インビトロにおけるウサギ胞状卵胞内卵母細胞の滑面小胞体の形態変化に及ぼす LH 添加の影響

高坂哲也・新村末雄・白石哲也・石田一夫

(新潟大学農学部畜産学科)

一般に、哺乳動物の卵胞内卵母細胞には小胞状の滑面小胞体が含まれているとされているが¹⁾、ZAMBONI & MASTROIANNI²⁾ はウサギの胞状卵胞内卵母細胞に、内腔に中等度の電子密度の物質をもつ比較的大型の粗面小胞体をみえており滑面小胞体の存在については記載していない。しかし、第一成熟分裂を開始した時期では内腔が電子密度の低い物質で占められた小胞が細胞表層に出現すると述べている²⁾。

高坂ら³⁾ はハムスターの胞状卵胞内の卵母細胞において、卵核胞が崩壊する時期に、既存の小胞状の滑面小胞体のほかに管状の滑面小胞体が発現することを認めた。哺乳動物の卵母細胞の成熟過程は LH の影響により再開することがインビボならびにインビトロの実験で確認されているので⁴⁾、LH サージと小胞体の形態との間には何らかの相互関係が存在するものと考えられる。

本実験は、上記のような小胞体の形態変化がインビトロでも起こるものかどうかを確かめるために、ウサギの胞状卵胞から採取した卵母細胞を LH 添加または無添加で培養し、この小胞の動態を中心に卵細胞質の微細構造の変化を観察したものである。

材料および方法

供試動物として日本白色種の未交配の成熟雌家兔（体重約 3.0 kg）5 羽を使用した。家兔は頸動脈を切断して屠殺し、直ちに開腹して両側の卵巣を摘出し、その表面を BAE & FOOTE の培養液（pH 7.2）⁵⁾ で数回洗浄した。その後時計皿に盛った同種の培養液中に移し有柄針を用いて大型の胞状卵胞（直径 1~2 mm）をかき破り卵丘細胞の付着している卵母細胞を採取した。

The effect of LH on morphological events of smooth-surfaced endoplasmic reticulum in rabbit follicular oocytes cultured *in vitro*.

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

Japan. J. Anim. Reprod., 27 (3・4), 1981.

採取した 54 個の卵母細胞のうち 32 個は時計皿に分注した 1 ml の培養液に約 10 個ずつ入れ、20 μ g の LH (Calbiochem) を添加し、炭酸ガス培養装置により、炭酸ガス 5%、空気 95% の気相下 37°C で 12 時間及び 24 時間培養した。なお、培養液は BAE & FOOTE の処法⁵⁾ に基づいて作成し、濾過滅菌した後、炭酸ガス培養装置内で約 6 時間平衡させたものを使用した。一方、残り 22 個のうち 12 個の卵母細胞は LH を含まない培養液で培養し、対照区とした。

培養前の卵母細胞 10 個ならびに培養後 12 時間目と 24 時間目のすべての卵母細胞は 4% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液（pH 7.4）に 4°C で 2 時間、前固定した。次いで、0.1 M カコジル酸緩衝液（pH 7.4）を数回交換しつつ 4°C で一晩洗浄した後、1% 四酸化オスミウムを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液（pH 7.4）に 4°C で 2 時間、後固定した。固定した試料はアセトン上昇系列で脱水し、クエトール 812 に包埋した。超薄切片の作成には JUM-7 型超ミクロトームを用い、写真撮影には JEM-100B 型電子顕微鏡を使用した。なお、電子染色はウランと鉛で行った。

結 果

1. 胞状構造物

培養前のウサギの大型胞状卵胞から得られた卵母細胞の細胞質には、内腔に中等度の電子密度を示す綿毛様の物質を含む大きな胞状構造物（直径 700~2000 m μ ）が多数観察された（図 1）。LH を添加して 12 時間培養した卵母細胞にも、このような大きな胞状構造物がみられたが、このほかに電子密度の低い物質を内腔に含む小胞（直径 50~200 m μ ）が細胞質表層に多数出現した（図 2）。しかし LH を添加して 24 時間培養した卵母細胞では、この様な小胞は認められず、大きな胞状構造物のみが観察された。LH を添加しない培養液で培養した卵母細胞では、常に大きい胞状構造物のみが存在し、小胞は観察されなかった。なお、これらの胞状構造物の膜にはリボゾームの付着は全く認められなかった。

2. その他の細胞小器官

卵核胞は培養前の卵母細胞では細胞質の表層に認められたが、LH を添加または無添加で培養した卵母細胞では、卵核胞は崩壊して第一極体を放出し、核分裂像が観察された。培養前ならびに培養後の卵母細胞とも、ミトコンドリアは円形または楕円形で少数の板状クリステを有し、細胞質に一樣に分布していた。しかし、培養後の卵母細胞のミトコンドリア基質の電子密度は培養前の卵母細胞のそれに比較し著しく増加していた (図 1 と 2)。培養した卵母細胞のゴルジ装置、表層顆粒及び多胞体は培養前のものに比べやや多い傾向がみられた。培養前の卵母細胞においても、また培養後の卵母細胞においても、粗面小胞体は断片的な槽状で、細胞質に小数散在しているだけであった。遊離リボゾームはどちらの場合でも細胞質全域に多数分布していた (図 1)。これらの細胞質小器官は LH を添加して培養した卵母細胞と無添加で培養した卵母細胞の間で、形態上、分布上の相違は全く認められなかった。

3. 表面構造

培養前の卵母細胞の表面には、太く短い微絨毛が生えており、その間の細胞膜にはところどころに陥入がみられたが、LH を添加するしないにかかわらず培養した卵母細胞では微絨毛は減少の傾向を示し、陥入も少なかった。

考 察

ウサギの大型胞状卵胞から採取した直後の卵母細胞と LH を添加または無添加で培養 (12 時間, 24 時間) した卵母細胞には、内腔に中等度の電子密度を有する綿毛様の物質をもつ大きな胞状構造物が常に観察された。類似の像は ZAMBONI & MASTROIANNI²⁾ も観察しており、彼らは少数ながらリボゾームの付着を認めている。しかし、本実験において観察された大きな胞状構造物にはリボゾームの付着が全く認められなかったので滑面小胞体であると判断された。

さらに ZAMBONI & MASTROIANNI²⁾ によると、第一成熟分裂開始後のウサギ胞状卵胞内の卵母細胞には、大きな胞状構造物のほかに、内腔が電子密度の低い物質で満たされた小胞が細胞の表層に多数出現するという。これらの小胞の中にはリボゾームの付着しているものも時折みられると述べている。本実験においても、LH を添加した培養液で 12 時間培養した卵母細胞に類似の小胞が多数出現していたが、リボゾームの付着している小胞は全く認められず、上述の小胞は滑面小胞体であると推察

された。このように、リボゾームの付着している小胞が全く認められなかったことは、ZAMBONI & MASTROIANNI²⁾ の結果と異なっているが、これは供試家兔が未交配であったり、卵母細胞が培養されたことによるものと思われる。また、彼ら²⁾ が観察した小胞は 60~70 m μ で大きさがほぼ一定していたが、本実験のものは 50~200 m μ で大きさがまちまちであった。この違いも上記のことが原因であるように推察される。

この様な小胞は、LH を添加した培養液で 12 時間培養した卵母細胞にのみ認められ、24 時間培養したものでは観察されなかった。このことから、この小胞は LH の存在によって生ずるものであり、時間が経つと (少なくとも 12 時間後には) 消失することが明らかであった。

哺乳動物において、卵母細胞の成熟過程の再開には LH が関与していることが知られている⁴⁾。従って、第一成熟分裂開始後のウサギの胞状卵胞内の卵母細胞における小胞体の形態変化は卵母細胞の成熟過程に生理的意義を有するものと推察された。既報³⁾ において、著者らは LH サージの時期 (排卵前 10 時間) にハムスターの胞状卵胞内の卵母細胞に管状の滑面小胞体が発現することを観察した。本実験の LH を添加して 12 時間培養したウサギの胞状卵胞の卵母細胞に出現する滑面小胞体はハムスターのものと形態は異なるが、その出現時期から考えて、やはり LH に関与するものであることは確かなように思われる。

滑面小胞体の形成には、粗面小胞体⁶⁻⁹⁾ が関与していると考えられている。すなわち、粗面小胞体に付着しているリボゾームが遊離して滑面小胞体になるといわれている。さらに、細胞質内の遊離リボゾームは小胞体の膜の構成蛋白質の補充ならびに更新に関与していると考えられている⁹⁾。本実験で LH を添加して培養したウサギの卵母細胞には、遊離リボゾームが多数認められたが、リボゾームの付着がまばらな粗面小胞体は観察されなかった。従って、LH を添加して培養した卵母細胞または LH サージの時期の卵母細胞における滑面小胞体の形成はリボゾームがなんらかの形で関与している可能性があると推察された。

要 約

ウサギの大型胞状卵胞から得た卵母細胞の細胞質には、内腔に中等度の電子密度の綿毛様の物質を含む大きな胞状の滑面小胞体が多数認められた。このような形態の滑面小胞体は、培養した卵母細胞でも培養液に LH を添加するしないにかかわらず常に観察された。一方、

LH を添加して 12 時間培養した卵母細胞では、このほかに、内腔に電子密度の低い物質を含む小胞状の滑面小胞体が多数細胞表層に出現した。しかし、LH を添加して 24 時間培養した卵母細胞では、小胞状の滑面小胞体は認められなかった。このことから、小胞状の滑面小胞体は LH の存在によって生ずるものであると推察された。

(1981. 1. 21 受付)

文 献

- 1) HERTIG, A. T. & B. R. BARTON: In Handbook of Physiology (GREEP, R. D. ed.), Sec. 7, Vol. II, Part 1, p. 317, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1973.
- 2) ZAMBONI, L. & L. MASTROIANNI, JR.: *J. Ultrastruct. Res.*, **14**, 95, 1966.
- 3) 高坂(哲)・新村(末)・石田(一): 日畜会報, **52**, 194, 1981.
- 4) MASUI, Y. & H. J. CLARKE: *Internat. Rev. Cytol.*, **57**, 185, 1979.
- 5) BAE, I.-H. & R. H. FOOTE: *J. Reprod. Fert.*, **59**, 11, 1980.
- 6) BJÖRKMAN, N.: *Acta Anat.*, **51**, 125, 1962.
- 7) BJERSING, L.: *Z. Zellforsch.*, **82**, 187, 1967.
- 8) BLACK, V. H.: *Am. J. Anat.*, **135**, 381, 1972.
- 9) 山田(英): 納胞学大系 2, 基質・小器官 I. (小川(和)・小田(琢)・黒住(一)・杉野(幸)編), p. 193, 朝倉書店, 東京, 1977.

Summary

The effect of LH on structural characteristics of smooth-surfaced endoplasmic reticulum (SER) in oocytes liberated from well-developed antral follicles of rabbit ovaries was investigated *in vitro*. Large vesicular-typed SER, of which lumen contained flocculent material being moderate in electron density, were distributed uniformly throughout the cytoplasm of the oocytes before cultivation. The SER remained essentially unchanged when cultured in a medium with or without LH for either 12 or 24 hours. After 12 hour-culture including LH, small vesicular-typed SER, of which lumen contained electron-lucent material, appeared in the cortical ooplasm in addition to the above-mentioned SER. The newly-appeared SER, however, was not found in the ooplasm after 24 hour-culture. It will be concluded that the appearance of the small vesicular-typed SER depends on the presence of LH in the medium.

Explanation of Figures

Fig. 1. Cortical part of a rabbit oocyte obtained from a well-developed antral follicle (scale=1 μ m). In the cytoplasm is seen large vesicular-typed smooth-surfaced endoplasmic reticulum (SER), of which lumen contains flocculent material being moderate in electron density (arrowed).

Fig. 2. Cortical part of a rabbit oocyte, obtained from a well-developed antral follicle and then cultured for 12 hours (scale=1 μ m). In the cytoplasm is seen relatively small vesicular-typed SER, of which lumen contains electron-lucent material (arrowed).

PLATE