

### 3 倍体ギンブナの卵形成における成熟分裂の細胞学的観察

小林 弘

## A Cytological Study on the Maturation Division in the Oogenic Process of the Triploid Ginbuna (*Carassius auratus langsdorfii*)

Hiromu Kobayasi

(Received December 1, 1975)

Cytological observations on the nuclei of the ripe egg cells just after spawning were carried out in two kinds of fishes, the kinbuna (*Carassius auratus* subsp.) and the ginbuna (*C. auratus langsdorfii*); both were collected from Kasumigaura. The egg cells of the kinbuna contained nuclei at metaphase of the second maturation division and had a first polocyte, while those of the ginbuna showed nuclei at metaphase of a single maturation division without a first polocyte. The mean diameter of the nuclear plates of 20 egg cells was  $6.32 \mu$  for the kinbuna and it was  $12.28 \mu$  for the ginbuna. The nuclear plate in the ginbuna was twice larger than that in the kinbuna in diameter. Judged from Kobayashi et al. (1970), it is obvious that the ginbuna here used was triploid or tetraploid specimens and the kinbuna was diploid ones.

The developmental process of the oocytes was carefully observed in the ovaries of two triploid lines of the ginbuna (offsprings from 3n ginbuna ♀). At the ripe egg stage, the majority of the oocytes contained metaphase nuclei derived from a single maturation division. Tripolar spindle formation at the first maturation division was not found in the present observation, contrary to the result in *Carassius auratus gibelio* by Cherfas (1966, 1972).

Based on the present observations, it is considered that the triploid lines of the ginbuna are unisexual and may make triploid egg cells throughout a single homoeotype division during maturation period.

(Department of Biology, Japan Women's University, Mejirodai, Bunkyo-ku, Tokyo, 112, Japan)

#### 緒 言

ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) の性比は一般に雌に傾き、特に関東地方のように雌の発見されない地域もある(岡田・中村; 1948; 中村, 1969). この関東地方に生息するギンブナ雌の体細胞の染色体数は hyperploid の 3n と 4n であることが明らかとなり(小林ら, 1970), これら関東地方のギンブナ卵は他亜種または、他種魚類精子の媒精で母系同様の雌魚を生じた(小林, 1972). 小林(1971), 小林・越智(1972)は、これら 3n ギンブナの繁殖が gynogenesis により導かれるものであることを細胞学的に確認した。しかし現在までの報告では 3n のギンブナが gynogenesis により同様の染色体数を子孫に引き継ぐ機構については何等触れていない。

Cherfas (1966, 1972) は白ロシアのギベリオブナ (*Carassius auratus gibelio*) の 3n population について、3n の雌が gynogenesis により繁殖することを指摘し、このフナの 3n の体細胞の染色体数が子孫に引き継がれ

る機構について、3 極状 spindle で起った第 1 成熟分裂が途中で分裂をとめ、続いて正常な第 2 成熟分裂が均等的に起こることよるとしている。また Macgregor and Uzzell (1964) は 3n の雌が gynogenesis により繁殖する salamander の *Ambystoma tremblayi* と *A. platinum* について、親から子への 3n 染色体の継続は、卵形成過程における最終卵原細胞の染色体の 6n 化にあるとしており、Schultz (1969) もメキシコの胎生魚の *Poeciliopsis* 属の Cy 系列の魚にみられる 3n 雌の gynogenesis について、*Ambystoma* 属の場合と同様な機構によるものとみなしている。

#### 材料および方法

まず、キンブナ (*Carassius auratus* subsp.) とギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) の産卵直後の卵を同時に得る目的で、1972 年産卵期の重なる 5 月初旬に霞ヶ浦で、これらのフナを採集し、その中から容易に熟卵を放出する完熟魚を両亜種についてそれぞれ 2 個体選出

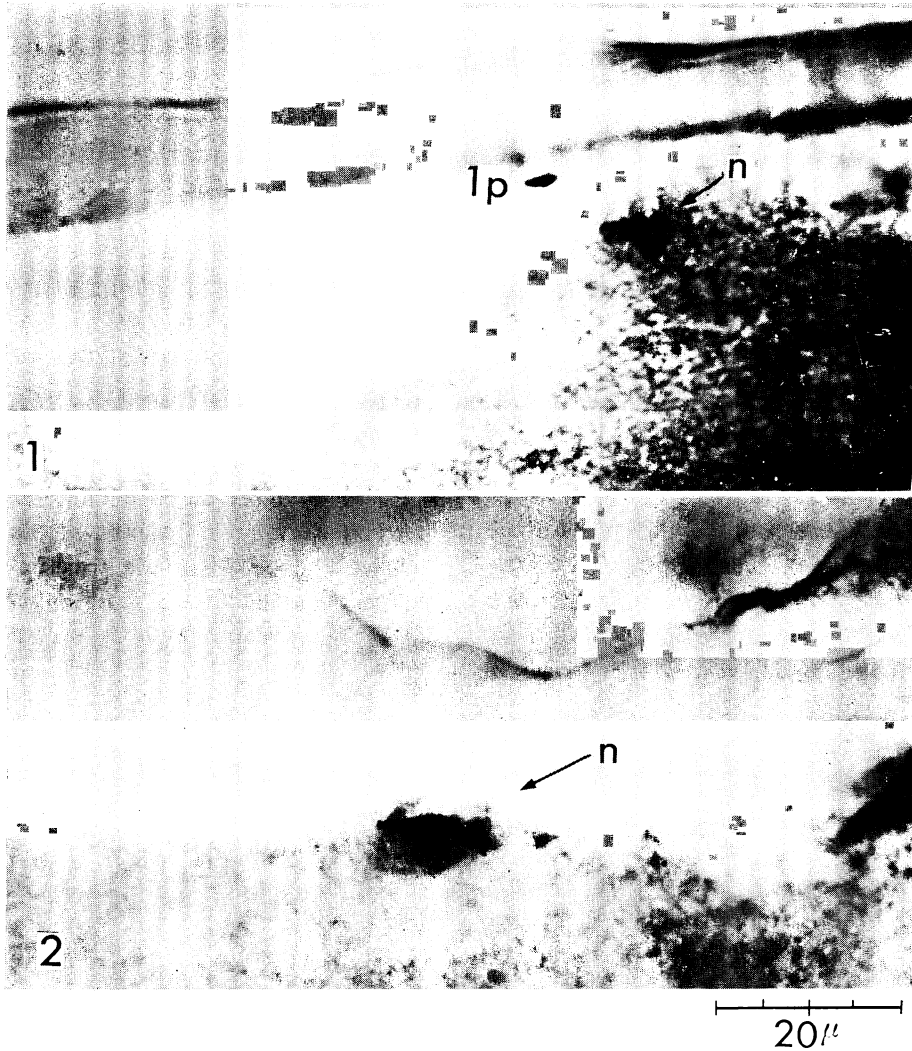


Fig. 1. The second maturation division in a ripe egg cell of the kinbuna just after spawning. lp: First polocyte. n: Metaphase spindle of the second maturation division.

Fig. 2. The maturation division in a ripe egg cell of the ginbuna just after spawning. n: Metaphase spindle of a single maturation division.

し、腹部を圧迫し放卵させ、放卵直後の卵を dioxan-Bouin's 液で固定し、これらの卵の中から各個体毎に 50 卵を材料として使用した。

次に、3n ギンブナの卵巣より成熟過程にある卵を得る目的で、1973 年 4 月下旬に 2 年魚となった 3n 系ギ

\*) 小林・越智(1972)は、3n 個体であることを確認したギンブナの卵をドジョウの精子で受精し、これより 3n の受精一代魚の生じることを報告した。その研究で使い残した同腹の受精一代魚を、本実験では 3n 系ギンブナとして使用した。

ンブナ\* 中、腹部の十分膨出した 5 個体を選び、それらの各個にそれぞれシナホリン (帝国臓器) の家兎 25 単位を注射し、水温 23°C の水槽中で約 10 時間飼育し、これらの中より、腹部を強く圧迫することにより始めて少量の熟卵を放出するような 2 個体を選び、これらから摘出した卵巣を肉眼的に熟卵部、熟未熟卵混合部、未熟卵部の 3 部分に分け、それぞれの部分を 1~2 立方厘の塊としてとり dioxan-Bouin's 液で固定した。固定後の各材料はパラフィン埋没法により厚さ 10 μ の連続切片とし、Delafield's hematoxylin と eosin 染色のプレパラ

トとして鏡検した。

成熟分裂中に現われる核板の長さは、側望よりみた spindle 中の中期の核板を、1,000 倍の顕微鏡で、接眼用マイクロメーターにより直接測定する方法と、同一倍率で引き伸ばした顕微鏡写真について計測する方法とを並行して行ない、その結果を調整することにより決定した。

卵巣内の卵母細胞の発達段階は Yamamoto and Yamazaki (1961) に基づいて決定した。

## 結 果

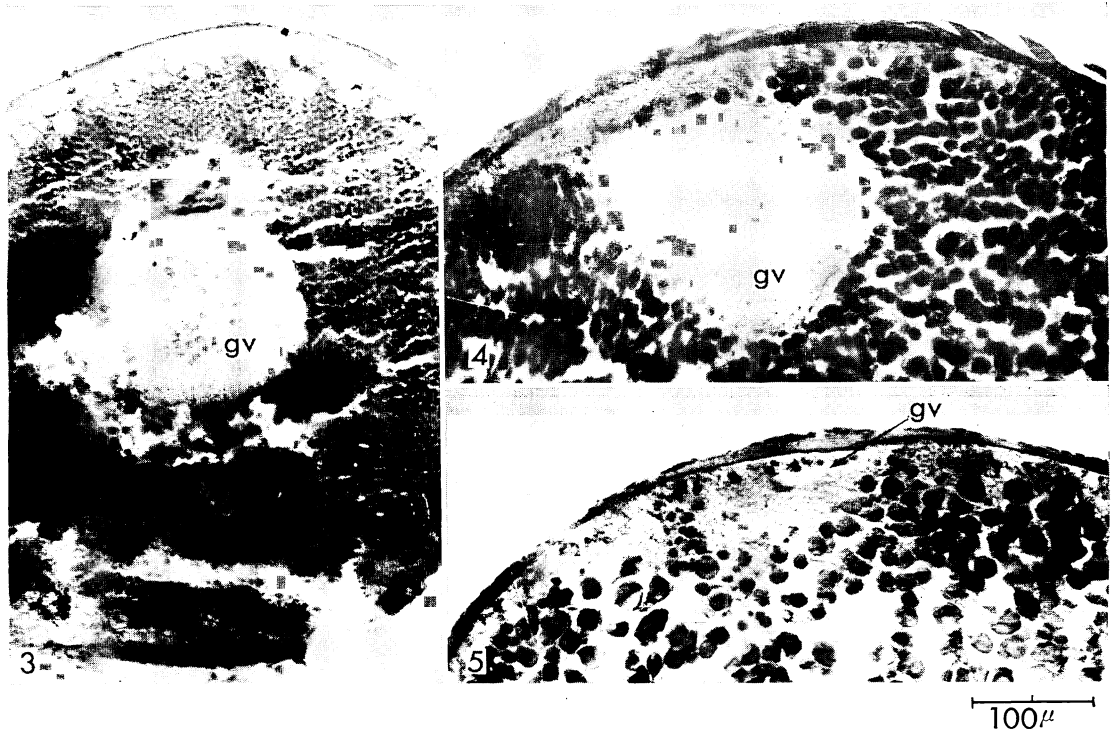
### 1. 産卵直後のギンブナ卵

100 個の卵の鏡検において、その中の約 2/3 は、卵の破損が甚だしかったり、卵膜を失うもの、また破損が僅かでも切断方向の関係で核板が完全な形態を表わさないものたちであった。残りの約 1/3 に相当する 36 個の卵では、卵母細胞の第 2 成熟分裂中期の像が観察できた。Fig. 1 に示すように、卵門の近くで、卵膜の内側に接して第 1 極体があり、第 1 極体より僅かに側方に片寄った位置で卵実質の表層部に第 2 成熟分裂中期の spindle が

存在した。これらの卵の中から第 2 成熟分裂中期の spindle が完全な形で保たれていると思われる 20 卵を選出し、それらの核板長を測定した。その結果、最長のものは  $6.75 \mu$ 、最短のものは  $5.95 \mu$  であり、20 卵の平均長は  $6.32 \mu$  であった。なおこの観察に使用した 2 個体のギンブナ卵の間には特記するような差異は認められなかった。

### 2. 産卵直後のギンブナ卵

100 個の卵の鏡検より、その 1/2 強は、卵の破損が甚だしかったり、切断方向の悪いもの、さらに卵膜を失うか、卵膜が卵実質から離れた位置にあるものなどで、これらは観察の対象から除外し、ほぼ完全な切断面をもつと思われる残りの 1/2 弱の 43 個の卵について詳細な観察を行なった。その結果、これらのいずれの卵にもギンブナ卵に存在したような第 1 極体を認めることはできず、Fig. 2 に示すように、卵門のやや側方で卵実質の表層部に大形の成熟分裂中期の spindle が一つ存在する特殊な卵母細胞像であった。これらの中から完全な成熟分裂中期の spindle が保たれていると思われる 20 卵を選び、核板長を測定した。その結果、最長のものは



Figs. 3~5. The developmental process of the oocytes from the migratory nucleus stage to the pre-maturation stage in the ovaries of the ginbuna of triploid line. 3. Early migratory nucleus stage. 4. Late migratory nucleus stage. 5. Pre-maturation stage. gv: Germinal vesicle.

13.50  $\mu$ 、最短のものでも 10.52  $\mu$  あり、20 卵の平均長は 12.28  $\mu$  であった。なおギンブナの場合にも使用した 2 個体の卵の間で特記するような相違は認められなかった。

### 3. 3倍体系ギンブナ卵の成熟過程

a) 肉眼による卵巣の状態。2 個体とも卵巣はほぼ同様な熟度にあり、卵管とそれに連なる左右の卵巣の最後部の 10~15 mm の部分にはアメ色半透明の卵の詰まる熟卵部があり、その前方 5~7 mm の比較的短い部分には半透明な熟卵と不透明な未熟卵が入り交じる熟未熟卵混合部があり、これらの部分の卵は容易に卵巣から離れ独立した。これより前方の卵巣はすべて不透明な卵で占められる未熟卵部であり、この部分の卵は簡単に卵巣から離れることはなかった。

b) 鏡検による未熟卵部。卵巣のこの部分に存在する卵母細胞の殆んどは migratory nucleus stage に相当するもので、Figs. 3, 4 で示すように、germinal vesicle が中央部より動物極側に移動し始めるものから、動物極に接近するものまでの間の各種の段階にあるものが存在した。この時期の卵膜の周囲は緊密に結合した follicle cell で取り囲まれていた。

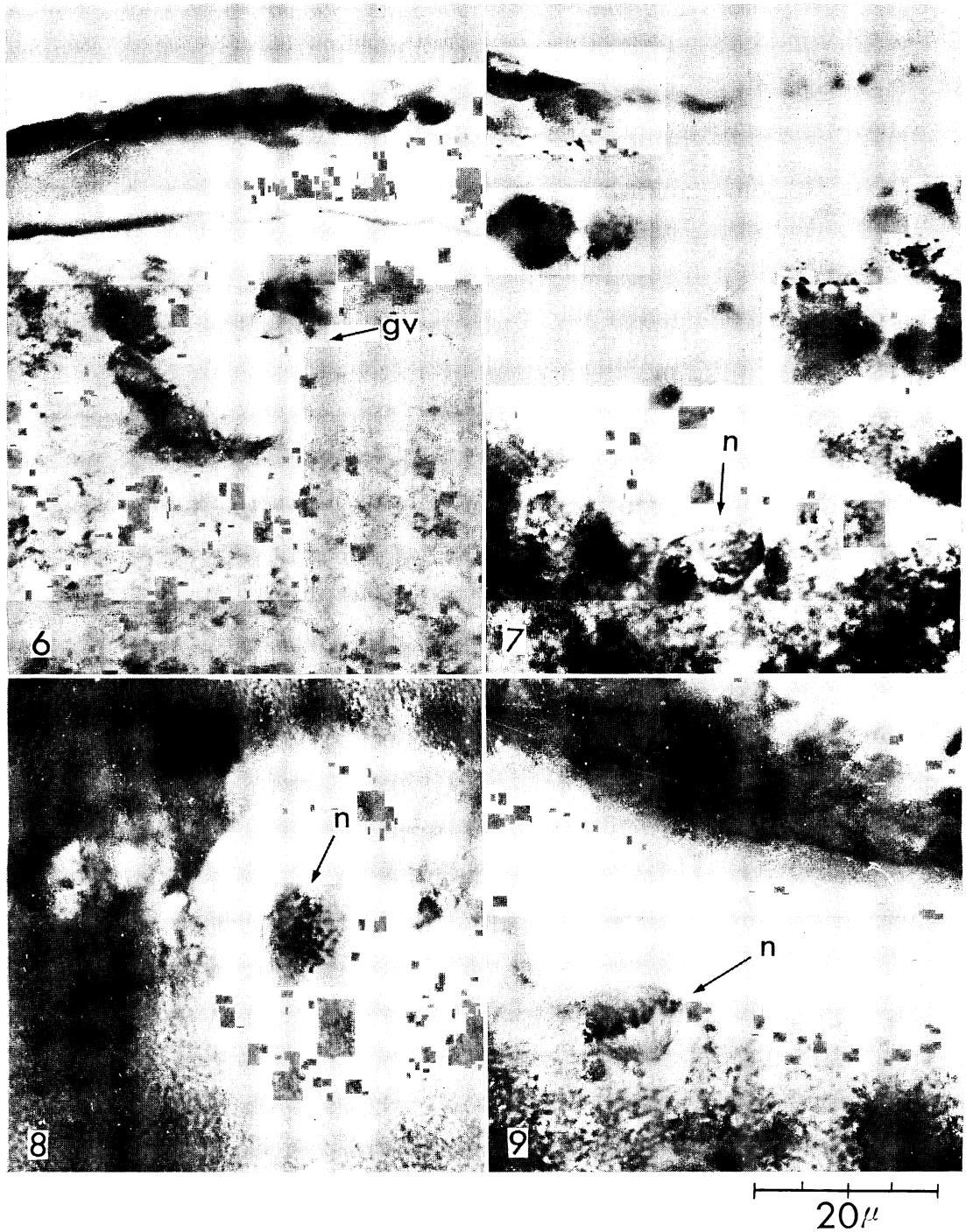
c) 鏡検による熟未熟卵混合部。卵巣のこの部分には migratory nucleus stage, pre-maturation stage, ripe egg stage の 3 段階の卵母細胞が存在した。migratory nucleus stage の卵母細胞はいずれも germinal vesicle が動物極側に接近しており、卵膜の周囲は follicle cell で取り囲まれていた。pre-maturation stage の卵母細胞は Figs. 5, 6 で示すように、動物極側に移動した germinal vesicle の核膜が消失し、細胞質と核質との境が次第に失われつつあったが、動物極側に片寄った核質の中央部に顆粒状の染色質が出現していた。この時期においてもまだ卵膜の周囲には follicle cell は認められた。ripe egg stage の卵母細胞では、細胞質が卵黄部の周囲を取り囲むようになり、この細胞質は動物極側で多少厚さを増し、細胞質の表層部には表層胞が出現し始めていた。この時期の始めに follicle cell は卵膜の外側の所々で剥脱し始め、その後卵膜の周囲から全く脱落してしまった。これらの卵母細胞について成熟分裂の過程をみると Fig. 7 のように、動物極側の細胞質中に細い染色糸が纏れるように集合して、一見胞状の塊をなすもの、Fig. 8 のように、動物極側の細胞質中に太さを増した染色体が赤道面に配列しつつあるもの、さらに Fig. 9 のように、動物極側の表層細胞質中で染色体が赤道面に配列し、完全な成熟分裂中期の spindle を表わすものも認められ、分裂の段階的な経過を示すと思われる。この時期

に Chermas (1966, 1972) の報告にあるような 3 極状 spindle の出現する可能性が最も高いように思われたが、本観察においては全くこのような spindle に遭遇することはなかった。これらの中で明瞭に spindle を表わす 5 個の卵母細胞について成熟分裂中期の核板長を測定した結果、それらの平均は 12.10  $\mu$  であった。

d) 鏡検による熟卵部。卵巣のこの部分にある卵母細胞はいずれも ripe egg stage に相当するもので、動物極側の細胞質の表層部に成熟分裂中期の spindle が存在した。もちろんこの部分の卵母細胞の卵膜の外側の follicle cell は完全に脱落していた。またこれらの中で明瞭に spindle を表わす 10 個の卵母細胞について成熟分裂中期の核板長を測定した結果、それらの平均は 12.38  $\mu$  であった。

## 考 察

小林ら (1970) によると、霞ヶ浦地方の両性型のキンブナの染色体数は 100 で  $2n$  であるのに対し、同地方の単性型ギンブナには  $2n$  のものではなく、染色体数がほぼ 156 で  $3n$  にあたるものと、ごく少数のほぼ 206 で  $4n$  にあたるものからなっている。そのため本研究で使用したキンブナの 2 個体はいずれも  $2n$  と考えられる。これらのキンブナから得た産卵直後の 36 個の卵には、明らかに第 1 極体と第 2 成熟分裂中期の spindle が認められた。霞ヶ浦産のギンブナの 2 個体は、 $3n$  か  $4n$  のどちらかの個体と思われる。これらのギンブナから得た放卵直後の 43 個の卵には全く第 1 極体は認められず、成熟分裂中期の spindle がただ一つ存在するにすぎなかった。またギンブナの成熟分裂中期の核板の長さは平均 12.28  $\mu$  であり、キンブナの第 2 成熟分裂中期の核板の長さは平均 6.32  $\mu$  で、長さについて前者は後者の約 2 倍、面積にすれば約 4 倍となり、両者の間に大きな違いがあった。しかし、これらのギンブナ卵の成熟分裂中期の spindle の形態や核板の大きさは、 $3n$  系ギンブナ卵巣中の ripe egg stage の卵母細胞とほぼ一致した。これらの事実から、霞ヶ浦産のギンブナ 2 個体は  $3n$  個体と推察されると同時に、 $3n$  系ギンブナの卵巣内にある ripe cell stage の卵母細胞の多くは、産卵直後の卵と細胞内部の形態について何等異なるものでないことが分かった。次にこのような  $3n$  系ギンブナは熟卵形成過程において成熟分裂の一回を欠如するもののように思われる。これは単に第 1 極体の存在を確認し得なかったという事実だけではなく、 $3n$  系ギンブナの成熟分裂中期の核板はキンブナの第 2 成熟分裂中期の核板よりはるかに大きいことによっても裏付けられた。



Figs. 6~9. The developmental process of the nuclei in the oocytes from the pre-maturation stage to the ripe egg stage in the ovaries of the ginbuna of triploid line. 6. Germinal vesicle at the pre-maturation stage. The nuclear membrane began to disappear. 7. Prophase nucleus at the ripe egg stage. 8. Pre-metaphase nucleus at the ripe egg stage. 9. Metaphase nucleus at the ripe egg stage. gv: Germinal vesicle. n: Nucleus.

Macgregor and Uzzell (1964) は *Ambystoma tremblayi* と *A. platinum* で、また Schultz (1969) は *Poeciliopsis* 属の Cy 系列について、これらの 3n の雌が gynogenesis をする卵を造るためには、最終卵原細胞の染色体数が 6n となり、これが二回の成熟分裂を経て 3n に減数するとしている。このような卵の成熟方式では、その過程で当然二回の成熟分裂が行なわれ、第 1 極体が放出されることになる。しかし今回の観察で第 1 極体の放出は認められなかったことから 3n ギンブナ卵の成熟過程には、この方式は当てはまらないことになる。

Cherfas (1966, 1972) は両性型の 2n のギベリオブナの染色体数を 94、単性型で gynogenesis を行なう 3n のギベリオブナ雌の染色体数を 141 とし、3n の染色体は相同の 3 組の染色体群により構成されると考えた。しかし、第 1 成熟分裂では相同染色体の間で接合は起らず、各染色体は一価のまま 3 極状 spindle を形成し、その後排卵時に 3 極が 2 極となり、染色体の減数が行なわれないまま、これが第 2 成熟分裂中期に移行すると述べている。ここで本研究で観察した 3n 系ギンブナの卵巣内にある卵母細胞の成熟経過を振り返ってみると、卵巣内には migratory nucleus stage や pre-maturation stage から ripe egg stage の卵母細胞に至る各 stage のものが密接して連続的に排列しており、特に熟未熟卵混合部中にある卵母細胞中には、成熟分裂中期の核板形成に至るまでの染色体の推移を表わすようなものが存在した。しかし、これらの過程を通して 3 極状 spindle は全く存在しないばかりでなく、卵巣内の卵母細胞の排列状態から推しても、pre-maturation stage から ripe egg stage の卵母細胞になるまでの間に第 1 成熟分裂の過程をさしはさむような時間的余裕は全く考えられない。また Ojima et al. (1966) の研究で、2n のフナの染色体数は 100、n は 50 であることが明確となり、小林ら (1970) は 3n のギンブナ、また小林ら (1973 a, b) は 3n のナガブナやアムール河産の 3n のギベリオブナについて、それらがいずれも 156 の染色体数をもつことを明らかにしたが、核型分析において、それらの中に 3 組の相同染色体群を想定することは困難であった。そのため 3n のギベリオブナの染色体数が 141 で 3 組の相同染色体群により構成されるとする推測は疑わしく、従って第 1 成熟分裂で 3 極を形成する論拠も稀薄となった。ただ Cherfas (1966) は第 1 成熟分裂に生じた 3 極状 spindle を説明するための写真を掲載している。しかし、この写真も上述の考察を覆えず程明瞭なものとは思われない。

以上の考察に基づいて本研究の結果をみると、3n ギンブナ卵の成熟機構は、2n の無脊椎動物の多くにみら

れるディプロイド型の単為発生や gynogenesis をする 2n の *Rhabditis pellio* の場合 (Wilson, 1928) と同様に、成熟期に同型核分裂を一回行なうだけで、真の減数分裂を欠き、3n の染色体数がそのまま卵に引き継がれるとみるのが现阶段では最も妥当なように考える。

なお、小林 (1971) は 3 倍体ギンブナの gynogenesis に関する細胞学的研究において、精子侵入後に放出される極体を第 2 極体と記載したが、本研究の結果より、これを単なる極体とみなすべきことを、ここに付記しておく。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり有益な御助言を賜わり、材料採集に御協力下さった国立科学博物館の中村守純博士、また本文の御校閲の労をとられた東京医科歯科大学の外村晶教授に心から感謝する。

## 引用文献

- Cherfas, N. B. 1966. Natural triploidy in females of the goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch). *Genetika*, (5): 16~24, figs. 1~6.
- Cherfas, N. B. 1972. Results of a cytological analysis of unisexual and bisexual forms of silver crucian carp. In Cherfas, N. B. ed. "Genetics, selection, and hybridization of fish." Israel Program for Scientific Translations Ltd., 79~90, figs. 1~3. (Original Russian edition, 1969).
- 小林 弘. 1971. 3 倍体ギンブナの gynogenesis に関する細胞学的研究. *動物学雑誌*, 80: 316~322, figs. 1~15.
- 小林 弘. 1972. 日本産フナの交雑実験について. *日本女子大学紀要 (家政)*, (19): 35~62, figs. 1~7.
- 小林 弘, 川島康代, 竹内直政. 1970. フナ属魚類の染色体の比較研究, 特にギンブナに現われた倍数性について. *魚類学雑誌*, 17: 153~160, figs. 1~4.
- 小林 弘, 越智尚子. 1972. キンブナとドジョウの精子の媒精により生じた 3 倍体ギンブナの仔魚の染色体について. *動物学雑誌*, 81: 67~71, figs. 1~5.
- 小林 弘, 越智尚子, 竹内直政. 1973a. フナ属魚類の染色体の比較研究 (続報): 特にニゴロブナ, ナガブナ, ギンブナについて. *魚類学雑誌*, 20: 7~12, figs. 1~5.
- 小林 弘, 越智尚子, 竹内直政. 1973b. アムール水系の silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) の染色体について. *日本女子大学紀要 (家政)*, (20): 83~88, figs. 1~4.
- Macgregor, H. C. and T. Uzzell. 1964. Gynogenesis in salamanders related to *Ambystoma jeffersonianum*. *Science*, 143: 1043~1045.
- 中村守純. 1969. 日本のコイ科魚類 (日本産コイ科

- 魚類の生活史に関する研究). 資源科学シリーズ 4, 資源科学研究所, 東京, 135 pp., figs. 1~16, pls. 1~419.
- Ojima, Y., S. Hitotsumachi, and S. Makino. 1966. Cytogenetic studies in lower vertebrates, 1. A preliminary report on the chromosome of the funa (*Carassius auratus*). Proc. Japan Acad., 42: 62~66, figs. 1~4.
- 岡田弥一郎, 中村守純. 1948. フナの品種に関する研究, (1) 群馬県城沼産のフナ. 日本水産学会誌, 13: 270~284, figs. 1~7.
- Schultz, R. J. 1969. Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (Poeciliidae) and other vertebrates. Amer. Natur., 103: 605~619, figs. 1~2.
- Wilson, E. B. 1928. The cell in development and heredity. Macmillan, New York, 1232 pp., figs. 1~529.
- Yamamoto, K. and F. Yamazaki. 1961. Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish, *Carassius auratus*. Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ., 12: 93~110, pls. 1~2.
- (112 東京都文京区目白台 日本女子大学生物学教室)