

アドレナリン作動性神経伝達物質処理並びにカルシウムイオノフォア処理による

## ツメガエル胚並びにニワトリ胚の内臓逆位の人為的誘発

豊泉龍児、福田裕之、大場順二、菊川明広、小林琢大、高橋雄<sup>1</sup>、塩尻信義<sup>2</sup>、  
松下晋<sup>3</sup>、竹内重夫

神奈川大学理学部応用生物科学科

<sup>1</sup> 帝京大学薬学部病態生化学教室

<sup>2</sup> 静岡大学理学部生物学教室

<sup>3</sup> 東京女子医科大学大学生物学教室

## 【要旨】

両生類胚の左右性は、既に2細胞期から「左半球の優位」という形で潜在的に備わっていることが、Spemannとその弟子たちの今世紀初頭の実験から明らかにされている。一方、ラット胚においては胚に内在する左右性は少なくとも神経胚期までは変更可能であることが、Fujinagaらの最近の一連の研究によって明らかにされた。彼らは、交感神経刺激剤として開発されたphenylephrine等を加えてラット胚を全胚培養中すると、最大50%の高率で内臓逆位が引き起こされることを発見した。では、早くも2細胞期に既に左右性を内在しているカエルでは、内蔵器官の左右性の成立のメカニズムはいつまで可塑性を持つのであろうか？脊椎動物内部で左右軸の成立機構はどの程度の共通性があるのであろうか？本研究は、哺乳類以外の脊椎動物でも交感神経刺激によって後天的に内臓逆位が引き起こされるか否かについて、アフリカツメガエル胚やニワトリ胚を用いて検討した。

塩類溶液中で培養可能なアフリカツメガエル胚を、脊椎動物のアドレナリン作動性神経伝達物質norepinephrineやoctopamineで曝露処理しながら飼育することで、果たして内臓逆位が生じるか否かについて実験を行った。その結果、神経胚期のツメガエル胚をnorepinephrine溶液に曝露すると、高率で心臓や腸管に逆位が誘発されることが判った。神経伝達物質octopamineでも逆位胚が有意に生じた。神経胚期から神経管期のツメガエル胚のCa<sup>2+</sup>-ionophore処理でも最大50%の高率で内臓逆位が生じた。カエル胚のnorepinephrine処理やCa<sup>2+</sup>-ionophore処理では、普通胚では1127例中1例も見出されなかった「心臓が正位だが腸管は逆位」の胚が総計981処理個体中、22個体得られた。Ca<sup>2+</sup>-ionophore処理においては、早くから曝露処理を開始すると逆位発生率はむしろ低下した。

また、鳥類胚を卵殻外で3日胚まで簡便に培養する方法を開発し、鳥類胚を交感神経刺激剤に曝露しながら全胚培養することで心臓逆位が誘発出来るか否かについても検討した。ニワトリの種卵を交感神経刺激剤phenylephrineで刺激しながら培養すると低頻度ながら心臓逆位が生じることが判った。

これらの結果から、ツメガエル胚の内蔵の左右軸は、神経管閉鎖前後の時期まではアドレナリン作動性交感神経伝達物質に均一に曝露することで変更可能な可塑性を持つことが分かった。アドレナリン作動性伝達物質受容体への刺激とそれに引き続いて生じる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を介した、ある神経性のメカニズムの支配下に脊椎動物胚の内蔵器官の左右性の決定機構が存在することが示唆された。

## 【序論】

脊椎動物の内臓器官の形態やその配置は、外部形態の対称性とはうらはらに、器官によっては際だった左右性を示す。発生途中までは厳密な対称性を示していた胚性器官も、体節期を過ぎるころから、左右性を示すようになる。器官の左右性は、自然界においてはそれが反転すること(逆位 [situs inversus]という)は希であるので、ある遺伝的な調節を受けていると考えられている。内蔵逆位という現象を手がかりに、内臓器官の左右性の決定のメカニズムが古くから様々なアプローチで調べられてきた。割球操作による実験発生学的な研究(Spemmann and Falkenberg, 1919; Brown et al., 1991)や、内蔵逆位を高率に引き起こすマウス系統の原因遺伝子*iv*, *inv*の追求(Hummel and Chapman, 1959; Layton, 1976; McGrath et al., 1992; Yokoyama et al., 1993)にみられるような分子生物学的研究や、肺の分葉や利き腕等を指標とした家系学的研究(Fishman et al., 1976; McManus, 1991)がある。

カエル胚の左半球の優位性の研究から分かるように、脊椎動物胚は2細胞期から左右軸に沿った潜在的な極性を確立していることが古くから指摘されてきた。左右軸に沿った極性は、胚性構造物である中軸組織が出来始める原腸胚-神経胚期の見かけ上完全に対称な胚の形態からは目で見て分からない。しかしながら、この時期にも形態形成分子の潜在的な左右性が(特に外胚葉や中胚葉に)あることが判り始めた。形態的には未だ左右対称である原条期ニワトリ胚において、軸形成に関わる遺伝子であるSonic hedgehogやactivin type IIa 受容体並びにcNR-1のHensen氏結節の周囲の分布は既に非対称であることが発見された(Levin et al., 1995)。また、原腸胚の動物極の胞胚天井の基底膜面に発現する細胞移動に関わる細胞外基質分子fibronectinの非対称な分布が、初期中胚葉細胞量の左右非対称な分布を介して内臓配置の左右性の原因となることが示唆されている(Yost, 1992)。

Fujinagaらは、ラット胚に対してN<sub>2</sub>O曝露を行う薬理的な研究の途中で、その処理が高率に内蔵逆位を引き起こすことを発見した(1989, 1990)。彼らは、N<sub>2</sub>Oが交感神経を刺激する作用があることに着目し、交感神経に対する刺激を介してN<sub>2</sub>Oが内蔵逆位を引き起こしたのではないかと推論した。そこで彼らは、ラット胚を全胚培養しながら交感神経の刺激剤であるphenylephrineに曝露したところ、最大50%の高率でラット胚の人為的逆位化に成功した(1991, 1992)。左右軸形成のメカニズムは、脊椎動物内部ですら異なる部分があるという指摘がある(Levin et al., 1995のdiscussion参照)が、カエル胚やニワトリ胚においても、Fujinagaらがラット胚において明らかにしたように、胚の左右軸を外科的手術によらず無傷のまま人為的に擾乱させることが出来るのだろうか？

本研究は、分子生物学的な実験材料としても実験発生学的な実験材料としても好適なアフリカツメガエルを用いて、両生類胚を交感神経刺激剤phenylephrineに曝露処理することで、果たして内蔵逆位が生じるか否かを検討した。その結果phenylephrine処理

ではツメガエル胚に内臓逆位を引き起こせなかった。しかしながら、神経胚期のツメガエル胚を脊椎動物や無脊椎動物の体内に存在する交感神経伝達物質octopamineやnorepinephrineといったよりnativeな物質によって、高率で内臓逆位が誘発されることが判った。また一方で、神経胚期から(神経管閉鎖前後の)神経管期のツメガエル胚をCa<sup>2+</sup>-ionophore A23187を用いて刺激すると内臓逆位が引き起こされることが判った。

鳥類胚については、それを卵殻外で3日胚まで簡便に培養する方法を新たに開発し、交感神経刺激剤phenylephrineによる内臓逆位が誘発出来るか否かについて、我々の全胚培養法で検討した。種卵のニワトリ胚をphenylephrineで刺激しながら全胚培養すると、低率ながら心臓逆位胚が生じることが判った。

これらの結果から、内臓器官の左右軸は初期尾芽胚期までは変更可能な可塑性を持つことが判った。脊椎動物の左右軸は交感神経伝達物質の関与する機構によって成立することが示唆された。Ca<sup>2+</sup>は、神経細胞間の化学的伝達機構の鍵分子であるので、交感神経伝達物質並びにCa<sup>2+</sup>-ionophoreの両方で内臓逆位が引き起こされたことから、ある神経性のメカニズムの直接の支配下に内臓器官の左右性が決まると予想される。

\*\*\*\*\*

## 【材料と方法】

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)並びにニワトリ(*Gallus domestics*)の胚を材料として用いた。これらの胚を、特定の時期に一定の濃度の交感神経伝達物質もしくは交感神経刺激剤を溶かした溶液に胚全体を曝露し、内臓器官の心臓ループ(カエル、ニワトリ)並びに腸管ループ(カエルのみ)の巻き方の左右性が判定できる発生段階まで培養した。

### <ツメガエル胚の場合>

発生段階はNieukoop & Faber (1967)の発生段階表に従って同定した。卵膜を剥いたツメガエル胚を、stage 9から26の時期に、交感神経伝達物質norepinephrineやoctopamine、並びにCa<sup>2+</sup>-ionophore A23187溶液に浸し始めた。常法に従って、メスの背側皮下に生殖腺刺激ホルモンであるgonadotropinを500-600 unit注射して、十数時間後に排卵させ、オスの精巢の懸濁液を振りかけて人工授精を行った。同時に人工授精を行った2-3匹の雌ガエル由来の受精卵を1batchと呼ぶことにする。初期原腸期から体節期(後期尾芽胚期)までのツメガエル胚を、無菌的に脱ゼリーした後1匹ずつ24穴Multi-well plateに入れて、1.5-2 mlの滅菌した10倍希釈 Steinberg氏液に試薬を溶かして23℃前後で定温培養した。Multi-well plateで神経伝達物質処理を行った胚は全て卵膜を予め剥いておき、滅菌した軟寒天をベッドにして10倍希釈 Steinberg氏液中で、往復振盪器で揺すりながら処理開始まで無菌的にリザーブしておいた。予備実験として、

後期胞胚期以降に卵膜を剥いた場合は、胚のかたさが十分であり重力でつぶれることなく4日胚まで正常に発生することを確かめた。卵膜を剥かなかつた場合は、norepinephrine処理やoctopamine処理の場合には、殆ど効果は現れなかつた。しかし、A23187に関しては、卵膜を剥かなくても効果が見られたので、大半の例数は卵膜を剥かなかつた胚のものである。

試薬としては、交感神経の神経伝達物質である、(-)-(R)-norepinephrine酒石酸塩(和光)並びにD,L-octopamine-HCl(Aldrich)を用いた。いずれも水に易溶性なので、高濃度のstock solutionを作り、10倍希釈 Steinberg氏液でstock solutionを薄め、その中で、胚を無血清培養した。予備実験として、0.5mM, 5mMのnorepinephrine溶液にstage 19-20の卵膜を剥いた胚を暴露したところ、5mMでは全例が死亡し、0.5mMでは全例が生き延びた(n=各8)。原腸胚に対しても、5mMのnorepinephrineは致死的な影響を与え、直ちに発生が停止して死に至った(n=12)。従って処理濃度を0.5mMに設定した。norepinephrineは感光性があるので、24穴multi-well plateをアルミホイルで包んで暗黒下で培養した。octopamineの処理濃度を検討する予備実験として、濃度2.5mMのoctopamine溶液に、stage 9, 18, 19の卵膜を剥いた胚(n=11, 12, 10)を暴露してstage 41-46まで飼育したが、生存個体は合計4個体であった。原腸胚に対しては0.5mMのoctopamineは致死的な影響を与え、直ちに発生が停止して死に至った(n=12)。そこで、0.005mM, 0.05mM, 0.5mMの濃度のoctopamine溶液を使い分けて暴露処理することにした。早い発生段階では、octopamine処理による死亡率が高かつたので、0.005mM, 0.05mMで処理を行った。比較的後期の胚では0.5mMの濃度で処理を行った。処理胚は、同一バッチの無処理胚が心臓ループ並びに腸管ループの巻き方の左右性が判定できる、stage 41-46の発生段階に達するまで培養した。処理胚、特に逆位化の生じた胚は発生が無処理胚に比べて遅れる傾向があつたが、数時間置きに左右性の判定を繰り返し、Multi-well plate内の全ての個体について内臓の正位/逆位を判定した。心臓ループ並びに腸管ループにより正位/逆位の判定の出来るstage 41-46で、判定した。

無処理群として、10倍希釈 Steinberg氏液中で飼育した人口授精胚をバッチごとにstage 41-46で心臓と腸管の左右性について判定した。また、卵膜を剥いて試薬処理群と同じ24穴プレート内で10倍希釈 Steinberg氏液のみで培養した対照群を設け、これについても両器官の左右性を検定した。天然の逆位胚もやはり、発生が遅れる傾向があつた。そこで、後期尾芽胚期に正常な胚をセレクションし、大半の胚がstage 41-46に達した段階でまず1回目の判定を行い、残りは棄却するのではなく、バッチ内の全ての胚について判定可能なstageまでは培養しては判定することを繰り返した。

交感神経伝達物質norepinephrineやoctopamineがそれらの受容体に結合すると、シナプス後膜上のCa<sup>2+</sup>-チャンネルを解放するなどして、受容体発現細胞の細胞質へのCa<sup>2+</sup>イオンの流入が生じて、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇することが知られている。そこで、



Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187を胚に作用させることで逆位が引き起こされるか否かについて実験を行い、norepinephrine処理やoctopamine処理の結果と比較検討した(Fujinaga et al., 1994)。予備実験として、stage 26の卵膜のない(孵化した)胚を、0.1, 1, 10, 50, 100nMのA23187に暴露処理した結果、半数致死量は、50, 100nMの間にあった(n=各8)。そこで処理濃度を50nMに設定した。DMSO(dimethyl sulfoxide)に溶かしたstock solutionからCa<sup>2+</sup>-ionophore A23187 (Sigma)を50nMの最終濃度で滅菌した10倍希釈 Steinberg氏液に溶かし、原腸期から後期尾芽胚期までの胚をその中で無菌的に培養した。処理胚がstage41-46の発生段階に達した段階で、全ての処理個体について逐次心ループと腸管ループの巻き方の左右性を判定した。判定後、逆位化した胚において何らかの生理機能不全が生じているか否かを検討するために、池の水で1ヶ月以上長期に飼育することを試みた。

### <ニワトリ胚の場合>

内臓の左右性の最初に現れるマーカーである、形成期の心臓のループの胚軸に対する位置(正位の胚では、背側から見て右側)によって、内臓の左右軸が反転したか否かを検定した。試薬に暴露したまま、心臓ループの左右性の判定の出来る3日胚まで長期に全胚培養することを試みたかったのですが、その目的に適した全胚培養法から検討した。鳥類胚の全胚培養法として、New(1955)の胚盤葉のみの培養法とPerry(1988)の自然の卵殻を容器として用いた方法が知られるが、いずれの方法も習熟に経験を要するため、新たに簡便な方法を確立した。上面の一部に菌を通過させないサイズのポアフィルター(直径1cm)を装着した、直径8cm、高さ7cmの植物培養用の容器(luchi製culture jar, 250ml)を紫外線滅菌した後に、Hanks氏液40mlと種卵または孵卵2日胚から採取した鶏卵2.5個分の卵白(80ml)を混ぜ合わせてその中に注いだ。ここに、卵黄膜を傷つけないように、卵黄全部を浮かべた(図1A)。Hanks氏液を混ぜたのは、Parén and Thörneby (1976)の方法に習って、卵白の比重を下げることで卵黄の上面に位置する胚盤葉を、水面下ギリギリに丁度沈ませた状態で培養するためである。ここまでの操作は、全て無菌的にクリーンベンチ内で行った。容器は、回転半径2.5cm, 35 r.p.m.で緩やかに攪拌しながら、全体を湿度を80%以上に高くした38度のインキュベーターに収納し(図1B)、最大70時間回転培養した。予備実験の結果、卵白のみでHanks氏液を混ぜなかった場合、胚盤葉は卵白液から浮き上がった状態で乾燥して死滅してしまった(n=3)。Hanks氏液と卵白とを等量混合した場合は、卵黄は容器の底に沈んでしまい、恐らくガス交換がうまくいかなかった為に死滅した(n=42)。上記の方法で、ルーチンに80%の成績で、見た目には完全な3日孵卵胚を得ることに成功した(n=14; 図1C)。用いた容器が、Perryの方法の核心である、内部の湿度が失われずにガス交換を行うという目的に合致したのであろう。更に全体を緩やかに攪拌することは、転卵と等価な効果をもたらしたと考えられる。

簡便な全胚培養に成功したので、Hanks氏液に最終濃度0.05mM-0.25mMになるようにphenylephrineを溶かして、胚全体を培養期間中暴露した。phenylephrineは感光性の薬剤であるが、扉を閉めたインキュベーターの内部は暗黒に保たれた。2.5-3日後に、容器の蓋を開けて内部の胚とその心臓ループとの位置関係並びに、血流の方向性を観察し、写真撮影またはビデオ撮影により記録した。我々の方法の長所の一つとして、ネジ回し式の容器の蓋を開けて胚の成長の状況を観察し、胚の生育が遅れた場合には再び蓋を閉め直して全胚培養を継続することが容易にできた。こうしてstage 11-19の2.5-3日胚の心臓ループの左右性を検討した。

\*\*\*\*\*

## 【結果】

### <自然逆位>

stage 41-46に達した人工受精胚を用いて、無処理のツメガエル胚の内臓逆位の出現頻度を、心臓ループ並びに腸管のらせんの巻き方の非対称性を手がかりに調べた。

9 batchの人工授精群の1127個体について、心臓-腸管逆位を双眼実体鏡を用いた視認によりチェックした。その結果、25個体、2.2%の自然逆位胚が存在した(表1)。心臓も腸管も逆位を示した個体(n=8)や、腸管が正位で心臓のみが逆位を示した個体(n=17)は出現したが、心臓が正位で腸管のみが逆位である例は観察されなかった(n=0; 表5)。逆位個体は発生がやや遅れる傾向がみられ、正位胚よりも判定可能な発生段階に達するのが半日から一日遅れる場合が多かった。

次に、対照群としてコリオンを剥いただけの場合の、逆位胚の発生率を調べた。stage 12またはstage 19の発生段階で卵膜を剥いた胚を、10倍希釈 Steinberg氏液を満たした24穴プレートの中で実験群同様stage 41-46まで飼育して、心臓並びに腸管の左右性を検定した。逆位胚は生じなかった(表1)。

### <交感神経伝達物質norepinephrineによる人為逆位>

主として交感神経伝達路の $\alpha$ 受容体を刺激するとされ、ツメガエル胚内においては神経胚以降から出現する(Rowe et al., 1993)、脊椎動物の神経伝達物質norepinephrineに胚を暴露した。norepinephrineを溶かした10倍希釈 Steinberg氏液中で、stage 9-24の胚を暴露処理しながら、正位/逆位の判定可能なstage 41-46まで培養した。原腸胚期から神経胚期に濃度0.5mMのnorepinephrineで暴露処理を行った場合、高頻度の逆位個体が出現した(図2; 表2)。特に、stage 11から処理を開始した場合には、心臓の逆位や腸管の逆位が28%の確率で生じた。前項の無処理群では、1127例中0例であった、「心臓は正位であるが腸管は逆位」という胚がstage 9-19の暴露処理生存胚343個体中8個

体出現したことが、注目される(図2C; 表5)。また、胚全体に対してsymmetricalな刺激を与えたが、逆位が誘発されたことになる。表2の実験例は全て卵膜を剥いた。卵膜を剥かなかった場合は、stage 12の神経胚に逆位を生じさせた濃度0.5mM, 0.05mMのnorepinephrineで処理しても、普通胚程度にしか逆位は出現しなかった(n=各8 計16、うち逆位個体1)。従ってnorepinephrineは卵膜を透過しなかったようだ。norepinephrine処理中には、4日胚で外鰓として存在する鰓が、胚体の側面から垂直にそそり立つ傾向があった。しかしながらそのことが原因で以後の胚発生が異常になったわけではなく、norepinephrine処理後に正常な10倍希釈 Steinberg氏液に戻して飼育を続けたが、そのまま数日間-1ヶ月間生き続け、外形や遊泳行動も正常だった(図3)。従って、norepinephrine処理で左右が反転したこと以外は、正常な胚が得られたことになる。norepinephrineに浸したまま更に飼育を続けた場合には、徐々に腹部が水泡化して膨らみ、そうなった個体から死んでいった。

#### <交感神経伝達物質octopamineによる人為逆位>

交感神経伝達路の $\alpha$ 1受容体を主に刺激するとされる脊椎動物の脳や交感神経の神経伝達物質octopamine (Molinoff and Axelrod, 1969; Axelrod and Saavedra, 1977; Maxwell et al., 1982; David, 1984; Ibrahim et al., 1985)を用いて暴露処理を行った。octopamineを0.005-0.5mMの濃度で溶かした10倍希釈 Steinberg氏液中で、stage 12(初期神経胚期), stage 21(神経管期)の胚を、正位/逆位の判定可能なstage 41-46まで培養し、逆位個体の出現率を検定した。stage 12からの処理胚において16%の頻度で、stage 18からの処理胚において35%の頻度で逆位個体が出現した(図2D; 表3)。この頻度は、2x2分割表におけるカイ検定の結果、卵膜を剥いただけの対照群や普通の人工受精胚における逆位出現率よりも有意に高かった(P.<0.001)。胚全体に対してsymmetricalな刺激を与えたにもかかわらず、逆位が誘発された。表3の実験例は全て卵膜を剥いた。卵膜を剥かなかった場合には、stage 19の胚に逆位を生じさせた2.5mMで処理しても、control程度にしか逆位胚は出現しなかった(n=20のうち奇形1以外は全て正位で生存していた)。従って、octopamineは卵膜を通過しなかったようだ。左右性の判定後、通常の10倍希釈 Steinberg氏液に切り替えて培養したところ、大半の胚が正常な外部形態を持ちつつ、普通胚と同程度の生存率を示した。stage 19から0.5mMのoctopamineに浸したまま内蔵器官の左右性を判定するまで暴露し、その後普通の池の水に戻して飼育を続けた場合、3日後までは80%の処理個体(15個体中12個体)が正常な外見と遊泳行動のまま生きていた(stage 47-48)。octopamineに浸したまま更に飼育を続けた場合には、徐々に腹部が水泡化して膨らみ、そうなった個体から死んでいった。



### <Ca<sup>2+</sup>-ionophoreによる人為逆位>

初期神経胚(stage 11)から初期神経管期胚(stage 19-20)までの間に、50nMのCa<sup>2+</sup>-ionophore A23187に暴露し始め、そのまま、stage 41-46の左右性が判定出来るstageまで培養した場合、高頻度に内臓逆位胚が出現した(図4; 表4)。逆位個体の出現率は、神経褶期(stage 17)から初期神経管期(stage 20)に処理を開始した場合に最も高く、50%前後であった。後期原腸胚を低濃度のA23187で処理した場合には、尾部が縮れた胚が高頻度で出現した。尾部の形成不全が見られた胚の場合でも、心臓や腸管などの内臓器官は意外に見かけ上正常であることがほとんどで、逆位の出現も無処理の対照群以上に見られた。尾部の形成不全は、Ca<sup>2+</sup>イオンが前後軸にも影響した結果だろう(Gotou et al., 1994)。一方、体節期の尾芽胚(stage 23-26)にA23187処理をしても、逆位個体は殆ど出現しなかった。早い発生段階から処理を開始した場合には、逆位の出現率は顕著に低下したので、胚が長期の暴露刺激に対して順応してしまい、刺激の効果が薄れたようだ。Ca<sup>2+</sup>-ionophore処理の場合、逆位胚の大半(67%)は心臓と腸管が同時に逆位を示した。普通胚には決して見られなかった「心臓は正位だが、腸管は逆位」という胚が検定数142個体中5個体出現したことが注目される(表5)。

逆位個体は、見かけ上正常な外見を示した。stage 17-22から50nMで処理して得られた33個体の逆位胚を、判定後10倍希釈 Steinberg氏液に戻して飼育した場合、8匹の個体(24%)が4週間以上、正常な外見のまま生存したので、左右は逆移転したが、胚の基本的な生理機能は損なわれていないと考えられる。卵膜を剥かなかった場合も、剥いた場合同様に高頻度に逆位胚が出現することが判明したので、卵膜が存在してもA23187の左右軸を攪乱する効果はあると言えた。表4の個体は全て卵膜を剥いていない処理胚のものである。

### <植物培養用容器を用いた鳥類胚全胚培養法によるphenylephrine処理>

孵卵0時間の種卵の状態から、濃度0.05mM-0.25mMの交感神経刺激剤であるphenylephrineを卵白に溶かした中で全胚培養した。高率とは言えないが、0.05mM-0.25mMのphenylephrineを加えた場合、心臓ループの位置が背側から見て左側に位置するものが、全処理個体37例中4例の割合(8%)で出現した(図5)。ニワトリ3日正常胚に見られる胚体全体の体のtorsion(ねじれ)に関しては、処理群中には反転する個体は得られなかった。心臓の反転したものは体軸が培養3日目になってもtorsionを示さず垂直なままであった(n=4/4)。心臓の反転した個体は、3日胚に達するまでの培養時間が0mMのcontrolよりも約1日余計にかかった。対照群として、0mMのphenylephrineで処理した場合、心臓のDループが逆位を示した例は、有精卵の調子が悪いlotで1例のみ出現した(n=59)。

## 【考察】

controlでは2%にすぎなかった内蔵逆位個体が、norepinephrine, octopamine, A23187処理によって著しく増加したので、内蔵逆位関連遺伝子iv, inv (Layton, 1976; Brueckner et al., 1989; McGrath et al., 1992; Yokoyama et al., 1993)などの遺伝によるものではなく、薬理的な処理によって引き起こされた後天的な現象であることは間違いないであろう。我々の処理方法は、50%を越える逆位胚を作出するには至らなかったため、左右軸を「変更」したのではなく、その成立を「混乱させた」のであろうと想像される。内蔵逆位関連遺伝子の研究や割球操作による逆位化の研究と考え併せると、内蔵の左右性の決定機構は、途中まで変更可能な可塑性を有する多段階の反応であることが予想される。我々の刺激処理によって、2細胞期から既に左右性の確立している両生類胚において、その決定は、神経管形成直後(stage19-20)までは可塑性を持っていることが判った。処理時期の遅さから、我々の処理方法は、内蔵の非対称性を直接に指示する「実行者」に影響を与えたと考えられる。逆位化処理に対する感受性の強い発生段階(stage19前後)は、心臓と腸管とで一致した。このことから、心臓の左右性を決定する機構と、腸管の左右性を決定する機構とは、交感神経伝達物質の刺激を特定の時期に受け取るという点において同質のものであることが伺われる。

今回の神経伝達物質処理によって得られた逆位個体の器官も、形が裏返しであること以外は正常な外形を示していた。器官の巻き方の左右性は、一度「どちら向きに転ぶか」が決定されれば、それが左巻きであろうと右巻きであろうと決められた同じ形に巻くことになるようだ。

### <どのシグナル伝達系が内蔵逆位にかかわるのか>

アドレナリン作動性交感神経を刺激することが知られる神経伝達物質を両生類胚に与えた場合、内蔵逆位が高頻度で誘発されることが分かった。交感神経の場合、 $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ と $\beta_1$ ,  $\beta_2$ の4つのタイプのreceptorが知られており(Ahlquist, 1948; Langer, 1977a, b; Langer and Hicks, 1984)、どの受容体と結合するかによってシナプス後膜下の情報伝達系は異なっており、引き起こされる自律神経性の効果も異なってくる(Shepherd, 1988参照)。今回逆位を引き起こした物質はいずれも $\alpha$ 受容体の刺激剤であることが知られている(Ruffolo, 1985; Morrow and Creese, 1986; Ruffolo et al., 1991)。特にoctopamineは主に $\alpha_1$ 受容体を刺激することが知られている。 $\alpha$ 受容体が、神経伝達物質の結合で刺激された場合、シナプス後膜側の細胞表面の $\text{Ca}^{2+}$  channelのゲートが開くなどして、シナプス後膜側の細胞質の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇することが知られており(van Breemen et al., 1980; Nelson et al., 1988)、今回のA23187  $\text{Ca}^{2+}$ -ionophore処理で内蔵逆位が引き起こされたのは、このことに関連すると考えられる。逆位化処理に対す

る感受性の高い発生段階が、神経伝達物質処理とCa<sup>2+</sup>-ionophore処理とで一致したのは、この推論を支持する。Ca<sup>2+</sup>-ionophore A23187によって逆位化した胚がその後1ヶ月の長期に渡って生存したことから、左右軸の成立機構は、他の生理機能に大きな影響が出ないレベルの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に対しても鋭敏に反応する、最もCa<sup>2+</sup>感受性の高いメカニズムであることが推察される。

<逆位を引き起こした交感神経伝達物質の標的器官はどれか？>

交感神経伝達物質で逆位が引き起こされる発生段階は、神経胚期から初期神経管期(初期尾芽胚期)に限定され、後期体節期には左右軸の変更は不可能であることが判った。このことは、表題の問題に対して我々に推論の手がかりを与えてくれる。ツメガエル胚の神経伝達物質norepinephrine並びにその受容体は後期原腸胚期から発現し始める(Rowe et al., 1993)。神経細胞としての機能的分化のタイミングと我々の処理によって逆位が誘発出来る初期段階とが符合することは、神経組織が内臓器官の左右性を指示するシグナルを出すことを伺わせる。我々の用いた神経伝達物質は交感神経のそれであるので、交感神経が何らかの形で直接内臓の左右性に関わることが、強く示唆される。処理が有効であった発生段階を考えると、交感神経の起源細胞である神経冠細胞に対して外部から与えた伝達物質が働きかけたとも考えられる。我々が処理を行った発生段階は、神経冠細胞がアドレナリン作動性神経細胞に分化し、そのautocrineな影響による正の調節を受けながら交感神経節を形成する時期である(LeDouarin et al., 1975; Cochard et al., 1978; Kahn et al., 1980; LeDouarin et al., 1986; Sieber-Blum, 1989; Artinger and Bronner-Fraser, 1992; Dupin et al., 1993)。体節期以降には左右軸の可塑性は一切失われることを考慮にいれるならば、我々の処理方法の標的器官が神経冠細胞由来の交感神経前駆細胞そのものであり、norepinephrine等のautocrineな刺激のもとに形成される内臓支配の交感神経節の機能的な分化のタイミングを、外部から与えた伝達物質が乱したことが、内臓逆位に繋がったのではないだろうか？

左右に分かれて移動する神経冠細胞の、左側の一群と右側の一群とのmotilityの差が、外部から与えられた神経伝達物質の影響で解消されて、左右軸の正常な成立を妨げた....ということを第二の可能性として我々は考えている。頭部神経冠細胞の移動に関しては、serotoninがその調節因子であるという報告が最近なされた(Moiseiwitsch and Lauder, 1995)。norepinephrineについては、そのような研究はない。しかしながら、norepinephrineは、白血球細胞や精細胞の細胞運動のmotilityの調節因子であるという報告は数多くなされていること(Deitch and Bridges; 1987; Doukas et al., 1989; McCorkle et al., 1990; Sliwa, 1994)、原生動物に対してすら走化因子として機能すること(Hauser et al., 1975)を考慮するならば、norepinephrineが神経冠細胞の移動の調節因子となる可能性は十分に考えられる。アドレナリン作動性神経伝達物質の神経冠

細胞の細胞移動に対する効果を検討する必要があると思われる。

#### <腸管のみの逆位胚の出現について>

自然逆位の場合、心臓逆位が生じた場合に限って腸管逆位が生じた。従って、自然状態の胚内においては心臓ループが左右非対称に巻き始めることが、腸管の左右性を指示する可能性が強いことが判った。しかしながら、我々の神経伝達物質処理やA23187処理においては、心臓が正位であっても腸管の逆位が生じていた個体が合計22個体出現した。その理由としては、(最初に非対称性を示す器官である)心臓から腸管に向けて左右性に関する情報が伝わるプロセスに、外部から与えた神経伝達物質が干渉したと考えられる。ラット11.5日胚においては、腸管を形成する細胞自身にnorepinephrineの合成酵素であるdopamine- $\beta$ -hydroxylaseとtyrosine hydroxylaseが存在し、その後減弱していくことの報告がある(Cochard et al., 1978; Black et al., 1981)。カエルの腸管細胞においても同様のことがいえるなら、腸管の左右性の決定に際して、外から与えたnorepinephrineは交感神経経路以外に、直接腸管細胞に働きかけた可能性もある。そして、このことが腸管のみの逆位を高頻度で引き起こした原因かもしれない。

#### <内臓逆位誘発モデルとしてのツメガエル胚>

カエル胚の場合は、卵膜を剥いても、ラット胚に逆位を引き起こしたphenylephrine処理では逆位が生じなかった(n=72)。その原因は、phenylephrineが哺乳類に対する薬効から薬理設計されたので、カエルの場合はphenylephrine- $\alpha$ 受容体間のaffinityが低かったからかもしれない。あるいは、単にphenylephrineが表皮を透過出来なかったからかもしれない。

ラットの内臓逆位を誘発したnorepinephrine (Fujinaga et al., 1992)によってカエルの内臓逆位も誘発されたのは、下等脊椎動物と高等脊椎動物との間で、内臓の左右性の決定のメカニズムが保存されていることを示唆する。

ラットの場合、80-100%血清中で全胚培養した条件下で試薬処理が行われていたので、交感神経刺激剤と血清成分中の未だ同定されていない刺激剤が協同して内臓逆位を誘発していた可能性があったが、カエル胚の場合は塩類溶液中で胚が生育するのでその懸念は生じない。大量の同調胚に対して、無血清中で最大50%の逆位個体を生じさせることの出来るツメガエル胚を用いた我々の処理法は、脊椎動物胚の内臓器官の左右性の問題の分子生物学的な解析に最適の方法論を提供すると思われる。今後は、交感神経伝達物質処理に対する初期応答遺伝子の解析が、我々に手がかりを与えてくれるだろう。

ニワトリ胚の場合には、カエル胚ほど完全な逆位個体は得られなかった。ニワトリ胚が端黄卵として発生することが、内臓器官の左右性の変更を難しくしているのかもしれない。しかしながら、心臓逆位に関しては、背側からみて胚の左側に存在するという逆位胚が、



controlよりも高頻度で見られた。ニワトリ胚の心臓の左右性に関しては、交感神経の刺激伝導路が、カエル胚やラット胚同様に、左右軸に関する情報の「実行者」としての役割を果たしていると言えそうだ。ニワトリ胚特有の「torsion」は、胚域と胚体外域との複雑な連携により成立していると思われる。形成される交感神経節からは遠い領域でおこる現象でありことから、交感神経刺激とは別の機構で左右性が生じる現象かもしれない。それ故、今回の交感神経刺激剤処理ではtorsionの逆位は生じなかったのかもしれない。

今回の一連の実験は、ニワトリ胚のphenylephrine処理から始めた。しかしながら、カエル胚に系を移してから、左右軸のみが変更された完全な個体が大量に高頻度で得られたので、カエル胚の方が現時点では解析系として好適であると言えそうだ。今後は、解析系を生殖サイクルが数カ月と短く単為発生も容易な小型魚類胚に移して、左右軸の成立の遺伝学的な解析を進めたい。//

[以下のページに附表・附図を示す]

表1 普通胚（上段）ならびに卵膜除去胚（下段）集計

stage		検定数	生存数		正位	逆位	逆位率	不明
-	-	1127	-		1,102	25	2%	-
12	0	24	24	100%	24	0	0%	0
19	0	48	42	100%	42	0	0%	0

表2 norepinephrine 処理集計

stage	mM	例数	生存数	生存率	正位	逆位	逆位率	不明
9	0.5	24	11	46%	6	3	27%	2
10	0.5	72	36	50%	27	5	14%	4
11	0.5	72	25	35%	14	7	28%	4
12	0.5	56	32	57%	26	5	16%	1
13	0.5	72	54	75%	45	4	7%	5
14	0.5	48	45	94%	42	2	4%	1
19	0.5	96	84	88%	62	17	20%	5
24	0.5	48	48	100%	48	0	0%	0
合計		544	391			43		22

表3 octopamine 処理集計

stage	mM	例数	生存	生存率	正位	逆位	逆位率	不明
12	0.005	24	19	79%	11	3	16%	5
12	0.05	36	22	61%	15	3	14%	4
15	0.005	46	40	87%	26	6	15%	8
18	0.05	27	26	96%	15	9	35%	2
19	0.05	48	45	94%	41	2	4%	2
19	0.5	67	58	87%	49	6	10%	3
21	0.5	16	14	88%	14	0	0%	0
合計		264	224			29		24

表4 calcium ionophore 処理集計

stage	μM	例数	生存数	生存率	正位	逆位	逆位率	不明
11-12	0.05	16	13	81%	9	3	23%	1
13-15	0.05	16	10	63%	8	1	10%	1
16-17	0.05	29	28	97%	17	9	32%	2
18-19	0.05	36	28	78%	9	15	54%	4
20-21	0.05	24	16	67%	8	8	50%	0
22-23	0.05	36	31	86%	23	8	26%	0
24-25	0.05	16	16	100%	15	1	6%	0
合計		173	142			45		8

## 【附表の説明】

### 表1 普通胚並びに卵膜無しの無処理胚の逆位の出現率

孵化した尾芽胚の段階で見た目が完全な胚を選別し、それら全てについてバッチごとに、心臓ループ並びに腸管ループの巻き方の左右性をもとに、両器官の正位/逆位を判定した。結果は、正位/全逆位(両器官とも逆位)/心臓のみが逆位/腸管のみが逆位の4つについて判定した。左右性の判定できない天然の奇形胚については表から外してある。1127個体の普通胚を検定したところ、25個体(2.2%)の天然逆位胚が存在した。心臓が正位であった場合、腸管のみの逆位胚は出現しなかった。

### 表2 norepinephrine処理による逆位胚の出現率

後期胞胚期-初期神経管期(stage 9-19)から0.5mMのnorepinephrineで暴露処理を行うと、表1のcontrolよりも高頻度に逆位胚が生じた。心臓/腸管がともに逆位の胚、心臓のみが逆位の胚、腸管のみが逆位の胚のいずれの場合も得られた。生き残った逆位胚の形態は、内臓の左右軸が反転している以外は、ほぼ完全に正常であった(図3)。心臓が正位で、腸管のみが逆位を示した例が合計8個体得られたが、それらは天然の逆位胚では1例も生じていないことに注意。

### 表3 octopamine処理による逆位胚の出現率

初期神経胚期-初期神経管期(stage 12-19)から0.005-0.5mMのoctopamine溶液に暴露したところ、表1のcontrolよりも高頻度に逆位胚が生じた。生き残った逆位胚の形態は、内臓の左右軸が反転している以外は、ほぼ完全に正常であった。心臓が正位で、腸管のみが逆位を示した胚が合計9個体得られたが、天然の逆位胚では1例も生じていない。

### 表4 Ca<sup>2+</sup> ionophore, A23187処理による逆位胚の出現率

原腸胚期-初期尾芽胚期(stage 11-23)から50nMのcalcium ionophore A23187溶液に暴露したところ、表1のcontrolよりも高頻度に逆位胚が生じた。stage 19前後からの処理では、心臓/腸管ともに50%の高頻度で逆位胚が得られた。stage 16以前に処理を開始すると、逆位胚の発生率が低下したことは、刺激に対する順応の結果と思われる。逆位の発生率は、stage 19-20の初期神経管期以降は減少している。生き残った逆位胚の形態は、内臓の左右軸が反転している以外は、ほぼ完全に正常であり、1ヶ月の長期に渡り生育した。心臓が正位で、腸管のみが逆位を示した例が合計5例得られたが、それらは天然の逆位胚では1例も生じていないことに注意。原腸胚期にA23187処理すると、尾部の形成不全の傾向があったが、それらの胚も、頭部-胴部の外部形態はほぼ正常に見え、腸管の左右性の判定に支障はなかった。

表5 得られた逆位個体の分類

	逆位			逆位発生率	
	心臓とも逆	心のみ逆	腸のみ逆		
普通胚	8	17	0	2% (25/1127)	-
無処理胚 (コリオンなし/st.12,19)	0	0	0	0% (各0/48)	-
norepinephrine (st.9-24集計)	13	22	8	20% (P.<0.1%)*	(st.19にて)
octopamine (st.12-21集計)	9	11	9	35% (P.<0.1%)*	(st.18にて)
Ca-ionophore A23187 (st.11-25集計)	30	10	5	54% (P.<0.1%)*	(st.18-19にて)

\* H<sub>1</sub>: P普通胚≠P処理群, H<sub>0</sub>: P普通胚=P処理群

**表5 得られた逆位個体における心臓逆位と腸管逆位の連鎖**

我々は、各検定個体において、心臓と腸管の二つの内臓器官の左右性について記録した。結果は、「心臓と腸管の両者において逆位」、「心臓のみが逆位」ならびに「腸管のみが逆位」の3カテゴリーに類別した。普通胚においては、心臓が逆位を示した場合に限って腸管の逆位が認められ、腸管が単独で逆位を示すことはなかった。ところが、神経伝達物質処理やカルシウムイオノフォア処理によって誘発された逆位の場合は、腸管のみの逆位が少なからず出現した。



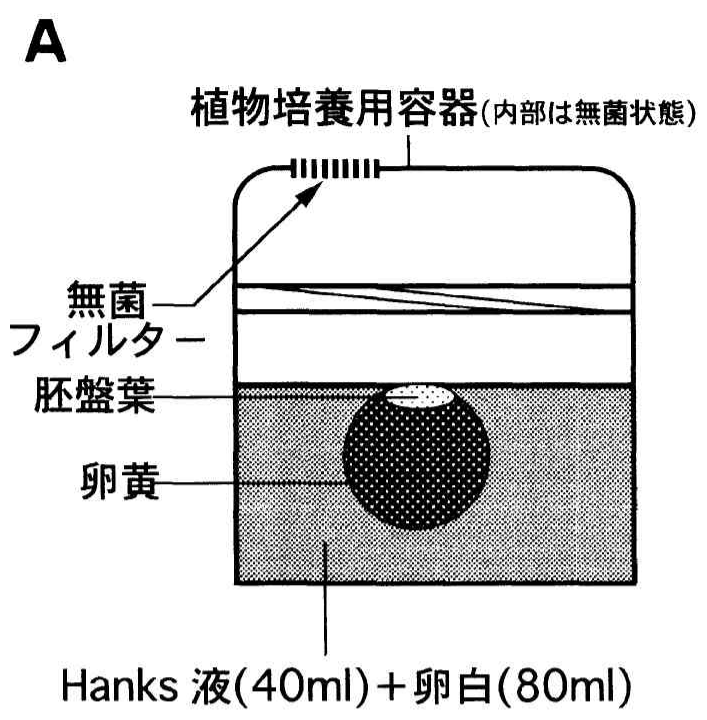
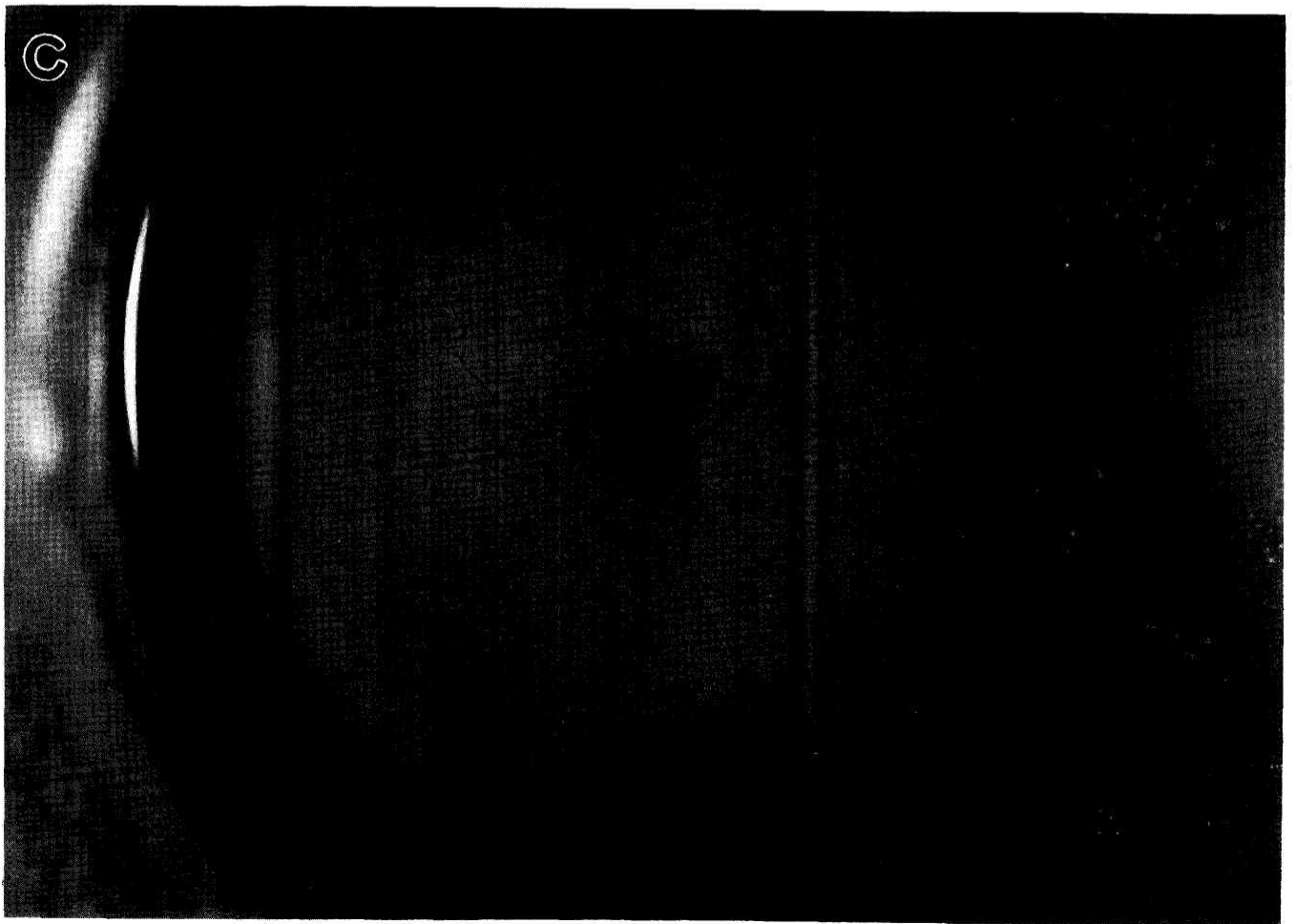


図 1



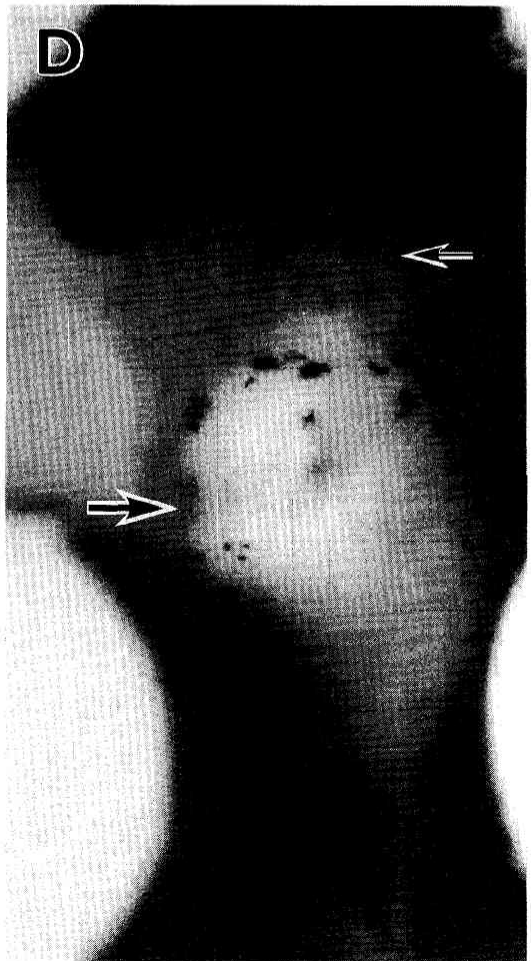
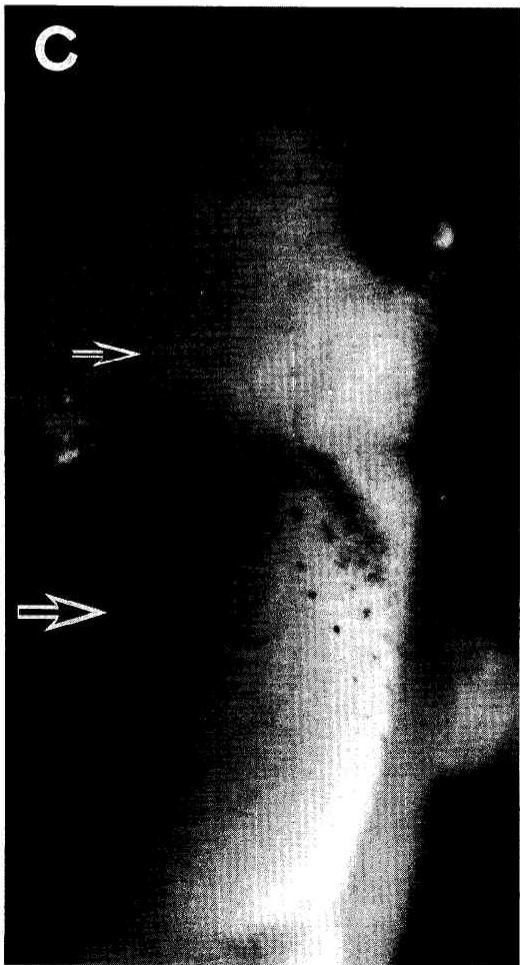
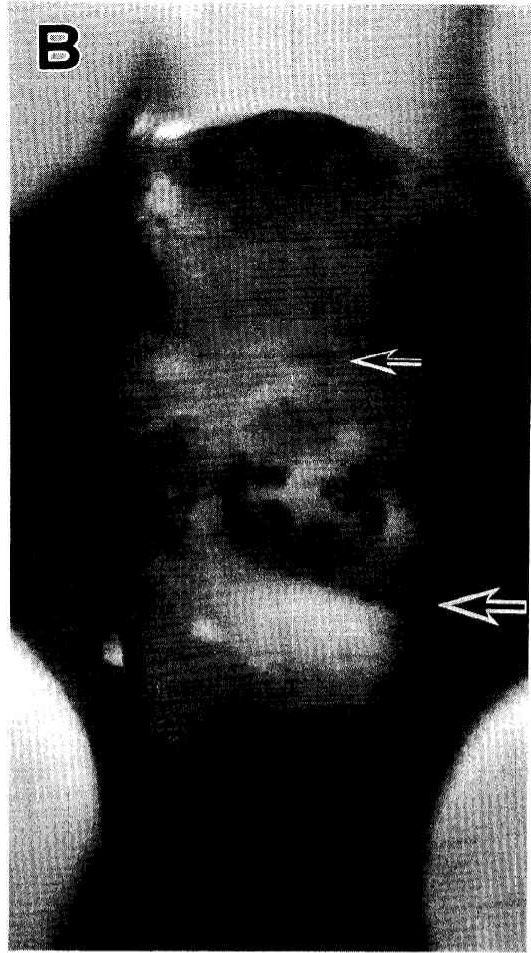
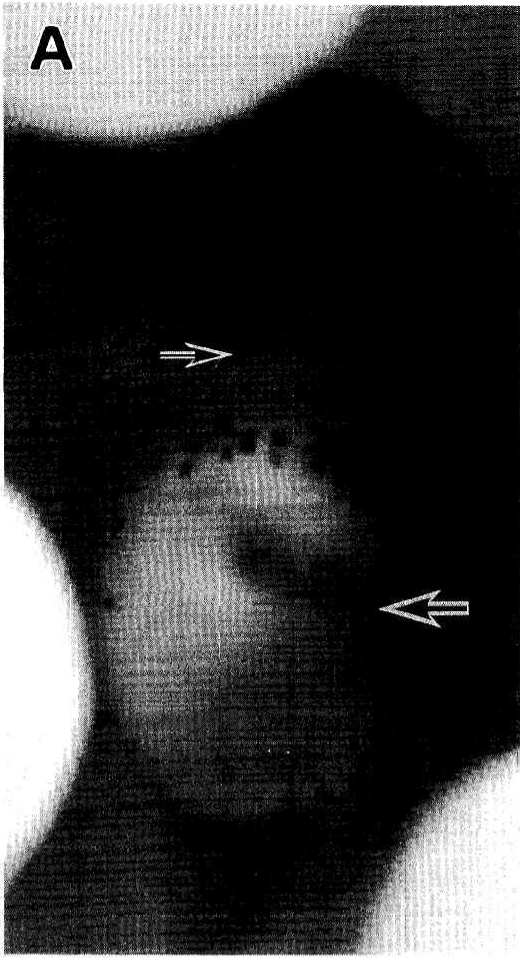


图 2

## 【附図の説明】

### 図 1

今回新たに我々の開発した簡便な ニワトリ胚の卵殻外全胚培養法。

図1A; 全胚培養に用いた植物培養用の容器。底面の直径8cm X 高さ7cm。上面の一カ所には、直径1cmの白いミリポアフィルターがとりつけられており、容器内の湿度を乾燥させ過ぎず、かつ無菌的なガス交換を容易にさせている。胚盤葉が容器内を満たした卵白液の水面直下に沈むように、Hank's液を40ml+水溶性卵白80mlの割合で混合して、その中に卵黄を浮かべた。

図1B; 容器全体をラックに並べ、インキュベーター内に設置したロータリーシェーカー(回転半径2.5cm)を用いて35 r.p.mで緩やかに攪拌しながら、湿度80%以上、38℃の条件で全胚培養した。

図1C; 我々の方法で得られた3日胚。種卵(H. H. stage 1)から91時間全胚培養することで得られたstage 19の胚。容器の蓋を開けた状態で観察すると、心臓の左右性並びに心臓回りの血流の方向性が容易に観察出来た。Barは1cm。

### 図 2

アドレナリン作動性神経伝達物質に暴露することで得られた逆位胚の腹面図。倍率40倍。

図2A; 比較対照のための正位の普通胚(stage 42)。心臓においては丸く膨らんだ動脈球(小矢印)が、心室に対して向かって左側(胚の右側)に位置する。

腸管においては、くびれ目が3時方向に存在する(矢印)。

図2B; norepinephrine処理(0.5mM)によって得られた心臓のみが逆位の胚(stage 42)。

腸管においてはくびれ目が3時方向に存在する(矢印; 正位)が、動脈球(小矢印)が、心室に対して、向かって右側(胚の左側)に位置する逆位となっている。

図2C; norepinephrine処理(0.5mM, st.11)によって得られた腸管のみが逆位の胚(stage 41)。動脈球(小矢印)が、心室に対して向かって左側(胚の右側)に位置するが、腸管においては、くびれ目が9時方向に存在する(矢印)。

図2D; octopamine処理(5 $\mu$ M, st.15)によって得られた、心臓/腸管ともに逆位の胚(stage 42)。

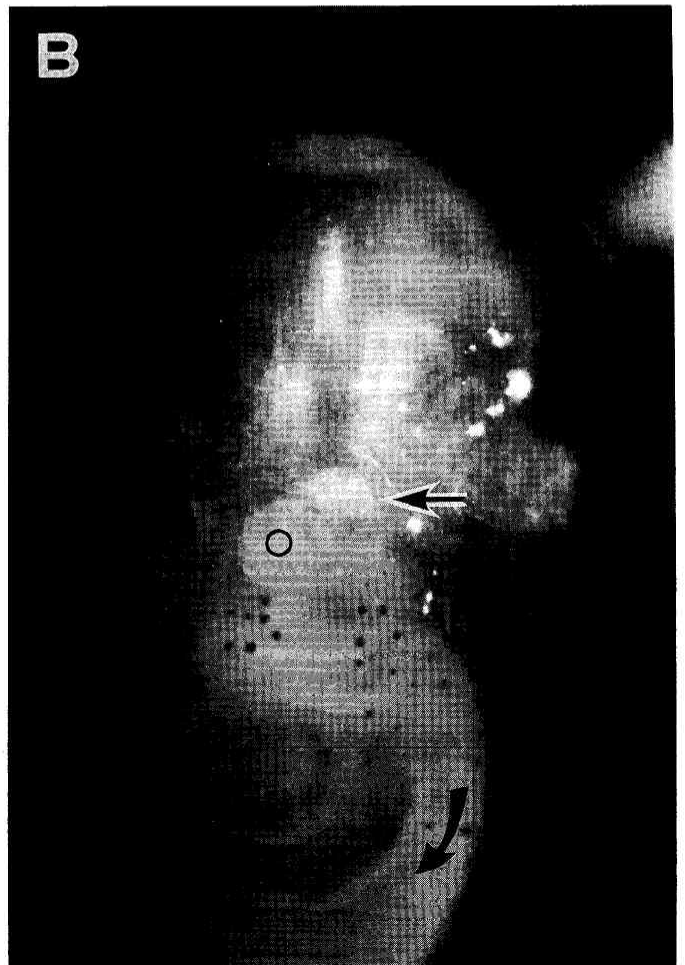
### 図 3

norepinephrine処理によって心臓逆位を示した胚を1ヶ月間飼育したもの。倍率40倍。逆位化した個体を池の水に戻して飼育したところ、完全に近い外形で生育した。



← ④ 3

↓ ④ 4





#### 図 4

50nMのcalcium ionophore A23187に暴露することで得られた、逆位の胚(stage 45)の腹面図。倍率40倍。

図4A; 比較対照のための正位の普通胚(stage 46)。心臓においては、丸く膨らんだ動脈球(矢印)が、心室(○)に対して、向かって左側(胚の右側)に位置し、血流がS字形を示す。腸管は反時計回りに巻き始めている。

図4B; A23187処理によって得られた心臓/腸管ともに逆位を示した胚(stage 45)。動脈球(矢印)が、心室(○)に対して向かって右側(胚の左側)に位置する逆位となっている。腸管の巻き方は、時計回りの逆位を示している。

#### 図 5

種卵(H. H. stage 1)から全胚培養しながら0.1mMのphenylephrineに暴露して得られた、心臓逆位胚。背側から撮影。ビデオ録画によって解析したところ、心室と動脈洞との前後軸に沿った位置関係は保存されていて、血流は後方から前方へ向かった。胚はねじれ(torsion)を示さなかった。心臓の左右性が判定できる発生段階に達するまで、無処理の対照群に比べ、20時間程度発生が遅れた。倍率5倍。

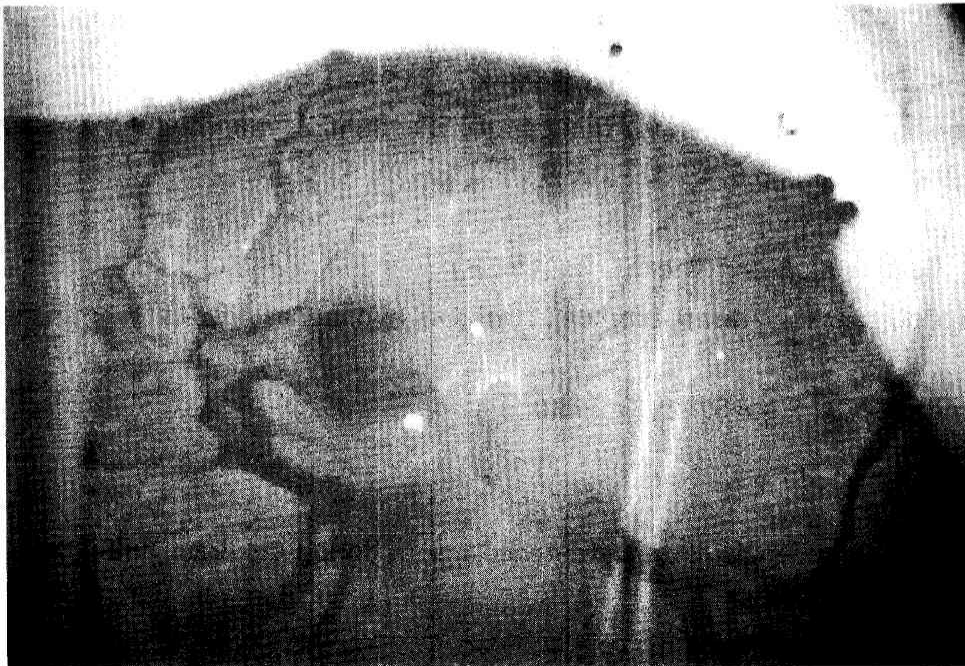


図 5

## 【参考文献】

Ahlquist, R. P. (1948)

A study of adrenergic receptors.

Am. J. Physiol. 153, 586-600.

Axelrod, J. and Saavedra, 1977

Octopamine.

Nature 265: 501-504.

Artinger, K. B. and Bronner-Fraser, M. (1992)

Partial restriction in the developmental potential of late emigrating avian neural crest.

Dev. Biol. 149, 149-157.

Black, I. B., Bohn, M. C., Jonakait, G. M., and Kessler, J. A. (1981)

Transmitter phenotypic expression in the embryo.

Ciba Found. Symp. 83, 177-193.

van Breemen, C., Aaronson, P., Loutzenhiser, R., and Meisheri, K. (1980)

Ca<sup>2+</sup> movements in smooth muscle.

Chest 78, 157-165.

Brown, N. A., McCarthy, A., and Wolpert, L. (1991)

Development of handed body asymmetry in mammals.

Ciba Found. Symp. 162, 182-201.

Brueckner, M., D'Eustachino, P. and Horwich, A. L. (1989)

Linkage mapping of a mouse gene i.v., that control left-right asymmetry of the heart and viscera.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5035-5038.

Cochard, P., Goldstein, M. and Black, I. B. (1978)

Ontogenetic appearance and disappearance of tyrosine hydroxylase and catecholamines in the rat embryo.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 75, 2986-2990.

David, J. C. (1984)

Relationship between phenolamines and catecholamines during rat brain embryonic development in vivo and in vitro.

J Neurochem. 43: 668-674.

Deitch, E. A. and Bridges, R. M. (1987)

Stress hormones modulate neutrophil and lymphocyte activity in vitro.

J Trauma 27, 1146-1154.

Doukas J., Hechtman, H. B., and Shepro, D. (1989)

Vasoactive amines and eicosanoids interactively regulate both polymorphonuclear leukocyte diapedesis and albumin permeability in vitro.

Microvasc. Res. 37, 125-137.

Dupin, E., Maus, M., Fauquet, M. (1993)

Regulation of the quail tyrosine hydroxylase gene in neural crest cells by cAMP and beta-adrenergic ligands.

Dev. Biol. 159, 75-86.

Fishman, J. E., Spaier, A. H. and Cohen, M. M. (1976)

Familial dextrocardia, divergent strabismus and situs inversus of optic disc.

Am. J. Med. Sci. 271: 225-231.

Fujinaga, M. and Baden, J. M. (1989)

Effects of nitrous oxide on rat embryos grown in culture.

Anesthesiology 71, 991-992.

Fujinaga, M. and Baden, J. M., Shepard, T. H., and Mazze, R. I. (1990)

Nitrous oxide alters body laterality in rats.

Teratology 41, 131-135.

Fujinaga, M. and Baden, J. M. (1991)

Evidence for an adrenergic mechanism in the control of body asymmetry.

Dev. Biol. 143, 203-205.

Fujinaga, M., Maze, M., Hoffman, B. B. and Baden, J. M. (1992)

Activation of alpha-1 adrenergic receptors modulates the control of left/right sidedness in rat embryos.

Dev. Biol. 150, 419-421.

Fujinaga, M., Hoffman, B. B. and Baden, J. M. (1994)

Receptor subtype and intracellular signal transduction pathway associated with situs inversus induced by  $\alpha$ 1 adrenergic stimulation in rat embryos.

Dev. Biol. 162, 558-567.

Gotou, T., Kinoshita, K. and Kinoshita, T. (1994)

Effect of calcium ionophore on the axis formation of *Xenopus laevis* embryos.

Zool. Sci. 11 (suppl.), p.84.

- Hauser, D. C., Levandowsky, M., Glassgold, J. M. (1975)  
Ultrasensitive chemosensory responses by a protozoan to epinephrine and other neurochemicals.  
Science 190, 285-286.
- Hummel, K. P., Chapman, D. B. (1959)  
Visceral inversion and associated anomalies in the mouse.  
J. Hered. 50, 9-13.
- Ibrahim, K. E., Couch, M. W., Williams, C. M., Fregly, M. J., and Midgley, J. M. (1985)  
m-Octopamine: normal occurrence with p-octopamine in mammalian sympathetic nerve.  
J Neurochem. 44, 1862-1867.
- Kahn, C. R., Coyle, J. T., and Cohen, A. M. (1980)  
Head and trunk neural crest in vitro: Autonomic neuron differentiation.  
Dev. Biol. 77, 340-348.
- Langer, S. Z. (1977a)  
Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release.  
Br. J. Pharmacol. 60, 481-497.
- Langer, S. Z. (1977b)  
Physiological significance of alpha-adrenoceptor-mediated negative feedback mechanism  
regulating noradrenaline release during nerve stimulation.  
Nature 265, 648-650.
- Langer, S. Z. and Hicks, P. E. (1984)  
Alpha-adrenoreceptor subtypes in blood vessels: Physiology and Pharmacology.  
J. Cardiovasc. Pharmacol. 6, 547-558.
- Layton, W. M. (1976)  
Random determination of a developmental process: reversal of normal  
visceral asymmetry in the mouse.  
J. Hered. 67, 336-338.
- LeDouarin, N. M., Renaud, D., Teillet, M.-A., and LeDouarin, G., H. (1975)  
Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblasts in interspecific chimeras after  
heterotopic transplantation.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 728-732.
- LeDouarin, N. M. (1986)  
Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny.  
Science 231, 1515-1522.

- Levin, M., Johnson, R. L., Stern, C. D., Kuehn, M., and Tabin, C. (1995)  
A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis.  
Cell 82, 803-814.
- Maxwell, G. D., P. D. Sietz and C. E. Rafford (1982)  
Synthesis and accumulation of putative neurotransmitters by cultured neural crest cells.  
J. Neurosci. 2: 879-888.
- McCorkle, F. M., Taylor, R. L. Jr., Denno, K. M., and Jabe, J. M. (1990)  
Monoamines alter in vitro migration of chicken leukocytes.  
Dev. Comp. Immunol. 14, 85-93.
- McGrath, J., Horwich, A. L., and Brueckner, M. (1992)  
Duplication/deficiency mapping of situs inversus viscerum (iv), a gene that determines left-right  
asymmetry in the mouse.  
Genomics 14, 643-648.
- McManus I. C. (1991)  
The inheritance of left-handedness.  
Ciba Found. Symp. 162, 251-281.
- Moiseiwitsch, J. R. D. and Lauder, J. M. (1995)  
Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7182-7186.
- Molinoff, P. and Axelrod, J. (1969)  
Octopamine: normal occurrence in sympathetic  
nerves of rats.  
Science 164, 428-429.
- Morrow, A. L. and Creese, I. (1986)  
Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of  
[3H]WB4104 and [3H]prazosin binding.  
Mol Pharmacol 29, 321-330.
- Nelson, M. T., Standen, N. B., Brayden, J. E., and Worley, J. F. (1988)  
Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels.  
Nature 336, 382-385.
- New, D. A. T. (1955)  
A new technique for the cultivation of the chick embryo.



J. Embryol. exp. Morph. 3, 326-331.

Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1967)

External and internal stage criteria in the development of *Xenopus laevis*.

In *Normal table of Xenopus laevis*, pp. 162

Elsevier/North Holland Co. (Amsterdam).

Palén, K. and Thörneby, L. (1976)

A simple method for cultivating the early chick embryo in vitro.

Experientia 32, 267-268.

Perry, M. M. (1988)

A complete culture system for the chick embryo.

Nature 331: 70-72.

Ruffolo, R. R. Jr. (1985)

Relative agonist potency as a means of differentiating alpha-adrenoceptors and alpha-adrenergic mechanisms.

Clin. Sci. 68 Suppl. 10, 9-14.

Ruffolo, R. R., Nichols, A. J., Stadel, J. M. and Hieble, J. P. (1991)

Structure and function of alpha-adrenoceptors.

Pharmacol. Rev. 43, 475-505.

Rowe, S. J., Messenger, N. J. and Warner, A. E. (1993)

The role of noradrenaline in the differentiation of amphibian embryonic neurons.

Development 119, 1343-1357.

Shepherd, G. M. (1988)

Neurotransmitters and neuromodulators.

In *Neurobiology* (2nd ed.) Oxford Univ. Press (Oxford)

pp.156-160.

Sieber-Blum, M. (1989)

Inhibition of the adrenergic phenotype in cultured neural crest cells by norepinephrine uptake inhibitors.

Dev. Biol. 136, 372-380.

Sliwa, L. (1994)

Chemotactic effect of hormones in mouse spermatozoa.

Arch. Androl. 32, 83-88.

Spemann, H., and Falkenberg, H. (1919)

Über asymmetrische Entwicklung und Situs inversus viscerum bei Zwillingen und Doppelbildungen.

Roux' Arch Entw mech Org 45, 371-422.

Yokoyama, T., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Montgomery, C. A., Elder, F. F. B. and Overbeek, P. A. (1993)

Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation.

Science 260, 679-682.

Yost, H. J. (1992)

Regulation of vertebrate left-right asymmetries by extracellular matrix.

Nature 357, 158-161.

\*\*\*\*\*

## 【謝辞】

本研究は、

総合理学研究所95年度共同研究

『脊椎動物胚に部域特異的な発生運命の変更をもたらす分子のスクリーニング』の一環として行われました。

本研究をご支援下さいました、総合理学研究所に深謝致します。