

■原 著■ 2005 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

## アルビノ・アフリカツメガエル胚に対する微量注射技術を用いた 半透明な脳室形態並びに脳室内液流の可視化

松谷武嗣<sup>1</sup> 茂木和枝<sup>2</sup> 日野晶也<sup>1</sup> 小笠原強<sup>1,3</sup> 竹内重夫<sup>1</sup> 豊泉龍児<sup>1,4</sup>

### Visualization of the Semitranslucent Brain Ventricle and Its Fluid Flow Using Microinjection Technique for Albino *Xenopus laevis* Larvae

Takeshi Matsuya<sup>1</sup>, Kazue Mogi<sup>2</sup>, Akiya Hino<sup>1</sup>, Tsuyoshi Ogasawara<sup>1,3</sup>,  
Shigeo Takeuchi<sup>1</sup> and Ryuji Toyoizumi<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Faculty of Science,

<sup>2</sup> Research Institute for Integrated Sciences, and

<sup>3</sup> High-tech Research Center, Faculty of Science, Kanagawa University, Tsuchiya 2946, Hiratsuka,  
Kanagawa, 259-1293, Japan

<sup>4</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: toyo-bio@kanagawa-u.ac.jp

**Abstract:** In vertebrates, the central nervous system (CNS) develops as a tube called the neural tube. Ependymal cells seal the inner surface of the brain ventricle, and movement of the cilia on the apical surface of the ependymal cells generates fluid flow called cerebrospinal fluid flow. The role of cerebrospinal fluid flow for the process of neurogenesis and regionalization of the CNS remains unveiled. In this study, using albino larvae of *Xenopus laevis*, we report a new methodology to clearly visualize the semitranslucent morphology of the brain ventricle and patterning of the fluid flow within the cavity during amphibian CNS development. Microinjection of the quantum dot (fluorescent nanocrystal) through the roof plate of the fourth ventricle rapidly and efficiently visualized the whole brain ventricle under fluorescent micrography, enabling us to trace the complicated morphology during development of the third, fourth and lateral ventricles. Microinjection of polystyrene beads (3.1µm in diameter) into the fourth ventricle also efficiently dispersed into every corner of the brain ventricle. This technique revealed that fluid flow within fourth ventricle displays dorso-ventral asymmetry. In 60% of the embryos examined, the rearward fluid flow within the third ventricle shifted to the left at the dorsal portion of the ventricle, whereas, in the other larvae, it was quite bilateral. These results suggest that fluid flow within the developing CNS is generated by a highly integrated, position-dependent metachronal wave of cilia on ependymal cell surfaces. This report is the first description of left-right asymmetric fluid flow in the brain ventricle of vertebrates, encouraging us to examine the relationships between the laterality of tadpole behavior and left-right asymmetry underlying the molecular anatomy of the developing brain.

**Keywords:** albino, cerebrospinal fluid flow, nanocrystal, polystyrene beads, left-right asymmetry

## 序論

脊椎動物の脳の中心部には脳室と呼ばれる腔所があり、脳室は発生初期の脳の形態形成時に出現する。脳室は脳の正常な発生のために必要な構造であり、その形状は発生に伴う脳の部域化と共に変化する。脳室内部は

脈絡叢から分泌される脳脊髄液で満たされており、脳室の内表面は上皮性の上衣細胞(ependymal cell)で覆われている<sup>1,2,3)</sup>。上衣細胞の表面には繊毛が生えており、その繊毛の運動によって脳脊髄液が一定の速度で

流動することが、ヒト成人の脳室内液流を MRI などの手法で調べた低解像度の研究から指摘されている<sup>4,7)</sup>。しかしながら、胎児期/発生初期の脳室内液流が担っている機能に関する研究は極めて少ない<sup>8)</sup>。脳室内の液流は、どの発生段階から生じ始め、発生の進行に伴ってどのように変化していくのか、また特定の発生段階において脳室内液流は一定の流動パターンを示すのか、即ち発生プログラムの制御下にあるのかという問題については、哺乳類胚を含め、脊椎動物胚全般を見渡しても殆ど知見がない<sup>9)</sup>。脊椎動物の神経発生における脳室内液流の役割に関する研究が進んでいない理由のひとつとして、脳室内液流研究の適切な実験モデルが確立していないことが挙げられる。このような背景を踏まえ、我々は、比較的容易に入手可能な両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のアルビノ幼生の脳領域は比較的透明度が高いことに着目した。野生型のアフリカツメガエル幼生では、幼生全体の透明度が高くなる発生段階にメラノフォアでメラニン色素が合成され、着色したメラノフォアが中枢神経系の背側を覆うように分布するので脳胞構造の観察が妨げられるが、アルビノの幼生ではメラニンが合成されないため、野生型幼生よりも遙かに頭部の観察に都合がよい。そこで我々は、ツメガエルのアルビノ幼生の脳室内に毒性の低い蛍光試薬を注入すれば、生きている状態で脳室構造の観察が可能となり、脳室内液流の研究の良いモデル実験系になると考えた。本研究では、アルビノのアフリカツメガエル幼生を研究対象として、生きた個体内での脳室内液流の可視化を行った。研究の第一段階として、蛍光色素を微量注射し脳室を可視化することで脳室の発生に伴う形態変化を追跡した。第二段階として、脳室内液流を可視化することで脳脊髄液の流動のパターンの調査を行った。

本研究は、神経発生における脳室内液流の役割を解析するための実験モデルを確立することを志向した萌芽的研究であり、このような研究の方向性は、脳脊髄液と相関する水頭症や脊髄空洞症などの病態の理解に寄与してゆくことが期待される。

## 材料と方法

アルビノのアフリカツメガエル雌雄成体に、生殖腺刺激ホルモンである gonadotrophin を皮下注射し(雌 400 unit、雄 200 unit)、自然交配により有精卵を得た。胚が胞胚期に達するまでに、チオグリコール酸溶液(pH8.6)で有精卵のゼリー層を除去した後に、人工淡水である 10% Steinberg 氏液を満たしたシャーレ中で実験に必要とする発生段階(stage 41-48)に達するまで 15-26°C のインキュベータ内で飼育した。発生段階の同定は、Nieuwkoop と Faber の 1967 年の発生段階表

に従った<sup>10)</sup>。

## 蛍光試薬

脳室の標識に使用する蛍光試薬としては、蛍光色素の FITC-dextran (50mg/ml DDW) と、超微粒子である量子ドット(nanocrystal)の Qdot655 (Quantum Dot Co., USA) 懸濁液を原液(2 $\mu$ M)のまま用いた。stage 41-48 の幼生頭部の脳室内に、これらのいずれか一方を 1 個体あたり 5nl ずつ注射した。

## 微量注射

微量注射の際には、10% Steinberg 氏液で希釈した 0.01% MS-222 溶液中に幼生を入れて全身麻酔をかけた後に、同濃度の MS-222 溶液を満たしたテラサキプレート(住友ベークライト製)のウェルとウェルの間隙に並べ、Drummond 社製の微量注射器「Nanoject」を用いて、脳室の中で最も広い第 4 脳室の蓋板(roof plate)を通して、その後方背側から前方腹側めがけて正中線上で低角度に注射針を差しこみ、蛍光試薬を注射した。その後、主に注射当日から翌々日にかけて蛍光像を観察した。

## 蛍光観察

蛍光による脳室形態の観察の際には、落射蛍光ユニットを装着した蛍光実体顕微鏡(オリンパス, SZX12)下で、幼生頭部に励起光を照射し、蛍光フィルターを通して主に背側から観察し、脳室を可視化する蛍光試薬としての有用性を検証した。FITC-dextran 注射時の励起光の波長は 460-490nm、Qdot655 注射時の励起光の波長は 545-580nm のバンドパスの励起フィルターをそれぞれ使用した。予備実験の結果、脳室の詳細な形態観察には、主に Qdot655 を蛍光試薬として用いた。蛍光で可視化した脳室像は、顕微鏡用デジタルカメラ(オリンパス, DP-70)で撮影した。

## ビーズを用いた脳室内液流の可視化

脳脊髄液の流動パターンの観察には、予備実験の結果、観察に最適と思われた平均直径  $3.135 \pm 0.146 \mu\text{m}$  の無着色のポリスチレンビーズ(Polysciences Inc., USA)の懸濁液を脳室内に注入することで液流を可視化した。stage 47-48 に達するまで飼育した幼生を上記の手順で麻酔をかけ、テラサキプレート中に並べ、微量注射器「Nanoject」を用いて 1 個体あたり 50nl のビーズ懸濁液(原液を 20 倍に DDW で希釈)を第 4 脳室内に注入した。CCD カメラ装置(ニコン, CS5270B)を装着した SZX12 実体顕微鏡下で、注入したビーズの動きを観察し、30fps の密度で DVD ディスクに記録し(総合倍率 $\times 250$ )、コンピュータ上で脳脊髄液の流動パター

ンを解析した。脳室内に注入したポリスチレンビーズの観察に際しては、SZX12 の高級架台(型番 SZX-ILLB100)からの透過光と、斜め上方から照射した冷光装置の反射光の 2 種類の光を当て、ポリスチレンビーズが白く光る状態で、なおかつ脳室形態が判別できるように、双方の光量を調節した。

## 結果

### Qdot で可視化される脳室・脊髓中心管について

FITC-dextran を第 4 脳室内に注射した幼生では、約 60 分後には脳室だけではなく中枢神経系全体が緑色の蛍光によって染色された(図 1b)。しかし、Qdot655 を脳室内に注射した幼生では、注射当日の間は、脳室のみが FITC-dextran よりも強い蛍光強度で鮮明に可視化された(図 1d)。注射 1 日後の蛍光を比較すると、FITC-dextran を注射した幼生では、蛍光が脳組織から滲出し、頭部を中心に体全体に広がっていたが、Qdot655 を注射した幼生では脳組織内への蛍光の広がりには生じたが、FITC-dextran に比べて脳組織の外側への Qdot655 の滲出は遙かに少なかった(図 2a)。以上の結果から、FITC よりも Qdot の方が生きたツメガエルアルビノ幼生の脳室形態の観察に適した蛍光ツールであることが明らかになった。

Qdot655 注射 1 日後の幼生では、脳室から脊髓中心管へとラベリングが進行した(図 2a)。さらに、Qdot655 注射 2 日後には赤色蛍光が脊髓神経の尾端にまで行き

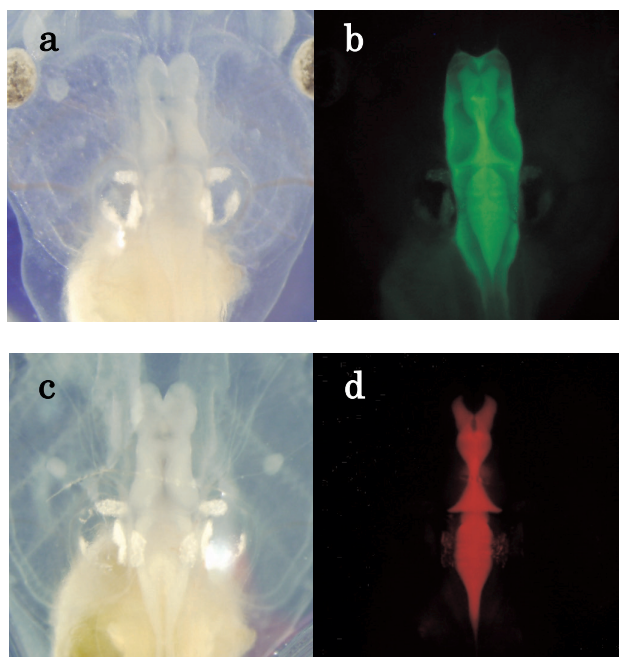


図 1. 蛍光試薬の比較。FITC-dextran を脳室内に注射した幼生(a, b)と Qdot655 を脳室内に注射した幼生(c, d)。同一胚を同一視野で撮影した反射光像(a, c)と蛍光像(b, d)を示す(dorsal view)。注射当日、FITC-dextran は脳室周辺領域も染めたが、Qdot655 は脳室のみを染めた。

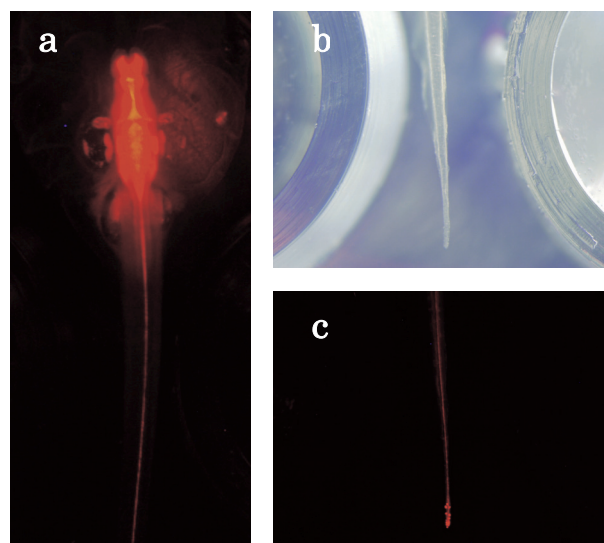


図 2. 脊髓中心管の蛍光。(a) Qdot655 を脳室内に注射してから 1 日後の幼生の蛍光像 (dorsal view)。 (b, c) Qdot655 注射 2 日後の幼生。同一幼生を同一視野で撮影した反射光像と蛍光像 (dorsal view)。脊髓中心管の隅々まで Qdot が行き渡り、特に尾の末端に強い蛍光が見られた。

渡っており、しばしば尾端部には特に強い蛍光のスポットが観察された(図 2b, c)。FITC-dextran を用いた場合には、注射 1 日後には頭部を中心に幼生全体に緑色蛍光が散逸してしまい、脊髓中心管は後脳に接した頭部側の一部を除き、ラベリングされることはなかった。

次に Qdot655 注射幼生の生存率を調査した。脳室内に Qdot655 を注射し MS-222 存在下で麻酔したまま観察した幼生を、観察終了後に通常の人工淡水(10% Steinberg 氏液)に戻すと、数分後に麻酔から覚醒し、再び遊泳を開始した。Qdot655 を注射した幼生を、汲み置き水(約 1 週間取り置いた水道水)を満たした 12 穴のポリスチレン製浮遊培養用テストプレート(岩城硝子製)に 1 穴につき 2 個体ずつ静置し、18°C で 5 日間飼育し、長期生存率を調査した結果、Qdot655 を脳室内に注射した幼生は無処理の幼生と比較して生存率は低かったが、注射 5 日後では注射幼生総数の 3 分の 2 にあたる 16 個体の幼生が生存していた(表 1)。Qdot655 を注射した個体は、麻酔から覚醒した後、長期飼育中に異常な行動を示すことはなく、Qdot が中枢神経系の機能に悪影響を与えていないことが示唆された。

各発生段階の脳室形態を比較すると、stage 41-48 で脳室形態が絶え間なく変化している様子が観察された。脳室の前端にある第 3 脳室は、発生の進行に伴いその容積を拡大していった。stage 46 になると第 3 脳室の前端が左右に分離し始め、側脳室が形成され始めているのが観察された(図 3d-f)。



表 1. Qdot655 を脳室内に注射した幼生の長期生存率.

	0 日	1 日	2 日	3 日	4 日	5 日
Qdot 655	100% 24 / 24	88% 21 / 24	79% 19 / 24	79% 19 / 24	71% 17 / 24	67% 16 / 24
無処理	100% 12 / 12	100% 12 / 12	100% 12 / 12	100% 12 / 12	100% 12 / 12	92% 11 / 12

上段は生存率, 下段は生存数 / 注射幼生数.

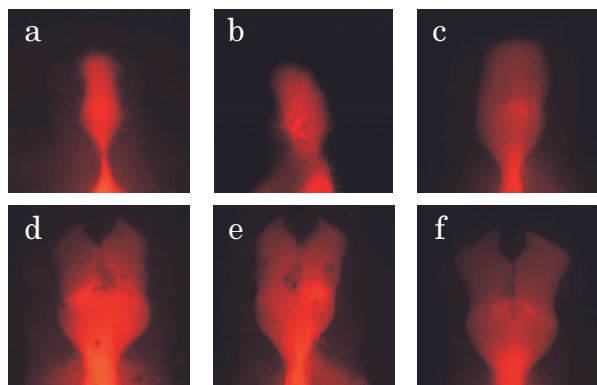


図 3. 第 3 脳室とそこから派生する側脳室の形態 (dorsal view). (a) stage 41-42. (b) stage 42-43. (c) stage 44-45. (d) stage 46. (e) stage 47. (f) stage 48 後期.

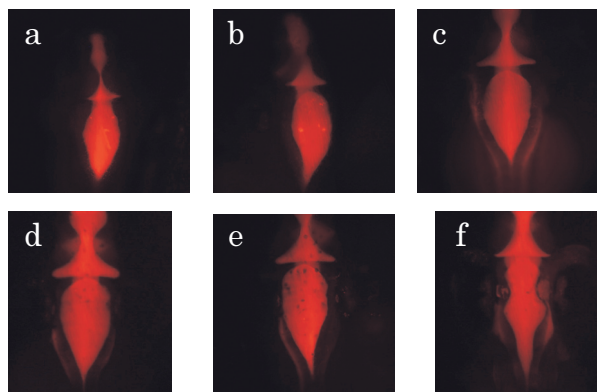


図 4. 第 4 脳室の形態 (dorsal view). (a) stage 41-42. (b) stage 42-43. (c) stage 44-45. (d) stage 46. (e) stage 47. (f) stage 48 後期.

CNS 後方の脳室である第 4 脳室は、stage 41-42 の幼生では菱形に近い形態をしていたが、発生の進行に伴ってその容積を拡大し、同時に、第 4 脳室の前端部は丸みを帯びて楕円形に近い形態へと変化していった (図 4)。さらに、stage 48 の後期には、第 4 脳室の側面に位置する内リンパ嚢が肥大成長し、それに圧迫される形で、第 4 脳室の中央部分の両側面に括れが出来るのが観察された (図 4f)。

#### 脳室内液流のパターニングについて

脳脊髄液の流動パターンは、脳室内に注入したビーズを背側から観察し、その動きを解析することで可視化することが出来た (図 5)。胚側面からの観察では、頭蓋部の組織の厚みと湾曲に妨げられて、ビーズの動きをトレースすることは殆ど出来なかった。

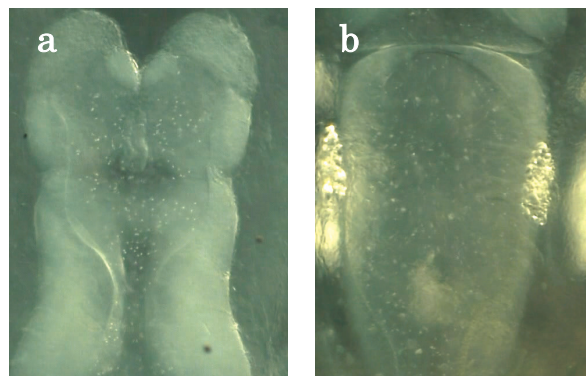


図 5. 脳室内に注入されたビーズ (dorsal view). (a) 第 3 脳室. (b) 第 4 脳室. 第 4 脳室に微量注射したビーズが、脳脊髄液の循環によって数分後には第 3 脳室にまで拡散していた。

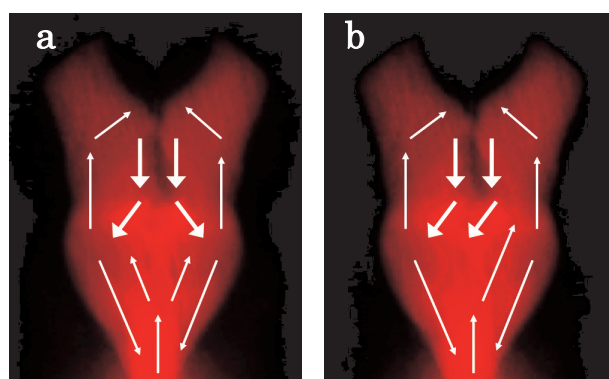


図 6. 第 3 脳室における脳脊髄液の流動パターンの模式図 (dorsal view). (a) 左右対称の液流を示したケース. (b) 左右非対称の液流 (左寄り) を示したケース. 太い矢印は、移動速度の速いビーズの流れを示している。

第 3 脳室の脳室内液流については、脳室の上層と下層でのビーズの流動パターンに大きな差異は見出されなかった。第 3 脳室背側の蓋板付近中央部では、録画した 37 個体のうち 22 個体 (59.5%) でビーズの流れに左右非対称性が観察され、15 個体 (40.5%) で左右対称なビーズの流れが観察された (図 6a)。液流が左右非対称性を示した 22 個体のうち、21 個体は左寄り (図 5a の撮影個体)、1 個体では右寄りの液流が認められた。また、観察した全ての個体において、第 3 脳室の蓋板付近中央部のビーズ移動速度は、第 3 脳室内の他領域のビーズの移動速度よりも遙かに速かった。

一方、第 4 脳室および中脳水道では、脳室の上層と下層でビーズの流動パターンが大きく異なっていた (図 7)。第 4 脳室では、ビーズの流れは左右対称で、脳室の左右両側面の脳室壁付近でビーズの移動速度が速く、脳室底に近い下層から蓋板に近い上層へとビーズが上昇していた。上層へと移動したビーズは脳室壁、蓋板に沿って左右両側から上層中央に移動し、ビーズは正中部分で下層へと下降していた (図 7a)。第 4 脳室下層におけるビーズの流れは、正中線上では直線状に尾部方向へと、その他の領域では後方に流されつつも

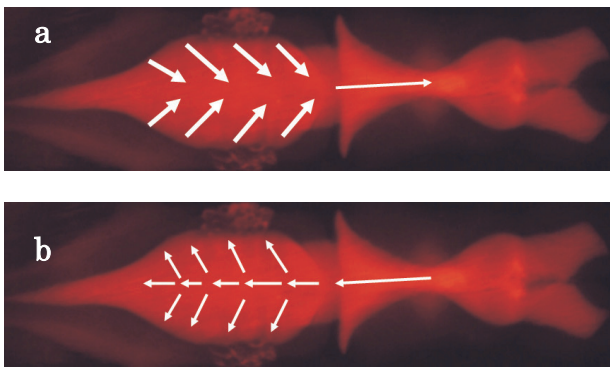


図 7. 第 4 脳室・中脳水道における脳脊髄液の流動パターンの模式図 (dorsal view). (a) 脳室の上層でのビーズの流動パターン. (b) 脳室の下層でのビーズの流動パターン. 太い矢印は、移動速度の速いビーズの流れを示している。

左右両側の脳室壁方向に向かうという、主に 2 方向の流れを形成していた(図 7b)。第 4 脳室上層におけるビーズの流れは、左右の脳室壁付近で前方に移動しながら上昇し、上層中央部でビーズがやや後方へ引き戻されながら下降し、この上昇と下降を繰り返しながら、第 4 脳室上層全体としては、ビーズは概ね頭部方向へと分散していった。

第 4 脳室と第 3 脳室を連絡している中脳水道の部分では、ビーズは蓋板に近い上層では頭部方向へと直線的に移動し、脳室底に近い下層では尾部方向へと直線的に移動していた。第 4 脳室に注入したビーズは(数分後には)速やかに第 3 脳室へと分散していったので、狭隘な中脳水道を頭部方向に向けて流れる液流にビーズが運搬されて第 3 脳室に効率よく運ばれたと考えられ、ツメガエル幼生の脳室内液流が強く速いものであることを示唆している。実際、第 3 脳室や第 4 脳室のビーズ流の運動スピードは 30fps のフレームレートでぎりぎり撮影可能となるような、毎秒めまぐるしくビーズ相互の位置関係が変わるものであった。

## 討論

本研究で用いた量子ドットは、蛍光強度が極めて強い、細胞毒性が低い、ならびに、全く褪色しないという特性から、細胞生物学分野で近年急速に普及している蛍光標識薬である<sup>11,12,13)</sup>。我々は、これをアフリカツメガエル脳室の可視化に適用し、一定の成果を得ることが出来た。脳室の形態形成には、細胞層の増殖パターンの他に、脳室という閉空間に封入された脳脊髄液の作り出す脳圧に関与することが明らかになりつつある<sup>14)</sup>。量子ドットの蛍光像が明らかにした目まぐるしい脳室形態の変化は、脳胞全体で統合された脳組織の分節的な増殖パターンや、脳胞を構成する CNS 前駆細胞の脳圧に対する生理的応答に加え、脳室を括る方向に働く収縮力の存在を予想させる。脳室内での液流は、

三次元的な複雑な流動パターンを生成していることが明らかになったが、第 3 脳室背側における左右性のある液流パターン(図 6)を除いては、個体差に乏しく、脳室内液流がランダムな纖毛運動の産物ではなく、発生プログラムに従って部域特異的に運動方向を統合された、高度に同調的な纖毛波の産物であることを示唆する。第 3 脳室においては、左右非対称な液流を示す個体と示さない個体があったが、観察に用いた幼生の発生段階である stage 47-48 が、左右非対称から両側性に、あるいはその逆の、液流の側性の切り替えが起こる発生段階であるためかも知れない。今後、前後の発生段階の幼生における脳室内液流パターンの観察が必要となる。

## 第 3 脳室背側の左右非対称な脳室内液流の役割

ヒトを含む霊長類の脳は、側頭回やシルビウス溝などいくつかの領域で左右非対称性を示し、左脳と右脳との機能的分業と脳の神経解剖学的な左右非対称性とが密接に関連することが知られている。一方、両生類においては、幾つかの種において、間脳背側の神経核である手綱核が、変態期幼生や成体において形態的な左右非対称性を示すことが 20 世紀前半から知られていたが<sup>15)</sup>、脳の他の領域に左右非対称性があるか否かに関しては報告がない。また、本研究で用いたアフリカツメガエルの手綱核は、終生左右対称とされる。下等軟骨魚類の手綱核の非対称性が報告されていたにもかかわらず、硬骨魚類の脳については、両生類とは異なり終生左右対称であると 20 世紀末まで信じられていた<sup>16)</sup>。しかしながら、共焦点レーザー顕微鏡技術の進展に伴い、2000 年ごろから、孵化直後のゼブラフィッシュ幼魚において、手綱核の神経回路網が、一過的に左手綱核で肥大し、より緻密になることが報告された<sup>17)</sup>。更に、手綱核近傍の組織である松果複合体を形成する副松果体も、正中よりも左寄りに位置することが報告された<sup>18,19)</sup>。

両生類脳の左半球と右半球との機能的分業の存否については、長らく不明であったが、1990 年代になって、嘔吐行動や、幼生の驚愕反応(逃避的遊泳行動)などに左右非対称性があることが相次いで報告され、その高次行動に「利き脳」があることが明らかになった<sup>20-24)</sup>。しかしながら、これまで「利き脳」の存在が報告された種の多くは、*Rana* 属や *Bufo* 属の比較的高等な無尾両生類であり、本研究で用いた *Xenopus laevis* などの最も下等な水棲無尾両生類であるビパ科の種において、利き脳の明快な左右性を示した研究はない。

硬骨魚類ゼブラフィッシュにおいては、*nodal*, *lefty* (*antivin*), *pitx2* の 3 種類の遺伝子が、孵化直後のごく短期間において、間脳背側の視床上部の一領域(おそら

くは手綱核、副松果体の原基を形成する発生拘束を受けた一領域)の左側に偏って発現することが1990年代後半以降明らかになっている<sup>25,26,27)</sup>。しかしながら、両生類 *Xenopus laevis* 胚/幼生においては、その相同遺伝子の発現が左右非対称であるとの報告はない。

以上のように、現時点では、手綱核が左右対称なアフリカツメガエルについて、神経解剖学的あるいは分子レベルでの脳の左右非対称性を研究した報告は全く無い状態である。しかしながら、本研究は、アルビノのアフリカツメガエル幼生を材料とした簡便で新しい方法を用いて、両生類の脳室内液流を生きた幼生個体内で可視化することに成功し、その過半数の個体の第3脳室背側の中央部で左右非対称な脳室内液流が発生していることを世界で初めて明らかにした。即ち、組織形態でも、分子でもない、液流という第三のメルクマールは、両生類において左右非対称性を示していたのである。両生類の利き脳については、その存在を疑問視する研究者もいるが、液流方向の左右性を変更する方法が見出されれば、脳室内液流が行動の側性に与える影響を定量的に評価することを通じて両生類の利き脳の実験発生学的に明証することが出来ると思われる。

第3脳室内の液流は、その背側領域で、脈絡叢ないし松果複合体原基になると思われる中央組織を挟んで、後方に向かう両側性の液流を形成していた。その中央組織に接近したビーズは、周囲のビーズよりも俄にスピードが増し「跳ね飛ばされる」ような振る舞いをしていたので、この組織の表面には強い繊毛流があると思われた。ヘマトキシリン-エオシン染色を施した横断切片を用いた観察から、stage 46-48 幼生の、この中央組織の表面には他の領域よりも密に繊毛が生えていた(n=3, データは示さず)。近年、ホメオボックスを有する転写因子 *otx5* (*orthodenticle homeobox-5*) が硬骨魚類ゼブラフィッシュ胚や両生類ツメガエル胚の松果複合体の分子マーカーとなることが報告されている<sup>28,29)</sup>。今後、*otx5* をマーカーとして、digoxigenin 標識 cRNA プローブを用いて *in situ* hybridization を行い、この第3脳室背側の中央組織に松果複合体原基が含まれるか否かについて検討したい。

第3脳室の左右非対称な液流の生理的な意義は何であろうか? 1998年、野中茂紀らは、monocilia の繊毛運動を司るモータータンパク質 Kinesin family のうち、*KIF-3B* のノックアウトマウスが内臓逆位を示すことをきっかけに、野生型マウス胚のノード(node, オルガナイザー領域)の腹側の窪みの表面に右から左に向けた左右非対称な液流があることを発見し、これをノード流と名付けた<sup>30,31)</sup>。KIF や Dynein などがモータータンパク質としての機能を喪失し、ノード表面の

monocilia が繊毛運動を行わない変異型マウスにおいては、ノード流がきわめて弱い存在せず、その後の体節期胚において、左側板のみで発現を示す *nodal* や *pitx2* などの遺伝子発現の左右非対称性が乱れることが分かった<sup>32,33,34)</sup>。従って、ノード領域で生成される左向きの液流が、内臓の左右性を制御する *nodal* の左側板における発現を誘導し、その後の *nodal*→*pitx2* への左側特異的なシグナル伝達経路を活性化し、内臓の左右の向きを規定すると考えられている。上述のように、*nodal* は、ゼブラフィッシュの間脳一部の背側領域でも左側特異的な発現をする。(厳密に云うと、ゼブラフィッシュに3種類ある *nodal* 相同遺伝子のうち *cyclops* のみが左側特異的な発現をする。) *nodal* は TGF- $\beta$  superfamily に属し、中胚葉誘導活性など多彩な分化誘導活性を有する拡散性の分泌因子 Nodal をコードするので<sup>35,36)</sup>、マウスの内臓の左右性決定においても、ゼブラフィッシュの脳の左右性決定においても、Nodal が左側組織に向けて選択的に拡散し、そのシグナル伝達経路を左側組織で活性化すると考えられている<sup>37,38)</sup>。しかしながら、一方で、マウスオルガナイザー領域のノード流は、ノードの窪みと、胚を包むライヘル膜(Reichert's membrane)との間を回転運動しているとの観察結果や、ノードの縁の部分でカルシウムセンサーが機能し、ノード周縁組織の細胞内カルシウム濃度に左右非対称性が発見されたことなどから<sup>39)</sup>、ノード流が拡散性の Nodal あるいは GDF-1 (Growth Differentiation Factor-1<sup>40)</sup>)、Shh (Sonic hedgehog<sup>34)</sup>)などの他の分泌因子を左側組織に非対称に運搬することが左右非対称シグナル伝達生成の契機になるのではなく、ノード流によって、左側のカルシウムシグナリングが活性化され、この興奮が左側板に伝わることで左特異的な *nodal* 遺伝子の発現が誘導されるとの対立仮説を支持する動きも依然として活発である<sup>41,42)</sup>。

孵化直後の(脳で *nodal* が左右非対称に発現する時期の)ゼブラフィッシュ幼生は微小で、脳室が腹側に弓なりに屈曲しているために観察しにくいいためか、脳室内液流のモニタリングについての報告は昨年ようやく第1報が出たが、CNS から脊髄神経の方向に液流があると記載しているのみである<sup>9)</sup>。一方、*Xenopus* 幼生のアルビノは比較的育て易く、ゼブラフィッシュに比べて遙かに大型であり、しかも幼生の脳は扁平で直線上に発生するために、脳室内液流のパターニングについては、透明度ではゼブラフィッシュに敵わぬまでも、トータルでは後者よりも観察に有利である。更に我々は、結果の項の前半に記したように、最新のテクノロジーである量子ドット法を用いてやや透明度で劣るツメガエル幼生の脳室を鮮明に可視化することに成



功したので、透明度が低いことから生じる技術的な困難も今後は乗り越えられると思われる。Qdot655の蛍光強度は非常に強く、脳室内にQdotを注入したアルビノ幼生に励起光を照射すると、室内照明下で更に冷光装置(白色光)を同時に照射した状態でも、その赤色蛍光を肉眼で容易に視認できる程であった。今後は、ポリスチレンビーズと量子ドットとの混合液の共注射を行い、高速スキャンの可能な共焦点レーザー蛍光顕微鏡と三次元像再構成技術を組み合わせて用いて、背腹軸方向の脳室内液流のより精密な計測を行いたい。

第3脳室の液流に関する我々の観察結果では、ノード流研究の初期の論文に記載のあるような右から左への単純で平面的な液流パターンのみではなく、脳室というコンパクトな閉空間内での複雑で三次元的な攪拌運動の中で、一領域のみに左右非対称な液流が観察された。液流のスピードは、その運動の複雑性から計測し難かったが、モニター画面一杯に第3脳室や第4脳室を映写した際に、秒毎にビーズがめまぐるしく相互の位置を変えていて、動きの複雑さを30fpsのフレームレートでようやく記録出来た程度であった。即ち、脳室内液流は、想像していたよりも遙かに速い秒単位の現象であり、仮に、ツメガエル幼生脳において脳室内に向けた左右非対称なNodalリガンドの分泌があったとしても、脳室内では速やかに均一に拡散してしまうことが予想された。分子レベルではNodal分子よりもやや大きいと予想される直径約20nmのQdot粒子を第4脳室に注入すると、数分以内に第4脳室ならびに第3脳室や側脳室にまで均一に分布するほど、脳室内液流が速かったことから、上記の予想は支持される。我々は、現段階では、脳における左右非対称性の分子機構を、マウス胚オルガナイザーにおけるノード流の単純なアナロジーで捉えるのは難しいと考えている。脳室内液流のモーター役である上衣細胞が比較的ルースな単層上皮であることから、我々は、「激しい」脳室内液流が、上衣細胞層を隔てた背側の脳組織の細胞外基質の中に、緩やかな左向きの液流を形成し、分泌性因子が(脳室内ではなく)脳室壁の基底側の組織中を左向きに拡散する効果をもたらしているとの作業仮説を持つに至った。このアイデアを検証するためには、アルビノツメガエル幼生の脳組織中にFITC溶液や量子ドット懸濁液を局所に注入し、その拡散の様子を定量化する必要がある。

#### 第4脳室、中脳水道における脳室内液流の役割

第4脳室や中脳水道における、上記のような速く強い脳室内液流の背腹でのパターンニングの差異については、その生理的意義を推察することが難しい。しかしながら、中枢神経系や脊髄神経の背腹のパターンニングには、

神経管底板における分泌因子Sonic hedgehogや最も背側の構造である蓋板におけるBone Morphogenetic Protein (BMP)やDorsalinなどの分泌因子の発現が、一連の神経組織特異的な転写因子コード(転写因子群の発現の組み合わせ)を誘導し、それが背腹に沿った領域特異的な細胞種の分化につながるということが明らかになりつつある<sup>43,44)</sup>。一見すると「速すぎる」第4脳室内の安定した液流パターンは、上衣細胞よりも基底側の脳組織中の組織液に伝わり、これを動かすことで液流パターンに沿ったBMPやShhの緩やかな拡散を促し、後部CNSにおける安定した前後・背腹軸分化を支えているのかもしれない。

中脳・後脳境界の主に背側組織に発現するFGF familyのリガンド群は、小脳と中脳の前後軸ならびに領域特異的な組織分化を規定することが明らかになっている。中脳水道におけるシンプルな双方向性の液流は、FGF-8a, 8b, 17などの「中脳・後脳境界オルガナイザー(isthmic organizer)」で合成される分泌因子の脳組織内での拡散に寄与するのかもしれない<sup>45)</sup>。中脳・後脳境界領域の脳組織片を脳室液やFGF分子を添加した培養液中で培養した結果から、脳室液が「中脳・後脳境界オルガナイザー」の活性を媒介することをParadaら(2005)は報告しているが、これは、上記推論の一部を支持する<sup>46)</sup>。

#### 本研究の今後の展開について

今後は、繊毛運動の麻酔剤や繊毛運動を制御する細胞内カルシウム濃度の調節薬(カルシウムイオノフォアなど)を用いて、脳室内液流全体を、あるいは局所的に停止させたり擾乱させたりすることで、中枢神経組織の前後・背腹軸、左右軸に沿った分子マーカーの発現パターンがどのように変化するかを観察したい。その際に、脳室内液流を止めることで低酸素症に関連した病的な遺伝子発現が誘導されないようにし、実験結果の解釈をシンプルになるように実験的な工夫を加える必要があると予想している。

#### 謝辞

本研究は、共同研究「両生類胚・幼生の脳形態形成における脳室内液流の役割の研究」として神奈川大学総合理学研究所の助成のもとで行いました。所長ならびに所員各位に感謝いたします。

#### 文献

- 1) Sarnat HB (1995) Ependymal reactions to injury. A review. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**: 1-15.
- 2) Redzic ZB and Segal MB (2004) The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**: 1695 - 1716.

- 3) Emerich DF, Skinner SJ, Borlongan, CV, Vasconcellos AV and Thanos CG (2005) The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *Bioessays* **27**: 262-274.
- 4) Enzmann DR and Pelc NJ (1993) Cerebrospinal fluid flow measured by phase-contrast cine MR. *Am. J. Neuroradiol.* **14**: 1301-1307; discussion 1309-1310.
- 5) Bradley WG, Jr., Scalzo D, Queralt J, Nitz WN, Atkinson DJ and Wong P (1996) Normal-pressure hydrocephalus: evaluation with cerebrospinal fluid flow measurements at MR imaging. *Radiology* **198**: 523-529.
- 6) Atkinson DJ and Wong P (1996) Normal-pressure hydrocephalus: evaluation with cerebrospinal fluid flow measurements at MR imaging. *Radiology* **198**: 523-529.
- 7) Greitz D and Hannerz J (1996) A proposed model of cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography. *Am. J. Neuroradiol.* **17**: 431-438.
- 8) Jones HC, Dack S and Ellis C (1987) Morphological aspects of the development of hydrocephalus in a mouse mutant (SUMS/NP). *Acta Neuropathol.* **72**: 268-276.
- 9) Kramer-Zucker AG, Olale F, Haycraft CJ, Yoder BK, Schier AF and Drummond IA (2005) Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis. *Development* **132**: 1907-1921.
- 10) Nieuwkoop PD, Faber J (1967) External and internal stage criteria in the development of *Xenopus laevis*. In: *Normal table of Xenopus laevis*. pp. 162-188. Elsevier/North Holland Co. (Amsterdam).
- 11) Bruchez M Jr., Moronne M, Gin P, Weiss S and Alivisatos AP (1998) Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* **281**: 2013-2016.
- 12) Stsiapura V, Sukhanova A, Artemyev M, Pluot M, Cohen JH, Baranov AV, Oleinikov V and Nabiev I (2004) Functionalized nanocrystal-tagged fluorescent polymer beads: synthesis, physicochemical characterization, and immunolabeling application. *Anal. Biochem.* **334**: 257-265.
- 13) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M and Yamamoto K (2004) Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol. Immunol.* **48**: 985-994.
- 14) Lowery LA and Sive H (2005) Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nagie oko* and *snake-head/atp1a1a.1* gene products. *Development* **132**: 2057-2067.
- 15) Morgan MJ (1991) The asymmetrical genetic determination of laterality: flatfish, frogs and human handedness. *Ciba Found Symp.* **162**: 234-247; discussion 247-250.
- 16) Concha ML and Wilson SW (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* **199**: 63-84.
- 17) Concha ML, Burdine RD, Russell C, Schier AF and Wilson SW (2000) A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. *Neuron* **28**: 399-409.
- 18) Gamse JT, Thisse C, Thisse B and Halpern ME (2003) The parapineal mediates left-right asymmetry in the zebrafish diencephalon. *Development* **130**: 1059-1068.
- 19) Halpern ME, Liang JO and Gamse JT (2003) Learning to the left: laterality in the zebrafish forebrain. *Trends Neurosci.* **26**: 308-313.
- 20) Naitoh T and Wassersug RJ (1996) Why are toads right-handed? *Nature* **380**: 30-31.
- 21) Wassersug R, Naitoh T and Yamashita M (1999) Turning bias in tadpoles. *J. Herpetology* **33**: 543-548.
- 22) Yamashita M, Naitoh T and Wassersug RJ (2000) Startle response and turning bias in *Microhyla* tadpoles. *Zool. Sci.* **17**: 185-189.
- 23) Bisazza A, De Santi A, Bonso S and Sovrano VA (2002) Frogs and toads in front of a mirror: lateralisation of response to social stimuli in tadpoles of five anuran species. *Behav. Brain Res.* **134**: 417-424.
- 24) Alashichev YB and Wassersug RJ (2004) Left and right in the amphibian world: which way to develop and where to turn? *Bioessays* **26**: 512-522.
- 25) Rebagliati MR, Toyama R, Fricke C, Haffter P and Dawid IB (1998) Zebrafish *nodal*-related genes are implicated in axial patterning and establishing left-right asymmetry. *Dev. Biol.* **199**: 261-272.
- 26) Thisse C and Thisse B (1999) Antivin, a novel and divergent member of the TGF- $\beta$  superfamily, negatively regulates mesoderm induction. *Development* **126**: 229-240.
- 27) Essner JJ, Branford WW, Zhang J and Yost HJ (2000) Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by *pitx2* isoforms. *Development* **127**: 1081-1093.
- 28) Kuroda H, Hayata T, Eisaki A and Asashima M (2000) Cloning a novel developmental regulating gene, *Xotx5*: its potential role in anterior formation in *Xenopus laevis*. *Dev. Growth Differ.* **42**: 87-93.
- 29) Gamse JT, Shen YC, Thisse C, Thisse B, Raymond PA, Halpern ME and Liang JO (2002) *Otx5* regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nat. Genet.* **30**: 117-121.
- 30) Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M and Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* **95**: 829-837.
- 31) Nonaka S, Shiratori H, Saijoh Y and Hamada H (2002) Determination of left-right patterning of the mouse embryo by artificial nodal flow. *Nature* **418**: 96-99.
- 32) Okada Y, Nonaka S, Tanaka Y, Saijoh Y, Hamada H and Hirokawa N (1999) Abnormal nodal flow precedes *situs inversus* in *iv* and *inv* mice. *Mol. Cell* **4**: 459-468.
- 33) Okada Y, Takeda S, Tanaka Y, Belmonte JC and Hirokawa N (2005) Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination. *Cell* **121**: 633-644.
- 34) Tanaka Y, Okada Y and Hirokawa N (2005) FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* **435**: 172-177.
- 35) Zhou X, Sasaki H, Lowe L, Hogan BL and Kuehn MR



- (1993) Nodal is a novel TGF- $\beta$ -like gene expressed in the mouse node during gastrulation. *Nature* **361**: 543-547.
- 36) Jones CM, Kuehn MR, Hogan BL, Smith JC and Wright CV (1995) Nodal-related signals induce axial mesoderm and dorsalize mesoderm during gastrulation. *Development* **121**: 3651-3662.
- 37) Hamada H, Meno C, Watanabe D and Saijoh Y (2002) Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 103-113.
- 38) Concha ML, Russell C, Regan JC, Tawk M, Sidi S, Gilmour DT, Kapsimali M, Sumoy L, Goldstone K, Amaya E, Kimelman D, Nicolson T, Grunder S, Gomperts M, Clarke JD and Wilson SW (2003) Local tissue interactions across the dorsal midline of the forebrain establish CNS laterality. *Neuron* **39**: 423-438.
- 39) Raya A, Kawakami Y, Rodriguez-Esteban C, Ibanes M, Rasskin-Gutman D, Rodriguez-Leon J, Buscher D, Feijo JA and Izpisua-Belmonte JC (2004) Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature* **427**: 121-128.
- 40) Zhang XM, Ramalho-Santos M and McMahon AP (2001) Smoothened mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node. *Cell* **105**: 781-792.
- 41) McGrath J, Somlo S, Makova S, Tian X and Brueckner M (2003) Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* **114**: 61-73.
- 42) Shimeld SM (2004) Calcium turns sinister in left-right asymmetry. *Trends Genet.* **20**: 277-280.
- 43) Lee SK and Pfaff SL (2001) Transcriptional networks regulating neuronal identity in the developing spinal cord. *Nat. Neurosci.* **4** Suppl: 1183-1191.
- 44) Shirasaki R and Pfaff SL (2002) Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**: 251-281.
- 45) Sato T and Nakamura H (2004) The Fgf8 signal causes cerebellar differentiation by activating the Ras-ERK signaling pathway. *Development* **131**: 4275-4285.
- 46) Parada C, Martin C, Alonso MI, Moro JA, Bueno D and Gato A (2005) Embryonic cerebrospinal fluid collaborates with the isthmus organizer to regulate mesencephalic gene expression. *J. Neurosci. Res.* **82**: 333-345.