The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies on mechanism of pharyngeal formation in planarian regeneration.
Author(s)	朝井, 悦夫
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37701
rights	
Note	著作権処理が未完了のため、要旨及び一部のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

CONTENTS

Chapter 1 Regenerating activity of pharynx.

a. Regeneration of the distal part of the pharynx of the freshwater planarian, Dugesia japonica japonica Ichikawa et Kawakatsu.

Chapter 2 Source of pharynx-forming cells.

a. Influence of X-irradiation on pharyngeal induction in the planarian, Dugesia japonica japonica.

b. Cell source of a new pharynx induced by head graft in the freshwater planarian, Dugesia japonica.

c. Pharyngeal induction by heteroplastic transplantation between different families of planarians.

Chapter 3 Role of nerve cord on pharynx induction.

a. Influence of nerve cord removal on pharynx induction by head piece transplanted in postpharyngeal body region of the planarian, Dugesia japonica japonica.

b. Induction of pharynx by nerve-cordless prepharyngeal tissue graft in planaria.

Chapter 4 Cell differentiation in pharynx regeneration.

a. The behavior of pharyngeal outer epithelial cells during regeneration of the planarian Dugesia japonica japonica.

b. Electron microscopic studies on formation of pharyngeal cavity and lumen in regenerating planarian. (in manuscript)

Appendix Electron microscopic observation on intranuclear inclusion of planarian pharyngeal epithelial cells.

a. On the intranuclear inclusion of pharyngeal cells in freshwater planarian.

b. Les cristaux intranucléaires des cellules pharyngiennes chez la Planaire, Dugesia japonica Ichikawa et Kawakatsu.

要約

Morgan(1900)が動物の再生の過程には、付加形成(epimorphosis)と形態調節(morphallaxis)の２つの機構があることを指摘して以来、再生の研究はそれらの機構の解明に向けて、常に古くて新しい問題として行われてきた。両生類の肢の再生は付加形成の代表的な例としてよく知られているが、下等無脊椎動物であるヒドラやプラナリアの再生では、細胞増殖が主体的な役割りを果たしているのではなく、細胞の相互位置の変更と、恐らくは細胞の分化転換、細胞形態の変更などによって再編成が行われると考えられる。プラナリアの頭部片を咽頭後部域に移植した際に、移植片の前後で起こる過剰な咽頭の形成は Brøndsted(1969)以来、典型的な形態調節によって行われると考えられて来ているが、その機構の解明はまだ十分に成されていない。筆者はまずこの機構解明を目指す一連の移植実験を行った。

細胞の分化転換は、細胞分化の機構を理解する上で基本的な重要性をもつもので、Eguchi and Okada,1973, Schmid,1974を嚆矢として近年、種々の動物細胞において、その事実が次第に証明されて来た。プラナリアについてはすでにKidoが(1961a,b) 咽頭形成に関する組織学的研究において、腸管細胞由来の脱分化した再生細胞が咽頭上皮や咽頭嚢の上皮組織細胞に分化転換する可能性を示唆していたにも拘らず、この重要な示唆を細胞レベルで確かめる研究は、これ迄のところ報告されていない。特に咽頭上皮細胞はいわゆる陥入型(insunk type) の細胞であって、この様な特異な形状が、どの様にして再構築されるのかについても、研究がなされていない。わずかに Gremigni and Miceli(1980)は染色体数を標識として、雄性生殖細胞が咽頭の筋肉細胞に分化転換することを指摘しているに過ぎない。そこで筆者は咽頭再生過程における細胞の微細構造を追跡する研究を行った。

本論文はこれらの諸研究をまとめたものであり、四章と付録から構成されている。

第一章　咽頭の再生能　（咽頭先端再生）

プラナリアの旺盛な再生力を担う細胞としては、この虫の柔織中に遊離細胞として存在し、唯一の分裂能をもつ新生細胞(neoblasts)が考えられてきた。しかし、新生細胞は咽頭組織中には極めて少ないかまたは存在しないと考えられている(Lender and Gabriel,1961; Baguñà,1975)。そこでまず、咽頭内に新生細胞が存在しないことを種々の組織学的染色法によって確かめたのち、咽頭の先端部を切除してその再生過程を調べた。

切断後の再生の初期に、筋層下に沈んでいた上皮細胞の核周部(perikarya)はその表層部(apical cytoplasmic disc)へ引き上げられ、これらの細胞が傷口表面上へ伸展し、その新しい上皮の下に再生芽組織の形成が開始され、その後、時間の経過と共に再生芽組織の量は増大した。４日目では、修復された咽頭は全体として細長くなっており、明かに形態調節を行ったことを示していた。細胞分裂像は、咽頭の基部に続く虫体部組織中で切除後２４時間まで著しく増大したが、しかし、切断された咽頭組織中には全く見られなかった。組織学的観察からは、咽頭の付け根の虫体部域から切断面へ向かって新生細胞が移動するという証拠は得られなかった。また、咽頭再生芽を構成する細胞は形態学的特徴から咽頭の固定柔組織細胞(fixed parenchyma cells)と咽頭の腺細胞から由来するのであろうことが示唆された。

Ｘ線を照射した虫の咽頭の先端部を切除した場合にも、再生初期の組織学的変化は非照射の場合と殆ど同様で柔組織層に好塩基性細胞が出現し、小さいながら再生芽が形成された。

以上の実験結果から、咽頭先端部再生に於て生ずる再生芽の形成は新生細胞の移動や増殖による付加形成によるものではなくて、切断端付近の細胞の再配置や分化転換を含む形態調節によって形成されるものであろうことが確認された。

第二章　咽頭形成細胞の起原

新生細胞は分裂能をもった全能性の細胞であって、プラナリアが切断されると、その細胞が傷口に向かって移動集積し、再生芽を構成して、種々の細胞種に分化し、失われた組織や器官を修復するといういわゆる新生細胞仮説が、これまでに多くの支持を得てきた。一方、組織細胞が脱分化して再生細胞となり、増殖してのち元の細胞種に再分化したり、分化転換するといういわゆる脱分化説を支持する研究者も多い。

以上の様に、プラナリアの再生に関与する細胞の起源については現在もなお見解が一致していない。そこで、誘導咽頭の形成に関与する細胞を明らかにする目的で、まずX線照射を併用した頭部片移植実験を行った。正常虫とX線照射虫のそれぞれおよび相互間で、頭部片を咽頭後部域に移植した。

その結果、宿主と移植片のどちらか一方が、X線照射されていない場合は、全ての実験虫体に於て咽頭誘導が起こったが、宿主・移植片共に照射されている場合は、咽頭誘導は起こらないことが明らかとなった。この結果は、移植片の誘導者としての能性は、X線照射によってほとんど影響を受けないことを意味しており、頭部片の咽頭誘導能は、移植片の再生力とは関係なく、Wolff(1962)が仮定しているような移植片内の拡散性物質による可能性を示唆している。

一方、誘導咽頭の形成には、非照射組織の存在が必要であったが、しかし、宿主がX線照射され、移植片が非照射の場合、移植片内の細胞が移動して宿主内に咽頭を形成するのか、それとも宿主の照射された組織細胞が健康な移植片と接触することによってX線の影響から回復して誘導咽頭を形成するのか、ということは不明であった。そこでその点を明かにする目的で、X線照射とR.I.標識を併用した移植実験を行った。

その結果、新咽頭を構成する細胞は必ずしも非照射移植片由来のものだけでなく、照射宿主の細胞がかなりの程度に関与したことを示していた。このことは、X線照射された宿主組織が健康な

移植片と接触することによって、X線の影響から回復することを推測させる。

誘導咽頭を構築する細胞の起源に関して、更に確実な結論を得る為に、プラナリアの咽頭の組織構成が異科間で顕著に異なるという事実を利用した。即ち、プラナリア科に属するナミウズムシ Dugesia japonica japonica の咽頭の内側筋肉層の縦走筋と輪走筋は互いに分離して配列しているが、一方、デンドロシーラ科に属するイズミオオウズムシ Bdellocephala brunnea の咽頭の内側筋肉層の縦走筋と輪走筋は互いに混在して配列している。この特徴は、淡水棲三岐腸亜目の中の科を分類する上で、分類学上の重要な指標となっている。この事実を利用して、次のような組合せのX線照射と異科間移植の併用実験を行った。ここで D. J. はナミウズムシ(Dugesia japonica japonica)を表し、B. b. はイズミオオウズムシ(Bdellocaphala brunnea)を表す。

実験1：非照射の宿主(D. j.)と移植片(B. b)。

実験2：照射宿主 (D. j.)と非照射移植片(B. b.)。

実験3：非照射の宿主(D.j.)と照射移植片(B. b.)。

その結果、実験2では咽頭誘導は起こらなかったが、実験1および3の移植虫では、Dugesia 型の新咽頭が誘導されることが、確かめられた。従って、新咽頭は頭部移植片の細胞が宿主中に移動して形成されるのではなく、殆ど宿主の細胞で構成されると結論された。

第三章　咽頭誘導に関する神経の役割

咽頭後部域への頭部片移植による咽頭形成に神経索が関与するかどうか、またもし関与するならばどの様な役割を果たしているのかについて調べた。

まず、宿主の神経索の関与の有無及びその役割について調べる為に、頭移植後、宿主の神経索を除去する実験を行った。その結果、神経索を除去した実験虫のすべてに於て咽頭誘導が起こっ

た。特に、移植後２日目に神経索除去を行った移植虫に於ては複数の誘導咽頭の発生が見られた。また誘導咽頭の発達程度については、移植後、神経索除去までの時間が長ければ長い程、分化程度が進んでいた。

これらの結果から、宿主の神経索は咽頭の形成にとっては必ずしも必要ではなくて、むしろ多咽頭形成に対して抑止効果を持つと言える。２日目での神経索除去が多咽頭形成をもたらした事は、誘導咽頭形成の決定が頭移植後２日以内に起こることを意味している。また、神経索は虫体の極性を支配する事によって咽頭の極性を決定し、その存在は誘導咽頭の成長を促進する事が示唆された。

次に、移植片の神経組織が咽頭誘導能をもつかどうかを明らかにする目的で、移植片の神経索除去とＸ線照射を組み合わせた移植実験を行った。

その結果、移植片に神経索を含まない場合でも、かなり高い咽頭誘導の発生率を示した。このことから、咽頭誘導を引き起こす移植片の能性は神経索とは関係なく、移植片内の何らかの拡散物質によると考えなければならない。神経索を含む移植片によって誘導された新咽頭は神経索を含まない移植片によるよりも、その成長や組織分化はより急速に進行しているという事実は、神経組織が咽頭の成長に対して栄養的影響を与えているという仮説を支持している。

第四章　咽頭形成における細胞の分化

咽頭腔の形成は咽頭形成の第一歩として極めて重要な過程であり、咽頭内腔の形成は三岐腸類の特徴である筒型咽頭の形態を作る形態調節の過程であって、この間の細胞の行動は咽頭形成の基本となると思われる。また、特にいわゆる陥入型(insunk-type)の上皮細胞の形成過程については詳細に観察した。

虫体の咽頭前部域で横断された頭部を含む前方片における咽頭

再生を観察した。切断後、３日目の再生芽の中に狭い裂腔が出現する。この裂腔が咽頭腔の原基である。再生４日目で咽頭原基の基部と前方主腸管の切断端との境界部でもう一つの新しい組織間裂腔が形成される。この裂腔が拡張し、咽頭原基内を貫通して、将来、咽頭内腔を形成する。これらの裂腔の形成に関与する細胞に共通する特徴は、互いに中隔接着斑(septate desmosomes)で隣接の細胞と接着しており、裂腔に面した細胞質中には咽頭上皮細胞特有の桿状小体(rod-shaped bodies) が配列し、多数の微絨毛が裂腔中に突出しているが、核膜付近には未分化細胞の特徴であるクロマトイド小体(chromatoid bodies)が見られることである。咽頭腔の側端付近では細胞間小裂腔が見られ、それらの小裂腔が後に予定咽頭腔と連続して、咽頭腔が拡大される。また、裂腔壁形成細胞では貪食液胞(phagosomes)の形成や細胞の崩壊像が、咽頭腔や咽頭内腔の拡大の過程で共通して見られた。腸管の切断端付近の腸管細胞が、基底膜から遊離して、咽頭内腔上皮細胞の補充に関与すると思われる電顕像が得られた。これらの観察結果から遊離腸管細胞の分化転換が示された。

再生４日目の咽頭原基の表層細胞（予定咽頭上皮細胞）は、球形又は楕円形の核を有し、細胞質が狭く、クロマトイド小体をもつ等、未だ未分化細胞の特徴を示す一方、咽頭上皮細胞の特徴である桿状小体や中隔接着斑をもっているが、まだ核沈下の兆候は見られない。再生５日目では、予定咽頭外側上皮細胞は多くの繊毛と少数の微絨毛をもつようになり、幾つかの上皮細胞で、内側細胞層への核沈下が開始される。核沈下の現象は上皮組織の下に基底膜がまだ形成されない早い時期に沈下するものと、上皮組織の下に基底膜が形成された後に沈下するものとで行動に違いが見られた。

早い時期に核沈下する場合、上皮細胞の基部細胞質は細胞質突起を、下打ちしている筋芽細胞の間の細胞間隙の中に伸展させ、

その後、核が細長く伸びて細胞質突起内を沈下していく。遅い時期に核沈下する細胞では、上皮細胞の基部細胞質は多数の細い突起を基底膜の中に伸ばす。核の基部も幾つかの核突起を形成する。多くの微小管がこれらの核基部突起間に存在している。核の沈下が完了すると、核周辺の基部細胞質中に多量のグリコーゲン顆粒が認められ、陥入型上皮の形成が完了する。

以上の観察結果から、咽頭外側上皮細胞核の沈下はそれらの細胞を下打ちしている筋芽細胞によって合成される物質との接触によって引き起こされるのであろうという可能性が指摘された。また、微小管が、核沈下の初期に於ける核基部の顕著な指状突起の形成と関連があることが指摘された。

まとめ

以上のことから、①新生細胞を含まない咽頭の先端部再生は、典型的な形態調節によって修復が行われること、②頭部片の咽頭後部域への移植による咽頭誘導では、移植片内の細胞が誘導咽頭の形成に関与せず、宿主組織の構成細胞が咽頭組織細胞に分化転換することによって遂行されること、③頭移植による誘導咽頭の形成に於ては、宿主の神経索は必ずしも必要ではないこと、また、移植片の神経索が無くても咽頭形成が起こること、④通常の再生過程に於ける咽頭形成では、kido(1961a,b)が指摘した腸管細胞の咽頭内腔上皮細胞への分化転換が起こることが電顕観察より示されたこと、⑤陥入型の咽頭上皮細胞の再構築では、細胞核が積極的に移動して沈下すること、等が明かにされた。

付録　　咽頭上皮細胞の核包含体

プラナリアの咽頭上皮細胞において極めて顕著な核内結晶が見い出された。この結晶はパラフィン切片をエオシンBのエタノール溶液で染色した標本では光顕でも観察できるほどに大きいものであり、電顕では六角形、四角形などの1-2μの結晶として見られ

る。この結晶構造は約60-80Åの間隔で平行に配列されたサブユニットよりなっている。プラナリアにおける核内結晶はヨーロッパ産のプラナリアで報告されたものもあるが、日本産のものでは初めてであり、結晶構造を示したのは本研究が初めてである。このような結晶が咽頭上皮細胞の陥入型と何らかの関係があるのか、或はこの細胞の分泌性と関連があるのかについては、今後、より詳細な研究が必要である。