

日本ウズラにおける卵殻表面色素の貯留及び放出に関する生理学的研究

宗, 知紀
Graduate School of Agriculture, Kyushu University

<https://doi.org/10.11501/3088180>

出版情報：九州大学, 1991, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：

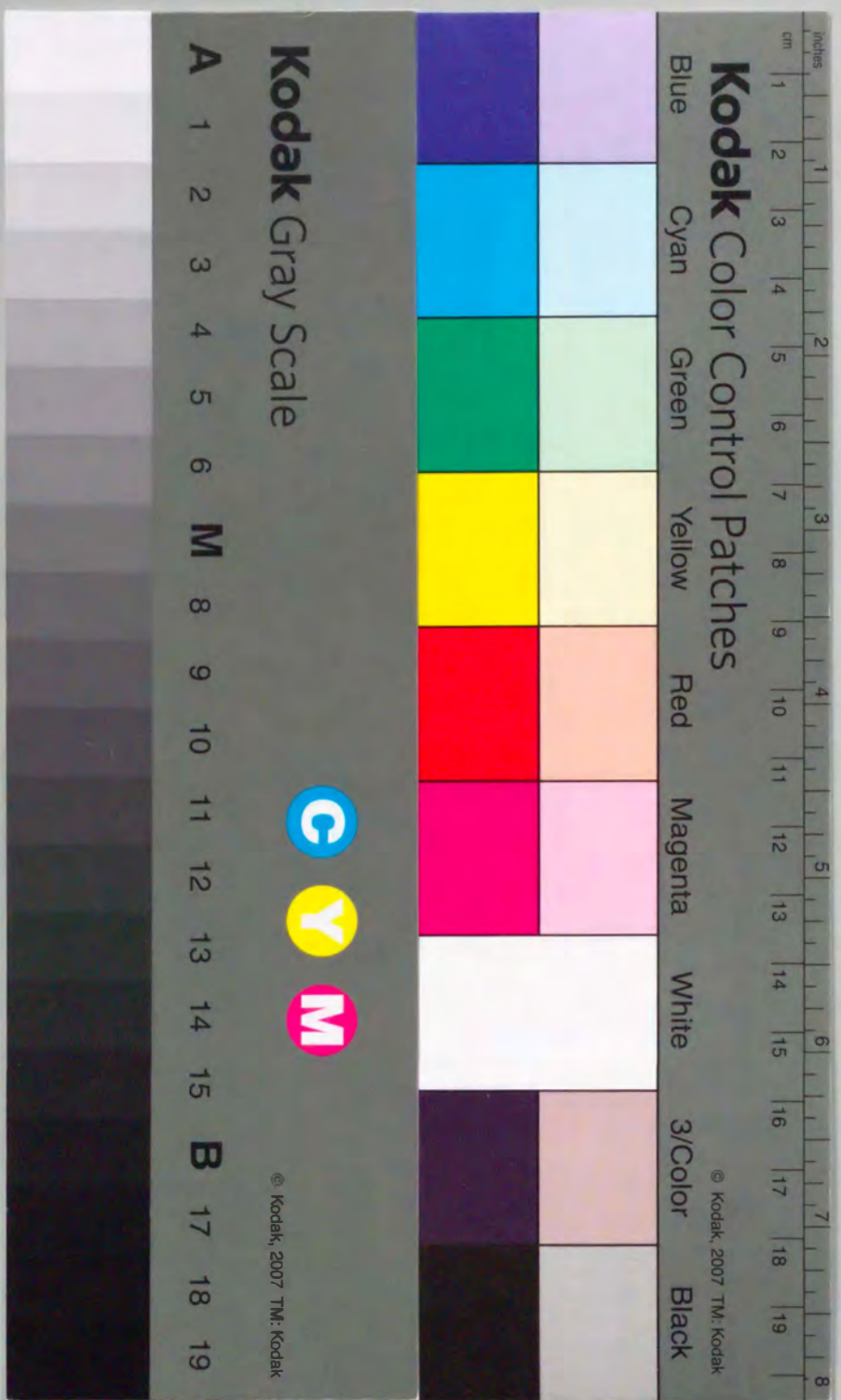


日本ウズラにおける卵殻表面色素の貯留
及び放出に関する生理学的研究

崇 知 社

1992

日本ウズラにおける卵殻表面色素の貯留



①

日本ウズラにおける卵殻表面色素の貯留
及び放出に関する生理学的研究

宗 知 紀

1 9 9 2

目次

第1章 緒論1
第2章 卵殻腺部における色素の貯留及び卵殻への沈着	
第1節 卵殻腺部における貯留色素量の変動及び斑紋形成過程	
(1) 卵殻腺部における貯留色素量の経時的変動8
(2) 卵殻腺部における色素貯留及び卵殻表面における斑紋形成の過程13
第2節 卵殻腺部における貯留色素の分布と卵殻表面の斑紋との関連22
要約31
第3章 卵殻腺部の色素貯留と排卵機構との関連	
第1節 卵殻腺部における色素貯留と排卵された卵子の卵管通過刺激との関連33
第2節 卵殻腺部の色素貯留と排卵の誘起要因との関連	
(1) フェノバルビタール投与による排卵阻止が卵殻腺部の色素貯留に及ぼす影響39
(2) 排卵20時間前の卵胞切除が卵殻腺部の色素貯留に及ぼす影響43
第3節 卵殻腺部の色素貯留に対するステロイドホルモンの関与49
要約64

第4章	卵殻腺部からの色素放出に対する誘起要因	
第1節	卵殻腺部からの色素放出に対するプロスタグランディンの関与	…67
第2節	プロスタグランディンの色素放出作用に対する卵殻腺部の反応性	…76
第3節	プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ の卵殻腺部内投与が卵殻形成に及ぼす影響	…84
	要約	…91
第5章	総合論議	…93
	総括	…103
	謝辞	…107
	文献	…108

第1章 緒論

鳥類は硬い殻を持つ卵を産卵し、それを体外で孵化させて繁殖する。この硬い殻すなわち卵殻は、主として炭酸カルシウムの結晶層からなり、水分の保持、細菌等の侵入阻止、胚の発育に必要なガス交換の調節及び胚へのカルシウム供給に貢献している。卵殻は内側から乳頭層、スポンジ層及びクチクラ層の3層に分けられ、スポンジ層が実質的な卵殻である。また、卵殻には色素が含まれていることが多く、一見白色に見える卵殻でも色素が存在しない場合の方が少ない (Kennedy and Vevers, 1975)。スポンジ層に存在する色素は ground pigment、クチクラ層に存在する色素は superficial pigment と、それぞれ区別して呼ばれている (Romanoff and Romanoff, 1949)。日本ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) の卵はこの色素の両者とも含み、卵殻表面には多量の superficial pigment が沈着して黒褐色の斑紋となり、卵殻全体は ground pigment によって淡い青緑色あるいは黄褐色を呈している。黒褐色の色素はポルフィリン化合物であることから、総称してオーポルフィリンと呼ばれ (Romanoff and Romanoff, 1949)、一方、青緑色の色素は胆汁色素として知られているピリベルジンであることが報告されている (Lemberg, 1934; Poole, 1965)。近年では、卵殻色素のほとんどがプロポルフィリンIV及びピリベルジンとその亜鉛キレートであることが明らかにされている (Kennedy and Vevers,

1975)。その他、鶏の褐色卵殻中にはウロポルフィリン及びコプロポルフィリンも、わずかに存在することが見いだされている (With, 1973)。

Romanoff and Romanoff (1949) は卵殻のポルフィリンもビリベルジンも、赤血球が破壊されて作られるとしている。すなわち、ポルフィリンについては、ヘモグロビンが卵殻腺部粘膜のリンパ細胞によって、色素塊 (pigment mass) に作り変えられるとし、ビリベルジンについては、血中に溶出したヘモグロビンがヘマチンとなり、肝臓でビリベルジンに変えられた後、血液によって卵殻腺部まで運ばれて来ると述べている。しかし、現在ではポルフィリンの生合成過程が明らかになり、赤血球が分解されて作られるのはビリベルジンだけとされている (Hudson and Smith, 1975)。ポルフィリンは生体内の多くの組織において生成されており、そのさまざまな誘導体は生化学的に重要な役割を果たしている。ポルフィリンの生合成の過程は次のように要約される (Granick and Sassa, 1971)。すなわち、ミトコンドリア内で δ -アミノレブリン酸合成酵素 (ALAs) の作用によって、グリシンとスクシニル CoA から δ -アミノレブリン酸 (ALA) が合成され、これが細胞質へ移動した後、 δ -アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAd) によって脱水縮合され、ピロール核を持つポルフォビリノゲンが生成される。ポルフォビリノゲンの4分子が結合してコプロポルフィリノゲンに代謝された後、再びミトコンドリア内に移動し、プロトポルフィリノゲンを経てプロトポルフィリンとなるというものである。

Kennedy and Ververs (1973) は赤血球がポルフィリンを合成し得ること (Dresel and Falk, 1954) から、卵殻色素のポルフィリンは赤血球から誘導されると考えた。しかし、その後赤血球由来説を支持する結果は報告されていない。Polin (1957) は褐色卵及び白色卵を産出する鶏から得た卵殻腺部の組織懸濁液に、ALA を加えて試験管内で反応させたところ、いずれからもポルフィリンが合成されたと報告し、また Stevens *et al.* (1974) は鶏の卵殻腺部の組織懸濁液にグリシンとスクシニル CoA を加え、試験管内で ALA を合成し得たこと、及びその合成能は卵管内に卵が存在しないときに高く、また褐色卵を産出する鶏の方が白色卵を産出する鶏より高いことを示した。ウズラについては、Poole (1966) 及び Lucotte *et al.* (1975) が Polin と同様の実験を行い、ウズラの卵殻腺部においても ALA からポルフィリンを合成し得ることを示し、Yamada (1972) は卵殻腺部の ALAd 活性は卵殻腺部で卵殻が形成されている時期にもっとも高いことを報告した。さらに、鶏及びウズラの卵殻腺部における ALAs あるいは ALAd の活性は、ステロイドホルモンの投与によって高められることも報告されている (Miller and Kappas, 1974; Yamada, 1972; Tsushima and Yamada, 1988)。

Tamura *et al.* (1965) はウズラの卵殻腺部組織を光顕的に観察し、粘膜上皮の apical cell に色素顆粒が存在することを報告した。彼らはこの細胞内の顆粒が卵殻表面の色素沈着直前に最も多く、色素沈着後では大きく減少したことから、この顆粒が分泌されて卵殻表面のクチクラ色素となること

及び卵殻腺部の色素顆粒と卵殻表面色素は、その吸収スペクトルからポルフィリンと同定されることを明らかにした。同様の結果は Poole (1967) によっても報告されている。一方、Baird *et al.* (1975) は粘膜に貯留される色素がポルフィリンであることを支持したが、apical cell ですべてのポルフィリンが合成されることは量的にほとんど有り得ないと述べ、血液あるいは卵殻腺部の腺細胞からポルフィリンあるいはその前駆物質が供給されるという可能性を論じている。しかし、現在までその点に関する実験的証明はなされていない。

鶏の卵殻色素は卵殻形成の初期から沈着されているが、卵殻の全色素量の 50 ~ 74% は卵が卵殻腺部に滞留する時間の終期 5 時間の間に沈着されること、及び七面鳥の卵殻にみられる斑点は、卵殻形成開始後 13 時間から放卵直前の間に沈着され、沈着中の色素は容易に指で剥離し得ることが示されている (Warren and Conrad, 1942)。また、Schwartz *et al.* (1975) は鶏の褐色卵の色素はクチクラ層にも存在することを確認し、Lang and Wells (1987) は褐色卵のクチクラ層を除くと、卵殻表面の反射率が上昇することを報告した。

ウズラは卵殻表面に多量の色素が斑紋状に沈着した卵を産出する。Woodard and Mather (1964) は放卵後のさまざまな時期にウズラを剖検し、卵殻表面色素の沈着が開始されるのは前卵放卵の 21.5 時間後であることを示した。Poole (1965) は推定放卵時刻 2 時間前では同 3 時間前の値と比較して、卵殻腺部の抽出液中のポルフィリン濃度が急激に減少し、そ

のとき卵殻腺部内の卵の卵殻表面に色素が沈着されていたことを報告した。田中ら(1977)はオキシトシンを用いて形成中の卵の放卵を誘起して色素沈着の状態を観察し、さらに卵殻腺部を通して色素沈着の過程を肉眼的に観察した結果、推定放卵時刻2.8時間前ごろから色素の沈着が開始され、その約30分後には斑紋のおおよその模様が完成すると述べている。これらの報告から、ウズラの卵殻表面の色素沈着は推定放卵時刻3時間前から同2時間前の間に開始されると考えられる。一方、卵殻のground pigmentであるピリベルジンは、卵殻形成の進行に伴って分泌され沈着されるものと考えられている(Woodard and Mather, 1964)。

ウズラ卵の卵殻表面にみられる斑紋の形状は個体によって特有であり、それによって産卵した個体を識別し得る(Jones *et al.*, 1964)。Lucotte(1975)は卵殻斑紋を色及び形で分類し、それがポリジーンによって決定され、主に雌の遺伝子型によるものであると報告した。斑紋の形成要因については、卵殻形成終期における卵殻腺部内のpHの局所的な変化(El Jack and Lake, 1967)によって、不均一な色素の沈着が起こるという考えを述べたもの(Baird *et al.*, 1975)、及び卵殻腺部粘膜上皮の色素分泌能が一様ではなく、高い分泌能を持つ細胞が偏在することによって斑紋が形成されるという推論を述べたもの(田中ら, 1977)があるが、いずれも実験的には明らかにされていない。

ウズラの卵殻斑紋の遺伝的変異としては、卵殻色素が極端に少ない白色卵殻(white egg-shell, WE)が知られており、

この変異は常染色体上の劣性遺伝子によって支配されている (Poole, 1964)。この WE 系のウズラはアルビノとは異なり、卵殻色以外の形質は正常のウズラと変わらないので実験動物として広く用いられている。そのほか、卵殻全体が赤みがかった変異として red egg-shell (R) (Hardiman *et al.*, 1975)、卵殻色素が少ない変異として celadon (CE) (Ito *et al.*, 1988) など報告されている。

以上述べたように、日本ウズラの卵殻表面色素は、卵形成中にポルフィリンが色素顆粒として卵殻腺部粘膜上皮の apical cell に貯留され、推定放卵時刻の 2～3 時間前に放出されて卵殻表面に沈着したものである。しかし、卵殻腺部粘膜上皮の apical cell における色素の貯留と放出に関する要因については現在までまったく明らかにされていない。また、卵殻表面に色素が沈着し、斑紋が形成される過程も十分には観察されていない。本研究は日本ウズラにおける卵殻表面色素の貯留及び放出に関する要因について、卵形成の機構との関連の下に生理学的見地から解明しようとしたものである。

第 1 章では鳥類の卵殻色素及びウズラの卵殻表面色素に関する従来の知見について概説し、同時に未だ解明されていない諸問題について記述した。これらの問題点を解明するため、第 2 章では卵殻腺部における色素の貯留と放出並びに卵殻表面における色素沈着の過程を肉眼及び顕微鏡的に観察し、斑紋の形成要因について検討した。第 3 章では卵殻腺部における色素の貯留と排卵機構との関連を追究し、

第4章では卵殻腺部に貯留された色素の放出に關与する要因について検討した。さらに、第5章では各章で得られた結果を総合し、卵殻表面色素の卵殻腺部における貯留、放出及び卵殻表面への沈着を支配する機構について論議した。

第4章では卵殻腺部に貯留された色素の放出に關与する要因について検討した。さらに、第5章では各章で得られた結果を総合し、卵殻表面色素の卵殻腺部における貯留、放出及び卵殻表面への沈着を支配する機構について論議した。

第2章 卵殻腺部における色素の貯留及び卵殻への沈着

第1節 卵殻腺部における貯留色素量の変動及び斑紋形成過程

(1) 卵殻腺部における貯留色素量の経時的変動

緒言

ウズラの卵殻表面色素であるポルフィリンは、卵殻腺部粘膜上皮の apical cell に貯留されることが明らかにされている (Tamura *et al.*, 1965; Poole, 1967)。顕微鏡的観察では、apical cell 内の色素顆粒は卵形成の進行とともに増加し、卵殻表面への色素沈着後は減少する (Tamura *et al.*, 1965; Tamura and Fujii, 1966)。Woodard and Mather (1964) は放卵後のさまざまな時期に卵殻腺部内の卵を観察した結果、卵殻表面に色素が沈着されるのは前卵放卵 21.5 時間後、すなわち放卵間隔が 24 時間に近い個体であれば放卵の 2.5 時間前であることを示した。卵殻表面に対する色素沈着の開始時期については他にも報告があり (Poole, 1965; 田中ら, 1977)、これらを総合すると、沈着開始時期は推定放卵時刻 3 時間前と同 2 時間前の間であると推定される。

以上のように、卵殻腺部の貯留色素量についてのおおよその変動は推定可能であるが、実際に排卵後の時間経過に

沿って貯留色素量を測定した報告はない。したがって、排卵周期中の貯留色素の動態を明らかにするため、本実験では、まず卵殻腺部における貯留色素量の経時的変動について検討した。

材料及び方法

動物：実験に用いた日本ウズラは養鶏業者から購入したウズラを基礎とし、以後当教室で維持している繁殖集団の中から選んだものである。ウズラは1日16時間(5:00.~21:00)の照明下で、単飼ケージで飼育し、飼料(CP: 23%, ME: 2800 Kcal/Kg)及び水は自由摂取とした。放卵時刻はケージに設置した自製の放卵記録装置によって毎日記録し、12~48週齢で放卵間隔がほぼ24時間である連産中の個体を実験に供した。

材料の採取：クラッチ内の卵(Cs)の排卵2時間後から同24時間後まで2時間間隔で、それぞれ6~10羽のウズラをと殺した。と殺後ただちに卵殻腺部を摘出し、湿重量を測定後、色素抽出時まで-20℃下で保存した。なお、卵管内の卵の位置及び形成中の卵の状態から、排卵がほぼ正常な時刻に行われていたことを確認した。

色素の抽出及び測定：色素の抽出はPolin(1957)の方法に準拠した。すなわち、小型のはさみで細切した卵殻腺部をガラスホモジナイザーに投入し、3N-HCl溶液20mlを加えてホモジナイズした。この組織懸濁液を遠心分離用のプラスチ

ックチューブに移し、暗所に室温で一晩放置した。その後約10,000 × gで30分間遠心分離を行い、上澄液を50mlのメスフラスコに移し、ただちに再び暗所に置いた。残渣に20mlの3N-HCl溶液を加えてガラス棒で丁寧に攪拌し、再び懸濁液にして暗所に室温で一晩放置した後、上記と同様に遠心分離した。ここで得られた上澄液を前述の上澄液に加え、3N-HCl溶液で液量を50mlとした。この抽出液をさらに3N-HCl溶液で3倍に希釈し、分光光度計(日立101型)を用い波長410nmで吸光度を測定した。色素量はプロトポルフィリンIV(Sigma Chemical Co.)を用いてあらかじめ作製した標準直線から算出した。

統計処理：平均値の差の検定はStudentのt検定あるいはCochran and Coxの近似法(Snedecor and Cochran, 1980)を用いた。

結 果

排卵周期中における卵殻腺部の貯留色素量を経時的に測定し、その結果を表2-1に示した。貯留色素量は排卵2時間後に最小値を示し、その後ほぼ直線的に増加して18及び20時間後に最高値に達した。これに対し、22時間後では再び急激に減少し、24時間後もこれと同程度の値を示した。また、と殺時に卵殻腺部に存在していた卵の卵殻表面には、排卵20時間後まで色素沈着はまったく観察されなかったが、22時間後ではすべての個体で卵殻表面に沈着した色素

表 2-1 卵殻腺部における貯留色素量の経時的変動

排卵後の時間	個体数	貯留色素量 ¹⁾ ($\mu\text{B/g tissue}$)
2	6	31 ± 5^a
4	6	45 ± 13^{ab}
6	6	59 ± 19^{bc}
8	6	69 ± 21^{cd}
10	7	97 ± 29^{de}
12	9	125 ± 19^f
14	10	123 ± 31^f
16	8	130 ± 37^{ef}
18	9	152 ± 49^f
20	7	144 ± 30^f
22	6	62 ± 27^{bc}
24	9	50 ± 41^{abc}

1) 平均値 \pm 標準偏差、異符号間に有意差あり($p < 0.05$)。

が認められた。

考 察

卵殻腺部の貯留色素量を経時的に測定した結果、色素は排卵後徐々に卵殻腺部に貯留され、排卵 18 ~ 20 時間後に最大となり、22 時間後には最大値の 1/2 量以下に減少し、同時に形成中の卵の卵殻表面に色素沈着が観察された。この結果はこれまでの報告 (Tamura *et al.*, 1965; Tamura and Fujii,

1966; Poole, 1965; Woodard and Mather, 1964; 田中ら, 1977) とよく一致していた。Poole (1965) は推定放卵時刻3時間前から同2時間前の間に、卵殻腺部抽出液中の色素濃度が1/2以下に減少することを示した。また、田中ら(1977)は肉眼的観察によって、色素沈着の開始が確認された後30分程度で、卵殻表面の斑紋形成がほぼ完成すると報告している。したがって、卵殻腺部の貯留色素は短時間で大量に放出されるものと考えられる。本実験では卵殻腺部の貯留色素量は卵の形成に伴って増加し、排卵22時間後すなわち推定放卵時刻の2時間前には放出され減少していることが観察された。しかし、排卵24時間後の値と排卵2時間後の値とを比較すると、前者の方が高かったことから、貯留されていた色素が放卵前にすべて放出されるのではなく、一部の色素は色素沈着後もなお卵殻腺部に残留していることが明らかになった。

(2) 卵殻腺部における色素貯留及び卵殻表面における斑紋形成の過程

緒言

前項では、卵殻表面色素は卵形成の進行とともに卵殻腺部に貯留され、推定放卵時刻の2時間前までに放出されることを明らかにした。この色素は卵殻腺部粘膜上皮のapical cellに顆粒として認められることが示されている(Tamura *et al.*, 1965; Poole, 1967)。色素顆粒は卵殻膜形成のころからapical cellの内腔側に観察され始め、卵殻形成中に著しく増加し、卵殻完成に伴って放出されること(Tamura and Fujii, 1966)が報告されている。田中ら(1977)は斑紋の形成過程を肉眼的に観察し、はじめ色素は卵殻表面上に点状に沈着され、その斑点が次第に大きくなり、卵殻腺部の運動とともに拡大されて斑紋状になることを報告した。しかし、この斑紋形成過程と関連させて、卵殻腺部粘膜上皮の変化を光顕的に観察した報告はなされていない。

本実験では排卵周期中の卵殻腺部における貯留色素の動態を明らかにするため、色素の貯留と放出及び卵殻表面における斑紋形成の過程を肉眼的及び光顕的に観察した。

材料及び方法

動物：ウズラは前項と同様の条件で飼育し、12～48週齢で放卵間隔がほぼ24時間である連産中の個体を選び実験に供した。

試料の採取及び観察の方法：斑紋の形成過程を観察するため、ウズラを推定放卵時刻2～3時間前にネンブタールで麻酔した後、開腹して卵殻腺部の変化を肉眼的に観察した。このとき、田中ら(1977)の報告を参考にして斑紋未形成期、斑紋形成中期及び形成後期の状態を判断し、それぞれウズラをと殺して卵殻腺部を内部の卵とともに摘出し、10%ホルマリン液で固定した。ついで、卵殻腺部の粘膜ヒダと卵殻表面の状態を肉眼及び実体顕微鏡によって観察した後、斑紋形成中期及び形成後期の卵殻腺部について、常法に従い厚さ5 μ mのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色及びPAS-ヘマトキシリン染色を行い、光学顕微鏡(Nikon SIN型)によって観察した。

また、色素貯留過程の観察のため、放卵直後(排卵30分前)、排卵6、12及び20時間後にウズラをと殺し、卵殻腺部を摘出した。卵殻腺部はただちに10%ホルマリン液で固定し、その後常法に従い厚さ5 μ mのパラフィン切片を作製し、上記と同様の方法で光顕標本を作成観察した。

結 果

肉眼及び実体顕微鏡による観察の結果は図 2-1 に示した。卵殻表面にまだ色素が沈着していない斑紋未形成期の卵殻腺部では、粘膜全体が一様に濃茶褐色を呈し、濃淡の差は認められなかった。卵殻表面に斑紋が形成されつつある斑紋形成中期では、卵殻表面及び卵殻腺部粘膜ヒダ上に大小の色素粒が観察された。同時期の卵殻腺部を実体顕微鏡で観察したところ、粘膜ヒダ間及びヒダ上に、大きな色素粒に加え、微小な色素粒も多数認められた。斑紋がほぼ完成した斑紋形成後期には、粘膜全体の色が薄くなっていた。

卵殻腺部粘膜上皮の apical cell にみられる色素貯留についての光顕的観察の結果は図 2-2 に示した。放卵直後では apical cell に貯留された色素顆粒は観察されず、また PAS 染色を行っても核上部がわずかに染色される程度であり、強く染色される部位はみられなかった。さらに、放卵された卵の斑紋形成時に卵殻表面に付着せず、卵殻腺部内に残留したと推定される色素粒が、粘膜上皮表面にいくらかみられた。排卵 6 時間後では apical cell の内腔側に色素顆粒がわずかに出現し、細胞の内腔側と核上部は PAS 染色に陽性反応を示した。排卵 12 時間後には apical cell 内腔側の貯留色素顆粒が増加し、核上部とともに PAS 染色に強く反応した。20 時間後になると apical cell 内腔側に多量の色素顆粒が貯留されていることが確認され、核より上部は全体的に強い PAS 陽性反応を示した。また、この時期の光顕像では放卵直後及び

排卵6時間後の像と比較して、上皮細胞が丈の高い円柱上皮となっていることが認められた。斑紋形成中期の標本の所見では、apical cell内腔側の貯留色素顆粒は減少しており、上皮表面には放出された色素顆粒が観察され、これらはPAS染色で強く染色された。また、色素顆粒を含まない均質なPAS陽性物質も、色素顆粒と同様に上皮表面に観察された。斑紋形成後期では、apical cell内腔側の色素顆粒はかなり減少したが、核上部は相変わらずPAS陽性反応を示し、同陽性物質がapical cellから放出されている状態がしばしば観察された。

斑紋形成中期及び後期に観察された上皮表面の色素粒について、その状態の変化を図2-3に示した。斑紋形成中期ではapical cellから内腔へ放出された色素顆粒は集合して色素粒を形成し、さらにその色素粒が集合して、より大きく成長した色素粒が粘膜ヒダの間隙に観察された。また、これらの粗大な色素粒はすべて強いPAS陽性反応を示した。斑紋形成後期の卵殻腺部では、排卵直後の像で述べたと同様に、粘膜上皮の表面に残留した小さな色素粒がしばしば観察された。

図 2-1 説明

1. 推定放卵時刻2～3時間前における卵殻腺部内の卵。左より斑紋未形成期、斑紋形成中期及び斑紋形成後期の卵を示す。
2. 推定放卵時刻2～3時間前における卵殻腺部の粘膜表面。1図に示す卵を除去した後の内腔を示す。斑紋形成中期の粘膜上に多数の色素粒が観察される。
3. 斑紋形成中期における卵殻腺部の粘膜表面。粗大な色素粒の他に微小な色素粒（矢じり）が粘膜上に多数観察される。

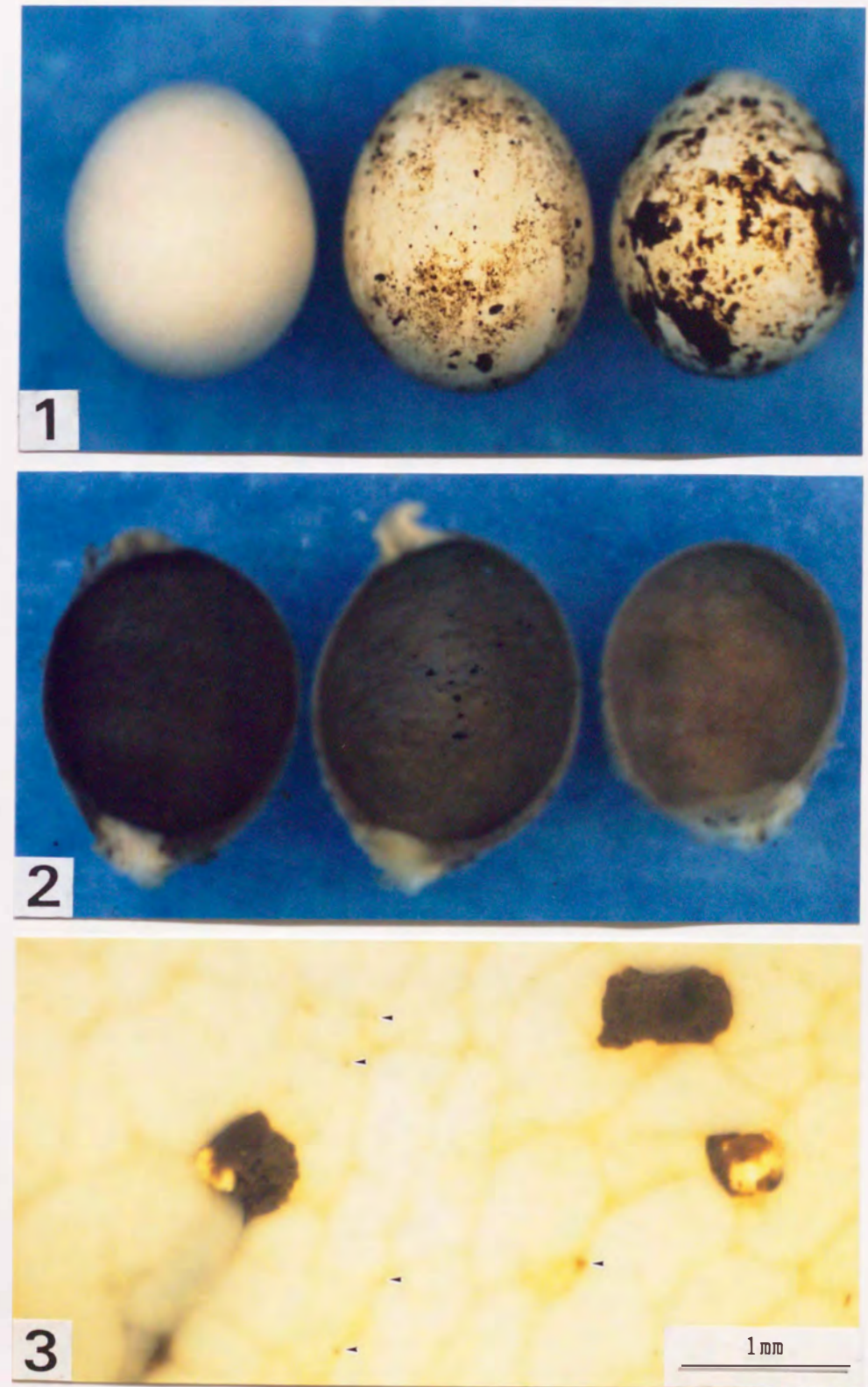


図 2-1 斑紋形成時の卵殻と卵殻腺部の肉眼及び実体顕微鏡的観察

図2-2 説明

4～9図はヘマトキシリン-エオシン染色、同倍率。挿図a～fはPAS-ヘマトキシリン染色、同倍率。

4. 放卵直後（排卵30分前）の粘膜上皮。apical cell内腔側に色素顆粒はほとんど観察されない。挿図a, 核上部にわずかにPAS陽性反応が観察される。この時期では上皮表面に残留色素粒が散見される。
5. 排卵6時間後の粘膜上皮。4図と比較するとapical cell内腔側に少量の色素顆粒が認められる。挿図b, apical cell内腔側及び核上部にPAS陽性反応が観察される。
6. 排卵12時間後の粘膜上皮。apical cell内腔側に色素顆粒の増加が認められる。挿図c, 挿図bと比較するとapical cell内腔側及び核上部のPAS陽性反応が強い。
7. 排卵20時間後の粘膜上皮。apical cell内腔側に多量の色素顆粒が認められる。挿図d, apical cellの核より上部は空胞を除き全体的にPAS反応で強く染色される。
8. 推定放卵時刻2～3時間前（斑紋形成中期）の粘膜上皮。7図と比較してapical cell内腔側の色素顆粒は減少している。上皮表面に放出された色素顆粒が観察される。挿図e, apical cellから放出された色素顆粒はPAS反応に強く染色され、色素顆粒を含まない均質なPAS陽性物質も観察される。
9. 推定放卵時刻2～3時間前（斑紋形成後期）の粘膜上皮。apical cell内腔側の色素顆粒はほとんど観察されない。挿図f, apical cell核上部はPAS陽性反応を示し、放出されている状態のPAS陽性物質がしばしば観察される。

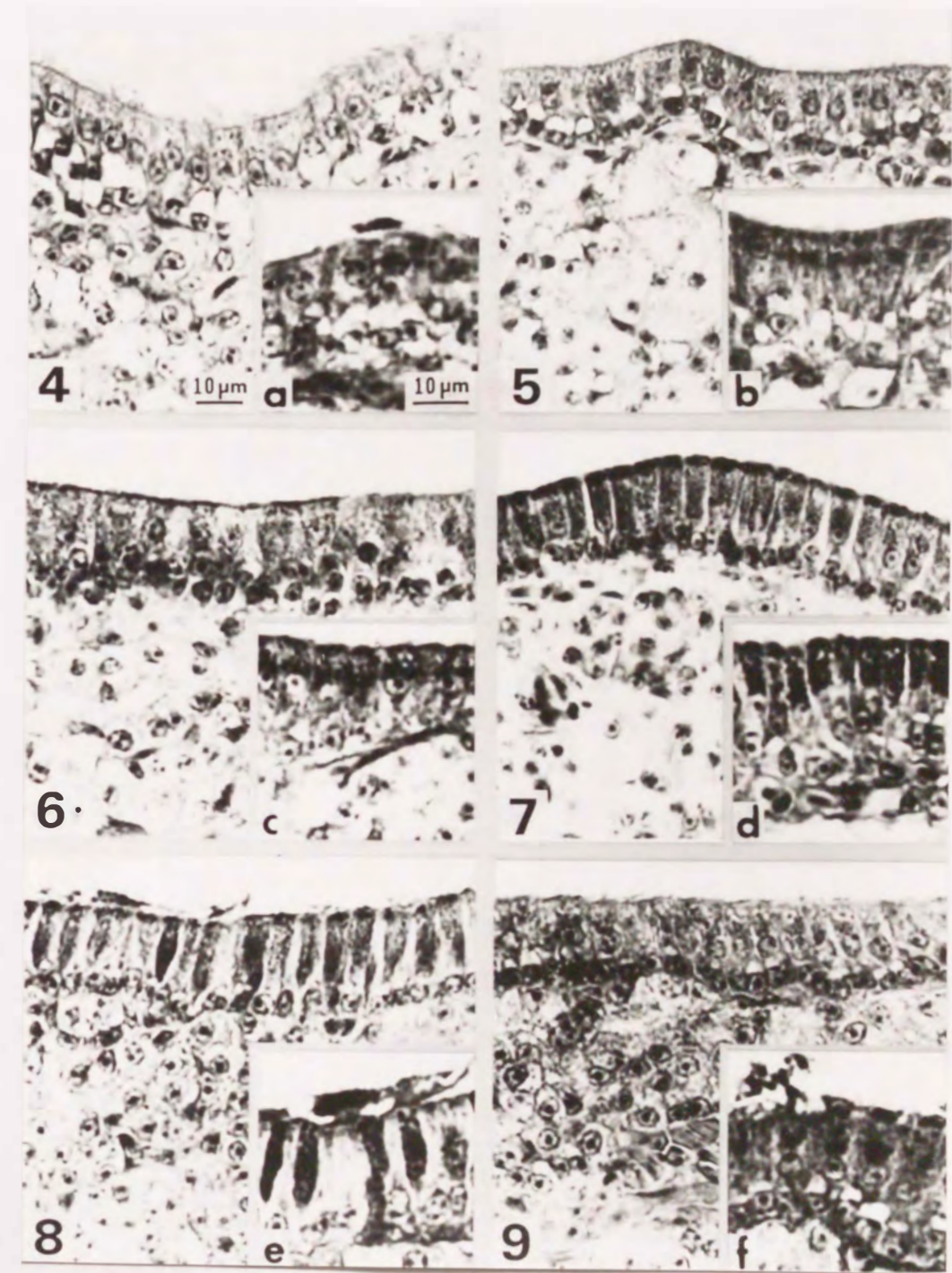


図2-2 卵殻腺部粘膜上皮の光顕的観察

図 2-3 説明

10. 推定放卵時刻2～3時間前（斑紋形成中期）の粘膜上皮と卵殻腺部内腔。内腔に放出された色素顆粒が集合して微小な色素粒を形成している。ヘマトキシリン-エオシン染色。
11. 推定放卵時刻2～3時間前（斑紋形成中期）の粘膜上皮と卵殻腺部内腔。上皮表面の微小な色素粒がさらに集合して成長した大きな色素粒が粘膜ヒダ間隙に観察される。ヘマトキシリン-エオシン染色。
12. 推定放卵時刻2～3時間前（斑紋形成中期）の粘膜上皮と卵殻腺部内腔。PAS-ヘマトキシリン染色。粘膜ヒダ間隙に粗大な色素粒が存在し、PAS染色に強い陽性反応を示す。
13. 推定放卵時刻2～3時間前（斑紋形成後期）の粘膜上皮と卵殻腺部内腔。上皮表面に残留した小さな色素粒がしばしば観察される。ヘマトキシリン-エオシン染色。

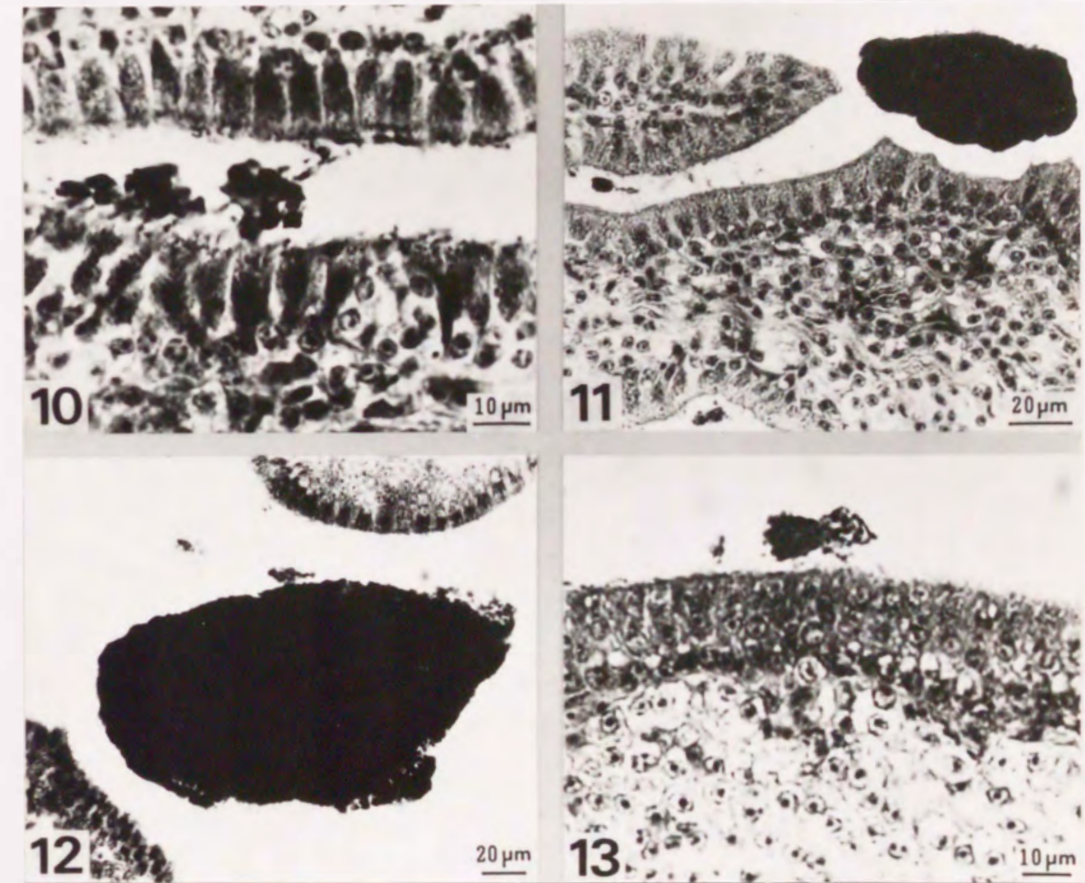


図 2-3 斑紋形成中期及び形成後期の卵殻腺部粘膜表面にみられる色素粒

考 察

ウズラの卵殻表面色素は卵殻腺部粘膜上皮の apical cell に貯留されることが報告されている (Tamura *et al.*, 1965, 1966; Poole, 1967)。本実験においても、これらの報告と同じく色素顆粒は粘膜上皮の apical cell 内腔側に貯留されることが観察された。この色素顆粒は排卵 6 時間後ごろから出現し始め、前項で観察された貯留色素量の変化と同様、時間の経過に伴い増加した。田中ら (1977) は斑紋形成の進行状況を肉眼的に観察し、はじめ卵殻表面に点状の模様が観察され、それが色素の分泌増加、卵殻腺部の収縮及び卵の回転等によって斑紋状に拡大され、色素の沈着開始 30 分後には、正常に放卵された卵の斑紋とほぼ同じ程度にまで斑紋が完成されたと述べている。本実験における肉眼的観察ならびに光顕的観察の結果、肉眼的に卵殻表面に色素沈着の開始を確認し得た時は、すでに多くの色素顆粒が粘膜上皮の apical cell から放出されていた。また、斑紋形成中期には粘膜上皮表面に大小の色素粒が多数存在し、それらが卵殻表面に付着している状態が観察された。この結果から、卵殻腺部粘膜上皮の apical cell に貯留された色素顆粒は、放卵の数時間前に放出され、集合して色素粒を形成した後卵殻表面に付着し、卵殻腺部の収縮運動と卵の回転等によってそれが押し広げられ斑紋となるものと考えられた。

また、apical cell 内にみられる PAS 陽性物質も、色素顆粒と同様に卵形成の進行に伴って増加し、色素顆粒とともに細胞から放出されたこと及び色素粒は PAS 染色に強い陽性

反応を示したことから、PAS 陽性物質は、放出された色素顆粒が色素粒を形成する際に顆粒同士を集合させ、また色素粒を卵殻表面に付着させるための接着剤としての役割をもつものと推測された。斑紋形成直後の色素はかなりの粘性を持ち、卵殻から容易に剥離することができるという田中ら(1977)の報告からも、PAS 陽性物質の役割に関するこの見解は妥当であると考えられる。他方、PAS 陽性物質は中性粘液多糖類-蛋白複合体であることから、卵殻表面のクチクラ層形成に関係するものと推測されている(Tamura *et al.*, 1965; Tamura and Fujii, 1966)。さらに、クチクラ層の成分には糖が含まれており(Cooke and Balch, 1970; Wedral *et al.*, 1974)、ウズラ卵の卵殻を脱灰してその横断切片をPAS 染色するとクチクラ層が強く染まること(Tamura, 1971)などの報告と、本実験の結果から、斑紋形成と同時にクチクラ層の形成も開始されると推定された。また本実験では、色素顆粒が apical cell の内腔側に貯留されるのに対し、PAS 陽性物質は apical cell の内腔側及び核上部に広く貯留され、斑紋形成後期も核上部に存在し、また放出されている状態が観察された。一方、放卵直後の細胞では、PAS 陽性物質はわずかにしか認められなかったことから、この物質は斑紋が形成された後も引き続き分泌され、卵殻表面に沈着されと考えられた。なお、斑紋形成後期及び放卵直後の卵殻腺部の粘膜上皮を観察すると、粘膜表面に小さな色素粒が残留していたことから、細胞から放出された色素顆粒のいくらかは、卵殻表面に付着せず体外へ排出されるものと推測された。

第2節 卵殻腺部における貯留色素の分布と卵殻表面の斑紋との関連

緒言

ウズラの卵には個体によって特有な斑紋が認められ、この斑紋の模様によって産卵した個体を識別し得ることが報告されている (Jones *et al.*, 1964)。卵殻表面の斑紋の様式を決定する要因について、田中ら (1977) は卵殻腺部の粘膜上皮細胞における色素の分泌能は必ずしも一様ではなく、分泌能の高い細胞が特定の部位に偏在している可能性を考えている。また Baird *et al.* (1975) は、卵殻形成中の卵殻腺部の pH の局所的な差 (El Jack and Lake, 1967) が、色素の不均一な沈着の原因と考え得ることを述べている。しかし、いずれの推論も実験結果に基づいて提唱されたものではなく、斑紋の様式を決定する機序についてはまだ明らかにされていない。前節で色素沈着時に大小の色素粒が卵殻腺部の粘膜表面で形成され、卵殻表面に付着して斑紋となることを示した。したがって、形成される色素粒の大きさあるいは数を決定する要因が、卵殻表面の斑紋の様式と密接に関連していると考えられる。本実験では、日本ウズラの卵殻表面に個体特有の斑紋が形成される要因を明らかにするため、卵殻腺部における貯留色素の分布と卵殻表面の斑紋との関連性について検討した。

材料及び方法

動物：前節と同様な条件で飼育した12～48週齢で連産中のウズラの中から、なるべく斑紋が大きく明確な卵を産卵する18羽を選び実験に供した。

試料の採取：推定放卵時刻3.5～4時間前にウズラをと殺し、卵殻腺部を卵が存在する状態のまま摘出した。これを速やかに-20℃で凍結し、内部の卵の長軸に対し直角にほぼ4等分した(図2-4)。卵殻腺部の各分割片は湿重量を測定した後凍結乾燥し、色素抽出時まで暗室内で保存した。一方、卵殻については供試個体が前日に産卵した卵を水洗後、卵殻腺部の場合と同様に長軸に対し直角にほぼ4等分した。これらの卵殻片を約50℃の恒温器内で24時間乾燥し、卵殻膜を含む重量を測定した後、色素抽出時まで暗室内で保存した。

なお、卵殻腺部及び卵殻とも、4分割片を卵の鋭端部方向からそれぞれa、b、c、dと称した(図2-4)。

色素の抽出及び測定：色素抽出は卵殻腺部及び卵殻の分割片ともWarren and Conrad (1942)の方法に準拠した。卵殻腺部については凍結乾燥した分割片を乳鉢中で粉碎し、遠心分離用のプラスチックチューブに投入して、濃塩酸とメタノールを1:9の比率で混合した溶液を用いて色素抽出を2回繰返した。すなわち1回目8ml、2回目5mlの溶液を加え、30℃、1時間の振とうを行った後、約10,000×gで30分間遠心分離を行い、上澄液を得た。それぞれの上澄液を混合し、さ

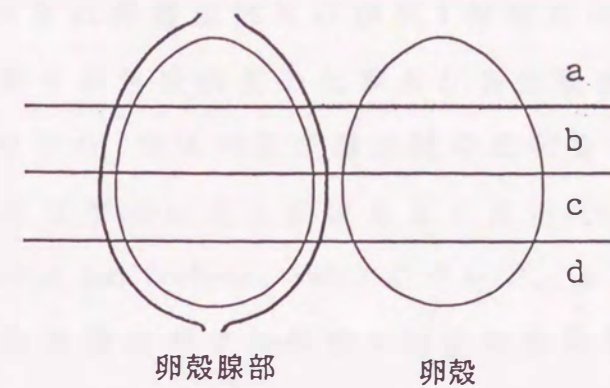


図2-4 卵殻腺部及び卵殻の分割

卵殻腺部及び卵殻とも、4分割片を卵の鋭端部方向からそれぞれa、b、c、dと称した。卵殻腺部は内部の卵の方向にしたがった。

らに上記の塩酸-メタノール溶液を加え液量を25mlとした。卵殻については分割片を試験管に投入してガラス棒で細かく粉碎した後、塩酸-メタノール溶液8mlを加えて1晩放置した。翌日、30℃で1時間振とうした後溶液をろ過し、上記溶液を加え25mlとした。卵殻腺部及び卵殻の抽出液は5倍に希釈し、分光光度計(日立101型)を用い波長410nmで吸光度を測定した。色素量はプロトポルフィリンIV(Sigma Chemical Co.)を用いてあらかじめ作製した標準直線から算出した。

データの処理及び統計的解析：上記の方法で得られた分割片の重量及び色素量から、卵殻腺部あるいは卵殻の1個体分及び各分割片の色素密度(単位重量当りの色素量)を



求めた。つぎに卵殻腺部及び卵殻1個体の色素密度に対する各分割片の色素密度の比率及び各分割部位ごとの比率の平均値を求め、個体内及び個体間の比較を行った。平均値の差の検定は Student の t 検定あるいは Cochran and Cox の近似法 (Snedecor and Cochran, 1980) を用いた。また、卵殻腺部1個体の色素量に対する卵殻1個体の色素量の比を求め、これを色素沈着割合とした。さらに卵殻腺部における貯留色素の分布と卵殻表面の斑紋との関連を検討するため、卵殻腺部及び卵殻の対応する分割片の色素量について相関係数を求めた。この場合、4分割片の色素量から求めた値を相関係数 I、隣接する2分割片を合計した色素量から求めた値を相関係数 II、隣接する3分割片を合計した色素量から求めた値を相関係数 III 及び4分割片を合計した色素量から求めた値を相関係数 IV とした。なお、相関係数の有意性は 5% の水準で検定した。

結 果

卵殻腺部における貯留色素の分布と前日放卵された卵の卵殻色素の分布を比較検討するため、4分割した卵殻腺部及び卵殻の色素量を測定し、その結果を色素密度の比率で示すと表 2-2 のとおりであった。卵殻腺部については、ほとんどの個体で各分割片間の色素密度の比率は異なっていることが認められたが、比率が大きい部位は個体によって変動しているため、18例の平均値では4分割片間に大きな差

表2-2 卵殻腺部及び卵殻の各分割片における色素の分布状態

個体番号	分割片の色素密度の比率 ¹⁾							
	卵殻腺部				卵殻			
	a	b	c	d	a	b	c	d
1	80	109	104	93	103	121	74	103
2	75	100	133	166	131	100	69	104
3	133	105	96	91	50	99	95	153
4	138	166	116	68	64	62	79	197
5	63	131	133	140	92	63	185	52
6	98	140	116	67	79	83	100	143
7	137	91	105	73	124	95	81	102
8	50	119	131	106	110	98	97	97
9	72	102	101	126	155	73	66	117
10	50	149	140	124	51	154	84	93
11	69	99	119	113	124	100	38	146
12	81	108	112	104	185	70	83	75
13	102	105	105	91	109	110	78	105
14	80	105	108	111	90	87	81	145
15	87	102	117	103	112	127	68	99
16	136	111	104	78	71	154	122	39
17	84	111	84	135	88	132	92	85
18	74	104	128	111	112	93	124	74
平均値 ²⁾	89	114	114	103	103	101	90	107

1) 色素密度の比率 = (分割片の色素密度)/(1個体分の色素密度) × 100。

2) 各分割片の比率の平均値。

卵殻腺部と卵殻の色素沈着に関する調査

No.	卵殻腺部				卵殻			
	a	b	c	d	a	b	c	d
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

はみられなかった。また、卵殻の場合も個々の卵によって斑紋の位置がそれぞれ異なっているため、色素密度の比率も各分割片の部位によって異なり、平均値間を比較すると卵殻腺部の場合と同様に大きな差はみられなかった。

卵殻腺部1個体分及び卵殻1個分の色素量から求めた色素沈着割合は平均 $66.1 \pm 16.4\%$ となり、貯留色素の約 $1/3$ は卵殻に沈着していないという結果が示された。

次に、卵殻腺部の貯留色素量と卵殻の沈着色素量との関係を検討するため、卵殻腺部分割片とそれに対応する卵殻分割片の色素量について相関係数を求めたところ、表2-3に示す結果が得られた。まず、4分割した各片(a, b, c, d)

表2-3 卵殻腺部と卵殻の対応する分割片間における色素量の相関係数¹⁾

	I ²⁾	II	III	IV
a	0.32 (18)			
b	0.19 (18)	a+b 0.44 (18)	a+b+c 0.56* (18)	
c	0.23 (18)	b+c 0.27 (18)	b+c+d 0.44 (18)	a+b+c+d 0.56* (18)
d	0.08 (18)	c+d 0.47* (18)		
全体	0.25* (72)	0.39* (54)	0.51* (36)	0.56* (18)

1) 卵殻腺部及び卵殻は卵の長軸と直角に4分割し、鋭端側からa、b、c、dとした(図2-1参照)。

2) Iはa、b、c、dの値から、IIはa+b、b+c、c+dの値から、IIIはa+b+c、b+c+dの値から、IVはa+b+c+dの値からそれぞれ求めた相関係数。全体はそれぞれの段階で得られるすべての値から求めた相関係数。括弧内の数値は例数。

* 有意性(p<0.05)を示す。

ごとに求めた相関係数 I は、おおむね低い値 (0.08 ~ 0.32) しか得られず、分割片全体から求めた相関係数も 0.25 にしか過ぎなかった。この分割の範囲を拡大して隣接する 2 部位ごとに合計し、その色素量について相関係数 II を求めると 0.27 ~ 0.47、全体では 0.39 となり、その値はやや高くなった。さらに分割の範囲を拡大して隣接する 3 部位ごとに色素量を合計して得られた色素量についての相関係数 III は 0.56 及び 0.44 であり、全体では 0.51 となった。卵殻腺部と卵殻の総量から求めた相関係数 IV は 0.56 となり、相関係数 III と顕著な差は認められなかった。なお、全体から求めた相関係数は I ~ IV とも統計的に有意であった。

考 察

色素放出直前のウズラの卵殻腺部は全体が濃い茶褐色を呈し、肉眼及び実体顕微鏡による観察では、貯留色素の多少によって生ずる濃淡の差はほとんど認められない (前節 (2))。しかし、卵殻腺部を 4 分割してそれぞれの色素量を測定したところ、貯留色素は均一に分布しているのではなく、部位によって色素密度に差があること、またその色素密度の高い部位は個体によってそれぞれ異なっていることが明らかになった。この原因としては、粘膜ヒダの形状によって上皮細胞の密度に差があるためと考えられた。また、田中ら (1977) は卵殻腺部の粘膜上皮細胞における色素の分泌能は必ずしも一様ではなく、分泌能の高い細胞がある部位に偏

在しているという可能性を述べている。これらのことから個体内および個体間にみられる貯留色素密度の分布の差が、色素沈着時に存在する色素粒の大きさ及び数に影響を与え、個体特有の斑紋を形成させるものと考えられた。

しかし、卵殻腺部の分割片とそれに対応する卵殻片との間の色素量の相関係数 I は比較的小さい値であり、色素が多く貯留されている卵殻腺部の分割片に対応する卵殻片が、必ずしも色素量が多いとは限らないという結果が得られた。このことは、色素密度の高い部位が必ずしも斑紋の形成部位とは限らないということを示している。前節で示したように、卵殻に沈着される色素粒は色素顆粒の集合によって形成されており、より大きい色素粒の形成の際には色素顆粒はより広い範囲から集合するため、放出部位からはより遠くへ移動することになり、卵殻腺部の色素貯留部位と卵殻の色素沈着部位との不一致が生ずるという理由が考えられる。さらに、色素粒は卵殻腺部の運動と卵の回転に伴って押し広げられる(田中ら, 1977)が、その際、色素は各方向に等しく拡大するとは限らず、斑紋が偏った方向に形成される可能性も考えられる。そこで、隣接する2分割片の色素量を合計して、卵殻腺部と卵殻の相対する部位を拡大した相関係数 II を求めたところ、4分割した場合よりも高い値が得られ、さらに部位を拡大して求めた相関係数 III はより高い値となった。これらの結果は、卵殻腺部の色素貯留部位と卵殻表面の斑紋との間に位置的なずれが存在することを示唆するものである。さらに、卵殻腺部の1個体分の色素

量に対する卵殻1個体分の色素量の比である色素沈着割合がさほど大きくなかったという事実は、卵殻腺部の貯留色素量がそのまま卵殻の色素量として反映されていないことを意味している。すなわち卵殻腺部に貯留されている色素は斑紋形成時に全量は放出されないか、または放出されても卵殻表面に付着せず卵殻腺部内腔に残存している可能性が考えられる。前節において経時的に卵殻腺部の貯留色素量を測定した結果、斑紋形成後の貯留色素量が必ずしも最低値を示さなかったこと、あるいは斑紋形成後及び放卵直後に卵殻腺部の粘膜上皮表面に残留している色素粒が観察されたことは、卵殻腺部の貯留色素量が卵殻の沈着色素量とは一致しないことを示している。したがって、本来きわめて高いと予測された相関係数IVにおいてさえも、0.56の値にしか過ぎなかった点を考慮すると、卵殻腺部と卵殻との相対する各分割片の相関係数が比較的低い値を示したのもまた当然であると言える。これらの点を総合して、卵殻腺部と卵殻の色素量についての相関係数は比較的低い値しか得られなかったけれども、卵殻腺部の貯留色素量の分布と卵殻表面の斑紋形成部位の間には、ある程度の関連があると考えるのが妥当であろう。

要 約

本章ではウズラの卵における卵殻表面色素の貯留、放出及び斑紋形成に関して、基礎的知見を得るための実験を行った。

第1節ではまず、排卵周期中における卵殻腺部の貯留色素量の経時的変動を検討した結果、排卵後に貯留色素量は徐々に増加し、排卵18～20時間後に最大値を示し、同22時間後には急激に減少した。つぎに、卵殻腺部における色素の貯留及び放出の過程を肉眼及び光顕的に観察した。粘膜上皮のapical cell内腔側に観察される色素顆粒は排卵後の時間経過に伴って増加したが、色素沈着時には減少した。色素沈着中の卵殻腺部粘膜ヒダ表面及び卵殻表面では、色素顆粒が集合して形成された大小の色素粒が多数観察された。apical cellの内腔側及び核上部に観察されたPAS陽性物質も、卵形成の進行とともに増加し、色素顆粒の放出と同時に放出されることが認められた。粘膜ヒダ表面に観察される色素粒は、強いPAS陽性反応を示した。斑紋形成後、apical cell内のPAS陽性物質は引続き放出されていることが認められ、また卵殻に付着していない色素粒も観察された。

第2節では卵殻腺部における貯留色素の分布と卵殻表面の斑紋との関連性について検討した結果、卵殻腺部及び卵殻のいずれにおいても、色素密度の分布は部々によって変動があることが認められた。つぎに、卵殻腺部とそれに対応する卵殻との間の色素量の相関係数は、4分割した各分割

片については比較的低い値しか得られなかったが、分割片を合計し対象面積を拡大するとその値は高くなった。一方、色素沈着割合の平均値は約66%で、貯留色素のすべてが卵殻に付着してはいないことが示された。これらの結果を総合して、卵殻腺部と卵殻の色素量に関する相関係数は比較的低い値しか得られなかったが、卵殻腺部の貯留色素量の分布は卵殻表面の斑紋形成部位とある程度の関連があると考えられた。

片については比較的低い値しか得られなかったが、分割片を合計し対象面積を拡大するとその値は高くなった。一方、色素沈着割合の平均値は約66%で、貯留色素のすべてが卵殻に付着してはいないことが示された。これらの結果を総合して、卵殻腺部と卵殻の色素量に関する相関係数は比較的低い値しか得られなかったが、卵殻腺部の貯留色素量の分布は卵殻表面の斑紋形成部位とある程度の関連があると考えられた。