

メダカ卵母細胞の培養液の改良

岩 松 鷹 司

(1973年1月29日受領)

Studies on Oocyte Maturation in the Medaka, *Oryzias latipes*. —Improvement of Culture Medium for Oocytes in Vitro

Takashi Iwamatsu

Oocytes of the orange-red type female of the medaka, *Oryzias latipes* were isolated 2~3 hours before the germinal vesicle breakdown. They were cultured *in vitro* in various media and germinal vesicle breakdown, ovulation, and development upon insemination were observed. The medium suitable for oocytes to acquire the developmental capacity was selected from various media. There appeared to be little effect of glucose (0.5~2 mg/ml) or sodium pyruvate (0.1~2 mg/ml) in the external medium on the oocyte maturation. Oocytes could mature in the presence of bovine serum albumin in Yamamoto's salt solution, although they failed to mature in Yamamoto's salt solution without bovine serum albumin. Bovine serum albumin was dispensable for the medium which was finally selected for oocyte culture. Composition of salts in the most suitable medium was as follows: NaCl 6.5 mg/ml, KCl 0.4 mg/ml, CaCl₂ · 2H₂O 0.15 mg/ml, and adjusted by N/10 NaHCO₃ to pH 7.3.

(Biological Laboratory, Aichi University of Education, Kariya-shi, Aichi-ken, 448, Japan)

魚において、体外で卵母細胞を成熟させる試みは早くからなされている(川村・本永, 1950; Dettlaff, 1960)。正常な発生ができるような卵母細胞の成熟過程を研究するには、その最適培養条件が明らかになることが要求される。これには、培養される卵母細胞の選定、それに適した培養液の改良がなされなければならない。淡水魚であるメダカにおいて、人工的に受精させるのに専ら山本氏塩類溶液(Yamamoto, 1939)が用いられてきた。しかし、この塩類組成は卵母細胞の培養には適さないらしい(Iwamatsu, 1967)。そしてこれまでに、卵母細胞の選定(Hirose and Donaldson, 1972)やその培養液の改良に対する可能性を示す報告が出されている(Hirose, 1971; 山内・山本, 1972)が、まだ十分な研究はないといつてよい。

今回は、その培養液の改良を試みいくつかの条件が明らかになったので、それらの結果を報告する。

材料および方法

採卵には愛知県弥富の養魚場から入手したヒメダカ *Oryzias latipes* (体長 32~38 mm) をつかって、7月

から10月までの4ヶ月間にわたって実験を行なった。これら(雌30匹, 雄15匹)を1つの水槽(60×35×30 cm, 水量約45 l)に入れ、自然の光および温度(24°~34°C)の条件の下(屋外)で、粉餌(こうせん: えび粉=1:1)を与え飼育した。

この条件下では、卵母細胞の卵核胞崩壊(Germinal Vesicle Breakdown, GVBD)は9:00 PM~11:00 PMに、また排卵は2:00 AM~4:00 AMに高頻度でおきた。これらの自然排卵した成熟未受精卵は、人工媒精によって、94.6%の付活率、93.5%の卵割率、および80.1%の胚体形成率を示した。

各実験には30匹ずつの雌を採卵のためにつかった。7:00 PM~8:00 PMに採卵を行なうとすぐその卵母細胞の培養を開始した。データの変動を防ぐために、1個の卵巣から得た卵母細胞を培養開始時(GVBD前2時間から3時間以内)に各実験区になるべく均一になるように分配した。これらの卵母細胞のうち、GVBDを示したものを選び出し培養を続け、その排卵率および媒精による発生率について調べた。培養途中細胞崩壊をおこしたものは培養液の汚染を防ぐため

とり除いた。

卵母細胞をとり出すには、まず眼科用ハサミの鋭った先で雌の脳をつぶし、肛門からエラ近くまで開腹して、そのハサミですばやく腸を肛門近くからなるべく排泄物を出さないようにして卵巣のまわりから除いた。肝臓の下を横に深く切り、体側を背部側から指先で強くおすと卵巣が体外に完全に露出するので、それをハサミで卵管をひきちぎるように摘出し、山本氏塩類溶液 (Yamamoto, 1939; NaCl 7.5 mg/ml, KCl 0.2 mg/ml, CaCl₂ 0.2 mg/ml, pH が 7.3 になるように N/10 NaHCO₃ で調整) に入れた。塩類の影響を調べる際には、各塩類欠除の溶液が使われた。排出物や血液の混ざり込むのを少なくするために、これらのすべての操作をいつも 10 秒以内の迅速さで行なった。このようにして、塩類溶液中にとり出した卵巣を、双眼実体顕微鏡下で、卵母細胞に傷をつけないよう、一方のピンセットで卵巣膜をはさみ固定し、他方の焼いて玉状にしたガラス針の先で数ヶ所ひき裂いた。続いてもっとも大きい群に属する卵母細胞だけをそのガラス針の先で溶液中に切り出した。これらの卵母細胞数を記録して、培養液中に移した。培養器は内径 4 cm のペトリ皿で、それに約 5 ml の溶液を入れ 15~30 個の卵母細胞を培養した。本実験に用いたすべての溶液は使用直前に、N/10 NaHCO₃ で pH を 7.3 に調整したものである。培養 (26±0.5°C) 期間中、pH の変化はほとんどみられなかった。

排卵率を中心として、培養液を調べるには最初山本氏塩類溶液を基準にして、これにハツカネズミの卵母細胞の培養液 (Whitten and Bigers, 1968) に含まれている量の牛血清アルブミン、ブドウ糖、ピルビン酸ナトリウムを同時にまたは個別に加え、それらの液中での卵母細胞の成熟を調べた。次に、その成熟に対する牛血清アルブミン (BSA, 0~8 mg/ml, Fraction V, Armor 社)、ブドウ糖 (0~2 mg/ml) およびピルビン酸ナトリウム (0~0.2 mg/ml) の濃度をかえて山本氏塩類溶液に加えてその溶液中で卵母細胞を培養し至適濃度を調べた。

この結果、加えられた組成のうちでもっとも排卵に効果のある液を定め、さらにその組成中の各塩類の濃度を種々にかえて卵母細胞の成熟を調べた。NaCl は 0~8 mg/ml, KCl は 0~0.5 mg/ml, CaCl₂・2H₂O は 0~0.5 mg/ml および MgSO₄・7H₂O は 0.05 mg/ml の範囲の濃度について調べた。

培養開始後 10~12 時間して、卵母細胞の状態を双眼実体解剖顕微鏡下で観察し、さらに媒精して発生状態

を調べた。成熟のための観察基準は卵核胞の崩壊 (GVBD)、排卵、付活および発生の状態であった。GVBD 率を全卵母細胞に対する GV の内膜が崩壊したものの比として扱い、排卵率については卵胞上皮を完全にぬいだ状態のもののみをその記録の対象とした。付活能を調べる時、排卵していないものは先のきっちり合うように磨いたピンセットをつかって、植物極部の付着毛が巻いた部分から卵胞上皮をむしりとり、そこに露出した付着毛を掴み、もう一方のピンセットで動物極の卵胞上皮を除いたものも、排卵していたものと同様に、そのまま予めきり出した精巢を入れてある山本氏塩類溶液に移した。受精がうまくゆくように、ピンセットで精巢を強くつまみ精子を放出させ、精子濃度を上げ静かに攪拌した。付活および卵割率については異常なものもすべて含めて記録した。すなわち、付活については不完全な表層変化や膜扛拳、卵割についても割球の大きさや形それに卵割速度などの異常なものを含めて記録した。媒精に用いた精巢は雌と一週間近く離して飼っていた雄から得たものであった。

以上、本実験に用いたすべての器具類は高圧滅菌を施したものである。

観察結果および考察

I. 卵母細胞の成熟、特に排卵に対する牛血清アルブミン、ブドウ糖およびピルビン酸ナトリウムの影響
a) Whitten-Biggers 氏液に含まれる濃度での影響 (Table 1):

山本氏塩類溶液中では、排卵はほとんどみられなかったし、正常に受精反応を示すものもなく、部分付活を示すものが約 30% みられただけであった。これらは卵膜が硬化しており正常な膜扛拳がおきなかった。BSA (4 mg/ml) を含む山本氏塩類溶液中で卵母細胞は 28% が排卵をおこし、部分付活 (動物半球あるいは植物半球の途中で表層胞の崩壊が止まったもの) を含めると約 51% が付活した。その後約 33% が発生を開始した。これに比べて、ブドウ糖 (1 mg/ml) やピルビン酸ナトリウム (0.11 mg/ml) の成熟 (排卵および付活) に対する効果はあまりみられなかった (2~6%)。BSA、ブドウ糖およびピルビン酸ナトリウムをすべて含む山本氏塩類溶液中では、卵母細胞の約 54% が排卵をおこし、約 44% がすべて正常に付活した。その約 38% は発生を開始した。発生を開始したものの大半 (68%) は正常胚の形成を示した。

以上の結果は、山本氏塩類溶液に BSA を加えることが卵母細胞の成熟に効果的であることを示している。

Table 1. Maturation in vitro of oocytes in various media and development of the eggs after insemination.

Y: Yamamoto's isotonic salt solution, YA: Y containing 4 mg/ml bovine serum albumin, YG: Y containing 1 mg/ml glucose, YP: Y containing 0.11 mg/ml Na-pyruvate, YAGP: Y containing 4 mg/ml bovine serum albumin, 1 mg/ml glucose, 0.11 mg/ml Na-pyruvate. Numbers in parentheses indicate eggs which are normal at each stage, GVBD: germinal vesicle breakdown.

Medium	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	cytolysed	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
Y	89	20	5 (4 no GVBD)	27 (0)	—	—	—
YA	89	2	28 (3 no GVBD)	45 (3)	29 (22)	19 (15)	19 (17)
YG	90	17	9 (4 no GVBD)	38 (3)	0	—	—
YP	87	12	4 (2 no GVBD)	44 (3)	0	—	—
YAGP	90	3	50 (1 no GVBD)	40 (40)	34 (31)	27 (25)	23 (23)

Table 2. Effect of bovine serum added to Yamamoto's solution. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs.

Concentration of bovine serum albumin (mg/ml)	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
0	89	24	0	14 (0)	0	—	—
2	89	31	15	23 (23)	17 (16)	17 (17)	17 (16)
4	88	34	26	23 (23)	21 (21)	20 (20)	20 (20)
6	89	32	26	24 (24)	22 (21)	21 (21)	19 (18)
8	88	31	20	23 (23)	20 (20)	21 (20)	20 (20)

* Only oocytes in which germinal vesicles have broken down 2 to 3 hours after start (6:30~8:00 pm) of incubation were used.

最近, Hirose (1971) によって報告された, 20% 牛血清を含む山本氏塩類溶液でメダカ卵母細胞 (排卵 8~11 時間前) の排卵誘起が可能である実験結果とよく似ている. このことは, 早くからカエルでも Ringer 氏液に BSA あるいは牛血清 (10~20%) を加え卵母細胞を培養すると, 成熟が可能であるという報告 (Masui, 1967) があり, それらと一致する.

b) BSA の濃度の影響 (Table 2):

培養開始 (7:00 PM) 後, 10:00 PM~11:00 PM までに GVBD をおこした卵母細胞の数は, BSA の存在によって影響されなかった. BSA を含まない液では, 卵母細胞は排卵を示さないが, それを含む液では排卵が GVBD をおこしてから約 6 時間後におきはじめた. 排卵率は 4~6 mg/ml の BSA を含む液でより高いという結果が得られた (Table 2).

この濃度は, ハツカネズミ卵母細胞に用いられているもの (Whitten and Biggers, 1968) にはほぼ一致する.

排卵しない卵母細胞をも含めて, 媒精による付活をみると, BSA を含まない液では排卵を全く示さなかったものも付活が可能であったが, すべて部分付活で膜扛拳は著しく低かった. この部分付活のうち, 動物半球域で表層変化が止まったものが 11 個 (約 46%), 植物半球域で止まったものが 3 個 (約 12%) であった. 一方, BSA を含む溶液中で培養したものは, たとえ排卵しなかったものでも媒精によって正常な表層変化や卵膜扛拳がみられた. 部分付活を示した卵は, 二極分化をゆっくり示したが, 6 時間後も表層変化はそれ以上すすまなかった. 完全付活を示したものは, ほとんど正常な発生を開始し胚体形成を示し, 以上の種々の濃度で BSA を含む液で培養してみても, 各実験区

Table 3. Effect of glucose added to Yamamoto's isotonic salt solution containing 5 mg/ml bovine serum albumin. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs.

Concentration of glucose (mg/ml)	No. of eggs		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
0	101	45	29	28 (28)	23 (23)	23 (21)	22 (21)
0.5	102	45	20	29 (29)	24 (22)	22 (21)	19 (18)
1	102	46	34	27 (27)	25 (22)	20 (20)	18 (17)
2	102	37	32	20 (20)	19 (19)	18 (18)	16 (16)

* See Table 2.

Table 4. Effect of Na-pyruvate added to Yamamoto's isotonic salt solution containing 5 mg/ml BSA and 2 mg/ml glucose. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs.

Concentration of Na-pyruvate (mg/ml)	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
0	87	37	21	24 (23)	23 (21)	19 (19)	18 (16)
0.1	88	34	15	18 (18)	13 (13)	13 (13)	12 (12)
0.5	87	32	21	14 (14)	7 (6)	9 (8)	7 (6)
1	88	29	17	18 (18)	17 (12)	14 (13)	13 (13)
2	88	26	21	11 (11)	11 (8)	10 (9)	9 (9)

* See Table 2.

の卵母細胞の発生率の間には有意差が認められなかった。

c) ブドウ糖およびピルビン酸ナトリウムの濃度の影響 (Tables 3, 4):

GVBD はブドウ糖が多い (2 mg/ml) と、いく分抑制される傾向がみられたが、排卵に悪くない結果を示した。しかし、高い濃度では付活率は逆に低下する傾向がみられた (Table 3)。

ピルビン酸ナトリウムが多くなればなるほど、一般に GVBD は抑制される傾向が認められた (Table 4)。排卵率および発生率とピルビン酸ナトリウムの濃度との相関性は認められなかったが、ピルビン酸ナトリウムは卵母細胞の付活および発生能の獲得にはよい効果を与えなかった。特に、濃度が高い (0.5~2 mg/ml) と卵割時に卵割溝が不明瞭なものが観察された。

これらの結果から、魚の卵母細胞には、哺乳類卵母細胞ほどエネルギー源としてブドウ糖とかピルビン酸ナトリウムを外液から供給する必要はないらしい。

そこで、次に排卵率を上昇させる効果のないピルビ

ン酸ナトリウムを除いて、BSA (5 mg/ml) とブドウ糖 (2 mg/ml) を加えて、無機塩類の成熟に対する影響を調べた。

II. 卵母細胞の成熟に対する NaCl, KCl, CaCl₂ および MgCl₂ の影響

a) NaCl の濃度の影響 (Table 5):

NaCl の濃度が 3 mg/ml の場合、86 個のうち 79 個の卵母細胞 (91.9%) が細胞崩壊をおこした。その濃度が 7 mg/ml より高くなると、GVBD の頻度が低くなる傾向を示した。排卵率は NaCl が 6~7 mg/ml の濃度のとき、より高かった。しかも発生率を高くするのにこの濃度が適していることがわかった。

低濃度において、排卵および媒精後の発生に悪い影響が明確に認められたが、それが単にイオン強度の変化による効果の可能性もあり、この観察だけでは Na⁺ イオンの作用について論じられない。

b) KCl の濃度の影響 (Table 6):

培養液中に KCl が欠除していても、GVBD は正常におきたが、排卵率はそれがないと著しく低くなる

Table 5. Effect of NaCl added to the solution containing 0.19 mg/ml KCl, 0.27 mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/ml BSA and 2 mg/ml glucose. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs.

Concentration of NaCl (mg/ml)	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
3	86	3	0	0	—	—	—
4	86	31	17	23 (22)	9 (1)	3 (0)	0
5	85	35	23	26 (25)	21 (16)	18 (7)	7 (4)
6	86	32	25	26 (26)	19 (18)	20 (17)	17 (17)
7	86	27	19	24 (24)	23 (20)	23 (23)	20 (20)
8	86	23	14	15 (15)	14 (11)	13 (13)	13 (13)

* See Table 2.

Table 6. Effect of KCl added to the solution containing 6.5 mg/ml NaCl, 0.27 mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/ml BSA and 2 mg/ml glucose. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs.

Concentration of KCl (mg/ml)	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
0	111	40	9	30 (30)	23 (12)	16 (13)	5 (4)
0.1	110	37	31	21 (21)	16 (16)	15 (13)	12 (9)
0.2	110	43	32	28 (28)	25 (25)	18 (15)	18 (16)
0.3	111	30	25	21 (21)	19 (19)	17 (17)	21 (16)
0.4	109	40	39	25 (25)	24 (23)	22 (22)	19 (15)
0.5	110	37	33	22 (22)	19 (19)	16 (16)	17 (14)

* See Table 2.

(約 23%) ことがわかった。KCl を含む培養液の中でも、0.4 mg/ml の濃度でよりよい排卵結果 (約 98%) を示した。付活は、培養液中に K^+ イオンがなくても、媒精によって正常にみられた。しかし、 K^+ イオンの欠除した培養液中で培養されたものは付活後の発生が正常に進まないのが他の場合に比べて多く出現した。

KCl 欠除培養液中で排卵率が著しく低下することから、 K^+ イオンは排卵に関与していると考えられる。

c) CaCl_2 の濃度の影響 (Table 7):

培養液中に CaCl_2 が欠除すると、GVBD がおきない卵母細胞が多くなることが明らかに認められ、0.1 mg/ml 以下の濃度では細胞崩壊をおこすものが多かった。排卵も CaCl_2 が欠除している培養液中では、ほとんど正常におきないし、植物極の付着毛もほとんど硬化していなかった。0.2 mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が

含まれていれば、GVBD、排卵および付活後の発生もほぼ正常におきることがわかった。Table 7 にみられるように、濃度が高くなると成熟には効果的ではないらしい。

CaCl_2 欠除の培養液中では GVBD 率がやや低いことから、GVBD 前 2~3 時間の卵母細胞において Ca^{++} イオンが GVBD に何らかの影響があるらしい。Merriam (1971) によれば、カエルの卵母細胞では、GVBD 前約 3 時間より若いものには外液に Ca^{++} イオンがないと、GVBD がおきない。この場合、プロジェステロンによって成熟を誘起させており、成熟開始後一定時間に現われる GVBD 誘起因子と Ca^{++} イオンとの関係が論じられている。このことから、メダカ卵母細胞でも同様な機構の存在が考えられる。 Ca^{++} 欠除の培養液で GVBD をおこしたものでも、排卵ばかりでなく山本氏塩類溶液中での媒精によって

Table 7. Effect of CaCl_2 added to the solution containing 6.5 mg/ml NaCl, 0.4 mg/ml KCl, 5 mg/ml BSA and 2 mg/ml glucose. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs.

Concentration of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mg/ml)	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
0	71	24	18 (17 cytolized)	5 (5)	3 (0)	1 (1)	0
0.1	71	31	31 (30 cytolized)	17 (17)	16 (14)	14 (14)	11 (11)
0.2	72	33	25	26 (26)	26 (26)	24 (24)	19 (18)
0.3	72	34	26	23 (24)	18 (17)	19 (17)	12 (8)
0.4	71	34	25	18 (18)	16 (16)	14 (14)	8 (8)
0.5	74	36	14	27 (27)	17 (15)	14 (12)	10 (7)

* See Table 2.

Table 8. Effect of the solution containing 6.5 mg/ml NaCl, 0.4 mg/ml KCl, 0.15 mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/ml BSA and 2 mg/ml glucose. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs.

Concentration of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/ml)	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
0	162	91	70	30 (30)	26 (25)	26 (23)	21 (17)
0.1	163	86	58	29 (29)	25 (25)	17 (16)	11 (9)
0.2	165	87	58	24 (24)	19 (17)	12 (12)	11 (10)
0.3	159	83	72	23 (23)	12 (11)	10 (8)	11 (9)
0.4	168	90	58	32 (32)	19 (17)	18 (17)	16 (15)
0.5	168	98	81	17 (17)	13 (13)	13 (13)	12 (12)

* See Table 2.

も付活や卵割がほとんどのものにおいて正常におきないという今回の観察は Ca^{++} が GVBD 以外の成熟段階にも要求されることを示すらしい。

d) MgSO_4 の濃度の影響 (Table 8):

MgSO_4 の培養液への添加は濃度を変えても、卵母細胞の GVBD, 排卵および付活につづく発生にほとんど影響を及ぼさなかった。

以上の観察結果から、NaCl 6.5 mg/ml, KCl 0.4 mg/ml, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15 mg/ml の塩類組成をもつ培養液が調べた中では最も適していると推定される。そこで、次にこの塩類組成だけを含む溶液とそれに BSA を成熟によい効果を及ぼすと考えられる濃度 (5 mg/ml) で含むものとで成熟を調べ比較した (Table 9)。この結果、山本氏塩類溶液での培養では排卵はみられなかったが、BSA を含まない上記組成をもつ塩類溶液でも BSA を含む塩類溶液 (50%) と同様 (約 53%)

に排卵がみられた。しかも付活率は、前者の場合約 76% で、後者の場合約 50% であり、BSA が付活能獲得によい効果をもつという結果は得られなかった。また、最終的な胚体形成率をみても両者の場合、ともに 23% 前後で差が認められなかった。

ここで用いた塩類溶液の浸透圧 (約 2.99 気圧) は山本氏塩類溶液のそれ (約 3.23 気圧) に比べて低いが、後の溶液では卵は正常に成熟しないのに、これにさらに BSA を加えると正常に成熟するようになること (Table 1) から、成熟を可能にする要因が単に浸透圧的なものだけとは考えにくい。むしろ前者の塩類組成において、山本氏塩類溶液のそれに比べて、NaCl の濃度が低く KCl の濃度が高い点に原因があるらしい。この塩類組成は両生類のリンゲル氏液や Earle 氏液 (Earle, 1943) のそれに非常に近いことがわかった。このことは、今後これらの液を用いてもメダカ卵母細

Table 9. Comparison of three media on maturation of oocytes and development of eggs *in vitro*. Numbers in parentheses indicate normally developed eggs. Y: Yamamoto's isotonic salt solution. MMO: A solution containing 6.5 mg/ml NaCl, 0.4 mg/ml KCl, 0.15 mg/ml CaCl₂ · 2H₂O. MMO-BSA: A solution containing 5 mg/ml BSA in MMO.

Medium	No. of oocytes		No. of eggs				
	collected	used*	ovulated	activated	cleaved	at the morula stage	with embryonic body
Y	88	39	0	26 (0)	0	—	—
MMO	77	38	20	29 (29)	25 (10)	10 (8)	9 (7)
MMO-BSA	84	52	26	26 (26)	23 (22)	12 (11)	12 (11)

* See Table 2.

胞の体外での成熟が可能であることを示唆する。これまで、*Rana* の卵母細胞の体外培養には、Holtfreter 氏液 (Schuetz, 1967) や両生類の Ringer 氏液 (Masui, 1967) が用いられ、*Xenopus* では両生類の Ringer 氏液に近い塩類組成と濃度をもつ溶液 (Merriam, 1971) が用いられて良い結果が得られている。これらはいずれもリン酸塩を含まず、NaCl の濃度が 5.1 mg/ml 以下である。一方、本実験と同様に、NaCl がより高い濃度で含まれている山本氏塩類溶液とこの液よりやや高張でリン酸塩を含む Hanks 氏液では、メダカの排卵が正常におきないことが観察されている (Hirose, 1971)。これは、メダカの卵母細胞の成熟においてもリン酸塩は不要であり、Na⁺ イオンの濃度条件が重要であることを示している。

おわりに、本稿を校閲して下さいた東京大学理学部動物学教室江上信雄教授に深謝の意を表する。

引用文献

Dettlaff, T. A. 1960. The ovulation and activation of oocytes of acspenserid fishes *in vitro*. Symposium on germ cells and development., 141~144.
 Earle, W. R. 1943. Production of malignancy *in vitro*. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J. Nat. Cancer Inst., 4: 165~212.
 Hirose, K. 1971. Biological study on ovulation *in vitro* of fish—I. Effect of pituitary and chorionic gonadotropins on ovulation *in vitro* of medaka, *Oryzias latipes*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 27. 585~591, fig. 1.
 Hirose, K. and E. M. Donaldson. 1972. Biological study on ovulation *in vitro* of fish—III. The induction of *in vitro* ovulation of *Oryzias*

latipes oocytes using salmon pituitary gonadotropin. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 38. 97~100.
 Iwamatsu, T. 1967. On acquisition of developmental capacity in oocytes of the medaka, *Oryzias latipes*. Annot. Zool. Japan., 40. 6~19, figs. 1~6.
 川村智治郎・本永妙子. 1950. シマドジョウに於ける人工排卵について, 魚類学雑誌, p. 1~7, figs. 1~10.
 Masui, Y. 1967. Relative roles of the pituitary, follicle cells, and progesterone in the induction of oocyte maturation in *Rana pipiens*. J. Exp. Zool., 166. 365~376, figs. 1~4.
 Merriam, R. W. 1971. Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. I. Continuous necessary for diffusible calcium and magnesium. Exptl. Cell Res., 68. 75~80, figs. 1~3.
 Schuetz, A. W. 1967. Action of hormones on germinal vesicle breakdown in frog (*Rana pipiens*) oocytes. J. Exp. Zool., 166. 347~354, fig. 1.
 Whitten, W. K. and J. P. Biggers. 1968. Complete development *in vitro* of the preimplantation storage of mouse ova in a simple chemically defined medium. J. Reprod. Fert., 17. 399~401.
 山内皓平・山本喜一郎. 1972. 生体外で維持されたメダカ卵の胚胞崩壊に対する卵細胞層の効果. 動物学雑誌, 81. 283~284.
 Yamamoto, T. 1939. Changes of the cortical layer of the egg of *Oryzias latipes* at the time of fertilization. Proc. Imp. Acad. Tokyo, 15. 269~271, fig. 1.
 (448 愛知県刈谷市 愛知教育大学 生物学教室)