発生初期の哺乳動物卵子における脂肪小滴の組織化学的観察

新村 末雄・石田 一夫

(新潟大学農学部 畜産学科)

家畜や実験小動物の卵巣内卵子に含まれている脂肪小滴については、卵子の発育に伴う量的変化や化学的性質が組織化学的に詳しく調べられている¹⁾。しかし、排卵後の分割卵子や胞胚の脂肪小滴については、古くから、その存在が知られており、電子顕微鏡的にも胞胚中の脂肪小滴の存在が確かめられているが²⁾、排卵してから胞胚に達するまでの過程を通して脂肪小滴の量的変化を調べた報告としては、スナネズミの卵子について観察したもの³⁾が見られる程度で、その実態は未だほとんどの動物で不明である。

脂肪は細胞膜や細胞質小器官の構成成分である一方、エネルギー源として重要な役割を持っているので、発生初期の卵子について脂肪小滴の量的変化やその性質を明らかにすることは、発生過程における卵子の物質代謝を論ずる上で重要なことと思われる。

本研究は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ及びブタの卵管・子宮内卵子について、細胞質に含まれている脂肪小滴の組織化学的性質を調べ、初期発生の過程における脂肪小滴の量的変化を観察したものである。

材料及び方法

供試動物として、マウス (ICR 系, 60 匹), ラット (ウイスター系, 40 匹), ゴールデンハムスター (40 匹), モルモット (ハートレー系, 30 匹), ウサギ (日本白色種, 20 匹) 及びブタ (ランドレース, 2 頭及び大ヨークシャー, 3 頭) を用いた。これらの動物の卵子は、発生時期を推定して、卵管または子宮から適宜採取した。採取した卵子は速やかに 10% ホルマリン水溶液に固定した。

各種脂肪の組織化学的検出は、それぞれ次の方法によ

って行った。すなわち、脂肪一般の検出のために sudan IV 染色、中性脂肪のために Nile blue sulfate 染色、類脂肪のために CIACCIO 染色、高級脂肪酸のために岡本、上田、加藤法、コレステロールのために SCHULTZ 法を用いた⁴⁾。処理した卵子は、あらかじめワセリン・パラフィンのカバーガラスの四隅に位置するように置いたスライドガラスの中央に移し、カバーガラスをかぶせ、静かに押して卵子を圧し、顕微鏡下で観察した。

結 果

マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ及びブタの卵子の初期発生の過程における脂肪小滴の量的変化について得られた成績は表 1 に示す通りである。

マウス 1細胞期から胞胚期までのマウスの卵子には、大きさの不揃いの sudan 好性の脂肪小滴が常に中等量観察された(図 1)。この脂肪小滴の主成分は類脂肪であったが(図 2)、2細胞期から胞胚期までの卵子には、中性脂肪が少量共存していた。なお、1細胞期から桑実期までの卵子には高級脂肪酸も少量検出された(図 3)。

ラット 1細胞期、2細胞期及び胞胚期の卵子には、微細な sudan 好性の脂肪小滴が少量見られたが(図 4)、4細胞期から桑実期までの卵子には認められなかった。この脂肪小滴は類脂肪で、中性脂肪は含まれていなかった。1~2細胞期の卵子には、高級脂肪酸もごくわずかに存在していた。

ハムスター 1~2細胞期の卵子には、脂肪小滴は含まれていなかったが、4細胞期から胞胚期までの卵子には、細かい sudan 好性の脂肪小滴が少量細胞質に分散して観察された(図 5)。この脂肪小滴は類脂肪と中性脂肪を含んでいた。なお、高級脂肪酸は検出されなかった。

モルモット モルモットの卵子には、粗大な sudan 好性の脂肪小滴が常に多量観察された(図 6, 7)。この脂肪小滴は主として類脂肪であったが、中性脂肪も少量含まれていた。高級脂肪酸は全く認められなかった。

ウサギ ウサギの卵子には、微細な sudan 好性の脂肪小滴が常に多量見られた(図 8, 9)。この脂肪小滴は

Histochemical observations of lipid droplets in mammalian eggs during the early development.

NIIMURA, Sueo & Kazuo ISHIDA (Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-21)

Japan. J. Anim. Reprod. 26 (1), 1980.

Table 1. The fluctuation in amount of lipid droplets in mammalian eggs at the early developmental stages

Animals	Developmental stages of eggs					
	1-Cell	2-Cell	4-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
Mouse	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Rat	+	+	—	—	—	+
Hamster	—	—	+	+	—	+
Guinea-pig	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Rabbit	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Pig	卅	卅	卅	卅	—	—

— none, + small amount, 卅 moderate amount, 卅 large amount, 卅 very large amount.

主として類脂肪であったが、1~8細胞期の卵子には中性脂肪もごくわずか含まれていた。高級脂肪酸は検出されなかった。

ブタ 1細胞期から8細胞期までの卵子には、著しく粗大な sudan 好性の脂肪小滴が極めて多量含有されていたが(図 10)、胞胚では、トロホブラストに微細な脂肪小滴が少量認められたに過ぎなかった(図 11)。1~8細胞期の卵子の脂肪小滴は類脂肪と比較的多量の中性脂肪を含んでいた(図 12)。高級脂肪酸は胞胚のトロホブラストにのみ少量認められた。

なお、コレステロールはどの動物の卵子においても検出されなかった。

考 察

家畜と実験小動物の卵巣内卵子について脂肪含量を組織化学的に調べた報告²⁾によれば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ及びウサギでは sudan 好性の脂肪小滴は卵子の発育と共に増加し、胞状卵胞卵子にはいずれも多量に含まれているが、マウスとラットでは胞状卵胞卵子でも少量しか含まれておらず、ハムスターでは全く認められないと言われている。本実験において、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ及びブタの排卵後の卵子について脂肪の組織化学的検出を行ったところ、いずれの動物においても脂肪は検出されたが、その量には動物の種類や卵子の発生時期による相違が見られた。この結果を卵巣内卵子の成績¹⁾と比較すると、脂肪の含量は、ブタでは胞胚期以外は胞状卵胞卵子のものと著しい相違は見られないが、マウス、ラット、ウサギではいずれも排卵直後にさらに脂肪を蓄積することがうかがわれた。また、ハムスターでは2細胞期までは胞状卵胞卵子と同様に脂肪を含んでいないが、4細胞期から脂肪を蓄積し始めることが明らかとなった。

卵巣内の卵子に含まれている脂肪小滴は、マウス、ラ

ット、ウサギでは類脂肪のみからなっているが、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌでは類脂肪のほかに中性脂肪も含んでいると言われている。また、これらの動物の卵子には高級脂肪酸は含まれていないと言う¹⁾。本実験において、排卵後の卵子に含まれている脂肪小滴は、ラットでは類脂肪のみからなっているが、マウス、ハムスター、モルモット、ウサギ、ブタでは中性脂肪も含まれていた。また、マウス、ラット、ブタの卵子には高級脂肪酸も認められた。すなわち、マウス、ハムスター、ウサギでは、卵巣内卵子に見られなかった中性脂肪が排卵後初期発生の過程で出現し、マウス、ラット、ブタでは卵巣内卵子には含まれていなかった高級脂肪酸が排卵後現れた。これらの結果から、卵管・子宮内の卵子は、卵巣内卵子と異なった脂肪代謝を行っていることが推察された。

卵子の生化学的研究によると、ウニ³⁾やマウス⁴⁾の卵子に含まれている脂肪の大部分はリン脂質とコレステロールであると言われている。しかし、本実験では、いずれの種類の動物の卵子においてもコレステロールを検出することはできなかった。これは組織化学的検出法の精度の低さによるものと思われる。生化学的に検出された脂肪の一部は細胞膜や細胞質小器官の構成成分となっているが、マウスの未受精卵子1個に含有されている総脂肪量は3.83 m/g で⁵⁾、この量は1000個以上の卵子の細胞膜や小器官を構成するのに十分なものであるという⁷⁾。従って、卵子中に含まれている脂肪の大部分は、エネルギー源として小滴の形で細胞質にたくわえられていることが推察される。実際に、ウサギの卵子は培養液中の脂肪酸をエネルギー源として利用する能力を持っていることが確かめられており⁸⁾、卵子の脂肪は初期発生のためのエネルギー源として使われるものと考えられる。しかしながら、本実験において、卵子中の脂肪小滴が発生過程において減少する傾向は見られなかった。これは、卵

子に α -glycerophosphate dehydrogenase 活性が存在し⁹⁻¹²⁾、常時糖から脂肪への転換が行われて、脂肪が補給されているためであると思われる。卵子を培養する際に、培養液に脂肪を添加しなくても卵子が発生し続けるのは¹³⁾、エネルギー源として必要な脂肪を卵子自身で合成しているためと考えられる。

要 約

発生初期の卵子に含まれている脂肪小滴の量は、ブタが最も多く、モルモットとウサギがこれに次ぎ、マウスは中等度、ラットとハムスターは最も少なかった。マウス、モルモット、ウサギ及びブタの卵子に含まれている脂肪小滴の量は初期発生の期間を通して変わらなかったが（ブタの胞胚期のみ減少）、ラットでは4細胞期から桑実期にかけて一時消失し、ハムスターでは1細胞期と2細胞期には出現しなかった。

これらの脂肪小滴は、いずれの動物のものも類脂肪を含んでいたが、動物によって中性脂肪がある時期に出現した。また、脂肪酸も細胞質にしばしば現れた。すなわち、中性脂肪はラットの卵子では認められなかったが、ハムスターとモルモットの卵子には常に含まれており、マウスでは2細胞期から胞胚期、ウサギとブタでは1細胞期から8細胞期にかけて出現した。脂肪酸はハムスター、モルモット、ウサギの卵子には認められなかったが、マウスでは1細胞期から桑実期、ラットでは1細胞期、ブタでは胞胚期にそれぞれ少量出現した。

終わりに、モルモットを多数ご提供下さった東京農科大学家畜繁殖学教室の石島 芳 郎 助 教授に感謝いたします。

(1979. 8. 20 受付)

文 献

- 1) ISHIDA, K.: *Arch. Histol. Jap.* **19**, 547, 1960.
- 2) ENDERS, A.C.: In *The Biology of the Blastocyst* (BLANDAU, R.J., ed.), p. 71, The Univ. of Chicago Press, Chicago & London, 1971.
- 3) 新村(末)・佐藤(栄) 石田(一): 本誌 **24**, 147, 1971.
- 4) 岡本(耕)・上田(政)・前田(隆)・水谷(明): 顕微鏡的組織化学, 第3版, pp. 333, 339, 343, 349, 354, 医学書院, 1965.
- 5) MOHRI, H.: *Biol. Bull.* **126**, 440, 1964.
- 6) LOEWENSTEIN, J.E. & A. I. COHEN: *J. Embryol. Exp. Morph.* **12**, 113, 1964.
- 7) PRATT, H.P.M.: In *Development in Mammals* (JOHNSON, M.H., ed.), p. 83, North-Holland Publishing Co., 1978.
- 8) KANE, M.T.: *J. Physiol.* **263**, 235, 1976.
- 9) LIN, C.H., C.F. HUANG & T.K. CHANG: *Acta Biol. Exp. Sinica* **9**, 281, 1964.
- 10) SUGAWARA, S. & E.S.E. HAFEZ: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **126**, 849, 1967.
- 11) SKINNER, A. & R. G. SPECTOR: *Experientia* **24**, 905, 1968.
- 12) ISHIDA, K.: *Jap. J. Fert. Ster.* **14**, 126, 1969.
- 13) BRINSTER, R.L.: *J. Exp. Zool.* **158**, 59, 1965.

Explanation of Figures

Eggs in Fig. 1 to 7 were taken at a magnification of 400, and those in Figures 8 to 12 at a magnification of 250.

Fig. 1. A moderate amount of lipid droplets in varied sizes found in a mouse blastocyst (sudan IV stain).

Fig. 2. A moderate amount of lipid droplets in different sizes found in a 2-celled mouse egg (CIACCIO stain).

Fig. 3. A small amount of fine fatty acid granules (arrowed) seen in a 2-celled mouse egg (OKAMOTO *et al.* stain).

Fig. 4. A small amount of fine lipid droplets in a rat blastocyst (sudan IV stain).

Fig. 5. A small amount of fine lipid droplets in a hamster blastocyst (sudan IV stain).

Fig. 6. A large amount of coarse lipid droplets

found in a 4-celled guinea-pig egg (sudan IV stain).

Fig. 7. A large amount of coarse lipid droplets in a guinea-pig blastocyst (sudan IV stain).

Fig. 8. A large amount of fine lipid droplets in a 16-celled rabbit egg (sudan IV stain).

Fig. 9. A large amount of fine lipid droplets found in trophoblast cells of a rabbit blastocyst (sudan IV stain).

Fig. 10. A very large amount of coarse lipid droplets seen in a 1-cell pig egg (sudan IV stain).

Fig. 11. A small amount of fine lipid droplets seen in trophoblast cells of a pig blastocyst (sudan IV stain).

Fig. 12. A moderate amount of neutral fat droplets in a 1-cell pig egg (nile blue sulfate stain).

Summary

The amount of sudanophilic lipid droplets in eggs during their preimplantation stage was most abundant in pigs, secondly abundant in guinea-pigs and rabbits, moderately abundant in mice, and least in rats and hamsters. The lipid droplets in eggs of mice, guinea-pigs and rabbits were constant in its amount during their preimplantation stage. The droplets in rat eggs temporarily disappeared during the stages from 4-cell to morula, such in pig eggs remarkably decreased at the blastocyst stage, and such were lacking in hamster eggs at 1-cell and 2-cell stages.

These lipid droplets always contained lipoids reactive with CIACCIO stain, and in many animals neutral fats stainable with nile blue sulfate at some developmental stages of their eggs. Namely, the lipid droplets in hamster and guinea-pig eggs contained neutral fats at every stage of their development, while such appeared at during stages from 2-cell to blastocyst in mice; during the stages from 1-cell to 8-cell in pigs; and never in rats. In some animals, higher fatty acids demonstrated by OKAMOTO *et al.* method frequently appeared in the cytoplasm of the eggs in shape of granules: in mice, during the stages from 1-cell to morula; in rats, at the 1-cell stage; in pigs, at the blastocyst stage; but never in eggs of hamsters, guinea-pigs and rabbits.