

アカハライモリ *Cynopus pyrrhogaster* 成体における尾の再生

山 舗 直 子¹⁾・小 櫃 諒 子²⁾

Tail regeneration in adults of Japanese fire-bellied newt, *Cynopus pyrrhogaster*.

Naoko YAMASHIKI¹⁾ and Ryoko OBITSU²⁾
(Accepted 22 July 2014)

1. はじめに

近年, 再生医療の実現に向けた研究成果が, 理学・医学の分野を超えて, 社会でも着目されている。ヒトをはじめ哺乳類は, 手足の切断に関して再生能力がない。一方, イモリやサンショウウオなど尾を有する仲間(両生類有尾目)は, 生涯を通じて尾や四肢の再生能力を持つ。無尾目のカエル類は, オタマジャクシの段階では肢も尾も再生するが, 変態後にその能力は失われてしまう。古くから数多く研究されている両生類の尾や四肢の再生については, 「切断後, 傷口の治癒, 細胞の脱分化, 細胞増殖による再生芽の形成, 再分化した細胞による組織および器官の構築」という過程が, 発生生物学に関する教科書的な図書には必ずと言っていいほど記されている(cf. 大隅 2007)。細胞の脱分化とは, 皮膚, 筋肉, 骨, 神経などに分化した細胞が, どのようなタイプの細胞にも分化できる状態に戻ることである。再生する過程では, 未分化となった細胞から再び分化が起こる。器官の再生能力においては生物種によって大きく異なるのに対し, 細胞の分化・脱分化の仕組みについては, 動物種間ではそれほど違いがないとされている。それ故に, 有尾類における研究成果は, その種に固有のものだけでなく, 多種にも広がる可能性を持つものと言える。

アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster* Boie) は, 日本固有の両生類で, 本州, 四国, 九州の水のきれいな池や水田等に生息している。飼育が容易であり,

実験動物としても多く用いられている。発生生物学研究室では, 昆恭平が2009年度の卒業研究において, アカハライモリの尾の中間を頭尾軸に垂直に切断し, その再生過程を追跡したところ, ほとんどの場合, 尾は尾側方向にほぼ正常に再生した。小櫃諒子は, 2010年度, 様々な尾の切断を試みた。それらの施術個体のうち1個体が, 過剰な尾を新生して双尾をもつ個体となった。研究室では, その後もこの双尾個体を飼育し続けている。本論文では, 尾の再生実験の結果の双尾の形成を例外とはせず, 再生個体には起こり得ることを目的とする。

我々は, あらためて二つの作業仮説を立てた。作業仮説の一つ目は, 切断部位における再生芽の形成とその後の再生が体の各部の位置と方向による制御を受けるというものである。二つ目は, 施術個体における切断時の脊椎の損傷の程度が再生に影響を与えるという作業仮説である。これらの作業仮説を確かめるために, 次の二つの切断法を対応させた。X切断法と名付けた方法では, 尾の根元からより近位とより遠位の差を作って尾を背から脊椎までと脊椎から腹側にギザギザに切断した。Y切断法では, 尾の背側を凹状に近位と遠位の2箇所切断した。一つ目の仮説は, 再生尾の立体構造を, 体の二つの軸, すなわち, 頭尾軸, 背腹軸, さらに, 体幹の基部から端までの近位-遠位の軸に分けて特徴をとらえ, それらが, 切断箇所や方向とどのように関連するかを見るためである。再生尾の正常な伸長, さら

¹⁾ 酪農学園大学農食環境学群環境共生学類発生生物学研究室

Laboratory of Developmental Biology, Department of Environmental and Symbiotic Science, College of Agriculture, Food and Environmental Sciences, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-midori-machi, Ebetsu-shi, Hokkaido, 069-8501, Japan

²⁾ 2010年度酪農学園大学環境システム学部生命環境学科発生生物学研究室卒業生

Laboratory of Developmental Biology, Department of Biosphere and Environmental Sciences, Faculty of Environment Systems, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-midori-machi, Ebetsu-shi, Hokkaido, 069-8501, Japan

現在, 栃木県なかがわ水遊園

Nakagawa Aquatic Park, Sarado, Otawara-shi, Tochigi, 324-0404, Japan

には、再生尾の頭尾軸、背腹軸の制御に脊髄神経が関与していることが報告されている (Mochii *et al.* 2007, Taniguchi *et al.* 2008)。二つの切断法ではどちらも、脊椎の長軸に沿った切断が含まれている。切断直後に脊髄を取り囲む脊椎骨の、特に背骨に沿った長軸方向の損傷の有無や損傷の程度をレントゲン撮影で確認し、その後の再生との関連を探った。

2. 方 法

2.1 飼育

アカハライモリは、ペットとして販売されている体長が 10 cm 程度で尾長のほぼ同じ個体を購入した。切断する方法の違いで X 切断法 4 匹、Y 切断法 5 匹をそれぞれ個体番号 (X 1-4, Y 1-5) をつけて、切断後は 1 匹につき 1 つの飼育ケース (横 220 mm × 奥行き 145 mm × 深さ 120 mm) に分けて飼育した。餌は冷凍赤虫 (株式会社キョーリン) を与え、4 日ごとにカルキ抜きした水に交換した。室内で飼育し、蛍光灯の光で明期 12 時間、暗期 12 時間とした。暗期はケースの周囲を段ボールで覆った。水温はほぼ 23°C 前後であった。

施術は 2010 年 8 月に実施し、2011 年 3 月まで施術個体の飼育を行った。

2.2 切断方法

アカハライモリを 1 匹ずつ、0.1% MS 222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, SIGMA) 溶液に 15 分程浸けて麻酔した。麻酔後、体長、尾長、尾高を測定し、解剖バサミとカッターを用いて X と Y の二通りの切断法で切断した。脊椎は非常に硬く細いために切断操作が不安定となり、刃先の切断面は当初想定した面から多少ずれることがあった。切断直後、実体顕微鏡 (OLYMPUS S2X7) に装着したカメラ (OLYMPUS E-510) で切断箇所を撮影した。麻酔が醒めるまで (約 30 分) は、バットに水分を含ませた紙製タオルを敷いた上に置き、麻酔から醒めた後に、飼育ケースに戻した。

(1) X 切断法

切断面を①脊椎に対して水平で背側に向う面②脊椎に対して垂直で尾側に向う面の 2 つを設定し、①と②の組み合わせで、ギザギザになる切断法を X とした。②は尾の基部により近い近位とより遠い遠位の距離の差を背側と腹側で設けた。断面は位置と向きから、近位尾側、遠位尾側、近位背側の 3 つとなり (図 1A)、遠位尾側のみ、背骨を垂直に切断した傷を含む。

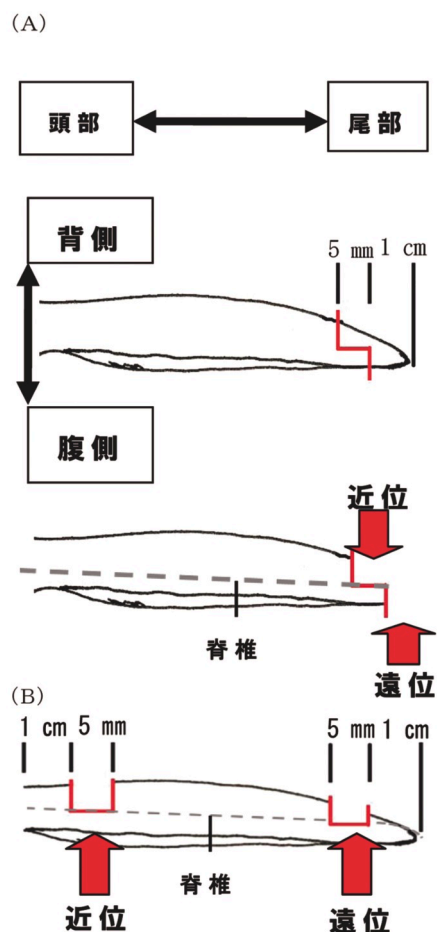


図 1 尾の切断法。(A) X 切断法、(B) Y 切断法。

(2) Y 切断法

①脊椎に対して水平で背側に向う面 (背側向き) ②脊椎に対して垂直で尾側に向う面 (尾側向き) ③脊椎に対して垂直で頭側に向う面 (頭側向き) を組み合わせて、背側に凹みがある切断を行った。さらに、凹みを尾の基部により近い近位とより遠い遠位の 2 カ所に設けた (図 1B)。①の面を脊椎骨に接するまでを基本としているが、中には脊椎骨に傷が及ぶ場合があった。

2.3 観察および記録

(1) 再生過程の観察

2 日毎に切断面の様子を観察し、デジタルカメラ (OLYMPUS μ 1600) で撮影した。各部の大きさを測定する時と、実体顕微鏡で再生箇所を詳細に観察する際は、0.1% MS 222 溶液を用いて麻酔をかけた。

(2) レントゲン装置による撮影

切断直後に麻酔をかけたイモリ 10 個体 (X1-4, Y1-5, コントロール個体) をレントゲン装置 (デジタルラジオグラフィ装置 DAR-300 SHIMAVISION RSi) によって背側からと側方からの両方を撮影した。また, 他の個体と異なる再生過程を示した 1 個体 (Y3) において, 172 日目にレントゲン撮影を行った。

3. 結果

3.1 X切断法

施術した 4 個体中, 3 個体において再生を確認することができた。残りの 1 個体 (X2) は切断後, 尾の再生開始前に死亡した。X3 個体は再生後に死亡した。再生過程はどの個体においても類似していた。X1 個体のものを代表して以下に記し, 写真を図 2 に示す。

【X1 個体】

切断面の治癒：切断面は白い膜 (傷上皮) に覆われ, 切断箇所の角が丸くなった。その後, 切断面が表皮によって完全に覆われた (切断 2-5 日目)。

再生芽の形成：各切断面に再生芽が垂直方向に形成され, それらが連なって一つの再生芽となった (切断 14-29 日目)。

再生尾の伸長 (前半)：正中線から斜め背側に伸長していた再生尾が, 正中線寄りに向きを変えて伸長した (切断 43-50 日目)。

(A)



(B)

| 日数(切断後) | 過程 | 日数(切断後) | 様子 |
|---------|----|----------|----|
| 0日 | | 29日 | |
| 14日 | | 51~103日 | |
| 18~26日 | | 104~115日 | |

図 2 X1 個体の尾の再生。(A)切断直後の個体において尾の切断部位を示す。(B)再生の過程。

再生尾の伸長(後半)：再生尾は, 正中線に沿って伸長していった。それと同時に, 再生尾の根元付近で, 元の尾高まで伸長していった(切断 51-103 日目)。

再生尾の完成：切断した箇所の区別がつかなくなるくらいに, 再生尾が元の組織と緩やかに連なった (切断 104-115 日目)。

3.2 Y切断法

施術した 5 個体中, 4 個体において再生を確認することができた。他の 1 個体 (Y1) は切断後に死亡した。Y2 個体と Y3 個体の再生過程を以下に記す。

【Y2 個体】

2 箇所の切断部分において同様の過程で, 完全に元通りまで再生した。近位と遠位における差はほとんどなかった。切断直後の状態と, 再生過程の写真を図 3 に示す。Y4 個体の再生過程も同様であった。切断面の治癒：遠位の凹状の切断面が白い膜 (傷上皮) に覆われ, 角が少し丸みを帯びた (切断 1 日目)。

再生芽の形成と再生の進行：近位と遠位においてどちらも同じ程度に, 凹状の切断面の角が丸くなり (切断 10 日目), 各切断面から形成された再生芽が連なり, 脊椎から背側へと再生組織が広がっていった (切断 12-86 日目)。

再生の完了：近位と遠位の両方において, 再生組織が完全に元の尾高まで (切断 87 日), また再生組織の厚みが増し, 元の状態にまで戻った (切断 114 日目)。

【Y3 個体】

Y3 個体では, 遠位においては Y2 個体と同様の再生であったが, 近位において尾が形成され, 結果的に双尾をもつようになった。Y3 個体は, Y切断法を施した個体の中で近位の切除した断片の大きさが最も大きかった。また切断後に, 脊椎神経が切断面から一部露出していたのを確認した。Y3 個体の切断直後と再生過程を図 4 に示す。切断直後に撮影したレントゲン像では, 脊椎に対して水平で背側に向う切断面は脊椎の中央近くまで達していることを示している (図 4A 2)。遠位の再生経過は, Y2 個体と同様であり, また近位においても再生芽の形成までは Y2 個体とほぼ同様であった。しかし, 再生芽の形成以降, 近位では以下のように Y2 個体とは異なった。

再生芽の形成：12 日目に形成した再生芽のうち頭



(B)

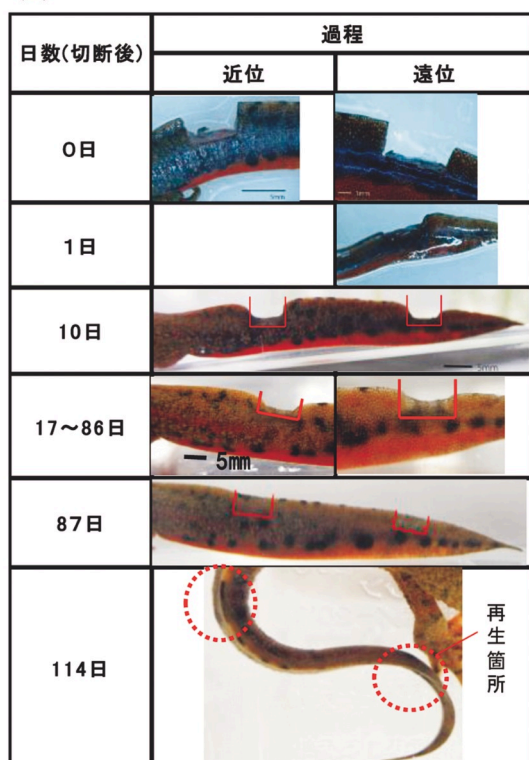


図3 Y2個体の尾の再生。(A)切断直後の個体において尾の切断部位を示す。(B)再生の過程。

部よりのものが、切断13日目尾側に伸長し始め、切断24日目に尾側の切断面に到達するまで伸長した。切断17日目には、頭側と背側に向いている角に形成された再生芽が頭側と背側斜めの方向に伸長し始めた。

新生尾の形成：切断27日目に尾側に伸長した再生組織に尖った先端が確認され、その伸長の方向が体の右側に逸れた。切断31日目には、尾側に伸長している再生組織の根元では頭と背側に向う再生組織が融合し始め、その後再生組織の融合が進み、切断35日目で完全に一体となった。再生組織は尾の形態となった。

新生尾の伸長：新生尾が体の右側面で背側後方に向けてさらに伸長し、切断113日目では、新生尾の先端がより尖った突起ようになった。切断126日目では、元の尾自体が体の左側に湾曲した。切断151日目においても、切断113日目と比較すると、

新生尾が3mmほど伸長した。切断172-182日目には、新生尾の長さは切断151日目と比べて変わらず、伸長が停止した。レントゲン写真において近位の新生尾では、元より存在する背骨から分枝して尾の先端にまで脊骨が形成されていることが確認された(図4C)。

4. 考 察

X切断法とY切断法では、切断面を一つではなく、複数設定した。再生がかなった個体においてはどの個体においてもまず傷上皮が切断面を覆い、必ず各切断面において再生芽が形成された。その後、各切断面の再生芽が連なるように融合して、大きな再生芽を生じていた。

一つ目の作業仮説は、構造的特徴が方向によって尾よりも顕著に異なる四肢の再生の現象において、再生芽の段階で、頭尾軸、背腹軸、近位-遠位軸の方向の確立がなされている(Ney *et al.* 2003)というものに基づいて設定している。二つ目の仮説は、脊髄神経が再生芽の伸長ばかりでなく、背腹の軸の制御も行っているというアフリカツメガエルのオタマジャクシによる研究報告(Taniguchi *et al.* 2008)に基づいている。

X切断手術個体では、再生組織は当初は背側に向かって伸長していたが、最終的には本来の尾の軸に沿って伸長した。イモリの体各部の位置と方向による制御を受けるという作業仮説に反するものではなく、再生芽の形成では大まかに、その後の再生過程、つまり、尾を構成する皮膚、筋肉、骨、神経、などが分化していく際に、互いの相互作用によって、新しい組織・器官が、より精密に体の軸に沿った位置と向きに沿って構築されていくと考えられる。

Y切断手術個体では、3個体のうち2個体では切断部が元通りに再生され、1個体において新生尾が伸長して双尾の個体が生じた。両者の再生過程を比較すると、Y3個体では、大きな再生芽が生じた段階の形態が、Y2個体とは著しく異なっていた。未分化な細胞の集団が集まって構成されている再生芽において、すでに再生組織の行方が決定されるということがありそうである。手代木・志田(1968)は、Y切断法と同じ背側に凹状の切断をして、無尾目のモリアオガエル(*Rhacophorus schlegelii arborea*)とニホンアマガエル(*Hyla arborea japonica*)の幼生、さらには有尾目のトウホクサンショウウオ(*Hynobius lichenatus*)、エゾサンショウウオ(*Hynobius retardatus*)の幼生において、尾の神経管と脊索部の中央部まで切断した場合、双尾の個体が

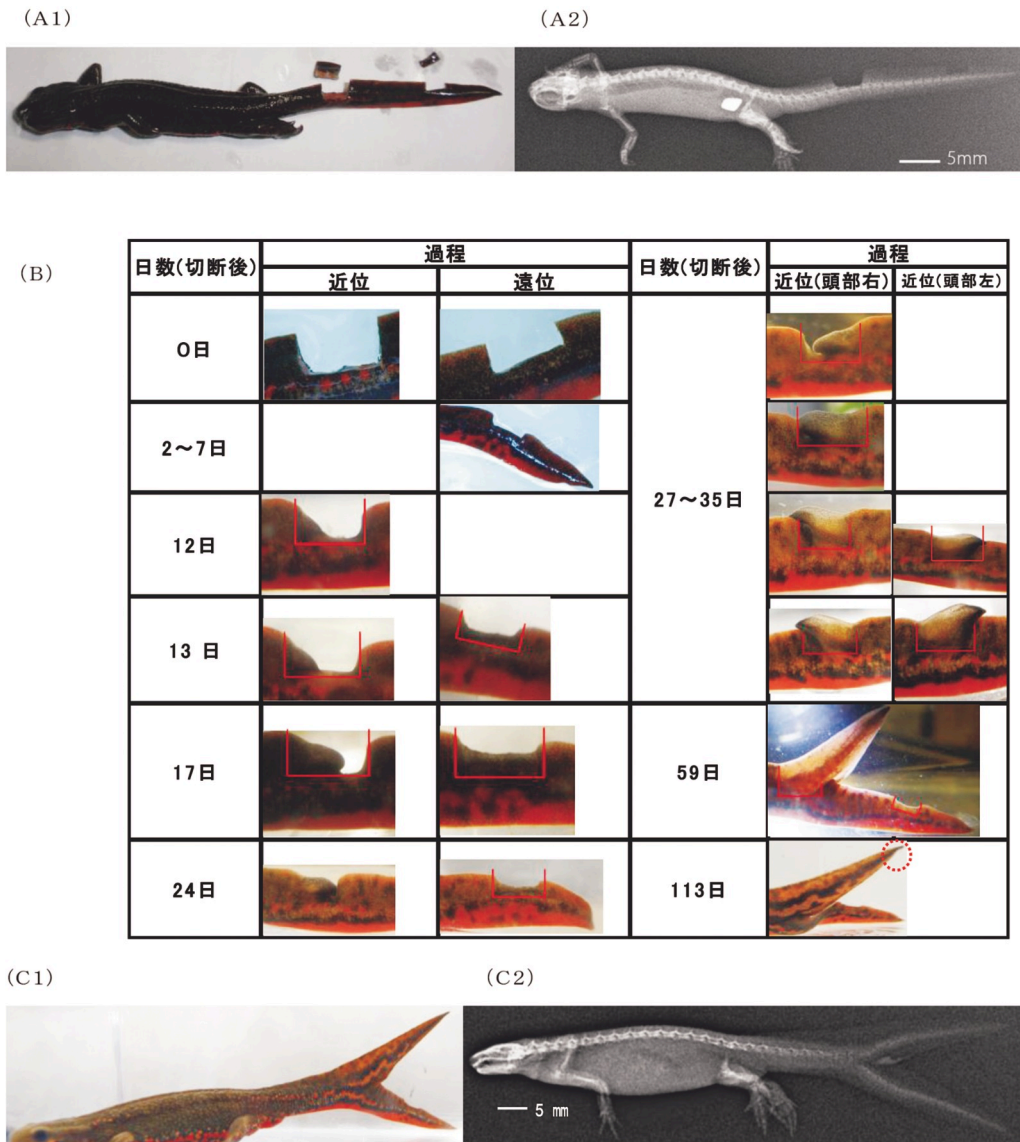


図4 Y3個体の尾の再生。(A1)切断直後の個体において切断部位と切断箇所を示す。(A2)切断直後の個体側面から撮影したレントゲン写真において近位の切断位置が脊椎骨まで達していることを示す。(B)再生の過程。(C1)切断182日目における双尾形成個体を示す。(C2)切断172日目の双尾形成個体のレントゲン写真において近位から再生した尾内に骨が形成されていることを示す。

得られたと記している。アカハライモリ成体の脊椎は細く硬い上、イモリの表皮はカエルの幼生と違って不透明のため、Y切断法を同様に施術しようとしてもなかなかできず、特に、脊椎に及ぼす損傷の程度が異なった。両生類の尾の再生には、脊髄が主要な作用をしている研究報告がある (Mochii *et al.* 2007, Taniguchi *et al.* 2008)。Y2個体では、尾の切断は脊椎に傷を生じず、再生組織には脊椎は含まれていなかった。一方、Y3個体では、切断によって骨と神経に傷が及んだ。これらに傷が及んだことがきっかけで、Y3の新生尾には、新しい脊椎骨と脊髄

神経が生じたと推測される。

Y3個体に見られたように、一旦、新生尾が伸長し始めると、新生尾の基部から先端に向う軸が本来の尾の近位から遠位の軸とほぼ同様の向きに生じていた。また、長さも、本来の尾の長さと同程度で伸長が停止した。過剰な尾が生じても、それはでたらめな向きや長さに伸長するものではなかったことから、一つ目の作業仮説が支持される。

再生という現象は、動物の体の一部を構成していくものであり、受精卵から複雑な動物の体を構築していく発生現象に包含される。発生は、分子、細胞、

組織, 器官といった様々なレベルの相互作用によってもたらされ, 全体で統一のとれたシステムが作られる。分子レベルや細胞レベルで追求する研究が多数あるが, まだそのシステムの全容が明らかになっているわけではない。再生の過程においても, 皮膚, 筋肉, 骨, 神経などの細胞が再生組織において実際どのようなダイナミックな行動をしているかの研究は現在も進行中である。双尾の個体が生じた実験結果は, 尾の再生において様々な相互作用は最初から決まっているものではなく, 状況に応じて進行していくものであることを示唆している。今回得られた結果は作業仮説のどちらもほぼ支持するが, 二つ目の作業仮説によって, 一つ目の作業仮説である位置と方向による制御の結果に揺らぎが生じ, 完全に失われた器官が元どおりになる以外の再生現象が生じることが示された。

謝 辞

イモリのレントゲン写真を撮影する為に協力してくださった, 酪農学園大学獣医学群獣医学類中出哲也教授(2009-2010年度は獣医学部), 酪農学園大学獣医学群獣医学類三好健二郎講師(2009年当時は酪農学園大学付属動物病院画像診断科研修医, 2010年当時は酪農学園大学獣医学部助教), 酪農学園大学付

属動物病院X線技師 神馬賢治氏(2010年当時), 酪農学園大学付属動物病院 山根由久技師(2009年当時)に深く感謝の意を表す。

引用文献

- Mochii, M., Taniguchi, Y., and Shikata, I. (2007) Tail regeneration in the *Xenopus* tadpole. *Dev. Growth Differ.*, 49: 155-161.
- Nye, H. L. D., Comerom, J. A., Chemoff, E. A. G., and Stocum, D. L. (2003) Regeneration of the urodele limb: A review. *Dev. Dyn.*, 226: 280-294.
- 大隅典子(訳)(2007) エッセンシャル発生生物学 改訂第2版 羊土社 pp.309-311. (J. Slack (2006) *Essential Developmental Biology*, Second Edition)
- Taniguchi, Y., Sugiura, T., and Tazaki, A., Watanabe, K., and Makoto, M. (2008) Spinal cord is required for proper regeneration of the tail in *Xenopus* tadpoles. *Dev. Growth Differ.*, 50: 109-120.
- 手代木渉・志田孝夫(1968) 渦虫および両生類幼生の尾の再生軸についての実験的観察, *動物学雑誌* 77: 350-358.

Abstract

The newt, a urodele amphibian, has the ability to regenerate its tail through the larval stage to adult stage. The Japanese fire-bellied newt is suitable for experiments on tail regeneration in adult because the regenerating process can be traced for long period in a laboratory. To disclose about relationships between the types of injury to individual newts and the regenerative behavior of the injured region, we present two working hypotheses: (1) regeneration at a cut surface may be controlled by the injured region and the antero-posterior axis of the body and (2) the degree of damage to the spinal nerve when the tail is cut affects the regenerative behavior at the cut surface and the operated individuals. We performed two types of injury to adult newts, and spine images after the operation were captured by digital radiography. The deleted tails were completely reformed in 5 of the 9 operated newts in a period of 4-5 months, and a double-tail was formed in one newt. These results support our working hypotheses and indicate that it is possible to explain fluctuation of regenerative behavior since the degree of damage to the spinal nerve affect the regenerative behavior.