

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580411

研究課題名(和文)キンカチョウの単一嗅球を嗅覚研究モデルにするための基盤研究

研究課題名(英文)Morphological and histochemical studies of the nasal cavity and fused olfactory bulb of the Zebra finch, *Taeniopygia guttata*

研究代表者

横須賀 誠 (Yokosuka, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授

研究者番号：90280776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：キンカチョウの鼻腔と嗅上皮の形態学的特性を解析した。また、行動観察でこのトリの餌好選性の有無、ニオイによる嫌悪学習試験の可能性を解析した。その結果、(a)他のスズメ目と同様に左右独立した1対の嗅神経束が存在し嗅球は左右区別のない単一嗅球であることが確認された。さらに(b)鼻腔の構造は単純である、(c)鼻腔の最後部に嗅上皮が存在する、(d)嗅上皮は嗅細胞、支持細胞、基底細胞で構成されている、(e)線毛と微絨毛を共存する嗅細胞が存在する、などを確認した。(f)ニオイ情報による嫌悪学習試験の成立は確認出来なかった。本研究によって、キンカチョウの嗅覚系の形態学的基盤を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the anatomical and histological properties of the nasal cavity and olfactory bulb of the zebra finch to investigate its functional level of the olfaction. In the nasal cavity of the zebra finch, although the anterior and maxillary conchae were clearly observed, there was obscure structure equivalent to the posterior concha. The olfactory epithelium of the zebra finch occupied remarkably small area of the posterior concha and had the histological and ultrastructural features of the olfactory receptor cells like already reported other avian species. The ratio of the OB size to that of the cerebral hemisphere was very small. The left and right OB were completely fused and located on the ventral side of the anterior extremity of the cerebrum. Our results suggested that the zebra finch has a limited sense of olfaction, as same as other passeriforme avians.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：キンカチョウ 嗅上皮 嗅細胞 鼻腔 単一嗅球

1. 研究開始当初の背景

鳥類の感覚の研究は聴覚を中心に行われてきた。メンフクロウをモデルとした「音による空間認知機構」の研究、鳴禽類をモデルとした「歌学習のメカニズムと臨界期の関係」の研究は、鳥類にとどまらずヒトの感覚系と学習成立に関わる神経機能解明に大きな貢献をしている。視覚研究も盛んで、網膜の吸収波長と視細胞の性質との関連性、網膜情報を脳に伝える神経節細胞の投射様式の研究などが展開され、脊椎動物における色覚や形態認知機構を考察する重要な所見を提供している。一方、嗅覚に関しては、ナンキョククジラドリが繁殖相手の選択に体臭を利用していること、鳩が帰巢に匂いを利用していることなど、行動学的にトリが匂いを感知していることは報告されている。しかし、嗅覚に関わる神経系の理解は極めて乏しく、キウイなど肉食系のトリの嗅球は大きく、スズメなど匂い感知が乏しいと予想されるトリでは嗅球が小さいという古典的解剖所見から嗅覚を予想するにとどまっている。

このような研究動向の中、報告者は野生のカラスやヒヨドリの嗅覚系を形態学的に解析し、これらスズメ目の嗅覚系がユニークな形態をもつことを明らかにしてきた(図1)。その特徴は、鼻腔・嗅神経とも一般動物と同様に左右独立に存在(図2)するが、嗅球は左右区別のない“単一嗅球”であること(図2)。また、一般のトリで嗅上皮を形成する後鼻甲介(PC)の発達が乏しく、代わりに中鼻甲介(MC)に嗅上皮を分布させている、というものであった。この所見は、カラスやヒヨドリにも嗅覚系が存在することを証明すると同時に、小さく維持された嗅覚系がどのような匂い分子の認識に必要なのか、単一嗅球であるにも関わらず左右の嗅神経回路が他動物と同様に独立して存在するのは何故かという疑問を生むに至った。

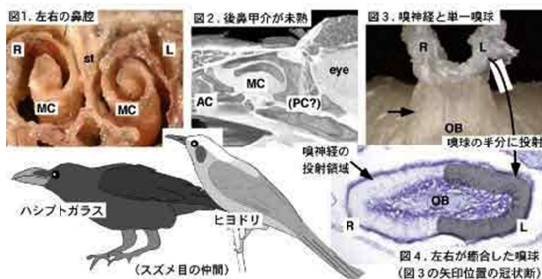


図1：野生スズメ目の鼻腔と嗅球

カラスやヒヨドリは野生動物のため、動物愛護さらには実験個体数確保の点から計画的に研究を進めることは困難である。そこで同じスズメ目に属するキンカチョウの使用を考えた。キンカチョウは国内における主要な愛玩動物であると同時に、歌学習の研究モデルとして世界的に使用されている実験動物でもある。そこで、このトリの嗅覚系を詳細に解析することで単一嗅球を嗅覚研究モデル

ルとして確立させるという着想に至った。

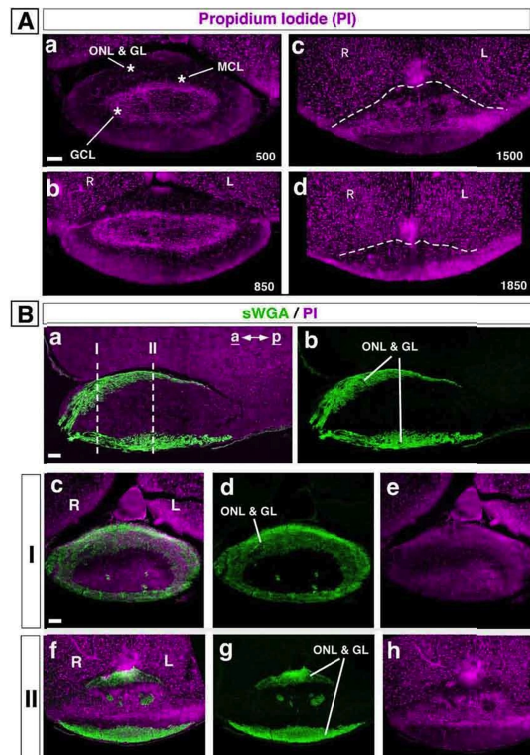


図2：ヒヨドリの嗅球組織像

ヒヨドリの嗅球は左右区別のない単一嗅球である(A)。このことは、嗅神経(緑色)が嗅球全体をループ状に囲うように投射していることから証明された(Bのc-h)。

2. 研究の目的

本研究は、キンカチョウの嗅覚系、すなわち“鼻腔、嗅上皮、嗅球”の解剖ならびに組織構造の詳細に明らかにすることで、“単一嗅球”を持つスズメ目の嗅覚神経系の一般特性を明らかにすることを第一の目的とした。また、スズメ目が餌を選択する際に嗅覚情報を利用している可能性を探るために、二オイ刺激を条件刺激とした嫌悪学習試験による餌好選性を誘導出来るかの試みを行った。これらの解析・試験を通じてキンカチョウの嗅覚系の一般形態ならびに餌選別における嗅覚の利用の有無を明らかにすることで、キンカチョウを新しい嗅覚研究モデル動物にするための基盤確立を目的とした。

3. 研究の方法

**[動物]** 健康な雌雄の成体キンカチョウ(孵化後約6ヶ月以上、体重11-14g)を用いた。使用した動物はすべて日本の動物繁殖業者(浅田鳥獣株式会社、東京)から直接大学の動物飼育施設に導入した。飼育施設に導入後は、1ケージ(サイズ:370mm x 415mm x 410mm)あたり1匹(餌好選性試験、嫌悪学習試験)ないし2匹(短期間飼育後に解剖を行う場合)の割合で飼育した。飼育と実験は他の動物種がない飼育室(22℃~25℃、14時間点灯・10時間消灯)で行った。



図 3: 使用動物(キンカチョウ、横須賀撮影)

**【固定処理】**鼻腔形態と嗅球の組織構造を調べるために灌流固定を施した。ソムノベンチールの胸筋内投与によって深麻酔(60 mg/kg)処置をした状態で灌流固定を施した。生理食塩水で前灌流を行い、引き続き 0.1M phosphatebuffer(PB, pH7.4)で調整した 4% paraformaldehyde (PFA)で灌流固定を行った。灌流固定終了後、頭部のみを切り離して、同じ固定液に 4 で一晩後固定処理をした。後固定に引き続き、頭部から脳のみを取り出し、0.1M PBで調整した 30% ショ糖液に浸漬させた。脳は組織化学染色を行うまで 4 で保存した。一方、脳を取り出した頭部標本は、脱灰処理を行うためにテトラ酢酸・エチレンジアミン・4 ナトリウム(EDTA)液に浸けて 4 で 1 週間処置をした。脱灰処理後、頭部標本は 70%、80%、90%、100%の上昇エタノールで脱水処理を行い、キシレン置換を行った後、パラフィン包埋処理を行った。

**【鼻腔一般形態の観察】**パラフィン包埋標本を 6 $\mu$ m で冠状断切片を作成し(REM-710, Yamato, Japan) スライドガラスに貼り付けた後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した。鼻腔標本は光学顕微鏡(Axioscop, Zeiss)で観察を行った。

**【嗅神経および嗅球の観察】**凍結マイクロトームで 40 $\mu$ m の冠状断切片を作成し、レクチンキット(Vecta FLK-2100, 3100, 4100)による組織化学染色を施した。観察は共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Zeiss,)で行った。

**【嗅上皮のトレーサー取り込み観察】**鼻腔と嗅球の間の嗅神経束に Dil(D-282, Molecular Probes)を注入し、固定液中で 1 ヶ月間 37 でインキュベートした後、マイクロスライサーで 50 $\mu$ m の冠状断切片を作成した。観察は共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Zeiss)で行った。

**【透過電子顕微鏡観察】**脱灰処理した標本を 1%四酸化オスmium後固定、上昇エタノールによる脱水処理、Quetol 812 による樹脂包埋重合を行った。70nm 超薄切片を作成(PowerTome X ultramicrotomes, RMC, U.S.A)し、染色は飽和酢酸ウラン液・鉛液を用いた電子線色を行った。観察に透過型電子顕微鏡(JEM-1400, Electro Optical Laboratory,)で行った

**【好選性試験】**市販のフィンチ用混合餌を成分毎に分別し、短期間(4時間)絶食処理後、

成分別に 5 つの餌箱で同時に呈示して餌の好選性試験を行った。試験は 5 日間連続で行った。評価は呈示前後の餌重量差とビデオ撮影による餌箱つき回数で評価した。

**【嫌悪学習試験】**餌好選性試験の後、その個体が好選した餌成分にオレンジ精油ニオイを付着させた餌を与え、摂食行動直後に LiCl を腹腔内投与して嫌悪刺激を与えた。翌日から 3 日間連続で、好選した餌にオレンジ精油ニオイ付きおよびニオイ無しの 2 つの餌箱を同時呈示して、餌箱間の好選性行動観察を行った。餌の位置は連日左右を交換して呈示した。評価は、餌重量変化とビデオ撮影による餌箱つき回数で評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 左右の嗅神経と嗅球の存在を確認  
キンカチョウの嗅神経は、左右独立した 2 本の束として認められた。この 2 本の嗅神経束は、肉眼解剖学的には“単一”の塊とし観察される大脳の先端部分(嗅球)に投射していた(図 4D)

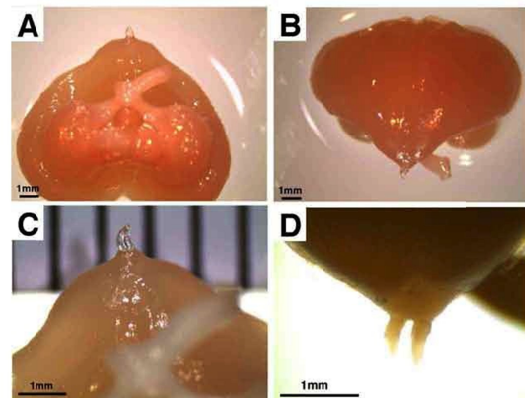


図 4: キンカチョウの嗅神経と脳

左右の嗅神経の束を冠状断で凍結切片を製作し(図 5B) 嗅神経を認識するレクチンで組織化学染色を行ったところ、2 本共に神経束全体がレクチンに結合した。従って、キンカチョウの嗅神経もレクチン組織化学染色で識別することが出来ることが判明した(図 5C-E)

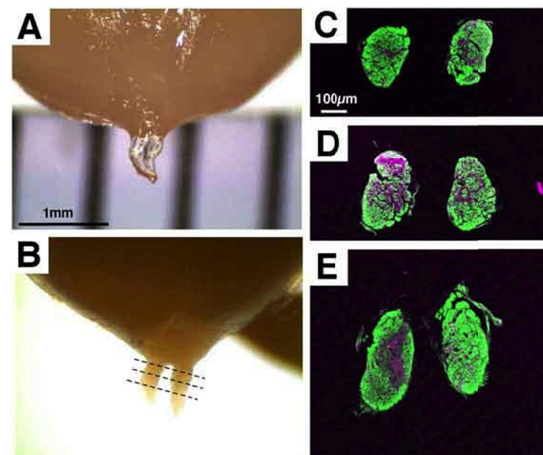


図 5: レクチン染色による嗅神経の確認

(2) 嗅球が“単一嗅球”であることの確認  
 キンカチョウの嗅球は、肉眼解剖学的に“単一の塊”として観察されたが(図4)、組織学的にも左右が独立していない構造を持つことが明らかとなった(図5)。

嗅神経に結合するレクチンは、嗅球組織の周囲に結合することが確認された。脳の冠状断標本において、嗅球の中央部にレクチンの結合部が認められないことから、嗅神経は脳の正中部分には投射していないことを示している。すなわち、嗅球は組織学的にも左右の区別が無い“単一嗅球”であることが証明された(図5)。

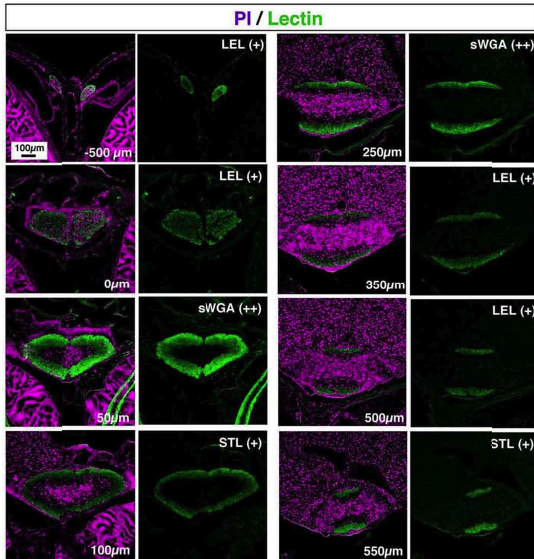


図6：左右が癒合した単一嗅球

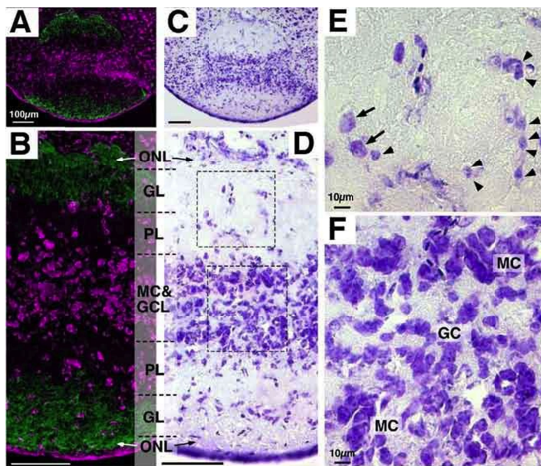


図7：嗅球の組織構造

(E)の矢印は傍節細胞様細胞、矢頭は傍系球体細胞を示す。層の略称は上記本文を参照)

### (3) 嗅球の組織構造

レクチン組織化学染色標本(図7 AとB)とニッスル染色標本(図7CからF)を比較して嗅球の組織構造を解析した。

キンカチョウの嗅球組織は、哺乳類の嗅球のような多数の傍系球体細胞(JG細胞)に囲まれた系球体構造は示さないため、系球体層(GL)における系球体単位の識別は困難であ

った(図7)。また、大型の細胞(僧帽細胞:MC)と小型の細胞(顆粒細胞:GC)が嗅球の中心部において混在しているため、哺乳類の嗅球のように僧帽細胞層(MCL)と顆粒細胞層(GCL)を分けて識別することは出来ない構造であった(図4DからF)。

これらの組織学的所見から、キンカチョウの嗅球構造は外側から内側に向かって、嗅神経層(ONL)、系球体層(GL)、叢状層(PL)、僧帽細胞および顆粒細胞層(MC&GCL)の4層に分けられることが判明した(図7BとD)。

### (4) 鼻腔の構造

キンカチョウの鼻腔構造を上嘴の冠状断標本を作製して解析した結果、以下のような解剖学的特性を持つことが判明した(図8)

- ・ 鼻中隔によって左右鼻腔は独立している。
- ・ 中鼻甲介(mc)の構造は極めて単純であり渦巻き状を示さない。
- ・ 後鼻甲介の存在が認められない(不明瞭)。

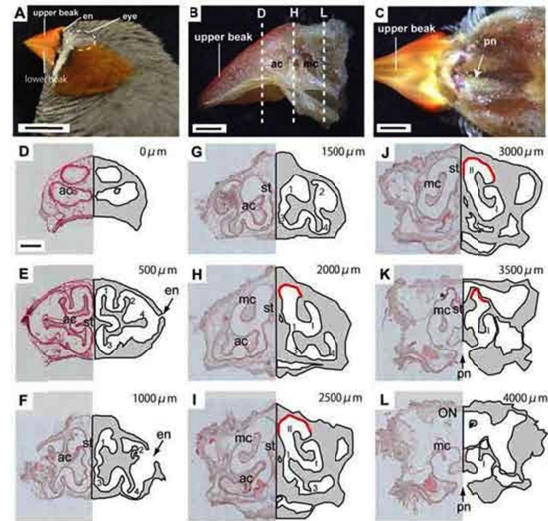


図8：鼻腔の形態と嗅上皮の位置

### (5) 嗅上皮の存在の確認

キンカチョウには左右の嗅神経束とその投射先として嗅球が存在していた(図1-4)。従って、嗅上皮は存在すると予想された。そこで、鼻腔の冠状断標本にHE染色を施して、嗅細胞(鼻腔内面に線毛様構造を持つ細胞)の存在を検索した。その結果、中鼻甲介の後方、鼻腔最後部の空間の内側に、線毛を有する細胞集団が分布していることを確認した。この領域がキンカチョウの嗅上皮であることが強く示唆された(図8D-H)。

### (6) 嗅細胞の存在の確認

HE染色で予想した領域が嗅上皮であることを確定するため、嗅神経束にDiIを投与し(図10A,B)嗅細胞の分布領域を検索した。逆行性にDiIを取り込んだ細胞を鼻腔に認めた(図7EからH)。DiIを取り込んだ細胞群は、HE染色で嗅上皮であることが示唆された領域に一致して分布していることから、鼻腔後方の内側が嗅上皮であることが確認された。

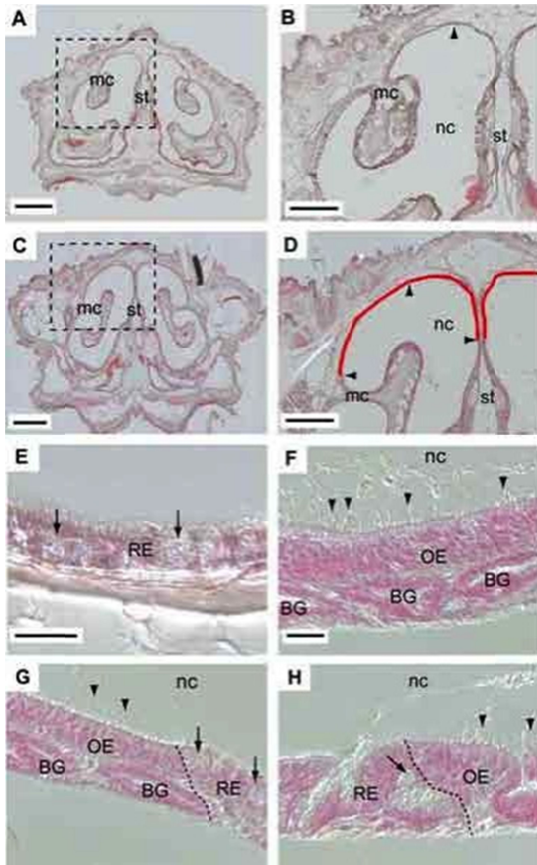


図9：嗅上皮の形態

(7) 嗅上皮を構成する細胞の微細構造

逆行性トレーサーを取り込んだ嗅細胞の形態は、脊椎動物の鼻腔に認められる嗅細胞に類似の形態を示していた(図10GとH、矢印で示した細胞)。次に、嗅上皮を構成する細胞群の微細構造を解析し、このトリ他の動物の嗅上皮との相違点について検討した。嗅上皮は、嗅細胞、支持細胞、基底細胞によって構成されていた(図11)。

嗅細胞は鼻腔表面に向かって太い樹状突起を伸ばしていた。また、嗅細胞の樹上突起の鼻腔表面部には線毛の他に、微絨毛を同時に派生している構造が認められた。線毛の横断面は、線毛の特徴である“9+2構造”が認められた(図11C)。嗅細胞の樹状突起は支持細胞に囲まれており、そこには多数のミトコンドリアが認められた。一方、細胞体から基底膜に向かって細い軸索の派生が認められ、基底部を詳しく観察すると、嗅細胞の軸索が基底膜を突き抜ける構造が認められた。支持細胞は、嗅細胞全体を囲むように存在しており、その細胞体は嗅細胞の細胞体よりも上に位置していた。支持細胞の鼻腔表面の形態は、鼻腔に向かって突出する構造を示していた。基底細胞の特徴として、細胞質に明瞭なミトコンドリアと粗面小胞体の存在が確認出来た。基底細胞はその細胞体を基底膜に接していることで認められた。

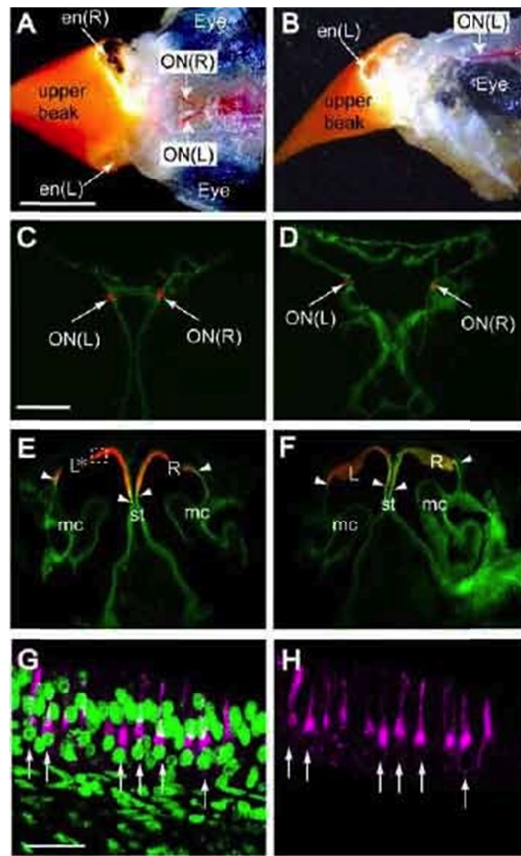


図10：逆行性ラベルされた嗅細胞

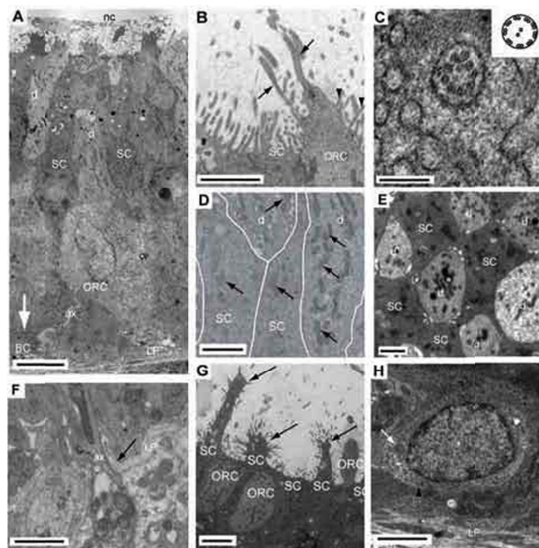


図11：嗅上皮を構成する細胞の微細構造

(8) 嗅覚情報による嫌悪学習試験の試み

キンカチョウはこの小さな嗅覚神経系をどのような行動のために維持しているのであろうか？齧歯類を用いた研究から、動物にとって嗅覚信号は「個体に関する情報」および「餌の認知」を一義的にしていると考えられている。本研究の最後に、塩化リチウム(LiCl)投与による嫌悪体験をオレンジ精油のニオイを手がかりにして学習(嫌悪学習試験の成立)成立が可能であるか否かの検討を行うことで、キンカチョウの餌選別におけるニオイ

情報の重要性の評価を試みた(図12)

その結果、LiCl 投与実験(嫌悪刺激試験)の翌日以降にオレンジ精油のニオイ付けを行った餌への選択性は、ニオイ付けしていない餌への選択性と比較して、有意な減少は認められなかった。従って、キンカチョウの餌選別において、ニオイ情報はあまり重要ではない可能性が示唆された。

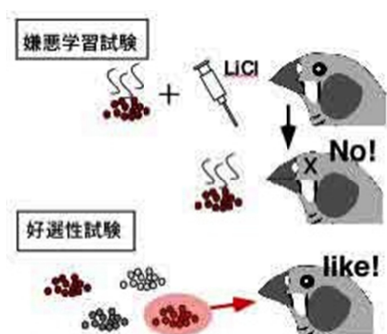


図12:嫌悪学習試験・好選性試験

#### (9)餌の好選性試験

混合餌を種類別に分別して、これらの餌(5種類)毎日並び順を飼えて呈示したところ、ある特定の餌に好選性を示すことが明らかとなった(図12)。しかし、どの餌成分に好選性を示すかは個体によって異なっていることから、キンカチョウが本質的に好む餌成分を特定するには至らなかった。

この現象は何らかの情報をもとに餌を好選していることを示唆しており、今後その情報(信号)が味覚であるのか嗅覚であるのか、あるいはその他の情報であるのかを確認することが必要である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

横須賀 誠、鳥類は嗅覚を使うのか？  
生物と化学、49巻、2011、573—579。

横須賀 誠、鳥類の嗅覚について～単一嗅球をもつトリの形態的特性～ 香料、258巻、2013、47—54。

[学会発表](計3件)

横須賀 誠、三上 恭平、中田 友明、斎藤 徹。キンカチョウ *Taeniopygia guttata* の嗅球の形態学的特性。日本味と匂学会 第45回大会 2011年10月7日 石川県立音楽堂

Yokosuka M, Mikami K, Nakada T and Saito TR. Morphological and histochemical studies of the nasal cavity and fused olfactory bulb of the Zebra finch, *Taeniopygia guttata*. XVI International Symposium on Olfaction and Taste. 2012年6月23-27日. スtockホルム、スウェーデン。

横須賀 誠、三上 恭平、中田 友明、

斎藤 徹。キンカチョウ *Taeniopygia guttata* の鼻腔および嗅上皮の形態学的特性。日本味と匂学会 第46回大会 2012年10月4日-5日 大阪大学コンベンションセンター

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

シンポジウム・招待講演

横須賀 誠、意外に知らない鳥類の嗅覚。  
日本獣医師学会総会 2012年2月3日 札幌  
コンベンション会館

横須賀 誠、鳥に嗅覚はあるのか？解剖学から考察する動物たちの匂いの世界。日本香料協会講演会。1月30日・薬業健保会館(東京) 2013年2月1日・大阪薬業クラブ(大阪)招待講演

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

横須賀 誠 (YOKOSUKA, Makoto)  
日本獣医生命科学大学・獣医学科・教授  
研究者番号：90280776

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：