

軟体動物腹足綱サカマキガイの発生過程における平衡胞の免疫組織学的解析

—平衡胞と中枢神経系における神経形成について—

高濱秀樹*・磯崎純恵**

【要旨】 軟体動物腹足綱サカマキガイ (*Physa acuta*) の発生過程で、平衡胞と中枢神経系における神経形成の過程を明らかにするため、成体と幼生の中枢神経（脳神経節、平衡胞を含む足神経節）を神経伝達物質ヒスタミンとセロトニンを検出する免疫組織学的方法で解析した。

セロトニン陽性ニューロンは、成体の脳神経節で約 20 対、足神経節で約 40 対観察され、ヴェリジャー初期に脳神経節に初めて 1 対現れ、その後発生の進行と共に脳神経節と足神経節で次第に増加することを示した。一方、成体の平衡胞に 2 対存在するヒスタミン陽性ニューロンは、ヴェリジャー初期に初めて 1 対現れ、ヴェリジャー後期になると 2 対となり、成体と同数になることが示された。この陽性部位が、その後の中枢神経系の形成様式の比較から、平衡胞内であることを示唆している。本研究結果は、淡水産巻貝では平衡胞が早期から形成され、平衡受容が働いていることを推測させた。

【キーワード】 軟体動物腹足綱 サカマキガイ 発生過程 平衡胞
中枢神経系 ヒスタミン セロトニン 免疫組織学的解析

はじめに

軟体動物の平衡感覚は平衡胞で受容され、その内面には平衡石と感覚毛を持つ神経細胞から構成される (Coggeshall, 1969)。平衡胞は、足神経節の近くに左右一対存在し、神経節周囲の結合組織に囲まれている。平衡胞内の感覚有毛細胞の数は、腹足綱の種類によって異なるが、*Limax* (Wolff, 1969)、*Lymnaea* (Coggeshall, 1969)、*Pleurobranchaea* (Wood and von Baumgarten, 1975) では 13 個の円盤状を呈する有毛細胞の存在が確認されている。

海水産腹足綱の幼生がプランクトンとなって浮遊生活を送るのに対し、淡水産腹足綱の胚と幼生は、透明な卵殻の中で発生が進み、胞胚期、原腸胚期、トロコフォア幼生期、ヴェリジャー幼生期、成体様幼生期、孵化後亜成体を経て成熟した成体となる (Marois and Croll, 1992; Voronezhskaya et al., 2004)。発生過程における平衡胞の出現に関し、海産腹足綱では詳細な

平成 20 年 6 月 2 日受理

*たかはま・ひでき 大分大学教育福祉科学部生物学教室

**いそざき・すみえ 大分大学教育学研究科教科教育専攻理科教育専修 (現大分商業高等学校)

記載があり、ヴェリジャー幼生期に出現することが知られている (関, 1996; Dickinson and Croll, 2003; Croll, 2006)。

セロトニン神経伝達物質の一つで、神経系内の分布を免疫組織学的に検出することが可能である。軟体動物の成体や幼生における神経系の構造解析に、この方法は効果的な手段として用いられる (Croll et al., 2001)。淡水産巻貝の一種 *Lymnaea stagnalis* では、セロトニンが脳神経節に発生の最初に現れると報告されて (Marios and Croll, 1992)、幼生と成体を通じて主要な物質であることを示している。一方、ヒスタミンも神経伝達物質の一つであるが、成体の平衡胞において重力受容に働くと報告されている (Braubach and Croll, 2004)。また、*Aplysia californica* と *Pleurobranchaea californica* の平衡胞で、ヒスタミン陽性ニューロンの存在が報告されていて (Soinila et al., 1990; Ohsuga et al., 2000)、ヒスタミンが平衡胞の神経系における重要な神経伝達物質であることを示している。しかし、幼生の平衡胞に関する免疫組織学的な報告は少なく、神経系の発生との関係も明らかでない。

そこで本研究の目的は、軟体動物腹足綱サカマキガイ (*Physa acuta*) の成体と幼生で、中枢神経系 (脳神経節、平衡胞を含む足神経節) におけるセロトニンとヒスタミン陽性ニューロンの免疫組織学的に解析を行い、神経形成の過程を明らかにすることである。

材料と方法

サカマキガイ (*Physa acuta*) 成体を野外から採取し、水槽で維持した。水槽内で産卵された卵塊をシャーレに移し、室温条件下 (20–24°C) で発生させた。発生段階は Voronezhskaya et al., (2004) に従って発生段階を区分し、4つの発生段階 (トロコフォア期、ヴェリジャー初期、ヴェリジャー後期、成体様幼生期) の幼生および成体を以下の実験に用いた。

幼生を固定液 (4%ホルムアルデヒド水溶液–0.1M 磷酸緩衝液, 4°C) に浸漬し、固定した。成体の場合は頭部を解剖後、中枢神経を摘出し、固定した。これらの試料は、一晚固定後、PBSで洗浄 (3回、各30分) した。固定した試料は以下のような方法で免疫染色した (Matsushima et al., 2002)。試料をブロッキング液 (1% normal goat serum, 1% BSA, 0.1% Triton-X を含む PBS) に移した後 (30分)、一次抗体に2時間反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体 (ローダミン標識抗ウサギ IgG 抗体, 希釈 1:100) に2時間反応させた。PBS洗浄後、ゲルマウントで封入し、蛍光顕微鏡 (オリンパス AX-FLB-1) で観察し、透過光と蛍光で撮影し、画像をハードディスクに記録した。

一次抗体は、抗ヒスタミン抗体 (ケミコン社, 希釈 1:250) と抗セロトニン抗体 (ケミコン社, 希釈 1:500) を用いた。上記の手順に一次抗体を除いたものを対照とした。

結果

1 成体

サカマキガイ (*Physa acuta*) の中枢神経系は、一対の脳神経節、足神経節、側神経節、壁神経節、口球神経節、および対になっていない内臓神経節から構成されていた (図 1A)。平衡胞は、足神経節の背側前方に位置し、楕円体を呈する形態で左右一対存在し、その内部は平衡石で満たされていた (図 1B)。

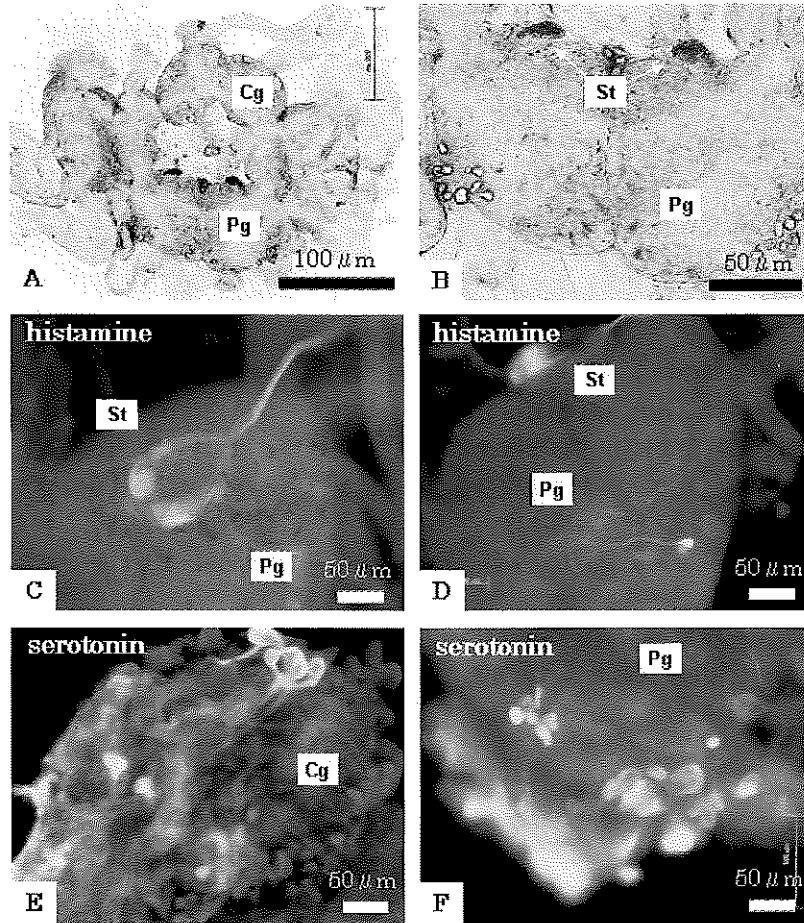


図1 成体から中枢神経系を摘出した直後の未固定の写真(A)と、足神経節(Pg)を拡大した写真(B)を示す。平衡胞(St)が左右の足神経節の背面に位置する。CとDは抗ヒスタミン抗体で、EとFは抗セロトニン抗体で免疫染色した写真を示す。右側の平衡胞(C)に2個のヒスタミン陽性ニューロンが見られ、脳神経節(Cg)まで軸索が伸びている。足神経節の腹側にもヒスタミン陽性のニューロンが見られる(D)。セロトニン陽性ニューロンが、脳神経節(E)にも、足神経節(F)にも多数観察された。

平衡胞には2対のヒスタミン陽性ニューロンが認められ、細胞体の直径は約 $30\mu\text{m}$ であった(図1C)。このニューロンから伸長する軸索が脳神経節まで達することも確認された。また、ヒスタミン陽性ニューロンが脳神経節で約7対、足神経節で数対存在した。足神経節に見られるものには、軸索を長く伸長させているものも観察された(図1D)。平衡胞にはセロトニン陽性ニューロンは確認されなかった。脳神経節におけるセロトニン陽性ニューロンは、約20対存在し、その細胞体の大きさは $10-40\mu\text{m}$ の範囲で、前方にやや大型の細胞体が散在し、後方に小型の細胞体が密集していた(図1E)。足神経節におけるセロトニン陽性ニューロンは、約40対認められ、腹側に集中していた(図1F)。

2 トロコフォア期

トロコフォア期の幼生は直径約 $40\mu\text{m}$ で、足部形成の開始により形態学的に特徴付けられる(図2A)。この時期には、ヒスタミン陽性ニューロンもセロトニン陽性ニューロンも観察されなかった(図2B, C)。

3 ヴェリジャー初期

ヴェリジャー初期の幼生は長径が $50\mu\text{m}$ 以上になり、足部の伸長($10\mu\text{m}$ 以下)と貝殻形成の開始で特徴付けられた(図2D)。この時期、ヒスタミン陽性ニューロンが1対、足部に近い位置に観察され(図2E)、細胞は球状であり、軸索の伸長は認められなかった。セロトニン陽性ニューロンも一対で、脳神経節が形成される部位である足部突起の後方、体側に近い位置に観察された(図2F)。その細胞は球状であるが、一部に軸索の伸長が認められた。ヒスタミン陽性細胞の間は約 $30\mu\text{m}$ で、セロトニン陽性細胞の間($120\mu\text{m}$)よりも狭かった。

4 ヴェリジャー後期

ヴェリジャー後期は、貝殻の形成と足部の伸長が進み、眼の形成がはっきりと認められた(図3A)。ヒスタミン陽性細胞は、平衡胞が存在する位置に部位に2対に観察された(図3B)。一部の陽性細胞で、軸索が脳神経節方向に伸長しているのが観察された。脳神経節には、ヒスタミン陽性細胞はまだ認められない。

セロトニン陽性細胞数は、ヴェリジャー幼生の成長の度合いによって異なり、足部の長さ按比例した。セロトニン陽性ニューロン数は、足部が少し伸長した個体($20\mu\text{m}$ 以下)では、脳神経節と足神経節にそれぞれ1対認められ、足部が $40\mu\text{m}$ 以上伸長した個体では、脳神経節と足神経節にそれぞれ2対観察された(図3C)。それぞれのニューロンから出る軸索が明瞭に観察され、神経節間をつなぐ環状構造を示した。

5 成体様幼生期

成体様幼生期は、成体と同じ形状となり、卵殻の内面で匍匐運動を行う。この時期には、平衡胞が明瞭となる(図3D)。ヒスタミン陽性ニューロンは、平衡胞の位置に2対は変わらないが、脳神経系の位置にも数対観察された(図3E)。セロトニン陽性ニューロンは、脳神経節と足神経節にそれぞれ3対のセロトニン陽性ニューロンが観察された(図3F)。脳神経節間の距離は以前よりも狭まっている。左右の足神経節間をつなぐ軸索も明瞭となり、足神経節から足部の先端方向に伸長させる軸索も多数観察された。

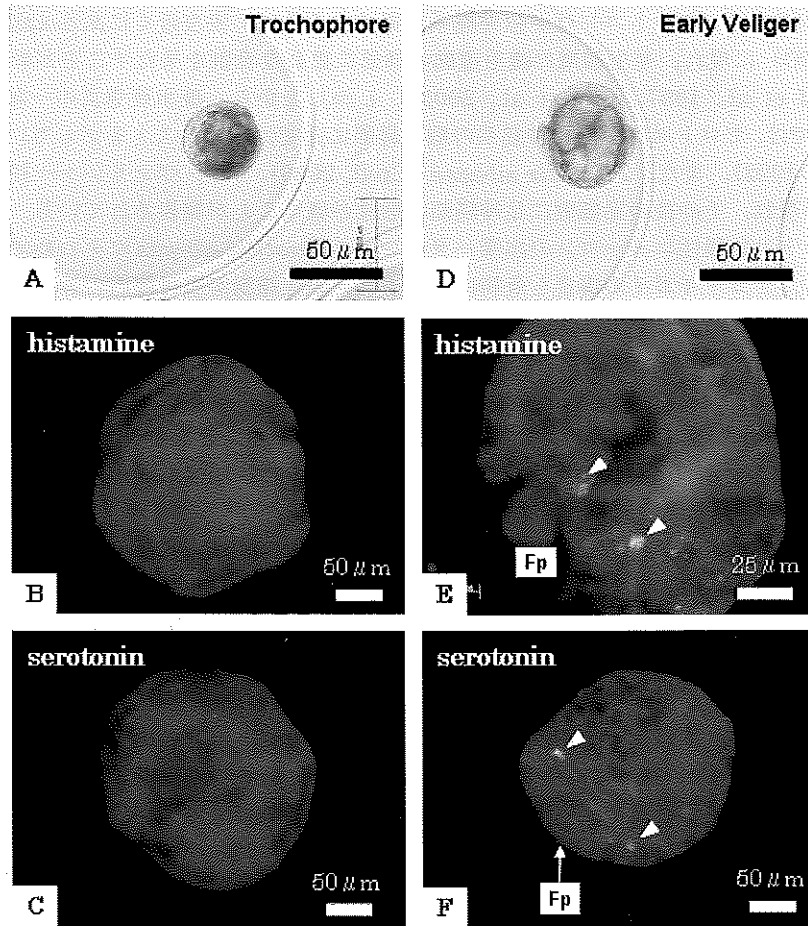


図2 トロコフォア期 (A-C) とヴェリジャー初期 (D-F) の写真を示す。AとDは、卵殻内で成長中の写真。BとEは抗ヒスタミン抗体で免疫染色、CとFは抗セロトニン抗体で免疫染色した写真を示す。トロコフォア期 (BとC) にはいずれも陽性ニューロンは認められないが、ヴェリジャー初期 (EとF) にはいずれも陽性ニューロン (矢尻) を1対認めることができる。この時期には、足部の突起 (Fp) を明瞭に観察できる。

考察

本研究は、軟体動物淡水産巻貝サカマキガイ (*Physa acuta*) の発生過程におけるセロトニンに対する免疫組織学的解析で、脳神経節が最初に形成され、後に足神経節が形成されることを示した。また、ヒスタミンに対する免疫組織学的解析で、平衡胞が脳神経節とは別の位置に形成され、その出現場所は平衡胞であることを示唆した。

海産腹足綱では、セロトニンは中枢神経系が発達する前に、表皮近くにある apical sensory organ (ASO) に現れ、発生初期の繊毛運動の調節に重要な役割を果たすことが報告されている (Kempf et al., 1997; Koss et al., 2003)。しかしながら、淡水産巻貝の一種 *Lymnaea stagnalis* では、セロトニンが中枢神経系の脳神経節に最初に現れることを示している (Marios and Croll, 1992)。また、*Phestilla sibogae* (Croll, 2006) では、ヴェリジャー初期に最初に脳神経節が現れ、その後の足部側に足神経節の形成が続くことが報告されている。本研究で示されたセロトニン陽性ニューロンの出現パターンは、*Phestilla sibogae* にきわめてよく似ている。従って、サカマキガイの場合も最初にセロトニン陽性細胞が脳神経内の神経細胞に現れたことを示している。

ヒスタミンは、平衡胞で重力受容に働く神経伝達物質として知られているが (Braubach and Croll, 2004)、海水産腹足綱 *Pleurobranchaea californica* の平衡胞ではヒスタミン陽性ニューロンが 13 対のうちの 8 対を占め、主要な神経伝達物質であることを示唆している (Ohsuga et al., 2000)。サカマキガイ成体の平衡胞においても、ヒスタミン陽性ニューロンが確かめられたが、平衡胞内の神経伝達物質の全容はまだ分かっていない。

海産腹足綱のエゾアワビ *Haliotis discus hannai* (関, 1996)、*Ilyanassa obsoleta* (Dickinson and Croll, 2003)、*Phestilla sibogae* (Croll, 2006) で詳細な発生段階の記載がなされ、平衡胞の発生はヴェリジャー幼生期に出現することが報告されている (Croll, 2006)。特に *Phestilla sibogae* では、発生過程の間の中枢神経系と平衡胞との詳細な位置関係が報告されている。それによると、ヴェリジャー初期に脳神経節の形成より少し遅れて平衡胞が足部側に形成されることを示している。本研究で最初のヒスタミン陽性が、セロトニンの出現部位とは異なり、足部に近いことを示した。従って、この位置が平衡胞であることを強く示唆している。

サカマキガイの発生過程で、平衡胞が明瞭に確認されるのは成体様幼生期である。発生様式が淡水産と海産では異なることも考えられるので直接比較はできないが、平衡胞におけるヒスタミン陽性ニューロンの早期の出現は、淡水産巻貝の平衡胞の形成および平衡受容の獲得が、海産巻貝類と同じくヴェリジャー幼生期であることを推測させる。しかし、この解明にはサカマキガイの平衡胞に関するより詳細な研究が必要である。

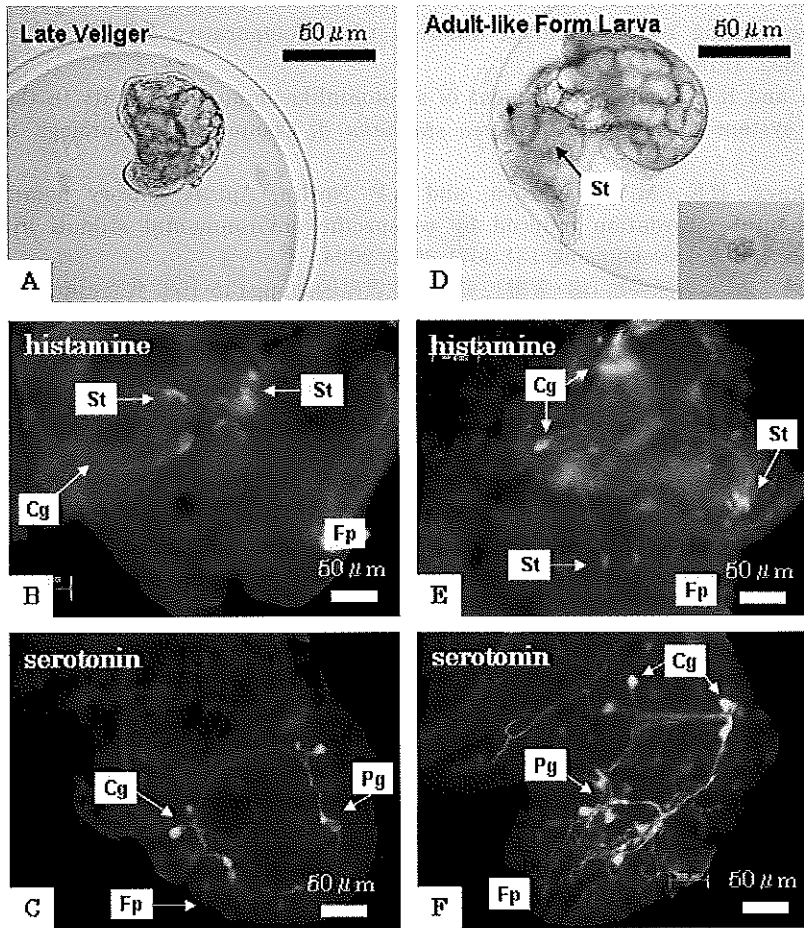


図3 ヴェリジャー後期と (A-C) と成体様幼生期 (D-F) の写真を示す。A とDは、卵殻内で成長中の写真。成体様幼生期には、矢印の位置に明瞭な平衡胞を認めることができる (Dの挿入写真)。BとEは抗ヒスタミン抗体で免疫染色、CとFは抗セロトニン抗体で免疫染色した写真を示す。ヴェリジャー後期には、足部の突起 (Fp) の伸長が以前よりも著しい。平衡胞 (St) が発達する部位に、ヒスタミン陽性ニューロンを2対認めることができる。セロトニン陽性ニューロンは、脳神経節 (Cg) と足神経節 (Pg) で認められる。成体様幼生期には、ヒスタミン陽性ニューロンが脳神経節においても観察される。

参考文献

- Coggeshall, R.E. A fine structural analysis of the statocyst in *Aplysia californica*. *J. Morphology*, 127:113-132. 1969.
- Wolff, H.G. Einige Ergebnisse zur Ultrastruktur der Statocysten von *Limax maximus*, *Limax flavus* und *Arion empiricorum* (Pulmonata). *Z. Zellforsch.*, 100:251-270. 1969.
- Wood, J. and J. von Baumgarten. Activity recorded from the statocyst nerve of *Pleurobranchaea californica* during rotation and at different tilts. *Comparative Biochemistry Physiology*, 43A:495-502. 1975.
- Marois, R. and R.P. Croll. Development of serotoninlike immunoreactivity in the embryonic nervous system of the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Comparative Neurology*, 322:255-265. 1992.
- Voronezhskaya, E.E., M.Y.Khabarova, and L.P. Nezhlin. Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails. *Development*, 131:3671-3680. 2004.
- 関哲夫. エゾアワビ. 石原勝敏 (編・著書), 動物発生段階図譜. pp145-153. 共立出版, 東京. 1996.
- Dickinson, A.J.G. and R.P. Croll. Development of larval nervous system of the gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *J. Comparative Neurology*, 466:197-218. 2003.
- Croll, R.P. Development of embryonic and larval cells containing serotonin, catecholamines, and FMRFamide-related peptides in the gastropod mollusc *Phestilla sibogae*. *Biological Bulletin*, 211:232-247. 2006.
- Croll, R.P., D.Y. Boudko, and M.G. Hadfield. Histochemical survey of transmitters in the central ganglia of the gastropod mollusk *Phestilla sibogae*. *Cell Tissue Research*, 305:417-432. 2001.
- Braubach, O.R. and R. P. Croll. Evidence that histamine acts as a neurotransmitter in statocyst hair cells in the snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Gravitational Physiology*, 11:57-66. 2004
- Soinila, S., G.J. Mpitsos, and P. Panula. Comparative study of histamine immunoreactivity in nervous systems of *Aplysia* and *Pleurobranchaea*. *J. Comparative Neurology*, 298:83-96. 1990.
- Ohsuga, K., M. Kurokawa, and K. Kuwasawa. Mosaic arrangement of SCPB-, FMRFamide-, and histamine-like immunoreactive sensory hair cells in the statocyst of the gastropod mollusk *Pleurobranchaea japonica*. *Cell Tissue Research*, 300:165-172. 2000.
- Matsushima, O., H. Takahama, Y. Ono, T. Nagahama, F. Morishita, Y. Furukawa, E. Iwakoshi-Ukena, M. Hisada, K. Takuwa-Kuroda, and H. Minakata. A novel GGNG-related neuropeptide from the polychaeta *Perinereis vancaurica*. *Peptides*, 23:1379-1390.
- Kempf, S.C., L.R. Page, and A. Pires. Development of serotonin-like immunoreactivity in the embryos and larvae of nudibranch molluscs with emphasis on the structure and possible function of the apical sensory organ. *J. Comparative Neurology*, 386:507-528. 1997.
- Koss, R., T.J. Diefenbach, S. Kuang, S.A. Doran, and J.I. Goldberg. Coordinated development of identified serotonergic neurons and their target ciliary cells in *Helisoma trivolvis* embryos. *J. Comparative Neurology*, 298:83-96. 2003

Immunohistochemical Analysis of the Nervous System in the Statocyst of the Gastropod Mollusc *Physa acuta* during Larval Development.

Comparison of neural development in the central nervous system and statocyst.

TAKAHAMA, Hideki and ISOZAKI, Sumie

Abstract

Developmental changes in the central nervous system including the statocyst of pond snail *Physa acuta* were examined by means of immunohistochemistry of histamine and serotonin. At the early veliger stage, a pair of the first serotonin-like (SLIR) neurons was recognizable in the cerebral ganglia, and a pair of histamine-like (HLIR) neurons was also detected in another part of the larval body. It was suggested that the latter sites were in the statocysts. Two pairs of HLIR neurons were seen at the late veliger stage. SLIR neurons were two pairs in both the cerebral and pedal ganglia. Thus, the appearance of HLIR neurons at the early larval stages suggests that the sense of equilibrium in statocyst may act.

【Key words】 Gastropod mollusc, *Physa acuta*, Development, Statocyst, Central nervous system, Histamine, Serotonin, Immunohistochemistry