

ニワトリ終脳におけるグリア細胞の分布および  
形態からみた領域化について

山口大学大学院連合獣医学研究科

内田 真輔

2010

## 目 次

総序	3
第 1 章 発生過程のグリア細胞の分布からみたニワトリ終脳の領域化について	
小序	7
材料および方法	8
結果	9
考察	11
小括	15
第 2 章 ニワトリ終脳の部位による上衣細胞の違いについて	
小序	17
材料および方法	17
結果	19
考察	20
小括	24
総括	25
謝辞	28
参考文献	29
付図および付図説明	38

## 総序

アストログリアは中枢神経系におけるグリア細胞であり、細胞外  $K^+$  の取り込み、神経伝達物質の再取り込みと再利用、シナプス活動に連動した血管からのグルコースの取り込み、セリンの合成、血管内皮細胞による血液脳関門のバリア機能発現、グリア限界膜の形成などさまざまな機能を有する [54]。発生段階では細胞骨格として中間径フィラメントである **vimentin** [17] を、成熟段階ではグリア線維性酸性タンパク (GFAP) を有する [10]。個体発生に伴って **vimentin** は減少し、哺乳類成体では海馬などの特殊な部位を除いて **vimentin** が消失するのに対し、他の脊椎動物では成体においても **vimentin** が消失しないことが知られている [23, 28, 29]。

放射状グリアは細胞増殖部位である脳室帯を構成する神経上皮細胞から分化し、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、グリア細胞などに分化する神経幹細胞として知られている [31, 33, 36, 39, 40]。脳の発生過程において、放射状グリアは神経細胞の移動に先立って脳室帯から脳表面に放射状突起を伸ばし、この突起に沿って神経芽細胞が移動する [38, 52]。神経芽細胞の移動が終わると放射状グリアは突起を縮めアストログリア、オリゴデンドログリア、上衣細胞に分化する [21, 49]。投射ニューロンは放射状グリアの突起に沿って放射状に移動するが、介在ニューロンは接線方向に移動することが哺乳類でよく知られているが [2, 32, 41, 53]、同様の現象は鳥類においても報告されている [9]。

上衣層は細胞増殖部位である脳室帯に由来し、脳室の周囲を覆っている。上衣層を構成する細胞は、様々な機能を有し、グリア細胞の一種、特に放射状グリア

に近いことからアストログリア系譜の細胞と考えられている [5, 16, 30, 51]。哺乳類や爬虫類では成体においても神経細胞新生が起こっている部位では、上衣層は上衣細胞、有尾上衣細胞と共に神経幹細胞を含む多様な細胞から構成されることが報告されている [4, 6, 11, 37]。また、様々な脊椎動物で、成体においても、これらの細胞は中間径フィラメントとして **vimentin** を含むことが報告されている [29, 48]。さらに、哺乳類成体では、海馬などの神経細胞新生が起こる部位では上衣細胞が **GFAP** を含んでいることが報告されている [13, 18] が、鳥類の上衣層に関する報告は少ない。

哺乳類の終脳は側脳室の腹側に位置する基底核およびそれを覆う外套から構成されている。外套、特に新皮質は知能に、一方の基底核は本能に関わるとされている。鳥類の知能は哺乳類より劣り、それは以下に示す構造の違いであると考えられていた。鳥類では、側脳室は終脳の表層に位置し、終脳の大部分は哺乳類の基底核と同じ神経核構造である。そのため、鳥類では外套は表層のごく一部を占めるに過ぎず、終脳の大部分は基底核と考えられていた。このような構造の違いから鳥類の終脳の名称の多くは語尾に「線条体」がつけられていた (図 1b) [3, 15, 26]。しかしながら、近年の神経科学的、伝達学的、機能的、発生学的研究によって、従来基底核と考えられてきた鳥類終脳の領域の多くは哺乳類の外套に相当すると考えられるようになってきた (図 1c) [25, 44, 46]。例えば、哺乳類では、ドーパミン作動性神経細胞の指標であるチロシン水酸化酵素 (**TH**) は、基底核の一部である線条体に限局して分布するが [24, 35]、鳥類でも **TH** の局在する領域が線条体であり、それは従来考えられてきた線条体より小さい領域であった [14]。

そのため、Avian Brain Nomenclature Forum では、鳥類終脳の領域の名称の多くを「～線条体」から「～外套」に変更する新説が提唱された [22, 47]。

この鳥類終脳の領域に関する新説は主に神経細胞の発生、分布および投射などの知見を根拠としている。しかしながら、上述したように、放射状グリアは神経細胞の発生や移動に深く関わっている。そのため、グリア細胞が鳥類終脳の領域分けに重要な役割を果たしているのではと仮説を立て、本研究ではまず、グリア細胞の発生、分化の点から終脳の領域を検証した。次に、哺乳類の終脳では、基底核、外套、および嗅球で上衣細胞の違いが報告されていることから、ニワトリにおいても部位による上衣細胞の違いが認められるのか、また上述した神経細胞から見た新説の領域分けと関連があるのかを調べるため、上衣細胞の分布、形態を組織学および免疫組織化学的に観察した。

外套という語は、哺乳類では発生期に用いられ、成体では灰白質（皮質）および白質と呼ばれるが、鳥類では成体でも外套と呼ばれる。そのため、本論文では、哺乳類においても外套という語を用いる。同様に基底核領域の名称は、哺乳類、鳥類ともに発生初期では外套下部、生後では基底核という語を用いる。また、基底核は、哺乳類同様、鳥類においても線条体、淡蒼球、扁桃などに分類されるが、本論文では特に言及しない限り、基底核としてまとめて扱う。

## 第 1 章

発生過程のグリア細胞の分布からみたニワトリ  
終脳の領域化について

## 小序

アストログリアは中枢神経系における多機能なグリア細胞であり、発生段階では細胞骨格として中間径フィラメントである **vimentin** [17] を、成熟段階では **GFAP** を有する [10]。さらにアストロサイトの細胞骨格は個体発生に伴い **vimentin** から **GFAP** に置き換わることが知られている [23, 28, 29]。

放射状グリアは、神経幹細胞として知られ [31, 33, 36, 39, 40]、脳の発生過程において、神経細胞の移動に先立って脳室帯から脳表面に放射状突起を伸ばし、この突起に沿って神経芽細胞が移動する [38, 52]。神経芽細胞の移動が終わると放射状グリアは突起を縮めアストログリア、オリゴデンドログリア、上皮細胞などに分化する [21, 49]。投射ニューロンは放射状グリアの突起に沿って放射状に移動するが、介在ニューロンは接線方向に移動することが哺乳類でよく知られているが [2, 32, 41, 53]、同様の現象は鳥類においても報告されている [9]。

従来、鳥類終脳は、構造的、機能的な概念から、知能に関わるとされる外套はごく一部に過ぎず、その大部分は本能に関わる基底核から構成されると考えられてきた (図 1b) [3, 15, 26]。しかしながら、近年の神経科学的、伝達学的、機能的、発生学的研究によって、従来基底核と考えられてきた鳥類終脳の領域の多くは哺乳類の外套に相当することが報告されはじめ (図 1c) [25, 44, 46]、**Avian Brain Nomenclature Forum** では、鳥類終脳の領域の概念および名称を変更する新説が提唱された [22, 47]。

この鳥類終脳の領域に関する新説は主に神経細胞の発生、分布および投射などの知見をもとに考えられている。しかしながら、上述したように、放射状グリア

は神経細胞の発生や移動に深く関わっている。そのため、グリア細胞が鳥類終脳の領域分けに重要な役割を果たしているのではと仮説を立て、グリア細胞の発生、分化の点から終脳の領域を検証した。

## 材料および方法

### 供試動物

ゲン・コンポレーション社より購入した白色レグホン種ニワトリの受精卵を 37.5°C、湿度 60% の条件下で孵卵させた。孵卵 4、5、6、8、10、12、14、16、18、20 日齢、孵化後 1、5、10、15、30、60 日齢の胚仔および若鶏を各 3 例用いた。実験は鳥取大学動物実験規則およびアジア獣医解剖学会の安楽死に関する規定に基づいて行った。

胚仔は断頭殺し、若鶏はジエチルエーテルで深麻酔後、4%パラホルムアルデヒド 0.1M リン酸緩衝溶液 (pH 7.6、4°C) を心臓から灌流した。終脳を採材後、同固定液で 4°C 一晩浸漬固定した。上昇アルコール系列で脱水、キシロールで透徹後、パラフィンに包埋し、ミクロトームで 10 $\mu$ m 厚横断および矢状断切片を作成した。横断切片の横断位置は図 1 a に示した。切片に vimentin、GFAP および TH に対する免疫組織化学およびクリューバー・バレラ染色を施した。

### 免疫組織化学

切片を 0.03% Triton-X 加 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS-T) で 10 分間 2 回洗浄したのち、非特異反応を防ぐため圧力鍋を用いて 1mM EDTA (pH

8) で 3 分間抗原賦活化を行った。PBS-T で洗浄後、1%正常ウサギ血清で室温 30 分間処理し、一次抗体で 4°C一晩処理した。一次抗体には抗 GFAP マウスモノクローナル抗体 (1:400、Sigma、St. Louis、MO、U.S.A.)、抗 vimentin マウスモノクローナル抗体 (VIM3B4、1:100、Progen、Heidelberg、Germany)、抗 TH マウスモノクローナル抗体 (1:100、Millipore、Billerica、MA、U.S.A.) を用いた。二次抗体として抗マウス IgG ウサギ血清 (1:100、Jackson Immunoresearch、West Grove、PA、U.S.A.) で室温 60 分処理した後、マウス peroxidase-anti-peroxidase complex (1:100、Jackson) で室温 90 分間処理し、0.006%過酸化水素加 3, 3'-diaminobenzidine で可視化した。カナダバルサムで封入後、光学顕微鏡で観察した。上記の抗原抗体反応はすべて湿箱内で行った。陰性コントロールとして一次抗体または二次抗体の代わりに PBS を用いた。論文で用いた終脳の領域の名称は Kuenzel and Masson [27] のアトラスを参考にした。

## 結果

### 孵卵 4 日齢

終脳は広い脳室（神経管）と増殖性の小型細胞が密集する脳室帯で構成され、脳壁は薄く、その厚さは背側領域と腹側領域でほとんど変化がなかった（図 2a、b、d）。vimentin 陽性細胞は脳室面に位置し放射状の突起を脳表面まで伸ばしていた（図 2c、e）。GFAP 陽性細胞および突起は認められなかった。

### 孵卵 5 日齢・孵卵 6 日齢

終脳の背正中部（蓋板）は発生が進むにつれ腹側方向に陥入し左右の半球を分ける中隔となり、これにより側脳室が形成された（図 3a）。背側領域では、脳壁は依然薄く（図 3b）、**vimentin** 陽性細胞は放射状突起を脳表面まで伸ばしていた（図 3c）。一方、腹側領域では、脳室帯の外側の脳壁が厚くなり（図 3d）、**vimentin** 陽性の放射状突起は脳室帯内で認められ、脳室帯外では細く分枝していた（図 3e）。

#### 孵卵 8 日齢 - 孵卵 10 日齢

背側領域では、脳室帯の外側の脳壁が厚くなったが（図 4a、b）、**vimentin** 陽性細胞は孵卵 5 日齢と同様、放射状突起を脳表面まで伸ばしていた（図 4c）。一方、腹側領域では、脳室帯外側の脳壁はさらに厚くなり、孵卵 5 日齢と異なり **vimentin** 陽性放射状突起は脳室帯の外から脳表面に向けて伸びていた（図 4e）。

#### 孵卵 12 日齢 - 孵卵 14 日齢

脳壁の増大によって側脳室は狭くなり、終脳のより内側に位置するようになった（図 5a、b）。発生初期に **vimentin** 陽性細胞や突起の形態に違いが認められた背側領域と腹側領域の境界部に外套－外套下部層（LPS）と呼ばれる無神経細胞層が認められ（図 5a、d）、この LPS 内には長い **vimentin** 陽性突起が認められた（図 5a、e）。さらに、孵卵 14 日齢において LPS の背側に上前頭層（LFS）、中外套層（LaM）と呼ばれる 2 つの無神経細胞層が認められるようになった。終脳全体では、**vimentin** 陽性突起は徐々に短縮したが、海馬、側脳室背側端、LFS、中外套の一部、LPS、および基底核では **vimentin** 陽性の長い突起が依然認められた（図 5b、e）。GFAP 陽性の突起が脳表面で認められ、TH 陽性の神経終末や線維が終脳腹側のごく一部で確認された（図 5c）。

### 孵卵 16 日齢・孵卵 20 日齢

多くの領域で vimentin 陽性突起はさらに減少したが、海馬、側脳室背側端、LFS、中外套の一部、LPS、および基底核では、依然認められた (図 6a、c、d)。また、TH 陽性神経終末や線維は LPS より腹側領域全体で認められるようになった (図 6b)。GFAP 陽性突起は脳表面を覆い (図 6e、図 7a-c)、また、GFAP 陽性細胞体が海馬や LFS、LPS および外套下部の淡蒼球で認められた (図 7d、e)。

### 孵化後 1 日齢・孵化後 60 日齢

孵化前に vimentin 陽性突起が認められた海馬、側脳室背側端、LFS、中外套の一部、LPS、および基底核では、孵化後においてもその陽性突起は消失しなかった (図 8a)。基底核の大部分や内外套で GFAP 陽性細胞が多数出現し (図 8b)、また海馬 (図 8d)、LFS (図 8e)、LPS (図 8f、g) および基底核の淡蒼球 (図 8h) の GFAP 陽性細胞は急増した。vimentin 陽性突起 (図 9b、d) や GFAP 陽性細胞 (図 9c、e) が LPS および LFS で認められ、LPS や LFS の vimentin 陽性突起は側脳室から嗅球に向かっていった (図 9a、b、d)。

## 考察

従来鳥類の終脳はそのほとんどが基底核であり、外套は表層のごく一部と考えられてきたが、近年における神経細胞の投射、分布の知見から鳥類終脳の新しい領域化の概念が提唱されるようになってきた (図 1) [22, 25, 44, 46, 47]。著者はグリア細胞やその突起が神経細胞と同様に終脳の領域分けに重要な役割を果たしていると推測し、グリア細胞のマーカーである vimentin や GFAP を用いてそ

の分布を調べた。発生学的研究で、外套や外套下部に由来する投射ニューロンは、放射状グリアの突起に沿って放射状に移動するが、一方で、外套下部由来の介在ニューロンは放射状グリアの突起を利用せず接線方向に移動する [2, 9, 32, 41, 53]。本研究では、初期の発生段階において、**vimentin** 陽性細胞の突起や脳室帯の厚さが終脳の背側領域と腹側領域で異なっていた。背側領域では、**vimentin** 陽性細胞は常に放射状の突起を側脳室から脳表面まで伸ばしていたが、これは投射ニューロンが放射状に移動することに関わっていると考えられる。対して、腹側領域では、**vimentin** 陽性細胞の突起は脳室帯の外では網状であった。それゆえ、鳥類終脳の背側領域と腹側領域では、神経細胞の移動方向あるいは移動時期が異なることが考えられる。

さらに発生が進むと、孵卵 12 日齢以降に **LPS** と呼ばれる無神経細胞層が認められた。この層は **vimentin** 陽性の長い突起で構成されており、発生初期で認められた背側領域と腹側領域の境界部に形成された。この境界はさらに発生が進んだ日齢での **TH** 陽性領域の境界に相当していた。**TH** 陽性領域は孵卵 12 日齢では **LPS** より腹側の小さい領域であったが、孵卵 16 日齢以降ではその背側が **LPS** にほぼ一致していた。**TH** 陽性領域は哺乳類において、基底核に限局して認められることが知られている。鳥類においても同様の分布を示すことから、新説では **TH** 陽性領域が基底核を示すとされる [22,47]。このことから、今回観察された **LPS** はグリア細胞からみた外套と外套下部の境界であると推測できる。したがって、神経細胞に主眼をおいた新説での外套と基底核の境界は発生段階のグリア細胞の分布からみても境界であること、さらにグリア細胞からみた境界は神経細胞

の境界より早い時期に出現するが示された。

外套において、孵卵 14 日齢に LPS 以外の無神経細胞層である LFS と LaM が確認された。孵化後 60 日齢においても **vimentin** 陽性の長い突起は LFS およびその腹側の中外套の一部で認められた。新線条体（新名称でいう巢外套）および腹側高線条体（新名称でいう中外套）は発生学的に同一の由来であることが報告されている [23, 45]。今回の実験において胚仔後期から孵化後にかけて、**vimentin** 陽性の長い突起は、巢外套と中外套の境界である LaM ではほとんど認められなかった。しかしながら、胚仔後期から孵化後にかけて、**vimentin** 陽性の長い突起が中外套で多く認められ巢外套ではあまり認められなかったこと、さらに孵化後の若鶏で、中外套の **vimentin** 陽性突起に沿って多くの GFAP 陽性細胞が存在したが、巢外套では一次視覚野の内外套を除いて GFAP 陽性細胞がほとんど認められなかったことから、グリアの分布から見ると巢外套と中外套は異なる領域であるということが考えられる。同様に高外套と呼ばれる LFS の背側領域と中外套（LFS の腹側領域）でもグリア細胞の異なる分布が確認された。さらに側脳室の背側端の内側（海馬）および外側の領域（高外套）でも違いが認められた。**vimentin** 陽性突起や GFAP 陽性細胞は海馬では多く認められたが、高外套ではほとんど認められなかった。哺乳類の外套（発生中の皮質）は 4 つの小区域で構成され、それぞれ背側外套、内側外套、外側外套および腹側外套と呼ばれる [8]。鳥類でも同様であり、背側外套は高外套に、内側外套は海馬に、外側外套は中外套に、腹側外套は巢外套になることが報告されている [34]。今回の研究で外套内に認められた **vimentin** 陽性突起および GFAP 陽性細胞の分布の違いは

これら 4 つの領域の違いに相当すると考えられる。このことは鳥類の外套は哺乳類の外套と同様の区域分けであることを示している。

脳室帯やグリア細胞の放射状の突起の分布の明らかな違いから、LPS の背側領域と腹側領域は異なる領域であり、それらはそれぞれ哺乳類の外套および基底核に相当することが示された。さらに胚仔後期や孵化後のグリアの分布から外套も 4 つの領域（単外套、中外套、高外套および海馬）に区別された。これらの結果は神経細胞の分布と同様にグリアの分布によっても鳥類の終脳が領域化されることを示唆している。

## 小括

従来、鳥類終脳の大部分は外套下部（基底核）で、外套（皮質）は表層のごく一部にすぎないと考えられてきた。しかしながら、近年の研究によって、鳥類終脳の大部分は、哺乳類の皮質に相当する外套であるという報告がされるようになった。この新説は、神経細胞に主眼が置かれていて、神経発生などに重要な役割を担うグリア細胞についてあまり言及されていない。本研究では、免疫組織化学的手法を用い、発生中および孵化後のニワトリ終脳におけるグリア細胞の分布を検索し、グリア細胞によるニワトリ終脳の領域化を検討した。その結果、発生初期では、**vimentin** 陽性細胞の分布および突起の形態から、終脳の背側と腹側で違いが認められた。発生が進むと、外套-外套下部層と呼ばれる無神経細胞層に存在する **vimentin** 陽性の長い突起によって外套と基底核が区別された。これは神経細胞からみた鳥類終脳の領域化の新説を支持するだけでなく、神経細胞の発達より早期にグリア細胞によって終脳が外套と基底核に区別されることを示すものだった。さらに発生が進み孵化後になると、**vimentin** およびグリア線維性酸性タンパクの分布によって、外套は4つの領域に区分されることが考えられた。

## 第 2 章

### ニワトリ終脳の部位による上衣細胞の違い について

## 小序

上衣層は脳室帯に由来し、それを構成する細胞は、様々な機能を有し、グリア細胞の一種、特に放射状グリアに近いことからアストログリア系譜の細胞と考えられている [5, 16, 30, 51]。脊椎動物成体の神経細胞新生が起こっている部位では、この上衣層は上衣細胞、有尾上衣細胞に加えて神経幹細胞を含む多様な細胞から構成される [4, 6, 11, 37]。様々な脊椎動物では、これらの細胞は中間径フィラメントとして **vimentin** を含むことが報告されている [29, 48]。また、哺乳類成体では、海馬などの神経細胞新生が起こる部位では上衣細胞の一部が **GFAP** を発現していることが報告されている [13, 18]。

哺乳類の終脳では、基底核、外套、および嗅球で上衣細胞の違いが報告されていることから、ニワトリにおいても部位による上衣細胞の違いが認められるのか、また、総序および第 1 章で述べた神経細胞から見た新説の領域分けと関連があるのかを調べるため、上衣細胞の分布、形態を組織学および免疫組織化学的に観察した。

## 材料および方法

### 供試動物

ゲン・コンポレーション社より購入した白色レグホン種ニワトリの受精卵を 37.5°C、湿度 60% の条件下で孵卵させたのち、孵化後 30 日齢の若鶏を 3 例用いた。実験は鳥取大学動物実験規則およびアジア獣医解剖学会の安楽死に関する規定に基づいて行った。

ジエチルエーテルで深麻酔後、4%パラホルムアルデヒド 0.1M リン酸緩衝溶液 (pH 7.6、4°C) を心灌流した。終脳を採材後、同固定液で 4°C一晩浸漬固定した。上昇アルコール系列で脱水、キシロールで透徹後、パラフィンに包埋し、ミクロトームで 10 $\mu$ m 厚横断および矢状断切片を作成した。横断切片の横断位置は図 1 a に示した。切片に vimentin および GFAP に対する免疫組織化学およびニッスル染色を施した。

### 免疫組織化学

切片を 0.03%Triton-X 加 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS-T) で 10 分間 2 回洗浄したのち、非特異反応を防ぐため圧力鍋を用いて 1mM EDTA (pH 8) で 3 分間抗原賦活化を行った。PBS-T で洗浄後、1%正常ウサギ血清で室温 30 分間処理し、一次抗体で 4°C一晩処理した。一次抗体には抗 GFAP マウスモノクローナル抗体 (1:400、Sigma、St. Louis、MO、U.S.A.)、抗 vimentin マウスモノクローナル抗体 (VIM3B4、1:100、Progen、Heidelberg、Germany)、二次抗体として抗マウス IgG ウサギ血清 (1:100、Jackson Immunoresearch、West Grove、PA、U.S.A.) で室温 60 分処理した後、マウス peroxidase-anti-peroxidase complex (1:100、Jackson Immunoresearch) で室温 90 分間処理し、0.006%過酸化水素加 3, 3'-diaminobenzidine で可視化した。カナダバルサムで封入後、光学顕微鏡で観察した。また蛍光二重染色として、一次抗体に抗 GFAP ウサギ血清 (希釈済み、Nichirei、Tokyo、Japan) および抗 vimentin マウスモノクローナル抗体 (VIM3B4、1:100、Progen) を二次抗体として、ローダミン標識抗ウサ

ギ IgG ロバ血清 (1:100、Chemicon、Me、U.S.A.) および FITC 標識抗マウス IgG ロバ血清 (1:100、Chemicon) を用い、蛍光顕微鏡で観察した。上記の抗原抗体反応はすべて湿箱内で行った。陰性コントロールとして一次抗体または二次抗体の代わりに PBS を用いた。終脳の領域の名称は Kuenzel and Masson [27] のアトラスを参考にした。

## 結果

側脳室周囲全周にわたって上衣層を構成する細胞はニッスル染色陽性であった。上衣層を構成する上衣細胞の形態や免疫組織化学染色性に部位による違いが認められた。側脳室より内側では、2 パターンの上衣層が確認されたが、側脳室の外側では、4 パターンの上衣層が認められた (図 10)。

また、複数の短い突起を有する GFAP 単独陽性細胞は上衣層に接する脳実質に存在していた。

### 側脳室より内側部 (正中付近) の上衣層

海馬を含む背側領域では、上衣は一層の小型錐体細胞や扁平細胞で構成されていた (図 11a-1)。これらの細胞は一本の長い突起を有し、vimentin および GFAP をともに含んでいた (図 11a-2、a-3、図 12a-1、a-2)。

中隔野と呼ばれる腹側領域では、上衣は 3、4 層の低い立方細胞からなる重層上皮であった。これらの細胞の多くは vimentin および GFAP をともにもたず、vimentin・GFAP 共陽性細胞は上衣層の外に認められた。

### 側脳室より外側部の上衣層

側脳室の背側端や LFS の基部周辺では、上衣層は単層円柱もしくは重層立方上皮で構成されていた (図 11a-1)。上衣細胞の多くは、その細胞体に vimentin を含み、vimentin 陽性の突起を終脳実質に伸ばしていた。いくつかの vimentin 陽性細胞は GFAP も含んでいた (図 11a-2、a-3、図 12a-1、a-2)。

高外套、中外套および巢外套では、上衣層は単層立方上皮で構成されていた (図 11b-1)。ほとんどすべての細胞は vimentin のみを含んでいて、vimentin・GFAP 共陽性細胞はごく少数であった (図 11b-2、b-3、図 12b-1、b-2)。

LPS の基部周辺では、上衣層は厚い重層立方上皮で構成され (図 11c-1)、それらの多くは vimentin・GFAP 共陽性細胞であり、vimentin 陽性もしくは vimentin・GFAP 共陽性の突起を上衣層外の LPS に沿って伸ばしていた (図 11c-2、c-3、図 12c-1、c-2)。

基底核では、上衣層はさらに厚い重層立方上皮で構成されていたが (図 11d-1)、それらは vimentin 陽性細胞で構成され、vimentin・GFAP 共陽性細胞はごく少数であった。vimentin 陽性細胞は上衣層の外側でも認められ、それらは脳表面に放射状の長い突起を伸ばしていた (図 11d-2、d-3、図 12d-1、d-2)。

矢状断切片の観察では、LPS と LFS に側脳室から嗅球に向かう vimentin 陽性細胞の突起や GFAP 陽性細胞体の集塊が認められた。側脳室外側および吻側の上衣層の違いを図 13 にまとめた。

## 考察

中枢神経系の部位によって上衣細胞の形態的、系統発生的な違いが存在するこ

とが報告されている。ニワトリやハトの脊髄では上衣細胞は **vimentin** および **GFAP** を含まないが [7]、ニワトリ視蓋の上衣細胞の一部は **GFAP** を含むことが報告されている [50]。哺乳類の成体では、上衣層の構成は領域によって異なり、皮質、基底核および嗅球では上衣層の違いが示されている [48]。それゆえ、成体のニワトリにおいても上衣層の違いが終脳の領域の違いを反映していることが推測され、本研究では終脳の上衣層の構成を詳細に観察するとともに、上衣細胞の形態および細胞骨格の違いを検索した。その結果、上衣層の厚さや **vimentin** および **GFAP** の免疫組織化学染色性の違いによって側脳室より内側領域では 2 パターンの、外側領域では 4 パターンの上衣層が確認された。

成体の哺乳類の外套において、上衣層を構成する上衣細胞は単層で **GFAP** を含まず **vimentin** を含むとされている [48]。今回のニワトリの実験では、高外套、中外套および巢外套（**LFS** 基部周辺、**LPS** 基部周辺および基底核以外の外套領域）の上衣層は単層立方上皮で上衣細胞はそのほとんどが **vimentin** 陽性で **GFAP** 陰性であった。これらの上衣層は哺乳類で報告されるものと類似した細胞構成をすることが考えられる。上衣細胞の形態、分布から見ると、ニワトリの高外套、中外套、巢外套は哺乳類の外套と同様の領域であることが示された。

哺乳類の基底核では、上衣層は単層だが、上衣細胞は **vimentin** 陽性で長い突起を有し、上衣層に接して上衣下層が存在する [48]。今回のニワトリ終脳の観察では、**LPS** より腹側領域の上衣層は厚く、長い突起を持つ **vimentin** 陽性細胞で構成され、ほとんどの細胞は **GFAP** 陰性であった。ニワトリ終脳腹側領域の上衣細胞は多くが **vimentin** 陽性細胞から構成されること、それらの細胞が長い突起

を有するという点で哺乳類の基底核の上衣細胞と共通の特徴を有していた。一方で、哺乳類の基底核の上衣層は単層であり、ニワトリ終脳腹側領域の上衣層は厚い **vimentin** 陽性細胞層で構成される点で異なっていた。哺乳類の基底核では、上衣層の外側に厚い上衣下層が存在し、発生後期以降、上衣層に代わって神経細胞およびグリア細胞の新生の場となっている。この基底核の上衣下層は線条体と吻側部で特徴が異なり、基底核吻側部では上衣下層の細胞は **vimentin** 陽性である。上衣下層は哺乳類以外の脊椎動物では認められない [19, 33] が、今回のニワトリにおいて、上衣層の外側に **vimentin** 陽性細胞層が認められたことから、哺乳類の基底核吻側部の上衣下層と今回のニワトリの厚い上衣層および上衣層外側の **vimentin** 陽性細胞層は共通の特徴を持つ。今回のニワトリの厚い上衣層および上衣層外側の **vimentin** 陽性細胞層は哺乳類の基底核吻側部の上衣下層に相当するのかもしれない。

LFS 基部周辺や LPS 基部周辺では、他の領域でほとんど認められなかった **vimentin**・GFAP 共陽性細胞が局在していた。第 1 章で、胚仔から若鶏にかけて、LFS および LPS は **vimentin** 陽性の長い突起で構成されること、さらに、これらの長い突起は側脳室から嗅球に向かい、グリア細胞からみた終脳の領域分けの境界であることを示した。哺乳類成体では、吻側移動路 (RMS) と呼ばれる経路が側脳室から嗅球にかけて伸びるが、この RMS の基部は基底核と白質の境界になっている [12, 13]。ニワトリ終脳において、側脳室から嗅球に向けて LPS と LFS の 2 経路が認められた。しかしながら、LFS の背側および腹側では上衣層の厚さにあまり変化が認められなかったのに対し、LPS の背側および腹側では上衣層の

厚さが異なっていた。哺乳類の基底核と白質では、上衣層の厚さに違いが認められない。しかしながら、基底核には上衣下層が存在し、上衣下層まで含めると、基底核と白質つまり外套で厚さが異なる。このことから考えると、ニワトリの LPS は LFS より哺乳類の RMS に近いのかもしれない。上衣層から見ても LPS は基底核と外套の境界であることが考えられる。

哺乳類成体では、GFAP は成熟したアストログリア [27] だけでなく神経幹細胞に含まれることが報告されている [13, 18]。今回のニワトリ上衣層で認められた vimentin・GFAP 共陽性細胞は形態から見ても上衣層の外側で見られた GFAP 陽性細胞と明らかに異なっていた。鳥類成体の脳では神経細胞新生は終脳に限られるという報告がある [20, 43]。さらに、今回 vimentin・GFAP 共陽性細胞が認められた部位は、海馬や LPS などの以前報告された成体においても神経細胞新生が起こる部位 [1, 42] に相当していた。これらのことから、vimentin・GFAP 共陽性細胞は神経幹細胞を含んでいるのかもしれない。しかしながら、それを確かめるには nestin など神経幹細胞に特異的な因子を調べる必要がある。

以上のことから、上衣細胞の中間径フィラメントの免疫組織学的な構成によってニワトリ終脳の領域化が認められ、この領域化は神経細胞からみた新説の終脳の領域化 [22, 47] を支持する。

## 小括

脳室帯に由来する上衣層を構成する細胞は、中枢神経系の部位によって大きく異なる。さらに哺乳類の脳では、上衣層は皮質と基底核で異なることが知られている。一方、鳥類の終脳では、上衣層の細胞構成を明らかにした研究は少ない。本研究では、免疫組織化学的手法によってニワトリ終脳の部位による上衣層の違いを検索した。その結果、側脳室の外側では、4種類の上衣層が分類された。上衣層は、外套-外套下部層（LPS）の基部周辺では、重層で主に **vimentin**・グリア線維性酸性タンパク（GFAP）共陽性細胞から構成され、上前頭層の基部周辺では、単層から重層で多くが **vimentin** 陽性細胞で **vimentin**・GFAP 共陽性細胞は少数だった。上記以外の外套では、上衣層は単層で、ほとんどが **vimentin** 陽性細胞で構成されていた。基底核では、上衣層は重層の **vimentin** 陽性細胞から構成され、**vimentin**・GFAP 共陽性細胞は稀だった。さらに基底核では上衣層の外側でも数層の **vimentin** 陽性細胞層が認められた。これらの上衣層の違いによって外套と基底核は LPS を境に違う領域であることが考えられ、これは近年報告された鳥類終脳の領域分けの新しい概念を支持するものである。

## 総括

アストログリアは中枢神経系における多機能なグリア細胞であり、発生段階では細胞骨格として中間径フィラメントである **vimentin** を、成熟段階ではグリア線維性酸性タンパク (**GFAP**) を有し、発生に伴って細胞骨格は **vimentin** から **GFAP** に代わることが知られている。哺乳類成体では、特殊な部位を除き **vimentin** は消失するが、鳥類では完全に消失しないことが知られている。脳室周囲を構成する上衣細胞はアストログリア系の細胞と考えられているが、脳の他の部位と異なり哺乳類成体でも上衣細胞は **vimentin** を有することが報告されている。脳の発生過程で、放射状グリアは脳室帯から脳表面に放射状突起を伸ばし、この突起に沿って神経芽細胞が移動する。神経芽細胞の移動が終わると放射状グリアは突起を縮めアストログリアや上衣細胞に分化する。

哺乳類の終脳は基底核およびそれを覆う外套から構成され、外套、特に新皮質は知能に、基底核は本能に関わるとされている。鳥類の知能は哺乳類より劣るとされ、鳥類終脳の外套は表層の一部であり、終脳の大部分は基底核であるという終脳領域の違いに反映されていると考えられてきた。しかしながら、近年の様々な研究によって、鳥類終脳の従来基底核と考えられてきた領域の多くは、哺乳類の外套に相当することが報告され、領域の名称の変更が提唱された。この鳥類終脳の領域に関する新説は主に神経細胞の発生、分布および投射などの知見をもとにされているが、上述したように、放射状グリアは神経細胞の発生や移動に深く関わっている。そのため、グリア細胞が鳥類終脳の領域分けに重要な役割を果たしていることが推察され、第 1 章では、発生過程におけるグリア細胞の細胞体や

突起の分布を明らかにし、終脳の領域化を検証した。また、脳室帯に由来する上衣層を構成する細胞は、中枢神経系の部位によって大きく異なり、哺乳類脳では、上衣層は皮質と基底核で異なることが知られている。一方、鳥類終脳では、上衣層の細胞構成を明らかにした研究は少ない。そこで、ニワトリにおいても部位による上衣層の違いが認められるのか、また上述した神経細胞から見た新説の領域分けと関連があるのかを調べるため、第2章では、上衣細胞の分布および形態を組織学的および免疫組織化学的に観察した。

第1章では、孵卵4日・20日齢および孵化後1日・60日齢の、第2章では、孵化後30日齢の白色レグホン種ニワトリを用いた。定法にしたがって10 $\mu$ m厚横断および矢状断パラフィン切片を作成し、クリューバー・バレラ染色およびvimentin、GFAP、チロシン水酸化酵素（TH）に対する免疫染色を施した。第2章では、さらにvimentin・GFAPに対する二重蛍光免疫染色を施した。

発生過程における観察では、発生初期から、vimentin陽性細胞および突起の分布と形態により、終脳の背側と腹側で違いが認められた。発生の進行に伴って、外套-外套下部層（LPS）と呼ばれる無神経細胞層に存在するvimentin陽性の長い突起によって外套と外套下部（基底核）が区別された。その後TH陽性細胞が外套下部に出現した。これは神経細胞からみた鳥類終脳の領域化の新説を支持するだけでなく、神経細胞の発達より早期にグリア細胞によって終脳が外套と基底核に区別されることを示唆するものであった。さらに孵化後では、vimentin陽性突起およびGFAP陽性細胞の分布によって、外套は4つの領域に区分されることが示された。

上衣層の検索において、側脳室内側で 2 種類の、外側で 4 種類の上衣層が区別された。側脳室内側の背側部（海馬）から側脳室背側端にかけて、上衣層は単層でほとんどが **vimentin・GFAP** 共陽性細胞から構成されていた。側脳室外側で、上衣層は、LPS の基部周辺では、重層で主に **vimentin・GFAP** 共陽性細胞から構成され、上前頭層（LFS）の基部周辺では、単層から重層で多くが **vimentin** 陽性細胞で **vimentin・GFAP** 共陽性細胞は少数だった。上記以外の外套では、上衣層は単層で、ほとんどが **vimentin** 陽性細胞で構成されていた。基底核では、上衣層は重層の **vimentin** 陽性細胞から構成され、**vimentin・GFAP** 共陽性細胞は稀だった。さらに基底核では上衣層の外側でも数層の **vimentin** 陽性細胞層が認められた。LFS や側脳室背側端、LPS は第 1 章においても終脳の区分の境界として認められたが、報告されている哺乳類の上衣層と比較した結果、LPS が外套と基底核の境界であることが考えられる。

ニワトリ終脳は神経細胞からみた新説と同様、グリア細胞の分布、形態や上衣層の組織学的、免疫組織化学的な特徴から、LPS を境に基底核と外套に分けられることが示唆された。一方、外套領域もグリア細胞や上衣層から、側脳室背側端で海馬と他の外套は異なる領域であると考えられた。グリア細胞の発生、分布では複数の領域と考えられた外套は上衣層の構成ではあまり違いが認められなかったが、LFS の上衣層が他の外套と異なることを考えると LFS も側脳室背側端同様に外套の中の境界である可能性がある。

## 謝辞

稿を終えるに臨み、終始、御懇篤なる御指導を賜りました 鳥取大学農学部・  
獣医画像診断学教室 今川智敬 教授、山口大学農学部・獣医解剖学教室 木曾  
康郎 教授、鳥取大学農学部・獣医生化学教室 浅野淳 准教授に深甚なる謝意  
を表します。

また、貴重なる御助言を頂きました 鳥取大学農学部・獣医解剖学教室 上原  
正人 教授、同・獣医病理学教室 島田章則 教授、同・獣医解剖学教室 保坂  
善真 准教授に心より深謝致します。

## 参考文献

1. Alvarez-Buylla, A., Theelen, M. and Nottebohm, F. 1990. Proliferation 'hot spots' in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5: 101-109.
2. Anderson, S. A., Eisenstat, D. D., Shi, L. and Rubenstein, J. L. R. 1997. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science* 278: 474-476.
3. Ariëns-Kappers, C. U., Huber, G. C. and Corsby, E. 1936. The comparative anatomy of nervous system of vertebrates, including man. Hafner, New York.
4. Balercia, G., Bentivoglio, M. and Kruger, L. 1992. Fine structural organization of the ependymal region of the paraventricular nucleus of the rat thalamus and its relation with projection neurons. *J. Neurocytol.* 21: 105-119.
5. Benjelloun-Touimi, S., Jacque, C. M., Derer, P., De, Vitry, F., Maunory, R. and Dupouey, P. 1985. Evidence that mouse astrocytes may be derived from the radial glia. An immunohistochemical study of the cerebellum in the normal and reeler mouse. *J. Neuroimmunol.* 9: 87-97.
6. Bjugn, R., Boe, R. and Haugland, H. K. 1988. A stereological study of the ependyma of the mouse spinal cord. With a comparative note on the choroid plexus ependyma. *J. Anat.* 166: 171-178.

7. Bodega, G., Suárez, I., Rubio, M. and Fernández, B. 1994. Ependyma: phylogenetic evolution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin expression in vertebrate spinal cord. *Histochemistry* 102: 113-122.
8. Butler, A. B. 1993. The evolution of dorsal pallium in the telencephalon of amniotis: cladistic analysis and new hypothesis. *Brain Res. Rev.* 19: 66-101.
9. Cobos, I., Puelles, L. and Martinez, S. 2001. The avian telencephalic subpallium originates inhibitory neurons that invade tangentially the pallium (dorsal ventricular ridge and cortical areas). *Dev. Biol.* 239: 30-45.
10. Dahl, D. and Bignami, A. 1985. Intermediate filament in nervous tissue. pp. 75-96. *In: Cell and Muscle Motility.* 6<sup>th</sup> ed. (Shay, J. W. ed.) Plenum Press, New York.
11. Del, Brío, M. A., Riera, P., García, J. M. and Alvarez-Uría, M. 1991. Cell types of third ventricle wall of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 23: 147-157.
12. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the Subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17: 5046-5061.
13. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. and Alvarez-Buylla, A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem

- cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716.
14. Durstewitz, D., Kröner, S. and Güntürkün, O. 1999. The dopaminergic innervation of avian telencephalon. *Progress Neurobiol.* 59: 161-195.
  15. Edinger, L. 1908. The relations of comparative anatomy to comparative psychology. *J. Comp. Neurol. Psychol.* 18: 437-457.
  16. Edwards, M. A., Yamamoto, M. and Caviness, V. S. 1990. Organization of radial glia and related cells in the developing mouse CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience* 36: 121-144.
  17. Elmquist, J. K., Swanson, J. J., Sakaguchi, D. S., Ross, L. R. and Jacobson, C. D. 1994. Developmental distribution of GFAP and vimentin in Brazilian opossum brain. *J. Comp. Neurol.* 344: 283-296.
  18. Garcia, A. D., Doan, N. B., Imura, T., Bush, T. G. and Sofroniew, M. V. 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7: 1233-1241.
  19. García-Verdugo, J. M., Ferrón, S., Flames, N., Collado, L., Desfilis, E. and Font, E. 2002. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: A comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res. Bulletin* 57: 765-775.
  20. Goldman, S. A. and Nottebohm, F. 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2390-2394.

21. Gressen, P., Richelme, C., Kadhim, J.J., Gadisseux, J. and Evrard, P. 1992. The germinative zone produces the most cortical astrocytes after neuronal migration in the developing mammalian brain. *Biol. Neonate*. 61: 4-24
22. Jarvis, E. D., Güntürkün, O., Bruce, L. L., Csillag, A., Karten, H. J., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Perkel, D. J., Shimizu, T., Striedter, G. F., Wild, J. M., Ball, G. F., Dugas-Ford, J., Durand, S., Hough, G., Husband, S., Kubikova, L., Lee, D. W., Mello, C. V., Powers, A., Siang, C., Smulders, T. V., Wada, K., White, S. A., Yamamoto, K., Yu, J., Reiner, A. and Butler, A. B. 2005. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain evolution. *Nat. Rev. Neurosci.* 6: 151-159.
23. Kálmán, M., Székely, A. D. and Csillag, A. 1998. Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin-immunopositive elements in the developing chicken brain from hatch to adulthood. *Anat. Embryol.* 198: 213-235.
24. Karle, E. J., Anderson, K. D., Medina, L. and Reiner, A. 1996. Light and electron microscopic immunohistochemical study of dopaminergic terminals in the striatal portion of the pigeon basal ganglia using antisera against tyrosine hydroxylase and dopamine. *J. Comp. Neurol.* 369: 109-124.
25. Karten, H. J. 1969. The organization of the avian telencephalon and some speculations on the phylogeny of the amniote telencephalon. pp. 146-179 *In*: Comparative and evolutionary aspects of the vertebrate central nervous system. (Noback, C. and Petras, J. eds.) Ann. N.Y. Acad. Sci. 167, New

York.

26. Karten, H. J. and Hodos, W. 1967. A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon, *Columba livia*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
27. Kuenzel, W. J., Masson, M. 1988. A stereotaxic atlas of the brain of the chick (*Gallus domesticus*). The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
28. Lazzari, M. and Franceschini, V. 2001. Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity of astroglial cells in the central nervous system of adult *Podarcis sicula* (Squamata, Lacertidae). *J. Anat.* 198: 67-75.
29. Lazzari, M. and Franceschini, V. 2006. Glial cytoarchitecture in the central nervous system of the soft-shell turtle, *Trionyx sinensis*, revealed by intermediate filament immunohistochemistry. *Anat. Embryol.* 211: 497-506.
30. Levitt, P. and Rakic, P. 1980. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing Rhesus monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 193: 815-840.
31. Malatesta, P., Hartfuss, E. and Götz, M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127: 5253-5263.
32. Marin, O. and Rubenstein, J. L. 2001. A long, remarkable journey:

- tangential migration in the telencephalon. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 780-790.
33. Martínez-Cerdeño, V., Noctor, S. C. and Kriegstein, A. R. 2006. The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb. Cortex* 16: i152-i161.
34. Medina, L. and Abellán, A. 2009. Development and evolution of the pallium. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20: 698-711.
35. Metzger, M., Jiang, S., Wang, J. and Braun, K. 1996. Organization of the dopaminergic innervation of forebrain areas relevant to learning: a combined immunohistochemical / retrograde tracing study in the domestic chicken. *J. Comp. Neurol.* 376: 1-27.
36. Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H. and Ogawa, M. 2001. Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31: 727-741.
37. Monzón-Mayer, M., Yanes, C., James, J. L. and Sturrock, R. R. 1991. An ultrastructural study of ependymal cell differentiation during lizard (*Gallotia galloti*) midbrain development. *J. Anat.* 174: 251-261.
38. Nadarajah, B., Brunstrom, J. E., Grutzendler, J., Wong, R. O. L. and Pearlman, A. L. 2001. Two modes of radial migration in early development of cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* 4: 143-150.
39. Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S. and Kriegstein, A. R. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720.

40. Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7: 136-144.
41. O'Rourke, N. A. 1996. Neuronal chain gangs: homotypic contacts support migration into the olfactory bulb. *Neuron* 16: 1061-1064.
42. Patel, S. N., Clayton, N. S. and Krebs, J. R. 1997. Spatial learning induces neurogenesis in the avian brain. *Behav. Brain Res.* 89: 115-128.
43. Paton, J. A. and Nottebohm, F. 1984. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225: 1046-1048.
44. Puelles, L., Kuwana, E., Puelles, E., Bulfone, A., Shimamura, K., Keleher, J., Smiga, S. and Rubenstein, J. L. 2000. Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *J. Comp. Neurol.* 424: 409-438.
45. Rehkämper, G. and Zilles, K. 1991. Parallel evolution in mammalian and avian brains: comparative cytoarchitectonic and cytochemical analysis. *Cell Tissue Res.* 263: 3-28.
46. Reiner, A., Medina, L. and Veenman, C. L. 1998. Structural and functional evolution of the basal ganglia in vertebrates. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 28: 235-285.

47. Reiner, A., Perkel, D. J., Bruce, L. L., Butler, A. B., Csillag, A., Kuenzel, W., Medina, L., Paxinos, G., Shimizu, T., Striedter, G. F., Wild, M., Ball, G. F., Durand, S., Gütürkün, O., Lee, D. W., Mello, C. V., Powers, A., White, S. A., Hough, G., Kubikova, L., Smulders, T. V., Wada, K., Dugas-Ford, J., Husband, S., Yamamoto, K., Yu, J., Siang, C. and Jarvis, E. D. 2004. Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J. Comp. Neurol.* 473: 377-414.
48. Roidríguez-Pérez, L. M., Pérez-Martín, M., Jiménez, A. J. and Fernández-Llebrez, P. 2003. Immunocytochemical characterisation of the wall of the bovine lateral ventricle. *Cell Tissue Res.* 314: 325-335.
49. Schmechel, D. E. and Rakic, P. 1979. A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol. (Berl.)* 156: 115-152.
50. Shin, D. H., Lee, E. and Cho, S. S. 2003. Glial cells in the chicken optic tectum. *Brain Research* 962: 221-225.
51. Suárez, I., Fernández, B., Bodega, G., Tranque, P., Olmos, G. and García-Segura, L. M. 1987. Postnatal development of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the hamster arcuate nucleus. *Dev. Brain Res.* 37: 89-95.
52. Tabata, H. and Nakajima, K. 2003. Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 23: 9996-10001.

53. Tamamaki, N., Fujimori, K. E. and Takauji, R. 1997. Origin and route of tangentially migrating neurons in the developing neocortical intermediate zone. *J. Neurosci.* 17: 8313-8323.
54. Wang, D. D. and Bordey, A. 2008. The astrocyte odyssey. *Progress Neurobiol.* 86: 342-367.

## 付図および付図説明

図 1、ニワトリ終脳の領域を示す模式図

a: 全脳矢状断面

第 1 章および第 2 章における横断切片の横断位置を赤線で示す。

b: 終脳横断面における区分と従来の名称

赤色が外套領域、緑色が基底核（線条体）領域を示している。白色は間脳の一部。

c: 終脳横断面における区分と新しい名称

赤色が外套領域、緑色が基底核領域を示している。白色は間脳の一部。従来基底核（線条体）とみなされていた領域の大部分は外套と名称が変えられた。

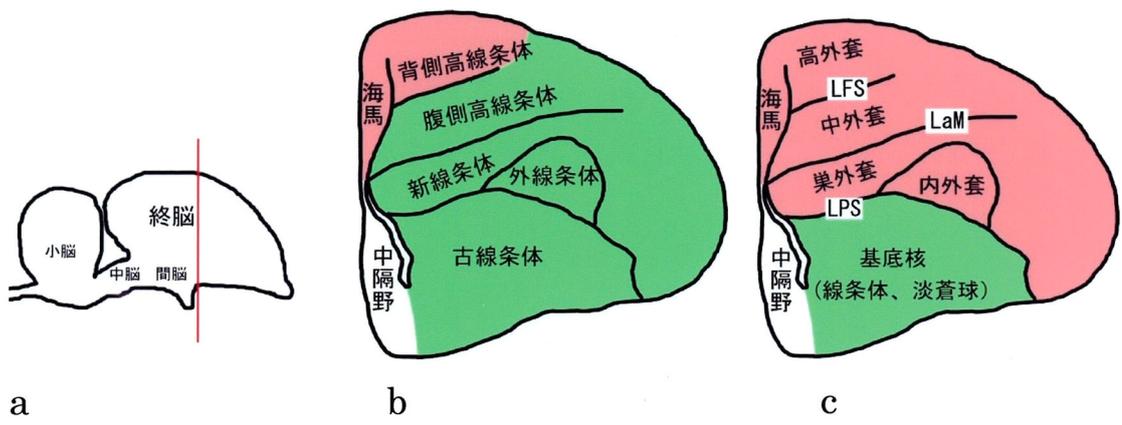


図 1

図 2、 胎卵 4 日齢胚仔 (E4) 終脳横断面における脳室帯 (a 左半球) と vimentin 陽性反応を示す模式図 (a 右半球) および vimentin 免疫組織化学像 (b-e)

a: 脳室が広く、終脳は薄くそのほとんどが水色で示す脳室帯から構成される。vimentin 陽性細胞は脳室面から脳表面に放射状の突起を伸ばしている。

b、c: 図 a 背側黒枠部のクリューバー・バレラ染色および vimentin 免疫組織化学像  
脳壁は薄くそのほとんどが脳室帯であり、脳室面から脳表面に向けて vimentin 陽性の放射状突起が観察される (scale = 50  $\mu\text{m}$ )。

d、e: 図 a 腹側黒枠部のクリューバー・バレラ染色および vimentin 免疫組織化学像  
脳壁の厚さは背側と同様薄くそのほとんどが脳室帯であり、脳室面から脳表面に向けて vimentin 陽性の放射状突起が観察される (scale = 50  $\mu\text{m}$ )。

KB; クリューバー・バレラ、V; 脳室、Vim; vimentin

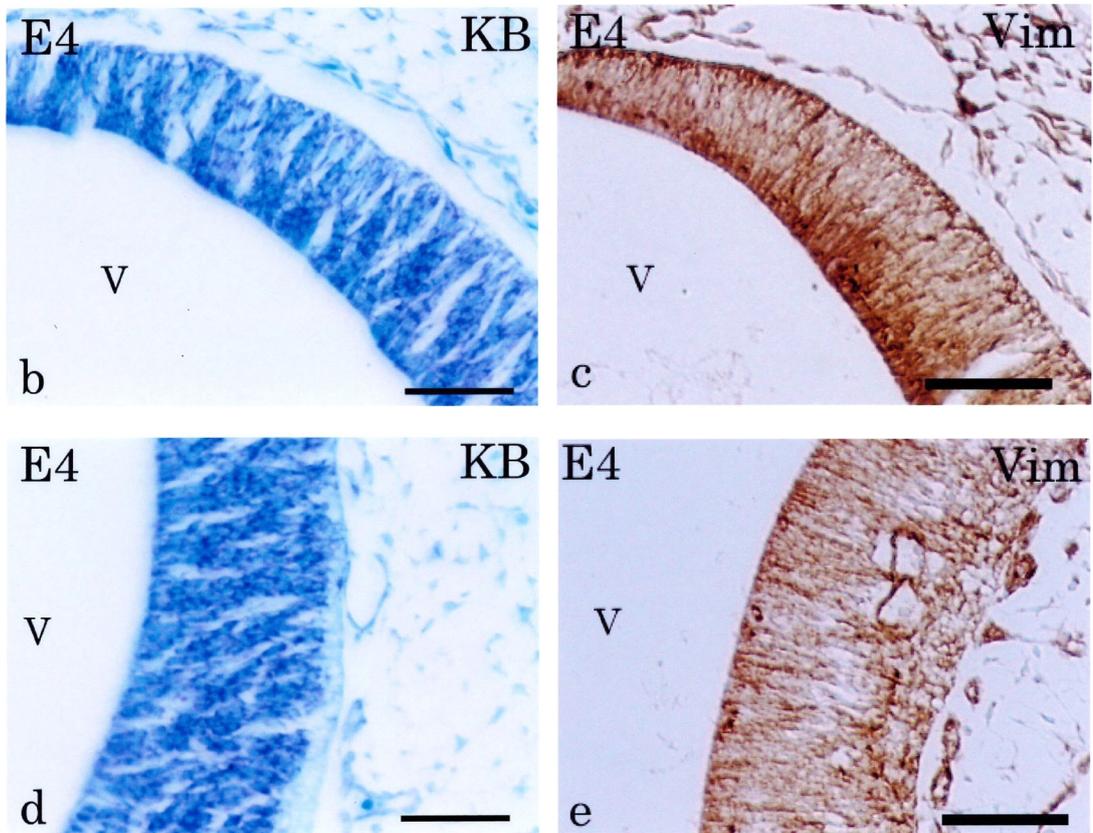
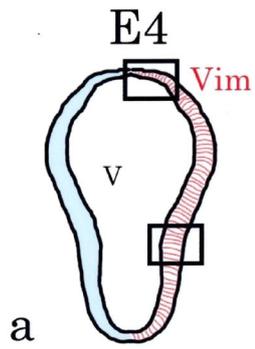


图 2

図 3、**孵卵 5 日齢胚仔 (E5) 終脳横断面における脳室帯 (a 左半球) と vimentin 陽性反応を示す模式図(a 右半球) および vimentin 免疫組織化学像 (b-e)**

a: 左半球の水色で示す領域は脳室帯を表す。背側正中領域が腹側に反転し、これによって左右の側脳室が形成される。終脳腹側では、脳壁が厚くなるが、**vimentin** 陽性の放射状の突起は脳表面まで達していない。

b、c: 図 a 背側黒枠部のクリューバー・バレラ染色および **vimentin** 免疫組織化学像  
脳壁は依然薄く、ほとんどが脳室帯であり、**孵卵 4 日齢胚仔**同様、側脳室から脳表面に向けて **vimentin** 陽性の放射状突起が観察される (scale = 50  $\mu\text{m}$ )。

d、e: 図 a 腹側黒枠部のクリューバー・バレラ染色および **vimentin** 免疫組織化学像  
写真中の破線は脳室帯と実質の境界を示している。脳室帯の外側の脳壁は厚くなり、**vimentin** 陽性の放射状突起は脳室帯の外側ではほとんど認められない。脳室帯の外側では **vimentin** 陽性突起は分枝している (矢印) (scale = 50  $\mu\text{m}$ )。

KB; クリューバー・バレラ、LV; 側脳室、**Vim**; **vimentin**、VZ; 脳室帯

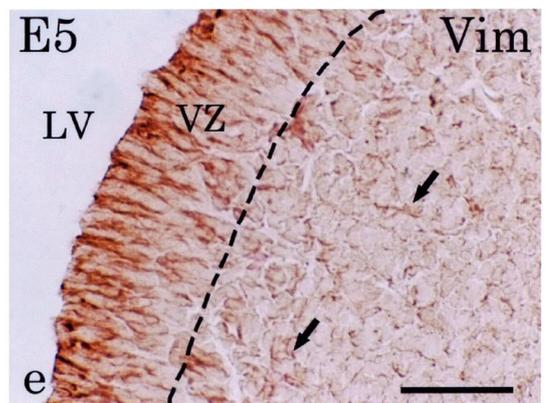
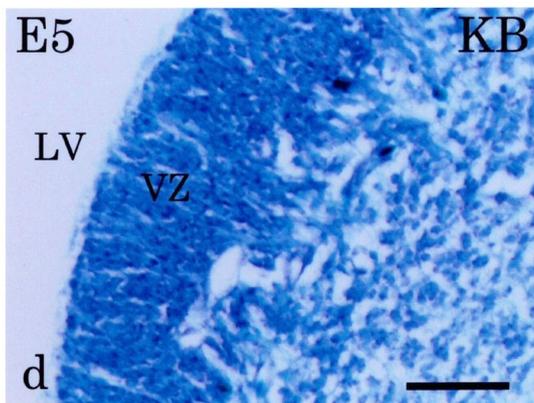
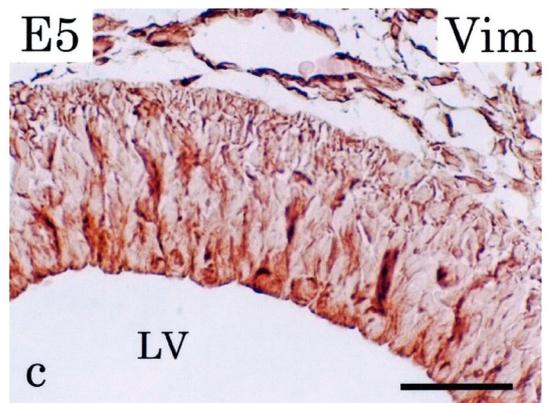
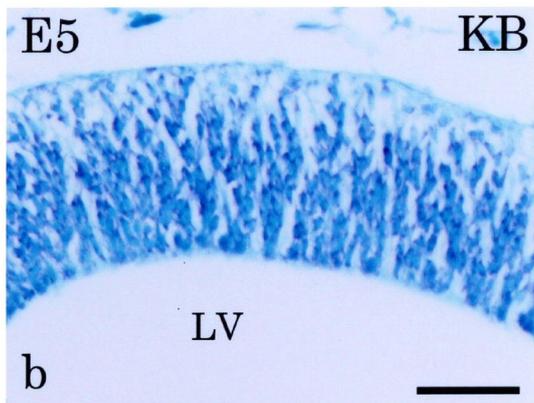
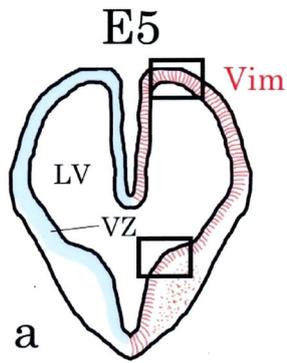


图 3

図 4、**孵卵 8 日齢胚仔 (E8) 終脳横断面における脳室帯(a 左半球)と vimentin 陽性反応を示す模式図(a 右半球) および vimentin 免疫組織化学像 (b-e)**

a: 左半球の水色で示す領域は脳室帯を表す。脳壁はさらに厚くなるが、背側と腹側で vimentin 陽性突起の伸展に違いが認められる。

b、c: 図 a 背側黒枠部のクリューバー・バレラ染色および vimentin 免疫組織化学像  
写真中の破線は脳室帯と実質の境界を示している。背側領域も脳室帯の外側の脳壁が厚くなるが、依然、側脳室から脳表面に向けて vimentin 陽性放射状突起が認められる (scale = 50  $\mu\text{m}$ )。

d、e: 図 a 腹側黒枠部のクリューバー・バレラ染色および vimentin 免疫組織化学像  
写真中の破線は脳室帯と実質の境界を示している。腹側領域では脳壁はさらに厚くなるが、孵卵 5 日齢胚仔と異なり、脳室帯の外側領域に放射状突起が認められる (矢印) (scale = 50  $\mu\text{m}$ )。

KB; クリューバー・バレラ、LV; 側脳室、Vim; vimentin、VZ; 脳室帯

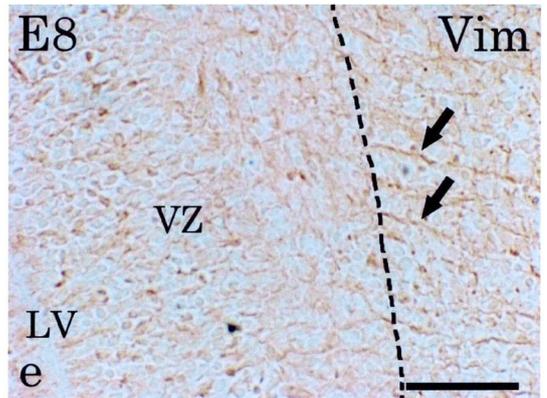
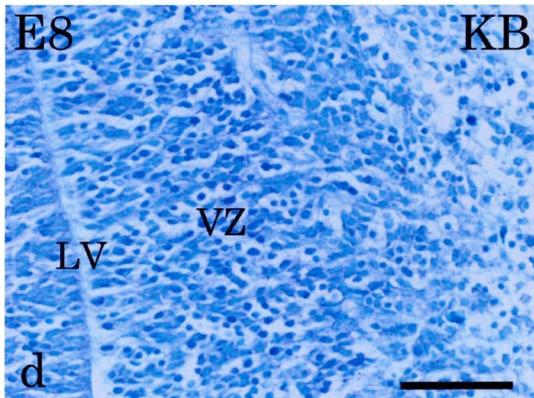
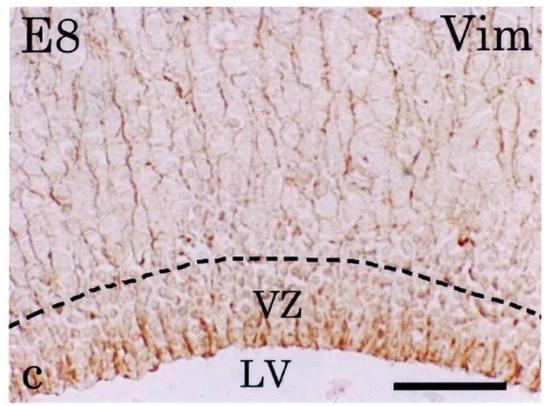
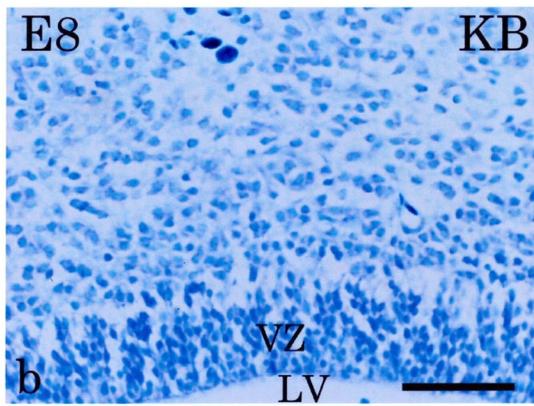
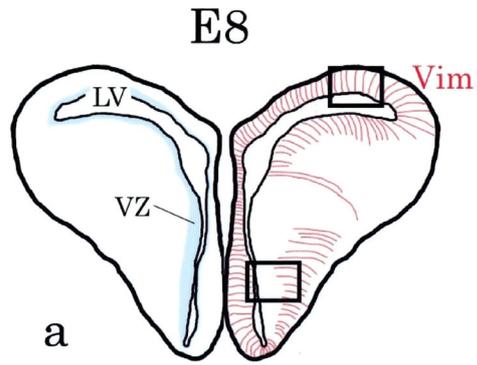


图 4

図 5、**孵卵 12 日齢胚仔 (E12) および孵卵 14 日齢胚仔 (E14) 終脳横断面における終脳全体図**  
と **vimentin** および**チロシン水酸化酵素 (TH)**陽性反応を示す**模式図 (a-c)**および **vimentin**、  
**グリア線維性酸性タンパク (GFAP)** 免疫組織化学像 (e、f)

a: 孵卵 12 日齢胚仔では、無神経細胞層である**外套 - 外套下部層 (LPS)** が区別される。左半球の水色領域は**脳室帯**を示す。**vimentin** 陽性の突起は減少するが、**LPS** を含むいくつかの部位では長い突起が認められる。

b、c: 孵卵 14 日齢胚仔では、**LPS** 以外に無神経細胞層の**中外套板 (LaM)**、**上前頭層 (LFS)** が認められるようになる。**TH** 陽性の神経終末や突起が終脳の腹側部に認められるようになるが、**vimentin** 陽性突起が認められる **LPS** よりも腹側に限局している。

d: **LPS** 周辺の**クリューバー・バレラ**染色像

矢印で示す **LPS** には神経細胞が少なく、**LPS** の背側と腹側では神経細胞の大きさが異なっている (scale = 100  $\mu\text{m}$ )。

e: **LPS** 周辺 (b の黒枠) の **vimentin** 免疫組織化学像

**vimentin** 陽性の突起は矢印で示す **LPS** で多く認められる (scale = 100  $\mu\text{m}$ )。

f: 孵卵 14 日齢胚仔の脳表層における**グリア線維性酸性タンパク (GFAP)** 免疫組織化学像

脳表層に矢頭で示す **GFAP** 陽性の突起が認められる (scale = 500  $\mu\text{m}$ )。

KB; **クリューバー・バレラ**、**Vim**; **vimentin**、**VZ**; **脳室帯**

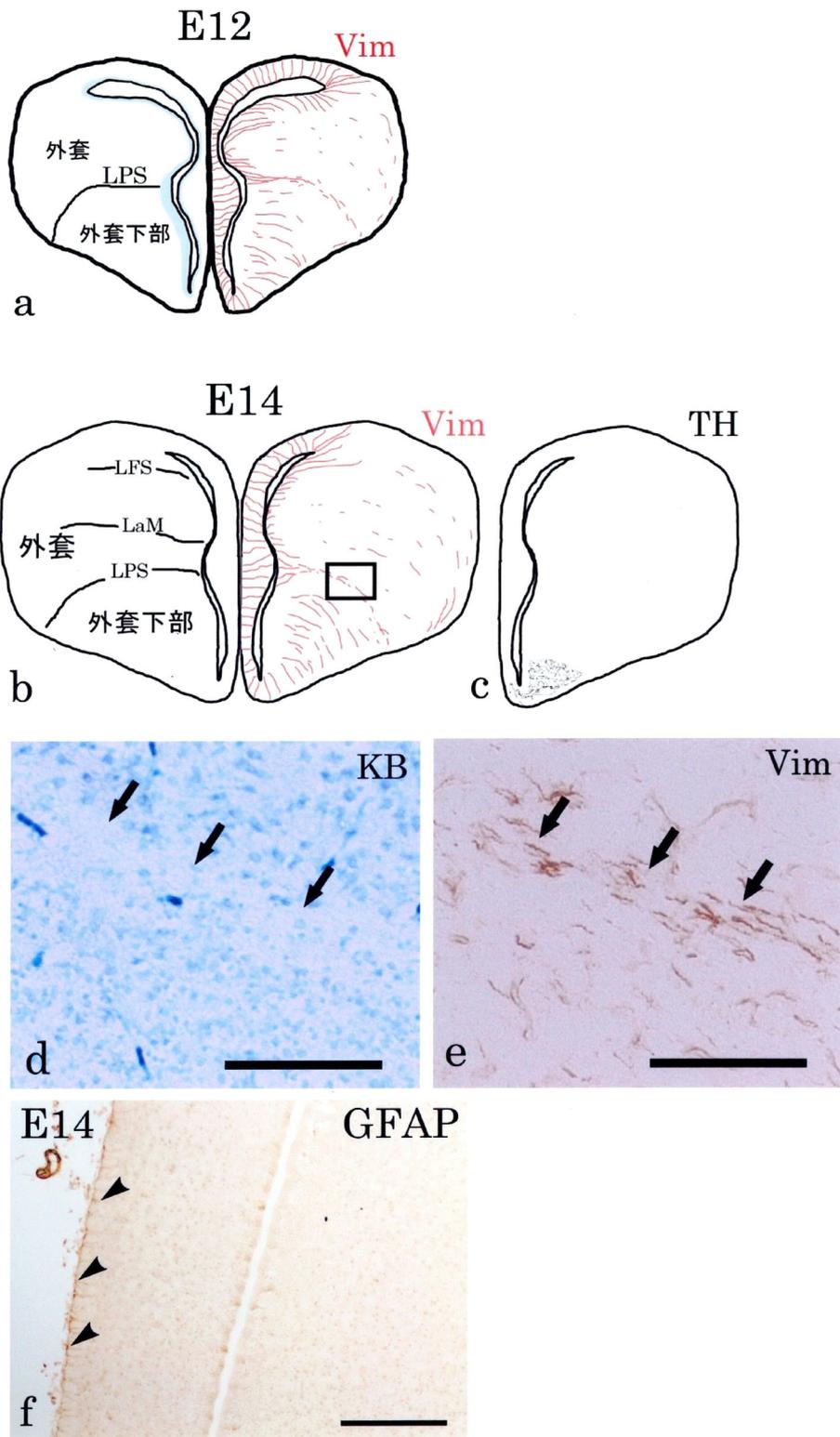


图 5

図 6、孵卵 16 日齢胚仔 (E16) 終脳横断面における vimentin (Vim)、チロシン水酸化酵素 (TH) およびグリア線維性酸性タンパク (GFAP) 免疫組織化学像

a: 終脳模式図 (左半球) および vimentin 免疫組織化学低倍像 (右半球)

上前頭層 (LFS) および外套 - 外套下部層 (LPS) で vimentin 陽性突起が認められる (scale = 2 mm)。

b: TH 免疫組織化学像

LPS より腹側の領域 (外套下部) で陽性反応が認められる (scale = 2 mm)。

c: 図 a 背側黒枠部の拡大像

vimentin 陽性突起は LFS (矢頭) やその腹側の中外套で多く認められる (白矢印)。また、側脳室 (LV) 背側端でも vimentin 陽性反応が認められる (黒矢印) (scale = 500  $\mu\text{m}$ )。

d: 図 a 腹側黒枠部の拡大像

矢印で示す LPS に vimentin 陽性突起が集中して存在している。\*は側脳室を表す (scale = 500  $\mu\text{m}$ )。

e: 高外套 (H) 領域の GFAP 免疫組織化学像

GFAP 陽性の突起が認められ、それらは脳表面を覆うように存在している (矢印) (scale = 200  $\mu\text{m}$ )。

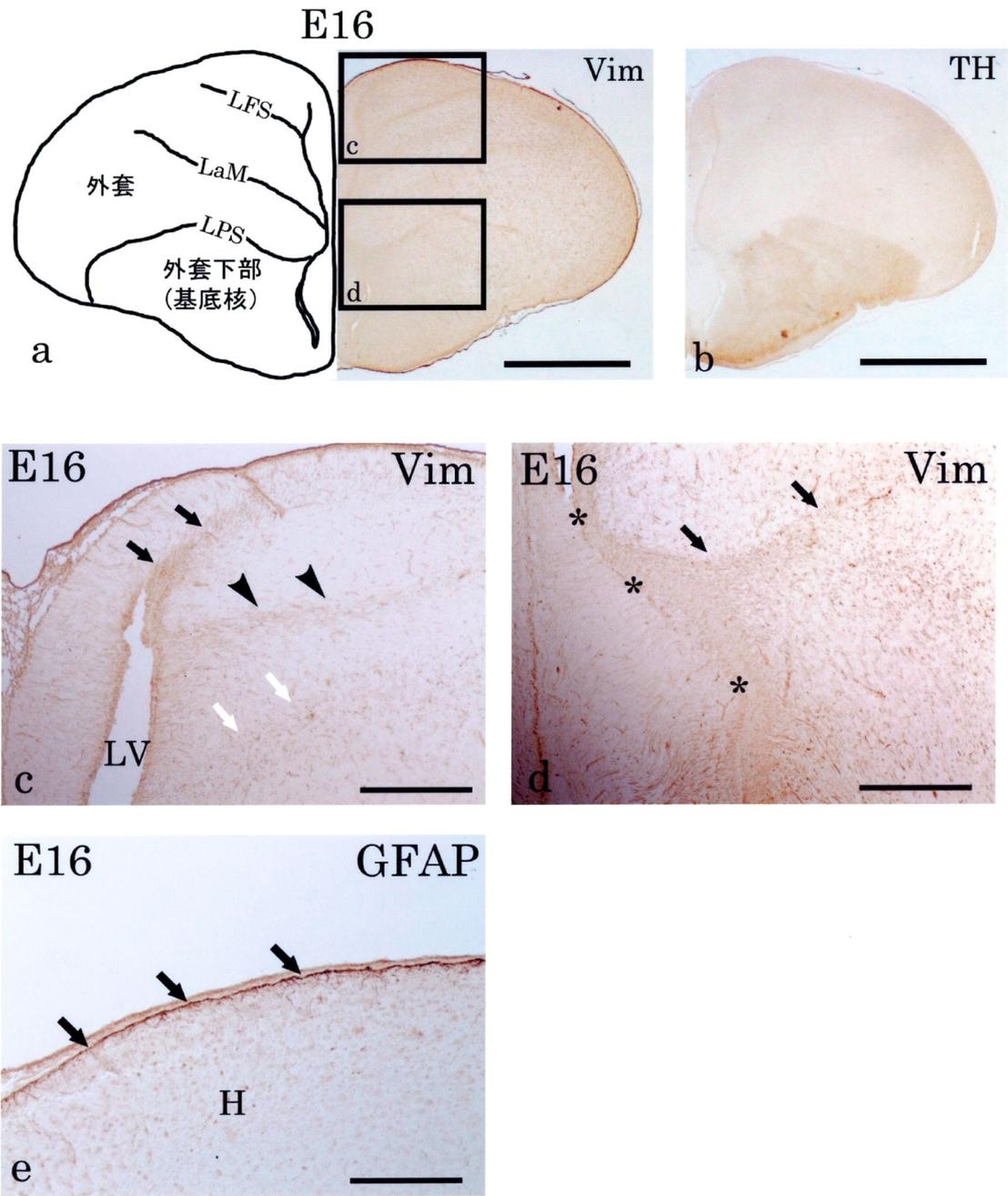


图 6

図 7、 孵卵 20 日 齡 胚 仔 (E20) 終 脳 横 断 面 に お け る グ リ ア 線 維 性 酸 性 タ ン パ ク (GFAP)

免 疫 組 織 化 学 像

a: 終 脳 模 式 図 (左 半 球) お よ び GFAP 免 疫 組 織 化 学 低 倍 像 (右 半 球)

外 套 下 部 の 一 部 で 多 く の GFAP 陽 性 反 応 が 認 め ら れ る (scale = 2 mm)。

b: 図 a 背 側 黒 枠 部 の 拡 大 像

側 脳 室 の 背 側 端 (黒 矢 印) お よ び 上 前 頭 層 (LFS) (白 矢 印) に GFAP 陽 性 細 胞 お よ び 突 起 が 認 め ら れ る。脳 表 面 を 覆 う GFAP 陽 性 突 起 の 数 は 孵 卵 16 日 齡 胚 仔 に 比 べ 増 加 し て い る (矢 頭) (scale = 500  $\mu\text{m}$ )。

c: 図 a 腹 側 黒 枠 部 の 拡 大 像

黒 枠 で 示 す 外 套 下 部 の 淡 蒼 球 で は 多 く の GFAP 陽 性 細 胞 が 認 め ら れ る (scale = 500  $\mu\text{m}$ )。

d: 図 b の 黒 枠 部 (海 馬) の 拡 大 像

海 馬 で は 少 数 の GFAP 陽 性 細 胞 (矢 印) が 認 め ら れ、そ れ ら は 長 い 突 起 (矢 頭) を 有 す る。(scale = 100  $\mu\text{m}$ )。

e: 図 c の 黒 枠 部 (淡 蒼 球) の 拡 大 像

淡 蒼 球 で は GFAP 陽 性 細 胞 (矢 印) が 多 数 認 め ら れ、短 い 突 起 を 多 数 伸 ば す。矢 頭 は 血 管 を 表 す (scale = 100  $\mu\text{m}$ )。

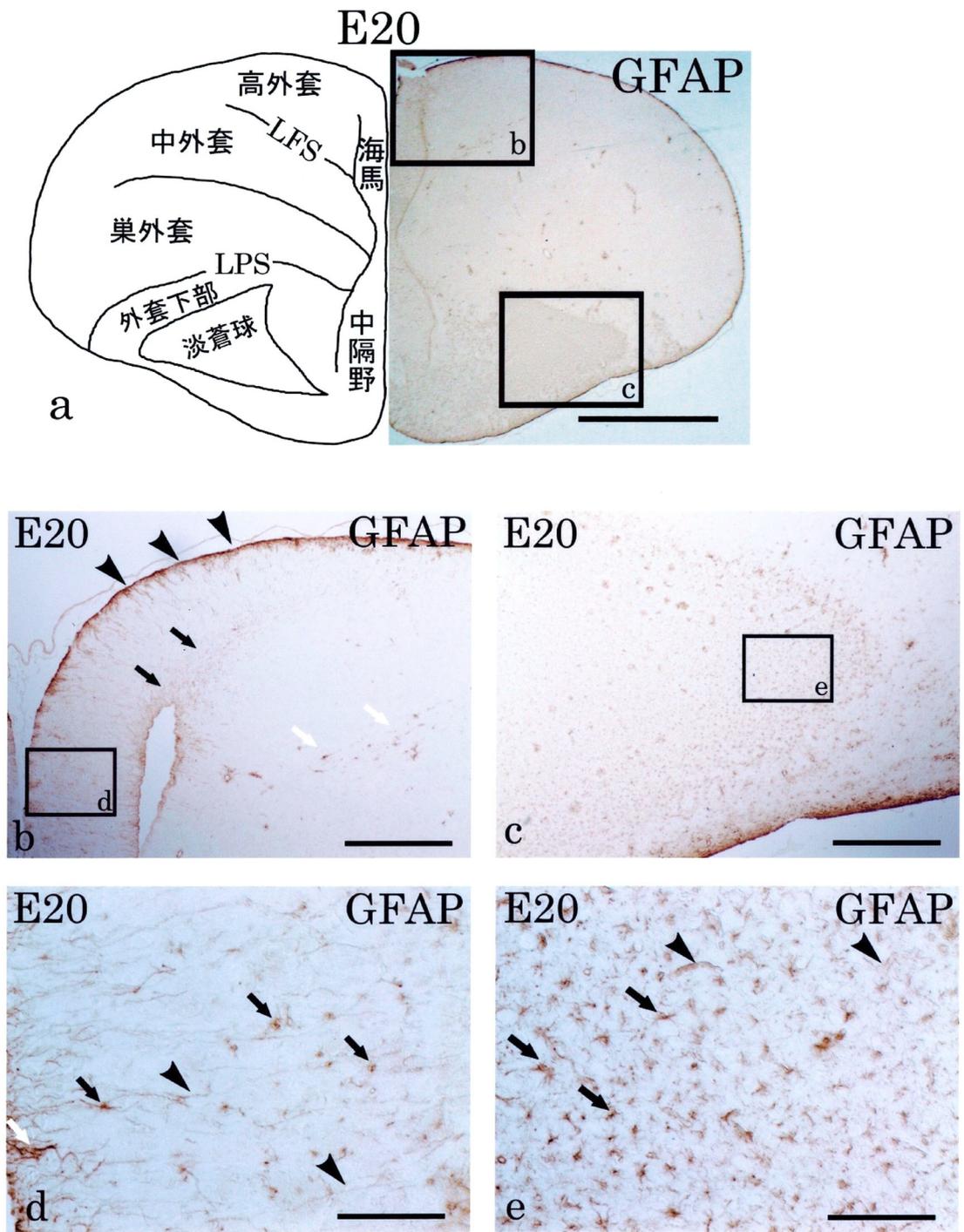


图 7

図 8、孵化後 30 日齢ニワトリ (P30) 終脳横断面における vimentin (Vim) およびグリア線維性酸性タンパク (GFAP) 免疫組織化学像

a: 終脳模式図 (左半球) および vimentin 免疫組織化学像 (右半球)

孵化後も海馬、側脳室背側端 (黒矢頭)、上前頭層 (LFS) (黒矢印)、中外套 (白矢頭)、外套 - 外套下部層 (LPS) (白矢印) に vimentin 陽性突起が存在する (scale = 2 mm)。

b: GFAP 免疫組織化学低倍像

海馬、内外套、基底核などに多くの GFAP 陽性細胞反応が局在している。

黒枠 c・h は図 8c・図 8h の位置を示す (scale = 2 mm)。

c: 側脳室背側端の拡大像

脳表面の GFAP 陽性突起 (矢頭) は深層まで広がる。側脳室背側端から脳表面に伸びる GFAP 陽性突起 (矢印) が認められ、それより正中側 (海馬側) では外側 (高外套) よりも多くの GFAP 陽性細胞 (大矢印) が認められる (scale = 200  $\mu$ m)。

d: LFS 拡大像

高外套 (H) および中外套 (M) の境界の LFS に GFAP 陽性細胞の集塊 (矢印) が認められる (scale = 200  $\mu$ m)。

e: 海馬拡大像

海馬では多数の GFAP 陽性細胞 (矢印) および GFAP 陽性の長い突起 (矢頭) が認められる。側脳室 (\*) 付近には突起が比較的多く認められる (scale = 200  $\mu$ m)。

f、g: LPS 拡大像

LPS 内は GFAP 陽性細胞 (矢印) や GFAP 陽性の細く細かい突起 (矢頭) が局在している (scale = 200  $\mu$ m)。

h: 基底核 (特に淡蒼球) 拡大像

基底核、特に淡蒼球では非常に多くの GFAP 陽性細胞 (矢印) およびそれらの短い突起 (矢頭) が認められる (scale = 200  $\mu$ m)。

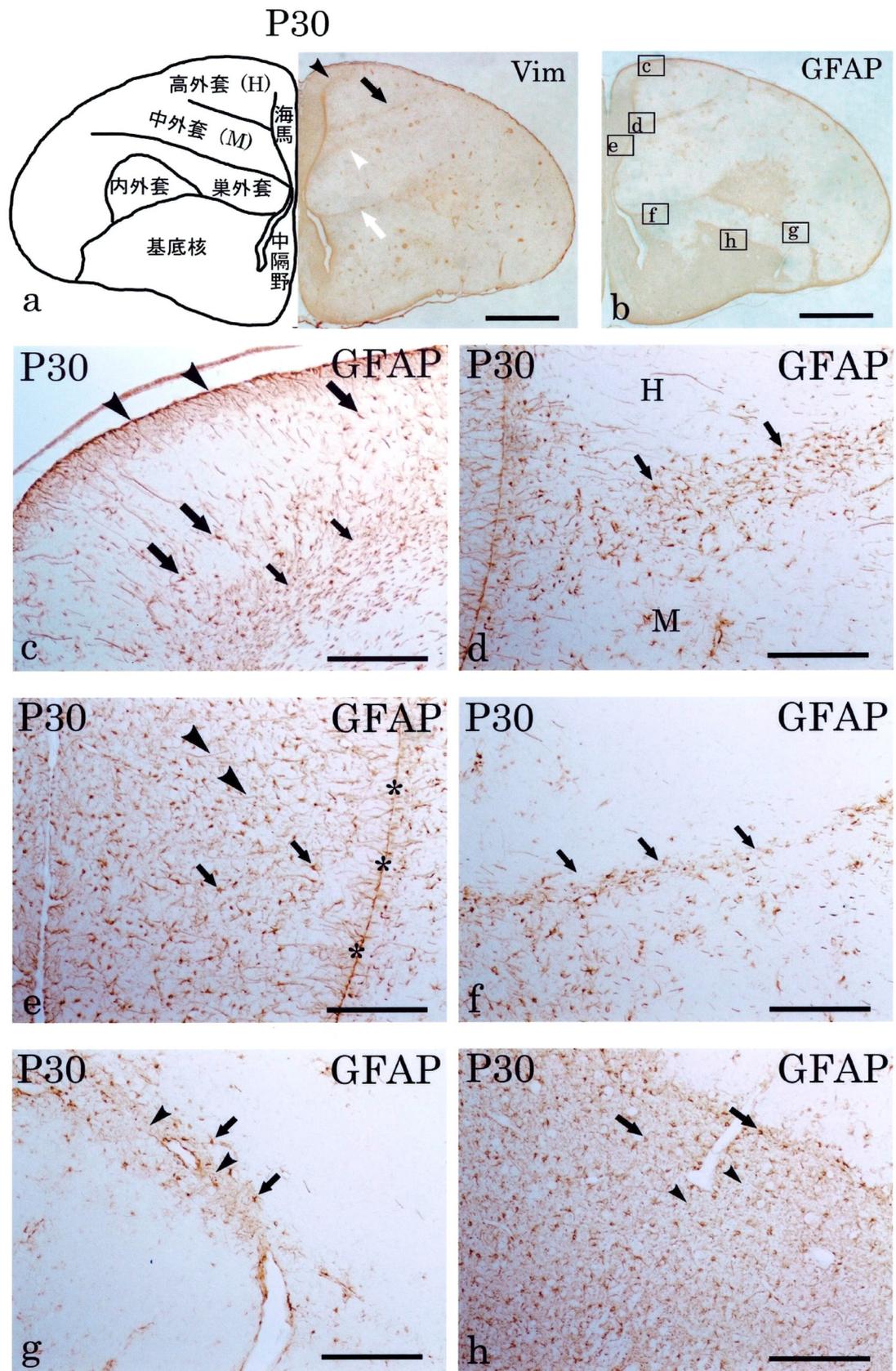


图 8

図 9、孵化後 10 日齢ニワトリ (P10) 矢状断面における vimentin (Vim) およびグリア線維性酸性タンパク (GFAP) 免疫組織化学像

a: 孵化後 10 日齢ニワトリ終脳矢状断面における模式図

b: 孵化後 10 日齢ニワトリ終脳矢状断面における vimentin 免疫組織化学像

上前頭層 (LFS) および外套-外套下部層 (LPS) で認められる vimentin 陽性の突起は側脳室から嗅球方向に向かう (scale = 2 mm)。

c: 孵化後 10 日齢ニワトリにおける終脳矢状断面の GFAP 免疫組織化学像

vimentin 陽性の突起同様 GFAP 陽性細胞も LFS および LPS で認められる (scale = 2 mm)。

d: 図 b 黒枠部の拡大像

LPS は vimentin 陽性の長い突起が多く存在している (矢印)。LFS 以外での vimentin 陽性反応は血管で認められる (矢頭) (scale = 200  $\mu$ m)。

e: 図 c 黒枠部の拡大像

LPS には GFAP 陽性細胞 (矢印) や GFAP 陽性突起 (矢頭) が多く存在している (scale = 200  $\mu$ m)。

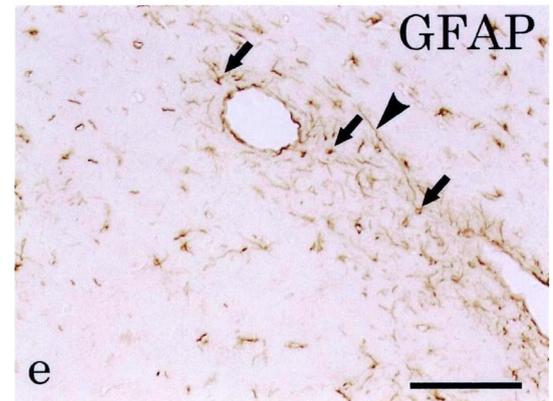
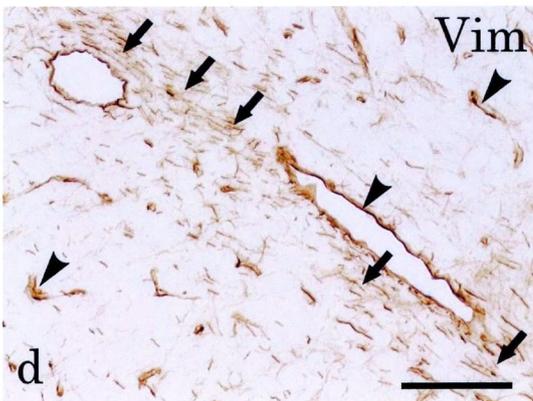
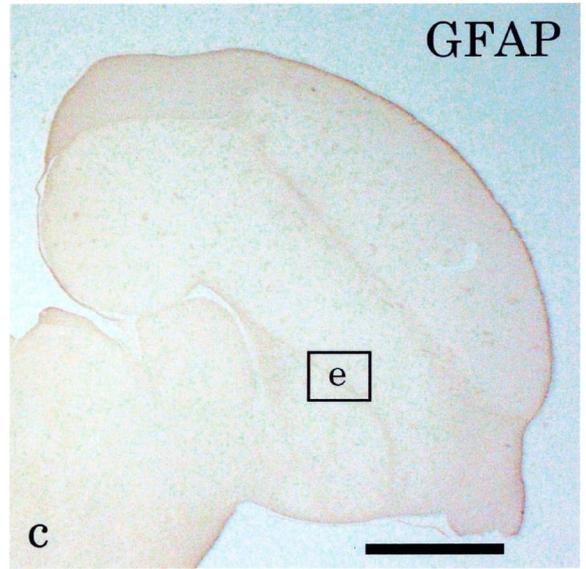
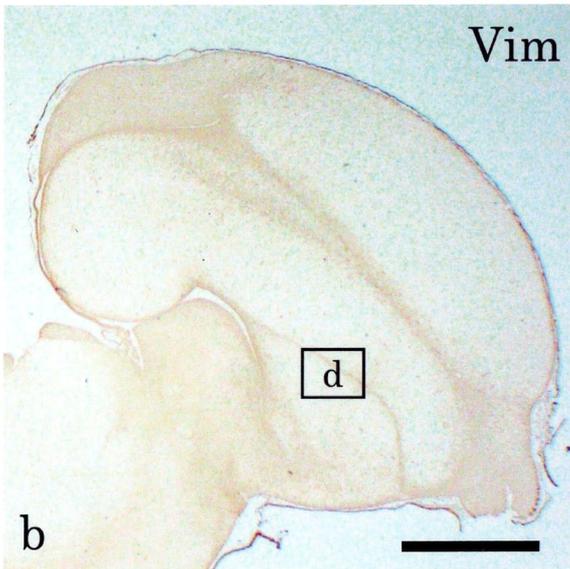
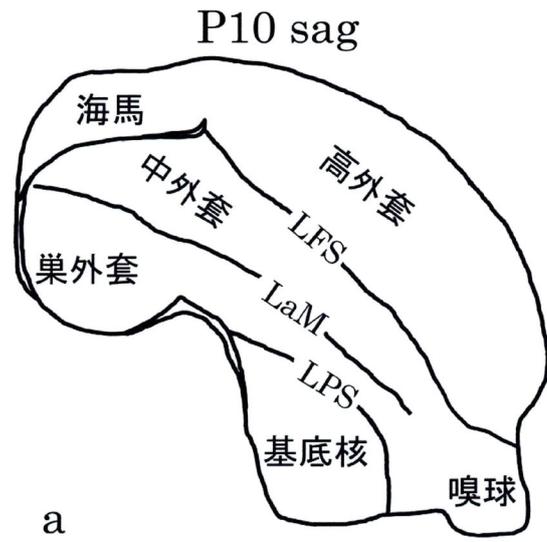


图 9

図 10、孵化後 30 日齢ニワトリ終脳横断面における模式図

模式図右半球の黒枠数字は図 11 および図 12 の a-d の位置を示している。

BG; 基底核、H; 高外套、Hp; 海馬、LaM; 中外套板、LFS; 上前頭層、LPS; 外套-外套下部層、LV; 側脳室、M; 中外套、N; 巢外套、S; 中隔野

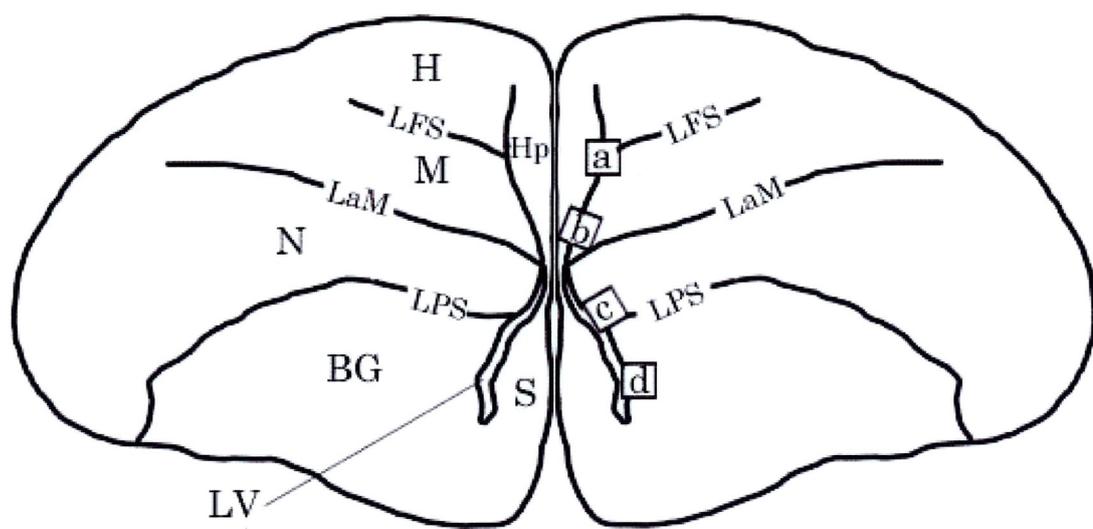


图 10

図 11、側脳室外側の上衣層におけるニッスル染色 (N) および vimentin (Vim)、  
グリア線維性酸性タンパク (GFAP) 免疫組織化学像 (scale = 25 $\mu$ m)

黒矢印は側脳室の位置を示す。側脳室の左側が側脳室内側、右側が側脳室外側を表す。

#### 上前頭層基部付近上衣層

- a-1: ニッスル染色像; 側脳室外側の上衣層は立方～円柱細胞で構成される。
- a-2: vimentin 免疫組織化学像; 側脳室内側の vimentin 陽性細胞は単層立方上皮だが、側脳室外側の vimentin 陽性細胞は 1～2 層の重層立方上皮である。
- a-3: GFAP 免疫組織化学像; 側脳室内側では、上衣層に GFAP 陽性細胞が多く存在し、それらは 1 本の長い突起を有している。一方、側脳室外側の上衣層では、GFAP 陽性細胞はまばらに存在し、内側の GFAP 陽性細胞より大型の細胞体をもつ。

#### 中外套上衣層

- b-1: ニッスル染色像; 側脳室外側の上衣層は単層の立方細胞で構成される。
- b-2: vimentin 免疫組織化学像; 上衣層は側脳室外側でも内側同様、多くが単層の vimentin 陽性細胞で構成される。
- b-3: GFAP 免疫組織化学像; GFAP 陽性細胞は側脳室外側の上衣層ではほとんど認められず、上衣層外で認められる。

#### 外套-外套下部層基部付近上衣層

- c-1: ニッスル染色像; 上衣層は外套領域より厚くなっている。
- c-2: vimentin 免疫組織化学像; 上衣層は 3-4 層の vimentin 陽性細胞で構成される。
- c-3: GFAP 免疫組織化学像; 側脳室 (LV) に面して GFAP 陽性細胞がほぼ連続して並んでいる。

#### 基底核上衣層

- d-1: ニッスル染色像; 上衣層は他の部位 (図 11a-c) より厚い。
- d-2: vimentin 免疫組織化学像; vimentin 陽性細胞は上衣層だけでなく上衣層外でも認められる。
- d-3: GFAP 免疫組織化学像; 上衣層を含む側脳室周囲には GFAP 陽性細胞がほとんど認められず、vimentin 陽性細胞が認められない領域で GFAP 陽性細胞の突起が認められる。

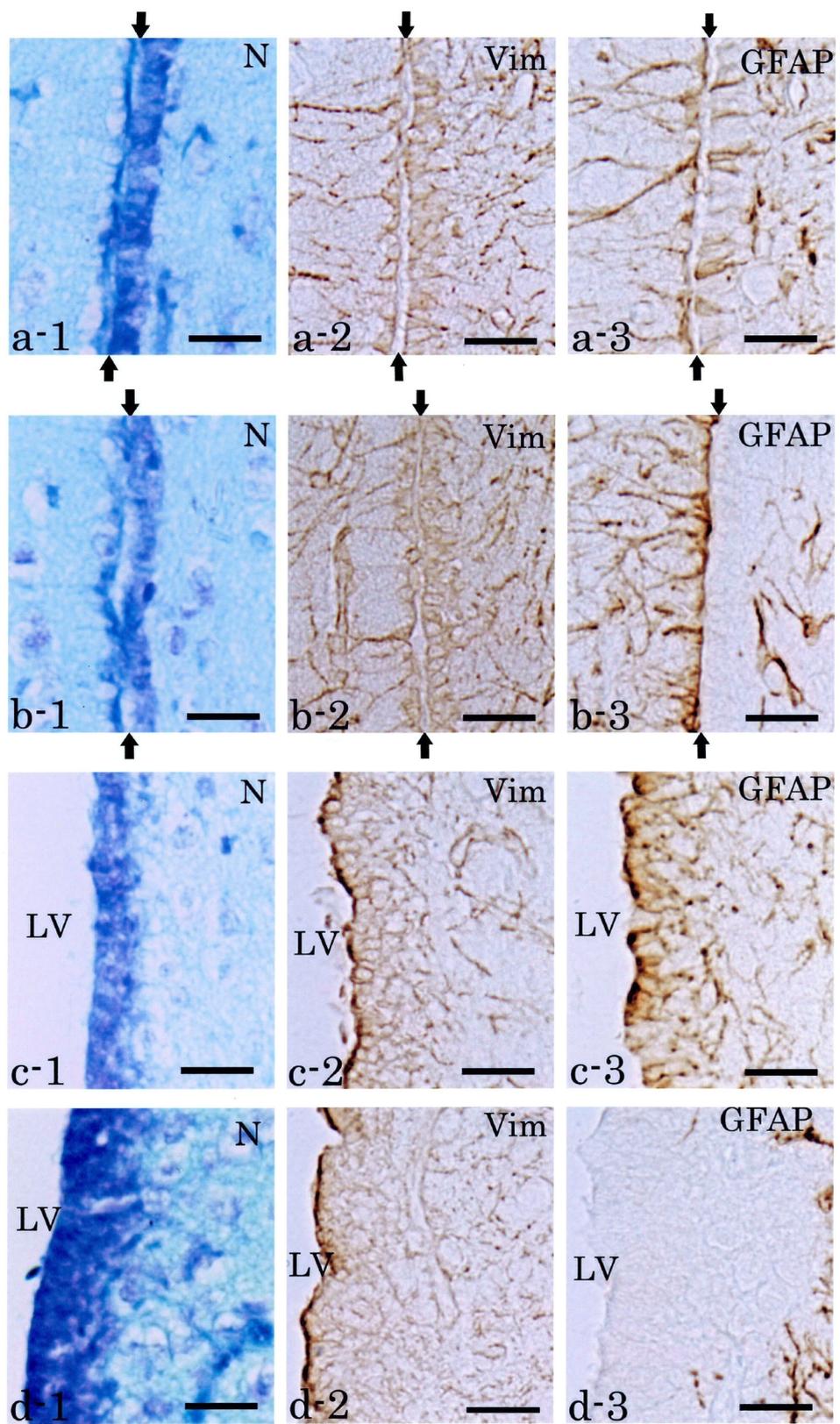


图 11

図 12、側脳室外側の上衣層における vimentin (Vim)、グリア線維性酸性タンパク (GFAP)  
二重免疫組織化学像

矢印は側脳室の位置を示す。側脳室の左側が側脳室内側、右側が側脳室外側を表す。

上前頭層 (LFS) 基部付近上衣層

a-1、a-2: vimentin、GFAP 二重蛍光免疫組織化学低倍像 (a-1、scale = 100 $\mu$ m) および高倍像 (a-2、scale = 25 $\mu$ m) ; 側脳室内側では、上衣層は多くが vimentin・GFAP 共陽性細胞 (黄) で構成される。一方、側脳室外側では、上衣層 (黒矢印と破線の間) は多くの vimentin 陽性細胞 (緑) と少数の vimentin・GFAP 共陽性細胞 (黄) で構成される。白矢印は vimentin・GFAP 共陽性細胞を示す。LFS に vimentin 陽性突起が伸びる。

中外套上衣層

b-1、b-2: vimentin、GFAP 二重蛍光免疫組織化学低倍像 (b-1、scale = 100 $\mu$ m) および高倍像 (b-2、scale = 25 $\mu$ m) ; 側脳室外側では、上衣層 (黒矢印と破線の間) を構成する細胞はほとんどが vimentin 陽性細胞 (緑) で vimentin・GFAP 共陽性細胞 (黄) はほとんど認められない。上衣層外で GFAP 陽性細胞 (赤) の突起が認められる。

外套-外套下部層 (LPS) 基部付近上衣層

c-1、c-2: vimentin、GFAP 二重蛍光免疫組織化学低倍像 (c-1、scale = 100 $\mu$ m) および高倍像 (c-2、scale = 25 $\mu$ m) ; 上衣層 (破線の左側) には vimentin 陽性細胞 (緑) に混じり vimentin・GFAP 共陽性細胞 (黄) が多く存在する。上衣層外では GFAP 陽性細胞 (赤) の突起が認められる。LPS に vimentin 陽性突起が伸びる。

基底核上衣層

d-1、d-2: vimentin、GFAP 二重蛍光免疫組織化学低倍像 (d-1、scale = 100 $\mu$ m) および高倍像 (d-2、scale = 25 $\mu$ m) ; 上衣層 (破線の左側) を含む広い領域は、ほとんどが vimentin 陽性細胞 (緑) で構成され、その外側に GFAP 陽性細胞 (赤) や vimentin 陽性突起が認められる。vimentin・GFAP 共陽性細胞はほとんど認められない。

Hp; 海馬

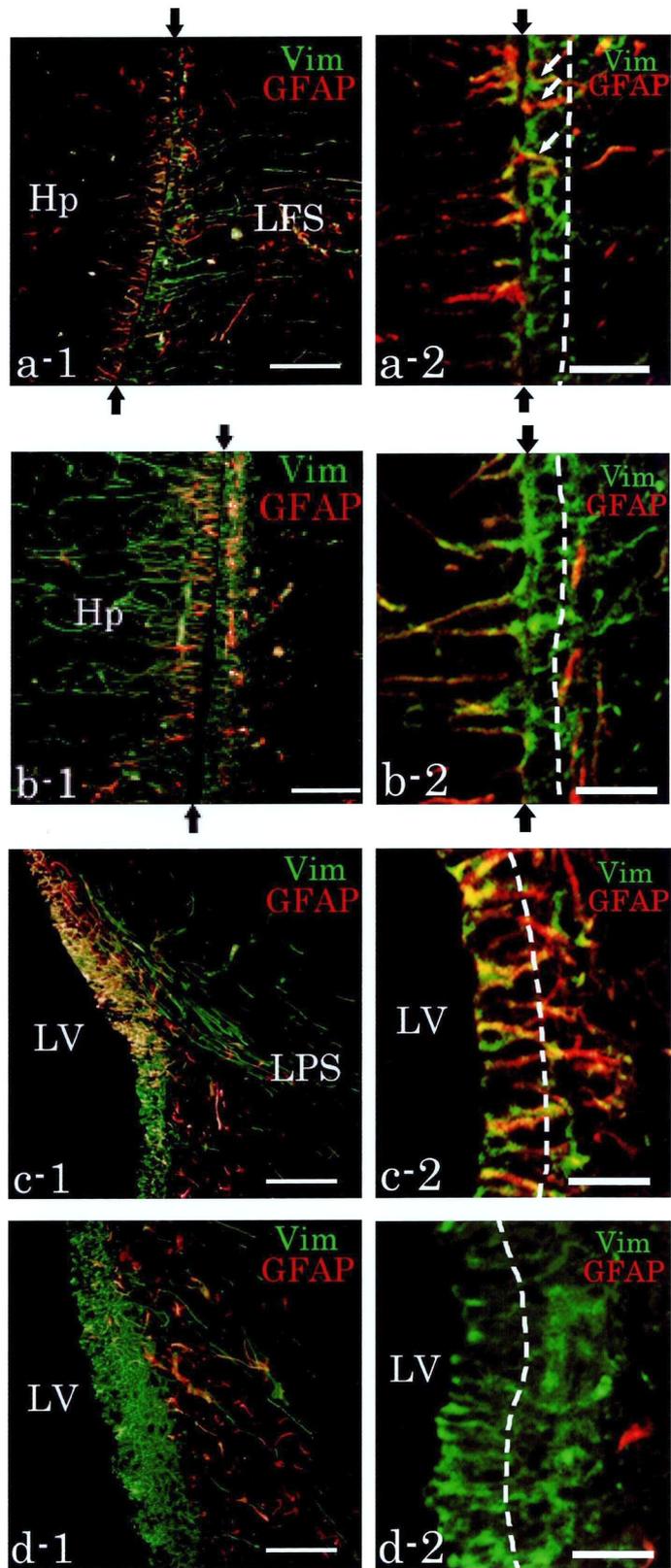


图 12

図 13、横断切片における側脳室外側の上衣層および矢状断切片における側脳室吻側の上衣層を構成する vimentin および GFAP 陽性細胞を示す模式図

青色が上衣層、緑色が vimentin 陽性細胞体および突起、赤色が GFAP 陽性細胞体および突起、黄色が vimentin・GFAP 共陽性細胞体および突起を表している。上前頭層 (LFS) や外套-外套下部層 (LPS) の基部では vimentin・GFAP 共陽性細胞が認められるが、それ以外の外套および基底核では vimentin・GFAP 共陽性細胞はほとんど認められない。

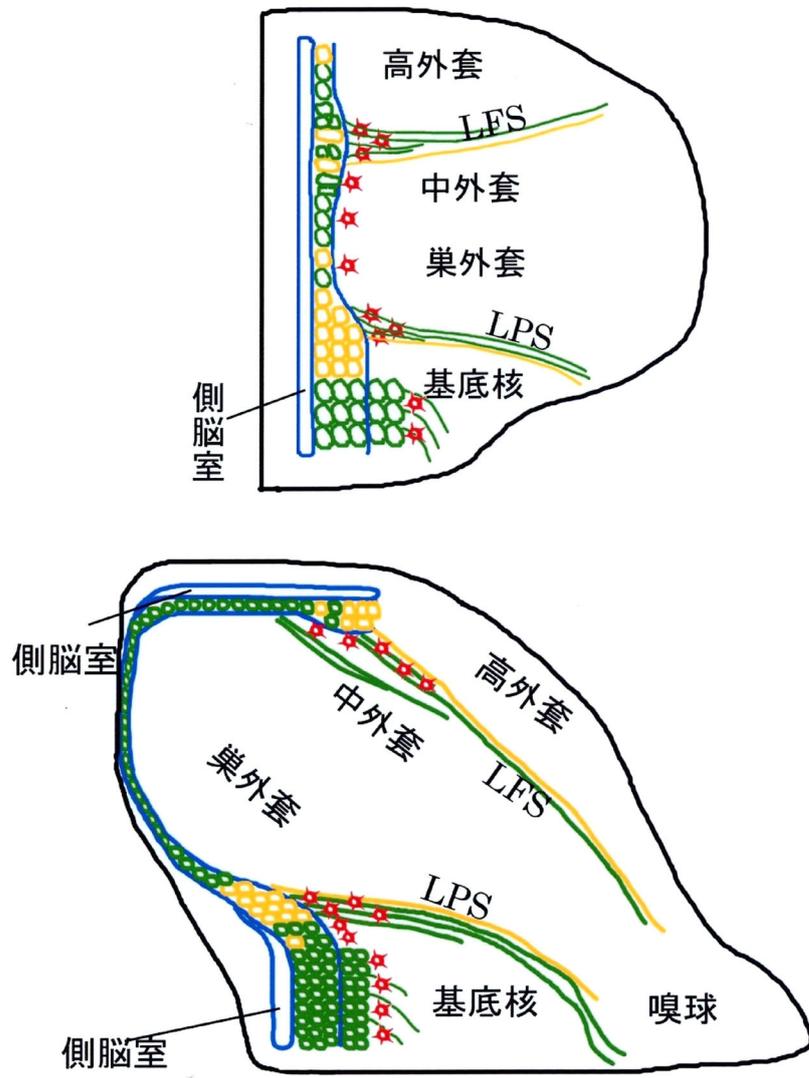


图 13