

馬蛔虫卵における染色質削減現象の機構に関する研究

只野 正志

岐阜大学学芸学部生物学教室

(昭和36年1月31日受領)

Boveri(1887)は馬蛔虫 *Parascaris equorum*(GOEZE)の卵について興味ある事実を発見した。即ち第1卵割で卵は第1次体細胞(S1)と予定生殖細胞(P1)に分裂する。そして後者は生殖細胞及び体細胞を生じ、第2~第5卵割迄に体細胞においてのみ染色質の削減が起る。

かかる削減の現象は Dostoiewsky (1888), Schneider (1891), Herla (1895), 及び Meyer (1895) らによつて確認された。その後 Zaccharias(1913), Painter (1945), Ubisch (1943) らによつて追究された。又一方、これと類似した現象は *A. lumbricoides*, *A. labiata* 及び *A. rubicunda* について Bonnevie (1901) により、又、*A. canis* について Walton (1918) により、その後 *Rhabditis nigrovenosa* について Schleip (1911) によつて見出された。その後かかる現象は線虫以外の動物のみならず、植物においても観察された (Fogg, 1919; Wilson, 1925; Yao & Pai, 1942)。尚、上記現象が Boveri により発見されて以来、蛔虫の発生は、Boveri (1892, 1899) 及び他の多数の人々 (Beneden 1887; Zoja, 1896; Strassen 1895, 1906; Müller, 1903; Retzius, 1914; Beneden & Neyt, 1887) によつて充分に研究された。

削減が起る機構については4つの仮説がある。即ち、Boveri (1892, 1899, 1904, 1910) は、正常卵、2精子受精卵、遠心処理卵についての研究結果から不可視的な細胞質の構成物の異極性 (Heteropolie) によるとして、絶対性仮説 (absolute hypothese) と相対性仮説 (relative hypothese) を上げた。しかし受精卵及び予定生殖細胞の第1分裂で削減が起らない事実の説明ができなかつた。また、卵の性質に基づく遠心処理の失敗から、その本体を確認することができなかつた。一方、Strassen (1895, 1896) は Weismann の胚種説に立脚して削減の原因を核内に求めたが、これは Boveri (1910) によつて批判されている。又 Beams & King (1937, 1938)

によつて chemical diminisher hypothesis が提出された。この説によると削減は動物極に局在する細胞質からつくられた chemical diminisher によつて起されると云う。

彼らは超遠心処理卵において細胞質分裂は起らなかつたが、核分裂のみ進行し、これらの核はすべて削減した事を基礎としているが、細胞質及び diminisher の本体については明らかでない。Ubisch (1943) はこの説を批判して、未分割卵の赤道帯を重視し、核がこの領域より離れると削減が起るといふ。これは Strassen (1895, 1896), Boveri (1887, 1899, 1904, 1910) らの研究に基づき提出されたものであるが、しかし、赤道帯の細胞質については全く不明である。

もしも以上の仮説が正しくても、それを実証する確かなものはない。確かに削減現象は本質的に化学反応であることは容易に推測されるが、しかし、その本体については以上の通り全く不明である。

尚、削減現象が持つ意義については、大凡二つに分けられる。即ち不要物の排棄と見做す Bonnevie (1901), Wilson (1925) らの見解と、他方、分裂に有益であろうとする Painter (1945), 並びに分化の開始に対する妨害の除去とする Ubisch (1943) らの見解がある。云うまでもなく、これらの見解の正否の結論は削減現象の機構の解決を前提とする様に思われる。よく知られているように回虫に関する膨大な報告にもかかわらず、削減の機構が今尚仮説の域を出ていないのは意外にさえ思われる。また蛔虫の整然とした割球分化現象を見ると、分化と染色質削減は密接な関係があると考えられる。もしかかる見解が正しいならば、削減機構の研究は分化の機構の一つの礎石を与えるかも知れない。

一般に発生過程における割球又は各胚域の運命の決定について今日まで詳細な検討がなされてきたが、しかし、それらの決定機構に関しては充分に明らかにされた

本研究の一部は文部省科学研究費によつて行つた。

と見ることができない。最近、Beatty (1954) は体細胞の染色体数に変動がある事を指摘した。亦、前記の様に削減又はこれに類似した現象は単に蛔虫にとどまらない。もしも削減の機構が明らかにされたならば、動物の種類によつて分化の様式に差があるにしても、染色体数の変化の原因の分析、分化の機構に関する発生学、遺伝学的研究に一つの足がかりができるかも知れない。

以上の理由から本論文は削減機構の解決を目的として行つた研究結果 (1956a, b, 1957a, c, 1958a, b, 1959, 1960a, b) を総括的に扱つたものである。

材料および方法

材料として馬蛔虫 *Parascaris equorum* (GOEZE) (Syn. *Ascaris megalcephala* CLOQUET) の受精卵を用いた。成虫の子宮から取り出した卵を稀アンチホルミン水溶液で処理し子宮の内容及び卵膜第1層(蛋白質)を除去した後、充分水洗を行つた卵を実験に供した。

生卵の観察には Wottge によるリングエル氏液及び蒸留水を用い、25~30°C で同一卵を幼生に達する時期まで連続的に観察した。又、場合によつて最初生卵について観察し、そのままの状態同一卵を観察し乍ら固定、染色を行つた。染色体の観察、薬品処理及び紫外線照射には卵膜(卵殻)を除去した卵を用いた。また第2層から第5層の内壁までの卵膜の除去には稀いアンチホルミン水溶液又はアンチホルミンと酵素による2段処理法を用いた(1955b, c, h, 1956)。特に酵素はプロナーゼ(0.2%前後)を用いた。全卵膜を除去しない卵にはカルノア氏液以外の固定液の透過は不可能か或いは著しく遅く、卵は屢々固定液中で幼生に達する。詳細な染色体の観察にはフォイルゲン反応を試みたがこの場合には DNAase 処理をも行つた。また染色にはメチルグリーンピロニン、ゲンチアナ堇を用いたが、前者には RNAase の処理をも試みた。その他塩化リチウム、ロダンソーダ、アンモニア、トリプシン及びペプシンの各水溶液を用いて処理を行つた。

紫外線の照射には遠心処理卵の第1層を除く他の層を錫箔で覆い光源として東芝 GL-15を用い5''~60'(41.4-29,760 = $\mu\text{W min/cm}^2$)、25°C で照射した。また遠心処理には普通電気遠心機及び超遠心分離機を利用し3,200~110,000 Gで1~5時間処理した。尚、超遠心処理には主に Spinco E 及び L を利用した、その他個々の方法については以下その部にのべることとする。

実験結果

1. 正常発生

固定卵についてみると精子侵入直後における雌核は弱いフォイルゲン反応の陽性を示し、輪かく不明瞭なそして僅かな構造物を持つ。卵内の雄核は点状にフォイルゲン反応の陽性物質を持つ。次に雌核にはピロニン好染物質が現われ、次にその消失と共に、フォイルゲン反応の陽性物質の増加がみられる。斯様な状態の回復につれて、点状のフォイルゲン反応の陽性物質が漸次増加してくる。第1極体放出後、再び上記と同様なフォイルゲン反応の陽性物質の増加がみられ、ついで卵は第2極体を放出する。この時期までに雄核においては、雌核と同様な様式で、徐々にフォイルゲン反応の陽性物質が増加する。両核はこの時期に至つてほぼ同量のフォイルゲン反応の陽性物質をもつようになる。

両核に同時に始まる核膜の形成と共に、ピロニン好染顆粒が繊維状の核膜の内側に散在してくる。膜の完成と共にこれらの顆粒は消失して、フォイルゲン反応の陽性な多量の顆粒が、蛋白(特にヒストン)反応の陽性の糸状構造物の上に配列してくる。次に両核は相互に接着する。接着後、両核の糸状物は折れ曲り、互に融合し両端がコルベン状に太く中央部が桿状の染色体が現われる。かくして核分裂の中期に達する(Fig. 1-1)。染色体は全体として強いフォイルゲン反応を示すが、この染色体のコルベン状部から桿状部分に移行する部位は細くなり、この部位は強い蛋白の陽性反応を示す。亦桿状部は一定間隔で配列するフォイルゲン反応陽性顆粒とその顆粒を連結する透明部分から成り、この透明部分は陽性の蛋白反応を示す。

上述のフォイルゲン反応の陽性物質は DNAase の作用後、陰性となる。又ピロニン好染物質は、同様に RNAase 作用後、陰性となる(1957b)。

生卵についてみると、両核の融合後、卵細胞質の周辺に、外部細胞質の形成が始まる。そして周辺の透明な領域に、ゴルジ氏体が液胞化して溶け込み、又、その中にミトコンドリアが移動し、卵の周辺部は緻密な領域となる(Photo. 1, Fig. 1-1)。

内部細胞質は、多数の大小顆粒によつて濁され不透明である。そして外、内細胞質の区別は明瞭になる。また外部細胞質は、分裂像の回転によつて動物極から植物極側に漸減した明瞭な「勾配分布」を示す。その直後に第1卵割が開始する。

その結果、動物極側に僅かに大きい第1次体細胞、S1割球、植物極側に第1次予定生殖細胞P1を生ずる。S1は第1次外胚葉割球で、多量の外部細胞質をもち、

第 1 表 I. 遠心処理卵における第 1 層

組織化学的テストの種類	アルギニン (セラ法)	アセタルフォスファチッド		レシチン (ロミユ一法)	リポイド		ナイルブリュー (ローランスミン法)	ビタミンA (カールトとプリース法)
		(フォイルゲンとボア法)	(ピインガー法)		ズダン黒B リソソ (とペーカ法)	スタン III, IV (チアチオ法)		
第 1 層	+	+ 赤紫色	+	+	+ 青黄色	+ 黄色	+ 青色	+
第 2 層	+	+ 赤色	+	+	+ 青色	+ 黄色	+ 青色	+
2 層間に差がみとめられたもの		○			○		○	○

P 1 は多量の内部細胞質を持つ。かかる細胞質の状態により容易に両者を区別することができる (Fig. 1-3, 4). 第 2 卵割で S 1 は第 1 卵割面に直角に生ずる卵割面により, A, B 割球を生じ, P 1 は第 1 卵割面に平行に生じて, 動物極側に第 2 次体細胞 S 2 (EM St, 第 1 次内胚葉, 第 1 次中胚葉, 口道細胞) と植物極側に, 第 2 次予定生殖細胞 P 2 を生ずる (Fig. 1-5).

前記の外部細胞質の勾配分布の出現からこの時期までに 150~180 分を要する。

この時期の卵を卵膜第 1 層から第 4 層までを除いた固定材料についてみると, S 1 割球における染色体の分離, 移動時(中期-後期)に, 染色体の両端のコルペン状部分が切れ, 細胞質の中に放出され, 分裂面の近部に散在しているのが見られる。即ち, 染色質削減 (chromatin diminution) が起る。放出された染色体の両端部には, 中期においてもけん引糸が見られない。P 1 の分裂では削減は起らず, P 2, S 2 割球の染色体は原型を保有している (Fig. 1-6)。しかし, 次に起る S 2 の分裂では削減が起る (Fig. 1-7)。

この後 P 2, P 3 割球よりそれぞれ生ずる S 3, S 4 割球には削減が起るが, P 3, P 4 には起らず, 始原生殖細胞 P 4 は G I, G II に分裂しながら陥入をする (Fig. 1-8, 9)。

削減後の細胞におけるすべての休止核は球形を示し, それらの内部にはフォイルゲン反応陽性の粒状染色体が散在しているが, 生殖細胞系割球の核は, 卵割面に向けてコルペン部の突起を持つ大型の嚢状を示し, フォイルゲン反応に陽性の桿状染色体がみられる。両静止核の区別はこのことよって明白である (1957b)。

削減を起した体細胞の分裂速度は次第に増す。これに反して, 予定生殖細胞の分裂速度は次第に遅れ, 始原生

殖細胞に至り分裂は停止したまままで幼生になる (Fig. 1-10)。割球の分裂速度が最も速いのは外胚葉割球で, 次に中胚葉, そして内胚葉が一番おそい (1957c)。

細胞質中に放出された染色質は, 発生 of 進行につれて, 小桿状から次第に点状に細分され, 次いで消失する。これに平行して, フォイルゲン反応は陰性となる。いずれの割球においても, 囊胚期頃までに放出された染色質は消失する。

一方, 各割球における細胞質の分布状態をみると, 各割球はその運命に従つて, 細胞質の固有の分布状態を示す (1957c, 1960b)。

即ち, 割球がもつ外部細胞質の内部細胞質に対する割合 Rec : Ren は次の様に示される。

$$\begin{cases} \text{外胚葉性割球} & \text{Rec : Ren} > 1 \\ \text{中胚葉性割球} & \text{Rec : Ren} \approx 1 \\ \text{内胚葉性割球} & \text{Rec : Ren} < 1 \\ \text{予定生殖細胞及び成熟卵} & \text{Rec : Ren} = 1 \end{cases}$$

各時期において体細胞は, それに対応する予定生殖細胞に比べて, 常により多量の外部細胞質をもっている。もし卵が pH, 温度等の不適当な状態で長い間保存されると, 外部細胞質の構造は粗となり, 内部細胞質との境界が不明瞭となる。斯様な卵における削減は遅れる。一般に分裂の各時期において P よりもそれに対応する割球においてより多量の外部細胞質をもつとき削減が起る。

2. 極化剤による処理

植物極化剤の代表者として塩化リチウム, 動物極化剤としてロタンソーダを用いて成熟卵に処理を行った。

(1) 塩化リチウム処理

成熟卵を, 0.015, 0.032, 0.125, 0.25, 0.5M 塩化リチウム水溶液で 30 分, 2, 8, 16, 32 時間, 15°C で

および第2層の組織化学的性質

コレステロール	ナデオキシダーゼ		SH-基	ヘマトキシリン	酸性フクシン	メチルグリーン・ピロニン	ゲンチャナ紫	ビスマルク褐
(ロッシュユ法とシュルツェ法)	Gナジ (グレフ法)	Mナジ (グレフ法)	(チルーと プユリア ール法)	(ハイデン ハイン法)	(アルトマ ン法)	(ブラシエ 法とその 変法)		
+	+	-	+	+	+	+ 淡桃色	+	+ 黄色
+	-	-	++	+	++	+ 桃色	+	+ 黄色
	○		○		○	○		○

処理した。強く作用させると、処理卵において、内部細胞の領域にある顆粒は液胞化の傾向を示しながら、卵細胞の周辺に移動し、外部細胞質の領域が不明瞭となつてくる。そしてしばしば、卵は等割する。

4~8細胞期で紡錘体の形成が著しく抑制され、染色体は大小不同に切断され、細胞質中に散在する。無核或は多核の割球を生ずる。弱く作用された場合に、卵は外嚢胚を形成し、しばしば生殖細胞の不明な場合がある。一般的にS1割球の分裂が抑制される(Photo. 2)。

(2) ロタンソーダ処理

0.5~0.25Mの濃度で処理した場合に、単細胞期において外部細胞質に含まれているミトコンドリアが減少し、また外部細胞質の透明な領域が内部細胞質の領域に入り込み、内部細胞質の領域は次第に拡大する様にみえるが、外部細胞質の存在が不明瞭となつてくる。殊にゴルジ氏体が、細胞質全体に分散する。かかる卵は6細胞期頃まで等分裂をする場合が多く、そして大きさ、細胞質が共に等しい細胞を生ずる。削減は極端に抑制され、分裂中期の桿状の染色体はワイヤー状になる。また、星状体の形成が抑制される。

0.25M—0.015 Mの濃度で処理した場合には、S1に内部細胞質が比較的多量に分配され、S1よりP1が先に第2卵割を始める場合がある。かかる場合には一般に、中、内胚葉系細胞の分裂が僅かに早くなり、外胚葉の分裂が正常より遅くなる。この卵は陥入を失敗し、種の形の外嚢胚となる。又他方、幼生になつたものの頭部、尾部は、やや正常の型を示すが、胴部即ち腸の発達は遅れ太く塊状を示す。正常においては生殖細胞は2個あるが、かかる幼生は6個以上の生殖細胞を持つ場合がある。しかしそれらの位置は正常である(1956b)。

3. アンモニア処理

2%, 10%, 28%水溶液を0~5°Cで3~16時間、卵膜2層~5層までを有する成熟期の卵に作用した。作用は一般にロタンソーダに類似した傾向を示す。溶液の濃度の大小に無関係に外部細胞質の形成が抑制される。完成した外部細胞質では、特にミトコンドリアの変形、消失が起り、そして全体として粗になる。また遠心力で分層され易くなる。内部細胞質が外部細胞質の領域に容易に拡散してくる。斯様な卵は処理後5日目でその大多数が外嚢胚となり、しかも生殖細胞が正常の2倍から3倍に増数し、しばしば8倍の生殖細胞数をもつものもみられた。増加したこれら生殖細胞の位置は正常のそれと変らない(1957a)。

4. 遠心処理(第1表)

(1) 成熟卵を強く遠心処理すると、細胞質は5層に分れる。動物極は常に遠心端になり、そこに第1層が位置する。第1層は、更に強力な遠心力によつて、ミトコンドリアと重い透明原形質に分離される。後者は凸レンズ型に分層されるが、処理直後に前者と速かに混る。第2層は最も小型の顆粒から成り第1層と形態的に類似しているが、第1表の如く他の種々の点において両者の間に差がある。第3層は軽い透明原形質から成り、第4層はゴルジ氏体である。求心端に分層された第5層は大型の卵黄顆粒から成つている。分層された卵の動物極には、多量の第1層が残つたままの状態、漸次正常卵の細胞質の分布状態に回復し、それと共に第1層は少量の溶解したゴルジ氏体とによつて、外部細胞質を再形成する。そして、卵は再形成された外部細胞質が動物極側から植物極に漸減した勾配分布を示す様になる。動物極は外部細胞質の量的優越点をなし、この部位にS1割球を生じ、そしてこのS1割球に削減が起る。そして卵は正常胚に発生する。これらの点は正常卵の場合と全く同様

II. 遠心処理卵における第1層及び第2層の物理的性質

物理的性質の種類	形, 大きさ	色調	分布, 行動及び他の物理的性質
分層の種類			分布, 行動及び他の物理的性質
第1層	球形の小顆粒 直径 0.5μ	黄褐色	粘弾性に富む。細胞の表層を移動する。ブラウン氏様運動著明。外部細胞質の主要な構成成分。相互に接着すると分離しがたい。
			粘弾性に富む。外部細胞質の主要構成成分。分層直後第1層 a と混合する。
第2層	球形の小顆粒 直径 0.025μ 以下	黄緑色	粘弾性が低い。内部細胞質に存在し、特に核、分裂像の周囲に集まる。接着しがたい。

である。

第1層の一部を除去しても他の層は正常な分布に回復する。しかし外部細胞質の量が減少する。第1層の除去量が多ければ多い程、外部細胞質の量が減少し、削減は遅れる。換言すれば、生殖細胞が増加する (Fig. 2)。かかる卵の分裂速度は一樣に遅れ、正常卵から生じた各割球が示すような、各々の運命に応じた特有の分裂の調和が失われる。そして各割球の著しい異常配列が起る。割球の大小の相違もまた減少する。これらの現象が著しい場合には、囊胚を形成することができない。又上述の処理卵に、第1卵割りによつて同じ細胞質を持つ割球を生じた。そして削減は遠心端の割球のみに起るが、削減が起る時期はおくれる。いずれも囊胚形成を失敗し、生殖細胞数は増加する。

全卵黄を単独に、或は大部分のゴルジ氏体と共に遠心力によつて卵細胞から除去すると、次の様な二つの場合が見られた (Photo. 4)。

外部細胞質の量的勾配を示さない時期、即ち分裂像の回転する前に、卵黄を除去すると、分裂像の回転後においても除去した卵には、外部細胞質の量的勾配が現われない。そして卵周辺に外部細胞質が均等に分布された状態で分裂をはじめ。第1卵割りにより、卵は等しい割球を生ずる。以後連続的にしかも急速に等割りが起り、生じた全割球に削減が起る。往々、局部的運動を示す著しい異常胚を生ずる。

他方、外部細胞質の量的勾配が現われた後に除去した場合には、卵は正常に発生し、やや小型であるが、完全な幼生となる。そして分離された卵黄は卵卵腔内に残存する。

(2) 上述のように有卵膜成熟卵は外部細胞質の多い動物極側が重く、遠心力を加えると卵自体は卵卵腔中で回転し、常に遠心端と動物極は一致する。そして処理後、分層は正常卵と同じ細胞質の分布になる。従つて細胞質の分布をかえるためには、卵の回転を抑制して、遠

心軸を卵の任意の方向におく必要がある。卵膜各層の化学的、物理的な性質を基礎とし以下の方法で軸の固定を行った。

第2～第5層の卵膜を有する成熟卵をスライドに貼りつけ、卵膜第3層の軽い乾燥により、繊維状の第5層の一部を卵卵腔の中に突出させ、この突出によつて卵細胞を固定した (1955h, 1956c)。かかる卵を遠心処理すると、遠心端が動物極から植物極まで (0度～180度) 種々の範囲に移動された。換言すれば、第1層の位置は、動物極以外の種々の部位に分層された。そして第1層が動物極から180度移動して植物極に分層されると、その部位に、他の部位より、より多量の外部細胞質が形成され、外部細胞質の量的勾配は正常卵 (未遠心処理卵) のそれから逆転する。そして第1次植物極にS1割球を生じ、その割球に染色質の削減が起り、第1次動物極側にP1割球を生ずる。即ち、本来、体細胞を生ずる部位に生殖細胞が生じ、生殖細胞が生ずる部位に体細胞が生ずる。割球の予定運命及び極性の転換が起るが、卵は正常に幼生となる。第1層の位置がいかなる部位に分層されても、常にその部位に体細胞が形成され、その割球に削減が起る。しかし第1層の部位が動物極に近くなればなる程、第1層の動物極への回復が盛んで、動物極に、より多量の第1層が移動し、多量の外部細胞質が形成される。そして卵は第1次動物極に体細胞を形成する。何れの場合も第1層のより多量に存在する位置が外部細胞質の量的優越点となり体細胞が形成され、そしてその割球に削減が起る。第1層の除去及び均等分配、第5層の除去における発生状態は上記(1)の場合と同じである。また他の分層の行動の変化によつて、削減の変化は見られなかつた (1958a, 1960a)。

5. 紫外線の照射

遠心処理した成熟卵の第1層のみに紫外線を照射した時に次の様な結果が得られた。即ち30分以上の照射で

は、外部細胞質の再形成、ミトコンドリアの移動及び削減の抑制が起り、又、正常の卵割型が崩れ、しばしば囊胚形成は不能になる。これらの状態は、ロダンソーダ或はアンモニア処理卵の場合に類似した傾向を示した。

6. 酵素の作用

卵膜第2層～第4層までを除去した成熟卵を、カルノア氏液、或はホルマリンを加えたカルノア氏液で3時間固定した後削減前の染色体に処理を行った。固定された核分裂中期の染色体は前記の様に、フォイルゲン反応に陽性を示す。ホルマリンを加えたカルノア氏液によつて固定された卵は、カルノア氏液のみによる固定に比べて細胞質顆粒はかなり保存されている。染色しないものとメチルグリーン・ピロニン染色したものの両者に酵素を作用させた。

(1) トリプシン処理卵

トリプシンの0.1%、0.3%水溶液を温度30°C、39°C、pH 7.6で6時間作用した。38°Cで、0.5%の場合には、処理30分後に桿状の染色体が8～9個の桿状体に切れ、75分後には細分し、細胞質の小顆粒から見分けられぬ程、小粒になった。30°Cで15分後には、染色体の表面が細かい凹凸を生ずる。120分後には、桿状の2～3ヶ所が細いくびれを生ずる。165分後8～10個に等分される。0.3%、38°Cの場合には、60分後の染色体の表面が凹凸を生じ始め、75分後には、全体に細くなつてくると共に、凹凸は更に細かになり、鋸歯状になる。90分後には、凹凸が消え、全体が細くなり、桿状の中央部に2～3ヶ所で切断され、120分ではコルベン型の両端を残して、中央部が5～6個に切断される。そして210分では、顆粒状となり、遂に顆粒は不明になる。30°Cで、165分では凹凸を生じ、195分後この凹凸は消失して、全体として細くなり、285分後に2～3ヶ所が切断されてくる。0.1%、30°Cの処理において、30分後には染色体は全体として細くなり、60分後には凹凸を現わし、120分で7～8個に等分に切れ、180分後には細かい顆粒になる。換言すれば蛋白反応の陽性部位が消失し、フォイルゲン反応陽性部位が残された。

(2) ペプシン処理卵

0.05～0.5%のペプシン水溶液を用い pH 4.0、37～39°Cで、20分～6時間処理した。何れの場合も、染色体は押しつぶされたように扁平な外観を示し、全体として輪かすが不鮮明になる。しかし、トリプシン処理のような著しい形態の変化は全くみられなかつた(1958f)。

考 察

削減に関する仮説中 Boveri (1910), Beams & King (1937, 1938) 及び Ubisch (1943) らは削減の原因を細胞質に求めた点で共通している。Boveri (1887, 1892, 1890, 1904) は、はじめ正常発生の観察から、原因が細胞質にある事を推測した。ついて、2精子受精卵の発生について、彼と Stevens の研究から発生に際し、核は不等分裂をしない事、削減の原因は細胞質にある事を強調した。次に彼及び Hogue (1910) の遠心処理実験から Boveri (1910) はその報告で同様の見解をのべ、相對説、絶対説のいずれによつても削減が説明できるとした。然しこの場合、遠心端の位置を動物極以外の位置に固定することが不可能であつたことが彼自身も認めているように彼が最終的な結論を下し得なかつた原因である。削減に関与する細胞質についての説明はまた彼の報告にはない。正常卵における外部細胞質の形成状況及び遠心処理卵における再形成の状況から第1層 a: ミトコンドリア、第1層 b: 重い透明原形質は外部細胞質の主要構成物である(1959)。

既述のように、正常な成熟卵において外部細胞質・内部細胞質の明瞭な分布の勾配があり、また各割球にはこれらの固有の分布が見られる。そして外部細胞質の多い動物極側の割球に削減が起るのみでなく、又、体細胞は、各時期で対応する予定生殖細胞より多くの外部細胞質を持ち、これらの細胞にのみ削減が起る(1960b)。正常卵において、削減が遅れる時は外部細胞質の分布に異常が見られる。以上の事実は、削減は核の状態によらない事を暗示する。そしてこの点は Boveri の見解と一致する。又細胞質についてみると事実は削減が内部細胞質によらないで外部細胞質によつてゐることを示す。Strassen (1895, 1896) の見解はこの事実に適合しない。Fogg (1919) は正常の過程で、削減は第2分裂以後から始まると云う。この事は本観察から卵の保存の不適による外部細胞質の分布の変化によると推定される。

アンモニア処理で、いずれも外部細胞質、特にミトコンドリアがおかされ、そして削減の抑制が現われる。これらの事実は亦外部細胞質が削減に関係するとする考えを支持する。

動物極を遠心端にして処理した卵において、第1層は遠心端に分層され、その部が再形成された外部細胞質の量的優越点になり、方向が移動した正常の勾配分布が現われた。そして遠心端側(第1次動物極側)の割球にのみ削減が起り、求心端の割球に起らない。第1卵割が等

割の時は削減の開始が遅延するが、開始部位は動物極側である。第1層が除去された場合には、その除去量に従って削減の開始がおくれる。かかる事実は細胞質の行動を除いて、遠心処理卵における削減の状態については Boveri, Hogue らの結果と同様である。亦、第1層が除去されると、その除去量に比例して再形成された外部細胞質の量が減少する。

これらのすべての事実は亦、削減には外部細胞質が関係することが明白であると同時に削減には外部細胞質或は第1層の量が問題となる事を示す。上記の処理では遠心端と外部細胞質の多い動物極が一致するため正常の細胞質の分布を強調した結果となるので問題を決定づけることが困難である。従つてこれを決定づけるためには、外部細胞質の配置換えを必要とする。軸固定遠心処理の結果、即ち第1層を動物極以外の場所に分層しても、より多くの第1層をもつ部に、より多量の外部細胞質が形成され、その部を頂点として勾配分布が現われ、この部位の割球に削減が起り、体細胞を生じた。また第1層以外の分層も方向を除外すると正常分布にもどつた。

第1層の分離は上記の処理と同じ結果を示す。これらの事実は外部細胞質、特に第1層が削減に不可欠である事を決定づける (1959)。

Boveri は細胞質の分布の配置換えに失敗したが、もし彼の云う細胞質の異極性の基礎をなす不可視的勾配構造の存在を外部細胞質に求めると本見解は、Boveri の実験にすべて適合できる。成熟期の卵に、外部細胞質の勾配分布が現われても、実際に削減が現われるのは第2卵割後になる。換言すれば、外部細胞質の勾配分布後2~3時間後に初めて削減が起る。即ち削減には一定の時間的間隔の必要性を示す。削減は本質的に生化学的反應であるとすればこの間隔は削減を遂行するための反應に必要な時間であると推定され、又トリプシン処理で示された消化時間がこれに暗示的である。生卵と固定卵を同一視する事はできないが、しかし削減の解明にとつて上記の染色体における変化の類似性は極めて重要な意義を持つていと云える。削減が遅延するすべての場合に外部細胞質の量的不足又は損傷の結果であり、軸固定遠心処理卵では、外部細胞質をより多量にもつ位置に削減が起るといふことは、削減物質が或一定量に達しないと削減効果を示さないことを示している。

卵黄除去卵で外部細胞質が一様に分布した場合における削減状態から、成熟卵は、それから生ずる全割球に削減を起し得るだけの外部細胞質を有している事を示して

いる。

Beams & King (1937, 1938) らは遠心処理卵で細胞質の分裂は抑制されたが、核分裂のみ進行し、これらのすべての核が削減した事を報告した。この事は上記の事実と極めて類似的である。

P0~P4は削減が不可能な外部細胞質の量もち、S1~S4は予定運命に従つて一定量の外部細胞質をもっている。此の量は削減有効量である事は明らかである。又厳密に云うとPの各時期でPがもつ外部細胞質は量的に差がある。此の相違は生ずる体細胞の運命と一致している。此の事実の正当性は遠心処理卵の発生において、細胞質の状態によつて運命の予測が可能である事により支持される。S1~S4の外部細胞質の量とP1~P4の外部細胞質の量との差引き量との中でS4-P4の場合が最小であり、この量が削減有効量になるか、否かの限界を示すと考えられる。

以上の見地に立つと Boveri (1910) の絶対性仮説でも説明が可能になる。削減それ自体は実験的に卵の方向に関係なく起し得るがこの場合、正常幼生にならない事を考慮すると正常発生に関しては卵の方向を無視する事はできないと云わねばならない。又削減に関する限り分裂において外部細胞質の不等分配が要求される。

放出される染色体の部分に、けん引糸がみられない事は Van Beneden (1887) の附図及び Schrader (1935) の研究と一致する。従つてもしこの部分が切断されると、染色質は必然的に細胞質に放出される事になる。染色体の組織化学的反應 (1957b) と酵素処理 (1958b) による結果から、外部細胞質或は第1層が削減に不可欠である事が正しいとしても、それらが直接染色体に作用すると考えられない。前述の時間及び上記の事実を考慮すると削減は確かに一種の生化学的反應であろうと考えられる。更にトリプシン処理で示された結果から、染色体の主として蛋白反応陽性の部分がある種の酵素で消化されると推定される。かかる推定が許されると此の消化の原因が細胞質中にあるため、細胞質の最短距離にある染色体のコルベン状部と桿状部との間の細い蛋白質の部分が最初に消化され、その結果コルベン部が細胞質内に放出され、所謂、削減となるとみることが出来る。亦桿状部が削減の際に小粒になる事は削減の機構と本質的に同じと考えられる。かくして削減は染色体の主に蛋白質の部分の分解であるとみる事ができる。このような見解から、外部細胞質或は第1層から化学的な削減誘起物質が生産されて、削減を惹起すると考えられる。酵素処理に

よる染色体の変化と削減の状態との類似は上記の見解に極めて重要な指標を与える。亦この事実から化学的削減誘起物質は弱アルカリ域で働く、蛋白分解酵素の好適濃度で削減が起るのであろう。トリプシン処理において pH 7.6 以上の場合は好結果が得られなかつた事は正常卵の発生の好適 pH が 7.4~7.6 である事を合せ考えると一つの興味ある事実と思われる。

外部細胞質を化学的削減誘起物質の前駆体と見做すと、外部細胞質の量に比例して誘起物質が生産されるとみてよいようであり、この誘起物質が分裂面を短時間に通過し得ないと見做さねばならない。この見解は Beams らと必ずしも一致しない。斯くして正常な削減には先ず割球内に必要な前駆体が分配されて、それから化学的削減誘起物質が出され、好適濃度で削減が起ると考えられる。

Beams 等は直接に削減を起すのは *diminisher* と考えた。これは現在の化学誘起物質と類似しているものと考えられるが、彼の前駆体は動物極に局在する *animal pole plasm* というが具体的な説明がない。そして彼は *diminisher* の生産は *plasm* の量と比例しないと云う事は筆者と異つている。たとえ *plasm* が関与するとしてもその極的配置転換がなされる前に結論を出し得ないように思われる。Ubisch (1943) は赤道帯の細胞質を重視したが実際に分裂間におけるこの部位の細胞質の行動及びこの細胞質と他の部位の細胞質との差に対する解決が必要であらう。

今日一般に旺盛な分裂をするもの程著しい蛋白合成の起る事が知られている。従つて Wilson (1952), Van Beneden (1887) らの考えたように削減を不要物の排棄とみるには困難がある。何故なら発生の旺盛な過程でしかも著しい蛋白合成が起ると考えられる時期に多量の DNA を棄てる事は非合理的とみられるからである。

放出染色体の消失と共にその S 割球の分裂速度は速くなり、これに反して P 割球の速度は次第に遅くなり、G I, G II は明らかにそれらの分裂を停止する事実は放出された染色質が分裂速度の調整に有意義であることを推測させる。

Ubisch (1943) は分化の開始に核と細胞質の協調の必要性を上げ、削減によつてこの協調が始まると考えた。しかし削減前に協調がないとは考えられない。確かに削減現象は体細胞と生殖細胞の分化を決定づけるとみられが、しかし直ちに S と P の分化以外に即ち内、中、外胚葉の分化にまで広げる事は困難である。勿論分化には細

胞質と核との協調が必要であらうし且又発生と共に、より高次の協調がとられる事も予測される。これまで細胞質の不等分布が核に影響する事がのべられた。放出された染色質が遺伝的要素をもたず、しかも核の不等分裂を考慮しなくとも、より高次の分化は漸進的な細胞質の不均等分布により、遺伝的要素の選択的活性化によつて遂行される事が仮定される。

先に報告 (1960) した様に放出された染色質の DNA の消失と共に、その割球に RNA の反応が強くなる事がみられる。体細胞系の細胞質の RNA 反応は生殖系細胞のそれより強く、P O→P 4 で次第に弱くなる。このことから放出染色質は RNA→蛋白合成に関与し蛋白合成を通じて卵の分裂、調整に関与している可能性が推測される。このような考えは Painter (1945) の見解と本質的に一致している。また G I, G II の分裂中止は蛋白質の不足によるのかも知れない。分裂装置、特に星状体に RNA の反応が強く現われる事から放出された DNA は分裂装置の形成に関連している可能性もある。

染色体数の恒常性は多くの場合主として生殖細胞について得られた様に思われる。削減又はこれと類似の現象が蛔虫以外に起る事実から今後種々の生物の体細胞の染色体数を検討すると上記の現象がもつと多数の動物に発見されるかもしれない。

Beatty (1954) は体細胞の染色体数の変動に注意した。この事は上記の推定に暗示的である。また Beatty の見解は今後発生と遺伝との関係において重要な問題を含むものと見做される。既述のように薬品及び遠心処理によつて生殖細胞が体細胞に変わり、生殖細胞が全く消失する場合もあつた。この事は有害動物の撲滅対策に考慮されてもよい様に思われる。

総 括

1. 本研究は馬蛔虫 *Parascaris equorum* (GOEZE) における染色質削減現象の機構を明らかにする目的をもつて、受精卵に物理的、化学的処理を行いその影響をしらべた。
2. 受精直後の卵内の雌、雄核には、旺盛な DNA の増加が起り、第 1 分裂中期までに、両端がコルベン状で中央部が桿状の大型染色体となる。
3. 成熟卵には、動物極から植物極に向つて漸減した外部細胞質の「最的勾配分布」がみられる。外部細胞質の主要構成要素は遠心端のミトコンドリアと重い透明原形質である。正常発生過程において、染色質削減は第 2 分裂から第 5 分裂まで、体細胞のみに起る。放出された

染色質は囊胚期までに消失する。また予定生殖細胞の分裂は漸次おくれ、囊胚期に生じた始原生殖細胞は分裂を停止する。

4. 卵割の各時期で体細胞はそれに対応する生殖細胞系割球に比べてより多量の外部細胞質をもっている。外部細胞質をより多くもつ割球にのみ削減が起る。温度の急変、貯蔵不良卵には、前述の外部細胞質の分布の変化が起り、同時に削減の開始がおくれる。

5. 塩化リチウム、ロダンソーダ、アンモニア処理卵及び紫外線照射卵には、外部細胞質の損傷、分布の変化が起り、削減の変化もおこる。アンモニア処理により、外部細胞質のミトコンドリアが著しい作用を受け、削減が抑制され、始原生殖細胞の数が正常の8倍にも増加する。ロダンソーダ処理卵もこれに準ずる。

6. 第1層を分離すると、その量に従つて削減がおくられて起り、体細胞の分化の抑制と生殖細胞の分化の促進、生殖細胞の増加が現われる。

7. 分裂像の回転前に卵黄を分離された卵には、その後外部細胞質の均等な分布が起り、この卵から生じたすべての割球に染色質の削減が起り、生殖細胞のない異常幼生になる。分裂像の回転後に卵黄を分離された卵は正常な外部細胞質の勻配分布を維持し、正常な幼生に発生する。

8. 遠心処理によつて第1層を任意の位置に配置転換した場合、より多量の第1層を有する位置に、より多量の外部細胞質が形成され、その位置が2次的に動物極になり、そこに生ずる割球に削減が起り、体細胞を生ずる。卵は正常に発生する。

9. 細胞質の配置換えにより生殖細胞と体細胞とを交互にかえることができる。

10. 削減において、切断される染色体の部位は中央部と太い両端の境界であり、この部位は主に蛋白からなる。トリプシンによつて、正常の削減状態と同様に染色体は切断される。

11. 削減はある一定量の第1層又は外部細胞質の存在の下で起る。成熟卵から卵黄を除いた細胞質中の外部細胞質はその卵の削減誘起可能量である。又、S4割球の外部細胞質の量からP4割球のそれを差引いた量は割球において削減を起し得るか否かの限界を暗示する。

12. 削減の原因は核内になく、外部細胞質内に存在する。そしてこれから出されるであろう化学的な削減誘起物質の至適濃度の存在によつて削減は惹起されると推定される。

13. 放出されたクロマチンのDNAは他のものになる。

そしてまたこのクロマチンが蛋白合成に関与することにより、体細胞の分裂の速度の調整に役立つと考えられ得る可能性及び生殖細胞の分裂の遅れ、そして停止する原因について考察された。

14. 生殖細胞を体細胞に変えうる事実は有害な動物の撲滅への対策に有意義と考えられる。

文 献

- 1) Beams, W. H. & R. L. King (1937): Effect of ultra-centrifuging on the egg of *Ascaris megalcephala*. Nature, 138, 369-370.
- 2) Beams, W. H. & R. L. King (1938): An experimental study of chromatin diminution in *Ascaris*. J. Exp. Zool., 77, 425-438.
- 3) Beatty, T. (1954): How many chromosomes in mammalian somatic cells. Internatl. Rev. Cytol., 3, 177-197.
- 4) Bonnevie, K. (1901): Über Chromatin diminution bei Nematoden. Zeitschr. f. Naturwiss., 36, 275-289.
- 5) Boveri, T. (1887): Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *A. megalcephala* Anat. Anz., 2, 688-693.
- 6) Boveri, T. (1892): Über die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei *A. megalcephala* Ber. d. Ges. f. Morph. und Phys., 8, 114-125.
- 7) Boveri, T. (1899): Die Entwicklung von *A. megalcephala* mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. Festschr. f. Kupffer, Jena, 383-430.
- 8) Boveri, T. & M. N. Stevens (1904): Über die Entwicklung dispermer *Ascaris*. Zool. Anz., 408-417.
- 9) Boveri, T. (1904): Protoplasmadifferenzierung als auslösender Faktor für Kernverschiedenheit. Verk. Phys. med. Ges. Würzburg. N. F., 34, 16-20.
- 10) Boveri, T. (1910): Über die Teilung zentrifugierter Eier von *A. megalcephala*. Arch. f. Entw.-mech., 30, 101-125.
- 11) Dostoiewsky, A. (1888): Eine Bemerkung zur Furchung der Eier von *A. megalcephala*. Anat. anz., 3, 646-648.
- 12) Fogg, L. C. (1919): A study of chromatin diminution in *Ascaris* and *Ephestia*. J. Morph. Physiol., 50, 413-444.
- 13) Herla, O. (1895): Étude des Variations de la

- Mitose chez l' *A. megalcephala*. Arch. Biol., 13, 423-518.
- 14) Hogue, M. J. (1910): Über die Wirkung der Zentrifugalkraft auf die Eier von *A. megalcephala*. Arch. f. Entw.-mech., 29, 109-145.
 - 15) Meyer, O. (1895): Celluläre Untersuchungen an Nematodeneiern. Jena. Naturwiss., 29, 391-410.
 - 16) Müller, H. (1903): Beiträge zur Embryonalentwicklung der *A. megalcephala*. Zoologica., 41, 1-30.
 - 17) Painter, T. S. (1945): Chromatin diminution. Trans. Conn. Art. Sci., 30, 443-448.
 - 18) Retzius, G. (1914): Über die früheren Studien der Entwicklung der Eier bei *A. megalcephala*, mit besonderer Rücksicht auf die Protoplasmastruktur. Biol. Unters. Retzius., 18, 19-40.
 - 19) Schleip, W. (1911): Das Verhalten des chromatins bei *Angiostomum nigrovenosum*. Arch. Zellforsch., 7, 87-138.
 - 20) Schneider, C. C. (1891): Untersuchungen über die Zelle. Arb. a. d. Zool. Inst., 9, Wien.
 - 21) Schrader, F. (1935): Note on the meiotic behaviour of long chromosomes. Cytologia., 6, 422-426.
 - 22) Strassen, Z. (1895): Entwicklungsmechanische Beobachtungen an *Ascaris*. Verh. D. Zool. Ges., 5, 83-95.
 - 23) Strassen, Z. (1896): Embryonalentwicklung der *A. megalcephala*. Arch. f. Entw.-mech., 3, 27-195.
 - 24) 只野正志・只野柳 (1955c): 蛔虫卵卵膜 (卵殻) の構成とその除去, 科学, 25(6), 309-310.
 - 25) 只野正志・只野柳 (1955b): アンチホルミンと酵素の二段処理による卵膜の除去, 動雑, 64, 14.
 - 26) 只野正志・只野柳 (1955b): 蛔虫受精卵の遠心処理における卵軸の固定法及び卵膜第5層の物理的除去法について, 動雑, 65, 8, 305.
 - 27) 只野正志・只野柳 (1956a): 馬蛔虫卵の所謂 chromatin diminution について, 動雑, 65(3,4), 86.
 - 28) 只野正志・只野柳 (1956b): LiCl, NaSCN による蛔虫卵の初期卵割における細胞質変化と異常胚の検討, 動雑, 65(3, 4), 99.
 - 29) 只野正志・只野柳 (1956c): 蛔虫受精卵の遠心処理における卵軸の固定法及び卵膜第5層の物理的除去について, 動雑, 65(8), 305.
 - 30) 只野正志・只野柳 (1957a): NH₃ 処理による馬蛔虫卵の始原体細胞から始原生殖細胞への転換, 動雑, 66(2, 3), 73.
 - 31) 只野正志・只野柳 (1957b): 馬蛔虫卵の精子侵入直後から初期幼生期迄における核酸の消長, 動雑, 66(2, 3), 63.
 - 32) 只野正志・只野柳 (1957c): 線形動物 (無脊椎動物発生学), 111, 培風館, 東京.
 - 33) 只野正志・只野柳 (1958a): 極性の人為的転換とその機構, 動雑, 67(1, 2), 28.
 - 34) 只野正志・只野柳 (1958b): 馬蛔虫卵の染色質削減機構について, 動雑, 68(1, 2), 42-43.
 - 35) 只野正志・只野柳 (1959): 極性及び予定体細胞と生殖細胞の転換を支配する細胞質の性状, 動雑, 68(2, 3), 144.
 - 36) 只野正志・只野柳 (1960a): 極性の人為的転換と極性の乱れが分化に及ぼす影響, 細胞化学シンポジウム ((No. 11, 印刷中).
 - 37) 只野正志・只野柳 (1960b): 馬蛔虫の割球の分化の機構, 動雑, 69(2), 6.
 - 38) Ubisch von L. (1943): Über die Bedeutung der Diminution von *Ascaris megalcephala*. Acta Biotheoretica., 7, 163-181.
 - 39) Van Beneden, E. & Y. Neyt (1887): Nouvelles recherches sur la Fécondation et la Division mitotique chez l' *Ascaride megalcephale*. Bull. Acad. Roy. Belg., 14, Ser. 3, 214-295.
 - 40) Walton, A. C. (1918): The oogenesis and early embryology of *A. canis*. J. Morph., 30, 527, 603.
 - 41) Wilson, B. E. (1925): The cell in development and heredity. New York.
 - 42) Yao, T. & S. Pai (1942): Heteropynosis and chromatin diminution in *Cosmocera* sp. Sci. Rec. Acad., Sinica, I, 197.
 - 43) Zaccharias, O. (1913): Die Chromatin-Diminution in den Furchungszellen von *A. megalcephala*. Anat. Anz., 43, 33-53.
 - 44) Zoja, R. (1896): Untersuchungen über Entwicklung der *A. megalcephala*. Arch. mikr. Anat., 47, 218-260.

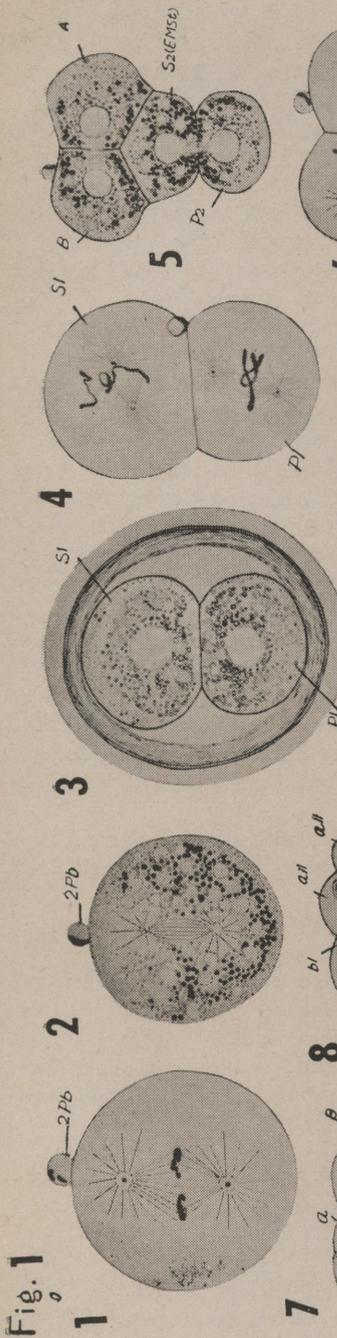


Fig. 1

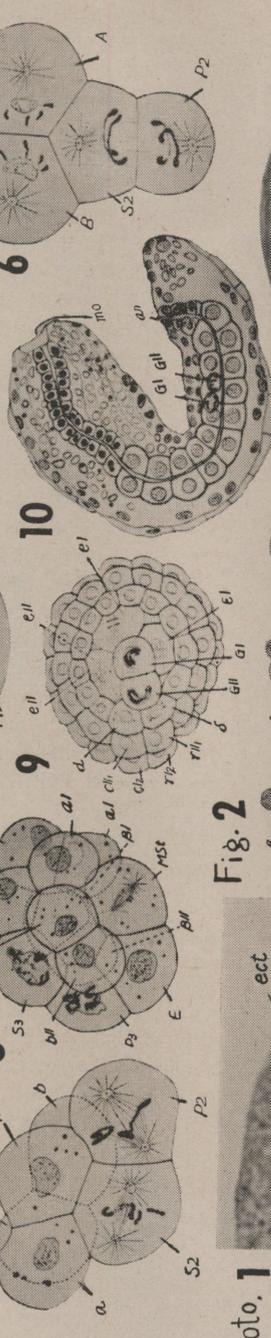


Fig. 2

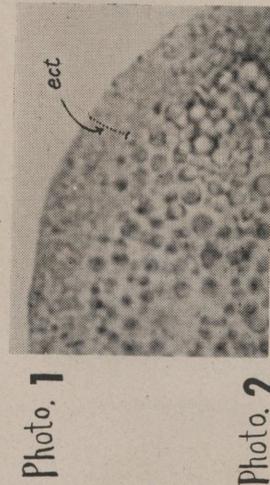


Photo. 1

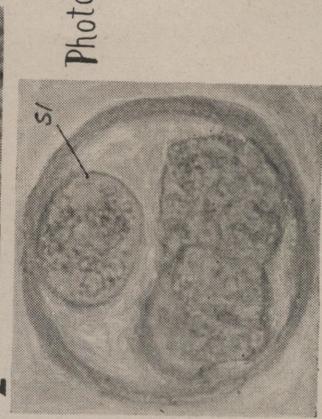


Photo. 2

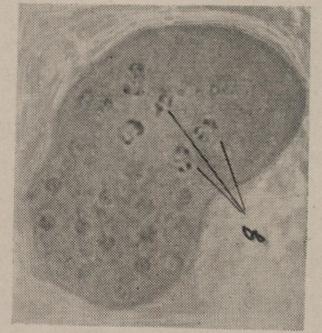


Photo. 3

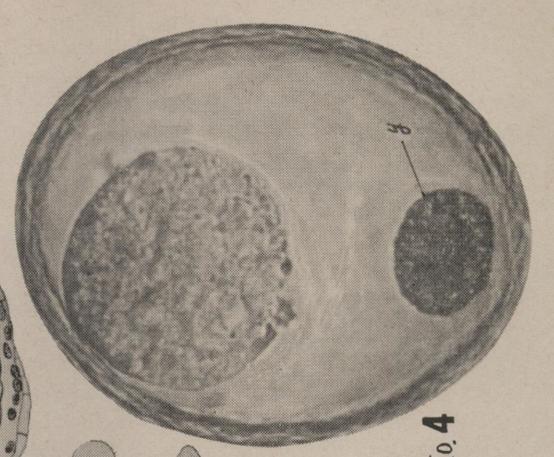


Photo. 4

附図の説明

Fig. 1 正常発生 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10—固定卵, 2, 3, 5—生卵で, 1と2, 5と6はそれぞれ同時期

1, 2—1細胞期, 2Pb…第2極体, 3, 4—2細胞期, S1…第1次体細胞, P1…第1次予定生殖細胞, 5, 6—4細胞期(T字型期), S1の娘細胞(A,B)に削減が起る, S2(EMSt)…予定第1次中胚葉割球, 第1次内胚葉細胞及び口道細胞である, P2…第2次予定生殖細胞, 7—6細胞期の側面, a, d, b, βはS1の娘細胞で放出染色質がみられる, S2に染色側削減が起る, S2P2は胚の腹側, 8—12細胞期の側面, MSt及びEは胚の腹側, P3は胚の後端, S3は第3次体細胞で, 予定第2次外胚葉及び第3次中胚葉細胞である, 9—囊胚期の腹面, GI, GII…始原生殖細胞, 削減しない染色体をもつ, 内胚葉細胞(eI, eII, EI, EII)は既に陥入, d, δ…第4次体細胞(第2次予定中胚葉細胞), c, γ…S3の子孫, 10—幼生期の側面, GI, GIIは分裂しない, mo…口, an…肛門.

Fig. 2 外部細胞質又は第1層分離卵の異常発生(模式), 小粒をもつ球は分離された外部細胞質, a-d…4細胞期, e…8細胞期, 4細胞に始原染色体がみられる, f—幼生期, 多くの生殖細胞がみられる.

Photo. 1 正常卵の外部細胞質. 外部細胞質は多数の顆粒からなり多くの液胞をもつ内部細胞質から区別される, ect…外部細胞質

Photo. 2 LiCl 処理卵の異常発生, S1は染色質削減を起すが分裂は抑制される.

Photo. 3 NaSCN 処理卵の発生, 囊胚後期, 生殖細胞の増加がみられる, g…生殖細胞

Photo. 4 遠心処理による卵黄分離卵, 求心端側に分離された卵黄球がみられる. y…卵黄

STUDIES ON THE MECHANISM OF CHROMATIN DIMINUTION IN THE EGG OF PARASCARIS EQUORUM (GOEZE)

MASASHI TADANO

(*Biological Laboratory, Faculty of Liberal Arts and Education,
Gifu University, Gifu, Japan*)

The present study was performed on the change of the chromatin diminution in the physically or chemically treated eggs. The matured egg showed the gradient in the distribution of the ectoplasm which was thickest at the animal pole and thinnest at the vegetal, and the ectoplasm mainly consisted of mitochondria and hyaloplasm. As were stratified at the heavy pole by centrifuging, they were named the 1st layer. Description was done on the histochemical and physical nature of the layer. The chromatin diminution occurred in only the somatic cell which had a larger amount of the ectoplasm than the correspondent propagative cell and it occurred first in the primary cell (S1). A long undiminished chromosome consisted of club-shaped end having no traction fibre and rod-shaped middle part having many traction fibres. The intermediate position between both showed positive reaction of protein and the other part of chromosome positive Feulgen reaction. Chromosome belongs to the collective type. In the later metaphase, the middle part becomes many granules and the intermediate position between both disappeared. With the moving apart of the granular daughter chromosome, which was the middle part, the end was discarded in the cytoplasm. Then, the discarded chromatin was smashed to large number of pieces and majority of the pieces disappeared until the gastrula stage. In accordance with this, the Feulgen reaction of the discarded chromatin became weak

and finally negative. In the process of development the propagative cell divided later than the somatic and the primordial germ cell remained undivided.

When the egg underwent rapid change of temperature or was reserved on inconstant temperature, the distribution of the ectoplasm changed and the diminution was delayed. When was treated with Lithium chloride, Sodium thiocyanate and ammonia or radiated with ultraviolet ray, the damage of the ectoplasm appeared. Consequently, the occurrence of the diminution was very suppressed, the number of the somatic cell decreased and that of the germ cell increased. Similar events were induced by the removal of the ectoplasm and the change in its distribution. With the increase in the amount of the ectoplasm or the first layer broken off from the egg, the occurrence of the diminution is retarded and the number of the germ cell increased. When yolk was broken before the rotation of mitotic apparatus, the even distribution of the ectoplasm, the chromatin diminution in all the blastomeres and the disorganization resulted.

When the egg was centrifuged, large amount of the ectoplasm was reformed at the centrifugal end keeping a large amount of the first layer, and the cell appeared at this end differentiated in SI and occurred the diminution. The particularly interesting event was that by the redistribution of the ectoplasm the prospective somatic cell changed into the germ cell and the latter into the former. Fixed chromosome was digested by trypsin in pH 7,4-7,6 with the same state as in normal diminution. These data supported that the diminution was induced by the optimum concentration of chemical inducer derived from a certain amount of the ectoplasm, especially the first and this inducer might be possibly proteolytic substance having optimum pH in the range of neutral and weak alkali.

Significance of the diminution might be on the point that the discarded chromatin controlled rhythm and continuation of division by the contribution to metabolism such as protein synthesis useful to performation of the differentiation. Artificial inversion from the germ cell into the somatic gives a considerable suggestion for further investigation on the mechanism of differentiation and the extirpation of harmful animals.