

Title	メダカをモデルとした脳神経回路の研究 解剖学的アプローチと遺伝学的アプローチ
Author(s)	出口, 友則
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1149
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位論文

メダカをモデルとした脳神経回路の研究 解剖学的アプローチと遺伝学的アプローチ

大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻

出口 友則

目次

概要	1
第一部 脳神経の末梢分布	2—34
第一章 要旨	3
第二章 序論	4
第三章 材料と方法	7
第四章 結果	10
第五章 考察	16
略号	20
図・表	22
参考文献	32
第二部 脳神経の中樞分布	35—68
第一章 要旨	36
第二章 序論	37
第三章 材料と方法	38
第四章 結果	42
第五章 考察	45
略号	54
図・表	57
参考文献	63

第三部 大規模突然変異体作製	69-86
第一章 要旨	70
第二章 序論	71
第三章 材料と方法	73
第四章 結果	78
第五章 考察	80
参考文献	83
謝辞	87

概要

メダカ (*Oryzias latipes*) は、日本で古くから生物学の様々な分野で研究が行われてきた実験動物であり、近交系が確立されている数少ない脊椎動物の1つである。また、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) と並んで近年、遺伝子レベルの研究が非常に進んでいる種の1つでもある。本研究の目的は、この有用な実験動物メダカを使って神経系の構築及び機能を遺伝子レベル、形態レベルで明らかにし、さらに電気生理レベル、行動レベルの解析へと役立てて行くことである。そこで、本研究は解剖学的アプローチと遺伝学的アプローチの2方向から行った。

解剖学的アプローチとしては成魚の脳神経の末梢分布と中枢分布を調べた。脳神経は頭頸部の感覚器から脳への情報が通り、また脳から運動器への出力が送られる経路であることから、この末梢分布と中枢分布の情報は脊椎動物の行動メカニズムを研究する上で必要な基礎情報である。遺伝学的アプローチとしては突然変異体の大規模作製を行い脳や脳神経の形態に異常を示す突然変異体をスクリーニングした。脊椎動物として初めて大規模な変異体スクリーニングが成功した種は同じ小型硬骨魚類のゼブラフィッシュであるが、メダカでの大規模な突然変異体スクリーニングは補完的な意味合いだけでなくメダカの持つ研究上の様々な利点により重要な意味を持つ。

本論文は研究の内容から三部構成にした。第一部では解剖学的アプローチとして成魚の脳神経の末梢分布を調べた研究について報告する。第二部では解剖学的アプローチのさらなるステップとして、成魚の脳神経の中枢分布を調べた研究について報告する。最後に第三部では遺伝学的アプローチとして行った大規模な突然変異体作製について報告する。

第一部

脳神経の末梢分布

要旨

メダカの成魚において、その全ての脳神経（嗅神経、視神経、動眼神経、滑車神経、三叉神経、外転神経、顔面神経、第八神経、側線神経、舌咽神経、迷走神経）の末梢分布を調べた。手法は実体顕微鏡下での標本の解剖である。標本には非染色状態の固定標本を主に使用し、Sihler 染色で神経を標識した固定標本や神経特異的に GFP (green fluorescent protein) を発現する遺伝子導入メダカの生体標本を補助的に用いた。この観察結果を基に脳神経の走行の様子を記述し、解剖図を作製した。

メダカの嗅神経は嗅球が終脳に接する無柄型であった。視神経は神経束が 1 束の円筒形をしており完全交叉型であった。外眼筋のうち上直筋、内側直筋、下斜筋、下直筋は動眼神経によって神経支配され、上斜筋は滑車神経、外側直筋は外転神経により神経支配されていた。三叉神経、顔面神経、前側線神経は眼球の尾側で結合し上眼窩神経幹、下眼窩神経幹、舌顎骨神経幹を形成していた。第八神経は前半規管、水平半規管、後半規管、卵形囊、球形囊、壺囊のそれぞれから延びた神経束で構成され、前半規管、水平半規管、卵形囊の神経束は一束になり前方枝を、後半規管と壺囊の神経束は一束になり後方枝の形状をとっていた。後側線神経は、舌咽神経、迷走神経と後頭部で融合するが、すぐに分かれ胴部の背側、背外側、外側の表面を尾側方向に延びる 3 本の神経束を形成していた。舌咽神経と迷走神経は後頭部で融合した後、吻側方向に屈曲し 4 本の鰓弓、腹腔に伸び心臓などの臓器に終末していた。

以上のように、全ての脳神経に関して、このような小型魚類では例がない詳細なレベルでの末梢の分枝の様子が明らかになった。メダカの脳神経の末梢分布は他の棘鱗上目の魚と良く類似した物であった。

序論

硬骨魚類は脊椎動物の中でも最も多様な種類を持つ綱である。その数は 25,000 種に及び現存する魚類の約 96% を占めている (Nelson, 1994)。その中でも正真骨魚類の棘鱗上目の魚は比較的新しい時期に派生した魚類であり、現在、最も種類が多く、最も多様化している魚類である。メダカ (*Oryzias latipes*) は、この棘鱗上目の中のスメグマモルフ系に属する (Nelson, 1994)。一方、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) はコイ (*Cyprinus carpio*)、キンギョ (*Carassius auratus*)、ナマズ (*Ictalurus punctatus*) と共に比較的古い時期に派生した骨鰾類に属する (Nelson, 1994)。

硬骨魚類は、動物に共通して見られる基本的な行動、例えば捕食、逃避、交配行動などを示す。のみならず種によっては社会行動のような複雑な行動も示す。硬骨魚類の脳は前方から終脳、間脳、中脳そして菱脳といった脊椎動物に共通した構造を有している (e.g. Ito and Yoshimoto, 1991)。しかし、終脳は哺乳類のように大きくなく、層構造も持たない (Yoshimoto and Ito, 2002)。特に小型魚類は各神経核を構成する細胞数が他の脊椎動物に比べても少ない (R. Baker, personal communication)。この事実は少ない神経数から構成される神経ネットワークでも、生存に必要な機能を実現できることを示している。この観点からみると、小型魚類は機能的な神経ネットワークの解析にとって適した動物であると言える。メダカは成魚の体長が 3 cm 程の小型硬骨魚であり、単純な逃避行動以外に、社会行動、ユニークな生殖行動のようなより複雑な行動を示すことから、脳の高次機能解析までカバーできる実験動物であると考えられる。これまでメダカの行動については多くの重要な観察がなされてきたが (Yamamoto, 1975 ; Egami *et al.*, 1990; Iwamatsu, 1997)、それがどのような神経回路に基づいて成立するものであるのか

はこれからの研究課題として残されている。

脳神経は主に頭頸部の感覚器から脳への情報が通り、また脳から運動器への出力が送られる経路であり、解剖学的解析を比較的容易に行える。さらに、動物が行動する際に重要である視覚情報、音情報、嗅覚・味覚情報を感覚器から脳へ伝達する経路は脳神経であることから、脳神経の末梢分布は脊椎動物の行動メカニズムを研究する上で必要な基礎情報である。脊椎動物一般の脳からは12対（嗅神経、視神経、動眼神経、滑車神経、三叉神経、外転神経、顔面神経、聴神経、舌咽神経、迷走神経、副神経、舌下神経）の脳神経が存在するが、魚類や両生類では少し異なる。それは魚類や両生類の副神経は迷走神経に含まれており、舌下神経は脊髄神経に含まれる、そして水中生活に特化した脳神経として、水の動きを知覚する側線神経が存在する。脳神経の末梢分布は多くの魚類で調べられておりその分布の様子は概ね共通するが、系統分類学的な大きな区分によって違いが見られるだけでなく、魚種による特徴も有することが分かっている。

メダカの脳神経の末梢分布はこれまで一部について調べられている。成魚に関してはFreihofer (1972) がSihler染色を用いて後側線神経を、Ishikawa (1994) がニューロフィラメントに対するモノクローナル抗体染色を用いて前側線神経を含む側線神経を調べている。稚魚に関してはIshikawa and Hyodo-Taguchi (1994) が成魚と同様に抗体染色を施し脳神経全般の末梢分布について報告している。つまり、成魚において全ての脳神経の末梢分布が明らかになっているわけではなかった。さらにメダカは近交系が確立されている実験動物である (Hyodo-Taguchi and Sakaizumi, 1993) が、Ishikawa *et al.* (1999) によればメダカの系統によって脳の形態は異なっている。これまで調べられた系統は、成魚で*bi-3R* 系統、*d-rR* 系統、*HB12A* 系統 (Ishikawa, 1994)、稚魚では *bi-3R* 系統、*d-rR* 系統であった (Ishikawa and

Hyodo-Taguchi, 1994) ため、大規模突然変異体スクリーニング (第三部参照) で使用した Cab-Kyoto 系統での神経解剖学的解析の必要性が考えられた。そこで本研究では Cab-Kyoto 系統のメダカを用いて全ての脳神経に関して末梢の分布を記述した。

材料と手法

標本

メダカ (*Oryzias latipes*) の南日本集団由来近交系 Cab-Kyoto (Cab; Carolina Biological Supply Company) 系統 (Furutani-Seiki *et al.*, 2004) を用いた。さらに Cab 系統にトランスポゾンを用いた遺伝子導入法で GFP を導入したメダカ (Grabher *et al.*, 2003) からスクリーニングされた、脳神経に GFP を発現する遺伝子導入メダカを使用した。

魚は 9L のアクリルタンクに約 30 匹入れ、14 時間–10 時間の明暗周期、水温 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 ± 0.5 の条件下で飼育した。餌は一日 2 回、午前 9 時と午後 1 時にブラインシュリンプ (*Artemia salina*) と粉餌 (Hikari Curst Guppy, Kyorin) を与えた。このようにメダカを成魚 (3 ヶ月齢以上; 体長 2-3 cm) になるまで飼育した。

固定標本の脳神経解剖

メダカを氷冷した麻酔液 (飼育水に 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS222, Sigma) を 0.04% 溶かしたもの) 中で約 5 分間処理し麻酔した。麻酔のかかった魚を、灌流台に移し虫ピンで仰向けに固定した。実体顕微鏡 (MZ12.5, Leica) 下で開胸し、心尖部にハサミ用いて少量の切開を加え、切開部から吻側方向に点滴用ガラス針を挿入し、灌流固定液 (2% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB)) を流し約 5 分間灌流を行った。個体全体を固定液 (4% PFA in 0.1 M PB) に浸け 4°C で最低 2 日間固定した。

固定処理したメダカを固定液を満たした解剖台に、背側を上に向け虫ピンで固定した後、実体顕微鏡下で固定液中のメダカをピンセットを用い頭頂骨、前頭骨および後頭骨を除去し、個体ごと dimethyl sulfoxide (DMSO)-methanol (DMSO :

methanol=1 : 1) 中で 1 日処理した。その後固定液で 2 回洗浄し、新しい固定液で満たした解剖台に、目的とする脳神経を露出しやすい体位で固定し、実体顕微鏡下で解剖および観察を行った。各脳神経につき 5 体以上観察した。

Sihler 染色

上記と同様に固定処理した魚の消化管、生殖器、肝臓、目の周りの皮膚をピンセットで注意深く取り除き、メスで切って半身にした。標本を水道水に浸け、10-14 日間毎日水を交換し標本から PFA を取り除いた。トリプシン水溶液 (1% trypsin (Wako) in 飽和ホウ砂水溶液) に標本が透明になるまで浸けた (3-7 日間)。標本を 2% KOH 水溶液に移し自然光の下 2 日間浸けた。Sihler I 水溶液 (0.75% chloral hydrate, 12.5% 氷酢酸, 12.5% glycerol) に移し 2 日間浸けた。Sihler II 水溶液 (0.75% chloral hydrate, 12.5% Ehlich's hematoxylin solution, 12.5% glycerol) に 1 週間浸け染色を施した。過度の染色を取り除くために 15-30 分間水道水に浸けた後、再度 Sihler I 水溶液に一晩浸けた。標本を 25% glycerol (1 日間)、50% glycerol (2 日間)、75% glycerol (3 日間)、100% glycerol に順番に浸けていき透明化した。

脳神経特異的に GFP を発現する遺伝子導入メダカの脳神経解剖

メダカを氷冷した麻醉液 (飼育水に 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS222, Sigma) を 0.04% 溶かしたもの) 中で約 5 分間処理し、十分な麻醉下にあることを確認した後、麻醉液を満たした解剖台に虫ピンで固定した。暗室中、蛍光を照射し実体顕微鏡下でメダカを解剖観察した。

図の制作

実体顕微鏡で観察しながら描いたスケッチや実体顕微鏡に接続したデジタルカメラ (HC-300Z 及び Photograb 300Z, Fujifilm) で撮影した写真を基に GIMP (<http://www.gimp.org>) を使用し各脳神経ごとにレイヤを分けて描いた解剖図を作製した。

結果

実体顕微鏡下の観察では、脳の概観上、全ての部位は大きさ、形、位置とも左右対称であった。視蓋は他の部位に比べて大きく、太い視神経に対応していた。終脳は視蓋の約 1/4 の体積を、小脳は脳全体の約 1/20 程度の体積を有していた。迷走葉と脊髄はほとんど膨大していなかった（図 1A,B,C）。脳神経は吻側から尾側方向に嗅神経、視神経、動眼神経、滑車神経、三叉神経、外転神経、顔面神経、前側線神経、第八神経、後側線神経、舌咽神経、迷走神経の順で左右一対ずつ脳から出ていた。脳神経末梢の走行も概ね左右対称であった（図 2A,B,C）。以下からは脳神経の末梢分布の特徴を基に区分し、末梢分布の様子をより詳細に記載した。

嗅神経

実体顕微鏡下の観察では、眼球の吻側、口腔のやや背外側にある鼻腔内の嗅上皮より始まり終脳の前方腹側部にある嗅球に入っていた（図 3A,B）。すなわちメダカの嗅神経は無柄型であった。

視神経

実体顕微鏡下の観察では、視神経は左右の眼球裏の中心より始まり、終脳と間脳の境界部付近の腹側部の正中線上で交叉し（視交叉）、視索となって脳に入り、視蓋に達していた（図 4A,B）。すなわちメダカの視神経は完全交叉型であった。神経束は 1 束の円筒形であった（図 4C）。交差での背腹位置の関係は、25 個体中左視神経が背側である個体が 12 匹、右視神経が背側である個体が 13 匹と左右に偏りはなかった。

動眼神経

実体顕微鏡下の観察では、動眼神経は中脳腹側部から脳を出て、脳の外側部の表面に沿って吻腹側方向に伸びていた。そして、頭蓋の吻腹部を構成する副蝶形骨 (Iwamatsu, 1997) の尾側基部にある孔を通り頭蓋から出ていた。その後、動眼神経は眼窩尾側で4つに分枝しそれぞれ上直筋、内側直筋、下斜筋および下直筋に終末していた (図 5A,B,C、赤)。上直筋は視交叉のやや後方 (副蝶形骨の中央部にみられる関節状部分) より始まり、吻背外側に伸び眼球の背側部、吻尾中央に付着していた (図 5A,C、ピンク)。内側直筋は副蝶形骨の中央部より始まり、吻外側に伸びて眼球の吻側部、背腹中央に付着していた (図 5A,B,C、黄色)。下斜筋は口蓋骨の背側部内側端に始まり、尾腹外側に伸びて眼球の腹側部、吻尾中央に付着していた (図 5B,C、紫)。下直筋は上直筋と同じく副蝶形骨の中央部より始まり、吻腹外側に伸びて眼球の腹側部、吻尾中央に付着していた (図 5B,C、オレンジ)。

滑車神経

実体顕微鏡下の観察では、滑車神経は動眼神経のやや尾背側の中脳外側部から脳を出て、脳の外側部の表面に沿って吻側方向に伸びていた。そして、滑車神経は副蝶形骨の尾側基部にある孔を通り頭蓋から出ていた。眼窩の尾側部に出た滑車神経は、すぐに吻背側方向に曲がり眼球の背側部表面に沿って伸び、上斜筋に終末していた (図 5A,B,C、青)。上斜筋は口蓋骨の背側部内側端に始まり、尾背外側に伸びて眼球の背側部、吻尾中央に付着していた (図 5A,C、シアン)。

外転神経

実体顕微鏡下の観察では、外転神経は菱脳の腹内側部から脳を出て、脳の腹側部の表面に沿って吻側方向に伸びていた。外転神経は副蝶形骨の尾側基部にある孔を通り頭蓋から出るとすぐ近くにある外側直筋に終末していた（図 5B,C、緑）。外側直筋は副蝶形骨の中央部から始まり、外側に伸び眼球の尾側部、背腹中央に付着していた（図 5A,B,C、黄緑）。

三叉神経、顔面神経、前側線神経

実体顕微鏡下の観察では、三叉神経は菱脳の外側部から脳を出て吻側に伸びていた（図 6A,B,C）。顔面神経は三叉神経のやや尾側から吻側に伸び、三叉神経の外側を並走していた（図 6A,B,C）。前側線神経は菱脳の外側部、顔面神経より尾背側の位置から脳を出て吻側に伸びていた（図 6A,B,C）。これら 3 対の脳神経は眼球の背尾側で結合組織により 1 束にされ蝶耳骨を通過していた（図 6A,B,C）。蝶耳骨通過後、眼球の尾背側に前神経節と思われる膨隆部が見られた。前神経節からは大きく分けて 3 本の分枝が伸びていた。1 つ目は眼球の背側部を吻側に走行する上眼窩神経幹、2 つ目は眼球の腹側部を吻側に走行する下眼窩神経幹、3 つめは眼球尾側のすぐ後方から体表近くに移動し、体表に沿って腹側方向に下顎の眼球腹側位置まで伸びている舌顎骨神経幹である（図 6C）。

実体顕微鏡下の観察では、上眼窩神経幹は眼球の背側部で体表面への分枝を出しながら上顎先端まで達していた。上顎先端の終末の様子は遺伝子導入メダカの実体蛍光顕微鏡観察で確認できた。

実体顕微鏡下の観察では、下眼窩神経幹は前神経節から出た後すぐに、内側の比較的太い上顎下顎枝と外側の比較的細い神経束に別れていた。上顎下顎枝は眼

球の腹側部で上顎に伸びる上顎枝と下顎に伸びる下顎枝に分枝していた。外側の比較的細い神経束は眼球の尾腹側部と腹側部で腹側方向に1本ずつ分枝を伸ばし、主神経束は下顎先端まで達していた。遺伝子導入メダカの実体蛍光顕微鏡下での観察では、これらの分枝からさらに細かく分枝が伸び体表に終末している様子が確認できた（図 6G,H）。

実体顕微鏡下の観察では、舌顎骨神経幹は前神経節から外側に伸び体表近くに出た後、腹側方向に伸びていた。その後、眼球尾側で尾腹側方向に鰓蓋後端まで伸びる opecular ramus が分枝していた。眼球の腹尾側で吻側（palatine ramus）と尾側に分枝を伸ばしていた。眼球の尾側には溝器が存在し、内部に側線感覚器である孔器が存在する（Ishikawa, 1994; Iwamatsu, 1997）が、遺伝子導入メダカの実体蛍光顕微鏡下での観察では、この孔器へ投射していると思われる様子が観察できた（図 6F）。

遺伝子導入メダカの実体蛍光顕微鏡下での観察では、さらに前神経節から他に2本の細い分枝が伸びていることも分かった。1つは眼球の外側部表面に伸び吻側と腹側に分枝し、それぞれから細かく分枝を伸ばし角膜に終末していた（図 6E）。もう1つは外側に伸び体表を背側に伸びた後、吻尾に分枝し体表の背側部に終末していた。

第八神経

実体顕微鏡下の観察では、メダカの内耳（膜迷路）は菱脳の外側に存在し、吻尾の範囲は吻側端が眼球のすぐ尾側、尾側端が迷走葉の尾側端と同じ高さであり、背腹の範囲は脳とほぼ同じであった（図 7A）。鰾（浮き袋）は内耳から尾腹側に遠く離れており、特に機械的な連結は見られなかった。膜迷路内には三つの耳石

系が存在し、最大の球形囊（図 7B,C、緑）は後脳側面に位置しその吻側と近い尾側にそれぞれ卵形囊（図 7B,C、オレンジ）、壺囊（図 7B,C、シアン）が位置していた。球形囊及び壺囊には内側部すなわち垂直方向に、卵形囊には腹側部すなわち水平方向に耳石と接合している聴斑があった。卵形囊と球形囊を背側でつないだ管が前半規管（図 7B,C、赤）、球形囊と壺囊を背側でつないだ管が後半規管（図 7B,C、青）、卵形囊と壺囊を外側でつないだ管が水平半規管である（図 7B,C、ピンク）。前半規管と水平半規管の前方、球形囊の近くは管が大きく膨らんでおり、有毛細胞が局在すると思われる膨大部稜があった。後半規管の後方、壺囊の近くも管が大きく膨らんでおり、膨大部稜があった。

実体顕微鏡下の観察では、第八神経は菱脳の外側部、前側線神経の腹側から脳を出て吻側に伸びる第八神経前方枝と、前方枝の尾側から脳を出て外側に伸び球形囊の聴斑に入る球形囊枝（図 7D,E、緑）と、球形囊枝の尾側から脳を出て尾側に伸びる第八神経後方枝から構成されていた。前方枝は球形囊の手前で、内側に分枝し前半規管の膨大部稜に入る前半規管枝（図 7D,E、赤）と、そのまま球形囊の聴斑に入る球形囊枝（図 7D,E、オレンジ）と、外側に分枝し水平半規管の膨大部稜に入る水平半規管枝（図 7D,E、ピンク）に分枝していた。後方枝は壺囊の手前で背腹に分枝していた。腹側方向の壺囊枝（図 7D,E、シアン）は幅が広く、そのまま壺囊の聴斑に入り、背側方向の細い後半規管枝（図 7D,E、青）は尾外側に伸びた後、後半規管の膨大部稜に入っていた。

後側線神経

実体顕微鏡下の観察では、後側線神経は前側線神経の尾側から脳を出て尾側方向に伸びていた（図 8C）。後側線神経は舌咽神経、迷走神経とともに球形囊背外

側で結合組織により一束にされ後頭骨を通過するが、それらとはすぐに分かれ尾外側方向に伸びていた。後側線神経は体表近く、胸鰭の付け根の背側位置で三本に分枝する。即ち、胴体外側表面の背腹中央部を吻尾方向に尾鰭まで真っ直ぐ伸びる後側線神経外側枝（図 8A,B、オレンジ）と胴体表面を一端背側方向に走行し背側表面の中央部で尾側方向に折れ曲がり脊髄に沿って尾鰭まで真っ直ぐ伸びる後側線神経背側枝（図 8A,B、青）、そしてこれら二本の間を走る後側線神経背外側枝である（図 8A,B、緑）。これらは遺伝子導入メダカの実体蛍光顕微鏡下での観察でも確認できた。

舌咽神経、迷走神経

実体顕微鏡下の観察では、舌咽神経、迷走神経ともに後脳後部側面から脳外に伸び、球形嚢背外側で結合組織により 1 束になっていた（図 9A,B）。その後の分枝には、吻側方向に屈曲し 4 本の鰓弓に伸びるものと腹腔に伸び心臓などの臓器に終末するものがあった（図 9A,B）。しかし、これらを明確に区別することはできなかった。

考察

魚類では魚種によって、その生活環境や行動形態の違いから特定の感覚能力が発達しており、それが脳においては発達している感覚に関わる領域の膨大という形態学的特徴を示す (Ito, 2002)。ウナギでは嗅球に、コイでは迷走葉に、ニザダイでは小脳に、ホウボウでは脊髄に膨大が見られる (Ito, 2002)。この観点からするとメダカでは視蓋が最も大きく発達していることから視覚が発達している種であると考えられる。

嗅神経

ヒトでは嗅上皮上にある受容細胞である嗅細胞から軸索がのび、篩骨の穴を通り近傍にある嗅球内の僧帽細胞の樹状突起とシナプス結合をする。僧帽細胞の主軸索は終脳外側の狭い領域を尾側に向かって伸長し、嗅索と呼ばれる軸索の束を形成する。魚類でもキングヨ、コイ、ナマズなどの骨鰾類ではこのような形態（柄型）を取る（図 3C）が、魚類一般には嗅細胞から嗅球までの距離が長く逆に嗅球から終脳までの距離は短く、ほぼ接する無柄型である (Yoshimoto and Ito, 2002)。メダカは嗅球が終脳腹側に接する無柄型であった。

視神経

メダカの視神経は円筒形であった（図 4C）が、骨鰾類コイ科の魚やスズキ型魚類シクリッド科の魚では視神経の断面がリボン状（図 4D）をしている (Vanegas H and Ito H, 1983)。視神経の束は左右一束ずつのまま背腹に完全交差していたが（図 4B）、骨鰾類コイ科のゼブラフィッシュでは視交叉付近で左右とも何束かに分枝し組み合った（指を組むような）交差を形成する（図 4E）。

眼神経、滑車神経、外転神経

これらの神経については、メダカ稚魚においても報告 (Ishikawa and Hyodo-Taguchi, 1994) があり、成魚でもその神経支配の様子は同じであった。また他の硬骨魚類のコイ (Luiten and Dijkstra-de Vlieger, 1978)、カサゴ (スズキ型魚類) (Lenard and Willis, 1979)、キングヨ (Graf and McGurk, 1985)、カレイ (スズキ型魚類) (Graf and Baker, 1985)、弱電気魚 (オステオグロスム類) (Szabo *et al.*, 1987)、カワハギ (スズキ型魚類) (Somiya *et al.*, 1992) とも異なる。

三叉神経、顔面神経、前側線神経

これらの神経についてはメダカ成魚でも Ishiwaka (1994) が、詳細な解剖学的報告を行っている。しかし、今回、トランスジェニックメダカの実体蛍光顕微鏡観察によって新たな知見があったので列挙する。

眼球上皮に終末する分枝が新たに発見された。眼球は黒いため Ishikawa の行った抗体染色ではこの分枝を確認することが出来なかったのであろう。

頭部の側線は 6 本 (rostral commissure, antorbital line, horizontal line, anterior mandibular line, ventral orbital line, lower opercular line) から成り、Ishiwaka (1994) は、それぞれの神経支配を rostral commissure は上眼窩神経幹によって、antorbital line は下眼窩神経幹によって、horizontal line は前側線神経外側枝と舌顎骨神経幹によって、anterior mandibular line, ventral orbital line, lower opercular line は舌顎骨神経幹によってされていると記述し、しかしながら lower opercular line が下眼窩神経幹によって神経支配されている可能性も示唆していた。今回の観察では lower opercular line に終末すると思われる分枝が下眼窩神経幹に見つかった。

Bartheld and Meyer (1985) が報告した 3 種のスズキ型魚類 (Blenniidae and Hexagrammidae) では三叉神経節は前神経節の一部ではなく、顔面神経節、前側線神経節と別れており、三叉神経節もまた 2 つ (眼神経節、上顎下顎神経節) に別れている。しかし、キンギョを初め、多くの硬骨魚類では、胚形成時に三叉神経の神経節は前側線神経と顔面神経の神経節と融合し、前神経節と呼ばれる神経節複合体を形成する (Landacre, 1910; Finger, 1976; Luiten, 1979; Puzdrowski, 1988) が、メダカでも同様であった。Ishikawa (1999) の報告によれば、稚魚でもすでにこの神経節複合体が形成されている。

メダカの上眼枝は上顎末端まで伸びているが、キンギョでは末端までは伸びず鼻腔付近で終末している (Puzdrowski, 1988)。これは単純にメダカの口が上向きで上顎の端までの距離が短いことによるのかもしれない。

第八神経

メダカの鰾は内耳と機械的な連結を持っていないが、マイワシやカタクチイワシでは鰾の先端から細い管が突出して膜を介して内耳と接する。また骨鰾類では内耳と鰾の間は、4 個の小さな骨が靭帯によって鎖状になった器官 (ウェーバー器官) で連結している (Popper, 1983)。このような連結を持つ魚は聴覚が優れている。

後側線神経

Freihofer (1972) に 7 種の硬骨魚類を Sihler 染色し観察した結果があり、そのうち 1 種がメダカである。それによると外側枝 (Freihofer (1972) では horizontal septum lateral line nerve) には腹側方向に伸びる分枝 (pectoral ventral ramus と 4 本の ventral

segmental lateral line rami) が記載されている。しかし遺伝子導入メダカの実体蛍光顕微鏡下での観察でも、Sihler 染色の結果でも確認できなかった。腹側には一般側線器らしきものは確認されているので (Yasuoka *et al.*, 2004) 染色条件が最良ではなかったのであろう。

舌咽神経、迷走神経

これらの分枝は多岐にわたっており、且つ体深部に入り込んでいるためその走行の全てを追うことが出来なかった。はっきりと確認できたのは吻側方向に 4 本の鰓弓へと伸びる 4 分枝と尾側方向に内臓へと伸びる 2 分枝だけであった。これら以外に一般には、舌咽神経成分として口腔前部の粘膜に分布する分枝や迷走神経成分として咽頭を支配する咽頭枝の存在が知られている (Funakoshi, 2002) がいずれも確認できなかった。

総括

以上のように全ての脳神経の末梢分布を調べた結果、詳細な解剖図が得られた。この結果は、メダカを使った電気生理学的解析や突然変異体解析に役立つであろう。特にメダカは現在、脳研究のモデル生物として注目されており、このような解剖学的基盤は重要な意味を持つ。

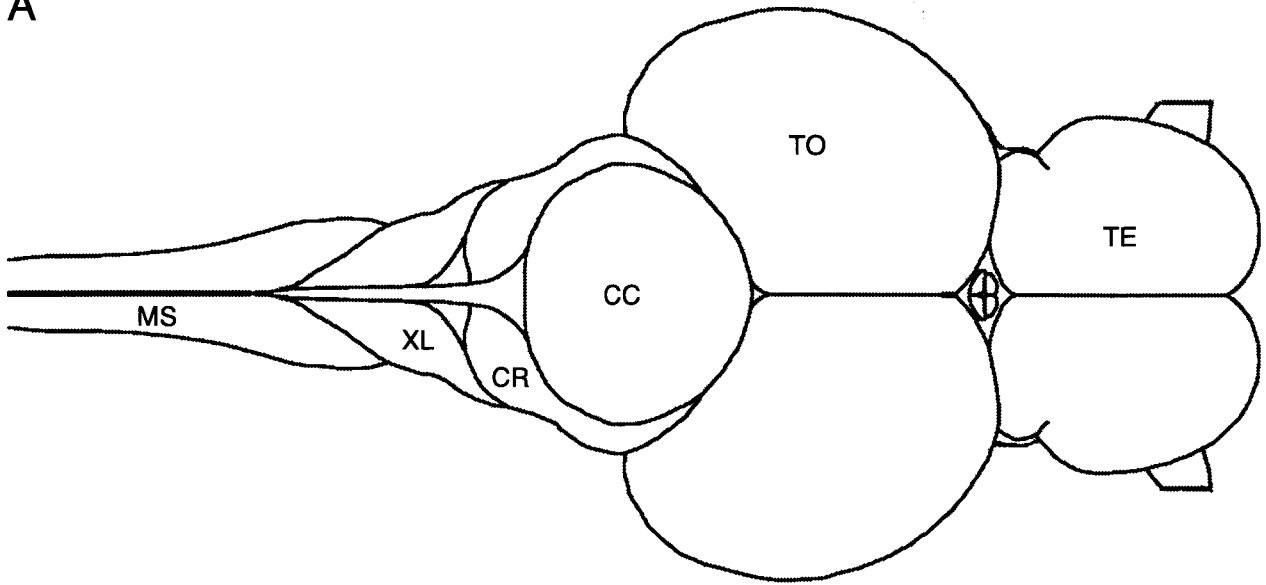
しかし、今回一部の脳神経においてはその神経束の区別が明確にできなかったものがある。これらは今後、脳神経根にトレーサーをインジェクションし脳神経を標識した後、全身切片を作製するなどしてさらに詳細に記載する必要がある。

略号

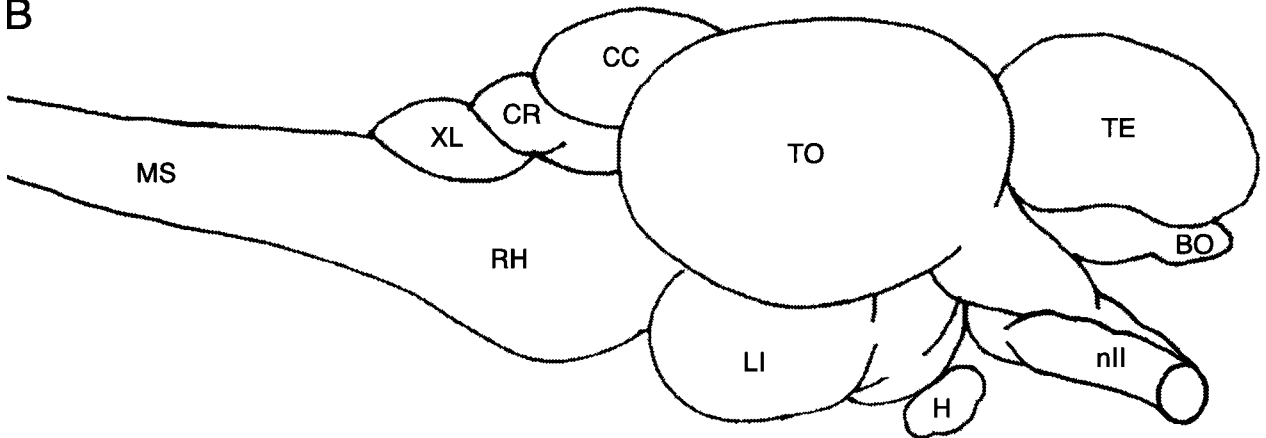
AB	air-bladder	鰾
AI	auris interna	内耳
B1	first branchial arch	第一鳃弓
B2	second branchial arch	第二鳃弓
B3	third branchial arch	第三鳃弓
B4	fourth branchial arch	第四鳃弓
BO	bulbus olfactorius	嗅球
CA	canalis semicircularis anterior	前半規管
CC	corpus cerebelli	小腦
CH	canalis semicircularis horisontalis	水平半規管
cho	chiasma opticum	視交叉
CN	nasal cavity	鼻腔
CP	canalis semicircularis posterior	後半規管
CR	crista cerebellaris	
H	hypophysis	腦下垂体
HNT	hyomandibular nerve trunk	舌顎骨神經幹
INT	infraorbital nerve trunk	下眼窩神經幹
L	lagena	壺囊
LE	left eye	左眼
LI	lobus inferioris	下葉
M	mouth	口
man	mandibular ramus	下顎枝
max	maxillary ramus	上顎枝
MMB	maxillomandibular branches	上顎下顎神經枝
MS	medulla spinalis	脊髓
n I	nervus olfactorius	嗅神經
n II	nervus opticus	視神經
n III	nervus oculomotorius	動眼神經
n IV	nervus trochlearis	滑車神經
n V	nervus trigeminus	三叉神經
n VI	nervus abducens	外転神經
n VII	nervus facialis	顔面神經
n VIII	nervus octavus	第八神經

nIX	nervus glossopharyngeus	舌咽神經
nX	nervus vagus	迷走神經
nALL	nervus lineae lateralis anterior	前側線神經
nALLd	dorsal ramus of nALL	前側線神經背側枝
nL	nerve to the lagena	壺囊神經
nLL	nervus lineae lateralis	側線神經
nPLL	nervus lineae lateralis posterior	後側線神經
nPLLd	dorsal ramus of nPLL	後側線神經背側枝
nPLLdl	dorsolateral ramus of nPLL	後側線神經背外側枝
nPLLI	lateral ramus of nPLL	後側線神經外側枝
nS	nervus sacularis	球形囊神經
OI	musculus obliquus inferior	下斜筋
OR	opercular ramus	主鰓蓋骨枝
OS	musculus obliquus superior	上斜筋
P	palatine	口蓋骨
PR	palatine ramus	口蓋骨枝
RB1	first branchial ramus	第一鰓弓枝
RB2	second branchial ramus	第二鰓弓枝
RB3	third branchial ramus	第三鰓弓枝
RB4	fourth branchial ramus	第四鰓弓枝
RE	right eye	右眼
RH	rhombencephalon	菱腦
RI	musculus rectus inferior	下直筋
RL	musculus rectus lateralis	外側直筋
RM	musculus rectus medialis	內側直筋
RS	musculus rectus superior	上直筋
S	sacculus	球形囊
SNT	supraorbital nerve trunk	上眼窩神經幹
TE	telencephalon	終腦
TO	tectum opticum	視蓋
U	utricle	卵形囊
nU	nervus utricularis	卵形囊神經
XL	lobus vagi	迷走葉

A



B



C

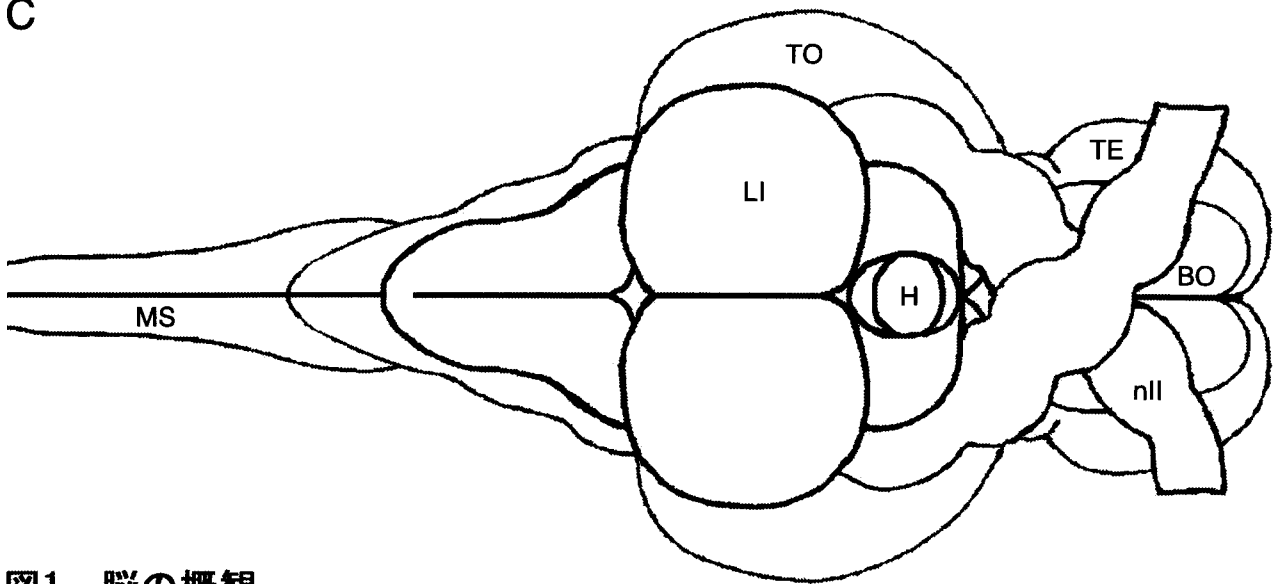


図1 脳の概観

視神経以外の脳神経を省略した図 (A) 背側面、(B) 右側面、(C) 腹側面。

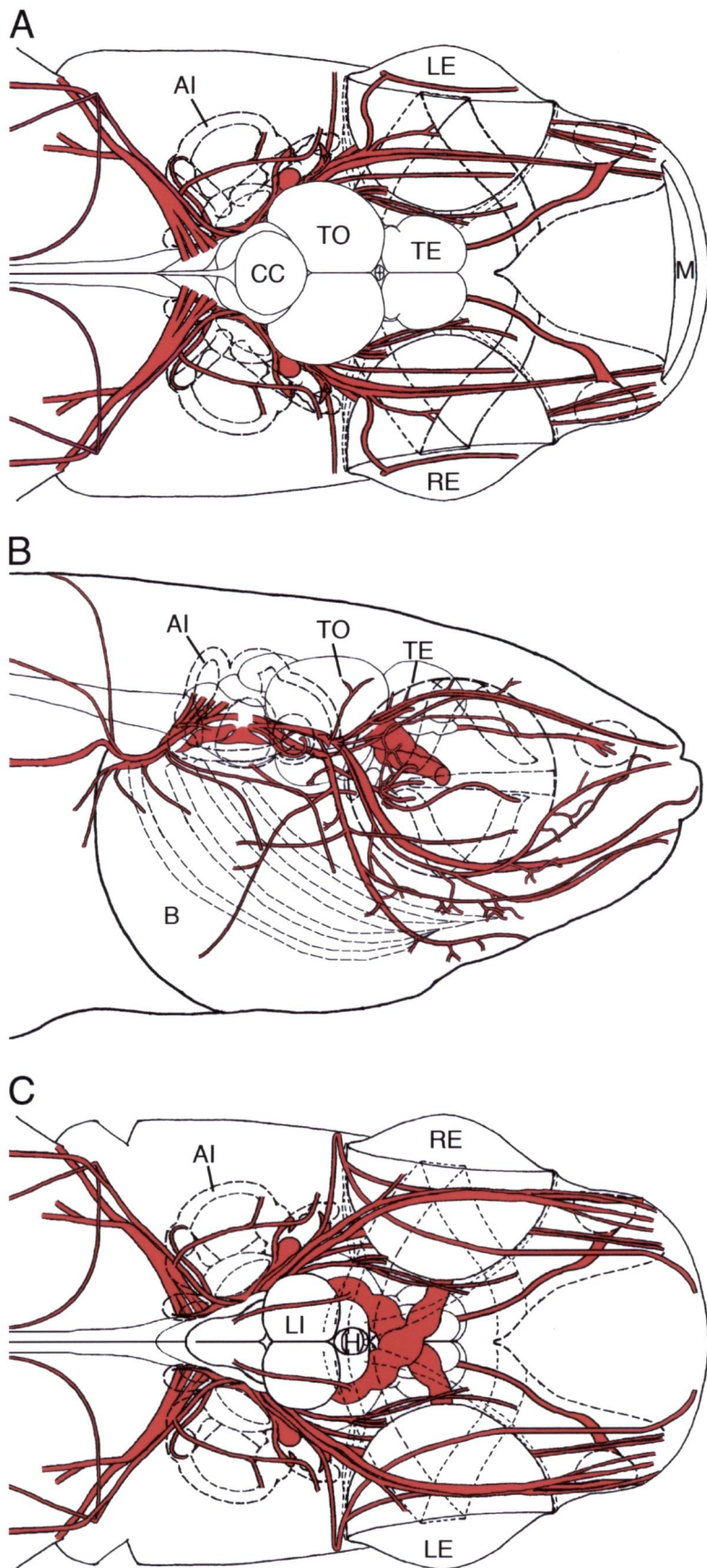


図2 全脳神経の走行図

全ての脳神経の走行を示したメダカ頭部の図。脳神経は赤、口蓋骨、外眼筋、内耳、鰓弓を点線で示す。(A) 背側面。(B) 右側面。(C) 腹側面。脳神経の走行はほぼ左右対称である。

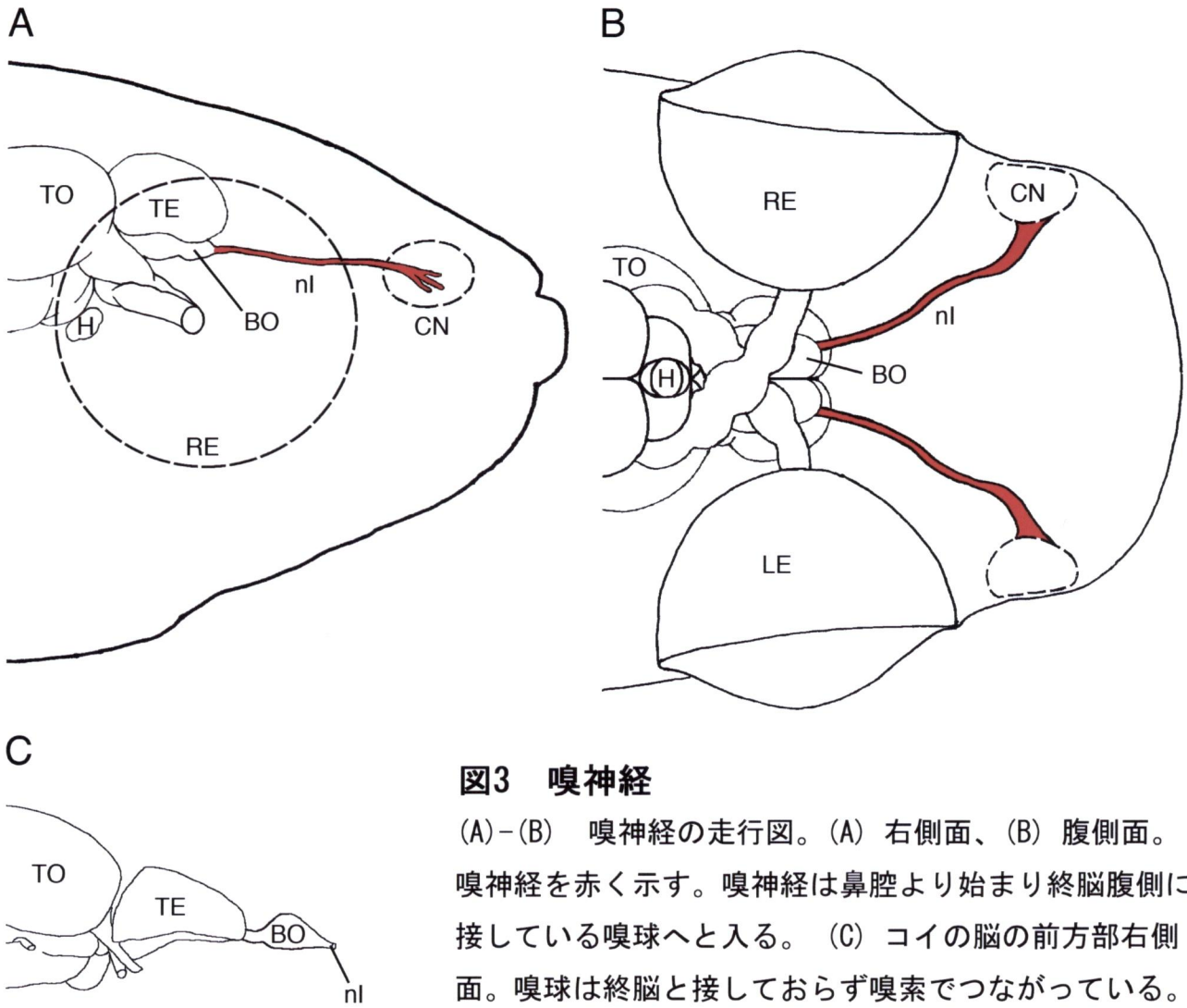


図3 嗅神経

(A)–(B) 嗅神経の走行図。(A) 右側面、(B) 腹側面。嗅神経を赤く示す。嗅神経は鼻腔より始まり終脳腹側に接している嗅球へと入る。(C) コイの脳の前方部右側面。嗅球は終脳と接しておらず嗅索でつながっている。

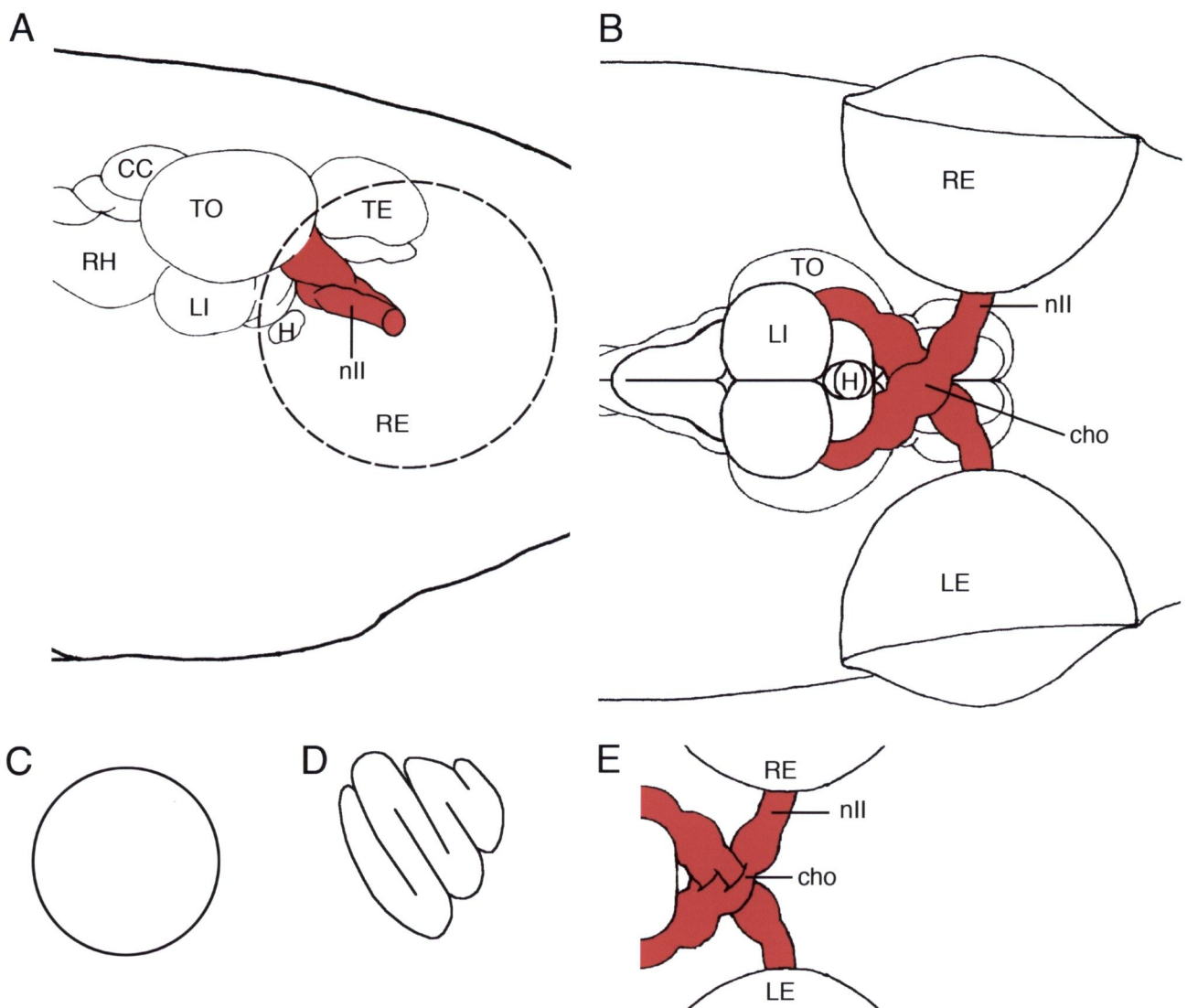


図4 視神経

(A)-(B) 視神経の走行図。(A) 右側面、(B) 腹側面。視神経を赤く示す。視神経は終脳の腹側で完全交叉している。(C)-(D) 視神経の断面図。(C) メダカ、(D) ゼブラフィッシュ。(E) ゼブラフィッシュの視交叉の模式図。腹側面。視交叉付近で左視神経が2本に右視神経が3本に分枝し、指を組むような形で交叉している。

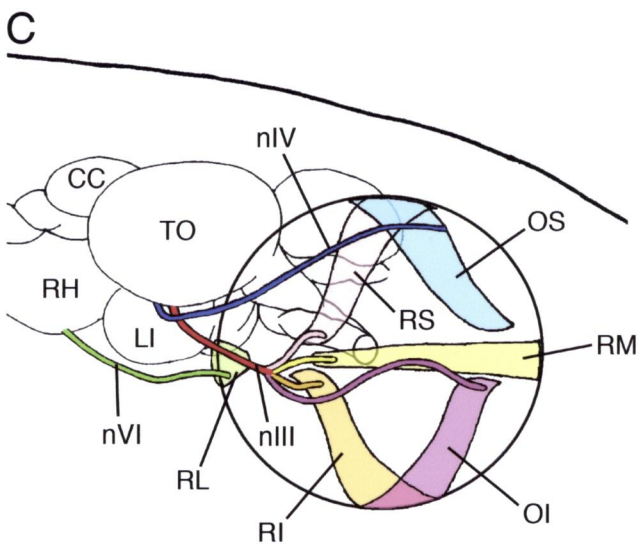
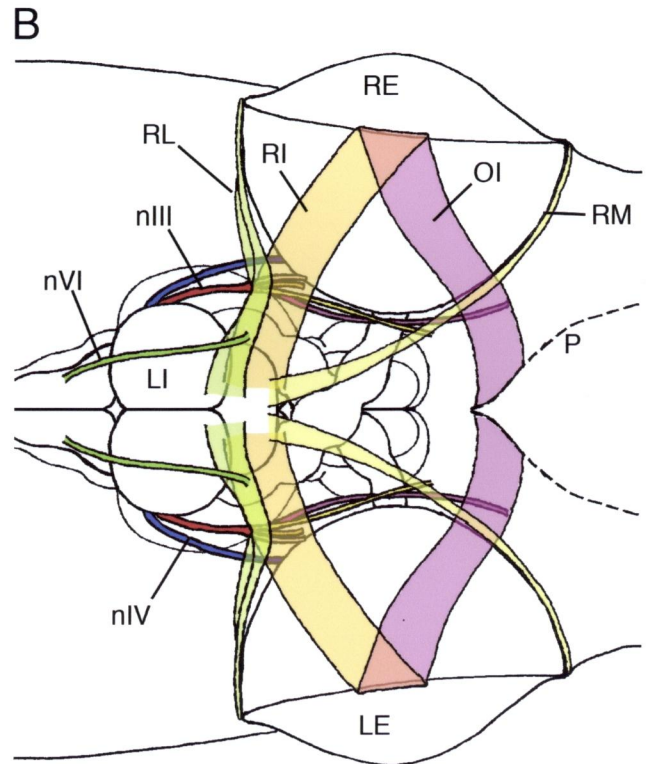
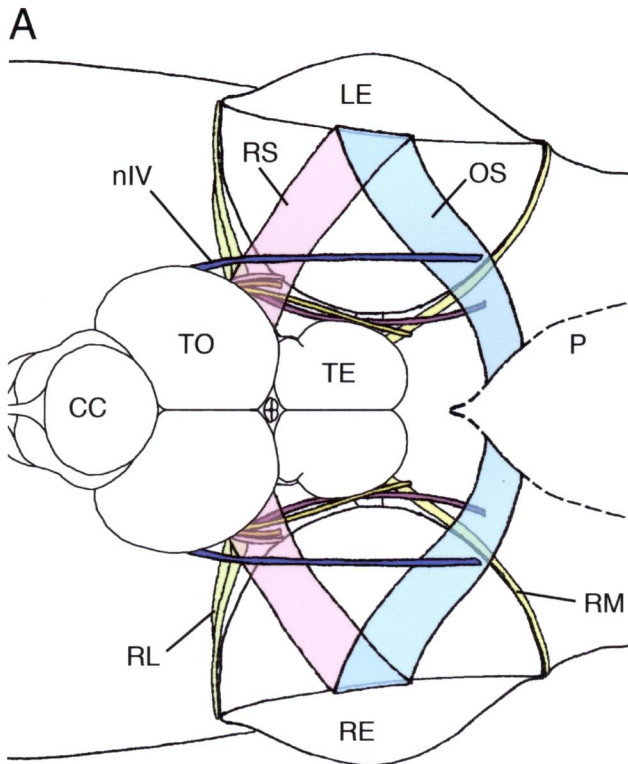
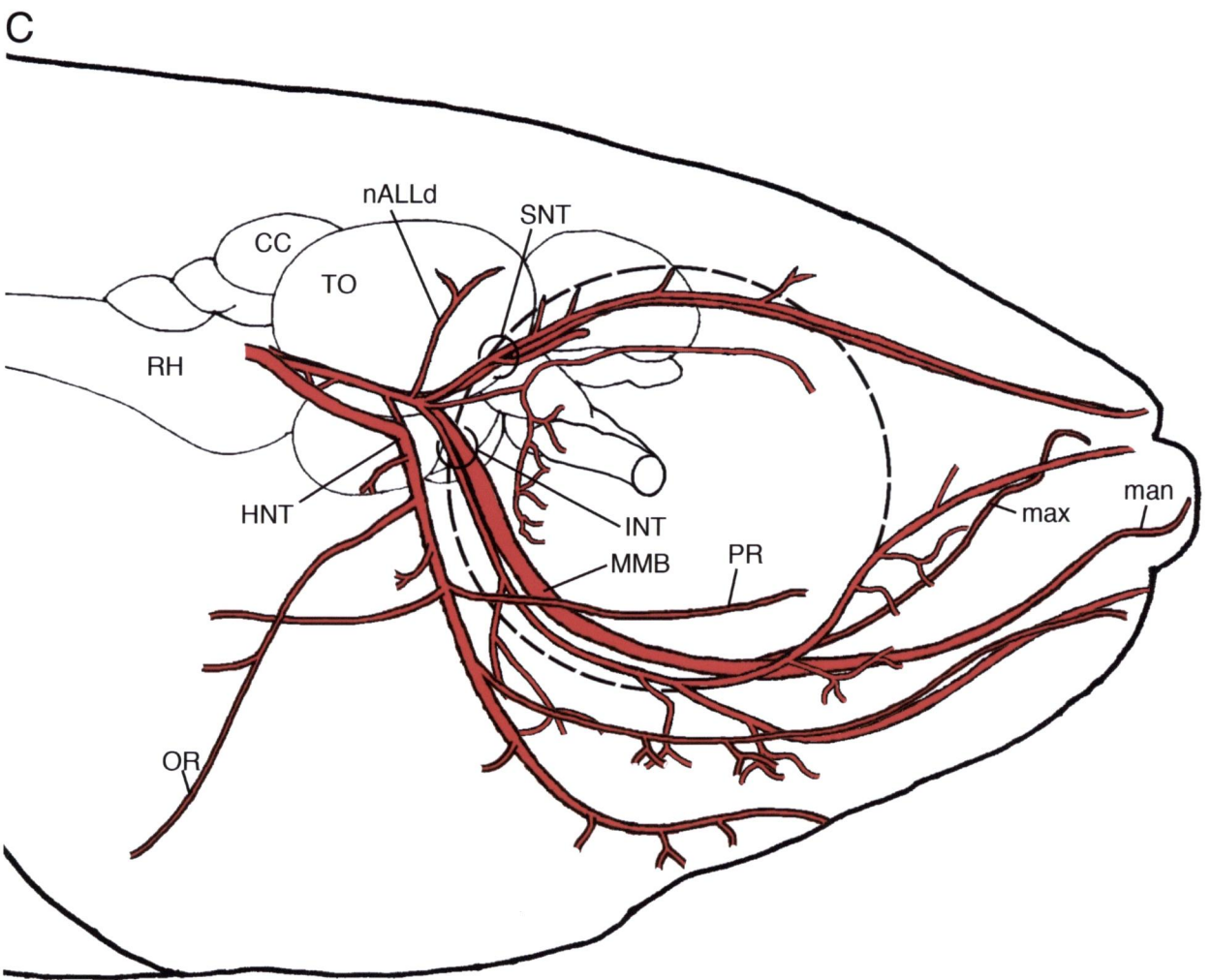
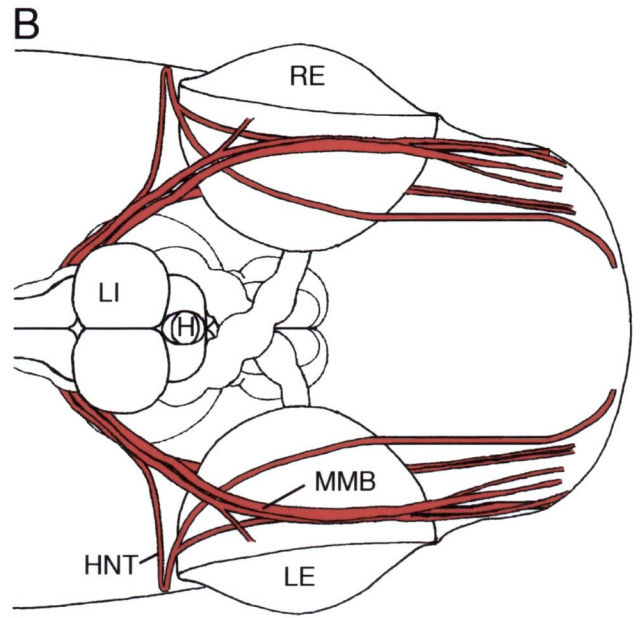
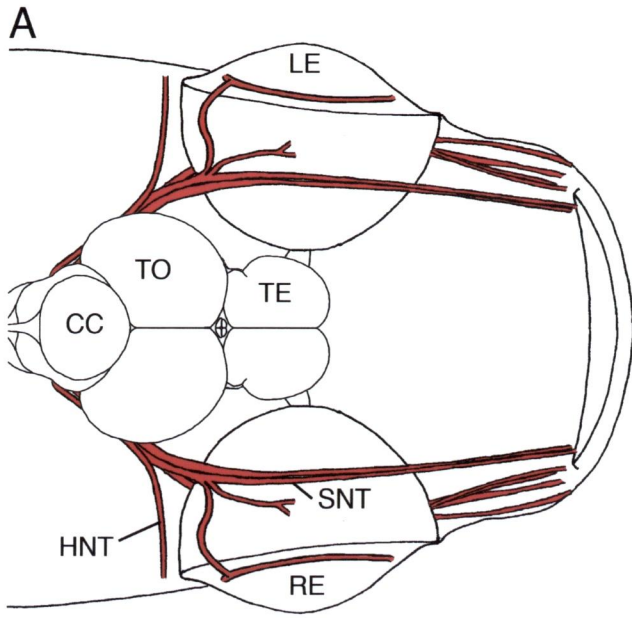


図5 動眼神経、滑車神経、外転神経

(A)-(C) 各脳神経が外眼筋を神経支配している図。(A) 背側面、(B) 腹側面、(C) 右側面。上斜筋を青、上直筋をピンク、内側直筋を黄、下斜筋を紫、下直筋をオレンジ、外側直筋を緑で示す。滑車神経を青、外転神経を緑、動眼神経を赤で示す。動眼神経の分枝は神経支配する筋肉と同じ色で示す。



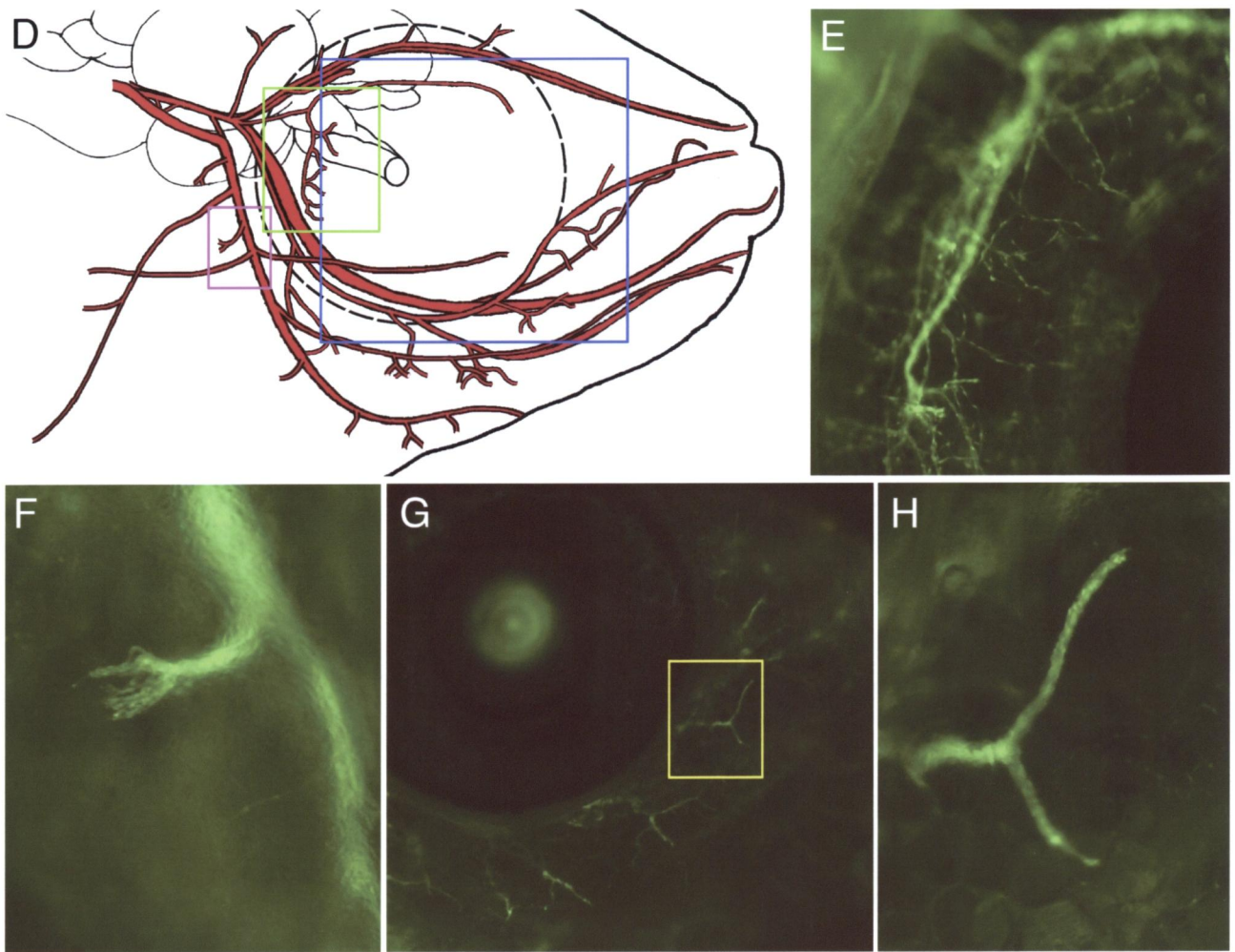


図6 三叉神経、顔面神経、前側線神経

(A)–(C) 神経束の走行図、(A) 頭部背側面、(B) 頭部腹側面、(C) 頭部右側面。(E)–(H) GFPトランスジェニックメダカの蛍光顕微鏡写真、(E) (D)の緑色の枠内、(F) (D)の紫色の枠内、(G) (D)の青色の枠内、(H) Gの黄色の枠内。

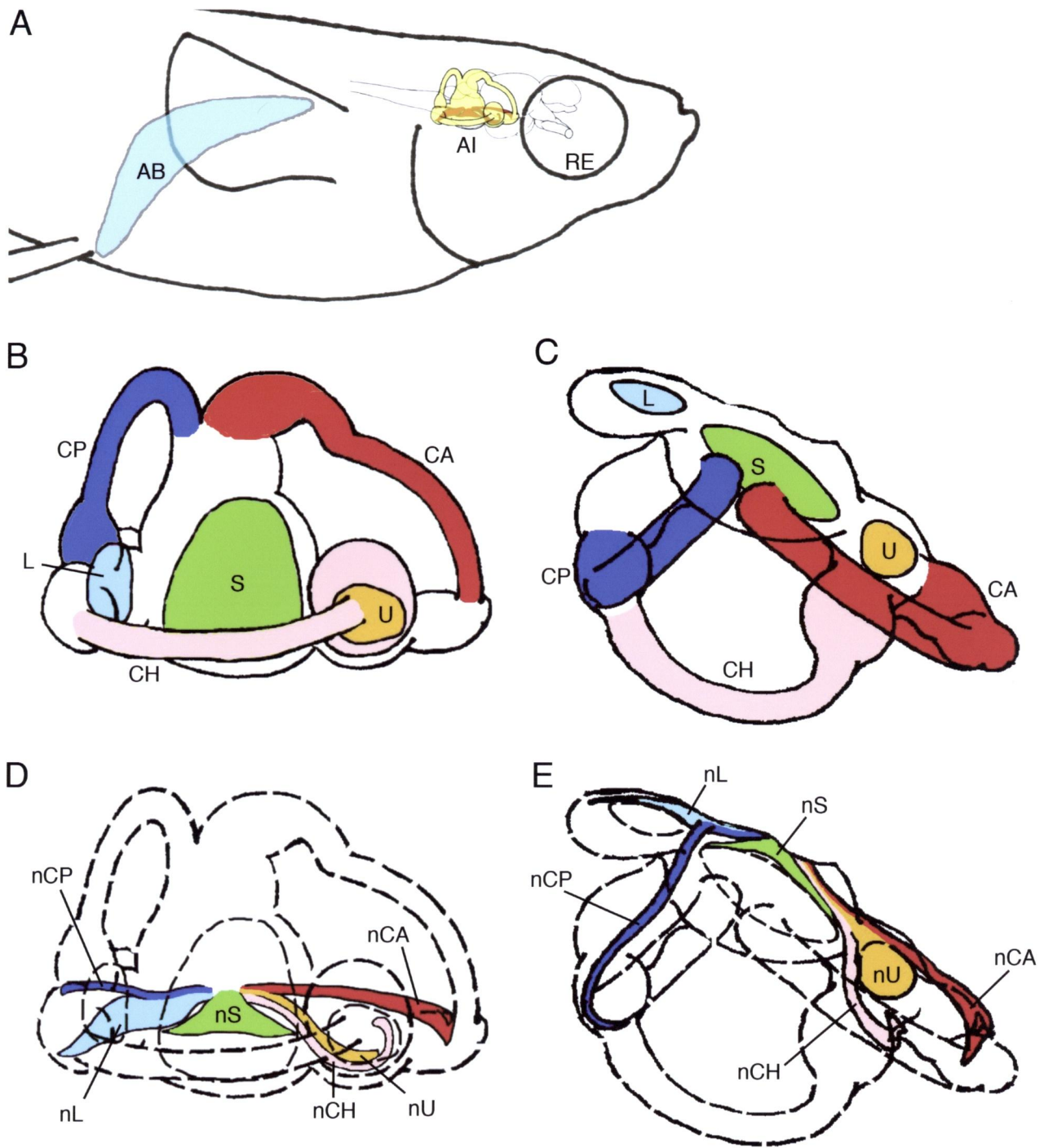
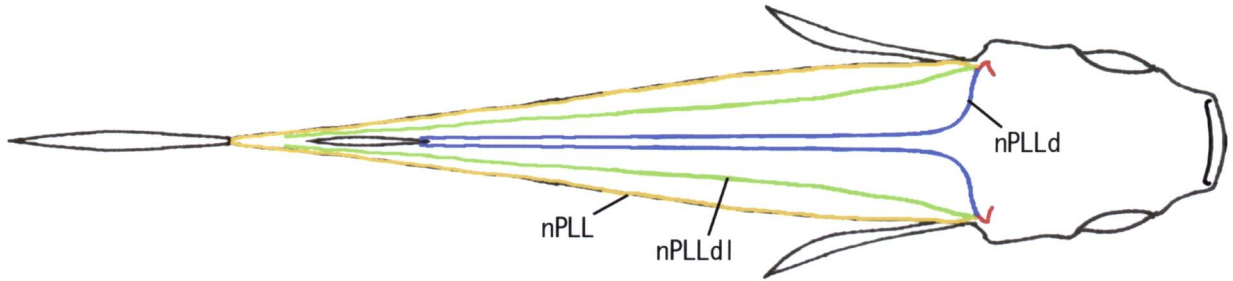


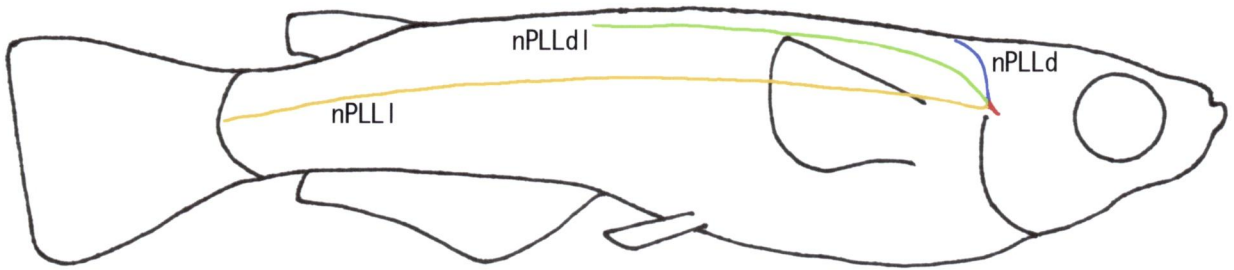
図7 第八神経

(A) 内耳と鰾の位置。右側面。内耳と鰾は接していない。(B)-(C) 膜迷路、(B) 右側面、(C) 背側面。前半規管は赤、後半規管は青、水平半規管はピンク、卵形嚢はオレンジ、球形嚢は緑、壺嚢はシアンで示す。(D)-(E) 第八神経の分枝、(B) 右側面、(C) 背側面。前半規管枝は赤、後半規管枝は青、水平半規管枝はピンク、卵形嚢枝はオレンジ、球形嚢枝は緑、壺嚢枝はシアンで示す。

A



B



C

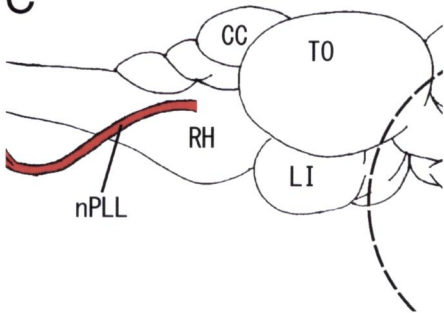


図8 後側線神経

(A)-(B) 胴部における神経束の走行図、(A) 背側面、(B) 腹側面。外側枝をオレンジ、背外側枝を緑、背側枝を青で示す。(C) 脳内への入行位置。後側線神経を赤で示す。右側面。

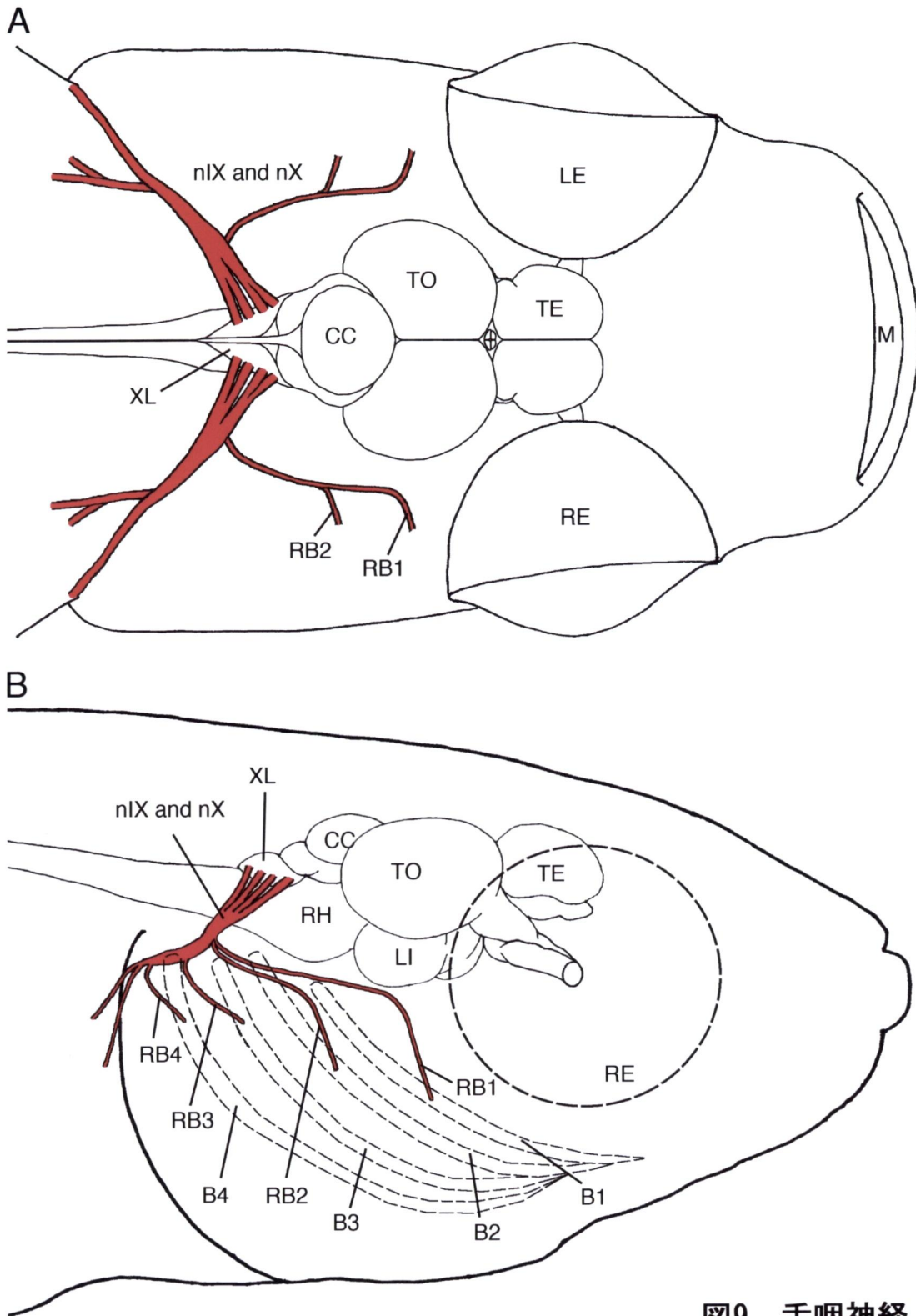


図9 舌咽神経、迷走神経

神経束の走行図、A) 頭部背側面、B) 頭部右側面。舌咽神経と迷走神経を区別できなかったため共に赤で示す。鰓弓に伸びる4本の分枝は終末まで確認できたが、内蔵に伸びる分枝の走行を追うことは出来なかった。

参考文献

- von Bartheld, C.S. and D.L. Meyer (1985) Trigeminal and facial innervation of cirri in three teleost species. *Cell Tissue Res* 241: 615-622
- Egami N, Yamagami K and Shima A (1990) *Biology of Medaka*. Tokyo Univ. Press, Tokyo [in Japanese]
- Finger TE (1976) Gustatory pathways in the bullhead catfish. 1. Connections of the anterior ganglion. *J Comp Neurol* 165: 513-526
- Freihofer WC (1972) Trunk lateral line nerves, hyoid arch gill rakers, and olfactory bulb location in Atheriniform, Mugilid, and Percoid fishes. *Occasional papers of the California Academy of Sciences* 95: 1-31
- Funakoshi K (2002) Autonomic nervous system. In “Neuroscience of Fishes” Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 263-273 [in Japanese]
- Furutani-Seiki M, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yoda H, Deguchi T, Hirose Y, Yasuoka A, Henrich T, Watanabe T, Iwanami N, Kitagawa D, Saito K, Asaka S, Osakada M, Kunimatsu S, Momoi A, Elmasri H, Winkler C, Ramialison M, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Shinomiya A, Kota Y, Yamanaka T, Okamoto Y, Takahashi K, Todo T, Abe K, Takahama Y, Tanaka M, Mitani H, Katada T, Nishina H, Nakajima N, Wittbrodt J and Kondoh H (2004) A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 647-658
- Grabher C, Henrich T, Sasado T, Arenz A, Wittbrodt J and Furutani-Seiki M (2003) Transposon-mediated enhancer trapping in medaka. *Gene* 322: 57-66
- Graf W and Baker R (1985) The vestibuloocular reflex of the adult flatfish. I. Oculomotor organization. *J Neurophysiol* 54: 887-899
- Graf W and McGurk JF (1985) Peripheral and central oculomotor organization in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 239: 391-401
- Hyodo-Taguchi Y and Sakaizumi M (1993) List of inbred strains of the medaka, *Oryzias latipes*, maintained in the Division of Biology, National Institute of Radiological

- Sciences. Fish Biol. J. Medaka 5: 29-30
- Ishikawa Y and Hyodo-Taguchi Y (1994) Cranial nerves and brain fiber systems of the medaka fry as observed by a whole-mount staining method. *Neurosci Res* 19: 379-386
- Ishikawa Y (1994) Innervation of lateral line system in the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Biol J Medaka* 6: 17-26
- Ishikawa Y, Yoshimoto M, Yamamoto N and Ito H (1999) Different brain morphologies from different genotypes in a single teleost species, the medaka (*Oryzias latipes*). *Brain Behav Evol* 53: 2-9
- Ito H and Yoshimoto M (1991) Nervous System. In “Fish Physiology” Ed by Y Itazawa and I Hanyu, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 363-402 [in Japanese]
- Ito H (2002) History and perspectives of fish brain research. In “Neuroscience of Fishes” Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 1-8 [In Japanese]
- Iwamatsu T (1997) The Integrated Book for the Biology of the Medaka. Daigaku Kyoiku Publ. Co., Ltd., Tokyo [in Japanese]
- Landacre FL (1910) The origin of the cranial ganglia in *Ameiurus*. *J Comp Neurol* 20: 309-411
- Leonard RB and Willis WD (1979) The organization of the electromotor nucleus and extraocular motor nuclei in the stargazer (*Astroscopus y-graecum*). *J Comp Neurol* 183: 397-413
- Luiten PG and Dijkstra-de Vlieger HP (1978) Extraocular muscle representation in the brainstem of the carp. *J Comp Neurol* 179: 669-675
- Luiten PGM (1979) Proprioceptive reflex connections of head musculature and the mesencephalic trigeminal nucleus in the carp. *J Comp Neurol* 183:903-912
- Nelson JS. (1994) *Fishes of the World* (3rd edition), John Wiley and Sons, New York.
- Popper AN (1983) Organization of the inner ear and auditory processing. In “Fish Neurobiology Vol 1” Ed by RG Northcutt and RE Davis, University of Michigan Press, Ann Arbor, pp 125-178

- Puzdrowski RL (1988) Afferent projections of the trigeminal nerve in the goldfish, *Carassius auratus*. J Morphol 198: 131-147
- Somiya H, Yoshimoto M and Ito H (1992) Cytoarchitecture and fiber connection of the Edinger-Westphal nucleus in the filefish. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 337: 73-81
- Szabo T, Lazar G, Libouban S, Toth P and Ravaille M (1987) Oculomotor system of the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. J Comp Neurol 264: 480-493
- Vanegas H and Ito H (1983) Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. Brain Res 287: 117-137
- Yamamoto T (1975) Medaka (Killifish)-Biology and Strains. Keigaku Publishing Co., Tokyo [in Japanese]
- Yasuoka A, Hirose Y, Yoda H, Aihara Y, Suwa H, Niwa K, Sasado T, Morinaga C, Deguchi T, Henrich T, Iwanami N, Kunimatsu S, Abe K, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting the formation of posterior lateral line system in Medaka, *Oryzias latipes*. Mech Dev 121: 729-738
- Yoshimoto M and Ito H (2002) Organization and function of the telencephalon. In "Neuroscience of Fishes" Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 178-195 [In Japanese]

第二部

脳神経の中樞分布

視神経、動眼神経、滑車神経、外転神経

要旨

メダカの視神経及び動眼神経、滑車神経、外転神経に対して、個別にトレーサーとして biocytin を注入し標識した後、脳の凍結切片を作製し光学顕微鏡下で観察することで、各脳神経の中樞投射と運動ニューロンの分布を調べた。

メダカの視神経は完全交叉型であり、脳内の 8 種類の神経核（視交叉上核、浅視蓋前域核、視床背外側核、視蓋前域背側部、視蓋前域腹側部、後交連核、副視束核、視蓋）に終末し、向網膜系神経細胞は 6 種類の神経核内（終神経節、視索前野、視床背外側核、視蓋前域背側部、視蓋前域腹側部、後交連核）に確認できた。視神経の中樞での終末と細胞体の分布は他の棘鱗上目の魚とよく似ていた。

動眼神経の運動ニューロンは末梢の神経束に対してそのほとんどが同側で、中脳の内側縦束の背内側に局在していた。滑車神経の運動ニューロンは末梢の神経束に対して対側で、中脳の内側縦束の背外側に局在していた。外転神経の運動ニューロンは末梢の神経束に対して同側で、菱脳の網様体の腹側に局在していた。この分布は硬骨魚類で共通しておりメダカもまた例外ではなかった。

序論

小型硬骨魚類であるメダカは、機能的な神経ネットワークを解析することに適した実験動物である（第一部序論参照）。硬骨魚類において脳の解剖学的解析は様々な魚種を用いて行われ、多くの貴重な知見が得られてきた（Davis and Northcutt, 1983; Ito and Yoshimoto, 1991; Uematsu *et al.*, 2002）。比較神経学な見地からは、魚種による脳の形態学的な多様性が着目され、この脳の多様性は、主として体性感覚区の局所的な膨大によるものであると言われており、種固有の生態的地位や外部環境によって、その種が受容しうる情報の種類や受容頻度が異なることと、魚の脳の形態学的多様性との関係が示唆されている（Ito and Yoshimoto, 1991; Ito, 2002）。メダカに関しては Anken and Bourrat (1998) や Ishikawa *et al.* (1999) によって脳のアトラスが作られている。しかし、これらは主に、脳の切片に Bodean 及び Nissl 染色を施し細胞構築学的な解析を行った結果によっており、メダカの脳神経の中樞投射や運動ニューロンの分布は標識実験で調べられてはいない。

メダカの中樞神経系を研究する土台として、脳神経の連絡を調べる一連の研究を開始した。脳神経は脳に感覚情報を送ると共に筋を直接支配する、いわば脳の情報のはり口である。メダカ（目高）はその名前が示すように、眼球が大きく、頭部の上端から飛び出しており、水面近くを遊泳して餌を探索する行動を示す（Yamamoto, 1975 ; Egami *et al.*, 1990; Iwamatsu, 1997）。すなわち、視覚に大きく依存する種と思われる。このことは脳や脳神経の形態学的な特徴からも支持された（第一部考察参照）。そこでまず始めに、視神経及び眼球運動を支配する脳神経（動眼神経、滑車神経、外転神経）の中樞投射と運動ニューロンの分布を biocytin によるトレーサー実験法を用い各脳神経を標識することで調べた。

材料と手法

標本

メダカ (*Oryzias latipes*) の南日本集団由来近交系 Cab-Kyoto (Carolina Biological Supply Company) 系統 (Furutani-Seiki *et al.*, 2004) を用いた。

魚は 9 L のアクリルタンクに約 30 匹入れ、14 時間–10 時間の明暗周期、水温 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 ± 0.5 の条件下で飼育した。餌は一日 2 回、午前 9 時と午後 1 時にブラインシュリンプ (*Artemia salina*) と粉餌 (Hikari Curst Guppy, Kyorin) を与えた。このように飼育したメダカの成魚 (3 ヶ月齢以上 ; 体長 2-3 cm) 17 匹を biocytin インジェクションに使用した。

麻酔とインジェクション後の処置

メダカを氷冷した麻酔液 (飼育水に 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS222, Sigma) を 0.04% 溶かしたもの) 中で約 5 分間処理し麻酔した。麻酔したメダカを解剖台に移し虫ピンで固定した。乾燥を防ぐため体幹部を飼育水で湿らせた紙 (キムワイプ, Kimberly-Clark Corporation) で覆った。以下の脳神経に biocytin をインジェクションする手技は、実体顕微鏡下 (MZ12.5, Leica) で作業を行った。インジェクション後は、乾燥を防ぐために体表をキムワイプで覆い時折水をかけて 30 分待ち、魚を水槽に戻し 1 日飼育した。

視神経の標識

7 匹のメダカを使用した。視神経を露出するために、左目と眼窩の間の皮膚を切り、上斜筋と上直筋を切り、眼球の付近で視神経を切り、虫ピンで眼球を刺し止めた。眼窩にある水分をキムワイプで取り除いた後、視神経切断面に biocytin

結晶 (ϵ -biotinoyl-L-lysine, Molecular Probe) を留置した。

動眼神経の標識

4 匹のメダカを使用した。動眼神経を露出するために、左目と眼窩の間の皮膚を切り、下斜筋、下直筋、外側直筋を眼球との付着部付近で切り、眼球を吻背側に返し、虫ピンで眼球を刺し止めた。眼窩にある水分をキムワイプで取り除いた後、眼窩内の尾側部で、上直筋、下斜筋、下直筋、内側直筋に分枝する手前の動眼神経に 1-2 μ l の biocytin 水溶液 (3% biocytin in 0.05 M Tris buffer, pH 7.2) を、PLI-100 Pico-Injector (Harvard/Medical Systems) を使って空気圧によりインジェクションした。

滑車神経の標識

5 匹のメダカを使用した。滑車神経を露出するために、左目と眼窩の間の皮膚を切り、眼球を腹側に少し返し、虫ピンで眼球を刺し止めた。眼窩内の背側部に見える上斜筋に終末する手前の滑車神経に動眼神経の実験と同じ手法で、biocytin 水溶液をインジェクションした。

外転神経の標識

1 匹のメダカを使用した。外転神経を露出するために、左目と眼窩の間の皮膚を切り、下斜、下直、外側直筋を眼球との接合部付近で切り、眼球を吻背側に返し、虫ピンで眼球を刺し止めた。眼窩内の尾側部、外側直筋に終末する外転神経に動眼神経の実験と同じ手法で、biocytin 水溶液をインジェクションした。

固定処理

メダカを氷冷した麻酔液中で約 5 分間処理し、麻酔した。魚を灌流台に移し、虫ピンで仰向けに固定した。実体顕微鏡下で開胸し、心臓を露出した。心尖にハサミ用いて少量の切開を加え、切開部から吻側方向に点滴用ガラス針を挿入した。2% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (PB) を流し約 5 分間灌流を行った。脳を取り出し 4% PFA, 0.5% glutaraldehyde in 0.1 M PB に漬け 4°C で一日以上固定処理した。

凍結切片の作製と染色

medaka 脳の固定標本を 30% sucrose in 0.1M phosphate buffer に移し替え 4°C で 12 時間おいた。試料を、37°C に調整した包埋液 (gelatin 15% (w/v), sucrose 5% (w/v) in 0.1 M PB) 中に包埋し、-20°C に温度調節したクライオスタット内で冷却した。脳はクライオスタットで 50 μm の横断切片を連続的に切り出した。切片は 48-well plate (底をくり抜いた後、網で覆った物) に個別に入れ、以下の手順で染色を施した。

まず 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) (0.9% NaCl) で 10 分間リンスした。次に 70% methanol, 3% H_2O_2 水溶液に 10 分間浸けた。0.1 M PBS で 8 分間、2 回洗い avidine-biotin complex (ABC) 水溶液 (1% ABC (Streptavidin Biotin Complex Peroxidase kit, Nacalai Tesque), 0.4% Triton-X-100 in 0.1 M PBS) で 3 時間反応させた。50 mM Tris-HCl で 5 分間 3 回洗った後、diaminobenzidine (DAB) 溶液 ($6 \times 10^{-4}\%$ DAB, 0.4% ammonium nickel (II) sulfate hexahydrate, and $3 \times 10^{-4}\%$ H_2O_2 in distilled water) に発色するまで浸けた (約 5-10 分間)。100 mM Tris-HCl で 5 分間、3 度洗い発色反応を止めた。染色した切片は 1 度蒸留水で洗い silan coated slides (super frost white

MAS; Matsunami) 上に切断順に並べて一日以上乾燥させた後、0.1% cresyl violet を用いた Counter Staining (Nissl staining) を行った。

図の制作

写真は光学顕微鏡 (AX80, Olympus) に接続したデジタルカメラ (DP70, Olympus) で撮影しコンピューターに取り込んだ。明るさとコントラストのみを Adobe Photoshop (Adobe) で調節した。線画は光学顕微鏡に取り付けたカメラルシードを用いて描画した。

結果

最初に視神経の解析結果を 1) 視交叉の交叉パターン、2) 順行性に標識されたパターン (Retinofugal system)、3) 逆行的に標識されたパターン (向網膜系) の順に述べる。次に外眼筋を神経支配する脳神経の解析結果を述べる。

視神経

1. 視交叉

視神経の標識線維は視交叉に向かい、全ての標識線維が正中線を越えていた。視交叉を越えた標識線維は視索となって反対側の脳に入っていた。すなわち、メダカの視神経は完全交叉型である。

2. Retinofugal system

a. 視索前野

視交叉を横切った直後背側に向かい脳に入る小線維束が見られた。この線維束は視交叉の真上にある視交叉上核に終わっていた (図 1C, 2A)。視交叉上核の終末は、吻側は nucleus entopeduncularis の高さから、尾側は手綱の吻側端の高さまで見られた。視交叉上核に見られた標識線維の一部は、手綱の高さで commissura minor of Ishikawa *et al.* (1999) で再度交叉し、インジェクションと同側の視交叉上核に終末を形成していた (図 1C)。

b. 視床、視蓋前域

視交叉から尾外側に向かう標識線維は背側に曲がり 1 束の太い視索を形成するが、その後分枝を出しながら視床や視蓋前域、視蓋に終末していた。視索は視床、

視蓋前域背側部、視蓋に終わる視索背内側部と視蓋前域腹側部、副視索核、視蓋に終わる視索腹外側部に分けられた。

手綱の高さで視索の背外側に局在する浅視蓋前域核に密な終末領域が観察された。標識線維はこの核の表層部のニューロパイルに特に密に終末していた（図 1C, 2B）。

同様のレベルで、視索から背内側に向かう線維束が分岐し終末領域を形成していた（視床背外側部；図 1C）。より尾側の手綱が最も大きく見える高さでは、この終末領域、視床背外側部が背腹に最も広がり、終末の分布は非常に密であった（図 1D, 2C）。

視床背外側部に見られる線維は尾側に続き後交連の腹外側部にも終末領域（後交連核）を形成していた（図 1E, 2D）。一部の線維は後交連で交叉し、インジェクションした同側の後交連核に終わっていた（図 1F）。

視索背内側部の線維の一部は視蓋に向かう途中で、終末領域を形成していた（視蓋前域背側部；図 1D, 2D）。視蓋前域背側部の腹側にも視索からの線維が形成する終末領域（視蓋前域腹側部）が見られた（図 1D, E）。

c. 副視索核

視蓋前域腹側部を通り抜けさらに尾内東側に伸びる線維束が見られた。これらの標識線維は後交連核の腹側の副視索核に終末していた（図 1F, 2G）。

d. 視蓋

最大の網膜の投射先は視蓋である。視索背内側部は背内側部から、視索腹外側部は腹外側部から視蓋に入っていた（図 1D）。メダカの視蓋は硬骨魚類に共通し

て見られる六層構造を有していることが明らかにされている (Ishikawa *et al.*, 1999)。標識線維は主に視神経繊維層と浅繊維灰白層を走行し終末していた。標識線維の一部はより深い層である中心白質層にも終わっていた (図 2H)。浅繊維灰白層は標識線維の走行の密度により、密度の濃い表層と密度の薄い深層に別れているように見えた。

3. 向網膜系

メダカでは網膜に投射する標識ニューロンが、6つの神経核に確認できた。終脳の終神経節、視索前野網膜投射核および終末領域でもある視床背外側部、視蓋前域背側部、視蓋前域腹側部、後交連核である。

終神経節は終脳腹側野腹側部に存在する大形のニューロンの集団であった (図 1A, 3A)。標識された細胞体の形は梨状もしくは卵形であった。終神経節の標識ニューロンからの線維は背尾側に延び手綱の吻側端の高さで腹外側に曲がり、視索と合流していた (図 1C)。

視索前野網膜投射核内には約 20 個の標識ニューロンが、視索前野と視索との境界付近に見られた (図 1B)。視索前野網膜投射核の標識細胞の形は卵形であった。尾側にいくに従って、視索前野網膜投射核の標識ニューロンは背側に分布するようになり、視床背外側部に達する (図 1C, 3B)。すなわち視床背外側部の標識ニューロンは視索前野網膜投射核の標識ニューロンと続いている様に見えた (図 1C,D, 3C)。視床背外側部の標識ニューロンの形状は梨状もしくは卵形であった。視床背外側部のすぐ尾側に位置する後交連核にも少数の卵形の標識ニューロンが見られた (図 3D)。大きさは他の領域の標識ニューロンに比べて小さかった。視索前野網膜投射核から外側にも少数の卵形した標識ニューロンが見られ、視蓋前

域腹側部に続いていた（図 1D）。視蓋前域背側部にも標識ニューロンが 1 つだけあった（図 1D）。

外眼筋を神経支配する脳神経

動眼神経核は外側陥凹の尾側部の高さで、中脳被蓋の背内側部に存在し、内側縦束の背内側に沿って局在していた（図 4A,B）。ほとんどの標識ニューロンは同側に見られたが少数の細胞が対側にも見られた。動眼神経核の標識ニューロンは紡錘状もしくは梨状をしていた。これらの標識ニューロンから延びた線維は 1 束となって腹側に延び、外側方向に曲がって中脳腹側部から動眼神経となって脳外に出ていた（図 4A）。動眼神経核の標識ニューロンからは内側縦束に標識線維が入っていき、内側縦束内を尾側に延びていた。

滑車神経核は動眼神経核より尾側、脚間核の高さで、内側縦束の背外側に局在していた（図 4C,D）。滑車神経核の標識ニューロンは紡錘状もしくは梨状をしていた。滑車神経核から内側に延びる標識線維は第四脳室の背側を弓なりに延び *commissura cerebelli* を通って対側に延びていた。対側に延びた線維は外側に延びた後、腹側に折れ曲がり、動眼神経よりも尾外側の位置より脳外に出ていた（図 4C）。滑車神経核の標識ニューロンからも内側縦束に標識線維が入っていき、内側縦束内を尾側に延びていた。

外転神経核は他の外眼筋支配神経核から尾側に遠く離れ菱脳の腹側部、網様体の腹外側に局在していた（図 4E,F）。外転神経核の標識ニューロンは卵形あるいは梨状であった。

考察

メダカの視神経、動眼神経、滑車神経、外転神経に対してトレーサー実験法によってその中枢への投射、神経核の位置や形状を明らかにしたのは本論文が初めてである。本論文により、これまでの細胞構築学的な解析結果 (Anken and Bourrat, 1998; Ishikawa *et al.*, 1999) だけでは分からなかったメダカの神経回路が一部明らかにすることが出来た。またメダカは棘鱗上目の中のスメグマモルフ系に属する (Nelson, 1994) が、全体的にこれまでの硬骨魚類の報告と比べて大きく異なることはなく、視神経の向網膜系ニューロンの分布は、系統分類学的に離れているゼブラフィッシュやコイなどの骨鰾類のそれとは異なり、同じ棘鱗上目の中の系統分類学的に近いイトウダイなどのイトウダイ型魚類やウマヅラハギなどのスズキ型魚類に似ていた。しかしメダカの神経核は、これまで報告されてきた硬骨魚類の神経核と比べると幾分明瞭に区分できないように続いているような傾向があった。後交連核に向網膜系ニューロンが観察されたのは本研究によるメダカでの報告が初めてであるが、メダカは上記のように神経核が明瞭に区分されていないためかもしれない。

以下からは脳神経の種類と投射系に分けてさらなる考察を記述する。まず、視神経の 1) Retinofugal system について、他の硬骨魚類で分かっている視覚上行路の結果全体をふまえた上での考察、2) 向網膜系についての考察の順に述べる。次に外眼筋を神経支配する脳神経の運動神経核の分布について、考察を述べる。

視神経

1. Retinofugal system

メダカの網膜投射は反対側優位であった。標識終末は視交叉上核、浅視蓋前域

核、視床背外側核（視床腹外側核への投射とされる場合もある；e.g. Braford and Northcutt, 1983; Northcutt and Wullimann, 1988）、視蓋前域背側部、視蓋前域腹側部、後交連核、副視索核そして視蓋の 8 カ所に見られた。同側性の投射は視交叉上核、後交連核の 2 カ所で、少数の終末が見られた。これらの投射先および反対側への投射の優位性は他の硬骨魚類（see review by Vanegas and Ito, 1983）と基本的には一致する。しかしながら、スズキ型魚類で報告がある視床腹内側核への投射（e.g. Ito *et al.*, 1984）はメダカでは確認できなかった。なお、骨鰾類、カラシン目のピラニアでは例外的に同側投射が豊富に存在することが知られている（Ebbesson and Ito, 1980）。今回メダカで見られた同側の後交連核への投射は骨鰾類でその存在が知られている（e.g. コイ（Reperant *et al.*, 1976）、ピラニア（Ebbesson and Ito, 1980）、キンギョ（Springer and Gaffney, 1981））。

上述のように、網膜投射は複数の神経核に至る。これらは視覚情報を複数の機能回路に送り、並行的処理を行うためと思われる。視交叉上核は視交叉のすぐ背側に位置し他の網膜投射受容神経核とは別個の線維束から入力を受ける点などの類似性から、哺乳類等の同名の核に相当すると思われる。硬骨魚類での機能は不明であるが、他の脊椎動物と同様に概日リズムに関わる可能性が高い（Klein *et al.*, 1997; Yu and Reiter, 1993）。視蓋前域の諸核は網膜投射を受けるとともに小脳へ投射するものが多い（Meek and Nieuwenhuys, 1998）。視蓋前域背側部、視蓋前域腹側部や副視索核は、ウマツラハギで小脳だけでなく動眼神経核、外転神経核にも投射することが知られている（Uchiyama *et al.*, 1988）。従って、これらの神経核は視覚像が網膜上で安定な位置に投影されるように眼球運動を制御する回路を構成していると推測される。

後交連核は、ウマツラハギにおいて動眼神経副核（or Edinger-Westphal 核）を

介して毛様体神経節に情報を送り、遠近調節に関わることが知られている (Somiya *et al.*, 1992)。視床背外側核は視床に属する神経核であるが、多くの硬骨魚類において終脳への投射はないかあっても微弱である (Striedter, 1990; Yamamoto and Ito, 2000)。スズキ型魚類とイトウダイ型魚類の視覚系では、視覚は視蓋から視床前核を介して終脳に上行する経路が発達している (Ito *et al.*, 1980; Ito and Vanegas, 1983, 1984)。浅視蓋前域核からは下葉に至る回路が起こることが分かっている (Murakami *et al.*, 1986; Sakamoto and Ito, 1982; Shimizu *et al.*, 1999)。下葉には味覚あるいは内臓感覚が到達することがスズキ型魚類で知られており (Yoshimoto *et al.*, 1998)、また電気刺激実験により摂食行動が誘発できることが知られている領域でもある (Demski, 1983)。浅視蓋前域核からの視覚情報が摂食行動制御に関与しているかも知れない。

今回のメダカの研究では、皮質核のニューロンの細胞体には終末は見られなかったが、よく似た状況がスズキ型魚類でも報告されている (Ito *et al.*, 1984; for review see Vanegas and Ito, 1983)。皮質核は、骨鰐類には見られず、スズキ型魚類でよく発達している (Ito and Yoshimoto, 1991; Yamamoto and Ito, 2002)。メダカにも皮質核は存在していた (図 1C-E)。生理学的な研究により、皮質核は網膜からの入力を受けることがスズキ型魚類で知られている (Rowe and Beauchamp, 1982)。また、皮質核のニューロンは視蓋の浅繊維灰白層および中心灰白層に長大な樹状突起をのばすことが知られている (Sakamoto and Ito, 1982; Shimizu *et al.*, 1999)。メダカの皮質核のニューロンの樹上突起形態は不明であるが、近縁のスズキ型魚類と同様であるならば、メダカにおいても網膜投射を受けられる。

メダカの視蓋が6層構造を有していることは Ishikawa *et al.*, 1999 によって報告されている。視蓋が表面から内部へ辺縁層、視神経線維層、浅繊維灰白層、中心

灰白層、中心白質層、脳室周囲層の 6 層からなることは硬骨魚類に共通して見られる構造である (Ito and Yoshimoto, 1991, Yamamoto and Ito, 2002)。硬骨魚類では視神経の投射線維は、辺縁層では見られず、主に視神経線維層と浅繊維灰白層を走行し終末し、少数の線維が深層の中心灰白層や中心白質層にも至る (Yamamoto and Ito, 2002)。最深層の脳室周囲層には表面部分に視神経線維が終末している報告例がある (Vanegas and Ito, 1983)。メダカでも他の硬骨魚類と同様に、視神経の標識線維は主に視神経線維層と浅繊維灰白層を走行し終末し、標識線維の一部はより深い層である中心白質層にも終わっていた (図 2H)。浅繊維灰白層は標識線維の走行の密度により、密度の濃い表層と密度の薄い深層に別れているように見えた。なお、視蓋は視覚情報を終脳へと送る中継核であるだけでなく、視覚以外の感覚情報も受け取り様々な部位に線維を送っている (for review see Vanegas and Ito, 1983; Meek and Nieuwenhuys, 1988; Yamamoto and Ito, 2002)。

2. 向網膜系

メダカでは網膜に投射する標識ニューロンが、対側の終神経節、視索前野網膜投射核、視床背外側核、視蓋前域背側部、視蓋前域腹側部、後交連核の 6 箇所を確認できた。後交連核の向網膜系ニューロンは硬骨魚類でこれまで報告されていない。

終神経節が網膜に投射することは、Münz and Claas (1981) が最初に発見して以来、各種の魚類で確認されてきた (Uchiyama, 1989)。終神経節の存在する位置は種によって異なっている。嗅球が終脳本体から遠く離れて嗅上皮の近くに位置する柄型では、終神経節は嗅球の吻側部にあり、嗅球が終脳のすぐ吻側に位置する無柄型では嗅球と終脳の境界領域に位置するのが一般的である (Demski, 1993)。

無柄型の嗅球を持つメダカでは、終神経節はやはり嗅球と終脳の境界領域に位置していた。終神経節のニューロンは gonadotropin-releasing hormone (GnRH) を産生し (for review, see Demski, 1993, Yamamoto, 2003)、嗅覚・視覚・一般体性感覚を受け、脳の広範な領域に投射し (Yamamoto *et al.*, 1995; Yamamoto and Ito, 2000)、神経修飾系として機能すると考えられている (for review see, Oka, 1997)。終神経節に由来する GnRH は網膜の興奮性に影響を与えることが知られている (Stell *et al.*, 1984; Walker and Stell, 1986; Umino and Dowling, 1991)。しかしながら、行動レベルでの機能は、スズキ型魚類に属するドワーフゲーラミーで雄の巣作り行動の制御に関わることがわかっているものの不明な点が多い (Yamamoto *et al.*, 1997; Yamamoto, 2003)。実験動物としての優位性を持つメダカは終神経節の機能研究の格好の材料となりうる。

メダカでは終脳だけでなく間脳にも向網膜系ニューロンが見られた。これは、他の棘鱗上目の魚と共通した性質である (Uchiyama, 1989; Butler and Northcutt, 1992)。骨鰾類では、間脳には向網膜系ニューロンは見つかっておらず、骨鰾類のゼブラフィッシュでも終神経節 (the nucleus olfactoretinalis: Burrill and Easter, 1994) のみ報告がある。なぜこのような違いがあるのかは不明であるが、骨鰾類よりも古くに分化した軟質魚類チョウザメでも間脳に向網膜系ニューロンが見られる (Hofmann *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1999) ことから、間脳での向網膜系ニューロンの欠損は骨鰾類で派生した特徴であると思われる。

メダカでは間脳のいくつかの神経核に向網膜系ニューロンが見られ、これらのニューロンは連続的な分布をしていた。視索前野網膜投射核と視床背外側核の向網膜系ニューロンが連続的な分布をすることは、スズキ型魚類でも観察されている (Ito *et al.*, 1984)。メダカの間脳に向網膜系ニューロンの大きさには核ごとに若干の

差がみられたものの、総じて4-6 μm 程度の小型ニューロンである点も共通している。これらの網膜投射ニューロンは、実際には単一のニューロン集団なのかもしれない。メダカでは他の種よりももっと散在的に存在するため多くの核に分布するのもかもしれない。今後これらのニューロンの網膜投射以外の線維連絡や伝達物質を比較検討する必要がある。

ウマヅラハギやカワハギなどのフグ目（スズキ型魚類に属する）では、視索前野網膜投射核が非常に発達していて、脳の片側に 8,000-10,000 個ものニューロンが存在している（Uchiyama *et al.*, 1981; Uchiyama and Ito, 1984）。フグ目では、視索前野網膜投射核は視蓋からの投射を受ける（Uchiyama *et al.*, 1986）。視索前野網膜投射核は視覚的な注意を集中している網膜上の点を移して行く働きを持つと推測されている（Uchiyama, 1989）。フグ目は視覚系の発達が極めてよいが、今回研究材料としたメダカも視覚系の発達は良いものの、視索前野網膜投射核内に標識された神経細胞数が 20 個ほどと視索前野網膜投射核の発達はそれほどでもない。標識されずに残っているニューロンの存在を考慮しても二桁もの差がある。また、やはり視覚系がよく発達している鉄砲魚（スズキ型魚類）でも視索前野網膜投射核の発達は悪い（Tanaka, Yoshimoto, Yamamoto, Ito and Somiya, personal communication）。メダカと鉄砲魚は水面上あるいは水上の餌をさがすという共通点があり、一方フグ目は水中の対象を両眼で見るという特徴を持つ。視索前野網膜投射核の発達程度の違いはこのような視覚情報の利用の仕方の違いによるかもしれない。この問題は他の多くの種で定量的な解析を行うことによって検討可能である。

外眼筋を神経支配する脳神経

メダカでは、神経支配している外眼筋に対して、動眼神経の運動ニューロンは概ね同側に局在し、滑車神経の運動ニューロンは対側に局在し、外転神経の運動ニューロンは同側に局在していた。このような一側優位の投射は、これまで調べられた、コイ（骨鰈類）（Luiten and Dijkstra-de Vlieger, 1978）、カサゴ（スズキ型）（Leonard and Willis, 1979）、キンギョ（骨鰈類）（Graf and McGurk, 1985）、カレイ（スズキ型）（Graf and Baker, 1985）、弱電気魚（アロワナ上目）（Szabo *et al.*, 1987）、カワハギ（スズキ型）（Somiya *et al.*, 1992）といった他の硬骨魚と同様であった。これらの魚では、トレーサーを脳神経に直接注入せず各外眼筋に注入する手法を取っており、動眼神経核は神経支配の対象とする筋に対応した亜核に分けられることが知られる。Graf and McGurk (1985) によるとこの実験法では全ての運動ニューロンを標識出来ないので、今回メダカの実験では、各脳神経に直接トレーサーを注入したが、今後メダカでも各外眼筋にトレーサー実験を行って検討する必要がある。また、コイ（Luiten and Dijkstra-de Vlieger, 1978）、キンギョ（Sterling and Gestrin, 1975; Sterling, 1977; McGurk and Graf, 1984; Graf and McGurk, 1985; Cabrera *et al.*, 1992; Pastor *et al.*, 1991）、カサゴ（Leonard and Willis, 1979）、カレイ（Graf and Baker, 1985）では、外転神経核は吻側部と尾側部に分かれていることが知られている。このことは、今回のメダカでの実験では明らかにならなかったが、外転神経が脳に入った後、吻尾に2束となって分かれている（data not shown）ことから、メダカでも外転神経核が吻側部と尾側部に分かれている可能性がある。

総括

魚類における脳内の神経ネットワークに関してはまだまだ不明な点が多く現在でも研究が進められており、日本では伊藤博信のグループによってティラピア（ス

ズキ型魚類) やコイを対象として精力的な研究がなされている。一方、メダカにおける脳内の神経ネットワークの解剖学的解析は、ほとんど行われていない。この理由の一つとしてメダカが小さく標識実験が困難であることがあげられる (N. Yamamoto, personal communication)。しかし、メダカの脳神経の末梢分布を調べた (第一部参照) 手技を生かし本研究を行うことが出来た。

本研究によって、メダカの視神経の中樞投射、向網膜系、外眼筋を支配する運動ニューロンの分布が明らかになった。近年、眼球運動について生理学的、行動学的な研究がメダカを使って行われた (Beck *et al.*, 2004)。本研究はこのような生理学的、行動学的な研究にとって解剖学的な基礎を提供するであろう。また、現在他の脳神経についても同様の解析を行っている。これらの知見は中枢回路を形態学および生理学的に調べるために必須なデータである。また、メダカの実験動物としての有用性を生かして、様々な行動の発現や制御に関わる遺伝子を研究するための土台としても本研究は重要であると考えられる。

略号

AON	accessory optic nucleus	副視索核
APd	area preectalis pars dorsalis	視蓋前域背側部
APv	area preectalis pars ventralis	視蓋前域腹側部
CC	corpus cerebelli	小脳体
CG	corpus glomerulosum	糸球体核
CR	crista cerebellaris	
DLT	nucleus dorsolateralis thalami	視床背外側核
Dm	area dorsalis telencephali pars medialis	終脳背側野内側部
Dp	area dorsalis telencephali pars posterior	終脳背側野後側部
flm	fasciculus longitudinalis medialis	内側縦束
GR	corpus glomerulosum pars rotunda	糸球体円形部
H	hypophysis	下垂体
HB	habenula	手綱
LI	lobus inferior	下葉
nIII	oculomotor nerve	動眼神経
NIII	oculomotor nucleus	動眼神経核
nIV	trochlear nerve	滑車神経
NIV	trochlear nucleus	滑車神経核
nVI	abducens nerve	外転神経
NVI	abducens nucleus	外転神経核
NC	nucleus corticalis	皮質核
NDLI	nucleus diffusus lobi inferioris	下葉の散在核

NE	nucleus entopeduncularis	
NPC	nucleus of the posterior commissure	後交連核
NRL	nucleus recessus lateralis	外側陷凹
PA	preoptic area	視索前野
PC	posterior commissure	後交連
PRN	preoptic retinopetal nucleus	視索前野網膜投射核
PS	nucleus pretectalis superficialis	淺視蓋前域核
RF	reticular formation	網樣體
SAC	stratum album centrale	中心白質層
SC	suprachiasmatic nucleus	視交叉上核
SFGS	stratum fibrosum et griseum superficiale	淺線維灰白層
SGC	stratum griseum centrale	中心灰白層
SM	stratum marginale	邊緣層
SO	stratum opticum	視神經線維層
SPV	stratum periventriculare	腦室周圍層
TE	telencephalon	終腦
TL	torus longitudinalis	縱走堤
TNG	ganglion of the terminal nerve	終神經節
TO	tectum opticum	視蓋
tro	tractus opticus	視索
trod	tractus opticus dorsomedialis	視索背內側部
trov	tractus opticus ventrolateralis	視索腹外側部
TS	torus semicircularis	半圓堤

VC valvula cerebelli

Vv area ventralis telencephali pars ventralis 終脳腹側野腹側部

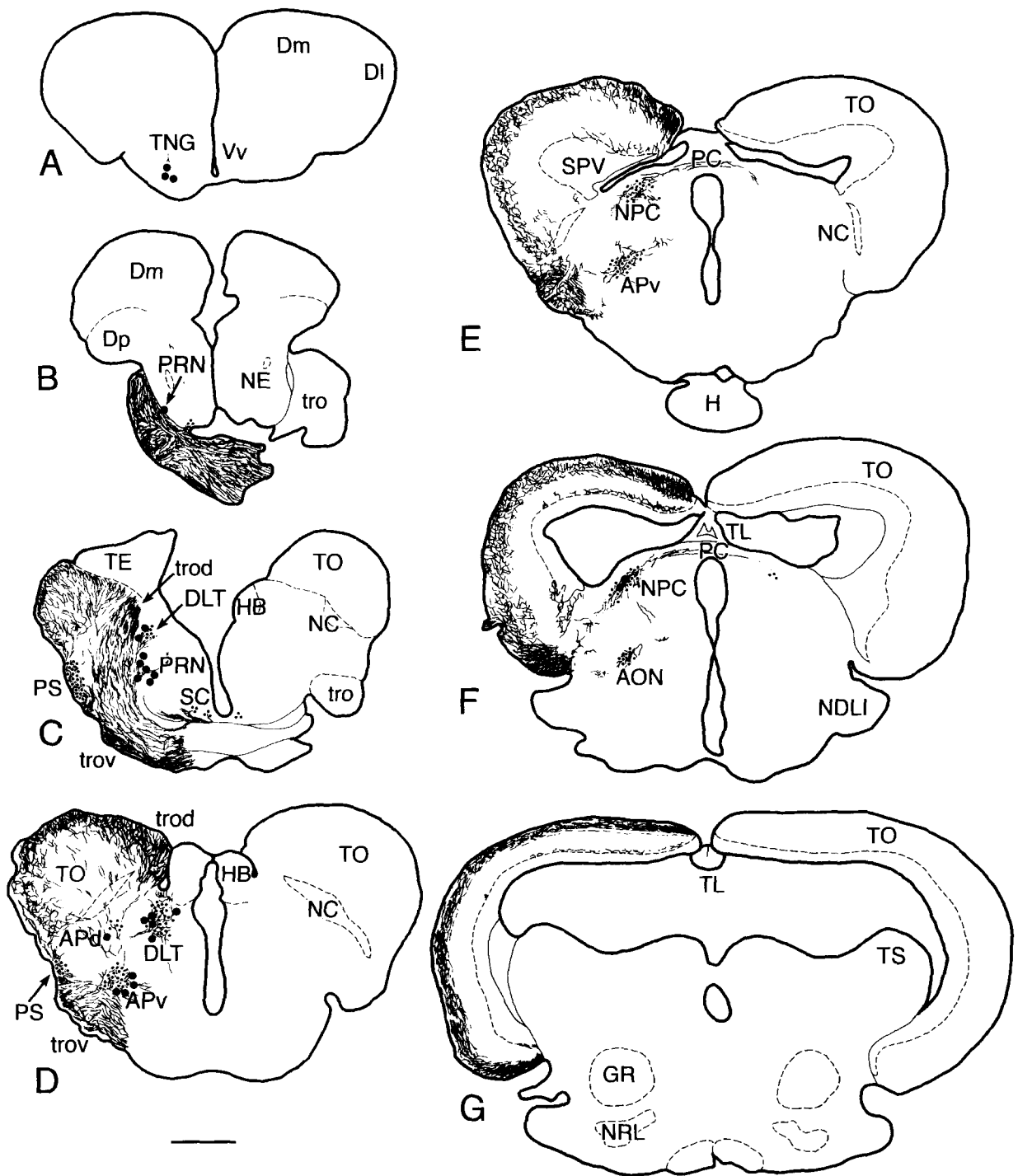
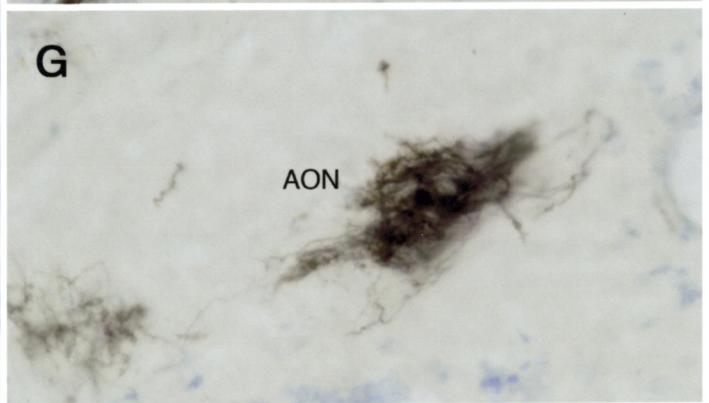
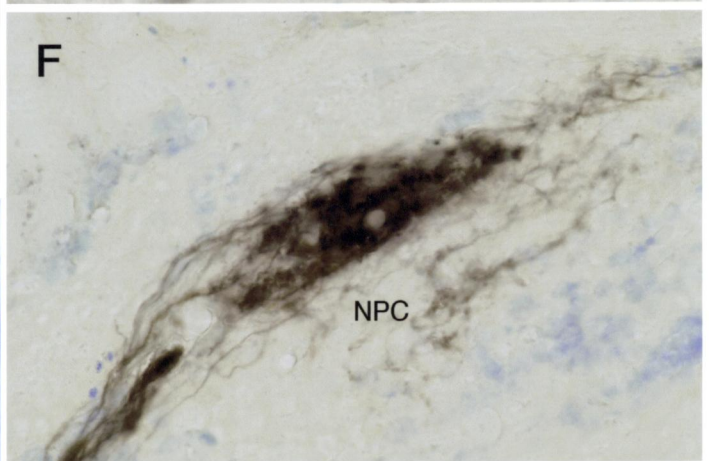
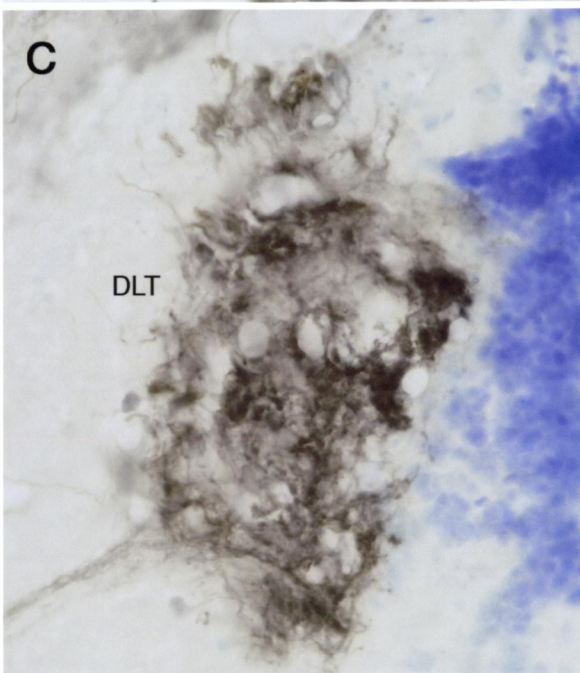
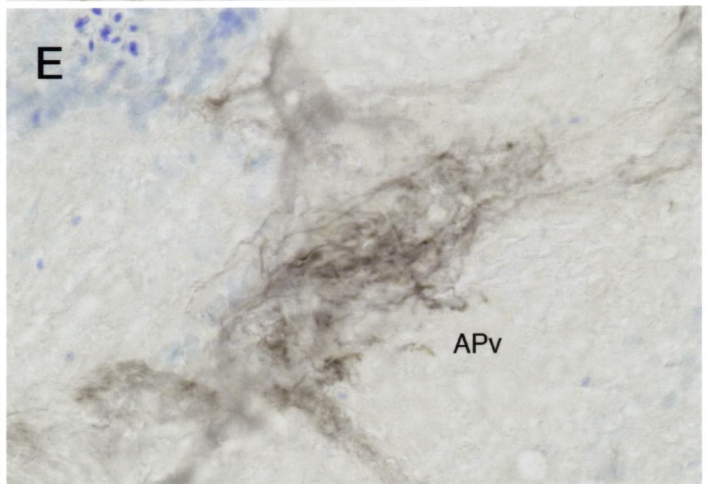
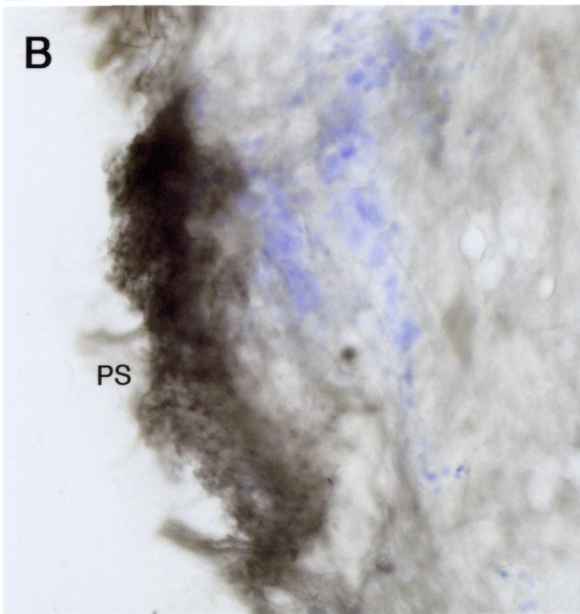
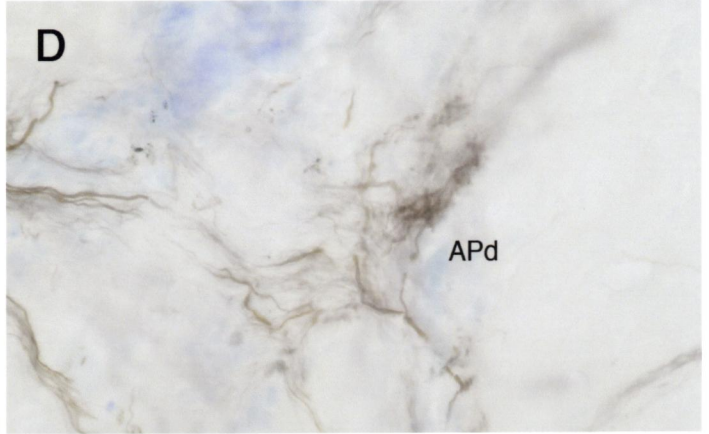
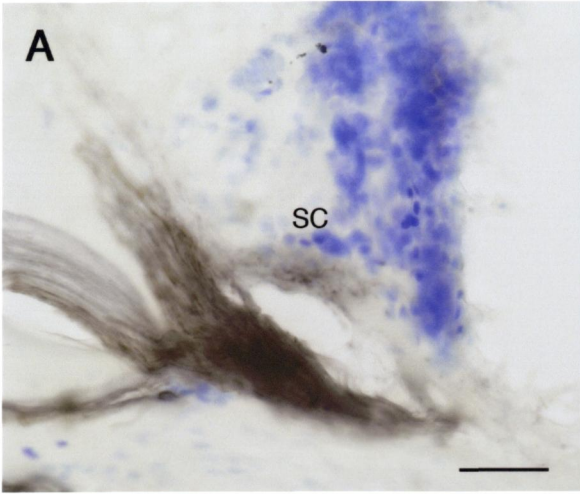


図1 視神経の中樞投射を示した終脳 (A) から間脳 (G) までの横断面図
 線維と細胞体を標識するために、左視神経にbiocytinを注入した。細い線は標識された神経線維を、小さい黒点は標識された神経終末を、そして大きな黒点は標識された神経細胞を示す。Scale bar = 200 μ m。



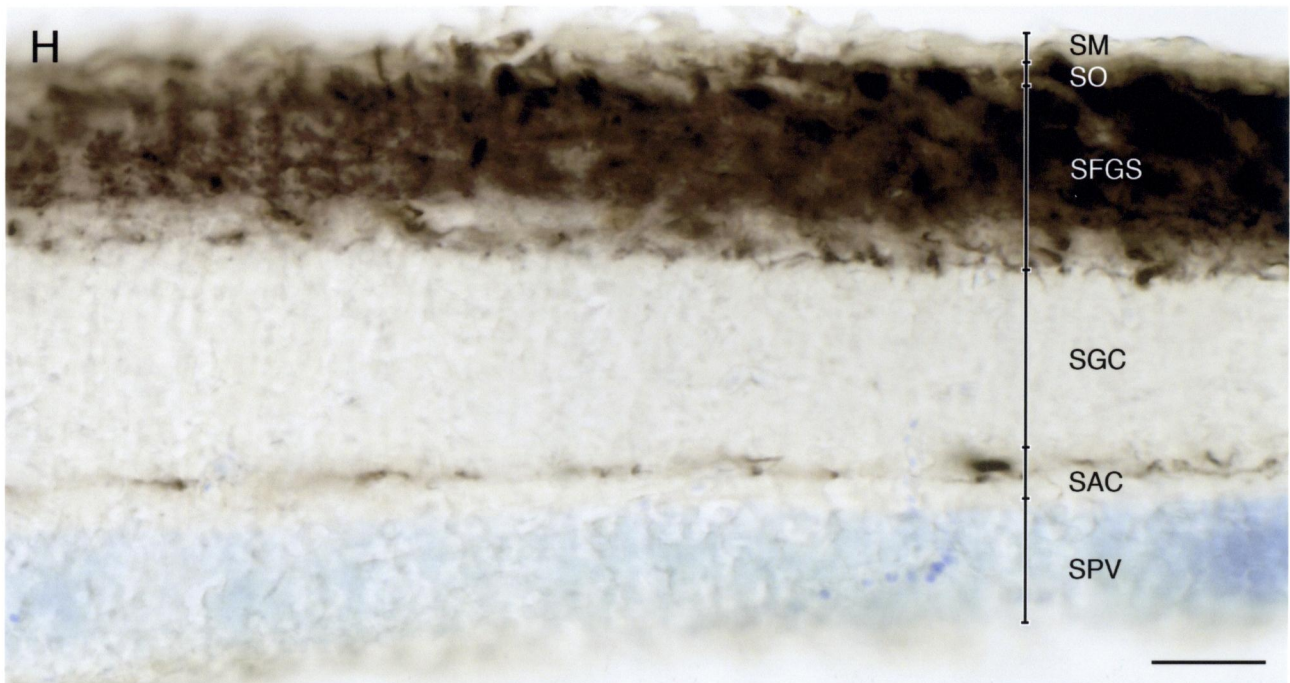


図2 biocytinで標識されたretinofugal fibersとその終末の様子

(A) 視交叉上核、(B) 浅視蓋前域核、(C) 視床背外側核、(D) 視蓋前域背側部、(E) 視蓋前域腹側部、(F) 後交連核、(G) 副視索核、(H) 視蓋における横断切片の写真。視蓋は表面から辺縁層、視神経線維層、浅線維灰白層、中心灰白層、中心白質層、脳室周囲層の6層構造をなす。標識線維は主に視神経線維層と浅線維灰白層を走行し終末し、標識線維の一部はより深い層である中心白質層にも走行し終末していた。浅線維灰白層は標識線維の走行の密度により、密度の濃い表層と密度の薄い深層に別れているように見えた。なお青く染まっている箇所はクレシル紫でのカウンスステイニングによる。(A)-(G) の写真の倍率は全て同じである。Scale bar = 25 μ m。

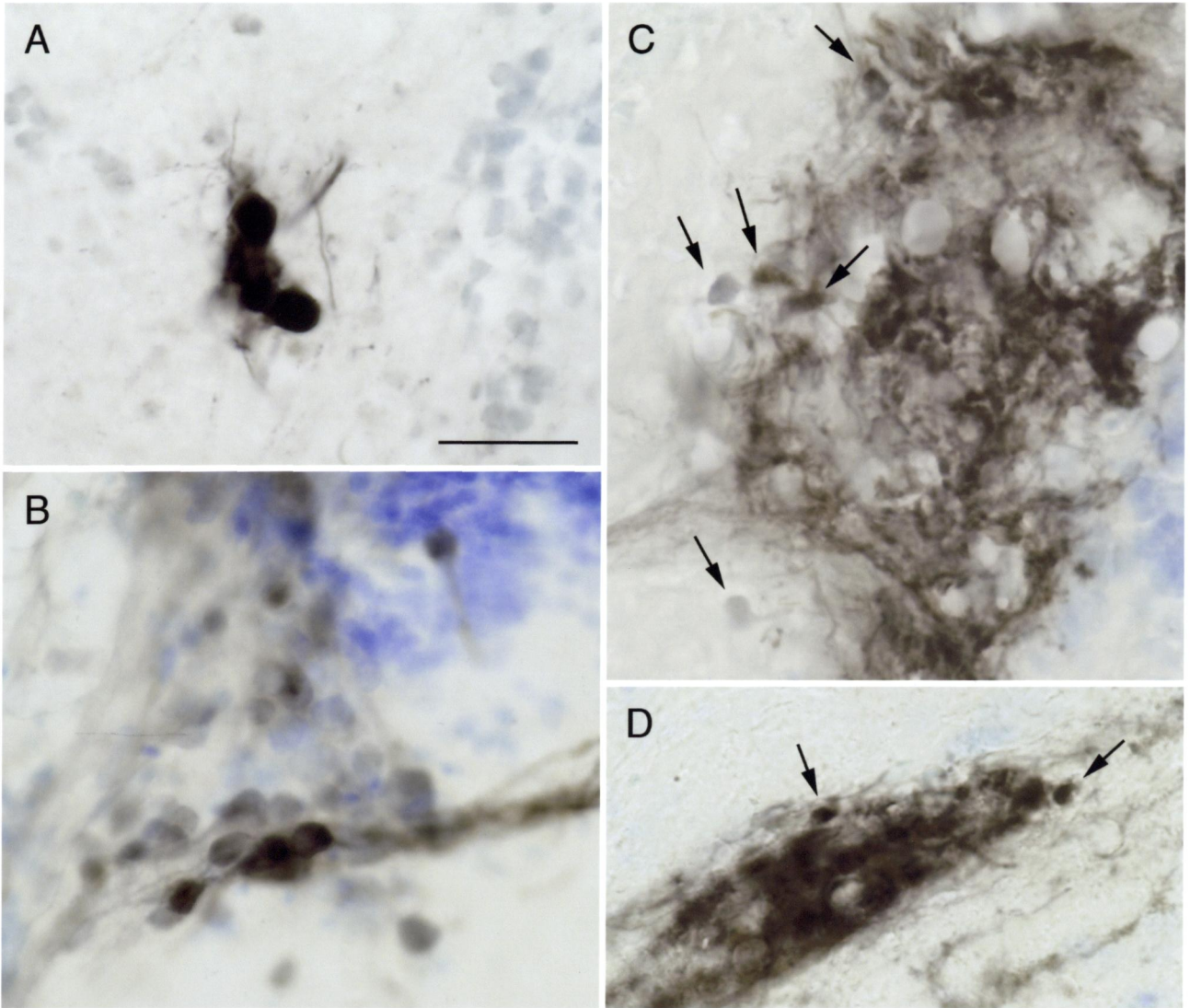
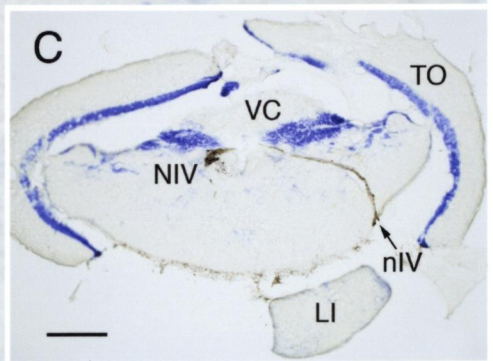
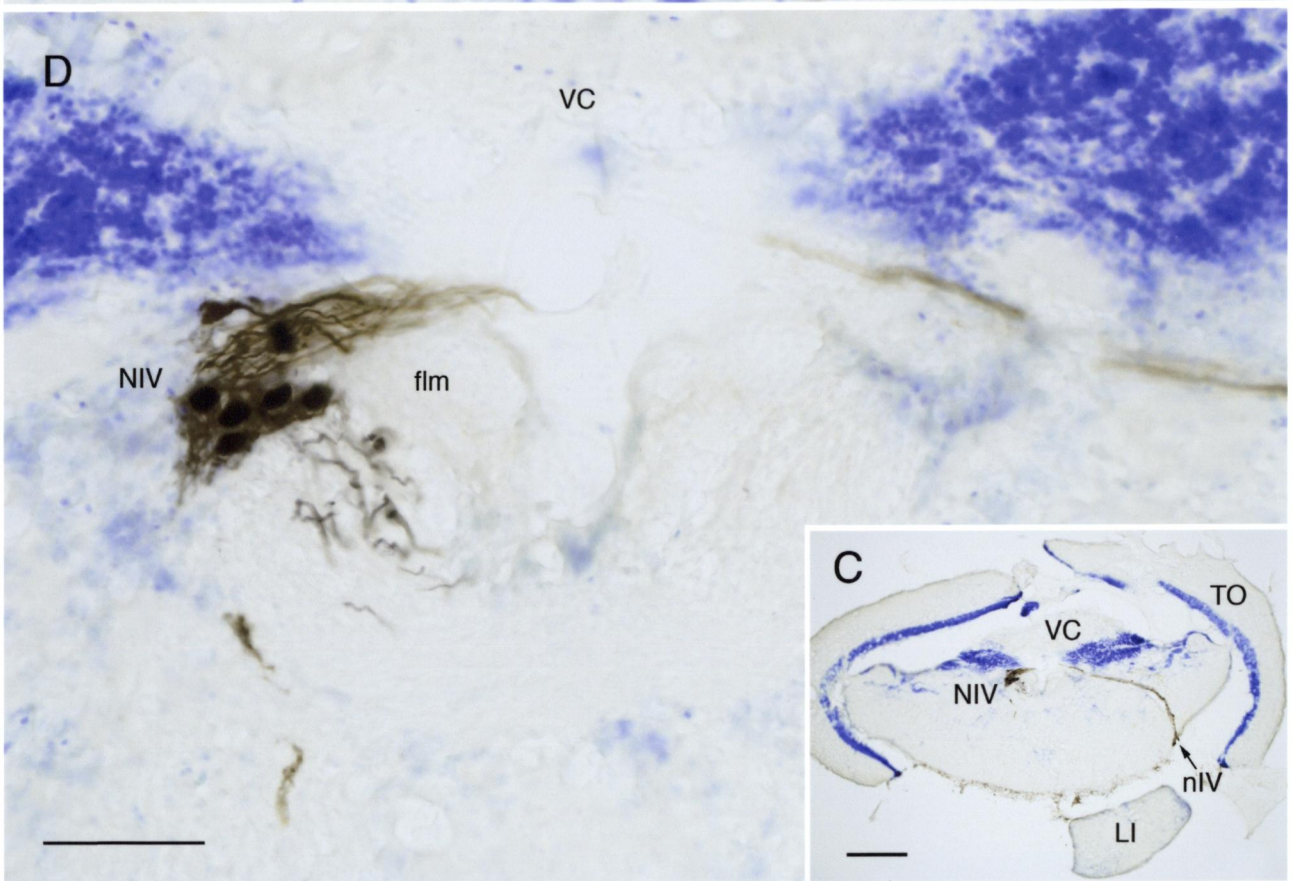
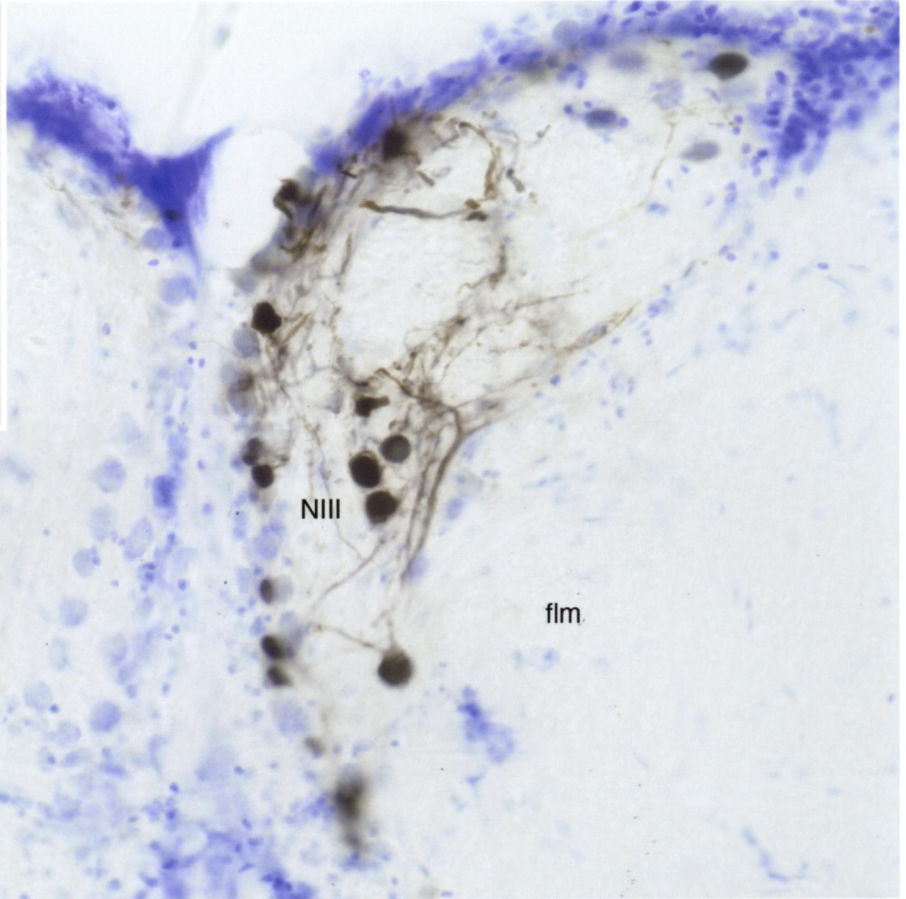
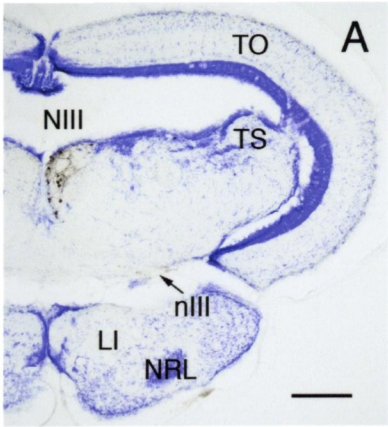


図3 biocytinで標識された向網膜系ニューロン

(A) 終神経節、(B) 視索前野網膜投射核、(C) 視床背外側核、(D) 後交連核における横断切片の写真。矢印は向網膜系ニューロンを示す。青く染まっている箇所はクレシル紫でのカウンスティainingによる。(A)-(D) の写真の倍率は全て同じである。Scale bar = 25 μm .



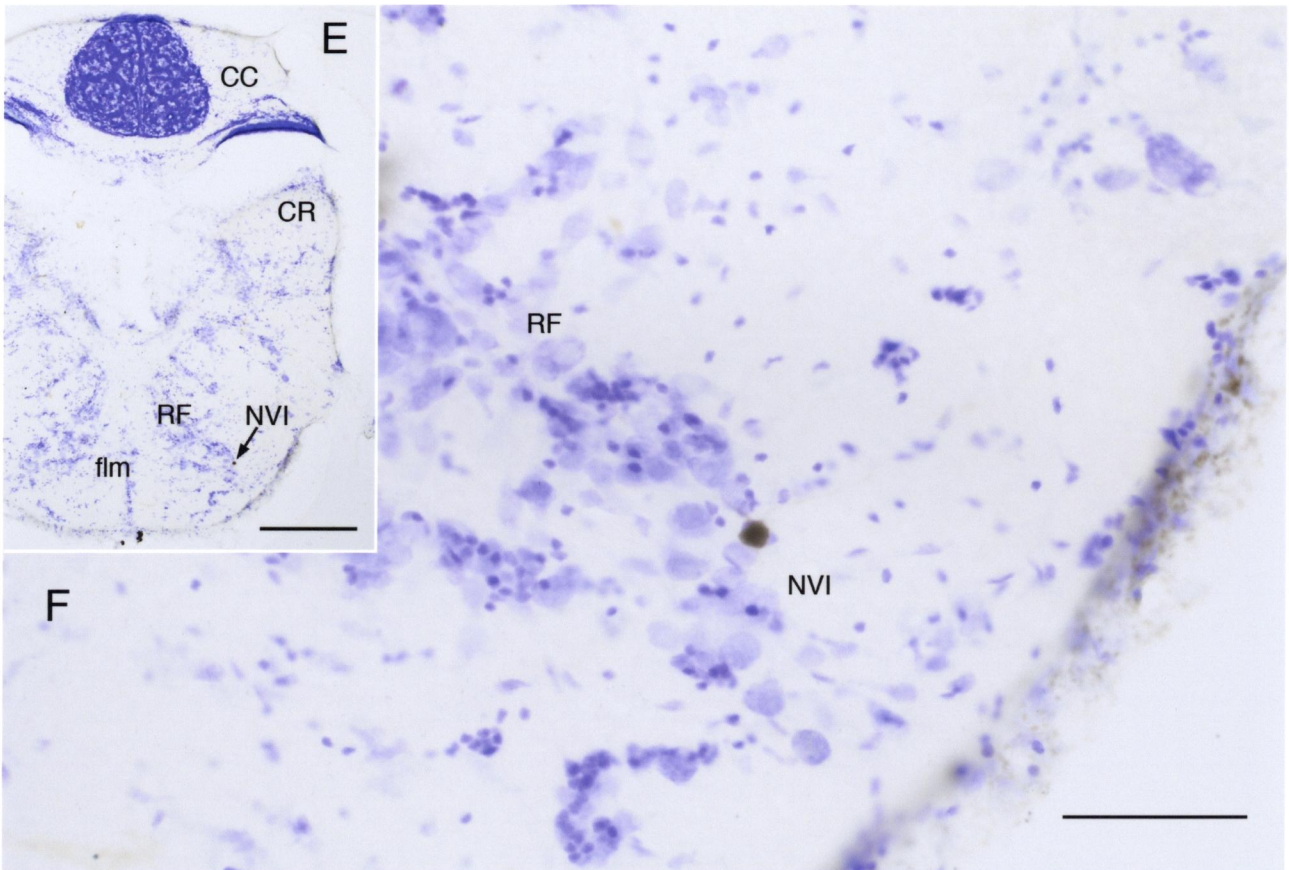


図4 biocytinで標識された外眼筋を神経支配する脳神経のニューロン

(A) 左の動眼神経に biocytin をインジェクションした後の、動眼神経核の高さにおける横断切片の写真。Scale bar = 200 μm 。(B) (A) と同じ切片を高倍率で撮影した物。Scale bar = 50 μm 。(C) 左の滑車神経に biocytin をインジェクションした後の、滑車神経核の高さにおける横断切片の写真。Scale bar = 200 μm 。(D) (C) と同じ切片を高倍率で撮影した物。Scale bar = 50 μm 。(E) 左の外転神経に biocytin をインジェクションした後の、外転神経核の高さにおける横断切片の写真。Scale bar = 200 μm 。(F) (E) と同じ切片を高倍率で撮影した物。Scale bar = 50 μm 。

参考文献

- Anken R and Bourrat F (1998) Brain Atlas of the Medakafish *Oryzias latipes*. INRA Editions, Paris
- Beck JC, Gilland E, Tank DW and Baker R (2004) Quantifying the ontogeny of optokinetic and vestibuloocular behaviors in zebrafish, medaka, and goldfish. *J Neurophysiol* 92: 3546-3561
- Braford MR, Jr. and Northcutt RG (1983) Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. In "Fish Neurobiology Vol 2" Ed by RE Davis and RG Northcutt, University of Michigan Press, Ann Arbor, pp 117-163
- Burrill JD and Easter SS, Jr. (1994) Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol* 346: 583-600
- Butler AB and Northcutt RG (1992) Retinal projections in the bowfin, *Amia calva*: cytoarchitectonic and experimental analysis. *Brain Behav Evol* 39: 169-194
- Cabrera B, Torres B, Pásaro R, Pastor AM and Delgado-García JM (1992) A morphological study of abducens nucleus motoneurons and internuclear neurons in the goldfish (*Carassius auratus*). *Brain Res Bull* 28: 137-144
- Davis RE and Northcutt RG (1983) *Fish Neurobiology*. University of Michigan Press, Ann Arbor
- Demski LS (1983) Behavioral effects of electrical stimulation of the brain. In "Fish Neurobiology Vol 2" Ed by RE Davis and RG Northcutt, University of Michigan Press, Ann Arbor pp 317-357
- Demski LS (1993) Terminal nerve complex. *Acta Anat* 148: 81-95
- Ebbesson SOE and Ito H (1980) Bilateral retinal projections in the black piranha (*Serrasalmus niger*). *Cell Tissue Res* 213: 483-495
- Egami N, Yamagami K and Shima A (1990) *Biology of the Medaka*. Tokyo Univ. Press, Tokyo [in Japanese]
- Furutani-Seiki M, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yoda H, Deguchi T, Hirose Y, Yasuoka A, Henrich T, Watanabe T, Iwanami N, Kitagawa D, Saito K, Asaka S, Osakada M, Kunimatsu S, Momoi A, Elmasri H, Winkler C, Ramialison M, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Shinomiya A, Kota Y, Yamanaka T, Okamoto Y, Takahashi K, Todo T, Abe K, Takahama Y, Tanaka M, Mitani

- H, Katada T, Nishina H, Nakajima N, Wittbrodt J and Kondoh H (2004) A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 647-658
- Graf W and Baker R (1985) The vestibuloocular reflex of the adult flatfish. I. Oculomotor organization. *J Neurophysiol* 54: 887-899
- Graf W and McGurk JF (1985) Peripheral and central oculomotor organization in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 239: 391-401
- Hofmann MH, Piñuela C and Meyer DL (1993) Retinopetal projections from diencephalic neurons in a primitive actinopterygian fish, the sterlet *Acipenser ruthenus*. *Neurosci Lett* 161: 30-32
- Ishikawa Y, Yoshimoto M and Ito H (1999) A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Biol J Medaka* 10: 1-26
- Ito H, Morita Y, Sakamoto N and Ueda S (1980) Possibility of telencephalic visual projection in teleosts, *Holocentridae*. *Brain Res* 197: 219-222
- Ito H and Vanegas H (1983) Cytoarchitecture and ultrastructure of nucleus prethalamicus, with special reference to degenerating afferents from optic tectum and telencephalon, in a teleost (*Holocentrus ascensionis*). *J Comp Neurol* 221: 401-415
- Ito H and Vanegas H (1984) Visual receptive thalamopetal neurons in the optic tectum of teleosts (*Holocentridae*) *Brain Res* 290: 201-210
- Ito H, Vanegas H, Murakami T and Morita Y (1984) Diameters and terminal patterns of retinofugal axons in their target areas: an HRP study in two teleosts (*Sebastiscus* and *Navodon*). *J Comp Neurol* 230: 179-197
- Ito H and Yoshimoto M (1991) Nervous system. In "Fish Physiology" Ed by Y Itazawa and I Hanyu, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 363-402 [in Japanese]
- Ito H, Yoshimoto M, Albert JS, Yamamoto N and Sawai N (1999) Retinal projections and retinal ganglion cell distribution patterns in a sturgeon (*Acipenser transmontanus*), a non-teleost actinopterygian fish. *Brain Behav Evol* 53: 127-141
- Ito H (2002) History and perspectives of fish brain research. In "Neuroscience of Fishes" Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 1-8 [In Japanese]
- Iwamatsu T (1997) The Integrated Book for the Biology of the Medaka. Daigaku Kyoiku

Publ. Co., Ltd., Tokyo [in Japanese]

- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Cassone VM and Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin *N*-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52: 307-358
- Leonard RB and Willis WD (1979) The organization of the electromotor nucleus and extraocular motor nuclei in the stargazer (*Astroscopus y-graecum*). *J Comp Neurol* 183: 397-413
- Luiten PGM and Dijkstra-de Vlieger HP (1978) Extraocular muscle representation in the brainstem of the carp. *J Comp Neurol* 179: 669-675
- McGurk JF and Graf W (1984) The oculomotor system of the goldfish, *Carassius auratus*. *Soc Neurosci Abstr* 10:290.2
- Meek J and Nieuwenhuys R (1998) Holosteans and teleosts. In "The Central Nervous System of Vertebrates Vol 2" Ed by R Nieuwenhuys, HJ Ten Donkelaar and C Nicholson, Springer, Berlin, pp 759-937
- Münz H and Claas B (1981) Centrifugal innervation of the retina in cichlid and poeciliid fishes. a horseradish peroxidase study. *Neuroscience Letters* 22: 223-226
- Murakami T, Morita Y and Ito H (1986) Cytoarchitecture and fiber connections of the superficial pretectum in a teleost, *Navodon modestus*. *Brain Res* 373: 213-221
- Nelson, JS (1994) *Fishes of the World*. 3rd ed, John Wiley and Sons, N.Y.
- Northcutt RG and Wullimann MF (1988) The visual system in teleost fishes: morphological patterns and trends. In "Sensory Biology of Aquatic Animals" Ed by J Atema, RR Fay, AN Popper and WN Tavolga, Springer, Berlin, pp 515-552
- Oka Y (1997) GnRH neuronal system of fish brain as a model system for the study of peptidergic neuromodulation. In "GnRH Neurons: Gene to Behavior" Ed by IS Parhar and Y Sakuma, Brain Shuppan Publishing, Tokyo, pp 245-276
- Pastor AM, Torres B, Delgado-Garcia JM and Baker R (1991) Discharge characteristics of medial rectus and abducens motoneurons in the goldfish. *J Neurophysiol* 66: 2125-2140
- Reperant J, Lemire M, Miceli D and Peyrichoux J (1976) A radioautographic study of the visual system in fresh water teleosts following intraocular injection of tritiated fucose

- and proline. *Brain Res* 118: 123-131
- Rowe JS and Beauchamp RD (1982) Visual responses of nucleus corticalis neurons in the perciform teleost, Northern Rock Bass (*Ambloplites rupestris rupestris*). *Brain Res* 236: 205-209
- Sakamoto N and Ito H (1982) Fiber connections of the corpus glomerulosum in a teleost, *Navodon modestus*. *J Comp Neurol* 205: 291-298
- Shimizu M, Yamamoto N, Yoshimoto M and Ito H (1999) Fiber connections of the inferior lobe in a percomorph teleost, *Thamnaconus (Navodon) modestus*. *Brain Behav Evol* 54: 127-146
- Somiya H, Yoshimoto M and Ito H (1992) Cytoarchitecture and fibre connection of the Edinger-Westphal nucleus in the filefish. *Phil Trans R Soc Lond B* 337: 73-81
- Springer AD and Gaffney JS (1981) Retinal projections in the goldfish: a study using cobaltous-lysine. *J Comp Neurol* 203: 401-424
- Stell WK, Walker SE, Chohan KS and Ball AK (1984) The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 940-944
- Sterling P and Gestrin P (1975) Goldfish abducens motoneurons: physiological and anatomical specialization. *Science* 189: 1091-1093
- Sterling P (1977) Anatomy and physiology of goldfish oculomotor system. I. structure of abducens nucleus. *J Neurophysiol* 40: 557-572
- Striedter GF (1990) The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II. retinal, tectal, cerebellar and telencephalic connections. *Brain Behav Evol* 36: 355-377
- Szabo T, Lazar G, Libouban S, Toth P and Ravaille M (1987) Oculomotor system of the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *J Comp Neurol* 264: 480-493
- Uchiyama H, Sakamoto N and Ito H (1981) A retinopetal nucleus in the preoptic area in a teleost, *Navodon modestus*. *Brain Res* 222: 119-124
- Uchiyama H and Ito H (1984) Fiber connections and synaptic organization of the preoptic retinopetal nucleus in the filefish (Balistidae, Teleostei). *Brain Res* 298: 11-24
- Uchiyama H, Matsutani S and Ito H (1986) Tectal projection neurons to the retinopetal nucleus in the filefish. *Brain Res* 369: 260-266

- Uchiyama H, Matsutani S and Ito H (1988) Pretectum and accessory optic system in the filefish *Navodon modestus* (Balistidae, Teleostei) with special reference to visual projections to the cerebellum and oculomotor nuclei. *Brain Behav Evol* 31: 170-180
- Uchiyama H (1989) Centrifugal pathways to the retina: influence of the optic tectum. *Vis Neurosci* 3: 183-206
- Uematsu K, Oka T and Ito H (2002) *Neuroscience of Fishes*. Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo [in Japanese]
- Umino O and Dowling JE (1991) Dopamine release from interplexiform cells in the retina: effects of GnRH, FMRFamide, bicuculline, and enkephalin on horizontal cell activity. *J Neurosci* 11: 3034-3046
- Vanegas H and Ito H (1983) Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res* 287: 117-137
- Walker SE and Stell WK (1986) Gonadotropin-releasing hormone (GnRF), molluscan cardioexcitatory peptide (FMRFamide), enkephalin and related neuropeptides affect goldfish retinal ganglion cell activity. *Brain Res* 384: 262-273
- Yamamoto N, Oka Y, Amano M, Aida K, Hasegawa Y and Kawashima S (1995) Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: Immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J Comp Neurol* 355: 354-368
- Yamamoto N, Oka Y and Kawashima S (1997) Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology* 65: 403-412
- Yamamoto N and Ito H (2000) Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. *J Comp Neurol* 428: 355-375
- Yamamoto N and Ito H (2002) Visual system of actinopterygian fishes. In "Neuroscience of Fishes" Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 122-136 [in Japanese]
- Yamamoto N (2003) Three gonadotropin-releasing hormone neuronal groups with special reference to teleosts. *Anat Sci Int* 78: 139-155
- Yamamoto T (1975) *Medaka (Killifish)-Biology and Strains*. Keigaku Publishing Co., Tokyo [in Japanese]

Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu M, Yamamoto N and Ito H (1998)
Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis (Tilapia)*
niloticus. J Comp Neurol 392: 209-226

Yu HS and Reiter RJ (1983) Melatonin: Biosynthesis, physiological effects and clinical
applications. CRC Press, London

第三部

突然変異体作製

要旨

突然変異体は特定の物質や神経回路を欠損した実験系を実現できるため、脳神経の機能的ネットワーク解析に役立つものと考えられる。そこで脳神経の機能的ネットワーク解析に役立つ突然変異体をメダカで得るため、科学技術振興機構・創造科学技術推進事業、近藤誘導分化プロジェクト（プロジェクトリーダー：近藤 寿人 教授）内のメダカを使った大規模突然変異体スクリーニング（グループリーダー：古谷-清木 誠 博士）に参加した。

変異導入時にメダカに対してのストレスを極力抑えることで、メダカへの非常に効率的な変異導入方法を確認した。そして、脳の形態に異常を示す突然変異体を 52、脳神経の形態に異常を示す突然変異体を 67 得ることが出来た。

序論

脊椎動物の中でも、ゼブラフィッシュやメダカなどの小型硬骨魚は遺伝学的・発生生物学的な研究に適したいくつかの利点を持っている (Westerfield, 2000; Ishikawa, 2000; Wittbrodt *et al.*, 2002)。すなわち、① 小さいスペースで飼育できる。② 世代交代時間が 2-3 ヶ月と短い。③ 多産である。④ 母体外で速く発生する。⑤ 卵膜が透明で、胚が半透明であるため発生過程を観察しやすい。近年では、大規模な突然変異体スクリーニングがゼブラフィッシュを使って行われ様々な器官形成に関わる突然変異体が数多く得られた (Haffter *et al.*, 1996; Driever *et al.*, 1996)。

メダカ特有の利点として野生集団の進化遺伝学的研究が進んでいること、メダカのゲノムサイズは 800Mbp でゼブラフィッシュの 1700Mbp に比べ半分以下であり (Lamatsch *et al.*, 2000)、変異解析において効率的であること、そして多数の近交系が利用できること (Sakaizumi *et al.*, 1983; Hyodo-Taguchi and Sakaizumi, 1993)、などがあげられる。

神経系を研究する観点からゼブラフィッシュと比べると、メダカの行動様式の高多様性が興味深い。水中の遊泳を例にとると、基本的に直進運動のみであるゼブラフィッシュに比べて、メダカは直進、後退、静止、縦向きに泳ぐことが可能である。その他、視覚情報が引き金となる性行動や「メダカの学校」として知られる社会的な行動を示すことが報告されている (Yamamoto, 1975 ; Egami *et al.*, 1990; Iwamatsu, 1997)。また突然変異体作製に関しては、メダカでも試験的に行われており (Ishikawa *et al.*, 1999)、小数しか作製されなかったにも関わらず、多数作製されてきたゼブラフィッシュに比べて、脳神経及び中枢神経系に異常を示す突然変異体が数多く得られている (Ishikawa, 2000)。さらに熱帯魚であるゼブラフィッシュ

ユは 25°C 以下では正常発生しないが (Westerfield, 2000)、メダカは 0°C-40°C までの広い範囲で正常に生存、孵化する (Iwamatsu, 1997) ため、温度感受性変異体を得られる可能性がある。このことは発生を正常に進めた後、行動に関わる機能だけをノックアウトし解析することが出来る可能性を示す。

メダカには以上のような利点があるので、脳神経の機能的ネットワークを解析する上で、特定の物質や神経回路を欠損した実験系となりうる突然変異体を作製することは非常に有意なことである。

材料と手法

系統と育成

メダカ (*Oryzias latipes*) の南日本集団由来近交系 Cab-Kyoto 系統 (Furutani-Seiki M. *et al.*, 2004) を用いた。大規模な突然変異体スクリーニングを実行するために、大規模水槽システム (Aquatic Habitats) を立ち上げそこで育成した。このシステムは大型の飼育水循環システム 5 系、中型の飼育水循環システム 1 系、小型の飼育水循環システム 12 系からなり、合計 120 基の棚を備える。この棚には 1 L、2.75 L、9 L、3 種の容量を備えた特性のアクリルタンクを自由に設置することができ、1 基の棚には 1 L なら 75-90 タンク、2.75 L なら 50-60 タンク、9 L なら 25-30 タンクを納めることが出来るので、システム全体では 2.75 L のアクリルタンクを 6,500 個も設置可能な大規模水槽システムである。魚は 9 L のアクリルタンクに約 30 匹入れ、14 時間－10 時間の明暗周期、水温 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 ± 0.5 の条件下で育成した。餌は一日 2 回、午前 9 時と午後 1 時にブラインシュリンプ (*Artemia salina*) と粉餌 (Hikari Curst Guppy, Kyorin) を与えた。

変異導入

1. 中和液の作製

ポリバケツに 30-40°C に温めた水道水 10 L を注水し、チオ硫酸ナトリウム五水和物 (Nacalai Tesque) 2.5 kg, NaOH 30-40 g を加え、棒などで攪拌しながら溶かし中和液(pH 10) を作製した。コンテナ内にも同様に中和液を作製する。コンテナをドラフトチャンバー (DRI-Vc 特, Shimazu) 内に設置し、ポリバケツはドラフトチャンバー横に設置した。

これ以降の作業は原則としてドラフトチャンバー内で行った。白衣と使い捨てラテックス手袋 (DGP-350-M, Microflex) を着用し、特に ENU (*N*-Nitroso-*N*-Ethylurea) を扱うときは手袋は2重に重ねて使用した。そして、一つの作業が終わるごとに外側の手袋を中和液に入れ、新しい手袋を着用した。

2. ENU 溶液の作製

50 ml 注射器 (針は取り付けていない) でビーカー内に作製した 0.01 M リン酸ナトリウム水溶液 (pH 6.3) を 40 ml 吸い取った。1 g の ENU が入った ISOPAC ENU (Sigma) のボトルのゴム栓に針が刺せる程度に金具の蓋をめくった。注射器に 20G の注射針を取り付け、ボトルのゴム栓に刺した。注射器を 10 ml 分引くことで生じたボトル内の陰圧で液を注入した。この作業を繰り返し注射器内の液をボトルにすべて注入した。この時点で注射器内の空気は ENU に汚染されているので針先を中和液に付けそのまま注射器内の空気をゆっくり放出した。20G の注射針を付属の蓋を使い、いったん注射器からはずし、再びビーカー内の液を 40 ml 吸い取った。同様にボトル内を陰圧にしながら注射器内の液をボトルに入れた。ボトルを厳重に包装した上で、振揺しながら 26°C でインキュベーションした。

3. ENU 処理液の作製

ENU 溶液のインキュベーション開始直後にドラフトチャンバー内に処理槽を設置した (付属の図を参考に)。ウォーターバス (ポリテナー PT-21, Yazaki) に水道水を入れヒーターの温度を 26°C に設定した (水量は後で浸ける ENU 処理槽と洗浄槽が浮かないぐらい)。0.03% 塩水を ENU 処理槽 (ボックスコンテナ B-6.6, Iris)

に 2.8 L と洗淨槽 (内寸: 幅 33.5x 奥行 19x 高さ 15.5cm、材質: ポリプロピレン) に 4 L 入れ、これらの処理槽をウォーターバスに浸けた。その後、1 M リン酸ナトリウム水溶液 (pH 6.3) 2.8 ml を ENU 処理槽に入れた。

振揺していた ENU が完全に溶けきった後 (約 1 時間)、先ほどの注射器と注射針を使用し、ボトル内を適度な陰圧に保つように注意しながらボトルから ENU 溶液を取り出した。注射器を引き空気を 40 ml 入れ、注射器に注射針を取り付け、ボトルのゴム栓に刺した。ボトルを逆さまにし注射器を 10 ml 引き ENU 溶液を吸い出した。次に注射器を押し注射器内の空気 10 ml をボトルに注入した。このように注射器内の空気とボトル内の ENU 溶液を数回に分け置換していった。注射器内に取り出した ENU 溶液を今度は ENU 処理槽にゆっくりとそして全体に広がるように注入していった。この作業を繰り返しボトル内の ENU 溶液を ENU 処理槽にすべて移した (ENU の最終濃度は 3 mM となった)。その後、魚移し替え用網 (アクリル板で作った幅 13.5 cm、奥行 15.5 cm、高さ 20.5 cm の筒の底に洗濯用ネットを張り付けた物) 2 個を ENU 処理槽に設置した。ボトル内にリン酸水溶液を入れた要領で中和液を注入してから使用済みの注射器、注射針そしてボトルを中和液に浸けた。

4. ENU 処理

メダカを飼育網で掬い、ENU 処理槽に設置した 1 つの魚移し替え用網に対して 25 匹ずつ (合計 50 匹) 静かに移し入れた。魚に刺激を与えないために部屋を消灯し静寂な環境下で 1 時間、ENU 処理を施した。

ENU 処理を施した後、魚を魚移し替え用網ごと洗淨槽に静かに移した。この際、

魚が跳ねるなどして飛び散る ENU 処理液に被爆せぬよう、魚移し替え用網の上にキムタオルで蓋をした。10 分後、メダカを魚移し替え用網ごと飼育用の 9 L タンクに移し、魚移し替え用網を静かに傾けながら抜き取った。メダカをこの 9 L タンク内で餌を与えずに一晩飼育した。

翌日、新たに飼育水で満たした飼育用の 9 L タンクを用意し、そちらに飼育網を使って魚をした後、通常通り飼育した。

5. スケジュール

以下のスケジュールに従って一週間に 1 回 ENU 処理し 3 週に分けてった。

第一週	月	第一回目の処理
	火	魚を水系に戻す。後かたづけ。
第二週	月	第二回目の処理
	火	魚を水系に戻す。後かたづけ。
第三週	月	第三回目の処理
	火	魚を水系に戻す。後かたづけ。
	水	餌を良く与える。
	木	餌を良く与える。
	金	2.75 L タンクで雌と交配させる。
第四週	月	採卵始める。

6. 後かたづけ

ENU は非酸性な溶液中では分解しやすい。少なくとも塩基性溶液中で 10 時間おくと完全分解する。実験翌日、使用したすべての溶液を中和液に流し入れ、ウォーターバスとヒーターをのぞくすべての器具を中和液に浸けた。その後、中和液は強塩基性なので塩酸で中性付近まで中和し廃棄した。

突然変異体スクリーニング

ENU 処理した 50 匹の雄のメダカ (G0 世代) と野生型の雌のメダカを雄メダカ 1 匹に対し雌メダカを 1-2 匹ずつ交配し、約 50 家族の次世代 (F1 世代) を作製した (1 家族あたり約 100 匹)。成魚まで育成した F1 世代を兄妹交配し F2 世代を作製した (F1 世代の 1 家族につき 20 家族の F2 世代)。さらに成魚まで育成した F2 世代を兄妹交配し (1 家族あたり 10 ペア)、F3 世代を作製した (図 1)。以上の過程を 3 回繰り返し、累計で G0 世代 150 匹、F1 世代 141 家族、F2 世代 1300 家族を作製した。この F2 世代のうち 1137 家族から得られた F3 世代を様々な方法でスクリーニングした (Furutani *et al.*, 2004; Kitagawa *et al.*, 2004; Elmasri *et al.*, 2004; Loosli *et al.*, 2004; Sasado *et al.*, 2004; Morinaga *et al.*, 2004; Iwanami *et al.*, 2004; Yasuoka *et al.*, 2004; Yoda H. *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2004; Aizawa *et al.*, 2004)。ただし作製した全ての F3 世代に対して行ったスクリーニング法は実体顕微鏡下での形態観察のみである。

結果

ENU 処理後の生存と生殖能力

150 匹のメダカを ENU 処理したが、その後死ぬことなく正常に生殖を行え次世代を得ることの出来たメダカは 141 匹であった。

スクリーニングした魚の統計データ

F2 世代は 1137 家族をスクリーニングに使用し、F3 世代作製のため交配したペアの数 6,088 であった。F3 世代は、母親の産卵回数 24,887 回数分で 261,647 匹にも上った。

突然変異体の種類と数

2031 種の劣性致死突然変異体が得られ、種々の器官形成に関わる 356 の突然変異体が同定できた (Furutani *et al.*, 2004)。うちわけは、前脳の形態に異常を示す突然変異体 33 (Kitagawa *et al.*, 2004)、始原生殖細胞の分布に異常を示す突然変異体 12 (Sasado *et al.*, 2004)、生殖腺に異常を示す突然変異体 16 (Morinaga *et al.*, 2004)、側線神経の形態に異常を示す突然変異体 4 (Yasuoka *et al.*, 2004)、肝臓の活性に異常を示す突然変異体 22 (Watanabe *et al.*, 2004)、胸腺の形態に異常を示す突然変異体 15 (Iwanami *et al.*, 2004)、眼の形態に異常を示す突然変異体 22 (Loosli *et al.*, 2004)、網膜視蓋投射に異常を示す突然変異体 7 (Yoda H. *et al.*, 2004)、体節の形態に異常を示す突然変異体 12 (Elmasri *et al.*, 2004)、放射線感受性の突然変異体 3 (Aizawa *et al.*, 2004) である。その他、遺伝学的な同定は出来ていないものも含めると、脳の形態に異常を示す突然変異体は 52、脳神経の形態に異常を示す突然変異体は 67 検

出できた。

上記のように様々な器官の形態形成や機能に関わる突然変異体を得ることが出来たが、これらのさらに詳しい報告については各論文を参考にして頂きたい。ここでは本論文の趣旨に関わる脳及び脳神経の突然変異体に関してのみ、形態学的な特徴を報告する。

脳の形態異常

発生段階の卵を実体顕微鏡下で観察することにより検出できた形態異常は、前脳や後脳など大きな領域の欠損の他、膨大、発達不良、細胞死であった。

脳神経の形態異常

胚の脳神経の走行は生体でも固定標本でもそのままでは確認できない。そのため固定した胚にチューブリンや HNK1 の抗体染色を施し神経を可視化した (Yasuoka *et al.*, 2004)。この手法で検出できた形態異常は、特定の神経束の欠損、伸展の遅延や停止、走行経路の異常であった。

網膜-視蓋投射を可視化するために視神経に蛍光色素をトレーサーとして注入し蛍光顕微鏡下で観察することにより検出できた形態異常は、網膜からの線維は本来正中線を完全交叉し対側の視蓋に終末するの (第二部参照) に対して、視蓋とは全く異なる前脳に線維を伸ばすもの、正中線を越えずに同側の視蓋に線維を伸ばし終末するもの、そして正中線は越えながらも同側の視蓋に線維を伸ばし終末するものであった。

考察

ENU 処理

メダカでこれまで行われてきた小規模な突然変異体スクリーニングでも ENU を使用して変異導入した例 (Ishikawa *et al.*, 1999) はあるが、その際の死亡率は 25% であった。本研究では 94%もの雄メダカがただ生存するだけでなく、正常に生殖を行え次世代を得ることが出来た。これは ENU 処理作業に於いてメダカへの光、音刺激を極力抑え、そして網で追い回したりせず効率よく移動できる装置の開発によりメダカへ過度のストレスを与えなかったためであると考えられる。そして、スクリーニングの結果として数多くの変異体を得られたことから、本手法がメダカに効率よく変異導入できる優れた手法であることが明らかとなった。

脳の形態異常

ゼブラフィッシュで行われた突然変異体スクリーニング (Haffter *et al.*, 1996; Driever *et al.*, 1996) では中枢神経系の発生に異常を示す突然変異体はほとんど得られなかった。それに比べ、今回行ったメダカの突然変異体スクリーニングでは中枢神経系の発生に異常を示す突然変異体が数多く得られ、その表現型も新規のものが豊富であった。メダカで中枢神経系の異常がゼブラフィッシュに比べて豊富に見られることは、これまでの小規模な突然変異体スクリーニングでも報告されている (Ishikawa, 2000)。特に本研究では前脳に異常を示す突然変異体が数多く得られた。魚類の終脳は古くから嗅覚にのみ関わるものであるとの説が有力であったが、近年では視覚、聴覚、一般体性感覚など様々な情報の入出力が行われていることが神経解剖学的に明らかにされており (Yoshimoto and Ito, 2002)、得られ

た前脳の突然変異体をさらに詳しく神経解剖学的に研究することは脳神経ネットワークの機能解明にも多くの重要な知見を与えることが期待できる。

脳神経の形態異常

脳神経の末梢分布に異常が見られる突然変異体が多く得られたが、これらはまた中枢の分布にも異常を持っている可能性が考えられる。事実、視神経においては、その中枢分布の異常を示す突然変異体が得られている (Yoda *et al.*, 2004)。今後このような観点からのより詳細な解剖学的解析が必要である。さらに Yoda *et al.* (2004) は、得られた突然変異体について網膜-視蓋投射にのみ着目して解析しているが、視神経の中枢分布は第二部で述べたように、網膜-視蓋投射だけではなく、間脳の様々な神経核への投射が存在し、さらには脳内から網膜へ投射する向網膜系が存在するので、この突然変異体に関しても網膜-視蓋投射以外の中枢分布に着目したさらなる解析が必要である。

総括

本研究の ENU を使った変異導入法は大変効率的な手法であり、今後さらに新たな観点から変異体スクリーニングを行う際にも役立つ物である。今回多くの脳及び脳神経の形態に異常を示す突然変異体を得られたことは、メダカを脳神経回路のモデルとして研究する遺伝学的アプローチとして成功の一步を踏み出したと言える。しかし、これらの変異体に関してはまだまだ解剖学的に明らかにしていかなければならないことが多い。これには第一部と第二部で明らかにした野生型のメダカを用いた脳神経回路の解剖学的解析が必要不可欠な基礎情報を提供するで

あろう。

参考文献

- Aizawa K, Mitani H, Kogure N, Shimada A, Hirose Y, Sasado T, Morinaga C, Yasuoka A, Yoda H, Watanabe T, Iwanami N, Kunimatsu S, Osakada M, Suwa H, Niwa K, Deguchi T, Henrich T, Todo T, Shima A, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Identification of radiation-sensitive mutants in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 895-902
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J and Boggs C (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123: 37-46
- Egami N, Yamagami K and Shima A (1990) *Biology of the Medaka*. Tokyo Univ. Press, Tokyo [in Japanese]
- Elmasri H, Winkler C, Liedtke D, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Henrich T, Hirose Y, Yasuoka A, Yoda H, Watanabe T, Deguchi T, Iwanami N, Kunimatsu S, Osakada M, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Wittbrodt J, Abe K, Takahama Y, Takahashi K, Katada T, Nishina H, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting somite formation in the Medaka (*Oryzias latipes*). *Mech Dev* 121: 659-671
- Furutani-Seiki M, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yoda H, Deguchi T, Hirose Y, Yasuoka A, Henrich T, Watanabe T, Iwanami N, Kitagawa D, Saito K, Asaka S, Osakada M, Kunimatsu S, Momoi A, Elmasri H, Winkler C, Ramialison M, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Shinomiya A, Kota Y, Yamanaka T, Okamoto Y, Takahashi K, Todo T, Abe K, Takahama Y, Tanaka M, Mitani H, Katada T, Nishina H, Nakajima N, Wittbrodt J and Kondoh H (2004) A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 647-658
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C and Nusslein-Volhard C (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 1-36
- Hyodo-Taguchi Y and Sakaizumi M (1993) List of inbred strains of the medaka, *Oryzias*

- latipes*, maintained in the Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences. Fish Biol J Medaka 5: 29-30
- Ishikawa Y, Hyodo-Taguchi Y, Aoki K, Yasuda T, Matsumoto A and Sasanuma M (1999) Induction of mutations by ENU in the medaka germline. Fish Biol J Medaka 10: 27-30
- Ishikawa Y (2000) Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. Bioessays 22: 487-495
- Iwamatsu T (1997) The Integrated Book for the Biology of the Medaka. Daigaku Kyoiku Publ. Co., Ltd., Tokyo [in Japanese]
- Iwanami N, Takahama Y, Kunimatsu S, Li J, Takei R, Ishikura Y, Suwa H, Niwa K, Sasado T, Morinaga C, Yasuoka A, Deguchi T, Hirose Y, Yoda H, Henrich T, Ohara O, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting thymus organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. Mech Dev 121: 779-789
- Kitagawa D, Watanabe T, Saito K, Asaka S, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yasuoka A, Deguchi T, Yoda H, Hirose Y, Henrich T, Iwanami N, Kunimatsu S, Osakada M, Winkler C, Elmasri H, Wittbrodt J, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Momoi A, Katada T, Nishina H, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Genetic dissection of the formation of the forebrain in Medaka, *Oryzias latipes*. Mech Dev 121: 673-685
- Lamatsch DK, Steinlein C, Schmid M and Scharl M (2000) Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. Cytometry 39: 91-95
- Loosli F, Bene FD, Quiring R, Rembold M, Martinez-Morales JR, Carl M, Grabher C, Iquel C, Krone A, Wittbrodt B, Winkler S, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Henrich T, Deguchi T, Hirose Y, Iwanami N, Kunimatsu S, Osakada M, Watanabe T, Yasuoka A, Yoda H, Winkler C, Elmasri H, Kondoh H, Furutani-Seiki M and Wittbrodt J (2004) Mutations affecting retina development in Medaka. Mech Dev 121: 703-714
- Morinaga C, Tomonaga T, Sasado T, Suwa H, Niwa K, Yasuoka A, Henrich T, Watanabe T, Deguchi T, Yoda H, Hirose Y, Iwanami N, Kunimatsu S, Okamoto Y, Yamanaka T, Shinomiya A, Tanaka M, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting gonadal development in Medaka, *Oryzias latipes*. Mech Dev 121: 829-839

- Sakaizumi M, Moriwaki K and Egami N (1983) Allozymic variation and regional differentiation in wild populations of the fish *Oryzias latipes*. *Copeia* 1983: 311-318
- Sasado T, Morinaga C, Niwa K, Shinomiya A, Yasuoka A, Suwa H, Hirose Y, Yoda H, Henrich T, Deguchi T, Iwanami N, Watanabe T, Kunimatsu S, Osakada M, Okamoto Y, Kota Y, Yamanaka T, Tanaka M, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting early distribution of primordial germ cells in Medaka (*Oryzias latipes*) embryo. *Mech Dev* 121: 817-828
- Watanabe T, Asaka S, Kitagawa D, Saito K, Kurashige R, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Henrich T, Hirose Y, Yasuoka A, Yoda H, Deguchi T, Iwanami N, Kunimatsu S, Osakada M, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Wittbrodt J, Abe K, Takahama Y, Takahashi K, Katada T, Nishina H, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting liver development and function in Medaka, *Oryzias latipes*, screened by multiple criteria. *Mech Dev* 121: 791-802
- Westerfield M (2000) The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Inst of Neuro Science, Oregon
- Wittbrodt J, Shima A and Schartl M (2002) Medaka--a model organism from the Far East. *Nat Rev Genet* 3: 53-64
- Yamamoto T (1975) Medaka (Killifish)-Biology and Strains. Keigaku Publishing Co., Tokyo [in Japanese]
- Yasuoka A, Hirose Y, Yoda H, Aihara Y, Suwa H, Niwa K, Sasado T, Morinaga C, Deguchi T, Henrich T, Iwanami N, Kunimatsu S, Abe K, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting the formation of posterior lateral line system in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 729-738
- Yoda H, Hirose Y, Yasuoka A, Sasado T, Morinaga C, Deguchi T, Henrich T, Iwanami N, Watanabe T, Osakada M, Kunimatsu S, Wittbrodt J, Suwa H, Niwa K, Okamoto Y, Yamanaka T, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting retinotectal axonal pathfinding in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 715-728
- Yoshimoto M and Ito H (2002) Organization and function of the telencephalon. In "Neuroscience of Fishes" Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 178-195 [In Japanese]

謝辞

本研究にあたっては、本当にたくさんの方々に言葉で言い表せないほどお世話になりました。指導教官である近藤寿人教授には学術的な助言だけでなく、研究者としての模範を示して頂き多くのことを学ぶことができました。また学外の研究チームに参加する機会を頂き、人との出会いにも恵まれました。科学技術振興機構 ERATO 及び SORST の研究所では、グループリーダーの古谷-清木誠博士他全てのメンバーの方々にお世話になりました。

魚類の神経解剖の手法及びメダカの突然変異体作製の手法は ERATO の研究員であった諏訪寛博士に教えて頂きました。日本医科大学の山本直之先生及び吉本正美先生には投稿論文作製に当たって魚類の神経解剖学的見地から様々なアドバイスを頂きました。

最後にここ数年、研究だけでなく人生に於いても何かと危機的状況にあった中、時には叱咤し、時には激励し、絶えることなくご指導し続けて頂いた近藤寿人教授に再度、最大限の感謝の意を表します。

TITLE

**Central Connection of the Optic, Oculomotor, Trochlear and Abducens
Nerves in Medaka, *Oryzias latipes***

AUTHORS

Tomonori Deguchi¹, Hiroshi Suwa², Masami Yoshimoto³, Hisato Kondoh^{1,2*} and Naoyuki
Yamamoto³

AFFILIATIONS

¹*Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Yamadaoka 1-3, Suita, Osaka
565-0871, Japan*

²*Japan Science and Technology Agency, ERATO Kondoh Differentiation Signaling
Project/SORST Kondoh Research Group, Kinki-chihou Hatsumei Center Building, Yoshida-
Kawaracho 14, Sakyo-ku, Kyoto 606-8305, Japan*

³*Department of Anatomy and Laboratory for Comparative Neuromorphology, Nippon
Medical School, Sendagi 1-1-5, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan*

SHORT TITLE

Cranial nerves of medaka

FIELD

Neurobiology

*Corresponding author: Tel. +81-6-6879-7963

FAX. +81-6-6877-1738

E-mail: j61056@hpc.cmc.osaka-u.ac.jp

ABSTRACT

Medaka (*Oryzias latipes*) is one of the few vertebrate experimental animals in which inbred lines have been established. It is also a species that has advanced in genetic studies in a manner comparable to zebrafish. This fish is therefore a good model for studying functional organization of the nervous system, but anatomical analysis of its nervous system has been limited to embryonic stages. In the present study, we investigated anatomy of cranial nerves in adult fish focusing on the visual function, using an inbred strain of medaka. Cranial nerves of medaka were labeled using biocytin, revealing a central distribution of retinofugal terminals, retinopetal neurons, and oculomotor, trochlear and abducens motor neurons. The optic nerve of the adult medaka was of a complete decussation type. Retinofugal terminals were located in 8 brain nuclei, the suprachiasmatic nucleus, nucleus pretectalis superficialis, nucleus dorsolateralis thalami, area pretectalis pars dorsalis (APd), area pretectalis pars ventralis (APv), nucleus of the posterior commissure (NPC), accessory optic nucleus, and the tectum opticum. Retinopetal neurons were identified in 6 brain nuclei, the ganglion of the terminal nerve, preoptic retinopetal nucleus, nucleus dorsolateralis thalami, APd, APv, and NPC. The oculomotor neurons were mostly labeled ipsilaterally and were located dorsomedially, abutting the fasciculus longitudinalis medialis in the mesencephalon. The trochlear nucleus was located contralaterally and dorsolaterally adjacent to the fasciculus longitudinalis medialis in the mesencephalon. The abducens nucleus was located ipsilaterally in a ventrolateral part of the rhombencephalic reticular formation. These results, generally similar to those in other teleosts, provide the basis for future behavioral and genetic studies in medaka.

Key words: retinal projection, retinopetal neuron, extraocular motor neuron, brain, teleost fish, medaka

INTRODUCTION

Medaka (*Oryzias latipes*) has several advantages as an experimental animal model for genetic and developmental studies (Ishikawa, 2000; Wittbrodt *et al.*, 2002). In recent years, large-scale mutagenesis screening of mutations affecting neurogenesis or organogenesis have been successfully performed using medaka (Furutani-Seiki *et al.*, 2004). Many mutants displaying defects in histogenesis of the brain and cranial nerves have been identified (Ishikawa 2000; Kitagaka *et al.*, 2004; Yoda *et al.*, 2004; Yasuoka *et al.*, 2004). Determination of the entire genome sequence is currently underway (<http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka/>).

The brain of teleost fish shares the same basic organization with other vertebrates, consisting of the telencephalon, diencephalon, mesencephalon and rhombencephalon in the anterior to posterior order (Ito and Yoshimoto, 1991). Small fish have markedly fewer neuron numbers compared to other vertebrate species but exhibit common basic behaviors (e.g. feeding, escape and reproduction) as well as more sophisticated social behaviors exemplified by schooling (Yamamoto, 1975; Egami *et al.*, 1990; Iwamatsu, 1997). This indicates their potential use as an experimental model for the analysis of various levels of behavioral responses. To take advantage of the biological characteristics of medaka in behavioral studies and to establish links between genes and behavioral functions, anatomical analysis of the medaka brain is an essential first step.

Neuroanatomical studies of teleost fish have been performed using various species, revealing a diversity of morphological features (Davis and Northcutt, 1983; Ito and Yoshimoto, 1991; Uematsu *et al.*, 2002) partly ascribed to the variety of sensory inputs in the life of individual fish species (Ito and Yoshimoto, 1991; Ito, 2002). A gross brain atlas of the medaka has been published by Anken and Bourrat (1998) and Ishikawa *et al.* (1999). Previous analyses of the medaka brain, however, have stopped short of identifying neural circuits.

To provide fundamentals to the study of the medaka nervous system, we initiated an investigation into the cranial nerve connections and compared the results to other fish species. Medaka belongs to smegmamorpha, which is considered to be closely related to percomorpha, such as the archer fish and filefish, and holocentrids; all belong to neoteleostei (a newly-evolved branch of euteleostei) (Nelson, 1994). Medaka is very distantly related to another group of teleost fish frequently employed for experimentation, such as zebrafish, carp and goldfish that belongs to cyprinids (an old group of euteleostei). There are several teleost groups with well-developed eyes (e.g. holocentrids, some percomorpha), which presumably reflect the large dependence on vision in their ecological niche. Medaka also has large eyes, as implicated by its name (me = eye, daka = high in Japanese). The origin of the name also relates to the known feeding habits of medaka that includes the dependence on the visual sense to identify food while swimming close to the water surface. We therefore began our study with an analysis of the cranial nerves involved in visual function. In the present study,

the central distribution of retinofugal terminals, retinopetal neurons, and oculomotor, trochlear and abducens motor neurons was analyzed using biocytin and tract-tracing experiments.

MATERIALS AND METHODS

Specimens

The Cab-Kyoto inbred strain, derived from the Southern population of the Japanese medaka, *Oryzias latipes* (Furutani-Seiki et al., 2004), were used in this study. The fish were raised in 9 L tanks (at a population density of 30 fish/tank) at 26°C±1, pH 7.0±0.5 with a 14 h light/10 h dark cycle. Fish were fed twice daily with live brine shrimp (*Artemia salina*) larvae and commercial dry fish food (Hikari Crest Guppy, Kyorin). A total of 17 adult medaka fish (over 3 months old, 2-3 cm of body length) were used for biocytin injection and analysis. To determine the peripheral distribution of cranial nerves innervating the oculomotor muscles, >5 adult medaka were used for each nerve.

Peripheral distribution of cranial nerves innervating extraocular muscles

Fish were anaesthetized for 5 minutes in chilled 0.04% 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS222, Sigma) in fish cultivation water (Furutani-Seiki *et al.*, 2004). Fish were held on a dissecting stage with insect pins and then perfused through the conus arteriosus with 2% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), using a small glass pipette under a dissection microscope (MZ12.5, Leica). Whole bodies were post-fixed with a fresh solution of the 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer for longer than 2 days.

The parietal, frontal, and occipital bones were removed under the dissection microscope prior to the overnight immersion of fish in dimethyl sulfoxide (DMSO)-methanol (DMSO:methanol = 1:1). After rinsing in 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer, the peripheral distribution of the nerves was observed under the dissection microscope.

General experimental scheme of tracer experiments

Fish were anaesthetized as described above for the cranial nerve distribution study. Under anesthesia, fish were held on a dissecting stage with insect pins. The body was covered with a wet paper (Kimwipe, Kimberly-Clark Corporation) to avoid drying. The procedure for the injection of biocytin into the cranial nerve was performed under a dissection microscope. After tracer injection (described below), fish were kept on the stage for 30 minutes, wrapped in a wet Kimwipe and occasionally sprinkled with water to maintain hydration. Fish were then returned to tanks and reared for 1 day.

Labeling of optic nerve

In order to expose the optic nerve, the left eyeball was turned ventrally after incising the skin at the orbital margin, superior oblique muscle, superior rectus muscle, and the optic nerve (the number of fish specimens, n=7). After wiping the orbit with a piece of dry Kimwipe, a small crystal of biocytin (ϵ -biotinoyl-L-lysine, Molecular Probe) was placed on

the distal end of the optic nerve.

Labeling of oculomotor nerve

In order to expose the oculomotor nerve, the left eyeball was turned dorsonasally after incising the skin at the orbital margin, inferior oblique muscle, inferior rectus muscle and lateral rectus muscle (n=4). After wiping the orbit with a piece of dry Kimwipe, 1-2 μ l of biocytin solution (3% biocytin in 0.05 M Tris-buffer, pH 7.2) was pressure-injected into the oculomotor nerve using a PLI-100 Pico-Injector (Harvard/Medical Systems). The oculomotor nerve was injected with tracer just before the nerve branched in the temporal area of the orbit, in order to trace innervation of the superior rectus, inferior oblique, inferior rectus and medial rectus muscles.

Labeling of trochlear nerve

In order to expose the trochlear nerve, the left eyeball was turned slightly ventrally after incising the skin of the orbital margin (n=5). Pressure injection was used to inject the biocytin solution into the trochlear nerve running through the dorsal area of the orbit.

Labeling of abducens nerve

In order to expose the abducens nerve, the left eyeball was turned dorsonasally after incising the skin of the orbital margin, then cutting the inferior oblique, inferior rectus and lateral rectus muscles at their insertion to the eyeball (n=1). Biocytin solution was pressure-injected into the abducens nerve running through the temporal area of the orbit.

Fixation

Fish were anaesthetized and perfused as described above. The brain was excised and post-fixed in a mixed solution of 4% PFA and 0.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 1 day or longer at 4°C.

Sectioning and staining

Fixed brains were immersed in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 12 h at 4°C, then embedded in 15% (w/v) gelatin and 5% (w/v) sucrose in 0.1 M phosphate buffer at 37°C. After freezing at -20°C, brains were cut serially on a cryostat (50 μ m-thick transverse sections), and sections were divided into wells in a 48-well plate and processed for visualization of the tracer using free-floating conditions.

Sections were washed in 0.1 M phosphate-buffered saline for 10 minutes, then immersed in 70% methanol containing 3% H₂O₂ for 10 minutes. After two rinses in 0.1 M phosphate-buffered saline, sections were incubated for 3 hours in a 1% avidine-biotin complex (ABC: Streptavidin Biotin Complex Peroxidase kit, Nacalai Tesque) solution containing 0.4% Triton-

X-100 in 0.1 M phosphate-buffered saline. After washing 3 times in 50 mM Tris-HCl for 5 minutes, sections were incubated with diaminobenzidine (DAB) solution ($6 \times 10^{-4}\%$ DAB, 0.4% ammonium nickel (II) sulfate hexahydrate and $3 \times 10^{-4}\%$ H_2O_2 in distilled water) until specimens developed color (approximately 5-10 minutes). To terminate the reaction, sections were washed 3 times for 5 minutes in 100 mM Tris-HCl. After washing in distilled water, sections were serially mounted in rostrocaudal order on silan-coated slides (Super Frost White MAS, Matsunami), counterstained with 0.1% cresyl violet (Nissl staining), then analyzed using microscopy (AX80, Olympus).

Figure production

Images of appropriate sections were captured using a DP70 digital camera (Olympus) and imported into a computer. Line drawings were made using a camera lucida.

RESULTS

We first analyzed the optic nerve by examining 1) the crossing pattern at the optic chiasm, 2) anterograde-labeling pattern or retinofugal system, and 3) retrograde-labeling pattern or retinopetal system. We then describe the cranial nerves that innervate the extraocular muscles and extraocular nerves, focusing on 1) peripheral distribution and 2) distribution of extraocular motor neurons.

Optic Nerve

The optic nerve was labeled by placing a small biocytin crystal on the distal stump of the nerve at the margin of eyeball.

1) Optic chiasm

Labeled fibers of the optic nerve were followed to the optic chiasm, where all labeled fibers crossed the midline. After crossing, labeled fibers continued to the tractus opticus and enter the contralateral brain. This indicates that the optic nerve of medaka is of a complete decussation type.

2) Retinofugal system

a. Preoptic area

Immediately after crossing the optic chiasm, a thin fiber bundle emerged from the tractus opticus contralateral to the injected optic nerve and coursed dorsally to enter the brain. This fiber bundle terminated in the suprachiasmatic nucleus located immediately dorsal to the optic chiasm (Figs. 1C, 2A). Terminals in the nucleus distributed from the level of the nucleus entopeduncularis to that of habenula. At the level of the habenula, a portion of the labeled fibers in the suprachiasmatic nucleus crossed the midline again through the commissura minor of Ishikawa *et al.* (1999) and terminated in the suprachiasmatic nucleus, ipsilateral to the injected optic nerve (Fig. 1C).

b. Thalamus and pretectum

Caudal to the chiasm, labeled fibers in the tractus opticus coursed dorsocaudally to provide terminals to the thalamus and pretectum, and finally to the tectum opticum. The tractus opticus split into 2 branches: the tractus opticus pars dorsomedialis that gave off terminals to the thalamus, dorsal pretectum and tectum opticum, and the tractus opticus pars ventrolateralis that gave off terminals to the ventral pretectum, accessory optic nucleus and tectum opticum.

At the rostral level of the habenula, a region with dense terminals was observed in the nucleus pretectalis superficialis located dorsolateral to the tractus opticus pars dorsomedialis (Figs. 1C, 2B).

At the same level, a fiber bundle branched from the tractus opticus pars dorsomedialis, and proceeded dorsomedially. This bundle gave off terminals to the nucleus dorsolateralis thalami (Fig. 1C). At a more caudal level, where the habenula appeared the largest, the terminal field in the nucleus dorsolateralis thalami extended maximally in the dorsoventral axis, where terminals appeared to be the densest (Figs. 1D, 2C).

Labeled fibers in the nucleus dorsolateralis thalami continued caudally and formed a terminal field in NPC, located ventrolateral to the posterior commissure (Figs. 1E,F, 2F). A fraction of fibers crossed the midline through the posterior commissure and terminated in the NPC, ipsilateral to the injected optic nerve (Fig. 1F).

Some fibers of the tractus opticus pars dorsomedialis formed terminals in the APd before they reached the tectum opticum (Figs. 1D, 2D). Ventral to the APd, another group of terminals was provided from the tractus opticus pars ventrolateralis, which is the terminal field in APv (Figs. 1D,E, 2E).

c. Accessory optic nucleus

Some fibers in the APv passed through the nucleus and extended caudomedially. These labeled fibers terminated in the accessory optic nucleus (Figs. 1F, 2G).

d. Tectum opticum

The largest of the retinal targets was the tectum opticum. The tractus opticus pars dorsomedialis entered the tectum from its dorsomedial aspect and the tractus opticus ventrolateralis from the ventrolateral aspect (Figs. 1D-F). The tectum opticum of medaka has 6 layers, a common feature in teleosts (Ishikawa *et al.*, 1999). Labeled fibers ran mainly through the stratum opticum and stratum fibrosum et griseum superficiale, terminating at this point (Fig. 3A). A fraction of labeled fibers ran deeper to terminate in the stratum album centrale. The stratum fibrosum et griseum superficiale appeared to be divided into a superficial layer with denser fibers and a deeper layer containing less dense fibers.

3) Retinopetal system

In medaka, neurons projecting to the retina were identified in 6 nuclei: TNG in the telencephalon, preoptic retinopetal nucleus, nucleus dorsolateralis thalami, APd, APv and NPC. The latter 4 nuclei are retinorecipient nuclei as described above.

The TNG was a cluster of large neurons located in the area ventralis telencephali pars ventralis (Fig. 1A). Labeled cells were piriform or oval in shape (Fig. 3B). Fibers of labeled neurons in the TNG extended dorsocaudally, turned ventrolaterally at the rostral level of the habenula, and then a subpopulation of fibers merged with the tractus opticus (Fig. 1C) toward the optic nerve.

Approximately 20-labeled neurons in the preoptic retinopetal nucleus were observed in

the boundary region between the preoptic area and the tractus opticus (Fig. 1B). Labeled cells of the preoptic retinopetal nucleus were oval-shaped. At more caudal levels, labeled neurons in the nucleus were distributed more dorsally and reached the nucleus dorsolateralis thalami (Figs. 1C, 3C). Labeled neurons in the nucleus dorsolateralis thalami thus appeared as a dorsocaudal continuation of labeled neurons of the preoptic retinopetal nucleus (Figs. 1C,D, 3D). Labeled cells were piriform or oval-shaped in the nucleus dorsolateralis thalami. Small numbers of labeled, oval cells were also observed in the NPC (Fig. 3E), positioned immediately caudal to the nucleus dorsolateralis thalami. A few neurons were seen lateral to the preoptic retinopetal nucleus, and labeled, oval neurons continued to the APv (Fig. 1D). One single, labeled, oval neuron was also observed in the APd (Fig. 1D).

Cranial nerves that innervate extraocular muscles

1) Peripheral distribution

Under the dissection microscope, the oculomotor nerve appeared to exit the brain from the ventral side of the mesencephalon and run rostroventrally along the lateral surface of the brain. The oculomotor nerve exited the cranium through a foramen located in the caudal basement of the parasphenoid bone (Iwamatsu, 1997) that constitutes the rostroventral wall of the cranium. The oculomotor nerve then split into 4 branches in a caudal area of the orbit to innervate the superior rectus muscle (SR), medial rectus muscle (MR), inferior oblique muscle (IQ) and inferior rectus muscle (IR) (Figs. 4A,B). The origin of SR was an articulation-like portion at the center of a parasphenoid located slightly caudal to the optic chiasm. The SR extended rostradorsally and inserted into the dorsal part of the eyeball (rostrocaudally central portion). The MR originated from a central position of the parasphenoid bone and inserted into the rostral part of the eyeball (dorsoventrally central portion). The IQ originated from the medial end of the dorsal part of the palatine bone, extended caudoventrally and inserted to the ventral part of the eyeball (rostrocaudally central portion). The IR originated from the center of the parasphenoids, similar to the SR, and extended rostroventrally to insert into the ventral part of the eyeball (rostrocaudally central portion).

The trochlear nerve exited the brain from a position dorsocaudal to the exit of the oculomotor nerve. The trochlear nerve extended rostroventrally along the lateral surface of the brain and exited the cranium from a foramen in the caudal basement of the parasphenoid bone. The nerve then traveled along the dorsal side of the eyeball and innervated the superior oblique muscle (SQ) (Figs. 4A,B). The SQ originated from the medial end of the dorsal part of the palatine bone, extended dorsocaudally and inserted into the dorsal part of eyeball (rostrocaudally central portion).

The abducens nerve exited the brain from a ventromedial part of the rhombencephalon, then extended rostrally and slightly laterally along the ventral aspect of the brain. The

abducens nerve left the cranium from a foramen in the caudal basement of the parasphenoid bone and innervated the lateral rectus muscle (LR) (Figs. 4A, B). The LR originated from the medial part of the parasphenoid bone, extended laterally and inserted into the caudal part of eyeball (dorsoventrally central portion).

2) Distribution of extraocular motor neurons

Extraocular motor neurons were labeled retrogradely by injecting biocytin solution into each cranial nerve. The oculomotor nucleus was located in the dorsal portion of the tegmentum mesencephali at the rostral level of nucleus recessi lateralis. The oculomotor nucleus was dorsomedially adjacent to the fasciculus longitudinalis medialis (Figs. 5A,B). Most of the labeled neurons were observed in the ipsilateral nucleus with only a few cells in the contralateral nucleus. Ipsilateral neurons were located dorsal and medial to the fasciculus longitudinalis medialis, while contralateral neurons medial to the fasciculus. The labeled cells in the oculomotor nucleus were fusiform or piriform in shape. The fibers derived from the labeled neurons extended ventrally to form a bundle. The bundle turned laterally and left the brain as the oculomotor nerve from the ventral aspect of the mesencephalon (Fig. 5A). A subpopulation of labeled fibers derived from labeled neurons in the oculomotor nucleus entered the fasciculus longitudinalis medialis and extended caudally as part of the fasciculus.

The trochlear nucleus was caudal to the oculomotor nucleus and located dorsolateral to the fasciculus longitudinalis medialis at the level of the nucleus interpeduncularis (Figs. 5C,D). Labeled cells were fusiform or piriform in shape. In its most rostral part, the trochlear nucleus was very close to the caudalmost neurons of the oculomotor nucleus. Labeled fibers of the trochlear neurons extended medially, running dorsal to the ventriculus quartus, forming a bow-shape tract, and passing through the commissura cerebelli to the contralateral side. These fibers extended further laterally, then turned ventrally and left the brain at a position caudolateral and dorsal to the oculomotor nerve exit (Fig. 5C). A subpopulation of labeled fibers derived from labeled neurons in the trochlear nucleus entered the fasciculus longitudinalis medialis and extended caudally through the fasciculus.

The abducens nucleus was located caudally away from the other extraocular motor nuclei, in a ventrolateral part of the rhombencephalic reticular formation. Labeled neurons in the abducens nucleus were oval or piriform-shaped (Figs. 6A,B).

DISCUSSION

To understand the central neural circuits in medaka, we initiated an analysis of cranial nerve projections and distribution of motor neurons using tract-tracing biocytin tracers. This study revealed a central distribution of retinofugal terminals, retinopetal neurons, and oculomotor, trochlear and abducens motor neurons in medaka. Medaka belongs to smegmamorpha, which together with the closely-related percomorpha, are regarded as highly-derived teleost groups (Nelson, 1994). We thus compared the present results in medaka with those of closely-related percomorpha and other more distant related teleosts.

Optic nerve

1) Retinofugal system

Retinal projections in medaka were contralateral dominant. Labeled terminals were found in 8 brain nuclei: the suprachiasmatic nucleus, nucleus pretectalis superficialis, nucleus dorsolateralis thalami (sometimes considered as a projection to the nucleus ventrolateralis thalami; e.g. Braford and Northcutt, 1983; Northcutt and Wullimann, 1988), APd, APv, NPC, accessory optic nucleus, and tectum opticum. On the ipsilateral side, small numbers of terminals were observed in the suprachiasmatic nucleus and NPC. These targets as well as terminal patterns in the tectum opticum are common to other teleosts (see review by Vanegas and Ito, 1983), but a projection to the nucleus ventromedialis thalami reported for percomorpha (e.g. Ito *et al.*, 1984) was not detected in medaka. Contralateral dominance of retinal projections is also common to other teleosts (see review by Vanegas and Ito, 1983), except the piranha, in which abundant ipsilateral projections have been reported (Ebbesson and Ito, 1980). Projection of the optic nerve to the ipsilateral nucleus of the posterior commissure in medaka, as observed in this study, is also known to occur in ostariophysan teleosts, e.g. cyprinids (Reperant *et al.*, 1976), piranha (Ebbesson and Ito, 1980) and goldfish (Springer and Gaffney, 1981).

As described above, retinal projections end in multiple nuclei. This implies that visual information is transmitted through multiple functional circuits to carry out parallel processing of visual information. The suprachiasmatic nucleus is located immediately dorsal to the optic chiasm and receives a projection of nerve tract fibers distinct from those projecting to other retinorecipient nuclei. This is analogous to the homonymous nucleus in mammals. Function of the suprachiasmatic nucleus in teleosts has not yet been determined, but the nucleus is likely involved in regulation of circadian rhythm, similarly to other vertebrates (Klein *et al.*, 1997). Many pretectal nuclei receive retinal projections and project to the cerebellum (Meek and Nieuwenhuys, 1998). In filefish that belong to percomorpha, the APd, APv, and accessory optic nucleus are known to project to the oculomotor nuclear group, in addition to the cerebellum (Uchiyama *et al.*, 1988). These nuclei may constitute neural circuits regulating

oculomotor kinetics to stabilize visual images on the retina.

In filefish, the NPC sends information to the ciliary ganglion relayed by the accessory oculomotor nucleus (or Edinger-Westphal nucleus) and regulates visual accommodation (Somiya *et al.*, 1992). The nucleus dorsolateralis thalami, although belonging to the thalamus, projects little to the telencephalon in most teleosts (Striedter, 1990; Yamamoto and Ito, 2000). In the visual system of percomorphs and holocentrids, the tectum opticum sends abundant fibers to the nucleus prethalamicus, which in turn projects to the telencephalon (Ito *et al.*, 1980; Ito and Vanegas, 1983, 1984). The nucleus pretectalis superficialis projects to the nucleus intermedius, which in turn sends fibers to the corpus glomerulosus, an afferent origin to the inferior lobe (Murakami *et al.*, 1986; Sakamoto and Ito, 1982; Shimizu *et al.*, 1999; Yamamoto and Ito, 2002). In percomorphs, the inferior lobe receives gustatory and viscerosensory inputs (Yoshimoto *et al.*, 1998), and electrical stimulation of the lobe evokes feeding behavior (Demski, 1983). It is possible that the visual signals through the nucleus pretectalis superficialis participate in the regulation of feeding behavior.

In the present study, no terminals of retinofugal projection were found on the cell bodies of nucleus corticalis neurons, a finding similar to the situation in percomorphs (Ito *et al.*, 1984; for review see Vanegas and Ito, 1983). The nucleus corticalis develops well in percomorphs but is not present (or at least is undetectable) in ostariophysans or salmonids, both of which are considered to have been derived at a relatively early stage in teleost phylogeny (Ito and Yoshimoto, 1991; Yamamoto and Ito, 2002). The nucleus corticalis is also present in medaka, a smegmamorph consistent in its close relationship with percomorphs (Figs. 1C-E). In percomorph teleosts, there is electrophysiological evidence that the nucleus corticalis receives input from the retina (Rowe and Beauchamp, 1982). The nucleus corticalis neurons extend huge dendrites to the stratum fibrosum et griseum superficiale and stratum griseum centrale of the tectum opticum (Sakamoto and Ito, 1982; Shimizu *et al.*, 1999). Dendrite morphology of the nucleus corticalis neurons is not described in medaka, but from an analogy with related percomorph teleosts, it is likely that the nucleus corticalis neurons receive retinal projections on their dendrites in medaka as well. The nucleus corticalis projects to the corpus glomerulosum, an afferent origin to the inferior lobe. Hence, visual information relayed by the nucleus corticalis may modulate feeding behavior, as discussed above for the nucleus pretectalis superficialis.

In teleosts, the tectum opticum is not only a relay center for visual input to the telencephalon but also an area that receives input of other modalities and sends fibers to various targets, including descending projections to the rhombencephalon (for review see Vanegas and Ito, 1983; Meek and Nieuwenhuys, 1998; Yamamoto and Ito, 2002). The tectum opticum is thus one of the most important centers for sensory-motor co-ordination.

Neural circuits related to vision that have been described for percomorphs are probably present in smegmamorphs medaka because of their close relationship. The present study

provides a basis for further investigation into the visual circuits from a morphological, functional, behavioral, and genetic viewpoint.

2) Retinopetal system

In medaka, neurons projecting to the retina were identified in 6 brain nuclei on the contralateral side: the TNG, preoptic retinopetal nucleus, nucleus dorsolateralis thalami, APd, APv and NPC. To our knowledge, this is the first report in teleosts of retinopetal neurons located in the NPC.

Subsequent to the first discovery of projection from the TNG to the retina (Münz and Claas, 1981), this pathway has been confirmed in various fish species (for review see Uchiyama, 1989). Position of the TNG is variable depending on the species. In species with a stalked-type olfactory bulb, where the olfactory bulb is located close to the olfactory epithelium and distant from the telencephalon, the TNG is located in a rostral region of the olfactory bulb. In species with a pedunculated olfactory bulb-type, where the olfactory bulb is positioned immediately rostral to the telencephalon, the TNG is usually located at the boundary between the olfactory bulb and telencephalon (for review see Demski, 1993). Medaka, a pedunculated olfactory bulb-type species, had the TNG at the boundary of the olfactory bulb and telencephalon, in concordance with a previous immunocytochemical study (Ishikawa *et al.*, 1999). The neurons of TNG, also called the nucleus olfactoretinalis, receive olfactory, visual and general somatosensory inputs, and project to wide areas in the brain (Yamamoto *et al.*, 1995; Yamamoto and Ito, 2000) and produce gonadotropin-releasing hormone (GnRH) (for review see Demski, 1993, Yamamoto, 2003), presumably functioning as a neuromodulatory system (for review see Oka, 1997). GnRH derived from the TNG affects the excitability of retinal neurons (Stell *et al.*, 1984; Walker and Stell, 1986; Umino and Dowling, 1991). At the behavioral level, in a percomorph (dwarf gourami), the TNG is involved in regulation of the nest-building behavior of male fish (Yamamoto *et al.*, 1997; Yamamoto, 2003). Study of medaka will contribute to the further understanding of neuromodulatory functions of the TNG.

In medaka, retinopetal nuclei were observed not only in the telencephalon but also in the diencephalon, a common feature in percomorphs and other closely-related teleost groups (Uchiyama, 1989; Butler and Northcutt, 1992). In ostariophysans, no retinopetal neurons have been observed in the diencephalon; in zebrafish, only the TNG or nucleus olfactoretinalis have been described (Burrill and Easter, 1994). The reason for the difference is unknown, but considering the fact that a sturgeon, which branched earlier than teleosts, has retinopetal neurons in the diencephalon (Hofmann *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1999), the lack of diencephalic retinopetal neurons is likely a derived feature in ostariophysans.

Retinopetal neurons of medaka were distributed in a continuous zone and found in several nuclei of the diencephalon. A similar distribution of retinopetal neurons in the preoptic

retinopetal nucleus and nucleus dorsolateralis thalami has also been observed in percomorphs (Ito *et al.*, 1984). Retinopetal neurons in the diencephalon of medaka were generally 4-6 μm in size. These retinopetal neurons may, in fact, represent a homogeneous population of neurons. It is possible that the distribution of diencephalic retinopetal neurons is spread in a more rostrocaudally-elongated fashion in medaka, resulting in the inclusion in a number of nuclei. It is important to determine the connections of these neurons other than their retinal projections and to identify their neurotransmitters in order to solve the issue of the identity of these neurons in multiple nuclei. A sub-group of percomorphs, the Tetraodontiformes fish, which includes *Navodon modestus* and *Stephanolepis cirrhifer*, have highly-developed visual systems, and presumably as its consequence develop the preoptic retinopetal nucleus to contain as many as 8000 to 10000 neurons per side (Uchiyama *et al.*, 1981; Uchiyama and Ito, 1984). In tetraodontiformes, the preoptic retinopetal nucleus receives projections from the tectum opticum (Uchiyama *et al.*, 1986) and may be involved in visual attention shifts on the retina (Uchiyama, 1989). Although medaka also has a well-developed visual system, the preoptic retinopetal nucleus is less developed than tetraodontiformes. The medaka showed approximately 20 labeled retinopetal neurons in the presently described tract-tracing experiments. Even though there might be neurons that were not labeled, the total number of neurons in the nucleus would not be significantly larger. Archer fish, another type of percomorph with a well-developed visual system, possesses very few neurons in the preoptic retinopetal nucleus (Tanaka, Yoshimoto, Yamamoto, Ito and Somiya, unpublished observation). These fish seek food on or above the water surface, while tetraodontiformes see objects in water, frequently by binocular vision. The difference in the development of the preoptic retinopetal nucleus may reflect a difference in the way visual information is used among fish species. This hypothesis can be examined by quantitatively analyzing neurons of the preoptic retinopetal nucleus in a variety of fish species.

Cranial nerves that innervate extraocular muscles

In medaka fry, gross peripheral distributions of cranial nerves innervating extraocular muscles have been previously described (Ishikawa and Hyodo-Taguchi, 1994). In the present study, adult medaka was investigated and the overall distribution of extraocular cranial nerves was in accordance with those of medaka fry. The present study extended further the investigation to include the distribution of motor neurons innervating the extraocular muscles by use of tracer experiments, the first time conducted in medaka. Projections of these motor neurons were unilateral dominant, namely ipsilateral dominance of the oculomotor neurons, contralateral dominance of the trochlear neurons and ipsilateral dominance of the abducens neurons. This pattern is also observed in other teleost fish (carp: Luiten and Dijkstra-de Vlieger, 1978; stargazer (a percomorph): Leonard and Willis, 1979; goldfish: Graf and McGurk, 1985; flatfish (a percomorph): Graf and Baker, 1985; weakly electric fish (an

osteoglossomorph): Szabo *et al.*, 1987; file fish: Somiya *et al.*, 1992). In these studies, the oculomotor nucleus is subdivided into sub-nuclei depending on the muscles in which they innervate. According to these studies, labeled neurons in the contralateral oculomotor nucleus in the present study appear to correspond to those innervating the SR. Labeling the four individual branches of the oculomotor nerve should provide more detailed information. In carp (Luiten and Dijkstra-de Vlieger, 1978), goldfish (Sterling and Gestrin, 1975; Sterling, 1977; McGurk and Graf, 1984; Graf and McGurk, 1985; Cabrera *et al.*, 1992; Pastor *et al.*, 1991), stargazer (Leonard and Willis, 1979) and flatfish (Graf and Baker, 1985), neurons of the abducens nucleus are divided into rostral and caudal groups. In the present tract-tracing study of medaka, the distribution of these specific neurons remained elusive, but considering that neurons of the abducens nucleus form separate anterior and posterior bundles in the brain (data not shown), it is likely that in medaka, the abducens nucleus is also divided into rostral and caudal compartments.

Recently, physiological and behavioral studies have been carried out in medaka (Beck *et al.*, 2004). The present study will provide an anatomical basis for these types of studies.

Concluding remarks

In the present study, central projection of the optic nerve, distribution of retinopetal system and distribution of motor neurons innervating the extraocular muscles were characterized in medaka. Analysis of other cranial nerves is currently ongoing. These findings are essential for understanding central neural circuits in both morphological and physiological terms. The use of medaka as an experimental animal serves a number of advantages and will be an important tool for future investigations into genes involved in the elicitation and regulation of behavior.

Acknowledgements

The authors would like to thank members of the ERATO Kondoh Project for encouragement and discussion. This work was partly supported by the SORST program of the Japan Science and Technology Agency and by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (12CE2007) of Japan to H.K.

REFERENCES

- Anken R and Bourrat F (1998) Brain Atlas of the Medakafish *Oryzias latipes*. INRA Editions, Paris
- Beck JC, Gilland E, Tank DW and Baker R (2004) Quantifying the ontogeny of optokinetic and vestibuloocular behaviors in zebrafish, medaka, and goldfish. *J Neurophysiol* 92: 3546-3561
- Braford MR, Jr. and Northcutt RG (1983) Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. In "Fish Neurobiology Vol 2" Ed by RE Davis and RG Northcutt, University of Michigan Press, Ann Arbor, pp 117-163
- Burrill JD and Easter SS, Jr. (1994) Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol* 346: 583-600
- Butler AB and Northcutt RG (1992) Retinal projections in the bowfin, *Amia calva*: cytoarchitectonic and experimental analysis. *Brain Behav Evol* 39: 169-194
- Cabrera B, Torres B, Pásaro R, Pastor AM and Delgado-García JM (1992) A morphological study of abducens nucleus motoneurons and internuclear neurons in the goldfish (*Carassius auratus*). *Brain Res Bull* 28: 137-144
- Davis RE and Northcutt RG (1983) *Fish Neurobiology*. University of Michigan Press, Ann Arbor
- Demski LS (1983) Behavioral effects of electrical stimulation of the brain. In "Fish Neurobiology Vol 2" Ed by RE Davis and RG Northcutt, University of Michigan Press, Ann Arbor pp 317-357
- Demski LS (1993) Terminal nerve complex. *Acta Anat* 148: 81-95
- Ebbesson SOE and Ito H (1980) Bilateral retinal projections in the black piranha (*Serrasalmus niger*). *Cell Tissue Res* 213: 483-495
- Egami N, Yamagami K and Shima A (1990) *Biology of the Medaka*. Tokyo Univ. Press, Tokyo [in Japanese]

Furutani-Seiki M, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yoda H, Deguchi T, Hirose Y, Yasuoka A, Henrich T, Watanabe T, Iwanami N, Kitagawa D, Saito K, Asaka S, Osakada M, Kunimatsu S, Momoi A, Elmasri H, Winkler C, Ramialison M, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Shinomiya A, Kota Y, Yamanaka T, Okamoto Y, Takahashi K, Todo T, Abe K, Takahama Y, Tanaka M, Mitani H, Katada T, Nishina H, Nakajima N, Wittbrodt J and Kondoh H (2004) A systematic genome-wide screen for mutations affecting organogenesis in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 647-658

Graf W and Baker R (1985) The vestibuloocular reflex of the adult flatfish. I. Oculomotor organization. *J Neurophysiol* 54: 887-899

Graf W and McGurk JF (1985) Peripheral and central oculomotor organization in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 239: 391-401

Hofmann MH, Piñuela C and Meyer DL (1993) Retinopetal projections from diencephalic neurons in a primitive actinopterygian fish, the sterlet *Acipenser ruthenus*. *Neurosci Lett* 161: 30-32

Ishikawa Y and Hyodo-Taguchi Y (1994) Cranial nerves and brain fiber systems of the medaka fry as observed by a whole-mount staining method. *Neurosci Res* 19: 379-386

Ishikawa Y, Yoshimoto M and Ito H (1999) A brain atlas of a wild-type inbred strain of the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Biol J Medaka* 10: 1-26

Ishikawa Y (2000) Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *Bioessays* 22: 487-495

Ito H, Morita Y, Sakamoto N and Ueda S (1980) Possibility of telencephalic visual projection in teleosts, *Holocentridae*. *Brain Res* 197: 219-222

Ito H and Vanegas H (1983) Cytoarchitecture and ultrastructure of nucleus prethalamicus, with special reference to degenerating afferents from optic tectum and telencephalon, in a teleost (*Holocentrus ascensionis*). *J Comp Neurol* 221: 401-415

Ito H and Vanegas H (1984) Visual receptive thalamopetal neurons in the optic tectum of teleosts (*Holocentridae*) *Brain Res* 290: 201-210

Ito H, Vanegas H, Murakami T and Morita Y (1984) Diameters and terminal patterns of

retinofugal axons in their target areas: an HRP study in two teleosts (*Sebastiscus* and *Navodon*). *J Comp Neurol* 230: 179-197

Ito H and Yoshimoto M (1991) Nervous system. In “Fish Physiology” Ed by Y Itazawa and I Hanyu, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 363-402 [in Japanese]

Ito H, Yoshimoto M, Albert JS, Yamamoto N and Sawai N (1999) Retinal projections and retinal ganglion cell distribution patterns in a sturgeon (*Acipenser transmontanus*), a non-teleost actinopterygian fish. *Brain Behav Evol* 53: 127-141

Ito H (2002) History and perspectives of fish brain research. In “Neuroscience of Fishes” Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 1-8 [In Japanese]

Iwamatsu T (1997) The Integrated Book for the Biology of the Medaka. Daigaku Kyoiku Publ. Co., Ltd., Tokyo [in Japanese]

Kitagawa D, Watanabe T, Saito K, Asaka S, Sasado T, Morinaga C, Suwa H, Niwa K, Yasuoka A, Deguchi T, Yoda H, Hirose Y, Henrich T, Iwanami N, Kunimatsu S, Osakada M, Winkler C, Elmasri H, Wittbrodt J, Loosli F, Quiring R, Carl M, Grabher C, Winkler S, Del Bene F, Momoi A, Katada T, Nishina H, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Genetic dissection of the formation of the forebrain in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 673-685

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcón J, Cahill GM, Cassone VM and Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin *N*-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res* 52: 307-358

Leonard RB and Willis WD (1979) The organization of the electromotor nucleus and extraocular motor nuclei in the stargazer (*Astroscopus y-graecum*). *J Comp Neurol* 183: 397-413

Luiten PGM and Dijkstra-de Vlieger HP (1978) Extraocular muscle representation in the brainstem of the carp. *J Comp Neurol* 179: 669-675

McGurk JF and Graf W (1984) The oculomotor system of the goldfish, *Carassius auratus*. *Soc Neurosci Abstr* 10:290.2

Meek J and Nieuwenhuys R (1998) Holosteans and teleosts. In "The Central Nervous System of Vertebrates Vol 2" Ed by R Nieuwenhuys, HJ Ten Donkelaar and C Nicholson, Springer, Berlin, pp 759-937

Münz H and Claas B (1981) Centrifugal innervation of the retina in cichlid and poeciliid fishes. a horseradish peroxidase study. *Neuroscience Letters* 22: 223-226

Murakami T, Morita Y and Ito H (1986) Cytoarchitecture and fiber connections of the superficial pretectum in a teleost, *Navodon modestus*. *Brain Res* 373: 213-221

Nelson, JS (1994) *Fishes of the World*. 3rd ed, John Wiley and Sons, N.Y.

Northcutt RG and Wullimann MF (1988) The visual system in teleost fishes: morphological patterns and trends. In "Sensory Biology of Aquatic Animals" Ed by J Atema, RR Fay, AN Popper and WN Tavolga, Springer, Berlin, pp 515-552

Oka Y (1997) GnRH neuronal system of fish brain as a model system for the study of peptidergic neuromodulation. In "GnRH Neurons: Gene to Behavior" Ed by IS Parhar and Y Sakuma, Brain Shuppan Publishing, Tokyo, pp 245-276

Pastor AM, Torres B, Delgado-Garcia JM and Baker R (1991) Discharge characteristics of medial rectus and abducens motoneurons in the goldfish. *J Neurophysiol* 66: 2125-2140

Reperant J, Lemire M, Miceli D and Peyrichoux J (1976) A radioautographic study of the visual system in fresh water teleosts following intraocular injection of tritiated fucose and proline. *Brain Res* 118: 123-131

Rowe JS and Beauchamp RD (1982) Visual responses of nucleus corticalis neurons in the perciform teleost, Northern Rock Bass (*Ambloplites rupestris rupestris*). *Brain Res* 236: 205-209

Sakamoto N and Ito H (1982) Fiber connections of the corpus glomerulosum in a teleost, *Navodon modestus*. *J Comp Neurol* 205: 291-298

Shimizu M, Yamamoto N, Yoshimoto M and Ito H (1999) Fiber connections of the inferior lobe in a percomorph teleost, *Thamnaconus (Navodon) modestus*. *Brain Behav Evol* 54: 127-146

- Somiya H, Yoshimoto M and Ito H (1992) Cytoarchitecture and fibre connection of the Edinger-Westphal nucleus in the filefish. *Phil Trans R Soc Lond B* 337: 73-81
- Springer AD and Gaffney JS (1981) Retinal projections in the goldfish: a study using cobaltous-lysine. *J Comp Neurol* 203: 401-424
- Stell WK, Walker SE, Chohan KS and Ball AK (1984) The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 940-944
- Sterling P and Gestrin P (1975) Goldfish abducens motoneurons: physiological and anatomical specialization. *Science* 189: 1091-1093
- Sterling P (1977) Anatomy and physiology of goldfish oculomotor system. I. structure of abducens nucleus. *J Neurophysiol* 40: 557-572
- Striedter GF (1990) The diencephalon of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. II. retinal, tectal, cerebellar and telencephalic connections. *Brain Behav Evol* 36: 355-377
- Szabo T, Lazar G, Libouban S, Toth P and Ravaille M (1987) Oculomotor system of the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *J Comp Neurol* 264: 480-493
- Uchiyama H, Sakamoto N and Ito H (1981) A retinopetal nucleus in the preoptic area in a teleost, *Navodon modestus*. *Brain Res* 222: 119-124
- Uchiyama H and Ito H (1984) Fiber connections and synaptic organization of the preoptic retinopetal nucleus in the filefish (Balistidae, Teleostei). *Brain Res* 298: 11-24
- Uchiyama H, Matsutani S and Ito H (1986) Tectal projection neurons to the retinopetal nucleus in the filefish. *Brain Res* 369: 260-266
- Uchiyama H, Matsutani S and Ito H (1988) Pretectum and accessory optic system in the filefish *Navodon modestus* (Balistidae, Teleostei) with special reference to visual projections to the cerebellum and oculomotor nuclei. *Brain Behav Evol* 31: 170-180
- Uchiyama H (1989) Centrifugal pathways to the retina: influence of the optic tectum. *Vis Neurosci* 3: 183-206

Uematsu K, Oka T and Ito H (2002) Neuroscience of Fishes. Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo [in Japanese]

Umino O and Dowling JE (1991) Dopamine release from interplexiform cells in the retina: effects of GnRH, FMRFamide, bicuculline, and enkephalin on horizontal cell activity. *J Neurosci* 11: 3034-3046

Vanegas H and Ito H (1983) Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res* 287: 117-137

Walker SE and Stell WK (1986) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), molluscan cardioexcitatory peptide (FMRFamide), enkephalin and related neuropeptides affect goldfish retinal ganglion cell activity. *Brain Res* 384: 262-273

Wittbrodt J, Shima A and Schartl M (2002) Medaka--a model organism from the Far East. *Nat Rev Genet* 3: 53-64

Yamamoto N, Oka Y, Amano M, Aida K, Hasegawa Y and Kawashima S (1995) Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: Immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J Comp Neurol* 355: 354-368

Yamamoto N, Oka Y and Kawashima S (1997) Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology* 65: 403-412

Yamamoto N and Ito H (2000) Afferent sources to the ganglion of the terminal nerve in teleosts. *J Comp Neurol* 428: 355-375

Yamamoto N and Ito H (2002) Visual system of actinopterygian fishes. In "Neuroscience of Fishes" Ed by K Uematsu, Y Oka and H Ito, Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo, pp 122-136 [in Japanese]

Yamamoto N (2003) Three gonadotropin-releasing hormone neuronal groups with special reference to teleosts. *Anat Sci Int* 78: 139-155

Yamamoto T (1975) Medaka (Killifish)-Biology and Strains. Keigaku Publishing Co., Tokyo [in Japanese]

Yasuoka A, Hirose Y, Yoda H, Aihara Y, Suwa H, Niwa K, Sasado T, Morinaga C, Deguchi T, Henrich T, Iwanami N, Kunimatsu S, Abe K, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting the formation of posterior lateral line system in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 729-738

Yoda H, Hirose Y, Yasuoka A, Sasado T, Morinaga C, Deguchi T, Henrich T, Iwanami N, Watanabe T, Osakada M, Kunimatsu S, Wittbrodt J, Suwa H, Niwa K, Okamoto Y, Yamanaka T, Kondoh H and Furutani-Seiki M (2004) Mutations affecting retinotectal axonal pathfinding in Medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121: 715-728

Yoshimoto M, Albert JS, Sawai N, Shimizu M, Yamamoto N and Ito H (1998) Telencephalic ascending gustatory system in a cichlid fish, *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. *J Comp Neurol* 392: 209-226

ABBREVIATION

AON	accessory optic nucleus
APd	area pretectalis pars dorsalis
APv	area pretectalis pars ventralis
CC	corpus cerebelli
CR	crista cerebellaris
DI	area dorsalis telencephali pars lateralis
DLT	nucleus dorsolateralis thalami
Dm	area dorsalis telencephali pars medialis
Dp	area dorsalis telencephali pars posterior
flm	fasciculus longitudinalis medialis
GR	corpus glomerulosum pars rotunda
H	hypophysis
HB	habenula
IQ	inferior oblique muscle
IR	inferior rectus muscle
LI	lobus inferior
LR	lateral rectus muscle
MR	medial rectus muscle
nIII	oculomotor nerve
NIII	oculomotor nucleus
nIV	trochlear nerve
NIV	trochlear nucleus
nVI	abducens nerve
NVI	abducens nucleus
NC	nucleus corticalis
NDLI	nucleus diffusus lobi inferioris
NE	nucleus entopeduncularis
NPC	nucleus of the posterior commissure
NRL	nucleus recessi lateralis
PC	posterior commissure
PRN	preoptic retinopetal nucleus
PS	nucleus pretectalis superficialis
RF	reticular formation
Rho	rhombencephalon
SAC	stratum album centrale
SC	suprachiasmatic nucleus

SFGS	stratum fibrosum et griseum superficiale
SGC	stratum griseum centrale
SM	stratum marginale
SO	stratum opticum
SQ	superior oblique muscle
SPV	stratum periventriculare
SR	superior rectus muscle
TE	telencephalon
TL	torus longitudinalis
TNG	ganglion of the terminal nerve
TO	tectum opticum
tro	tractus opticus
trod	tractus opticus pars dorsomedialis
trov	tractus opticus pars ventrolateralis
TS	torus semicircularis
VC	valvula cerebelli
Vv	area ventralis telencephali pars ventralis

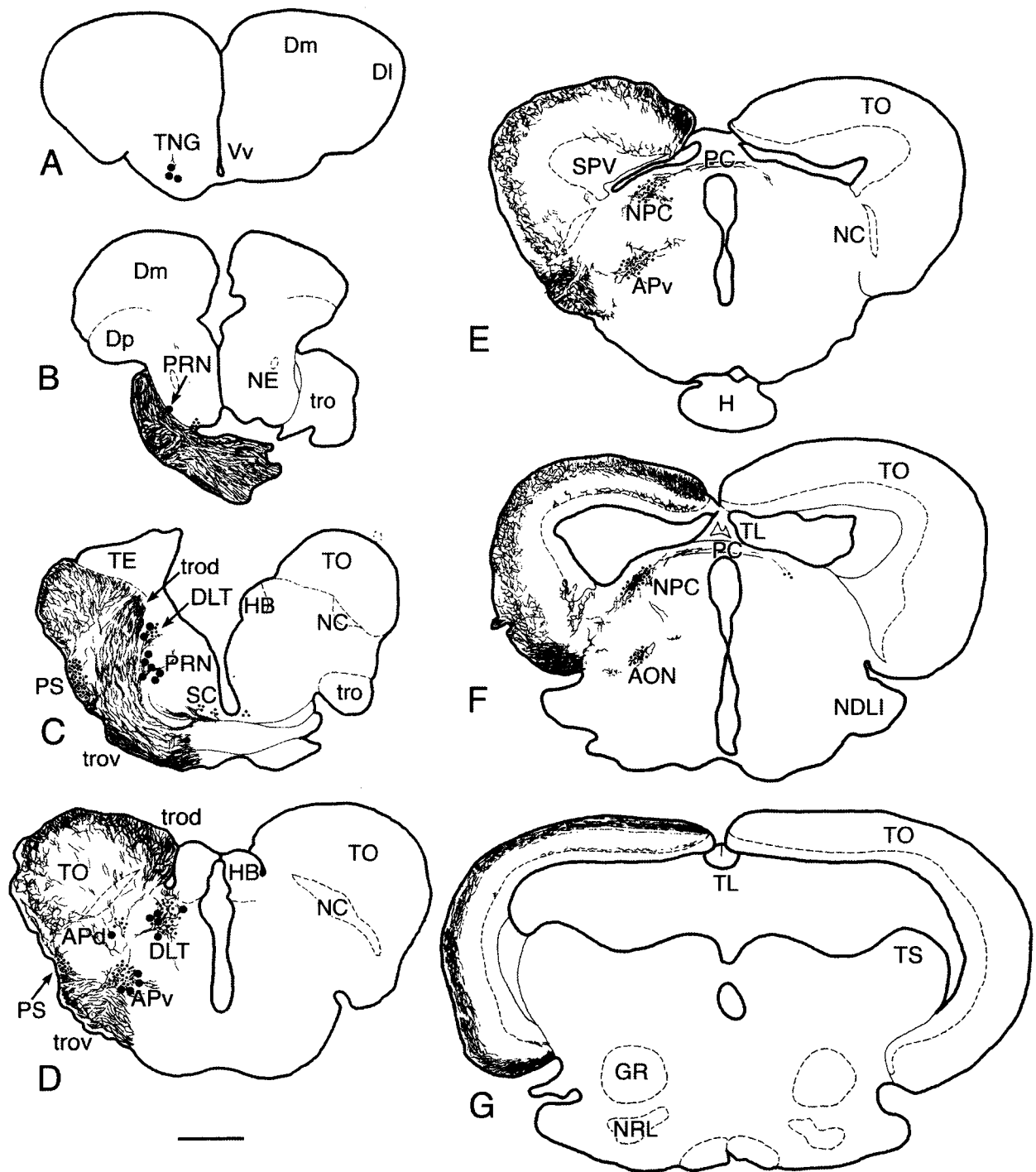


Fig. 1. Representative frontal sections from the telencephalon (A) to the mesencephalon (G) showing distribution of retinal projections and retinopetal neurons. Left optic nerve was injected with biocytin. Labeled fibers (thin lines), terminals (small dots) and retrogradely labeled cells (large dots) are illustrated. Scale bar = 200 μ m

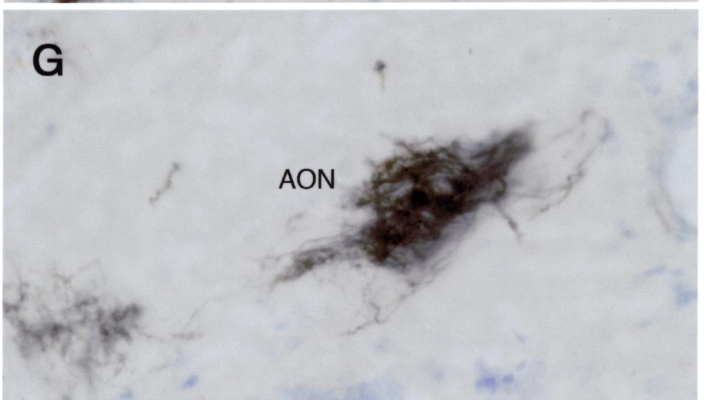
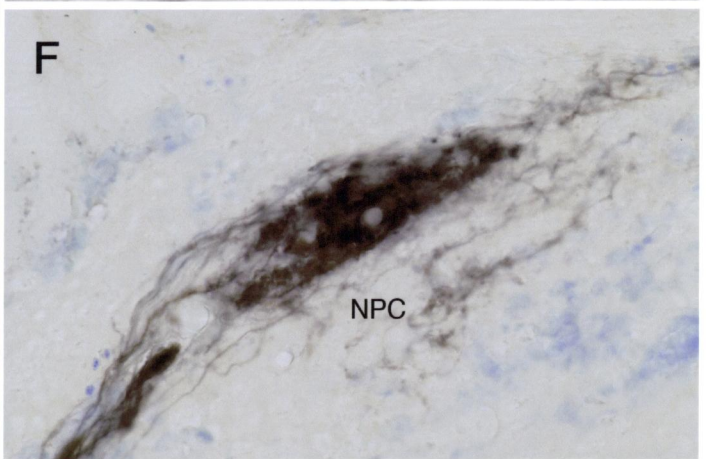
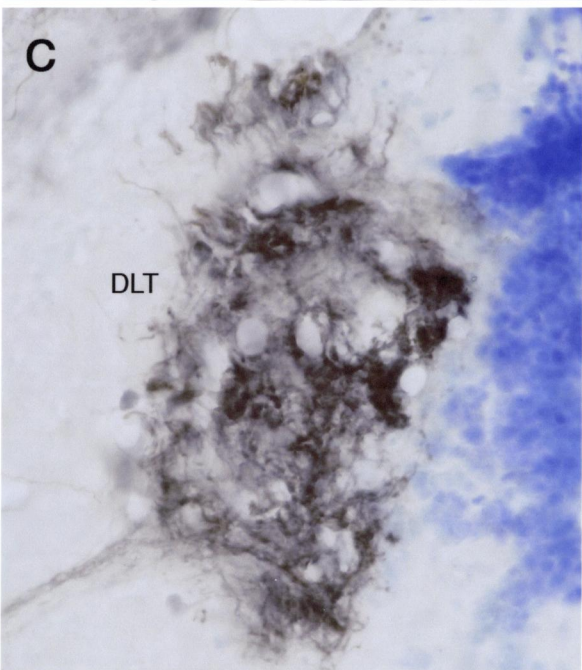
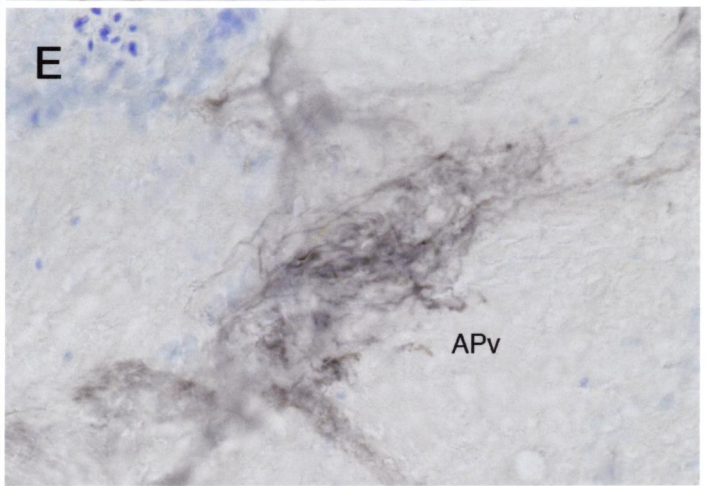
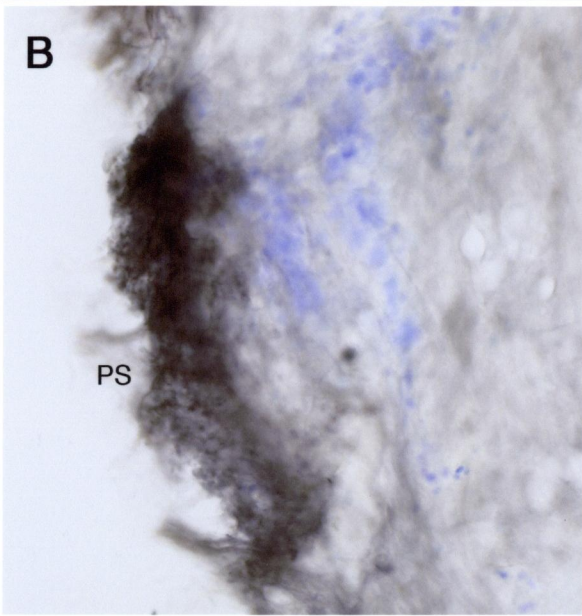
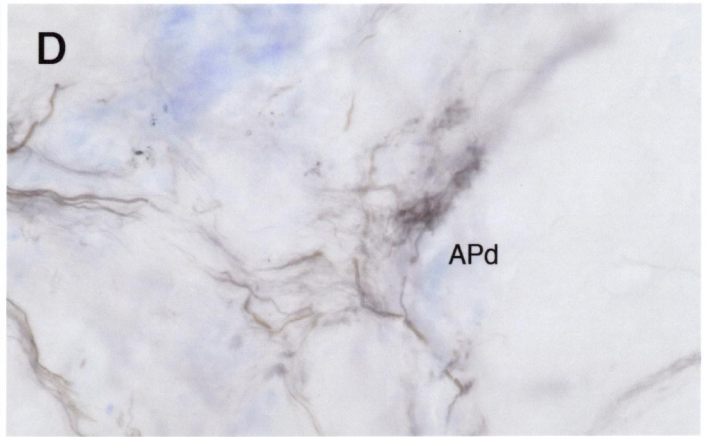
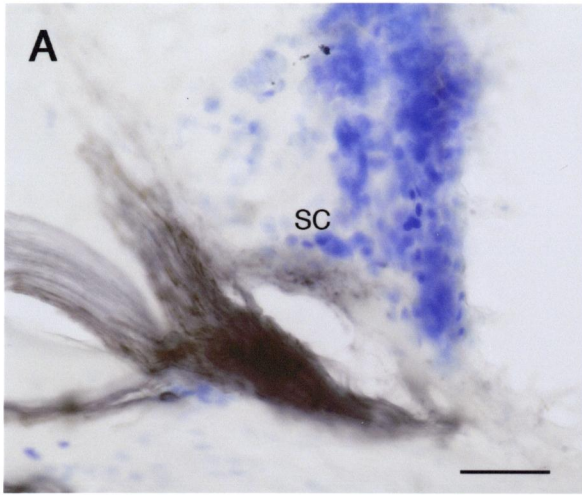


Fig. 2. Biocytin-labeled retinofugal fibers and their terminals in suprachiasmatic nucleus (**A**), nucleus pre-tectalis superficialis (**B**), nucleus dorsolateralis thalami (**C**), area pre-tectalis pars dorsalis (**D**), area pre-tectalis pars ventralis (**E**), nucleus of the posterior commissure (**F**), and accessory optic nucleus (**G**) in frontal sections. Sections were counterstained with cresyl violet (blue). Scale bar = 25 μ m.

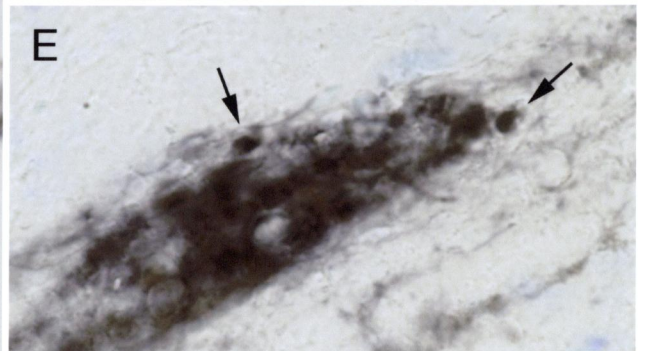
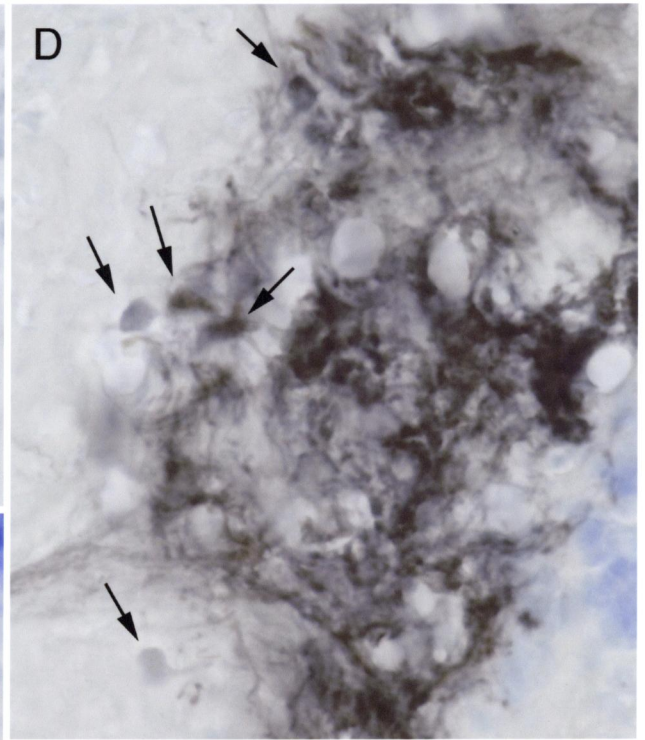
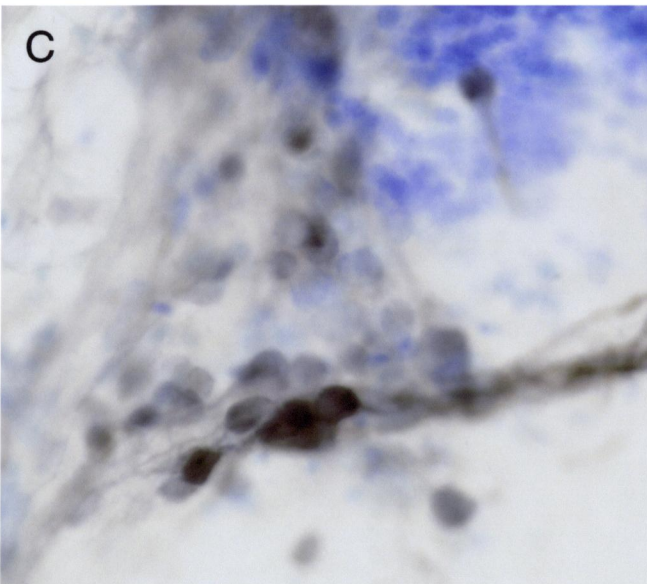
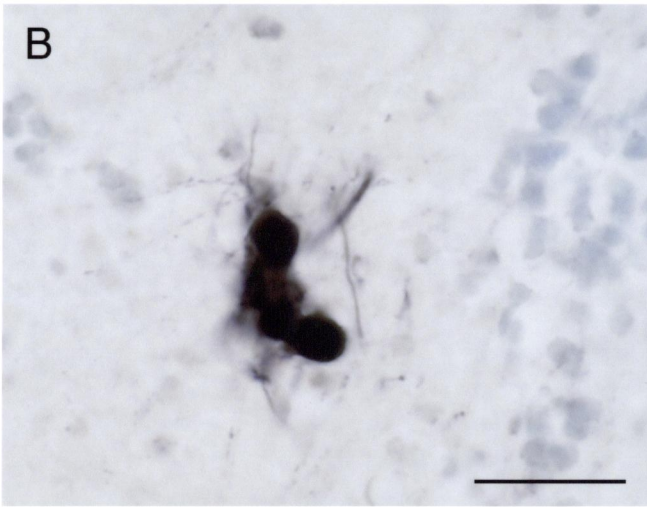
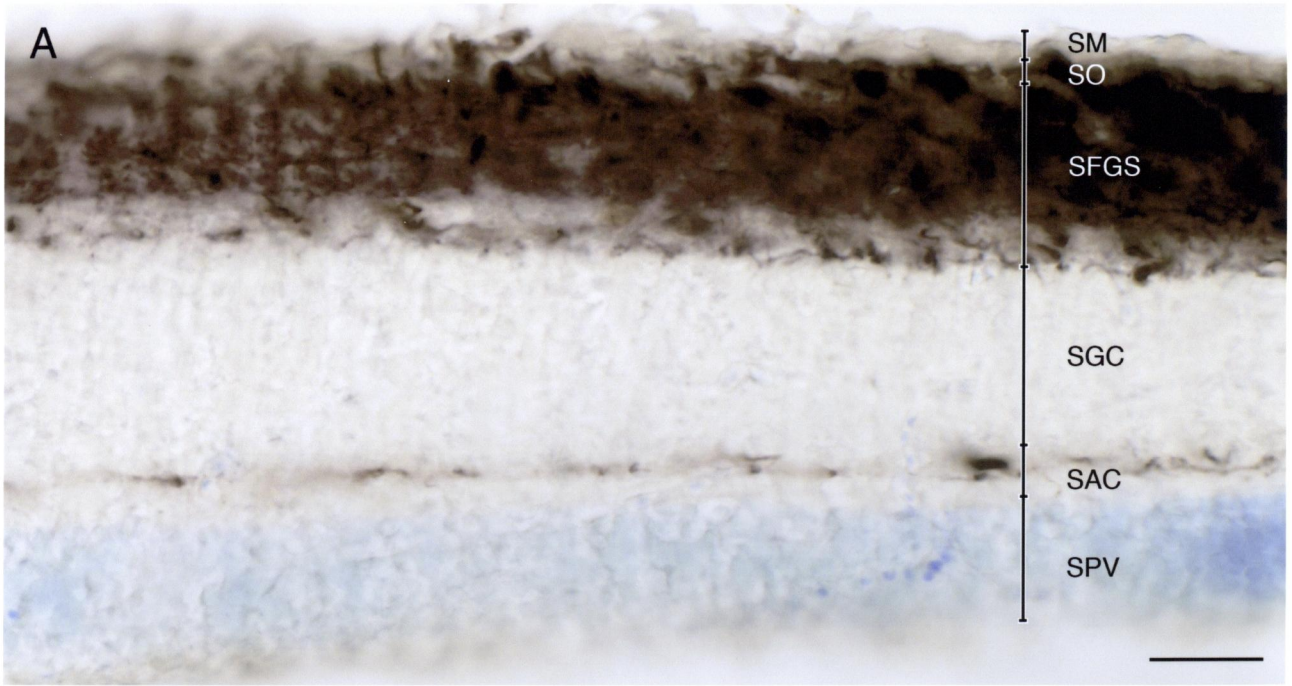


Fig. 3. Biocytin-labeled retinofugal fibers (**A**) and retinopetal neurons (**B-E**). (**A**) Frontal section showing retinofugal fibers and their terminals in the tectum opticum. Fibers are mainly observed in the stratum opticum and stratum fibrosum et griseum superficiale (SFGS). Labeled fibers are dense in superficial portions of SFGS and less dense in the deeper portions. Much fewer fibers and terminals are found in the stratum album centrale. Retinopetal neurons in the ganglion of the terminal nerve (**B**), preoptic retinopetal nucleus (**C**), nucleus dorsolateralis thalami (**D**) and nucleus of the posterior commissure (**E**). Arrows in (**D**)-(E) point to select retinopetal neurons. Scale bar = 25 μm .

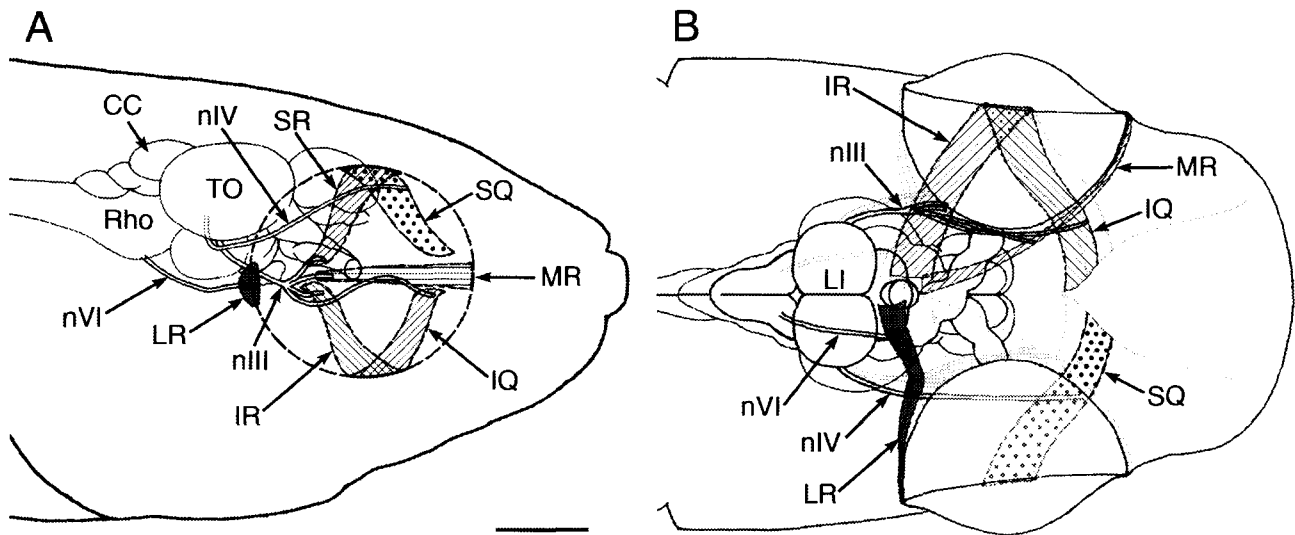


Fig 4. Schematic drawings indicating innervation patterns of extraocular muscles by oculomotor, trochlear and abducens nerves. (A) Right lateral view of the head of medaka. The circle drawn with a broken line indicates the right eyeball. (B) Ventral view of the medaka head, upper-half (right-half of the head) showing oculomotor nerve and muscles innervated by this nerve (inferior rectus muscle, inferior oblique muscle, medial rectus muscle, but superior rectus muscle not shown). The lower-half shows trochlear and abducens nerves, and superior oblique muscle and lateral rectus muscle innervated by the nerves, respectively. Scale bar = 1 μ m.

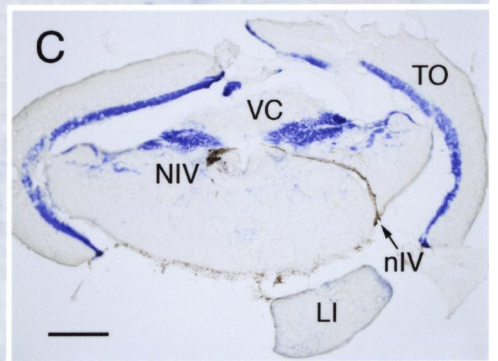
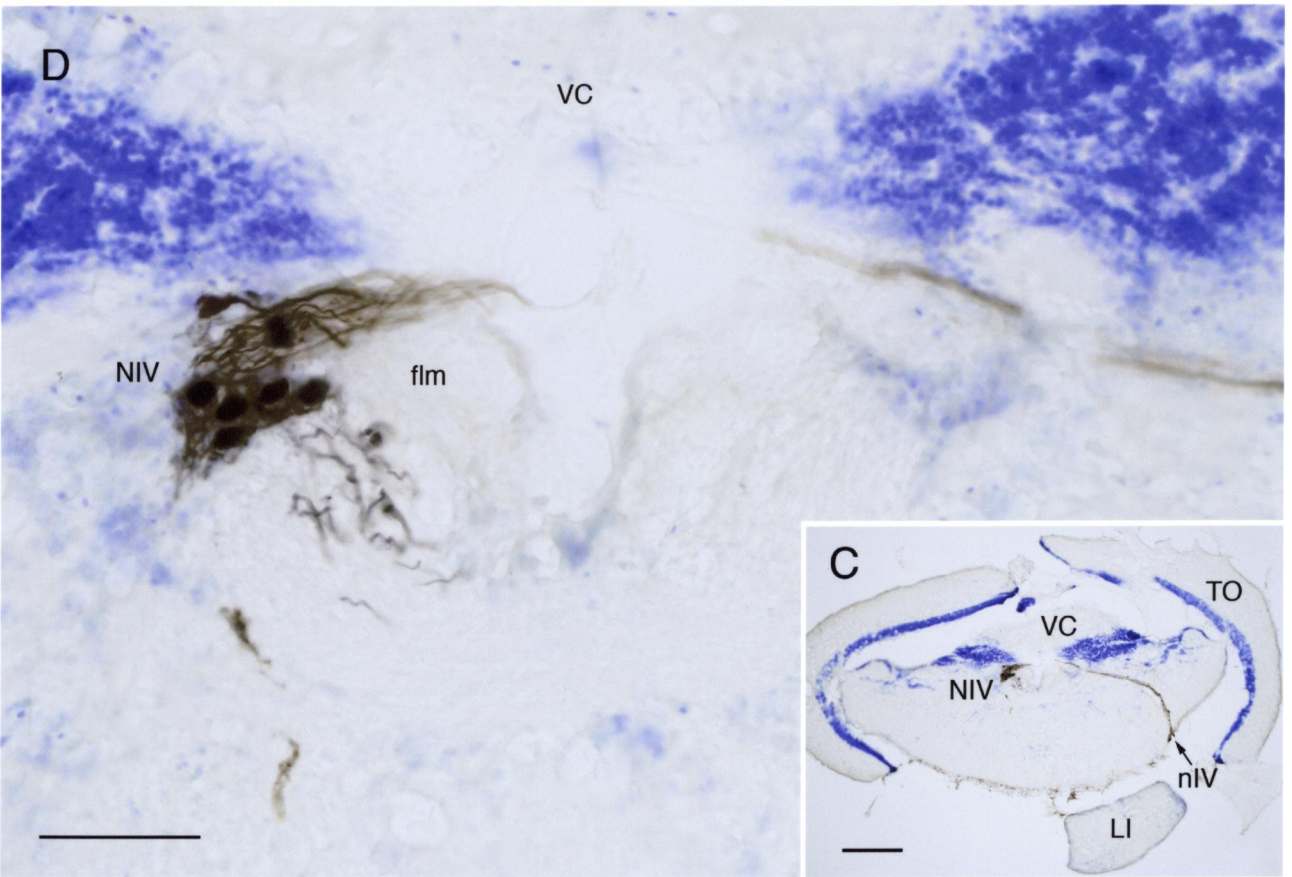
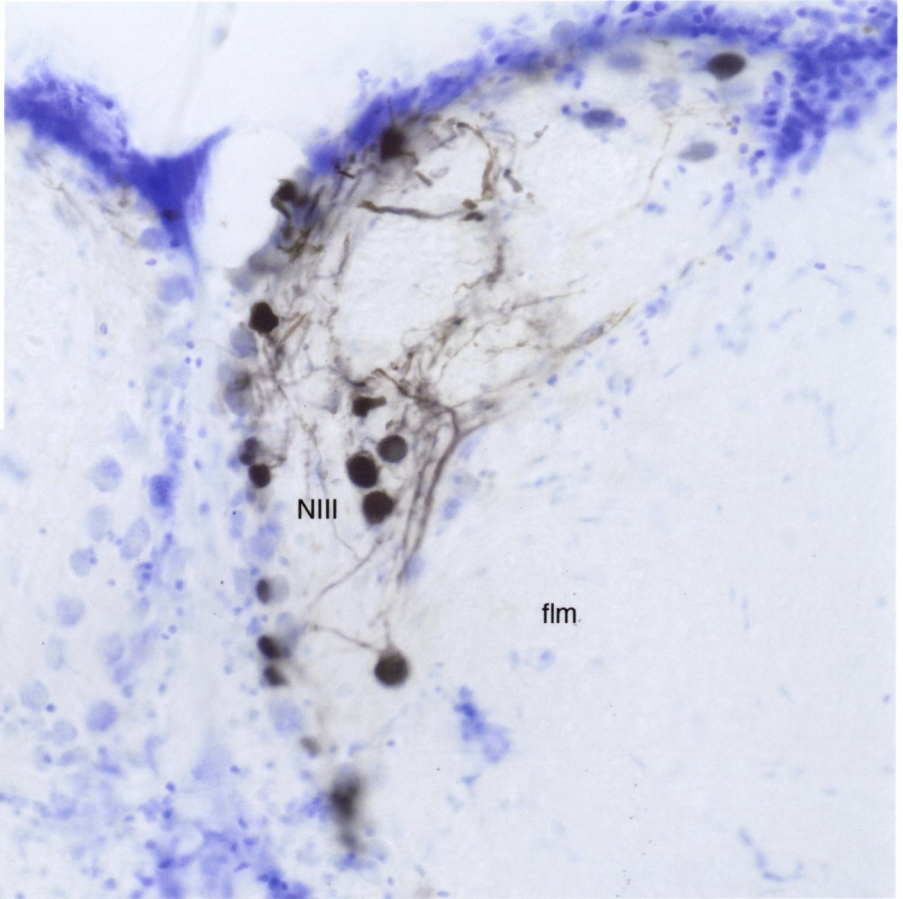
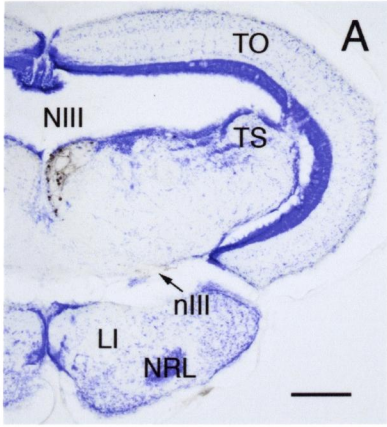


Fig. 5. (A) Frontal section at the level of oculomotor nucleus after unilateral injection of biocytin into the left oculomotor nerve. Scale bar = 200 μm . (B) Increased magnification of oculomotor neurons from (A). Scale bar = 50 μm . (C) Frontal section at the level of trochlear nucleus after unilateral injection of biocytin into left trochlear nerve. Scale bar = 200 μm . (D) Increased magnification of trochlear neurons from (C). Scale bar = 50 μm .

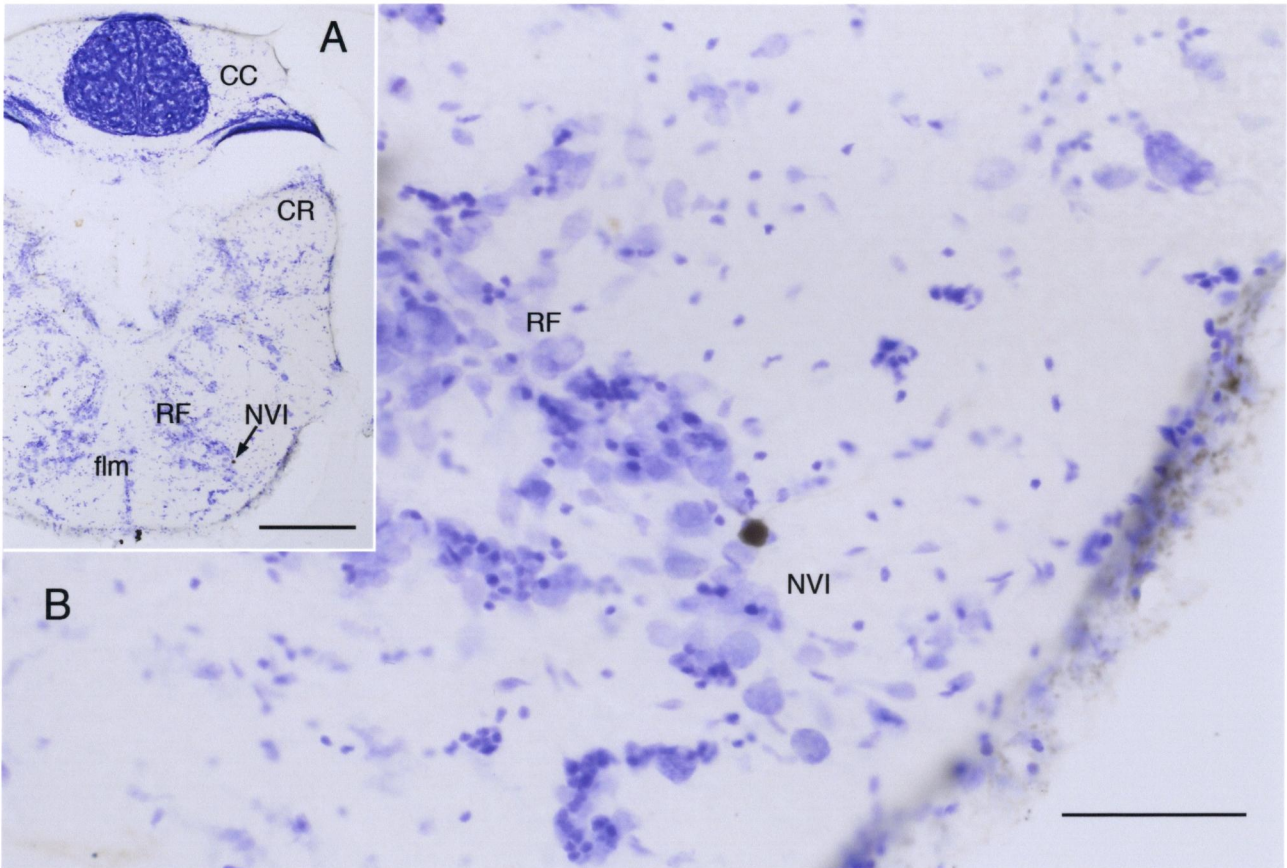


Fig. 6. (A) Frontal section at the level of abducens nucleus after unilateral injections of biocytin into left abducens nerve. Scale bar = 200 μm . (B) Increased magnification of abducens neurons from (A). Scale bar = 50 μm