

# 硬骨魚・コイの発生；アトラス — 受精から孵化まで —

藤 本 十四秋

## Development of the Carp (*Cyprinus Carpio*) from Fertilization to Hatching; An Atlas Toyoaki FUJIMOTO

キーワード：コイ (*Cyprinus carpio*)，人工授精，発生，epiboly，硬骨魚

### 概 要

硬骨魚・コイ (*Cyprinus carpio*) の，受精から孵化までの発生過程をアトラスのかたちで示した；人工授精を行い得た受精卵を，経時的に実体顕微鏡下に観察し，孵化までを記録したものである。受精から孵化までの日数・時間を以下の2例について記す。

第1例：5月27—28日；水温，22—23℃，孵化まで3日と12時間。

第2例：5月5日；水温17—19℃，孵化まで5日と4時間。

硬骨魚類では，比較発生学的な特徴を幾つかもっている。ここでは，コイの受精卵分割方式（動物極側のみで行われる部分分割）と，分割細胞群（胚盤）がその後，卵黄囊を覆って植物極側に向かい，胞胚形成に向けて，伸展・移動する様子—いわゆる epiboly；覆い被せ運動—とを特記した。

### はじめに

硬骨魚の鯉（コイ，carp, *Cyprinus carpio*）は，人口に膾炙された魚種であり，それはまた，人工孵化によって養殖・飼育され，鑑賞用或いは食用として馴染まれている。そして主に稚魚・成魚について，それらの生理，生育条件或いは性分化の研究は比較的多く行われているが，その基礎となる初期発生過程，受精から孵化までの形態変化，ないし，比較発生学的特徴などは，必ずしもよく記録されているとは言えない。筆者はさきに硬骨魚に特有な，神経管の形成過程（充実性の neural keel から始まる）について報告したが<sup>1)</sup>，卵分割の様式や，分割細胞の胞胚形成へ向けての，その後の展開の仕方—epiboly<sup>2,3)</sup>（覆い被せ現象）—が，他の脊椎動物のそれとは大いに異なっている。これらは一部既述したところであり<sup>4)</sup>，次の所見の項で示す写真で一目瞭然であるが，この現象は，発生における形態形成運動，morphogenetic movement(s) のよい例証

として，そのメカニズム解析が，他の魚種，Fundulus や zebrafish で行われてきている。上記のほか，硬骨魚では，中間細胞塊，intermediate cell-mass の分化（大静脈の発生母地）や孵化腺の起源についても，比較発生学的に興味をもたれるところである。本稿では，硬骨魚・コイの発生過程を，アトラスのかたちで提示する。

### 材料と方法

熊本県の水産試験場・八代分場では，コイの人工孵化，稚魚の育成・供給が行われてきた。水産試験場では，選ばれた最適な時期（季節では5月）と条件に従って，飼育池に性熟成魚を放ち（図1参照），自然受精によって孵化幼生を期待する。併しこれでは受精時を確定することが極めて困難なので，試験場の協力を得て人工授精を試みた。そして幾つかの成功例を得て，それらについて受精から孵化までを経時的に観察し，記録を行った（一部は既報<sup>4)</sup>）。即ち，コイの産卵の行われる5月に，予め短期間，雌雄を分けて飼育しておき，水温ほぼ26℃，晴天の日を選んで，雌1尾，雄2—3尾を1つの単位として，それぞれ別々の水槽に入れる。水槽内には産卵用に，予めキンギョ藻を浮かばせ

（平成13年9月6日受理）

（前）川崎医療短期大学 第二看護科

(formerly) The Second Department of Nursing, Kawasaki College of Allied Health Professions

（現住所：岡山市富田267-1-305）

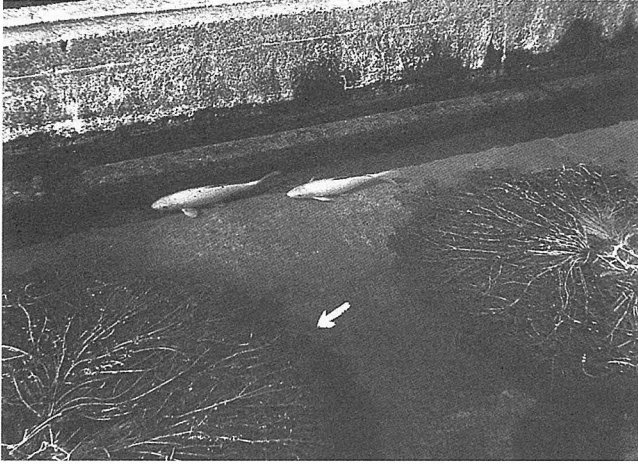


図1 コイの産卵・飼育池

熊本県水産試験場・八代分場。矢印はキンギョ藻；これに卵を産みつける。

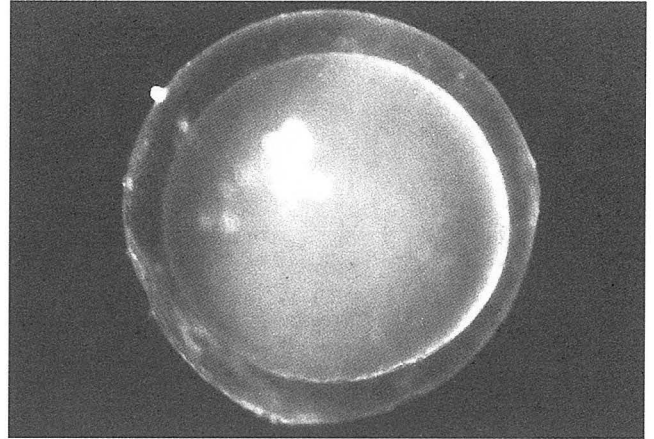


図2 授精直後の受精卵 ×45

ておく。昼間にこれらの準備を行っておくと、その日の夜半から翌朝にかけて、ごく自然の状態で産卵・受精が行われる。これは、根気よく、注意深く観察していくと、受精の瞬間を捉えることも可能であるが、やや確かさを欠く。そこで、ほぼ放卵を終えてはいるがなお卵を保っている雌を用い、雄からの精液とで人工授精を行い、実体顕微鏡下に受精を確かめたわけである(図2)。成功例のうちの2例のデータを、次項に示している。なお、epibolyの観察のため、間歇的16ミリ位相差顕微鏡映画撮影法(time-lapse 16mm-cinemicroscopy)も試みた。また必要に応じてブアン液にて固定、全胚或いは組織標本をつくり、一部は型に従って透過型電子顕微鏡標本として観察した。

## 所 見

先ず、コイの人工孵化池の様子を図1に、そして前記の人工授精による2例について、受精から孵化までの時間的経過を、表1と2に示しておく。なお、受精時に精子貫入点に現れるとされる卵門は、必ずしも確認できるとは限らない(図2参照)。

## 卵の分割、胚盤形成、そして Epiboly と胞胚形成

受精卵の分割は、いわゆる部分分割方式をとり、動物極側でのみ行われる<sup>5)</sup>(図5-(1-6))。その後、細胞分裂が一応終了すると、細胞群は動物極側で胚盤(blastoderm)を形成するが、その一方で、その周縁から細胞が卵黄囊の外側を覆って植物極側に向けて伸展・大移動を行い(図3)－硬骨魚に特有な“epiboly”「覆い被せ」－胞胚(blastula)を形成していく(図4および図

表1 受精から孵化までの日数

例	受精の月/日・時	水 温	孵化した日時	孵化までの日数
(1)	5/27, 22:00 (1965)	22—23℃	5/31, 10:00	3日と12時間
(2)	5/05, 10:00 (1966)	17—19℃	5/10, 14:00	5日と04時間

表2 発生段階と受精後の時間(水温17℃—19℃)

発 生 段 階	受精後の時間
2細胞期	1時間
4細胞期	1時間27分
8細胞期	2時間13分
16細胞期	3時間05分
32細胞期	3時間58分
囊胚初期	6時間28分
胚盾形成明瞭	18時間28分
所謂・発眼期	2日17時間28分
背鰭・胸鰭形成	3日09時間
孵化	5日と数時間

5-(9a, b))。

この epiboly は胚盤の辺縁から一斉に始まるのだが、その遠位端は部分的に移動開始や速度に多少の差があるため、球状の卵黄囊を取り巻いて、波状ないし、目の粗い鋸状を呈して、細胞移動が植物極側に進んでいく。これは、顕微鏡映画法でよりよく観察できる。また、切片標本では、卵黄囊の外周を形成するゼリー(コロイド)状の合胞層が、epiboly 展開の基質の役割を果たしていることを窺わせる(図4)。実際、伸展・先端部の細胞を単純培養してみると、細胞は突起を出し、

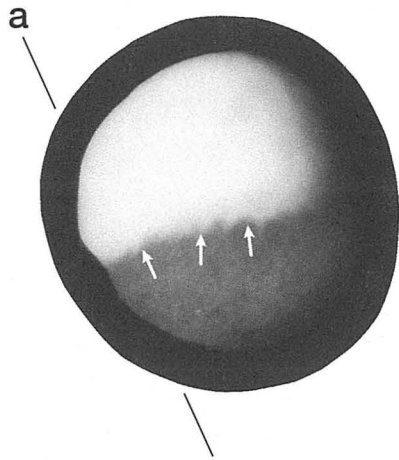


図3 進行中の epiboly

胚盤 (blastoderm) 周縁の細胞が植物極に向かい、卵黄嚢を覆って移動・伸展していく。epiboly を先導する先端部 (矢印) は、部位による細胞移動の遅速などにより、不揃いで波状ないしジグザグにみえる。固定標本。×31.5

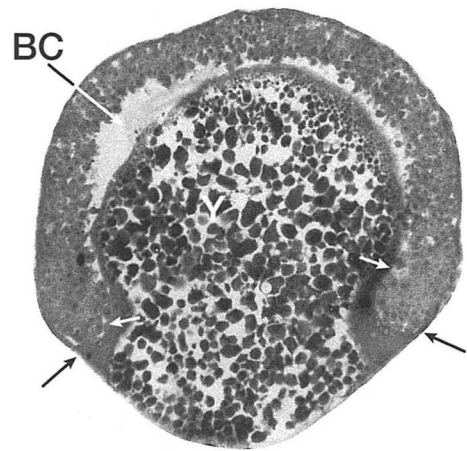


図4 図3のaを通る切片標本；ヘマトキシリン-エオシン染色

大きな矢印 (黒)：epiboly の最先端。

小さな矢印：卵黄嚢の合胞体層；epiboly 進行に基質の役割を担う。BC：原始胞胚腔。Y：卵黄 ×196

遊走性が窺われ、上記の卵黄嚢の合胞層ゼリーを足場にして epiboly を先導していくことが分かる。

さて以下に、受精・卵割から孵化までの過程を、一部切片による組織標本を加えながらアトラスとして提示する (図5 (シリーズ, 1-17))。これらの写真は、発生初期では実体顕微鏡下に撮影したもので、後・晩期のものはマクロ写真撮影装置を用い、或いは通常の接写法によって得たものである。

### 考察・むすび

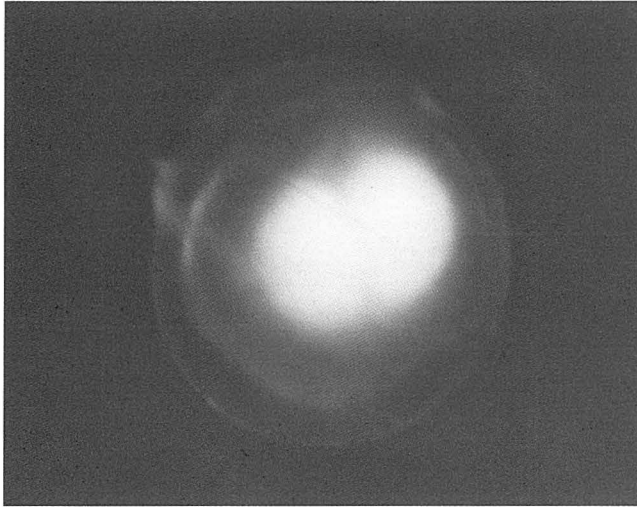
硬骨魚ではわが国に特有なメダカについての発生・生理学の研究がよく行われており、海外でも Japanese Medaka として研究者には親しまれている。コイについては既述のように、<sup>むしろ</sup>水産関係で養殖の面で親しまれてきている。本稿ではコイについて、従来あまり報告のない人工授精による受精卵の、卵割から孵化までの過程を、全胚マクロ観察の結果を中心に、アトラスとして提示した。また硬骨魚に特有な epiboly に注目してきた。

この epiboly については、比較発生学的に、また胚形成時の形態形成運動のモデルの一つとして、前述のように Fundulus や近年では zebrafish を用いての解析が行われている。後者は胚が透明なので諸変化が外から観察できるという利点があり、例えば、間歇的顕微鏡映画撮影法で epiboly やその周辺における細胞移動の状況が調べられている<sup>6)</sup>。(ウニも同様な利点がある)。筆者もこの方法を併用し、一部の所見の裏づけに

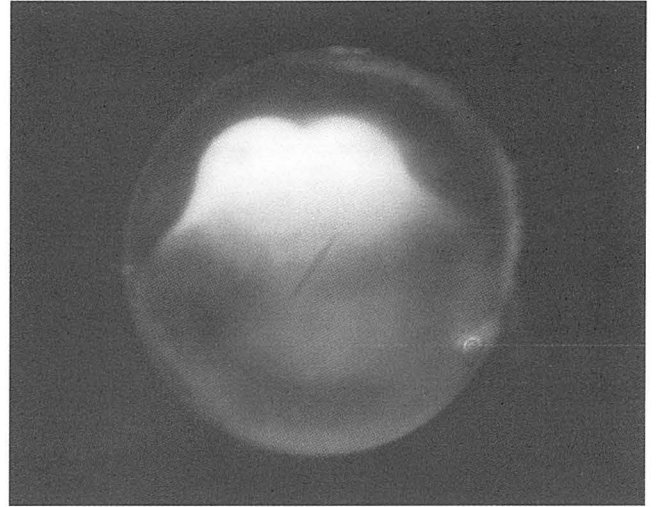
用いている。

さて、硬骨魚コイでは動物極側でのみ細胞分割が行われて、そこで胚盤が形成され、一方でその辺縁から、卵黄嚢を覆って植物極に向う細胞群の大移動 - epiboly - によって胞胚が形成される。次いで陥入・囊胚 (gastrula) 形成の間に胚盾 (embryonic shield) が現れ<sup>7)</sup>、神経胚 (neurula) へと発生が進んでいく (図5 - (10, 11))。これら一連の過程で、発生学的な関心の中心は前記のように epiboly とその機構の解析である。最近の知見では、移動に関わる - epiboly - 細胞構造としては、microfilaments (Fundulus で<sup>8)</sup>) 或いは microtubules (zebrafish で<sup>9,10)</sup>) や、actin (zebrafish で<sup>11)</sup>) の関与が、形態学的或いは実験的に確かめられている。さらに実験奇形学的<sup>12)</sup>ないし、分子遺伝学的アプローチ<sup>13,14)</sup>も試みられているが、この epiboly と共に、囊胚ないし胚盾形成における細胞移動を全体として捉えることが、発生初期に起こる形態形成運動のメカニズム解析に繋がる。

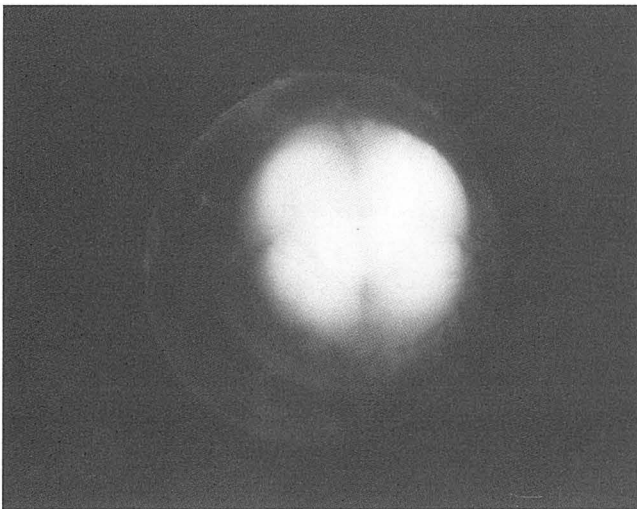
ところで、前記以外にも硬骨魚には冒頭で触れたように、比較発生学的ないし比較解剖学的に興味ある課題が存在し、それはまた、硬骨魚を脊椎動物進化・系統樹のどの位置に置くか、といった問題とも関わっている。本稿ではそれらに立ち入る十分な資料を持ち合わせないが、硬骨魚の発生には、なお解明に値する幾つかの課題を包含しているのである。



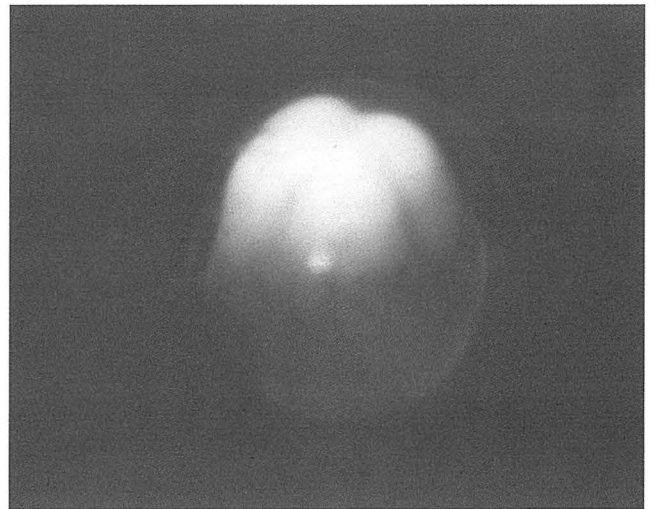
1 a : 2 分割卵 ; 動物極側からみる



1 b : 同 , 側面からみる



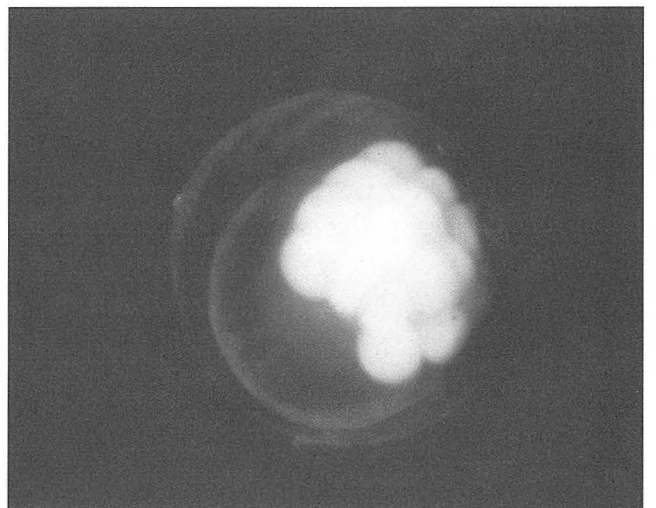
2 a : 4 分割卵 ; 動物極側から



2 b : 同 , 側面から



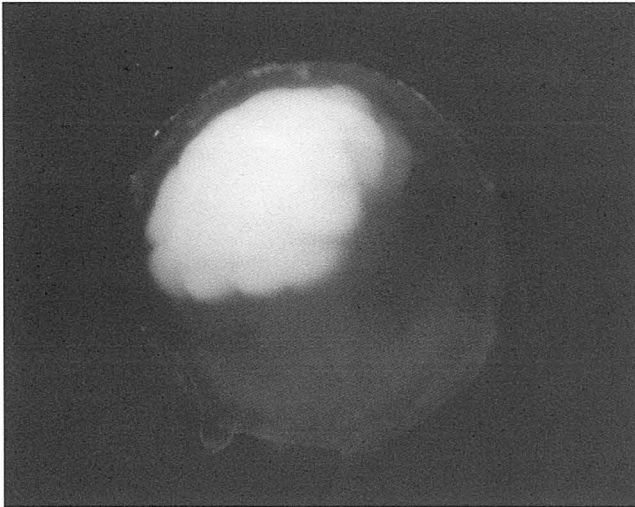
3 : 8 分割卵 ; 固定標本



4 : 16 分割卵

図 5 卵割から孵化まで (シリーズ(1)-(17)).  
特に記載のないものは倍率  $\times 31.5$

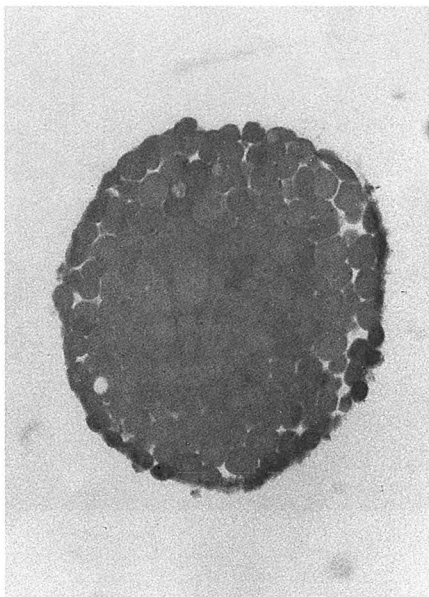




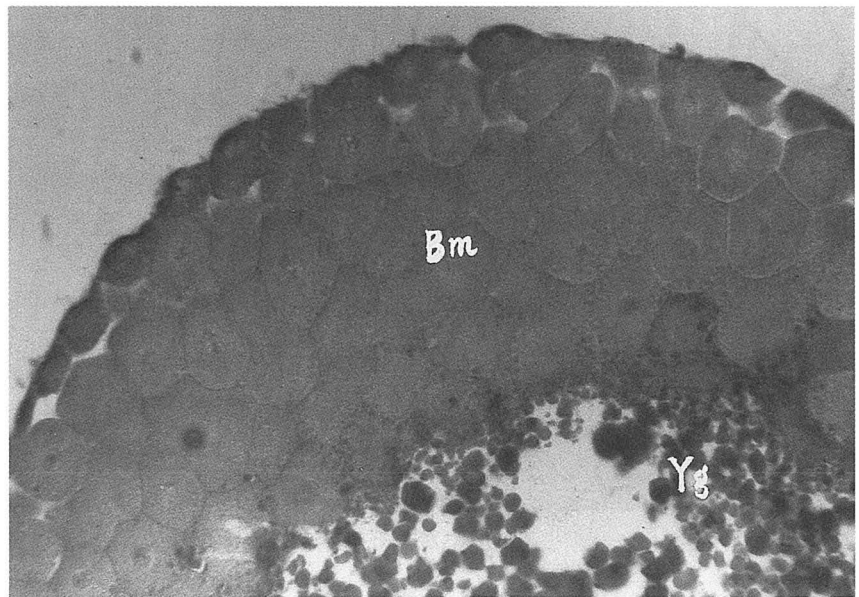
5 : 32分割卵



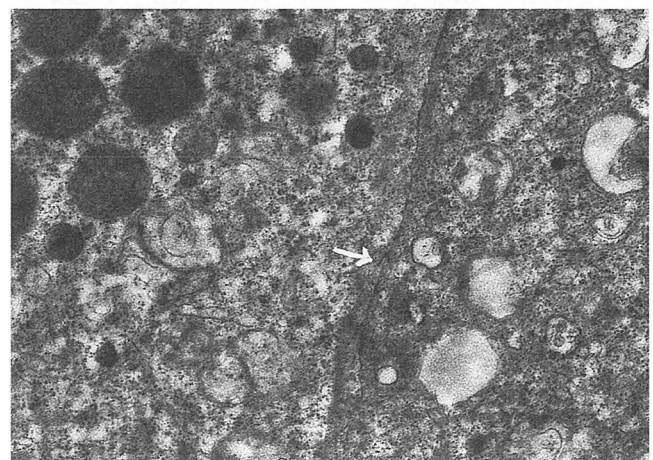
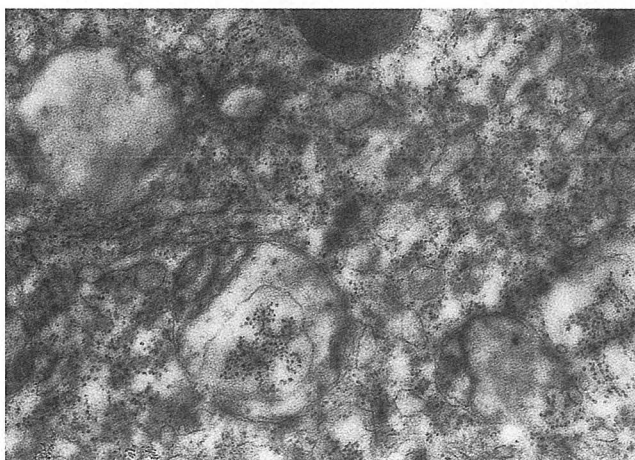
6 : 桑実胚 (morula) ; 固定標本



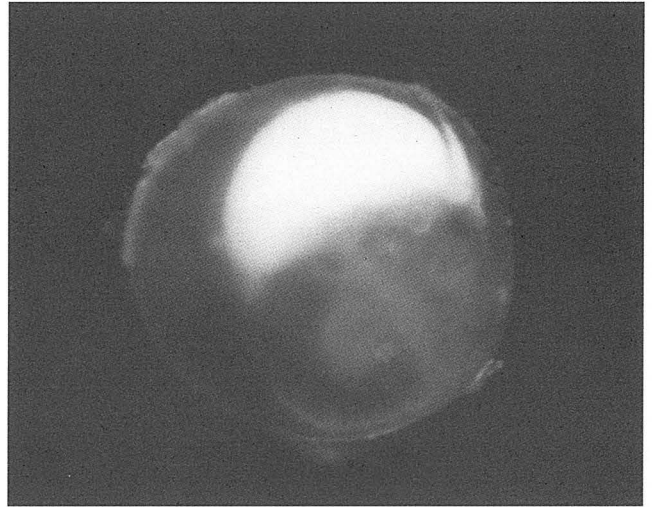
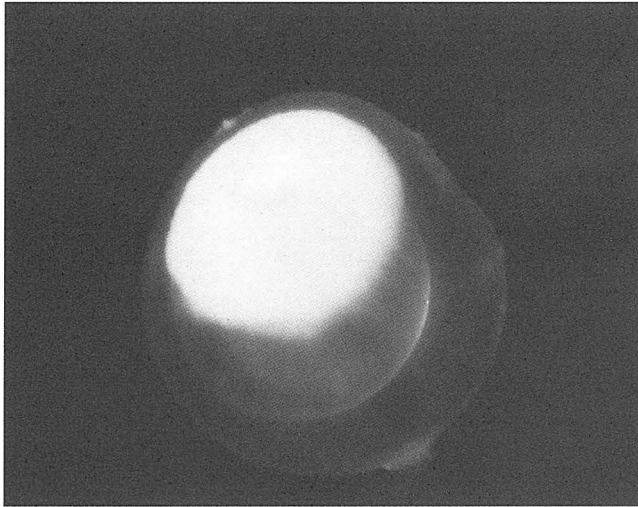
7 a : 分割細胞群の切片標本 × 70



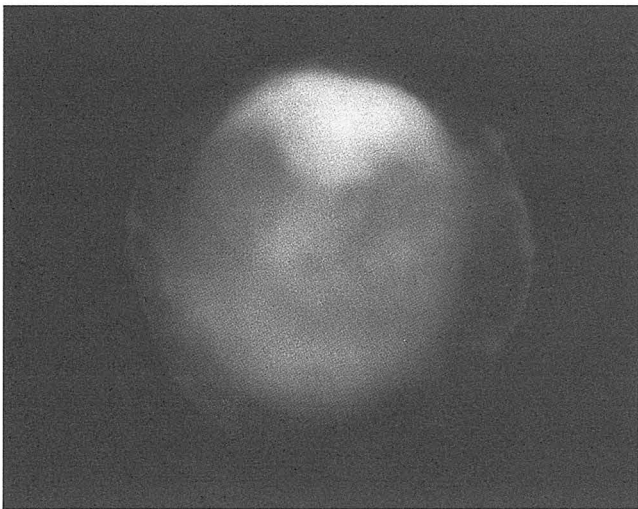
7 b : 同, 表層部の拡大 (Bm : 分割細胞群, Yg : 卵黄粒) × 168



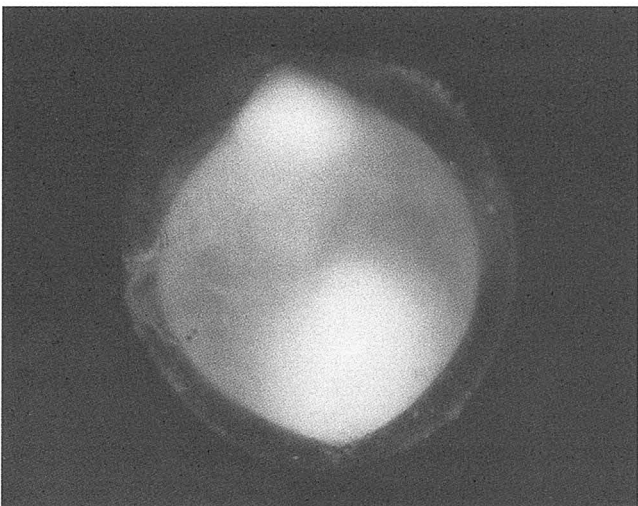
8 a, b (右) : 桑実胚分割細胞の電子顕微鏡写真 (b, 矢印は細胞の境界) × 10,600



9 a, b (右) : 胚盤形成期, b は側面観 ; 辺縁からの epiboly で, のち胞胚が形成されていく



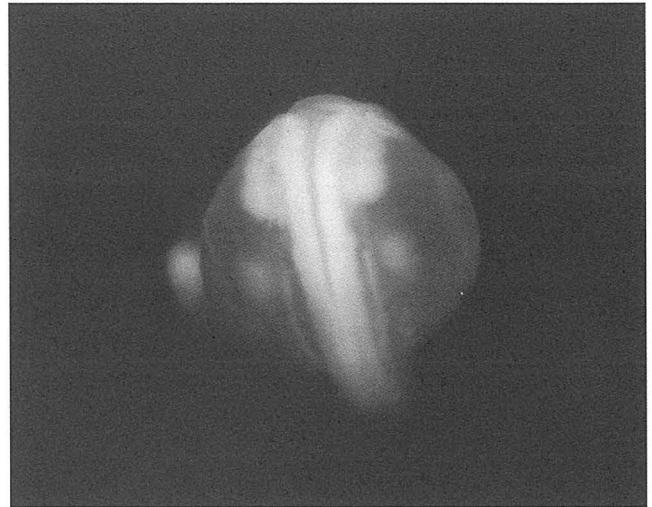
10 a, b (右) : 胚盾の形成—囊胚 ; のち胚体が出現してくる (b の矢印)



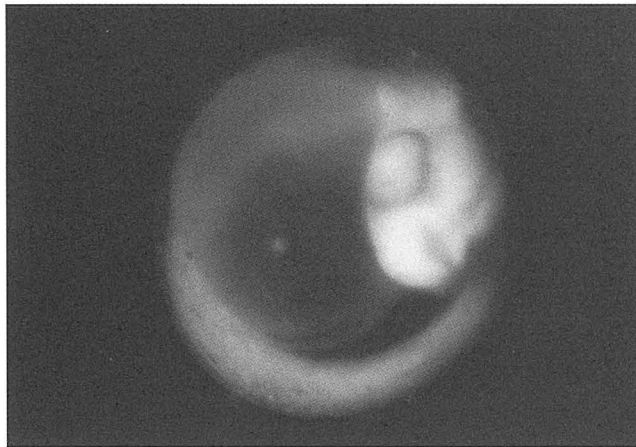
11 a, b (右) : 神経胚早期, b は固定標本 ; 前方は脳, 背方は脊髓の, それぞれ原基



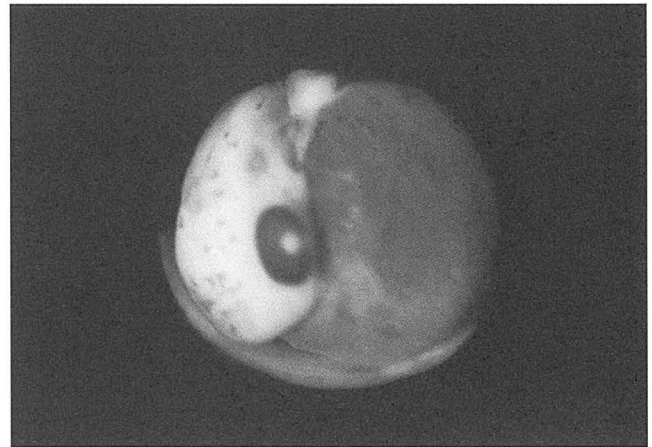
12 a : 神経胚後期—体節 (somite) 期, 固定標本



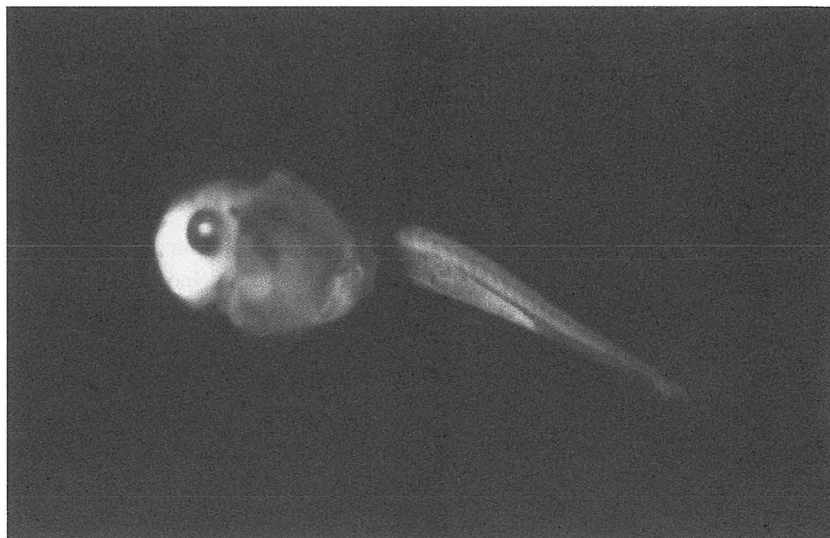
12 b : 体節の形成明瞭.  
前方・脳胞 (brain vesicles) の形成が明らか, 頭背方から観る



13 : いわゆる発眼期, 体の伸長・屈曲, 且つ卵膜内での動きが見られる



14 : 孵化前 1 日, 固定標本

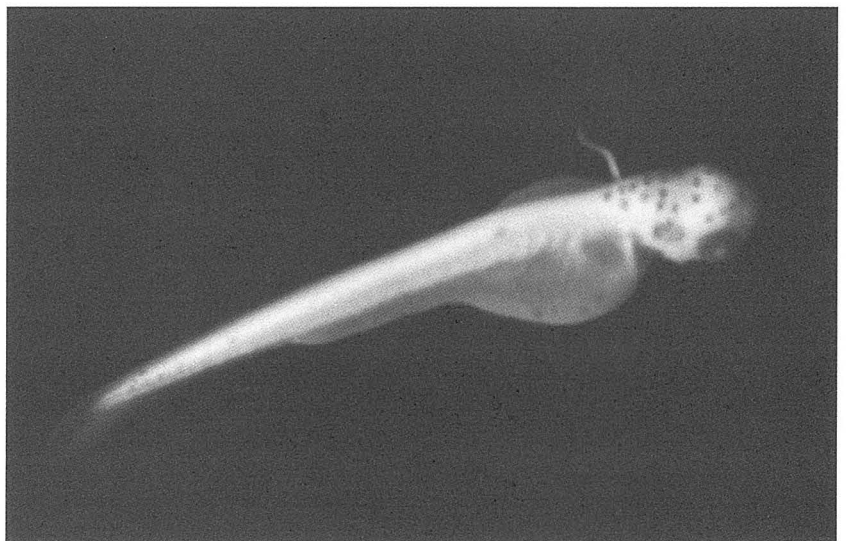


15 : 孵化中 ; 卵膜が破れ, 尾を伸ばして出て行く ×19.6





16: 孵化直後 ×19.6



17: 孵化後2日 ×19.6

## 謝 辞

研究の便宜を，熊本県水産試験場八代分場（崎山嗣光・場長（故人））に受けた。共同研究者：宮山幸彦（現・熊本大学医療技術短大），工藤修二（現・大分市）。

## 文 献

- 1a) 藤本十四秋：コイ（*Cyprinus carpio*）における初期器官発生，特に神経管の形成について，解剖学雑誌 42(1)：57-58，1967.
- 1b) 藤本十四秋：成体からは分からぬ発生時のすがた — かたちや構造の深い理解のために — (2) 管の構造からはじまる脳と脊髄 — 硬骨魚では少し違う，川崎医療短期大学紀要18：19-26，1998.
- 2) Ballard WW：Comparative Anatomy And Embryology, New York：The Ronald Press Co, 1964.
- 3a) Trinkaus JP：Cells into Organs；The Forces That Shape The Embryo, 2nd Ed, Englewood Cliffs, N. J：Prentice-Hall Inc, 1984.
- 3b) Trinkaus JP/岡田善雄・監訳：細胞行動と器官形成，東京：丸善，1973.
- 4) 斎藤宣雄，藤本十四秋：コイ（*Cyprinus carpio*）の人工孵化と発生の経過，解剖学雑誌 42(2)，付録，p. 3，1967.
- 5) 犬飼哲夫：動物発生学（脊椎動物）岩波全書，第五刷，東京：岩波書店，1941.
- 6) Weliky M and Oster G：The mechanical basis of cell rearrangement. 1. Epithelial morphogenesis during *Fundulus* epiboly, Devel. 109：373-386，1990.



- 7) Van Gestel WJ, te-Kronnie G, and Stroband HW : Blastoderm structure, cell migration and formation of the embryonic shield during gastrulation in the carp (*Cyprinus carpio*) ; a scanning electron microscopic study, *Eur J Morph.* 36 : 65–75, 1998.
- 8) Batchaku T and Trinkaus JP : Contact relations, surface activity, and cortical microfilaments of marginal cells of the enveloping layer and of yolk syncytial cytoplasmic layer of fundulus before and during epiboly, *J Exp Zool.* 206 : 381–462, 1978.
- 9) Strahle U and Jesuthasan S : Ultraviolet irradiation impairs epiboly in zebrafish embryos : evidence for a microtubule-dependent mechanism of epiboly, *Devel.* 119 : 909–919, 1993.
- 10) Solnica KL and Driever W : Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell : organization and function during epiboly, *Devel.* 120 : 2443–2455, 1994.
- 11) Zalik SE, Lewandowski E, Kam Z and Geiger B : Cell adhesion and the actin cytoskeleton of the enveloping layer in the zebrafish embryo during epiboly, *Biochem Cell Biol.* 77 : 527–542, 1999.
- 12) Baumann M and Sander K : Bipartite axiation follows incomplete epiboly in zebrafish embryos treated with chemical teratogens, *J Exp Zool.* 230 : 363–376, 1984.
- 13) Wilson ET, Cretekos CJ and Helde KA : Cell mixing during early epiboly in the zebrafish embryo, *Dev. Genet.* 17 : 6–15, 1995.
- 14) Kane DA, Hammerschmidt M, Mullins MC et al. ; The zebrafish epiboly mutants, *Devel.* 123 : 47–55, 1996.

