

## 頭部または尾部組織を欠損したツメガエル胚における内臓左右軸形成

### - 胚の中軸組織は内臓左右軸の向きに影響するか？ -

Left-right axis formation in the dorsalized or ventralized *Xenopus laevis* embryos:

Does dorsal-midline development affect the left-right orientation of visceral organs?

神奈川大学理学部応用生物科学科

豊泉龍児・樋口麻美・金田昌子・日野晶也・竹内重夫

Ryuji Toyozumi, Asami Higuchi, Masako Kaneda, Akiya Hino and Shigeo Takeuchi

#### 【要旨】

Yostら(1995)は、ツメガエル受精卵の表層回転を阻害することで頭部組織を欠損させた胚や、卵割期の背側割球に*Xwnt-8* mRNAを微量注射することで頭部組織を欠損させた胚において、心臓逆位が高率に生じることを発見した。彼らはその理由について「頭部中軸組織は内臓の左右軸の決定に関与する因子を放出するので、頭部が欠けると内臓が左右軸の手がかりを失い内臓逆位が生じる」とした。筆者らは、彼らとは異なる以下の3つの処理方法を用いて頭部欠損症状を持った胚を人工的に作出し、それらの心臓や腸管の左右非対称性の正位/逆位を調べた。頭部欠損の程度と内臓逆位の出現率とが相関するか否かを解析することで、Yostらの仮説の検証を試みた。

胚の頭部形成を阻害することが知られるレチノイン酸で短時間暴露処理(パルス処理)したツメガエル胞胚～神経胚の内臓逆位の出現率について調べた。1-10 $\mu$ Mレチノイン酸処理胚は著しい頭部欠損症状を示したにもかかわらず、それらの内臓逆位出現率は1% (3/263)と、無処理胚における逆位の自然発生率と同レベルであった。

カルシウムイオノフォアA23187のパルス処理によって、発生段階依存的に頭部欠損胚または尾部欠損胚が得られる(後藤ら, 1994)が、その場合の内臓逆位出現率について調べた。後藤らの報告では、初期卵割期の処理では胴尾部欠損胚が得られ、卵割後期～胞胚期の処理では頭部欠損胚が得られるとあるが、我々の実験結果はそれと正反対のものであった。初期卵割期の処理では頭部欠損が見られ、後期胞胚～原腸胚期の処理では胴尾部欠損(特に尾部欠損)が観察された。原腸胚期にA23187処理を行った胚の63%(15/24)が内臓逆位を示した。処理によって尾部を欠損した胚の多くは内臓逆位胚であった。

塩化リチウム処理で内臓逆位が生じることが、高谷(1949)によって明らかにされており、一方、品川ら(1989)により胞胚期～原腸胚期のリチウム処理で頭部欠損胚が得られることが報告されている。そこで、リチウム処理による頭部欠損の程度と内臓逆位の出現との相関について調べた。原腸胚期のリチウム処理で、11% (8/72)の個体に内臓逆位が生じた。同じ処理群の中に頭部が欠損した胚も多数得られ、頭尾軸欠損指標Dorso-Anterior Index(Kao & Elinson, 1988)の平均は4.35であった(n=72)。しかしながら、個々の胚について頭部欠損の程度と逆位発生との相関を調べると、逆位胚の75%はDAI 5の頭尾軸は正常な胚であり、頭部欠損の度合いと内臓逆位出現率とは相関がなかった。

以上の結果から、「胞胚期以降の胚においては、内臓の左右性に関連する位置情報はすでに心臓や腸管の予定細胞群自身が獲得していて、それらの左右軸は、頭部組織の有無に影響を受けない程度には決定されている。」と考えられる。

## 【序論】

高等脊椎動物の内蔵諸器官は、その外部形態の対称性とはうらはらに、体腔内において、著しい左右性を示すものがある(脾臓、膵臓、腸管、心臓....etc.)。古来から、発生学研究の中心的な問題として、この左右性の成立の機序は、発生学者の興味を掻き立ててきた。器官の左右性は、自然界においては通常一定の厳密な規則性がある。ところが希に、内蔵の左右性の逆転した個体が現れる。これを内蔵逆位という。人間にも、他の遺伝的な疾患症状と連動した形で逆位が現れることが知られている。

動物胚のからだは、頭尾軸・背腹軸・左右軸の3つの軸をもとに3次元的に構築される。先に頭尾軸や背腹軸が細長い胚体の中軸構造(神経管や脊索や体節)を左右対称につくりあげ、それから心臓や腸管の左右非対称性が顕在化してくる。胚の中軸構造と左右軸とは、干渉しあうことのない独立なメカニズムによって決定されるのだろうか?それとも両者は連鎖関係にあって、たとえ内臓器官を形成する予定運命の細胞群が無傷であっても、胚の中軸構造に生じた障害が内臓の左右軸に影響するのだろうか?

ツメガエル受精卵の表層回転を紫外線照射によって阻害することで、頭部組織が欠損\*した胚が得られることが知られている(Gerhartら, 1989)。DanosとYost(1995)は、こうして得られた頭部組織欠損胚において、心臓逆位が高率に生じることを発見した。頭部欠損の度合いが著しい胚ほど、逆位が高頻度で起こることも見出した。Xwnt-8 mRNAを卵割期胚の背側赤道域に注射することでも頭部欠損胚が得られる(Sokolら, 1991)が、この処理を行った場合にも頭部欠損の度合いと内臓逆位の発生率が正の比例関係にあった。これらの結果からYostらは『頭部中軸組織は、内臓の左右性を決定する』と主張した。

ゼブラフィッシュの脊索欠損突然変異胚*flh*(floating head), *ntl*(no tail)や、頭部背側組織を切除したツメガエル胚において、高頻度の内臓逆位が見出されるとの報告(Yostら, 1996)の中でも、彼らの主張は繰り返されている。

彼らの仮説が一般化できるものであるならば、Yostらとは別の方法で作出した頭部欠損胚においても、内臓左右軸は反転するはずである。そのように考えた筆者らは、頭尾軸に沿った欠損胚を高率で生じさせることが知られている以下の3つの処理を行った胚について、頭部組織の欠損が内臓逆位を誘起するか否かについて調査した。

\*レチノイン酸処理

\*カルシウムイオノフォアA23187処理

\*塩化リチウム処理

これらの物質に短時間浸したツメガエル胚を培養し、3日胚の時期に、頭尾軸に沿った中軸構造の欠損の度合いを調べた。処理胚が4日胚になってからは、心臓と腸管の左右非対称性が正常なもの(正位)か、左右反転したもの(逆位)かについて判定した。個々の処理胚における中軸構造の欠損の程度と内臓の左右性の正位/逆位の2つの情報を照合し、頭尾軸と左右軸との連鎖の有無について定量的に検討した。最後に、得られた結果をもとにYostの仮説についての検証を試みた。

\*.....本稿では、「欠損」という言葉を「矮小化」または「欠失(欠落)」と定義する。

## 【材料と方法】

特定の遺伝的なバックグラウンドを持たない野生型のアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を人工受精させて得た胚を材料にした。2.5%チオグリコール酸溶液(pH8.2)または2%システイン酸溶液(pH8.2)を用いて、第一卵割後に室温で脱ゼリーした。淡水相当の浸透圧を持つ10%スタインバーグ氏液(pH7.3)中で、必要な発生段階に達するまで室温(18~24°C)で培養し、(1)~(3)のいずれかの処理を室温で行った。

### <実験1/レチノイン酸処理>

レチノイン酸をDMSOに溶かしてから10%スタインバーグ氏液で希釈し、0.1-10 $\mu$ Mの濃度のレチノイン酸溶液を調製した。胞胚(stage 8)~神経管閉鎖期の初期尾芽胚(stage 20-22)をこれに30分間浸した。実験群におけるDMSOの最終濃度は0.1%以下になるようにストック溶液を調製した。

### <実験2/calcium ionophore A23187処理>

DMSOに予め溶かし10%スタインバーグ氏液で希釈した1 $\mu$ Mのcalcium ionophore A23187溶液に5分-1時間浸した。実験群におけるDMSOの最終濃度は0.1%以下になるようにストック溶液を調製した。予備実験により、死亡率を抑え、かつ頭尾軸に沿った欠損症状が最も大きくなる処理時間を探した。そのため、実験2の処理時間は初期卵割期胚(stage 4-6)で5-10分とし、後期胞胚~原腸胚(stage 9-10)に対しては60分とした。stage 2-3の初期卵割期胚は3-5分間の1 $\mu$ M A23187溶液処理で全滅した。

### <実験3/塩化リチウム処理>

0.3MLiCl-10%スタインバーグ氏液に胞胚(stage 8)~神経管閉鎖期の初期尾芽胚(stage 20-22)を10分間浸した。表3に処理条件を記した一部の例数については、濃度/処理時間がやや異なるものも集計に入れた。

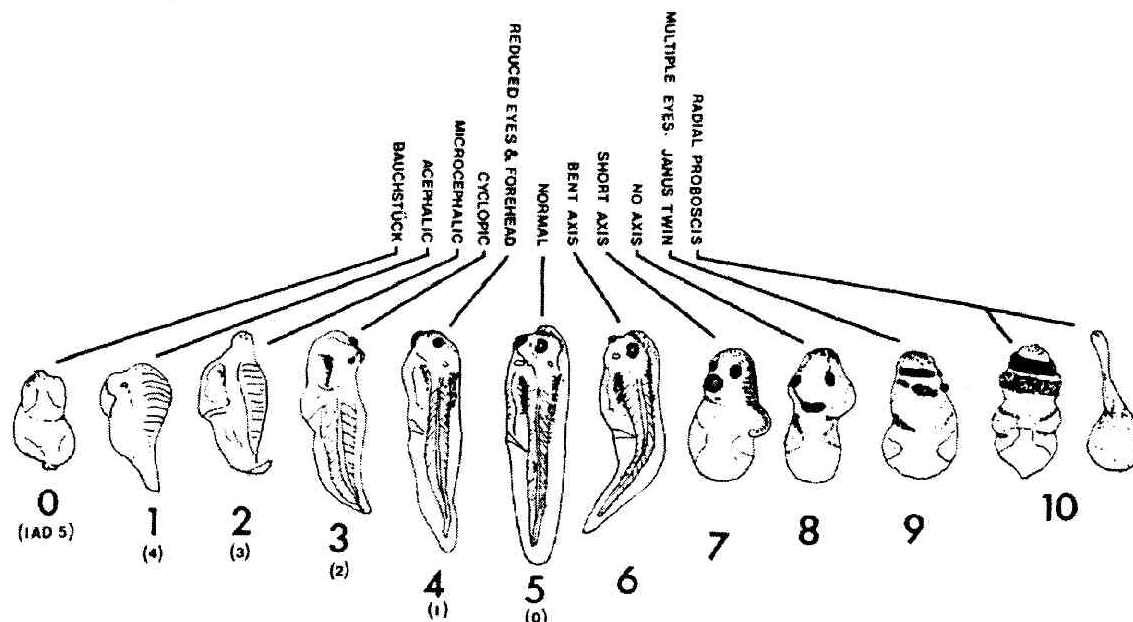
いずれの処理の場合も、処理後は10%スタインバーグ氏液で数回 胚を洗浄し、24穴マルチウエルプレート(岩城硝子製)に10%スタインバーグ氏液を2ml満たした中で18-24℃で飼育した。発生段階の同定はNieuwkoop & Faber (1967)の発生段階表をもとにおこなった。

3日胚(尾芽胚期)に達した胚の頭部または胴尾部の欠損の程度をKao & Elinson (1988)のDorso-Anterior Index(DAI)(図M-1)で定量化し、24穴マルチウエルプレートの各個室の上面に記録した。処理胚が4日胚に達してから、心臓と腸管の左右非対称性の正位/逆位を(主にstage42-45で)判定し、同様に24穴マルチウエルプレートの各個室の上面に記録した。こうして個々の処理胚のDAIと内臓の正位/逆位を両方とも追跡した。

判定に際しては、処理胚を生きた状態のままピペットに吸い込んで観察することで判定を行った(図M-2)。アフリカツメガエル胚の4日胚は透明なため、腹面の胚外皮越しに無傷のまま内臓器官の観察ができる。心臓と腸管の左右性の正位(正常胚の大部分が示す左右性を持つもの)と逆位(正位胚のそれとは左右非対称な臓器の配置/形態を持つもの)の判定を行った。本稿では、特に断らない限り心臓もしくは腸管の少なくとも一方が逆位を示す胚を「逆位胚」とした。心臓と腸管の両方とも逆位を示す胚を「全逆位胚」とした。

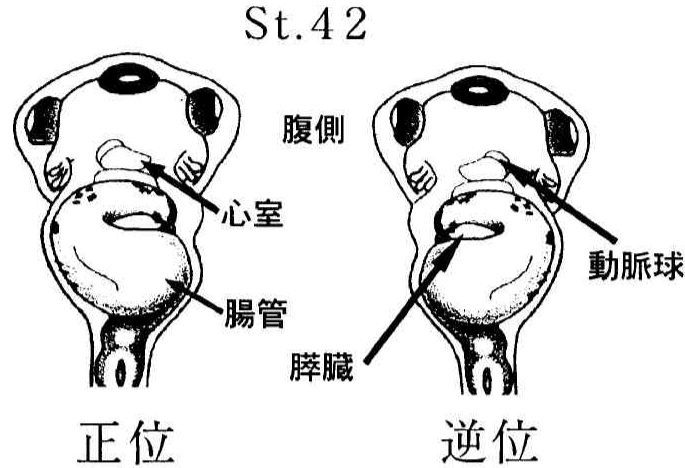
心臓の左右性の判定においては、心室から動脈球へ流れ込む血流の向きに着目した。心室に対し動脈球が胚の右側に位置するものを正位、左側に位置するものを逆位とした。腸管に関しては、stage 41-42において、腸管の最初のくびれ目が腹側から見て3時方向にできたものを正位、9時方向にできたものを逆位とした。stage 43以降の胚では、腸管は長さを増しながら、腹部体腔内で巻き始めるが、その巻き方の向きが反時計まわりのものを正位、時計まわりのものを逆位とした。

【図M-1】 Xenopus胚のDorso-Anterior Index (DAI) [Kao & Elinson (1988)による]



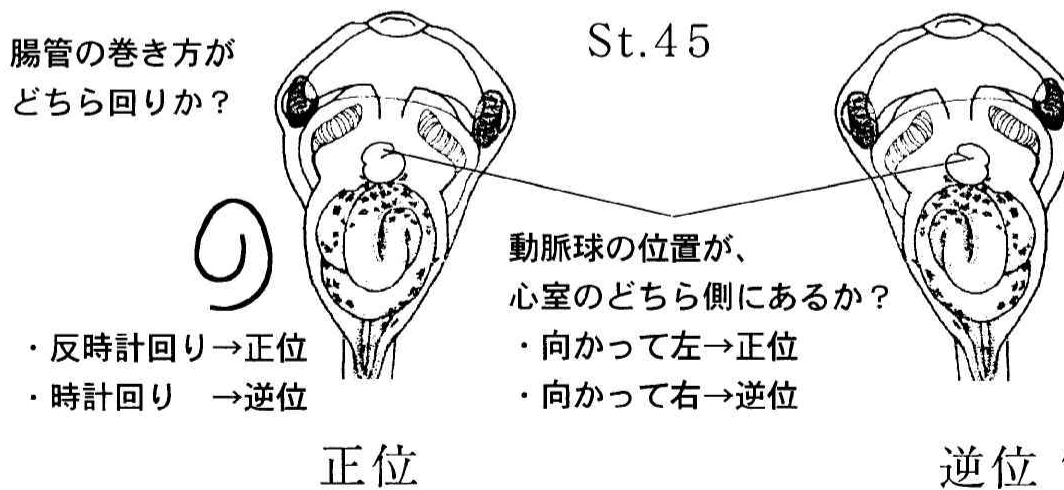
【図M-2】 ツメガエル4日胚の心臓ならびに腸管の正位/逆位の判定

左右性判定の基準 (初期4日胚 st. 41-42の場合)



St.42胚においては、  
心室に対して向かって右側に動脈球が存在するものを  
心臓逆位、向かって左側に腸にくびれができるものを  
腸逆位とした。

左右性判定の基準 (後期4日胚 st. 44-46の場合)



## 【実験結果】

### 実験1：レチノイン酸処理胚における内臓の左右性

ツメガエル初期胚をレチノイン酸処理することで、頭部の矮小化～欠失した胚が大変高率に生じることが知られている(Ruiz i Altabaら, 1991)。

コントロールとして、レチノイン酸をSteineberg氏液に溶かすための両親媒性溶媒であるDMSOのみを0.2-4%(v/v)含むSteineberg氏液中で飼育した胚の内臓の左右性について調べた。致死濃度以下の0.2%DMSO単独投与では、内臓逆位は生じなかった(表1-1)。

1-10 $\mu$ M レチノイン酸投与で、stage 8(胞胚)～stage 19(後期神経胚)のいずれの時期の胚も頭部矮小化を示した(n=263)。そのDAIは1.0(10 $\mu$ M, stage 8で処理)-4.5(1 $\mu$ M, stage 18-19で処理)の間に存在し、定量的にも明らかに頭部組織の欠失～矮小化の数値を示した(表1-1, 写真1)。次に、レチノイン酸のパルス処理で頭部組織が欠損した胚における、心臓や腸管の左右性について調べた。DAIの変動から明らかのように、レチノイン酸は頭尾軸には確かに作用していたが、得られた頭部欠損胚は自然逆位の発生率(2%)と同程度の逆位率しか示さなかった(n=263中3, 1%)。

レチノイン酸処理胚で内臓逆位を示したものが263処理個体中3胚あった。しかしながら、そのDAIは4が2個体、5が1個体であり、DAIが1-3の頭部が完全に欠失した胚に属したわけではなかった。即ちYostら(1995)が報告したような「頭部の欠失の度合いに比例して逆位が生じる」という傾向はなかった(表1-2)。

【表1-2】レチノイン酸処理胚における逆位発生例のDAI別集計

DAI	1	2	3	4	5(正常)
逆位胚数	(判定不可)	(判定不可)	0	2	1
逆位(%)	—	—	0	4	1
生存数	6	10	58	48	82

レチノイン酸処理胚のDAIはすべてDAI 5以下であった。

【表1-1】 レチノイン酸処理によって得られた頭部欠損胚のDAIと内臓逆位発生率

自然胚	調査数	正位	全逆位	心臓のみ逆位	腸のみ逆位	死亡	不明 (奇形)	逆位 (%)
	1127	1102	8	17	0	0	-	2.2%

RAなし

DMSO濃度: 0.2~4%

DMSO濃度	処理胚数	正位	全逆位	心臓のみ逆位	腸のみ逆位	死亡	不明 (奇形)
0.2	24	18	0	0	0	4	2
2	24	11	0	1	0	5	7
4	24	0	-	-	-	24	-
総計	72	29	0	1	0	33	9

RA濃度: 0.1 μM

DMSO濃度: 0.0001%

処理stage	処理胚数	正位	全逆位	心臓のみ逆位	腸のみ逆位	死亡	不明 (奇形)	DAI平均
10	23	18	0	0	0	2	3	5.0
1.7-1.9	48	42	0	1 (2%)	0	0	5	5.0

RA濃度: 1 μM

DMSO濃度: 0.01%

処理stage	処理胚数	正位	全逆位	心臓のみ逆位	腸のみ逆位	死亡	不明 (奇形)	DAI平均
8	24	0	0	0	0	9	15	2.5
10	24	16	0	0	0	5	3	3.7
12	24	0	0	0	0	11	13	2.8
1.8-1.9	24	24	0	0	0	0	0	4.5

RA濃度: 10 μM

DMSO濃度: 0.1%

処理stage	処理胚数	正位	全逆位	心臓のみ逆位	腸のみ逆位	死亡	不明 (奇形)	DAI平均
8	24	0	0	0	0	18	6	1.0
10	24	0	0	0	0	4	20	3.0
1.8-1.9	48	17	0	0	2 (4%)	9	20	3.4

レチノイン酸処理した総胚数 = 263

↑↑

うち、逆位を示した胚の総数 = 3

DAIに関しては濃度依存的に効いている

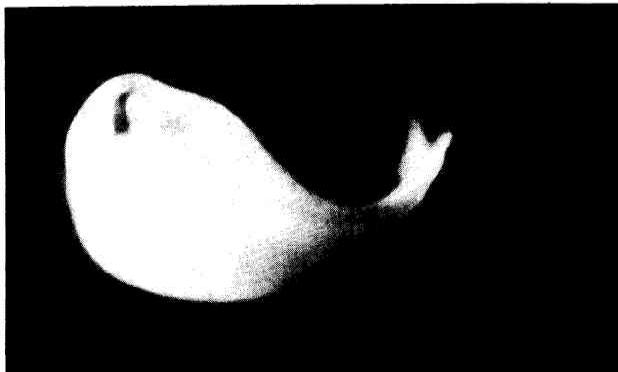
レチノイン酸による逆位発生率 = 1.1% (P.>0.1)

レチノイン酸処理によって、胞胚-後期神経胚の頭部が欠損したが、  
内臓逆位は自然胚レベルにしか生じなかった。(自然胚のデータは昨年度年報のものを再掲)

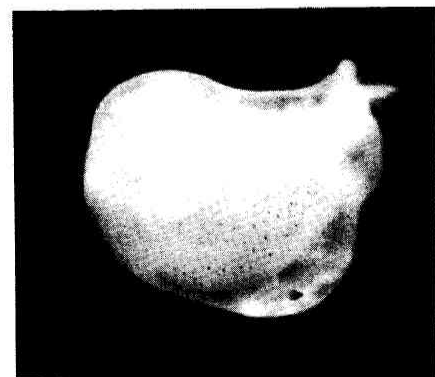
【写真1】 レチノイン酸処理によって頭部を欠失した胚の例

stage 10胚を1μMのレチノイン酸溶液に30分間暴露した。

DAI 3



DAI 1



## 実験2 : calcium ionophore処理胚における頭尾軸欠損と内臓逆位の相関

細胞内Ca<sup>2+</sup>イオンは細胞内情報伝達系においてセカンドメッセンジャー(シグナル分子)として働く。calcium ionophoreで細胞を処理すると、細胞外Ca<sup>2+</sup>イオンの流入ならびに細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン貯蔵プールからのCa<sup>2+</sup>イオンの放出が促され、細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度が上昇することが知られている。

calcium ionophore A23187のパルス処理によって発生段階依存的に頭部矮小化胚または尾部矮小化胚が得られることが知られている(後藤ら, 1994)。我々は、原腸胚期～神経管期のツメガエル胚をA23187に漬けたまま飼育すると、内臓逆位が最適条件下では50%の確率で生じることを見いだした('95総合理学研究所年報 '95 (1996), Develop. Growth & Differ.誌-印刷中)。以上の知見をもとに、卵割期～胞胚期のA23187パルス処理を行い、頭尾軸の形成不全と内臓逆位の出現率との相関について調べた。

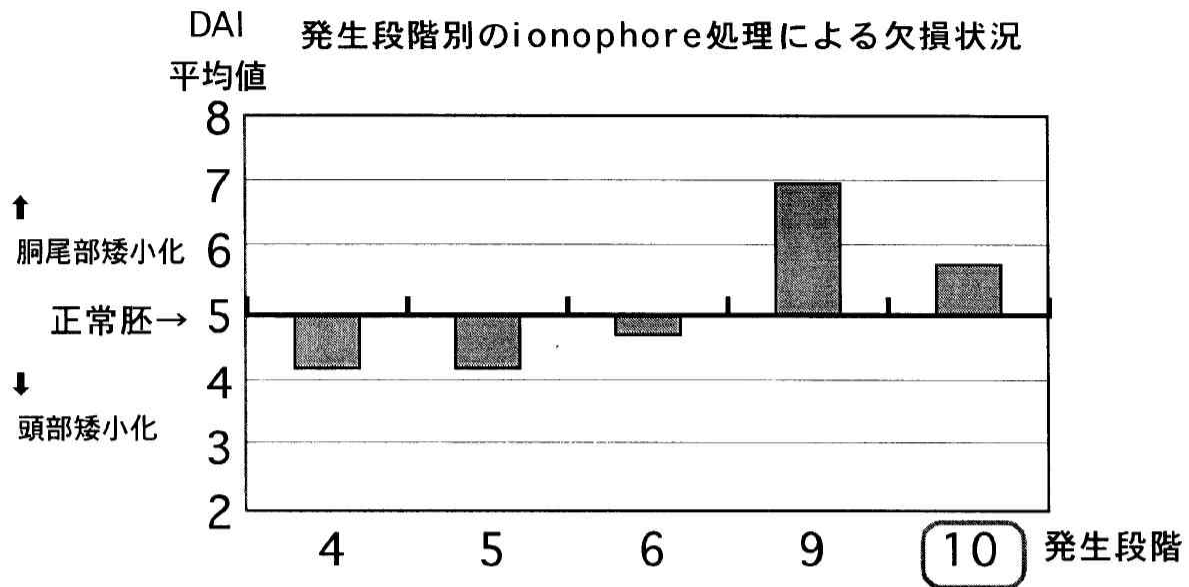
後藤らの報告では、『ツメガエル胚をカルシウムイオノフォアで処理すると、初期卵割期の処理では胴尾部の矮小化が、卵割後期から胞胚期の処理では頭部の矮小化又は欠損が観察された』(日本動物学会第65回大会予稿集-1994から引用)とある。しかしながら、彼らと同じcalcium ionophore A23187を同じ1 $\mu$ Mの濃度で用いて処理を行ったにもかかわらず、結果の発生段階依存性は、彼らと反対のものになった(図2)。即ち、初期卵割期であるstage 4, stage 5におけるA23187処理では頭部の矮小化～欠失が観察され(DAI平均値はいずれも4.2)、胞胚期であるstage 9や初期原腸胚期であるstage 10の処理では、胴尾部特に尾部の矮小化が観察された(DAI平均値はそれぞれ7.0, 5.7; 写真2)。

胚尾部の組織の矮小化が生じたstage 10の処理胚(DAI平均5.7)24例のうち、15例(63%)で内臓逆位が観察された。心臓のみが逆位を示すもの、腸管のみが逆位を示すもの、全逆位を示すもの、いずれのケースも得られた(全逆位 4例、心臓のみ逆位 5例、腸管のみ逆位 6例)。そこで、それらについて、DAIの数値と内臓の正位/逆位との相関を2x2表の形に集計した(表2)。24処理例中の逆位胚15個体の内訳は、DAIが5であるものが9例、DAIが6のものが5例、DAIが9のものが1例であった。従って胚の胴尾部の削れぐあいが高いものほど逆位が生じるという比例関係はなかった。しかしながら、DAIが6-7であった個体9例のうち、正位の胚は2例であるのに逆位の胚が5例もあったこと(表2のワク部分)から、胚の尾部欠損として表現される頭方化現象が左右軸の決定機構と連動している可能性がある。例数の追加が必要である。

stage 9の処理では 4日胚になるまで生存胚の大半が奇形を起こした。しかし4回の実験のうち1回は 処理胚24中11が内臓逆位であった。今後精密な実験条件の検討を行う必要がある。



【図2】



我々のイオノフォア処理の結果は、後藤らの報告(1994)と反対になった。

※初期卵割期の処理→頭部矮小化が生じた。

※後期胞胚の処理 → 胴尾部矮小化が生じた。

.....処理時間等の条件の違いのせいかもしれない。

内臓逆位が生じた。  
n=15/24

A23187処理胚のDAI 分布 (上のグラフの使用データ)

発生段階	DAI										DAI平均	判定数	総処理数	3日胚 生存率
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10				
4		1		9		2					4.2	12	24	50%
5	1	2	4	12	9	2	1				4.2	31	48	65%
6	2		1	8	25	5	1				4.7	42	120	35%
9					7	14	36	20	3	2	7	82	119	69%
10					14	6	3		1		5.7	24	24	100%

【表 2】

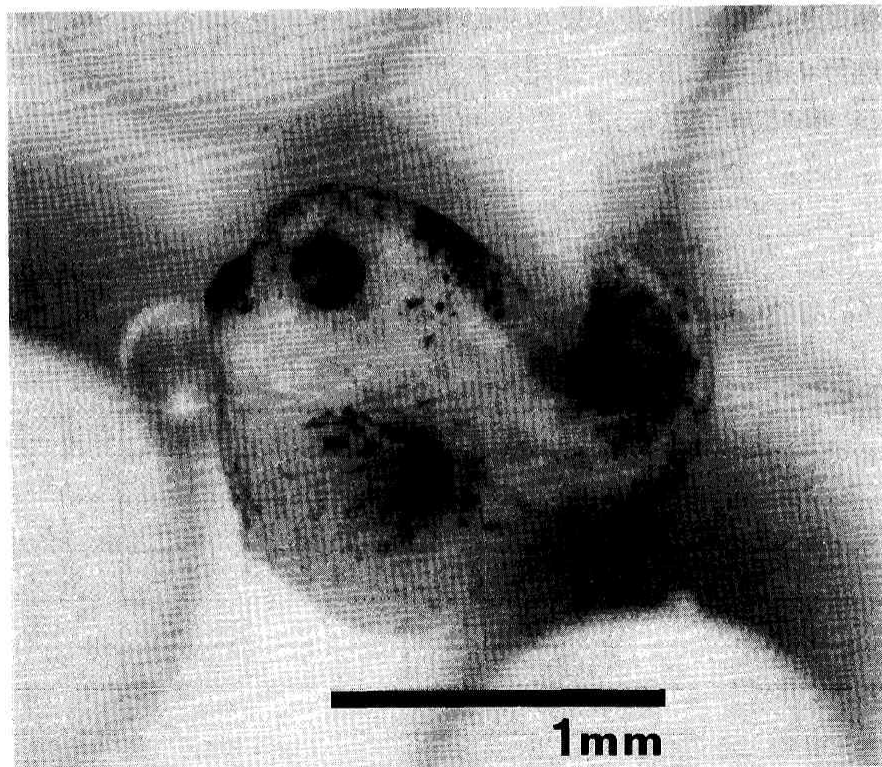
A23187 calcium ionophoreにおける内臓の左右性とDAIとの相関

処理条件 st. 10, 1 $\mu$ M, 60min.のパルス処理										例数	
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	24
正位				1	1	5					
逆位		1			5	9					
奇形				1							
死亡				1							
DAI判定後に死亡											

尾の先の無い胚が多く(DAI 6-7)、それらの大半は逆位を示した。

【写真2】

後期胞胚(stage 9)の時期に1 $\mu$ MのA23187 calcium ionophore溶液に60分間漬ける処理で尾部組織が著しく欠損した3日胚 (DAI=7)



### 実験3：塩化リチウム処理胚における頭部欠損と内臓逆位の相関

塩化リチウム処理で内臓逆位が誘起されることが、高谷(1949)によって明らかにされている。卵割期リチウム処理によって胴尾部欠損が起こることはよく知られているが、後期胞胚期～原腸胚期のリチウム処理では頭部欠損が生じる(品川ら, 1989)。そこで後期胞胚以降のリチウム処理によって、頭部欠損胚を作出し、個々の胚について頭部の矮小化～欠失の程度と逆位の発生率との関連について調べた。

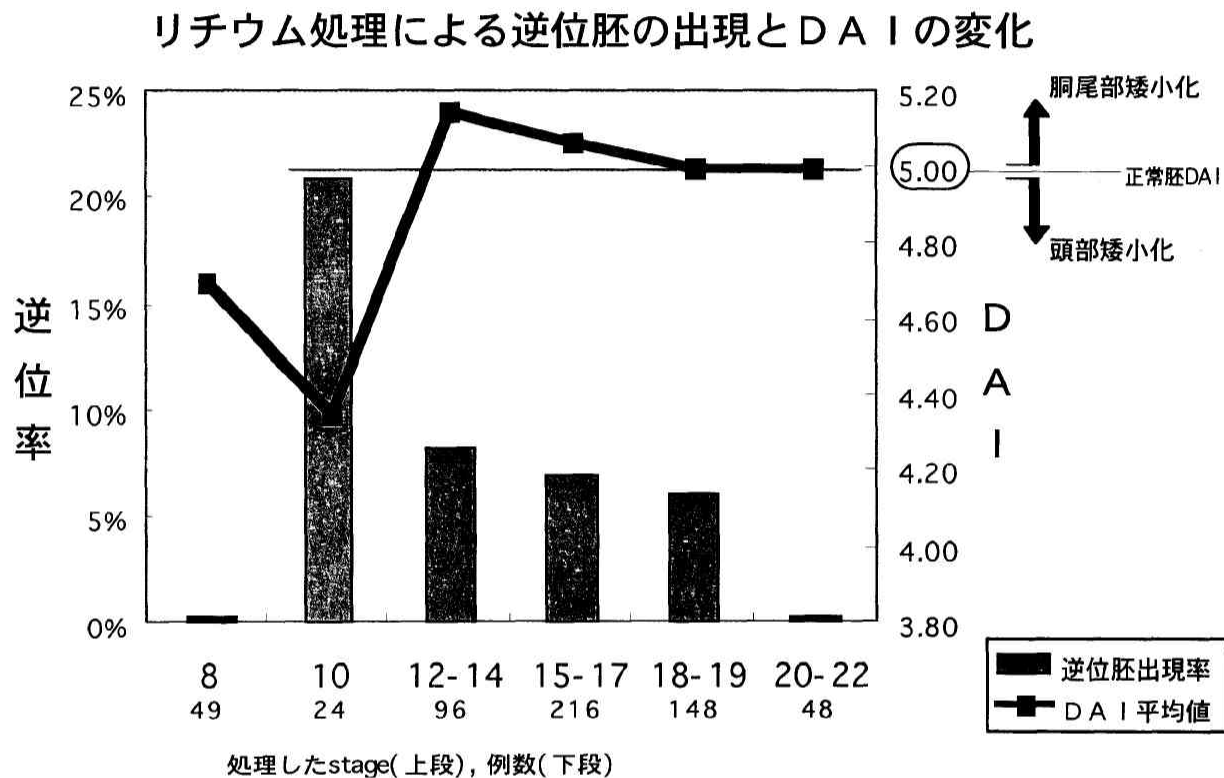
品川らの報告と同様に、後期胞胚期であるstage 8や原腸胚期であるstage 10におけるリチウム処理で、DAIがそれぞれ4.7 (n=49), 4.3 (n=24)である頭部欠損胚が得られた(図3)。神経胚期になるとリチウム処理による頭尾軸への影響はみられなくなった。stage 12-14 (神経胚期)での処理胚のDAIは5.1 (n=96)であり、stage 15-22での処理胚ではほとんどDAIが5の正常胚が得られた(n=412)。

内臓逆位の発生率については、stage 8(胞胚期)の処理では4日胚内臓の奇形率が高く、内臓の左右性を判定できなかった。stage 10胚(原腸胚)では処理胚総数のうち21%にあたる5例で内臓逆位が観察された。初期神経胚期～後期神経胚期を通じて8～6%の内臓逆位胚が得られた。リチウム処理による内臓逆位の発生率と、1127調査例中25例が逆位であった自然逆位胚の発生率の2.2%(神奈川大学総合理学研究所年報'95参照-1996)とを2X2分割表を用いたカイ二乗検定を用いて比較した。その結果、「stage 10-19における処理群の逆位発生率のいずれもが自然逆位発生率よりも有意に高い」と有意水準1%で判断された。上記の1127例の自然胚の調査時には、得られた自然逆位胚25例のうち、腸のみの逆位は1例も得られなかったが、リチウム処理によって心臓のみが逆位を示すもの、腸管のみが逆位を示すもの、全逆位を示すもの、いずれのケースも得られた(写真3)。表3の処理群において全逆位10例、心臓のみ逆位13例、腸管のみ逆位6例であった。神経管の閉鎖後のstage 20-22の胚においては逆位胚は全く観察されなかった(n=48)。この時期になると左右軸の最終的な決定がおこなわれ、その後はリチウム処理を行っても左右軸の変更が不可能になるものと考えられる。

stage 10以降にリチウム処理を行った胚216例について、頭部欠損の程度と内臓逆位の出現について表の形で整理した(表3)。DAI平均が4.3で、集団としては頭部が矮小化したstage 10のリチウム処理胚72例(図3の24例を含む)のうち、8例が逆位を示した。逆位胚のDAIの内訳はDAI 5が6例、DAI 3が2例であった。このことは、リチウムによる頭部矮小化胚については、「頭部の矮小化の度合いに比例して逆位が生じる...という傾向はない」ことを示している。

stage 12以降にリチウム処理をして得られた逆位胚21例のうち、20例までがDAI 5の全く正常な胚であった。stage 12-14の処理胚72例のうち7例が逆位を示したが、逆位胚のDAIの内訳はDAI 6が1例、DAI 5が6例であった。stage 15-16の処理胚72例のうち14例が逆位を示したが、逆位胚のDAIはすべて5であった。

【図3】



stage 8(胞胚期)のリチウム処理では、頭部矮小化は生じたが内臓は奇形であった。stage 10(原腸胚期)のリチウム処理では、内臓逆位も頭部の矮小化もみられた。stage 12以降(神経胚期)では、リチウム処理により内臓左右軸のみが変更を受け、頭尾軸異常は生じなくなった。

【表3】 リチウム処理胚における内臓左右軸とDAIの相関に関する調査

St.10

処理条件 0.3M-10min, 0.15M-15min, 0.03M-20minのいずれか 例数 72

	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
正位						42	1				3日胚以前に奇形↓
逆位						6		2			DAI判定出来ず
奇形						2	3	3	1	1	1
死亡						4	1	1	1		3
	DAI判定後に死亡										判定以前に死亡

St.12-14

処理条件 0.3M-10min

例数 72

	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
正位					1	59					3日胚以前に奇形↓
逆位					1	6					DAI判定出来ず
奇形				1		1					
死亡											3
	DAI判定後に死亡										判定以前に死亡

St.15-16

処理条件 0.3M-10min, 0.3M-30min, 0.15M-15minのいずれか

例数 72

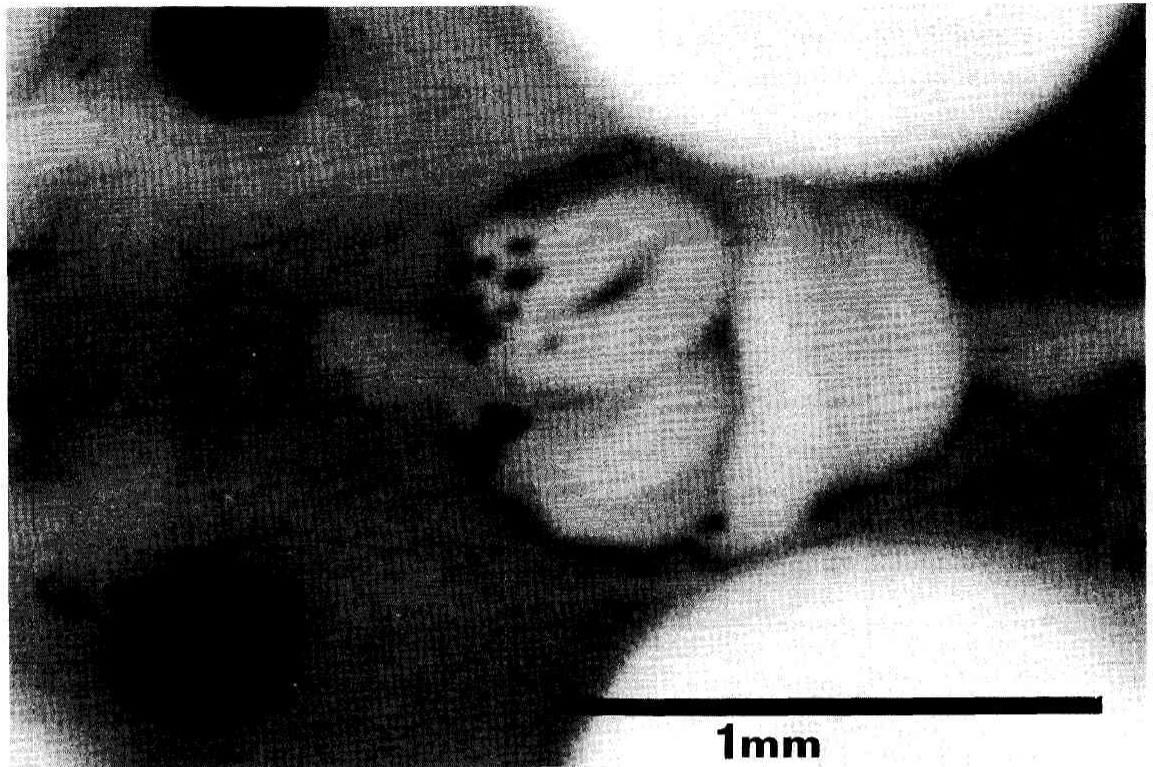
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
正位					1	57					3日胚以前に奇形↓
逆位						14					DAI判定出来ず
奇形											
死亡											
	DAI判定後に死亡										判定以前に死亡

stage 10(原腸胚)のリチウム処理では、多数の頭部矮小化胚が得られた。しかしながら個々の胚についてDAIの変化と内臓の正位/逆位を追跡したところ、逆位を示した胚の多くはDAIが5の頭尾軸異常を持たない正常胚であることが分かった。Yostらの仮説どおりならば「頭部欠損の度合いの著しい胚ほど、逆位が多く出現する」という傾向になることが予想されたが、そうははならなかった。

stage 12-16(神経胚)のリチウム処理では頭尾軸異常は生じず、内臓逆位のみが生じた。

【写真3】

リチウム処理によって得られた心臓逆位胚 stage 44胚で 腸は正位。  
stage 18の時期に0.3M塩化リチウム溶液に10分間 暴露処理した。左右性の判定については図M-2参照。



【結果のまとめ】

レチノイン酸処理：

処理で得られた頭部欠損胚は 内臓逆位を示さなかった。

calcium ionophore A23187処理：

処理によって引き起こされた胚細胞内部の細胞内Ca<sup>2+</sup>イオン濃度の上昇が、  
原腸胚の頭尾軸と左右軸の両方に作用することが分かった。

stage10(原腸胚)のA23187処理で、尾部欠損と内臓逆位が共に生じた。

尾部欠損胚の多くは内臓逆位を示した。

リチウム処理：

原腸胚期の処理で、頭部の欠損と内臓逆位が生じた。しかし逆位胚の大半はDAIが5で、  
頭尾軸に関しては正常な胚に逆位が生じていたといえる。

神経胚期のリチウム処理は胚の頭尾軸には影響せず、左右軸のみに作用した。

## 【考察】

レチノイン酸処理やリチウム処理で得られた頭部欠損胚においては、頭尾軸と左右軸との連鎖関係は生じていなかった。胞胚期以降の胚においては、心臓や腸管自身が内臓の左右性に関連する位置情報を既に備えていて、頭部中軸組織の有無の影響を受けなかったと考えられる。calcium ionophore処理による尾部欠損胚の多くは内臓逆位を示したことから、これらの尾部欠損胚においては後方の中軸組織が無かったことが内臓の左右軸に影響した可能性は残された。

### <Yostらの仮説に対する本実験の解釈>

リチウム処理の結果は、『頭部欠損の程度の大きい胚ほど逆位を生じやすい』という結果にはならなかった。更にレチノイン酸処理によって得られた頭部欠損胚が内臓逆位を殆ど示さなかったことから、Yostらの仮説に対して『頭部欠損処理のすべてが内臓逆位に繋がるわけではない』と結論される。

頭尾軸と左右軸の連鎖に関するYostらの結果と我々の結果との相違は、何処からきたのだろうか？筆者らは、用いた胚の発生段階の違いが主な原因であると考えている。Yostらの実験は、第一卵割前の受精卵や初期の卵割期の胚を用いている。

ごく初期の胚においては頭尾軸成立機構と左右軸成立機構とは不可分な連鎖関係にあるが、胚自身のzygoticな遺伝子の転写・翻訳が開始される中期胞胚期以降の胚では、頭尾軸の成立機構と左右軸のそれとの分離が進むのではないだろうか？（中期胞胚以前の胚は、卵細胞質中に大量に蓄えられたmRNAやタンパク質を元に発生することが知られている。）言い換えれば、Yostらが実験した極く若い発生段階の胚では、頭尾軸と左右軸とがまだ連動している時期であったので頭部欠損が内臓逆位をひきおこしたが、我々が実験に用いた中期胞胚より後の胚では、頭尾軸の成立機構と左右軸のそれとが分離独立していたので頭部欠損処理が内臓逆位を引き起こす原因とはなり得なかったのではないだろうか？このように考えると、Yostらの実験結果と本実験結果との結果の相違を、両実験に対して矛盾無く包括的に解釈出来ると思う。

Yostらは、内臓の左右性の正位/逆位を心臓のみについてしか見ていない。ツメガエル3日胚～4日胚前半にかけては、腸管は頭尾軸に沿って長細く分布している。頭部欠損と内臓一般の左右非対称性との関連を論じるにあたっては、頭部にとっても近い心臓のみならず、頭部から離れて分布している腸管についても、正位/逆位の判定を行うべきであろう。そのような視点から、心臓逆位と腸管逆位との出現頻度の差異について注意を払った。結果としては、実験群で逆位が出たリチウム処理とcalcium ionophore A23187処理の両方で心臓逆位も腸管逆位も出現したので、器官による差は特に見られなかったと言える。

動物胚の頭尾軸についての研究も、左右軸についての研究も、片方だけを扱った論文は多数ある。しかしながら、胚の頭尾軸と左右軸とは連動するか？という発生分野の研究者なら誰でもふと考える問題に現実に取り組んだYostらの研究は意外にも類を見ず、貴重なものに思われる。胚の左右軸成立機構に関して、新しい視点・着想の研究を世に問い続けているH. J. Yost博士の一連の著作に敬意を払いたい。

---

#### 【引用文献】

Danos, M. C. and Yost, H. J. (1995)

Linkage of cardiac left-right asymmetry and dorsal-anterior development in *Xenopus*.  
*Development* 121, 1467-1474.

Gerhart, J., Danilchik, M., Doniach, T., Roberts, S., Rowing, B., and Stewart, R. (1989).  
Cortical rotation of the *Xenopus* egg: consequences for the anteroposterior pattern of embryonic dorsal development.

*Development* 107 Suppl., 37-51.

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

Effect of calcium ionophore on the axis formation of *Xenopus laevis* embryos.  
*Zool. Sci.* 11 (suppl.), pp. 84.

Kao, K. R. and Elinson, R. P. (1988)

The entire mesodermal mantle behaves as Spemann's organizer in dorsoanterior enhanced *Xenopus laevis* embryos.

*Dev. Biol.* 127, 64-77.

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. 162-188.

Elsevier/North Holland Co. (Amsterdam).

Ruiz i Altaba, A. and Jessell, T. M. (1991)

Retinoic acid modifies the pattern of cell differentiation in the central nervous system of neurula stage *Xenopus* embryos.

*Development* 112, 945-958.

Sokol, S., Christian, J. L., Moon, R. T., and Melton, D. A. (1991).

Injected Wnt RNA induces a complete body axis in *Xenopus* embryos.

*Cell* 67, 741-752.



Takaya, H. (1949)

内臓逆位の問題 (Problems of the Situs Inversus Viscerum; in Japanese).

実験形態学(Exp. Morphol.) 5, 11-32.

Toyoizumi, R., Kobayashi, T., Oba, J., Kikukawa, A. and Takeuchi, S. (1997)

Adrenergic neurotransmitters and calcium ionophore induced situs inversus viscerum in *Xenopus laevis* embryos.

Develop. Growth & Differ. (印刷中)

豊泉・福田・菊川・大場・小林・高橋・塩尻・松下・竹内 (1996)

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

神奈川大学総合理学研究所年報'95 pp.21-47. (原報)

Yamaguchi Y. and Shinagawa A. (1989)

Marked alternation at midblastula transition in the effect of lithium on formation of the larval body pattern of *Xenopus laevis*.

Develop. Growth & Differ. 31, 531-541.

Nieuwkoop & Faberの発生段階表(1967)の図版は、以下のサイトから入手し、本稿の説明補助のため使用させていただきました。 <http://timpwrmac.clh.icnet.uk/xenopus.html>

---

### 【学会発表】

第49回 動物学会関東支部大会 一般口演 P-5 (1997/3/28, 於 神奈川大学)

---

### 【謝辞】

本研究は、神奈川大学総合理学研究所の助成による、理学部応用生物科学科竹内重夫研究室と日野晶也研究室の学内共同研究「水棲動物胚の左右軸に関する研究: 器官配置の逆位(situs inversus)誘発処理法の開発を中心として」の一環として行われました。本研究計画をご支援下さいました総合理学研究所所長ならびに所員各位にここに深謝致します。