— 原 著 —

鶏胚盤上葉の走査型電子顕微鏡による観察

鳥橋 茂子

日本医科大学第1解剖学教室 (主任: 中村逸雄教授)

A scanning electron microscopic study on the epiblast of chick blastoderm

Shigeko Torihashi

Department of Anatomy (Chief: Prof. Itsuo Nakamura), Nippon Medical School

The epiblast of chick blastoderm was observed by scanning electron microscope at the definitive primitive streak stage (St. 4: Hamburger and Hamilton 1951), pre-primitive streak stage (St. 1) and younger blastoderm (2 h. incubation).

Surface differentiation of the epiblast was found as early as the younger blastodermal stage.

On the epiblast of the St. 4 blastoderm, the surface structure was classified into 3 basic types (type-a, -b and -c cell).

Type-a cell had mushroom-shaped or glass-bell-like processes at the cell boundaries and no microvilli. Many of the cells among type-a cells had a single cilium. Type-a cell was distributed mainly in the central area around the Hensen's node (area I). Type-b cell had a rather smaller number of microvilli in the central part of the cell surface than on the cell boundaries. Cells with a single cilium were smaller in number than type-a cells. Type-b cells were localized mainly in the peripheral area of the pars pellucida (area II). Type-c cells had a great number of microvilli on the whole cell surface. Single cilium was never found in this type of cell which occupied the pars opaca (area III) of the blastoderm. The correlation between the distribution pattern of the three basic types of cells and the prospective fate of the epiblastic cells was also discussed.

Key words: scanning electron microscope, blastoderm, epiblast, chick

緒 言

鶏胚の発生過程にあって胚盤上葉 (epiblast) の上皮細胞はその後の形態形成運動のあり方とともにその細胞の運命について多くの研究者の興味を焚きつけている。内胚葉形成について Pasteels¹⁾ は予定内胚葉の材料は原条形成中にもその後も胚盤上葉には存在しないということを生体染色実験に基づいて示している。Hunt²⁾ は内胚葉は原条を通して陥入する胚盤上葉の細胞によって形成されることを推定し、Nicolet^{3,4)}、Rosenquist⁵⁾ は放射性同位元素を使った標識法により Hunt²⁾ の考え方を実証した。Spratt⁶⁾ はカーボン粒による標識実験で定原条期 (definitive primitive streak stage) においても原条の両側に、まだ予定中胚葉の一部が存在することを示している。一方このような形態

形成運動をはじめとして各細胞が協調的に機能するために従来の細胞間結合装置のほか、細胞表面に生じた紐状構造物 (threads) が存在していることを走査型電子顕微鏡で見出している (Klika and Jelinek⁷⁾、Backhouse⁸⁾、Jacob ら⁹⁾、Bancroft and Bellairs¹⁰⁾).

本論文では鶏胚盤上葉の上皮細胞を主として走査型電子顕微鏡を使って観察し、細胞の自由表面に見られる形態学的な分化の様相を明らかにし、それぞれの細胞の発生学的運命を考察した。

実験材料および方法

白色レグホンの受精卵を孵卵し、定原条期 (definitive primitive streak stage) (Stage 4. Hamburger and Hamilton¹¹⁾)、前原条期 (pre-p.s. stage) (Stage 1)、さらに幼若 (孵卵 2 時間) のものを観察した。

定原条期胚は 37℃、24~26 時間、前原条期胚は 7 時間の孵卵で得られた。孵卵した卵を割って卵白を除き卵黄を 37℃ に保温したロック液に入れビベットで

Correspondence to Shigeko Torihashi, Department of Anatomy, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

残っている卵白などを十分に洗い流し、液を数回取り替えたあと液面に露出させた胚盤表面に卵黄膜の上から 2.5% glutaraldehyde を含む 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) を滴下し、胚盤が硬化したところに卵黄膜とともに胚盤を切り出し、0.5% glutaraldehyde を含む 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) の固定液に移す。この固定液で 1.5 時間固定するがその間に卵黄膜を除きさらに胚盤を十分に洗浄した。次に蔗糖 0.18 M を含む 0.08 M cacodylate buffer (pH 7.4) に 30 分浸漬し、1% オスミウム酸と 0.09 M 蔗糖を含む 0.04 M cacodylate buffer (pH 7.4) で 1 時間後固定を行った (Gordon ら¹²⁾)。

走査型電子顕微鏡用としては後固定後洗浄液中でフォルマリン固定の肝組織片またはシリコンゴム片に胚盤の辺縁部を挟み込むようにして張り付け、エタノール系列で脱水、臨界点乾燥を行い炭素と白金を蒸着 (Hummer, Technics Inc.) して、日立 SSM-II 型走査型電子顕微鏡 (加速電圧 20 kV) で観察した。透過型電子顕微鏡用資料としてはエタノール脱水後 Epon 812 に包埋、酢酸ウラニール、クエン酸鉛による二重染色を施し、日立 HS-8 型電子顕微鏡で観察した。

結 果

定原条期胚の胚盤上葉を走査型電子顕微鏡で観察すると、その構成細胞の表面構造が 3 基本型に大別されることが分かり、それぞれを a, b, c 型とした (Fig. 1 a~c)。

a 型細胞は三角形、台形を示す場合が多く、ほかのものより小形である。表面はほぼ平滑で多少膨隆している。微絨毛はほとんど認められず、孤立線毛を有する場合が多い。細胞境界部には、円蓋状の隆起が孤立した状態や癒合した状態で一列に並んでいる。そのため細胞の輪郭はきわめて明瞭である。この円蓋状の突起は隣接した細胞の突起でできており、その内部には腔が存在する (Fig. 2, Photo 1)。またこの円蓋の頂点に陥凹が存在するものも見られた。a 型細胞は定原条期胚にあってはヘンゼン結節と原条を含む pars pellucida の中央部 (領域 I) (Fig. 3 I) に存在する。

b 型細胞の表面は五角形、六角形を示すものが多い。全体として表面は平坦であるが、細胞内空胞による隆起も見られる。また長短様々な微絨毛が散在し、球状の微突起もきわめてわずかながら認められる。細胞境界には相対的に微絨毛が多い (Photo 2)。a 型細胞に比べて孤立線毛をもつ細胞は少ない。この細胞は pars pellucida の後端部を除き辺縁部 (領域 II) (Fig. 3 II) に存在する。

c 型細胞の表面は平坦で四角形、五角形、六角形などの多角形を示す。きわめて多くの微絨毛を有し、特に細胞境界部には密集している。孤立線毛はほとんど認められない (Photo 3)。この細胞は pars pellucida の後端部と pars opaca の領域 (領域 III) (Fig. 3 III) に見られる。

上記 I, II, III の領域は画然としたものではなく、領域 I と領域 II との境界部では a 型細胞の特徴であ

Fig. 1 Drawings illustrated the surface architecture of 3 basic types of cells
a: The type-a cell which has the mushroom-shaped processes or folds at the cell boundaries and no microvilli. The single ciliated cell is neumerous in this type.
b: The type-b cell which has smaller number of microvilli on the central part of the cell than the cell boundaries. The cell with a single cilium is less than type-a cell.
c: The type-c cell which has a great number of microvilli on the cell surface and at the cell boundaries. A single cilium is not found in this type.

Fig. 2 Horizontal section of the mushroom-shaped processes or folds in type-a cell. $\times 8,000$
Scale bar: $1\mu\text{m}$

る円蓋状の隆起が細胞境界に存在し、同時にb型細胞の特徴である微絨毛が細胞表面や細胞境界部に存在するというa型とb型の両方の特徴的構造を併せ持つ細胞が存在する(Photo 4)。また領域IIと領域IIIとの移行部には微絨毛がきわめて多いc型の細胞でありながら孤立線毛を有するものが認められる。

孤立線毛はb型細胞に比べてa型細胞のほうにより多く存在することは前述したが、同じa型細胞であってもヘンゼン結節の前方部の細胞に孤立線毛の出現頻度が高くなっている。この現象はb型細胞についても同様であり、言い換えると孤立線毛はヘンゼン結節の前方部に多く、そこを中心として周辺に向かい減少し、pars opacaの細胞には認められなくなる。これに対して微絨毛はpars opacaに多く、中央部に向かって減少する傾向を示している。

前原条期胚では中央部の細胞の表面は三角形、四角形、五角形と多彩な形を示し表面が膨隆しているものが多い。わずかな微小突起とともに孤立線毛をもつ細胞が多い。細胞境界部にはa型と同様な隆起が存在するが単なる線状の隆まりとなっているところも見られる(Photo 5)。辺縁部では微絨毛が多く、さらに孤立線毛をもった細胞もある(Photo 6)。

孵卵2時間の胚盤では細胞表面は強く膨隆しておりさらに数多くの小隆起がある。胚盤中央部では辺縁部ほど多くの微絨毛が見られないが細胞境界部に線状の隆まりが認められる(Photo 7, 8)。

Fig. 3 Drawing of the epiblast layer at the definitive primitive streak stage

I: The central area around the Hensen's node. This area is occupied mainly by the type-a cells.

II: The peripheral area of pars pellucida. This area is occupied mainly by the type-b cell.

III: Pars opaca occupied mainly by the type-c cell. Dots on the right side show the distribution of single ciliated cells.

考 察

鶏胚盤を走査型電子顕微鏡で観察するに際して最も留意すべきことは、胚盤を変形させないことはもとより人工産物の混入を極力排除しなければならないという点である。特に胚盤表面には卵黄膜があり、その表面には硬卵白層(firm albumen layer)が接している。孵卵して胚盤の形成が進むと同時にそこに接していた硬卵白は溶融し、外流動卵白(outer fluid layer)と同様の状態になる。一方卵黄膜は線維性の網目構造を持った膜であり、また胚盤上葉は辺縁部で卵黄膜と接合し、中央部では卵黄膜との間に腔を作っていることになる。胚盤を中心とした上記のような局所条件は、特に走査型電子顕微鏡の標本を作るときに十分考慮しておかなければならない。胚盤表面から卵黄顆粒をはじめとしてどれだけ蛋白性の浮遊物を除去できるかということが、標本作成の要点である。

表面構造の局所的な相違は孵卵2時間の胚盤で認められた。すなわち胚盤の中央部は辺縁部に比べて微絨毛が少なく、また孤立線毛をもつ傾向を示しており、st. 1になるとこの傾向は一層顕著になる。ここで相違

の中心となるものは微絨毛のあり方と孤立線毛の存在である。この局所的な分化の始まりを Bancroft and Bellairs¹⁰⁾は st. 2 とし、中央部の細胞には微絨毛が少ないことを述べているが同時に球状突起 (globular projections) と小胞 (vesicles) が多いことを記している。この球状突起は本研究の中ではどの標本についてもほとんど存在しないといえるほどであった。人工産物との区別が困難な構造物というべきであろう。彼らは st. 2, 3, 3+ の胚盤上葉の表面構造として球状突起 (globular projections), 微絨毛のほかに紐状構造物 (threads), 短剣状突起 (daggers), 線毛 (cilia) を記載している。本研究で観察した胚盤では、紐状構造物はきわめてまれに見出されたが隣接する細胞に達するもので彼らの分類の 2 型に属するものと考えられた。この紐状構造物については彼らのほかにも記載しているが⁷⁻⁹⁾、本研究でそれほど著明に現れなかったことは標本作成上の問題であるかもしれない。なお Bellairs and Bancroft¹³⁾は彼らの 1974 年の報告とは別に細胞分裂時の遺残物という考え方を示している。線毛について Bancroft and Bellairs¹⁰⁾は st. 3 の胚盤に、「基底小体をもち通常の微細構造を有する線毛が、すべての細胞ではないが存在する」と述べているにすぎないが本研究では st. 1 ですでに孤立線毛の存在を確認できた。そしてその構造は (9 + 0) であった。この孤立線毛を有する細胞は領域 I, II の細胞であるがその分布状態はヘンゼン結節付近に密度が高く、辺縁部に向かって密度が低くなる (Fig. 3 右半) 傾向を示していた。

本研究で示した a 型細胞に見られる細胞境界部の構造物については Klika and Jelinek⁷⁾は glass-bell-like formations として記載し、細胞間の情報交換のための特殊装置と考えた。Jacob ら⁹⁾は vesicular cell connections と称し、頂点が陥凹した状態のものを bowl-like cell connections と呼び、Klika ら⁷⁾の解釈を受けて、それを合胞体結合 (syncytial connection) と考えている。確かに隣接した細胞からの板状突起が結合して出来た胞状の構造物 (Fig. 2) であるが合胞体を示す所見は得られなかった。成因や機能についてはさらに追及する必要がある。その他の表面構造物自体の意義は種々論議されているがいずれも推論の域を出ない。ただ、孵卵開始後定原条期に至るまでに胚盤上葉に細胞の局所的な形態分化が起こっているといえることができる。本論文ではその細胞の形態を a, b, c という 3 基本型に大別したがその分布域を Rosenquist⁵⁾

が示している Fig. 1 に対照させると a 型細胞は神経管、内胚葉、側板、傍中軸中胚葉、脊索などを構成する予定の領域に存在していることになり、b 型細胞の存在領域は外胚葉と胚表皮を形成する予定領域に相当する。すなわち a 型細胞領域は胚内の器官を構成し、b 型細胞は胚表面に留まる運命を有することが考えられる。また孤立線毛を有する細胞について同様に考察すれば、孤立線毛を有する細胞は胚内に入っていく細胞に多く存在するといえることができる。最後に領域 I, II, III のそれぞれの境界部に a, b, c 各基本型の間の移行型が存在していたことは、胚盤上葉の形態形成運動に応じて表面構造も変化しているものと推定される。

結 論

本論文では孵卵 2 時間から定原条期の鶏胚盤上葉を走査型電子顕微鏡で観察した。鶏胚盤は標本作成に際して特に人工産物を生じやすい材料であることを強調した。観察結果として、

- 1) 定原条期の鶏胚盤上葉を構成する細胞は表面構造の違いによって 3 基本型 (a, b, c) に大別され、その各型の細胞の分布領域は一定していた (領域 I, II, III)。
- 2) 各領域の移行部にはそれぞれ各基本型の移行型の細胞が認められた。
- 3) 定原条期における胚盤上葉細胞の表面構造物としては微絨毛、孤立線毛、細胞境界部における円蓋状隆起物が主であり、球状微突起や紐状構造物はきわめてまれな存在であった。
- 4) 鶏胚盤上葉に見られる局所分化は孵卵 2 時間の胚盤ですでに認められた。

文 献

- 1) Pasteels, J.: Etude sur la gastrulation des Vertébrés méroblastiques. III. Oiseaux. IV. Conclusions générales. Archs. Biol., 48, 381~488, 1937.
- 2) Hunt, T.E.: The origin of entodermal cells from the primitive streak of the chick embryo. Anat. Rec., 68, 449~459, 1937.
- 3) Nicolet, G.: La chronologie d'invagination chez le Poulet; étude à l'aide de la thymidine tritiée. Experientia, 23, 576, 1967.
- 4) Nicolet, G.: Analyse autoradiographique de la localisation des différentes ébauches présomptives dans la ligne primitive de l'embryon de Poulet. J. Embryol. Exp. Morphol., 23, 79~108, 1970.
- 5) Rosenquist, G.C.: A radioautographic study of labeled grafts in the chick blastoderm; Development from primitive-streak stages to stage 12. Contrib. Embryol.,

- 38, 71~110, 1966.
- 6) Spratt, N.T., Jr. : Localization of the prospective neural plate in the early chick blastoderm. *J. Exp. Zool.*, 120, 109~130, 1952.
- 7) Klika, E. and Jelinek, R. : "Glass-bell-like" formations as modified cellular junctions in the developing neural tube and ectoderm of the chick embryo. *Folia Morphol. (Praha)*, 19, 137~146, 1971.
- 8) Backhouse, M. : Observations on the development of the early chick embryo. "Scanning Electron Microscopy" (Johara, O. and Corvin, I. eds.), p. 525~532, Illinois Inst. Technol. Res. Inst., Chicago, 1974.
- 9) Jacob, H.J., Christ, B., Jacob, M. and Bijvank, G.J. : Scanning electron microscope (SEM) studies on the epiblast of young chick embryos. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.*, 143, 205~214, 1974.
- 10) Bancroft, M. and Bellairs, R. : The onset of differentiation in the epiblast of the chick blastoderm (SEM and TEM). *Cell Tiss. Res.*, 155, 399~418, 1974.
- 11) Hamburger, V. and Hamilton, H.L. : A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88, 49~92, 1951.
- 12) Gordon, G.B., Miller, L.R. and Bensch, K.G. : Fixation of tissue culture cells for ultrastructural cytochemistry. *Exp. Cell Res.*, 31, 440~443, 1963.
- 13) Bellairs, R. and Bancroft, M. : Midbodies and beaded threads. *Am. J. Anat.*, 143, 393~398, 1975.

Legends

- Photo 1 The type-a cell in area I. SEM. $\times 3,200$
- Photo 2 The type-b cell in area II. SEM. $\times 1,300$
- Photo 3 The type-c cell in area III. SEM. $\times 1,300$
- Photo 4 The mixed type cells of the type-a and type-b cell in the peripheral region of the area I. SEM. $\times 1,300$
- Photo 5 The type-a cells in the central area of epiblast at the stage 1. SEM. $\times 1,300$
- Photo 6 The mixed type of the type-b and type-c cell in the peripheral region of the stage 1 blastoderm. SEM. $\times 1,300$
- Photo 7 The central area of the younger blastoderm. (2 hours incubation) SEM. $\times 1,300$
The microvilli is less than in the peripheral area Photo 8. The ridge is found at the cell boundaries.
- Photo 8 The peripheral area of the younger blastoderm. (2 hours incubation) SEM. $\times 1,300$

(受付: 1987年12月4日)

Plate (1)