

兩棲類の血島由來の赤血球に於けるヘモグロビンの出現について

藤原正武 (東京學藝大學) (1952年5月27日受領)

兩棲類の胚に最初に現れる赤血球は卵黄囊の腹面に發達する血島に由來するものであるが、これにヘモグロビンの出現する時期についてのこれまでの記載には可なり疑問がある。何故ならば、無染色標本でのヘモグロビンの固有の黄色色調だけでは微量な存在の識別が甚だ困難であり、また呈色反應を利用しても必ずしも判定が容易ではないからである。筆者はヘモグロビンの検出にこれまでに用いられた種々の呈色反應の適用を試みた結果、ベンチジンが赤血球の生鮮材料に對して鋭敏な反應を示すことを見出したので、これによつて兩棲類の血島由來の赤血球に於けるヘモグロビンの出現時期を調べた。

本文に入るに先立ち、御指導と御校閲を賜つた恩師犬飼哲夫教授に厚く御禮申上げる。

材料及方法 材料は *Rana japonica*, *Bufo vulgaris* 及び *Hynobius tokyoensis* の3種で、野外から採集した卵塊を實驗室内で飼育したものを用いた。赤血球内のヘモグロビン微量検出法はベンチジン反應により次の如くに行つた。(1) スライドに血液を塗抹して空氣中で乾燥し、(2) 顯微鏡で一視野中に赤血球が平均に散在する部分をさがす。(3) ベンチジン溶液 (96% アルコール 2cc に微量のベンチジンを溶解したものと、70% アルコール 4.5cc に過酸化水素液 0.5cc を加えたものとを混合する) をスライドの一侧に滴下し、顯微鏡で見ながら視野の半部をベンチジン溶液で覆うようにガラス棒で擴げ、1~3 分間放置する。(4) 流水で 1~2 分間洗滌、アルコール脱水、キシロール透化、バルサム封入の後、(5) 顯微鏡の一視野中でベンチジン處理を行つた部分と無處理の部分とを比較して褐色の呈色反應の有無を判定する。ベンチジン處理を顯微鏡下で行つたのは幼若な胚では赤血球の数が少ないので單にスライドの一部にベンチジン處理を施しただけでは都合よく一視野の中で比較ができるとは限らないためであり、また、脱水・透化を行つたのは微弱な呈色反應の識別をも容易にする目的のためである。

觀察 (1) *Rana japonica* 胚が孵化してまだ吸盤で寒天質に吸着している時代に心臓の鼓動が始まつて血液の循環が起り、外鰓が發達する。外鰓の發達途上にある胚の發育段階を第1外鰓の發達程度を標準にして定めると、(1) 全體が棍棒状をなし2個の瘤狀の側枝をそなえたもの、(2) 側枝を2個そなえたもの、(3) 側枝を3個そなえたもの、(4) 側枝を4個そなえたもの、(5) 側枝を5個そなえたものとなすことができ、(1) に於いて既に心臓の鼓動が心臓部の體表の搏動によつて認められ、(2) に至れば外鰓の血管内を流動する血球を觀察することができる。

赤血球のベンチジン反應は (1)、(2) では陰性であるが、(3) になると微弱ながら陽性となり、(4) 以後に於いては極めて明瞭な反應を呈する。すなわちベンチジン反應が陽性となるのは第1外鰓の側枝が3個生じた時代で、このときの胚の全長は約 6.5mm に達し、赤血球の形態は循環開始當時のものと未だ全く同じで大型の球形をなし、細胞質内には多數の卵黄球があつて典型的な卵黄球期 (藤原 '51) の特徴をそなえている。

(2) *Bufo vulgaris* この種類も孵化後吸盤で寒天質に吸着している時代に血液循環及び外鰓の發達が始まり、赤血球のベンチジン反應は血液循環開始後外鰓發達の途中で陰性から陽性に轉化する。外鰓發達途上の胚の發育段階を第1外鰓の形態によつて定めると、(1) 全體が棍棒状でこれに側枝が2個瘤狀にあらわれたもの、(2) 全體がまだ棍棒状を保ちこれに側枝が3個あらわれたもの、(3) 3個の側枝が稍伸長したもの、(4) 4個の側枝をそなえたもの、(5) 側枝が5個以上となつたもの (この種類では側枝は 14~15 個位生ずる) とすることができ、(1) に於いて既に心臓の鼓動が觀察され、(3) に至つて始めて外鰓内の血管を流動する血球を認め得るようになる。

赤血球のベンチジン反應は (1) で陰性で微弱、(2) で微弱な陽性、(3) 以後では明瞭な陽性を示し、*Bufo* でもヘモグロビンの最初の出現時期は循環開始後第1外鰓に側枝が3個瘤狀に生じた時代であると

見ることができる。このときの赤血球はやはり卵黄球期のもので、*Rana japonica* の場合と同様の形態をそなえ、胚の全長は約 8.5mm に達する。

(3) *Hynobius tokyoensis* 有尾類では孵化前に血液の循環及び外鰓の発達が起る。外鰓には勿論後には側枝を生ずるが、赤血球のベンチジン反応が陽性となるのは側枝の分化する以前である。この時代の胚の發育段階を外鰓の發達程度を標準にして定めると、(1) 第1・2・3外鰓が前後に相接して並ぶ3個の瘤状をなすもの、(2) 各外鰓が棍棒状をなし第1外鰓のみが遊離して第2・3外鰓が相接しているもの、(3) 外鰓は棍棒状をなすが伸長がすすんで各外鰓の互に遊離するに至つたものとするができる。心臓の鼓動は(1)に於いても認められるが、外鰓内血管の血球の流動は外胚葉蓋に妨げられて(3)になつても觀察できない。

赤血球のベンチジン反応は(1)で陰性、(2)で微弱な陽性、(3)で明瞭な陽性を示す。すなわちこの種類では血液の循環開始後、まだ外鰓に側枝を生ぜず棍棒状をなして、第2外鰓が第3外鰓に相接している状態の時代に赤血球中にヘモグロビンが現れるものとするができる。この時代の胚の全長は約 9.5 mm で、その赤血球はやはり無尾類の場合と同様に卵黄球期のものである。

考察 兩棲類の血島由来の赤血球に於けるヘモグロビンの出現に關し、MAXIMOW ('10) は *Rana* で彼の所謂 Primitive Erythrocyten につき「扁平卵圓形でヘモグロビンを有する」と述べ、これよりも幼若な、球形で、卵黄球を多數に含有する時代のものについては言及していない。また、COGHILL 及び MOORE ('24) は *Amblystoma* の生鮮材料で「游泳運動第2日目」に認められるようになると記載し、GOSS ('28) もこれを引用して「ヘモグロビンの最初の出現時期を指摘」したものとしている。更に、SLONIMSKI ('37) は呈色反應の結果として *Rana temporaria* で全長 6.2~6.5mm の時代をヘモグロビンの最初の出現時期と考えている。これらはいずれもヘモグロビンが血液循環開始後に現れるものと見てゐる點では一致するが、最初に出現する時期については尙研究の要がある。筆者は LEPHÈNE ('18) がホルマリン固定の切片で組織學的行つたベンチジンによる呈色反應を血液の生鮮塗抹標本に適用して、顯微鏡視野の半部に對してベンチジン處理を施し、無處理の部分と同一視野内に於いて比較觀察することによつてヘモグロビンの最初の出現時期を明かにした。すなわち、無尾類の *Rana japonica* 及び *Bufo vulgaris* では第1外鰓に3個の側枝が生じ始めた頃に、また、有尾類の *Hynobius tokyoensis* では3個の外鰓のいずれにも未だ側枝を生ぜず、棍棒状をなして互に相接している状態からこれがはなればなれになる途上で、はじめて、赤血球にヘモグロビンが現われる。このときの赤血球はいずれの種類に於いても未だ循環開始當時の形態をそなえ、球形を呈し、卵黄球を多數に含んで、典型的な卵黄球期の特徴を示している。このヘモグロビンの出現時期は MAXIMOW が *Rana* について述べている赤血球が「扁平卵圓形」を呈する時代、或は SLONIMSKI が *Rana japonica* よりも小型の種類 *Rana temporaria* で記載している全長 6.2~6.5mm の時代、更に COGHILL 及び MOORE が報告した *Amblystoma* の「游泳運動第2日目」の時代よりも明かに早期である。

尙、ヘモグロビンに對するベンチジンの作用機序は、過酸化水素液の強力な酸化作用によつてヘモグロビンからグロビンを分離せしめ、これによつて生じたヘマチン様の基質にベンチジンが作用するものであらうと推察される。また、ベンチジンは過酸化酵素に對しても陽性の反應を呈するが、この場合には、例えば GRAHAM ('18) の白血球内過酸化酵素檢出法では、40%アルコール 10cc に過酸化水素液 0.02cc を加えるにすぎない。これに對して本法では全量 7cc 中に過酸化水素液 0.5cc を含むのでその酸化力は極めて強力であり、このために過酸化酵素は破壊されてベンチジン反應には全く關與しなくなる。従つて本法に於けるベンチジンの作用機序は過酸化酵素檢出の場合とは全く異なるものと見ることができる。

摘要 (1) *Rana japonica*, *Bufo vulgaris* 及び *Hynobius tokyoensis* で血島由来の赤血球にヘモグロビンの出現する時期を調べた。

(2) ヘモグロビンの微量檢出法は血液の生鮮塗抹標本をベンチジン溶液(微量のベンチジンを 96% アルコール 2cc に溶解したもの、過酸化水素液 0.5cc を 70% アルコール 4.5cc に加えたものとを混合)

で處理して生ずる褐色色調によつた。

(3) ヘモグロビンの出現時期は, *Rana* 及び *Bufo* では孵化後で, 第1外鰓に3個の側枝を生じたとき, また *Hynobius* では孵化前で, 互に相接している3個の外鰓がはなればなれになりかけるときで, その赤血球は, いずれの種類でも未だ球形を呈し多數の卵黄球を有している。

文献 COGHILL, G. E., '24, Anat. Rec. 28, 131. 藤原正武, '51, 動雜. 60, 74. GOSS, C. M., '28, Jour. Exp. Zool. 52, 45. GRAHAM, G. S., '18, Jour. Med. Research. 39, 15. LEPHENE G., '19, Ziegler's B. 65, 183. MAXIMOW, A., '10, Anat. Anz. Erg. 37, 67. SLONIMSKI, P., '37, Anat. Anz. Erg. 85, 55.

Résumé

On the Hemoglobin Formation in the Embryonic Erythrocytes of Amphibia

MASATAKE FUJIWARA (Tokyo Gakugei University)

The developmental stage in which hemoglobin occurs in embryonic erythrocytes was examined in the amphibians, *Rana japonica*, *Bufo vulgaris* and *Hynobius tokyoensis*. The earliest erythrocytes in circulating blood, which have been derived from the blood islands, do not contain hemoglobin, but have many yolk globules of various sizes in their basophilic cytoplasm. A careful investigation with the color reaction to benzidine solution (a few crystals of benzidine being dissolved in 2cc of 96% alcohol, to which a mixture of 0.5cc of hydrogen peroxide and 4.5cc of 70% alcohol is added) has revealed that hemoglobin is formed before, and not after, the features described above of the embryonic erythrocytes are lost. In *Rana* and *Bufo*, is found in the erythrocytes when embryos show 3 branches on the 1st outer gill, while in *Hynobius*, at the stage in which the rod-shaped outer gills are going to separate from one another. The results of the present investigation shows that the formation of hemoglobin in the embryonic erythrocytes takes place in the stage earlier than hitherto reported by MAXIMOW ('10), COGHILL ('24), SLONIMSKI ('37) and others.

新 著 圖 書 I

[C]

中央氣象臺彙報 35 冊: 3 號—4 號 1951. 36 冊: 1—4 號 1951. 37 冊: 1—2 號 1952.
中國昆蟲學報 1 卷 1 號 1951.
地質學雜誌 57 卷 668—675 號 1951, 57 卷 676 號—677 號 1952, 58 卷 678 號—684 號 1952.

[E]

衛生試驗所報告 69 號 1951.
衛生動物 Vol. 2: 1—3 1952.

[G]

岐阜大學農學部研究報告 1 卷 1951.

[H]

北海道大學水産學部研究彙報 1 卷 1 號—4 號 1951. 2 卷 1 號—4 號 1952. 3 卷 1 號 1952.

[I]

石川縣生物學會誌 2 卷 1 號 1952.

[K]

解剖學雜誌 25 卷 4 號 1950. 27 卷 1 號 1952.
科學研究所報告 (化學の部) 27 卷 2 號—6 號 1951. 28 卷 1 號—2 號 1952.
科學 21 卷 6 號—12 號 1951. 22 卷 1 號—10 號 1952.
國立遺傳研究所年報 1 號 1949~1950.
國立公衆衛生院研究報告 1 卷 1 號—3 號 1951~1952. 2 卷 1 號 1952.
國立國會圖書館納本月報 1949.
國立公園 19 號~33 號 1951~1952.
高知大學研究報告 (自然科學) 2 卷 2 號 1952.
昆蟲 17 卷 1 號—5 號 1949.
久留米醫學會雜誌 15 卷 1—2 號 1952.

(382 頁へつづく)