

薬物処理によるカブトガニ胚の脳と神経索の分離形成

伊藤 富夫

422 静岡市大谷 静岡大学教育学部生物学教室

1982年2月12日 受領

1982年7月1日 再受領

Artificially Induced Separation of Brains and Nerve Cords in Embryos of the Horseshoe Crab. TOMIO ITOW (Department of Biology, Faculty of Education, Shizuoka University, Shizuoka 422, Japan)

ABSTRACT Calcium-free sea water or inhibitors of DNA synthesis induced the monsters with separated embryonic areas in the horseshoe crab. Brains of these monsters were often separated from nerve cords. In some of these monsters, the position of the brain was extremely abnormal. The results brought the following presumptions. The nervous cells or the mesodermal tissue which induces the nervous system are determined at the stage of occurrence of separation (gastrula stage). The ganglion of each segment is independently formed after this stage. The position of the brain does not determine the route of elongation of the stomodaeum. The crossing between the nervous system and the alimentary canal is not necessary for development and existence of the *Protostomia* horseshoe crabs. (*Zool. Mag.* 91: 230-238, 1982)

一般に、中枢神経系は、発生の初期（囊胚期のおわり）に中胚葉性組織によって誘導された外胚葉から生じてくる。その後、中枢神経間の明確な分化がおこるが、脳と他の中枢神経系、すなわち脊髄や腹髄（神経索）は連合し一体となっている（Anderson, 1973; 塚田, 1976; 渡辺ら, 1977; 伊藤, 1982）。

脊椎動物において、中枢神経系の裂けた奇形が知られているが（山村, 1974）、節足動物カブトガニでも、Ca欠除海水やデオキシリボ核酸（DNA）の合成阻害剤による処理で生じた胚域分離胚において、脳と神経索は分離していた（Itow, 1979）。

本論文では、この脳と神経索の分離の状態や原因を調べた。

材料と方法

佐賀県伊万里市および岡山県笠岡市の海岸で採取した成体のカブトガニ *Tachypleus tridentatus* を、静岡大学へ運び、人工受精した。胚の発生段階は Sekiguchi (1973) の発生段階表に従って決定した。

胚域の分離した胚を得る為に、各々 20 または 25

個体の囊胚期の胚（処理の Stage 7-12）を、約 10 ml の Ca 欠除海水または DNA 合成阻害剤含有海水を入れた小型シャーレ内で、24 時間処理した。処理液は、処理開始後 12 時間で、一度交換した。Ca 欠除海水は Van't Hoff の人工海水中の CaCl_2 を NaCl で置換し、また、 NaHCO_3 の代わりに NaOH で pH を約 8.0 に調節した。多くの場合、さらに、 10^{-3} ~ 10^{-2} M のエチレングリコール ビス (β -アミノエチルエーテル) -テトラ酢酸 (EGTA) を加えた。DNA 合成阻害剤としては、 10^{-2} ~ 10^{-1} M のヒドロキシ尿素および 10 ~ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアザセリンを用いた。

正常胚および処理胚を、そのまま、または $1/20,000$ の中性赤で生体染色した後、実体顕微鏡で観察した。

内部構造の観察のために、ブアン液、カルノア液および FAA 液（ホルマリン：70% エタノール：酢酸 = 5：15：1）で固定した胚（固定した胚の Stage は 20 または 21）を、セロイジン・パラフィン二重包埋法またはパラフィン包埋法により包埋し、 5 ~ $20 \mu\text{m}$ の切片にした。染色はヘマトキシリン・エオシン二重染色法とアザン染色法を用いた。

結 果

1. 胚域分離胚の形成

Ca 欠除海水やDNA合成阻害剤による処理で、胚域が前後に分離した胚が生じたFig.1 (Fig. 1; Table 1)。その形成条件および生じた胚域分離胚の型は次の通りであった。

Ca 欠除海水による24時間処理の場合、胚盤出現期 (Stage 7) から胚盤完成期 (Stage 10)にかけての胚盤拡大期で処理すると、主に頭胸部第3・第4体節付近で胚域が分離した胚が生じた。活発な形態形成運動期 (Stage 10~Stage 12)で処理すると、頭胸部第2・第3体節付近で胚域が分離した胚が生じた。

DNA合成阻害剤である $10^{-2} \sim 10^{-1}$ M のヒドロキシ尿素または $10 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ のアザセリンで24時間処理した場合：胚盤拡大期での処理で、頭胸部第2・第3体節付近で胚域の分離した胚が生じた。どちらの薬剤によっても、胚域の分離が不完全なものや完全なものが生じ、その中間形も多くみられた。他の発生段階での処理では胚域分離胚は生じなかつ

た。また上記より高濃度では発生が停止し、また上記より低濃度では正常に発生した。また、処理時間は、24時間が胚域分離胚を得るために最適であった (Fig. 2)。

なお、Ca欠除海水処理で生じた胚域分離胚とDNA合成阻害剤処理で生じた胚域分離胚の間には、胚域の分離の位置が同じならば、外形にも、以下に述べる内部構造にも、処理直後の胚以外差異はみられなかった。

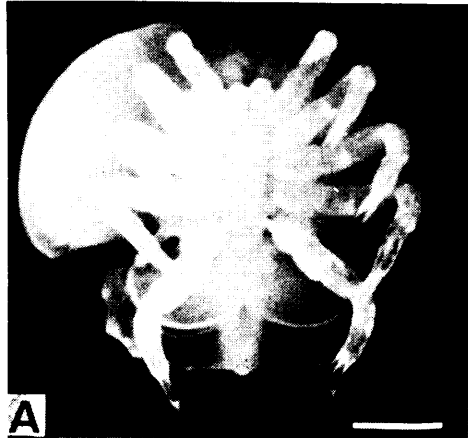
2. 中枢神経系の分離

胚域分離胚において、胚域が完全に分離したのも、不完全な分離だけのものも、その中枢神経系は完全に分離していた (Fig. 3; Fig. 5-C) すなわち、完全分離・不完全分離にかかわらず、胚域の分離部で、中枢神経系は分離し、胚域分離胚の各体節ごとに神経節が観察された。左右の付属肢が融合した体節では、左右の神経節が正中線に寄り、かたまって小さくなっていた。頭胸部第3・第4体節付近で胚域が分離した胚では、神経索の途中のその部分で、中枢神経の分離がおきていた。頭胸部第2・第3体節付近で胚域が分離した胚では、脳と食道下神

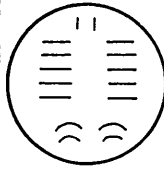
Table 1. The frequency of formation of the monsters with separated embryonic areas. The embryos were treated for 24 hr with Ca^{2+} free sea water, 5×10^{-2} M hydroxyurea or $25 \mu\text{g/ml}$ azaserine either at the stage of enlargement of germ disc (A) or at the stage of obvious morphogenic movement (B).

	Monsters with separated embryonic areas	Developed embryos	Number of experiments
	Number (% *)	Number (% **)	
Ca ²⁺ free sea water	50 (10.7)	469 (61.3)	45
(A) Hydroxyurea	134 (32.1)	418 (74.2)	25
Azaserine	73 (16.7)	436 (68.4)	34
Ca ²⁺ free sea water	29 (27.6)	105 (48.5)	13
(B) Hydroxyurea	19 (11.2)	169 (53.1)	14
Zsaserine	0 (0.0)	106 (92.9)	6
Sea water (for control)	6 (0.088)	6829 (100.0 ***)	

*Percentage of developing embryos which developed as the monsters with separated embryonic areas. **Percentage against control of embryos which developed. ***In normal sea water, 81.2 ± 9.5 (mean \pm S.D.) % of the total number of embryos developed. They were converted into 100.0 %.



A



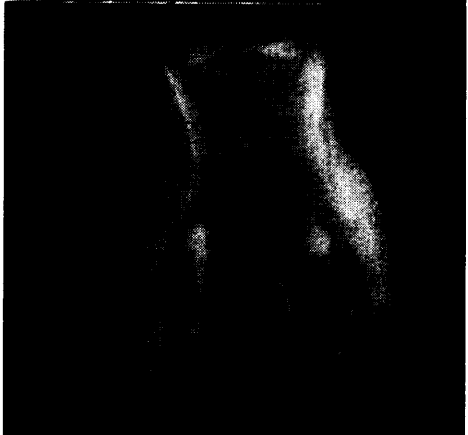
E



B



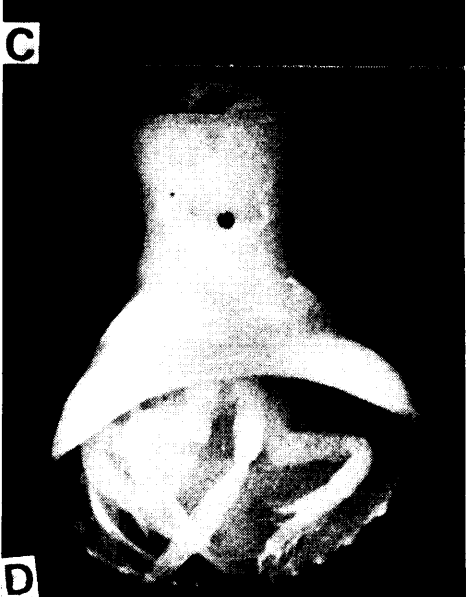
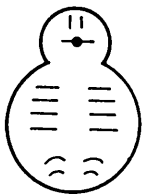
F



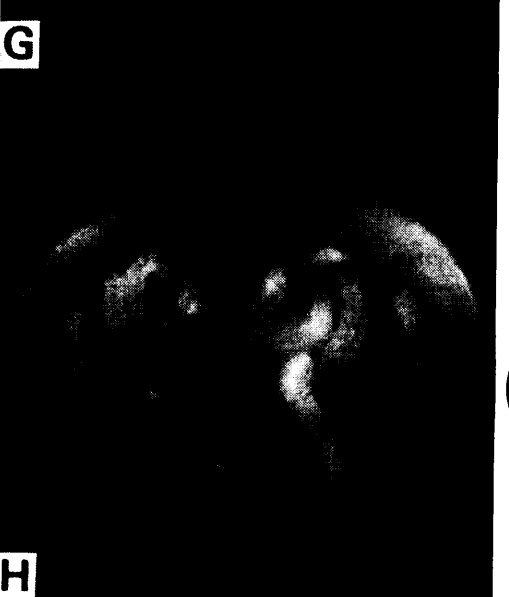
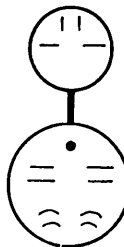
C



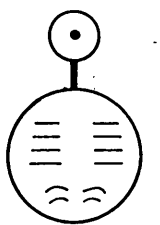
G



D



H



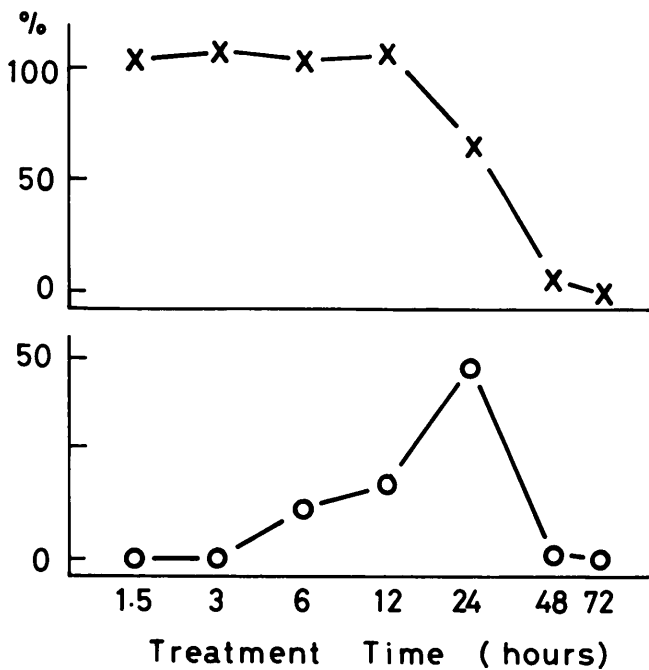


Fig. 2. The effect of treatment time to the rate of formation of the monsters with separate embryonic areas in the treatment with 25 $\mu\text{g/ml}$ azaserine at stage 7. x: The rate of development against the control; o: The rate of formation of the monsters against the developed embryos in the control experiment.

経節と思われる神経節の集まりと他の神経索との間で分離がおきていた。胚域分離胚の前方胚域が消失した胚、すなわち、前方欠損胚には、脳らしい構造が観察されなかった (Fig. 3-E)。

分離した中枢神経系を組織標本で観察したところ、分離はしているが、個々の組織の状態に正常胚のものとの差はみられなかった。また、前後に分離した各胚域の付属肢は運動を行なうので、各神経節は、分離しても、部分部分で機能を果していると思われる。

3. 脳の位置異常

脳と神経索が分離した胚の一部に、特に、脳の位置が異常なものがみられた。前口動物群に属するカ

ブトガニの神経系は消化管と交差し、脳は相対的に消化管の背側かつ前方にある (Beklemishev, 1964; Scholl, 1977)。ところが、神経系と消化管の交差がみられず、脳が消化管に対し、相対的に腹側かつ後方に位置する胚が見出されたのである (Fig. 3; Fig. 4)。このような脳の極端な位置異常は、頭胸部第3・第4体節付近で胚域が分離した胚にはみられず、頭胸部第2・第3体節付近で分離した胚に限って観察された。しかも、分離した胚域のうち、前方胚域に付属肢がない場合か、あっても、頭胸部第1肢 (鉗角) のみの場合がほとんどであった。脳の位置の極端な異常は、分離した胚域の前方域に頭胸部第2肢までが存在する胚にもみられたが、このような胚での脳の位置異常出現率は低く、かつ、第2肢が融合しているものに限られていた。

脳の位置異常は、胚域が完全に分離した胚にも、不完全にしか分離していない胚にも同じようにみられ、上述の観察は両者に共通していた。

なお、前方欠損胚には、脳と同様に、口道もみられなかった (Fig. 3-E)。

4. 脳と神経索の分離形成の過程

Ca 欠除海水は他の動物同様、カブトガニ胚の細胞を解離させる (Herbst, 1900; Itow and Sekiguchi, 1979)。胚盤拡大期のカブトガニ胚を Ca 欠除海水で処理すると、胚盤の細胞の接着は弱くなり、胚盤内外のいろいろな場所で解離がおこり、(例外もかなりみられたが) 主に頭胸部第3・第4体節付近で胚域の分離した胚になった。

カブトガニの活発な形態形成運動期に、胚盤周辺部の細胞は胚盤前方の正中部に集まって来る。ひきつづき、胚盤の前端部、すなわち、のちの頭胸部第2・第3体節付近になる部分を中心に、胚域が全体のつながりを保ちながら、前後に伸長していく (Itow and Sekiguchi, 1980)。Ca 欠除海水で処理すると、その伸長の中心部で胚域の解離がおこり、処理された胚は頭胸部第2・第3体節付近で胚域が分離した胚になった。

DNA 合成阻害剤で胚盤拡大期の胚を処理した場

Fig. 1. Examples and the diagrammatic sketches of the monsters with separate embryonic areas. A: A normal embryo; B to D: The monsters whose embryonic areas are separated mainly at the 3rd and 4th prosomal segment; E: The monster whose anterior area of separate embryonic areas is lost. That is, the monster having no anterior part of embryo; F to H: The monsters whose embryonic areas are separated mainly at the 2nd and 3rd prosomal segment. The monsters of B, C, F and G have the incomplete separate embryonic areas. The embryonic areas of the monsters of D and H completely separated. White bar = 1 mm.

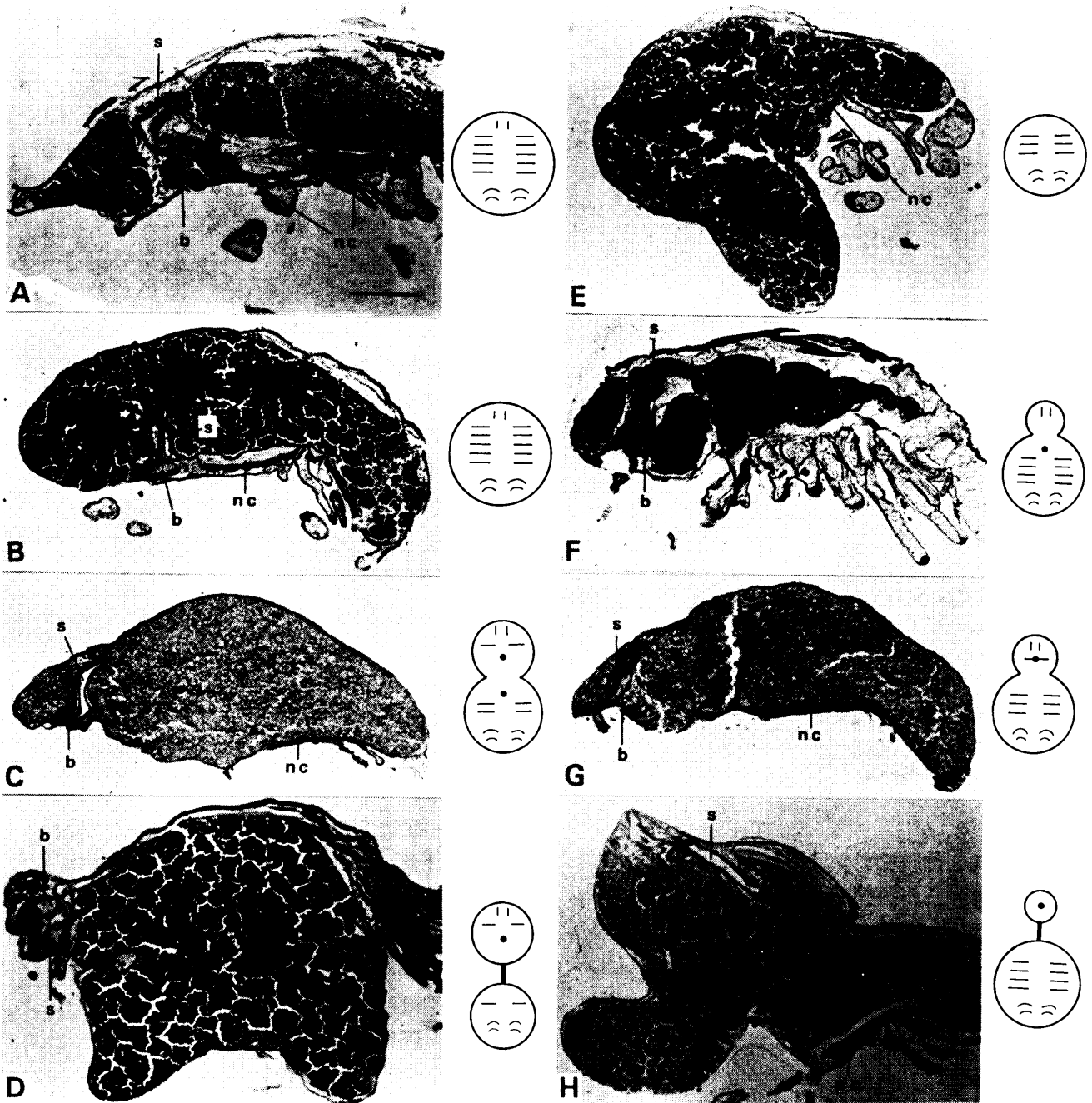


Fig. 3. The histological features of the monsters with separate embryonic areas. A: A normal embryo at stage 21 (the 1st instar larva); B: A normal embryo at stage 20; C and D: The monsters whose brains situate at the normal position; E: The monster having no anterior part of embryo; F to H: The monsters whose brains situate at the abnormal position. Their nervous systems and their alimentary canals do not cross each other; The monsters of C to H are ones at stage 20, and they have the separated nervous systems. Black bar = 0.5 mm. b: brain; nc: nerve cord; s: stomodaeum.

合は、細胞の増殖が抑えられ、胚盤の形成が不完全になった。そのため、形態形成運動期のCa 欠除海水で処理の場合ほど明確ではないが、胚域の伸長の中心部で胚域が分離した。

胚域の分離をおこした胚では、正常胚同様、体節構造が出現し (Stage13), 付属肢原基が出現する Stage 14 を過ぎると、中枢神経系が観察され始めた。そして、胚域分離胚の中枢神経系は分離しながらも、正常胚におけるのと同様に発達した (Fig 5)。

カブトガニ胚の口は頭胸部第1肢より前方に生じ、発生が進むにつれ、頭胸部第3・第4肢付近まで、相対的に後方へ移動する (Kingsley, 1892; Patten, 1896)。しかし、胚域分離胚の口は、分離した胚域の前方胚域にとどまっていた。いっぽう、まだ卵黄を包んだままの、後に中腸となる内胚葉へ

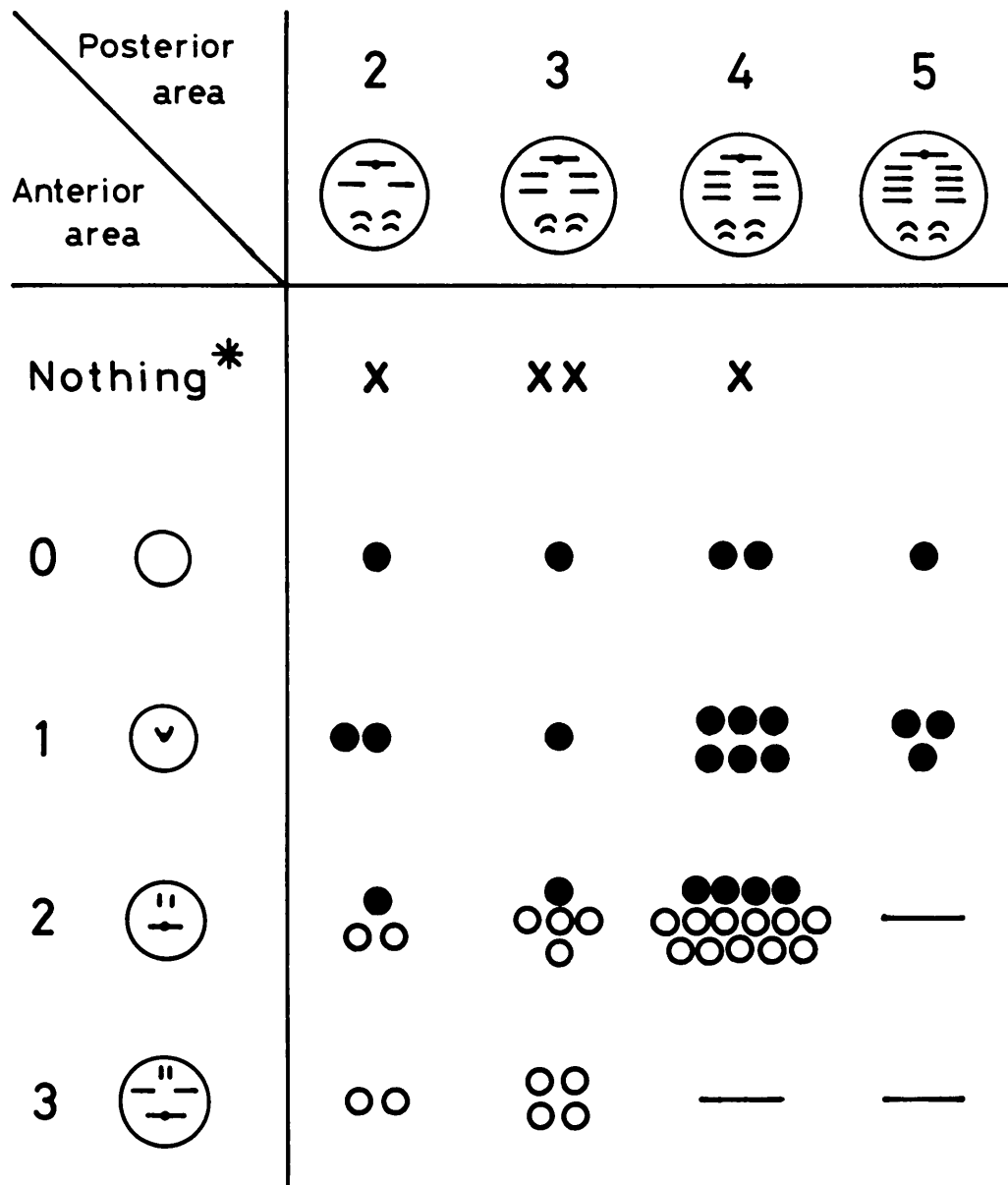


Fig. 4. The position of brains in the monsters with separated embryonic areas. X: The monsters having no brains and no stomodaea; ●: The monsters whose nervous systems and stomodaea do not cross each other. Their brains situate at the abnormal position; ○: The monsters having the brains that situate at the normal position; *: The monsters having no anterior part of embryo. Numerals show the number of prosomal segments that have appendages, in each area of separated embryonic areas.

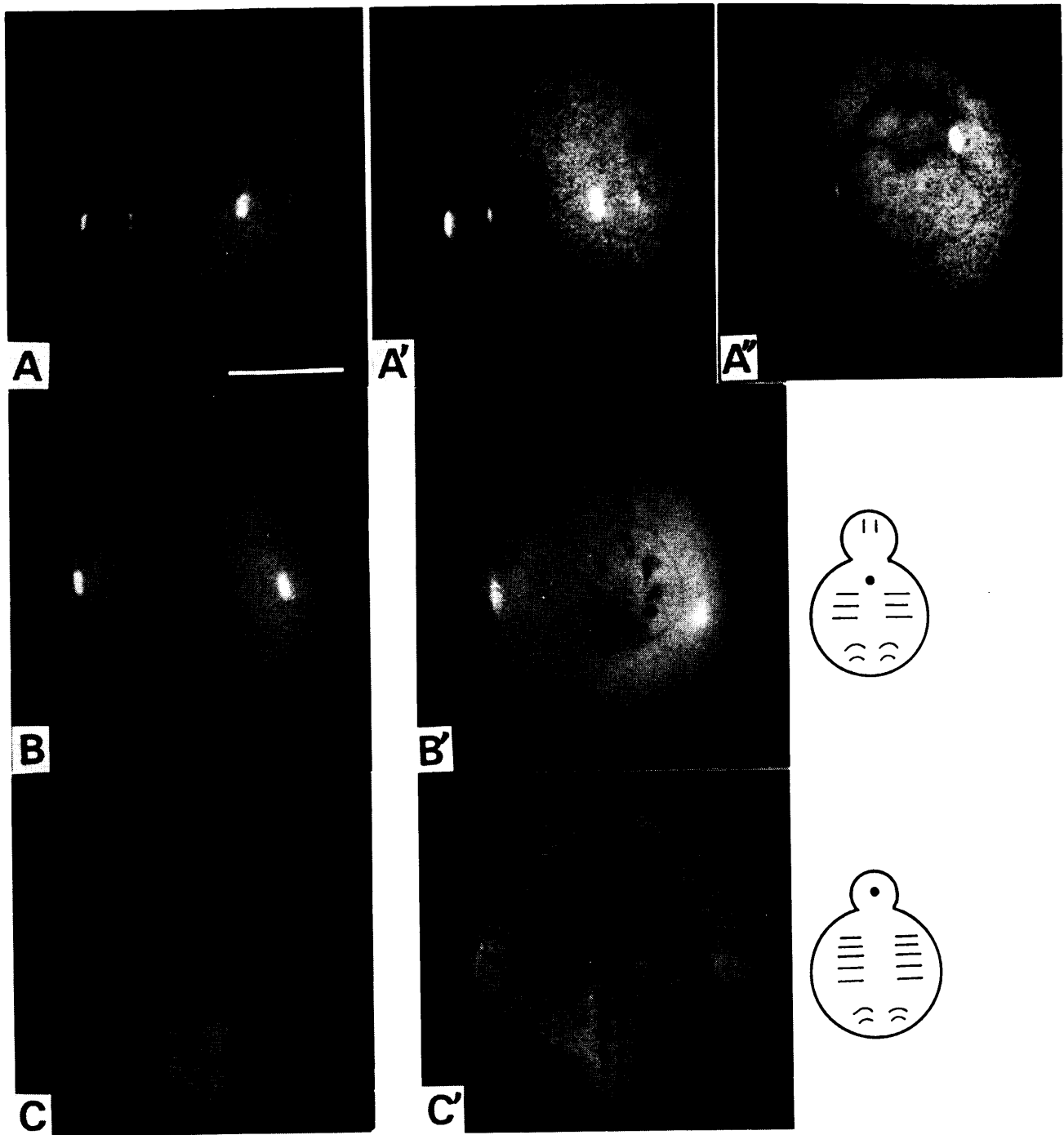


Fig. 5. Development of normal embryos and the monsters with separated embryonic areas. A to C: Normal embryos. A: An embryo at stage 11; B: An embryo at stage 17; C: An embryo at stage 19; A' to C' and A'': The monsters with separated embryonic areas. A': The monster at stage 11. It was treated with $25 \mu\text{g/ml}$ azaserine for 24 hr at stage 7, A'': The monster at stage 11. It was treated with Ca^{2+} free sea water for 24 hr at stage 10, B': The monster at stage 17. It was treated with Ca^{2+} free sea water for 24 hr at stage 10; C': The monster at stage 19. It was treated with 5×10^{-2} M hydroxyurea for 24 hr at stage 8. b: brain; nc: nerve cord. White bar = 1 mm.

