

# 借腹養殖技法開発を目的としたマダイの胚発生に関する基礎的研究

小林 徹,<sup>1\*</sup> 長谷川 徹,<sup>2</sup> 家戸敬太郎,<sup>3</sup> 大谷 哲<sup>3</sup>

(種苗生産・養殖グループ)

<sup>1</sup> 近畿大学大学院農学研究科, <sup>2</sup> 近畿大学農学部, <sup>3</sup> 近畿大学水産研究所

\* kobayasi@nara.kindai.ac.jp

近年、養殖業において借腹を用いた新しい育種・種苗生産技術の開発が進められている。この技術体系には胚の発生段階の設定および発生過程における始原生殖細胞 (PGCs) の移動経路等の詳細な発生学的知見が必要である。淡水魚では実験モデル魚のゼブラフィッシュを始め、初期発生過程における詳細が報告されている種が多くあるが、ほとんどの海水魚ではその詳細は明らかでない。借腹を用いた種苗生産技術を海産魚類に応用していくためには、それぞれの対象種の初期発生過程について詳細に調べる必要がある。本研究では人工採卵技術が確立され比較的容易に卵を採取できるマダイ (*Pagrus major*) を対象魚として、発生過程における内部形態の変化の観察を行い、海水魚における胚の発生段階の設定を行なった。

## 試料および方法

**試料** 近畿大学水産研究所白浜実験場で養成されたマダイの雌雄各 1 尾から採卵採精

し、乾導法で受精させたのち 20°C で培養した。

**方法** 受精直後から実体顕微鏡下で外部形態観察を行い、分裂周期の測定を行った。受精後 35 分から 25 時間まで定時的に各 100 粒の卵をブアン氏液で 24 時間固定した。固定が完了した卵は 70% エタノール液で置換し、同液中で卵膜を除去した。常法により 6  $\mu$ m パラフィン切片を作成し、HE 二重染色を施して、顕微鏡により時間ごとの胚の形態変化を観察した。

また、初期発生卵の卵膜除去の技法開発を目的に消化酵素処理および物理的除去を試みた。

## 結果および考察

**マダイ初期発生胚のステージング** 経時的な外形観察の結果、受精後 55 分に第 1 卵割が認められ、その後約 25 分おきに卵割が起こる様子が観察された。胚盤は卵黄サイズと比較して小さめで、多くの海産魚と類似していた。4-8 細胞期では胚盤を形成している細胞

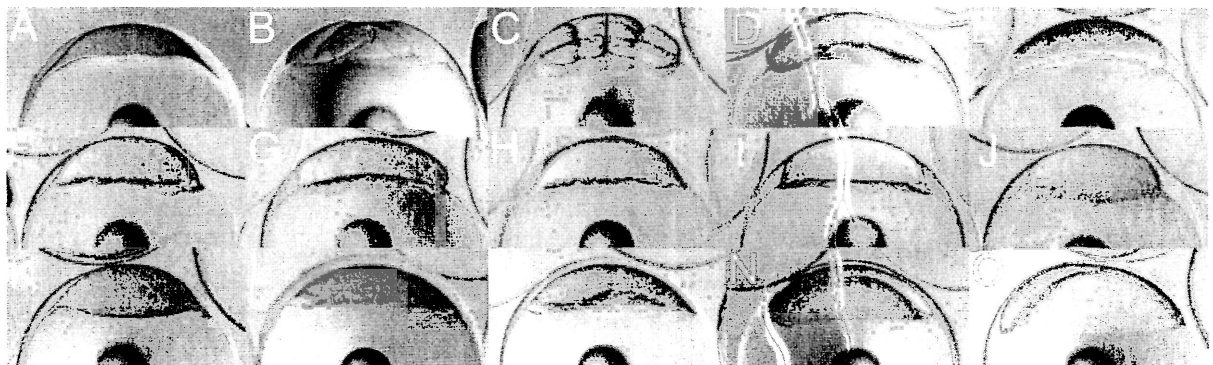


図 1. マダイの初期発生. A) 1 細胞期. B) 4 細胞. C) 8 細胞期. D) 16 細胞期. E) 32 細胞期. F) 64 細胞期. G) 128 細胞期. H) 256 細胞期. I) 512 細胞期. J) 約 1000 細胞期. K) 後期胞胚期. L) エピボリー運動開始期. M) ドーム期. N) 胚環形成期. O) 胚盾形成期. それぞれの時間は表 1 を参照.

質は卵黄の内部に入り込んでいるのが観察されたが(図 1B, C), 16 細胞期以降は卵黄部分からせり出した形で胚盤を形成した(図 1D)。32 細胞期では一部割球が上下二段になっている胚も観察された(図 1E)が, 多くの場合は 64 細胞期に観察され始めた(図 1F)。128 細胞期になると胚細胞の一部が胚盤から周縁部に広がっているのが観察された(図 1G)。周縁部に移動した細胞は受精後 6 時間 30 分まで確認されたがそれ以降は形態が不明瞭になり, 代わりに胚盤を囲む薄い層が観察されるようになった(図 1K)。また, この時期には胚盤の中央部が膨らみ, 卵黄側にせり出しているのも観察された。

その後, 胚盤は周縁部へと広がりはじめ, 同時に胚盤中央部が卵黄側から窪んだドーム

状の形態を示すようになった。その際ドームの内側の中心は胚盤の中心とずれており, 胚細胞層の厚みに差が生じた(図 1M)。胚盤が卵の 30% を覆う頃には胚環が確認された。その際, 胚細胞層が肥厚している部分から胚環形成が始まり, 胚盤周縁全域に胚環が形成されることには肥厚部で胚盾の形成も始まっていた(図 1N と O)。組織学的観察の結果では, 受精後 5 時間 5 分(約 2000 細胞期)までは胚盤内の各細胞の分裂周期に同調性が見られた(図 2A)。しかしながら 5 時間 30 分には胚全域で分裂周期が不揃いであることが観察された(図 2B)。これらのことから卵割が同調的な分裂から非同調的な分裂へと変わる時期(中期胞胚遷移: MBT)は 5 時間 30 分までに起こることが明らかになった。

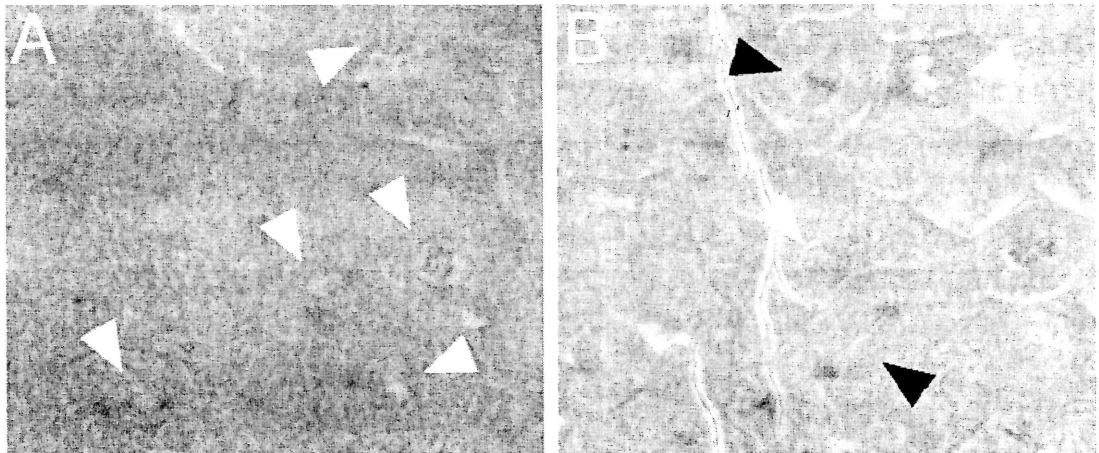


図 2. 非同調分裂期への移行. A) 受精後 5 時間 5 分. 核の分裂周期は終期～前期を示している(白矢頭). B) 受精後 5 時間 30 分. 分裂終期～前期の核(白矢頭)と分裂中期～後期の核(黒矢頭)が存在している.

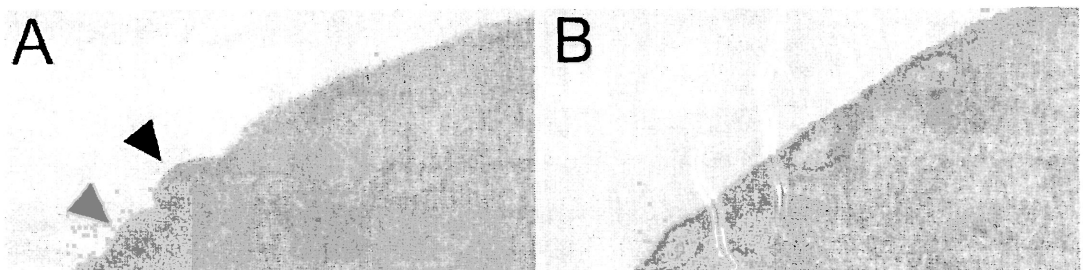


図 3. 上皮層の形成. A) 受精後 5 時間 5 分. 表層の細胞は内部の細胞よりも強い染色性を示している. 黒矢頭は割球の形状を残している細胞. B) 受精後 5 時間 30 分. 表層の細胞は薄く伸張し, 上皮層を形成している.

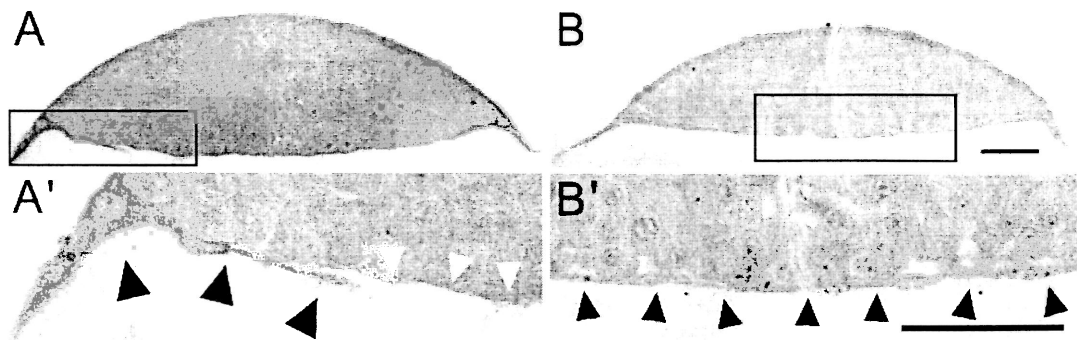


図4. 卵黄多核層の形成。A)およびA') 受精後5時間30分。胚盤周縁部と卵黄の境界に卵黄多核層が形成されている(黒矢頭)。胚盤中央部にはまだ形成されていない(白矢頭)。B)およびB') 受精後7時間35分。胚盤中央下部にも卵黄多核層が確認できる。Scale Bar=50 $\mu$ m。

それまで形態的に差の無かった胚細胞は、受精後5時間5分には胚盤表層に位置している細胞の表面が滑らかになり、表層の細胞と胚内部の細胞との染色性に違いが見られるようになった(図3A)。その後、受精後5時間

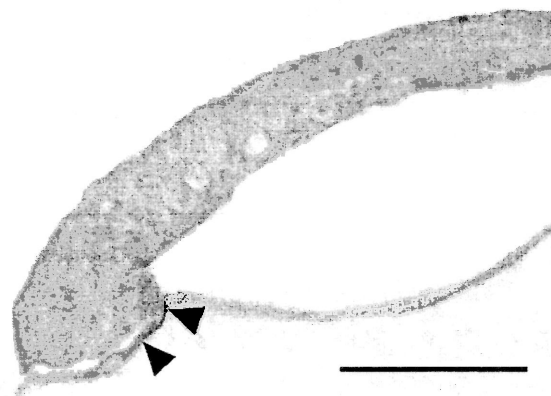


図5. 胚環の形成。胚盤周縁部の細胞が内部へ巻き込み肥厚している(黒矢頭)。Scale Bar=50 $\mu$ m。

30分には胚盤表層細胞が一層の細胞層を形成していた(図3B)。さらにこの時期には胚の周縁部に位置していた胚細胞の核が卵黄と胚の間に形成された細胞質の層に取り込まれているのが観察された(図4A)。周縁部に形成された卵黄多核層は中央部へと広がっていき受精後7時間35分には胚盤中央部にも観察された(図4B)。さらにこの時期には卵黄多核層が卵黄を覆うように伸張し始めているのも観察された。その後、覆い被せ(エピボリー)運動が進行し、胚盤が卵黄の30%を覆っ

た受精後8時間に胚盤周縁部に位置する細胞が胚盤内部へと落ち込み、胚盤葉下層(予定中-内胚葉領域)を形成しているのが観察された。その後、巻き込み運動により胚盤下層の細胞は動物極側へと伸張していった。

また将来背側となる領域への細胞運動も観察された。胚盾が形成された側の細胞層が肥厚し、反対側の細胞層が薄い状態であったが、受精後13時間の胚では腹側の胚盤葉下層の

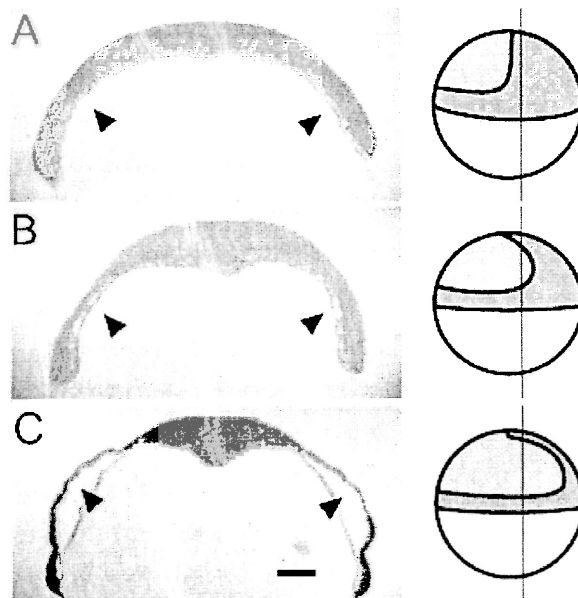


図6. 背側への集合運動。背側の胚盤葉下層の細胞は胚体形成と共に存在しなくなる。A) 受精後13時間 B) 受精後14時間 C) 受精後15時間。Scale Bar=50 $\mu$ m

細胞はほとんど観察されなかった。その後、受精後14時間には胚体部の肥厚が始まった

表 1. マダイの発生段階表

時間(受精後)	発生段階		
	外部形態観察	組織学的観察	
35分	胚盤上昇(1細胞期)		同調分裂期
55分	2細胞		
1時間20分	4細胞		
1時間45分	8細胞		
2時間10分	16細胞		
2時間35分	32細胞		
3時間	64細胞		
3時間15分	128細胞		
3時間40分	256細胞		
4時間10分	512細胞		
4時間35分	約1000細胞		
5時間5分		表層細胞の形態変化 上皮層の形成	
5時間30分		胚盤周縁部の卵黄多核層形成	
6時間40分	後期胞胚 エピボリー運動開始 ドーム期		
7時間30分	30%エピボリー期	卵黄多核層の完成	
8時間	胚環形成期	胚盤葉下層の形成	
8時間30分	胚盾形成期	背側への集合運動開始	
13時間	50%エピボリー期		
14時間			
15時間	70%エピボリー期	胚体部以外の胚盤葉下層細胞が殆ど観察されなくなる	
16時間	90%エピボリー期		
17時間	100%エピボリー期		
17時間30分	眼胞形成 2-4体節期		
18時間	4-5体節期		
19時間	6-8体節期		
20時間	10-12体節期		

がそれに伴って胚体両側の胚盤葉下層細胞が減少していき、受精後 15 時間ではほとんど観察されなくなった (図 6)。

その後、受精後 17 時間に胚盤が完全に卵黄を覆いかぶせ、エピボリー運動が終了した。受精後 17 時間 30 分には眼胞が観察された。また体節の分節が確認された。その後体節は約 15 分ごとに増加していった (表 1)。

マダイは海産養殖魚としてきわめて重要な位置を占め、また、体型や成長について優良な系統が選抜作出されつつある。海産魚における借腹技術が完成されれば、これらの系統の品種維持や形質の改良などに大きく貢献できるものと考えられる。今後は、本種におい

での始原生殖細胞の起源や動態を調べるとともに、単離、保存、培養、移植など、発生工学的技術の開発を進めていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) Kimmel, CB, Ballard, WW, Kimmel, SR, Ullman, B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 1995; 203: 253-310.
- 2) 小牧博信. マダイ仔稚魚の成長・発育に及ぼす水温の影響について. *水産増殖* 1996; 44: 99-104.