

一次誘導系における未誘導細胞の関与

栗原一茂・佐々木直井

812 福岡市 九州大学理学部生物学教室

1976年11月1日 受領

The Participation of Uninduced Cells in Mesodermal Differentiation of Induced Cells. KAZUSHIGE KURIHARA AND NAOI SASAKI (Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University 33, Fukuoka 812).

ABSTRACT We used presumptive ectoderm (1×1.5 mm) of *Cynops pyrrhogaster* embryos as a reactor in the primary induction system, and the participation of uninduced cells in the differentiation of induced cells in the reactor was investigated. The inductor used was a protein solution prepared from guinea-pig bone-marrow. When its inducing stimulus was given to the ectoderm by treating it in the solution for 3 hours at 20°C , mesodermal induction was evoked in the ectodermal explants. If, after the treatment, some ectodermal explants were cut into 4 small pieces and each of them was combined with another fragment of the uninduced presumptive ectoderm of the original size, mesodermal induction was also evoked in the combined explants, but the regionality of the resultant differentiation was different from that of the uncombined ones; notochord and muscular tissues were evoked predominantly in the latter, whereas the dominant structures in the former were mesenchyme and mesothelium. Autoradiography was applied to the analysis of the origin of mesenchyme and mesothelium in the combined explants. An isolated piece of uninduced presumptive ectoderm was labelled with ^3H -thymidine and combined

with a small piece of the induced ectoderm. After being cultivated for 1, 3 and 10 days, the explants were fixed and processed for autoradiography. After 1 day's cultivation, the segregation of explant cells with labelled nucleus from those with unlabelled nucleus was observed. After 3 days' cultivation, the cells with labelled nucleus were scattered among the cells with unlabelled nucleus. After 10 days' cultivation, many labelled cells were observed in epidermis, mesenchyme and mesothelium. Since no necrotic figures of labelled nuclei were observed in the combined explants at 1 and 3 days' cultivation, it can be concluded that the mesodermal cells with labelled nucleus in the combined explants came from the uninduced ectoderm most probably by the homoiogenetic inducing effect of the cells in the induced ectoderm. (*Zool. Mag.* 86: 133-136, 1977)

モルモット骨髄は両生類胚予定外胚葉にたいして脊索・筋節といった背方性のつよい中胚葉性組織を優位に誘導することが知られている (Toivonen 1953a, b, Yamada 1958a, b)。Sasaki *et al.* (1976)はイモリ胚の予定外胚葉片をモルモット骨髄で処理して中胚葉性誘導刺激を与えたのち1/8に切って小片化し、別に用意したものと大きさの未処理予定外胚葉片と結合させると中皮や間充織が優位に生じてくることを示した。1/8程度の小片でも脊索、筋節の誘導の優位性は保持されることから、中皮・間充織の優位な分化は未処理の予定外胚葉片の影響によるものと考えられた。本報はその影響を具体的にとらえるための第一段階として、誘導刺激を受けた予定外胚葉の細胞の組織分化に、それと組み合わされた未処理の予定外胚葉の細胞が参加するかどうかをしらべたものである。

用いた材料はイモリ *Cynops pyrrhogaster* で、う胚期 (St. 12, Okada and Ichikawa 1947) の予定外胚葉片 (1×1.5 mm) を反応体として実験を行なった。モルモット骨髄から Sasaki *et al.* (1976)の方法に従って調整された抽出物溶液 (O. D. $280 \text{ m}\mu = 2$) を誘導体とし、この中で3時間 (20°C) 処理することによって反応体に誘導刺激を加えた。

実験群では誘導刺激を加えた予定外胚葉片をさらに4等分し、各片に誘導刺激を加えていないもとの大きさの予定外胚葉片を融合させた。これに対する対照実験として、もとの大きさの予定外胚葉片、その骨髓処理片、およびそれをさらに1/4に小片化したものを用意した。それぞれを10日間室温で培養後、ブアン氏液で固定し、分化してきた組織を光学顕微鏡観察で同定した。

次に分化した組織への未処理予定外胚葉の細胞の関与を知るためオートラジオグラフィ実験を行なった。予定外胚葉片をミリポア・フィルター Type HA (Millipore Co. Mass. U.S.A.)の上のせ、更にその上に2×2 mmのカバーガラスのをせ、 ^3H -チミジン (50 $\mu\text{Ci/ml}$)を含むホルトフレーター氏液中に室温で6時間放置してラベルした。一方すでに述べた方法で骨髓処理をほどこした1/4大の予定外胚葉片を用意し、これとラベルした未誘導予定外胚葉片とを融合させた。これらは1, 3および10日間室温で培養後、ブアン氏液で固定し、通常のパラフィン法で5 μm 厚で切片にした。この切片標品に感光乳剤 NR-M2 (Konishiroku Photo. Co. Tokyo)をかぶせ、5°Cで20日間露出後に現像し、染色後ラベルされた細胞の検索を行なった。

誘導実験の結果を表1に示す。誘導刺激を受けた予定外胚葉片 (Eb 群), およびその1/4片 (1/4 Eb 群) においては高頻度で中胚葉性組織誘導がみ

られた。これらの場合、脊索・筋節が多数生じている。一方実験群 (Eo+1/4 Eb) では間充織や中皮が上記の対照群にくらべて増加している。この結果は Sasaki *et al.* (1976) の結果と一致しており、誘導刺激を受けなかった予定外胚葉細胞群が誘導刺激を受けた細胞の分化に何等かの影響を与えたとする考え方を支持するものである。

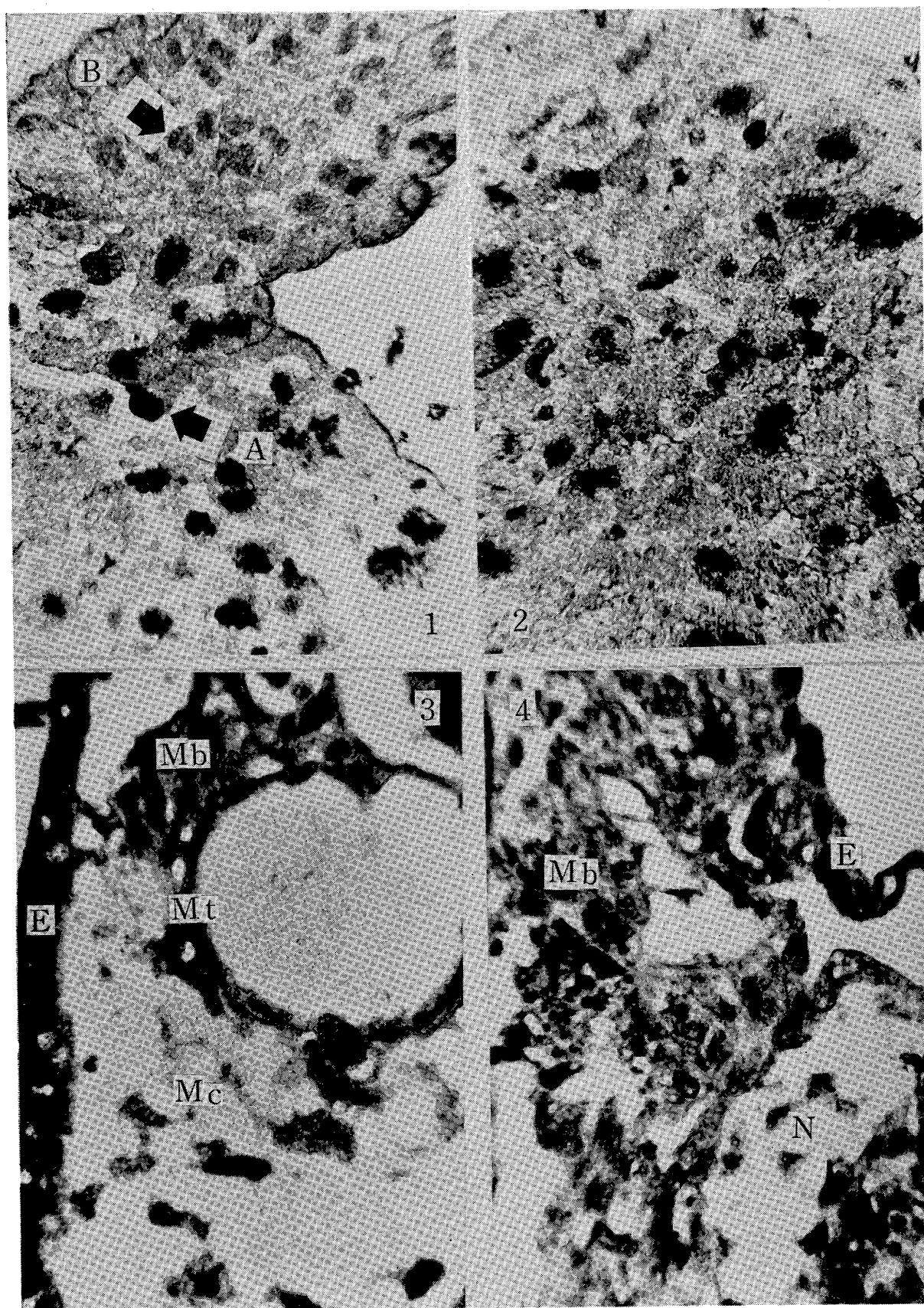
次にオートラジオグラフィの実験結果であるが、1日目の外植体 (図1) においては、ラベルされた核 (図1のA) をもつ予定外胚葉細胞の集団と、ラベルされていない誘導刺激を受けた細胞 (図1のB) の集団とは分離している。

しかし3日目のものになると分離は乱れて両方の細胞が混じり合っている (図2)。組織が分化してしまった10日目のものでは、間充織、中皮、前腎、筋の細胞に銀粒子を有する核が存在している (図3, 4)。しかし、脊索にはラベルされた細胞が観察されなかった。またこれらのものの表皮細胞はほとんどがラベルされていた。以上から骨髓の誘導刺激を直接には受けなかった予定外胚葉の細胞が、中胚葉性組織の構成の一部に参加することが認められた。本実験で採用した ^3H -チミジンの取り込み時間 (6時間) は、全細胞のラベルには十分でない。しかし本実験の目的にはその必要はなく、中胚葉性組織を構成する細胞に1つでもラベルされたものがあれば、それは未処理予定外胚葉細胞の参加を示しているも

Table 1. Inductions evoked in the ectodermal explants

Series	Eo	Eb	1/4 Eb	Eo+1/4 Eb
Total number of explants	18	24	96	47
Positive cases	0	16	61	28
No. of explants containing:				
Brain	0	0	0	0
Neural tissues	0	0	4	0
Notochord	0	7	30	2
Muscle, myotome	0	10	49	6
Pronephros	0	4	5	8
Mesothelium	0	11	7	16
Mesenchyme	0	8	13	20
Blood cells	0	2	1	2

The inductor was a protein solution prepared from guinea pig bone-marrow and the reactor was a strip of presumptive ectoderm of gastrulae of *Cynops pyrrhogaster*. After 10 days' cultivation in Holtfreter's solution, tissues evoked in the ectodermal explants were identified morphologically. Series Eo; intact presumptive ectoderm. Series Eb; presumptive ectoderm treated by the inductor. Series 1/4Eb; small sized Eb (1/4 in size). Series Eo+1/4Eb; small sized Eb combined with Eo.



のと判断してよい。 ^3H -チミジンの外植体内での移行の可能性については1日目および3日目の外植体に、細胞の壊死像がみられないことと、10日間の培養中に経過する予定外胚葉の細胞世代数がごく僅かである (Suzuki and Kuwabara 1974) ことから考えにくい。

Deuchar (1971) は少数の予定外胚葉細胞にオーガナイザーの誘導刺激をあたえると同時に ^3H -チミジンでラベルし、これと未処理の予定外胚葉片とを組合わせ、分化してきた神経組織中でのラベルされた細胞の分布をしらべた。

この場合、多数のラベルのない細胞が神経組織に見出されている。このことから彼女はオーガナイザーによる誘導刺激を受けた細胞が更に周囲の細胞に第2段の誘導作用をおよぼすことを主張している。全く類似の現象がニワトリ=ウズラの系を用いた実験で Rasilo and Leikola (1976) によって示されている。

本実験においても、骨髄からの誘導刺激を直接には受けなかった予定外胚葉細胞が中胚葉性組織の分化に参加し、結果的には中胚葉性組織に分化している。その意味では Deuchar および Rasilo and Leikola が神経組織の誘導について得た現象と同一であり、同質誘導といわれる範疇に入る現象である。しかしそれは実験群における間充織や中皮の分化の増加は説明するが、脊索や筋節などの分化の減少は説明しない。この点についてはさらに種々の角度からの実験が必要である (野田等, および栗原・佐々木, 1976 日本動物学会大会報告)。

文 献

DEUCHAR, E.M. (1971) Transfer of the pri-

mary induction stimulus by small numbers of amphibian ectoderm cells. *Acta Embryol. Experim.* 93-101.

OKADA, Y.K. AND M. Ichikawa (1947) A new normal table for the development of *Triturus pyrrhogaster*. *Exp. Morph.* 3: 1-6.

RASILO, M.-L. AND A. LEIKOLA (1976) Neural induction by previously induced epiblast in avian embryo *in vitro*. *Differentiation* 5: 1-7.

SASAKI, N., S. IYEIRI AND K. KURIHARA (1976) Interaction of induced and un-induced cells during primary induction. *Roux's Arch.* 179: 237-241.

SUZUKI, A. AND K. KUWABARA (1974) Mitotic activity and cell proliferation in primary induction of newt embryos. *Develop. Growth Differ.* 16: 29-40.

TOIVONEN, S. (1953a) Knochenmark als mesodermaler Induktor im Implantatversuch bei Triturus. *Arch. Soc. zool. bot. fenn. Vanamo* 7: 113-121.

——— (1953b) Bone-marrow of the guinea-pig as a mesodermal inductor in implantation with embryos of Triturus. *J. Embryol. exp. Morphol.* 1: 97-104.

YAMADA, T. (1958a) Induction of specific differentiation by samples of proteins and nucleoproteins in the isolated ectoderm of *Triturus-gastrulae*. *Experientia* 14: 81-87.

——— (1958b) Embryonic induction. A symposium on chemical basis of development Eds. by W. McElroy and B. Glass Jhon Hopkins Press, Baltimore, pp. 217-238.

Figs. 1-4. Autoradiograms of the combined explants; an isolated piece of presumptive ectoderm was labelled with ^3H -thymidine and combined with a small piece of the induced ectoderm. Fig. 1. A combined explant at 1 day's cultivation; segregation of cells with labelled nucleus (A with the arrow) from the cells with unlabelled nucleus (B with the arrow) is observed. Fig. 2. A combined explant at 3 days' cultivation; the cells with labelled nucleus are observed among the cells with unlabelled nucleus. Figs. 3 and 4. Combined explants at 10 days' cultivation; labelled cells are observed as the main component of the epidermis (E). In Fig. 3, labelled nuclei are observed in the myoblast (Mb), the mesothelium (Mt) and the mesenchyme (Mc). In Fig. 4, they are visible in the myoblast (Mb), but not in the notochord (N).