— 原 著 —

ウシガエル小腸筋間神経叢内神経細胞の変態期における形態変化

鳥橋 茂子

日本医科大学第1解剖学教室 (主任: 中村逸雄教授)

Morphological observations on the alteration of the myenteric plexus neurons in the bullfrog small intestine during metamorphosis

Shigeko Torihashi

Department of Anatomy (Chief: Prof. Itsuo Nakamura), Nippon Medical School

Bullfrog tadpoles, *Rana catesbeiana*, ranging from St. 17 (Taylor and Kollros 1946) to St. 25, and froglets 3 months after completion of metamorphosis were used for the study of the myenteric plexus neurons in the small intestine. The enface preparations of the intestinal wall were made along the whole length of the small intestine and impregnated with silver nitrate using the Gros-Bielschowsky method. The neurons were classified into two basic types at the pre-metamorphic stage: the first one was a slender type of cell (Photo 1, 2), and the second was a polygonal cell with radiating dendrites (Photo 3).

The first type was distributed throughout the wall of the oral area to the opening of the pancreatico-duodenal duct ("oral area") and the vicinity of the mesenteric attachment in the anal area to the opening of the pancreatico-duodenal duct ("mesenteric attachment area"). The second type was distributed throughout the wall of the anal area to the opening of the pancreatico-duodenal duct ("anal area").

The first type of cell was transformed into a small unipolar cell at the climax stages of metamorphosis (St. 21-22) and began to appear in the oral area and the mesenteric attachment area at St. 23 and increased in number thereafter. The second type of cell disappeared at St. 21 from the anal area, where the smaller sized polygonal cells began to appear at St. 23 and increase in number thereafter. In this case only a few polygonal cells with radiating dendrites appeared in the anal area. This was the difference between the pre- and post-metamorphic stages in the distribution pattern of neurons.

Key words: myenteric plexus, small intestine, amphibian, metamorphosis

緒 言

両生類の消化管神経叢についてはCajal¹⁾がこれに神経細胞の存在することを報告している。Nemiloff²⁾はその神経細胞を哺乳類の消化管神経叢についてのDogielの分類³⁾に従って三型に分けている。Gunn⁴⁾は主にメチレンブルー法や鍍銀法を用いてそれぞれの神経細胞の形態や分布パターン、線維結合などを詳細に報告している。しかしこれらはみな両生類の成体を材料としたもので、幼生期の神経叢について触れているものは見当たらない。一方無尾両生類においては変態

の過程で腸管が著しく短縮することは周知の事実であり、変態期における消化管の粘膜上皮の入れ替わりについてはKuntz⁵⁾, Bonneville⁶⁾, Hourdryら⁷⁾が記載している。また変態期における中枢神経系についての記載(Hughes⁸⁾, Kollros⁹⁾, Fox¹⁰⁾)や末梢神経系では脊髄神経節についての研究(Kollros)がみられるが、筋間神経叢の態度についての報告は全く見当たらない。本論文では変態期における腸管短縮という現象の中での小腸筋間神経叢の態度を明らかにする目的で、変態前期の幼生から変態完了後のカエルに至るまでの小腸筋間神経叢を鍍銀法によって観察したものであり、変態期に神経細胞が変形しその数が減少し、変態極期後半からは数が増加し神経細胞の形もほぼ旧に復するが、その分布は一部変化したことが明らかになっ

Correspondence to Shigeko Torihashi, Department of Anatomy, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

た。神経細胞の数が増減する機構についても考察した。

実験材料および方法

東京近郊で採集し水温 23℃ で飼育したウシガエル幼生を使用した。研究対象は変態前期 (Stage 17, 19: Taylor and Kollros¹⁴⁾)、変態極期 (Stage 20~24)、変態完了期 (Stage 25)、変態完了後約 3 カ月経過したカエルであるが、Stage 20 になって 2 日目のもの (horny beak は消失しているが口角はまだ広がっていない段階) と 4 日目のもの (尾の退縮は起こっているが口角は Stage 21 のもののほど広がっていない段階) を加え、併せて 11 段階のものの合計 31 個体を材料として用いた。

各個体は針で延髄を破壊した後開腹し、食道から大腸までを取り出して固定液に漬けた。Stage 17, 19, 20 の材料は内容物を入れたまま固定液に漬け、腸間膜付着部に沿って切り開きピペットで固定液を吹き付けながら内容物と吸収上皮層を洗い流した。Stage 20 になって 2 日目、4 日目、Stage 21, 22 の材料は腸管の内腔にその内径に応じた太さのガラス管を挿入して固定液に浸し、組織が硬化してから腸間膜付着部に沿って切り開いてガラス管を外した。さらに Stage 23, 24, 25、変態完了後約 3 カ月のカエルは腸管の内腔に固定液を注入した上で固定液に浸した。いずれも腸管をできるだけ膨らませた状態で固定するように留意した。固定液は次の三種類を用いた。① 0.05 M cacodylate buffer 緩衝 7% paraformaldehyde 液 (pH 6.0)。②、①に 2% の割合で pyridine を加えた液 (pH 8.5)。③、①に 4% の割合で pyridine を加えた液 (pH 8.7)。各固定液をそれぞれの発生段階によって使い分けた。すなわち Stage 17~21 までと変態完了後約 3 カ月のカエルの材料には①の液を用い、Stage 22~24 までの材料には②の液を用い、Stage 25 の材料には③の液を用いた。

固定後の標本作製法は以下のとおりである。

(i) 1 週間以上固定した材料を個体別に 700~800 ml の蒸留水とともに 1 時間 30 分~2 時間振盪しながら約 10 分ごとに蒸留水を交換するという方法で水洗を行った。

(ii) 筋層および漿膜を残して粘膜側をピンセットで取り除いたあと 2~3 日間蒸留水中に保存した。ただし Stage 17, 19, 20 の材料は鍍銀が完了したあとで結合組織層を剝離した。またこの段階の材料は蒸留水中に保存する期間を長くし、しかも小腸の部位により

期間を変える必要があった。肛門端部は 3 日間、口側に移るほど長く置く必要があり口側端部では 6~7 日間保存した。

(iii) 小腸を小片に切り分け、それぞれ小腸内における位置を記録したあと一片ずつ膜片標本として鍍銀操作を行った。鍍銀は Gros-Bielschowsky 法に従い、これに幾つかの点で変更を試みて次のように行った。

(iv) 2% 濃度の硝酸銀水溶液約 20 ml に材料を入れ室温 (19~23℃) で 3~6 分間振盪する。途中 1 回液を交換する。

(v) 20% formalin (pH 6.6~6.8) (2℃) に 5~25 秒間浸す。

(vi) Stage 17, 19, 20 の材料は蒸留水 (2℃) で短時間水洗する。その他の材料は水洗しない。

(vii) アンモニア銀液 (2℃) (40% 水酸化ナトリウム水溶液 5 滴, 10% 硝酸銀水溶液 10 ml, 強アンモニア水 (28% アンモニア含量) 18 滴以下, 蒸留水 10 ml) に材料が色付き始めるまで入れる。ただし Stage 17, 19, 20 の材料の胆膵管開口部から小腸の折れ返り点までの領域を鍍銀する場合には上記アンモニア銀液の処方の中で蒸留水を 20 ml とした。

(viii) 蒸留水 (2℃) で水洗しつつ十分に黒化させる。

(ix) 蒸留水 8 ml にアンモニア水 2 ml を加えた液に室温で 1~2 分間漬けたあと稀酢酸を通して水洗し、鍍銀を完了する。

(x) 鍍銀が完了したあとと蒸留水 10 ml に 1% の塩化金水溶液を 3~5 滴加えた液に 30 分~1 時間浸す。

(xi) 5% のチオ硫酸ナトリウム水溶液を通して水洗する。

(xii) グリセリンジェリーまたは脱水、透徹後パラサムで封入する。

必要に応じて collagenase (ベーリンガー・マンハイム) 1 mg/ml を含む 0.2 M phosphate buffer (pH 6.8) に 38℃ で 12 時間作用させて漿膜を取り除いた。その前処置として Stage 17~21 までの材料は 2 N 塩酸に 30 分間 (室温)、Stage 22 以後の材料は 4 N 塩酸に 38℃ で 75 分間漬した。

結 果

観察したいずれの発生段階においても縦走筋方向に走る多数の神経線維束が互いに吻合して網目を形成していた。神経細胞はこれら神経線維束の近くあるいはいくらか離れたところにそれぞれ孤立して散在し、哺乳類の筋間神経叢で見られるように細胞が集まって神

Photo 1 A slender type of cell with eccentrically situated nucleus found in the oral area at St. 17; bending soma seems to be characteristic in this area
Scale bar : 30 μm , (Silver impregnation, $\times 270$)

経節を形成するようなことはなかった。

腸管が最も長くなっている発生段階は Stage 17 であり、本研究は Stage 17 を出発点とした。Stage 17 における神経細胞は小腸内の分布域によって形態学的にかなり特異性を示していた。その分布域は大別すれば、胆膵管開口部を境としてそれより口側領域と肛門側領域に二分されるが、肛門側領域では腸間膜付着部を中心にした部分にだけ分布する細胞型と小腸壁全周に分布する細胞型とが認められた。以下発生段階に従って胆膵管開口部を境として口側の領域（以下口側部と記す）と肛門側の腸間膜付着部を中心とした領域（以下腸間膜付着部と記す）と肛門側の小腸壁全域（以下肛門側と記す）の 3 領域について所見を述べる。

Stage 17：口側部には核が偏在する細長い細胞 ($40\sim 190\ \mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim 40\ \mu\text{m}$) が存在している (Photo 1) (Fig. 1 A~C)。細胞体の大きさは様々であるが大きい細胞が多い。また細胞体が湾曲しているものが多い。細胞体は核の反対側で徐々に細くなり、軸索突起に移行するが軸索突起はほとんどが肛門側に走り神経線維束に入っている。この細胞は比較的銀に染まりやすく樹状突起は多いもので 16 本認められた。樹状突起は最も長いもので $130\ \mu\text{m}$ 程度たどることができたが、一般に大型の細胞体になるほど樹状突起は長く、数も多くなる傾向を示していた。樹状突起は輪走筋と同じ方向へ向かうものが多い。長い樹状突起には 1~3 回分岐が見られその際は鋭角に枝を出すことが多い。また起始部が太く先細りになっている樹状突起に

Photo 2 A slender type of cell with eccentrically situated nucleus found in the mesenteric attachment area at St. 17
Scale bar : 30 μm , (Silver impregnation, $\times 270$)

混じって幅の広い ($8\ \mu\text{m}$) 樹状突起も見られる。以上のような細胞がこの領域に 767 個認められた。

腸間膜付着部にも前述と同様の細長い ($40\sim 160\ \mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim 25\ \mu\text{m}$) 神経細胞が認められた (Photo 2) (Fig. 1 D~G)。この神経細胞も比較的銀に染まりやすく細胞体は縦走筋の方向に伸びており軸索突起は肛門側に走り近接する神経線維束に入っていくことが多い。口側部の細胞と違って細胞体は湾曲していない。一般に樹状突起の数は細胞体の長さに対応し、大きな

Photo 3 A polygonal cell with radiating dendrites found in the anal area at St. 17
Scale bar : 30 μm , (Silver impregnation, $\times 270$)

細胞では最も多くて 14 本の樹状突起が数えられた。樹状突起は長いもので 120 μm までたどることができたが、一般に先細りで輪走筋あるいは縦走筋方向へ真直に伸びることが多く、分岐の際は直角に枝を出している。腸間膜付着部に局限して存在するこのような神経細胞に対して肛門側の腸壁全体に分布する細胞群がある。

すなわち肛門側では細胞体は多角形 (12~24 μm) $\times$ (25~37 μm) を呈しその中央に核があり、2~5 本の比較的幅広い (最大幅 12 μm) 樹状突起が放射状に出ている細胞が存在する (Photo 3) (Fig. 1 H~J)。その最も長い樹状突起は 150 μm であった。長い樹状突起は 6~7 回、短いものでも 3~4 回の分岐が見られ、その間樹状突起の幅は起始部とあまり変わらないが樹状突起の先端部では末端細糸という形になる。この分岐部には三角形の拡張部が見られることが多い。軸索突起は樹状突起の末端から始まり肛門側の方に走行し神経線維束に入っている場合が多い。腸間膜付着部および肛門側に認められた上記の細胞総数は 1,666 個である。

Stage 19 : 口側部に存在している細胞は Stage 17 の同領域で見られたものと形や数はほとんど変わらない

い (Fig. 2 A, B)。

また腸間膜付着部に存在する細胞も形、数において Stage 17 のものとほとんど変わらない (Fig. 2 C)。

肛門側には核がほぼ中央部に存在する多角形の多極細胞 (12~25 μm) $\times$ (21~37 μm) が存在しているがその細胞体の大きさは Stage 17 とほとんど変わらない。分岐の多い樹状突起が 3~5 本ほぼ放射状に広がっているが、同一細胞の樹状突起の中で長さ、太さや分岐の頻度が他の突起より劣っている突起が見られるようになったことは Stage 17 と異なる点である (Fig. 2 D~F)。腸間膜付着部および肛門側の細胞は合わせて、1,784 個であった。

Stage 20 : 口側部にある核が偏在した細長い細胞 (35~160 μm) $\times$ (10~30 μm) は、細胞体が湾曲するものが多い点で Stage 17 や 19 のものと共通するが、多少小型化している (Fig. 3 A~C)。樹状突起の数は多いもので 16 本を数え Stage 17 や 19 と変わらないが、長さは 100 μm 以下であり、いくらか短くなっている。先細りの樹状突起が多く幅の広い樹状突起は少ない。分岐することも少なくせいぜい長いものに 1~2 回見られるだけである。口側部の細胞数は 689 個であった。

腸間膜付着部に見られる細胞 (35~130 μm) $\times$ (10~22 μm) の形は Stage 19 の同領域の細胞と同様であるが長さ 100 μm を越えるような長い細胞は少なくなっている。しかし樹状突起の数は最も多いもので 14 本あり、Stage 17 や 19 と変わらない。これらは細胞体から輪走筋あるいは縦走筋方向に出ており分岐は少ない (Fig. 3 D~F)。

肛門側に存在する多角形の細胞 (9~20 μm) $\times$ (15~25 μm) は樹状突起が細く短くなる傾向を示し、最も幅広いもので 8 μm 、最も長いもので 100 μm である。分岐回数も減少し多いものでは 5~6 回であるが、中には全く分岐しないものも見られるようになる。そして分岐部にある三角形の拡張部は目立たなくなっている。樹状突起は 3~5 本放射状に出ているが、そのなかに長さ、太さや分岐の頻度が他の突起より劣っているものを含む細胞も多く見られるようになる。これらのなかに銀の染まり方が細胞全体に弱いもの、不均一なもの、逆に全体が濃染しているものが見られるようになったことは Stage 19 と異なる点である (Fig. 3 G~K)。腸間膜付着部と肛門側の細胞は合わせて 1,092 個であった。

Stage 20 になって 2 日目の段階 (Stage 20+2 日) :

口側部に見られる細胞 ($35\sim100\mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim35\mu\text{m}$) はさらに小型化しているが細胞体は湾曲しているものが多い (Fig. 4 A~C). 樹状突起はすべて先細りで細胞体から様々な方向へ出るがその長さは $75\mu\text{m}$ 以下である。また樹状突起の数も多くて 13 本とその数はやや減少している。分岐も少なくなり少数の樹状突起に見られるだけである。口側部の細胞の総数は 571 個であった。

腸間膜付着部にある細長い細胞 ($35\sim100\mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim25\mu\text{m}$) の分布領域はこの発生段階以後腸間膜付着部とさらに胆膵管開口部に接した部位にまで広がり、細胞自体は Stage 20 よりやや小型になる傾向をもつ (Fig. 4 D~F)。輪走筋あるいは縦走筋の方向に樹状突起を出す但那数は多いものでも 7~8 本と減少している。樹状突起は長いものでも $90\mu\text{m}$ で前段階に比べて全体に短くなり、分岐はほとんど見られない。

肛門側にある多極細胞 ($5\sim15\mu\text{m}$) $\times$ ($15\sim30\mu\text{m}$) からは幅 $8\mu\text{m}$ 以下、長さ $25\sim85\mu\text{m}$ の樹状突起が 3~5 本ほぼ放射状に出ている。多いもので 4~5 回の分岐が見られるが、分岐の全く見られないものや 1 回程度のものが多い。また分岐部に三角形の拡張部が全く見られなくなったものもある。同一細胞において放射状に出ている樹状突起は突起ごとに太さ、長さや分岐の回数がまちまちであり、しばしば先細りの樹状突起も見られる。そして銀の染まり方が細胞全体に弱いもの、不均一なもの、逆に全体が濃染しているものが多く見られる (Fig. 4 G~K)。腸間膜付着部と肛門側には合わせて 1,020 個の細胞が存在していた。

Stage 20 になって 4 日目の段階 (Stage 20+4 日) : 口側部に見られる神経細胞 ($35\sim80\mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim30\mu\text{m}$) は前段階に比べてやや小型化している。樹状突起は先細りでその数は多いもので 9 本観察されるが単極細胞も多く存在している。樹状突起は細胞体から様々な方向へ出ており、長いものでも $50\mu\text{m}$ とその長さは Stage 20+2 日に比べて短くなっている。そして分岐はほとんど見られない (Fig. 5 A~D)。

腸間膜付着部に見られる細長い細胞 ($25\sim80\mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim20\mu\text{m}$) の樹状突起の数も減少しており多いもので 4 本を数えた。樹状突起は輪走筋あるいは縦走筋方向に出ているが分岐は見られない。また樹状突起を全く持たない単極細胞も多く存在している (Fig. 5 E~H)。

肛門側には細い線状構造物の一端がやや膨らんでそこから様々な方向へ伸びる短く細い突起を 3~5 本出

し、他の一端は神経線維束へ入っている小形で細胞核の存在を認めることができない構造物が存在していた。そしてこれらには銀による黒化が強いもの、弱いもの、不均一なものが見られた (Fig. 5 I~N)。

Stage 21 : 口側部に見られる細胞 ($20\sim80\mu\text{m}$) $\times$ ($8\sim25\mu\text{m}$) は細長い形を示すが多くは単極細胞であり、それらは細胞体あるいは軸索突起の起始部が湾曲している (Fig. 6 A~E)。樹状突起をもつものも少しは見られる但那数は多いもので 3 本ぐらい、長いものでも $50\mu\text{m}$ であった。細胞の数は 440 個であった。

腸間膜付着部では細長い単極細胞 ($20\sim80\mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim20\mu\text{m}$) が主体となっている (Fig. 6 F~H)。これらは縦走筋方向に真直に伸びているものが多い。1~2 本の樹状突起をもつものもごく少数あるが、その長さは $40\mu\text{m}$ 以下である。

肛門側では Stage 20 になって 4 日目の段階にも観察されたような、線状の構造物の一端が膨らみそこから短くて細い突起を 3~5 本出す構造物がごく少数見られるが、これらは全体に強く黒化しているものが多い (Fig. 6 I, J)。細胞の数は腸間膜付着部と肛門側を合わせて 1,111 個であった。

Stage 22 : 口側部全体に Stage 21 以前にはきわめて少数しか見られなかった銀に濃染する構造物が多数見られた (Fig. 7 A~C)。形は棒状や不正形を示しているがいずれも一端は細くなって近接する神経線維束に合流する。あるものは短い樹状突起様の突起を出していることがあるが大きさは Stage 21 で見られた単極細胞より小さいものが多い。このような構造物は Stage 25 に至るまで存在する。ここでのいう構造物とは小形で細胞核の存在を認めることができないものをいい、本研究では細胞数のなかには算入していない。

口側部ではこのほか胆膵管開口部の近接部で腸間膜付着部にきわめて少数の単極細胞 ($30\sim80\mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim30\mu\text{m}$) が存在した (Fig. 7 D, E)。

腸間膜付着部には口側部と同様銀に濃染する棒状や不正形の構造物 (Fig. 7 F, G) が多数存在し、そのほかには単極細胞がごく少数散在していた (Fig. 7 H~J)。その形、大きさは口側部に存在している単極細胞と同じで、数は 265 個であった。

この段階の肛門側には神経線維束以外の細胞や構造物は観察されなかった。

この Stage 22 の発生段階においては今まで区別して述べてきた口側部、腸間膜付着部に見られる細胞の形態はほとんどが単極細胞という形になり、両分布領

域の特性が失われている。そしてこの Stage 22 以降変態完了後約 3 カ月のカエルに至るまで口側部と腸間膜附着部に存在する細胞の間には特に形のうえでの違いが見られなくなる。さらにこの Stage 22 では正常な細胞と判断しかねるような構造物が多数出現していることも特徴となっている。

Stage 23：口側部では胆膵管開口部近辺だけに神経細胞 ($50\sim100\ \mu\text{m}$) $\times$ ($15\sim30\ \mu\text{m}$) が存在し、その多くは核の偏在する単極細胞である (Fig. 8 A~C)。また中には 1~3 本の樹状突起をもつものもあるがその長さはせいぜい $30\ \mu\text{m}$ 程度で、分岐は見られない。このほか銀に濃染する構造物が小腸の口側端近くに多数存在するがその形は Stage 22 で観察された構造物と同様であった (Fig. 8 D)。口側部に存在していた細胞は 101 個であった。

腸間膜附着部には口側部で見られた細胞と全く同じ形や特徴を示す細胞が存在している (Fig. 8 E~H)。銀に濃染する構造物もなお存在しているが数は減少している (Fig. 8 I)。

一方肛門側には上記の細胞とは別に胆膵管開口部の近くに輪走筋方向に細い紡錘形の単極ないしは双極の細胞 ($35\sim55\ \mu\text{m}$) $\times$ ($5\sim10\ \mu\text{m}$) がきわめて少数見られるようになった (Fig. 8 J, K)。これらは Stage 22 までには全く観察されなかったもので、紡錘形の細胞体の一つの極から出た軸索突起は輪走筋方向へ走行し神経線維束へ入っていく。この細胞は銀の染まり方が前述の細胞に比べて弱い。腸間膜附着部と肛門側の細胞総数は 291 個であった。

Stage 24：口側部全域に観察される核が偏在している細胞 ($50\sim110\ \mu\text{m}$) $\times$ ($15\sim30\ \mu\text{m}$) は Stage 23 の単極細胞に形は似ているがやや大きく、そして数本の樹状突起を有する細胞が多くなる (Fig. 9 A~C)。このような細胞のうち比較的大きい細胞は胆膵管開口部の近くに存在する傾向があった。

腸間膜附着部に分布する細胞は口側部と全く同様の細胞であった (Fig. 9 D~F)。

肛門側では Stage 23 の段階で胆膵管開口部に接して初めて現れた輪走筋の方向に細い紡錘形に加え円錐形の細胞も見られるようになる (Fig. 9 G~J)。いずれも太さを多少増した形 ($40\sim55\ \mu\text{m}$) $\times$ ($5\sim15\ \mu\text{m}$) となり、また小腸の折れ返り点までの領域に広く分布するようになるが、胆膵管開口部に近いほどその密度が大きい傾向があった。さらにこの Stage 24 では胆膵管開口部に接して口側部にもこれらの細胞の分布域が

広がるが、肛門側に比べて数は少ない。そしてこれら紡錘形、円錐形の細胞は銀の染まり方が弱い。

口側部にはこの細胞を含めて 275 個の細胞が存在しており、腸間膜附着部と肛門側の細胞は合わせて 618 個であった。

Stage 25：口側部に存在する銀に濃く染まり核が偏在する細胞 ($60\sim130\ \mu\text{m}$) $\times$ ($15\sim30\ \mu\text{m}$) は Stage 24 のものより大きくなっている。樹状突起を 10~13 本もつ細胞も見られるようになりその長さは長いもので $80\ \mu\text{m}$ に達し、しばしば分岐が観察される (Fig. 10 A~C)。

そして腸間膜附着部にも同様の細胞が存在していた (Fig. 10 D, E)。

肛門側には Stage 24 で観察されたような細い紡錘形または円錐形の細胞 ($35\sim55\ \mu\text{m}$) $\times$ ($10\sim16\ \mu\text{m}$) に加え短い樹状突起を 2~5 本出している小型の多角形の細胞 ($12\sim24\ \mu\text{m}$) $\times$ ($20\sim40\ \mu\text{m}$) が見られるようになるがいずれも銀の染まり方は弱い (Fig. 10 F~J)。これらの分布域は Stage 24 よりさらに広がり肛門側の全域に観察されるようになるが、やはり胆膵管開口部に近い部位ほど数は多くなる傾向を示している。そしてこのような細胞は口側部にも存在しそこの分布域は Stage 24 よりも広がっているが、小腸口側端部では数が少ない。口側部ではこの細胞も含めて 589 個の細胞が存在し、腸間膜附着部と肛門側は合わせて 4,182 個の細胞が見られた。

変態完了後約 3 カ月のカエル (Stage 25+3 カ月)：口側部には銀の染まり方の強い細長い細胞 ($100\sim250\ \mu\text{m}$) $\times$ ($30\sim60\ \mu\text{m}$) が存在している (Fig. 11 A, B)。その多くは核が偏在しているが大きさは Stage 25 の細胞に比べてはるかに大きくなっている。樹状突起は先細りで輪走筋方向へ向かうことが多く長さ $80\ \mu\text{m}$ に達するものもあり、長い樹状突起には分岐が 1~3 回見られる。樹状突起の数は細胞体の大きさにほぼ比例しており中には 20 本持つものも存在している。軸索突起は肛門側へ走り神経線維束へ入ることが多い。

腸間膜附着部にも全く同様の細胞が存在していた (Fig. 11 C)。

一方肛門側には銀の染まり方の弱い小型の細胞が存在しているがその形は多角形 ($16\sim30\ \mu\text{m}$) $\times$ ($25\sim90\ \mu\text{m}$) もしくは輪走筋方向に向く小さな円錐形 ($32\sim60\ \mu\text{m}$) $\times$ ($15\sim20\ \mu\text{m}$) である (Fig. 11 D~I)。細胞体は Stage 25 より大きくなっており、樹状突起の数も増え、また長さも長くなり $70\ \mu\text{m}$ ぐらいの長さの樹状突

起を8本ぐらい持つ細胞も見られる。そのなかには樹状突起が放射状に配列した細胞も少数ながら存在し、その樹状突起は Stage 17 で観察されたものに比べると細く短い、その分岐部にはしばしば三角形の拡張部が見られる (Fig. 11 E, F)。しかしその他多くの細胞はこの段階では Fig. 11 G~I に示されるようなものである。いずれの細胞も軸索突起は輪走筋方向あるいは肛門側へ走り神経線維束に入っていくことが多い。これら小型の細胞は肛門側全域にほぼ均一に分布するが胆膵管開口部に近い部位ほど樹状突起の発達した多角形の細胞の占める割合が円錐形の細胞より多い傾向を示していた。また上述の細胞は口側部にも Stage 25 に比べて多く分布するが小腸の口側端部は少ない。口側部はこれらの細胞を含めて4,801個の細胞が認められ、腸間膜付着部と肛門側は合わせて40,406個の細胞が観察された。

考 察

本研究では筋間神経叢の神経細胞が変態期を通じて形態学的にどのように変化するかを追究したが、神経細胞の検出を鍍銀法で行っている。鍍銀法による神経細胞の検出は一面不安定な面もあるが、また鍍銀法に習熟することによって再現性も生じ相対的な比較も可能になると考えている。しかし鍍銀されて現れる構造物が正に神経細胞であるか否かについての判断は困難な場合がある。その意味ではモノクローナル抗体を使わざるをえないであろう。本研究では Gros-Bielschowsky の鍍銀法を使用した。安定した成績を得るまでには各発生段階や小腸の部位別に水洗時間、浸銀時間、アンモニア銀濃度などを考慮しつつ検討し、原法を多少変更した。

Stage 17 の幼生の小腸から観察を始めたことはこの時期は変態極期直前であり腸管が一番長いということによる。Stage 17 に見られる神経細胞の形態は基本的に二群に大別される。一つは細長い細胞体でその一端に核が偏在し他端から軸索突起が生じている細胞である。樹状突起は細胞体を中心として主にその両側に向かって出ている。他の一つは多角形の細胞体で比較的幅広い軸索突起がほとんど同じ長さで放射状に出ている。前者は口側部と腸間膜付着部に存在し、後者は肛門側に分布する。神経細胞の分類は Dogiel の分類が多く引用されており、Gunn も両生類の筋間神経叢の観察に Dogiel の分類を適用している。Dogiel は細胞体の形、樹状突起や軸索突起の形態とその結合状態を

基準に分類しているが、本研究では線維結合を明らかにすることができなかったこともあるが、例えば肛門側の細胞 (Stage 17) では放射状に出る樹状突起は幅広く、分岐数も多いが決して短くはなかったので形態的にも Dogiel の I 型の条件を満たすことは困難であった。したがってあえて Dogiel の分類に従った分類を行わなかった。

本研究で各発生段階の小腸壁に鍍銀されて現れた構造物は神経線維を除けば6種類のものがあった。すなわち①主に口側部、腸間膜付着部に現われたもので核が偏在した細長い細胞。②変態極期の口側部と腸間膜付着部に主に見られる単極細胞。③棒状、不正形を示し、銀に濃染する構造物。④変態前期の肛門側に見られた多角形の細胞で幅広い樹状突起を放射状に出している細胞。⑤変態極期の肛門側に見られる線状の構造物の一端から放射状に小突起を出す構造物。⑥銀の染まり方が弱い小型の細胞で輪走筋の方向を向く紡錘形、円錐形の細胞。および小型の多角形細胞。そして短く細い樹状突起を放射状に出す小型の細胞を含むものである。これら6種類の構造物は発生段階に応じてその出現状況は異なっているがそれをまとめたものが Fig. 12 である。この Fig. 12 から分かるように口側部の細長い細胞①は Stage 21, 22 には認められなくなるが、その代わりに②の単極細胞が現れている。そしてこの単極細胞は Stage 24 以後はきわめて少なくなる

NEURONS & STRUCTURES	STAGE											
	17	19	20	20	21	22	23	24	25	25		
			+2*	+4*								
slender type neuron (Photo 1, 2)												
unipolar neuron (Fig. 7-D, E, I, J)												
heavily impregnated structures (Fig. 7-A, B, C, F, G)												
neuron with radiating dendrites (Photo 3)												
structures with radiating processes (Fig. 6-I, J)												
small sized neuron (Fig. 8-J, 9-J, 10-J, 11-F)												

Fig. 12 Appearance and disappearance of the silver impregnated neurons and structures in the 3 areas of the small intestine during successive developmental stages investigated

■: oral area, ▨: mesenteric attachment area, ▩: anal area

*days, **months

り、再び①の細長い細胞と、そして Stage 22 からは③の銀に濃染する構造物が現れてくる。これと全く同じ現象が腸間膜付着部でも認められる。また肛門側では④の多角形の細胞が Stage 20+2 日の段階まで認められているが、その後は⑤の線状の構造物の一端から放射状に小突起が出ている構造物が現れ、Stage 23 では⑥の銀の染まり方の弱い小型の細胞が現れている。この細胞はその後数を増すとともに口側部にも見られるようになる。このような変遷を経て Stage 25 あるいは 25+3 カ月のカエルでは Stage 17 で見られたような核が偏在する細長い細胞は口側部と腸間膜付着部に分布するようになる。しかし、肛門側では Stage 17 で見られた放射状に樹状突起を出す形の細胞は少なく、ほとんどの細胞は多角形で Fig. 11 G-I で示されるようなものであり、このような細胞が口側部にも分布するようになる点で Stage 17 と異なっていた。そしてこの変遷が最も著しく起こっている時期は Stage 20 から Stage 23 にかけてである。この時期は粘膜上皮についてもその変化が著しい時期であり、また筋層の酸性フォスファターゼ反応陽性細胞は内輪走筋と外縦走筋との間にあって、Stage 20 では Stage 17 の 2 倍以上に増加し、Stage 21 ではさらに増加しているが Stage 23 では小腸の前半部では減少の傾向を示しつつも後半部では依然として高い値を示しているといわれている(本田¹²⁾)。Fig. 12 の中で Structures という言葉で表現したものは鍍銀標本で見える限り、細胞とは判断できない構造物であり、酸性フォスファターゼ反応陽性細胞の消長と考え合わせるとあるいは変性してしまった細胞の遺残物であるかもしれない。一方明らかに細胞と判断される構造物が発生段階によってそれぞれ突起の数、長さ、分布数や細胞体の大きさなどについて変化を示したことは変性過程や成長過程を示しているのかもしれない。鍍銀標本だけではその決定はできない。神経細胞が変性したあと、それに代わって新たに神経細胞が腸管のなかで成長してくるとすれば、その起源を含めてその過程を明らかにする必要がある。本研究ではそれについての手掛かりは得なかった。

結 論

両生類の変態期における筋間神経叢の変化、特に神経細胞の形態変化を全小腸を膜片標本として Gros-Bielschowsky の鍍銀法によって観察した。観察した材料は Stage 17, 19, 20, 20+2 日, 20+4 日, 21, 22,

23, 24, 25, 25+3 カ月の各発生段階に相当するものであるが、鍍銀結果の再現性を確実にするためには発生段階と小腸の部位に応じて鍍銀法の一部を変更する必要があった。

観察結果から得られた結論は次のとおりである。

1) 両生類小腸の筋間神経叢内神経細胞は神経節という形に集合して存在することはなく、孤立して散在している。

2) 変態前の筋間神経叢の神経細胞は細胞体の形から 2 型に大別され、それぞれ特異的な分布域を示していた。一型は細長い細胞体で核が一端に偏在し、他端は軸索突起に移行する。細い樹状突起は輪走筋の方向に出ている。他の一型は多角形の細胞体で核は中心にあり、幅広い樹状突起が放射状に出ている細胞である。前者は口側部、腸間膜付着部に存在し、後者は肛門側に存在する。

3) 筋間神経叢の神経細胞に最も強い変化が見られるのは Stage 20~23 の間であり、Stage 21, 22 ではほとんどの細胞は単極細胞の形となる。

4) 変態完了後は口側部と腸間膜付着部には変態前と同様核が偏在する細長い細胞が主に分布する。肛門側には小型の多角形をした細胞が多く見られ、その中に変態前に見られたような放射状に樹状突起を出す細胞も存在するがその数は少ない。そしてこれら小型の細胞は口側部にも分布する。

文 献

- 1) Cajal, R.Y.: Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Tome II. 1911.
- 2) Nemiloff, A.: Zur Frage der Nerven des Darmcanals bei den Amphibien. Travaux de la Societe Imperiale des Naturaliste de Petrograd (Petersbourg.), 32, 59~88, 1902.
- 3) Dogiel, A.S.: Ueber den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugethiere. Arch. Anat. Physiol., Physiol. Abt., 5, 130~158, 1899.
- 4) Gunn, M.: A study of the enteric plexuses in some amphibians. Quart. J. Micr. Sci., 92, 55~77, 1951.
- 5) Kuntz, A.: Anatomical and physiological changes in the digestive system during metamorphosis in *Rana pipiens* and *Amblystoma tigrinum*. J. Morphol., 38, 581~598, 1924.
- 6) Bonneville, M.A.: Fine structural changes in the intestinal epithelium of the bullfrog during metamorphosis. J. Cell Biol., 18, 579~597, 1963.
- 7) Hourdry, J. and Dauca, M.: Cytological and cytochemical changes in the intestinal epithelium during anuran metamorphosis. Int. Rev. Cytol. Suppl., 5, 337~385, 1977.
- 8) Hughes, A.: Metamorphic changes in the brain and spinal cord. "Frog Neurobiology" (Llinás, R. and Precht,

- W. eds.), p. 856~863, Springer-Verlag, Berlin, 1976.
- 9) Kollros, J.J.: Transitions in the nervous system during amphibian metamorphosis. "Metamorphosis" (Gilbert, L. I. and Frieden, E. eds.), 2nd ed., p. 445~459, Plenum, New York, 1981.
- 10) Fox, H.: The central nervous system; Organic origin, development and change in anuran larvae to the completion of metamorphosis. "Amphibian Morphogenesis", p. 81~91, Humana Press, Clifton, NJ., 1983.
- 11) Taylor, A.C. and Kollros, J.J.: Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. Anat. Rec., 94, 7~23, 5 pl., 1946.
- 12) 本田伊克: ウンガエル幼生の変態期における腸管の組織化学的研究; 特に酸性フォスファターゼ反応陽性細胞の動態について, 日医大誌, 48, 612~622, 1981.

Legends

Plate 1-4 Figures show the cameralucida drawings of the silver impregnated neurons and "structures" found in the myenteric plexus of the small intestine at the successive developmental stages. "structures" means what is not identified as a neuron. Scale bar: 100 μ m.

Plate 1

Fig. 1 Neurons (St. 17). (A-C) found in the oral area, (D-G) in the mesenteric attachment area and (H-J) in the anal area.

Fig. 2 Neurons (St. 19). (A, B) found in the oral area, (C) in the mesenteric attachment area and (D-F) in the anal area.

Plate 2

Fig. 3 Neurons (St. 20). (A-C) found in the oral area, (D-F) in the mesenteric attachment area and (G-K) in the anal area.

Fig. 4 Neurons (St. 20+2 days). (A-C) found in the oral area, (D-F) in the mesenteric attachment area and (G-K) in the anal area.

Fig. 5 Neurons and structures (St. 20+4 days). Neurons (A-D) found in the oral area, neurons (E-H) in the mesenteric attachment area and structures (I-N) in the anal area.

Plate 3

Fig. 6 Neurons and structures (St. 21). Neurons (A-E) found in the oral area, neurons (F-H) in the mesenteric attachment area and structures (I, J) in the anal area.

Fig. 7 Neurons and structures (St. 22). Structures (A-C) and neurons (D, E) found in the oral area, structures (F, G) and neurons (H-J) in the mesenteric attachment area.

Fig. 8 Neurons and structures (St. 23). Neurons (A-C) and structure (D) found in the oral area, neurons (E-H) and structure (I) in the mesenteric attachment area and neurons (J, K) in the anal area.

Fig. 9 Neurons (St. 24). (A-C) found in the oral area, (D-F) in the mesenteric attachment area and (G-J) in the anal area.

Plate 4

Fig. 10 Neurons (St. 25). (A-C) found in the oral area, (D, E) in the mesenteric attachment area and (F-J) in the anal area.

Fig. 11 Neurons (St. 25+3 months). (A, B) found in the oral area, (C) in the mesenteric attachment area and (D-I) in the anal area.

(受付: 1987年12月25日)

Plate (1)

Fig. 1 Neurons, at St. 17

Fig. 2 Neurons, at St. 19

Plate (2)

Fig. 3 Neurons, at St. 20

Fig. 4 Neurons, at St. 20+2 days

Fig. 5 Neurons and structures, at St. 25+4 days

Plate (3)

Fig. 6 Neurons and structures, at St. 21

Fig. 7 Neurons and structures, at St. 22

Fig. 8 Neurons and structures, at St. 23

Fig. 9 Neurons, at St. 24

Plate (4)

Fig. 10 Neurons, at St. 25

Fig. 11 Neurons, at St. 25+3 months