淡水産プラナリアの一種、トウホクコガタウズムシ
Phagocata teshirogii の核型ならびに再生片の
新生細胞における染色体変異

手代木 渉・佐々木 俊一

弘前大学理学部生物学教室 弘前市 036

KARYOTYPE OF A FRESHWATER PLANARIAN, *PHAGOCATA*
TESHIROGII, AND CHROMOSOMAL VARIATIONS
IN NEOBLASTS OF REGENERATING PIECES

WATARU TESHIOGI AND SHUN-ICHI SASAKI

Department of Biology, Faculty of Sciences, Hirosaki University,
Hirosaki 036

Received August 16, 1977

ABSTRACT

By using the squash method, researches on the karyotype of *Phagocata teshirogii* and chromosomal variations found in neoblasts of regenerating pieces have been carried out. Observations were also made on the meiotic divisions of primary spermatocytes and oocytes.

The chromosome number of this species was $2n=24$ and $n=12$. The karyotype consisted of 5 pairs of metacentric chromosomes, 1 pair of subtelocentric and 6 pairs of submetacentric chromosomes (Table 2). Chromosome No. 1 is particularly large. Chromosome No. 2 is medium in size, while all the others are distinctly small (Fig. 3). Although many neoblasts in regenerating pieces have the chromosome number of $2n=24$, some others have different chromosome numbers. This finding seems to support Chandebois' view that various kinds of abnormal cell division, such as amitosis, budding and endomitosis, occur in neoblasts during regeneration (1965, 1976). No abnormality in chromosome number was found during the meiosis of spermatocytes and oocytes.

プラナリアの核学的知見に基づいて、その種分化と系統の問題を明らかにしようとする研究は多くの研究者によってなされてきた (Melander 1950; 門馬 1953; Benazzi 1957a, b, 1966; Benazzi and Giannini 1970; Lentati 1957; Dahm 1958, 1963, 1964; 手代木・板垣 1965; その他). Benazzi は、その夫人 G.B. Lentati との共著 (1976) で、“Animal Cytogenetics, 1: Platyhelminthes” を刊行し、扁形動物の染色体進化を論じているが、それによると、渦虫類では、倍数性、異数性、B 染色体、多極性紡錘体、非対合、偽対合、一価染色体や多価染色体の出現、出芽、無糸分裂などが卵母細胞や精母細胞にみられるだけでなく、体細胞である新生細胞 (neoblast) でもみられ、複雑な核型を示すという。

最近、わが国でも系統分類、あるいは再生機構との関連からプラナリアの染色体研究が活発になり、とくに、多型種 (polymorphic species) であるナミウズムシ *Dugesia japonica* において、過剰染色体、倍数性、異数性あるいは同一個体内における $2n$ と $3n$ 新生細胞の混在の問題などが論議されている (杉野ら 1973; 広瀬

ら 1974; 沖・田村 1974, 1975a, b; Kawakatsu *et al.* 1976).

今回用いたプラナリアはトウホクコガタウズムシ *Phagocata teshirogii* であるが, この *Phagocata* に属するプラナリアは種類が多く, 本邦では現在までに 8 種類が知られ, 各地方に分布している (川勝 1966; 杉野ら 1976 参照). しかし, これらの染色体についてのくわしい研究報告はいまだなされていない. 本論文では本種の新生細胞, 精母細胞および卵母細胞における染色体の核型分析を行なうと共に, 再生機構の観点から再生時にみられる染色体数の分布変異についても調べたので, これらのことについて報告したい.

材 料 と 方 法

実験に用いた材料は, 1976 年 7 月から翌年 3 月にかけて弘前市内のわき水から採集されたトウホクコガタウズムシ *Phagocata teshirogii* Ichikawa et Kawakatsu, 1962 で, 体長 5~10 mm の成虫を用い, それらは実験前, 一週間空腹状態に保たれた. 再生実験には, 水道水 18l にハイポ 0.5g を加えて脱塩素したものを飼育水として使用した.

染色体の観察は, 手代木・板垣 (1965) の方法に従い, 再生しつつある虫片を用い, フォイルゲン染色後, おしつぶし法により行なった. すなわち, Fig. 1 のように, 虫体から咽頭前域片を切りだして 2~4 日間再生させ, その再生片を中央で 2 分してそれぞれの切断片をカルノア液 (70% アルコール 3+氷醋酸 1) で 30 分~

Fig. 1. *Phagocata teshirogii*, showing level of the piece used and position of the genital organs. A, level of pre-pharyngeal region. B, regenerating piece. ab; anterior blastema. ca; copulatory apparatus. gp; genital pore. lc; level of cutting. m; mouth. o; ovary. p; pharynx. pb; posterior blastema. ppr; pre-pharyngeal region. sv; spermiducal vesicle. t; testis.

1時間固定し、1N 塩酸、60°C で6分間加水分解を行ない、ついでシッフの試薬中に1~1.5時間浸した。その後、これらの切断片を亜硫酸水に通し、よく水洗後スライド上にとり、それに醋酸カーミンを数滴加えておしつぶし、バルサム・パラフィンで封じた。

染色体数の観察には、とくに視野外に染色体が飛び出していないか、どうか、また他の細胞からの混入の有無についても顕微鏡を低倍にして十分に注意した。また、2つ以上の細胞質が重なっているようなばあいには位相差顕微鏡を用いてその正確さを期した。なお、染色体のスケッチは1,500倍の倍率下でカメラルシダを用いて行なった。

Table 1. Numbers of specimens and cells examined cytologically, and chromosome numbers in *Phagocata teshirogii*

Kind of cells	No. of specimens examined cytologically	No. of cells observed	Chromosome nos.
Neoblast (mitosis)	28	81	$2n=24^*$
Spermatocyte (meiosis)	12	18	$n=12$
Oocyte (meiosis)	7	9	$n=12$

* There are many other kinds of variations in chromosome number in neoblasts of regenerating pieces. See Fig. 3.

Fig. 2. Karyotype of a neoblast in a regenerating piece of *Phagocata teshirogii*. A and B, photomicrographs of the chromosomes in metaphase plates ($2n=24$). a and b, mitotic chromosomes arranged according to length, correspond to A and B, respectively.

観 察 と 結 果

本虫の核型は再生片の新生細胞や精母細胞および卵母細胞で調べられ、用いた虫の数、細胞数、染色体数などは Table 1 に示されている。

1. 再生片の新生細胞における核型と染色体数の変異

a) 核型 本観察は再生中の新生細胞の正常核分裂について行なった。再生中に有糸分裂をするのは、生殖細胞を除いて、新生細胞だけであることが知られている。とくに、その分裂頻度は、再生 2~4 日において高く、また、それは再生芽に隣接した旧組織の部域において高い (手代木・大場 1959; Teshirogi 1962 参照)。

新生細胞の染色体数は、基本的には $2n=24$ である。Fig. 2 にはこの 12 対の染色体を大きさの順にならべて 1~12 の番号を付してある。第 1 染色体は極端に大形で、中部着糸点をもち、第 2 染色体は中形で、次端部着糸点を有している。第 3~第 12 染色体はいずれも小形であるが、第 3, 6, 8, 10 染色体の 4 対は中部着糸点をもち、その他は次中部着糸点をもっている (Table 2)。

b) 染色体数の変異 再生 2 日から 4 日のものについて調べたが、新生細胞の染色体数には、1 から 37 におよぶ種々のバラツキが観察された。しかし、24 個のものが最も多い (Fig. 3)。

Fig. 3 は 28 個体のうち、81 細胞で観察されたものであるが、これは染色体数を明らかに確認できたものだけをえらんだもので、不明確なものは除いてある。たとえば、染色体数が明かに 30 を越えていると確認できるものでもその全染色体数が確定できなかったものは除外した。これらの染色体数の変異の中には、どの染色体が欠け易いとか、重複し易いということは認められなかった。たとえば、第 1 染色体が 1 個であったり、第 2 染色体がなかったり、あるいは小形染色体だけなどの種々の組合せが観察された (Fig. 4)。

2. 精母細胞における染色体

精巣は卵巣の後方から尾方に向って、虫体の背側に分布し (Fig. 1)、精子形成はほとんど年中おこなわれている。

Fig. 5 は第 1 減数分裂の中期の染色体で、2 価染色体が 12 個みられた。

3. 卵母細胞における染色体

Fig. 6 は、卵巣を含む再生虫片の前片 (Fig. 1) をおしつぶして観察したもので第 1 減数分裂前期の複糸期のものである。2 価染色体が 12 個みられ、大形染色体が 1、中形が 1、そして小形染色体が 10 個認められ

Table 2. Arm-ratio and designation of each of the 12 chromosomes found in neoblasts of regenerating pieces in *Phagocata teshirogii*

Chromosome No.	Arm-ratio range	Mean value	Chromosome designation*
1	1.0—1.2	1.1	metacentric
2	2.8—3.3	3.2	subtelocentric
3	1.0—1.1	1.0	metacentric
4	1.7—2.0	1.8	submetacentric
5	1.5—2.0	1.8	submetacentric
6	1.0—1.2	1.0	metacentric
7	1.3—2.2	1.8	submetacentric
8	1.3—1.8	1.6	metacentric
9	1.8—2.5	2.1	submetacentric
10	1.1—2.0	1.5	metacentric
11	1.8—2.5	2.1	submetacentric
12	1.8—2.7	2.2	submetacentric

* This classification is based on that of Levan *et al.* (1964).

Fig. 3. Variation of chromosome numbers in neoblasts of regenerating pieces.

る。すなわち、卵母細胞においても精母細胞における観察とよく一致している (Fig. 5 参照)。なお、卵巣内では、とくに卵細胞形成過程における同時期の卵母細胞が集団をなして存在するのが観察された。

論 議

前にも述べたように、本邦産ナミウズムシ *Dugesia japonica* の核型は、近年、系統の問題ともからみ活発に論議がなされている。杉野ら (1973) は、山梨県清里産有性系個体は $2n=16$ で、手代木・板垣 (1965) の報告した小樽、弘前、京都、松山産のものとよく一致するが、京都市鞍馬産無性系ナミウズムシの体細胞の染色体数は 25 で、 $2n+1$ か、それとも $3n+1$ かはまだ決めかねており、さらにこの種を *D. japonica* から外すことが妥当かどうかを分類学の専門家にゆだねたいとしている (杉野ら 1973)。また、彼らは、和歌山紀の川産と大阪府谷川産の無性系では 16 と 24 の染色体をもつ細胞が同一個体に混じっていると述べている (広瀬ら 1974)。染色体数の違った体細胞の混在は、沖・田村 (1974, 1975a, b) によっても報告されている。箕面川産ナミウズムシは、16 と 25 の細胞、または、16 と 24 の染色体数をもった細胞が混在し、個体によっては染色体数 8, 32 の細胞が、16 と 24 の染色体をもつ虫体に混じっていることもあったと述べている。すなわち、個体によっては、8, 16, 24, 32 の染色体をもつ体細胞が混在していることになる。

また、Kawakatsu ら (1976) は沖縄および韓国からのナミウズムシの染色体は基本的には $n=8$, $2n=16$ であるが、2 倍体と 3 倍体の細胞の混在する個体、3 倍体だけの個体、 $n=7$, $2n=14$ を有する個体 (沖縄)、小形の余分な染色体を含み、異数性を示す個体 (沖縄・韓国) など、多くの変異を見だし、これらを、地史を背景とした種分化の過程と関係があると考えている。そして、最近 $n=7$, $2n=14$ のものを *Dugesia japonica ryukyuensis* Kawakatsu, 1976 とし、これまでの *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu, 1964 を *Dugesia japonica japonica* Ichikawa et Kawakatsu, 1964 とし 2 亜種に分割した。

Phagocata に属する本邦産プラナリアは、地方的にあるいは垂直分布的に生息域を異にしているが、その核

Fig. 4. Photomicrographs of neoblasts showing various chromosome numbers in regenerating pieces. A) chromosome number; 22, lacking 2 small chromosomes. B) 16,

Fig. 5. Bivalent chromosomes of primary spermatocytes of *Phagocata teshirogii*. A; microphotograph of a meiotic metaphase of a primary spermatocyte with 12 bivalents. B; drawing of the bivalents in A. C and D; bivalent chromosomes of two spermatocytes, arranged according to their size.

型については、杉野ら (1976) の短かくふれたものがあるにすぎない。

今回、観察したトウホクコガタウズムシ *Phagocata teshirogii* の染色体数は、再生中の新生細胞で、基本的には $2n=24$ で、大形染色体 1 対、中形 1 対、小形が 10 対であるが、第 1, 3, 6, 8, 10 染色体の 5 対が中部着糸型染色体で、その他は第 2 染色体の次端部着糸型を除き、すべて次中部着糸型染色体である。また、卵母細胞および精母細胞の減数第 1 分裂の前期あるいは中期での像で、12 個の 2 価染色体が認められた。

杉野ら (1976) は、ホクリクホソウズムシ *Phagocata suginoi* の染色体についてふれているが、それによると $2n=24$ で、大形のものが 1 対、中形 1 対、他は小形で、あまり大きさの差異が認められないとし、最終的な結果ではないと断っているが、これは今回の結果によく類似しているように思われる。また、新村はコガタウズムシ *Phagocata kawakatsui* の観察結果として、 $2n=24$ で、大形が 1 対、第 2 から第 12 染色体まで

lacking 8 small chromosomes. C) 14, lacking 2 median and 8 small chromosomes. D) 8, consisting of one median and 7 small chromosomes. E) 4, consisting of one large and 3 small chromosomes. F) 2, consisting of 2 small chromosomes.

Fig. 6. Primary oocyte with 12 bivalents at the diplotene stage in *Phagocata teshirogii*. The small nucleus found in this oocyte is that of an oogonium (arrow).

は次第に小さくなっているというが (私信による), これらはいずれも確定されたものではないので, これ以上論議することはできない. しかし, ヨーロッパ産の *Phagocata* 属は, 種によって核型が異なっているといえる. Dahm (1958, 1964) は *Phagocata* 属, 4 種について報告しているが, それによると *Phagocata vitta* には基本数 7 の倍数体で, 3 倍体から 10 倍体までの 8 種の系統のあることを見だし, *P. albissima* は $2n=36$, *P. paravitta*, $2n=34$ そして *P. dalmatica* は $2n=32$ で, 今回観察の *P. teshirogii* とは著しく異なっている. *Phagocata* 属のプラナリアは, 同じ属でありながら種によって再生能 (頭形成頻度曲線) に差があり (Teshirogi *et al.* 1965), この点からもとくに本属の染色体の比較研究には興味をもたれている.

次に, 今回の観察で注目すべきことは, 再生片の新生細胞の染色体数に種々の変異がみられることである. Chandebois (1965, 1976) は, プラナリアのタイプ 1 細胞 (新生細胞と同義語) には核内有糸分裂 (endomitosis) により倍数性を示したり, 無糸分裂や細胞質の出芽によって種々の異数性や無核細胞が出現し, これらの細胞は短命で, やがて崩壊し, 再生細胞である多核細胞に核酸を与え, それを受けた多核細胞は分裂能を高めて再生芽に分化すると主張している. 今回の観察で新生細胞の無糸分裂や出芽を確認することはできなかったが, これらの現象が起ると仮定すれば, 染色体数の分布変異についても理解できる. しかし, 彼女の主張する再生芽形成細胞としての多核細胞は電顕的にも観察できないが, 新生細胞が他の柔組織細胞を捕食している像は電顕的にとらえている (手代木・石田, 未発表).

また, 植物におけるカルス形成中に染色体数が著しい変異を示し, そのカルスから根, 茎へ分化が進むものは, その染色体数が本来の 2 倍体になって安定することが報告されている (常脇, 1975), この結果が本観察で得られたプラナリアの再生時の場合とよく似ていることは注目に値する.

広瀬ら (1974) は無性系のナミウズムシに 16 と 24 の染色体をもつ体細胞が混在するのは, 性器官を形成しない原因としているが, 沖ら (1975b) は有性個体でも 16 と 24 の染色体をもつ体細胞を観察している. しかし, 卵から孵化した仔虫の体細胞は 2 倍体であると述べている. また, Benazzi and Lentati (1976) によると, プラナリアでは生殖細胞の形成においても異常分裂は普通にみられ, 正常な減数分裂のみをする種はむしろ珍らしいとされているが, 本観察においては, 生殖細胞形成過程における異常分裂は認められなかった. すなわち, 本種は正常な減数分裂をする種であるといえる.

これらの考察より, 著者らは, 再生片の新生細胞は異常分裂により染色体数に多くの変異をもたらし, $2n=24$ 以外の細胞, とくに染色体数の少ない細胞は崩壊したり, あるいは再生芽形成に関与する正常な新生細胞に捕

食されて核酸を提供している可能性はあると考えている。そして、再生片の体細胞の観察のみでプラナリアの核型を論ずるには慎重を要するとの結論である。

摘 要

1) 淡水産プラナリアの一種、トウホクコガタウズムシ *Phagocata teshirogii* の核型ならびに再生片の新生細胞における染色体変異について、おしつぶし法によって調べた。

2) 再生片の新生細胞は、基本的には $2n=24$ で、大形染色体 1 対、中形 1 対、そして 10 対の小形染色体からなり、第 1, 3, 6, 8, 10 染色体の 5 対が中部着糸型染色体で、第 2 染色体が次端部着糸型染色体、他はすべて次中部着糸型染色体である。

3) 卵母細胞と精母細胞の減数第 1 分裂の前期あるいは中期の像で、12 個の 2 価染色体が認められた。生殖細胞形成中の減数分裂では染色体数の異常は認められなかった。

4) 再生片の新生細胞では染色体数の種々の変異が観察された。この結果からプラナリアの核型分析は新生細胞だけの観察では慎重さを要することを指摘し、さらに、この変異をおこす原因とその異常細胞の再生に果たす役割について議論した。

謝 辞

本稿をまとめるにあたり、有益なる御助言と御批判をいただいた本大学理学部板垣源太郎博士に対し心から厚く御礼申上げる。なお、本研究は文部省科学研究費 (B) 248025 の援助によって遂行されている研究の一部である。

引 用 文 献

- Benazzi, M., 1957a Introduzione alla analisi genetica dei biotipi cariologici di tricladi. La Ricerca Sci. 27: 9-24.
- Benazzi, M., 1957b Cariologia di *Dugesia lugubris* (O. Schmidt) (Tricladia Paludicola). Caryologia 10: 276-303.
- Benazzi, M., 1966 Consideration on the neoblasts of Planarians on the basis of certain karyological evidence. Chromosoma 19: 14-27.
- Benazzi, M., e E. Giannini, 1970 Ricerche su popolazioni della planaria *Dugesia benazzii* con due tipi di ovociti: Analisi statistica delle frequenze e considerazioni di ordine genetico. Riv. Biol. 63: 145-157.
- Benazzi, M., and G. B. Lentati, 1976 "Animal Cytogenetics" Vol. 1: Platyhelminthes. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- Chandebois, R., 1965 Cell transformation systems in planarians. In "Regeneration in Animals and Related Problems" (V. Kiortsis and H. A. L. Trampusch, ed.) pp. 131-142. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Chandebois, R., 1976 "Monographs in Developmental Biology" Vol. 11: Histogenesis and Morphogenesis in Planarian Regeneration. S. Karger, New York.
- Dahm, A. G., 1958 Taxonomy and ecology of five species groups in the family Planariidae (Turbellaria Tricladida Paludicola). Nya Litografen Malmö: 1-241.
- Dahm, A. G., 1963 The karyotypes of some freshwater Tricladids from Europe and Japan (Turbellaria Tricladida Paludicola). Arkiv Zool. 16: 41-67.
- Dahm, A. G., 1964 The taxonomic relationships of the European species of *Phagocata* (?=Fonticola) based on karyological evidence. Arkiv Zool. 16: 481-509.
- 広瀬栄治・加藤文裕・杉野久雄, 1974 淡水産渦虫 *Dugesia japonica* の染色体について (第 2 報), 動物学雑誌 83: 442.
- Ichikawa, A., and M. Kawakatsu, 1962 *Phagocata teshirogii*, a new freshwater planarian, from

- the Tohoku region in Honshu. Annot. Zool. Japan **35**: 112-120.
- 川勝正治, 1966 日本産淡水棲三岐腸類既知種の総覧, 日本生物地理学会会報 **24**: 9-28.
- Kawakatsu, M., I. Oki, S. Tamura, and H. Sugino, 1976 Studies on the morphology, karyology and taxonomy of the Japanese fresh water planarian *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu, with a description of a new subspecies *Dugesia japonica ryukyuensis* subsp. nov. Bull. Fuji Women's College, No. 14, Ser. II: 81-126.
- Lentati, G. B., 1957 Sul determinismo e sulla ereditarietà della aneuploidia in *Dugesia etrusca benazzi* planaria a riproduzione anfiponica. Caryologia **10**: 352-387.
- Levan, A., K. Fredga, and A. A. Sandberg, 1964 Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas **52**: 201-220.
- Melander Y., 1950 Accessory chromosome in animals, especially in *Polycelis tenuis*. Hereditas **36**: 19-38.
- 門馬栄治, 1953 イズミオオウズムシの染色体, 染色体 **16**: 573-574.
- 沖岩四郎・田村幸子, 1974 箕面川ナミウズムシの染色体について, 動物学雑誌 **83**: 457.
- 沖岩四郎・田村幸子, 1975a 染色体数 16 および 24 の細胞が 1 個体内に混在している淡水産ナミウズムシについて, 動物学雑誌 **84**: 61-63.
- 沖岩四郎・田村幸子, 1975b 染色体数の異なる細胞が混在している淡水産ナミウズムシについて, 動物学雑誌 **84**: 444.
- 杉野久雄・広瀬栄治・加藤文裕, 1973 日本淡水産渦虫 *Dugesia japonica* Ichikawa et Kawakatsu の染色体, ネイチャー・スタディー **19**: 5-7.
- 杉野久雄・川勝正治・村山 均, 1976 ホクリクホソウズムシの採集記, 遺伝 **30**: 70-73.
- Teshirogi, W., 1962 Dynamic morphological change and time-table during the regeneration of the turbellarian *Bdellocephala brunnea*. Sci. Rep. Hirotsaki Univ. **9**: 21-48.
- 手代木渉・板垣源太郎, 1965 *Dugesia gonocephala* とよばれてきた本邦淡水産プラナリア *Dugesia* species の核型, 動物学雑誌 **74**: 38-45.
- 手代木渉・大場昭雄, 1959 渦虫の一種 *Bdellocephala brunnea* の再生型についての一考察, 動物学雑誌 **68**: 307-316.
- Teshirogi, W., M. Yagihashi, and M. Sutô, 1965 Regeneration capacities of transverse pieces in four species of Japanese freshwater planarian. Sci. Rep. Hirotsaki Univ. **12**: 22-36.
- 常脇恒一郎, 1975 植物カルスにおける染色体変異, 組織培養 **1**: 132-137.