 75, 410-421.

- Glabe, C. G., Grabel, L. B., Vacquier, V. D. and Rosen, S. D. (1982) .
Carbohydrate specificity of sea urchin sperm binding: a cell
surface lectin mediating sperm-egg adhesion.
J. Cell Biol., 94, 123-128.
- 後藤晃 (1989) . 淡水カジカ類の繁殖スタイルと繁殖戦術. 「魚類の繁殖行動」
(後藤晃・前川光司編). 東海大学出版会, p. 201.
- Hart, N. H. and Donovan, M. (1983) . Fine structure of the chorion and
site of sperm entry in the egg of Brachydanio.
J. Exp. Zool., 227, 277-296.
- 林咲 (1990) . エゾメバル (Sebastes taczanowskii) の卵成熟および妊娠に
伴う卵巣組織の微細構造的変化. 39p, 修士論文, 北海道大学.
- 平井俊朗 (1986) . アサヒアナハゼ (Pseudoblennius cottoides) 雄の生殖に
関する研究. 40p, 修士論文, 北海道大学.
- Hoar, W. S. (1957) . The gonads and reproduction.
In "The Physiology of Fishes", (M. E. Brown, ed.) , Vol. 1,
pp.287-321, Academic Press, New York.
- Holland, N. D. (1980) . Effects of ionophore A23187 on oocytes of
Comanthus japonica (Echinodermata: Crinoidea).
Develop. Growth & Differ., 22, 203-207.
- 星元紀・松井太衛・西山一朗 (1987) . 精子と卵の相互作用.
細胞, 18, 82-91.
- 石原勝敏 (1980) . 受精. 「発生と形態形成」 (小林英司 編) .
東海大学出版会, p250.
- Iuchi, I. and Yamagami, K. (1976) . Major glycoproteins solubilized
from the teleostean egg membrane by the action of the hatching
enzyme. Biochem. Biophys. Acta, 453, 240-249.
- Iwamatsu, T. (1989) . Exocytosis of cortical alveoli and its initiation
time in medaka eggs induced by microinjection of various agents.
Develop. Growth & Differ., 31, 39-44.
- Iwamatsu, T. and Ohta, T. (1978) . Electron microscopic observation on
sperm penetration and pronuclear formation in the fish egg.
J. Exp. Zool., 205, 157-180.
- Iwamatsu, T. and Ohta, T. (1981) . Scanning electron microscopic
observation on sperm penetration in teleostean fish.
J. Exp. Zool., 218, 261-277.

- Iwamatsu, T., Ohta, T., Oshima, E. and Sugiura, T. (1985) . Requirement of extracellular calcium ions for the early fertilization events in the medaka egg. *Develop. Growth & Differ.*, 27, 751-762.
- 狩野康比古 (1949) ニシンの卵子. 採集と飼育, 11, 162-164.
- Kobayashi, W. (1985) . Electron microscopic observation of the breakdown of cortical vesicles in the chum salmon egg. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI Zool.*, 24, 87-102.
- Kobayashi, W. and Yamamoto, T. S. (1981) . Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. *J. Exp. Zool.*, 217, 265-275.
- Kobayashi, W. and Yamamoto, T. S. (1987) . Light and electron microscopic observation of sperm entry in the chum salmon egg. *J. Exp. Zool.*, 243, 311-322.
- Krejsa, R. J. (1964) . Reproductive behavior and sexual dimorphism in the manacled sculpin, *Synchirus gilli* Bean. *Copeia*, 1964, 448-450.
- Kudo, S. (1980) . Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. *Develop. Growth & Differ.*, 22, 403-414.
- Kudo, S. (1982a) . Ultrastructure of a sperm entry site beneath the micropylar canal in fish eggs. *Zool. Mag.*, 91, 213-220.
- Kudo, S. (1982b) . Ultrastructure and ultracytochemistry of fertilization envelope formation in the carp egg. *Develop. Growth & Differ.*, 24, 327-339.
- Kudo, S. (1982c) . The localization of concanavalin A binding sites in the common carp egg. *Zool. Mag.*, 91, 39-47.
- Kudo, S. (1983) . Response to sperm penetration of the cortex of eggs of the fish, *Plecoglossus altivelis*. *Develop. Growth & Differ.*, 25, 163-170.
- Kudo, S. and Inoue, M. (1986) . A bactericidal effect of fertilization envelope extract from fish eggs. *Zool. Sci.*, 3, 323-329.
- Kudo, S. and Inoue, M. (1989) . Bacterial action of fertilization envelope extract from eggs of the fish *Cyprinus carpio* and *Plecoglossus altivelis*. *J. Exp. Zool.*, 250, 291-228.

- Kudo, S. and Sato, A. (1985) . Fertilization cone of carp eggs as revealed by scanning electron microscopy.
 Develop. Growth & Differ., 27, 121-128.
- 黒住一昌 (1965) . 分泌の形態学に関する電子顕微鏡的研究.
 電顕学会報, 14, 12-26.
- Kurosumi, K. and Kawabata, I. (1976) . Transmission and scanning electron microscopy of the human ceruminous apocrine gland.
 I. Secretory glandular cell. Arch. Histol. Jap., 39, 207-229.
- Lombardi, J. and Wourms, J. P. (1985) . The trophotaenial placenta of a viviparous goodeid fish. I. Ultrastructure of the internal ovarian epithelium, the maternal component.
 J. Morphol., 184, 277-292.
- Longo, F., Clark, W. H., Jr. and Hinsch, G. W. (1988) . Gamete interactions and sperm incorporation in the nemertean, Cerebratulus lacteus. Zool. Sci., 5, 573-584.
- Lou, Y. (1990) . Studies on the experimentally induced autoimmunity to testis material in the Nile tilapia, Oreochromis niloticus.
 Doctoral Dissertation, Hokkaido Univ.
- Lou, Y. and Takahashi, H. (1987) . Induction of autoimmune response to testes in a tilapia, Oreochromis niloticus.
 Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 38, 14-26.
- Lou, Y. and Takahashi, H. (1989a) . The blood-testis barrier and its breakdown following immunization to testis material in the Nile tilapia, Oreochromis niloticus. Cell Tissue Res., 258, 491-498.
- Lou, Y. and Takahashi, H. (1989b) . Spermiogenesis in the Nile tilapia Oreochromis niloticus with notes on a unique pattern of nuclear chromatin condensation. J. Morphol., 200, 321-330.
- Lou, Y., Yamauchi, K. and Takahashi, H. (1990) . Isolation and partial characterization of sperm plasma membrane of masu salmon, Oncorhynchus masou. Com. Biochem. Physiol., 95B, 187-192.
- 益田一・尼岡邦夫・荒賀忠一・上野輝弥・吉野哲夫 編 (1984) . 日本産魚類大図鑑, 東海大学出版会, 東京.
- 松原孝博 (1982) . 硬骨魚の生殖腔液の性状と起源に関する研究.
 46p, 修士論文, 北海道大学.

- 松原孝博 (1988) . サケ科魚類の体腔液の性状と産生機序に関する研究.
151p, 博士論文, 北海道大学.
- Matthews, L. H. (1955) . The evolution of viviparity in vertebrates.
Mem. Soc. Endocrinol., 4, 129-148.
- 森沢正昭 (1984) . 精子の運動開始. 生態の科学, 35, 366-376.
- 森沢正昭・石田克美 (1987) 魚類における精子運動と受精. 「回遊の生物学」
(森沢正昭・会田勝美・平野哲也 編). 学会出版センター, p 260.
- Morisawa, M. and Suzuki, K. (1980) . Osmolality and potassium ion:
their roles in initiation of sperm motility in teleosts.
Science, 210, 1145-1146.
- Morisawa, M., Suzuki, K. and Morisawa, S. (1983a) . Effects of
potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid
fishes. J. Exp. Biol., 107, 105-113.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K.
(1983b) . Effects of osmolality and potassium on motility of
spermatozoa from freshwater cyprinid fishes.
J. Exp. Biol., 107, 95-103.
- Morris, R. W. (1952) . Spawning behavior of the cottid fish Clinocottus
recalvus (Greeley) . Pac. Sci., 6, 252-258.
- Morris, R. W. (1956) . Claspig mechanism of cottid fish Oligocottus
snyderi Greeley. Pac. Sci., 10, 314-317.
- Munehara, H. (1988) . Spawning and subsequent copulating behavior of
the elkhorn sculpin Alcichthys alcicornis in an aquarium.
Japan. J. Ichthyol., 35, 358-364.
- 宗原弘幸 (1988a) . ケムシカジカの繁殖習性.
昭和 63 年度日本魚類学会年会講演要旨.
- 宗原弘幸 (1988b) . ニジカジカ・イソバテングの繁殖様式と受精機構.
昭和 62 年度日本魚類学会シンポジウム. カジカ類の多様性と進化.
(会記) . 魚類学雑誌, 34, 532.
- 宗原弘幸 (1989) . スジアイナメ Hexagrammos octogrammus の繁殖生物学的
研究. 152p, 博士論文, 北海道大学.
- 宗原弘幸・三島清吉 (1986) . ニジカジカの胚発生と稚仔魚の形態.
魚類学雑誌, 38, 46-50.

- Munehara, H., Takano, K. and Koya, Y. (1989) . Internal gametic association and external fertilization in the elkhorn sculpin, Alcichthys alcicornis. *Copeia*, 1989, 673-678.
- Munehara, H., Okamoto, H. and Shimazaki, K. (1990) . Paternity estimated by isozyme variation in the marine sculpin Alcichthys alcicornis (Pisces: Cottidae) exhibiting copulation and paternal care. *J. Ethol.*, 8, 21-24.
- Munahara, H., Takano, K. and Koya, Y. (1991) . The little dragon sculpin Blepsias cirrhosus, another case of internal gametic association and external fertilization. *Japan. J. Ichthyol.*, 37, 391-394.
- 宗原弘幸・竹中晃子・竹中修 (1991) . DNA フィンガープリント法による交尾型カジカにおける精子間競走の存在の証明.
平成 3 年度日本魚類学会年会講演要旨.
- Noda, Y. D. and Yanagimachi, R. (1976) . Electron microscopic observations of guinea pig spermatozoa penetrating eggs in vitro. *Develop. Growth & Differ.*, 18, 15-23.
- Ohta, H. (1984) . Electron microscopic study on adhesive material of Pacific herring (Clupea pallasii) eggs. *Japan. J. Ichthyol.*, 30, 1-9.
- 太田博巳・神力義仁・本間正男・伊沢敏穂 (1984) . 両側回遊魚, カンキョウカジカの精子運動.
昭和 59 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集. 38 頁.
- Ohta, T. (1985) . Electron microscopic observations on sperm entry and pronuclear formation in naked eggs of the rose bitterling in polyspermic fertilization. *J. Exp. Zool.*, 234, 273-281.
- Ohta, T. (1986) . Electron microscopic observations on the process of polar body formation in artificially activated eggs of the rose bitterling. *J. Exp. Zool.*, 237, 263-270.
- Ohta, T. (1991) . Initial stages of sperm-egg fusion in the freshwater teleost, Rhodeus ocellatus ocellatus. *Anat. Rec.*, 229, 195-202.
- Ohta, T. and Iwamatsu, T. (1983) . Electron microscopic observations on sperm entry into eggs of the rose bitterling, Rhodeus ocellatus. *J. Exp. Zool.*, 227, 109-119.

- Ohtake, H., Tanimoto, S., Sakai, K., Shimizu, N. and Morisawa, M. (1990) .
Purification of sperm-activating protein from unfertilized
herring eggs. Proc. 61st annual meeting, Zool. Soc. Japan,
Zool. Sci., 7, 1093.
- 沖山宗雄・赤川泉 (1990) . クダヤガラの受精機構.
平成 2 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集. 66 頁.
- Pagano, R. E. and Takeichi, M. (1977) . Adhesion of phospholipid to
Chinese hamster fibroblasts. Role of cell surface proteins.
J. Cell Biol., 74, 531-546.
- Picard, A. and Doree, M. (1982) . Intracellular microinjection of
anticalmodulin drugs does not inhibit the cortical reaction
induced by fertilization, ionophore A23187 or injection of
calcium buffers in sea urchin eggs.
Develop. Growth & Differ., 24, 155-162.
- Quinitio, G. F. (1989) . Studies on the functional morphology of the
testis in two species of freshwater sculpin.
Doctral Dissertation, Hokkaido Univ.
- Rossignol, D. P., Earles, B. J., Decker, G. L. and Lennarz, W. J. (1984) .
Characterization of the sperm receptor on the surface of eggs of
Strongylocentrotus purpuratus. Develop. Biol., 104, 308-321.
- Russell (1976) . The eggs and planktonic stages of British marine
fishes.
524pp., Academic Press, London, New York and San Francisco.
- Santis, R. D. and Pinto, M. R. (1987) . Isolation and partial
characterization of a glycoprotein complex with sperm-receptor
activity from Ciona intestinalis ovary.
Develop. Growth & Differ., 29, 617-625.
- Shalgi, R., Matityahu, A. and Nebel, L. (1986) . The role of
carbohydrates in sperm-egg interaction in rats.
Biol. Reprod., 34, 446-452.
- Sharon, N. and Lis, H. (1972) . Lectins: cell-agglutinating and sugar-
specific proteins. Science, 177, 949-959.
- 四宮明彦 (1985) . 海産カジカ科 3 種の生殖生理および繁殖生態に関する研
究. 145p, 博士論文, 北海道大学.

- 塩垣優・道津喜衛 (1974) . アサヒアナハゼの産卵.
長崎大学水産学部研究報告, 38, 71-76.
- Shur, B. D. and Hall, N. G. (1982) . A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to egg zona pellucida. *J. Cell Biol.*, 95, 574-579.
- Stanley, H. P. (1969) . An electron microscope study of spermiogenesis in the teleost fish Oligocottus maculosus. *J. Ultrastruct. Res.*, 27, 230-243.
- Steyn, G. J. and Van Vuren, H. J. (1986) . The role of the blood-testis barrier in the chemical composition of the seminal plasma of the freshwater teleost Clarias gariepinus. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83A, 421-425.
- Suzuki, N. (1990) . Structure and function of sea urchin egg jelly molecules. *Zool. Sci.*, 7, 355-370.
- Suzuki, R. (1958) . Sperm activation and aggregation during fertilization in some fishes I. Behavior of spermatozoa around the micropyle. *Embryologia*, 4, 93-102.
- 高橋裕哉 (1989) . 精巢の構造と配偶子形成, pp. 35-64.
「水産養殖学講座 第4巻, 水族繁殖学 I」, 高島史夫・羽生功 編, 439p. 緑書房, 東京.
- Takahashi, H. and Takano, K. (1972) . Morphogenesis of accessory reproductive organs in male goldfish, Carassius auratus. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 23, 53-64.
- Takahashi, S. (1981) . Sexual maturity of the isaza, Chaenogobius isaza II. Gross morphology and histology of the ovary. *Zool. Mag.*, 90, 54-61.
- Takano, K. (1968) . Fine structure of the wall of the ovarian lumen in the teleost, Oryzias latipes. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, 19, 76-82.
- 高野和則 (1987) . 生殖器官, pp. 193-219. 「水産養殖学講座 第1巻, 魚類解剖学 VII」, 落合明 編, 347p. 緑書房, 東京.
- 高野和則 (1988) . カサゴ目魚類の生殖機構. 昭和 62 年度日本魚類学会シンポジウム. カジカ類の多様性と進化.
(会記) . 魚類学雑誌, 34, 532.

- 高野和則 (1989) . 卵巢の構造と配偶子形成, pp. 3-34.
「水産養殖学講座 第 4 巻, 水族繁殖学 I」, 高島史夫・羽生功 編,
439p. 緑書房, 東京.
- Takemura, A., Takano, K. and Takahashi, H. (1987) . Reproductive cycle
of a viviparous fish, the white-edged rockfish, Sebastes
taczanowskii. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 38, 111-125.
- Vacquier, V. D. and Moy, G. W. (1977) . Isolation of bindin: the
protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs.
Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 2456-
- Veron, M. and Shapiro, B. M. (1977) . Binding of concanavalin A to the
surface of sea urchin eggs and its alteration upon fertilization.
J. Biol. Chem., 252, 1286-1292.
- Washington, B. B., Moser, H. G., Laroche, W. A. and Richards, A. J.
(1984) . Scorpaeniformes: development. pp. 405-427.
In: Moser, H. G. et al. (ed.) . Ontogeny and Systematics of
Fishes, Amer. Soc. Ichthyol. Herpetol. Spec. Publ. 1. 760pp.
- Wassarman, P. M. (1987) . The biology and chemistry of fertilization.
Science, 235, 553-560.
- Wolenski, J. S. and Hart, N. H. (1987) . Scanning electron microscope
studies of sperm incorporation into the zebrafish (Brachydanio)
egg. J. Exp. Zool., 243, 259-273.
- Wolenski, J. S. and Hart, N. H. (1988a) . Sperm incorporation
independent of fertilization cone formation in the danio egg.
Develop. Growth & Differ., 30, 619-628.
- Wolenski, J. S. and Hart, N. H. (1988b) . Effects of cytochalasins B
and D on the fertilization of zebrafish (Brachydanio) eggs.
J. Exp. Zool., 246, 202-215.
- Wourms, J. P. (1981) . Viviparity: the maternal-fetal relationship in
fishes. Am. Zool., 21, 473-515.
- Wourms, J. P. (1991) . Reproduction and development of Sebastes in the
context of the evolution of piscine viviparity.
Env. Biol. Fish., 30, 111-126.
- 矢部衛 (1988) . カジカ類の系統類縁関係.
昭和 62 年度日本魚類学会シンポジウム. カジカ類の多様性と進化.
(会記) . 魚類学雑誌, 34, 530-531.

- 山本喜一郎 (1951) . 魚卵の附着器官の研究. 第 1 報 クロガシラガレヒの粘着層の膨潤に就いて. 札幌農林学会報, 38, 34-38.
- Yamamoto, K. (1963) . Cyclical changes in the wall of ovarian lumen in the medaka, Oryzias latipes. Annot. Zool. Japon., 36, 179-186.
- Yamamoto, T. (1954) . Physiological studies on fertilization and activation of fish eggs. V. The role of calcium ions in activation of Oryzias eggs. Exp. Cell Res., 6, 56-68.
- Yamamoto, T. (1961) . Physiology of fertilization in fish eggs. Int. Rev. Cytol., 12, 361-405.
- 山本正 (1955) . サケ, ニシンおよびヤツメの排卵過程. 魚類学雑誌, 4, 182-192.
- Yamamoto, T. S. (1963) . Eggs and ovaries in the stickleback, Pungitius tymensis, with a note on the formation of a jelly-like substance surrounding the egg. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI Zool., 15, 190-201.
- 柳町隆造 (1957a) . ニシン卵の受精の研究. II. 精子の形態と二, 三の性質. 動物学雑誌, 66, 10-13.
- 柳町隆造 (1957b) . ニシン卵の受精の研究. III. 精子の卵内進入過程. 動物学雑誌, 66, 14-20.
- Yanagimachi, R. and Noda, Y. D. (1970a) . Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization. J. Ultrastruct. Res., 31, 465-485.
- Yanagimachi, R. and Noda, Y. D. (1970b) . Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. J. Ultrastruct. Res., 31, 486-493.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

