

## 孵化期ブチサンショウウオ胚における 卵被膜構造変化の電子顕微鏡的観察

大 氏 正 己・松 野 煒

島根大学理学部生物学教室

(1978・9・6 受理)

### An Electron-microscopic Study on Vitelline Coat Change in the Salamander Embryos during Hatching Process

By Masami OUJI and Akira MATSUNO

Department of Biology, Faculty of Science,

Shimane University, Matsue, Japan

#### はじめに

一般に魚類・両生類胚の孵化は、孵化期に孵化腺細胞から分泌される孵化酵素・炭酸ガス・纖毛運動ならびに筋肉運動などの働きにより、卵膜を軟化・分解し、或いは卵膜に押し破る力が働くことにより成立されるものと考えられている。孵化に働くこれらの要因のうち最も重要なものは孵化腺細胞から分泌される孵化酵素の働きと考えられ、これまでに魚類・両生類胚に現れる孵化腺細胞の発生・形態および孵化酵素の働きについては多くの報告がなされてきた。しかし、孵化期における孵化酵素の卵被膜への働きがどのような形態的変化として卵被膜に現されてくるかという事に関する報告は少なく、僅に吉崎('78)が無尾目両生類のニホンアカガエル胚の発生に伴う卵被膜の変化について報告しているにすぎない。吉崎はこの報告で、孵化酵素が卵被膜に働くと、それまで卵被膜中を平行して並んで走っていた細纖維束が段々と減少し、終には分解することを新たな知見として電子顕微鏡像の上から観察し興味ある報告を行なっている。

著者らは前報('75)で有尾目両生類に属するブチサンショウウオ胚の孵化腺細胞の発生の様子を電顕像の上から観察しているので、この報告を基に、<sup>1)</sup>尾芽胚初期・<sup>2)</sup>平衡桿発現期・<sup>3)</sup>胚の眼に黒色素胞が発現した時期・<sup>4)</sup>孵化直前の4つの発生段階の卵被膜構造の様相を電顕像の上から観察し、若干の知見を得たのでその結果を報告する。

#### 材料と方法

材料に用いたブチサンショウウオ *Hynobius (Hynobius) naevius naevius* (SCHLEGEL) の卵嚢は1978年5月2日、鳥取県西伯郡中山町の標高約1000mの地点の流水中の石の下に自然産卵されたものを採集し、これを研究室に持ち帰り、水温を9°~11°Cに保って発生を続

けさせた。観察に用いた卵被膜は、1) 胚に尾芽が隆起し始めた時期、2) 胚頭部に平衡桿が出現した時期、3) 胚の眼に黒色素胞が発現した時期、4) 孵化直前の各々の発生段階で胚から採取し直ちに固定した。固定には2.5%グルタルアルデヒド固定液(0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.4, 0.1 M 蔗糖液)を用い氷上で1.5時間前固定した後、0.1 M 磷酸緩衝液(pH 7.4, 0.1 M 蔗糖液)で30分間洗い、続いて1%オスミウム酸固定液(0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.4, 0.1 M 蔗糖液)で2時間氷上で後固定を行なった。続いて70%, 80%, 90%の濃度のエチルアルコールで脱水し、98%アルコールに飽和させた燐タングステン酸液で1時間ブロック染色を施した後、更に、エチル純アルコール、プロピレンオキサイドを通してエポキシ樹脂に包埋した。超薄切片はガラスナイフを用い、切片の方向は卵膜の子午線にそった方向とした。切片の染色には酢酸ウラニウムと Reynold のクエン酸鉛の2重染色を用いた。染色した切片は日立 HU-12 型電子顕微鏡で観察し、直接倍率2,000~12,000倍で写真撮影を行なった。

### 観察結果と考察

#### 1) 胚に尾芽が隆起し始めた時期：

この時期の卵被膜は1~2mmの厚さを有し、電顕像の上からは4層から成り立つ(Fig. 1)。このうち胚に最も近い第1層(J<sub>1</sub>層)は厚さ凡そ25 $\mu$ で非常に秩序正しく並ぶ細繊維の束が卵被膜の子午線に沿った方向に配列し、全体として数10本の細繊維束が重なり合ってJ<sub>1</sub>層を形成している。各々の細繊維束の間隙は電子密度が低く、所々に電子密度の高い構造物が混在する(Fig. 2, 下方の↑印)。このFig. 2の↑印で示された高電子密度の構造物は、細繊維が密に集結した細繊維束の横断面であり、このものが所々で前述の細繊維束と直角の方向に分布していることが観察された。また、卵被膜中、子午線の方向に走る繊維束内には細繊維のほか微小管がみられ、これらは互に結合して網目状構造となっている(Fig. 2)。J<sub>1</sub>層のうち胚に最も近い部分には複雑な形をした突出趨起がみられ、突出趨起内に認められる細繊維は無方向に分布し、その分布密度は低く束状になっていないことが観察された(Fig. 1)。この突出趨起は材料の固定或いは脱水の際に生じた人工産物とは考えられず、本種における卵被膜に固有の形態と思われる。このJ<sub>1</sub>層は非常に密に細繊維束が重なり合っているため、外部からの物理的な力に対して相当な力で胚の保護に当たっていることが考えられる。

このJ<sub>1</sub>層の外側に存在するJ<sub>2</sub>層は約25 $\mu$ の厚さを持ち、非常に電子密度の低い層であることが特徴として挙げられる(Fig. 1)。J<sub>2</sub>層にもJ<sub>1</sub>層でみられた微小管(直径38nm)と同じ管径のものが分布するが、このものの分布密度は粗く、方向も一定していないことが観察された。これらの微小管の間には所々に空胞がみられ(Fig. 3の↑印)、微小管は所々で互に連絡し合っている(Fig. 3)。このJ<sub>2</sub>層とJ<sub>1</sub>層との境界は明瞭でなく、J<sub>1</sub>層の微小管の集まりがほぐれた部分が両者の境界を形成しているように見える(Fig. 2, 上方の↑印)。

J<sub>2</sub>層の外側に存在するJ<sub>3</sub>層は高電子密度を示す層として観察され、この層もJ<sub>1</sub>層と同じく微小管と細繊維の束とからできているが、J<sub>1</sub>層のように明瞭な細繊維束の重なりはみられない。しかし、全般的に細繊維束は卵被膜の子午線に沿った方向に配列し、各々の細繊維

維束の間隙には、これら細繊維と直角の方向に分布する細繊維束の横断面が電子密度の高い構造物として現われていることは  $J_1$  層と同様である。 $J_2$  層と  $J_3$  層との境界面は  $J_1$  層と  $J_2$  層との関係と同様で、 $J_3$  層の微小管がぼじれて伸びた形で  $J_2$  層に移行しているようにみえる (Fig. 4 の ↑ 印)。しかし、 $J_4$  層と  $J_3$  層との境界面は多少、形態的に様相が異なっており、 $J_4$  層に接する  $J_3$  層側の細繊維と微小管は平行に並んだまま、その間隔が広がり、次第に  $J_4$  層に移行している (Fig. 4)。つまり、 $J_3$  層と  $J_4$  層の境界面は  $J_1$  層と  $J_2$  層或いは  $J_2$  層と  $J_3$  層の境界面と較べ明確ではない。

$J_4$  層は細繊維束のみで形成された非常に厚い層で、全体として電子密度は低いが  $J_2$  層に較べると幾分高いといえる (Fig. 1)。この  $J_4$  層は最外側の卵囊に接し、個々の卵とそれを取り巻く卵被膜を共通に縦に覆って連続する層として発達している。この  $J_4$  層は部分的に厚い所と薄い所とがみられる。以上述べた  $J_1 \sim J_4$  層は胚に出現した孵化腺細胞からの分泌は全くみられない時期での完全な形態を示していることが観察された。

## 2) 胚頭部に平衡桿が出現した時期

この時期の卵被膜にはあまり大きな変化は現れていないが、 $J_1 \sim J_4$  の各層に若干の変化が認められる場合がある。 $J_1$  層は厚さも変わらず、最も胚に近い突出趨起もほとんど尾芽の隆起が始まった時期と変わらず同様の構造を示している。 $J_2$  層はかなりの変化を示し、厚みが2~3倍となる。この厚みの増加と共に微小管の分布密度もまばらとなる (Fig. 6)。 $J_3$  層も厚みが多少増加する傾向にあるが、細繊維束の配列等に変化はない。 $J_4$  層も別に変化は認められず、この層全体の電子密度の低下もなく、また細繊維の配列も変わらない (Fig. 5)。しかしこの Fig. 5 の ↑ 印に示したごとく、 $J_3$  層と  $J_4$  層との境界面附近にはバクテリアの存在することが認められた。この写真からは、この頃、外部からの微生物の侵入が始まり、それが  $J_3$  層により防がれているようにもみえる。この時期の胚における孵化腺細胞はまだ発達の途中で孵化酵素の分泌はみられていない。それ故、前述の変化は孵化酵素の作用によるものでなく、その他の要因或いはバクテリアの侵入と共に、吸水による肥厚が生じたものと考えられる。

## 3) 胚の眼に黒色素胞が発現した時期

この時期になると胚体に発達した孵化腺細胞は孵化酵素の分泌を開始する。この孵化酵素の分泌に伴ない、卵被膜は大きく構造が変化する。まず、 $J_1$  層は厚みが減じて薄くなり約  $13\mu$  となる。このことは細繊維束の間隙が少し広がるにもかかわらず、細繊維束の数が大幅に減少するためである (Fig. 7, 8)。このとき残った細繊維は子午線に沿った方向に規則正しく並び、配列が無秩序になることはない。この時期になると  $J_1$  層の最も胚に近い突出趨起も退化を始め、趨起の高さも減じ、数も減少することが認められた (Fig. 7, 8)。 $J_1$  層中の細繊維束の減少は  $J_2$  層との境界面での細繊維束が次第にほぐれ分解するためと考えられる (Fig. 8 の ↑ 印)。

また、突出趨起の退化は、胚の生長とともに囲卵腔中に水が入り、膜が引き伸ばされた結果とも考えられる。 $J_2$  層もやや薄くなり、内部構造は非常に粗となる (Fig. 7)。 $J_3$  層も  $J_4$  層との境界面で細繊維束の配列が幾分乱れ、この部分では細繊維束が粗い網目状にほぐれ  $J_4$  層に移行している (Fig. 9)。また、 $J_3$  層と同様にバクテリアが多数みられた。

この時期は前述のように、孵化酵素の分泌を始めており、その酵素の作用を受け特に  $J_1$  層に大きな構造変化を受けることが観察された。この変化は当初予想されたような、直接細繊維束を徐々に分解させる変化ではなく、 $J_1$  層全体に作用し、 $J_1$  層と  $J_2$  層との境界面の細繊維束を先ず分解し、この変化が続いて  $J_2$  層に及ぶように観察された。即ち、 $J_1$  層の細繊維束の減少は  $J_2$  層との境界面で起こり、 $J_1$  層全体に配列する細繊維束の秩序正しい配列は乱されることなく徐々に変化することになる。

また  $J_4$  層の細繊維束が卵被膜に平行な配列から網目状の構造に変化するの、胚全体の生長につれて、卵被膜が大きく引き伸ばされる結果として起こるものと考えられる。

#### 4) 孵化直前

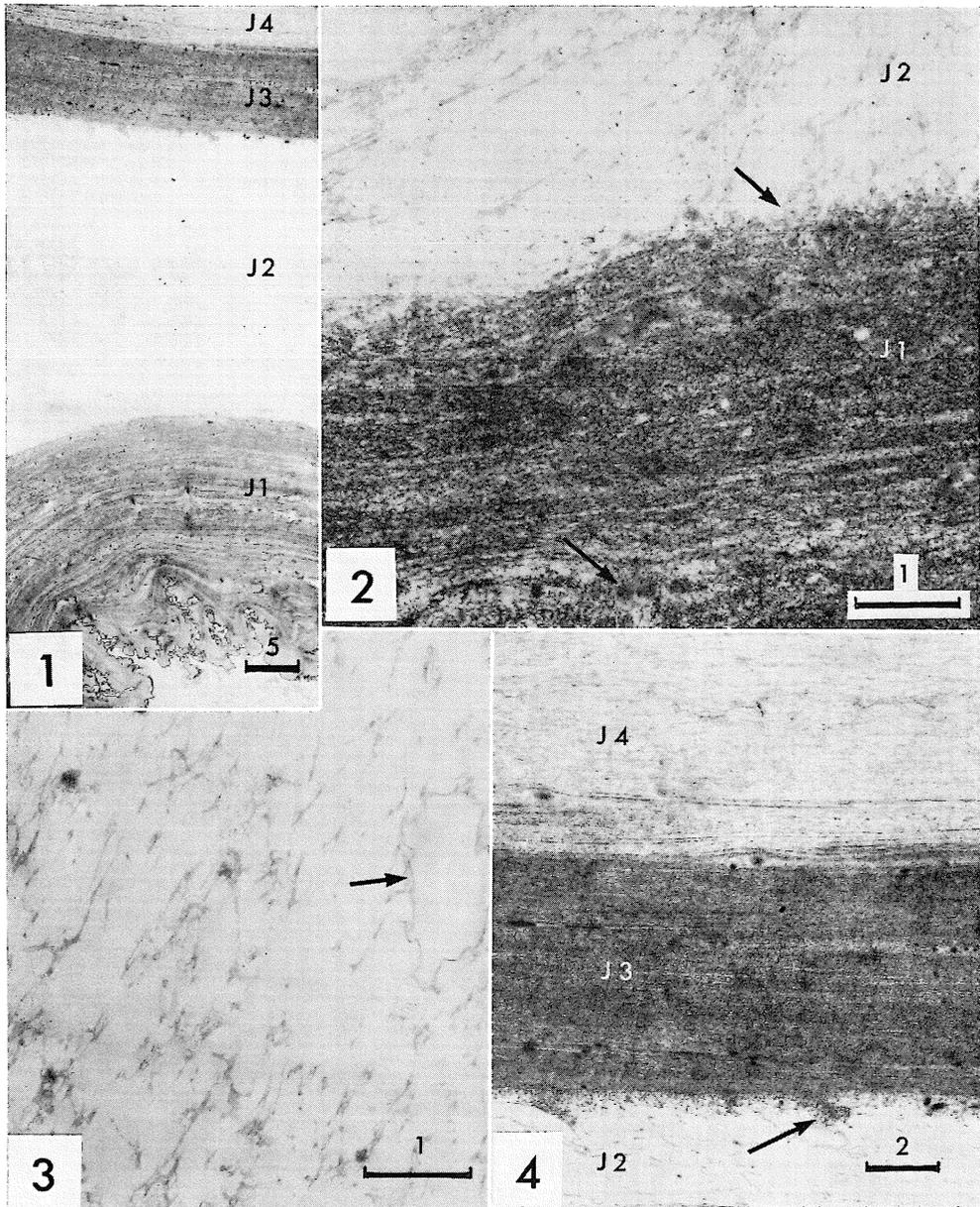
この時期になると卵被膜の  $J_1$  層はもとより、被膜のすべての層が物理的な力に対して弱くなる。またこの時期になると卵被膜の各層は非常に薄くなり、しかも細繊維束の配列が乱れ密度分布が粗になっていることが観察された (Fig. 10)。 $J_1$  層の最も胚に近い突出趨起の層は全く消失し、囲卵腔との境界面は細繊維束間の連絡が無くなり、細繊維束が囲卵腔側にほぐれ、1本ずつの細繊維束となっているもの、或いはほとんど消失する短かい細繊維束となっている像が観察された (Fig. 10)。この時期になると、上述のような過程を経た結果  $J_1$  層の厚みが薄くなると考えられ、胚の眼に黒色素胞が現れた頃の分解の働き方とは異なるように思われた。 $J_2$  層も眼に黒色素胞が現れた時期と異なり高い電子密度を示している。更にこの  $J_2$  層をみると数層の構造に分かれていることがみられた (Fig. 10, 11)。この  $J_2$  層の中の細繊維構造は消失し均質化しているように見える。 $J_3$  層も細繊維束の規則正しい配列が乱れ、 $J_4$  層との境界面が所々で崩れつつあるような像がみられた (Fig. 11 の ↑印)。以上のように  $J_4$  層では細繊維束の崩れている所もあり、細繊維束の配列が残こされている所もあるが、いずれの層も非薄化し、胚の纖毛運動や筋肉運動の力に抵抗しきれない性質の構造になっているようにみられた。以上の結果から、孵化腺細胞からの孵化酵素の分泌の開始と同時に卵被膜の構造に変化が起こり、細繊維の分解することが観察され、孵化に孵化酵素が関係していることが新たな知見として得られた。

### 要 約

- 1) ブチサンショウオ胚を囲む卵被膜は4層から成り立っており、いずれの層にも細繊維束或いは微小管の構造物の存在が観察された。
- 2) 卵被膜は最内層(突出趨起層)と内側から第三番目の層( $J_3$ 層)が細繊維束は最も密に結合しており、電子密度も高い。
- 3) 胚から孵化酵素の分泌が始まると4層のうちの内側から第一番目の層( $J_1$ 層)が先ず酵素作用を受け、この層の構成細繊維束の数が減少し、 $J_1$ 層の厚みが薄くなる。
- 4) 孵化直前の卵被膜は第一番目の層( $J_1$ 層)がほとんど分解し、囲卵腔側に分解途中の細繊維が多くみられるほか卵被膜全体の非薄化がみられた。

参 考 文 献

- 1) 大氏正己・松野 焯 (1973) 島根大学文理学部紀要, VI, 39-45.
- 2) 松野 焯・大氏正己 (1975) 島根大学文理学部紀要, IX, 79-87.
- 3) Norio YOSHIZAKI (1978) J. Exp. Zool., 203, 1, 127-133.



- Fig. 1. 初期尾芽胚期卵被膜の低倍率写真，電顕像の上から J<sub>1</sub>~J<sub>4</sub> の4層が区別できる。
- Fig. 2. 初期尾芽胚期，J<sub>1</sub>層は細繊維束と微小管で形成され細繊維束は卵被膜の子午線に沿った方向に走る。細繊維束の間隙に直角に走る細繊維束の断面が見られる（下方の↑印）。
- Fig. 3. 初期尾芽胚期，J<sub>2</sub>層の一部で微小管が所々に連絡している。空胞も存在する（↑印）。
- Fig. 4. 初期尾芽胚期，J<sub>3</sub>層は高い電子密度を示す。J<sub>2</sub>層は微小管，J<sub>1</sub>層は細繊維束で構成されている。

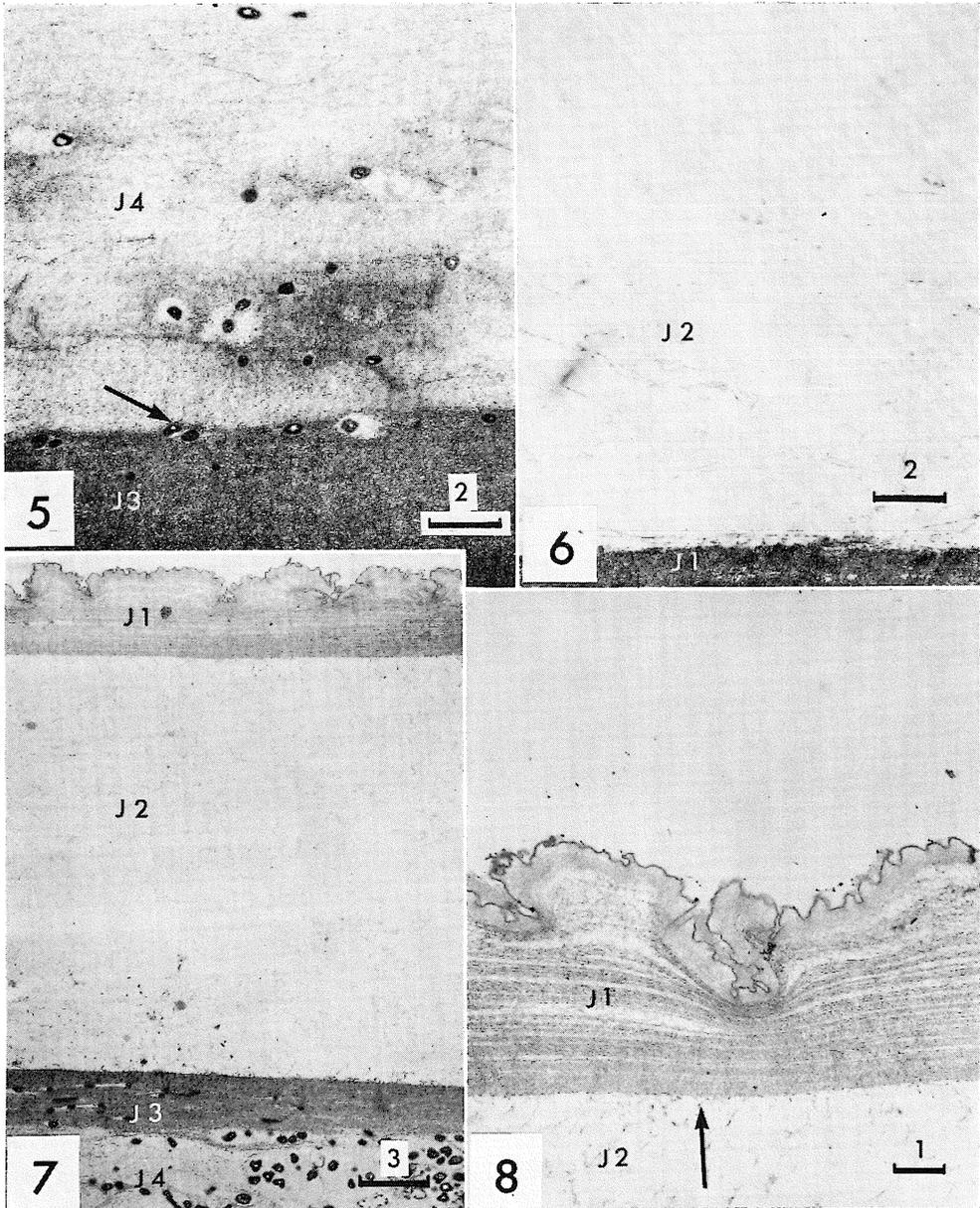


Fig. 5. 平衡桿出現期の J<sub>3</sub> 層と J<sub>4</sub> 層, J<sub>4</sub> 層の細繊維束の乱れがみられる。J<sub>3</sub> 層と J<sub>4</sub> 層に多数のバクテリアがみられる。  
 Fig. 6. 平衡桿出現期, J<sub>2</sub> 層の微小管の分布がまばらとなる。  
 Fig. 7. 眼に色素の発現期, J<sub>1</sub> 層最内側の突出皺起の低下がみられる。  
 Fig. 8. 眼に色素の発現期, J<sub>1</sub> 層の突出皺起は少なくなり, 細繊維束の数の減少と J<sub>2</sub> 層の方へほぐれている (↑印)。

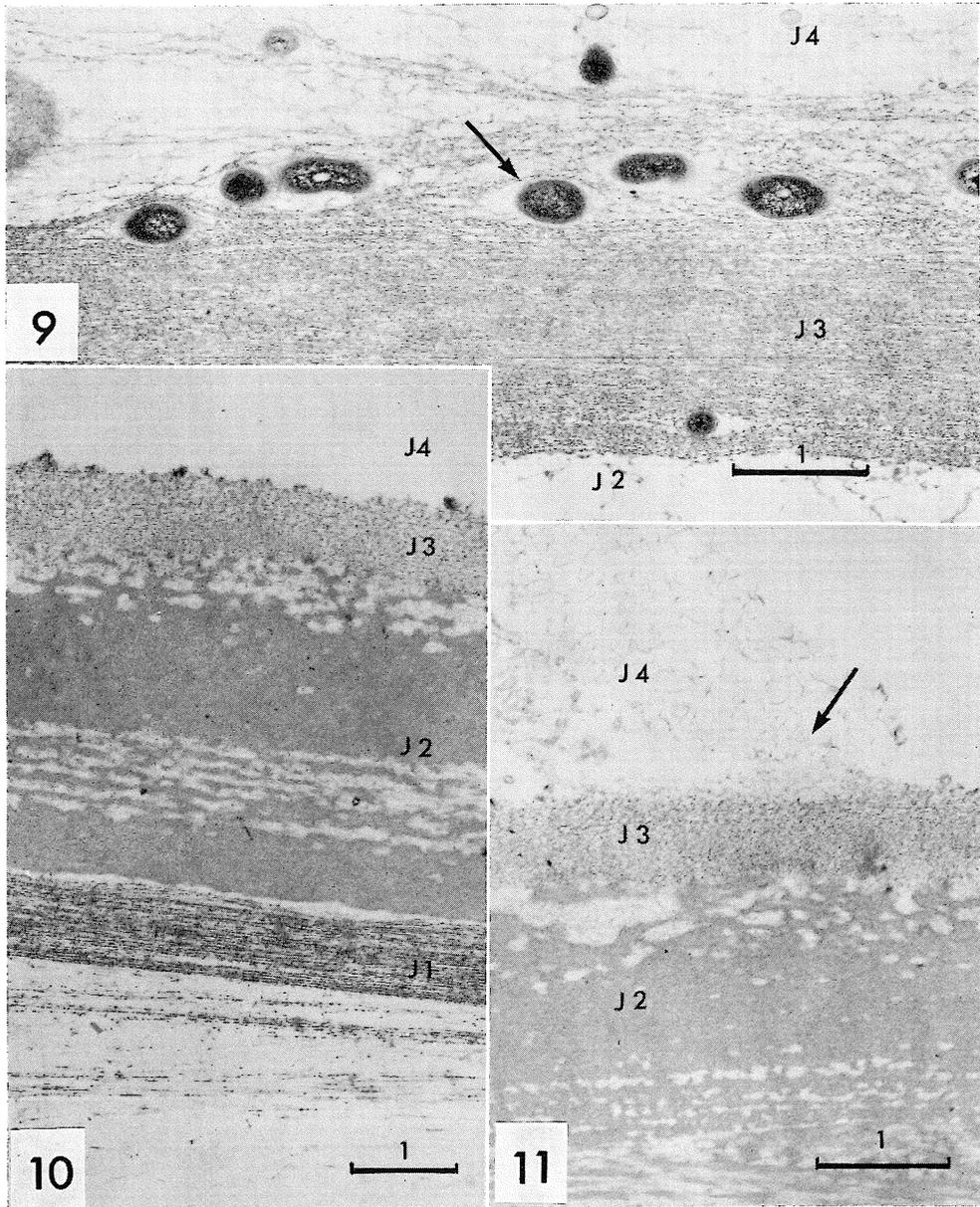


Fig. 9. 眼に色素の発現期の J<sub>3</sub> 層, 細繊維束がほぐれ, J<sub>4</sub> との境界が不明瞭となる。バクテリアの侵入がみられる (↑印)。

Fig. 10. 孵化直前の卵被膜, J<sub>1</sub> 層の細繊維束はほぐれて囲卵腔側に移動する。J<sub>2</sub> 層は高い電子密度を示し, J<sub>3</sub> 層に細繊維束の乱れがみられる。

Fig. 11. 孵化直前の卵被膜の J<sub>3</sub> 層, J<sub>3</sub> 層の細繊維束はほぐれ J<sub>4</sub> 層へ移動するように見える (↑印)。