

博士（環境科学）坂東 洋

学位論文題名

Functional cytological studies on olfactory imprinting  
and homing in salmon

(サケの嗅覚記録・回帰に関する機能形態学的研究)

学位論文内容の要旨

サケ科魚類の母川回帰については、Wisby and Hasler (1954)によって提唱された嗅覚仮説を始めとして、母川記録メカニズムの解明や母川ニオイ成分の探索を目的として、数多くの電気生理学的および行動学的研究が行われてきた。現在では、サケ科魚類は母川固有のニオイ成分を降河時に記録し、親魚は記憶したニオイ成分を想起することによって母川へと回帰すると考えられており、サケの記録する母川固有のニオイとして、河川中の溶存遊離アミノ酸の組成が重要であると考えられている (Ueda *et al.*, 2007)。このようなサケ科魚類の母川記録・回帰行動と嗅覚機能との関係から、母川のニオイ情報の記録・想起には、嗅覚中枢である嗅球および終脳が深く関係していることが推測される。そのメカニズムを解明するためには、嗅球および終脳内における母川のニオイ刺激に対する中枢神経系内の神経活動を解析し基礎的な知見を収集していく必要がある。しかし、母川のニオイ情報の投射・処理に関する中枢神経系における神経生理学的報告はほとんど無い。また、高次中枢である終脳における脳機能イメージングによる神経生理学的な知見も少なく、高等脊椎動物である哺乳類等と比べ、魚類終脳内の各領域における機能的な詳細は明らかにされていない。このような魚類終脳における研究の背景については、魚類の持つ脳の発生段階における特異性から、他の脊椎動物との機能的な相同意に関する解剖学的比較が困難であったこと、従来の魚類の神経活動解析では、細胞レベルの詳細な神経応答を解析できる微小電極を用いた電気生理学的手法が主であったために、終脳をはじめとする中枢神経系における広い範囲の神経応答を解析することが困難であったことが考えられた。そこで本研究では、サケの母川回帰において重要な働きを担う、母川水のニオイ情報の投射・処理機構を明らかとすることを目的として、脳内の広い範囲における神経活動の解析を行うことのできる、Functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI : 機能的磁気共鳴画像法) による母川水ニオイ刺激時の終脳における神経活動解析を行った。また終脳内における神経の走行および嗅球から終脳への嗅覚情報の投射経路を明らかにすることを目的とし、神経トレーサーとしてカルボシアニン系脂溶性蛍光色素 DiI (1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethyl lindocarbocyanine perchlorate) を用いて、局所的蛍光染色を行い神経組織の追跡をおこなった。

fMRI実験では、北海道大学動物用MRI実験装置 (Varian<sup>NOVA</sup>, 7 T) を使用し、実験魚として北海道大学洞爺臨湖実験所産のヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) 4歳魚を用い、その母川水として洞爺湖実験所飼育水を使用した。本研究で確立した魚類のfMRI実験系では、ヒメマス4歳魚の終脳を、3-4枚の前額断面スライスとして撮影でき、各スライス上の $300 \mu\text{m}^2$ のピクセルの空間分解能で神経活動を解析できることが分かった。この空間分解能はヒメマス終脳における解剖学的な領域の区分けにも対応できることから、本手法が魚類終脳における

神経活動解析法として有効な空間分解能を有していると考えられた。魚類における一般的なニオイ物質であるL-セリン ( $10^{-3}$  M) によるニオイ刺激では終脳における有意な嗅覚応答は出現しなかった。一方で母川水によるニオイ刺激時では、 $10^{-3}$  MのL-セリン溶液に比べ溶存遊離アミノ酸の合計濃度が2万倍近く薄いにもかかわらず、終脳における有意な嗅覚応答が強く広範囲に出現していた。これは、母川水が濃度差によるニオイ強度とは異なるニオイ情報として終脳で処理されたためであると考えられた。また、終脳は解剖学的に背側野(D)と腹側野(V)にわけられ、さらに背側野は背側野外側領域(Dl)、背側野内側領域(Dm)、背側野背側領域(Dd)そして、背側野後部領域(Dp)に区画され、腹側野では腹側野背側領域(Vd)と腹側野内側領域(Vv)に区画される。母川水に対する嗅覚応答は、主に終脳の背外側部(Dl)で出現していた。また、しかし、L-セリンに対する嗅覚応答では、これらの領域での応答は出現しなかった。

Dlを用いた神経トレース実験では、終脳のVv, Vd, Dl, Dm, Dpにおいて、嗅球と連絡する神経が観察された。また、同側だけでなく前交連(AC)を介した逆側の終脳のVv, Vd, Dl, Dpへの神経連絡も確認された。過去の報告による他の感覚情報と比べ、嗅覚情報は、嗅球からの終脳内へニューロンを介して終脳背側野、腹側野への広範囲における投射が確認された。このことは魚類における嗅覚情報に基づく様々な行動(索餌、生殖・繁殖、誘引・忌避、群形成等)の発現、制御における解剖学的な裏付けといえる。また、終脳 DI領域に入出力する神経線維では、嗅球との連絡には外側嗅索(Iot)を介したものが多く観察され、終脳内の神経網では同側のDmのほか、ACを介して逆側のDlやDmとの連絡が確認された。また、同側の視床前核(PTH)との連絡も確認された。他魚種では逆側の視神経からの投射を受けたPTHを介して、DI領域へと視覚情報を投射していると考えられており、ヒメマスにおいても視覚情報がDI領域へ投射されていると考えられる。

近年の分子生物学的報告から魚類の終脳背側部は、他の脊椎動物の外套(pallium)に相当すると考えられている。組織学的報告では記憶や想起に深いかかりを持つことで知られるNMDA型グルタミン酸受容体もDI領域に分布していることが報告されており、脳の破壊実験による報告では学習や記憶の成立にはDIが重要な働きを担っていることが報告されている。これらの近年の研究から、魚類における海馬に相当する領域は、DI領域に含まれていると考えられている。本研究において、ヒメマスで母川水のニオイ情報がDI領域へ投射・処理されていることが示唆され、DI領域が母川の記憶や想起において重要な役割を果たしていることが示唆された。また視覚情報の投射領域であることから、DI領域において外部環境からの嗅覚・視覚情報を統合・処理し、母川および非母川の判断をするための情報として処理していることが示唆された。

今後は母川情報の詳細な処理機構を明らかにしていくことで、母川記憶や回帰行動の発現機構のさらなる解明が期待され、我が国の重要な水産資源となっているサケ科魚類が、環境指標種としてサケ科魚類が様々な環境にどのように適応しているのかなど、環境科学の分野においても重要な知見を提供することが期待される。

また、本研究で用いたfMRIは、主に人やラットといった高等脊椎動物で用いられているが、魚類に導入した脳機能の神経科学的研究は、これまでに、ベルギーでコイ(*Cyprinus carpio L.*)のストレスに対する脳内の活動解析を行った報告(Van der Linden *et al.*, 2000; Van den Burg *et al.*, 2004, 2006)があるのみであり、fMRIによる魚類の化学感覚刺激に対する脳内の応答解析は世界でも前例がない。今後、高度な情報(記憶、学習、行動の発現など)処理に関わるニオイ物質の嗅覚応答解析や、様々な感覚刺激による応答解析において、本研究で確立したfMRIシステムを応用することによって、魚類終脳における領域ごとの機能的な役割と働きをさらに解明することができると期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 上田 宏

副査 教授 東 正剛

副査 准教授 工藤秀明（大学院水産科学研究院）

副査 教授 庄司 隆行（東海大学大学院）

生物科学研究所科

副査 研究員 黄田 育宏（東京都精神医学

総合研究所）

## 学位論文題名

### Functional cytological studies on olfactory imprinting and homing in salmon

（サケの嗅覚記録・回帰に関する機能形態学的研究）

サケの母川回帰については、1950年代に米国のHaslerらにより提唱された嗅覚仮説により、サケ稚魚が母川固有のニオイ成分を降河時に記録し、親魚は記録したニオイ成分を想起することによって母川へ回帰すると考えられている。サケは、嗅覚中枢である嗅球および終脳において、母川のニオイ情報を記録・想起していると考えられており、そのメカニズムを解明するためには、嗅球および終脳内における母川のニオイ刺激に対する神経活動を詳細に解析し、基礎的な知見を収集していく必要がある。しかし、サケの嗅覚中枢神経系における母川のニオイ情報の投射経路・処理機構に関する神経生理学的研究は少なく、また脳機能イメージングによる研究もほとんど無い。

本研究では、サケの母川記録・回帰機構に関与する嗅覚中枢神経系における母川水のニオイ情報の投射経路・処理機構を解明するため、脳内の広い範囲における神経活動を詳細に解析することができるfunctional Magnetic Resonance Imaging (fMRI：機能的磁気共鳴画像法) を用いて母川水ニオイ刺激時の嗅覚中枢神経系、特に終脳における神経活動解析を行った。さらに、嗅球から終脳への嗅覚情報の投射経路、および終脳内における神経走行を明らかにするため、神経トレーサーのひとつであるカルボシアニン系脂溶性蛍光色素 DIIを用いて、局所的蛍光染色による神経走行の解析を行った。

実験魚として北海道大学洞爺臨湖実験所産のヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) 4歳魚を用いた。fMRI実験では、北海道大学動物用MRI実験装置 (Varian<sup>INOVA</sup>、7テスラ) を使用し、母川水として洞爺湖実験所飼育水を使用した。本研究で確立した魚類のfMRI実験系では、ヒメ

マス4歳魚の終脳を、3-4枚の前額断面スライスとして撮影でき、各スライス上の $300 \mu\text{m}^2$ のピクセルの空間分解能で神経活動を解析できることを確認した。この空間分解能はヒメマス終脳における解剖学的な領域の区分けにも対応できることから、本手法が魚類終脳における神経活動解析法として有効な空間分解能を有していることが明らかとなった。魚類における一般的なニオイ物質であるL-セリン ( $10^{-3}$  M) によるニオイ刺激では終脳における有意な嗅覚応答は得られなかった。一方、母川水によるニオイ刺激では、 $10^{-3}$  MのL-セリン溶液に比べ溶存遊離アミノ酸の合計濃度が2万分の1程度であるにもかかわらず、終脳における有意な嗅覚応答が主に終脳の背側野外側領域 (DI) で得られることを明らかにした。

DIを用いた神経トレース実験では、終脳の腹側野内側領域 (Vv) 、腹側野背側領域 (Vd) 、DI、背側野内側領域 (Dm) 、背側野後部領域 (Dp) において、嗅球と連絡する神経を観察した。また、同側だけでなく前交連 (AC) を介した逆側の終脳のVv、Vd、DI、Dpへの神経連絡も確認した。過去の報告による他の感覚情報と比べ、嗅覚情報は、嗅球からの終脳内へニューロンを介して終脳背側野と腹側野への広範囲に投射していることを確認した。これらの部位は、魚類における嗅覚刺激が誘発する様々な行動（索餌、生殖・繁殖、誘引・忌避、群形成等）の発現・制御に関与していることが示唆されている。また、DIに入出力する神経線維では、嗅球との連絡に外側嗅索 (ot) を介したものが多く観察し、終脳内の神経網では同側のDmのほか、ACを介する逆側のDIやDmとの連絡を確認した。また、同側の視床前核 (PTH) との連絡も確認した。他魚種では逆側の視神経からの投射を受けたPTHを介してDIへと視覚情報を投射していると考えられており、ヒメマスにおいても視覚情報がDIへ投射されている可能性を示唆した。

近年の分子生物学的研究により、魚類の終脳背側部は他の脊椎動物の外套(pallium)に相当すると考えられている。分子組織学的報告により、記憶や想起に深いかかわりを持つことで知られるNMDA型グルタミン酸受容体がDI領域に分布していることが報告されており、脳の破壊実験による報告では学習や記憶の成立にはDI領域が重要な働きを担っていることが報告されている。これらの研究から、魚類における海馬に相当する領域は、DIであると考えられている。本研究により、ヒメマスで母川水のニオイ情報が嗅球を介して終脳のDI領域へ投射され処理されていることが明らかになり、DI領域が母川の記録や想起において重要な役割を果たしていることを示唆した。また視覚情報の投射領域であることから、DI領域において外部環境からの嗅覚・視覚情報を統合・処理し、母川および非母川の判断をつかさどる部位である可能性を示唆した。

今後は、サケ終脳のDI領域における母川水のニオイ情報の詳細な処理機構を分子組織学的手法などを併用して明らかにしていくことで、サケの母川記録・回帰機構が解明されることが期待される。我が国の中でも重要な水産資源となっているサケ科魚類が、環境指標種として様々な環境にどのように適応しているのかなど、環境科学の分野においても重要な知見を提供することが期待される。

本研究で用いたfMRIは、主にヒトやラットといった高等脊椎動物で用いられている。一方、魚類に導入した脳機能の神経科学的研究は、ベルギーでコイ (*Cyprinus carpio* L.) のストレスに対する脳内の活動解析を行った報告があるのみであり、fMRIによる魚類の化学感覚

刺激に対する脳内の応答解析は世界でも前例がない。今後、様々なニオイ物質によるニオイ情報の処理に関する嗅覚応答解析や、種々感覚刺激による感覚応答解析において、本研究で確立したfMRIシステムを応用することによって、魚類終脳における領域ごとの機能的な役割を解明することができると期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。