

メダカ胚の切片の作り方

蒲生英男

(愛知学芸大学 生物学教室)

How to make sections of the embryo of the mekaka, *Oryzias latipes*

Hideo GAMO

(Dept. Biology, Aichi Gakugei Univ.)

メダカが発生学のよい材料である事は雨宮、山本以来よく知られているが、切片が作られにくいために発生組織学的研究は進まなかったようである。筆者は山本時男教授（名古屋大学）にすすめられてメダカ胚を切っているので、その方法を報告する。いつも変わぬ激励を頂いている山本教授に深く感謝する次第である。

固定はプアンの液。切るまでこの液に入れたまま。(1) 尾が卵黄の外へ延長しあらかじめる時期（松井^{*}の発生段階図 St. 26）の前には、卵膜をかぶったままのを固定し、切るために脱水を始める時に解剖顕微鏡の下で2本の針で卵膜を破って取り除く。パラフィンに埋没した時に体の前後の方向がわかるように、卵黄の左右を少し針でこわして、胚全体が、球形ではなく、前後に長細く見えるようにする。(2) 尾が延長しあらかじめてからは(St. 27)、ほかのフ化前の胚(Sts. 32, 33)を数コすりつぶしたものを加えた少量の水の中に、卵をしばらく入れておく。フ化酵素で卵膜を溶かすためである。卵膜は部分的に溶かされるから、針で静かに取り除く。トリプシンの1~3%水溶液を補助的に使ってもよいが、濃度と時間と温度とに注意して、胚自身まで溶かされないようにすること。こうして卵膜を除いてから固定すれば、尾はほぼまっすぐに伸びたままに保たれるから、パラフィンに埋没する時に方向がわりやすく、また、正しく横断される。この場合は卵黄の左右をこわす必要はない。

プアンの液を炭酸リチウムで抜いてから、中性赤で染める。卵黄はよく染まるが、胚体はあまりよく染まらないから、パラフィン埋没の時に方向がわかりやすい。脱水には特別の注意は不要ない。ただし、材料が小さく、また、こわれやすいから、材料をつまんで移すことは危険である。筆者は薬屋で目薬に添加するペニシリンの入っていた1~2ccの管瓶を数コもらって来て、その中に材料を入れ、注射器で液の入れかえをおこなっている。

パラフィンは融点55~60°Cのを使うのがもっともよい。これは固定されたメダカ胚の卵黄の硬さに適当であるらしい。このパラフィンを、かろうじて溶けている温度に保つことが絶対に必要である。具体的にいえば、オーフェンの中で、(筆者のオーフェンは手製のソマツなものだから、中央の熱電球の上と周辺との温度差は大きく、温度は周辺へ向って同心円的に、かなり急に下る)何かの入れ物に入れたこのパラフィンの、一部は溶けていて、他の部分は固っている、

* 松井喜三, 1949: メダカの発生経過。実験形態学, V, 33~42.

という場所を見つけ、その溶けている部分に材料を入れる（透明剤といっしょに）。こんな低い温度では埋没の時にパラフィンが固まりやすくて、少々手ぎわを要するが、大した問題ではない。それよりも、この60°Cをあまり越えない温度に止めておく事によって、卵黄部のタンパクを固まらせない事が絶対に必要である。（筆者は数年のあいだ手さぐりをした後、偶然の機会にこの低温の事を見つけたが、その後はこの一点の注意でほとんど完全に切る事ができるようになった）こうして作ったパラフィン・ケーキの材料の卵黄はヨーカンのように鮮かに切れる。誤って温度を上げすぎたのは、卵黄がこなごなに散って、卵黄と周縁層との関係はわからず、しばしば卵黄が胚体の断面の上にかさなってしまって、観察をさまたげる。卵黄の固まりぐあいは、ミクロトームで切っている時にすでにわかる。

染色には筆者はデラフィールドのヘマトキシリンだけを使い、二重染色をしない。フ化前には核と細胞質の染め分けはできない。ふつうの方法で作ったこの染色剤を蒸溜水で3倍にうすめて、数時間染める。あとで酸で脱色する事をしない。切片がスライドから離れるのを防ぐためである。ただ、同じ目的のために、スライドにアルブミンを塗る前に、指の脂肪をセツケンでよく洗っておく事が必要である。頭のポマードなど特に警戒すること。

フ化した子魚では核と細胞質との染め分けができる。染色時間は、卵内の胚の1/10でよい。この急激な変化は将来の研究に値するであろう。ただ、性巣原基の中の始原生殖細胞はフ化と同時に分裂を始めるという事実のある事もここに報告する。

Summary

The medaka, *Oryzias latipes*, a cyprinodont fresh-water teleost, which is popular in Japan and is easy for laboratory culture, is, therefore, a favorable material for embryological researches. The difficulty of sectioning embryos, however, has been hindering its histo-embryological study.

The author found a key point for solving this problem. It is not to raise the temperature of the melted paraffin for imbedding the embryos over 60°C, probably to avoid the yolk protein heat-coagulating.