Histochemical Observations of Proteins, Polysaccharides and Lipids in the Oocytes and Embryos of Mastomys (*Praomys natalensis*) during the Folliculogenesis and Early Development

Sueo NIIMURA, Nobuyoshi FUJISAWA¹⁾, Norimitsu L. SATO¹⁾, and Kazuo ISHIDA

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University, Ikarashi, Niigata-shi 950-21,

¹⁾Facilities for Comparative Medicine and Animal Experimentation,

Niigata University School of Medicine, Asahimachidori, Niigata-shi 951

(Accepted for publication November 26, 1990)

Summary. Histochemical examinations of proteins, neutral and acid polysaccharides, and lipids were made using the oocytes in primordial, secondary and antral follicles and the embryos at the stages of 1- to 8-cell, morula and blastocyst of the mastomys, *Praomys natalensis*. The cytoplasm and zona pellucida of both oocytes and embryos always contained acrolein-Schiff reactive proteins, but not sudanophilic lipids. The zona pellucida of both oocytes and embryos contained neutral polysaccharides that were periodic acid-Schiff reactive and salivary test-resistant, and alcian blue positive acid polysaccharides, while the cytoplasm of those possessed no such substances. The cytoplasm of oocytes in secondary and antral follicles and of embryos at the stages of 1-cell to blastocyst possessed a large amount of glycogen granules that were periodic acid-Schiff reactive and salivary test-digestible.

KEY WORDS: MASTOMYS, OOCYTE, EMBRYO, HISTOCHEMISTRY.

Jpn J Anim Reprod 37, 65-69, 1991

マストミス (*Praomys natalensis*) の卵胞卵と発生初期胚におけるタンパク質、多糖類及び脂質の組織化学的観察

新村 末雄・藤沢 信義¹⁾・佐藤 徳光¹⁾・石田 一夫

新潟大学農学部畜産学科 〒950-21 新潟市五十嵐二の町8050

¹⁾新潟大学医学部附属動物実験施設 〒951 新潟市旭町通

哺乳動物の卵胞卵（卵母細胞）と発生初期胚は細胞質にグリコゲン顆粒や脂質小滴を蓄積しており、これら物質の発育・発生過程における量的変化が種々の動物について調べられ、それらの量が動物種によっても異なっていることが知られた (Ishida, 1954, 1960, 1963; Thomson and Brinster, 1966; Parkening and Soderwall, 1974; Niimura *et al.*, 1978a, b, 1985, 1987; Niimura and Ishida, 1980).

一般に、タンパク質、多糖類および脂質は細胞の重要

な構成成分であるばかりでなく、封入体として細胞質に蓄積され、エネルギー源としても重要な役割をもっている。したがって、卵母細胞や胚についてこれら封入体の存在や、発育・発生過程における量的変化を明らかにすることは、卵の物質代謝を論ずる上で重要なことと思われる。

マストミス (*Praomys natalensis*) はアフリカ大陸に生息するゲッ歯動物で、細菌や寄生虫の感染や腫瘍の研究 (Soga, 1977; Amtmann *et al.*, 1984)、雌の前立腺とホルモンの関係についての研究 (Brambell and

Davis, 1940; Ghanadian *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 1982, 1983)などに広く使用されている。また、マストミスはネズミ科に属しているので、この動物の繁殖パターンや卵の物質代謝などはマウスやラットに類似する点が多いものと推察される。しかし、この動物の繁殖生理学的研究は少なく、腔開口、初回発情および初回排卵の日齢、性周期と妊娠期間がOliff (1953) および Johnston と Oliff (1954) により、また卵胞の形成と発育、および精子形成がNiimura ら (1988) によって調べられている程度で、卵に含まれる封入体については全く調べられていない。

本研究は、マストミスの原始卵胞から胞状卵胞までの卵母細胞と1細胞期から胚盤胞期までの胚について、タンパク質、多糖類および脂質の組織化学的検出を行い、発育・発生に伴うこれら物質の量的変化を調べて他のゲッ歯動物と比較したものである。

材料と方法

供試動物として、3ないし4カ月齢の成熟雌マストミス64匹を使用した。マストミスは新潟大学医学部附属動物実験施設内で、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、点灯14時間（午前4時から午後6時まで）の条件下で飼育した。

卵胞卵を観察するために、9匹のマストミスから18個の卵巣を採取し、4個は脂質の検出用に10%中性ホルマリン緩衝液で固定した後、ゼラチンに包埋した。また、残りの14個の卵巣はブアン液で固定した後、常法通りパラフィンに包埋した。なお、卵巣はタンパク質検出用に4個、中性多糖類（グリコゲンを含む）検出用に6個、酸性多糖類検出用に4個を用いた。一方、初期胚を観察するために、55匹のマストミスの雌を成熟雄と同居させて交配させ、翌朝腔垢を観察して、腔垢中に精子が確認された日をDay 1とした。観察した初期胚の発生時期は次の通りである。すなわち、1細胞卵（前核期）はDay 1の午後1時、2細胞胚はDay 2の午後1時、4細胞胚はDay 3の午後7時、8細胞胚はDay 4の午前7時、桑実胚はDay 4の午後7時、胚盤胞はDay 5の午後7時のものである。腔垢中に精子が確認されたマストミス55匹を上述の各時間にエーテルで麻酔死させ、脂質を検出するための13匹については、卵管あるいは子宮をかん流して各発生時期の胚を採取し、10%中性ホルマリン緩衝液で固定した。また、残りの42匹については、上述の各時間に卵管および子宮を採取し、ブアン液で固定した後、常法通りパラフィンに包埋した。なお、マストミスはタンパク質検出用に13匹、中性多糖類（グリコ

ゲンを含む）検出用に16匹、酸性多糖類検出用に13匹を用いた。

タンパク質、中性多糖類（グリコゲンを含む）および酸性多糖類の検出に、パラフィン包埋した卵巣、および卵管または子宮の $6\mu\text{m}$ の連続切片を作成した。タンパク質はアクロレイン・シッフ反応 (Van Duijn, 1961)、中性多糖類は過沃素酸・シッフ反応（唾液消化試験併用）(McManus, 1948)、酸性多糖類はアルシアン青染色 (Okamoto *et al.*, 1965) によってそれぞれ検出した。脂質の検出にあたっては、ゼラチン包埋した卵巣の $15\mu\text{m}$ の氷結切片、および卵管あるいは子宮から採取してホルマリンで固定した胚に、スダンⅣおよびスダン黒B染色 (Okamoto *et al.*, 1965) を施した。

結 果

原始卵胞から胞状卵胞までの卵母細胞と1細胞期から胚盤胞期までの胚について、タンパク質、中性多糖類、酸性多糖類および脂質を組織化学的に検出したところ、Table 1にみられるような成績が得られた。

タンパク質：すべての時期の卵母細胞と胚において、アクロレイン・シッフ反応陽性のタンパク質は細胞質全域に赤紫色を呈して認められたが、貯蔵物質（封入体）と考えられる顆粒や小滴は全くみられなかった (Fig. 1)。透明帯は原始卵胞の卵母細胞では形成されていないが、その他の時期の卵母細胞ではすべて形成されており、これらでは均一に強く染色された (Fig. 1)。卵母細胞の発育や胚の発生に伴うタンパク質の量的変化は認められなかった。

中性多糖類：二次卵胞と胞状卵胞の卵母細胞、1細胞期から胚盤胞期までの胚に過沃素酸・シッフ反応陽性の中性多糖類は赤紫色の顆粒として細胞質に常に多量認められたが (Fig. 2)、原始卵胞の卵母細胞にはこの顆粒は観察されなかった。なお、この顆粒は唾液消化試験によって消化されたので、グリコゲンであることが確認された。しかし、細胞質自体はこの反応によって染まらず、また透明帯は常に均一に強く染まったが、唾液では消化されなかった (Fig. 2)。卵母細胞の発育や胚の発生に伴う細胞質のグリコゲンおよび透明帯の中性多糖類の量には変化はみられなかった。

酸性多糖類：アルシアン青好性の酸性多糖類は、いずれの発育・発生時期の卵母細胞と胚の細胞質にも含まれていなかった。しかし、卵母細胞と胚の透明帯はどの時期においても淡青色に均一に染色された (Fig. 3)。

脂 質：スダン好性の脂質は、すべての時期の卵母細胞

Table 1. Proteins, polysaccharides and lipids in oocytes and embryos of the mastomys

Substances		Oocytes			Embryos					
		Primordial follicles	Secondary follicles	Antral follicles	1-Cell	2-Cell	4-Cell	8-Cell	Morula	Blastocyst
Proteins	Cytoplasm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Zona pellucida		++	++	++	++	++	++	++	++
Neutral polysaccharides	Cytoplasm	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Inclusion (glycogen)	—	++	++	++	++	++	++	++	++
	Zona pellucida		++	++	++	++	++	++	++	++
Acid polysaccharides	Cytoplasm	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Zona pellucida		+	+	+	+	+	+	+	+
Lipids	Cytoplasm	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Zona pellucida		—	—	—	—	—	—	—	—

— None, + small amount, ++ large amount.

Fig. 1. An oocyte in secondary follicle of a mastomys. Acrolein-Schiff method. A small amount of the proteins is contained in the cytoplasm, while a large amount in the zona pellucida. $\times 400$.

Fig. 2. An 8-cell embryo of a mastomys. Periodic acid-Schiff method. A large amount of glycogen is contained in the cytoplasm, and a large amount of salivary test-resistant neutral polysaccharides in the zona pellucida. $\times 400$.

胞と胚で、細胞質と透明帯のいずれにも全く検出されなかった。

考 察

ゲッ歯動物の卵母細胞について、グリコゲンと脂質の組織化学的検出を行った報告 (Ishida, 1960; Niimura *et al.*, 1987) によると、マウス、ラットおよびハムスターの卵母細胞は、グリコゲンを多量に含んでいるが、ハタネズミでは少量であり、脂質はマウス、ラットおよびハタネズミでは少量、ハムスターでは全く認められない。

また、発生初期胚のグリコゲン含量についてもラット (Ishida, 1954), マウス (Thomson and Brinster, 1966), ハムスター (Parkening and Soderwall, 1974), スナネズミ (Niimura *et al.*, 1978b) およびハタネズミ (Niimura *et al.*, 1987) で調べられており、脂質含量もラット、マウス、ハムスター、モルモット (Niimura and Ishida, 1980), スナネズミ (Niimura *et al.*, 1978a) およびハタネズミ (Niimura *et al.*, 1987) で報告されている。これらによると、グリコゲン顆粒はどの動物の胚でも発生初期を通じて常に認められているが、マウス、ラット、ハム

Fig. 3. A 2-cell embryo of a mastomys. Alcian blue stain. A small amount of acid polysaccharides is contained in the zona pellucida, while none in the cytoplasm. $\times 400$.

スターおよびスナネズミの胚ではその含量は発生が進むにしたがって減少する。一方、脂質含量は動物種によってかなり異なり、1細胞期から胚盤胞期まで常に少量ないし多量含んでいるもの（マウス、モルモットおよびハタネズミ）（Niimura and Ishida, 1980; Niimura *et al.*, 1987）、胚盤胞期に減少するもの（スナネズミ）（Niimura *et al.*, 1978a）、脂質を含有している発生時期が限定されているもの（ラットおよびハムスター）（Niimura and Ishida, 1980）がある。このようにゲッ歯動物では、卵母細胞と初期胚は発育・発生のためのエネルギー源としてグリコゲン顆粒を必ず含有しているが、脂質については含有時期が限定されている動物種があるものの脂質小滴の含有も一般的な事実と思われる。

ネズミ科に属するマストミスでも、卵母細胞と胚の発育・発生のためのエネルギー源として、マウスやラットと同様にグリコゲンと脂質の両者を含有するものと推察されたが、マストミスの卵母細胞と初期胚の組織化学的観察では、グリコゲンは二次卵胞以降の卵母細胞と初期胚には常に多量に含まれ、脂質はいずれの時期のものにも全く含有されていなかった。この脂質についての所見はマウスやラットとは著しく異なるもので、本種の特徴のように思考された。

一方、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミなどのゲッ歯動物の卵母細胞と初期胚の細胞質には、タンパク質性の線維構造物あるいは板状構造物が封入体として存在することが電顕的に確かめられている（Szollosi, 1965; Enders and Schlafke, 1965; Hadek, 1966; Weakley, 1967; Sasaki *et al.*, 1979）。これらの構造物は胚の発生

に伴って減少することから、初期発生のための栄養分として貯えられている物質であろうと考えられている（Enders and Schlafke, 1965; Enders, 1971）。本実験では、マストミスの卵母細胞と初期胚にタンパク質の検出（アクロレイン・シッフ反応）を試みたところ、この反応に陽性のタンパク質はすべての時期の卵母細胞と初期胚の細胞質全域に認められ、顆粒や小滴として染色されるものはなかった。したがって、電顕観察を行わないと明確にはできないが、光顕による観察からは、マストミスの卵母細胞と初期胚にタンパク質性の封入体が存在しているという確証は得られなかった。

以上のことから、マストミスの卵母細胞と初期胚は発育・発生のためのエネルギー源としてグリコゲンのみを細胞質に蓄積しているものと思われる。このことは、他のゲッ歯動物と著しく異なっており、本種の卵における物質代謝の特異性がうかがわれる。

謝 辞

多数のマストミスを分与していただいた新潟大学医療技術短期大学部、曾我 淳教授に感謝の意を表する。

文 献

- Amtmann E, Volm M, Wayss K (1984) Tumor induction in the rodent *Mastomys natalensis* by activation of endogenous papilloma virus genomes. *Nature* 308: 291-292.
- Brambell FWR, Davis DHS (1940) The normal occurrence, structure and homology of prostate glands in adult female *Mastomys erythroleucus* temm. *J Anat* 75: 64-74.
- Enders AC (1971) The fine structure of the blastocyst. In: *The Biology of the Blastocyst* (Blandau RJ ed.), The Univ Chicago Press, Chicago. pp 71-94.
- Enders AC, Schlafke SJ (1965) The fine structure of the blastocyst: some comparative studies. In: *Preimplantation Stages of Pregnancy* (Wolstenholm GEW, O'Connor M eds.), J. & A. Churchill, London. pp 29-59.
- Ghanadian R, Lewis JG, Chisholm GD (1977) Androgen concentrations in prostate and serum of the male and female *Praomys (Mastomys) natalensis*. *Invest Urol* 15: 212-214.
- Hadek R (1966) Cytoplasmic whorls in the golden hamster oocyte. *J Cell Sci* 1: 281-282.
- Ishida K (1954) Cytochemical studies of tubal ova. *Tohoku J Agric Res* 5: 1-11.
- Ishida K (1960) Histochemical studies of lipids in the ovaries of domestic animals. *Arch Histol Jap* 19: 547-563.
- Ishida K (1963) Histochemical studies of the tubal ova of rabbits and pigs. *Jpn J Fertil Steril* 8: 11-17.
- Johnston HL, Oliff WD (1954) The oestrous cycle of female

- Rattus (Mastomys) natalensis* (Smith) as observed in the laboratory. *Proc Zool Soc Lond* 124: 605–613.
- McManus JFA (1948) Histological and histochemical use of periodic acid. *Stain Technol* 23: 99–108.
- Niimura S, Sato Y, Ishida K (1978a) Histochemical studies of lipids and related enzymes in Mongolian gerbil eggs. *Jpn J Anim Reprod* 24: 147–148 (in Japanese).
- Niimura S, Sato Y, Ishida K (1978b) Histochemical studies of glycogen, phosphorylase and UDPG-glycogen transferase in Mongolian gerbil eggs. *Jpn J Anim Reprod* 24: 181–183 (in Japanese).
- Niimura S, Ishida K (1980) Histochemical observations of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. *Jpn J Anim Reprod* 26: 46–49 (in Japanese).
- Niimura S, Fujisawa N, Sato NL (1985) Histochemical demonstration of proteins, lipids and polysaccharides in Japanese monkey oocytes. *Exp Anim* 34: 73–76 (in Japanese).
- Niimura S, Imamura K, Goto N, Ishida K (1987) Histochemical observations of proteins, polysaccharides and lipids in the oocytes and embryos of Japanese field voles (*Microtus montebelli*) during the folliculogenesis and early development. *Jpn J Anim Reprod* 33: 6–10 (in Japanese).
- Niimura S, Fujisawa N, Maeda Y, Sato NL, Ishida K (1988) Postnatal development of gonads in the mastomys, *Praomys natalensis*, with particular reference to folliculogenesis and spermatogenesis. *Bull Fac Agric Niigata Univ* 40: 61–66 (in Japanese).
- Okamoto K, Ueda M, Maeda R, Mizutani A (1965) Microscopic Histochemistry. Igaku Shoin, Tokyo. pp 285, 336 (in Japanese).
- Oliff WD (1953) The mortality, fecundity and intrinsic rate of natural increase of the multimammate mouse, *Rattus (Mastomys) natalensis* (Smith) in the laboratory. *J Anim Ecol* 22: 217–226.
- Parkening TA, Soderwall AL (1974) Histochemical localization of glycogen in preimplantation and implantation stages of young and senescent golden hamsters. *J Reprod Fert* 41: 285–295.
- Sasaki H, Niimura S, Ishida K (1979) Lamellar or fibrous inclusions in mammalian oocytes. *Jpn J Zootech Sci* 50: 88–94 (in Japanese).
- Soga J (1977) Historical background of mastomys research. In: *Praomys (Mastomys) Natalensis* (Soga J, Sato H eds.), The Daiichi Printing Co. Ltd., Niigata. pp 1–8.
- Suzuki Y, Hatakeyama Y, Takei M, Inose T, Tomoda S, Takahashi S, Asano T (1982) Studies on reproductive endocrinology of the mastomys, *Praomys Mastomys natalensis*. I. Endocrine control of accessory sexual organs especially of the female prostate and sexual difference of the adrenal. *Bull Fac Agric Meiji Univ* 59: 1–16 (in Japanese).
- Suzuki Y, Hatakeyama Y, Maruyama K, Kishi K, Mizuguchi H, Tomoda S, Asano T (1983) Studies on reproductive endocrinology of the mastomys. II. Sexual difference in the adrenal of mastomys and its endocrine control on functions of female reproductive organs. *Bull Fac Agric Meiji Univ* 62: 11–23 (in Japanese).
- Szollasi D (1965) Development of “yolky substance” in some rodent eggs. *Anat Rec* 151: 424.
- Thomson JL, Brinster RL (1966) Glycogen content of preimplantation mouse embryos. *Anat Rec* 155: 97–102.
- Van Duijn P (1961) Acrolein-Schiff, a new staining method for proteins. *J Histochem Cytochem* 9: 234–241.
- Weakley BS (1967) Investigations into the structure and fixation properties of cytoplasmic lamellae in the hamster oocyte. *Z Zellforsch* 81: 91–99.

要 約

原始卵胞から胞状卵胞，1細胞期から胚盤胞期までのマストミスの卵母細胞と胚について，タンパク質，中性多糖類，酸性多糖類および脂質の組織化学的検出を試みた。卵母細胞と胚の細胞質と透明帯は常にアクロレイン・シッフ反応陽性のタンパク質を含んでいたが，スダン好性の脂質は含有していなかった。卵母細胞と胚の透明帯は過沃素酸・シッフ反応陽性で唾液消化試験抗性的な中性多糖類とアルシアン青好性の酸性多糖類を含んでいたが，細胞質にはこのような多糖類を証明できなかった。二次卵胞と胞状卵胞の卵母細胞と1細胞期から胚盤胞期までの胚の細胞質は，過沃素酸・シッフ反応陽性で唾液で消化される多量の中性多糖類（グリコゲン）の顆粒を含有していたが，他のゲッ菌動物にみられるようなタンパク質や脂質の封入体は全く認められなかった。