

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657051

研究課題名(和文) 魚類瞳孔の動きの研究

研究課題名(英文) A study of pupil in Medaka

研究代表者

尾田 正二(Oda, Shoji)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：50266714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：硬骨魚類では瞳孔(黒目)の大きさは変化しないとされてきたが、本研究では強い光に反応してメダカの瞳孔が小さくなる(縮瞳)対光反射があることを見出した。また、ヒトと同様に、メダカにおいても交感神経の活動が瞳孔散大筋を収縮させて散瞳を、副交感神経の活動が瞳孔括約筋を収縮させて縮瞳を引き起こすことを見出し、さらに撮影時のメダカ成魚は交感神経の活動が大きく亢進している、すなわち緊張していたことが示唆された。近年高性能化が著しいデジタルカメラとPCを活用した映像の数値化手法によってメダカの眼の大きさ変動を詳細に観察することにより、当該メダカ個体の心身状態を推察することに道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：Textbooks say that the iris size does not change in most species of teleost, although all vertebrates including Chondrichthyes change the size of iris in response to strong light under control by autonomic nervous system. In this study, employing high-resolution digital image recording and image analysis the size change of iris was examined carefully in a model teleost, medaka (*Oryzias latipes*). When exposed to strong light, medaka decreased the size of pupil, showing miosis. Moreover, activation of parasympathetic nervous system activity by administration of acetylcholine or tamsulosin induced miosis, strongly suggesting that iris contracts via control by autonomic nervous system in medaka as the same manner as human. Administration of atropine or phenylephrine did not increase the size of pupil, suggesting that the iris of the examined individual expanded maximum presumably because sympathetic nervous activity was thoroughly activated by taking pictures.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：瞳孔 自律神経 メダカ

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類をはじめ、ほとんど全ての脊椎動物において、瞳孔の大きさが変化することが知られてきた。強い光を眼が受けると入射する光量を減ずるために瞳孔が縮小する(縮瞳)対光反射が誘起されるほか、ヒトでは副交感神経系が瞳孔括約筋を収縮させて縮瞳を、交感神経系が瞳孔散大筋を収縮させて散瞳を誘起し、瞳孔の大きさの変動によって心理的な状況を推測することも可能である。

魚類においてもサメ・エイなどの軟骨魚類においては顕著な対光反射がみられることが古くより報告されているが、硬骨魚類においては瞳孔の大きさは変動しないとされてきた。しかし、硬骨魚類においても対光反射を示す魚種の報告もあり、また解剖学的に瞳孔括約筋、瞳孔散大筋の存在が報告されている魚種も存在し、硬骨魚類においてのみ瞳孔の大きさが変動しないと定説には疑問符も付いていた。

2. 研究の目的

硬骨魚類であるメダカ (*Oryzias latipes*) について、瞳孔の大きさの変動の有無を検証し、さらにメダカの瞳孔の大きさが自律神経支配を受けていることを証明することが本研究の目的である。「眼は口ほどにもの言い」と言うが、メダカの瞳孔の変動より当該個体の自律神経活動状態を推測し、メダカの身体状態を推測する手法の基礎を築くことを目指した。

3. 研究の方法

近年高性能化が著しいデジタルカメラと画像解析アプリケーションを活用することによって、メダカの瞳孔の映像よりメダカ瞳孔の大きさを数値化し、その変動を詳細に分析した。

実験室において飼育されたメダカ成魚(近交系である Hd-rR と体躯が透明な SK2 系統の 8 ヶ月齢以上の健康な成魚を実験に使用)を、麻酔を施すことなく、幅 0.5 cm、長さ 5.5 cm のメダカがちょうど無理なく収まる撮影用水槽に静かに移し、専用のマクロレンズをとりつけたハイビジョンハンディカメラ (HC9, SONY) を用いて容器の正より面 2cm 離れた位置から、メダカ頭部を拡大してメダカ瞳孔を 15 分間撮影した(図 1)。

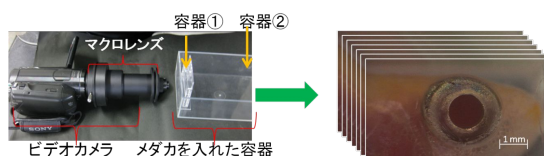


図 1. メダカ成魚の瞳孔映像の撮影方法

撮影したメダカ瞳孔の映像を PC 上にてビデオ編集ソフトウェア Final Cut Pro (Apple 社) を用いて編集し、画像解析アプリケーション Image J、および映像解析アプリケーション TEMA (フォトロン) を用いて瞳孔の大きさを数値化し、計測した(図 2)。

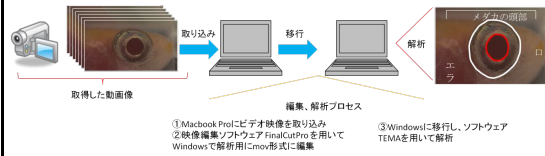


図 2. 撮影した動画像を取り込み解析するフロー図

4. 研究成果

メダカ成魚の瞳孔を撮影した映像を解析したところ、メダカの眼全体(白目+黒目)の大きさ、すなわち眼球の大きさは変動しないことを確認した(図 3)。よって、瞳孔のサイズを数値化し画像間で比較する際には、白目に対する黒目(瞳孔)の面積比を画像ごとに算出し、瞳孔の大きさの指標とした。

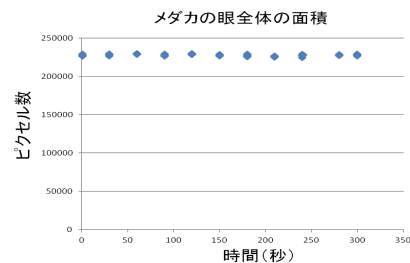


図 3. メダカの眼全体の面積の経時的変化

無麻酔状態では、メダカ成魚の瞳孔はほぼ一定の大きさを維持していた(図 4)。

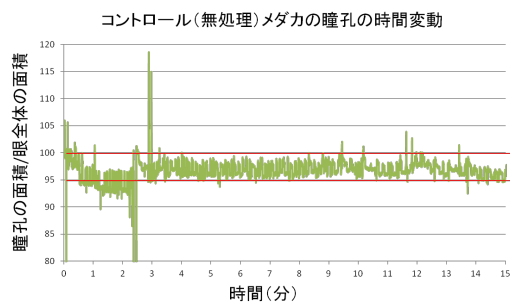


図 4. 無麻酔状態でのメダカ瞳孔が眼全体に占める比率の経時的変化

LED 懐中電灯を用いて強い光 (23,000 Lux) をメダカに照射すると、一過的な縮瞳が誘発され、メダカの瞳孔がその大きさを変化することが可能であることが確認された(図 5)。

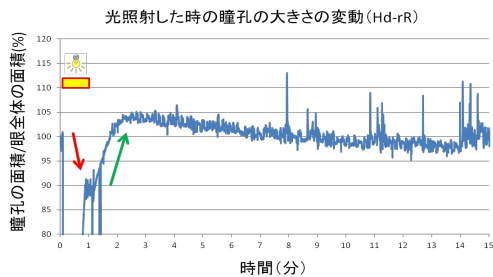


図5 . Hd-rR 系統メダカに光を照射したときの瞳孔の大きさの経時的変化

同じ強度の LED 光を照射した場合に、Hd-rR 系統に比較して SK2 系統のメダカにおいて誘発された縮瞳はより軽度であった。近交系 Hd-rR は黒色体色遺伝子座 B に関しては劣性 b 遺伝子のホモであり体躯は黒くないが、眼にはメラニンが存在して野生型と同じ黒い瞳孔を有する。一方、SK2 系統は体色関連遺伝子の多重欠損系統であり、眼のメラニン色素の沈着が弱いために、その瞳孔は赤色を呈している。以降の自律神経作動薬の投与実験においては、対光反射が弱く、自律神経作動薬の薬効をより正確に検討できる SK2 系統を採用した。

副交感神経作動薬(アセチルコリン、1 mM)、交感神経遮断薬(タムスロシン、100 μ M)を投与したメダカにおいては持続的に縮瞳が誘発され、ヒトと同様に副交感神経が優位になると縮瞳が惹起されることが強く示唆された(図6、7)。

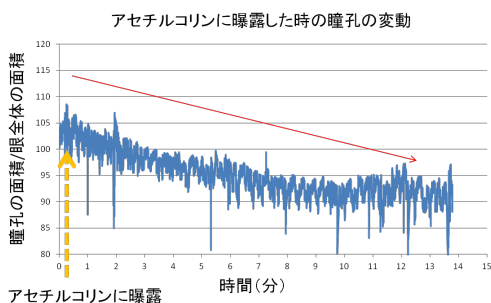


図6 . アセチルコリンに SK2 を曝露した際の瞳孔の面積変化

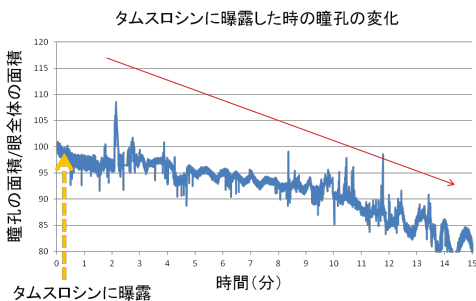


図7 . タムスロシンに SK2 を曝露した際の瞳

孔の面積変化

一方、副交感神経遮断薬(アトロピン、1 mM)、交感神経作動薬(フェニレフリン、1 mM)の投与では予想に反して散瞳が全く誘発されなかった(図8、9)。

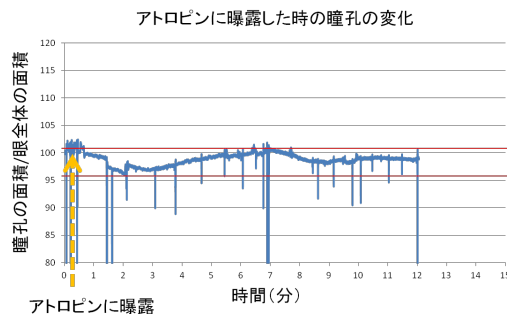


図8 . アトロピンに SK2 を曝露した際の瞳孔の面積変化

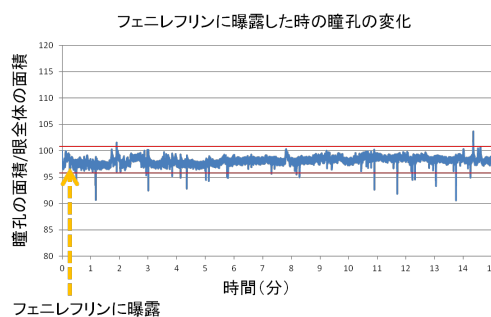


図9 . フェニレフリンに SK2 を曝露した際の瞳孔の面積変化

副交感神経作動薬(アセチルコリン)および交感神経遮断薬(タムスロシン)の投与によって縮瞳が誘発された実験結果から、メダカにおいてもヒトと同様に副交感神経の活動が瞳孔括約筋を収縮させ、交感神経の活動がそれに拮抗していることが強く示唆された(図10)。

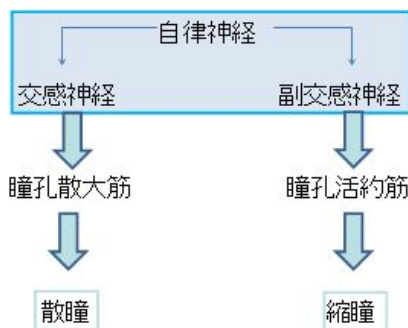


図10 . 平常時無麻酔下におけるメダカの瞳孔変化の自律神経支配の模式図

一方、交感神経作動薬(フェニレフリン)および副交感神経遮断薬(アトロピン)の投

与によって散瞳が誘発されなかった。図10に示したフレームに従ってこの実験結果を解釈すると、本研究における撮影対象のメダカでは、縮瞳は誘起できるものの、交感神経を亢進させても、副交感神経を抑制しても散瞳が誘起されない状態であったものと解釈できる。一方、副交感神経の亢進もしくは交感神経の抑制によって縮瞳が誘起されることから、撮影時のメダカは交感神経の著しい活性化によって、それ以上瞳孔が散大できないまで瞳孔が散大した状態にあったものと推測できる(図11)。撮影時のメダカ成魚は大きく交感神経優位な状態にあった、すなわち撮影時、メダカはとても緊張していたものと推測される。

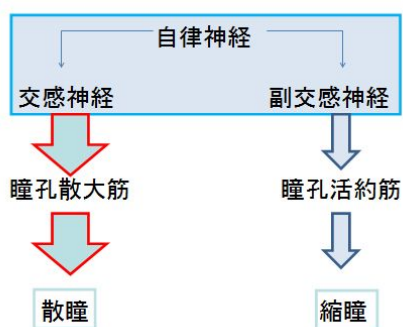


図11. 撮影時のメダカの自律神経の活動状態と瞳孔支配の推測図

本研究によって、硬骨魚類においても、ヒトと同様に自律神経が瞳孔の大きさ変化を支配していることを示す成果が得られた。ヒトを含む脊椎動物における自律神経の統合的生理学のモデルとしてメダカを用いることが原理的に可能であることを示す成果である。

また、本研究ではメダカの瞳孔の大きさ変化から当該個体の緊張状態を知ることが可能である成果を得た。今後は、メダカがリラックスした状態にある際に予想通り散瞳がみられるかどうかを検証することが必要と考えられる。また、今回の撮影条件は対象メダカ個体に多大なる無理を強いてその瞳孔を撮影していたために、当該個体をひどく緊張させていた可能性が高いことが判明した。画像取得条件を工夫し、たとえばフリー遊泳状態にあるメダカの瞳孔の大きさ変動を数値化して解析し、より自然な状態にあるメダカの目をみて当該個体の精神活動の状態を推測する方法を模索・構築すれば、将来的には、メダカの眼をみて当該個体の緊張状態等を知ることが可能になるものと考えられる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

メダカの瞳孔に関する研究
尾田正二、内木場寛明、三谷啓志
東京大学生命科学ネットワークシンポジウム(東京大学本郷キャンパス)
2014年4月26日

メダカの瞳孔の研究
内木場寛明、三谷啓志、尾田正二
日本動物学会 第84回大会(岡山)
2013年9月28日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾田正二(Oda, Shoji)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 50266714