

サケの孵化に関する細胞組織学的研究

I 孵化腺, 粘液腺及卵膜溶解について

委嘱 西 田 秀 夫

(北海道大学理学部)

Histological and Cytological Studies on the Hatch of Salmon,
Oncorhynchus keta. I. On the Hatching Gland, Mucous Cell,
and Softening of Egg Membrane.

By

Hideo NISHIDA

Zool. Inst. Hokkaido Uni.

(With 5 figures)

1. Before hatching out two types of unicellular glands (hatching gland and mucous cell) are present in the epidermis of salmon embryo. The development of these glands begins in the eyed stage (seeing the eye-spot through the membrane). A great number of hatching gland in the oral cavity and gill at about two or three days before hatching out is disappeared after the hatch, but the surface of embryo is covered with mucous cells.

2. Numerous secretory granules included in the hatching gland, its diameter reaches to 2 microns, are mitochondria and this granule is well fixed with Bouin's solution and stained in blue with Mallory's triple stain. The mucous cell inclusion is almost Golgi materials and by the use of basic dye a distinct metachromatical color is produced. Mitochondria and Golgi materials of the gland cell were discussed cytologically and cytochemically.

3. Toward the end of the embryonic life, the egg membrane which consists of three layers, is highly softening. The change of constitution of the egg membrane during the softening was studied by the use of Mallory's triple stain.

I 緒 言

サケの孵化に関しては森脇(1910)の生理学的研究があるが、これはわが国のみならずこの分野における最初の業績であつた。また本道における犬飼等(1939)の生理並びに細胞組織的報告も注目される。これらの研究を發展せしむるとともにサケの孵化事業のための基礎資料を得んとして本研究に着手した。この報告はその最初の結果として孵化時における孵化腺, 粘液腺について記するとともに卵膜溶解の組織学的観察も併せ記した。孵化腺に関する細胞学的観察は先にイバラトミヨ(1953 a), サケ(1953 b)で述べたから再び繰り返す必要もないが都合上簡単に記載することにした。

研究にあつて終始御助言賜つた市川純彦教授, 山形大学久佐守助教授並びに材料の提供など特別の御配慮を戴いた北海道さけ・ます孵化場調査課長佐野誠三氏, 同課足田豊彦氏に対し厚く感謝の意を表する。なおまたこの研究は北海道科学研究費補助金によつたものである。

II 材料及方法

本研究に用いられたものはすべて北海道さけ・ます孵化場千歳支場で1952年11月, 12月に採集したものを北海道大学理学部動物学教室において人工受精し, その後同教室で飼育したものである。受精卵は孵化盆にならべ温度 10°C 内外の流水の井水で飼育し孵化場で行っているように容器を黒く塗つて暗くするようなことはしなかつた。固定は発眼期頃のものには卵膜のついたまま固定液に入れたが孵化近くのもので卵膜の除去出来るものは卵膜を除いて固定することとした。固定後組織が硬化するから卵黄と胚とは分離しやすくなる。それで卵膜を除去した後胚体をメス等で卵黄からはがし水洗, 脱水等のその後の処理を行い, 切片はおもにパラフィン切片によつた。固定液並びに染色は次の要領に従つた。

1. Bouin 氏液固定

- a Mallory 氏三重染色: 第 I 液 (0.1% 酸性フクシン水溶液) で3分染め, 一寸水洗し第 II 液 (1% 燐モリブデン酸水溶液) で3~5分処理し一寸水洗し, 第 III 液 (オレンジ G 2g + アエリン青 0.5g + 鞣酸 2g 蒸溜水 100g の混液を重湯煎で約 100°C に保ち量が半減するまで処理し瀧過したもの) で約2分染め水でゆすいで95% アルコールで弁色する。
- b 0.2% チオニン水溶液: 約10~30分間染色する。脱水中あまり脱色するものは空気乾し, 乾燥し直接キシロールに入れた。
- c 1% 中性赤水溶液: チオニンの場合と同様にした。
- d Delafield のヘマトキシリン-エオシン二重染色: 普通行われている方法によつた。
- e ピロニン水溶液: ピロニンはあらかじめ精製したものを水にとかし, 適当にうすめて使用した。
- f Hotchkiss 法の多糖類検出

2. Zenker 氏液固定

- a Feulgen 反応
- b ピロニン・メチル緑水溶液: ピロニンは柴谷 (1949) の方法により精製しメチル緑にはクロロフォルムを接触させた。

3. Da Fano 氏液固定, 後銀染色。

4. Regaud 氏液固定, 後 Heidenhain の鉄ヘマトキシリン染色を行つた。

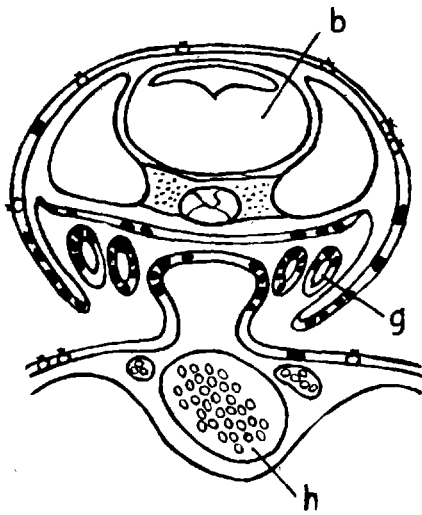
5. Champy 氏液固定

- a Heidenhain の鉄ヘマトキシリン染色。
- b Kull の染色, 酸性フクシンはアエリン-フクシンとした。

卵膜溶解観察のためには発眼期の卵と孵化直前の卵との Bouin 固定したものを卵膜をつけたままセロイデン切片とし, Mallory 氏三重染色を行つた。

III 孵 化 腺

サケは水温 10°C 内外では受精後50日頃より孵化し始めるが, 孵化腺は発眼期 (受精後約30日) 頃より現われる単細胞皮腺である。孵化前2, 3日からもつとも発達し数も非常に多くなる。分布するところはおもに口腔内の上皮及び鰓の上皮であるが頭部表皮及び鰓蓋の表皮にも見られる。また卵黄囊膜にも散見される。(第1図) 孵化腺は内部に Mallory 氏三重染色でア



- mucous cell
- hatching gland

Fig. 1. A cross sectional diagram of the salmon embryo in the part of head two or three days before hatching out.,
b: brain, g: gill, h: heart.

ニリン青によく染まる大きな顆粒をもつことによつて他の細胞から容易に区別される。孵化腺について細胞学的にその消長を記述すると次のようである。(第2図)

口腔上皮には分裂中の細胞がしばしば見られまた DaFano 固定銀染色によつて核の周辺によく発達したゴルジ物質をもつ細胞があるが(第2図の a) この細胞が将来孵化腺になるものである。このゴルジ物質はその後(発眼期頃)著しく伸長し(第2図の b) 更にまた短棒状に切断され(第2図の c) 切断が進み小さい顆粒になる頃に細胞内に液胞が現われ始める(第2図の c) この液胞は Bouin 固定で保存されず従つて酸性色素でも塩基性色素でも染色されない。Champy-Kull の固定染色によれば淡緑色に染色される。これが更に進むとゴルジ物質は消失し Regaud 固定, Heidenhain の鉄ヘマトキシリンでよく染まるミトコンドリアが小さい顆粒状で現われ始め核を中心に進行し前述の液胞の間をも埋める(第2図の d)。このミトコンドリアの顆粒は更に増大し大きな顆粒となり前述の液胞と交代する(第2図の e) このミ

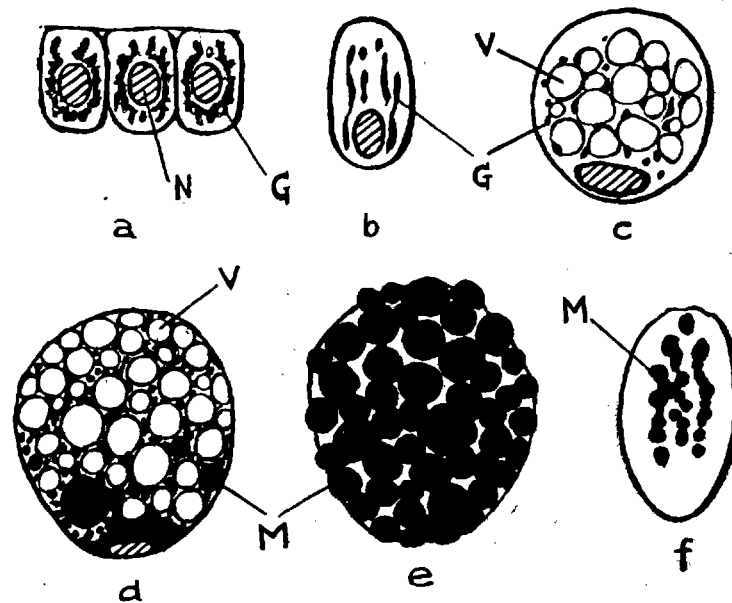


Fig. 2. Cyto-genesis of the hatching gland during the development of the embryo.
G: Golgi materiales, M: mitochondria. N: nucleus, V: vacuoles.

トコンドリアの顆粒が Mallory 染色でアエリン青によく染まる顆粒で、エオシンにも染まりチオエンで青く、中性赤で桃色に染まる。また Champy-Kull 固定染色で赤紫に染色され、Zenker 固定ピロニン・メチル緑染色で赤紫に染まる。Feulgen 反応は陰性であるが Hotchkiss 法の多糖類検出では陽性である。ミトコンドリアの顆粒は孵化 2, 3 日前がもつともよく発達し各顆粒の大きさは約 2μ にまでも達する。頭部上皮に見られる孵化腺では孵化時にもまだよく発達せず液泡が細胞内にかなり残存するものもある。孵化後はミトコンドリアの顆粒は著しく萎縮し小さい顆粒となりこの小さい顆粒が連続して珠数状になり (第 2 図の f) 遂には消失する。一方核は顆粒の発達につれて細胞の隅に押しやられ小さくなり孵化時には核も消失する。このようにして孵化腺は孵化後の胚にはまったく見られなくなる。

IV 粘 液 腺

粘液腺も発眼期頃より現われる細胞学的に孵化腺と非常に対称的な単細胞皮腺である。最初おもに頭部の表皮に分布するが孵化後は体表全面を覆うようになる (第 3 図)。粘液腺は Bouin 固定 Delafield のヘマトキシリン・エオシン染色でエオシンよりヘマトキシリンに淡く染まり Malloay 染色ではアエリン青にうすく染まる。表皮組織中のある細胞は始めミトコンドリアよう物質が核の周りに現われ (第 4 図の b) 続いて細胞内にゴルジ物質の網状構造が現われてくる。このゴルジ物質の網状構造は遂には細胞全体を占めるようになるが (第 4 図の c) 続いて細胞遊離端の一部が破れゴルジ物質が外部に出される (第 4 図の d, e) このゴルジ物質は Hotchkiss の多糖類検出でよく赤色に染められる。細胞外にゴルジ物質が出される頃には細胞内にはゴルジ物質は認められなくなる。しかし多糖類を含む細胞質は依然認められる。分泌が終る頃には核周辺にミトコンドリアよう物質は萎縮しその後核とともに消失する。粘液腺のゴルジ物質を主とする細胞質は Bouin 固定 チオエン, 中性赤, ピロニンによる染色で明らかにメタクロマゼンを示す。またゴルジ物質が細胞外に出る前までの粘液腺の細胞質は Zenker 固定ピロニン・メチル緑染色淡く赤紫で網状構造に認められる。

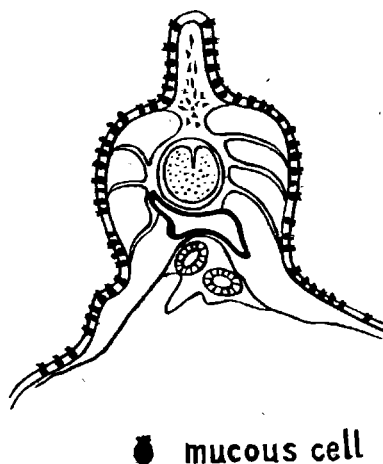


Fig. 3. A cross sectional diagram of the embryo in the middle part of the body at the hatching out.

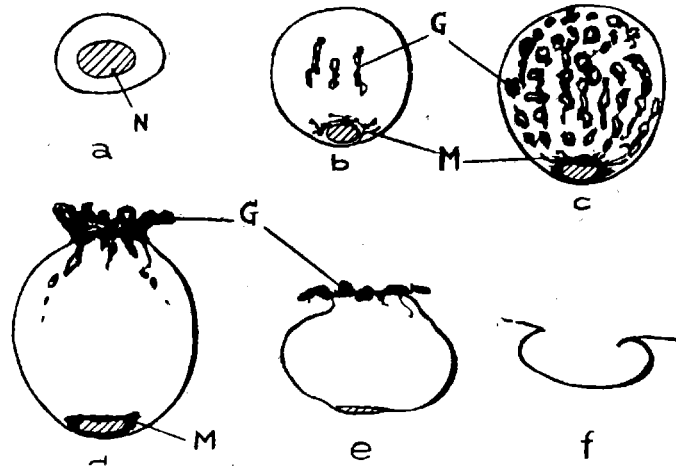


Fig. 4. Cytogenesis of the mucous cell during the development of the embryo.
G: Golgi materiales, M: mitochondria, N: nucleus.

V 卵膜溶解

サケの卵膜は Bouin 固定で約 60 μ の厚さがあり, Mallory 染色を行えばオレンジ G 及び酸性フクシンに染まり黄橙色に見える。卵膜は、明確ではないが内・中・外 (約 1: 3: 1) の三層に区別される。そして内部に卵表面に対し垂直に線条構造が認められる (第 5 図), 卵膜は孵化近くなるに従つて孵化酵素により侵食を受けた部分はアエリン青に染まるようになる。このためはじめ黄橙色であつたものが褐色となり, 遂にはアエリン青のみに青く染まるようになる。この孵化酵素により崩壊した卵膜の部分はしばらくコロイド状に膨潤した状態で卵膜に附着しているが最後にははげ落ちてしまう。そのため卵膜の厚さは約 13 μ まで薄くなる。こ

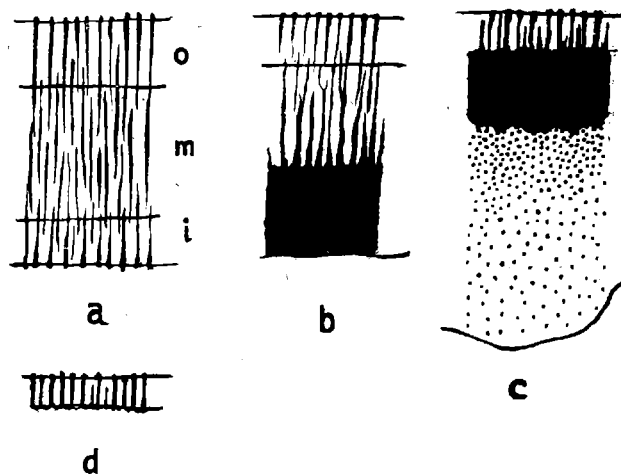


Fig. 5. The diagrams show the process of the softening egg membrane at the course of hatching. i: innerlayer, m: middle layer, o: outer layer.

の崩壊の程度は胚体の位置する附近の部分にはなほだしく、遠ざかるにつれて緩い傾向がある。しかもこの崩壊の進み方は前に記した卵素面に垂直な腺条構造の部分において先行するかのように見える。卵膜が 13μ 程度に薄くなつた頃胚は自身の機械的破壊によつて卵膜を破り孵出する。第 5 図はその過呈を示す。

VI 考 察

サケの孵化腺については先に著者 (1953b) はかなり詳しい報告をしているのでここに重複することをさけるが、孵化時における粘液腺と卵膜溶解を孵化腺と関連させつつ一つの考察を試みることにする。

イバラトミヨでは孵化腺はおもに頭部表皮にあるが (西田 1953a), サケではおもに口腔に限られている。この点では石田 (1944) によつて観察されたメダカ (*Oryzias latipes*) の分布状態と類似している。孵化腺の細胞でもつとも特徴のあることは孵化時に近く細胞内に現われるミトコンドリアの顆粒である。この顆粒について石田は顆粒には Delafield のヘマトキシリンに染まる粒があると報じているがサケでは顆粒にそのような粒の存在は認められなかつた。またイバラトミヨの孵化腺の顆粒は Mallory 染色で淡橙色に染まるがサケではアエリン青に青く染まるのはサケの孵化顆粒はイバラトミヨのそれよりも構造的に粗であることを示すと考えられる。メダカやイバラトミヨの孵化腺に見られなかつた脂肪様の液胞がサケに見られるのは特に注目される。このような孵化腺の性質、分布の相違は種類によるものであろうが分類学的関連があるかどうか一応の興味を持つてと思う (石田, 1947)。孵化腺にミトコンドリアが発達しているのに対し粘液腺にはゴルジ物質が富んでいることはこの 2 種の単細胞皮腺の特徴といわなければならないもので、この 2 種の細胞の機能と関係させて考えると非常に興味深い。孵化腺は卵膜の溶解に役立ち、粘液腺はおもに孵化後の体表の保護に役立つものであろう。粘液腺に多量に含まれる多糖類はおもに粘液分泌による体表の保護に効果があるものでなからうか、また孵化腺の多糖類は一種のエネルギー源になつていのであるかもしれない。孵化酵素による卵膜溶解の生理学的研究は古く森脇に始まりその後 Winterbert, Boudin, 石田等があるが卵膜溶解の現象を組織学的に観察した結果次のことがいえると思う。即ち卵膜は孵化酵素によつて構造の間隙部から崩壊していくが全体として崩壊は内部より外部に一様に進むその程度の差は酵素の働き方によつて生ずる。その結果卵膜を構成していた物質は構造的に粗になり、容積を増し膨潤し遂には無構造のものとなりはげ落ちると考えられる。そして胚は卵膜のもつとも薄い部分を破つて孵出する。したがつて孵化のときに頭部から出るとか尾部から出るといつたような一定の孵出の現象はないように思う。

VII 摘 要

1. サケの胚について特に孵化時の全体的組織並びに細胞学的観察を行い、顕著な 2 種の細胞即ち孵化腺と粘液腺について研究するとともに卵膜溶解の現象を組織学的に観察した。
2. 孵化腺及び粘液腺においてミトコンドリアとゴルジ物質が明らかに対称的に関係していることが解つた。また卵膜の溶解が組織学的にある程度追求観察することが出来卵膜構造の変化を染色反応から考察した。

引用文献

- 犬飼・国弘・柏岡： 1939 鮭の孵化の機構 動物学雑誌 第51巻 第2号
石田寿老： 1947 動物の孵化
Ishida, J.: 1944 Hatching enzyme in the fresh-water fish, *Oryzias latipes*. Annot. Zool. Japon. Vol. 22. No. 3
Monnè, L. and S. Harde: 1951 On the cortical granules of the sea urchin egg. aed 1. Häfte 6.
森脇幾茂： 1910 第3回北海道水産試験場事業報告
西田秀夫： 1953 a 魚胚の孵化腺とミトコンドリア 科学 第23巻 第2号
西田秀夫： 1953 b サケ胚の孵化腺におけるゴルジ体とミトコンドリア 科学 第23巻 第6号
柴谷篤弘： 1949 低分子核酸染色のためのピロニン精製法 科学 第19巻 第11号