

令和元年6月18日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08185

研究課題名(和文) 脳室上衣細胞の線毛は脳脊髄液流を制御できるか？：二枚貝鰓線毛による解析

研究課題名(英文) Can cilia of ventricular ependymal cells control flow of CSF?

研究代表者

瀬尾 芳輝 (SE0, Yoshiteru)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90179317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：水頭症の原因を解析する為に、脳室上衣細胞線毛運動の脳脊髄液の流れへの寄与を解明するために、二枚貝をモデル動物とした。微視的な線毛運動をビデオマイクロスコープで、巨視的な流れをMRIにより測定するシステムを構築した。海水の粘性を増加させたとき、特に水流速度の変化するときに、微視的な線毛運動と巨視的な水流の変化との間にギャップがあることが示唆され、モデル動物としての二枚貝類の有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳室上衣細胞線毛の運動性の低下したマウスが水頭症を発症することから、脳脊髄液の流れが線毛運動により制御されていると推察されている。しかし、哺乳動物の脳室内の線毛運動と流れを測定することは事実上不可能である。ビデオマイクロスコープとMRIを用いた本研究によって、二枚貝の鰓線毛と外套膜腔の水流剛体の解析が可能となる事が示された。二枚貝は実験動物への倫理的障壁も低く、良いモデルシステムとして水頭症の病因究明に貢献しうる。

研究成果の概要(英文)：In order to analyse hydrodynamics of cerebrospinal fluid in the hydrocephalus, contribution of cilia of ventricular ependymal cells was focused. Cilia of gills of bivalves were selected as a model system. Microscopic motion of cilia was observed by videomicroscopy, and the macroscopic water flow in the mantle was analysed by MRI. We found some discrepancy between the microscopic and macroscopic water movements, and this result suggested usefulness of the bivalves as a model system for the future study.

研究分野：生理学

キーワード：脳脊髄液 水頭症 線毛運動 鰓線毛 ムラサキイガイ ビデオマイクロスコープ MRI

1. 研究開始当初の背景

脳脊髄液は側脳室・第三脳室の脈絡叢で産生され、脳室からクモ膜下腔へ流れる。脈絡叢での脳脊髄液分泌圧が、脳脊髄液流を生み出していると考えられてきた。しかし、脳室上衣細胞の運動性線毛が欠如したり運動性の低下したマウスが水頭症を発症することから、線毛運動が水流を引き起こしているとの仮説が提案されている^(1,2)。線毛1本についての運動解析は進んでいるが、マクロスコピックな脳脊髄液の流れとの間には大きなギャップがある。例えば、ヒト中脳水道の脳脊髄液は、心周期に同期した ± 25 mm/sの流速変動を示し⁽³⁾、脳室上衣細胞の線毛運動の寄与は定かではない。

研究代表者は脳組織の血管・間質細胞、および脳室における対流について研究を進めてきた⁽⁴⁻⁶⁾。しかし、脳室上衣細胞線毛の運動性の低下したマウスが水頭症を発症するとの報告は、脈絡叢における分泌圧が主たる駆動力と想定していた研究者らには衝撃であった^(1,2)。光学顕微鏡は不透明な脳組織に阻まれ、MRI法では微細な線毛運動を直接観察することはできず、しかも、線毛1本レベルでの微視的な運動解析は多くされているが、その線毛が引き越すであろう巨視的な水流との間には研究上大きなギャップがある。線毛運動が脳脊髄液流を引き起こしているとの仮説を直接検証するのは、極めて困難と考えられた。そこで、二枚貝を用いた循環動態計測中に、水流が短時間で停止・再開することに気がつき、線毛運動による流れ研究に有効であることに気がついた。二枚貝の鰓の側線毛 (lateral cilia) は、鰓を透過する水流をおこしていると考えられている。しかし、単離した鰓糸を用いた *in vitro* 実験による流体力学的研究では、*in vivo* 実験による入水・出水流量の数分の1しかおこせないと推定されている⁽⁷⁾。すなわち、外套腔や鰓葉間腔などの鰓の周辺の水 flow の *in vivo* 計測がほとんど行われていないために、ミクロスコピックな線毛運動をマクロスコピックな水流とを統一的に解析することができていない。研究代表者は H₂S の循環器系への作用を深海性二枚貝をモデル動物として研究を進めてきた (挑戦的萌芽 24659102 : 2012-2013)。MRI法により世界で初めて、鰓血管の血流速度の測定に成功した⁽⁸⁾。その測定中に、すぐ横の鰓葉間腔を流れる水流速度が、鰓血管血流速度と同程度 (10-30 mm/s) であることを確認した。従来の鰓の側線毛の研究は、摘出した鰓を用いた *in vitro* 実験であったが、MRI法を用いれば、鰓葉間の水流速度を全く非侵襲的に *in vivo* 測定することができる。さらに、時折、水流が停止し、再開すると1分程度で定常流まで回復することに気がついた。従来の流体力学的研究は、定常流での解析であったため、大きく条件を変化させることができなかったが、鰓の水流再開時の流速上昇過程を実測し解析できれば、マクロスコピックな水流への線毛運動の寄与をより詳細に解析できると考えた⁽⁹⁾。

< 引用文献 >

- (1) Fliegau M et al., Nat Rev Mol Cell Biol 8:880-893 (2007)
- (2) Suzuki T. et al., Human Mol Gen 18:1099-1109 (2009)
- (3) Yoshida et al., Magn Reson Med Sci 8:91-100 (2009)
- (4) Takamata A et al., Jpn J Physiol 51:555-562 (2001)
- (5) Seo Y et al., J Physiol 545:217-228 (2002)
- (6) Seo Y et al., J Physiol Sci 61:259-266 (2011)
- (7) Jørgensen CB, Marine Biol 70:275-281 (1982)
- (8) Seo E. et al., J Exp Biol 217: 964-973, 2014 (doi:10.1242/jeb.092577)
- (9) Seo E. et al., J Exp Biol 217: 2277-2287, 2014 (doi:10.1242/jeb.101949)

2. 研究の目的

脳室上衣細胞の運動性線毛が欠如したマウスは水頭症となることから、線毛運動が脳脊髄液の流れを引き起こしているとの仮説が提案されているが、直接証拠はない。本研究では、二枚貝の鰓水流が短時間で停止・再開することに着目し、停止・再開時の側線毛の運動と流速変化をビデオマイクロコピー法とMRI法にて *in vitro* から *in vivo* まで同一条件下に測定する。海水の Reynolds 数を変化させたり、線毛運動の刺激薬や阻害薬を投与した条件でも測定し、微視的な線毛運動による巨視的な流れの制御機構を、流体力学的解析により統一的に明らかにする。そして、二枚貝をモデル動物として、脳脊髄液の流れの制御機構への脳室上衣細胞線毛運動の寄与を検討する。

3. 研究の方法

本研究課題では、1) 倒立顕微鏡で鰓側線毛1本レベルの運動を解析する。2) MRI法によって、入水口、下外套膜腔、鰓葉間腔、上外套膜腔、出水管の各部位における、水流速度と水流方向を *in vivo* 測定する。そして、3) 実体顕微鏡により、側線毛運動から *in vivo* で水流測定までを行い、1)、2)のギャップを埋める。4) 線毛運動は流体力学的には非常に小さい Reynolds 数 ($Re \ll 1$) を持つので、海水の粘性が大きく影響する⁽¹⁰⁾。よって、PVP やデキストランを用い海水の粘性を大きくし、その影響を測定する。また、セクレチンによる線毛運動刺激作用

を、線毛レベルおよび個体レベルで確認する。さらに、5) T1 強調画像の inflow artifact から 1 秒間隔で水流速度を測定し、水流の停止および再開時の水流変化を測定する。最終的には、水流再開時の変化を画像化し、水流速度の変化を定量し解析する。

< 引用文献 >

(10) Riisgård HU & Larsen PS, Mar Ecol Prog Ser 343:141-150 (2007)

4. 研究成果

平成 27 年度では、まず、二枚貝の鰓側線毛運動による水流測定に最適化したビデオマイクロスコープシステムの構築を完了させた。当初計画では、蛍光測定のための光源は、現有のものを流用する予定であったが、運用に多々困難があったため、光源を含めたシステムで購入した。このため、実体顕微鏡システム全体の購入経費が平成 27 年度経費の 91.4%となったが、消耗品費の削減で対応することができた。In vivo での巨視的な水流は、ケイ藻の葉緑体の自家蛍光を観察することで間接的に評価する方法を確立しつつある。セロトニンを投与することで濃度依存的にケイ藻の流れる速度が速くなることも確認した。ただし個体差が大きいため、結論を出すには例数が必要であることが確認された。

これとは別に、巨視的な流れを生み出す微視的な線毛運動を観察するために、単離した鰓系の側線毛の運動を、倒立位相差顕微鏡およびハイスピードカメラを用いて観察、記録した。その結果、in vivo 実験と同様にセロトニン濃度依存的に線毛の振動数が増加することが分かった。ただし単離した鰓系の側線毛においても個体差が大きかったため、今後は例数を重ねていく。それと同時に、側線毛が密に生えていて観察がしづらいため、線毛に蛍光マイクロスフェアを付着させた状態で観察する条件について検討する事とした。

一方、T1 強調 MRI 画像の連続測定画像の inflow effect による流速測定では、毎秒 1 枚を予定していたが、0.32 秒間隔で毎秒 3 枚まで測定が可能となった。これにより、ダイナミックな流速変化の測定に対応できるようになった。

平成 28 年度は、まず、ビデオマイクロスコープシステムにより、in vivo での巨視的な水流へのセロトニンの効果について例数を加えた。また、単離した鰓系の側線毛の運動を、倒立位相差顕微鏡およびハイスピードカメラを用いて観察、記録した。in vivo 実験と同様にセロトニン濃度依存的に線毛の振動数が増加することが分かった。また、側線毛が密に生えていて観察がしづらいため、線毛に蛍光マイクロスフェアを付着させた状態で観察することを試みたが、条件を検討中で試行段階に留まった。

一方、T1 強調 MRI 画像の連続測定画像の inflow effect による流速測定では、PVP を用い海水に粘性を加え、入水管、下外套膜腔、出水管の各部位における水流速度を推定した。個体差は大きいものの、単離鰓系線毛の in vitro 研究報告に反し、粘性を増加させた時の水流速度の低下は予測ほどは変化しなかった。殻の開口角が大きくなる傾向が認められ、流路抵抗を減少させて、水流量を確保している可能性が示唆された。

個体差が大きいこと、また、ダイナミックな流速変化と心拍動との関連が示唆されたので、ビデオマイクロスコープシステムおよび T1 強調 MRI 画像法と同時測定が可能で、赤外プレチスモグラフィ法 (IRP 法) の測定を試みた。T1 強調 MRI 画像法との同時測定から、心拍動による IRP 波形の同定を行い、学術誌に発表することができた。ただ、平成 28 年夏場の天候のためか、夏場以降にムラサキイガイを得ることができず、十分な実験データの蓄積ができなかった。その為、同じイガイ類のシンカイヒバリイガイや、淡水生のイシイガイなどを用いて、生理的な状態や活動と、心拍動と鰓の水流の変化について、補足的な実験を進めたが、十分には遅れを取り戻せなかった。

平成 29 年度の研究では、セロトニン濃度依存的に in vivo での水流、および in vitro での線毛の振動数が増加する傾向があることが分かった。さらに、0-1%の PVP K90 により人工海水の粘性を上げると、in vivo での水流が減少する傾向があることも分かった。しかし、人工海水の粘性を上げた際の in vivo 水流の個体差は非常に大きく、粘性の影響を正確にとらえることが出来なかった。個体差の原因を検討したところ、人工海水の粘性を段階的に上げていく過程で、粘性の増加とは無関係にランダムな鰓側線毛の活性化/非活性化が起こってしまうために、実験ごとの誤差が大きくなることが分かった。そこで、セロトニンを 10^{-7} M の濃度で作用させた際に最も in vivo 水流が速くなる結果に着目し、 10^{-7} M のセロトニンによりランダムな鰓側線毛の活性化/非活性化を抑えた上で、PVP K90 により人工海水の粘性を上昇させた際の in vivo 水流への影響を調べた。その結果、1% PVP K90 により有意に in vivo 水流が遅くなることが分かった。一方 in vitro の線毛運動に対する人工海水の粘性の有意な影響は見られなかった。これらの結果は、微視的な線毛運動と巨視的な水流の間にギャップがあることを示唆している。

ただ、研究代表者が、第 45 回日本磁気共鳴医学会大会 (宇都宮市、平成 29 年 9 月 14-16 日、参加 1700 人) の大会長に指名された。コンベンション業者の力量不足などのため、研究分担者を含め教室員全員が 4 月から 10 月までの半年間、大会準備に忙殺され、本研究課題の実験

をほとんど行うことができなかつた。秋以降は実験に適したムラサキガイが入手困難であった。本研究をより精緻に達成するために、1年間の研究期間の延長を行った。

平成30年度の研究では、位相エンコードMRI法によるin vivoでの巨視的な水流への人工海水の粘性の影響を評価した。その結果、PVP K90の濃度依存性(粘性依存性)にin vivoでの外套膜腔の水流速度が抑制されることが確認できた。ビデオマイクロスコーピー法に比べ、個体差は比較的小さい範囲に収まり、再現性の良い測定が行えた。一方で、T1強調MRI画像の連続測定画像のinflow effectによる流速測定では、海水の粘性が高くなっても、巨視的な水流速度の変化速度は、大きくは減少せず、現在、水力学的解析を検討している。関連して、同じく線毛運動による輸送が重要視されている腎臓への濾液の輸送についても検討し、派生論文として発表することができた。

以上の研究によって、MRI法によりin vivoでの巨視的な水流を間接的に評価する方法、およびビデオマイクロスコーピー法により巨視的な流れを生み出す微視的な線毛運動を観察する方法を確立した。ムラサキガイの個体差が予想以上に大きかったことや、天候や学会の主催などのアクシデントはあったものの、最終的に、微視的な線毛打と巨視的な水流の間にギャップがあることを示唆する新たな知見が得られた。目下、水力学的解析を進め、論文での発表を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Wakashin, H., Seo, E., Seo, Y.
Accumulation and excretion of manganese ion in the kidney of the *Mytilus galloprovincialis*.
Journal of Experimental Biology, 査読有, 221, 2018, jeb.185439.(doi: 10.1242/jeb.185439)
[Epub ahead of print]

Seo E, Sazi T, Togawa M, Nagata O, Murakami M, Kojima S, Seo Y.
A portable infrared photoplethysmograph: Heartbeat of *Mytilus galloprovincialis* analyzed
by MRI and application to *Bathymodiolus septemdierum*. Biology Open, 査読有, 5(11),
2016, 1752-1757, doi: 10.1242/bio.020909

〔学会発表〕(計 6 件)

Y Seo, H Wakashin, E Seo. Accumulation of Mn²⁺ by kidney of bivalve. 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2018年3月28-30日、サンポートホール高松、高松市

Y Seo, T Sazi, M Tagawa, O Nagata, M Yokoi-Hayakawa, Y Imaizumi-Ohashi, M Murakami. Heart rate measurement by T_{1w}-MRI and infrared photoplethysmography of *Mytilus galloprovincialis*. 44th Annual Meeting of Japanese Society of Magnetic Resonance in Medicine. 2016年9月9-11日、大宮ソニックシティ、大宮

Y Seo, E Seo, T Ikuta, T Maruyama, S Kojima. Noninvasive analysis of cardiovascular function of deep-sea bivalves by 7 T MRI. 27th International Conference of Magnetic Resonance in Biological Systems. 2016年8月21-26日、国立京都国際会館、京都

Y Seo. Noninvasive analysis of cardiac function of inside shells by using MRI and photoplethysmography. 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2016年3月22-24日、札幌コンベンションセンター、札幌

Y Seo. Visualization of water flow in mantle cavity of bivalves by 7 T MRI. 13th International Conference of Magnetic Resonance Microscopy. 2015年8月6日. Technische Universität München, München, Germany.

瀬尾 芳輝 二枚貝鰓水流の動態: *Mytilus* is not a boring black shell. 第55回中海海底工学フォーラム. 2015年4月10日、東京大学、東京

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 竹井 元

ローマ字氏名： (TAKEI, gen)

所属研究機関名：獨協医科大学

部局名： 医学部

職名： 助教

研究者番号(8桁)： 00708183

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 中張 隆司

ローマ字氏名： (NAKAHARI, takashi)

研究協力者氏名： 若新 英史

ローマ字氏名： (WAKASHIN, hidefumi)

研究協力者氏名： 瀬尾 絵理子

ローマ字氏名： (SEO, eriko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。