

オキサンシヨウウオ胚における孵化腺細胞の 電子顕微鏡的観察

大 氏 正 己・松 野 焯

島根大学理学部生物学教室
(1979・9・8 受理)

Electron Microscopic Observations on the Hatching Gland
Cells of *Hynobius naevius okiensis* SATO

Masami OUJI and Akira MATSUNO

Department of Biology, Faculty of Science,
Shimane University, Matsue, Japan

はじめに

島根県隠岐郡に属する隠岐群島の中で、最大の島、島後地区には、有尾目両生類のうち、この島の特産種、カスミサンシヨウウオ属のオキサンシヨウウオ (*Hynobius naevius okiensis* SATO) の生息がみられる。このオキサンシヨウウオは、その形態や生態における類似性から、ブチサンシヨウウオ群の1つとして認められている。オキサンシヨウウオはこれまで、産卵に関して不明の点が多く、胚を確実に採集する機会に恵まれなかったが、著者らの調査の結果、西郷町の東郷川の産卵場所では、3月下旬に産卵のみられることの多いことを知り得た。

著者らは、これまでに、ブチサンシヨウウオ胚における孵化腺細胞の発達を電子顕微鏡的に観察しており (松野・大氏 '75)、オキサンシヨウウオはブチサンシヨウウオに比べ、産卵時期が早いこと、両種の幼生の体表面に現れる斑紋の様相の異なり、および両種の成体の体色や斑紋の型の異なりなどの相異的が同属の同じ群内でみられることから孵化腺細胞の発達や微細構造の点でも変化があるかどうかに興味を抱き、本年、自然産卵による卵塊を採集し、オキサンシヨウウオ胚における孵化腺細胞の電子顕微鏡的構造の変化を観察し、両種間の孵化腺細胞の発達とその構造について比較することとした。その結果、両種の胚に現れる孵化腺細胞の腺分化の様相は、電子顕微鏡的観察の上からは、類似する点の多いことを知り得たので、それらの観察結果を報告する。

材料と方法

材料に用いたオキサンシヨウウオ (*Hynobius naevius okiensis* SATO) の胚は、1979年4月3日に島根県隠岐郡西郷町の東郷川上流部で囊胚中期まで発生した、自然産卵による卵塊

を採集し、これを研究室に持ち帰り、水温を15°Cに保ち発生を続けさせた。固定は、a) 眼杯が形成された時期、b) 外鰓に分枝が認められた時期、c) 眼に色素胞が現れる時期、および d) 孵化直前の4つの発生段階で行なった。固定・脱水および包埋の方法は、一般的な電子顕微鏡観察のための方法、すなわち、固定には1.5%パラフォルムアルデヒド、1.5%グルタルアルデヒドおよび、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む固定液中で1.5時間、室温で前固定し、前固定された胚は、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液中でよく洗い、この液中で頭部を切り出し、続いて、この頭部を1%オスミウム酸および、0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を含む固定液で2時間水冷し、後固定を行なった。固定の終了した材料は、直ちに80%、90%および100%エチルアルコールの各段階を通して脱水し、プロピレンオキシドを置換剤としてエポン812樹脂に包埋し、超薄切片とした。切片の方向はすべて、頭頂部を正中断する方向で行ない、切片は予め、光学顕微鏡観察のための切片で孵化腺細胞を確認した後、超薄切片を作製した。超薄切片の染色は、酢酸ウラニルの飽和水溶液とレイノルズ法による鉛染色の二重染色を施した。観察には日本電子社製 JEM-100c 型電子顕微鏡を用い、直接倍率2,000~20,000倍で写真撮影を行なった。

観 察 結 果

各発生段階の胚の孵化腺細胞内における分泌顆粒の形成の様子を電顕像の上から観察した結果は次のとおりである。

a) 眼杯が形成された時期

この時期における孵化腺細胞は、胚の頭部正中部の表皮細胞間に、数個の細胞が集団を作り、もぐり込む様にして挟まっているのが観察される。しかし、この頃の孵化腺細胞は、外形上からは表皮細胞と区別することは困難である。すなわち、細胞の大きさの上からは孵化腺細胞も表皮細胞も特別に異なることはなく、集団を作り背中部にもぐり込む型式をとることと、この部分の細胞が腺分化して後で孵化腺細胞となることを一連の観察の結果知り、孵化腺細胞と同定した(図, 1)。この孵化腺細胞の細胞質の中には、底部に近く、大型の核が認められ、この頃から核の周縁部にクロマチン物質の集中するのが観察される。核を除いた細胞質中には、電子密度が高く大型の卵黄粒と、電子密度が幾分低い脂肪滴とが多数みられるのが特徴で、これらの構造物はほぼ均等に分布している。リボゾームは僅に認められるだけで、粗面小胞体や滑面小胞体のいずれも顕著な発達はみられない。また、ミトコンドリアは、非常に小型(直径 0.3 μm)で電子密度が高く未発達の段階を示すものが少数観察される程度である(図, 2)。しかしながら、細胞によっては、孵化腺細胞の内部に、分泌顆粒の認められるものもあり(図, 2)、この頃の分泌顆粒は大きさが直径 0.35 μm 、長さ 0.6 μm 位の細長い形を示し、中程度の電子密度を示すものである。そして、この分泌顆粒は、細胞周縁部に極く少数が認められる。

b) 外鰓に分枝が認められた時期

この時期になると、孵化腺細胞は高さを増し、円柱状の形態となり、明らかに周囲の表皮細胞と外形上からも区別することが可能となる。核は細胞の中央部より底部に近く位置し、

核小体も内部にみられるようになる。核に近い細胞質中には、粗面小胞体が発達して位置し、リボゾームの量も増加するのが認められ、活発な生合成を示す像が認められる(図, 3)。また、ゴルジ装置も細胞質の数個所に観察され、ゴルジ装置の近くには、ミトコンドリアやリボゾームが多数観察される。また、内部に、中程度の電子密度を示す物質で満たされたゴルジ小胞も観察され(図, 4)、分泌顆粒の形成の初期の段階を示すと考えられる像が認められた。この時期の分泌顆粒は大きさもまちまちのものがみられるが、ほぼ楕円形の外形を示すものが多く、直径 $0.5 \mu\text{m}$ 位のものが最も多い。この発生段階となると、分泌顆粒の数は著しく増加し、その分布は、細胞の周縁部と頂部に特に密に分布するようになり、細胞質の中央部から底部には認められない。卵黄粒は前の発生段階 a) の頃に較べて小型化し、細胞の底部にみられるようになる。また、特に小型の卵黄粒の周縁には、電子密度の低い層が現われ(図, 3 ↑印)、卵黄粒が周縁部から徐々に消費されることを示す像が観察される。これに対して、脂肪滴は小型に分割されることなく、外形も変化しない。このものは、内部の電子密度が徐々に低下することから、内部から消費が起る像として受け取れる(図, 3)。

c) 眼に色素胞が現われる時期

発生段階が進み、眼に色素眼が形成された時期となると、粗面小胞体或いは滑面小胞体の著しい増加がみられ、その分布は前の b) の発生時期に較べ著しく密となる。特に、核の周囲から細胞周縁部に亘って粗面小胞体が密な層状構造を示すようになる。また、ゴルジ装置の数も増え、細胞質の各所で分泌顆粒の形成がみられる(図, 5)。

特に、ゴルジ小胞と同じ電子密度を示す分泌顆粒の増加の著しいことはこの発生段階における孵化腺細胞の特色といえる。このゴルジ装置の附近には卵黄粒の分布をみるが、それらの卵黄粒はどれも小型化していて、分泌顆粒形成に何らかのかかわりを持っていることが暗示されるようにみえる。また、この時期になると、孵化腺細胞の分泌顆粒は、細胞底部を除いて、くまなく分布するようになり、一部の分泌顆粒は細胞頂部から細胞外に放出されている像もみられるようになる。この時の分泌顆粒の放出の様子は、細胞頂部に運ばれた分泌顆粒の膜と細胞膜とが互に融合して、内容物を細胞外に放出することが観察された。

d) 孵化直前の時期

孵化の直前となると、孵化腺細胞の外形は前の c) の発生段階のものと変わりはないが、核の位置する細胞底部には空胞が多数分布するようになる。また、この細胞底部には、卵黄粒が観察され、この卵黄粒はここ以外の部分では全くみられなくなる(図, 6)。核の形は複雑化し、細胞質は分泌顆粒で満たされ、孵化腺細胞は腺分化の頂点に達する(図, 7)。この時期における粗面小胞体やゴルジ装置は前の発生段階 c) の状態と同様に、細胞質内に発達した形態のまま残っていて(図, 8)、孵化腺細胞は盛んに、分泌顆粒の形成と放出とを同時に行なっていることが認められ、この時期には、細胞の退化の様相は呈していないことが観察された。

ま と め

以上の観察の結果、オキサンショウウオ胚の孵化腺細胞は、眼杯の形成期では、孵化腺細

胞としての腺分化は既に始まっているが、外形の上からは、周囲の表皮細胞と区別することは困難である。そして、この頃から一部の孵化腺細胞では少数ながら分泌顆粒の形成が認められ、孵化腺母細胞の過程をすぎていることが分かる。この分泌顆粒形成にかなりの時間的な幅のあることと、分泌顆粒を含む孵化腺細胞の位置の関係からは、孵化腺細胞が原基の位置から移動してきて、背中部の特定の位置に到達すると、分泌顆粒の形成が開始されるようにも暗示される。このことは、続いての発生段階の外鰓に分枝が生じた時期となり、孵化腺細胞が定位置に達して、細胞の移動が停止すると、細胞の高さが増し、粗面小胞体・リボゾーム並びにコルジ装置が発達し、ゴルジ小胞の発現と分泌顆粒の急激な増加のみられることから推察されることである。そして、孵化腺細胞は胚の眼に色素が形成された時期に最高に発達した形態を示し、この時期から、細胞外への分泌顆粒の放出が開始されるようになる。更に、この眼に色素が形成された時期から孵化する時期までは、15°C の水温下で約6日間を要することからは、6日間の間かなりの量の孵化酵素が細胞外に放出されて、卵膜に働き影響を与えることが予想される。一方、孵化直前の時期になっても、孵化腺細胞の内部には、まだ多量の分泌顆粒が残っており、粗面小胞体やゴルジ装置、或いはゴルジ小胞などの細胞内小器官が、前の発生段階と同じ発達の形態のまま残されていて、分泌顆粒の形成と放出とを行なっていることから、孵化後も一定期間、分泌顆粒の放出が行なわれることが想定された。これらのことは、今回観察されたオキサンシヨウ胚のほか、ブチサンシヨウウオ胚でも同様な結果が観察されており（松野・大氏 '75）、これらの胚を包む卵膜の構造が強固であること（大氏・松野 '78）のほか、胚の孵化期の環境が、比較的低温の条件下にあることから十分に推察できる事柄のように考えられる。以上の観察の結果は、これまでにブチサンシヨウウオ胚の孵化腺細胞の発達の微細構造上で得られた結果（松野、大氏 '75）と大綱において異なることはなく、同属の中の、同群に含まれるブチサンシヨウウオとは、孵化腺細胞の発達の様子と構造上の上からも共通する特徴を有する関係にあることが観察された。

参 考 文 献

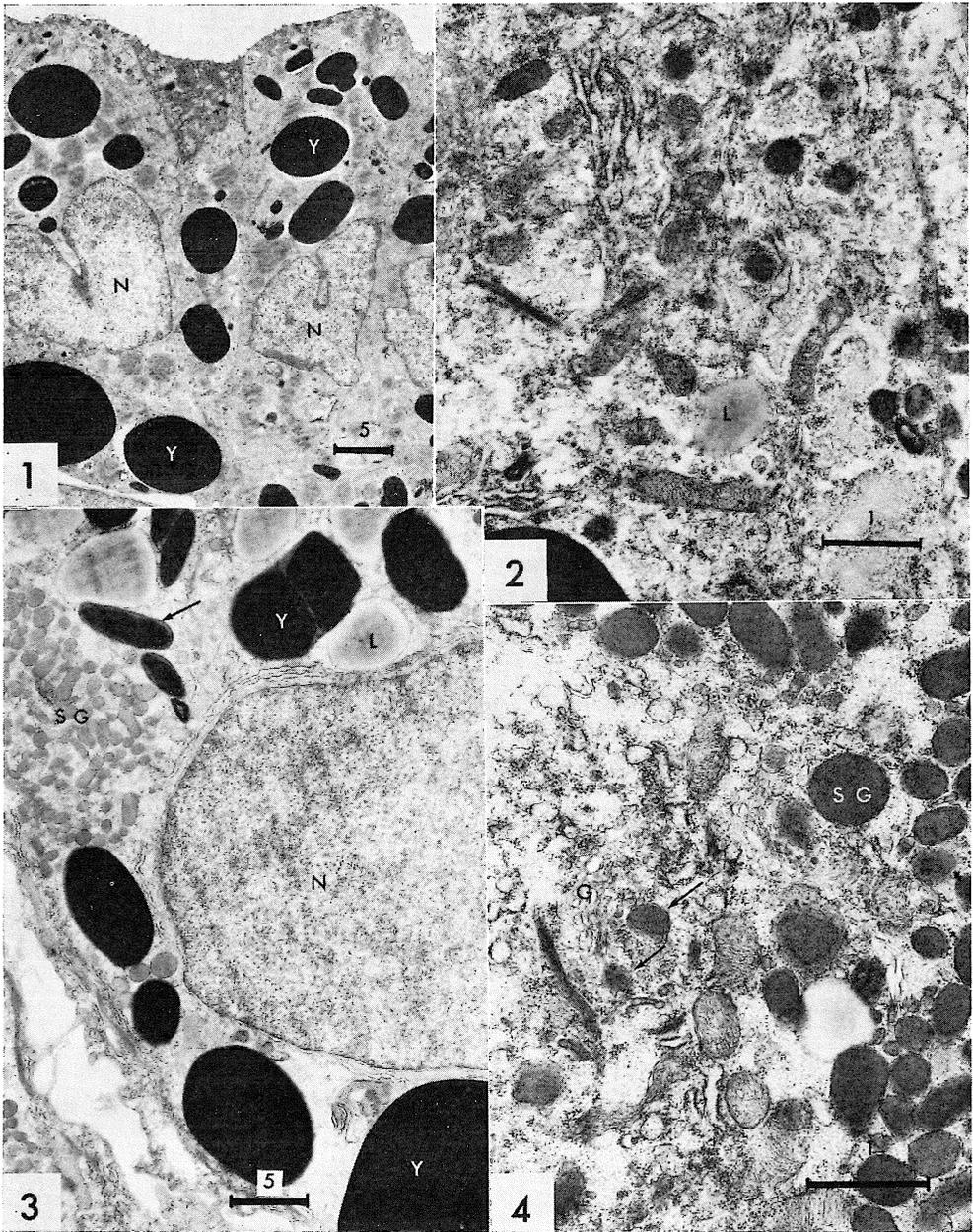
- 1) 松野 焯・大氏正己 (1975) 島根大学文学部紀要, 理学科編, IX, 79-87.
- 2) 大氏正己 (1978) 動物と自然, 8(9), 25-29.
- 3) 大氏正己・松野 焯 (1978) 島根大学理学部紀要, XII, 65-72.

図版 I

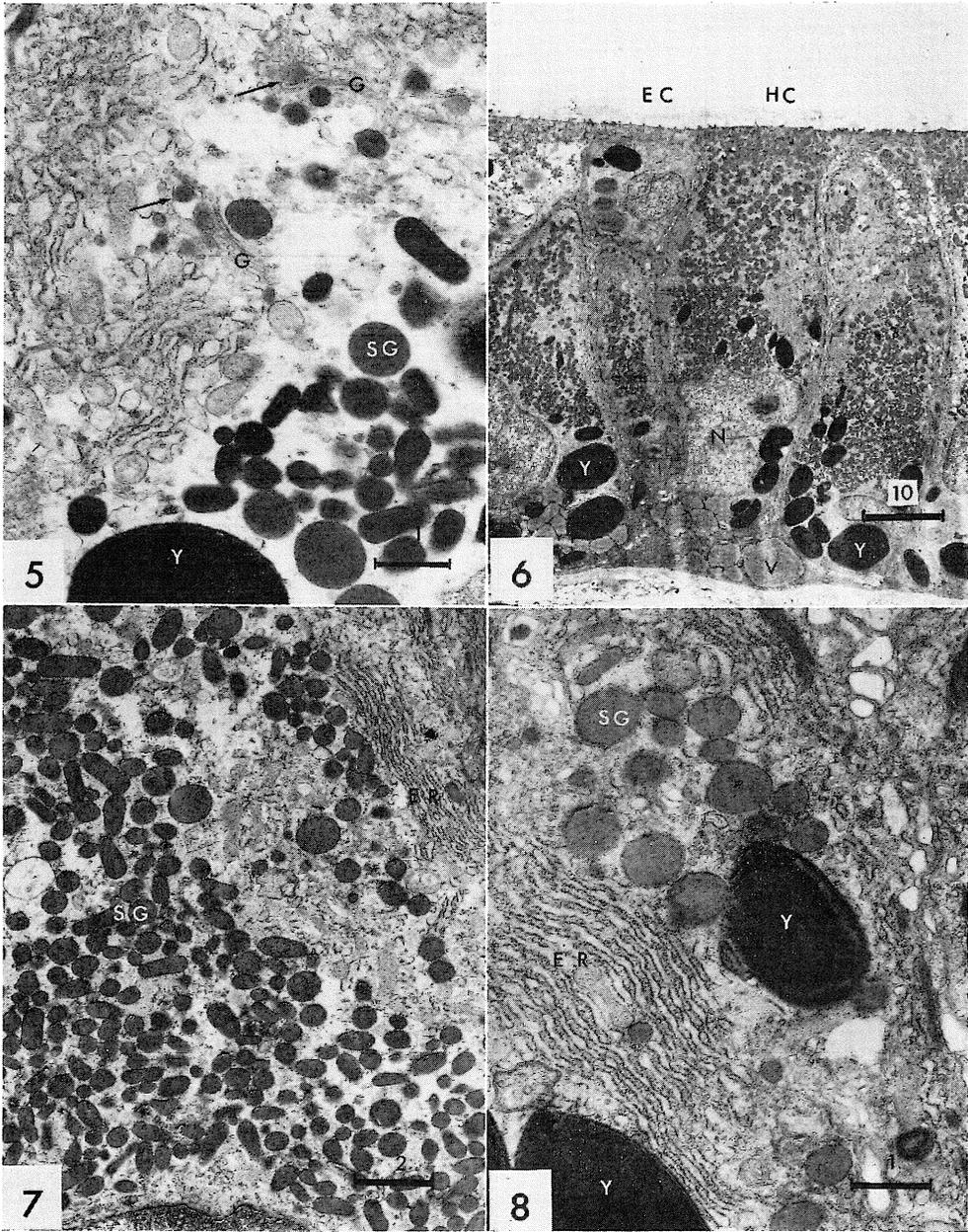
- 図1 眼杯が形成された時期の孵化腺細胞。大型の卵黄(Y)が多数見られる。×2100
- 図2 眼杯が形成された時期の孵化腺細胞の一部。小型のミトコンドリア, 小数の分泌顆粒, 脂肪滴(L)等が見られるが, 腺分化の程度は低い。×18000
- 図3 外鰓に分枝が認められた時期の孵化腺細胞。かなり外数の分泌顆粒(SG)が認められ, 卵黄(Y)も小さなものが多い。核(N)周辺にはクロマチン物質がみられる。×2900
- 図4 外鰓に分枝が認められた時期の孵化腺細胞の一部。ゴルジ装置(G)附近のゴルジ小胞に分泌顆粒(SG)と同じ電子密度を示す物質が詰っているのが見られる(↑印)。×21000

図版 II

- 図5 眼に色素が形成された時期の孵化腺細胞。ゴルジ装置(G)の附近のゴルジ小胞(↑印)に分泌顆粒(SG)の起源があるように思われる。×14000
- 図6 孵化直前の時期の孵化腺細胞と表皮細胞。孵化腺細胞(HC)と表皮細胞(EC)の区別は容易にできる。×1400
- 図7 孵化直前の時期の孵化腺細胞の一部。分泌顆粒(SG)がぎっしりとつまっている。×7000
- 図8 孵化直前の時期の孵化腺細胞の一部。よく発達した粗面小胞体(ER)が見られる。×14000



図版 I



図版 II