

ベンケイガニにおける視神経束切断の脱皮抑制効果

川崎医科大学 生物学教室

泰山浩司・佐藤国康・松本邦夫

(昭和57年9月11日受理)

Inhibition of the Leg Regeneration and Molting by Cutting
the Optic Tracts in a Brackish Water Crab,
Sesarmops intermedium

Kouji YASUYAMA, Kuniyasu SATOH and Kunio MATSUMOTO

*Department of Biology, Kawasaki Medical School
Kurashiki 701-01, Japan*

(Received on Sept. 11. 1982)

概 要

カニの脱皮誘発には、自切による多脚の除去が有効な刺激である。本実験ではベンケイガニを材料として、脱皮誘発刺激である多脚（5または10脚）除去の前あるいは後に視神経束を切断し、視神経束の切断が多脚除去後形成された再生芽の成長および脱皮に及ぼす影響を調べた。

多脚除去に先だち、両側の視神経束を切断したカニでは、多脚除去後再生芽は R 値が9から13までは成長するが、その後の成長は停止し脱皮はみられなかった。多脚除去したカニで、再生芽の R 値が低い時期 ($R=10-15$) に両側の視神経束を切断すると、切断後再生芽の成長は止まり脱皮はみられなかった。しかし多脚除去後、再生芽の成長が進んだ時期 ($R=25-27$) に視神経束を切断すると、切断後も再生芽は成長しやがてカニは脱皮した。これらの結果から、多脚除去に先行した両側の視神経束の切断は、多脚除去による脱皮誘発効果を打ち消すこと、また多脚除去後再生芽が短い時期 ($R=10-15$) での視神経束切断は、再生芽の成長を停止し多脚除去による脱皮誘発の効果を打ち消すが、再生芽の成長が進んだ時期 ($R \geq 25$) での切断は、脱皮誘発の効果を打ち消しえないことが明らかとなった。

Abstract

In many species of crabs, multiple autotomy of the legs induces leg regeneration and molting. The effects of cutting the optic tracts on the growth of regenerated limb buds and on molting were examined in a brackish water crab, *Sesarmops intermedium*.

In animals in which the optic tracts were cut previous to inducing multiple autotomy of the legs, the growth ceased in the regenerating limb buds when they had grown to an R value of 9-13, and the cutting completely inhibited molting. In animals in which molting was triggered by leg removal, cutting the optic tracts at various stages of regeneration produced various results. Cutting at $R=10-15$ in the stage of regeneration caused interruption of the growth in the regenerating buds and complete

inhibition of molting. Cutting at $R \geq 15$ or 20 interrupted both growth and molting in some cases, but in other cases neither growth nor molting was interrupted. Cutting the optic tracts at $R \geq 25$ did not cause interruption of growth or molting in any case. These results indicate that the multiple removal of legs does not induce molting in crabs with previously cut optic tracts, and that cutting the optic tracts before a critical point in regeneration inhibits both the growth of regenerated limb buds and molting, but after this critical point, cutting the optic tracts does not affect either the growth of regenerated limb buds or molting.

緒 言

多種の甲殻類において、多脚の自切除去は次の脱皮の到来をはやめることが知られており、現在では多くの研究室で、多脚の自切除去が脱皮誘発の刺激として用いられている^{1)~6)}。

しかしながら、多脚の除去によりどのようにして脱皮間期の成体に脱皮が誘発されるのか、その機構については不明な点が多い。Skinner と Graham²⁾は、自切の際脚神経が切断されることが脱皮の誘発に有効な刺激となると示唆し、また Stoffel と Hubschman³⁾は、多脚が自切によって除去されることが、神経の活動電位を介してX器官の神経分泌細胞を刺激し、脱皮抑制ホルモンの生産、分泌を抑制すると考察している。また一方では、脱皮ホルモンを分泌すると考えられているY器官が、脚神経の切断が刺激となって活性化され脱皮がおこるのであろう、とも推論されている⁷⁾。

多脚の自切による脚神経の切断刺激が、中枢神経系を介してX器官—サイナス腺系を抑制しているとするならば、食道上神経節と眼柄内の視葉を連絡している視神経束が、その脱皮抑制系を制御する経路として重要な役割をはたしていると考えられる。Andrew ら⁸⁾は、電気生理学的方法を用いてザリガニ *Orconectes virilis* において、食道上神経節とサイナス腺を連絡し、神経分泌顆粒をもたない神経繊維が存在することを明らかにした。そしてこの神経繊維の電気的な活動によって、サイナス腺からの神経分泌が制御されている可能性を示唆した。

著者らは、多脚の自切除去が脱皮誘発の刺激となる機構を知る手がかりを得るために、食道上神経節と視葉を連絡する視神経束に着目し、ベンケイガニを用いて、脱皮誘発刺激である多脚の自切除去を行なう前、あるいは後に左右の視神経束を切断し、視神経束の切断が多脚の除去後自切面に形成される再生芽の成長、および脱皮に及ぼす影響について観察した。

材料と方法

材料には1981年9月、1982年3月に岡山市洲崎の旭川河口で採集した汽水産のベンケイガニ *Sesarmops intermedium* (de Haan, 1835) を用いた。

実験では、カニの脱皮に関する生理的狀態を一定化するため、採集後研究室内で多脚自切除去により一度脱皮させた脱皮後10日目のカニ、また2脚除去後長期間飼育したカニを実験個体として用いた。

実験個体は、底に砂を敷き5倍稀釈海水を浅く入れた小容器(約10×10×10cm)に1個体ず

つ入れ、市販の淡水魚用餌“ミニペット”を1個体当たり1日に7粒ずつ与えて飼育した。水温はサーモスタット付ヒーターで加温することにより約28°Cに保った。

1. 脱皮誘発

自切により多脚（5脚または10脚）を除去することにより脱皮を誘発した。脚の除去はピンセットで長節を傷つけ自切させることにより行なった。10脚除去はカニの10脚すべてを、また5脚除去は左右いずれか片側の5脚を自切させ除去した。

脚除去後自切面に形成された再生芽のうち、第3脚の再生芽の長さ（自切面から先端までの長さ）を、1週間ごとに目盛りの付いた拡大鏡で計測し、再生芽の大きさはR値：（再生芽の長さ/最大甲幅） $\times 100^{\circ}$ で表示した。

2. 視神経束の切断

左右の第一触角を基部から除去し、その部位から先端の細いハサミを挿入し両側の視神経束を切断した。また第一触角は除去するが視神経束は切断しない個体を、偽手術を行なった対照群とした。切断の成否は、実験期間（脚除去から60日間）終了後、実験個体を解剖し確認した。

視神経束の切断は表1に示す5実験群で行なった。実験群Iでは、視神経束切断後7日目に10脚あるいは5脚を自切除去した。実験群II, III, IVでは10脚あるいは5脚除去後、再生芽のR値が10から15（実験群II）、15以上（実験群III）、20以上（実験群IV）に達した時期に、視神経束の切断を行なった。実験群Vでは、左右の第3脚を自切除去し、再生芽の成長が100日以上停止した状態、すなわち基再生（basal growth）⁹⁾完了後再生芽の成長が停止した状態にあるカニで、さらに4脚（左右いずれかの第1, 2, 4, 5脚）の除去を行なった。4脚除去後、成長を始めた第3脚の再生芽のR値が25以上、かつ脚除去後新たに形成された第4脚の再生芽のR値が20以上に達した時期に視神経束の切断を行なった。

結 果

実験群 I

視神経束切断後7日目に、脱皮誘発刺激である多脚（5脚あるいは10脚）除去を行なった。

視神経束切断後10脚除去した8個体のうち、6個体では再生芽はR値が9から11までは成長し、その後の成長は停止し実験期間内に脱皮はみられなかった。残り2個体は、視神経束切断後1ないし2日で死亡した（表1、図1）。

また、視神経束切断後5脚除去したカニ4個体のうち、3個体（他の1個体は切断後1日で死亡）では、再生芽の成長はR値が12から13まではみられるが、その後の成長は停止し実験期間内に脱皮はみられなかった（表1、図1）。

一方、視神経束切断は行なわず、10脚または5脚除去のみ行なった対照群ではすべての個体が脱皮した。10脚除去群（4個体）では脚除去後28—35日（中央値30日）、5脚除去群では2個体とも27日で脱皮した（表1、図1）。

Table 1 Effects of cutting the optic tracts on molting in crabs lost multiple legs by autotomy

| Group | Treatment | | No. of animals | Carapace width (mm) | No. of molted animals | Days before molt |
|-------|------------|--------------------|-----------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| | 1 | 2 | | | | |
| I | 10 L. A.*1 | — | — | 23.0±0.4 | 4 | 28, 29, 32, 35 |
| | 5 L. A. | — | — | 22.5 | 2 | 27, 27 |
| | OTcut*2 | 10 L. A. | — | 23.0±0.3 | 0 | — |
| | OTcut | 5 L. A. | — | 22.3±0.2 | 0 | — |
| II | 10 L. A. | S. O. *3 (R=10~15) | — | 23.0±0.3 | 5 | 28, 29, 29, 30, 30 |
| | 10 L. A. | OTcut (R=10~15) | — | 23.0±0.3 | 0 | — |
| III | 5 L. A. | S. O. (R=15~17) | — | 22.9±0.3 | 4 | 28, 29, 36, 36 |
| | 5 L. A. | OTcut (R=15~17) | — | 22.9±0.3 | 1 | 41 |
| | 5 L. A. | S. O. (R=20~23) | — | 21.2±0.5 | 5 | 28, 29, 30, 36, 37 |
| IV | 5 L. A. | OTcut (R=20~23) | — | 21.3±0.2 | 3 | 36, 39, 40 |
| | 2 L. A. | 4 L. A. | OTcut (R=25~27) | 24.4±0.2 | 6 | 23, 24, 31, 31, 47, 49 |

*1L. A.=leg autotomized, *2OTcut=Cut of the optic tracts, *3S. O.=Sham operation : Removal of first antennae,

*4R=(length of limb bud/carapace width)×100

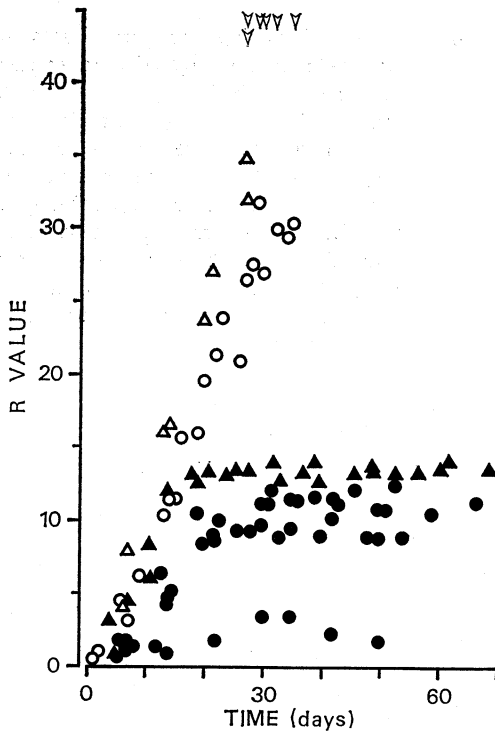


Fig. 1 Effect of cutting the optic tracts previous to inducing multiple autotomy of the legs on the growth of regenerated limb buds and on molting. In the experimental animals the optic tracts were cut on the seventh day before multiple autotomy. Control and experimental animals were caused to autotomize five or ten legs on the day indicated by 0. Control animals caused to autotomize ten legs (○); Experimental animals caused to autotomize ten legs (●); Control animals caused to autotomize five legs (△); Experimental animals caused to autotomize five legs (▲). The open arrow heads indicate the time of molting in each control animal.

これらの結果から、あらかじめ左右の視神経束を切断した後多脚除去を行なうと、再生芽の基再生はみられるが、その後の再生芽の成長は停止し脱皮はおこらない、すなわち視神経束が切断されたカニでは、多脚の自切除去は脱皮誘発に有効な刺激とはなりえないことが明らかとなった。

実験群 II

10脚除去後形成された再生芽の R 値が10から15 (平均11.9) に達したカニ12個体で、左右の視神経束の切断を行なった。このうち3個体は視神経束切断後6日以内に死亡したが、残り9個体では再生芽の R 値は切断時の値のままで、再生芽の成長は停止し実験期間中脱皮する個体はみられなかった (表1, 図2)。

他方、10脚除去後再生芽の R 値が10から15 (平均11.2) に達した時期に、両側の第1触角を除去 (偽手術) した対照群5個体は、脚除去後28—30日 (中央値29日) で脱皮した。この対照群における10脚除去から脱皮までに要した日数は、実験群 I で対照とした、第1触角をもった10脚除去群のものとはほぼ同期間であった (表1)。したがって、視神経束切断のために第1触角を除去することは、多脚除去による脱皮に影響を与えないと考えられる。

実験群 III

5脚の自切除去後、再生芽の R 値が15以上 (15—17, 平均15.4) に達したカニで左右の視神経束切断を行なった。この実験群では死亡率が高く、10実験個体のうち6個体は、視神経束切断後それぞれ1, 5, 17, 25, 30, 42日で死亡した。しかし、残り4個体のうち1個体は、視神

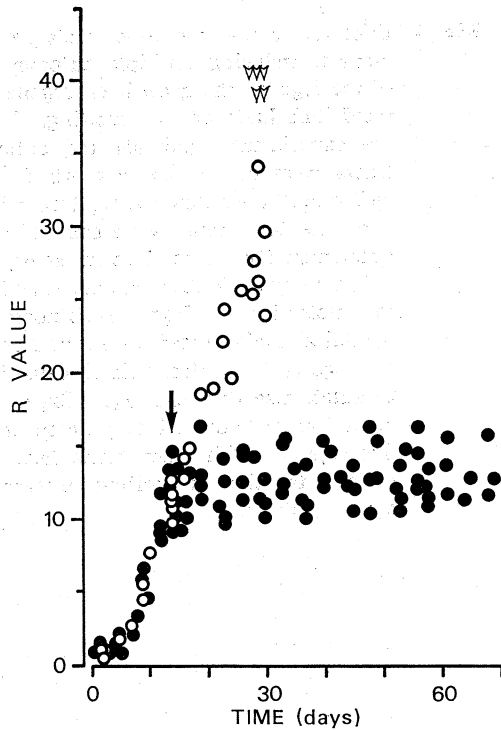


Fig. 2 Effect of cutting the optic tracts at $R=10-15$ in the stage of regeneration on the growth of regenerated limb buds and on molting. Animals were caused to autotomize ten legs, on the day indicated by 0. The time of cutting or sham operation (see Table 1) is indicated by an arrow. Sham operated animals (\circ); Experimental animals (\bullet). The open arrow heads indicate the time of molting in each sham operated animal.

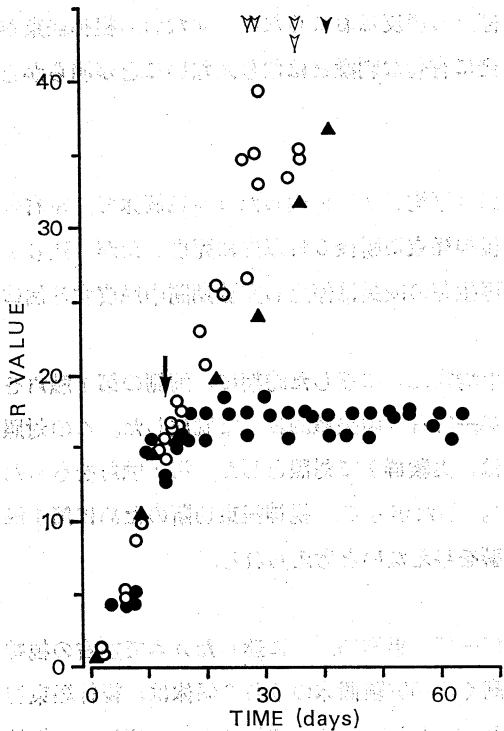


Fig. 3 Effect of cutting the optic tracts at $R=15-17$ in the stage of regeneration on the growth of regenerated limb buds and on molting. Animals were caused to autotomize five legs on the day indicated by 0. An arrow indicates the time of cutting or sham operation (see Table 1). Sham operated animals (\circ); Experimental animals (\bullet , \blacktriangle). The open arrow heads indicate the time of molting in the sham operated animals. Cutting did not affect the growth of regenerated limb buds in one experimental animal (\blacktriangle), and the animal molted on the time indicated by a solid arrow head.

経束切断後も再生芽は成長し、5脚除去後41日で脱皮した。また3個体では、切断後再生芽の成長は停止 ($R=15-18$) し、実験期間内には脱皮しなかった。一方、再生芽のR値が15以上 ($15-17$, 平均16.2) に達した時期に偽手術を行なった対照群4個体は、すべて脱皮し脚除去から脱皮までに要した日数は28-36日 (中央値29日) であった (表1, 図3)。

実験群IV

5脚の自切除去後、再生芽のR値が20以上 ($20-23$, 平均22.3) に達したカニで左右の視神経束切断を行なった。9個体中3個体は、視神経束切断後3日以内に死亡したが、実験期間中生存した6個体のうち3個体は、視神経束切断後も再生芽は成長し、5脚除去後36-40日 (中央値39日) で脱皮した (表1, 図4)。また、脱皮のみられなかった3個体では、視神経束切断後再生芽の成長は停止し、実験期間中再生芽のR値は21-24のままであった (図4)。対照群として第1触角除去のみ (偽手術) を行なった5個体 ($R=20-23$, 平均21.3) は、実験期間内にすべて脱皮し脚除去から脱皮までに要した日数は28-37日 (中央値30日) であった (表1, 図4)。

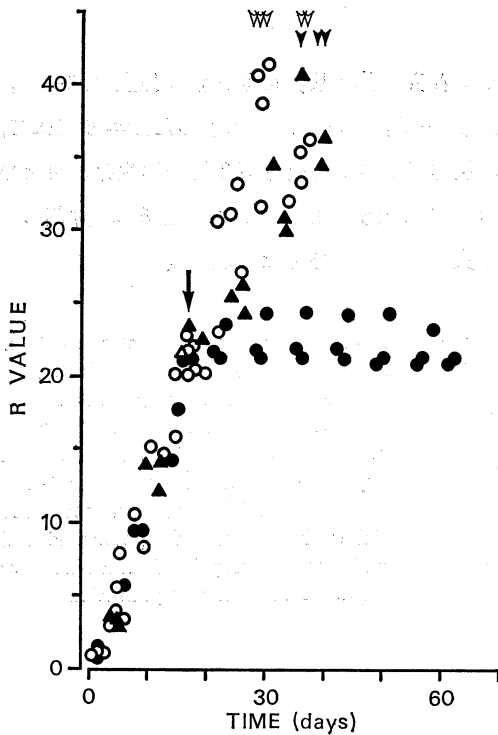


Fig. 4 Effect of cutting the optic tracts at $R=20-23$ in the stage of regeneration on the growth of regenerated limb buds and on molting. Animals were caused to autotomize five legs on the day indicated by 0. An arrow indicates the time of cutting or sham operation (see Table 1). Sham operated animals (○); Experimental animals (●, ▲). The open or solid arrow heads indicate the time of molting in the sham operated or experimental animals, respectively. In three experimental animals (▲), cutting did not affect either the growth of regenerated limb buds or molting.

実験群V

2脚 (左右の第3脚) の自切除去後、再生芽の成長が停止 ($R=11-13$) し、110日たっても脱皮のみられないカニで、さらに片側の4脚 (第1, 2, 4, 5脚) を自切除去すると、新たに形成された再生芽の急速な成長とともに、成長の停止していた第3脚の再生芽の再成長が開始することが観察された (図5)。

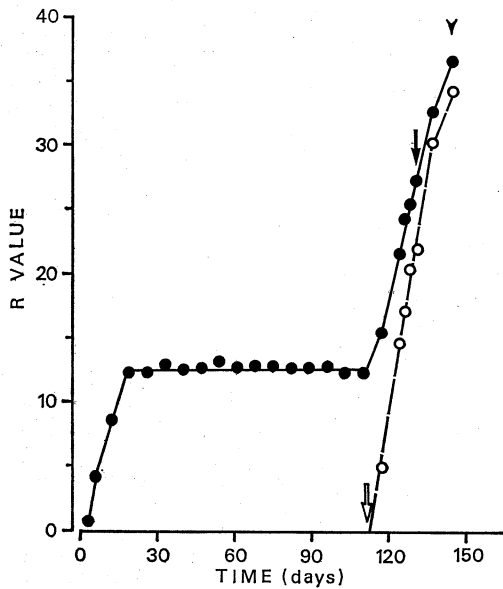


Fig. 5 Effect of cutting the optic tracts at R=25-27 in the stage of regeneration on the growth of regenerated limb buds and on molting. A typical instance is shown. The animal was primarily caused to autotomize two legs on the day indicated by 0, and secondly caused to autotomize four legs on the day indicated by the first arrow. The optic tracts were cut when the primary regenerated limb buds grew to an R value of 25-27 and secondary regenerated limb buds grew to R=20-22. The time of cutting is indicated by the second arrow. A solid arrow head indicates the time of molting. Primary regenerated limb buds (●); Secondary regenerated limb buds (○). Cutting did not interrupt the growth in either primary or secondary regenerated limb buds.

本実験では、4脚除去により新たに形成させた再生芽（第4脚）のR値が20以上（20-22, 平均21.6）、かつ第3脚の再生芽のR値が25以上（25-27, 平均26.2）に達したカニ6個体で、視神経束の切断を行なった。図5に示すように、視神経束の切断後も第3脚の再生芽、および第4脚の再生芽は成長を続け、やがて実験個体すべてに脱皮が観察された（図6）。片側の4脚除去から脱皮までに要した日数は23-49日（中央値31日）であった（表1）。

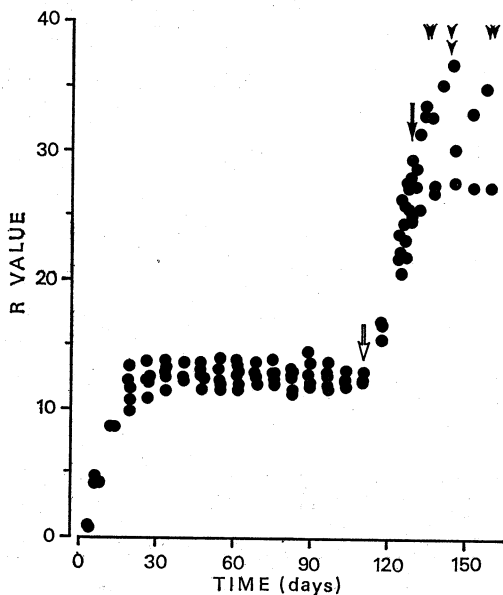


Fig. 6 Effect of cutting the optic tracts at R=25-27 in the stage of regeneration on the growth of regenerated limb buds and on molting. R values of primary regenerated limb buds in six experimental animals are indicated by solid circles. Cutting did not affect either the growth of regenerated limb buds or molting in all animals. See Figure 5 for other explanation.

考 察

多脚除去に先行して視神経束を切断したベンケイガニでは、多脚（5または10脚）の自切除後形成される再生芽はR値が9から13で成長が停止し、多脚除去後60日を経過しても脱皮は観察されなかった（図1）。また、多脚除去後再生芽がまだ短い時期（ $R=10-15$ ）に視神経束の切断を行なっても、視神経束切断後には再生芽の成長は停止し、脱皮する個体はみられなかった（図2）。そしてR値が15—23に達した時期での視神経束の切断では、再生芽の成長が停止する個体と、再生芽は成長を続け脱皮する個体とが見られた（図3, 4）。また再生芽のR値が25をこえた時期での視神経束切断個体では、切断後も再生芽は成長を続け、すべての実験個体で脱皮が観察された（図6）。

これらのことから、多脚除去に先行して視神経束を切断すると、多脚の自切除は脱皮誘発に有効な刺激とはなりえないこと、そして、多脚除去後再生芽が短い時期での視神経束切断は、多脚除去の脱皮誘発効果を打ち消すこと、さらに、再生芽の成長がかなり進んだ時期での視神経束切断は、多脚除去による脱皮誘発効果を打ち消しえないことが明らかとなった。

Holland と Skinner¹⁰⁾ は *Gecarcinus lateralis* で、多脚の自切除による脱皮誘発後、ある時期より以前（ $R=10-17$ ）に再生芽を1つでも自切除去すると、新たに形成された再生芽の基再生が完了するまでは、残りの再生芽の成長は一時的に停止すること、またある時期以後（ $R \geq 20$ ）では、再生芽を自切させても残りの再生芽の成長は停止することなく、やがてカニは脱皮することから、この時期を‘critical point’と呼んだ。ベンケイガニにおける視神経束切断の効果も、多脚自切除による脱皮誘発後の時期により異なること、すなわち再生芽が短い時期（ $R=10-15$ ）では再生芽の成長は停止し、ある程度再生芽の成長が進んだ時期（ $R \geq 25$ ）では、再生芽は成長を続けやがて脱皮がみられることから、Holland と Skinner¹⁰⁾ が報告したように、ベンケイガニにも再生芽の再生過程に‘critical point’が存在し、それはR値が15—23であると考えられる（図3, 図4）。

再生芽の基再生完了以前での視神経束切断は、再生芽の成長を停止させるが、基再生完了後の視神経束切断は再生芽の成長を停止させないことから、視神経束は、カニが再生芽の基再生完了後脱皮前期へ移行する時期に、X器官—サイナス腺系を抑制するなんらかの刺激を中枢神経から視葉に伝達すると考えられる。McCarthy と Skinner¹¹⁾ は多脚除去によって脱皮を誘発した *Gecarcinus lateralis* で、体液中のエクジソン濃度が再生芽の基再生が完了するまでは低く維持され、基再生完了後はエクジソン濃度が上昇することを明らかにした。そして、基再生を完了した再生芽内での神経支配の再構成完了がこのような変化を引き起こす刺激となる可能性を示唆した。*Gecarcinus lateralis* でエクジソン濃度の変化を引き起こす刺激¹¹⁾と、本実験の結果から推察されるX器官—サイナス腺系を抑制する刺激とが同じものであるかどうかは明らかにされなかったが、再生芽の基再生完了後カニが脱皮前期へ移行する時期には、なんらかの刺激がX器官—サイナス腺系に伝えられるものと考えられる。

また、あらかじめ視神経束の切断をしたベンケイガニでは、多脚の自切除後形成された再

生芽の成長はR値が9-13で停止すること、すなわち基再生以降の成長がおこらないことから、基再生完了後さらに再生芽の成長を引き起こすような、なんらかの刺激が基再生完了後視神経束を介して眼柄へ伝えられていることが推察される。

多脚の自切によって脱皮誘発されたベンケイガニでは、再生芽の基再生完了後、視神経束を介して脱皮抑制系であるX器官-サイナス腺系の抑制がおこると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Skinner, D. M. and D. E. Graham (1970) Molting in land crabs: Stimulation by leg removal. *Science*, **169**: 383-385.
- 2) Skinner, D. M. and D. E. Graham (1972) Loss of limbs as a stimulus to ecdysis in *Brachyura* (true crabs). *Biol. Bull.*, **143**: 222-233.
- 3) Passano, L. M. and S. Jyssum (1963) The role of the Y-organ in crab proecdysis and limb regeneration. *Comp. Biochem. Physiol.*, **9**: 195-213.
- 4) Suzuki, S. (1980) The effects of leg-removal to the molting of the crabs, *Sesarma (Holo-metopus) haematocheir* (H. Milne Edwards). *Reser. on Crustacea*, No. 10: 61-68.
- 5) Stoffel, L. A. and J. H. Hubschman (1974) Limb loss and the molt cycle in the freshwater shrimp, *Palaemonetes kadiakensis*. *Biol. Bull.*, **147**: 203-212.
- 6) 佐藤国康・松本邦夫(1981) ベンケイガニの多脚自切による脱皮誘発, 川崎医学会誌一般教養編(7): 79-88.
- 7) Passano, L. M. (1960) Molting and its control. Pages 473-536 in T. H. Waterman, Ed., *The physiology of Crustacea*. Academic Press, New York and London.
- 8) Andrew, R. D., I. Orchard, and A. S. M. Saleuddin (1978) Structural re-evaluation of the neurosecretory system in the crayfish eyestalk. *Cell. Tiss. Res.*, **190**: 235-246.
- 9) Bliss, D. E. (1960) Autotomy and regeneration. Pages 561-589 in T. H. Waterman, Ed., *The physiology of Crustacea*. Academic Press, New York and London.
- 10) Holland, C. A. and D. M. Skinner (1976) Interactions between molting and regeneration in the land crab. *Biol. Bull.*, **150**: 222-240.
- 11) McCarthy, J. F. and D. M. Skinner (1977) Interruption of proecdysis by autotomy of partially regenerated limbs in the land crabs, *Gecarcinus lateralis*. *Develop. Biol.*, **61**: 299-310.