Japanese Journal of Ichthyology
Vol. XIII, nos. 4/6
July 31, 1966

魚類学雑誌
第13巻 第4/6号
1966年7月31日発行

メダカの正常発生過程における生殖細胞の増殖と性分化*

都築英子**・江上信雄・兵藤泰子
(放射線医学総合研究所・生物研究部)

Multiplication and sex-differentiation of germ cells during development in the medaka, *Oryzias latipes*

Eiko TUZUKI, Nobuo EGAMI and Yasuko HYODO
(Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences)

硬骨魚類の生殖細胞の起源や生殖腺形成過程に関する組織学的観察は古くから多くの報告があるが (JHONSTON, 1951, 参照), 最近哺乳類について詳細に行なわれている生殖細胞の増殖と分化の知見とくらべると, さらに詳しく研究すべき点が少くないと思われる。

我々はメダカの胚にX線照射を行なうと, 完全に生殖細胞を欠く個体が多数出現する事を知ったので, これに関連してメダカの正常発生における生殖細胞の行動を研究する必要が生じた。メダカの生殖細胞の起源と生殖腺形成については就に山本 (1953) や蒲生 (1961) によって研究されているが, 今回は主として, より後の時期について観察した。結果の大要をここに報告する。

材料と方法

ヒメダカの受精卵を集め, 22.5±1°C で孵卵した胚, およびこれから孵化した稚魚に, 山本 (1958) の処方による粉末飼料を与えて飼育したものを材料とした。受精後4日以降毎日100個体以上をブアン氏液で固定し, 8μ のパラフィン連続切片を作り, マイヤー氏のヘムアラム・エオジン染色をした。

胚および孵化後20日以内の稚魚については生殖細胞が分布する部位全体の切片を総て検鏡した。生殖細胞数の算定の場合には, 切片上にみられる生殖細胞の核の数を総て数え, 同一の核が隣接する切片に現われる場合にはこのうち一方を除外した。孵化後30日以降の個体については, 生殖細胞数が激増するので, 10枚おきの切片を観察に用いて算定した。

なお胚の発生期の記述には, 便宜上松井 (1949) の発生段階図表に従うことにした。

結果と論議

(1) 孵化以前の胚の生殖細胞の分裂と総数について

蒲生 (1961) によると, 嚢胚期には既に始原生殖細胞が形態学的に認められるといわれているが, 今回は発生初期については観察を行なわず, 受精3日後に血液循環のはじまった胚 (松井

* Contribution No. 69 from the Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences.

** 現所属: 名古屋大学理学部生物学教室

図 1.　メダカ胚と稚魚の生殖細胞の増殖および分化過程

A；受精後 6 日 (st. 28)，始原生殖細。(pgc) B；受精後 8 日，(st. 30) 有糸分裂 (m) が見られる。C；孵化日，有糸分裂がみられない切片。D；孵化日，有糸分裂 (m) が見られる切片。E；孵化後 2 日，(g) 生殖原細胞だけの見られる個体。F；孵化後 2 日，卵原細胞 (g) の外に減数分裂前期のレプトテン期 (l) 及びザイゴテン期 (z) の細胞が見られる個体。G；孵化後 5 日，減数分裂前期に入つた細胞の見られない個体。H；孵化後 5 日，卵原細胞 (g)，ザイゴテン期 (z) の外にパキテン期 (p) の細胞が見られる個体。I；孵化後 10 日，生殖原細胞 (g) のみが見られる個体。J；孵化後 10 日，卵原細胞 (g)，ザイゴテン期 (z)，パキテン期 (p) の外にデイプロテン期 (d) の細胞が見られる個体。 C, E, G, I は雄ら D, F, H, J は雌分化の過程を示す (説明本文)。

表 1.　メダカ胚の発生に伴なう生殖細胞数の変化

受精後の日数	発生段階(松井，'59による)	観察個体数	1個体のもつ生殖細胞総数(平均±標準誤差)	全生殖細胞の分裂頻度(%)
4	27	30	37.3± 2.1	0.0
5	28	30	40.9± 1.8	0.0
6	29-29	24	49.8± 4.1	0.0
7	29-30	41	41.1± 2.8	0.0
8	30-31	12	57.5± 7.2	0.0
9	31-32	19	62.4± 6.9	1.2
10	32-33	21	108.0±10.3	1.1
11	33	33	121.4±13.0	1.1

の発生段階 26) で，生殖細胞が明白に腸と前腎の間にむかって移動している時期以降だけについて研究した。発生段階 26 になると生殖細胞はその位置からも又形態からも明白となり，体細胞と見誤る可能性がほとんどなくなるからである。生殖細胞は他の細胞にくらべて極めて大型で球形に近く，細胞質の染色性は薄く，大きく球形の核は明瞭な仁を含む点で他の細胞と区別される (図 1A)。

受精の 4 日後には眼のメラニンは増加し，胸鰭原基の形成が認められ，松井の発生段階 27 に達する。この時期には生殖細胞は腸の背面の生殖腺原基部に集まる。この状態の胚 30 個について生殖細胞の総数をかぞえたところ，その平均数は 37 個であった (第1表)。受精の 5 日後には松井の発生段階 28 に，6 日後，7 日後には個体によって多少の発生段階のずれが生ずるが，それでも生殖細胞には分裂像はほとんど見られず，生殖細胞総数も有意な増加を示さない。8 日後には発生段階の 30 から 31 に達し，僅かに生殖細胞総数の増加の傾向を示す。第 9 日後から 10 日後には明瞭に生殖細胞総数は明らかに増加し，生殖細胞の中に分裂中のものが出現し (図 1B)，孵化直前には生殖細胞総数の平均が 100 個をこえる。分裂像は 9 日～11 日の間ほぼ全体の 1% を保つが，この 3 日間に生殖細胞総数は約 2 倍になるので，各細胞は平均 1 回の分裂を行なうと思われる。蒲生 (1961) の報告では，孵化以前の胚では，生殖細胞は未だ分裂を行なわないと記載されている。しかし今回の観察によると，生殖細胞の分裂は発生段階 31 以降において急速におこることが明らかとなった。このことは分裂像が発見されこるとからも，生殖細胞の数が増すことからも裏付けされるので確かといえる。蒲生のこの時期については観察個体数が 5 から 9 個程度であるが，生殖細胞総数については，今回の観察結果の範囲に入っているので，数のとり方自体には両者の間で差はないとみてよいと思われる。

(2)　孵化以降の稚魚の生殖細胞について

今回の実験では孵化は受精後 11 日からはじまり 12，13 日にもおこった。孵化直後の稚魚を集め，孵化後の日数の異なる群毎に生殖細胞を調べた。

孵化前の胚では，生殖細胞はほとんど総て生殖原細胞 (gonia) の状態にある。孵化時の生殖腺は平均 100 個の生殖細胞を含み，この中には時として，これが減数分裂の前期に入っているものがみられた。

生殖細胞の状態をよく観察すると，孵化直後の個体で，既に雌型のものと雄型のものの分化がおこっていることがわかった。すなわち，孵化直後から生殖細胞の総数が比較的少なく，これらがすべて生殖原細胞であり，しかもほとんど分裂していないものがあるが，これが将来精

表2. 孵化後の雄の生殖細胞の変化

孵化後の日数	観察個体数	精原細胞総数（平均±標準誤差）	全生殖細胞の分裂頻度（%）
0	9	123±15*	0.4*
1	5	124±14*	0.9*
2	4	63± 9	0.0
3	7	74±17	0.5
4	8	80± 8	0.0
5	5	82± 9	0.0
6	4	65± 6	0.0
7	9	91±10	0.2
8	8	86±10	0.0
9	6	71±10	0.0
10	9	77± 6	0.0
11	8	92±16	0.0
12	3	75± 9	0.4
20	5	142± 9	0.0
30**	5	14×10^2	—

* これらの中には雌が混在している可能性がある。
** 10枚おき切片の観察より計算した概数。

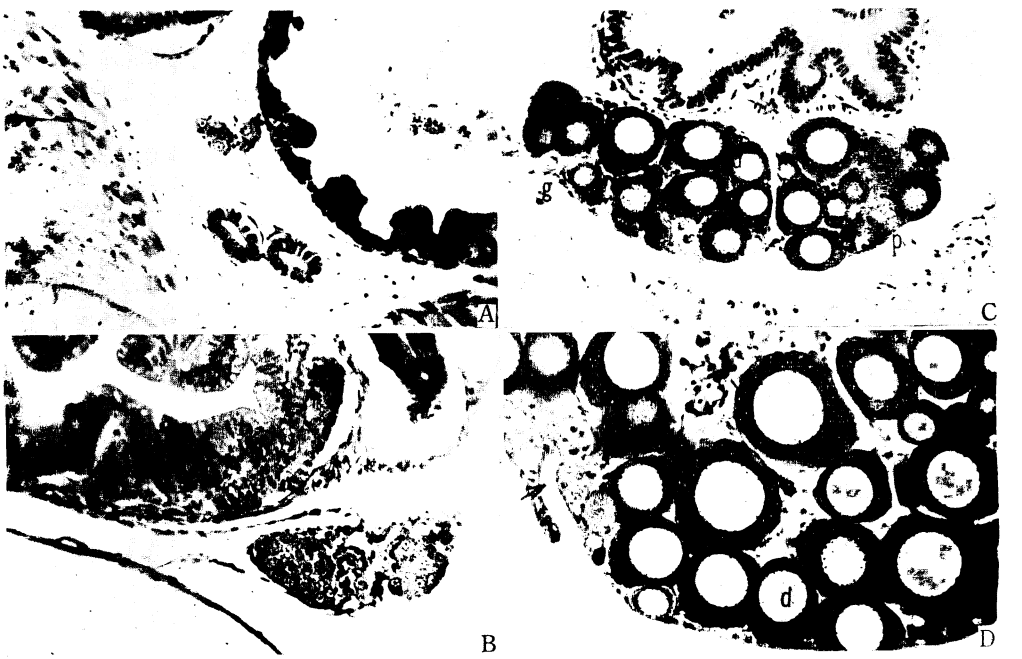

図2. 孵化後20日及び30日の稚魚の生殖腺

A；孵化後20日の雄の生殖腺。B；孵化後30日の雄の生殖腺。C；孵化後20日の卵巣，卵原細胞（g），パキテン期（p）の細胞もみられるが，卵巣の大部分をデイプロテン期（d）の細胞がしめる。D；30日後の卵巣デイプロテン期（d）の細胞が，卵巣の大部分を占め，成熟雌の卵巣に近くなるが，卵巣のかく壁の近くには卵原細胞がザイゴテン期，パキテン期の細胞や存在する（矢印）。

巣となるのに対し，生殖細胞の総数が多く，これらの一部が有糸分裂を行なって増殖しており，しかも一部細胞の核内に染色体の凝集がみられ，減数分裂前期に入っているものが卵巣になってゆくことがわかったので，以下両者を区別して記す。

A；精巣への分化を示す生殖腺

生殖原細胞のみを含む個体についての，孵化後30日間の生殖細胞総数の変化を表2に示す。孵化日及び孵化後1日の稚魚では分裂像が時として観察される。これは分化がおくれた個体であって，その後卵巣に分化してゆくものが混在していたものと考えられる。このことを考慮すると，雄では孵化直後から孵化12日目にかけて精原細胞の分裂像が始んどみられず，80個内外の精原細胞をもち（図1C, E, G, I），生殖細胞の増加はみられないことがわかる。その後に分裂がはじまり，孵化後20日目には生殖細胞数は約150に達し支持組織も僅かに発達してくる（図2A）。孵化後30日目の個体では成体のような精巣構造に近づき精原細胞の有糸分裂も観察され，生殖細胞総数は20日目の10倍程度となる。減数分裂も開始され第一次精母細胞への分化が観察された（図2B）。70日後には，精巣の外形，大きさは成体のそれと始んど同じまで生長し，精巣の外周辺より中心部に向って精原細胞をもった嚢，第一次及び第二次精原細胞をもった嚢，精細胞，精子をもった嚢が配列し，中心部の輸精管には成熟精子も観察される。これらの一連の変化から未分化生殖腺から精巣への分化の過程が時期を追って明らかとなった。

B；卵巣への分化を示す生殖腺

孵化直後の稚魚では，明瞭な仁が1つ存在する球形の核を持つた生殖原細胞の外に核内にヘマトキシリン染色性の顆粒と染色糸が見られ，減数分裂前期の開始が観察される個体がある（図1D）。これらの細胞はその後の細胞の様相から卵母細胞の減数分裂前期の開始であることがわかる。従つて，この様な変化のはじまつた個体は雌に分化するものである。これらの個体では孵化と前後して減数分裂が始まる一方，生殖原細胞（卵原細胞）の分裂もつづけられる。卵原

表3.　孵化後の雌の生殖細胞数の変化

孵化後の日数	観察個体数	卵厚細胞（平均）	卵原細胞の有糸分裂の数（平均）	レプトテン期とザイゴテン期にある細胞の合計	パキテン期とデイプロテン期にある細胞の合計	生殖細胞総数（平均）
0	8	109	0.8	8	0	117.8
1	9	171	2.6	18	0	119.6
2	13	157	0.4	52	0	209.4
3	10	146	0.1	82	0	228.1
4	9	139	1.1	61	2(1)**	203.1
5	10	144	0.6	121	32(5)	297.6
6	12	152	0.9	213	13(3)	378.9
7	8	108	1.8	159	17(4)	285.9
8	—	—	—	—	—	—
9	8	132	0.1	88	133(7)	353.1
10	10	153	0.1	88	131(9)	372.1
11	9	152	0.2	113	105(7)	370.2
12	6	175	0.8	123	132(6)	430.8
20	5	288	1.2	145	270(5)	704.2
30*	4	6×10	—	99×11	245×10(4)	405×10

* 10枚おきの切片の観察による概数

** (　) 内の数字はこの期の細胞のみられる個体数

細胞は孵化時には約100あつたものが10日後には約150となり20日後には200となる。(表3) 減数分裂の過程は生殖原細胞の核中にヘマトキシリン染色性の染色糸の出現にはじまり，孵化後1日で，染色糸の塊が核の中心部にあつまつているレプトテン期の細胞がみえはじめる (図1F)。これと前後して1～2日後に，核の内容物 (染色糸) が核の一方 (仁の反対側)に片寄つて凝塊となつている (図1F，H) ザイゴテン期の細胞が出現しはじめ，孵化後3，4，5日と日数の経つにつれてザイゴテン期の細胞の割合が増加する。更に孵化後4日には個体によつては，染色糸が次第に核の周辺部よりもどりはじめ核全体に拡がつた (図1H，J) 状態のパキテン期の細胞がみえはじめ，5，6，7，8，9日とこの期の細胞をもつた個体が増え，その数も増加し，孵化後10日では，始んど全部の個体でこの期の細胞が出現し，その数も平均130となる。また孵化後6～7日頃から，染色糸がやや太くなつて，細胞質がヘマトキシリン染色性をおびはじめていわゆるデイプロテン期の細胞 (図1J) が出現しはじめ，孵化後10日ではデイプロテン期も進行し，核にはランプ・ブラッシュ染色体を持つて，細胞質はだんだん増加していわゆるディクティエイトの状態に入つた卵母細胞 (図1I) が相当数みられる様になる。この期の卵母細胞の周辺には沪胞細胞がみられる。孵化後20日の個体では，卵原細胞から，減数分裂前期のレプトテン期からデイプテン期までの全段階の細胞が存在し，デイプテン期の細胞が非常に大きくなつて，卵巣のかなりの容積を含める様になる (図2C)。更に孵化後30日の個体では，卵原細胞やレプトテン期及びザイゴテン期の細胞よりもパキテン，デイプロテン期の細胞の方が多くなつて成体の卵巣に近ずいて来る (図2D)。孵化後70日のものでは，始んど成体のそれと同じ程度まで発達し卵原細胞は始んどみあたらず，レプトテン，ザイゴテン，パキテン，デイプロテン期の細胞も，卵巣中の生殖上皮のすみにほんのわずかを残すのみで，始んどの細胞がディクィエイトの状態で卵母細胞の成長と共に沪胞細胞もだんだんと増加し，すでに卵黄の蓄積のおこなれわたものもみられる。孵化直後から12日までと20日及び30日の卵巣中の，各段階の生殖細胞の数の変化は，卵原細胞，レプトテン期及びザイゴテン期，パキテン期及びデイプロテン期の細胞に分けて，表3に卵原細胞の有糸分裂と共に示した。

以上の観察結果から，生殖腺の構造を組織学的にみた場合には，性分化がみられるのは孵化後10日目以降であるが，生殖細胞の増殖の様子及び減数分裂の過程の開始状態からみると，孵化直後に既に性分化がはじまつており，雌の卵原細胞の卵母細胞への分化の方が雄の精原細胞の精母細胞への分化よりも早い時期におこることが明らかとなつた。これらの観察結果は比較的最近明らかになつた哺乳類胚についての結果と比較して，極めて興味深い。

また雌性生殖腺の先熟傾向も細胞学的に明らかとなつた。

結　　語

メダカ胚では受精後4日目 (松井，1949 の st. 27) に始原生殖細胞は腸と前腎の間の生殖腺原基部に集まつて生殖腺の形成がはじまるが，受精後4日 (st. 27) から8日 (st. 30-31) までは始原生殖細胞の有糸分裂は起らず，その数は増加しない。孵化前2～3日 (st. 31-32) の胚になると急激に有糸分裂がはじまり，その数も上昇する。しかし孵化前の胚では生殖腺細胞の減数分裂は認められず，雄，雌の生殖腺の区別は生殖細胞の形態からは認められない。孵化の頃から雌では生殖原細胞の減数分裂前期の過程がはじまり，雄と雌の分化が起りはじめる。雄では孵化後12日までは殆んど，精原細胞の有糸分裂はみられないが孵化後20日以降は精原細胞数は増殖しており，30日頃から精母細胞への分化がはじまる。孵化後日70日には始んど成体型

の精巣にまで達する。一方雌では孵化後も卵原細胞の分裂がつづく一方孵化直後から一部の細胞が減数分裂前期にはいる。孵化後1～2日でレプトテン期，ザイゴテン期の細胞が出現しはじめ4～5日でパキテン期，6～7日でデイプロテン期の細胞がみられる。孵化後10日，20日の卵巣には卵原細胞から，減数分裂前期デイプロテン期までの種々の段階の細胞が含まれるが，30日後には卵原細胞やレプトテン及びザイゴテン期の細胞よりもパキテン及びデイプロテン期の細胞の割合が増加し，成熟雌の卵巣に近くなり，孵化後70日には，卵黄蓄積のはじまつたディクティエイトの核を持つ卵母細胞がみられ，成熟雌の卵巣と同じ程度まで発達する。

引 用 文 献

蒲生英男, 1961. On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka, *Oryzias latipes*. Japanese Journal of Zoology, xiii, 101-115.

JOHNSTON, P. M., 1951. The embryonic history of the germ cells of the largemouth black bass, *Micropterus salmoides salmoides*. Journal of Morphology, lxxxviii, 471-542.

松井喜三, 1949.メダカの発生経過. 実験形態学, v, 33-42.

山本時男, 1953. Artificially induced sex-reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). Journal of Experimental Zoology, cxxiii, 671-594.

———, 1958. Artificial induction of functional sex-reversal in genotypic females of the medaka (*Oryzias latipes*). Journal of Experimental Zoology, cxxxviii, 227-264.