

【研究解説】

両生類を用いた発生と再生の実験手技

Ⅱ. 胚の基本操作と実験発生学の基礎実験

有泉高史

要約

両生類の卵や胚は他の脊椎動物のものとは比べて大きく、体外で発生するため結紮や移植などの外科的な操作を加えやすい。実験操作を加えて正常とは異なる形態をもつ胚に発生させ、その因果関係から発生の仕組みを解析する研究分野が実験発生学である。本稿では、今から100年以上も前にドイツの発生学者Spemannが行った実験発生学の基礎実験の中から、結紮実験とオーガナイザーの移植実験についてその手法と実験結果を解説する。これらの実験には、卵膜等の除去・滅菌・培養など、両生類の初期胚を扱うための基本操作が含まれている。本稿では、高校生や大学生が可能な限り容易かつ正確に実験を再現できるように、筆者自身が行った追試実験の結果や実験方法の改良点も紹介する。

キーワード：両生類胚，オーガナイザー，結紮実験，移植実験，局所生体染色

はじめに

両生類の初期胚は体外（＝水中）で発生するため、実体顕微鏡を使えばその過程を詳しく観察できる。また、受精卵や初期胚の大きさが他の脊椎動物のものよりも大きいので、外科的な実験操作を加えることも可能である。胚を二分したり、胚の一部の組織を切除したり、切除した組織を別の胚に移植したりすれば、それらの胚は正常に発生した胚とは異なった形態を示す。そのような手法を用いて発生の仕組みを理解しようとする発生学の分野が発生機構学（Entwicklungsmechanik, 独）である（Hamburger, 1988）。

1888年にドイツの発生学者Rouxは2細胞期胚の一方の細胞（割球）を熱した針で焼き殺すと、残りの割球から体の半分の構造をもった胚が発生することを示した。前成説を支持するこの実験結果は誤りであるが、胚に実験操作を加えてその因果関係を調べようとする発生機構学の提唱に繋がった重要な実験である。

両生類の初期胚に対してさらに緻密な実験操作を加え、発生機構学を実験発生学へと発展させたのが、同じくドイツの発生学者Spemannである。2細胞期胚を毛髪で縛る結紮実験（1900-1903年）、眼杯による水晶体誘

導の解析（1898-1912年）、予定表皮域と予定神経域との交換移植実験（1915-1918年）などを通して、両生類の発生における誘導現象とその役割を明らかにした（Spemann, 1967）。そして1921年には、門下生のH. Mangoldが予定神経域と思い込んで移植した原口背唇部を中心に、移植を受けた胚の腹部に第二の胚（二次胚）が形成されたのである。これらの一連の実験結果から、Spemannは原口背唇部が胚の形態形成において中心的な役割を果たしていることを確証し、この特別な胚域をオーガナイザー（形成体）と名付けた（Spemann, 1967；浅島ほか, 1977；Mangold, 1982）。

一方、Spemannと同時代に活躍したドイツの発生学者Vogtは、Spemannとは異なるアプローチで発生の仕組みの解明に取り組んでいた。彼は胚の各領域（胚域）が将来どのような組織に分化するのかを調べるため、胚に外科的な操作を加えるのではなく、それぞれの胚域を色素で染め分けて追跡した。この局所生体染色の結果、胚の造形運動（形態形成運動）が明らかになるとともに、それぞれの胚域の予定運命（将来どの組織や器官に分化するか）を初期原腸胚の表面に逆投影した図、すなわち原基分布図が完成したのである（Vogt, 1992）。1924年にSpemannとH. Mangoldによってオーガナイザーとして

働くことが示された原口背唇部は、2年後の1926年に発表されたVogtの初期原腸胚の原基分布図に描かれた脊索前板、脊索、体節の一部を含む予定域と一致する。

本稿では、Spemannが行った実験発生学の基礎的かつ重要な実験の中から、2細胞期胚の結紮実験とオーガナイザーの移植実験の手法と実験結果を解説する。いずれも100年あるいはそれ以上も昔に行われた古典的な実験であるが、動物の体づくりの基本原則を理解する上で重要な実験である。また、これらの実験には両生類の胚に実験操作を加える際に必要となる卵殻や卵膜の除去、胚組織の切除や移植、滅菌処理、培養などの基本操作が含まれている（江口，1980；高梨ほか，1982；中林ほか，1982；武田ほか，1982；角川・江口，1983；浅島，1985）。実験内容は至って単純だが、実際に胚に触れてみると想像以上に手先の器用さや集中力が必要になることがわかる。そのため本稿では、筆者が追試実験を行って再現性を確認するとともに、多少なりとも容易に取り組めるように原法の一部改変を試みている。Vogtが行った局所生体染色法による原基分布図の作成については追試するには至らなかったが、中村治の改良染色法（中村，1992）を紹介するとともに筆者が加えた改良点も解説してみたい。

1. 2細胞期胚の結紮実験

2細胞期の胚を卵割面に沿って髪の毛や糸で縛ると、各々の細胞(割球)を分離して発生させることができる。この方法は結紮法あるいは緊縛法と呼ばれ、今から120年以上も前にドイツの発生学者らによって考案された。結紮実験の材料にはアカハライモリが適している。卵や胚は他の両生類と同様に卵膜(卵黄膜)に包まれ、外側に向かって液状層、ゼリー層の順に覆われている(図2A)。最外層には卵殻膜と呼ばれる丈夫な膜があり、卵は一つずつ楕円体状のカプセルの中に閉じ込められた状態となっている。そのため卵殻のカプセルごと結紮すれば、内部の胚に直接触れることなく割球を分離できる。卵殻の内部は無菌状態に保たれているため、結紮後も汲み置き水の中で発生を続けさせることが可能である。

2細胞期胚と結紮材の準備

アカハライモリの受精卵は水温が18℃の場合、6-7時間後に第一卵割を行って2細胞期胚になる(岡田・市川，1947；市川ほか，1966；岡田，1989)¹⁻³⁾。水温を10℃まで下げれば第一卵割の開始時間を半日後まで遅らせるこ

とができる。産卵用のビニール片に産み付けられた卵を採取する際に(有泉，2016)、卵殻の表面に付着している粘着性の層を取り除いておく。親指と人差し指で卵殻をつまみ、指先で軽く押し出せば粘質層(図2A)が剥ける。強く押し出すとゼリー層が露出して結紮が困難になるので注意する。

胚を縛る材料には毛髪(乳幼児の細くてしなやかなもの)や絹糸をほぐした細い糸が用いられてきたが、電子部品のリレーコイル用のエナメル線(線径0.05 mm, 2UEW 0.05 mm, 協和ハーモネット)が非常に使いやすい(図1)。いずれかの結紮材を選び、ピンセットを使って2回くくって卵殻の短径よりやや大きい輪を作る。輪の両端は0.5-1 cmの長さに切っておく。胚の結紮は実体顕微鏡で覗きながら行う。顕微鏡のステージ板を黒にしておくと胚が見やすく、結紮位置の確認や結紮した胚の観察に都合がよい。

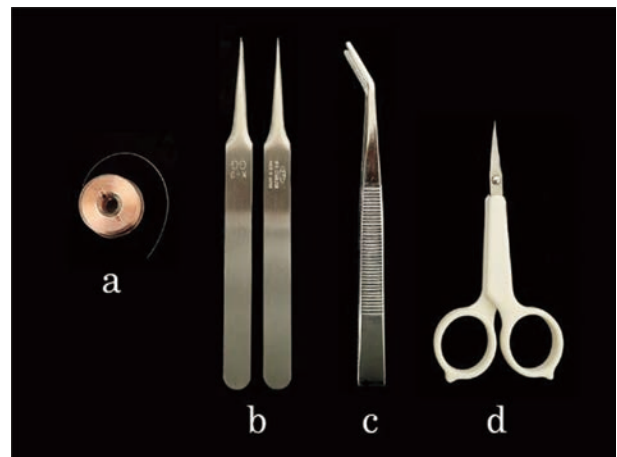


図1 結紮実験に必要な器具

胚の結紮には毛髪やほぐした絹糸などが用いられてきたが、極細のエナメル線(a)が非常に使いやすい。徐々に絞めつけることができ、弾力がないため結び目が緩むことがない。エナメル線をつまんで引くピンセット2本(b)は一般的なものでよく、エナメル線を切断するはさみ(d)も安価なもので構わない。胚の移動には先曲がりピンセット(c)を用いる。卵殻に包まれた状態で胚を結紮するため、実験器具の滅菌は不要である。

結紮の方法と手順

汲み置き水を満たしたシャーレの中に2細胞期胚とエナメル線を入れ、卵殻の中央にエナメル線の輪を掛ける。続いて、エナメル線の輪が卵殻にしっかりとハマる程度まで2本のピンセットを使って引き締める。このとき、卵殻の長軸を正確に二等分する位置に、エナメル線が長軸に対して直角に掛かっていることを確認する。卵殻ごと胚を揺り動かして第一卵割面とエナメル線の輪が完全に

重なったことを確認してさらに引き締める。一方のピンセットの先をシャーレの底に当ててしっかりと固定し、他方のピンセットの先をシャーレの底を滑らせるように引くと上手く結紮できる（図2B）。一気に縛ろうとすると、胚が破裂したり卵膜が破れて中の胚が傷ついたりする。これを防ぐには、数分程度の間隔で数回に分けてエナメル線を引き締め、完全に縛りきる7-8割を目途に結紮を終える。2細胞期の段階で2つの割球を完全に分離することは不可能である。完全に分離したい場合はさらに数回に分けて少しずつエナメル線を引き締め、胞胚期までに縛りきるようにする。

実験結果の解釈

結紮実験は胚を卵殻ごと毛髪などで結ぶだけの極めて単純な実験であるが、実際に行ってみると相当な集中力と忍耐力が必要なことがわかる。無理に縛ろうとすれば胚が破裂し、中途半端な縛り方だと割球が分離されずに正常な一個体に発生してしまう。粘質層を取り除いておくこと、卵殻の長軸の中央を縛ること、第一卵剖面と結紮面が完全に一致していること、時間をかけて徐々に縛ること、2細胞期の時点で完全に縛りきらないことが成功の秘訣である。

2細胞期胚の結紮実験によって二個体（一卵性双生体）が生じることから、イモリ卵が調節卵であることがわか

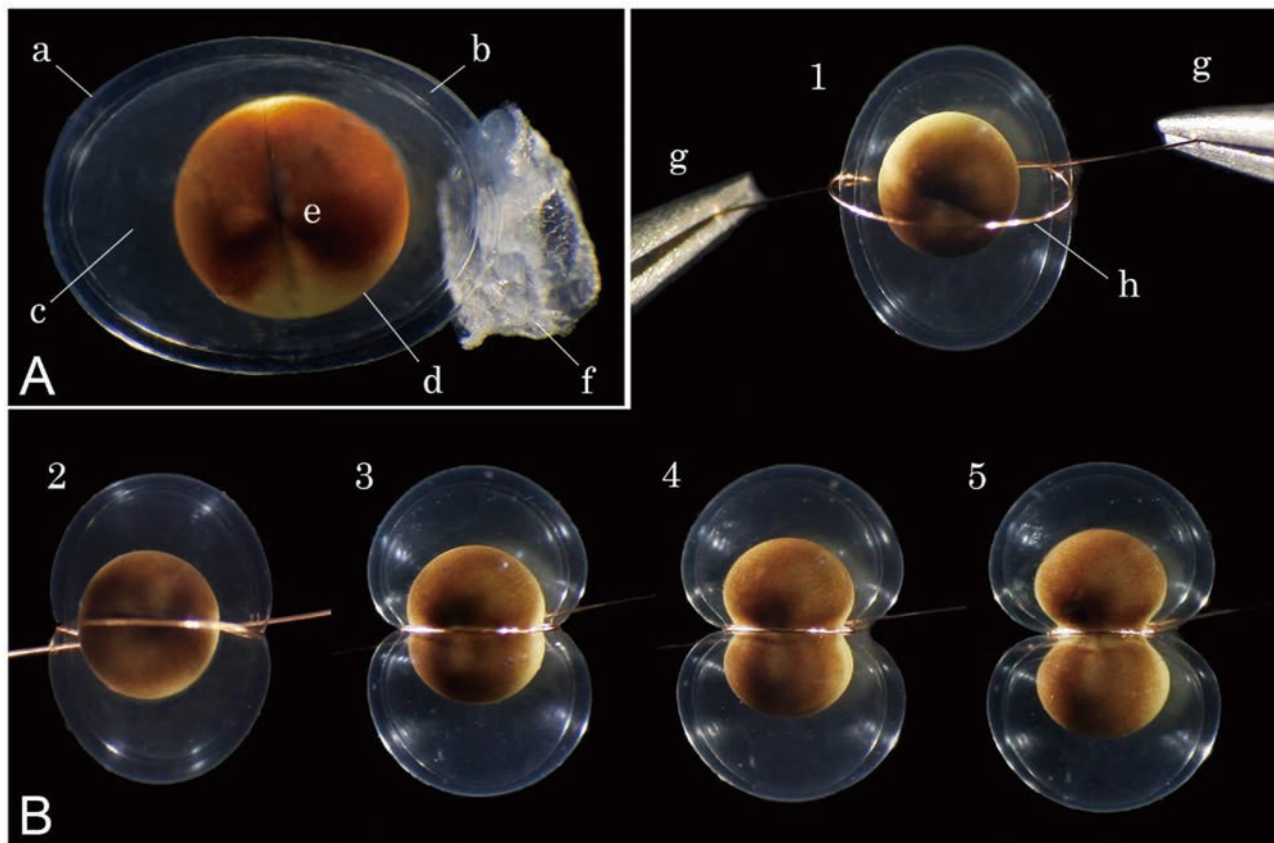


図2 2細胞期胚の結紮手順

- A. アカハライモリの受精卵は1つずつ卵殻に包まれた状態で産み落とされる。卵殻膜は弾力のある丈夫な膜であり、その外側を粘性のある粘質層が覆っている。胚を結紮する前に、粘質層を指先でつまんで取り除いておく。
- B. 実体顕微鏡を覗きながら、汲み置き水を注いだシャーレの中で結紮する。2本のピンセットを使って、エナメル線を2回くくって卵殻の短径よりも少し大きい輪を作る。輪の両端は0.5-1 cmの長さに切っておく。エナメル線の輪を卵殻の中央（長軸を正確に2分する位置）に掛けて（1）、両手のピンセットを静かに両側に引く。この状態のまま、左右のピンセットを使って揺すり、2細胞期胚の第一卵剖面がエナメル線と重なるようにする（2）。エナメル線の輪をわずかに縮めると胚が固定されるので（3）、さらに輪を縮めて2つの割球を分離していく（4）。鉄アレイのような姿になり始めたところを結紮を止める（5）。一気に結紮するのではなく、胚の様子を見ながら数回に分けて少しずつ絞めつけていく。2細胞期の時点で完全に2つの割球に分離するのは不可能である。完全に分離したい場合はさらに数回ほど「増し絞め」して、胞胚期の終わりまでに分離する。結紮した胚は汲み置き水の中で発生させる。
- a. 卵殻膜 b. ゼリー層 c. 液状層 d. 卵膜（胚に密着している） e. 2細胞期胚 f. 除去した粘質層 g. ピンセット h. エナメル線

る。しかし、第一卵割面を結紮したからと言って、必ずしも二個体に発生するとは限らない。一方の割球から一個体が作られ、他方は球状塊（腹片）となる場合も多い。

二個体に発生する場合は、両方の割球が卵割を繰り返して原腸胚期に達すると、結紮面の両側に原口が現れて

陥入が始まる。やがて神経板や神経管が形成されて中軸構造が明確になり、一卵性双生体へと発生していく（図3A）。ゆるく結紮した場合は二個体に完全には分かれず、二つの頭部をもつ双頭胚が形成される（図3B）。これらは結紮した第一卵割面と胚の正中面が一致したためであ

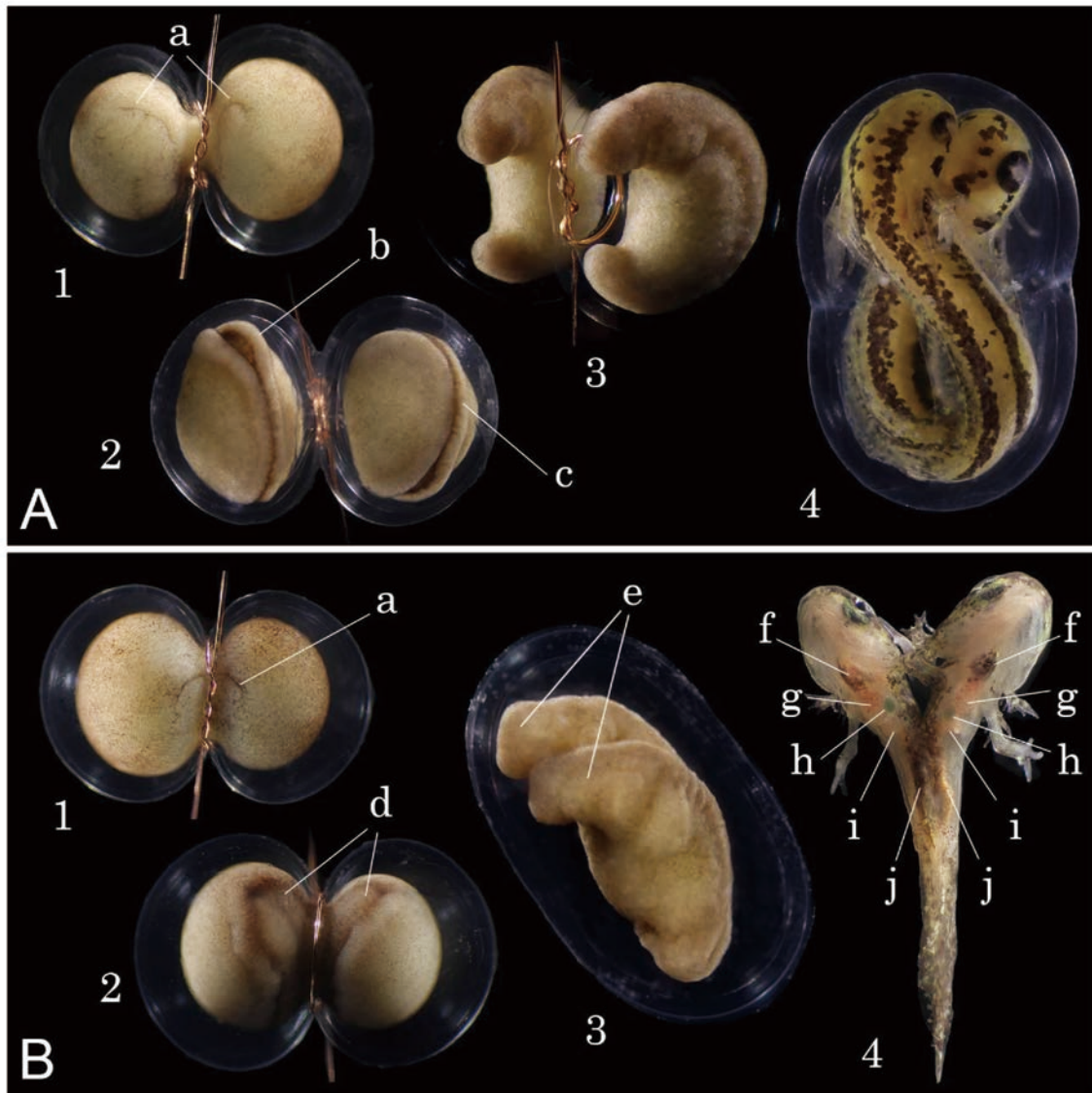


図3 結紮実験の結果（正中結紮）

アカハライモリの場合、第一卵割面は将来の体の正中面と必ずしも一致しない。二個体や双頭胚に発生するのは結紮した胚の約半数であり、このような結果になった結紮を正中結紮という。

A. 強く結紮した場合には原腸胚期のそれぞれの胚に原口が現れ、原腸形成と神経形成を経て二つの個体を作り上げていく。各個体は一つの受精卵から発生した個体に比べて小さいが、体の基本構造は備わっている。

B. 弱く結紮した場合には結紮面をまたいで原口が現れ、二股に分かれて原腸陥入が進行して前方が分岐した神経板を形成する。そのため、胚の前方に二つの頭をもった双頭胚が形成される。双頭胚に発生した個体のうち、およそ半数のものに内臓の配置が鏡像対称となる内臓逆位が認められる。右側（写真は腹側から見ているので左側）の個体の内臓が逆位している。

1. 初期原腸胚 2. 神経胚 3. 尾芽胚 4. 幼生 a. 原口 b. 神経（脳を形成） c. 神経（脊髄を形成） d. 神経板（脳を形成） e. 頭部（双頭） f. 心臓 g. 肝臓 h. 胆嚢 i. 胃 j. 腸

り、このような結果になった結紮を正中結紮と呼ぶ。強い正中結紮で生じた二個体のうち、左側の割球から生じた個体の心臓や消化器官は正常な位置に形成される。ところが右側の割球から生じた個体では、これらの器官は左側個体の鏡像対称となり心臓の巻き方、胃や肝臓の位置が逆になる場合が多い。この現象は内臓逆位と呼ばれている。

結紮して一個体と腹片が生じる場合は、原口が形成された側だけが脊索や脊髄などの中軸器官をもつ正常個体に発生する。原口が現れなかった側（腹片）には中軸器官が形成されず、表皮や血島などが見られる。これは結紮した第一卵割面と胚の正中面が直交したためであり、このような結果になった結紮を背腹結紮または矢状結紮と呼ぶ。

これらの実験結果から、イモリ卵の第一卵割面と将来の体の正中面には明確な対応関係がないことがわかっている (Spemann, 1967)。筆者が246個の2細胞期胚に対して行った追試実験では、正中結紮となったものが139例 (56.5%)、背腹結紮となったものが107例 (43.5%) であった。正中結紮で生じた個体の約半数に消化器官の配置が鏡像対称となる内臓逆位が認められた。

2. 卵殻、ゼリー層および卵膜の除去

結紮実験では卵殻ごと結紮するため、胚に直接触れずに割球を分離できる。しかし、胚に移植や切除などの実験操作（胚操作あるいは胚手術と言う）を加えるには、胚を包んでいる卵殻やゼリー層、卵膜をすべて取り除かなければならない。

イモリ胚の卵殻の除去

卵殻の内部は無菌状態に保たれているが、卵殻の外側はあらかじめ殺菌消毒しておく必要がある。産卵用のビニール片から取り外した卵や胚をまとめてビーカーに入れてできるだけ水を捨てる。続いて、70%エタノールを注いで殺菌消毒するが、エタノール中に1分以上入れておくと卵や胚が死んでしまうので、30-40秒後にエタノールを捨てイモリ用の培養液 (Holtfreter液、以下HSと略す)⁴⁻¹⁾ で数回洗う。

卵殻はHSを満たしたガラスシャーレ (プラスチックシャーレは不可) の中で実体顕微鏡を覗きながら手作業で取り除く。これには、2本の先の細いピンセット (No. 3) を使って卵殻を大きく引き裂いて中の胚をとり出せばよい (図4A)。とは言うもののコツをつかむまでは難易度

の高い操作である。右利きの場合は、左手に持ったピンセットで卵殻を押さえ、右手に持ったピンセットの片方の先を卵殻膜と卵の間にある液状層 (図2A) に突き刺す。次に、左手のピンセットの片方の先も液状層に突き刺し、左右のピンセットの先が液状層に突き刺さった状態にする。左手のピンセットを閉じて、その先が動かないようにしっかりとガラスシャーレの底に押し当てる。右手のピンセットの先を液状層の奥深くまで差し込む。最後に、右手のピンセットの先がガラスシャーレの底から離れないようにして素早く真横に引く。このようにすると、卵殻が一瞬のうちに大きく裂けて中の胚が飛び出してくる。ゼリー層は卵殻膜とともに取り除かれる。卵殻の裂け目が小さいと胚が無理に押し出され、大きく変形して死んでしまう。ピンセットの代わりに、鋭利なメスや有柄針、ウェッケル剪刀なども利用できるが (浅島, 1985; Asashima et al., 1989)、いずれの道具を用いる場合も卵殻に大きな裂け目を素早く作ることが成功の秘訣である。

ピンセットでうまく卵殻を除去できない場合や、一度に多数の胚の卵殻を除去しなければならない場合は、チオグリコール酸ナトリウム溶液を使って卵殻膜とゼリー層を溶解する方法もある (図4B)。pHを調整せずにオートクレーブ滅菌 (121°C, 20分) したHSに、チオグリコール酸ナトリウムを1% (w/v) となるように溶かす。この溶液に対して、卵殻膜とゼリー層を除去する直前に1Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下し、pH7.8前後に調整したものが脱ゼリー液である⁴⁻³⁾。脱ゼリー液のpHはHSに加えておいたフェノールレッドの色調で判断する。

70%エタノールで殺菌消毒した卵殻に入った状態の卵や胚を、先曲がりピンセットを使って脱ゼリー液の中に投入していく。しばらくすると卵殻が溶け始め、次々に中の卵や胚が飛び出してくる。先曲がりピペット²⁾ を使って、飛び出した卵や胚を別のシャーレに用意したHSへ順次移していく。最後にHSを2-3回交換して混入した脱ゼリー液を完全に取り除く。以上の操作によって卵殻膜とゼリー層が取り除かれ、卵や胚は卵膜だけで包まれた状態となる。

チオグリコール酸ナトリウム溶液によるゼリー層の除去

チオグリコール酸ナトリウムを用いた脱ゼリー液は、アカハライモリに限らず多くの両生類の卵や胚を包んでいるゼリー層、卵殻、卵囊、卵紐 (らんちゅう) を溶かすことができる。筆者は有尾類のイベリアトゲイモリ、

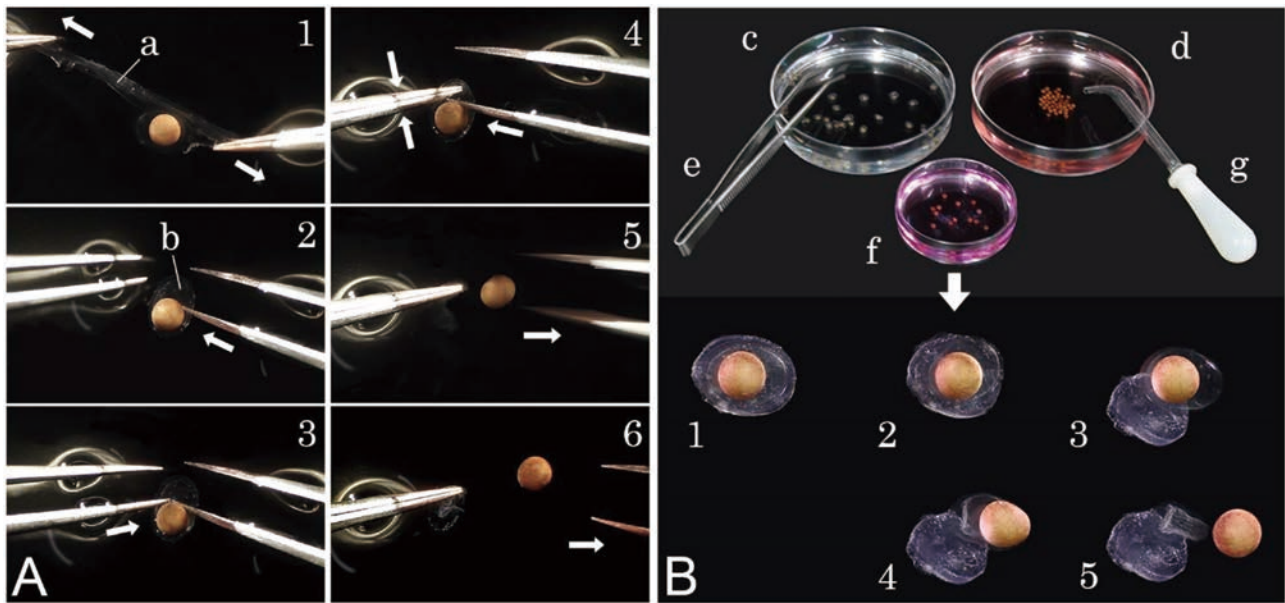


図4 イモリ胚の卵殻の除去

- A. ピンセットによる卵殻の開裂法. 70%エタノールで卵殻表面を殺菌消毒したイモリ胚をHSを満したガラスシャーレの中に入れる. 先の尖ったピンセット (No. 3) を両手に1本ずつ持ち, 右利きの人は右手に持ったピンセットで卵殻を開裂する. 初めに, 左右のピンセットを使って卵殻の表面にある粘質層を剥ぎ取る (1). 次に, 左手のピンセットで卵殻を押さえ, 右手のピンセットの片方の先を液状層に突き刺す (2). 左手のピンセットの先もそのすぐ近くに突き刺す (3). 左手のピンセットを閉じて, 右手のピンセットの先を液状層の奥深くまで差し込む (4). 左手のピンセットが動かないようにシャーレの底に押し当てながら, 右手のピンセットの先がシャーレの底から離れないように素早く横に引く (5). 卵殻を大きく切り裂くことができれば, 中から胚が飛び出してくる (6). 卵殻が十分に開裂できていないと胚が大きく変形したり破裂したりする. ゼリー層は卵殻膜とともに取り除かれる.
- B. チオグリコール酸ナトリウム溶液による卵殻膜とゼリー層の溶解法. 70%エタノールで卵殻表面を殺菌消毒したイモリ胚を, 先曲がりピンセットを使って脱ゼリー液 (チオグリコール酸ナトリウム溶液) の中に投入する (1). 粘質層と卵殻膜が徐々に溶け出し (2), 液状層に包まれた状態で胚が飛び出してくる (3). 続いて, 液状層を包んでいた膜も溶けて中から胚が飛び出してくる (4). 胚の表面には透明で薄い卵膜が密着しているが (5), こちらは2本の精密ピンセットを使って除去する (図6参照). 卵殻膜とゼリー層が溶解して胚が飛び出してくるまでの所要時間はおおよそ1分である. HSを満したシャーレに先曲がりピペットを使って胚を移し, HSを数回交換して混入した脱ゼリー液を完全に除去する.
- a. 粘質層 b. 液状層 c. 卵殻表面を殺菌消毒した胚 d. 卵殻が取り除かれた胚 e. 先曲がりピンセット f. 脱ゼリー液 (チオグリコール酸ナトリウム溶液) g. 先曲がりピペット

アホロートル, トウホクサンショウウオ, クロサンショウウオ, トウキョウサンショウウオについてその効果を確認している. イベリアトゲイモリやアホロートルでは, ゼリー層に覆われた卵が直接産み落とされるので, それらを回収して少量ずつシャーレに取り分ける. 日本産の小型のサンショウウオ類では, 左右の卵巣から産みだされた卵が数十個ずつ袋状の卵囊に入っている. 卵囊ははさみで切り開き, 指先やピンセットを使ってゼリーの付いた卵をシャーレに取り出す. 続いて, 脱ゼリー液 (pH7.8前後)⁴⁻³⁾ を注ぎ, シャーレ内の液を時々攪拌してゼリー層を完全に溶かす. HSを満した別のシャーレに卵や胚を先曲がりピペットを使って回収し, HSを2-3回交換して混入した脱ゼリー液を取り除く. 以上の操作によって卵膜に包まれた卵が得られる.

無尾類については, ヒキガエル卵やアフリカツメガエ

ル卵のゼリー層を溶解できることを確認している. ヒキガエルの場合, 卵は紐状の卵紐の中に入っている. はさみで短く切った卵紐を脱ゼリー液 (pH7.8前後)⁴⁻³⁾ に入れると, 10分ほどで卵紐とゼリー層を溶かすことができる. アフリカツメガエルの場合は短時間でゼリー層を除去できるため, 迅速に取り扱う必要がある初期の胚 (受精卵~8細胞期頃) のゼリー層の除去に適している. なお, アカガエルやヤマアカガエルの卵のゼリー層はチオグリコール酸ナトリウム溶液では溶かすことができない.

システイン塩酸溶液によるゼリー層の除去

アフリカツメガエルのゼリー層の除去にはシステイン塩酸溶液も脱ゼリー液として利用できる (Sive et al., 2000; Ariizumi et al., 2017). L-システイン塩酸塩を4.5% (w/v) となるようにツメガエル用の培養液 (Steinberg 液,

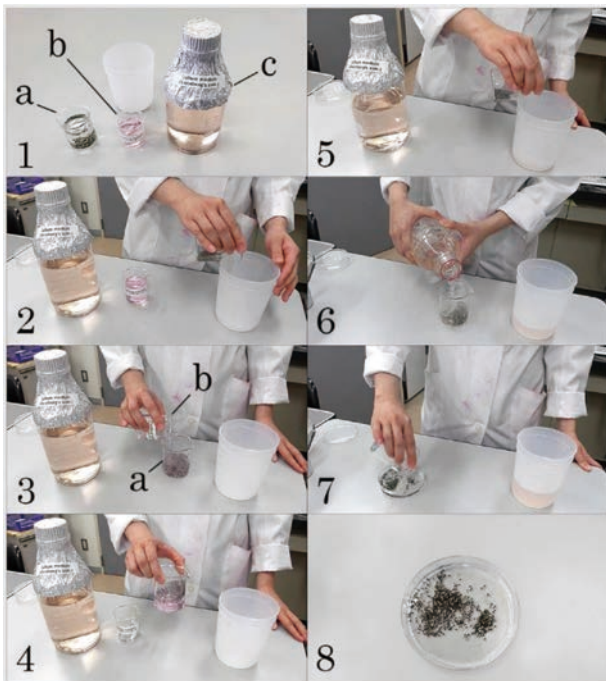


図5 ツメガエル胚のゼリー層の除去

ゼリー層に包まれたツメガエル胚をピーカーに入れ (a)、脱ゼリー液 (b) とSS (c) を用意する (1)。水をできるだけ捨てて (2)、脱ゼリー液を注ぐ (3)。ピーカーを軽く揺すりながら、ゼリー層の溶解を促すと (4)、5分程度でゼリー層が完全に溶ける。ゼリー層が除去されて卵どうしが密着した状態になったことを確認して脱ゼリー液を捨てる (5)。SSを静かに注ぎ、10回ほど溶液を交換することで脱ゼリー液を完全に取り除く (6)。ディスポーザブルの滅菌シャーレなどに移す (7)。胚どうしの間に隙間がないことから、ゼリー層が除去されたことが肉眼でも確認できる (8)。

以下SSと略す)⁴⁻²⁾に溶かして、10Nの水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.4前後に調整する。この脱ゼリー液⁴⁻⁴⁾はチオグリコール酸ナトリウム溶液よりも穏やかにゼリー層を除去することができる (図5)。

ゼリー層が付いたツメガエル胚 (Nieuwkoop and Faber, 1994)¹⁻²⁾をピーカーに移して水を捨て、30-50 mlの脱ゼリー液を注ぐ。ピーカーを数分間、静かにゆすり続けるとゼリー層が溶け出す。それまで胚の周囲にあったゼリー層が失われ、胚どうしが隙間なく接するようになる。そのような状態が確認できたら脱ゼリー液を捨て、SSで繰り返し10回程度洗う。脱ゼリー液で胚を処理しすぎると、卵膜まで溶けて胚が壊れるので注意する。また、SSはピーカーの壁を伝わらせて静かに注ぐように心がける。

精密ピンセットによる卵膜の除去

胚に外科的な操作を加える際には、胚の表面に密着し

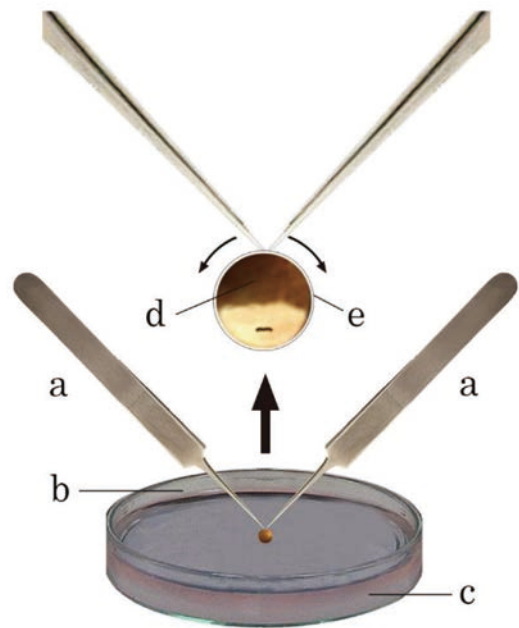


図6 精密ピンセットによる卵膜の除去

HSやSSを満たした手術皿にゼリー層を除去した胚を入れる。両手に持った精密ピンセットで卵膜をつまみ、左右に引き裂いて卵膜を除去する。無傷のまま胚を取り出すのは難しいので、傷ついても実験に影響が出ない部分をつまむ。図のように動物極付近から卵膜を引き裂いたときに傷 (穴) が生じた場合は、胞胚腔への移植実験の際に受容胚として用いることができる。また、動物極付近が傷ついた胚は、原口背唇部を切り出す際の供与胚にもなる。

ている透明な卵膜も取り除く必要がある (図6)。実体顕微鏡を覗きながら、ピンセットで胚を転がして原口の有無や陥入の進み具合を確認し、目的の発生段階¹⁾にある胚を選び出す。先曲がりピペット使ってHSまたはSSを満たした手術皿 (3%の寒天を底に敷いたシャーレ)に移す。卵膜は2本の先の鋭い精密ピンセット (No. 5) を使って手作業で取り除く (Ariizumi et al., 2017)。一方のピンセットで卵膜をつまみ、他方のピンセットですぐ隣の部分をつまむ。それぞれのピンセットを左右に引くようにして卵膜を破り取る。このとき胚が傷つくので (無傷で卵膜を取り除くには練習が必要)、卵膜をつまむ位置は移植実験などに支障がない場所を選ぶ。卵膜を取り除くとそれまで球形だった胚は扁平になる。

3. オーガナイザーの移植実験

両生類胚では、胞胚期を過ぎると植物半球の背側部分に色素が集まり始める。やがて付近の細胞が胚の内部に向かって陥入を始め、原口が形成される。原口の上方が

原口背唇部であり，原基分布図の脊索や脊索前板の予定域に相当する．この部分は原腸胚の間，原口を通して陥入を続け，原腸形成とともに原腸の天井部を前方へ進んでいく．薄く広がりながら到達した部分には頭部，それに続く伸長した部分には胴と尾が形づくられる．原口背唇部は予定運命にしたがって脊索や脊索前板に分化するとともに，頭部では前脳を，胴尾部では後脳から脊髄へと続く中枢神経系を誘導する．このように，原口背唇部は自律分化能と著しい誘導能を併せもち，体づくりの中心的な役割を果たすため「オーガナイザー（形成体）」

と呼ばれる（Spemann, 1967；浅島ほか，1977）．

初期原腸胚からオーガナイザー域を切り出して，別の初期原腸胚の腹側や胞胚腔の中に移植すると，腹部にもう一つの体（二次胚）をもつ胚に発生する．このことからオーガナイザーは体づくりの中心として働くことがわかる．ただし，オーガナイザー域と他の胚域との間には境界線が引かれているわけではない．したがってオーガナイザーの移植実験では，胚から切り出す移植片の大きさによって，誘導される二次胚の構造や大きさなどに違いが生じる．また，移植する場所や移植する時期などによっても異なった結果が得られる．ここではイモリ胚を用いたオーガナイザーの移植実験について，移植片を原口が生じる背側域と反対の腹側域に移植する「移植法」と，胞胚腔の中に挿入移植する「挿入法」の手順と実験結果を解説する（図7）．

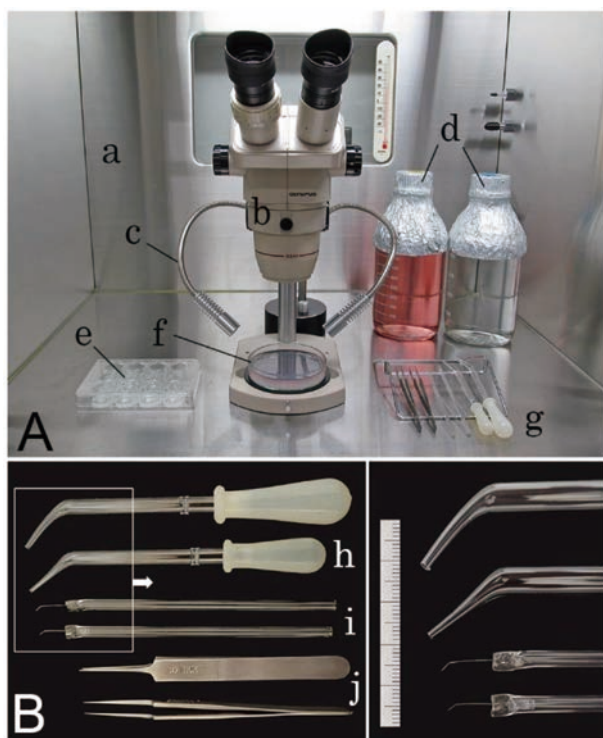


図7 オーガナイザーの移植実験に必要な器具

- A. 移植実験は可能な限りクリーンベンチ内で行うが，実体顕微鏡を使うためクリーンベンチの扉は大きく開けなければならない（プロアー運転を行う）．3%の寒天を薄く敷いたガラスシャーレにHSを注ぎ入れ，その中でピンセット，タングステン針，先曲がりピペットを使って移植手術を行う．寒天シャーレはあらかじめオートクレーブ滅菌しておく．移植した胚は，3%の寒天を薄く敷いた12穴または24穴培養プレートで発生させる．培養プレートに入れる培養液はHSを滅菌水で5-10倍に希釈したものをを用いる．
- B. 卵膜を除去するための精密ピンセット，原口背唇部を切り出して移植するためのタングステン針，移植片や胚を運ぶための先曲がりピペットを用意する．これらの手術用具一式は乾熱滅菌しておく．
- a. クリーンベンチ b. 実体顕微鏡 c. LED光源 d. HSと滅菌水 e. 培養プレート f. 手術皿 g. 手術用具一式 h. 先曲がりピペット大小 i. タングステン針2本 j. 精密ピンセット (No. 5) 2本 目盛：1mm

移植法 Transplantation method

卵殻を除去したイモリの初期原腸胚（発生段階第11期または第12期a）¹⁻¹⁾を二つ用意する．一方は原口背唇部の移植片を切り出す供与胚 donor，他方は移植片を受け取る受容胚 recipient とする．寒天を薄く敷いたシャーレをHSで満たし，供与胚と受容胚を並べる．精密ピンセット2本を使って卵膜を取り除くが，受容胚はできるだけ傷つけないように注意する．卵膜を除去して球状から扁平状になった二つの胚を，どちらも植物極が上を向くように置く（図8A）．

供与胚から原口背唇部を四角く切り出す．まず，原口の両側の口角に当たる部分に，原口と直角にタングステン針³⁾を押し当てて，原口背唇部の両側を切断する．次に，原口背唇部の上限を決めて，原口と平行になるようにタングステン針を押し当てて切断する．最後に，原口の部分を切断するが，できるだけ原口付近の細胞を傷つけないように注意する．

切り出した原口背唇部の移植片を，上下・左右の方向を見失わないように注意しながら，タングステン針を使って受容胚の近くに運ぶ．次に，移植片と同等の大きさとなるように受容胚の腹方（植物極をはさんで原口と対称となる部分）を切り取る．移植は2本のタングステン針を使って行うが，受容胚の腹側の切除部分に移植片を無理に埋めるのではなく，向きに注意しながら移植片をはめ込むように行う．

移植片が生着するまで15分ほど静置してから，先曲がりピペットを使って慎重に胚を培養プレートに移して20-22℃で培養する．12穴または24穴の培養プレートに

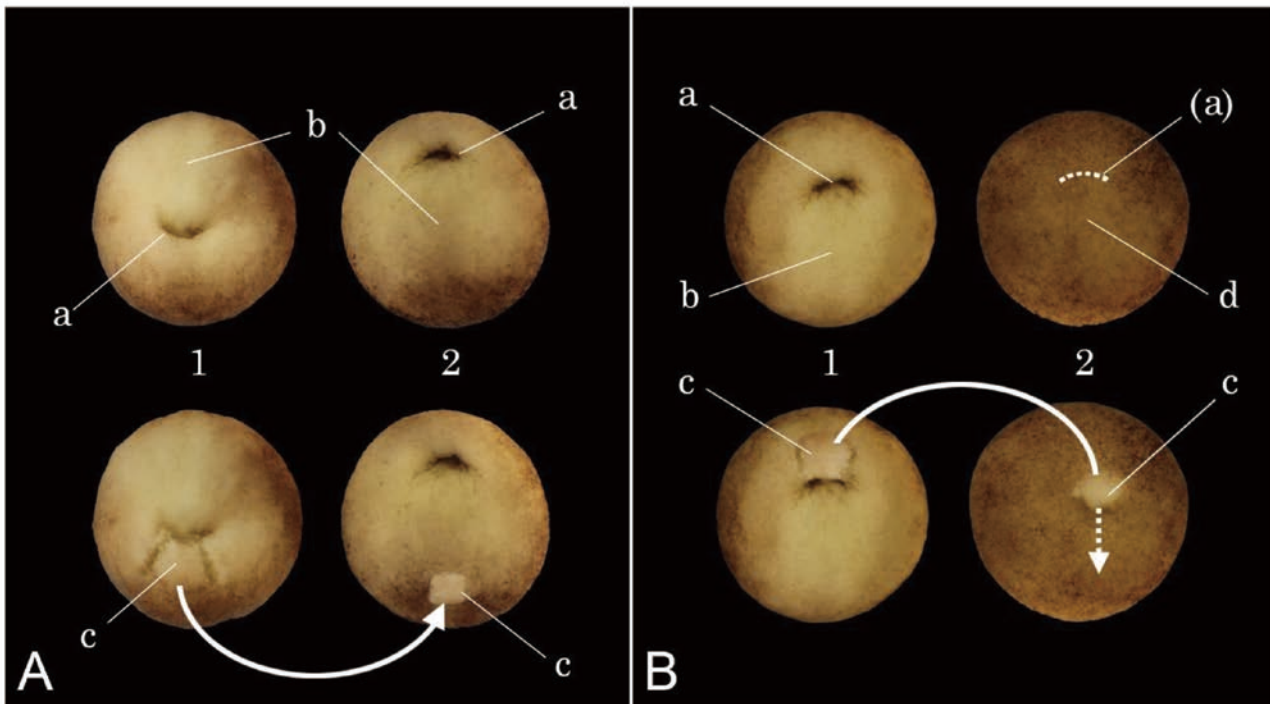


図8 オーガナイザーの移植実験の方法と手順

- A. 移植法. 初期原腸胚を2つ用意し, 3%の寒天を敷いてHSを満したシャーレ(手術皿)に入れる. 2本の精密ピンセットを使って卵膜を除去し, 扁平になった胚を植物極が上を向くように並べる. タングステン針を使って供与胚から原口背唇部を四角く切り出す. 針を上から押し付けると切断できるが, 切断面から細胞が脱落するので少し大きめに切り出してからトリミングする. また, 原口付近の細胞はできる限り傷つけないようにする. 前後, 左右の方向を見失わないように注意しながら, タングステン針や先曲がりピペットを使って移植片を受容胚の隣に運ぶ. 受容胚の腹部(植物極をはさんで原口と対称の位置)を切り取り, その場所に移植片の方向を間違えないようにはめ込む. 移植した胚は15分ほど静置してから, 先曲がりピペットを使って3%の寒天を敷いた培養プレートに移す. 胚の向きは植物半球が上を向いていても構わない. 培養プレートに入れる培養液は滅菌水で5-10倍に希釈したHSとする. 温度を20-22℃に保ったインキュベーター内で発生させる.
- B. 挿入法. 卵膜を除去した初期原腸胚を2つ用意して手術皿に並べる. 供与胚は植物極が, 受容胚は動物極が上を向くように置く. 移植法と同様にタングステン針を使って原口背唇部を四角く切り出して受容胚の隣に運ぶ. タングステン針を使って, 移植片がかるうじて通れるくらいの穴(裂け目)を受容胚の動物極付近に開ける. この穴から移植片を胞胚腔の中に押し込むが, 受容胚の原口と反対側(胞胚腔の腹側)に位置するように挿入する(破線矢印). 移植した胚は植物極が上を向くように裏返し, 15分ほど静置してから培養プレートに移して発生させる. 胚の向きは, 動物半球が上でも植物半球が上でも構わない.
1. 供与胚(初期原腸胚) 2. 受容胚(初期原腸胚) a. 原口 b. 植物極 c. 原口背唇部の移植片 d. 動物極

はあらかじめ滅菌した3%の寒天を薄く敷き, 5-10倍に希釈したHSを入れておく. 移植片を受け取った受容胚は約1日かけて原腸形成を行い, さらに1日かけて神経形成を行う. 移植が成功した場合には神経胚の腹部に第二の神経板や神経管が形成され, 移植後およそ2週間で腹部に二次胚をもつ幼生となる(図9A).

挿入法 Implantation method・Einsteck method

移植法と同様に, 卵殻を除去したイモリの初期原腸胚をHSで満した寒天シャーレに並べる. 受容胚の卵膜は動物極付近を精密ピンセットでつまんで取り除くが, その際に胞胚腔の天井部が多少傷ついても構わない(図8B).

受容胚は動物極が上を向くように置く. 移植法と同様に供与胚から切り出した原口背唇部の移植片を受容胚の近くに運ぶ. タングステン針を使って移植片を受容胚の動物極付近(胞胚腔の天井中央部)に開けた小さな穴から胞胚腔の中に挿入する. このとき, 針先で移植片を傷つけないように注意しながら, 移植片を胞胚腔の腹側(原口と反対側)へ押し込むようにする.

移植を受けた受容胚を植物極が上を向くように裏返して15分ほど静置する. 先曲がりピペットを使って受容胚を3%の寒天でコートした培養プレートに移し, 5-10倍に希釈したHS中で培養する. 胞胚腔内の移植片は受容胚の原腸形成に伴って胚の腹方へ移動し, その場所で二次胚を誘導する(図9B).

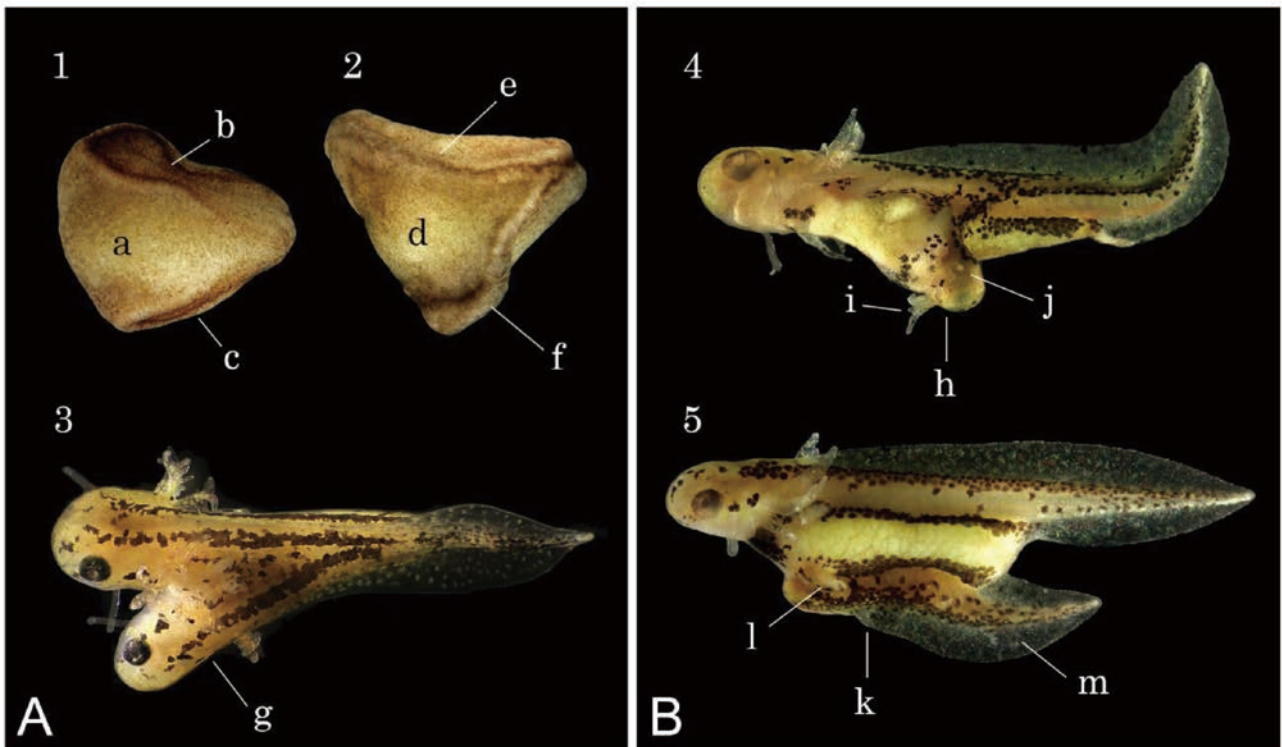


図9 オーガナイザーの移植実験の結果

- A. 移植法によって生じた二次胚。神経胚の腹部に第二の神経板が形成される (1)。やがて神経板が閉じて、脳から脊髓に続く神経管が形成される (2)。移植から約2週間が経過した幼生の腹部には、頭部から胴尾部の構造をもった二次胚が形成されている (3)。
- B. 挿入法によって生じた二種類の二次胚。初期原腸胚の原口背唇部を受容胚の胞胚腔に挿入すると、受容胚の腹部には頭部の構造をもつ二次胚が形成される (4)。一方、後期原腸胚の原口背唇部を受容胚の胞胚腔に移植した場合には、胴尾の構造をもつ二次胚が形成される (5)。誘導される二次胚の形態には、移植した原口背唇部のもつ誘導特異性が関与している (本文参照)。
- a. 神経胚 b. 受容胚の神経板 c. 誘導された第二の神経板 d. 尾芽胚 e. 受容胚の神経管 f. 誘導された第二の神経管 g. 頭部から胴尾部までの構造をもつ二次胚 h. 頭部の構造をもつ二次胚 i. 鰓とパランサー j. 眼 k. 胴尾部の構造をもつ二次胚 l. 前肢 m. 尾鰭

実験結果の解釈

誘導される二次胚の構造は、オーガナイザーを供与した胚の発生段階に依存する。初期原腸胚の原口背唇部は頭部オーガナイザーとして働くが、はじめは胴尾部を誘導する活性をもっている。挿入法では、受容胚の原腸形成が進むと胞胚腔は縮小しながら腹部に移動していく。そのため、胞胚腔に移植された原口背唇部が腹部で作用するまでには時間が経過しており、その間に初期原腸胚の原口背唇部の誘導活性が胴尾部誘導から頭部誘導へと変化するのである。この現象は誘導特異性の変化と呼ばれている (高谷, 1977)。その結果、初期原腸胚の原口背唇部は頭部オーガナイザーとして働き、受容胚の腹部に頭部の構造をもつ二次胚を誘導する (図9B上)。一方、後期原腸胚の原口背唇部は胴尾部を誘導する活性をもち、その誘導特異性は変化しない。そのため、胞胚腔に移植された移植片は胴尾部オーガナイザーとして働き、受容胚の腹部に胴尾の構造をもつ二次胚を誘導する (図

9B下)。

挿入法では、胞胚腔に移植された原口背唇部は受容胚の原腸形成に伴って腹方に運ばれて二次胚を誘導する。そのため、挿入法はオーガナイザーの誘導活性を調べる以外にも、固体状の誘導物質 (他の胚組織、培養細胞、成体の組織片や器官片など) の活性を調べるためにも利用される。

4. 局所生体染色

後期胞胚や初期原腸胚の表面を生体に無害な色素でスポット状に染めると、染色された部分 (胚域) が原腸形成に伴ってどのように移動し、どのような組織や器官に分化するかを追跡することができる。これがVogtによって考案された局所生体染色法である。追跡結果をもとにすれば、それぞれの胚域が将来どのような組織や器官に分化するかを明らかにできる。各胚域の予定運命を後期

胞胚や初期原腸胚の表面に逆投影した図が原基分布図(予定運命図)である (Vogt, 1992).

Vogtの局所生体染色法では、ナイルブルー、ニュートラルレッド、ピスマルクブラウンなどの色素溶液に寒天を浸し、色素を吸着させた色素寒天を用意する。続いて、パラフィンを敷いた手術皿に胞胚や原腸胚が収まる程度の半球状の窪みを作り、手術皿にはHSを満たしておく。窪みの中に複数の色素寒天片を並べ、その上から染色する胚を運び入れると、胚自身の重みで色素寒天が押さえつけられて胚表面に色素が染み込む。胚の重みだけで不足な場合はガラス片や錫箔を胚の上に載せて押さえつける。このようにVogtの原法は操作が複雑なため、初心者には再現することが極めて難しい。以下に述べる局所生体染色の方法と手順は中村治が改良した染色法(中村, 1992)に基づいている。

胚と色素寒天の準備

材料には卵殻を除去したイモリ胚を用いる。色素寒天の作製には、市販の食用寒天(角寒天)を用いる。角寒天の芯の部分から小さな塊をピンセットでむしり取り、ナイルブルーやニュートラルレッドの1%水溶液に1日-数日漬け込む。これを周囲に色素が流れ出なくなるまで流水で洗い、十分に乾燥させて色素寒天を完成させる。メスを使って微小片(0.5 mm角以下)を多数切り出しておく。

胚の染色方法

中村治の改良染色法(中村, 1992)は、染色する部分が上を向くように胚を置き、色素寒天の微小片を載せていく点がVogtの原法と異なる。また、Vogtや中村はパラフィンを敷いた手術皿を用いたが、3%の寒天を敷いた手術皿でも代用できる。パスツールピペットの先端をガスバーナーであぶって直径約2.5 mmのガラス球を作製する。ガラス球を熱して寒天に軽く押し当て、胚が収まる半球状の窪みを複数作っておく(図10A)。先曲がりピペットを使って胚(卵膜は除去しない)を手術皿の窪みに入れ、パスツールピペットを使ってHSをできるだけ取り除く。続いて、染色する部分が上を向くように窪みの中でヘアループ(図10B)を使って胚を回転させる。濾紙の小片にHSを吸わせると胚が動かなくなるので、あらかじめ切り出しておいた色素寒天の微小片を素早く胚の上に載せていく。精密ピンセット(No. 5)の一方の先端に付着させた色素寒天片を卵膜の表面に貼り付けると、寒天片がわずかな水分を吸って膨張して卵膜

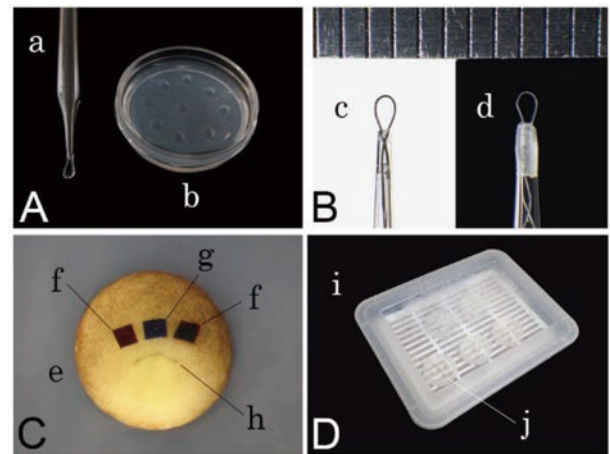


図10 局所生体染色に必要な器具

- A. シャーレの底に3%の寒天を敷いたものを手術皿(染色皿)とする。パスツールピペットの先端をガスバーナーであぶって作ったガラス球(直径約2.5 mm)を熱して寒天に押し当て、胚が半分ほど入る窪みを複数作っておく。
 B. 寒天の窪みに入れた胚はヘアループやナイロンループを使って、染色する面が上を向くように回転させる。これらの器具はパスツールピペットの先をガスバーナーであぶって細く引き伸ばし、毛髪やナイロン繊維をループ状に差し込んで瞬間接着剤やパラフィンで固定して作製する。
 C. 胚の周囲のHSを濾紙の小片で吸い取り、色素寒天の微小片(0.5 mm角以下)をピンセットの先を使って素早く貼り付けていく。
 D. 胚の表面が乾燥しないように加湿箱の中で20-40分ほど染色する。加湿箱の底にペーパータオルを敷いて湯を注ぎ、湯気を充満させておく。
 a. ガラス球 b. 手術皿(染色皿) c. ヘアループ d. ナイロンループ e. 初期原腸胚 f. 色素寒天片(ニュートラルレッド) g. 色素寒天片(ナイルブルー) h. 原口 i. 加湿箱 j. 染色中の胚が入った手術皿 目盛: 1 mm

に密着する(図10C)。胚の乾燥を防ぐために、あらかじめ少量の湯を入れて湯気を充満させておいた加湿箱(図10D)の中に手術皿を入れる。20-40分ほど経つと色素が寒天片から胚表面に移ってスポット状に色がつく。先曲がりピペットにHSを入れて胚の上から静かに注いでいくと、色素寒天片が洗い流されて染色された胚が得られる。

染色した胚の発生と実験結果の解釈

染色した初期原腸胚を18℃に保ってHSの中で発生させると、約1日かけて原腸形成を行う。例えば、原口背唇部をナイルブルーで青く染色し、その両脇の胚域をニュートラルレッドで赤く染め分けてみると(図11A)、原腸形成が進んで卵黄栓が形成されるとともに染色域が胚の内部へ陥入していく(図11B)。翌日には神経板が形成されるが、陥入した原口背唇部が神経板の

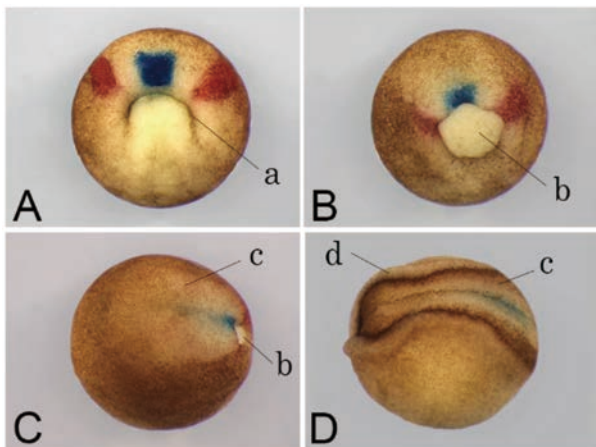


図11 胚の形態形成運動に伴う染色した胚域の移動

- A. 初期原腸胚の原口背唇部をニールブルーで青く、その両脇をニュートラルレッドで赤く染色した。写真の胚は染色後に陥入がやや進んだものである。
- B. 中期原腸胚では形態形成運動（原腸陥入）に伴って、3か所の染色域が胚の内部へ陥入していく様子が見られる。
- C. 初期の神経胚では神経板の中央に薄い青色の筋が認められる。これは陥入して神経板の直下で前後に伸びる原口背唇部である。
- D. 神経褶が隆起して神経板が閉じ始める時期にも陥入した原口背唇部の青い筋は確認できるが、胚の内部に移動した赤色の染色域は外からは確認できない。
- a. 原口 b. 卵黄栓 c. 神経板 d. 神経褶

直下で伸長している様子が青い筋として観察できる（図11C）。やがて神経板が閉じるとともに青色の染色域は胚の内部に隠れていく（図11D）。なお、赤く染めた原口背唇部の両脇の胚域は陥入後には胚の外から確認できない。

発生が進んで染色域が胚の外から確認できなくなったら、中性ホルマリン（10%中性緩衝ホルマリンまたは4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液）で胚を固定し、実体顕微鏡下で胚の断面を観察する。どのような組織や器官に分化したかは実体顕微鏡レベルで十分に確認できるが、さらに詳細に観察するためには組織切片標本を作製する。ただし、脱水に用いるエタノールで色素が溶出してしまうため、パラフィン切片ではなく凍結切片などを作製しなければならない。

染色した胚域の移動を注意深く追跡するとともに、各胚域が行なう形態形成運動（巻き込み・伸長・覆いかぶせ）を経時的に観察する。正確な追跡結果を得るためには、一度に複数の胚域を染色せず、追跡する胚域を一箇所と決めて繰り返し実験を行うべきである（図12A）。これは染色やその操作による胚のダメージを最小限にして、胚を正常に発生させるためにも重要である。参考と

して、中村治が改良生体染色法を用いて完成させたアカハライモリの初期原腸胚の原基分布図を図12Bに示す。

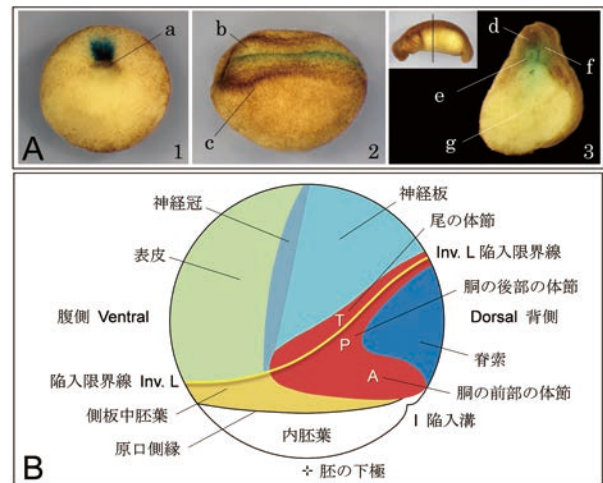


図12 初期原腸胚の染色域の追跡と原基分布図の作成

- A. 初期原腸胚の原口背唇部をニールブルーで青く染色して（1）、尾芽胚期まで追跡する。神経胚では神経板直下で胚の前後に伸びる1本の筋として認められ（2）、ホルマリン固定した尾芽胚の横断面では脊索に分化していることが確認できる（3）。
- B. 原腸胚の初期に染色した胚域を追跡することで、各胚域の発生運命を初期原腸胚に逆投影した図が描ける。図は中村治が1938年に発表したイモリの初期原腸胚の原基分布図をトレースして色分けしたものである。
- a. 原口 b. 神経板 c. 神経褶 d. 神経管 e. 脊索 f. 体節 g. 内胚葉

おわりに

本稿では、両生類の初期胚を用いた実験発生学の基礎実験として、2細胞期胚の結紮実験とオーガナイザーの移植実験を中心にその手順と結果を解説してきた。どちらも100年以上も昔に行われた古典的な実験であるが、動物の体づくりを理解する上で今も重要な実験である。これらの実験は高校『生物』のどの教科書にも載っているが、高校生には単に知識として覚えるのではなく、実際に実験を行って双頭胚や二次胚が形づくられる様子を観察してほしいと思う。両生類の発生に興味を持った大学生には、分子・遺伝子レベルの研究に取り組む前に発生という生命現象を形態レベルで捉えてほしい。そのためにも本稿では、Spemannの実験を追試して原法の一部改変を試み、高校生や大学生ができる限り容易に実験を再現できるように解説したつもりである。

結紮実験は胚を縛るだけの単純な実験だが、いざ縛ってみると第一卵割面とずれてしまったり、胚が破裂してしまったり、なかなかうまくいかない。結紮できたとし

でも、結び目が緩んで二個体に分かれないことも多い。本稿をまとめるに当たって250個ほどの胚を結紮してみたが、改めてその難しさと集中力や精神力の必要さを思い知った。Spemannは結紮材に毛髪を用いたが、髪は毛は滑りやすく弾力があるため結び目が緩みやすい。そのことに気づいて弾力のないエナメル線に替えてみると、それまでの倍以上の速さで確実に結紮できるようになった。結紮した胚は教科書に書かれているように双頭胚や二個体に常に発生するのではなく、半数のものは一個体と細胞の塊を形成した。また、双頭胚や二個体を形成した胚の約半数には内臓の逆位が認められた。これらの追試結果はSpemannの論文の結果と一致したが、彼の場合は毛髪を使って1,000個以上もの結紮実験を続けたために左手の筋肉が萎縮してしまったと伝えられている(Mangold, 1955)。今回、エナメル線を使うなど結紮実験の方法に改良を加えることができたが、今から120年も昔に結紮実験に取り組んだSpemannの苦勞と偉大さを改めて認識することができた。

イモリ胚を使って移植実験を行う場合、卵殻や卵膜の除去は最初の関門になるであろう。2本のピンセットを使って卵殻を破る方法は、慣れてしまえば実験に必要な数の胚を迅速に集められるので便利である。だが、そのコツをのみ込むまでにはある程度の訓練が必要である。一方のピンセットで卵殻を動かさずしっかりと摘み、もう一方のピンセットで卵殻を大きく切り裂くのがコツである。どうしても難しい場合のために、本稿ではチオグリコール酸ナトリウム溶液による卵殻膜とゼリー層の溶解方法も解説した。この方法は一度にたくさんの胚を集める必要がある場合にも利用できる。胚に密着している卵膜を胚に傷をつけずに取り除くのも容易ではない。ただし、初期胚の修復力は非常に高いので多少の傷は気にする必要はなく、移植部位を意図的に傷つけて卵膜を除去してもよい。

本稿をまとめるにあたって、オーガナイザーの移植についても移植法と挿入法を用いて追試実験を行った。移植法では、供与胚の発生段階や移植片とする原口背唇部の大きさによって、誘導される二次胚の形態や大きさに差が生じる。移植法において移植を成功させる(=二次胚を確実に誘導する)ためには、移植する原口背唇部の向きに注意するとともに、移植片と移植部位の損傷を最小限に留めなくてはならない。移植片を無理に埋め込むのではなく、はめ込むつもりで移植するのが成功の秘訣である。一方、挿入法の解説ではオーガナイザーの誘導特異性についても触れた。初期原腸胚の原口背唇部は頭

部ではなく胴尾部を誘導する活性をもっている。胞胚腔に挿入された原口背唇部の移植片は、受容胚の腹方に運ばれるまでの間にその誘導能が胴尾から頭へ変化し、頭部の構造をもった二次胚を誘導する。このようなオーガナイザーが示す誘導特異性の経時的な変化は、頭尾の軸に沿った胚の基本的な体制を確立する上で非常に重要な現象である。

本稿で解説した実験は、すべてアカハライモリ胚を実験材料としている。イモリは卵や胚が大きく、受精卵の直径はアフリカツメガエル卵の約2倍の2.3-2.4 mmである。発生速度は遅く、第一卵割を開始するまでに数時間、原腸形成にも丸一日かかる。遺伝子レベルの解析ではツメガエルに後れをとっているが、胚に対して外科的な操作を正確に加えられる点では非常に優れている。ツメガエル胚での結紮実験はさすがに難しいが、オーガナイザーの移植実験については本稿で解説した方法がツメガエル胚を実験材料に使う場合にも適用できる。ただし、ツメガエル胚は小さくて発生速度が速いため正確な実験操作を加えることが難しい点、原口背唇部の構造がイモリ胚と異なっている点(中村, 1992)、などを理解しておく必要がある。

資料

1) 発生段階表

実験に使用するアカハライモリ胚およびアフリカツメガエル胚の発生段階(stage, st.)は、以下の発生段階表にしたがって同定する。

1-1) アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*

岡田 要, 市川 衛. 1947. イモリの発生段階規準改訂図表. 実験形態学年報, 第3輯, pp. 1-6.

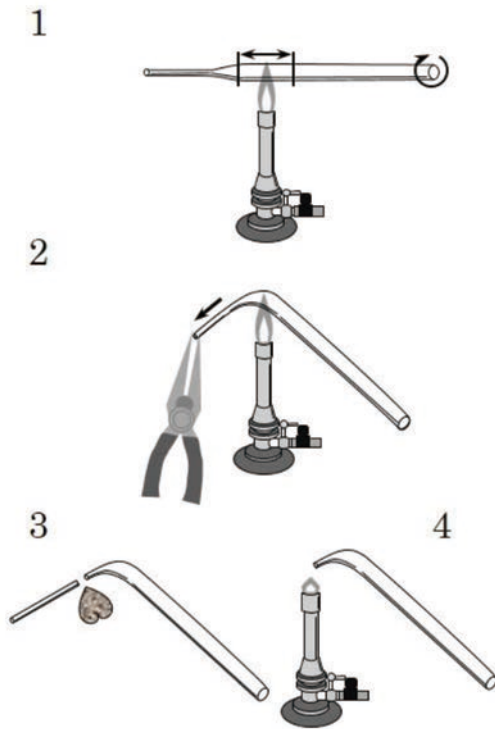
市川 衛, 梶島孝雄, 加藤正昭, 江口吾朗. 1966. イモリの発生段階表. 脊椎動物発生学, pp. 154-177. 培風館, 東京.

岡田節人, 編. 1989. イモリの発生段階表. 脊椎動物の発生上, pp. 333-355. 培風館, 東京.

1-2) アフリカツメガエル *Xenopus laevis*

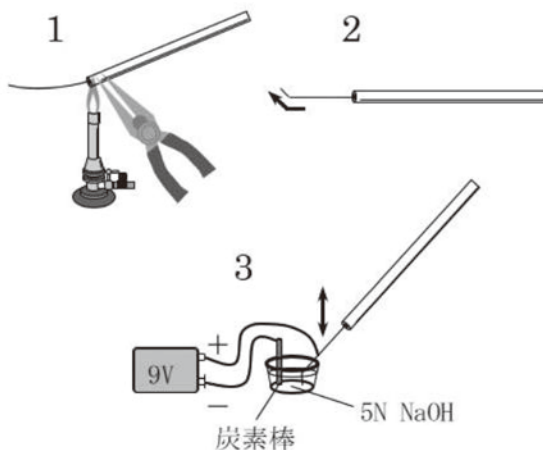
Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. 1994. Normal Table of *Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York & London.

2) 先曲がりピペットの作製法



先曲がりピペットはパスツールピペットをガスバーナーであぶり (1), 角度を付けながら引き伸ばして作製する (2). アンプルカッターを使って目的とする口径の部分で切断し (3), 軽く火であぶって切り口を滑らかにする (4). 胚を吸うためのピペットの先端は大きめ, 原口背唇部の移植片を吸うピペットの先端は小さめ, というように口径の異なるものを作製する.

3) タングステン針の作製法



タングステン針は線径0.2 mmのタングステン線 (461267, ニラコ) を2-3 cmの長さに切断して作製する. ガスバーナー

であぶって先端を柔らかくしたガラス管 (外径4 mm, 内径2 mm, 長さ12 cm程度) にタングステン線を5 mmほど差し込み, ガラス管が熱いうちに素早くラジオペンチでガラス管ごと挟んで固定する (1). ラジオペンチを使ってタングステン線を図に示したような角度に曲げ, 折れ曲がった先の部分が3-4 mmとなるように切断する (2). 先端部を5N NaOHの中を出し入れしながら電気分解して研ぐ. 電気分解の電源には9V乾電池 (006P型) を使い, マイナス極と炭素棒, プラス極とタングステン線を接続する (3).

4) 培養液および卵殻膜・ゼリー層溶解液 (脱ゼリー液)

4-1) Holtfreter液 (HS)

NaCl 3.5g, KCl 0.05g, CaCl₂ 0.1g, HEPES 1.1g, Kanamycin sulfate 0.1g, 0.2 % phenol red 0.5 ml, 蒸留水 1000 ml. 1N NaOH約2 mlを加えてpH7.4に調整する. オートクレーブ滅菌 (121℃, 20分間) を行う. Kanamycin sulfateは滅菌後に加える.

4-2) Steinberg液 (SS)

NaCl 3.4g, KCl 0.05g, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.08g, MgSO₄ · 7H₂O 0.205g, HEPES 0.715g, Kanamycin sulfate 0.1g, 0.2 % phenol red 0.5 ml, 蒸留水 1000 ml. 1N NaOH約2 mlを加えてpH7.4に調整する. オートクレーブ滅菌 (121℃, 20分間) を行う. Kanamycin sulfateは滅菌後に加える.

4-3) チオグリコール酸ナトリウム溶液

pHを調整せずにオートクレーブ滅菌 (121℃, 20分間) したHSに1% (w/v) となるようにチオグリコール酸ナトリウム (メルカプト酢酸ナトリウム) を溶かす. 使用直前にフェノールレッドの色調を見ながら1N NaOHを滴下してpH7.8前後に調整する.

4-4) システイン塩酸溶液

L-システイン塩酸塩を4.5% (w/v) となるようにSSに溶かし, 10N NaOHでpH7.4前後に調整する.

引用文献

- 有泉高史. 2016. 両生類を用いた発生と再生の実験手技I. 飼育方法と採卵方法. 玉川大学農学部研究教育紀要1: 53-72.
- Ariizumi, T., Michiue, T. and Asashima, M. 2017. *In vitro* induction of *Xenopus* embryonic organs using animal cap cells. Cold Spring Harbor Protocols. doi: 10.1101/pdb.prot097410.
- 浅島 誠, 林雄次郎, 中村 治. 1977. Spemannから50年 Aオーガナイザー研究50年の歩み. オーガナイザー (中村 治, 川上 泉, 編), pp.1-40. みすず書房, 東京.
- 浅島 誠. 1985. 分化と形態形成. 実験生物学講座11発生生物学 (金谷晴夫, 山上健次郎, 編), pp.195-206. 丸善, 東京.

- Asashima, M., Malacinski, G. M. and Smith, S. C. 1989. Surgical manipulation of embryos. In (Armstrong, J. B. and Malacinski, G. M., eds.) *Developmental Biology of the Axolotl*, pp. 255-263. Oxford University Press, New York.
- 江口吾朗. 1980. 形態形成. 科学と実験 別冊 発生学実験 (石原勝敏, 編), pp. 117-130. 共立出版, 東京.
- Hamburger, V. 1988. *The Heritage of Experimental Embryology: Hans Spemann and the organizer*. Oxford University Press, New York.
- 市川 衛, 梶島孝雄, 加藤正昭, 江口吾朗. 1966. イモリの発生段階表. 脊椎動物発生学, pp. 154-177. 培風館, 東京.
- 角川裕造, 江口吾朗. 1983. 発生のしくみ. 科学と実験 別冊 図説 教材生物 下 (石原勝敏, 山上健次郎, 監修), pp. 196-201. 共立出版, 東京.
- Mangold, O., 佐藤忠雄 (訳). 1955. 発生生理学への道. 法政大学出版局, 東京.
- Mangold, O. 1982. *Hans Spemann. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart*.
- 中林千明, 朝倉正海, 山川 宏, 浅島 誠. 1982. 両生類の初期発生実験 (2). 遺伝 36 (8) : 71-79.
- 中村 治. 1992. VOGT以後. 両生類胚における造形運動と器官形成 (W. フォークト, 波磨忠雄 (訳)), pp. 348-366. 学会出版センター, 東京.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. 1994. *Normal Table of Xenopus laevis*. Garland Publishing, New York & London.
- 岡田節人, 編. 1989. イモリの発生段階表. 脊椎動物の発生上, pp. 333-355. 培風館, 東京.
- 岡田 要, 市川 衛. 1947. イモリの発生段階規準改訂図表. 実験形態学年報, 第3輯, pp. 1-6.
- 高梨征雄, 小山従道, 大矢敏江, 浅島 誠. 1982. 両生類の初期発生実験 (1). 遺伝 36 (7) : 88-95.
- 武田 実, 斎藤隆政, 大矢敏江, 浅島 誠. 1982. 両生類の初期発生実験 (3). 遺伝 36 (9) : 66-73.
- Sive, H. L., Grainger, R. M. and Harland, R. M. 2000. *Early Development of Xenopus laevis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Spemann, H. 1967. *Embryonic Development and Induction*. Hafner Publishing Company, New York.
- 高谷 博. 1977. オーガナイザーのダイナミクス A オーガナイザーの造形運動. オーガナイザー (中村 治, 川上 泉, 編), pp. 44-68. みすず書房, 東京.
- Vogt, W., 波磨忠雄 (訳). 1992. 両生類胚における造形運動と器官形成. 学会出版センター, 東京.

Experimental Studies on Development and Regeneration Using Amphibians II: Basic Manipulation of Embryos and Fundamental Experiments on Experimental Embryology

Takashi Ariizumi

Abstract

Amphibian eggs and embryos are larger than those of other vertebrates and develop in water, making them easier to perform surgical manipulations such as ligation and transplantation. Experimental embryology is a research field in which experimental operations are applied to develop embryos with abnormal morphology, and the mechanism of development is analyzed based on the causal relationship. This paper describes the methods and results of ligation experiments and organizer transplantation experiments performed by German embryologist Spemann more than 100 years ago. These experiments include basic techniques for handling early amphibian embryos, such as removal of egg membranes, sterilization, and culture. This paper also introduces the results and improvements of the author's replication study so that high school and university students can reproduce the experimental results as easily and accurately as possible.

Keywords: amphibian embryo, organizer, ligation experiment, transplantation experiment, localized vital staining