

サンショウウオ幼生にみられる指間突起の異属間誘導 (続)
 — 肢芽中胚葉と外胚葉の相互作用と, 外胚葉の反応性の変化 —

碓井益雄¹⁾・斎藤利子*

112 文京区 東京教育大学理学部動物学教室

*140 品川区 東京都立八潮高等学校

1977年4月18日 受領

1977年5月25日 再受領

Heteroplastic Induction of the Interdigital Process in Urodelan Larval Limbs (II)—Interaction between Ectoderm and Mesoderm in Limb Development and the Competence of Flank Epidermis—. MASUO USUI AND TOSHIKO SAITO (Zoological Institute, Faculty of Science, Tokyo Kyoiku University, Tokyo 112 and Yashio High School, Tokyo 140)

ABSTRACT To study the interaction between ectoderm and mesoderm in limb development, heteroplastic recombinations were made with limb-bud mesoderm and flank ectoderm from *Hynobius* and *Triturus* larvae at various developmental stages. All resultant chimeric limbs composed of *Hynobius* mesoderm and *Triturus* epidermis developed the interdigital process, peculiar to the limb of *Hynobius* larva. However, in the chimeric limb composed of *Triturus* mesoderm and *Hynobius* epidermis, the interdigital process did not develop when the host (*Hynobius*) was in stages 35 to 37. The degree of development of the chimeric limbs and interdigital process varied according to the host stage and the methods of transplantation. From the present experiments, we can conclude that: 1) the *Hynobius* epidermis at stages 35 to 37 can react to the limb mesoderm, and after stage 38, the epidermis produces a factor (Ge factor) which promotes cell division and growth in the limb mesoderm—the activity of this factor lasts until stage 53; 2) *Triturus* limb mesoderm, after stage 36, produces another factor (Gm factor) which maintains the Ge factor and stimulates the growth of ectoderm, peaking at stage 39; 3) after the Gm factor regressed, the mesoderm produces a second factor (D factor) which promotes degeneration of interdigital tissue and development of the digits. (*Zool. Mag.* 87: 1-11, 1978)

肢の発生・形態形成は、肢芽を構成する外胚葉と中胚葉の相互作用によって進行することは、哺乳類、鳥類、両生類の肢での種々の実験で示されてきた。

有尾両生類の *Hynobius* 属のサンショウウオ幼生では、肢発生過程中、独特の指間突起 (IDP) が形成される。碓井 (1941)、碓井・斎藤 (1972) は *Hynobius* とイモリ *Triturus* の間で、肢原基又は肢芽の中胚葉と表皮とを相互に交換移植することによってキメラ肢をつくり、指間突起の形成も両組織間の相互作用によることを示した。そしてこの形成機構は、鳥類の肢分化で Zwillig, Saunders 等によって示された肢芽先端の頂堤と肢芽中胚葉の要因

(Saunders ら, 1957, 1962; Zwillig, 1956 a, b, c, Zwillig and Hansborough, 1956; Searls and Zwillig, 1964) を適用し説明できることを示した。即ち、外胚葉と中胚葉には、相互に作用しあう成長促進要因とこれを維持する要因、更に中胚葉には発生の進行につれて先端の形の分化に関する指間組織の退化要因を仮定して説明した。しかし 1972 年 (碓井・斎藤) の実験は、特定の発生段階での実験であって、両組織に仮定した要因は、発生段階の違いに応じて変化することが考えられる。

またこの実験において、*Hynobius* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せでは、すべて *Hynobius* に特有の指間突起を形成し、結果が明瞭であるのに対し、逆の組合せの *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius*

¹⁾ 現在 112 文京区千石 2-33 林町住宅 1-104

表皮の組合せでは、指間突起が形成される場合と、形成されない場合があり、実験条件によって異った結果が得られる。そこでこれらの問題を明らかにするために、それぞれの組合せにおいて、宿主と移植体の発生段階をかえて実験を試みた。

材料と方法

材料として、指間突起を生じるトウキョウサンショウウオ *Hynobius tokyoensis*, クロサンショウウオ *H. nigrescens* と、これを生じないイモリ *Triturus (Cynops) pyrhogaster* の幼生を用いた。

Hynobius では35期から56期(碓井・浜崎, 1936)の間, *Triturus* では31期から49期(岡田・市川, 1947)の間の種々の発生段階のものをを用い、相互に組合せた。

肢芽中胚葉と外胚葉の組合せの方法は、前肢芽を切出し、エチレンジアミンテトラアセテイト(EDTA)処理により表皮を除いた肢芽中胚葉を移植体として、異属の宿主の側腹中央に移植、側腹表皮と組合せた。EDTA処理は Mg, Ca を除いた Niu-Twitty 液を用い $10^{-3}M$ として用いた。すなわち NaCl 0.34 g, KCl 0.05 g, Na_2HPO_4 0.011 g, KH_2PO_4 0.002 g, $NaHCO_3$ 0.02 g, EDTA 0.038 g を水にとかし 100 ml とし、室温 (18~20°C) で 5~10分処理した。

移植方法は、表皮下移植 (A群) と“露出移植”

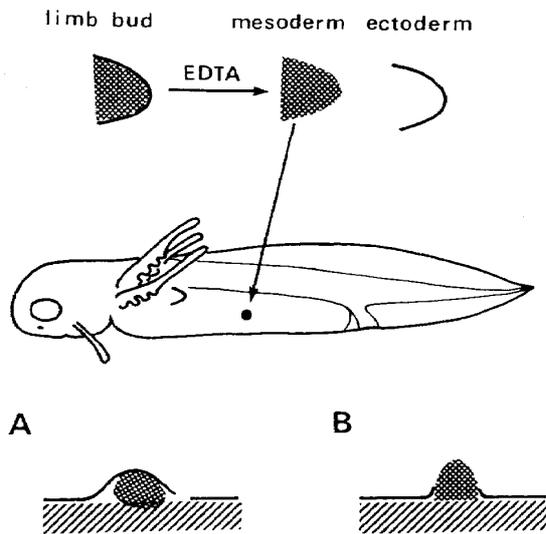


図1 方法
図は切出した肢芽から、EDTA処理によって外胚葉を除き、その肢芽中胚葉のみを、異属の宿主の側腹中央へ移植することを示す。Aは表皮下移植、Bは露出移植を示す。

すなわち側腹中央位置に作った傷口へ移植体基部をさしこみ、先端部を外液中に露出させた移植(移植後間もなく再生表皮によっておおわれる)(B群)の2種行なった(碓井・斎藤, 1972)(図1)。

実験群は次の通りである。

I. *Hynobius* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せ

A: 表皮下移植

B: 露出移植

II. *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せ

A: 表皮下移植

B: 露出移植

以上の手術はすべて Holtfreter 液または Niu-Twitty 液中で行なった。

実験個体は指間突起の発達する時期まで、頻りに観察し、肢分化完了まで飼育した。一部の組織的観察は、ブアン固定、マイヤーヘマトキシリン・エオジン染色によって行なった。

結 果

実験の結果は、表1, 2, 3にまとめた。得られたキメラ肢の分化については、完全肢、不完全肢¹⁾、退化したものにわけ、更に完全肢中、重複したものの個体数を()内に示した。また指間突起に関しては、これを生じたもの、生じないもの、指間膜²⁾を生じたもの、判定困難なものに分け、表中にその個体数を示した。

I. *Hynobius* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せ(表1)

I—A群: キメラ肢の分化は、39~40期の肢芽中胚葉と宿主の *Triturus* 38~39期の組合せで最もよく分化し、31期の若い宿主及び48~49期の発生の進んだ宿主との組合せでは悪く、不完全肢や退化したものの率が高い。発生の進んだ41期の肢芽中胚葉の移植によるキメラ肢は、若い38~39期の肢芽中胚葉にくらべ分化はよくない。

キメラ肢は、ほとんどすべての組合せで、指間突起又は指間膜を形成した。指間突起を形成しなかった例は、ほとんどが第1指を形成しなかったものである。指間突起の発達程度は宿主の発生段階により差があり、宿主38~41期では最もよく発達するが、

¹⁾ これには、肢の基部のみ分化した基部型肢と、先端部のみ分化した先端型肢を区別することができる。本実験で得られた不完全肢はすべて基部型肢である。

²⁾ 指間突起がのびず、*Hynobius* 幼生の第2指以降の指間にみられるものと同じ膜。

表 1. I—A, B: *Hynobius* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せにおけるキメラ肢の分化と指間突起の形成

実験群	組合せ発生段階		実験 個体数	キメラ肢の分化				指間突起形成		
	<i>Hynob.</i> 中胚葉	<i>Trit.</i> 表皮		完全肢	不完全肢	退化	重複	指間突起	指間膜	なし
A 群 (表皮下移植)	38	38	16	9	6	1	(3)	8	0	1△
	30	31	10	4	6	0	(3)	3+1×	0	0
		35	20	11	2	6	(8)	10	0	1△
		38~39	20	15	3	2	(7)	12+1△	1	1△
		40	10	5	3	2		5	0	0
		41	33	11	15	7	(5)	7	1	3△
		43	21	6	10	5	(2)	2	4	0
		44	22	17	1	4		10+1△	2	2+2△
		45	42	23	15	8		16	3	1+3△
	40	46~47	24	9	4	11		9	0	0
		48~49	29	10	12	7	(1)	2+4△	1+1△	2△
	41	*55	11	1	4	6		1	0	0
		35	25	12	8	5	(6)	6+2×	2	2
	41	36	22	20	2	0	(4)	19	0	1
38		16	4	5	7	(3)	2	1	1△	
B 群 (露出移植)	40	35	10	8	1	1	(6)	8	0	0
		38	10	9	0	1	(3)	8	1△	0
		41	9	5	3	1		5	0	0
		45	7	5	2	0	(1)	3	2	0
		48	11	11	0	0	(1)	7	3	1△
		*55	10	10	0	0		10	0	0
		*59	10	10	0	0		10	0	0
		41	38	11	9	2	0		6	2

*: *Hynobius nigrescens* との組合せを含む。他はすべて *Hynobius tokyoensis*。

×: 貧弱な指間突起。△: 第1指を分化しなかった個体。

若い31~35期及び発生の進んだ45~49期の宿主では長くのびない。

I—B群: キメラ肢の分化はI—A群の場合とちがって、宿主・移植体の発生段階と関係なく良好である。指間突起の形成については、A群と同様、完全肢の大部分が形成する。指間突起の発達程度も、発生の進んだ45~50期の宿主では長くのびず、指間膜を形成する率が高くなっている。また35期の若い宿主でも正常のもののように長くのびない。

II. *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せ

II—A: (表2および4) キメラ肢の分化は、37

期の若い肢芽中胚葉、また発生の進んだ51~53期の宿主を用いた場合、悪くなっている。38~40期の肢芽中胚葉を、若い35~38期の宿主へ移植した場合分化良好である。またキメラ肢の重複が、若い35~38期の宿主で特に多くみられる。

キメラ肢の指間突起の形成についてみると、若い35, 36, 37期の宿主では、移植体の肢芽中胚葉の発生段階に関りなく、指間突起は形成されない。宿主38期を用いたものでは指間突起が形成されるが、その率は低く、発生の進んだ肢芽中胚葉40~41期との組合せでは形成されない。その他の組合せでは、ほぼ指間突起が形成され、宿主39~40, 41期と移植体

表 2. II-A: *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せにおけるキメラ肢の分化と指間突起の形成

組合せ発生段階		実験 個体数	キメラ肢の分化				指間突起形成			
<i>Trit.</i> 中胚葉	<i>Hynob.</i> 表皮		完全肢	不完全肢	退化	重複	指間突起	指間膜	なし	判定不能
36	38	11	9	1	1	(2)	4	0	5	
	41	15	13	1	1		4	0	9	
37	35	20	11	5	4	(6)	0	1●	10	
	38	20	10	4	6		4	0	5	1
	41	20	14	3	3	(2)	6+1△	0	7	
38	35	20	15	4	1	(12)	0	0	12+2△	1
	36	20	19	1	0	(15)	1×	2	15+1△	
	37	19	10	5	4	(7)	0	2	7	1
	38	37	29	5	3	(12)	4+2●	1	22	
	39	19	10	6	3	(1)	3-1△	0	4+2△	
	41	44	23	13	8	(8)	4+2×	1	15	1
	43	23	11	4	8	(2)	5	0	5+1△	
45~46	29	16	4	9	(3)	1+3×	0	12		
39	38	27	22	3	2	(6)	2-2●	0	17	1
	41	20	8	4	8	(3)	7	0	1	
40	35	19	17	2	0	(10)	0	0	15+2△	
	38	20	17	3	0	(4)	1	0	16	
	40~41	25	17	6	2	(2)	10	0	7	
	43	16	6	4	6	(1)	5	0	1△	
	51~53	28	3	11	14		2	0	1	
41	38	16	13	2	1	(1)	5+1×	0	7	
42	43~44	10	3	3	4		2	0	1	

●: 重複肢 △: 第1指を分化しなかった個体。×: 貧弱な指間突起

の肢芽中胚葉38, 39, 40期の組合せでその形成率が高くなっている。

II-B: (表3) キメラ肢の分化は全般的に良好で、特に発生が進んだ40期の肢芽中胚葉との組合せでよくなっている。また宿主の発生段階と関係なく発生が進んだ54~56期の宿主においてさえ、キメラ肢の分化は良好である。またこの実験群では、宿主38期の場合を除き、キメラ肢の重複がほとんどみられない。

キメラ肢の指間突起形成については、宿主38期で重複した2例を除き、すべての組合せで形成されない。また指間膜も形成されない。

論 議

碓井 (1941) は、*Hynobius* 幼生の肢に特異的に形成される指間突起が、*Triturus* 肢原基中胚葉と *Hynobius* 表皮との組合せで誘導されることから、有尾両生類と無尾両生類の間でみられる吸着器や平衡桿の異属間誘導と同様の現象と考えた。即ち作用系に対して反応系は自己の遺伝的素質にしたがって形態形成する誘導現象の一種とみなし、*Triturus* の肢中胚葉には指間突起を誘導する能力があり、反応系としての表皮に指間突起形成能がないとし、指間突起形成能のある *Hynobius* 表皮と組合せた時指間突起を形成すると考えた。

その後、碓井・斎藤 (1972) により、その逆の組

表 3. II-B: *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せにおけるキメラ肢の分化と指間突起の形成

組合せ発生段階		実験 個体数	キメラ肢の分化				指間突起形成		
<i>Trit.</i> 中胚葉	<i>Hynob.</i> 表皮		完全肢	不完全肢	退化	重複	指間突起	指間膜	なし
37	41	22	18	3	1		0	0	18
38	35	6	5	1	0		0	0	5
	38	10	6	1	3	(6)	2●	0	4
	41~43	35	20	13	2		0	0	17+3△
	45	13	9	2	2		0	0	9
40	48	19	16	3	0		0	0	16
	35	4	4	0	0		0	0	4
	45	9	6	2	1	(1)	0	0	6
	49~50	10	9	1	0	(1)	0	1	7+1△
	54~56	12	11	1	0		0	0	11

●: 重複肢を生じた個体。△: 第1指を分化しなかった個体。

合せでも指間突起が形成されること、すなわち *Triturus* 表皮も *Hynobius* 肢芽中胚葉に反応して指間突起を形成することが明らかにされ、上の場合は別の形の誘導現象として検討されることになった。その結果、*Hynobius* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せではすべて、正常とほぼ同じ指間突起を形成し、一方 *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せでは、実験個体の $\frac{1}{3}$ ~ $\frac{2}{3}$ に於て、正常と同程度のものから小突起状のものにいたる種々の発達段階の指間突起を生じるが、残余のかなりの数の個体では、指間突起を生じないという結果を得た。これらの結果から指間突起の形成機構について、ニワトリの肢の発生過程で明らかにされた要因 (Zwilling, 1968, 1971; Saunders *et al.*, 1962; Saunders, 1966) に類似した要因を仮定して、説明を試みた (碓井・斎藤 1972)。即ち肢発生過程を肢芽成長期と肢芽分化期に分け、肢芽成長期において、外胚葉には肢芽中胚葉の細胞分裂、成長を促がす Ge 要因、中胚葉には外胚葉の要因を維持し、かつ先端部の外胚葉の伸長を促がす Gm 要因、更に肢芽分化期において中胚葉に先端部の指の分化を促がす指間組織の退化要因の D 要因を仮定して実験の結果を説明した。イモリとサンショウウオの間で、これらの要因の発現の時期、強さに差があり、それぞれ特有の肢の分化過程を示すのだと考えた。即ち Ge と Gm 要因はサンショウウオの方がイモリより強く、D 要因はイモリでは指軟骨の分化が始まると同時に発現、サンショウウオでは指軟骨の完成後

に発現するものとした。また Gm 要因に対する表皮の反応性は、サンショウウオとイモリの間で差がないと考えた。

上記の要因を仮定することによって、実験結果、ひいては肢の分化のしくみについて一応の説明を与えることができた。しかし先の実験は特定の発生段階でのみ行なわれたものであった。そこで異なった条件でもこの仮定が成立つかどうか問題である。また側腹表皮は肢芽中胚葉と相互に反応しあって肢を分化し得るが、その反応性の発生段階にともなう変化も検討すべき問題であった。

本実験の結果では、指間突起の形成は移植体の肢芽中胚葉と宿主の表皮の発生段階に密接に関係していることが示された。先づ各実験群について検討する。

I. *Hynobius* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せ

A・Bの実験群とも、第1指の欠損した個体を除き、すべての組合せでほとんどが指間突起を形成した。しかしその発達の程度は宿主の発生段階によって差が認められた。38~39, 41期の宿主でよく伸長し、しばしば正常のものより大きく発達した。若い31~35期及び発生の進んだ45~49期の宿主では指間突起はあまり伸長しない傾向が観察された。以上の結果は、先の1972年の論文で与えた説明が、本研究の結果にも矛盾なく適用されることを示すと同時に、宿主 (*Triturus*) の側腹表皮の反応性が発生段階に応じて変ることも示唆している。特に発達のよい指

間突起を得た宿主38~39, 41期は正常前肢の肢芽成長期に相当し、肢芽が最もよく伸長する時期と一致している。この時期に肢芽中胚葉に対する表皮の反応性が高まっていて指間突起の発達を良好にするとも考えられる。また45~49期の宿主で指間突起の伸長がよくないという事も、この時期が肢分化期に相当し Ge 要因の低下につれて表皮の中胚葉に対する反応性が低下したことによるとも考えられる。

II. *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せ

II—A: (表2) 移植体の *Triturus* の肢芽中胚葉の発生段階に関係なく、35~37期の宿主 (*Hynobius*) で、更に40期の移植体では38期の宿主でも、キメラ肢に指間突起を生じない。これらの関係をわかりやすくするため、宿主の発生段階を固定し、移植体の発生段階をかえた表に書きかえたものが表4である。更に宿主と移植体の発生段階と指間突起形成の関係をみるため、完全肢全体に対して指間突起を形成したものの比を%で示したのが表5である。

これによると宿主35期では、どの移植体との組合

せでも、キメラ肢に指間突起を形成しない。38期の宿主では若い37~39期の肢芽を移植した時、低い率で指間突起を生じる。宿主41期では、すべての組合せで、比較的高率で指間突起を形成する。

このように移植体と宿主の発生段階によって明らかに異なる結果が得られたことは、1972年の論文における *Triturus* 38~39期の肢芽中胚葉と *Hynobius* 41期の表皮の組合せで、指間突起を生じるものと生じないものとの両方の型の肢が得られたことに対して、理解を与えるように思われる。先の実験においては、結果を次のように説明した。即ち *Triturus* 肢芽中胚葉と *Hynobius* 表皮との接触が確立すると、まず、肢芽成長期には *Triturus* の Gm 要因と *Hynobius* 表皮の強い Ge 要因によって、肢芽の伸長が強く促進され、同時に *Triturus* では早期に発現する D 要因が抑制されることとなり、先端部の伸長が促進され指間突起が形成される。またある条件下では、*Triturus* 肢芽中胚葉の D 要因が優位に作用し、指間組織の退化が早められた時、指間突起は形成されないとした。*Triturus* 肢

表4. II—A: *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せにおける指間突起の形成

組合せの発生段階		実験 個体数	キメラ肢 完全肢	指 間 突 起 形 成			
<i>Trit.</i> 中胚葉	<i>Hynob.</i> 表 皮			指間突起	指間膜	なし	判定不能
37		20	11	0	1●	10	
38	35	20	15	0	0	10+2△	3
40		19	17	0	0	15+2△	
36		11	9	4	0	5	
37		20	10	4	0	5	1
38	38	37	29	4+2●	1	22	
39		27	22	2+2●	0	17	1
40		20	17	1	0	16	
41		16	13	5+1×	0	7	
36		15	13	4	0	9	
37		20	14	6+1●	0	7	
38	41	44	23	4+2×	1	15	1
39		20	8	7	0	1	
40		25	17	10	0	7	
38		23	11	5	0	5+1△	
40	43	16	6	5	0	1△	
42		10	3	2	0	1	

●: 重複肢を生じた個体 △: 第一指を分化しなかった個体。×: 貧弱な指間突起。

表 5. II: *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せにおける指間突起の誘導 (%)

実験群	<i>Trit.</i> 中胚葉 発生段階	<i>Hynobius</i> 表皮発生段階										
		35	36	37	38	39	40~41	45~46	48	49~50	51~53	54~56
A	36				44		31					
	37	0			40		50					
	38	0	5	0	14	30	26	25				
	39				9		88					
	40	0			6		59				66	
	41				46							
B	37						0					
	38	0			0		0		0			
	40									0		0

表はキメラ肢中、完全肢に対する指間突起形成個体数の比を%で示した。
指間突起形成個体中重複した個体は除外した。

芽は *Hynobius* 肢芽にくらべて、発生分化の時間は、同じ条件の下で速く進行する。従って移植後、*Hynobius* 表皮の Ge 要因と *Triturus* 中胚葉の D 要因が同時に作用した時、その相互作用の過程で、指間組織の退化の時期に多少の差を生じ、種々の発達程度の指間突起を形成すると説明した。本研究の結果は、これと矛盾せず、更にこれらの要因の発現、低下の時期を推定することができる。表 3, 4, 5 から移植体の発生段階に関係なく、宿主 *Hynobius* の 35~37 期では指間突起を形成しない事、41 期で指間突起の形成率が高いことから、*Hynobius* の肢芽形成前 (37 期以前) の若い表皮では、特殊な要因はまだ発現せず、移植体の要因に対し単に反応するだけとみることができる。そして 38 期以後、肢芽形成が明瞭に認められる時期から、Ge 要因が次第に発現し、41 期近くで最高となり、その後もしばらく持続するようにみえる。

また移植体 (*Triturus*) に注目すると、39 期で指間突起の形成率が最高であることから、Gm 要因が、*Triturus* では 36 期頃から発現し、39 期まで高まり、その後低下し D 要因が発現してくると考えられる。

以上のように、先の論文 (1972) で仮定した要因は本実験の結果からも支持され、キメラ肢の指間突起が肢芽中胚葉と外胚葉に、その発生段階に応じて出現する要因の相互作用によって、種々の程度に分化したり、また分化しなかったりすると考えることができる。

II-B: (表 3 及び 5) 表皮下移植とちがってどの組合せでも、指間突起は全く形成されない。先の実

験ではこれについて、移植後 2~3 時間後には傷口周辺から移動し移植体をおおってしまう再生表皮 (図 2) は、肢芽中胚葉と早期に緊密な相互作用を確立し、中胚葉のもつ要因がよりよく効果を及ぼす条件が作られるのではないかと解釈した。しかし本実験で若い 35~37 期の宿主 (*Hynobius*) への表皮下移植でも指間突起を生じないことから考えると、再生表皮は若い発生段階の表皮と同じく特別の要因が発現していないものと考えられる。

表皮下移植と露出移植について

移植方法の違いによる結果を検討すると、A 群 (表皮下移植) と B 群 (露出移植) の間で、指間突起の形成だけでなく、種々の点で明瞭な違いがみられる。先ず B 群ではキメラ肢の分化が良好なことである (表 1, 2, 4)。これについて更に各実験群で、実験個体数に対し肢を分化した個体数 (完全肢 + 不完全肢) の比を%で示すと、表 6, 7 の様になる。表皮の肢芽中胚葉に反応して肢を分化する能力は、*Hynobius* では、51~53 期頃から、*Triturus* では 55 期頃から急激に低下するに関らず、露出移植では、宿主の発生段階に関係なく、良好に肢を分化する。このことも再生表皮が若い状態にあることを示唆する。

また露出移植では肢の重複が少ない点も興味ある問題である。再生表皮については今後検討したい点の一つである。

両生類幼生の側腹表皮

本実験でキメラ肢の形成において用いた幼生の側腹表皮は、肢芽中胚葉と反応し、肢を形成する。ま

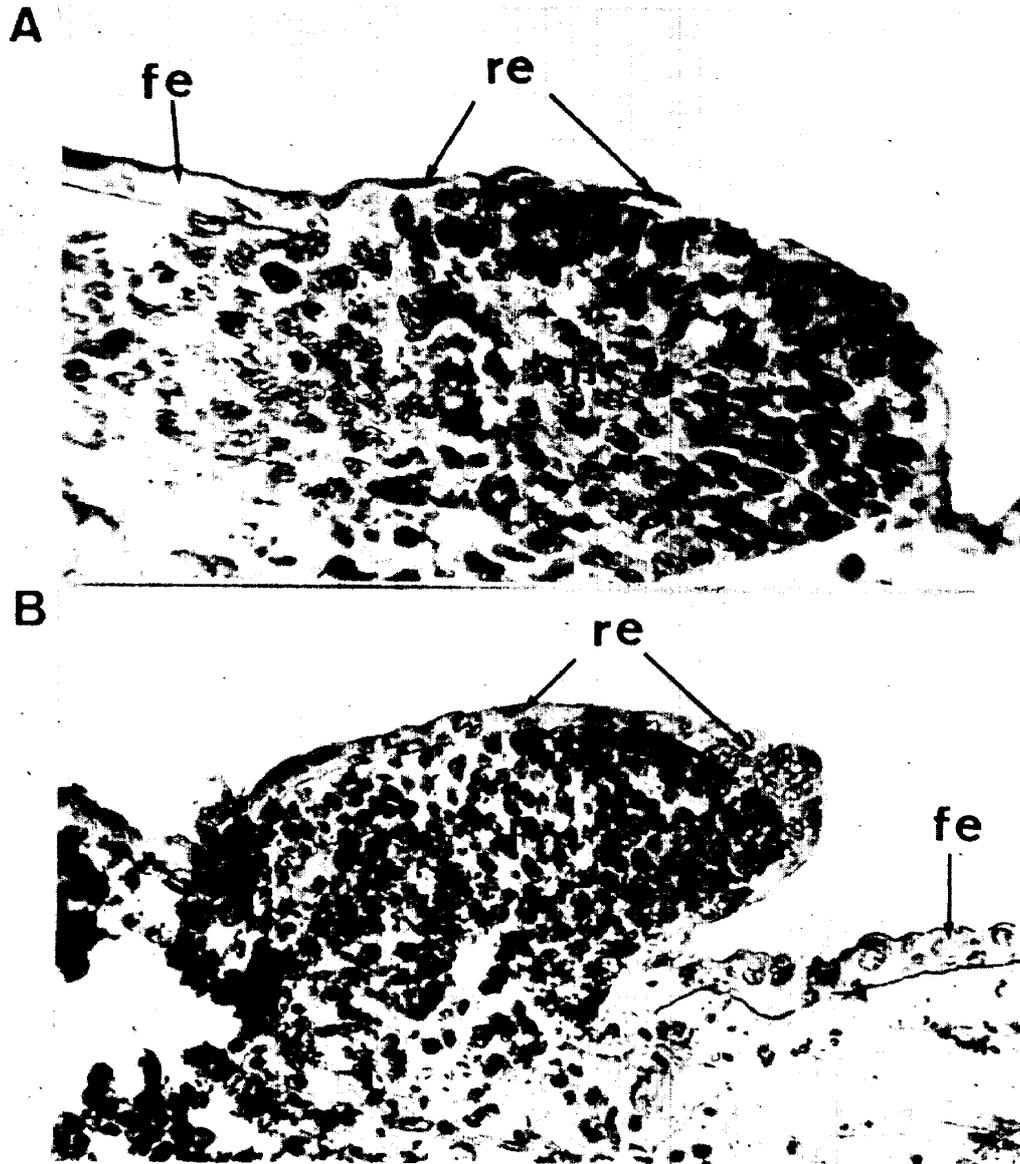


図 2 露出移植の組織観察

- A: 移植後2時間の移植体を示す。移植体 (lm) は既に再生表皮 (re) でおおわれている。この時期の再生表皮は著しく扁平である。
- B: 移植後10時間の移植体を示す。移植体をおおう再生表皮は厚みを増している。
- fe: 側腹表皮, re: 再生表皮, lm: 移植体の枝芽中胚葉。

た種々の要因で誘導される誘導肢の形成にも関与することが知られている。このことは、ニワトリの肢形成では、側腹表皮は全く反応しない点と著しく異なる点である。両生類では、肢分化に際して枝芽外胚葉にそなわっている要因が、側腹表皮にも潜在的にそなわっていて、正常肢の発生に伴って消長するとみられる。

両生類の肢分化における外胚葉と中胚葉の相互作用

用

最後に、肢分化において外胚葉と中胚葉の組織に仮定した要因について考察する。これらの要因は、指間突起の形成機構を説明するために仮定したものであるが、この指間突起形成の現象を手がかりとして両生類の肢の発生過程における枝芽中胚葉と外胚葉の相互作用を解明することが可能と思われる。

先ず枝芽発生過程の観察から、*Hynobius* と

有尾両生類における指間突起の異属間誘導

表 6. I: *Hynobius* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せにおけるキメラ肢の形成率 (%)

実験群	<i>Hynob.</i> 中胚葉 発生段階	<i>Triturus</i> 表皮発生段階									
		31	35	38~39	40	41	43	45	46~47	48~49	55
A	38			94 (56)							
	39~40	100 (40)	65 (55)	90 (75)	80 (50)	79 (33)	76 (29)	90 (55)	54 (38)	76 (33)	56 (9)
	41			56 (25)							
B	40		90 (80)	90 (90)		89 (56)		100 (71)		100 (100)	100 (100)
	41			100 (81)							

表中の数字 (%) は $\frac{\text{キメラ肢形成数 (完全肢+不完全肢)}}{\text{実験個体数}} \times 100$ として出した。

() 内の数字 (%) は $\frac{\text{完全肢}}{\text{実験個体数}} \times 100$.

表 7. II: *Triturus* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せにおけるキメラ肢形成率 (%)

実験群	<i>Trit.</i> 中胚葉 発生段階	<i>Hynobius</i> 表皮発生段階											
		35	36	37	38	39	40~41	43	45~46	48	49~50	51~53	54~56
A	36				91 (82)		93 (88)						
	37	80 (55)			70 (50)		85 (70)						
	38	95 (75)	100 (85)	79 (53)	92 (76)	84 (53)	89 (52)	65 (48)	69 (55)				
	39				93 (81)		60 (40)						
	40	100 (89)			100 (85)		92 (68)	63 (38)				50 (10)	
	41				94 (81)								
B	37						95 (82)						
	38	100 (83)			70 (60)		94 (63)		85 (69)	100 (84)			
	40	100 (100)							89 (67)		100 (90)		100 (92)

表中の数字 (%) は $\frac{\text{キメラ肢形成数 (完全肢+不完全肢)}}{\text{実験個体数}} \times 100$.

() 内の数字 (%) は $\frac{\text{完全肢}}{\text{実験個体数}} \times 100$ として出した。

Triturus の前肢芽について、肢芽成長期と肢芽分化期を次のように定めた (図 3)。

肢芽成長期: 肢芽出現から指軟骨分化の始まる前まで

Hynobius— 38~44期

Triturus— 35~41期

肢芽分化期: 指軟骨の分化が始まり、肢分化完了まで

Hynobius— 45~56期

Triturus— 42~51期

外胚葉には肢芽成長期に Ge 要因 (肢芽中胚葉の細胞分裂、成長を促がし、また中胚葉の D 要因に

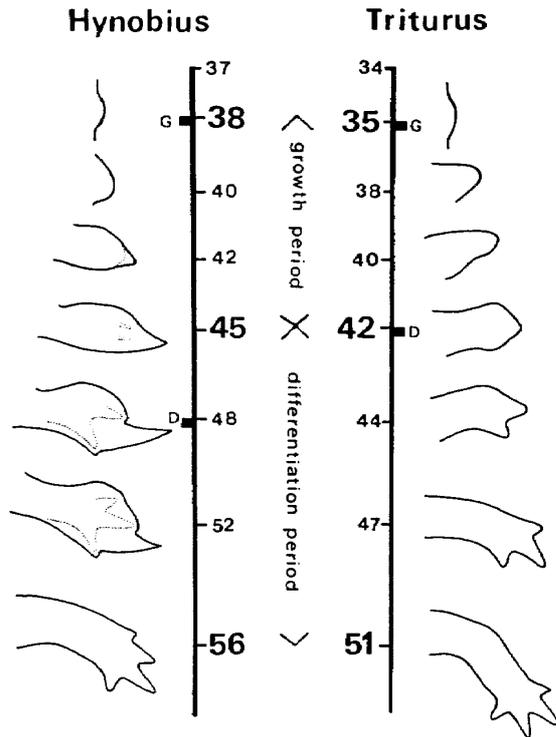


図3 *Hynobius* と *Triturus* の肢の発生比較。数字は発生段階、G は成長要因、D は指間組織の退化要因の発現時期を示す。

抑制的にはたらく) が肢芽形成と共に発現する。*Hynobius* では38期から次第に高まり、41期で最高となりその後もかなり後期まで維持されるとみられる。本実験の結果から少なくとも51~53期まで存在するように考えられる。(*Hynobius* 後肢の肢芽成長期にあたる発生段階は44~50期である。) しかし全体的に肢分化の能力は低下してゆく。また *Triturus* では Ge 要因は、*Hynobius* に比べ弱い、38~41期に高まり、その後発生が進むにつれ低下してゆくとみられる。

次に肢芽成長期の肢芽中胚葉に仮定した Gm 要因(外胚葉の Ge 要因を維持し、肢先端部の外胚葉の伸長を促がす)についてみると、*Hynobius* 肢芽では解析しにくい、39、40期で最高とみられる。*Triturus* では36期から発現し、39期で最高となり、40期で低下し、その後 D 要因(指の形の分化に関与するとみられる指間組織の退化要因)が発現すると考える。D 要因は実際に指間の組織の退化が認められる前、*Hynobius* では48期、*Triturus* では42期よりも前に発現すると考えられる。

両組織に仮定した Ge、Gm 要因については、ニワトリの肢分化で、かなり明確に示されている。即

ち肢芽発生初期にみられる頂堤に先端部の伸長を支配する要因があることが示され (Saunders ら、1957; Gasseling and Saunders, 1961), また肢芽中胚葉にこれを維持する要因 (maintenance factor) のあることを示す実験 (Zwilling 1956c; Zwilling and Hansborough, 1956; Searls and Zwilling, 1964), また指の分化にともなう指間組織の細胞死の観察 (Saunders ら、1962; Saunders, 1966) がなされている。

両生類では、ニワトリ、哺乳類の肢芽でみられる頂堤と類似するものが、*Xenopus* で観察されているが (Tarin and Sturdee, 1971), *Hynobius*, *Triturus* では顕著でない。形態的に顕著ではないが、おそらく同じ肢の分化過程で、同じ機構がはたらくしているとみられる。両生類で肢先端部の伸長分化が、外胚葉の存在によっておこることを示す実験は古くから行なわれている (Balinsky, 1929, 1934; Rotmann, 1933)。両生類の再生肢芽の初期にみられる頂帽の役割はこれと同じとみられる (Thornton, 1957)。また指間組織の退化要因については、先の論文 (1972) で述べたように本研究で使用した材料について、ナイル青による生体染色、更に組織切片による観察で、細胞死の像は僅かにみられるが、ニワトリの場合のように顕著ではない。これについては、ニワトリでは肢発生が非常に短時間で進行するのに対し、両生類では発生速度がおそいことに原因があるのではないかと思う。すなわちサンショウウオで38期から60期(前後肢の分化完成)まで20°Cで約50日、前肢完成(38~50期)まで約24日を要するのに対し、ニワトリでは後指完成(19~33期)まで5日を要するのみである。

以上考察したように、両生類とニワトリの肢芽の発生のしくみは、基本的に同じであるように思う。両者の違いや類似点を明らかにすることも今後に残された問題である。

なお、対照実験として意味を持つと思われる *Hynobius* 肢芽中胚葉—*Hynobius* 表皮の組合せ、および *Triturus* 肢芽中胚葉—*Triturus* 表皮の組合せについては、今までに同種間移植における誘導肢や重複肢の研究に関連して、一部の発生段階で実験がなされているが、その詳細は別の機会にゆずりたい。

謝 辞

本実験は1971~1972年に東京教育大学理学部動物学教室で行なったものである。同教室発生学研究室

のかたがたおよび岩手医大高木知道博士の御援助・御助言に対し深く感謝致します。

文 献

- BALINSKY, B. I. (1929) Über die Mesodermverschiebungen bei der Extremitäteninduktion. *Roux' Arch.* 116: 604-632.
- (1934) Selbstdifferenzierung des Extremitätenmesoderm im Interplant. *Zool. Jahrb. Abt. Allgem. Zool. Physiol.* 54: 327-348.
- GASSELING, M. AND J. W. SAUNDERS (1961) Effects of the apical ectodermal ridge on growth of the versense-stripped chick limb bud. *Devel. Biol.* 3: 1-25.
- 岡田 要・市川 衛 (1947) キモリ *Triturus pyrrhogaster* (Boie) の発生段階規準改訂図表. 実験形態学年報 3: 1-6.
- ROTMANN, E. (1933) Die Rolle des Ektoderms und Mesoderms bei der Formbildung der Extremitäten von *Triton*. II. Operation im Gastrula und Schwanzknospens stadium. *Roux' Arch.* 129: 85-119.
- SAUNDERS, J. W. (1966) Death in embryonic system (Death of cells in the usual accompaniment of embryonic growth and differentiation). *Science* 154: 604-611.
- , J. M. CAIRNS AND M. T. GASSELING (1957) The role of the apical ridge of ectoderm in the differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts in the chick. *J. Morph.* 101: 57-88.
- , M. T. GASSELING AND L. C. SAUNDERS (1962) Cellular death in morphogenesis of an avian wing. *Devel. Biol.* 5: 147-178.
- SEARLS, R. L. AND E. ZWILLING (1964) Regeneration of the apical ectodermal ridge of chick limb bud. *Devel. Biol.* 9: 38-55.
- TARIN, D. AND A. STURDEE (1971) Early limb development of *Xenopus laevis*. *J. Emb. Exp. Morph.* 26: 169-179.
- THORNTON, C. S. (1957) The effect of apical cap removal on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *J. Exp. Zool.* 134: 357-384.
- 碓井益雄 (1941) 山椒魚幼生の指間突起の生成機構, 特に他種所属器官の誘導について (予報). 動物学雑誌 53: 403-410.
- ・浜崎 幹 (1936) クロサンショウウオ発生段階図表. 動物学雑誌 51: 195-206.
- ・斎藤利子 (1972) サンショウウオ幼生にみられる指間突起の異属間誘導. 動物学雑誌 81: 135-145.
- ZWILLING, E. (1956 a) Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryos. I. Axis establishment. *J. Exp. Zool.* 132: 157-171.
- (1956 b) Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. II. Experimental limb duplication. *J. Exp. Zool.* 132: 173-187.
- (1956 c) Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo. IV. Experiments with a wingless mutant. *J. Exp. Zool.* 132: 241-254.
- (1968) Morphogenetic phases in development. *Devel. Biol.* 2: 184-207.
- (1971) Culture stability of morphogenetic properties of chick limb bud mesoderm. *J. Exp. Zool.* 176: 397-408.
- AND L. A. HANSBOROUGH (1956) Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in chick embryo. III. Experiments with polydactylous limbs. *J. Exp. Zool.* 132: 219-239.