

マダイの卵膜表面の 電子顕微鏡的観察

細川和子・伏見徹・松里寿彦

Electron Microscopic Observation of the Chorion and Micropyle Apparatus of the Porgy,

Pagrus major

Kazuko Hosokawa, Toru Fusimi
and Toshihiko Matsusato
(Received September 4, 1980)

The chorion of eggs in the porgy, *Pagrus major*, was observed by transmission and scanning electron microscopy. During the breeding season, mature unfertilized eggs and eggs immediately after fertilization were used as materials. The materials were fixed in 2% glutaldehyde (pH 7.2) and 1% osmium tetroxide (pH 7.2) for 2 and 1 hours, respectively, according to the usual method for prepared samples. Using scanning electron microscopy, the micropyle apparatus and numerous pits were observed on the chorion surface. The micropyle apparatus consisted of well-defined spiral layers and seemed to be of the tunnel type. When observed by transmission electron microscopy, the longitudinal profile of the chorion was composed of two layers, a thick inner layer and a thin outer layer composing the pits. As a result of applying Lloyd's "mean crowding" to the number of pits, it can be concluded that the distribution appearance of pits has a uniform distribution pattern.

(KH: Biological Laboratory, Predental Course of Tokyo Dental College, Sugano-cho, Ichikawa 272, Japan; TF: Hiroshima Prefectural Fisheries Experimental Station, Ondo-cho, Aki-gun, Hiroshima-ken 737-12, Japan; TM: Nansei Regional Fisheries Research Laboratory, Fisheries Agency, Ohno-cho, Saeki-gun, Hiroshima-ken 739-04, Japan)

硬骨魚類の卵膜は卵子の(卵巣内にあっては卵細胞の)最外部に存在する厚く硬い膜で、産卵後は孵化までのあいだ胚の保護を行っている。卵膜表面には、付属物的構造をもつているものや、全くなめらかで構造のないものが知られている。この構造と卵の性質とは密接な関係があり、成熟卵ではその性状によって浮性卵と沈性卵に

分かれる(内田ほか, 1958)。

マダイ *Pagrus major* Temminck et Schlegel の成熟卵は卵径約 0.8~0.9 mm の透明な分離浮遊性の球状卵で、約 0.2 mm 径の油球が 1 個存在する。成熟卵の卵膜表面の光学顕微鏡的観察では、表面はいたってなめらかで特殊な構造がないと報告されている(山口, 1978)。今回は走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡で卵膜を観察した結果を報告する。

材料および方法

広島県水産試験場で飼育しているマダイの成熟卵を 1979 年 6 月に採卵し、未受精卵と人工受精直後の受精卵を採卵後ただちに 2% グルタルアルデヒド(カコジル酸緩衝液 pH 7.2)で 2 時間固定した。ついで 2% 塩酸グアニジンとタシニン酸の混合液で 1 時間導伝染色をほどこした後、1% オスマニウム酸で 1 時間後固定を行った。固定後アルコール系列で脱水し、酢酸イソアミルを通して液化炭酸ガスによる臨界点乾燥を行い、イオノスターで白金パラジウムを蒸着し試料作製した。走査型電子顕微鏡は JSM 50A を用い、加速電圧 15 KV、走査速度 50 秒で観察撮影した。

透過型電子顕微鏡的観察には、試料を SEM 試料と同様の方法で固定、脱水した後通常の方法で Epon 包埋して超薄切片とし、酢酸ウラニールとクエン酸鉛で染色して、JEM 100-c 透過型電子顕微鏡を用い、加速電圧 60 KV で観察撮影した。

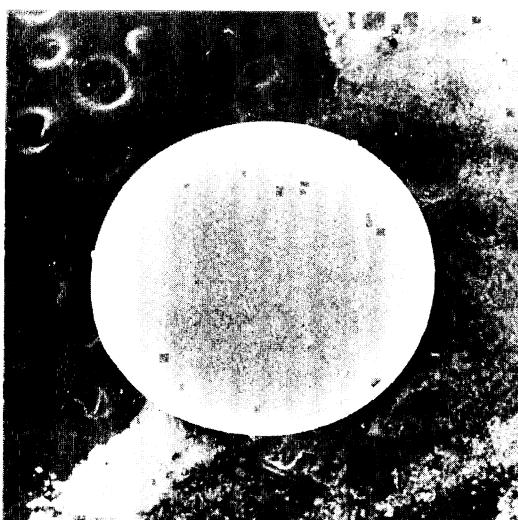


Fig. 1. Unfertilized egg of *Pagrus major*.
SEM. ×79.

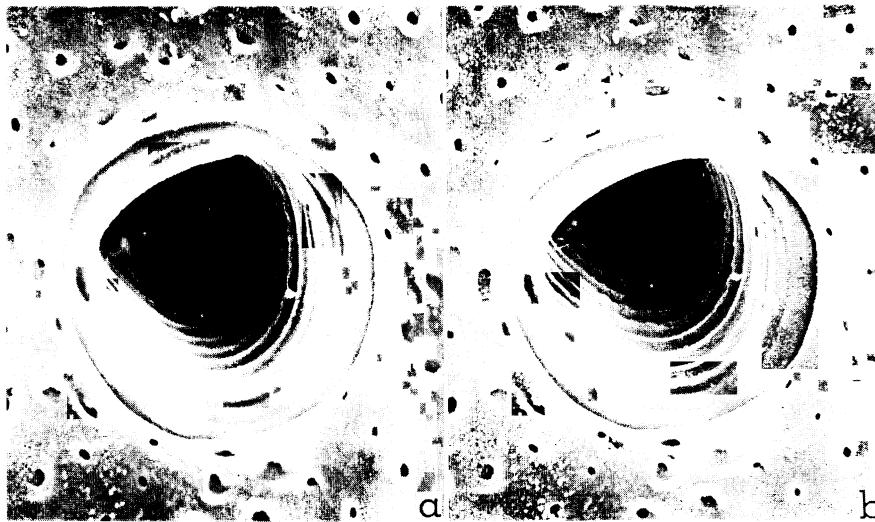


Fig. 2. Micropyle apparatus of the egg of *Pagrus major* immediately after fertilization, showing spiral lamellates and pit features. Stereo arrangement. SEM. $\times 6,670$.

結 果

卵門の構造 卵径 0.8~0.9 mm の球状卵は、固定から臨界点乾燥までの試料作製により卵径約 0.55~0.6 mm に収縮した (Fig. 1)。

動物極と思われる位置に卵門^[1]が観察された (Fig. 2a, b). その周辺には卵門を標示する特別な構造はみられない。ニジマスや *Fundulus* やメダカにみられる様な典型的な漏斗状の卵門 (Szöllösi and Billand, 1974; Kuchnow and Scott, 1977; 細川, 1979) にくらべ、マダイの卵門は漏斗のゆるやかな部分はごくわずかで、ただちにトンネル部となり胚卵腔に通じている。トンネル部の直径は約 5 μm である。Sperm の頭部の径は 2.5 μm ほどであるので、sperm の通路としては十分な広さである。トンネル部の内腔面には約 10 層の層状構造がみられ、それをらせん状に正確にたどることができる。卵門の写真 (Fig. 2a, b) は 10° の傾斜をかけステレオ写真に撮影し配置したものである。ステレオグラスを使用すると卵門が立体視できる。

Pit の構造 卵膜表面全体に多数の小孔 (pit) が観察された。同一卵膜表面を視野を重複させることなく撮影するために、試料に 10° ごとの傾斜をかけ場所を移動し設定した。撮影倍率は常に 1 万倍に固定した (Fig. 3a~d)。透過型電子顕微鏡で卵膜の断面を観察すると外層と内層の 2 層からなっていることがわかる (Fig. 4)。Pit はその外層にできた小さな孔で、内層部には通じてない。内層部は線維状物質と思われる部分と層間物質

とで 8 層から 10 層の層状構造をなしている。内層部は外層部に比して非常に厚く、約 10 倍 (ある場所では内層部 3.5~4 μm , 外層部 0.4 μm) の厚さが測定された。表面像から pit の径を測定すると約 0.2~0.3 μm であるが、卵門周辺では多少径が大きくなっている。Pit が卵膜表面全体にはほぼ均一に分布しているように思われる所以で、それを確認するために生態学で用いている Lloyd (1967) の m^* 指数を適用して検定した。まず、同一倍率で撮影した写真面上に一定の区画をとり、それを N 個の小区画に分割し、それぞれの小区画内の pit 数 k をかぞえ、下式

$$m = \frac{\sum k N_k}{N}$$

$$V = \frac{1}{N-1} (\sum k^2 N_k - N m^2)$$

$$m^* = m + \frac{V}{m} - 1$$

(N_k : k 個の pit を含む小区画数; N : $\sum N_k$)

から m^* および m を算出した。もし pit が均一分布であれば $m^* = m - 1$ の関係が成り立ち、点 (m, m) を座標平面上にとるとほぼ直線上にならぶはずである。そこで未受精卵と受精卵それぞれ 30 個について 8 枚ずつ写真をとって計数し、上記の式にあてはめ m^* および m を算出して m , m^* をプロットしたところ、いずれも完全に直線上に配列した (Fig. 5)。従って、未受精卵、受精卵ともに pit は卵膜表面に均等に分布しているものと判断された。

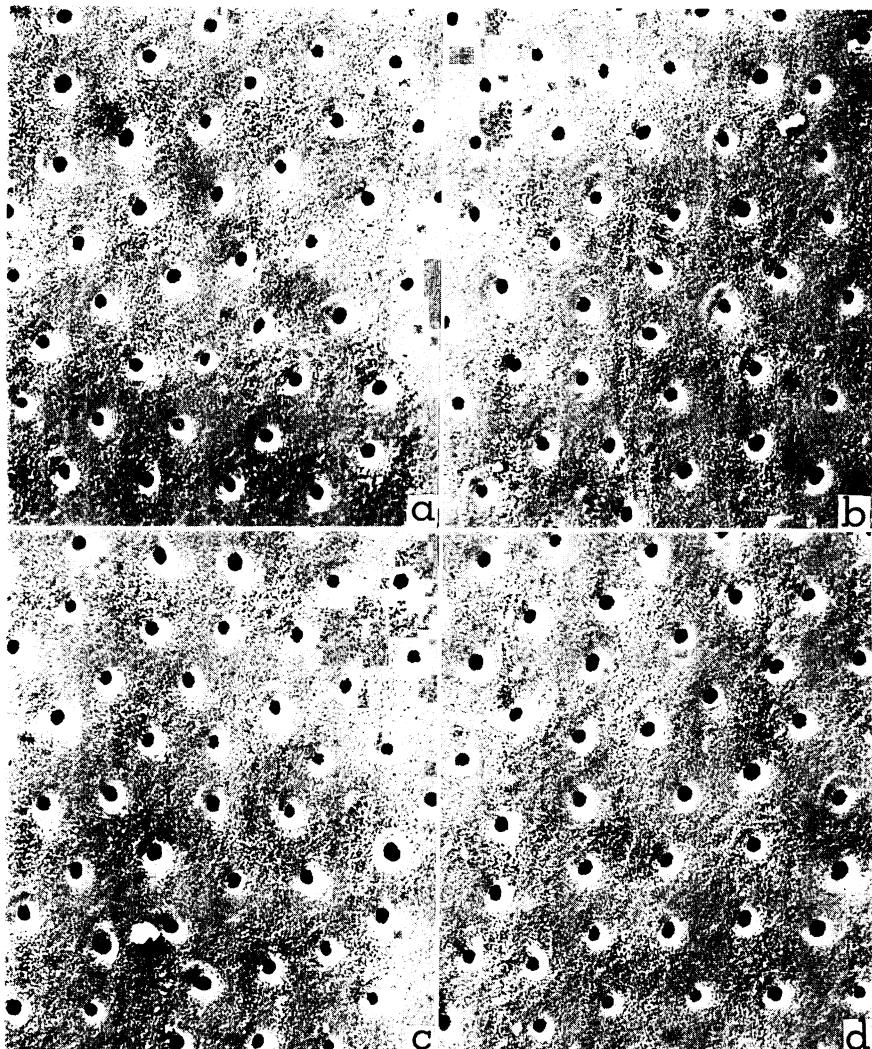


Fig. 3. Pit features of the egg of *Pagrus major* immediately after fertilization. a: Tilted at $+45^\circ$ with micropyle. b: Tilted at $+30^\circ$ with micropyle. c: Tilted at -10° with micropyle. d: Tilted at -20° with micropyle. SEM. $\times 8,330$.

さらに試みとして、それぞれ 6 個の卵について、区画の大きさ X のときの pit 数の平均 Y をもとめて座標上にプロットし、回帰直線 (Fig. 6) を求めたところ、未受精卵、受精卵ともに区画の大きさの増大に伴い、pit 数がほぼ直線的に増加することがわかった。

考 察

硬骨魚類の卵門の電子顕微鏡的観察は、ニジマス (Szöllösi and Billand, 1974), *Fundulus* (Kuchnow and Scott, 1977), メダカ (細川, 1979) で行われている。卵門はいずれも漏斗状で、*Fundulus* やメダカではらせ

ん構造は外縁から顯著で、漏斗部からトンネル部に到っているが、ニジマスの漏斗部にはらせん構造はみられず、いたってなめらかで、しかも広くゆるやかである。今回観察したマダイの卵門では、漏斗部のゆるやかな部分はほとんどなく、外縁から直接トンネル状に通じている。クロダイやヒラメやトラフグについても観察しているが（未発表）、卵門はみなこのタイプの様に思われる。海産魚には共通性があるのかもしれない。さらに多くの種類について観察し比較検討する必要があるが、卵門の形態が種類により多少異なることは明らかとなつた。

卵膜表面の構造は光学顕微鏡的にはいたってなめらか

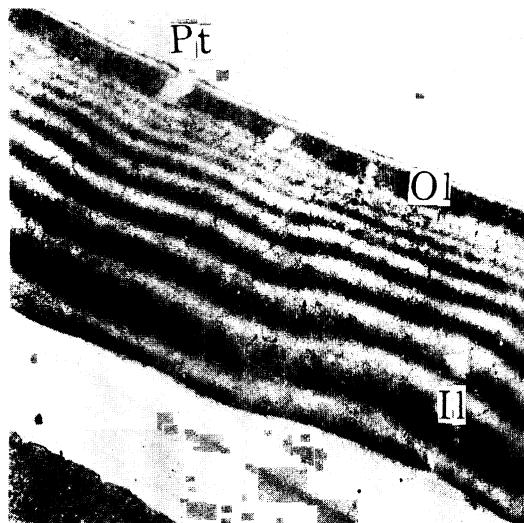


Fig. 4. Longitudinal profile of the chorion of a fertilized egg of *Pagrus major*. Il, inner layer; Ol, outer layer; Pt, pit. TEM. $\times 10,000$.

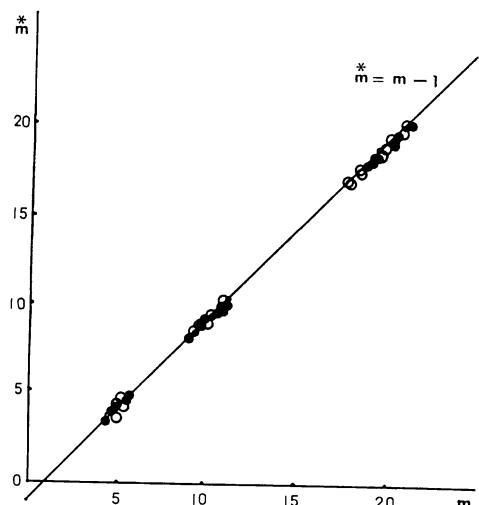


Fig. 5. Relationship between mean crowding index (m^*) and mean density (m) of pits on the chorion surface. Open circle, unfertilized egg; solid circle, fertilized egg.

で特別な構造はみられないが、今回の電子顕微鏡的観察により多くの pit 構造が存在することが明らかとなつた。マダイのほかクロダイやトラフグやヒラメにも同様の pit 構造があることを観察している（未発表）。

Yamamoto (1963) はメダカで卵膜形成以前の oocyte に microvilli があり、その間隙に卵膜が形成されてゆ

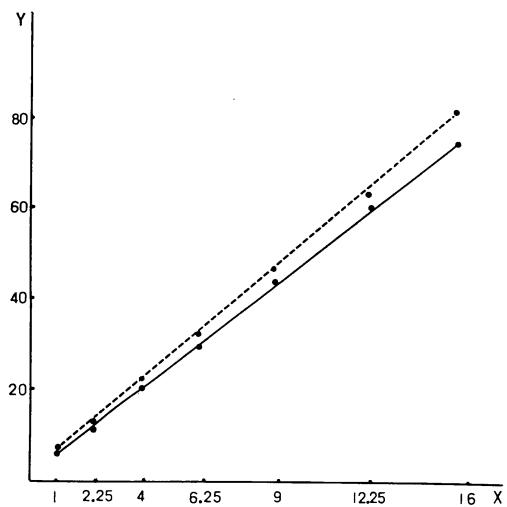


Fig. 6. Mean number of pits (from six eggs) (Y) for each order of magnitude (X). Dotted line, unfertilized egg; solid line, fertilized egg.

くことを明らかにし、Meijor (1979) は Annelida の oocyte で microvilli が vitelline membrane の外側にまで突き出て存在していることを観察した。この tangential section にみられる microvilli の配列が、今回観察したマダイの卵膜表面の pit の配列によく似ていることなどから、著者らはマダイにおいても同様に卵膜形成以前の oocyte には microvilli が存在し、卵膜形成とともに消失してその痕跡が pit となって残っているのではないかと推察している。どの時期にどの様な経過で変化し消失していくのか、follicle cell との関連についての機能的な解明も含め、今後の問題として興味深く思われる。

Pit の分布状態については、その“こみあい度”は均等であるとみなすことができる。さらに区画の大きさを増大させると、pit 数はほぼ直線的に増加するものと予想される。しかし試料作製上の誤差も含め走査電子顕微鏡の倍率表示に機械的誤差 $\pm 10\%$ が生じることは否めず、個体間の pit の定量的比較や、卵子 1 個体の場所による分布状態の定量的検討については現段階では有意の結果を得ることができなかつたことを付記しておく。

謝 辞

この論文をまとめるにあたり貴重な御助言と御校閲をたまわった東京大学理学部江上信雄教授ならびに推計処理について御教示いただいた東京歯科大学菅野隆三助教授に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 細川和子. 1979. メダカの卵門の走査電子顕微鏡による観察. 魚類学雑誌, 26(1): 94~99, figs. 1~7.
- Kuchnow, K. P. and J. R. Scott. 1977. Ultrastructure of the chorion and its micropyle apparatus in the mature *Fundulus heteroclitus* (Walbaum) ovum. J. Fish Biol., 10: 197~201, fig. 1, pls. 1~3.
- Lloyd, M. 1967. Mean crowding. J. Anim. Ecol., 36: 1~30, figs. 1~8.
- Meijor, L. 1979. Hormonal control of oocyte maturation in *Arenicola marina* L. (Annelida: Polychaeta). 1. Morphological study of oocyte maturation. Develop. Growth Differ., 21(4): 303~314, figs. 1~28.
- Szöllösi, D. and R. Billand. 1974. The micropyle of trout eggs and its reaction to different incubation media. J. Microscopie, 21: 55~62, fig. 1, pls. 1~3.
- 内田恵太郎ほか8名. 1958. 日本産魚類の稚魚期の研究. 第一集. 九州大学農学部水産学第二教室, 89 pp., 86 pls.
- 山口正男. 1978. タイ養殖の基礎と実際. 恒星社厚生閣, 東京, 414 pp., 63 figs., 203 pls.
- Yamamoto, M. 1963. Electron microscopy of fish development. 11. Oocyte-follicle cell relationship and formation of chorion in *Oryzias latipes*. J. Fac. Sci. Univ. Tokyo, 4(10): 123~127, figs. 1~10.
- (細川: 272 市川市菅野町 4-18-7 東京歯科大学生物学生物学研究室; 伏見: 737-12 広島県安芸郡音戸町大字音戸 5233-2 広島県水産試験場; 松里: 739-03 広島県佐伯郡大野町丸石 7782-9 水産庁南西海区水産研究所)