

ツチガエル幼生の生殖巣分化過程における性差の組織学的解析

(愛媛大学教育学部) 柳澤千浩・宮内早紀

(理科教育講座) 中村依子

Characterization of sexual dimorphism in gonadal differentiation of *Rana rugosa* tadpoles

Chihiro YANAGISAWA, Saki MIYAUCHI and Yoriko NAKAMURA

(平成 27 年 7 月 8 日受理)

抄録：ツチガエルでは、幼生の St.25-3 週から生殖腺の形態的な雌雄差が出現することが報告されているが、それ以前については報告がない。本研究では、St.25-1 週から 3 週において幼生の連続組織切片を作製し、生殖巣の長さ、最大長径・最大短径の計測から体積を算出した。その結果、St.25-1 週から生殖巣の横断面積（体積）に雌雄差が見られた。また、生殖巣内の生殖細胞数を数えて生殖細胞の密度を求めると、生殖巣内の生殖細胞数には個体間でばらつきがあることが示唆された。

Abstracts : A previous study showed that sexual dimorphism first appears in *Rana rugosa* tadpoles as structural changes in differentiating gonads at St.25-3W. However, there have been no reports to date showing gonadal sexual dimorphism in tadpoles before St.25-2W. Therefore, we examined length and width from cross-sectional sections of tadpole gonads between St.25-1W and 3W. The results revealed that the developing gonads of female tadpoles at St.25-1W appeared bigger than males. We also determined the number of germ cells in female and male gonads at St.25-1W to 3W. The results suggest that the number of germ cells in tadpoles also varies among individuals.

キーワード：ツチガエル、性分化、生殖腺、生殖細胞

Keywords : *Rana rugosa*, sex differentiation, gonad, germ cell

1. はじめに

生殖腺は体細胞と生殖細胞から成り、性的特徴を示す重要な器官である。哺乳類では、将来の生殖腺になる生殖隆起に始原生殖細胞が移動し、未分化生殖原基を形成する。雄性または雌性生殖原基内の始原生殖細胞は生殖細胞に分化後、数を増し、成体の精巣や卵巣内で精子や卵になる。哺乳類の性は受精時の性染色体の組み合わせで決まるが、初期の生殖原基の体細胞は、雌雄両方の性の生殖腺に分化する能力を持つ。生殖腺の体細胞で性が

決定し、生殖細胞の性が誘導される。未分化生殖腺のセルトリ前駆細胞における Y 染色体上の精巣決定遺伝子 (*SRY*) の発現により、生殖細胞が雄に分化する¹⁾。一方で、最近、ショウジョウバエやメダカでは、哺乳類とは異なり、生殖細胞の性は生殖腺の形成以前に細胞自律的に決定されるという報告がある^{2), 3)}。生殖腺の体細胞と生殖細胞が、それぞれいつから雌雄の特徴を示すようになるのかを知ることは、性決定のメカニズムを明らかにする上で必要不可欠である。

両生類は、基本的には遺伝的に性が決まるが、温度やホルモンなど外的要因によっても性が決まる。アフリカツメガエルでは、*Dm-W* という卵巣形成に重要な遺伝子が W 染色体上に存在することが明らかにされているが⁴⁾、他の両生類ではこの遺伝子は見つかっていない。また両生類では、初期の生殖細胞の雌雄差についての報告はない。

ツチガエル *Rana rugosa* は 2 つの性決定様式 (XX/XY (雄ヘテロ) 型と ZZ/ZW (雌ヘテロ型) をもち、生殖腺の基底膜構成タンパク質ラミニンに対する抗体を用いた免疫染色により、組織学的な構造の性差が明らかになっている⁵⁾。基底膜の構造では、幼生 (オタマジャクシ) の St.25-3 週から雌雄差が見られ始め、卵巣に卵巣腔という空所が形成される。生殖細胞に関しては、St.25-2 週から St.XXV の幼生の生殖腺内で増殖中の生殖細胞数についての解析が行われている。増殖中の生殖細胞が雄では増加し続けるが、雌では増加した後で急激に減少することが示されている。そこで本研究では、生殖腺の構造上の雌雄差が出現するとされている St.25-3 週より前の時期の生殖腺の大きさと全生殖細胞数に着目し、いつからそれらに雌雄差が出現するかを調べた。

2. 材料および方法

2-1. 実験材料

本研究で用いた両生綱無尾目アカガエル科のツチガエルは日本に広く分布しているが⁶⁾、本研究で用いたツチガエルは新潟県長岡市で採集した。

成体の飼育環境は、蛍光灯を用いて明期 10 時間、暗期 14 時間、飼育温度は 22 °C とした。餌は週 2 回市販 (月夜野ファーム) のフタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) を与えた。

2-2. 胚の採取

ウシガエルの脳下垂体をアセトンに 1 時間、ジエチルエーテルに 1 時間浸し、室温で乾燥した。乾燥した脳下垂体を乳鉢に入れすりつぶした後、スタインバーグ溶液 (塩化ナトリウム 3.4 g、塩化カリウム 0.05 g、硝酸カルシウム四水和物 0.08 g、硫酸マグネシウム七水和物 0.205 g、トリス 0.56 g を MilliQ 水に溶解して 1 L とし、塩酸で pH=7.4 に調整) を加えて攪拌した。

ツチガエルの雌成体 1 匹に対して 1.5 個相当の脳下垂体の抽出液 (150 μ L) を腹腔内に注射器で注射して排卵を誘導し、20 時間後に未受精卵を得た。同時に雄の成体を解剖して精巣を採取し、MMR 溶液 (0.1M 塩化ナトリウム、2 mM 塩化カリウム、1 mM 硫酸マグネシウム、2 mM 塩化カルシウム、5 mM HEPES (N-(2-ヒドロキシエチル) ピペラジン-N'-(2-エスタスルホン酸)) (pH=7.8)、0.1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物) 内で精巣を細かく刻み、MilliQ 水で 1/10 に希釈した後、スライドガラス上の未受精卵に媒精して 15 分後に脱塩素水を入れた大型ガラスシャーレに移し発生させた。

2-3. 胚発生

受精後、2細胞に分裂する前に、2%システイン溶液 (0.1 \times MMR 溶液に L-システイン (Wako) を溶かし、10N 水酸化ナトリウムで pH=7.8 に調整) で約 5 分間処理してゼリー層を除去し、0.1 \times MMR 溶液内で、初期胚を室温 22 °C で飼育した。

2-4. 胚の固定

Shumway⁷⁾および Taylor and Kollros⁸⁾の発生分期表をもとに、St.25-1 週、2 週、3 週に達した幼生をブアン液 (飽和ピクリン酸 15 ml、氷酢酸 1 ml、ホルマリン 5 ml) で、氷上で振盪しながら 2 時間固定した後、70%エタノールに置換して 4 °C で保存した。

2-5. 胚の包埋

70%エタノールで保存していた幼生をブアン液の黄色がなくなるまで 70%エタノールで 10 分間ずつ 3 回置換した。その後、同様に 80%エタノールで 10 分間ずつ 3 回、90%エタノールで 10 分間ずつ 3 回、95%エタノールで 10 分間ずつ 3 回、100%エタノールで 30 分間ずつ 2 回、ブタノールで 30 分間ずつ 2 回の順で置換した。次に、60 °C で融解しているブタノール : パラフィン (メルクミリポア) を 1 : 1 で混合したものに 20 分間、60 °C で融解しているパラフィンに 30 分間ずつ 2 回浸した。その後、包埋皿内のパラフィンの中に移し、常温で 1 時間以上放置した後 4 °C に移しパラフィンをしっかりと固めた。

2-6. 切片の作製

胚の切片作製は緒方⁹⁾の方法を改良して行った。幼生が埋まったパラフィンブロックをトリミングした後、パラフィン用木製ブロック（アズワン株式会社）に溶着させ、しばらく 5℃でパラフィンを冷まし固めた。

回転式マイクロトームを用いて 7 μm の厚さでリボン状の連続切片を作製した。これを MAS コートされたスライドガラス（MATSUNAMI）の上ののせ、約 45℃に設定した伸展器の上で一晩置いて、伸展・乾燥させ、スライドガラスに接着させた。

2-7. 切片の染色

ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色は以下の手順で行った。

(1) 脱パラフィン

キシレンに 3分間ずつ 3回、100%エタノールに 3分間ずつ 2回、95%エタノールに 3分間、90%エタノールに 3分間、純水に 3分間浸した。

(2) HE 染色

ヘマトキシリン（武藤化学株式会社）に 8分間、純水に 15秒間、塩酸アルコールに 3秒間、1%エオシン Y 溶液に 1分間、純水に 3秒間浸した。

(3) 脱水

90%エタノールに 3秒間、95%エタノールに 3秒間、100%エタノールに 1分間ずつ 2回、キシレンに 5分間ずつ 3回浸した。その後、顕微鏡用速乾性封入剤エンテランニュー（メルクミリポア）をのせ、カバーガラス（MATSUNAMI）をのせて封入した。

3. 結果

3-1. ツチガエルの幼生の生殖腺の形態的観察

ツチガエルの幼生の生殖腺は雌雄ともに体の中心部に位置し、腎臓の腹側のすぐそばに 1 対存在する。多くは球形で、一部楕円体のものもある。St.25-1 週から 3週にかけて雌雄の幼生の生殖腺の連続切片を観察すると、すべての週で腎臓と生殖巣をつなぐ腸間膜付近に体細胞が密集して存在し、その周りに大きな生殖細胞があり、さらにその周りを小さな体細胞が取り囲んでいた。分裂途中と思われる生殖細胞も観察された。St.25-1 週と 2週では卵巣腔は見られなかったが、St.25-3 週より

雌の生殖腺で卵巣腔と思われる空所が見られる個体があった（図1）。生殖巣内の生殖細胞の大きさと配置にはほとんど雌雄差は見られなかった。

3-2. ツチガエルの幼生の生殖腺の大きさ

St.25-1週、2週、3週において、生殖腺の長さ、最大断面の長径と短径を計測し、それらの値から最大横断面の面積と体積を求め、生殖腺の大きさに雌雄差が見られるか調べた（表1、個体の種類は各週 x, y, z の n=3）。生殖腺の長さは、切片 1 枚 7 μm であるので、頭-尾方向の生殖腺を含む切片の枚数により計算した（表2）。頭-尾方向での生殖腺の長さの平均値は、St.25-1 週の雄が 415 μm、雌が 359 μm、St.25-2 週の雄が 474 μm、雌が 474 μm、St.25-3 週の雄が 588 μm、雌が 614 μm であった。よって、頭-尾方向の生殖腺の長さは St.25-1 週では雌よりも雄の方が長く、2週では同じくらいの長さになり、3週では雄よりも雌の方が長かった。

St.25-1 週から 3週の雌雄の幼生の生殖腺の横断面が最大のもの長径と短径の平均値を求めた（表 3）。St.25-1 週の雄の長径は 3.5 μm、短径は 2.4 μm、雌の長径は 6.1 μm、短径は 3.9 μm で、St.25-2 週の雄の長径は 5.5 μm、短径は 3.9 μm、雌の長径は 6.9 μm、短径は 4.2 μm で、St.25-3 週の雄の長径は 7.8 μm、短径は 4.8 μm、雌の長径は 11.6 μm、短径は 5.8 μm であり、St.25-1 週から 3週にかけて長径も短径もともに常に雄よりも雌の方が長かった。これらの平均値から、最大横断面の面積の平均値を求めると、St.25-1 週の雄は $2.1 \pi \mu m^2$ 、雌は $6 \pi \mu m^2$ で、St.25-2 週の雄は $5.4 \pi \mu m^2$ 、雌は $7.2 \pi m^2$ で、St.25-3 週の雄は $9.4 \pi \mu m^2$ 、雌は $16.8 \pi \mu m^2$ であり、St.25-1 週から 3週にかけて最大横断面の面積は常に雄よりも雌の方が大きかった。

雌雄の幼生の生殖腺の連続切片を観察すると、生殖腺の先端ほど切片が小さく、内部に行くほど切片が大きくなった。これは、生殖腺の形は頭側と尾側が窄んだ円筒型であることを示している。St.25-1 週から 3 週の雌雄の幼生の生殖腺の長さ、最大値の長径、最大値の短径から、最大横断面を全断面の大きさとした円柱型として生殖腺の体積をそれぞれ計算した（表 4、n=3）。生殖腺の体積の平均値は、St.25-1 週の雄が $887.2 \pi \mu m^3$ 、雌

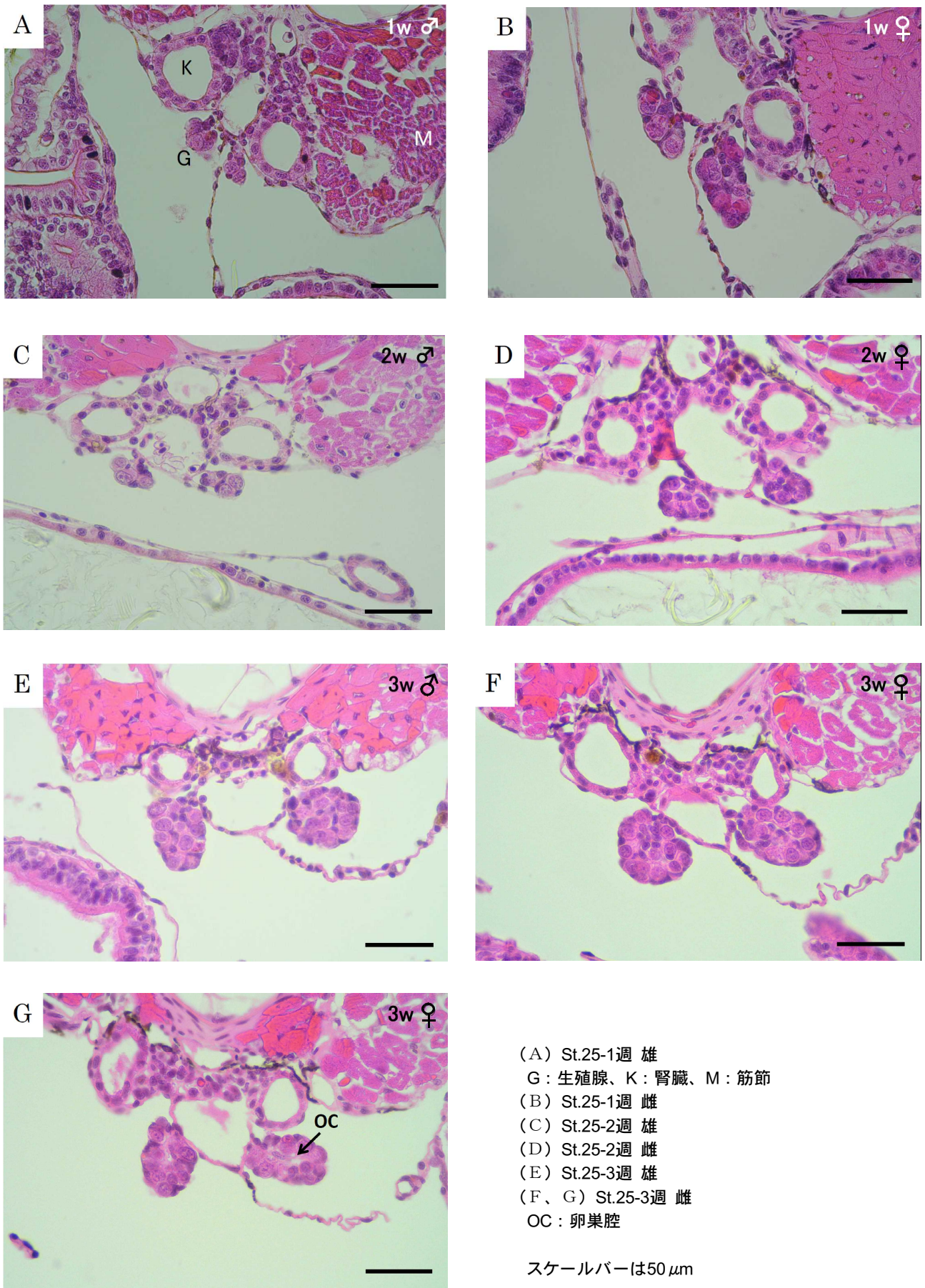


図1 幼生の生殖腺

表1 3個体(x, y, z)の生殖腺の長さ、最大長径、最大短径、最大横断面の面積、体積

x	St.25 1週		St.25 2週		St.25 3週	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
長さ	364	392	525	406	609	546
長径	4.3	4.2	3.3	4.8	8.7	13.9
短径	2.2	3.8	2.7	4	6.9	6.7
面積	2.37 π	3.99 π	2.23 π	4.8 π	15.01 π	23.28 π
体積	860.9 π	1564.1 π	1169.4 π	1948.8 π	9139.6 π	12712.2 π

y	St.25 1週		St.25 2週		St.25 3週	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
長さ	448	343	497	497	574	637
長径	3.8	8	8	6.7	8	10.4
短径	3	4	5.7	4	3.6	4.8
面積	2.85 π	8 π	1.14 π	6.7 π	7.2 π	12.48 π
体積	1276.8 π	2744 π	5665.8 π	3329.9 π	4132.8 π	7949.8 π

z	St.25 1週		St.25 2週		St.25 3週	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
長さ	434	343	399	518	581	658
長径	2.3	6	5.3	9.3	6.7	10.7
短径	2.1	4	3.3	4.7	4	6
面積	1.21 π	6 π	4.37 π	10.9 π	6.7 π	16.05 π
体積	524.1 π	2058 π	1744.6 π	5660.4 π	3892.7 π	10560.9 π

(長さ・長径・短径の単位は μm 、面積の単位は μm^2 、体積の単位は μm^3)

表2 生殖腺の長さ

個体	St.25 1週		St.25 2週		St.25 3週	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
x	364	392	525	406	609	546
y	448	343	497	497	574	637
z	434	343	399	518	581	658
平均	415	359	474	474	588	614

(単位は μm)

表3 生殖腺の最大長径と最大短径および最大横断面の面積

	St.25 1週			St.25 2週			St.25 3週											
	雄	雌	面積	雄	雌	面積	雄	雌	面積	雄	雌	面積	雄	雌	面積			
x	4.3	2.2	2.4 π	4.2	3.8	4 π	3.3	2.7	2.2 π	4.8	4.0	4.8 π	8.7	6.9	15 π	13.9	6.7	23.3 π
y	3.8	3.0	2.9 π	8.0	4.0	8 π	8.0	5.7	11.4 π	6.7	4.0	6.7 π	8.0	3.6	7.2 π	10.4	4.8	12.5 π
z	2.3	2.1	1.2 π	6.0	4.0	6 π	5.3	3.3	4.4 π	9.3	4.7	10.9 π	6.7	4.0	6.7 π	10.7	6.0	16.1 π
平均	3.5	2.4	2.1 π	6.1	3.9	6 π	5.5	3.9	5.4 π	6.9	4.2	7.2 π	7.8	4.8	9.4 π	11.6	5.8	16.8 π

(長径・短径の単位は μm 、面積の単位は μm^2)

表4 生殖腺の体積

	St.25 1週		St.25 2週		St.25 3週	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
x	860.9 π	1564.1 π	1169.4 π	1948.8 π	9139.6 π	12712.2 π
y	1276.8 π	2744 π	5665.8 π	3329.9 π	4132.8 π	7949.8 π
z	524.1 π	2058 π	1744.6 π	5660.4 π	3892.7 π	10560.9 π
平均	887.2 π	2122 π	2860 π	3646.4 π	5721.7 π	10407.6 π

(単位は $\pi\mu\text{m}^3$)

が $2122\pi\mu\text{m}^3$ 、St.25-2週の雄が $2860\pi\mu\text{m}^3$ 、雌が $3646.4\pi\mu\text{m}^3$ 、St.25-3週の雄が $5721.7\pi\mu\text{m}^3$ 、雌が $10407.6\pi\mu\text{m}^3$ であった。生殖腺の大きさは、雌雄ともに個体間でばらつきが見られたものの、雄よりも雌の方が大きかった。したがって、St.25-1週から3週においては、生殖腺の長さは大きな雌雄差は見られなかったが、生殖腺の最大横断面、大きさ(体積)は St.25-1 から雌

雄差が見られた。

3-3. 生殖腺内の生殖細胞の数

両生類における体細胞と生殖細胞との区別には以下の6つの特徴が挙げられる。生殖細胞は、①細胞自体の大きさが周辺の体細胞より大きい。②核の体積が体細胞の核より大きい。③核の形が、体細胞のように表面の滑ら

表5 生殖腺内の生殖細胞数

	St.25 1週						St.25 2週						St.25 3週					
	雄			雌			雄			雌			雄			雌		
	x	y	z	x	y	z	x	y	z	x	y	z	x	y	z	x	y	z
a	276	167	164	336	167	116	317	192	134	270	356	321	845	603	368	702	408	561
b	264	138	129	303	208	112	330	177	114	276	283	327	732	603	425	682	464	603
平均(a, b)	270	153	147	320	188	114	324	185	124	273	320	324	789	603	397	692	436	582
平均(x, y, z)	190			207			211			306			596			570		

(単位は個)

表6 生殖腺内の単位体積あたりの生殖細胞数

	St.25 1週			St.25 2週			St.25 3週		
	雄	雌		雄	雌		雄	雌	
x	0.01	0.065		0.088	0.045		0.027	0.017	
y	0.038	0.022		0.01	0.031		0.046	0.017	
z	0.089	0.018		0.023	0.018		0.032	0.018	
平均	0.046	0.035		0.04	0.031		0.035	0.017	

(単位は個/ μm^3)

かな球状ではなくて、表面に大きな凹凸が多く、しばしば中央部がくびれた二葉型を示す。④核の染色性が体細胞の核とは違って、ヘマトキシリンなどの塩基性色素で染まりにくい。⑤核は普通1～2個の目立つ核小体を含んでいる。⑥腸の上皮細胞を除く他の体細胞が卵黄粒を消費してしまった時期でも、まだ卵黄粒を細胞質中に保持している。これら特徴を併せ持つ細胞が生殖腺の中にある場合、それを生殖細胞と呼ぶ¹⁰⁾。これらの特徴を指標にして生殖細胞を同定し、St.25-1週から3週にかけて雌雄の幼生の生殖細胞数に雌雄差が見られるかを調べた。

雌雄の幼生ともに1個体に生殖腺は2つ存在する。St.25-1週、2週、3週の雌雄の幼生各3匹(x, y, z)のすべての連続切片の生殖細胞数を数えると、St.25-1週の雄の生殖腺の生殖細胞数はxが276個と264個、yが167個と138個、zが164個と129個、雌の生殖腺の生殖細胞数はxが336個と303個、yが167個と208個、zが116個と112個で、St.25-2週の雄の生殖腺の生殖細胞数はxが317個と330個、yが192個と177個、zが134個と114個、雌の生殖腺の生殖細胞数はxが270個と276個、yが356個と283個、zが321個と327個で、St.25-3週の雄の生殖腺の生殖細胞数はxが845個と732個、yが603個と603個、zが368個と425個、雌の生殖腺の生殖細胞数はxが702個と682個、yが408個と464個、zが561個と603個であった(表5)。雌雄ともに、個体間でばらつきは見られたが、生殖細胞数は成長するにしたがって増加し、各個体の中の

2つの生殖巣間では、生殖細胞数に大きな差は見られなかった。

St.25-1週から3週の雌雄の幼生では生殖腺の大きさが雌雄で異なっている。雌雄で生殖巣内の生殖細胞の大きさと配置にはほとんど雌雄差がなかったため、雌雄の生殖細胞数の違いは生殖巣の大きさに依存している可能性が考えられる。生殖巣が大きくなるに伴い、生殖細胞数が増えているかを確かめるため、生殖腺の単位体積あたりの生殖細胞数を調べた。1個体中の2つの生殖巣の生殖細胞数は大きな違いは見られなかったため、2つの生殖巣内の生殖細胞数の平均値を体積で割った。その結果、すべての週において、雌雄ともに、単位体積あたりの生殖細胞数はやや雄の方が大きく、また、個体間で違いが見られた(表6)。

4. 考察

本研究では、ツチガエルのSt.25-1週から3週の幼生の生殖腺および生殖細胞の形態観察によって、どの発生時期から雌雄差が出現するのかを調べた。Saotomeら⁵⁾の報告では、生殖腺の基底膜タンパク質ラミニンに対する抗体を用いた免疫染色により、St.25-3週から生殖腺の構造に雌雄差が出現することが示されている。HE染色では、St.25-3週の生殖腺に雌雄差は見られなかったと報告されているが、本研究ではSt.25-3週の雌で卵巣腔と思われる空所が見られる個体があった。

St.25-1週から3週にかけて生殖巣の大きさは雄よりも雌の方が大きかった。この結果は、これまでの報告より

も早い St.25-1 週から生殖腺に形態的雌雄差が出現することを示す。

本研究では、生殖細胞数は St.25-2 週では雄よりも雌の方が 1.45 倍多かったが、St.25-1、3 週では大きな雌雄差は見られなかった。しかし、Saotome ら⁵⁾の報告では、St.25-2 週から St. V までの生殖巣内で BrdU が取り込まれる増殖中の生殖細胞数が、雌は雄に比べて10倍近く多い。この違いが生まれる原因として、Saotome らは分裂中の生殖細胞の数を数えているのに対し、本研究では全生殖細胞の数を数えていることがある。このため、生殖巣内の全生殖細胞数に雌雄の大きな違いはないが、分裂中の生殖細胞数は雄に比べて雌で多いことが考えられる。2つ目は、サンプル数が少ないことによるのかもしれない。特に St.25-2週および3週では、個体間で幼生の全長に多少の差があった。また、すべての週において、個体間で体積、生殖細胞数および単位体積あたりの生殖細胞数（生殖細胞の密度）に大きな違いが見られた。メダカでも、年齢が同じ雌の卵巣の発達度合いに個体差がある可能性があること¹¹⁾、全長が同じ稚魚の卵巣内の生殖細胞数に個体差があることが報告されている¹²⁾。ツチガエルで個体数を増やすことで、生殖巣の体積や生殖細胞の密度に個体差があるかどうかを確かめる必要がある。

本研究において、St.25-1週から3週にかけて生殖細胞の密度を求めると、生殖細胞の大きさと配置に違いはほとんど見られなかったのにもかかわらず、個体間で大きな違いが見られた。St.25-3 週では、雌は雄に比べて生殖巣が大きいのも関わらず、生殖細胞の密度が雄よりも少なかった。おそらく、この原因は、雌には卵巣腔という空所が形成されているためと考えられる。したがって、全体積から卵巣腔の体積を除き、生殖細胞の密度を求める必要がある。しかし、St.25-1、2 週においては、雌の卵巣の方が大きく、卵巣腔が形成されていないのも関わらず、生殖細胞の密度が雄よりも少ない場合があった。さらに、雄内や雌内の個体間で生殖細胞の密度にばらつきがあった。よって、St.25-1、2週においては、生殖細胞数に個体間でばらつきがある可能性が考えられる。よりサンプル数を増やして検証する必要がある。

本研究結果から、ツチガエルにおいてこれまでの報告より早い St.25-1 週から生殖腺の横断面積（体積）に雌

雄差が出現することが明らかになった。今後は、St.25-1 週以前に生殖腺および生殖細胞数に雌雄差が出現するのかを明らかにするため、St.25-1 週以前に生殖腺の大きさや単位体積当たりの生殖細胞数に雌雄差があるかどうかを調べる必要がある。また、様々な分子マーカーを用いて、いつから生殖腺および生殖細胞の構造や形質の発現に雌雄差が見られるのかを明らかにする必要がある。それらの解析によって、生殖腺の雌雄差と生殖細胞の雌雄差のどちらが先に出現するのかという重要な課題に迫ることができると考えられる。これが可能になれば、脊椎動物に共通の現象かどうか明らかになり、生殖細胞の雌雄差の研究に大きく役立つと思われる。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、ツチガエルの提供と胚の発生と固定にご協力いただきました早稲田大学 教育・総合科学学術院 生物学教室 中村正久教授と児玉万穂さん、中嶋由紀子さん、新倉良季さんに深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 篠村麻衣他 哺乳類の性分化と性的可塑性 *細胞工学* Vol. 32 No.2 151-157 (2013)
- 2) Hashiyama K. *et al.* *Drosophila Sex lethal* gene initiates female development in germline progenitors. *Science* **333** (6044) : 885-888 (2011)
- 3) Nishimura T. *et al.* Analysis of a novel gene, *Sdgc*, reveals sex chromosome-dependent differences of medaka germ cells prior to gonad formation. *Development* **141**(17), 3363-3369 (2014)
- 4) 伊藤道彦 両生類・爬虫類・鳥類の性決定システムおよびその分子機構 *細胞工学* Vol.32 No.2 181-187 (2013)
- 5) Saotome K. *et al.* Structural changes in gonadal basement membranes during sex differentiation in the frog *Rana rugosa*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* **313** (6), 369-380 (2010)
- 6) 前田憲男、松井正文 改訂 日本カエル図鑑 文一総合出版(1999)

- 7) Shumway W. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. I. *External form. Anat Rec* **78**:139-147 (1940)
- 8) Taylor AC, Kollros JJ. Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat Rec* **94**:7-23 (1962)
- 9) 緒方知三郎 (編) 病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき 南山堂 30-43, 80-97, 122-133, 135-148 (1964)
- 10) 小谷穰一 生殖質と始原生殖細胞の分化—両生類の場合— 先天異常(*Cong. Anom.*) **21**, 449-464 (1981)
- 11) Kanamori A. *et al.* Development of the tissue architecture in the gonads of the medaka *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.*, **2**, 695-709 (1985)
- 12) Iwamatsu T. Growth of the Medaka (IV) - Dynamics of oocytes in the ovary during metamorphosis. 愛知教育大学研究報告 第64輯 (自然科学編) 37-46 (2015)