

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 発生過程における 頭部骨格形成 - 光学顕微鏡像とX線CT画像を用いて -

大澤得二・城内文吾

Study on the Formation of Cranial Skeleton of *Xenopus laevis* during
Development using Light Microscopic and X-ray CT Images

Tokuji OSAWA and Bungo SHIROUCHI

要 約

アフリカツメガエルの55期、59期および65期の幼生を用い、頭部骨格の形成過程を光学顕微鏡像およびX線CT画像により検索した。55期幼生において耳胞に一致した部位においてX線不透過像を認めたが、脳函の形態に一致したX線不透過像は認められなかった。光学顕微鏡的には内耳の周囲に軟骨組織による骨格の発達を認めた。59期、65期と発生が進むにつれ、脳函の形状がX線CT画像で認められるようになった。内耳を包む領域においてのX線不透過構造は発生に伴い増大した。また変態過程における頭部の改造に伴い、左右の内耳を包むX線不透過構造の距離は短縮した。本研究によって、アフリカツメガエル幼生の頭部では内耳周囲における骨格形成が脳函など他の部分に先行して進むことが明らかとなった。

キーワード：アフリカツメガエル、発生、光学顕微鏡像、X線CT画像、頭部骨格、耳胞、脳函

Abstract

Skeletons in the heads of stages 55, 59, and 65 larvae of *Xenopus laevis* were examined by light microscopy and X-ray CT imaging. At stage 55, otic capsules of *Xenopus laevis* were observed as X-ray opaque images by CT imaging. On the other hand, the brain case did not show the apparent X-ray opaque image. Light microscopic images showed the cartilaginous skeleton surrounding inner ears. As the progress of the development, the morphology of the brain case became more obvious in the X-ray CT images, and the distance between otic capsules was reduced depending on the reconstruction of the skull. In the present study, it became clear that the skeletal formation develops initially around the inner ears of the *Xenopus laevis*, prior to the formation of the other portions including the brain case.

Keywords: *Xenopus laevis*, development, light microscopy, X-ray CT image, cranial skeleton, otic capsule, brain case

緒言

脊椎動物の骨は外骨格と内骨格より成り¹⁾、それらの組織の形成様式は膜内骨化 (intramembranous ossification)、軟骨内骨化 (endochondral ossification) であることは教科書的にも良く知られた事実である²⁾。そもそも脊椎動物が外骨格を持つようになった最初の動物は甲皮類 (Ostracoderm) であり、体を覆う骨板と鱗を発達させた。これらの外骨格は捕食者からの防御、あるいはカルシウムとリンの貯蔵場所としての役割を持つものと考えられている³⁾。その後内骨格が発達するが、椎骨系および下肢 (後肢) の骨格に関しては軟骨内骨化のみにより形成されるものと理解してよい。しかし、頭蓋骨および上肢帯については皮骨性の部分と内骨格性の部分が複雑に入り組んでいる⁴⁾。頭蓋骨および上肢帯は多くの骨片から由来し、骨同士の癒合や、消失する骨があることなどが現存している骨の由来の理解を難しくしている⁵⁾。

両生類はその発生過程において、頭蓋を含む体幹の骨格を先行して形成し、つぎに四肢の骨格を形成する。従って発生過程を追って骨格の形成を観察すれば、複雑に入り組んだ頭蓋および上肢帯の形成順序および由来 (膜内骨化なのか軟骨内骨化なのか) を明らかにできる期待が持てる。本論文ではアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 発

生過程における初期の頭部骨格形成過程を光学顕微鏡的およびX線CT画像により捉え、頭蓋の形成について考察した。

材料と方法

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 雄成体には500単位の、そして雌成体には800単位のヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを皮下注射して交尾させることにより産卵させ、孵化後、幼生を55期、59期あるいは65期⁶⁾ (図1a-c) まで飼育し、2-メチル-2-プロパノール (クロレトン) にて麻酔したのち、10%ホルマリンで固定した。オリンパスSZX7実体顕微鏡で背面および側面を観察し、iPhone7のカメラ機能を使って撮影した。一部の試料は脱水、パラフィン包埋し、厚さ7 μmの連続前額断切片とし、ヘマトキシリン・エオシン染色を施してZeiss Primo Star 光学顕微鏡で検鏡し、iPhone7にて撮影した。

10%ホルマリン固定した試料の一部 (55期、59期および65期の幼生) は実験動物用X線CT装置 (Latheta LCT-100, 日立アロカメディカル株式会社) に供し、各発達段階にある幼生頭部のX線CT画像 (それぞれ前頭断と矢状断の2パターン) を撮影した。予備撮影 (スカウト撮影) により二次元X線透過画像を撮影し、この画像に基づき断層撮影の開始位置と終了位置を決定した (図2a-c)。なお、



図1. 使用したアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の3つの発生段階。

- a) 55期: 変態の初期であり、四肢の形成が開始した直後である。
- b) 59期: 変態が進み、四肢はほぼ形成されている。頭部の変形が進み、眼幅は小さくなっている。尾の退縮はこれからである。
- c) 65期: 変態はほぼ終了している。頭部は変形し、眼幅はさらに小さくなっている。尾はほとんど退縮してしまっている。

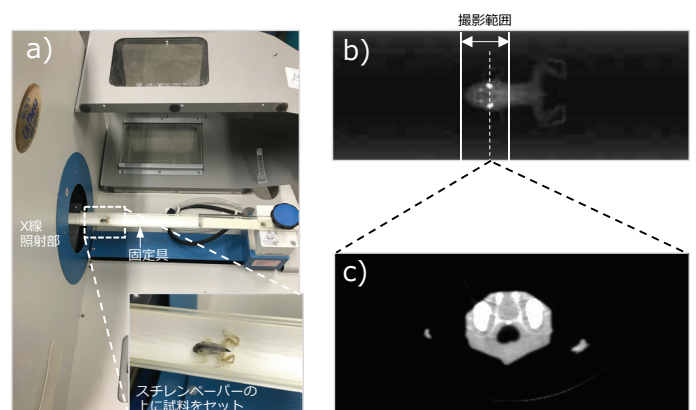


図2. アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の65期幼生のX線画像の一例。

- a) 測定試料を固定具にセットした状態。X線照射部が左側にあり、固定具が順次スライドしていくことで断層画像が得られる。
- b) スカウト撮影 (全身の二次元X線透過画像)。2本の実線が撮影範囲であり、耳胞周囲 (点線部分) の石灰化が認められる。
- c) スカウト撮影したb)の点線部分の断層画像。

撮影は以下の条件で実施した。

- ・ 固定具(試料を挿入する円筒型ホルダー)：小視野用
- ・ X線発生器：管電圧50 kV、管電流1mA
- ・ 標準走査時間：超高精度(約36 sec/1スライス)
- ・ スライス間隔：0.15 mm

結果

1. 55期幼生の観察

実体顕微鏡の透過光を用いた観察では、55期の幼生の背面観において、色素細胞の密度が低く皮膚の透明度が高いため、内部構造のある程度の同定ができた。脳の上面は多くの色素細胞が覆い、脳から嗅神経、視神経が出ているのがわかった。また、血管では大動脈弓と、その枝が明瞭に観察できた。耳胞は透過光では密度の高い暗部として

観察された。実体顕微鏡の落射照明による背面観および側面観では、皮下において耳胞周囲が白い結節状を呈しており、骨格の形成を示唆する構造であった(図3a-c)。

X線CT像において、前額断面像、矢状断面像ともに頭部にX線不透過部分が認められ、それらは左右対称的な位置に見られ、耳胞の位置と一致していた。耳胞以外にも小規模なX線不透過部分がいくつか認められたが、脳を完全に覆うような脳函の形態は認められなかった(図4a-d)。

光学顕微鏡による組織切片の観察では、眼球よりも尾側の部分において脳の両側に内耳の発達を認めたが、その周囲を軟骨性の骨格が取り囲んでいた。骨格は上方、外方、内方でそれぞれ肥厚している部分があった。一方、脳の上面には表皮とその下部に色素細胞が見られるのみで、骨格の発達は見られなかった(図5)。

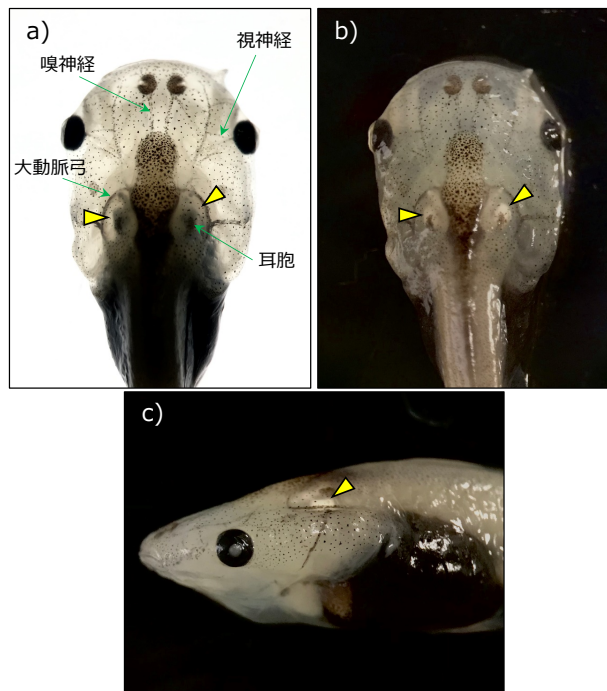


図3. アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の55期幼生の頭部周辺の実体顕微鏡像。

- 透過光による55期幼生(背面)の実体顕微鏡像。
脳の輪郭、神経と血管が透けて観察される。耳胞の周囲は密度が高く、照明が透過しないので暗部として観察される。b)およびc)の像を併せて考えると、透過光で暗部となるのは、白く石灰化した構造物によるものと考えられる(◀部分)。
- 落射照明による55期幼生(背面)の実体顕微鏡像。
背部皮下に白い結節状の構造物が透けて認められる(◀部分)。耳胞の周囲が石灰化しているものと考えられる。
- 落射照明による55期幼生(側面)の実体顕微鏡像。
腹腔の内臓は増加した色素細胞のため観察できない。大動脈弓の深部に石灰化部分が認められる(◀部分)。

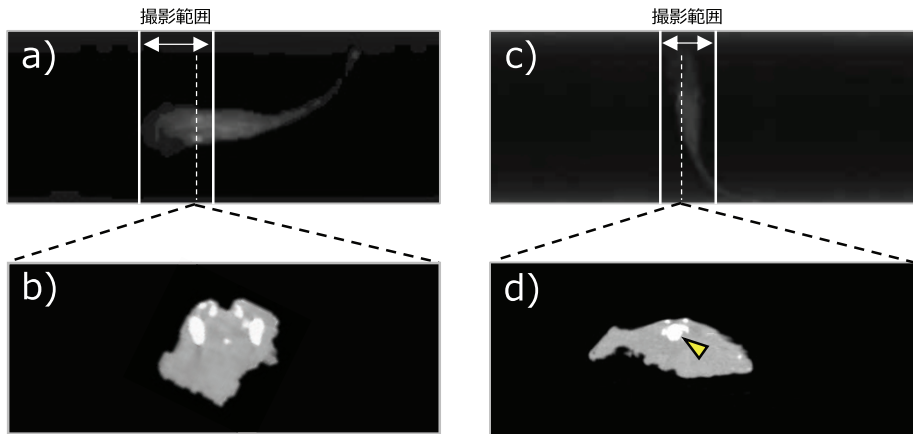


図4. アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の55期幼生の頭部周辺のX線CT像。
 a,b) 頭部の前額断面像。左右対称的に2箇所X線不透過部分が見られる。それ以外には小さな結節状のX線不透過像が見られる。
 c,d) 頭部の矢状断面像（左側が前方）。頭部にX線不透過部分が認められ、これが耳胞の位置と一致している（▲部分）。

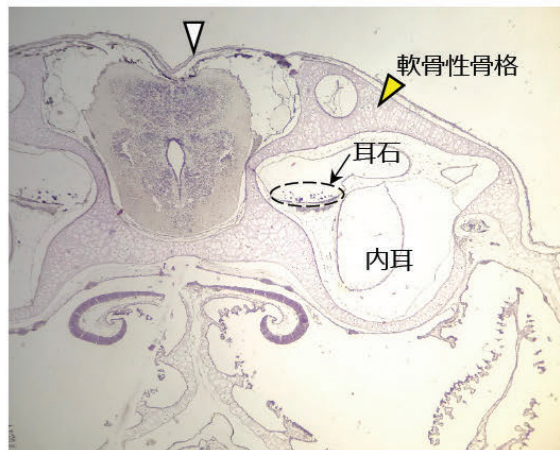


図5. アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の55期幼生の頭部の光学顕微鏡像。眼球よりも尾部の部分で内耳が大きく発達し、耳石も確認することができる。内耳を包む軟骨性の骨格（▲部分）が発達している一方で、脳の上面を覆う骨格（◁部分）の発達は乏しい。

2. 59期幼生の観察

59期の幼生の実体顕微鏡観察において、皮膚の透明度が低くなっているため、神経と血管の走行は認めにくくなっているが、脳の上面を覆う組織は薄いようで、脳の上面の皮下に高密度に存在する色素細胞が認められた。変態が進行し眼幅が小さくなる傾向を示すなど、頭蓋の改造が進んでいた。内耳を包む骨格のものと思われる白色の結節状構造については、大きさが増加しており、特に側面観では明瞭に観察された(図6a-b)。

X線CT像では前額断面像、矢状断面像ともにX線不透過な結節状部を示しているが、それ以外に脳を囲む薄いX線不透過物を見せており、脳函の形成が55期よりも進んでいることを示唆していた。前額断面では内耳を包む骨格と思われるX線

不透過物が左右対称的に認められた事は55期と同様であるが、左右のX線不透過物の間隔は55期よりも狭くなっており、頭蓋の改造が進んでいることを示唆していた。また脳の上面に薄いX線不透過物が見られ、脳の底部に接してもX線不透過物が見られることにより、脳函の形成が進んでいることが分かった。矢状面においては結節状部以外にも脳の周囲を取り囲むX線不透過の構造が認められ、55期よりも脳函の形成が進んでいることが明らかであった(図7a-d)。

59期の組織切片像では、内耳はより厚い骨格に囲まれていたが、内耳を包む軟骨性の骨格の壁は一樣の厚さのものではなく、上内側部、外側部、底部などに厚い部分が認められた(図8)。

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)発生過程における頭部骨格形成
 - 光学顕微鏡像とX線CT画像を用いて -

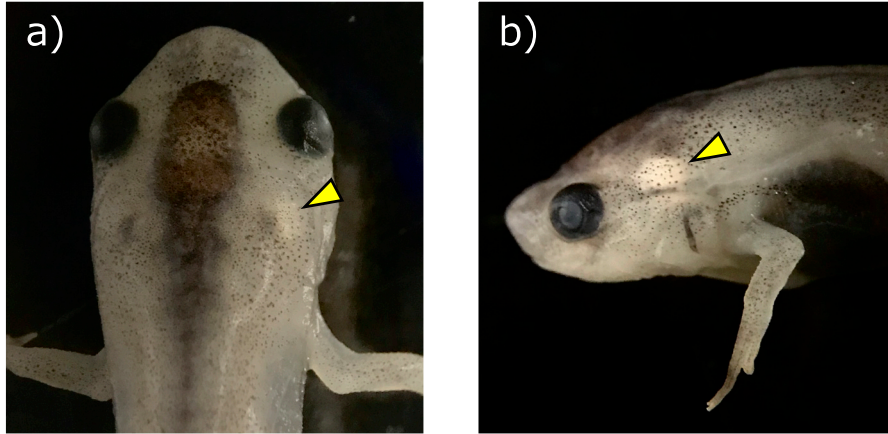


図6. アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の59期幼生の頭部周辺の実体顕微鏡像.

- a) 59期幼生の背面.
 皮膚が厚くなり、不透明感が増大している。脳の上面を覆っている色素細胞は密度を高めている。眼幅は55期と比較して狭くなり、頭蓋は改造されている。脳の両側に白色の結節状の構造物が認められる (◀部分)。
- b) 59期幼生の側面.
 白色の結節状構造は55期と比較して、大きさを増大させ、より明瞭になっている (◀部分)。

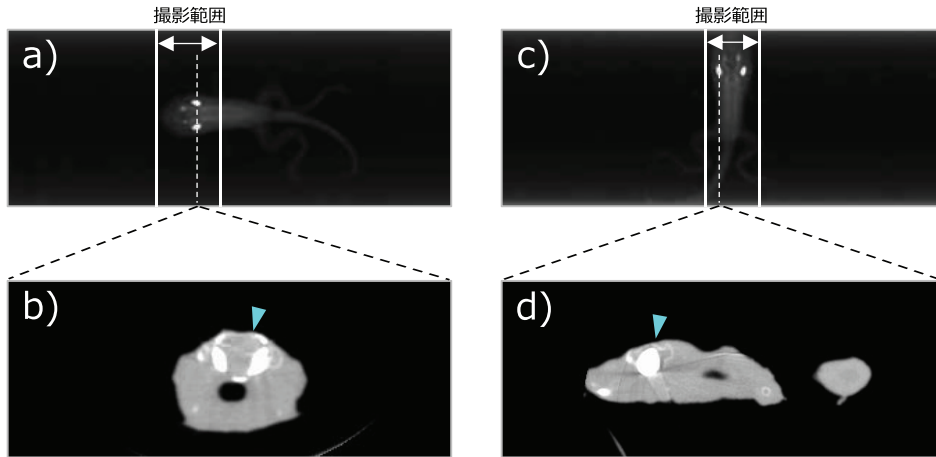


図7. アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の59期幼生の頭部周辺のX線CT像.

- a,b) 頭部の前額断面像。c,d) 頭部の矢状断面像 (左側が前方)。
 脳函の形成が進んでいること (◀部分), また前額断では左右対称的に見られる内耳を包むX線不透過構造物の距離が近くなっている。

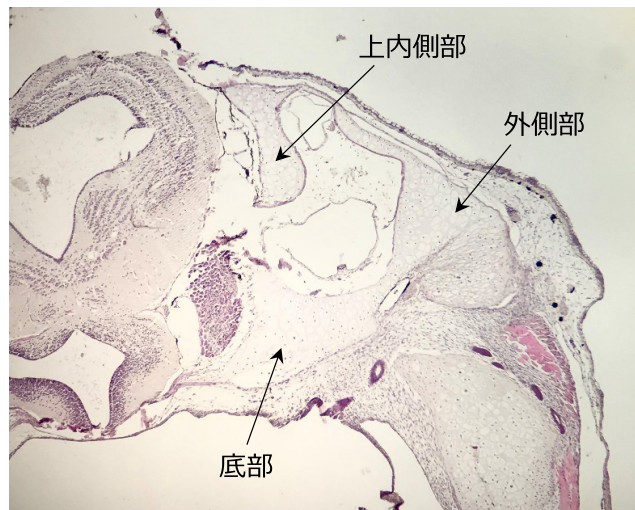


図8. アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の59期幼生の頭部の光学顕微鏡像。
 内耳を包む軟骨性の骨格の厚さは一様ではなく、上部内側部、外側部、底部に接する部分が特に厚いことが分かる (矢印部分)。

2. 65期幼生の観察

65期の幼生の背面観では、色素細胞が増加しているため、皮膚の透明度は下がり、神経と血管は明瞭に観察することはできなかった。しかし骨格の形成については55期および59期より進み、皮膚を一部除去することにより、大きく確かなものとして皮下に確認することができた(図9a-c)。

X線CT像においては前額断方向の画像で、左右対照的にX線不透過構造を認めたが、55期、59期よりその大きさは増大していた。また脳函の形

が明瞭に認められるようになった。矢状断方向においても55期および59期と比較してより大きなX線不透過構造を認めたが、脳を囲む脳函と見られる構造もより明瞭となった(図10a-d)。

65期においても眼球より尾側における頭部の組織切片で、発達した内耳と、それを取り囲む骨格がみられたのは55期、59期と同様であるが、特に底部が厚みを増大させているのが認められた(図11)。

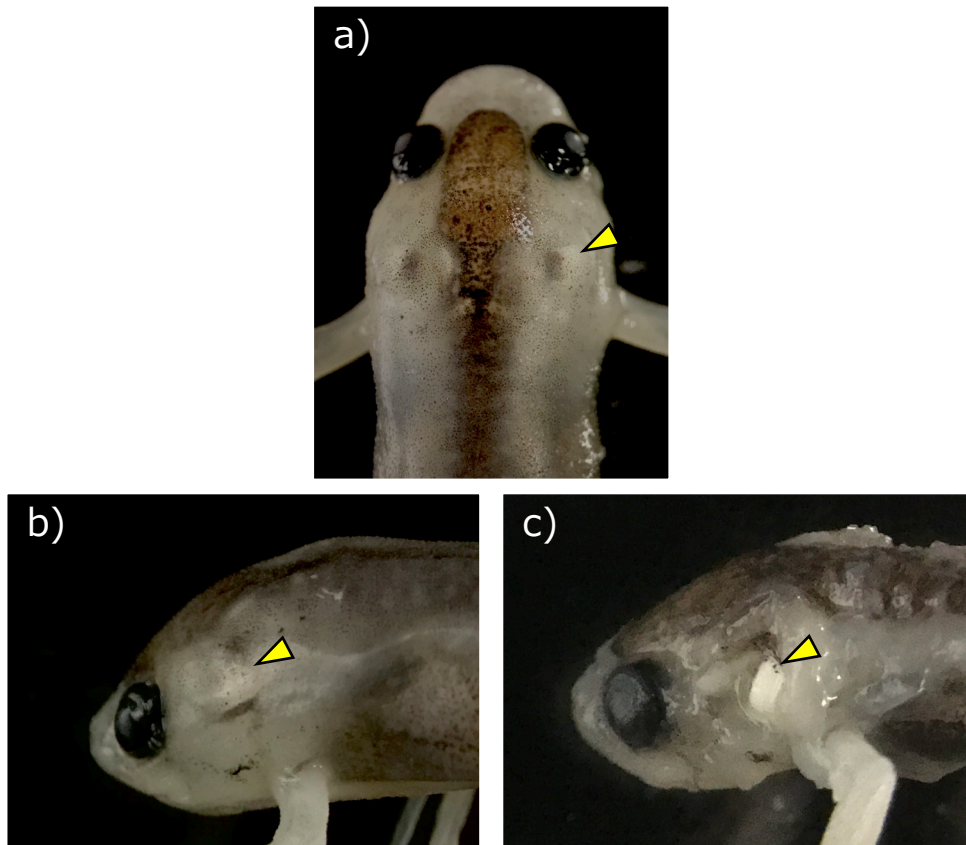


図9. アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の65期幼生の頭部周辺の実体顕微鏡像。

- a) 65期幼生の背面。
皮膚は厚くなり不透明感が増しているため視神経、嗅神経および大動脈弓は認められないが、脳の上面を覆う色素細胞層は皮下の浅い位置に存在しているため、その存在が明瞭である。55期、59期と比較して、変態が進んだため眼球と脳との距離は短くなっている。体表を覆っている組織が増加したため骨格部分は観察しにくい(◀部分)。
- b) 65期幼生の側面観。
皮膚の不透明感が増大し、血管および神経は明瞭に認められない。眼球の後方に白い結節状の構造が存在している(◀部分)。
- c) 骨格を覆っている組織を一部除去したところ、白色の骨格が明らかに認められる(◀部分)。

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 発生過程における頭部骨格形成
 - 光学顕微鏡像とX線CT画像を用いて -

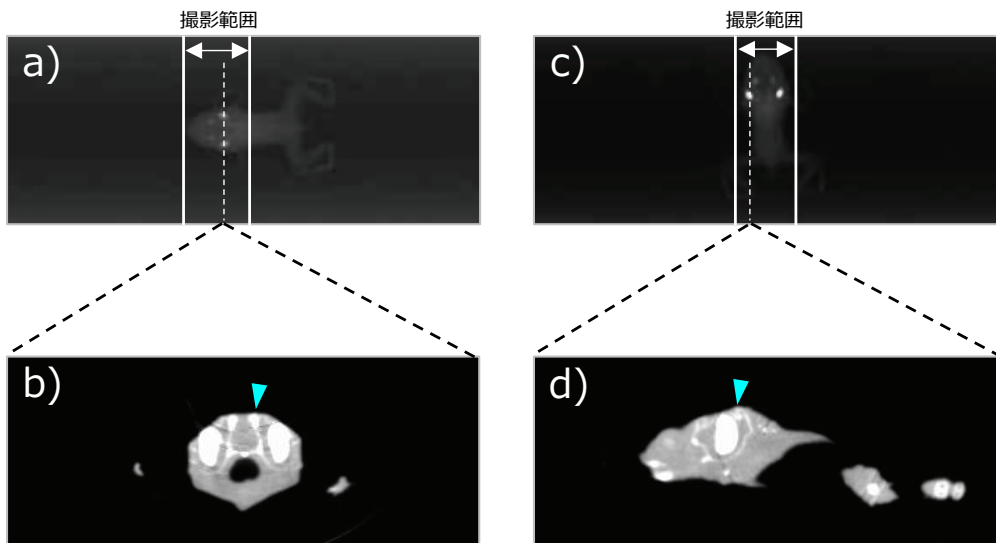


図10. アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の65期幼生の頭部周辺のX線CT像.

a, b) 頭部の前額断面像.

左右1対のX線不透過領域が他の発生段階におけるより大きく認められる.
 脳の周囲に脳函と思われるX線不透過構造物が59期と比較してより明瞭に認められる (◀部分).

c, d) 頭部の矢状断面像 (左側が前方).

内耳周囲の広範囲にX線不透過領域が認められる.
 脳を囲む脳函と思われる構造も明瞭に認められる (◀部分).

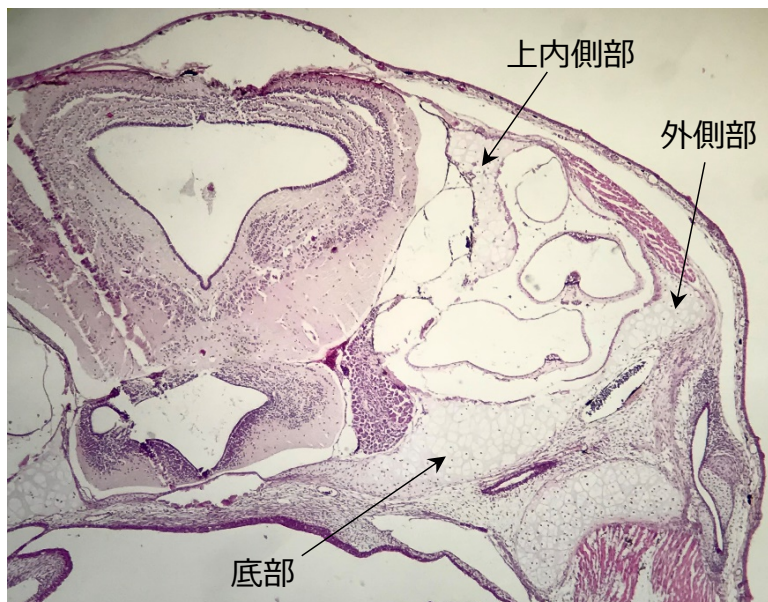


図11. アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の65期幼生の頭部の光学顕微鏡像.

内耳を取り囲む骨格は、上内側部、外側部、底部に接する部分において厚いが、特に底部に接する部分における肥厚が顕著である (矢印部分).

考察

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の発生段階55期、59期、65期の個体を、実体顕微鏡による外部形態の観察、全額断連続切片の光学顕微鏡による観察、及びX線CT画像により、耳胞を囲む部分において骨格の形成が先行することが明らかとなった。

両生類の骨格においてはヒトの解剖学的な骨の名称とは異なる名称の骨を多く見る。また側頭骨という名称はカエルの骨格には見ないが、それは頭蓋の進化において、多くの骨が癒合するなどにより整理がなされたためと思われる。脊椎動物の進化を扱った著書には、古代魚あるいは初期四足動物の頭蓋がヒトの頭蓋の比較してはるかに多くの骨から形成されている事を示す図が多く掲載されている^{8,9)}。

成体のアフリカツメガエル (5歳齢雄性) を参考に解剖したところ、幼生時において他の部分に先行してX線不透過構造を示す部分は前耳骨 (Os prooticum) に相当する領域であると思われる (図12)⁷⁾。

食用ガエルを用いた報告では、内耳が前耳骨に包まれ、前頭頭頂骨に連結するとされているので¹⁰⁾、成体アフリカツメガエルで観察されたX線不透過構造は食用ガエルにおける内耳の位置と一致していると思われる。

Romer and Parsons (1986)¹¹⁾ によれば、耳胞 (otic capsule) は、まだ脳函 (brain case) が不完全な状態であるヤツメウナギで既に存在しており、有尾両生類や爬虫類においても頭函が完成していない発生段階で、otic capsuleが明らかに形成されている。この事は本研究において明らかになった内耳を囲む骨格の形成が頭部の他の部分に先行する事実と一致している。

今回55期、59期、65期の内耳を囲む骨格の形成を比較し、内耳周囲のX線不透過構造が増大するだけではなく、左右のX線不透過構造物間の距離が短くなる事も観察された。これは変態に伴う頭蓋の改造の影響が表れていると考えられる。変態に伴って眼幅が狭くなり、視神経が短くなる事が報告されているが¹²⁾、耳胞は眼窩のすぐ後方に位置し、やはり頭蓋の改造の影響を受けるものと思われる。

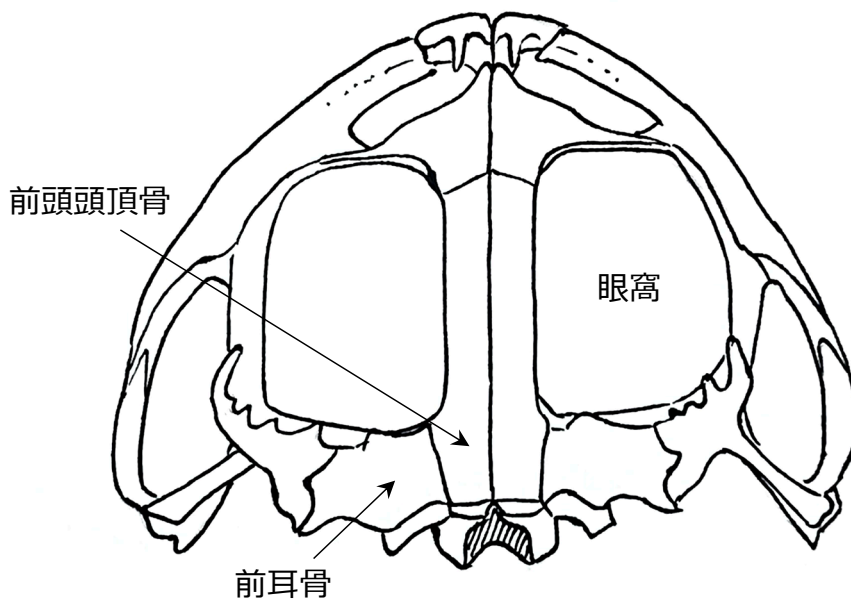


図12. ヒキガエルの頭蓋骨 (広島大学生物学会編「日本動物解剖学図説」より改変).

前耳骨は眼窩の後方に位置し、前頭頭頂骨と接している。

またRomer and Parsons (1986)⁸⁾ は、otic capsule は皮骨に覆われた脳函の後方に位置しているが、軟骨内骨化による骨であるとし、明らかに皮骨と区別をしている。さらに須田と仲谷 (2012)¹³⁾ は軟骨魚類の、軟骨のみからなる神経頭蓋において、その一部としてotic capsuleを含ませている。また松原ら (1991)¹⁴⁾ は硬骨魚類の頭蓋を軟骨性硬骨と膜骨に分け、前者に蝶耳骨 (sphenotic)、翼耳骨 (pteroitic)、上耳骨 (epiotic)、前耳骨 (prootic) を含ませている。今回の著者らのアフリカツメガエル幼生の組織切片による観察においても、内耳を取り囲む骨格は軟骨性のものであった。これらの事よりotic capsuleについては軟骨性骨化により形成されるものとして良いだろう。

一方、千葉 (1963)¹⁵⁾ はシヨクヨウガエルとトウキョウサンショウウオについて、内耳を含む骨格は膜性骨化のものと軟骨性骨化のものが混在していると報告している。部分的な膜性骨化による骨格の存在については、今後のさらなる組織学的検索が必要である。

結語

本研究における組織学的及びX線CT画像による観察により、アフリカツメガエルの骨格形成過程において、内耳を包む骨格が他の部分に先行して形成されることが明らかになった。両生類の頭蓋骨は変態時に改造が行われ、加えて膜性骨化と軟骨性骨化という由来が異なる2種類の骨が複雑に入り組んで形成されていく頭蓋骨の成り立ちの全てを掌握するには今後のさらなる研究が必要である。今回の組織学的な検索に加えてX線CT画像の活用を試みたが、骨形成過程の解明におけるX線CT画像の有効性が明らかであった。本研究においては変態前後の発生段階に限定して観察を行ったが、その後の発生段階における骨化の進行をX線CT画像を用いて追跡することにより、頭蓋形成過程はさらに解明されることと思われる。

利益相反の開示

本研究における利益相反は存在しない。

著者貢献度

すべての著者は、研究の構想およびデザイン、データ収集・分析および解釈に寄与し、論文の作成に関与し、最終原稿を確認した。

引用文献

- 1) Colbert EH, Morales M and Minkoff EC: Evolution of the vertebrates. In: A history of the backboneed animals through time (5th ed), 2004, 田隅本生監訳, 脊椎動物の進化(原著第5版), 5章 硬骨魚類, 築地書館, 東京, 61-74, 2004.
- 2) 藤田尚男, 藤田恒夫: 標準組織学総論, 156-157, 医学書院, 東京, 1981.
- 3) Radinsky LB: The Evolution of Vertebrate Design, 2002, 山田格監訳, 脊椎動物デザインの進化, 32-47, 海游舎, 東京, 2002.
- 4) 島田和哉: 進化から見たotic capsuleの発育についての考察, Ear Research Japan, 20, 87-88, 1989.
- 5) Colbert EH, Morales M and Minkoff EC: Evolution of the vertebrates. In: A history of the backboneed animals through time (5th ed), 2004, 田隅本生監訳, 脊椎動物の進化(原著第5版), 8章 両生類, 築地書館, 東京, 97-121, 2004.
- 6) 石原勝敏編著: 動物発生段階図譜, 292-306, 共立出版, 東京, 1996.
- 7) 広島大学生物学会編, 池田嘉平, 稲葉明彦監修: 日本動物解剖図説, 23-33, 森北出版, 東京, 1971.
- 8) Romer AS and Parsons TS: The vertebrate body (6th ed), Chapter VIII The Skull, 237-272, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1986.
- 9) Goodrich ES: Studies on the structure and development of vertebrate, Chapter VI The Skull, 230-395, The University of Chicago Press, Chicago, 1986.
- 10) 井上敬子, 高山幹子, 石井哲夫: カエルの鼓膜とその周辺, Ear Research Japan, 19, 83-85, 1988.
- 11) Romer AS and Parsons TS: The vertebrate body (6th ed), Chapter VII Supporting Tissues - The Skeleton, 158-236, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1986.
- 12) 大澤得二, 松浦絵里, 小笠原勝利, 花坂智人, 石田

欣二, 遠山稿二郎, 末松貴史, 和泉伸一: アフリカ
ツメガエル変態時における視神経の形態変化
- 髄鞘の崩壊と軸索の変形過程 - 医学生物学電
子顕微鏡技術雑誌, 26, 49-52, 2012.

- 13) 須田健太, 仲谷一宏: 軟骨魚類の骨格系, 木村清志
監修, 新魚類解剖図鑑, 26-33, 緑書房, 東京, 2012.
- 14) 松原喜代松, 落合明, 岩井保: 新版魚類学(上), 36-
53, 恒星社厚生閣, 東京, 1991.
- 15) 千葉英樹: 脊椎動物迷路骨包及び膜様迷路の比較
解剖学的研究, 日本耳鼻咽喉学会会報, 66, 1494-
1504, 1963.