

ホヤから双子は生まれるか～実験発生学的手法による双子づくりの試み～

Can we make twins of *Halocynthia roretzi*?

～ The attempt of making twins by an experimental embryological method. ～

山田奈央^{1,2}、大場千裕^{1,3}、三浦桃理^{1,4}YAMADA Nao^{1,2}, OBA Chihiro^{1,3}, MIURA Towa^{1,4}東北大学「科学者の卵養成講座」¹、仙台白百合学園高等学校²、山形県立山形西高校³、秋田県立本荘高校⁴EGGS, Tohoku University¹, Sendai Shirayuri High School², Yamagata-nishi High School³, Akita Honjo High School⁴

*Corresponding Author's e-mail: nao.yamada.x3@sci-eggs.net

(Received: 21 July 2024; Accepted: 24 March 2025; Released: 29 October 2025)

[要約]

ホヤは尾索動物亜門（被囊動物）に属し、体の前後に伸びる中枢神経系と脊索がそれぞれ背側と腹側に並んで配置する共通の体制をもつことから、ヒトと同じ脊索動物門に属す。ホヤと共通の体のつくりをもつヒトからは、わずかな確率ながらも、一卵性双生児と二卵性双生児という主に2種類の方法で双子が生まれる。ならば、ホヤの受精卵から、ヒトと同様に、双子を作ることとは可能なのか。本研究では、実験発生学的手法を用いることで、先行実験である、Chabryの実験を参考にして、ホヤの2細胞期胚を極細いガラス針で割球を単離し、それぞれの単離胚がどう成長するかを生物顕微鏡で観察した。今回は残念ながら観察した単離胚が完全な双子の尾芽胚になっているかどうかを特定するには至らなかったものの、単離胚のサンプルのうち一つを観察したところ、尾芽胚の脊索がつくられる途中である、脊索細胞の並びらしきものを確認することができた。

[キーワード] 発生、ホヤ、脊索、双子

Development, *Halocynthia roretzi*, Notochord, Twins

1. はじめに

ヒトの子供が、双子の兄弟姉妹として生まれる確率は、一卵性と二卵性を合わせて100分の1とされている。つまり、100人いるうち1人の母が双子を産むということである。なお、この割合には自然妊娠以外の不妊治療により授かったケースも含まれているため、実際には自然妊娠で授かる割合はわずか0.4%である。双子には、主に二つの発生の仕方があり、二卵性双生児と一卵性双生児に分けられる。二卵性双生児は、母親の胎内に二つ存在する卵巣のうち、どちらか片方から卵子が二つ排卵される場合と、二つの卵巣からそれぞれ一つずつ卵子が排卵される場合とがあり、結果共に2つの受精卵が生じる。二卵性双生児は、性別が兄弟姉妹で必ずしも同じになるとは限らず、男女と異なる性別で生まれてくるケースもある。対して、一卵性双生児は、生物学的に言えば、遺伝的に同じ、つまりはゲノムの配列が同一な兄弟姉妹で、性別は必ず同じになる。これは、母親の体内にて一つの受精卵が卵割期に、二つに分かれてしまうことで、それぞれが別々に発生することで生じる。以上の過程が、ヒトから一卵性双生児が生じる流れであるが、ヒトと同じ生物学的分類群に属し、共通のつくりをもつ動物であれば、一卵性双生児を生じることができるのだろうか。また、どのような発生の仕組みを持った動物が双子をつくるのが可能なのだろうか。それを理解することが、本研究の目的である。

本研究において、以上の二点を確認するために、マボヤの胚を実験発生学的手法により、一卵性双生児をつくる、つまりは、一つの受精卵から発生していく途中で胚を2つに分離

し、双子がつくれるかどうか試みた。ヒトなどの哺乳類の場合、8細胞期胚の1つの割球から完全な成体ができることが知られており、ウニの場合は、4細胞期胚の1つの割球から完全な幼生ができることがわかっている。

今回の研究で扱ったマボヤ（または単にホヤ）は、海中に生息するものである。雌雄同体であるが、他家受精のみ行い、発生を開始する。卵割を繰り返してオタマジャクシ形の幼生になり、しばらくの間海中を遊泳した後、岩礁等に固着し、変態して成体となる。また、ヒトと同じ脊索動物門に属しており、典型的なモザイク卵であるために、発生運命が決まるまでの時間が短いので、発生時間も短い。よって、マボヤの胚を実験に用いることにした。

本研究を行うにあたって、先行研究（1887年 Chabryの実験）を参考にした。その内容は、Chabryが、単体ボヤ *Ascidella scabra* の2細胞期に、卵膜は除去せず片方の割球のみをハリで刺して殺し、残った割球を発生させると、片側だけの胚（半胚）になることを発見したというものである（Chabry, 1887）。このとき注意したいのは、先行研究内で取り扱っている、半胚は双子ではないということだ。後に Conklin が1905年にフタスジボヤの発生過程の観察を行ったところ、半胚では脊索や筋肉の細胞が正常の半分であること、4細胞期に1～2個の割球を殺すとそれに相応する欠陥胚が得られることが証明された（Conklin, 1995）。したがって、Chabryの実験において生じた胚も、完全な胚ではないことがわかる。

私たちは、片方の胚を刺し殺して、残りの胚のみを発生させたという方法では双子をつくることができないと考え、実

験に改良を施し、マボヤを用いて受精させたのち、受精卵から卵膜を取り除き卵を取り出して、2細胞期胚に分裂した地点で、それを割球単離する作業を行うことにした。

ホヤの幼生の見た目は、カエルの幼生時である、おたまじやくしの姿によく似ているが、ホヤ幼生の体内を観察すると、尾の中心を小さな細胞が一行に並んで貫いている様子が見られる。ホヤ、カエル、ヒトは同じ分類群に属するため、共通の体のつくり（体制）が存在する。その1つが脊索と呼ばれる器官で、この器官を構成し尾を貫く細胞群の一つ一つの細胞を脊索細胞と呼ぶ。ヒトの場合は胎児の時期に、脊索の周りに背骨がつくられることで、脊索はその後消失してしまう。脊索細胞は、通常のホヤの幼生個体では40個存在する。したがって、本研究においては、生まれた双子が正常かどうかを判断する材料として、脊索細胞が40個存在するか、細胞の数を数えることにした。また、この研究の結果を哺乳類やウニの発生の過程や仕組みと比較し、何が同じで何が異なるのかを考察することを本研究の最終目的とした。

2. 実験方法と手順

ヒトの一卵性双生児が発生するメカニズムにのっとり、マボヤの双子を人為的に作成する。マボヤを受精させ、受精卵の卵膜除去を行い、二細胞期胚を二つの割球に単離し、それぞれの単離胚をインキュベーター内で発生させることにより、双子を作成することを試みた。

(2-1) マボヤ受精

この実験では、マボヤ *Halocynthia roretzi* を使用した。マボヤは雌雄同体で、自家不和合性であるため、異なる個体から卵と精子をそれぞれ集め、シャーレ内で混合させた。受精したことは、極体の放出、卵細胞質の移動、卵膜上昇で確認した。

受精卵は卵膜に覆われており、その卵膜の表面には濾胞細胞が付着している（図1）。

濾胞細胞が存在すると受精卵の中身が見にくいことと、卵膜除去の操作が困難になることから、まずは、タンパク質分解酵素を含む海水（0.05%アクチナーゼ E を含む海水）で、受精卵を5~10分処理することで、濾胞細胞を取り除いた。

なお、濾胞細胞は受精を促す役割をもつ細胞であるため、受精後に取り除けば、その後の発生に影響はない。タンパク質分解酵素を含む海水での処理の終了のタイミングは、処理

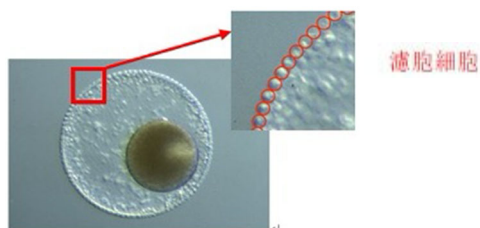


図1 マボヤの受精卵 直径 270 μm

中の一部の卵をシャーレ内に取り出し、以下のように双眼実体顕微鏡で観察することで判断した。すなわち、タングステン針（図2）を用いて、卵膜を引っ掻くことで少しでも濾胞細胞が除かれる場合は、メッシュを用いてすぐに卵を海水でよく洗浄し、完全に濾胞細胞を除去し、卵をシャーレ内に移した。



図2 タングステン針

(2-2) 卵膜除去

濾胞細胞を除去した受精卵または胚は、タングステン針を両手にそれぞれ2本持ち、双眼実体顕微鏡を覗きながら、手で卵膜を破り、内にある卵や胚を卵膜外へと取り出した。取り出した卵や胚は、シャーレの底に張り付くと崩壊してしまうため、アガーシャーレ（海水に1%(w/v)となるようにアガーを加え、溶解させ、プラスチックシャーレの底に薄く注ぎ、乾燥させたもの）内に移し発生させた。



図3 割球単離を行っている様子

(2-3) 割球単離

卵膜を除去した受精卵が細胞分裂をして二細胞期胚になったのを見計らって、二細胞期胚の割球と割球の間を、双眼実体顕微鏡を覗きながら、単離針を用いて切り落とし、割球を単離した（図3）。

割球同士の接着面が小さい胚は、細胞分裂が完全に完了していない状況であるため、割球と割球の接着面が大きい胚を選んで単離を行った。

四細胞期胚でも単離することができるが、単離する方向をよく確認することが必要である（四細胞期胚は、大きい割球と小さい割球が二つずつ存在し、単離する際には大きい割球と小さい割球がひとつずつになるようにすると、二細胞期胚を単離したのと同じ方向で胚を二つに分けることができる）。

単離した割球は、割球同士がくっつかないように、くぼみのついたアガーシャーレ（4x2のゴムシートをアガー海水溶液に浮かべ、乾燥させたもの）内に移し、一つ一つをくぼみのなかで発生させた（図4）。

作業を行った単離胚は、13°Cに設定したインキュベーター内で、通常の胚（二細胞期に単離していないコントロール胚）が40個の脊索細胞を尾部に持つようになる尾芽胚期まで発生させる。その後、発生させた胚を観察し、脊索細胞が40個あるかどうかを確認する。

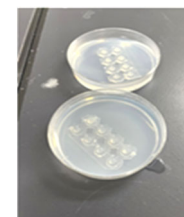


図4 くぼみのついたアガーシャーレ

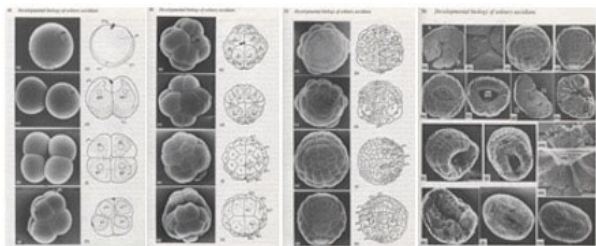


図5 通常のマダガスカルの胚発生の様子 (Satoh, 1994 より)

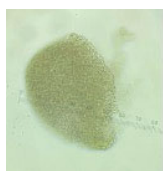


図6 発生が進んでいない個体



図7 半分のみ発生が進んだ個体

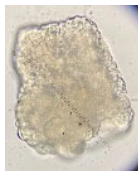


図8 途中で発生を止めてしまった個体

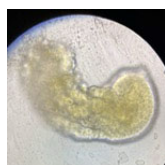


図9 頭部と尾部の形態的な区別が付きはじめた個体

3. 実験結果

この実験で観察した胚は割球単離をしてから、13°Cに保ったインキュベーター内で25時間～26時間発生させたもの、もしくは19～20時間発生させたものである。ここで私たちは、単離した割球を64個体発生させることができ、その全ての個体を観察した。まず、通常のマダガスカルの胚発生の過程を以下に示す(図5)。

私たちは「発生が進み、頭部と尾部が確認できること」を、40個の脊索が並ぶ尾芽胚になった基準として用い、判断した。今回の実験の結果、観察された個体のパターンは以下の①～④の4つであった。

- ①そもそも発生が進んでいない個体(図6)
- ②半分のみ発生が進んだと考えられる個体(図7)
- ③途中で発生を止めてしまったと考えられる個体(図8)
- ④頭部と尾部の形態的な区別が付き尾芽胚であると考えられる個体(図9)

①(図6)と②(図7)のような個体は観察した64個のうち、合計で29個であった。また、③(図8)、④(図9)のような個体は合計で35個であった。よって今回の実験において、単離後に少なくとも途中までであっても発生が進んだと考えられる個体は35個であった。

私たちは④のような個体の細胞を観察し、脊索細胞が40個存在するか、



図10 図9と同じ個体

細胞の数を数えることで双子が発生したかどうか判断することにした。

ここからは④の個体のうち、図10に示すような個体に着目して話を進めていく。

これは図9と同一の個体である。この個体を選んで考察することにした理由は以下の二つである。

- (1) ③、④の個体のサンプルの中で唯一、二細胞期胚から単離した二つの割球がどちらも同じ状態(頭部と尾部の区別が付き尾芽胚)まで発生していたため。
- (2) 観察しやすかったから。

この個体は1つ1つの細胞が他の個体よりもはっきりと見えたため、説明と考察がしやすかったため。

一方、この実験において(1)、(2)の条件がそろっていたのはこの個体のみであり、発生したと考えた35個体がすべてこのような個体ではなかった。この個体は特異な結果である可能性があるが、本研究で目指したのは、半胚ではない、完全な双子が生じるかどうかを確かめることであるため、「この研究で双子が生じたかどうか」に着目し、考察を行っていく。

4. 結果の考察

(4-1) 脊索細胞の特定

図11に示す写真は図10と同一個体である。この個体は左が尾側、右が頭側と考えられる。図11内で赤く囲んだ部分に、他とは形態的に異なり特異な細胞(脊索細胞の並びらしきものと思われる)と認識できる細胞の塊が見られた。ここで次のように仮定した。

【仮定1】:「赤く囲んだ細胞群は尾部の中心に位置するため、これらが脊索細胞である。」

しかし前述したようにマダガスカルの尾芽胚では既に脊索細胞は一行に40個並んでいる。一方で、図11ではそれを見ることができず、赤く囲んだ部分が脊索細胞であるという特定には至らなかった。また、脊索細胞は一行に並んでいるのが特徴であるが、今回の細胞では一行に並んでいるようには見えなかった。脊索細胞が一行に並んでいないパターンはあり得るのだろうか。そこで私たちはマダガスカルの脊索細胞について「数」、「形成過程」について着目して調べるとともに、着目した部分が脊索細胞ではない可能性についても考察をおこなった。

(4-2) 脊索細胞の数の特定

図12は、図11の赤く囲んだ部分を拡大した写真である。ここではこの細胞群の数を数えることを試みた。もし数が40個あることを確認することができればそれは脊索細胞



図11 図10と同じ

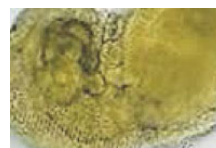


図12 図10の一部を拡大

胞である可能性がでてくる。私たちが行ったのは以下の二つである。

① 目視での確認

この細胞群の細胞の数が 40 個あるかどうかを顕微鏡下で確認する。

② 比率による計算

この細胞群の全体像はとらえられているためそのサイズがわかり、この細胞群を構成する一個の細胞を確認することができれば、細胞 1 個の大きさと細胞群全体の大きさを比べることでこれら細胞がいくつ存在しているのかを予想できる。

残念ながら今回の実験で使用した顕微鏡下では解像度が低く細胞一個がどれであるかさえも判断することができず、これら細胞群が脊索細胞であることを判断することができなかった。

(4-3) 脊索細胞と仮定した細胞群が一行に並んでいないように見える理由

ここで脊索細胞である可能性をさらに検討するために脊索細胞の形成の仕方について検討した。

脊索の形成過程を調べた結果、ホヤ類の胚では、収縮伸展運動がかなり単純な形で起こっており、ちょうど 40 個の脊索細胞が相互に挿入されることが分かった (Cloney, 1964, David M. Miyamoto, Robert J. Crowther 1985)。つまり図 13 のように脊索細胞は最初二列に並んでおり、その後に二列が組み合わさるようにして一行になることが分かった。ここで私たちは次のような仮定を立てた。

【仮定 2】：「図 12 の個体の脊索細胞は二列に並んでいるのではないか」

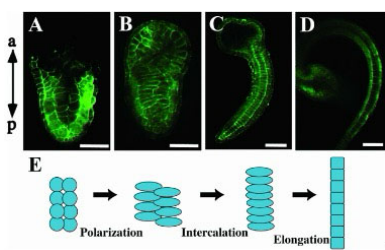


図 13 ホヤ脊索の収縮伸展運動(インターカレーションについて) (Niwano, 2009 より)

しかしこの仮定はこの胚に既に尾ができていることに矛盾する。なぜなら尾ができている状態になるまでには既に脊索細胞は一行に並ぶことが知られているからである。よって仮定 2 は正しくないと判断できる。

以上のことから、これら細胞群が脊索細胞であるとは判断できなかった。図 11 の胚が正常に発生したものなのか、それとも体の一部が欠如した個体なのか判断することはできないため、この部分が脊索細胞ではない可能性についても検討をおこなった。

(4-4) 脊索細胞と仮定した細胞群が脊索細胞ではない可能性について

図 11 で赤く囲んだ部分が脊索細胞ではない場合、考えられる可能性は何か。私たちは以下の 2 点考えた。

① 筋肉細胞である。

マボヤは発生後 20 時間が経過した胚では、既に尾の筋肉細胞を観察できる (図 14)。

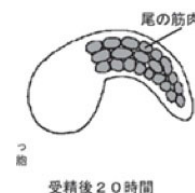


図 14 尾の筋肉を作る胚細胞の様子 (西田, 2020 より)

図 11 の赤く囲んだ細胞群と見比べてみると確かに尾の先の部分の構造がよく似ているように見える。細胞群が複数列で並んでいたり、一つ一つの細胞が丸みを帯びていたりする

点である。このことから、赤く囲んだ細胞群は筋肉である可能性がある。

② 発生が遅れているため脊索細胞や筋肉細胞がまだできていない。

私たちが作成した単離胚の中には「途中で発生を止めてしまったと考えられる個体 (図 8)」も存在した。しかし、もし単離の際に胚を傷つけてしまっていたのならそもそも、ここまで尾芽胚のように発生するのだろうか。図 8 で示したような形態になるのではないか。そのようなことからこの可能性は低いと考えた。

(4-5) 考察まとめ

今回の実験結果からは、二細胞期に割球を単離することで双子をつくることができるかどうかを結論付けることはできなかった。なぜなら、割球単離後最も発生が上手くいったと思われた単離胚ですら、脊索細胞の同定および細胞数を数えることができなかったからである。その原因として次のようなものが推測される。

(1) 胚操作の失敗

今回の実験では胚を明らかに傷つけたり、胚を保存する際見失ったりするなどの実験上のミスがあった。胚の形が尾芽胚に似ているから発生が上手くいったと判断した 35 個の中にも、実は傷をつけていて異常に発生したものが含まれていた可能性もある。

(2) 発生時間の短さ

マボヤは受精後およそ 35 時間で幼生になる。しかし私たちの今回の実験では長くても 25 時間~26 時間ほど、または 19 時間~20 時間ほどしか発生時間をとることができなかった。このため、脊索細胞を同定でき、その数を数えられるまでに発生させられたサンプルを得ることができなかった可能性がある。

(3) 割球単離時の胚のステージの判断ミス

前述したように、四細胞期胚は、大きい割球と小さい割球が二つずつ存在し、単離する際には大きい割球と小さい割球

が一つずつとなるようにすると、二細胞期胚を単離したのと同じ方向で胚を2つにわけることができる。この場合、二細胞期胚のようなものが二つできることになる。本当は四細胞期胚を割球したものなのに、二細胞期胚と見間違い、それを割球したことで、二分の一胚を作りたいはずが誤って四分の一胚を作ってしまった可能性がある。

5. 結論

本研究では、ホヤの2細胞期胚を2つに単離し、それぞれの単離胚が双子として成長するかを生物顕微鏡で観察した。残念ながら観察した単離胚が完全な双子の尾芽胚になっているかどうかを特定するには至らなかったが、単離胚の一つに、尾芽胚の脊索がつくられる途中である、脊索細胞の並びらしきものを確認することができた。一方で尾の筋肉細胞群である可能性もあり、同定は出来ていない。

今回の実験では「マボヤの双子は発生学的手法で人工的に生まれるのか」という問いへの明確な解答を得ることはできなかったが、実験上の注意点に留意しながら改善を図り挑戦をしていきたい。

謝辞

本研究は東北大学「科学者の卵養成講座」（JST 次世代科学技術チャレンジプログラム、三菱みらい育成財産）、熊野岳先生（東北大学生命科学研究科 教授）、高橋真湖さん、宮澤由真さん（東北大学大学院生命科学研究科）の支援のもとで実施されました。

参考文献

- Chabry, L. 1887. Contribution à l'embryologie normale et tératologique des Ascidies simples. J. Anat. Physiol. (Paris) 23: 167-319.
- Conklin, E. G. 1905. Mosaic development in ascidian eggs. J. Exp. Zool. 2:145-223.
- Niwano Tomoko, et al. (2009) Wnt5 is required for notochord cell intercalation in the ascidian *Halocynthia roretzi*, *Biology of the Cell*, 101, 645–659 (<https://doi.org/10.1042/BC20090042>).
- Satoh, N. 1994. Developmental biology of ascidians, pp. 69-131. Cambridge University Press, Cambridge.
- 西田宏記 (2020)、「珍味なホヤのマッチョな発生生物学」、日本の科学者、Vol.55 No.9 36(524)-42(530). (https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsci/55/9/55_36/_pdf-char/en)

参考資料

- 「発生生物学II（4）調節卵とモザイク卵」 (https://www.shimoda.tsukuba.ac.jp/~hassei/kougi/fuku_4.pdf)
- 「ふたごの確立」 (https://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/twin/futago_research/probability/#:~:text=ふたごの確率は)

先行研究：Chabry の実験と Conklin の実験。

Chabry は1887年にホヤから半胚を得られるかどうかという研究目的の下、単体ホヤ *Ascidella scabra* の2細胞期に、片方の割球をハリで刺して殺すと、片側だけの胚(半胚)になることを発見した。その後、Conklin はフタスジボヤで半胚では脊索や筋肉の細胞が正常の半分であること、4細胞期に1~2個の割球を殺すとそれに相応する欠陥胚が得られることを報告した。

用語解説

尾索動物：被囊動物とも。脊索動物門に属するホヤ類などが属する。

モザイク卵：卵割の非常に早い時期に各割球が既に個体全体を形成しうる能力を失って、決められた部分しか形成できない卵。

インキュベーター：温度を一定に保つ装置。恒温機。

タングステン針：タングステンで作られた細い針。強度と耐久性から繊細な作業に適している。

濾胞細胞：ホヤ卵は、卵殻の内側にテスト細胞を含む「複合卵」と呼ばれる特徴的な構成をしている。つまり、未受精卵は、卵殻の内側にテスト細胞、卵殻の外側に濾胞細胞が並び、二種類の付属細胞を持つ卵である。