

機関番号：33501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580331

研究課題名（和文）系統発生からみた脊椎動物の視覚情報処理機構の進化

研究課題名（英文）Phylogeny of organization of visual information processing in the vertebrates

研究代表者

内藤 順平（NAITO JUMPEI）

帝京科学大学・生命環境学部・教授

研究者番号：30048467

研究成果の概要（和文）：鳥類および哺乳類の視覚機構が両棲類からどのように発展してきたかを知るために、以下の事柄を鳥類（ヒヨコ）と両棲類（トノサマガエル）で調べた。1）ヒヨコ網膜の内網状層（IPL）亜層のカルシウム結合タンパクおよび GAD の免疫反応 2）ヒヨコ網膜の視床と視蓋との二重投射ニューロンの出現頻度とその分布状態および IPL における樹状突起の広がりの特徴 3）ヒヨコの視蓋 F 層に投射する nAChR $\beta 2$ 陽性網膜節細胞の樹状突起の広がりの特徴 4）カエルの網膜節細胞の分布密度、大きさの特徴 5）鳥類と哺乳類における視蓋の網膜受容層の相違 6）発光体の波長および明るさに対するカエルの反応

研究成果の概要（英文）：To know how the visual organizations of bird and mammal have been developed from the amphibian, the following matters have been studied in the bird (chick) and amphibian (frog). 1) The sublaminal structures of the IPL and its immunoreactivity to calcium-binding-protein and GAD in the avian retina. 2) The appearance rate and distribution of the double-labeled RGCs projecting to both tectum and thalamus in birds. 3) Feature of the dendritic arborization of the nAChR $\beta 2$ -immunoreactive RGCs projecting to the tectal layer F. 4) Size and distribution-density of the frog RGCs. 5) Morphological differences in the retinal receptive layers between the avian and mammalian tectum. 6) Behavioral reaction to the wavelength and brightness in the frog.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：網膜、内網状層、視蓋、網膜投射、ヒヨコ、カエル、系統進化

1. 研究開始当初の背景

視覚情報を中枢に伝える網膜神経節細胞の数は、視覚に大きく依存して生活をしているネコやサルではそれぞれおよそ 10 万個および 100 万個 (Hughes, '81; Webb & Kass, '76)

存在すると言われている。これらの網膜節細胞は大きく 3 つのグループ α 、 β 、 γ に区分され (Boycott & Wässle, '74; Naito, 86, '89)、各タイプは脳の異なる部位に投射し (Dreher

& Sefton,'79; Itoh et al., '81; Sur & Sherman, '82; Naito, '89; Leak & Moore,'97)、それぞれ動体視、形態視、明暗視に関与する。即ち視覚情報は脳の異なる部位で処理される。

一方、ヒヨコの網膜節細胞の数はサルよりも遙かに多く、400万個(Chen & Naito,'99)を数え、夜行性のフクロウでは600万個(Webb,'78)におよぶ。その分布密度は中心野から周辺網膜に向かって減少するが、中心野はネコやサルほど明確ではない。しかし、背側網膜にはやや密度の高い背側野がふ化直後のヒヨコで観察される。哺乳類と同様に、網膜節細胞を細胞体の大きさ、樹状突起の二次元的広がり、分岐の密度により分類すると6種類(グループIc, Is, IIc, IIs, IIIs, IVc)に分類される(Naito & Chen, '04)。これらのグループと哺乳類の分類との対応は形態学的にはIcは β タイプに、IIIsは γ タイプの1つ ϵ タイプに、IVcは α タイプにそれぞれ対応する。

光受容細胞が受けた視覚情報は双極細胞とアマクリン細胞を介して内網状層で網膜節細胞に伝達される。カハールが提唱して以来(Cajal, 1892)、脊椎動物の内網状層は5つのsublayerに分けられている。各sublayerは異なる機能を有し(Wässle,'91)、網膜節細胞の突起がどの層に広がるかにより、この細胞の生理的性質が決まってくる。一方、ヒヨコの内網状層は哺乳類より遙かに厚く、網膜節細胞の層分岐は8層を数え、より高度な情報処理をしていると思われる(Naito & Chen, '04)。さらに、網膜節細胞の中樞投射様式も哺乳類とは異なり、大部分は中脳視蓋に集中的に投射し、視床への投射は少量である。また、視蓋の層構造は哺乳類では視覚関連部位は3層であるのに対し、鳥類では6層を形成する(Kunzel & Masson,'88)。

これら、哺乳類との違いは何を意味しているのか。この様な形態的な相違は単に量的な違いではなく、視覚機能に基本的な違いがあることを強く示唆しており、行動学的にも違いが現れている。一体この違いは何によってもたらされたのか。そこで進化的に下位の両棲類の視覚系を検索することを試みた。

2. 研究の目的

動物がどのような感覚機能を発達させてきたかは、一重に棲息環境と密接な関係があり、視覚機能においては網膜および視覚中枢投射によく現れている。これまでの網膜構造および中枢投射等の結果を通覧すると(Gamalin & Cohen, '88; Van Hoesen,'83; Naito & Chen,'04; Chen & Naito '09)、視覚システムは鳥類と哺乳類では根本的に異なっているのではないかと考えられる。即ち、哺乳類では網膜において視覚情報は内容により分類され、それぞれ脳の異なる場所へ伝達され、並行処理(parallel processing)されるのに対し、鳥類では視覚情報の多くは中脳視蓋で集約的処理(intensive processing)がなされている。

一般に、脳の情報処理は動物が高等になればその処理機構も複雑化すると考えられており、感覚情報処理の結果は一見その様に見える。しかし、本当に処理システムは所謂下等動物は高等動物よりも未熟なままとどまっているのか。我々はこれまでの研究で、基本的な違いはシステムのモジュールの違いにあつて、システムの未熟さではないのではないかと考えている。この点を究明するには、系統発生的に網膜節細胞の構造や網膜投射の違いがどの様に形成されてきたかを調べ、視覚機構と視覚行動について進化の面から詳しく解析する必要がある。もし、系統発生的に情報処理システムに大きな違いがないとなると、これまでの脳について例えば、高等、下等と言った認識は哺乳類と鳥類の間では修正されなければならない。

この研究では鳥類と哺乳類における視覚情報処理の違いはどこから来ているのか、下位の動物の視覚系を調べることにより系統発生的視点から検索した。

3. 研究の方法

以下の方法を用いた。具体的には研究成果に記す。

ニッスル染色法、各種の軸索トレーサー法、蛍光免疫組織化学法、行動観察法

4. 研究成果

鳥類の網膜構造

(1)ヒヨコ網膜節細胞の形態

詳細は先の報告書「オペラント行動を利用したヒヨコの視覚神経回路の意味づけ」(課外番号16580249、2004-2007)で詳細に報告されているのでここでは省く。

(2)ヒヨコ網膜の内網状層の構造

材料と方法

ヒヨコ：P1-P7のBoris Brown種およびWhite Leghorn種

固定と切片

- ① 4%パラホルムアルデヒド-15%飽和ピクリン酸-0.1M PBで固定
- ② 16~20 μ の厚さで薄切

免疫反応

Parvalbumin + Calretinin 抗体およびParvalbumin + GAD 抗体の免疫二重染色

- ① 一番目の一次抗体 (抗 Parvalbumin 抗体)
- ② 蛍光標識二次抗体
Anti-mouse IgG-Alexa Fluor488
- ③ 二番目の一次抗体 (Calretinin 抗体、GAD67 抗体)
- ④ 蛍光標識二次抗体
Anti rabbit Ig G-Alexa Fluor568
- ⑤ 蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡で観察・記録

結果と考察

Parvalbumin と Calretinin の二重染色

Parvalbumin 陽性細胞と Calretinin 陽性細胞が内顆粒層 (INL) の内側半分に多数染まっているが、重なっているものはほとんど見られない。内網状層 (IPL) においても Calretinin 陽性突起と Parvalbumin 陽性突起が作るそれぞれ3本のラインはどれも重なるところはなかった。このことは、ヒヨコ網膜の内網状層はカルシウム結合タンパクにより8つの異なる層に区分され、カルレチニン陽性が第5, 7, 8 層に、パルバルミン陽性が第1, 4, 6 層に分布することを示している。これらの層は網膜節細胞の樹状突起が作る8つの層 (Naito と Chen, 2004) の数と幅との点で一致する。

Parvalbumin と GAD の二重染色

内顆粒層 (INL) において、Parvalbumin と GAD の共存細胞がいくつか観察された。さらに内網状層 (IPL) において Parvalbumin

抗体で染まった3本のラインはそれぞれ GAD 抗体で染まった3本のバンドと重なるが、GAD 抗体でやや強く染まった3本のラインのうち、最外層はほぼ完全に重なるが、その他の2本は接しているが、重なっていない。このことは、Parvalbumin と GAD がおなじ層に存在し、両者が共存するか、または非常に近い関係にあることを示唆している。恐らくアマクリン細胞以外にも双極細胞のあるものは抑制性の性質をもつことを示唆している。

双極細胞、アマクリン細胞の突起の生理活性物質の分布結果はDiIの逆行標識による網膜節細胞樹状突起の8つの層の直接的証明ではないが、網膜節細胞の樹状突起も8層を形成していることを強く示唆する。しかも、GAD陽性層がparvalbumin陽性層と同じあるいは隣接する層に存在する可能性が高いことは、複数の抑制層が連続せずに存在していることを示している(哺乳類では5層のうち、外側の2層が抑制系)。

鳥類網膜の中核投射

(1) ヒヨコ網膜の中核投射様式

材料と方法

ヒヨコ、Boris brown, P8-P10を使用

- ① 2色の蛍光マイクロビーズを視床と視蓋にそれぞれ微量注入
- ② 4-6日の生存期間の後、灌流固定
- ③ 30 μ m厚の凍結連続切片を作製
- ④ 網膜を4%パラフォルム固定
- ⑤ 二重標識された網膜節細胞にルシファーイエロー (LY)を細胞内注入
- ⑥ LY抗体に浸漬
- ⑦ anti-goat IgG AF568に2時間浸漬
- ⑧ 観察、写真撮影

結果と考察

視蓋への網膜投射ニューロンは視蓋の網膜局在に従って分布し、一方、視床への網膜投射ニューロンは主として網膜の中央部に分布した。標識された網膜節細胞の内、視蓋投射ニューロンは95%に対し、視床投射ニューロンは25%で、二重標識された網膜節細胞は20%認められた。即ち、視床投射ニューロンのほとんどが視蓋と視床へ二重投射し、それ

らは網膜の中央部に分布した。

二重標識された網膜節細胞にLYを細胞内注入し、樹状突起の2次元の広がりを可視化した結果、樹状突起が複雑に分岐したCタイプと単純なSタイプ (Naito & Chen 2004) の出現頻度はほぼ同じだが、最も多く見られたのはグループIc (43%) のCタイプであった。

高等哺乳類ではほとんど認められない同側脳にある視蓋と視床の両者に軸索側枝を出す二重投射ニューロンが網膜中央部に多数認められたことは、視床が形態視に関与する網膜中央部 (鳥類では明瞭な中心野は認められない) の画像情報処理にあたっていることを示唆する興味ある結果である。また、網膜中央部の情報が視蓋にも同時に送られていることは、鳥類では視蓋を発達させた結果、視床の役割をあまり分化させていないことを示唆する。また、IPLにおける視蓋投射ニューロンと視床投射ニューロンの共通した樹状突起の層分岐は主に4-8層に分岐し、共通しない樹状突起の層分岐は1-8層まで広く分岐した (Chen & Naito, 2009)。

(2) ヒヨコ網膜節細胞の層特異投射ニューロン

方法

- ①後眼房を4%パラホルム固定
- ②一次抗体 (Anti-rat nAChR β 2 抗体)
- ③二次抗体 (Anti-rat IgG Alexa Fluor 488)
- ④蛍光標識された網膜節細胞へ DiI の細胞内注入
- ⑤ 面積測定には Scion image を使用

結果と考察

様々な大きさの nAChR β 2 免疫陽性節細胞が網膜全体で多数観察された。網膜中心部では蛍光標識の弱い比較的小さな細胞体が数多く見られ、網膜周辺部へ向かうに従って、強い蛍光標識の中～大型の細胞体が比較的多く見られた。その為、細胞内注入は網膜の周辺部と中間部で行った。DiI によって標識された nAChR β 2 陽性網膜節細胞は Naito and Chen (2004) に従って分類した。

網膜周辺部では nAChR β 2 陽性網膜節細胞は Group II ~ Group IV type の細胞体が観察されたが、最も多く観察されたのは Group II type (80.8%)、次いで Group III type (17.0%)、Group IV type (2.1%) であった。Simple type は 51.0%、Complex type は 32.6%、未分類が 16.3% みられた。細胞体の平均面積は $262.27 \mu\text{m}^2$ 、樹状突起野面積の平均面積は $26252.74 \mu\text{m}^2$ だった。

網膜中間部の nAChR β 2 陽性網膜節細胞は Group II type (93.3%) がほとんどで、少数 Group III type (6.6%) が観察されたが、Group IV type は観察されなかった。大方は Simple type で 73.3%、Complex type 23.3%、未分類が 3.3% だった。細胞体面積の平均は $216.80 \mu\text{m}^2$ 、樹状突起野面積の平均は $11828.09 \mu\text{m}^2$ だった。

本研究から、視蓋の F 層に投射する nAChR β 2 受容体を持つ網膜視神経節細胞の多くは Simple タイプで、先の棚田 (2007) の結果を支持し、さらに、各タイプのおおよその出現頻度が示された。Simple type が F 層に主として投射していることは視蓋 F 層では明暗や動きの視覚機能を主に行っているのではないかと推測される。

さらに、視蓋の網膜受容層の最下層にある F 層には、より下層の I 層細胞の上行性樹状突起の側枝や突起の末端が分岐し、網膜からの視覚情報を受け取り、視床の外側膝状体腹側部 (GLv) に送っていることと、I 層細胞はその樹状突起の形態から槍型とフォーク型があることを我々はすでに示している。

両棲類 (トノサマガエル) の視覚機構

(1) トノサマガエルの網膜節細胞

方法

網膜節細胞の染色

- ① 網膜を $50 \mu\text{m}$ 厚の凍結切片
- ② ニッスル染色

DiI の逆行性細胞標識

- ① 網膜を 4% パラホルムで浸漬固定
- ② 視神経の断面に DiI の結晶を移植
- ③ 10 日 ~ 1 カ月後に網膜を観察
- ④ 神経節細胞の樹状突起野と細胞体の面積を測定

結果と考察

ニッスル染色標本

細胞体の大きさは哺乳類、鳥類に比べ小さい、やや大きな細胞が散見された。分布密度は非常に高く、密度分布は網膜の中央部から周辺部までかなり均一で、中心野は確認できない(アフリカツメガエルの網膜節細胞の密度はかなり低い)。

DiI 標識標本

網膜節細胞を分類する目的で、DiI を視神経に投与し、網膜節細胞を逆行性に標識し、Naito & Chen (2004) に従い分類した。細胞体が中型で分岐が密な FIIc が最も多く確認され、次いで細胞体が中型で分岐が疎な FIII s タイプ、細胞体が大きく分岐が密な FIVc タイプの順に観察された。細胞体が小さく分岐が密な F Ic タイプの頻度は最も低かった。この DiI の結果をヒヨコの結果と比較すると、ヒヨコ網膜神経節細胞 G Ic に形態学的に対応するのはカエルでは F Ic であるが、その出現頻度はヒヨコに比べはるかに低い。これはカエルの視覚機能、特に形態視には鳥類や哺乳類とは異なることを示唆している。

(2) トノサマガエルの視蓋層構造と網膜投射

方法

- ① 眼球内に 3%WGA-HRP を注入
- ② 3~4 日後に灌流固定
- ③ 50 μ m 厚で凍結切片
- ④ TMB による呈色反応
- ⑤ 観察

結果

視蓋の層構造

視蓋の層区分は Lazar & Szekely (1966) に従った。トノサマガエルの視蓋表層の白質層(第9層)は鳥類に比べ、非常に厚く、多量の網膜投射線維が終止する1層の網膜受容層となっている。しかし、WGA-HRPの標識を行うと濃淡のある複数の帯が認められるので、単純な白質層ではないが、鳥類の様には分化されていない。さらに深層にWGA-HRPに標識された細胞層(第6層)が認められた。これは6層にある細胞が第9層に上行性樹状突起を出していることを示すもので、9層で網膜投射線維終末から二次的にWGA-HRPで標

識されたと理解される。

トノサマガエルの網膜投射

WGA-HRP の実験ではカエルの網膜投射線維は視交叉で交叉した後、対側の視床の NB、PTN、V、P、Ldp、La、A、CP の各神経核に終止したのち、さらに後方へ進み。視蓋の第9層に終止した。他の例で、視交叉から同側の視索を上昇し、同側の CP と NB に終止する同側投射が確認された。しかし、この同側投射線維は視蓋には達しなかった。両棲類の同側投射は Neary & Northcutt (1983)、Hoskins & Grobstein (1985) がカエルで報告している。もし同側投射が両棲類や虫類の視床に存在するならば、視床は両眼視に重要な部位となる。そのように考えると、鳥類は両眼視をすることを捨て、視蓋を特異的に発達させた動物といえる。

トノサマガエルの視覚行動(色覚)

方法

実験装置

色パネルにバックライトを当て、色光を発するパネル 2 枚を装置の壁に装着。2 枚のパネルの間は衝立で仕切る。パネルは白、赤、青、緑色に発光し、暗パネルは無発光による。暗パネル以外のパネルの明るさは同じになるように電圧で調光した(100lx)。2 枚のパネルの発光色はランダムに選択した。カエルの乾燥を防ぐため、実験装置内に水で濡らしたガーゼを敷き、天井は透明のシートで覆った。

行動の記録

トノサマカエルは光源からおおよそ1時間以内にパネルに到達する距離においた。実験は暗室で行い、カエルの行動はおおよそ1時間、赤外線カメラで記録した。カエルがどちらのパネルに接近したかは、パネル間の仕切りのどちらの領域にいたかで判断した。

結果と考察

室温、約 20°C の一定の環境温度でトノサマガエルの色光(青、赤、緑、白)に対する反応を調べた結果、赤光に対しては青光や白光がより反応し、暗パネルにはほとんど反応しない。赤光や緑光に反応するのは、ほとんどが暗パネルが対になっているときである。その他、青光に対してまれに緑光に反応するこ

とがあった。カエルが暗パネルに全く反応しないことは、カエルは基本的により明るいものに反応すること、また青光（あるいは白）により反応するのはトノサマガエルの視細胞が短波長に感受性が高く、そのため、同じ光量ではであれば、短波長をより明るく感じているのではないかと考えられる。カエルは波長の違いを色に変換して認識しているよりも明暗の違いとして認識しているのかも知れない。しかし、もしそうだとすると、短波長に感受性が高い理由は不明である。また、環境変化に対する影響についても今後の問題として残された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- (1) Cao J., Naito J., Chen Y. (2011) Retrograde tracing with fluorescent microspheres reveals bifurcating projections from central retina to tectum and thalamus in chicks. *Anat. Hist. Embry.* 査読有、in press
 - (2) Chen Y., Naito J. (2009) Morphological properties of chick retinal ganglion cells in relation to their central projections. 査読有、*J. Comp. Neurol.* 514: 117-130
 - (3) Shibata H., Honda Y., Sasaki H. Naito J. (2009) Organization of intrinsic connections of the retrosplenial cortex in the rat. *Anat. Sci. Int.* 査読有、84: 280-292
 - (4) Shibata H., Naito J. (2008) Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the retrosplenial cortex in the rat. 査読有、*J. Comp. Neurol.* 506: 30-45
- [学会発表] (計8件)
- (1) Naito J. (2010) Retino-vLGN Pathways via the Tectum in the Chick. Chinese Association of Veterinary Anatomists (CAVA 010), Qinghai Univ. (China) 2010/8/11 (招待講演)
 - (2) Naito J., Tamura T. (2009) Dendritic stratification of RGCs in relation to the calretinin and parvalbumin-immunoreactive lamination in the inner plexiform layer of the chick retina. 3rd

Congress of Asian Association of
Veterinary Anatomist, Cheongju Univ.
査読有、(Korea) 2009/11/9 (国際学会)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 順平 (NAITO JUMPEI)

帝京科学大学・生命環境学部・教授

研究者番号：30048467

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：