

# ヒドラの細胞分裂周期について

海 藤 是 夫

*H. japonica* ITÖの細胞核をトリチウムでラベルするため、 $^3\text{H}$ -チミジンを経口的に胃腔へ投与する微量注入法をくふうして、細胞核にとりこませることに成功している。これにより、オートラジオグラフィーの手法をもちいて黒化粒子数が経時的に一定の減少を示すことを確認し、黒化粒子数の半減するに要する時間をもってその細胞の一細胞分裂周期をあらわすものとして4種の細胞についてその細胞分裂周期を推定している。

## 1 はじめに

本報告では高等学校生物Ⅰにおける再生、生物Ⅱにおける課題研究などに関する基礎資料を得る目的で、細胞の新生と細胞老化による脱落がおよそつり合っていると考えられる状態のヒドラについて、まずその細胞核を $^3\text{H}$ -チミジンでラベルする方法をくふうし、次いで細胞分裂周期を推定しようと試みた。

ヒドラの形態形成の調節機構として、かつて口丘下部の成長域の存在が主張され、そこから成長抑制物質が、また口丘部より成長促進物質がそれぞれ分泌されて基部へ向って拡散し、この両物質による拮抗作用のメカニズムが考えられた (Burnett<sup>1)</sup>, 1962)。しかし Campbell<sup>2)3)</sup> (1965, 1967) はオートラジオグラフィーによる研究で、成長域とされていた部分で細胞分裂頻度が特に高いことはないと報告した。

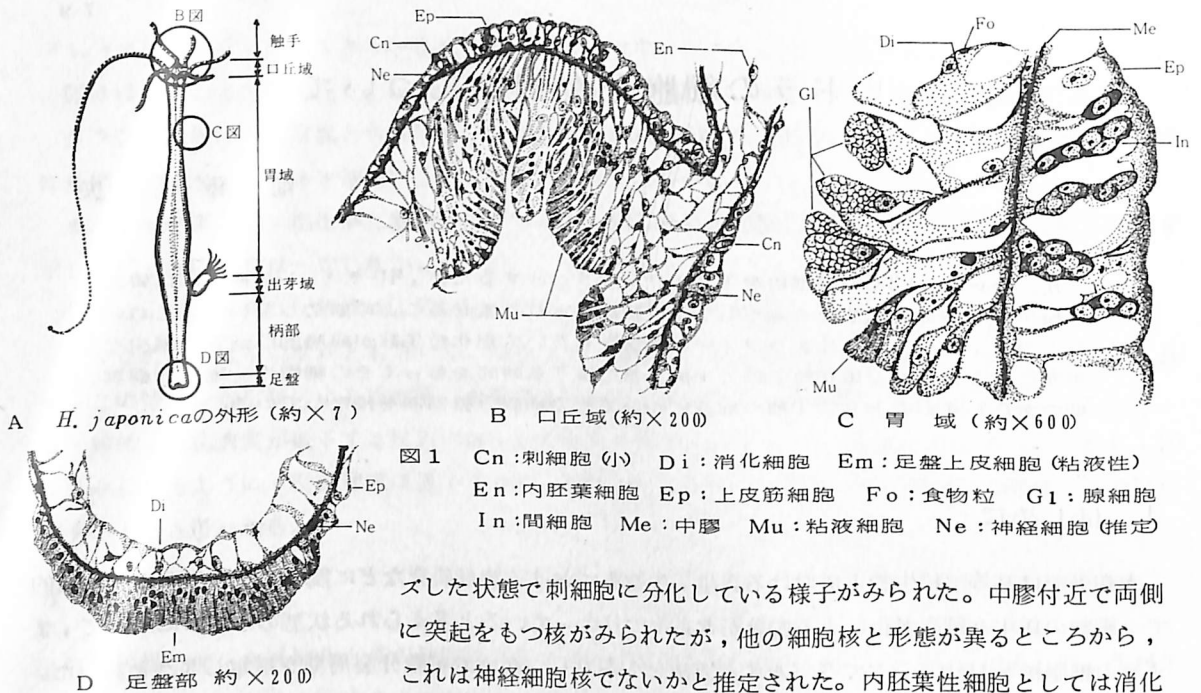
しかし口丘下部域を中心として細胞集団が触手方向と足盤方向へ順次移動し、古い細胞が体両末端からしだいに脱落していくとされていることから (野田<sup>4)</sup>, 1974)、このような細胞の相対移動には各部位における細胞分裂の割合 (Campbell) の違いに加えて細胞分裂周期の違いも関与しているのでないかとその予想のもとで、筆者は細胞分裂周期についてオートラジオグラフィーによる検討を試みた。

## 2 材 料

材料として *Hydra japonica* ITÖ をもちいた。個体の飼育は概ね Leomis<sup>5)</sup> の報告した方法によった。培養液として Littoralis solution をもちい電気定温器中で約20℃で飼育し、餌としてブラインシュリンプ幼生を与えた。充分摂食させると指数関数的に出芽による無性生殖を行って増殖した。また卵巣、精巣の発達も若干の個体でみられた。

＜ヒドラの形態について＞ 外部形態は図1, Aのごとくであり、全体を大きく触手、口丘域、胃域、出芽域、柄部、足盤の6領域に分けることができる。

内部形態としては、中央の中膠をはさんで外側に外胚葉性細胞層、内側に内胚葉性細胞層がある (図1, B, C, D)。ブアン固定、ヘマトキシリン・エオシン二重染色による切片の観察より、外胚葉性細胞として上皮筋細胞、間細胞、刺細胞が区別された。間細胞は細胞質部分が特にヘマトキシリンで濃染するので区別は容易である。さらに口丘下部域を除いてはクラスターとして存在し、全部がシンクロナイ



ズした状態で刺細胞に分化している様子がみられた。中膠付近で両側に突起をもつ核がみられたが、他の細胞核と形態が異なることから、これは神経細胞核でないかと推定された。内胚葉性細胞としては消化細胞、分泌顆粒を含む腺細胞、更にムチカルミン染色により赤染することから粘液細胞が区別された。

### 3 方法

$^{14}\text{C}$ -ロイシンを含んだ液の中にヒドラを置くと、かなり容易にこのアミノ酸をとりこんでラベルされる。しかし $^3\text{H}$ -チミジンに対して、ヒドラ体壁は不透過性を持つため上記の方法では全くラベルされない。したがって $^3\text{H}$ -チミジンで細胞核をラベルするには経口投与が必要である。既にCampbellは胃腔中にガラス毛細管で注射する方式で成功しているが具体的注射方法についての記述はない。筆者はごく微量の還元型グルタチオンがある種のヒドラに摂食行動を惹き起す(Loomis, 1955 Lenhoff, 1961)ことにヒントを得て次の二つの経口投与方法を試みた。その結果、本研究では全て(2)の方法によって実験を行った。

＜ $^3\text{H}$ -チミジンの経口投与方法＞ (1)  $^3\text{H}$ -チミジンをゼラチンに混合し、還元型グルタチオンを添加してこのゼラチン小塊を摂食させた。しかしこのゼラチン小塊をヒドラがのみこむのに長くて十数分時間がかかるため、 $^3\text{H}$ -チミジンが水中に溶け出して損失が多く、結局ラベルされる程度が低かった。

(2) 1mlツベルクリン注射器の針に、先の径約0.1mmのガラス毛細管をパラフィンで接着した微量注入装置を作った(図2)。注入器のピストンの動きは注射器に接着したスクリュウコックのねじを操作し、また注入装置の上下左右の動きはマイクロマニピュレーターを利用した。ホロウスライドに2滴の水を置き、その中に置かれたヒドラに還元型グルタチオンを添加して摂食行動を起こさせ、口部にガラス毛細管の先端を触れると、ただちにヒドラはガラス毛細管をのみこんでいく。胃腔中央部をこえてのみこんだら一頭あたり約 $8\mu\text{Ci}$ ( $0.1\mu\text{l}$ )

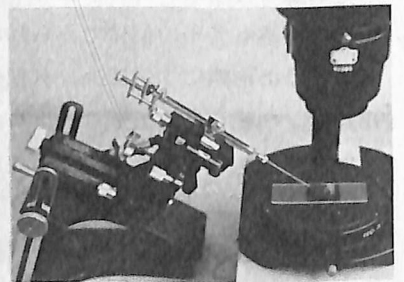


図2 微量注入装置

の $^3\text{H}$ -チミジンを注入した。

<オートラジオグラフィ>  $^3\text{H}$ -チミジン投与後、必要時間、餌を与えずに培養液中に飼育し、5  $\mu$ 厚のパラフィン切片とした。原子核乳剤被覆は全てdip coating法によった(乳剤: SAKURA, NR-M2)。被膜処理後、暗箱に入れ、約4°Cの冷凍庫中に2週間放置して被曝させた。現像は常法によった。

<黒化粒子数の計測>  $^3\text{H}$ -チミジンがDNAにとりこまれることによって、図3の例に示されるように $^3\text{H}$ による黒化点が生じた。

黒化粒子を油浸にて検鏡し、まず乳剤膜中の最上部黒化粒子にピントを合わせてその数を数え、次にいま数えた粒子のピントがはずれて消えるまでレンズを下げ、この面にピントが合った粒子数を加算して計測していく方法をとった。 $^3\text{H}$ -チミジンが核酸中に確かにとりこまれたのかどうか調べるために、対照切片をWorthingtonのDNaseにより処理したところ、核の黒化粒子数の激減がみられたことから、細胞質中の若干を除いては核にとりこまれていることを確認した。

核にとりこまれた $^3\text{H}$ -チミジン量と、 $^3\text{H}$ より放出される $\beta$ 線により生じる黒化粒子とは平行関係にあることから、黒化粒子数の比較はとりこまれた $^3\text{H}$ -チミジンの相対量を比較していることになる。

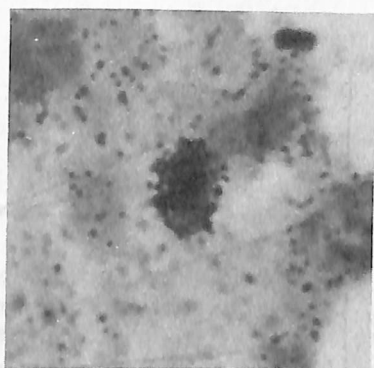


図3 トリチウムによる黒化銀粒子

#### 4 結果と考察

充分成長したヒドラに週二回、適量の餌を与えることによって出芽をほとんどなくし、かつ体も縮小しない程度に飼育することができる(20°C)。この状態のヒドラはいわば平衡状態のヒドラと呼ぶことができる。即ち細胞の新生と、老化による脱落がほぼつり合っている状態と考えられる。本研究では全てこの状態のヒドラを使用した。一方餌を充分与え一定速度で無性生殖を行っている親ヒドラは定常状態<sup>2) 3)</sup>のヒドラといわれるが(Campbell)、これに比べて平衡状態のヒドラは一般的生理活性はある程度低下した状態と考えられる。

平衡状態ヒドラの胃腔に $^3\text{H}$ -チミジンを注入後、6時間以降について口丘上皮筋細胞核、口丘下部(胃域上部)間細胞核と消化細胞核、足盤上皮粘液性細胞核のそれぞれについて黒化粒子数を計測し、切片上最大の黒化粒子数をもつそれぞれの核、20個についての平均値を算出した。注入後6時間ですでに細胞核はラベルされたが、時間の経過にしたがって一細胞核あたりの黒化粒子数は図4の片対数グラフで示されるごとく、しだいに直線的に減少していくという結果を得た。これは $^3\text{H}$ -チミジン注入時にたまたま細胞分裂に先立つDNA合成期にあった細胞核が $^3\text{H}$ -チミジンをとりこみ、その細胞核が分裂するに際して $^3\text{H}$ 量が娘細胞に分配されたことによりこのような減少がみられたものと考えられた。細胞分裂にあたり染色体が分離し、ランダムな組合せで娘核を形成すると考えられるから、図4のグラフの勾配から求められる黒化粒子数の半減期が平衡状態ヒドラ組織、*in situ*、の細胞の一細胞分裂周期をあらわしていると考えられる。黒化粒子数半減期とその比の値を表1に示した。この結果、細胞の種類に応じて細胞分裂周期に違いがあることがわかった。

間細胞は未分化な胚的細胞であり、刺細胞や神経細胞に絶えず分化していくことが従来認められてい

表1

| 細胞の種類  | 半減期    | 比   |
|--------|--------|-----|
| 上皮筋細胞  | 約84hs  | 1.1 |
| 間細胞    | 約74hs  | 1   |
| 足盤上皮細胞 | 約2週間   | 3.9 |
| 消化細胞   | 約148hs | 2.0 |

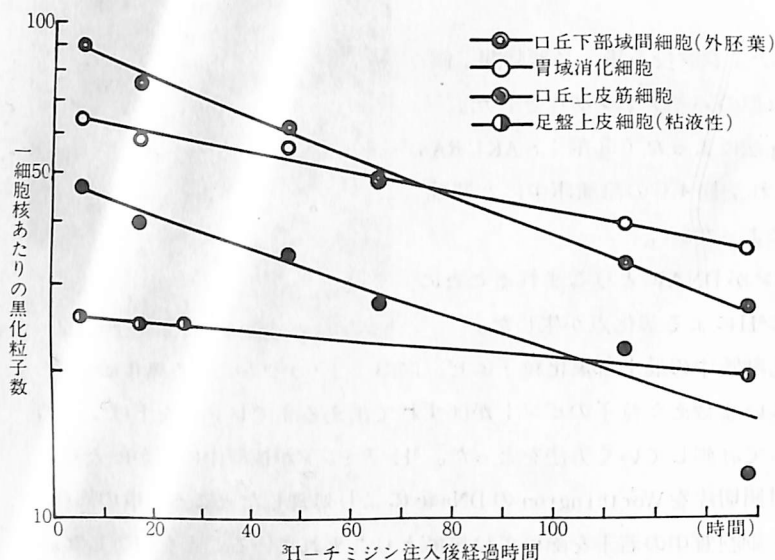


図4

い値を示したことから、これは口丘上皮筋細胞の代謝活性が高いことに裏付けされるものと解釈されよう。足盤の上皮細胞は、柄部の上皮筋細胞がしだいに基部へ送られて最後に分化したものといわれているが、間細胞のそれに比べて約4倍の分裂周期をもつことから、もっとも老令に達した度合いが高い細胞といえるだろう。

Campbellによると間細胞を含む外胚葉層における細胞分裂像の割合(Thymidine index<sup>2)3)</sup>は胃域におけるそれが体両末端方向部域におけるそれと比して高いことが示されているが、胃域を中心として体両末端に向う細胞の相対的流れは、分裂頻度と分裂周期の二つの要因が関与し、かつ細胞分裂とそれにひき続く分化の制御にあたっているとされる現在追跡されつつある未知の化学物質などの作用の総和として生じる現象として理解されなければならないであろう。

## 5 謝 辞

御多忙中にもかかわらずヒドラの同定と、いろいろ御教示賜った愛媛大学伊藤猛夫教授に心から御礼申し上げます。またRIの入手、実験など全般にわたって御指導賜った新潟大学清水泰二教授、田口賢三博士に深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Burnett, A. L. ; The Maintenance of Form in Hydra. Regeneration 20th Symp. of the Soc. for the Study of Dev. and Growth, Roland Press, New York, (1962), 27-52
- 2) Campbell, R. D. ; Cell Proliferation in Hydra, Science, 148, 28, (1965), 1231-1232
- 3) ——— ; Tissue Dynamics of Steady State Growth in *Hydra littoralis*, Dev. Biology, 15, 6, (1967), 487-502
- 4) 野田 幸一 ; ヒドラ細胞間の相互作用, 遺伝, 28, 10, (1974), 48
- 5) Loomis, W. F. ; The Cultivation of Hydra Under Controlled Conditions, Science, 117, 22, (1953), 565-566
- 6) Lenhoff, H. M. ; Activation of Feeding Reflex in *Hydra littoralis*, The Biology of Hydra, Univ. of MIAMI Press, (1961), 203-229