

トラフグ (*Takifugu rubripes*) 脊髄における中心管形成に関する研究

加藤篤幸*・上原正人*

平成元年5月31日受付

Morphogenesis of the Central Canal in the Puffer (*Takifugu rubripes*) Spinal Cord

Atsuyuki KATO*, Masato UEHARA*

The morphogenesis of the central canal in the puffer (*Takifugu rubripes*) spinal cord has been observed by light and scanning electron microscopy. The central canal through the whole length is formed by a so-called secondary neurulation, which is usually observed in the tail bud of birds and mammals. The fragmentary primordia of the central canal are initially formed as slit-like openings within the medullary cord which is composed of a solid, compact mass of cells. The slit-like openings are formed along the sagittal plane of the medullary cord. Serial sections revealed that such slit-like openings are isolated from one another. The central canal is formed by fusion of these slit-like openings. The apical sides of the lateral walls of the central canal are in close apposition. However, the porelike openings, which are usually located dorsally and/or ventrally, are observed in occluded areas.

緒 言

神経管は、将来中枢神経系に分化する部分であり、その発生の時期はあらゆる器官の中でもっとも早い。神経管は一般に一次神経管形成と二次神経管形成の二つの発生様式によって形成されることが知られている⁷⁾。一次神経管形成は最も一般的な神経管発生様式である。すなわち、胚子部の正中軸で肥厚した外胚葉が神経板となり、ついで板の中軸が次第に凹んで神経溝が現われ、これに反し板の両縁は神経隆起となって神経ヒダを造って盛り

上がる。神経ヒダは神経溝に被いかぶさり、こうして溝は深さを増し、ヒダは高さを加え、ついに両側のヒダの頂点が正中線で結合して神経管となる方法である。魚類以外の脊椎動物では脳と脊髄の大部分がこの方法によって形成される。二次神経管形成は魚類以外の脊椎動物の尾部で起る。これら動物の体尾部の構造はすべて尾芽から発生する。尾芽とは表皮を別にすればまったく同一の細胞が盛んに増殖しながら尾方に伸長しているもので、この細胞群から神経管と中胚葉が分化する⁹⁾。

最も良く研究されている鶏の二次神経管形成は、尾芽

* 鳥取大学農学部獣医学科家畜解剖学講座

* Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture, Tottori University

の細胞塊から神経管原基である管腔を伴わない細胞索 (medullary cord) がまず分化する。medullary cordは頭側で一次神経管形成によって生じた神経管と連続している。次いでmedullary cord内で不規則な内腔を持つ空洞化が起り、これら複数の内腔が互いに融合しながら、同時に一次神経管形成によって形成された中心管と融合する事によって中心管が形成される^{1,5,10,11)}。しかし、ヒトを除く哺乳類ではmedullary cord内に単一の内腔を持つ中心管が伸長する^{4,14)}。

ところで硬骨魚の神経管形成は脳も含めてすべて二次神経管形成によって発生する³⁾。そして脊髄の中心管はまずmedullary cordの腹側に初期中心管が形成され、次いで背側へと拡がり形成される^{6,8,15)}。しかし、魚類の神経管形成に関する報告は少ないので、従来の報告以外の魚種に関する研究が必要である。

本実験の目的は脊髄レベルでの神経管形成を追うためにフグの胚子を用い、ある程度の幅を連続的に観察するため、解析力が高いメタクリレート樹脂包埋の完全連続切片を作成し、光学的及び走査型電子顕微鏡的に観察した。

実験材料および方法

材料には硬骨魚綱フグ目フグ亜目マフグ科トラフグ *Takifugu rubripes* の胚子を用いた。観察に供した材料は4日目2時間齢と9時間齢, 5日目2時間齢と9時間齢, 6日目2時間齢胚子である。また、材料は山口県内海裁培試験場にて入手した。

光学顕微鏡的方法

各々の材料はpH7.4の0.1M磷酸緩衝液 (PBS) を溶媒とした2%パラホルムアルデヒド・2%グルタルアルデヒド溶液によって前固定した。この材料を実体顕微鏡下でムシピンとメスを用い卵殻と卵黄を取りのぞき胚体だけにした。これをアルコールにて脱水し、メタクリレート樹脂に重合包埋した。ついで、準超薄用マイクローム (SORVALL JB-4) により2 μ mで連続切片を作成し、2枚のスライドガラスに交互に拾い、一枚は1%ホウ酸ナトリウムを溶媒とした1%トルイジンブルー溶液で染色を施し光学顕微鏡で観察した。そして、もう一枚は染色も封入もせずに走査型電子顕微鏡で観察するために以下の処理を施した。特に5日目2時間齢では3 μ m間隔で連続切片を作成し観察した。

走査型電子顕微鏡的方法

樹脂切片をクロロホルムで12時間脱樹脂した後、四酸化オスミウム溶液による後固定を施した。再びアルコール系列による脱水後、酢酸イソアミルに置換し、更に液化二酸化炭素を置換液として用いる臨界点乾燥機 (HCP-2 HITACHI) で乾燥した後、マルチコーター (VX-10A GIKO) で、イオンエッチング (加速電圧DC600V, イオンカレント2mA以下) を4分間、続いて白金蒸着し、走査型電子顕微鏡で観察した。

結 果

4日目2時間齢

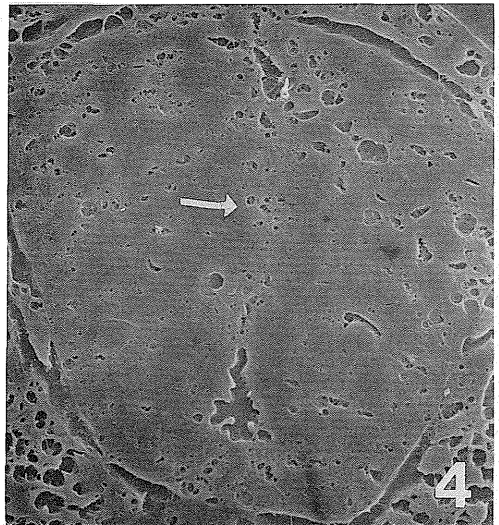
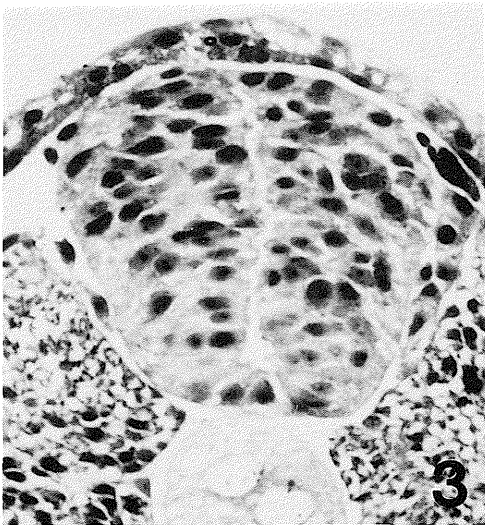
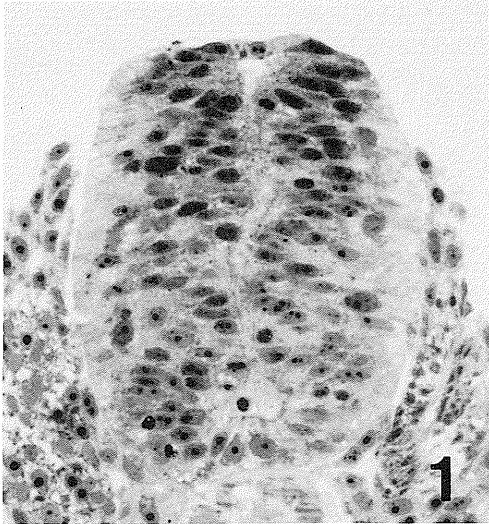
medullary cordには正中線に沿って背腹に長い裂隙状の中心管が見られた。しかし、詳細な点ではかなりの変異が見られた。それらは、一断面において裂隙状の中心管の一部に断裂が見られるもの、背側端と腹側端で内腔が拡張しているもの (以後それぞれの内腔をDL, VLとする)、VLだけが内腔として存在し中心管は全く認められないもの、VLもDLも含めて中心管を全く認められないものであった。長い裂隙状の中心管は一般的に蛇行していた (第1図)。また裂隙状の中心管は一般に閉鎖していた。これら切片の走査型電子顕微鏡像ではDLとVLがはっきりとしているが、裂隙状の中心管は認められなかった (第2図)。

4日目9時間齢

光学顕微鏡的には、裂隙状の中心管はほぼ直線的になり、内腔はやや拡大し、DL, VLはいずれも明らかであった。しかし、中心管の状態にはここでもかなりの変異が見られ、中心管裂隙状部が極めて狭いものも見られた。この変異には4日目2時間齢と類似するものもあった。中心管はDL, VL両側から中心に向かって拡大していた (第3図)。その走査型電子顕微鏡像では中心管裂隙状部は連続した内腔を形成していなかったが、多数の小腔が見られた (第4図)。

5日目2時間齢

すべての切片でDL, VLはより拡大し、一般にDLの方が大きかった。中心管は一般に間隔の狭いほぼ直線状に形成されており、数箇所癒着していた (第5図)。

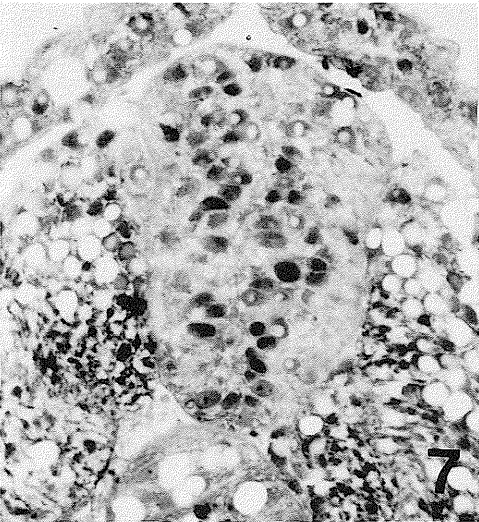


第1図：蛇行する裂隙状の中心管。(×600)。

第2図：DL (矢印), VL (矢頭) 以外は中心管が見られない。(×660)。

第3図：裂隙状である中心管。(×630)。

第4図：走査型電子顕微鏡写真では中心管裂隙状部に多数の小腔 (矢印) が見られる。(×800)。

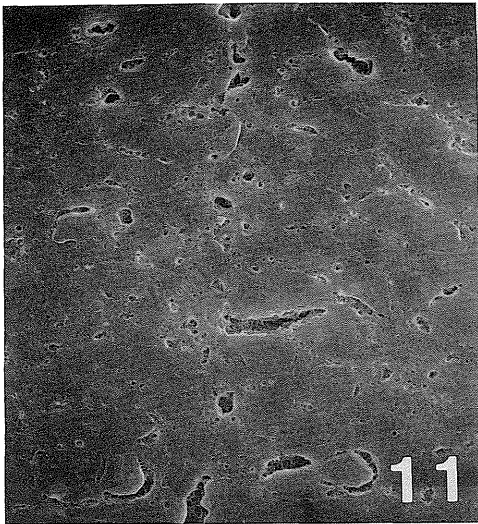
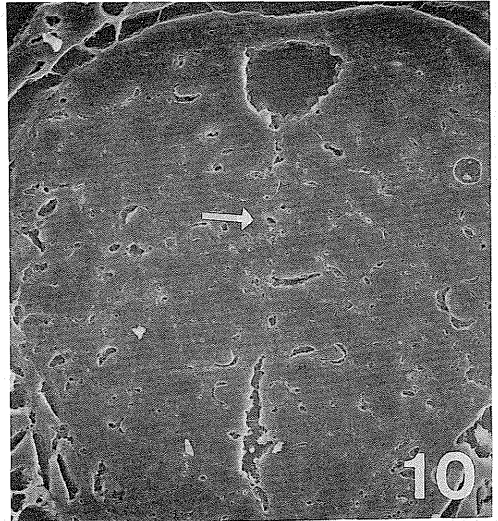


第5図：中心管裂隙状部に数箇所の癒着が見られる。
(×630)。

第6図：ほぼ直線的な中心管。(×560)。

第7図：背側で弯曲している中心管。(×560)。

第8図：ジグザグ状で全く不明瞭な中心管。(×560)。

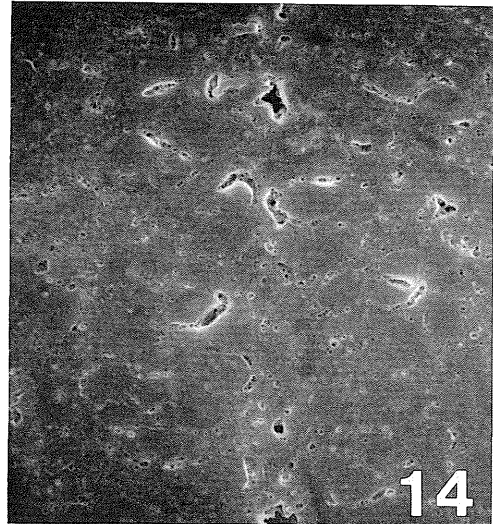
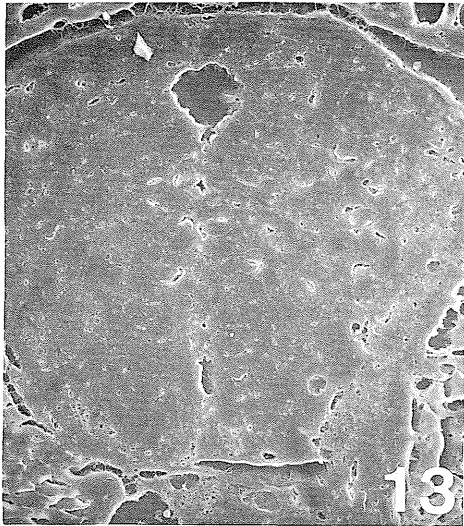


第9図：中心管裂隙状部に内腔が見られる。(×600)。

第10図：中心管裂隙状部に内腔(矢印)が見える。
(×800)。

第11図：第10図の中心管裂隙状部拡大像。(×2,100)。

第12図：中心管裂隙状部で癒着した中心管。(×600)。



第13図：中心管裂隙状部に内腔が見られる。(×660)。

第14図：第13図の拡大像。(×1,700)。

第1, 3, 5~9, 12図はトルイジンブルー染色の光学顕微鏡写真。

第2, 4, 10, 11, 13, 14図は走査型電子顕微鏡写真。

さらに詳細に尾側に向かって3 μm 間隔で観察したものは、中心管がほぼ直線的でその両側に核が列をなして規則正しく配列しているもの(第6図)、その尾側では中心管が背側で弯曲しジグザグ状を呈し腹側で小さな内腔を備えているもの(第7図)、さらにその尾側では中心管がジグザグ状で腔は全く不明瞭で核がVL周囲に放射状配列をしているが背側では散在しているもの(第8図)、の三つの型が順に観察された。そして、それより尾側に於てはこれら三つの型が順不同に観察された。

5日目9時間齢

いずれの切片も、DLが大きく頂点が腹側を指す正三角形に近い形で形成されていた。VLは裂隙状に形成されていたが、ほぼ直線状に筋目として見られる中心管とは区別がつく。中心管裂隙状部は閉鎖していたが、その状態には変異が見られた。即ち、DL, VL以外はほとんど閉鎖しているもの、DLとVL両側から中心に向かって中心管が形成されているものがあった(第9図)。走査型電子顕微鏡による観察で、DLは大きく認められ、VLも光学顕微鏡像よりはっきりとした内腔として存在

していた。中心管裂隙状部の内腔が明らかにみられたものは走査型電子顕微鏡像でも同様に見られ、DL, VLが中心に向かって広がっていた(第10, 11図)。

6日目2時間齢

光学顕微鏡像ではどの切片もDLが円形に近く大きく、そしてVLも、5日目9時間齢に比べてより拡大していた。中心管裂隙状部の拡がりには変異が大きいが、内腔の特に広いものは見られなかった(第12-14図)。

考 察

今回の実験に於て、フグの5日目2時間齢胚子を観察した結果、今回の研究目的である明らかに中心管を備えていない神経管を見つけた。そこでこの日齢を中心として標本を作成し観察した。

5日目2時間齢の標本を観察すると、同一個体においても前後して中心管の状態には何種類かの型が存在した。即ち、中心管が全く形成されていないものからDL, VLが明らかでその間に裂隙状の中心管を備えたものまで観察された。これらの走査型電子顕微鏡による観察に於

でも、中心管はDL, VL間の正中線上の所々で空洞化の集合として存在しているようである。これらの事から、硬骨魚に於ける脊髄中心管形成過程には、medullary cord内の細胞が細胞群として正中線を境に左右両側へ分離し、そこに中心管ができるが、その中心管形成は必ずしも頭側から尾側へ連続して進行するものではない。また、まず腹側に内腔(VL)が形成され、次いで背側へ伸長して中心管を形成するもの⁶⁾でもない。胚子の中心管はDL, VLおよびその間の裂隙状部からなるが、これらの形成に規則性は見られなかった。つまり、将来中心管が形成されるべき位置(medullary cordの矢状断面上)に複数の裂隙状の内腔形成が起り、それらの融合によって一つの内腔(中心管)を形成する、という推測ができる。この事は一断面上に観察されるのみならず、頭尾方向にも観察された。SCHOENWOLFとその共同研究者による鶏胚子の二次神経管形成においても尾芽中に複数の内腔が形成され(この様をcavitationと表現しているが)、これらの融合によって単一の中心管が形成される^{2,9-13)}。従ってこの点に関しては本例と鶏胚子の中心管形成は類似していた。しかし鶏胚子のcavitationの内腔は広いが、本例では常に内腔の不明瞭な裂隙状であった。さらに、鶏胚子の中心管形成は尾方に向かって連続的に進行するが、本例では頭尾軸においても不連続に裂隙状の中心管が形成された後、それらの融合によって単一の中心管が形成された。

今回観察した節囲の中心管はすべて背腹に長い裂隙状を呈し、VLとDLでのみ内腔が明らかに認められた。当教室の田口によるトラフグの孵化後の発生学的研究によると裂隙状の中心管は終始開く事がなかった。鶏胚子の脊髄中心管の発生学的研究によると、中心管は約1.5~3.0日胚の間閉鎖する¹²⁾。この閉鎖した状態は本例の裂隙状中心管と非常に類似していた。さらに、走査型電子顕微鏡的観察において中心管裂隙状部に多数の小腔が見られたとはいえ、連続する内腔を形成していなかった事はこれを裏付けている。発生中における中心管の一時的閉鎖は鳥類と哺乳類に特有の現象とされているが²⁾、魚類、少なくともトラフグでは終始中心管は閉鎖した状態にあり、中心管閉鎖の意義(脳の急激な拡大)について再検討を必要とするかもしれない。

総 括

硬骨魚における脊髄中心管の形成過程を検討する目的で、トラフグの胚子を樹脂包埋し、連続切片を作成、光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡で観察した。

その結果、トラフグの脊髄中心管は細胞索状のmedullary内で、鳥類と哺乳類に見られる、いわゆる二次神経管形成によって形成されていた。脊髄中心管は、一横断面においても頭尾軸方向においても、将来中心管が形成されるべき位置(medullary cordの矢状断面上)で複数の裂隙状の内腔形成が起り、さらにそれらの単一内腔への融合によって中心管形成がなされていた。これは従来魚に関する報告および鳥類と哺乳類の尾芽に見られる二次神経管形成と異なっていた。

謝 辞

今回の材料であるトラフグを提供して下さった山口県内海栽培試験場に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Criley, B. B. : Analysis of the embryonic sources and mechanisms of development of posterior levels of chick neural tubes. *J. Morphol.*, 128 465-502 (1960)
- 2) Desmond, M. E. and Schoenwolf, G. C. : Timing and positioning of occlusion of the spinal neurocele in the chick embryo. *J. Comp. Neurol.*, 235 479-487 (1985)
- 3) Harder, W. : *Anatomy of Fishes*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nagele u. Obermiller), Stuttgart (1975) pp. 370
- 4) Hughes, A. F. and Freeman, R. B. : Comparative remarks on the development of the tail cord among higher vertebrates. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 32 355-363 (1974)
- 5) Klika, E. and Jelinek, R. : The structure of the end and tail bud of the chick embryo. *Folia Morphol.*, 17 29-40 (1968)
- 6) Miyama, Y. and Fujimoto, T. : Fine morphological study of neural tube formation in the Teleost, *Oryzias latipes*. *Okajimas Folia. Anat. Jpn.*, 54 97-120 (1977)
- 7) Romanoff, A. L. : *The avian embryo*. The Macmillan Co., New York (1960) pp. 217-221
- 8) Saitou, S. : The embryological study of fishes. *J. Fac. Agr., Hokkaido Univ.*, 98 271-275 (1950)
- 9) Schoenwolf, G. C. : Tail (End) bud contributions to the posterior region of the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 201 227-246 (1977)

- 10) Schoenwolf, G. C. : An SEM study of posterior spinal cord development in the chick embryo. *Scanning Electr. Microsc.*, 11 139-146 (1978)
- 11) Schoenwolf, G. C. and Delongo, J. : Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. *Am. J. Anat.*, 158 43-63 (1980)
- 12) Schoenwolf, G. C. and Desmond, M. E. : Descriptive studies of occlusion and reopening of the spinal canal of the early chick embryo. *Anat. Rec.*, 209 251-263 (1984)
- 13) Schoenwolf, G. C. : Histological and ultrastructural observation of tail bud formation in the chick embryo. *Anat. Rec.* 193 131-148 (1979)
- 14) Shedden, P. M. and Wiley, M. J. : Early stages of development in the caudal neural tubes of the golden syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *Anat. Rec.*, 219 180-185 (1987)
- 15) Tavalga, W. N. : Embryonic development of the platyfish (*Platyocilus*), the swordtail (*Xiphophorus*), and their hybrids. *Bull. Am. Museum Natl. History*, 94 161-230 (1949)