

## 毛顎動物ヤムシ神経系観察のための鍍銀染色法

安田映津子・後藤太一郎

### A silver impregnation method for staining the chaetognath nervous system

Etsuko YASUDA and Taichiro GOTO

#### 要 旨

毛顎動物であるヤムシの全神経を全載標本で観察するための、鍍銀染色法について検討した。鍍銀染色法の一つである Bodian 染色法をもとに、固定液、前処理、鍍銀液を変えた。その結果、Bodian No. 2 固定液、Triton 処理、プロテイン銀 (Roques 社) により、極めて良好に多くの神経繊維が染色された。中枢神経系では、脳神経節内の神経繊維、腹神経節と脳神経節を繋ぐ主縦連合神経、そして腹神経節のニューロパイル内を縦走する繊維束と一部の細胞体が染色された。末梢神経系では、腹神経節から派生する放射神経や尾部神経、およびこれらから分岐する繊維が染色された。この全載標本を包埋して作成した 10  $\mu$ m 切片でも、神経繊維を詳細に観察することができた。この鍍銀染色法は、ヤムシ神経系における神経構築を調べるうえで有用であるといえる。

#### ABSTRACTS

Silver staining methods for the chaetognath nervous system were devised for impregnating block preparations. Based on the Bodian method, fixatives, preliminary treatment, and silver impregnators were determined. A procedure using Bodian No. 2 fixative, treatment of Triton, and silver protein (Roques) yielded consistent and reliable results. Not only the central nervous system but also the peripheral nerves were stained strongly and fine arborizations of the peripheral nerves were clearly observed. 10  $\mu$ m sections of the block-impregnated preparations revealed the positions and pathways of some fibers and fiber tracts. The present method of block impregnation is useful for understanding the architecture of the nervous system in chaetognaths.

#### は じ め に

毛顎動物であるヤムシは系統的には後口動物に属しているが、その神経系のプランは前口動物のものに類似している。つまり、頭部背面に脳神経節、胴部腹面に腹神経節があり、これらは縦連

合神経で繋がれている。このような特徴は古くから報告されている (Hertwig, 1880; Grassi, 1883; Burfield, 1927; John, 1933)。しかし、前口動物の神経系と異なり、ヤムシでは中枢神経系を含むほとんどの神経が上皮性であるという興味深い特徴をもつ。このような神経系は他の三胚葉性の動物にはみられず、動物系統の立場からも注目される。

比較的最近のヤムシ神経系の形態的研究は Bone and Pulsford (1984) によって行われ、鍍銀染色法により腹神経節を中心とした神経構築が示

原稿受理日 1995年9月10日

三重大学教育学部生物学教室

Department of Biology, Faculty of Education Mie University, Tsu, Mie 514, Japan

された。さらに免疫組織化学法により、特定の神経の走行をはじめ、末梢神経や中枢神経の一部の走行が明らかにされた (Bone *et al.*, 1987; Goto and Yoshida, 1987; Goto *et al.*, 1992)。このように、ヤムシの神経系について解明されつつある中で、ヤムシ神経系全体を新たに見直す必要が生じてきた。また、このユニークな神経系の形成過程を調べるうえでも、全神経について明らかにする必要がある。

この目的のために有効な染色法として、Bone and Pulsford (1984) が用いた鍍銀染色法があげられる。鍍銀染色法は神経繊維を染色する手段として、古くから用いられている。しかし、画一的な染色法はなく、実験動物や染色目標とする神経により適した染色条件を見つける必要がある (佐野, 1965)。そこで、これまでに私たちの研究室で扱っているカエデイソヤムシの神経系を染色するための鍍銀染色法について検討した。Bone and Pulsford (1984) は Winkelman and Schmit (1957) の方法を用いたが、染色に関する詳細な記載がされていない。本研究では、この方法をはじめ、鍍銀法の1つである Bodian 染色を試みた。その結果、固定液、前処理、鍍銀液を変えることで、極めて良好に多くの神経繊維を染色することのできる条件を見出したので報告する。

## 材 料 と 方 法

実験動物としては、底生性のカエデイソヤムシ (*Paraspadella gotoi*) の成体を用いた。本種は、熊本県天草郡の九州大学臨海実験所付近の岩礁海岸低潮亜帯で採集され、私たちの研究室で累代飼育されている。

標本の作成には、まずカエデイソヤムシを解剖せずにそのまま固定した。固定液としては、Bouin 液、Bodian No. 2 液 (80% エタノール 90 ml、ホルマリン 5 ml、氷酢酸 5 ml) および合成による aged alcholic Bouin 液 (ホルマリン 15 ml、エタノール 35 ml、氷酢酸 3.5 ml、エチルアセテート 25 ml、ピクリン酸 0.46 g、蒸留水 100 ml) を用いた。固定は室温で一晩行なった。洗浄後 (蒸留水で 3 回)、前処理として 0.1% Triton を含むリン酸緩衝液 (PBS) に一晩置き、10% ホルマリン中で 10 分間処理を行なった。その後、鍍銀液に浸した。鍍銀液は、20% 硝酸銀 (和光) および 3% プロテイン銀 (Merck, Sigma, Polysciense, Roques の 4 社) を用いた。プロテイン銀には、5 ml 当たり

0.1 g の銅を加えた。鍍銀は 35°C で 6 日間行なった。鍍銀後、1% 亜硫酸ナトリウムと 0.2% ヒドロキノン含む水溶液中に 20 分間置いて現像を行なった。さらに 0.2% 塩化金水溶液中に 4~5 時間置いて金に置換したあとで、5% チオ硫酸ナトリウム中で 10 分間定着した。試料を各試薬に移す前に蒸留水で 3 回洗浄した。

全載標本の作成には、染色後のヤムシを PBS 中で解剖した。この場合、上皮組織である泡状組織を全て除去し、背面中央から体を縦に切開し、腹神経節を中心に末梢神経が観察できるようにした。これをエタノールシリーズで脱水し、キシレンを経てからスライドガラスに載せてエンタランニューで封入し観察した。

また、切片標本作成には、鍍銀染色したヤムシ全体を脱水後、Technovit 8100 (Kultzer) に包埋した。滑走式ミクロトームを用いて厚さ 10~15  $\mu$ m の切片を作成し、スライドガラスに載せてから、エンタランニューで封入して観察した。

## 結 果 と 考 察

ヤムシの鍍銀染色については Bone and Pulsford (1984) が *Sgitta setosa* を用いて行なっている。彼らは Winkelman and Schmit (1957) の方法に従い、全載標本で良好な染色結果を得ている。この方法では、固定に Bouin 液、鍍銀液に 20% 硝酸銀を使用する。本研究でもカエデイソヤムシにこの方法を適用した。鍍銀時間を 6 日間にする事で、腹神経節内の繊維や感覚神経を全載標本で観察することができた。神経以外の組織はあまり染色されず、神経繊維の走行を観察することも可能であった。しかし、これを切片にしたところ、染色が比較的弱いいためか、神経繊維を認めることは困難であった。

次に、この方法にほぼ従い、使用する銀の種類を 3% プロテイン銀 (Merck) に変えてみたところ、硝酸銀の場合より多くの神経繊維が染色された標本が得られた。しかし、染色結果は試料により極端な差がみられ、ほとんど染色されない場合も多かった。一般にプロテイン銀を鍍銀液とする染色法を Bodian 法という。これはプロテイン銀の質により染色結果が左右される。そこで、Merck 以外に Sigma, Polysciense, Roques の各社のプロテイン銀を使用した。Sigma 以外の製品ではいずれも良好な結果を示す標本が得られたが、Roques のプロテイン銀が最も濃く繊維を染色し

表1 鍍銀液および固定液の違いによる鍍銀染色性

鍍 銀 液	Bouin 液	aged alcoholic Bouin 液	Bodian No. 2 液
硝 酸 銀	+	*	*
プロテイン銀 (Merck)	++	+	+++
(Sigma)	—	*	*
(Polyscience)	++	+	+++
(Roques)	++	+	++++

一、染色されない；＋、比較的太い繊維が染色される；++、染色されるが末梢の細かい繊維は染色されない；+++、中枢および末梢の繊維が染色される；++++、中枢および末梢の繊維が極めて明瞭に染色される。

\* 未試験。

(表1)、染色性も比較的安定であった。

また、鍍銀染色の結果は固定液によっても大きく異なることが知られている。そこで、Bouin 液以外に aged alcoholic Bouin 液および Bodian No. 2 液について検討した。aged alcoholic Bouin 液は Gregory (1980) が昆虫の神経の鍍銀染色で良好な結果を得ている固定法として知られている。Bodian No. 2 は Bodian によってプロテイン銀を用いた染色のために開発されたもので、この固定法により様々な種類の動物の神経で良好な鍍銀染色の結果が得られると言われている (佐野、1965)。ヤムシの場合でも aged alcoholic Bouin 液で固定した試料は神経繊維が濃く染色されたが、同時に背景となる筋肉や上皮組織も濃く染色されたために神経の観察が困難であった。Bodian No. 2 液による固定では神経繊維は濃染されたが筋肉や上皮組織など神経以外の組織はほとんど染色されなかったため、多くの繊維を細部まで見ることができた (表1)。

腹神経節を中心とした染色結果の一例が図1Aである。腹神経節から派生する繊維は多く、頭部へ延びる主縦連合神経の他に、後方から出て尾部後端まで達する尾部神経、側方から出て筋肉や感覚器に延びる放射神経が明瞭に観察された。腹神経節中央にあるニューロパイル内を走行する繊維も多く染色され、これらの繊維路のうち、縦走するものは比較的太く、主縦連合神経や尾部神経へ延びるものが多かった。横走する繊維は神経節の細胞体部分から延びており、放射神経として胴部に向かうものがみられた。放射神経の一部は機械受容器である触毛斑からの感覚神経の束であった (図1B)。また、脳神経節ではこの中を走行する繊維路がみられた。

さらに、このような全載標本を包埋して切片に

した場合では、厚さ約 10  $\mu$ m の切片で、腹神経節内の繊維の位置および感覚神経や運動神経の走行を観察することができた (図1C)。腹神経節のニューロパイルを縦走する主な繊維路は、正中線に近い部分では背面、中間、腹面にそれぞれ各一对、側方部にも同様に背面、中間、腹面に各一对存在した。また、ニューロパイルの最も側方部背面にある繊維路は太く、触毛斑の感覚繊維と連絡していた。このように、ヤムシ神経系における繊維走行を観察するために十分な標本が得られた。

組織片を対象とした鍍銀法の代表的なものには、鍍銀液に硝酸銀を使用する Cajal の方法と、アンモニア性銀液を使用する Bielschowsky の方法が知られている。後者は凍結切片の染色にも適用できるが、切片の鍍銀法の主なものとしては Bodian の方法と Holmes の方法がある (佐野、1965)。Bodian の方法はプロテイン銀を用いるが、これは有機化合物であるため染色性が不安定である。Holmes の方法では全て無機化合物を使用し、硝酸銀・硼酸—硼砂緩衝液を鍍銀液としている。Holmes の方法により、昆虫では良好な結果が得られているが (Blest and Davie, 1980)、ヤムシではまだ試みていない。今後、この方法についてもヤムシに適用してみる必要がある。

Bodian 法により全載標本で良好な染色結果が得られた理由として、鍍銀の前処理として Triton 処理を施したことが重要であると考えられる。Bodian の方法は繊維中の微小管をはじめとする細胞骨格系のタンパクを染色すると言われており、細胞内に鍍銀液が浸透するには Triton 等による処理は不可欠と思われる。Triton 処理をしない場合は、染色性は著しく低下した。鍍銀染色以外に、多くの神経繊維を染色する方法としてアセチル化  $\alpha$  チューブリンの抗体を用いた方法が知られてお

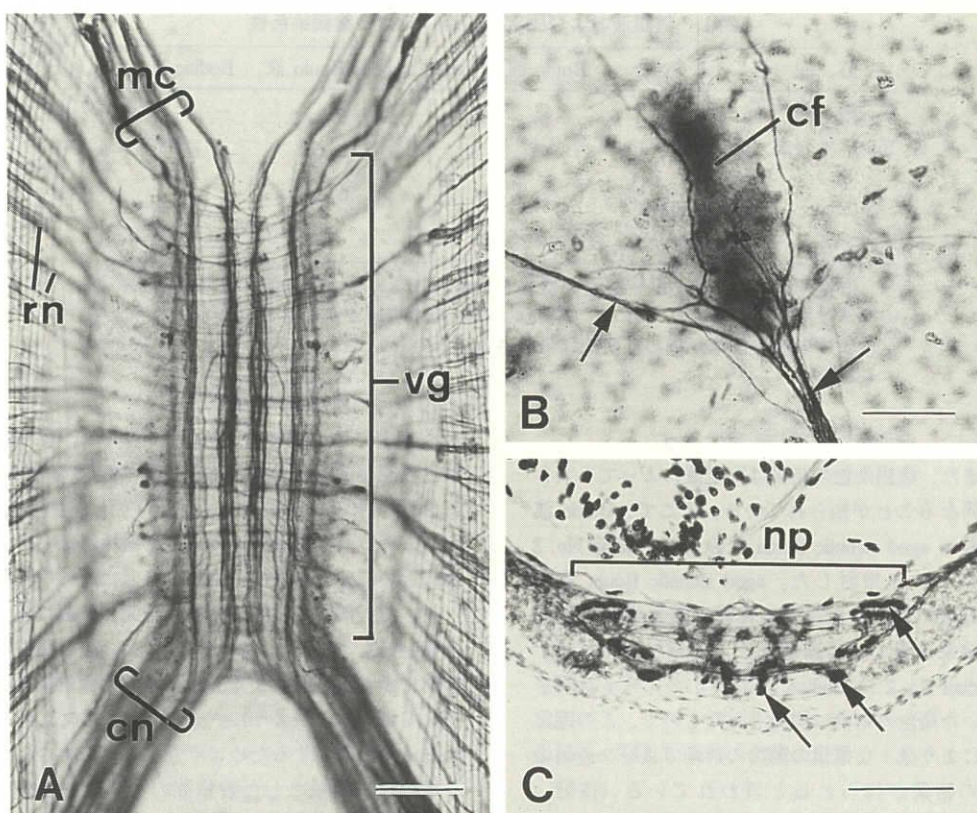


図1. ヤムシの鍍銀染色標本。固定液は Bodian No. 2 液、鍍銀液は Roques 社のプロテイン銀を用いている。

A: 胴部腹面の全載標本。写真の上がヤムシの前方となる。cn、尾部神経；mc、主縦連合神経；rn、放射神経；vg、腹神経節。B: 上皮組織の一部の全載標本。触毛斑 (cf) からの感覚神経 (矢印) が明瞭に染色されている。C: 腹神経節 (vg) の切片像。腹神経節の中央部はニューロパイル (np)。矢印は縦走する繊維路のいくつかを示す。スケールは A、C で 50  $\mu$ m、B で 30  $\mu$ m を示す。

り (Chitnis and Kuwada, 1990; Wilson, *et al.*, 1990)、これをヤムシに適用した結果は、鍍銀染色の場合と類似していた (後藤と安田、未発表)。鍍銀染色とこのような細胞骨格系タンパクの抗体を用いた染色により、ヤムシ神経系の全貌を明らかにすることができるであろう。

#### 参 考 文 献

- Blest, A. D. and P. S. Davie (1980) Reduced silver impregnations derived from the Holmes technique. In: Neuroanatomical techniques. Insect nervous system (Strausfield, N. J. and T. A. Miller, eds), pp. 97-118. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bone, Q. and A. Pulsford (1984) The sense organs and ventral ganglion of *Sagitta* (Chaetognatha). Acta Zool. Stockh., **65**: 209-220.

- Bone, Q., C. J. P. Grimmelikhuijzen, A. Pulsford and K. P. Ryan (1987) Possible transmitter functions of acetylcholine and an RFamide-like substance in *Sagitta* (Chaetognatha). Proc. Roy. Soc. Lond., **230**: 1-14.
- Burfield, S. T. (1927) *Sagitta*. L.M.B.C. Mem. Liverpool, **28**: 1-104.
- Chitnis, A. B. and J. Y. Kuwada (1990) Axonogenesis in the brain of zebrafish embryos. J. Neurosci., **10**: 1892-1905.
- Goto, T., Y. Katayama-Kumoi, M. Tohyama and M. Yoshida (1992) Distribution and development of the serotonin- and RFamide-like immunoreactive neurons in the arrow worm *Paraspadella gotoi* (Chaetognatha). Cell Tissue Res., **267**: 215-222.
- Goto, T. and M. Yoshida (1987) Nervous system in Chaetognatha. In: Nervous system in invertebrates (Ali, M. A., ed), pp. 461-481. NATO-

- ASI series, Plenum Press, New York.
- Grassi, B. (1883) I Chaetognati. Faun Flora Neapel. Monogr., 5: 1-126.
- Gregory, G. E. (1980) The Bodian protargol technique. In: Neuroanatomical techniques. Insect nervous system (Strausfield, N. J. and T. A. Miller, eds), pp. 75-95. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Hertwig, O. (1880) The Chaetognatha, their anatomy, systematics and development history. 86 pp. (Translated by Eagan, S. M and P. N. Sund. Library of Script Inst. Oceanogr.).
- John, C. C. (1933) Habitats, structure, and development of *Spadella cephaloptera*. Quart. J. Microscop. Sci., 75: 626-696.
- 佐野 豊 (1965) 組織学研究法. 南山堂, 東京. 941 pp.
- Wilson, S. W., L. S. Ross, T. Parrett and S. S. Easter, Jr. (1990) The development of a simple scaffold of axon tracts in the brain of the embryonic zebrafish, *Brachydanio rerio*. Development, 108: 121-145.
- Winkelman, R. K. and R. W. Schmit (1957) A simple silver method for nerve axoplasm. Proc. Staff Meet. Mayo Clin., 32: 217-222.