

毛顎動物ヤムシにおける精子形成過程観察のための 標本作成法

林 芳生・後藤太一郎

A method for preparations of spermatogenic cells in chaetognath.

Yoshio S. HAYASHI and Taichiro GOTO

要 旨

毛顎動物であるヤムシの精子は、精巣より遊離した精原細胞が尾部体腔内を循環しながら増殖・成長することにより形成される。この精子形成過程を明らかにするために、体腔から摘出した様々なステージの細胞を容易に観察できる試料作成法について検討した。体腔液をスライドガラスにとり、空気乾燥後にメタノール固定した標本を酢酸オルセインまたはヘキスト33342で核染色したところ、良好な観察像が得られた。また、この標本では、免疫組織化学染色も可能であったことから、ヤムシ精子形成過程を研究するための標本作成法として有用であることが示された。

ABSTRACT

Chaetognaths are hermaphrodites and the male reproductive organs are located in the tail coelom. Spermatogonia released from the testes develop while circulating in the tail coelom. To understand the process of spermatogenesis, we tried to make preparations for observation of various stages of spermatogenic cells. The tail coelomic fluid put on a glass slide was completely dried and fixed with methanol, giving good profiles by staining with acetic orcein or Hoechst 33342 dye. This preparation was also available to immunocytochemical staining, indicating that it is useful for the study of spermatogenesis in chaetognath.

はじめに

精子は極めて特殊化した細胞で、複雑な生活史を経て形成されていく。精原細胞として体細胞分裂により増殖した後、一次精母細胞となり減数分裂がおこる。二次精母細胞が分裂の後に精細胞となり、これは精子完成過程を経て精子となる。精子形成過程において、精原細胞から減数分裂を行

なう精母細胞への移行、減数分裂の機構、精子形態形成の機構などには未解決の問題が含まれており、関心がもたれてきた(例えば安部、1992)。これらの機構には、ホルモンや支持細胞が関与していることが脊椎動物を用いた研究から示されているが(例えば田島と西宗、1994)、無脊椎動物については精子形成に関する機構についてほとんど研究が進んでいない。我々は精子形成の機構を理解する上で比較的単純な動物を用いる必要があると考え、毛顎動物であるヤムシを材料として精子形成過程の研究をはじめた(Hayashi and Goto, 投稿中)。

ヤムシは雌雄同体で両性が同時に成熟し、雄性

原稿受理日 1994年9月30日
三重大学教育学部生物学教室
Department of Biology, Faculty of Education Mie
University, Tsu, Mie 514, Japan

生殖器官は尾部体腔中に存在する。精巣は小さく、精原細胞は早期に精巣から体腔中へ遊離し、尾部体腔中を環流しながら精子形成が進行する (Grassi, 1883; Burfield, 1927; Stevens, 1903, 1910; Jærsten, 1940; 時岡, 1940; Ghirardelli, 1968; Bergey, *et al.*, 1994; Hayashi and Goto, 投稿中)。ヤムシには循環系がないうえに、雄性生殖器官には支持細胞に相当するものもないため、この動物の精子形成に係わる因子について明らかにすることは、精子形成の機構を理解するうえで重要であると思われる。

我々は底生性のヤムシであるカエデイソヤムシを用いて、精子形成の全過程を観察し、精原細胞の分裂回数やその時間について明らかにした (Hayashi and Goto, 投稿中)。精子形成細胞の観察には、摘出した細胞の全載標本が適していた。摘出試料を染色するには、これをガラス面に付着させることが必要となる。精子や卵の全載標本の作成については、摘出試料をポリ-L-リジンや硫酸プロタミンで表面を処理したガラス片に付着させる方法が用いられることが多い (例えば野田, 1992)。我々もこの方法を用いたが、細胞の脱落を完全に防ぐことは難しく、効率的に良好な試料を作成することは困難であった。

本研究では精子形成細胞の観察を容易に行なうため、血球や染色体の観察などに用いられる塗抹空気乾燥法を試みた。この方法では細胞の脱落がほとんどないうえに、あらかじめ細胞を拡散しておくことにより細胞同士が重なることも少なく、試料を効率的に観察できた。また、標本作成に技術的習熟を必要とせず、失敗が少ないうえ、免疫組織化学的染色にも適用できることがわかった。

材料と方法

実験動物としては、底生性のヤムシであるカエデイソヤムシ (*Paraspadella gotoi*) の成体を用いた。本種は熊本県天草郡にある九州大学臨海実験所付近の岩礁海岸低潮亜帯で採集され、採集個体は研究室で累代飼育されている (Goto, 1993)。ヤムシは止水または循環水槽の中で飼育された。止水の場合には約15個体をガラスボール (直径15 cm) に入れ、これを12時間の明暗周期をつけた恒温器 (17°C) に置き、3日に1回換水した。循環水槽の場合には、観賞魚用産卵箱 (ニッソー) を 20°C に設定した循環式濾過水槽に吊りし、この中に20-30個体入れた。この産卵箱にはヤムシ

や餌の脱出防止のために XX17 のミューラーガーゼを取付けた。餌としてはチグリオプス (*Tigriopus japonicus*) を与えた。

標本の作成には、ヤムシをカバーガラスまたはスライドガラス上で解剖して尾部体腔より精子形成細胞を含む体腔液を抽出し、空気乾燥した。メタノールを滴下して固定し、再度乾燥させたものを空気乾燥標本とした。核染色には0.001%ヘキスト33342 (Sigma) による蛍光染色または酢酸オルセインを用いた。酢酸オルセイン染色の時間は10分で、染色前には2N HCl で5分間加水分解した。染色後は水洗し、グリセリンで封入した。

免疫組織化学的観察には、チミンのアナログである BrdU (5'-プロモデオキシウリジン) を投与し、この取り込みを抗 BrdU 抗体を用いて間接蛍光抗体法により検出する方法を用いた。ヤムシを0.1 mM BrdU を含んだ海水中で1日間遮光して飼育した後に解剖して尾部体腔液を抽出し、冷却したメタノールを用いて固定・乾燥後、2N HCl で20分間加水分解した。一次抗体として1000倍希釈したマウスの抗 BrdU 抗体 (Becton Dickinson) で一晩、二次抗体として500倍希釈したローダミン標識抗マウス IgG 抗体 (Cappel) で5時間インキュベーションした。さらにヘキスト33342で染色した後、落射蛍光顕微鏡 (ニコン optiphot) を用いてG励起光及びUV励起光で観察した。

結果と考察

精巣から遊離した精原細胞は体腔中で分裂するため、体腔中には様々なステージの精子形成細胞がみられる。この精子形成細胞は、細胞が集団となった多核体を形成している。摘出した精子形成細胞の形と核の状態を観察するために、摘出後ただちにパラホルムアルデヒド固定し、ヘキスト染色した後、これをノマルスキー微分干渉および落射蛍光顕微鏡でみると、多核体をなす細胞集団を認めることができる (図1A, B)。この標本でみられる形態は生きたままの状態に近い。同様の観察を、摘出した試料を冷却したメタノールで固定し、空気乾燥させた後にヘキスト染色した標本について行なった場合でも、多核体をなす細胞集団を容易に認めることができ、核の状態も明瞭であった (図1C, D)。空気乾燥法では固定液の蒸発の際に空気との間で表面張力がかかるため、細胞の形態は収縮すると思われたが、ノマルスキー像からみて細胞の外形はほぼ完全に保たれていた。

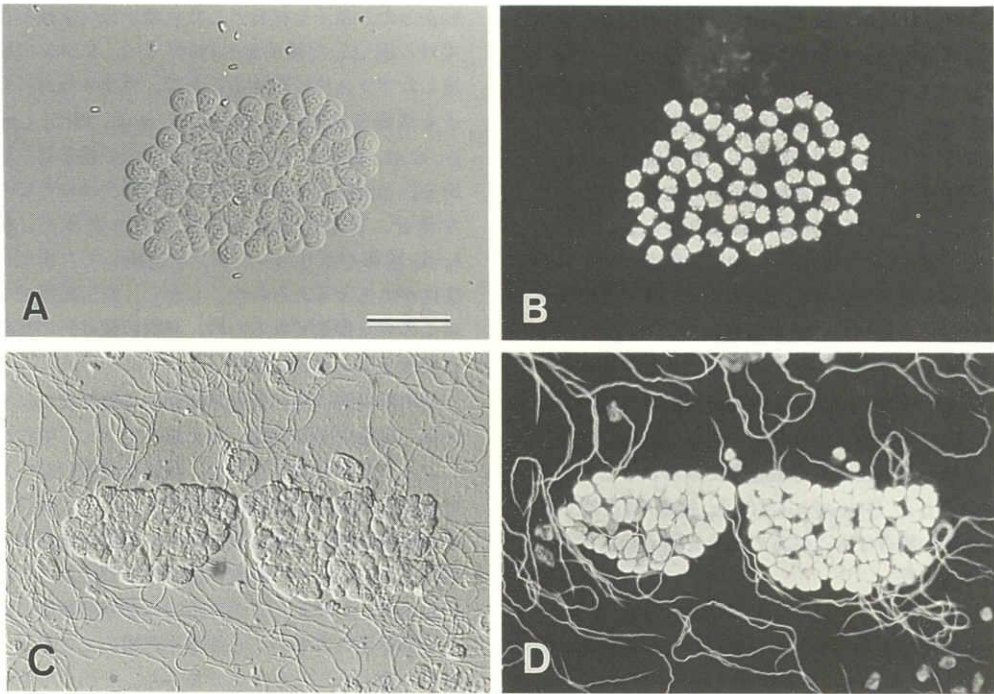


図1. 精子形成細胞（精母細胞）のノルマルスキー像（A、C）とヘキスト染色による蛍光像（B、D）。A、B はパラホルムアルデヒド固定した同一標本。C、D はメタノール固定後に空気乾燥した同一標本。スケールは $20\ \mu\text{m}$ を示す。

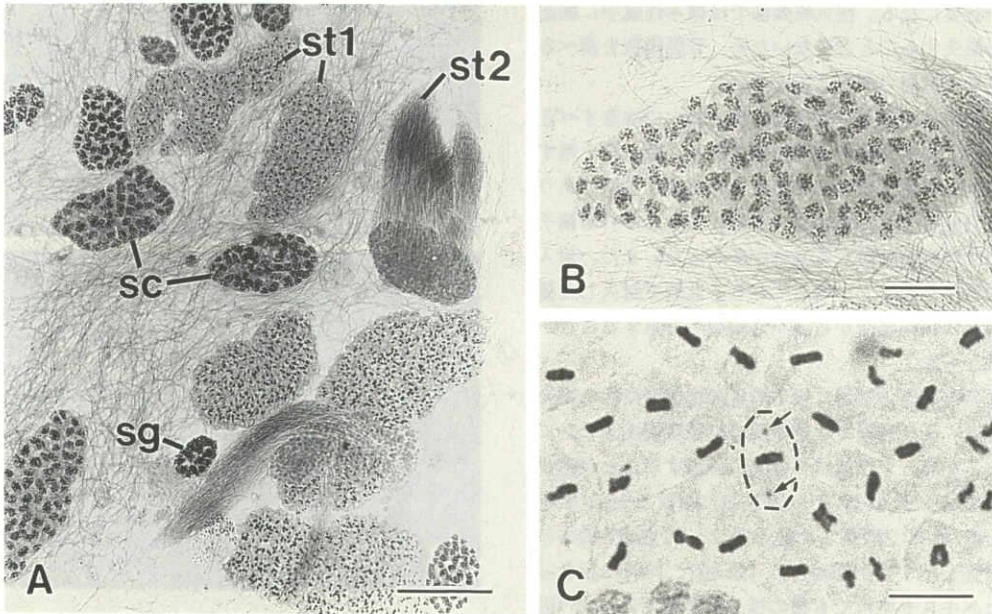


図2. 酢酸オルセイン染色した精子形成細胞（空気乾燥標本）。A、様々なステージの精子形成細胞。sc、精母細胞；sg、精原細胞；st1、精細胞；st2、伸長した核をもつ精細胞。B、一次精母細胞。C、第一減数分裂中期。破線で囲った部分は1つの分裂像で、矢印は早期に移動する一対の染色体を示す。スケールはAで $50\ \mu\text{m}$ 、Bで $20\ \mu\text{m}$ 、Cで $10\ \mu\text{m}$ を示す。

ヘキストによる染色も良好で、パラホルムアルデヒド固定の場合より強い蛍光がみられた。

冷却メタノール固定後に空気乾燥した試料を酢酸オルセイン染色した場合でも精子形成細胞は明瞭に染色され、核の状態から、精原細胞、精母細胞、精細胞、及び成熟精子を認めることができた(図 2A)。これらの形態の保存状態もよく、過剰に染色されることもなく、精原細胞では核小体まで観察が可能であった(図 2B)。これまでに我々はパラホルムアルデヒド固定後にポリ-L-リジンで処理したカバーガラスに付着させる方法を用いて観察を行ない、ヤムシの精原細胞は6回の分裂後に64細胞の多核体をなす一次精母細胞になること、核小体は二次精母細胞までみられることを明らかにした(Hayashi and Goto, 投稿中)。空気乾燥標本の場合でもこれらの知見を得るのに十分な像であった。

また、ヤムシでは精母細胞の減数分裂中期に一对の染色体が他の染色体に先だって両極に移動するという特異的な分裂像を示すが(Stevens, 1910; Ghirardelli and Arnaud, 1966; Ghirardelli, 1968; Hayashi and Goto, 投稿中)、この様子も今回の標本で確認できた(図 2C)。中期像は少ないためにできるだけ多くの精子形成細胞をみる必要がある。空気乾燥法では標本作成中に細胞を損失することが少ないため、分裂指数を調べる上でも有用であると言える。

酢酸オルセイン染色標本作成の上で注意すべき点は、加水分解の処理時間である。染色性を増す目的で行なった加水分解は5分程度が至適であり、10分間行なった場合では多核体をなしている精子形成細胞が分散するが多かった。また、封入にはグリセリンが適しており、乳酸で封入した場合は細胞集団から個々の細胞へ分離することが多かった。

免疫組織化学的に精子形成細胞を観察する場合には、染色過程で数種の溶液に長時間浸すことになるため、ガラス面へ確実に付着することが重要となる。今回行なった BrdU の取り込みを抗 BrdU 抗体で観察した結果では、抗 BrdU 抗体に陽性を示す核が認められ(図 3B)、同時に行なったヘキスト染色でも核の様子は明瞭であった(図 3A)。核の DNA にとりこまれた BrdU は分裂に伴って娘細胞の核に分散的に引き継がれるため、BrdU 処理後の飼育時間が長い個体では短時間の個体に比べて、抗 BrdU 抗体の結合を示す蛍光は

弱かった。精子を材料とした免疫組織化学観察法では、固定した精子を0.1%ポリ-L-リジンで処理したガラス片に載せることで、ガラス表面に精子を接着させている(Flaherty, *et al.*, 1986; Longo, *et al.*, 1989)。この方法でヤムシの精子形成細胞を抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色でみた場合、背景に蛍光を発する汚れが多く、抗 BrdU 抗体がポリ-L-リジンを認識してしまう可能性があると考えられた。しかし、空気乾燥法ではこの点を排除できるため、細胞の核以外の部分に染色されることはなかった。

空気乾燥法は主に染色体観察の目的で使われている。染色体の研究は、古くはパラフィン切片法によって行なわれてきたが、煩雑な過程の割に良好な染色体標本の作成は困難であった。これに代わる方法が押しつぶし法であり、特別な装置を必要としないことから染色体標本の作製法として用いられた。しかし、この方法では標本の長期にわたる保存ができないことや標本作成の上で多少の技術を要することが欠点であった。その点で空気

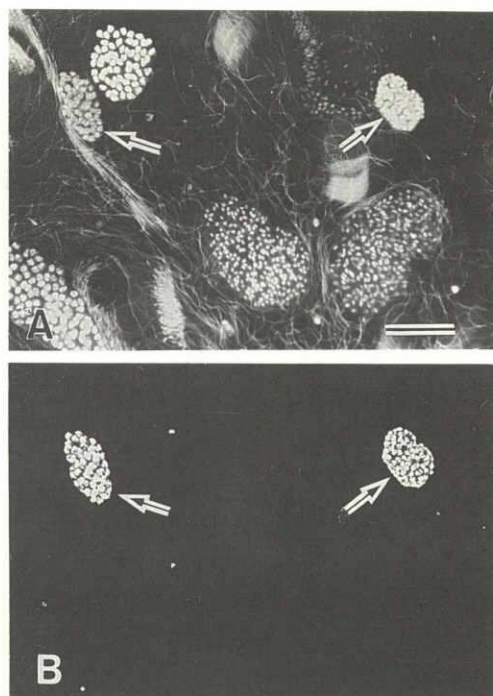


図 3. BrdU 処理した個体の精子形成細胞のヘキスト染色像(A)と抗 BrdU 抗体でラベルされた精母細胞(矢印)を示すローダミン蛍光像(B)。スケールは 50 μ m を示す。

乾燥法ではこのような欠点はなく、標本作成の失敗もほとんどなく、Q分染法やG分染法といったいくつかの分染法も可能である(中西, 1981)。今後、ヤムシの精子形成細胞を多様な染色法で調べる上でも、空気乾燥法は有用であると考えられる。

参 考 文 献

- 安部真一 (1992) 精子の形成. “精子学”, (森沢正昭, 星元紀編), pp. 54-67, 東京大学出版会.
- Bergey, M. A., R. J. Crowder, and G. L. Shinn (1994) Morphology of the male system and spermatophores of the arrowworm *Ferosagitta hispida* (Chaetognatha). *J. Morphol.* **221**: 321-341.
- Burfield, S. T. (1927) *Sagitta*. *L. M. B. C. Memories Liverpool* **28**: 1-104.
- Flaherty, S. P., V. P. Winfrey, and G. E. Olson (1986) Localization of actin in mammalian spermatozoa: a comparison of eight species. *Anat. Rec.* **216**: 504-515.
- Ghirardelli, E. (1968) Some aspects of the biology of the chaetognaths. *Adv. Mar. Biol.* **6**: 271-375.
- Ghirardelli, E. and J. Arnaud (1966) Contribution à l'étude de la spermatogenèse chez les Chaetognathes. *Arch. Zool. Ital.* **51**: 309-325.
- Goto, T. (1993) Culture of *Paraspadella*. “Proceedings of the II international workshop of Chaetognatha”, (Moreno, I., ed), pp. 135-136, Universitat de les Illes Balears.
- Grassi, G. B. (1883) I Chaetognati. *Fauna Flora Golf. Neapel. Mon.* **5**: 1-126.
- Jägersten, G. (1940) Zur Kenntnis der Physiologie der Zeugung bei *Sagitta*. *Zool. Bidr. Upps.* **18**: 397-413.
- Longo, F. J., C. Georgiou, and S. Cook (1989) Membrane specialization associated with the acrosomal complex of sea urchin sperm as revealed by immunocytochemistry and freeze fracture replication. *Gametes Res.* **23**: 429-440.
- 中西 宥 (1981) “染色体の研究”. 東京大学出版会, 170 pp.
- 野田 善郎 (1992) 精子の基本構造. “精子学”, (森沢正昭, 星元紀編), pp. 39-42, 東京大学出版会.
- Stevens, N. M. (1903) On the ovogenesis and spermatogenesis of *Sagitta bipunctata*. *Zool. jb. Anat.* **18**: 227-240.
- Stevens, N. M. (1910) Further studies on reproduction in *Sagitta*. *J. Morphol.*, **21**: 279-303.
- 田島陽一, 西宗義武 (1994) マウス精巣における支持細胞の働き. *細胞*, **26**: 344-349.
- 時岡 隆 (1940) “毛類動物門”. 日本動物分類第5巻, 三省堂, 129 pp.