

ウシ卵胞の発育に伴う卵母細胞と卵胞上皮細胞の 形態および組織化学的变化

額爾敦朝魯¹⁾・阿部光雄²⁾・竹花一成²⁾

Morphology and Histochemistry of Glycoconjugates in the Oocytes and the Follicular Epitheliocyte Associate with Maturation

Orudonchouro, Mitsuo ABE and Kazushige TAKEHANA

(June, 1993)

緒 論

卵胞は卵母細胞および卵胞上皮細胞(顆粒層細胞)により構成され、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞と成熟し、その発育に伴い、卵胞を構成している卵胞上皮細胞の形は単層扁平から、分裂、増殖して、一次卵胞では単層立方、二次卵胞では重層円柱、胞状卵胞ではさらに分化し重層円柱の顆粒層細胞を形成する。この卵胞上皮細胞はその発育途中では卵巣ステロイドホルモンを産生するが、排卵後には黄体細胞に変化し、プロジェステロンを産生することも知られている^{1,11)}。卵母細胞の透明帯はタンパク質と複合糖質で構成され、組織化学的に二層あるいは三層であるが、内層と中層は中性糖質が主体で、外層は酸性糖質に富み、表面に多種の末端糖残基が存在することもすでに報告されている^{3,10,11)}。また卵胞液にも中性および酸性複合糖質が含まれ、卵母細胞の潤滑、イオン交換および卵母細胞に適正な成長環境を与える重要な物質である^{13,14)}。現在、ウシの繁殖領域では過剰排卵処置を含めた卵胞発育の人為的コントロールが広範に行われているが、卵胞の発育に伴う卵母細胞と卵胞上皮細胞の形態および組織化学的变化について詳細な報告は現在まで認められない。

そこで、今回我々は、卵胞の発育および排卵に伴う卵母細胞、卵胞上皮細胞、透明帯の形態および卵母細胞、

卵胞上皮細胞、透明帯ならびに卵胞液に含まれる複合糖質の変化を明らかにし、また過剰排卵処置を施し排卵直前の卵胞についても検討した。

材料および方法

材料は屠畜場より入手したホルスタイン種の成ウシ10頭の左右卵巣それぞれ20個と排卵直前の胞状卵胞を視察するために過剰排卵処置を施したウシの左卵巣2個を用いた。過剰排卵処置は正常発情周期を確認後、黄体期にPGF_{2α}を25mg筋肉注射することによって発情を誘発させ、その発情周期の14日目から4日間FSHを1日2回ずつ筋肉注射した。すなわち、8時と20時にそれぞれ1日目には10mg、2日目には5mg、3日目には3mg、4日目には2mgを投与した。また、FSH投与後3日目にはPGF_{2α}を8時、14時および20時にそれぞれ15mg、10mgおよび5mg筋肉内注射した。その後、超音波診断法および内視鏡検査によって左右卵巣の状態を観察し、排卵直前の卵巣を確認後、放血殺し、左右卵巣を卵巣動脈と共に採取した。採取後細切し直ちに2%酢酸カルシウム-10%ホルマリン溶液で48時間固定後、常法に従い、アルコール系列にて脱水後パラフィンに包埋し、薄切、脱パラフィンの後以下の染色法を施し観察した。

- 1) 中国、内蒙古農牧学院、獣医学科、獣医組織発生学教室
Department of Histology and Embryology, Inner Mongolia Institute of Agriculture and Animal Husbandry, Xingjian Dongjie, Huhhot, IM, PRC
- 2) 獣医学科、獣医解剖学教室
Department of Veterinary Medicine, Veterinary Anatomy, Rakuno Gakuen University, Ebetsu Hokkaido 069, Japan

表-1 レクチンの種類, 特異性および阻害糖

レクチン	糖 特 異 性	阻 害 糖
Concanavalin A (ConA)	α -D-Man, α -D-Glu	α -Methyl-Man
Wheat germ agglutinin (WGA)	α/β -D-GlcNAc	GlcNAc
Peanut agglutinin (PNA)	β -D-Gal-GalNAc, D-Gal	Gal
Limulus polyhemus agglutinin (LPA)	NeuNAc	NeuNAc
Soybean agglutinin (SBA)	α/β -D-GalNAc, α -D-Gal	GalNAc
Griffonia simplicifonia-I (GS-I)	α -Gal	Gal
Griffonia simplicifonia-II (GS-II)	α -GlcNAc	GlcNAc
Maclura pomifera agglutinin (MPA)	Gal	Gal
Ulex europaeus agglutinin-I (UEA-I)	α -L-Fuc	Fuc
Ricinus communis agglutinin-I (RCA-I)	α/β -D-Gal	Gal

Man=マンノース, Glu=グルコース, GlcNAc=N-アセチルグルコサミン, Gal=ガラクトース, NeuNAc=N-アセチルノイラミン酸(シアル酸), GalNAc=N-アセチルガラクトサミン, Fuc=フコース (E. Y. Lab., U. S. A.)

1. 組織学的方法

ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色

2. 組織化学的反応

過ヨウ素酸-Schiff (PAS) 反応, Alcian Blue (AB pH1.0), Alcan Blue (AB pH2.5), AB (pH2.5)-PAS 反応

レクチンは以下の10種のビオチン化もしくはペルオキシダーゼ標識したものをを用い, 直接法もしくは Avidin-Biotin-complex (ABC) 法⁹⁾で行った。

表-1にレクチンの種類, 糖特異性および阻害糖を示した。

卵胞の発育過程の段階の分類方法は Franchi and Ryan の方法²⁾に基づき, 卵母細胞周囲の卵胞上皮細胞が単層扁平のものを原始卵胞, 単層立方状のものを一次卵胞, 重層円柱が単層扁平のも状のものを二次卵胞, 卵胞洞を有するものを胞状卵胞とした。また過剰排卵ホルモン処置を施したウシの胞状卵胞は排卵直前のものとした。

結 果

1. 組織学的所見

1) 卵母細胞

卵母細胞の直径は卵胞の成熟に伴って増加していた(図-1)。すなわち, 原始卵胞では直径 $49.6 \pm 6.1 \mu\text{m}$, 一次卵胞では直径 $50.1 \pm 8.0 \mu\text{m}$, 二次卵胞では直径 $99.4 \pm 11.0 \mu\text{m}$, 胞状卵胞では直径 $200.5 \pm 21.0 \mu\text{m}$, 排卵直前の胞状卵胞では直径 $169.2 \pm 23.3 \mu\text{m}$ であった。原始卵胞と一次卵胞の卵母細胞の直径には有意差は認められな

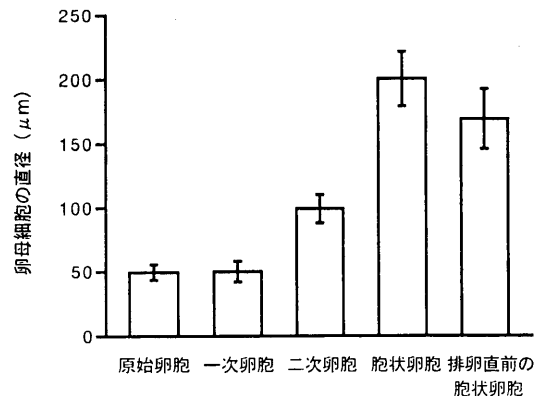


図-1

かったが, 一次卵胞と二次卵胞の直径および二次卵胞と胞状卵胞の直径には有意差が認められた。

2) 卵胞上皮細胞

卵胞上皮細胞は卵胞の発育に従って複雑にその大きさを変化させ, 原始卵胞では直径 $10.9 \pm 3.0 \mu\text{m}$, 一次卵胞では長径 $13.9 \pm 3.2 \mu\text{m}$ であった。二次卵胞から卵胞上皮細胞は7~9層に成り, その大きさは存在部位によって異なっていた。二次卵胞の基底膜側の顆粒層細胞は長径 $28.1 \pm 6.0 \mu\text{m}$, その他の部位の顆粒層細胞は平均直径 $24.1 \pm 3.0 \mu\text{m}$ であった。胞状卵胞では基底膜側の顆粒層細胞は長径 $18.6 \pm 3.1 \mu\text{m}$, 卵胞腔側の顆粒層細胞は円形で長径 $22.5 \pm 5.1 \mu\text{m}$, 卵丘での顆粒細胞は長径 $23.2 \pm 6.4 \mu\text{m}$ であった。また, 排卵直前の胞状卵胞では基底膜側の顆粒層細胞は長径 $18.6 \pm 3.6 \mu\text{m}$, 卵胞腔側の顆粒層細胞は長径 $15.2 \pm 1.6 \mu\text{m}$, 卵丘の顆粒層細胞は長径 17.7

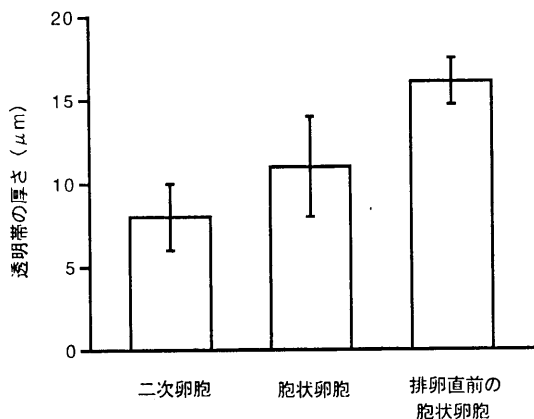


図-2

±3.4 μm であった。

3) 透明帯

透明帯は卵母細胞の直径が 65 μm 程度の大きさで初めて出現し、卵胞の成熟に伴ってその厚さを増した(図-2)。すなわち、二次卵胞では厚さは 8.0 ± 2.0 μm、胞状卵胞では 11.0 ± 3.0 μm であったが、排卵直前の胞状卵胞では厚さ 16.1 ± 1.4 μm であった。

2. 組織化学所見

組織化学的には、卵胞の発育段階では原始卵胞と一次卵胞の卵母細胞の大きさには有意差が認められなかったため、原始および一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、排卵直前の胞状卵胞と分類した。

1) 原始および一次卵胞

卵母細胞は PAS には陰性、AB (pH1.0)、AB (pH 2.5) には陰性もしくは 1 の強度、AB (pH2.5)-PAS 反応には陰性もしくは 1 の強度に青紫色に反応した。レクチンでは MPA、RCA、GS-I および GS-II には 2 の強度に反応し、UEA-I、PNA、WGA、ConA、LPA、DBA および SBA には 1 の強度に反応した。

卵胞上皮細胞は PAS に陰性、AB (pH1.0)、AB (pH 2.5) 反応には陰性もしくは 1 の強度、AB-PAS (pH2.5) 反応には 1 の強度に紫紅色に反応した。卵胞上皮細胞は MPA および RCA-I には 2 の強度に反応し、PNA、

WGA、ConA、LPA、GS-I、GS-II、SBA および UEA-I には 1 の強度に反応した。以上の結果を表-2 に示す。

2) 二次卵胞

卵母細胞は PAS に陰性もしくは 1 の強度で、AB (pH 1.0)、AB (pH2.5) には 1 の強度に青紫色に反応した。レクチンでは卵母細胞は MPA には 3 の強度に反応し、RCA、SBA、GS-I、GS-II、LPA、ConA、WGA および PNA には 2 の強度に反応し、UEA-I には 1 の強度で反応が認められた。

透明帯は PAS、AB (pH1.0) および AB (pH 2.5) には 2 の強度で反応したが、AB (pH2.5)-PAS には 2 の強度で紫紅色に反応した。レクチンでは透明帯は ConA、LPA、GS-I、GS-II、UEA-I および MPA には 1 の強度に反応し、内層、中層および外層においてその反応の差は認められなかった。また SBA、RCA、DBA、WGA および PNA の反応は認められなかった。

基底膜側の顆粒層細胞と他の部位の顆粒層細胞は PAS および AB (pH1.0) には共に陰性もしくは 1 の強度で反応した。AB (pH2.5) には基底膜側の顆粒層細胞は陰性もしくは 1 の強度、AB (pH2.5)-PAS には陰性もしくは 1 の強度で青紫色に反応した。他の部位の顆粒層細胞は AB (pH2.5) には 1 もしくは 2 の強度に赤紫色に反応した。AB-PAS (pH2.5) では 1 もしくは 2 の強度に青紫色に反応した。基底膜側の顆粒層細胞と他の部位の顆粒層細胞は PAS、AB (pH1.0) には差が認められなかった。AB (pH2.5)、AB-PAS (pH2.5) では基底膜側の顆粒層細胞は他の部分より反応が強い傾向が認められた。レクチンでは ConA には基底膜側の顆粒層細胞は 2 の強度に反応し、他の部位の顆粒層細胞は 1 の強度に反応した。基底膜側の顆粒層細胞と卵胞腔側の顆粒層細胞は共に WGA、LPA、SBA、DBA、UEA-I および RCA-I には 2 の強度で、MPA には 3 の強度に反応し、PNA、GS-I および GS-II には 1 の強度に反応した。

卵胞液は PAS に 2 の強度に反応し、AB (pH1.0) および AB (pH2.5) には 3 の強度で青色に反応し、AB

表-2 原始および一次卵胞の組織化学的反応

	PAS	AB (pH1.0)	AB (pH2.5)	AB (pH 2.5)-PAS	ConA	WGA	PNA	LPA	SBA	GS-I	GS-II	MPA	UEA-I	RCA-I
卵母細胞	0	0-1 B	0-1 BP	0-1 BP	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	2 Br	2 Br	2 Br	1 Br	2 Br
卵胞上皮細胞	0	0-1 B	0-1 B	1 M	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	2 Br	1 Br	2 Br

反応の強度: 0: 反応せず, 1: 弱陽性, 2: 陽性

反応色: M: 紫紅色, B: 青色, BP: 青紫色, Br: 褐色

表-3 二次卵胞の組織化学的反応

	PAS	AB (pH1.0)	AB (pH2.5)	AB (pH2.5)-PAS	ConA	WGA	PNA	LPA	SBA	GS-I	GS-II	MPA	UEA-I	RCA-I
卵母細胞	0-1 M	1 B	1 B	1 BP	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	3 Br	1 Br	2 Br
透明帯	2 M	2 B	2 B	2 M	1 Br	0	0	1 Br	0	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	0
顆粒層細胞	基底膜側	0-1 M	0-1 B	0-1 BP	2 Br	2 Br	1 Br	2 Br	2 Br	1 Br	1 Br	3 Br	2 Br	2 Br
	卵胞腔側	0-1 M	0-1 B	0-2 B	1-2 PB	2 Br	2 Br	1 Br	2 Br	2 Br	1 Br	1 Br	3 Br	2 Br
卵胞液	2 M	3 B	3 B	2-3 BP	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	3 Br	2 Br	2 Br

反応の強度: 0: 反応せず, 1: 弱陽性, 2: 陽性, 3: 強陽性

反応色: M: 紫紅色, B: 青色, BP: 青紫色, PB: 赤紫色, Br: 褐色

(pH2.5)-PAS では 2 もしくは 3 の強度に青紫色に反応した。以上の結果を表-3 に示した。

3) 胞状卵胞

卵母細胞は PAS, AB (pH1.0) および AB (pH2.5) には 1 の強度に反応し, AB-PAS (pH2.5) には 1 の強度に青紫色に反応した。GS-I および RCA-I には 3 の強度に反応した以外他の全てのレクチンには 2 の強度に反応した。

透明帯は内, 中および外層に区別出来, 内層は PAS に 3 の強度で, AB (pH1.0) および AB (pH2.5) には 2 の強度で, AB (pH2.5)-PAS には 3 の強度に紫紅色に反応した。レクチンでは ConA, SBA, GS-I, GS-II および MPA は 2 の強度で, WGA および LPA には 1 の強度に反応したが, 他のレクチンでの反応は認められなかった。中層は PAS には 3 の強度で, AB (pH1.0) および AB (pH2.5) には 1 の強度で, AB (pH2.5)-PAS には 3 の強度に紫紅色に反応したが ConA, WGA, LPA および UEA-I には 1 の強度に反応して他のレクチンの反応は認められなかった。外層は PAS, AB (pH1.0) および AB (pH2.5) には 3 の強度で, AB-PAS (pH2.5) には 2 の強度に赤紫色に反応した。ConA, SBA, GS-I, GS-II および MPA には 2 の強度で, LPA および UEA-I には 1 の強度に反応したが他のレクチンでの反応は認められなかった。

基底膜側の顆粒層細胞は PAS, AB (pH1.0), AB (pH2.5) には陰性または 1 の強度に反応し, AB (pH2.5)-PAS には 1 の強度で青紫色に反応し, レクチンは全て 1 の強度に反応した。卵胞腔側の顆粒層細胞は AB (pH1.0), AB (pH2.5) および全てのレクチンに 2 の強度に反応した。卵丘の顆粒層細胞は PAS には 1 もしくは 2 の強度, AB (pH1.0), AB (pH2.5) には 2 の強度に反応し, AB (pH2.5)-PAS では 2 の強度に青紫色に反応し

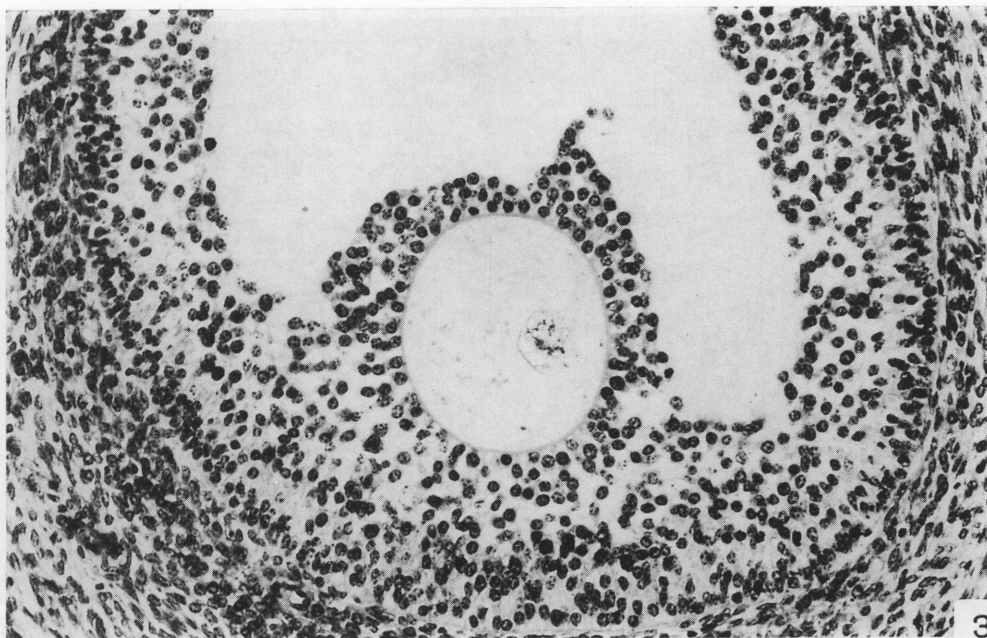
た。卵丘の顆粒層細胞は ConA, GS-II, WGA および MPA には 3 の強度に反応したが他のレクチンには全て 2 の強度に反応した。

卵胞液は PAS には 2 の強度で, AB (pH1.0), AB (pH2.5) には 3 の強度に反応したが, AB (pH2.5)-PAS でも 3 の強度で青紫色に反応した。また, 全てのレクチンでは 2 の強度に反応した。以上の結果を図-3~6, 表-4 に示した。

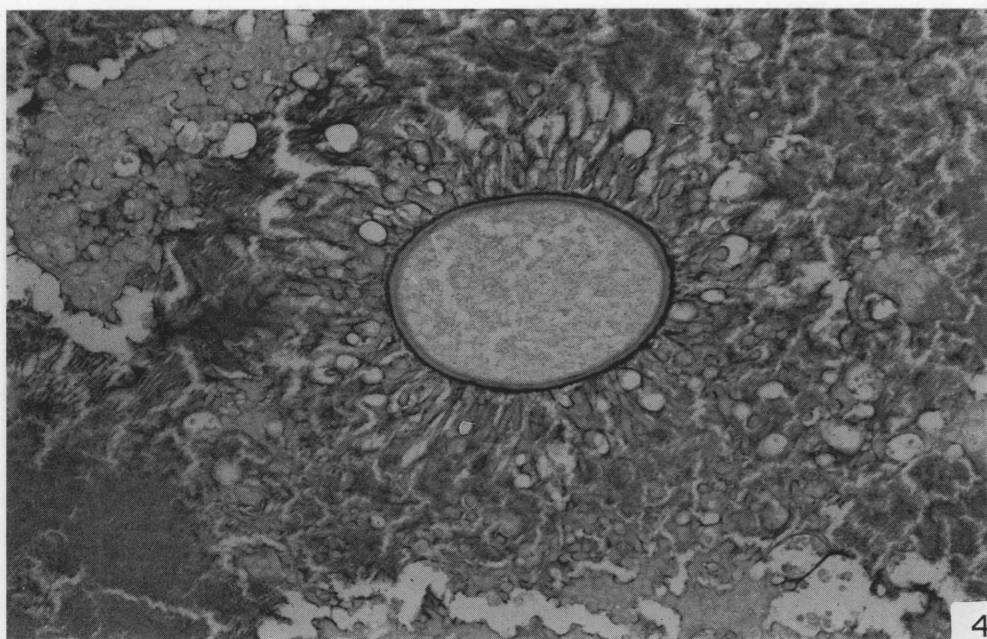
4) 排卵直前の胞状卵胞

卵母細胞は PAS, AB (pH1.0) および AB (pH2.5) には 1 の強度に反応した。AB (pH2.5)-PAS には 1 の強度に青紫色に反応した。レクチンでは WGA, PNA および PCA-I には 3 の強度で, ConA, SBA, GS-I, GS-II および MPA には 2 の強度に反応し, LPA, UEA-I には 1 の強度に反応した。

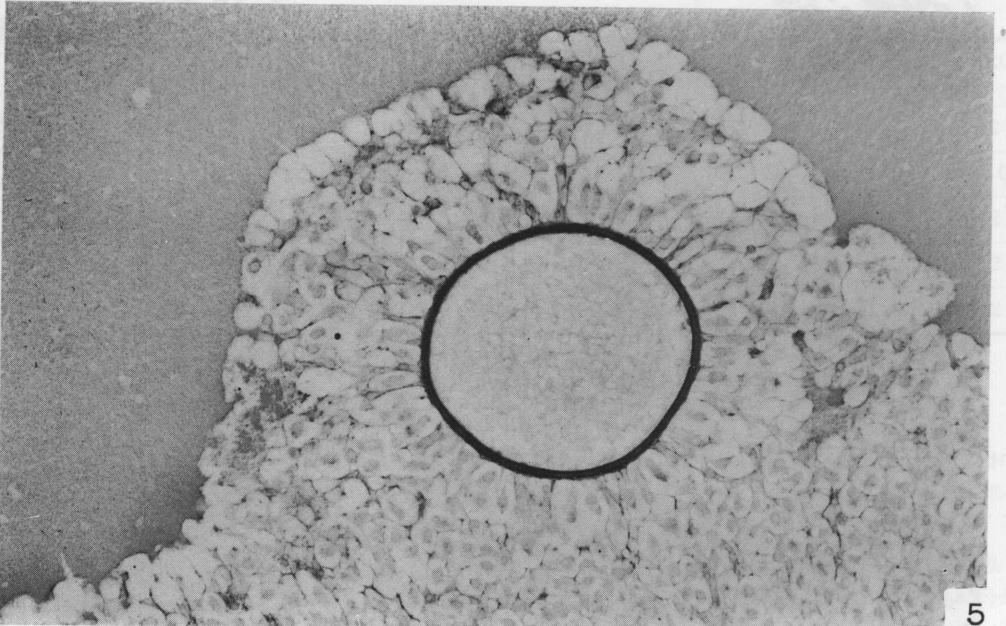
透明帯の内層は PAS および AB (pH1.0) には 3 の強度に反応し, AB (pH2.5) には 2 の強度に反応したが AB (pH2.5)-PAS には 3 の強度に赤紫色に反応した (図-9)。また, レクチンでは WGA および LPA には 2 の強度で, SBA および RCA-I には 1 の強度に反応したが他のレクチンでは反応が認められなかった。中層は PAS には 3 の強度, AB (pH1.0) には 1 の強度で, AB (pH2.5) には 2 の強度に反応したが AB (pH2.5)-PAS では 3 の強度に青紫色に反応した。WGA および LPA には 2 の強度で, SBA および RCA-I には 1 の強度で反応したが, 他のレクチンには反応が認められなかった。外層は PAS には 3 の強度に反応, AB (pH1.0) には 1 の強度, AB (pH2.5) には 2 の強度で, AB (pH2.5)-PAS には 3 の強度に赤紫色に反応した。レクチンのうち GS-I では 3 の強度に, WGA および LPA には 2 の強度で, SBA および RCA-I には 1 の強度に反応したが他のレクチンには反応が認められなかった。



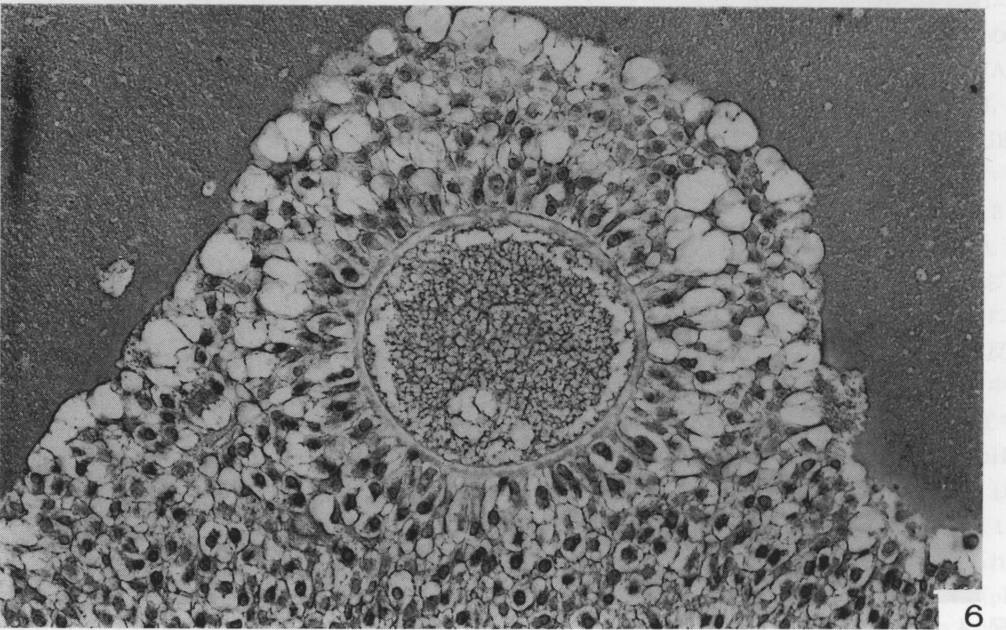
図—3 胞状卵胞の卵母細胞および卵胞上皮細胞質はエオジンに染まり、透明帯は薄く、均一に染色されている。
H-E, $\times 340$.



図—4 胞状卵胞の AB (pH1.0) 反応を示す。卵母細胞、卵胞上皮細胞、卵胞液は陽性反応し、透明帯の外層と内層、特に外層が中層より強く反応している。
 $\times 340$.



図—5 胞状卵胞の AB (pH2.5)-PAS を示す。卵母細胞，卵胞上皮細胞，卵胞液が陽性に反応し，透明帯の内層と外層が中層より強く反応している。
×340.



図—6 胞状卵胞の GS-II を示す。卵母細胞，卵胞上皮細胞卵胞液および顆粒細胞間質物は陽性に反応し，透明帯の内層と外層が陽性，中層には反応しなかった。
×340.

表—4 胞状卵胞の組織化学的反応

	PAS	AB (pH1.0)	AB (pH2.5)	AB (pH2.5)-PAS	ConA	WGA	PNA	LPA	SBA	GS-I	GS-II	MPA	UEA-I	RCA-I
卵母細胞	1 M	1 B	1 B	1 BP	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	3 Br	2 Br	2 Br	2 Br	3 Br
透明帯	透内層	3 M	2 B	2 B	3 BP	2 Br	1 Br	0	1 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	0
	中層	3 M	1 B	1 B	3 BP	1 Br	1 Br	0	1 Br	0	0	0	1 Br	0
	外層	3 M	3 B	3 B	2 BP	2 Br	1 Br	0	1 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	0
顆粒層細胞	基底膜側	0-1 M	0-1 B	0-1 B	0-1 BP	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br	1 Br
	卵胞腔側	0-2 M	0-1 B	0-1 B	0-2 BP	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br
	卵丘	1-2 M	2 B	2 B	2 BP	3 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	3 Br	3 Br	2 Br	2 Br
卵胞液	2 M	3 B	3 B	3 BP	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	

反応の強度: 0: 反応せず, 1: 弱陽性, 2: 陽性, 3: 強陽性
 反応色: M: 紫赤色, B: 青色, BP: 青紫色, Br: 褐色

基底膜側の顆粒層細胞はPASおよびAB (pH1.0) には1の強度で, AB (pH2.5) には2の強度に反応し, AB (pH2.5)-PASでは2の強度に青紫色に反応し, 全てのレクチンは2の強度に反応した。卵胞腔側の顆粒層細胞はPASおよびAB (pH1.0) には2の強度で, AB (pH2.5) には1の強度で, AB (pH2.5)-PASには2の強度に紫色に反応した。卵丘の顆粒層細胞はPASには3の強度で, AB (pH1.0) およびAB (pH2.5) には1の強度に反応しAB (pH2.5)-PASでは2の強度で赤紫色に反応した。レクチンではConA, WGA, GS-II, WGA およびMPAには3の強度に反応したが他のレクチンでは全て2の強度に反応した。

卵胞液はPASおよびAB (pH2.5) には2の強度で, AB (pH1.0) には1の強度に反応したがAB (pH2.5)-PASには2の強度で青紫色に反応した。また全てのレクチンは2の強度に反応した。以上の結果を図-7~10, 表-5に示した。

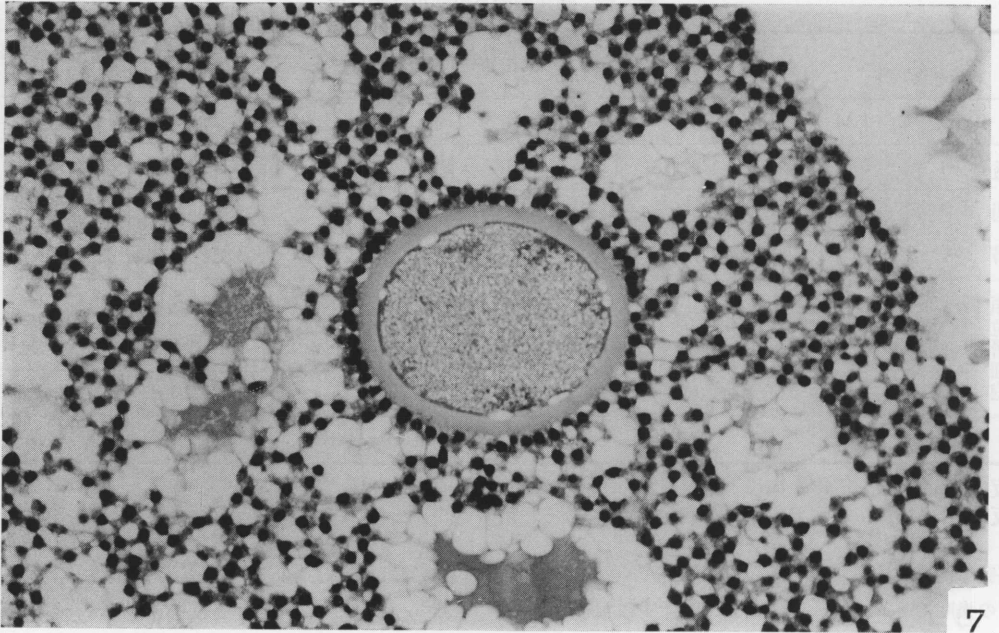
考 察

卵母細胞は原始卵胞から徐々に発育し, 排卵に至るまでの過程でその大きさ, 形および細胞内に含まれる物質が複雑に変化することはすでに知られている^{6,15)}。原始卵胞および一次卵胞での卵母細胞の直径は50 μm 程度で大きさに差が認められなかったが, 二次卵胞から成熟に向かって急速に大きくなり, 排卵直前の卵胞の卵母細胞は直径200 μm 程度の大きさになった。組織化学的に原始および一次卵胞の卵母細胞にはグリコゲンおよびその他のPAS陽性物質が全く含まれていないが, 二次卵胞の卵母細胞で初めて少量のグリコゲンを有し, 胞状卵

胞の卵母細胞では多量のPAS陽性物質を有していた。しかし, いずれの卵胞でもグリコゲン以外の他のPAS陽性物質は含まず, 卵母細胞が成熟するに従ってグリコゲンのみが増加する傾向があると報告されている⁷⁾。ウシの原始卵胞および一次卵胞の卵母細胞の細胞質には酸性複合糖質は存在したが中性糖質は認められず, 二次卵胞および胞状卵胞で少量の中性糖質が存在したにすぎなかった。これらの糖質の反応の強度は, 卵母細胞の成熟に従って強くなり, 胞状卵胞の卵母細胞の細胞質では反応物質は顆粒状になる傾向が認められた。このことは過去の報告^{7,11)} にもあるように, 中性糖質および酸性複合糖質が卵母細胞の成長と発育, 分裂に重要な役割を有することを示唆している。

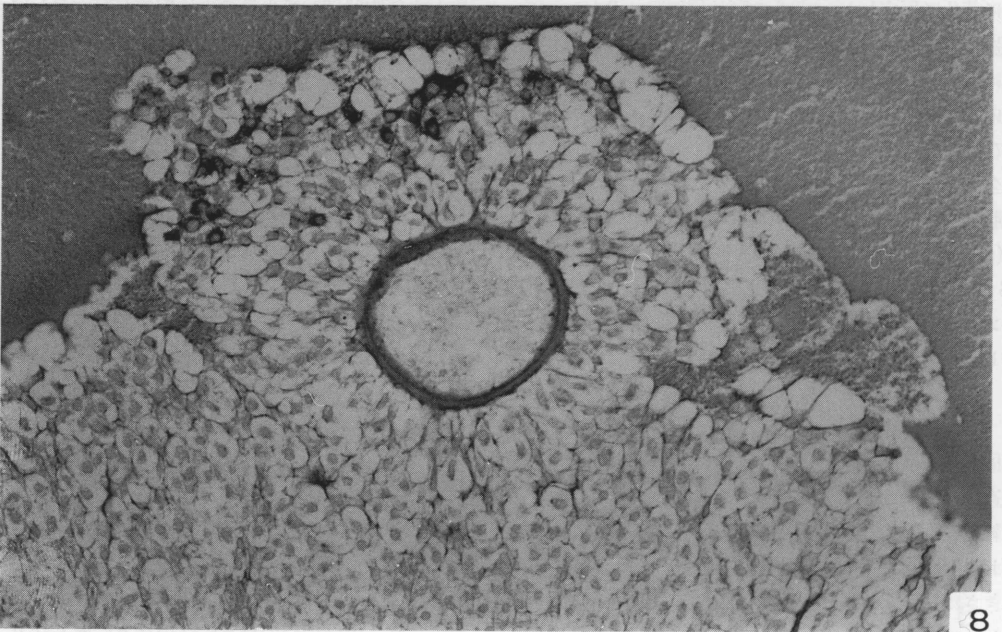
透明帯は哺乳動物の卵母細胞を取り巻く透明で比較的厚い非細胞性の膜構造で, 卵母細胞の保護, イオンの調節および種特異的に精子を認知する重要な役割を果たしている⁸⁾。従来, 透明帯の構成は糖蛋白, 硫酸ムコ多糖類, ヒアルロン酸, シアル酸などのムコ糖質およびムコ糖蛋白質として記述されており, その構造の維持には-SS-結合が含まれていることも知られている⁸⁾。また動物種によって透明帯の構造と組成物質に多少の違いのあることもレクチン反応性を含んだ組織化学的反応によりすでに報告されている^{3-5,12)}。

ウシの透明帯は直径65 μm 程度の卵母細胞で初めて形成され, 卵母細胞の発育に伴い徐々に厚くなり, 胞状卵胞では厚さは11 μm 程度となっていた。排卵直前の胞状卵胞の透明帯は16 μm 程度で排卵直前に透明帯は急速に厚くなることも明らかになった。組織化学的にこの透明帯は厚さ6.5 μm に至るまで全層が一様に中性糖



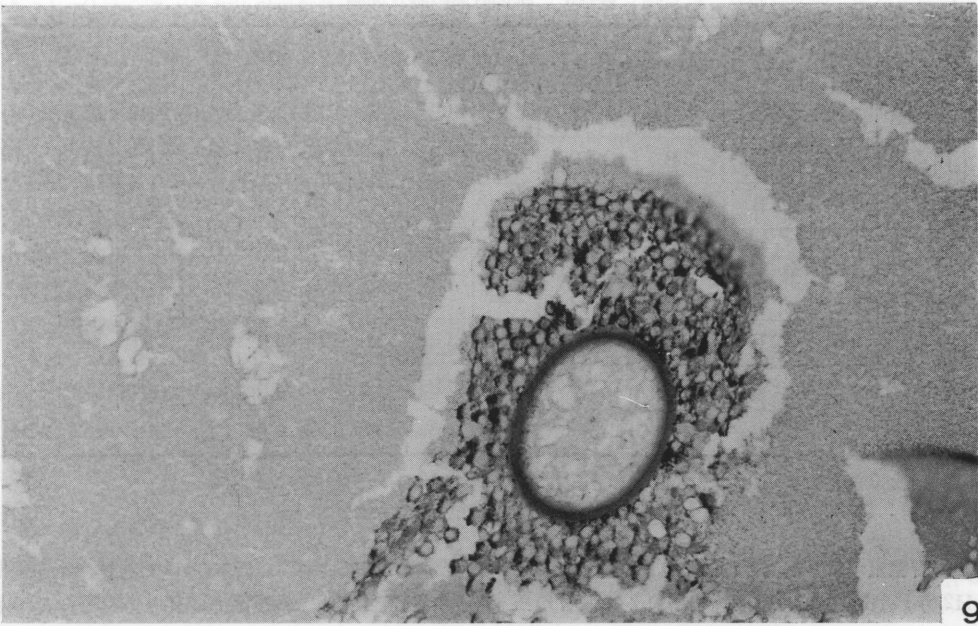
7

図-7 排卵直前の胞状卵胞，卵母細胞はエオジンに濃く染まり，透明帯が厚くてエオジン好性であり，卵丘の顆粒層細胞の核が濃縮し，細胞間隙が拡大，細胞質が変形している。
H-E, $\times 340$.

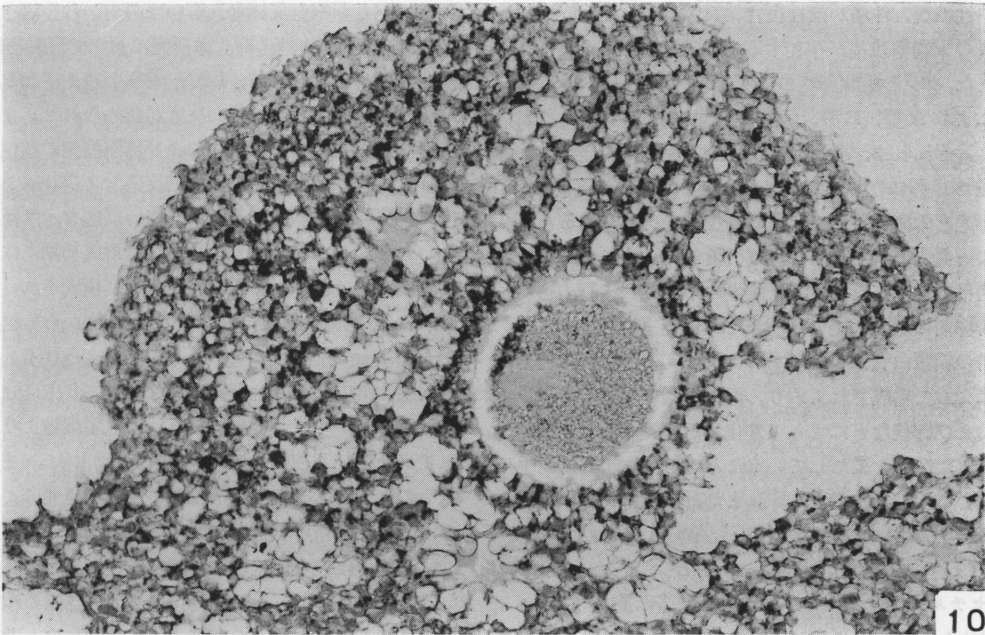


8

図-8 排卵直前の胞状卵胞の AB (pH1.0) 反応を示す。卵母細胞，卵胞上皮細胞，卵胞液および顆粒細胞間質物は陽性反応を示す。
 $\times 340$.



図—9 排卵直前の胞状卵胞の AB (pH2.5)-PAS を示す。卵母細胞および卵胞液が陽性に反応し、透明帯全層の反応は弱いが卵丘の顆粒層細胞の細胞質には顆粒状の反応物質がみられる。
×340.



図—10 排卵直前の胞状卵胞 GS-II の反応を示す。卵母細胞、卵胞上皮細胞液および顆粒層細胞間質物は陽性に反応し、透明帯には反応はみられなかった。
×340.

表-5 排卵直前の胞状卵胞

		PAS	AB (pH1.0)	AB (pH2.5)	AB (pH 2.5)-PAS	ConA	WGA	PNA	LPA	SBA	GS-I	GS-II	MPA	UEA-I	RCA-I
卵母細胞		1 M	1 B	1 B	1 BP	2 Br	3 Br	3 Br	1 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	1 Br	3 Br
透明帯	内層	3 M	3 B	2 B	3 PB	0	2 Br	0	2 Br	1 Br	0	0	0	0	1 Br
	中層	3 M	1 B	2 B	3 PB	0	2 Br	0	2 Br	1 Br	0	0	0	0	1 Br
	外層	3 M	1 B	2 B	3 PB	0	2 Br	0	2 Br	1 Br	3 Br	0	0	0	1 Br
顆粒層細胞	基底膜側	1 M	1 B	2 B	2 PB	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br
	卵胞腔側	2 M	2 B	1 B	2 PB	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br
	卵丘	3 M	1 B	1 B	2 PB	3 Br	3 Br	2 Br	2 Br	2 Br	3 Br	2 Br	3 Br	2 Br	2 Br
卵胞液		2 BP	1 B	2 B	2 BP	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br	2 Br

反応の強度：0：反応せず，1：弱陽性，2：陽性，3：強陽性

反応色：M：紫紅色，B：青色，BP：青紫色，PB：赤紫色，Br：褐色

質と酸性複合糖質により構成され、それ以上厚くなると AB (pH2.5)-PAS 反応では内層、中層および外層の三層に分かれて反応した。透明帯の内層と外層には主として酸性糖質が存在するが透明帯の中層には中性糖質が主として存在していることも明らかにされた。哺乳類の透明帯は組織化学的に二層あるいは三層の層状構造で、内層は中性糖質、外層が酸性複合糖質に富み、その表面には種々の末端糖残基が存在すると報告されている^{3-5,11,12)}。また、ウシの胞状卵胞の透明帯は AB (pH2.5)-PAS 反応により A 型、B 型、C 型の三型にすでに分類されており、それらは、卵母細胞の成熟に伴って A 型から B 型を経て C 型になると報告されている¹¹⁾。この三型に卵胞の形態と本研究での組織化学的反応とを加味すると、A 型の透明帯は卵胞洞が形成される時期のもので、B 型の透明帯は卵丘が形成された時期のもので、C 型の透明帯は排卵前の胞状卵胞の透明帯であると推察される。透明帯の糖蛋白質は ZP-1、ZP-2、ZP-3 と呼ばれる複合糖質によって構成されており、卵母細胞の成熟、排卵、受精および卵割などによって変化する糖鎖が細胞生理学的に重要な機能を果たしていることが組織化学的研究手法を用いて報告されている¹²⁾。また、ハムスターの卵母細胞の透明帯では ConA、RCA-I、WGA に対して反応性のあるマンノース、グルコース、D-ガラクトース、N-アセチルグルコサミンが精子が透明帯に進入することを阻止し、ブタおよびヒトの透明帯もハムスターの透明帯と同様に RCA-I、ConA、WGA と結合性のあることもすでに明らかにされている⁶⁾。しかしウシの透明帯の全層は ConA、WGA、LPA、UEA-I の結合性が認められたが、RCA-I および PNA に対する反応は全く認め

られなかった。これらのことは哺乳動物の透明帯を組成する複合糖質には共通性があると共に種により特有のものがあると事が考えられ、透明帯の複合糖質の種特異性が精子の認知および通過を左右するものであることも十分に推察される。

透明帯の起源については多くの説があり主なものでは卵母細胞と卵胞上皮細胞あるいは両方から分泌されていると報告されている^{6,10)}。本研究において形成初期の透明帯に結合した ConA、LPA、GS-I および MPA は卵母細胞の細胞膜直下に強い反応が認められた。また胞状卵胞では卵丘の顆粒層細胞および卵胞腔側の顆粒層細胞が PAS、AB などの組織化学的反応およびレクチン反応では基底膜側の顆粒層細胞より強い反応を示す傾向が認められた。このことより、透明帯は形成初期には主に卵母細胞から分泌される複合糖質により構成され、形成末期では主に卵母細胞と卵丘の顆粒層細胞から分泌される糖質によって構成されているものと考えられる。これは透明帯を構成する複合糖質は卵母細胞より主に分泌されているが、いくつかの複合糖質は顆粒層細胞より分泌されているという佐々木¹⁰⁾の報告と一致した。また、小泉⁶⁾のハムスターの顆粒層細胞の電顕的研究により明らかにされた卵丘の顆粒層細胞と卵胞腔側の顆粒層細胞のゴルジ装置は他の部位の顆粒層細胞よりも良く発達していることからこれらの分泌作用が他の部位の顆粒層細胞より盛んであることを示唆するものであると考える。

卵胞液は卵母細胞に対して適正な成長環境およびイオンの調整などを保つ役割を果たし、その由来は卵母細胞および卵胞膜の細胞により分泌されていると報告されている¹⁶⁾。今回の研究でも卵胞液には中性糖質と酸性複合

糖質が含まれており、その作用も卵母細胞に対して適正な成長環境およびイオンの調整などを保つなど、過去の報告⁶⁾と同様のものであると考える。

また排卵直前の胞状卵胞の卵母細胞は小さくなり、透明帯は厚く、卵丘の顆粒層細胞の細胞間隙が拡大し、細胞核が幼弱化、細胞質の変形などの変化が認められた。この卵丘の顆粒層細胞の変化はラットなどで報告されているものと一致している。また本研究では排卵直前の胞状卵胞の透明帯が AB (pH2.5)-PAS には全層一様に反応し、糖質の組成および分布パターンも胞状卵胞の透明帯と異なっていることが明らかになった。この現象が成熟卵胞の排卵直前の特徴であるのか、過剰排卵処置を施すために使用したホルモンによる影響なのかは今回明らかにする事は出来なかった。

要 約

ウシ卵胞の発育に伴う卵母細胞、卵胞上皮細胞、透明帯と卵胞液の形態および複合糖質の変化を組織化学的方法を用いて検索した。

卵母細胞は二次卵胞より急激に大きさを増し、そこに含まれる複合糖質も卵胞の発育に伴って増加していた。卵胞上皮細胞も卵胞の発育に伴って、徐々に大きくなり二次卵胞の基底膜側の顆粒層細胞の長径が最大であった。透明帯は三層より構成され、全層に中性糖質が存在し、内層と外層には中性糖質の他、酸性複合糖質が存在していることも明らかになった。

ホルモンによる過剰排卵処置を施したウシの排卵直前の卵胞の卵母細胞は小さく、透明帯が厚く、含まれている複合糖質の組成が変化していることも明らかになった。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、留学と研究の機会を与えて下さった中国内モンゴル農牧学院院長鳥尼先生、副院長包彬先生、学校法人酪農学園理事長遊佐孝五先生、園長牛島純一先生、酪農学園大学学長平尾和義先生および両大学教職員一同に深謝いたします。

文 献

1) 赤堀泰一郎, 1980. 卵胞の発育, ステロイド産生

における顆粒膜・莢膜細胞群の機能的相関, 臨婦産, 8: 57-588.

- 2) Franchi, L. L. and Ryan, K. D. 1973. Oogenesis and follicular growth. *In*: Human reproduction conception and contraception. E.S.E. and T.N. Evans (eds). J. Reprod. Fert. Suppl. 30: 75-90.
- 3) 藤原孝彦, 1984. ブタの卵胞に於ける複合糖質の組織化学的研究. 酪農学園大学獣医学研究科修課程課題研究成績綴, 1984.
- 4) 長谷川美知子, 1978. ヒト及びブタ卵胞のレクチン結合能に関する研究. 日本不妊学会雑誌, 3: 47-55.
- 5) Kimura, J. 1989. Cytochemistry of glycoconjugates in the hamster zona pellucida associated with oocyte maturation. Cell biology international reports 3: 975-976.
- 6) 小泉 攻, 1986. ハムスター卵胞に於ける顆粒層細胞の微細構造. 新潟大学農学部研究報告, 38: 39-47.
- 7) 宮本 元, 1985. ウシ卵巣の組織化学. 日畜会報, 7: 539-549.
- 8) 新村末雄, 1985. ニホンザルの卵胞内卵母細胞に於けるタンパク質, 脂質及び多糖類の組織学的観察. 実験動物, 1: 73-76.
- 9) 日本組織細胞学会編. 組織細胞化学, 1989.
- 10) 佐々木博之, 1991. 卵巣内卵子の微細構造と卵子透明帯に於けるレクチン結合性について. 産婦人科の世界, 9: 11-17.
- 11) 重信隆夫, 1938. ウシの卵胞に於ける複合糖質の組織化学的研究. 酪農学園大学獣医学研究科修士課程課題研究成績綴, 1983.
- 12) Tadano, T. and Yamada, K. 1979. The histochemistry of complex carbohydrates in the ovarian follicles of adult mice. Histochemistry. 57: 203-215.
- 13) 高岡波留人, 1985. 卵子の顆粒細胞増殖促進因子と伝達系. 日本産婦人科学会雑誌, 1: 92-98.
- 14) 田中俊誠, 1992. ヒト LH-CG レセプターの特徴. 医学のあゆみ, 4: 209-220.
- 15) 豊田 裕, 1978. 卵子. 畜産大事典, 259.
- 16) 山下和雄, 1980. 卵巣の微細構造. 細胞, 12: 6-14.

Summary

The morphology and histochemistry of complex carbohydrates of oocytes, follicular epithelial cells, zona pellucida and liquor folliculi in bovine follicles were examined by using histochemical methods.

The oocytes increased in size and the quantity of carbohydrates in the antrum increased in quantity in proportion to follicular growth after secondary follicle. The granulosa cells on the basal lamina were columnar, being the highest in the secondary follicles. Three layers could be distinguished the zona pellucida, which contained neutral carbohydrates throughout the three layers, and acid carbohydrates in the outer and inner layers. The oocytes just before ovulation in the bovine treated with hormones for superovulation were small, but the pellucidae were thick. The components of the carbohydrates in the zona pellucida were also altered.