

寄生蠕虫類の染色体に関する研究 (I)

肝吸虫の成熟分裂における染色体, 精子完成過程および受精過程——押しつぶし法による観察——

長 博 雪

久留米大学医学部寄生虫学教室

(昭和53年6月16日 受領)

吸虫類の配偶子形成および受精過程に関する研究には, Goldschmidt (1908) 以降多数の研究がある. 肝吸虫 *Clonorchis sinensis* におけるこれらの過程に関しては, 齊藤(1898), 中山(1910), 小林 (1922) の研究があり, 小宮・鈴木 (1963) がこれらを集成して述べている.

しかし, 染色体に関しては, いまだ明確さを欠く部分も多い. 吸虫類の配偶子形成および受精過程の観察には, 種々の方法があるが, 筆者は Snow (1963) の押しつぶし法を応用し, 肝吸虫についてこれらの過程を観察した. この結果, いわゆる正常な受精過程と染色体に関する知見を得たので報告する.

実験材料および方法

観察虫体: 佐賀県産モツゴ (*Pseudorasbora parva*) を人工消化し, これより得た肝吸虫メタセルカリアをラットに経口投与して, 感染後13日目より6日毎に解剖, 摘出した虫体を使用した.

虫体処理: 0.005%のホルヒチンを含む TC-199組織培養液中で37°C 3時間の短期培養を行ない, 1:3酢酸エタノールで24時間固定した. その後虫体を塩酸アルコール中に入れ保存した.

観察: 上記処理虫体を45%酢酸にて脱色分別し, 実体顕微鏡下で micropin を用いて, 精巣および卵巣をそれぞれスライドガラス上に取出し, カバーガラスをかけて押しつぶし標本として観察に供した. また受精過程の観

察には, micropin にて卵巣末端から輸卵管・メーリス腺・子宮起始部を一塊として取出し, 不要な周囲組織を除去し, 押しつぶし標本としたものを用いた.

結 果

1. 精子形成過程

精巣を押しつぶすと, 精原細胞・精母細胞・精細胞が集団を形成してみられる. 精原細胞は分裂を繰り返して, 8個ずつの細胞集団を形成し, 第一精母細胞となる. Fig. 1 は第一精母細胞の分裂中期であり, 8個の第一精母細胞のそれぞれに7個の二価染色体がみられる. 第一精母細胞は成熟分裂の第一分裂を経て16個の第二精母細胞の集団を形成し, さらに第二分裂を経て32個の精細胞の集団を形成する.

精細胞は精子完成過程に入り, はじめ正円形であつた核はしだいに楕円形からコマ状となり, しだいに細長くなり, やがて縮毛状の集団を形成する. 次に縮れが伸び, 針状ないし毛髪状の32本の束状の精子群となり, 完成精子となる (Fig. 2 A-F).

2. 精子形成過程における染色体

精巣の押しつぶし標本では, 精原細胞の分裂中期像は比較的少ないが, 成熟分裂の各過程の像は多数観察された.

精原細胞中期は100核板以上, 第一精母細胞中期および第二精母細胞中期は200核板以上について染色体数の検索を行ない, $n=7$, $2n=14$ を得た.

精原細胞中期の染色体の大きさは, 最も大型の染色体で平均 $3.8\mu\text{m}$, 最も小型の染色体で $0.9\mu\text{m}$ であつた.

精原細胞における中期核板は, 2対の大型の染色体群

本研究は文部省科学研究, 奨励研究 (177145号) の補助を受けて行なわれた. 記して謝意を表する.

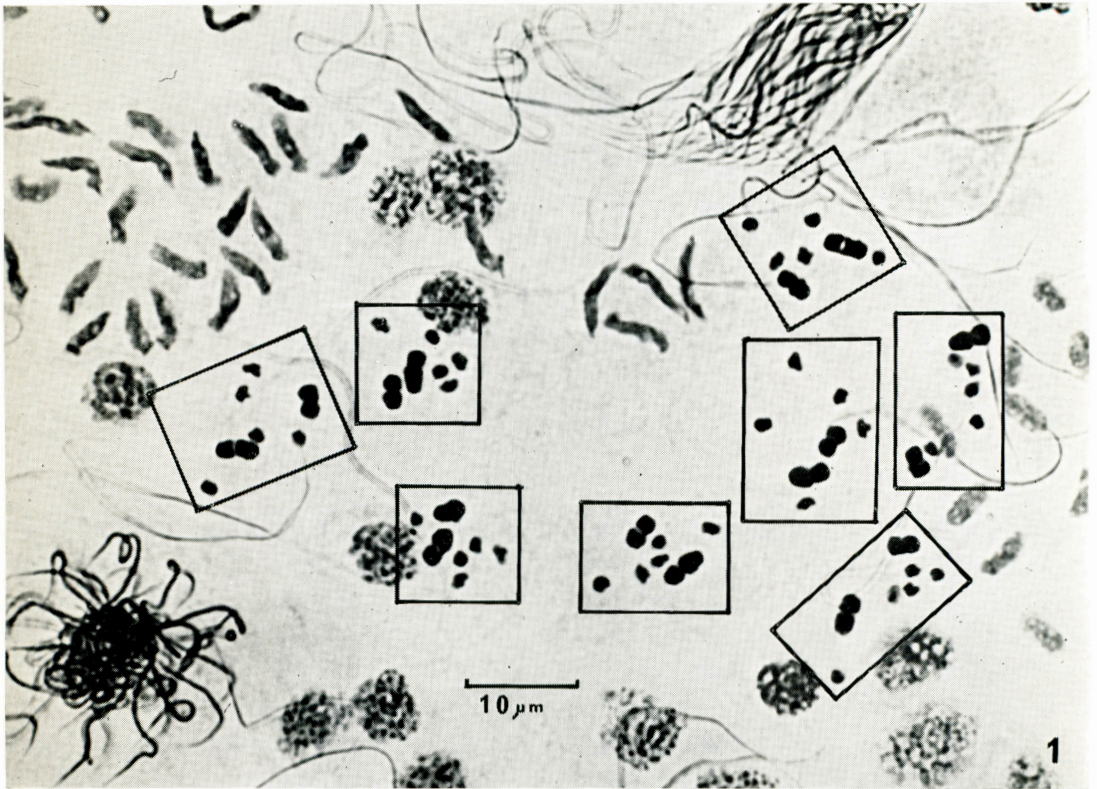


Fig. 1 Eight primary spermatocytes at metaphase.

と5対の小型の染色体群より構成される。動原体の位置は、大型2対の染色体では次中部にあり、小型5対の染色体では端部または次端部にあるものを含むが詳細は不明であった (Fig. 3)。

成熟分裂における第一分裂の核板では、明瞭な二価染色体が認められた。第一中期の染色体の大きさは、最大のもので平均 $7\mu\text{m}$ 、最小のもので平均 $0.8\mu\text{m}$ であった (Fig. 4)。

3. 卵子形成過程および受精過程

卵巢では卵原細胞の分裂像は非常に少なかった。卵巢の中心部には、明瞭な核小体と大型の核を有する第一卵母細胞の集団があり、ほとんど前期(細糸期~接合期)のものであった。

卵巢より出た第一卵母細胞は直ちに精子の侵入を受ける。輸卵管中には多数の精子がみられた。またこの時期に、1個の第一卵母細胞は4~5個の卵黄細胞とともに卵殻に含まれる。以後の受精過程および卵割の2細胞期までの過程を Fig. 5 の模式図によって示す。

子宮起始部付近の第一卵母細胞の核は前期から中期の

状態にあるが、その細胞質には明瞭な精子頭部の存在が確かめられた。精子頭部は、はじめ針状のやや曲つた形であるが、その後しだいに形を変じ、長さが短く、幅が大きくなり、長円形を呈して雄性前核化する (Figs. 5 G-H)。

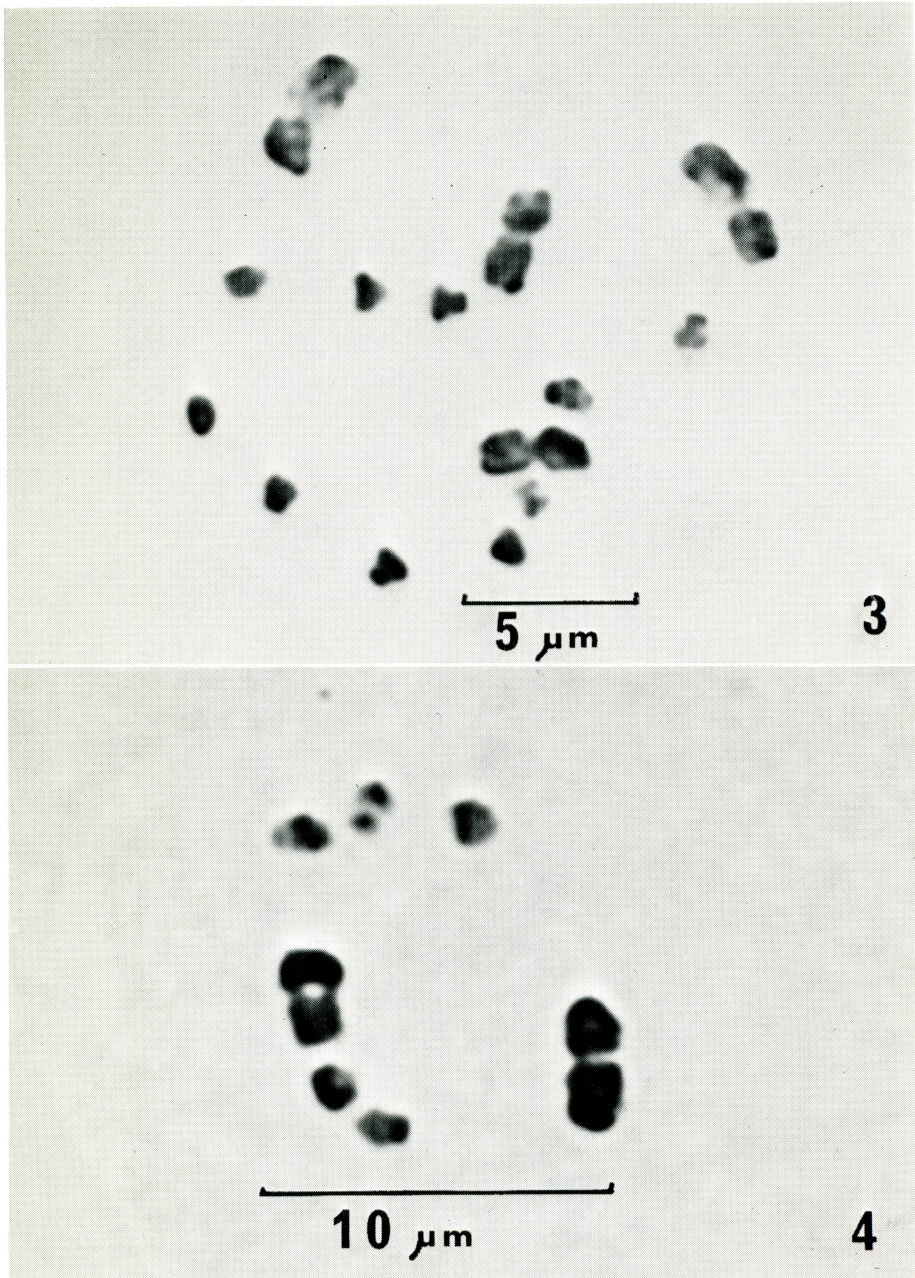
第一卵母細胞は後期を経て、第1極体を放出する (Figs. 5 I-J)。さらに、第二卵母細胞の分裂により第2極体を放出して卵細胞となる (Figs. 5 K-M)。卵細胞の核は雌性前核となり、中間期では膨化し、雄性前核も同様に膨化し染色性が薄れる (Fig. 5-N)。その後、雌性前核および雄性前核は分裂期に入り、核板を形成するが、後期に雌性前核由来の染色体と雄性前核由来の染色体とは共通な極に向かって別れ、第1卵割を終る (Figs. 5 O-Q)。

第1卵割の後、中間期を経て第2卵割に入るが、この頃になると卵黄細胞の核は不鮮明となる (Fig. 5-R)。

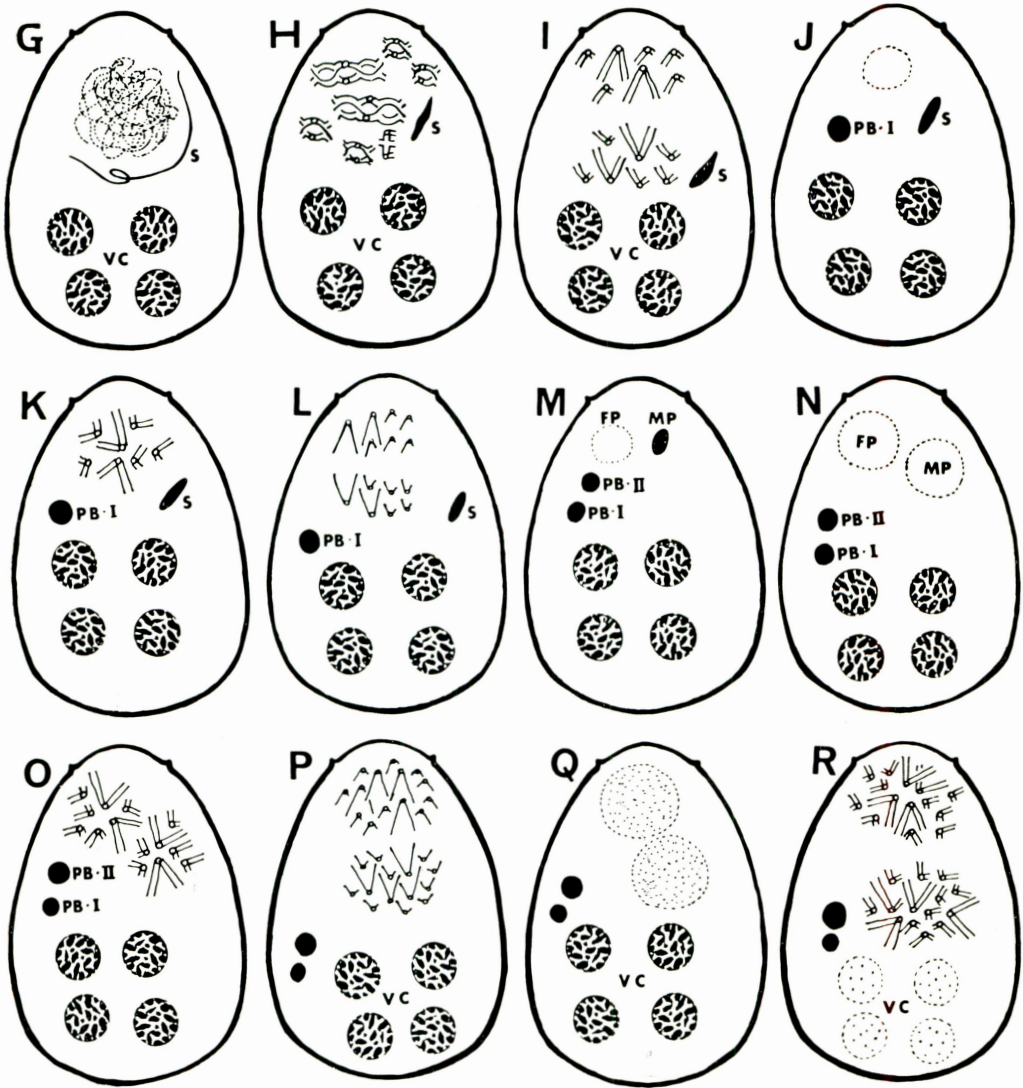
上述のいくつかの時期を写真によって示したものを Figs. 6~11で、記号 J-R は模式図 (Fig. 5) の J-R とほぼ同時期のものである。



Fig. 2 Various stages of spermiogenesis (A to F).
 A. Just after the meiosis. 32 spermatids are shown.
 F. Bundle of spermatozoa.



Figs. 3-4 Chromosomes of *Clonorchis sinensis*.
3. Spermatogonial metaphase ($2n=14$).
4. Metaphase of a primary spermatocyte (7 II).



5

Fig. 5 Diagram showing early stages of capsule after fertilization, prophase of primary oocyte to metaphase of second cleavage division.

G : prophase of primary oocyte.

H : metaphase of primary oocyte.

I : anaphase of primary oocyte.

J : interphase of secondary oocyte.

K : metaphase of secondary oocyte.

L : anaphase of secondary oocyte.

S : sperm head

VC : vitelline cell

PB I : first polar body

PB II : second polar body

M : interphase of secondary oocyte.

N : interphase of first cleavage division.

O : metaphase of first cleavage division.

P : anaphase of first cleavage division.

Q : interphase of second cleavage division.

R : metaphase of second cleavage division.

FP : female pronucleus

MP : male pronucleus

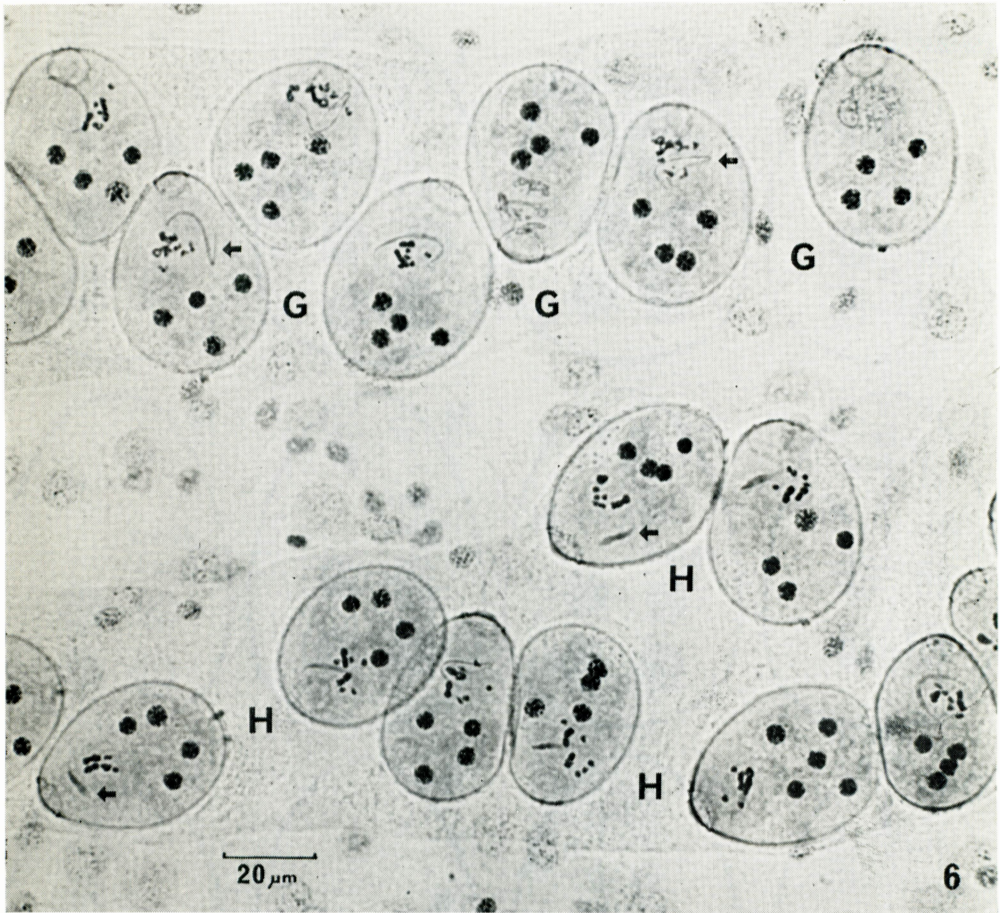


Fig. 6 Capsules in beginning of uterus. Two portions of the winding uterus are shown. For alphabets in the photographs refer to diagram in Fig. 5.

4. 卵子形成過程および受精過程における染色体

第一卵母細胞の分裂中期では、第一精母細胞の分裂中期にみられたのと同形態の明瞭な7個の二価染色体がみられた (Fig. 10). また1個の第一卵母細胞に対する精子の侵入は1個のみであり、2個以上の精子の侵入は認められなかった. 逆に、この時期に至つても細胞質中に精子、あるいは雄性前核を含まない卵母細胞も観察された. これがいわゆる不受精卵ではないかと思われる.

考 察

近年一部の吸虫類において、3倍性の個体が存在することが知られるようになり、Sakaguchi and Tada (1976), Terasaki (1977) が、ウエステルマン肺吸虫について、また Sakaguchi and Nakagawa (1975), 坂口ら (1977), 森山・辻 (1977) が日本産肝蛭において3

倍体の存在を報告している. 一般に3倍性の個体が通常の有性生殖を通じて維持されることは困難であり、単為生殖等の特殊な機構が考えられる.

Jones and Mackiewicz (1969) は、条虫類の一種である *Atractolytocestus huronensis* が3倍体であり、3倍性を維持している機構は精子形成過程での「成熟分裂の崩壊」のため、機能的な精子ができず、卵は未受精のまま単為生殖により次世代が形成されるものであろうと述べている.

著者もこれらの点に着眼し、生殖形態を明らかにするためには、精子形成過程のみでなく卵子形成過程および受精過程の検索が是非必要であると考えた. そのために Snow (1963) が行なつた方法を応用して、肝吸虫の精子形成過程、卵子形成過程および受精過程を押しつぶし法により観察した. その結果、肝吸虫においては従来述

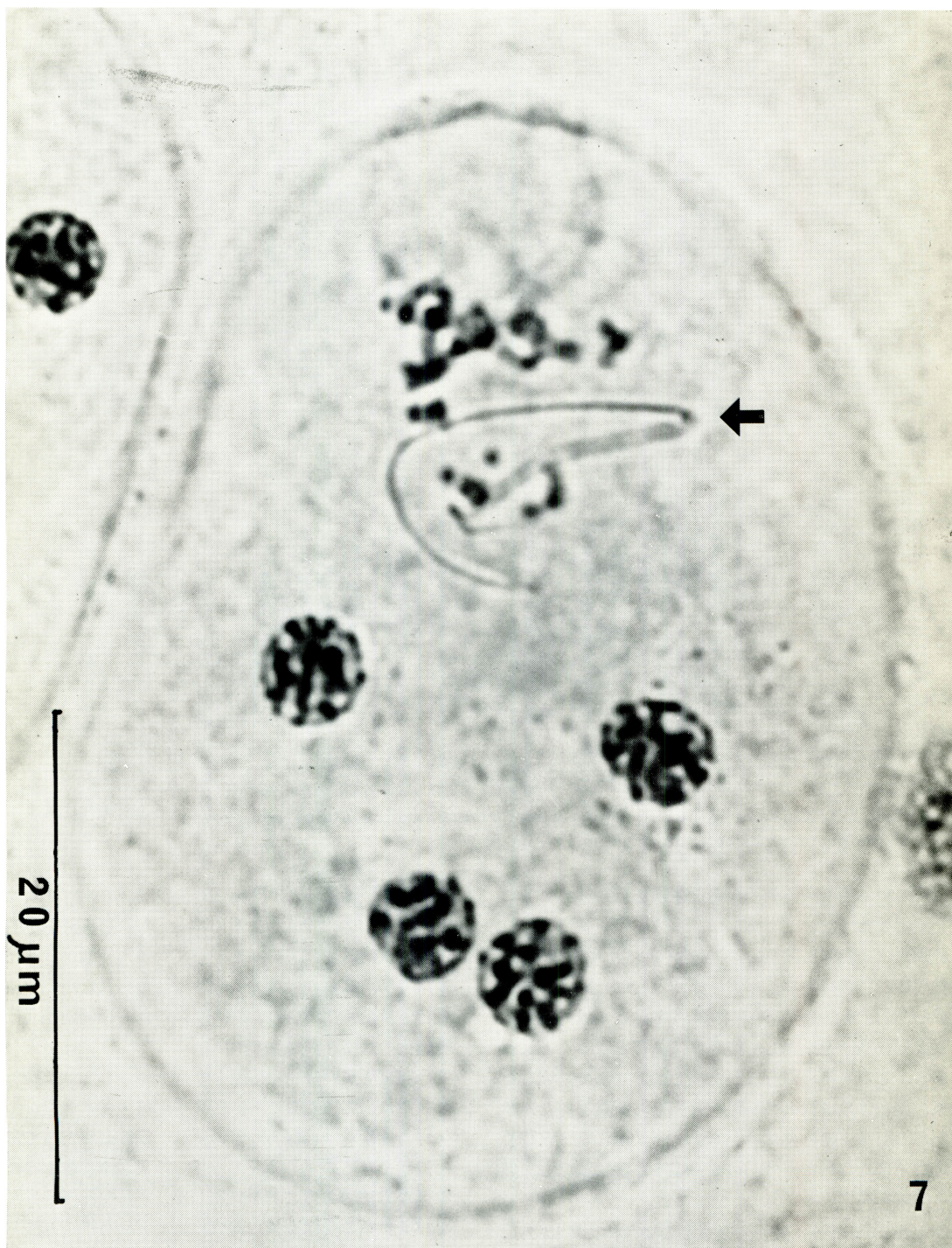
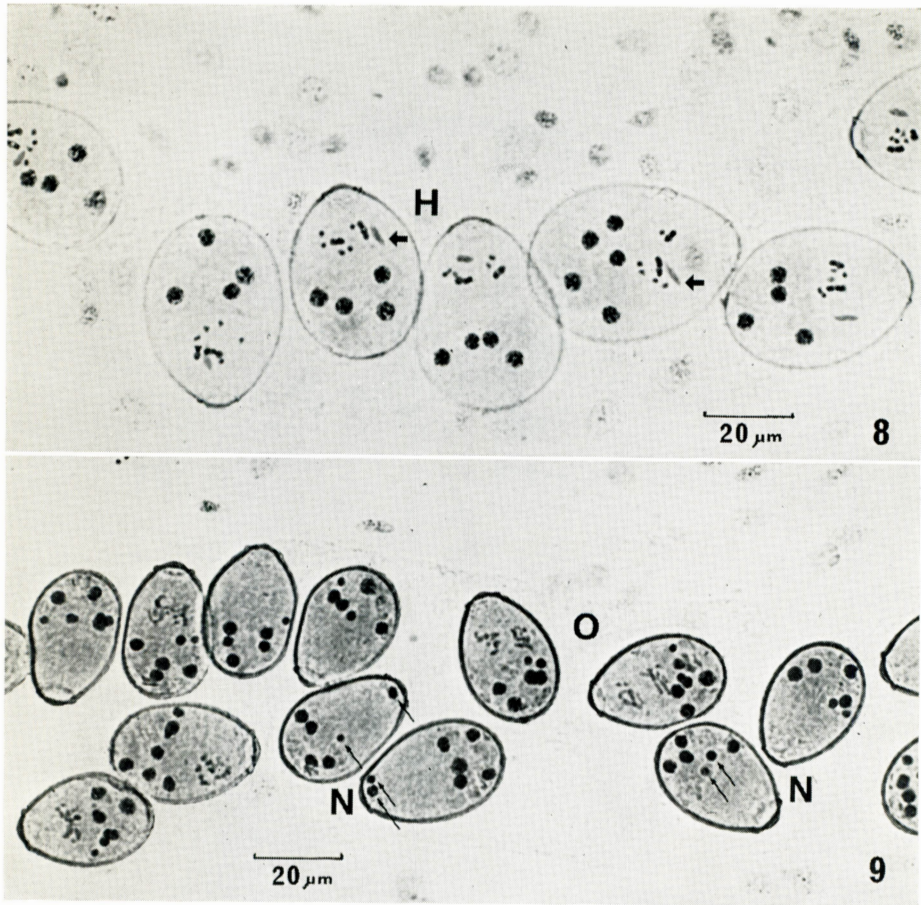


Fig. 7 A single capsule showing 7II of primary oocyte at diakinesis. Four large nuclei in the lower part are of vitelline cells. Arrow indicates a sperm head.



Figs. 8-9 Capsules in uterus. Two portions of the winding uterus are shown. For alphabets in the photographs refer to diagram in Fig. 5.

べられている通り、典型的な両性生殖を行なっていることを確認した。

肝吸虫の染色体に関しては、齊藤(1898)、中山(1910)、小林(1922)が研究し、小宮・鈴木(1963)がこれらを集成し、「肝吸虫の核の染色体数は6個で、成熟現象により2個の極球を放出し、染色体は3個となる」と述べている。しかし筆者の行なった押しつぶし法で追究した結果、染色体数は先人の結果とは異なる所見を得た。すなわち、肝吸虫の染色体は $n=7$, $2n=14$ であつた。また坂口・草野(1977)は、エアードライ法で観察し、同様の成績を得ている。

Opisthorchiidae に属する吸虫類の染色体に関しては、Jha(1975)が *Opisthorchis felineus* および *O. geminus* の核型について研究しており、*O. felineus* は、 $n=8$, $2n=16$ で2対の大型染色体、3対の中型染色体、

3対の小型染色体より構成され、*O. geminus* は $n=9$, $2n=18$ で、2対の大型、6対の中型および1対の小型染色体より構成されていると述べている。筆者が調べた肝吸虫では、2対の大型の染色体は認められたが、中型の染色体は全く認められなかつた。これら種間の差異は核型進化の点で注目される。

今回筆者が肝吸虫に応用した押しつぶし法は、染色体の観察はもちろんのこと、配偶子形成・受精過程が、生体での位置をほぼ保ちながら、広い範囲にわたつて容易に観察できるので、連続的な変化の過程を追跡するのに有効な方法であることを証明した。本法は他の吸虫類および条虫類の受精過程の観察にも非常に有用な方法と思われる。

尚この方法により、すでに Cho *et al.* (1977) は、*Paragonimus westermani* の生殖形態が単為生殖であ



Fig. 10 A single capsule showing 7II of primary oocyte at metaphase. Four large nuclei in the lower part are of vitelline cells. Arrow indicates a sperm head.

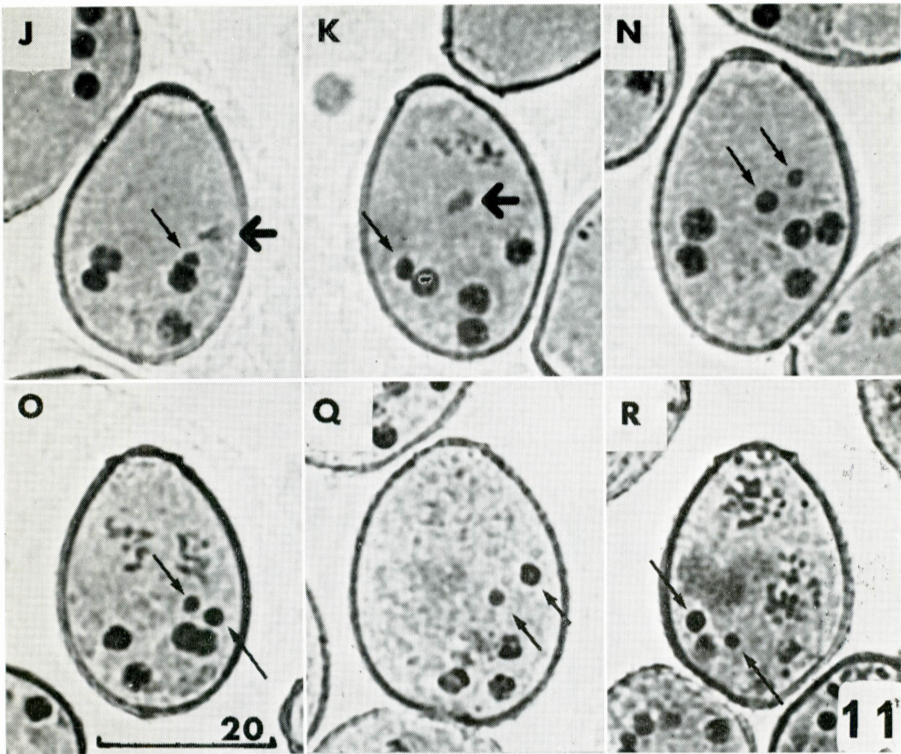


Fig. 11 Various stages after first division of oocyte in the capsule.

- J : interphase of secondary oocyte.
 K : metaphase of secondary oocyte.
 N : female pronucleus and male pronucleus at interphase.
 O : prophase of first cleavage division.
 Q : two cell stage of cleavage division (interphase).
 R : metaphase of second cleavage division.
 Large arrow indicates a sperm head.
 Small arrows indicate polar bodies.

ることを明らかにしている。

結 論

筆者は、Snow (1963) が行なつた押しつぶし法を応用し、肝吸虫の染色体および配偶子形成・受精過程を観察した。肝吸虫の染色体数は、 $n=7$ 、 $2n=14$ であり、大型2対の染色体と小型5対の染色体より構成されていることを明らかにした。また、配偶子形成・受精過程は、典型的な両性生殖を行なっていることを確認し、写真によつて示した。

本法は、染色体の観察のみならず、生殖過程の観察にも非常に有用な方法である。

謝 辞

稿を終るにあたり、染色体研究の機会を与えて下さ

いました久留米大学医学部寄生虫学教室・塘 普教授ならびに同小児科学教室・山下文雄教授に深謝するとともに、終始御指導と御校閲を賜りました長崎大学教養部生物学教室・茅野 博教授に心から感謝致します。

また、御協力いただいた教職員各位に感謝致します。

本論文の要旨の一部は昭和52年4月の第46回日本寄生虫学会総会において発表した。

文 献

- 1) Cho, H., Sasada, K. and Takao, Y. (1977) : Gametogenesis of *Paragonimus westermani*. Chromosome Inform. Serv., 23, 29-30.
- 2) Goldschmidt, R. (1908) : Über das Verhalten des Chromatins bei der Eireifung und Befruchtung des *Dicrocoelium lanceolatum*. Arch.

- f. Zellf., 1, 232-244.
- 3) Jha, A. G. (1975) : Cytogenetics, evolution and systematics of digenea. (Trematoda : Platyhelminths). Egypt. J. Genet. Cytol., 4, 201-233.
 - 4) Jones, A. W. and Mackiewicz, J. S. (1969) : Naturally occurring triploidy and parthenogenesis in *Atractolytocestus huronensis* Anthony. (Cestoidae : Caryophyllidae) from *Cyprinus carpio* L. in North America. J. Parasit., 55, 1105-1118.
 - 5) 小林晴治郎 (1922) : 籠形二口虫の動物学的方面. 日新医学定期増刊, 3-56.
 - 6) 小宮義孝・鈴木了司 (1963) : 肝吸虫の生物学, 日本における寄生虫学の研究 3. 120-122, 目黒寄生虫館, 東京.
 - 7) 森山信子・辻 守康 (1977) : 日本産肝蛭の染色体構成と表現型にみられる差異. 寄生虫誌, 26 (増), 54.
 - 8) 中山平次郎 (1910) : 籠形二口虫卵子の發育. 東京医会誌, 24, 1-51.
 - 9) 齊藤精一郎 (1898) : 籠形二口虫卵内容及其仔虫の構造. 東京医会誌, 12, 579-587.
 - 10) Sakaguchi, Y. and Nakagawa, C. (1975) : A note on the chromosomes of the common liver fluke, (*Fasciola* sp.) from Japan. Chromosome Inform. Serv., 19, 20-21.
 - 11) Sakaguchi, Y. and Tada, I. (1976) : Chromosomes of a lung fluke, *Paragonimus westermani*. Chromosome Inform. Serv., 20, 23-24.
 - 12) 坂口祐二・鍋岡明子・上野計 (1977) : 寄生蠕虫の染色体に関する研究 (8) 日本産肝蛭 (*Fasciola* sp.) とオーストラリア産 *F. hepatica* の核型比較. 寄生虫誌, 26 (増), 54.
 - 13) 坂口祐二・草野美智子 (1977) : 寄生蠕虫の染色体に関する研究 (9) 肝吸虫の核型. 寄生虫誌, 26 (増), 58.
 - 14) Snow, R. (1963) : Alcoholic hydrochloric acid-carmine as a stain for chromosomes in squash preparations. Stain Technol., 38, 9-13.
 - 15) Terasaki, K. (1977) : Studies on chromosomes of the lung flukes in Japan. Jap. J. Parasit., 26, 222-229.

Abstract

STUDIES ON THE CHROMOSOMES OF PARASITIC HELMINTHS (I)
CHROMOSOMES IN MEIOCYTES, SPERMIOGENESIS AND FERTILIZATION
OBSERVED BY MEANS OF A SQUASH METHOD IN *CLONORCHIS SINENSIS*
(TREMATODA : OPISTHORCHIIDAE)

HIROYUKI CHO

(Department of Parasitology, Kurume University School of
Medicine, Kurume 830, Japan)

The chromosomes of *Clonorchis sinensis* were observed by a squash method using Snow's (1963) alcoholic hydrochloric acid-carmin. The method was found to be available for the observation of gametogenesis and process of fertilization of this fluke, which were illustrated photographically. The main results are as follows.

1) The chromosome number of this fluke was $2n=14$ in the spermatogonium which consisted of two pairs of large submetacentrics and five pairs of small subtelocentrics or acrocentrics (Fig. 3). Seven bivalents ($n=7$) were found in the primary spermatocytes as well as in the primary oocytes (Figs. 1, 4, and 10). Various stages of spermiogenesis were shown in Fig. 2.

2) Each of the capsules within the beginning of uterus contained four to five vitelline cells and a primary oocyte in which a sperm head was clearly shown (Fig. 6-10). The earliest stage of the primary oocytes within the capsules was leptotene to zygotene and the sperm head within it was elongated. Thereafter, the primary oocytes were found to progress to metaphase through pachytene, diplotene, and diakinesis (Figs. 6-8, and 10). The shape of sperm head within the primary oocyte condensed gradually to assume male pronucleus (Figs. 6-8).

After the division of secondary oocyte a female and a male pronucleus were less stainable within the capsule presumably because of their entering into interphase of the first cleavage division (Fig. 11). Metaphase of the second cleavage division was the last stage to be observed by the present method (Fig. 11).