

原著：秋田大学保健学専攻紀要19(1)：39 - 46, 2011

## 視床下部下垂体路における神経線維の概年リズムでの形態変化について

大友和夫\* 福原紅子\*\* 呉毅\*\*\*

### 要 旨

概年リズムの一つである冬眠現象は、様々な生理現象が低下することでエネルギー代謝を抑えている。そのリズムは特に視床下部の諸核の連携によってもたらされるが、中でも視床下部下垂体路 (hypothalamo-hypophysial tract; HHT) が大きな役割を果たしていることが近年明らかにされている。HHT は主に視床下部の神経分泌からのホルモンの分泌に関わることが多い。そこで、本研究ではHHTのアルギニンバソプレシン (aVP) とメチオニンエンケファリン (mEnk) の免疫陽性神経線維とヘリング小体 (HB) の形態学的季節変化について、光学顕微鏡及び電子顕微鏡で観察し検討した。HHTにおけるHBは、非冬眠期と冬眠期で顕著な形態変化を示した。さらに、神経分泌核からのaVPの軸索流による移動及びmEnk免疫陽性神経線維が非冬眠期と冬眠の間の時期によって顕著に変化することが観察された。mEnkがこの変化に関与していることが明らかになった。また、HBは冬眠動物の種によって形態変化に差異のあることが明らかになった。

### はじめに

視床下部は間脳下部の狭い領域であるが、多くの神経核を有し、脳や脊髄との関連が深いことから自律神経機能の調節中枢とも呼ばれ、恒常性の維持に関与している。また、この部位は下垂体とも関係し、内分泌機能にも深く関わっている。内分泌機能に関わる主なものは、室傍核 paraventricular nucleus (PVN) と視索上核 supraoptic nucleus (SON) で産生されるバソプレシンが軸索流によって正中隆起 median eminence (ME) を経由して、下垂体後葉へ輸送され後葉の毛細血管に放出され抗利尿作用を行う視床下部下垂体系 (hypothalamo-hypophysial tract; HHT) である<sup>1,2)</sup>。

一方、視床下部への求心性線維の中で網膜からの投射は、様々な生理現象の概年リズムの中核とされている視交叉上核への投射、この核からのPVN, SONへの投射、さらに網膜から直接PVN, SONへの投射が明らかになっている<sup>3,4,5)</sup>。これらの構造が生体リズム

形成に重要な役割をなしていると考えられる。概年リズムの一つである冬眠は、厳しい環境に対応するために心拍数、呼吸数、体温といった生体情報を極端に低下させることでエネルギー消費を抑えている<sup>6,7)</sup>。

PVNからの線維は、核内から外側方向に向かい、その後、腹側に向かい内側に方向を転じて後方から下垂体に入る<sup>1)</sup>。

下垂体に向かう線維を移動する分泌顆粒は、途中ヘリング小体 (HB) を形成し軸索流によってか脳下垂体後葉に運ばれる<sup>8,9)</sup>。本研究は、このHBの概年リズムによる季節ごとの形態的变化を明らかにし、冬眠から覚醒の際のaVPとmEnkのはたらきについて形態学的に検討した。

### 方法と材料

#### 1. 動物

キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) (体重：17.3~34.8 g, 雄20匹), シマリス

\* 秋田大学大学院医学系研究科保健学専攻作業療法学講座

\*\* 秋田大学医学部解剖学第二講座

\*\*\* 中国広州大学生命科学部

Key Words: 概年リズム  
神経線維  
視床下部  
免疫組織化学  
電子顕微鏡

(*Tamias sibiricus aciatics*) (体重: 70~100 g, 雄15匹) を用いた。キクガシラコウモリは、環境省の許可を得て男鹿市門前の海蝕洞で採集した。キクガシラコウモリの冬眠状態の個体は、自然環境下での冬眠期(10月~翌年4月)の動物を使用した。シマリスは、飼育したものをを用い、気温と明暗の調節を行い自然環境に近い条件で冬眠状態に導いたものをを用いた。動物実験は「秋田大学動物実験指針」に準じて行われた。

## 2. 固定, 切片作成

非冬眠の動物はネンブタール (sodium pentobarbital; 25mg/Kg) での腹腔内麻酔を施し、冬眠状態の動物は、覚醒を防ぐために無麻酔 (低温麻酔状態) 下で灌流固定を行った。灌流固定はカニューレを左心室から上行大動脈に挿入し、心室部を鉗子で結紮し行われた。はじめに生理食塩水 (10~15ml: 10~15ml/分), ついで固定液 (100~150ml: 10~15ml/分) で灌流した。固定液は4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid を0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解したものをを用いた。1時間後、脳を取り出し、灌流固定液と同じ溶液で一晩浸漬固定を行った。

免疫染色のための切片は、Vibratome で50  $\mu$ m 厚の冠状断の連続切片を作成した。

電子顕微鏡試料は、灌流固定後1%オスミウム酸で後固定後、脱水しエポキシ樹脂で包埋した。薄切は600nm 厚で行い、酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染

色を行って観察した。

## 3. 免疫反応

免疫反応は全ての過程が Free flow で、peroxidase-antiperoxidase method (PAP 法) を用いて行った<sup>10)</sup>。はじめに、0.01M リン酸緩衝食塩水 (PSA) で洗浄, 0.3% 過酸化水素水で内在性の peroxidase をブロックした後に第1抗体 (アルギニンバソプレシン, メチオニンエンケファリン: 1000倍希釈) に0.5% albumin bovine (Sigma, USA, normal goat serum; Vector, USA) を pH 7.4の0.01M PBS に溶解し, 4 で3日間反応を行った。0.01M PBS で洗浄後, 第2抗体; goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research, USA) を PBS で200倍に希釈し, 室温で2時間反応を行った。0.01M PBS で洗浄後, peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) (Dacopatts, Denmark) を0.01M PBS で200倍に希釈し, 2時間反応を行った。50mM トリス塩酸緩衝液で洗浄置換後, 0.05% diaminobenzidine (Sigma, USA) を50mM トリス塩酸緩衝液と0.01% 過酸化水素水で5~8分反応し, 可視化した。切片は amino-alkylsilane でコーティングされたスライドガラスに貼付し, エタノール系列 (50~100%) で脱水後, Permount (Fisher, USA) で封入した。

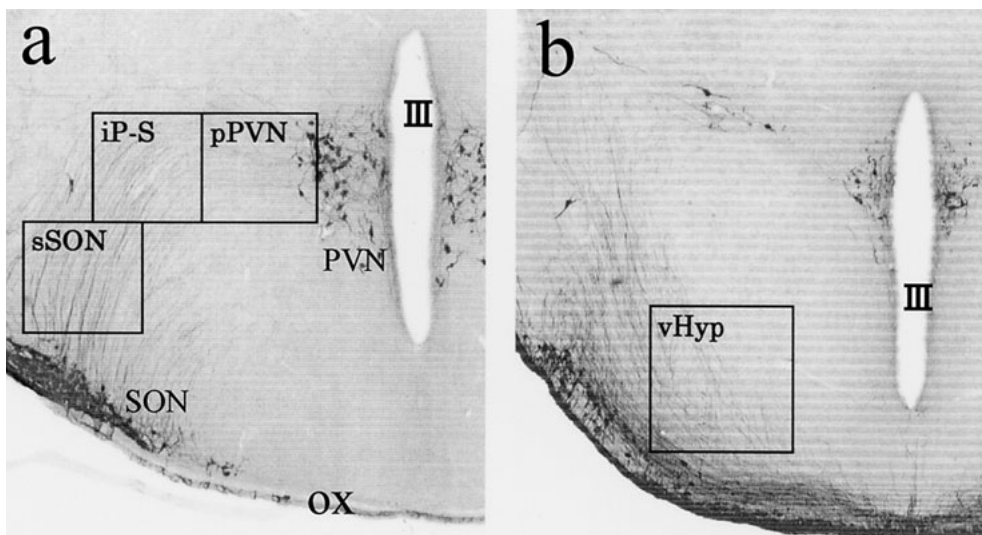


Fig.1; Arginine Vasopressin immunoreactivity in the area of the hypothalamus during the hibernating bat. a: Anterior region showing the coronal section at the level of mid paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON). b: Posterior region showing the coronal section level of paramedian eminence. square pPVN: para-PVN. square iP-S inter-PVN and SON. square sSON: superior-SON. square vHyp: ventral-hypothalamus. ; third ventricle, OX; optic chiasm,

#### 4. 計 測

非冬眠期と被冬眠期の視床下脳下垂体路のHBの大きさの変化を比較するためにaVPとmEnkそれぞれの免疫陽性HBの大きさを1,600倍の写真上で計測した。

#### 結 果

##### 1. 免疫組織化学による観察

キクガシラコウモリ及びシマリスの視床下部下垂体路(hypothalamo-hypophysial tract; HHT)神経線維は、アルギニンヴァソプレシン(aVP)とメチオンエンケファリン(mEnk)の抗体を用い、PAP法で免疫染色して観察した。HHTの神経線維は、概年

リズムによってリング小体(HB)の顕著な大きさの変化を示した(Figs.1-9)。

概年リズムを非冬眠期と冬眠期に分けて神経線維のHBの大きさを短径(軸索の横断径)を計測して比較した(Figs.6-9)。キクガシラコウモリでは、冬眠期(10月後半から翌年4月半)については、初期(10月後半から12月前半, early hibernation; eH)、中期(12月後半から2月前半, middle hibernation; mH)後期(2月後半から4月前半, late hibernation; lH)に分けて計測し、シマリスは非冬眠期(non hibernation; nH)と冬眠期(hibernation; H)に分けて計測した。また、キクガシラコウモリでは、HHTの免疫陽性神経線維を室傍核と視索上核の間を室傍核近傍(para-paraventricular nucleus; pPVN)、室傍核と

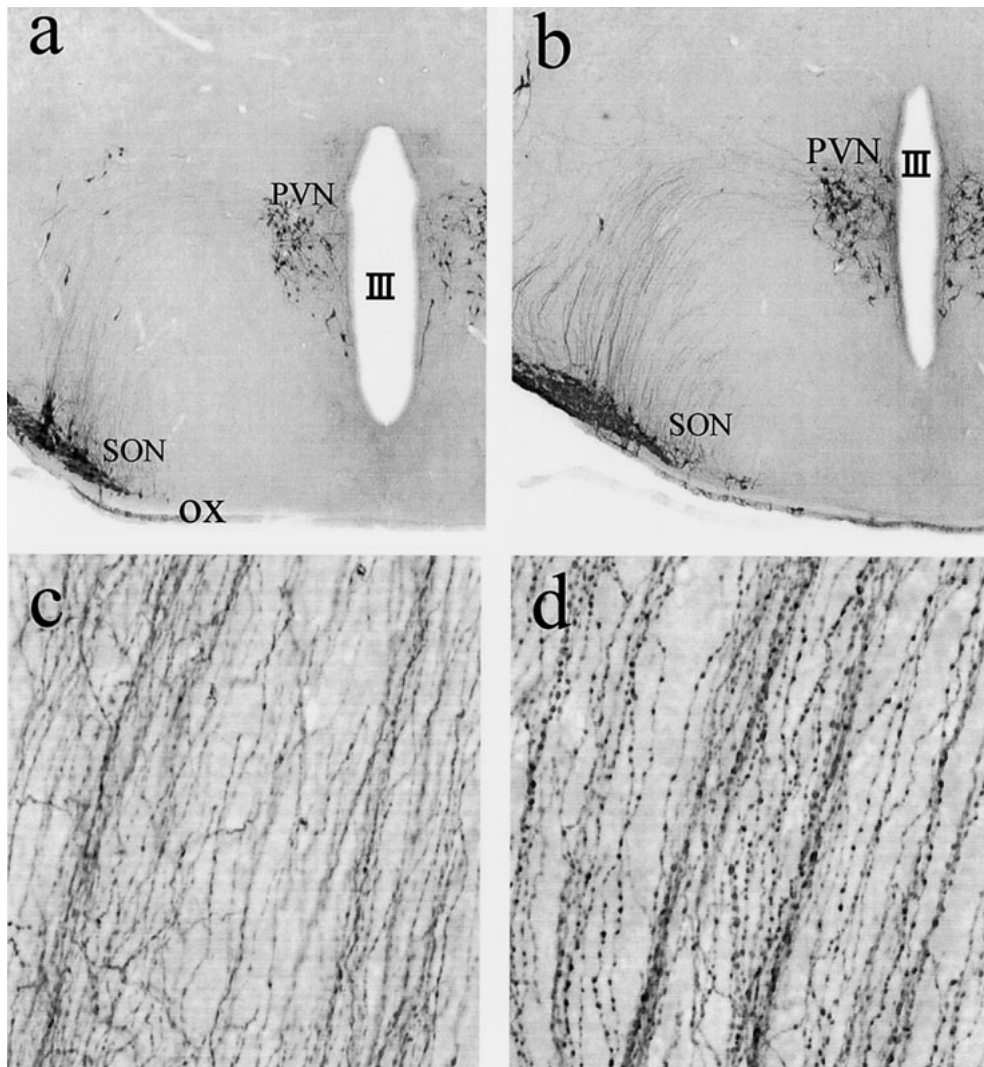


Fig.2; Arginine Vasopressin immunoreactive cell bodies and fibers in the anterior hypothalamus with paraventricular nucleus; PVN and supraoptic nucleus; SON during the non-hibernating(a, c=high magnification of HHT fibers with HB) and hibernating(b, d=high magnification of HHT fibers with HB) bat. OX; optic chiasm,

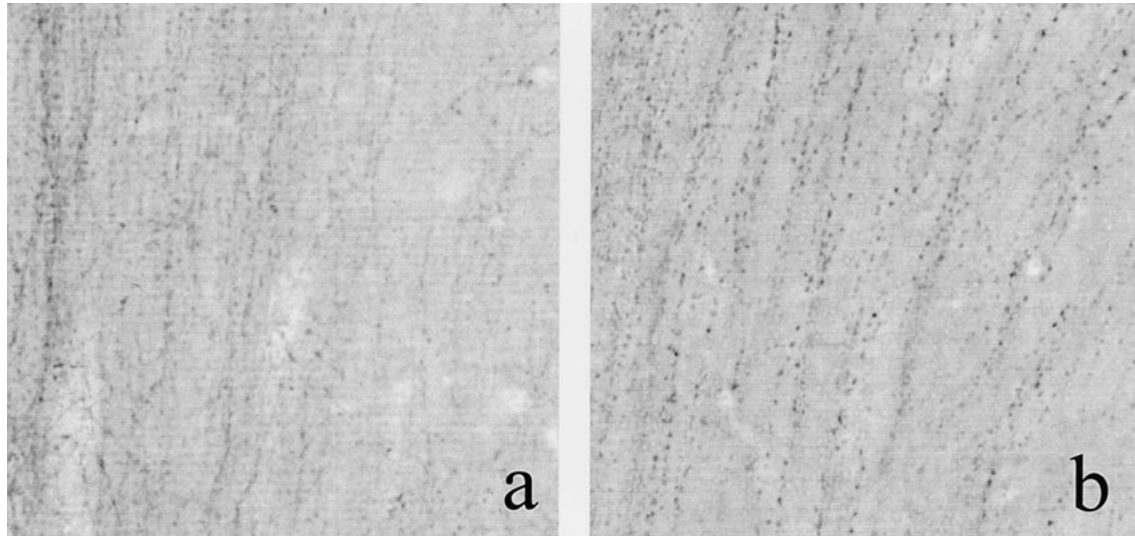


Fig.3; High magnification photographs of methionine Enkephalin immunoreactive fibers with HB during the non-hibernating(a) and hibernating(b) bat. Note the remarkable Herring bodies on the photograph b.

視索上核の中間部 (inter-paraventricular nucleus and supraoptic nucleus; iP-S), 視索上核上部 (superior-supraoptic nucleus; sSON), そして正中隆起近傍の視床下部腹側部 (ventral-hypothalamus, vHyp) に分けて HB の短径を計測して概年リズムによる大きさの変化を比較した (Fig.1a, b). HB の径が  $0.4\ \mu\text{m}$  から  $3.4\ \mu\text{m}$  で切片の厚さが  $50\ \mu\text{m}$  さらに、線維上の HB のみを計測することで計測した径が実際の径であるとした。

aVP 及び mEnk 陽性線維の HB 体は、いずれも非冬眠期に比べて冬眠期の各期間で径の大きな HB の割合が大きかった (Figs.2-6, 8)。

キクガシラコウモリにおける aVP 免疫陽性 HB の大きさは、非冬眠期 ( $n = 264$ ) においては径  $0.9\ \mu\text{m}$  の HB がほぼ半数を占め、最大でも径が  $1.4\ \mu\text{m}$  が 5% 程度を占めるのみであった。eH ( $n = 230$ ) では、 $0.9\ \mu\text{m}$  のものが 45% と  $1.0\ \mu\text{m}$  の 35% とわずかに非冬眠期のものより大きいものがあった。mH ( $n = 299$ ) では、 $1.2\ \mu\text{m}$  のものが 22.5% で最も多く、さらに、 $1.2\ \mu\text{m}$  から  $2.2\ \mu\text{m}$  のものが 10% 前後あり、nH, eH に比べて大きいものが増加していた。IH ( $n = 175$ ) では、 $0.9\ \mu\text{m}$ ,  $1.0\ \mu\text{m}$ ,  $1.2\ \mu\text{m}$  のものがそれぞれ 20% 前後を占め、大きいものでも  $1.8\ \mu\text{m}$  のものが 5% 以下であった (Fig.5)。

キクガシラコウモリの mENK 免疫陽性 HB の大きさは、非冬眠期 ( $n = 141$ ) において、 $0.8\ \mu\text{m}$  のものが約 45% で多く、次いで、 $1.0\ \mu\text{m}$  のものが約 30% で、 $1.2\sim 1.6\ \mu\text{m}$  のものが 5% 以下であった。eH ( $n = 138$ ) においては、 $0.8$ ,  $1.0\ \mu\text{m}$  のものが、約 35% で、

$1.2\ \mu\text{m}$  のものが約 10% で、最大が  $1.6\ \mu\text{m}$  でわずか 0.5% であった。mH ( $n = 209$ ) では、 $1.0\ \mu\text{m}$  のものが約 30% で最も多く、 $1.2\sim 1.6\ \mu\text{m}$  のものが約 20% から 10% で、最大のもは、 $1.8\ \mu\text{m}$  で 5% 以下であった。IH ( $n = 246$ ) においては  $0.8\ \mu\text{m}$  のものが約 30% と最も多かったが、 $1.0\ \mu\text{m}$  と  $1.2\ \mu\text{m}$  のものを合わせると約 50% を占め僅かに小型のほうにシフトしていた (Fig.6)。

キクガシラコウモリの冬眠期における HHT での HB の大きさの部位差は、pPVN ( $n = 172$ ) では  $1.0\ \mu\text{m}$  のものが約 35% と多く、iP-S ( $n = 121$ ) では、 $1.4\ \mu\text{m}$  が約 20% で最も多かった。sSON ( $n = 231$ ) と vHyp ( $n = 135$ ) では、 $1.2\ \mu\text{m}$  と  $1.4\ \mu\text{m}$  がそれぞれ約 20% と 15% と多く、 $1.6\sim 3.4\ \mu\text{m}$  までのものが 10% から 5% 前後と数はそれほど多くはないが、大きいものが目立っていた。注目すべきは vHyp で  $2.6\ \mu\text{m}$  と  $3.2\ \mu\text{m}$  のものが 5% 前後観察された (Fig.7)。

シマリスにおける非冬眠期と冬眠期との比較では、非冬眠期では  $0.8\ \mu\text{m}$  が半数以上を占め、 $1.0\ \mu\text{m}$  のものと合わせると、80% 以上になった。一方、冬眠期では  $1.0\ \mu\text{m}$  のものが約 35% と最も多く  $1.2\ \mu\text{m}$ ,  $1.4\ \mu\text{m}$ ,  $1.6\ \mu\text{m}$  のものがそれぞれ約 20%, 10%, そして 5% で合わせると約 35% を占めていた (Fig.8)。

## 2. 電子顕微鏡観察

冬眠期における HHT の神経線維を電子顕微鏡で観察すると、HB の内部には、直径  $100\sim 200\text{nm}$  の分泌顆粒が集積しているのが観察された (Fig.9)。HB 以外の軸策では、分泌顆粒はまれにしか観察されなかつ

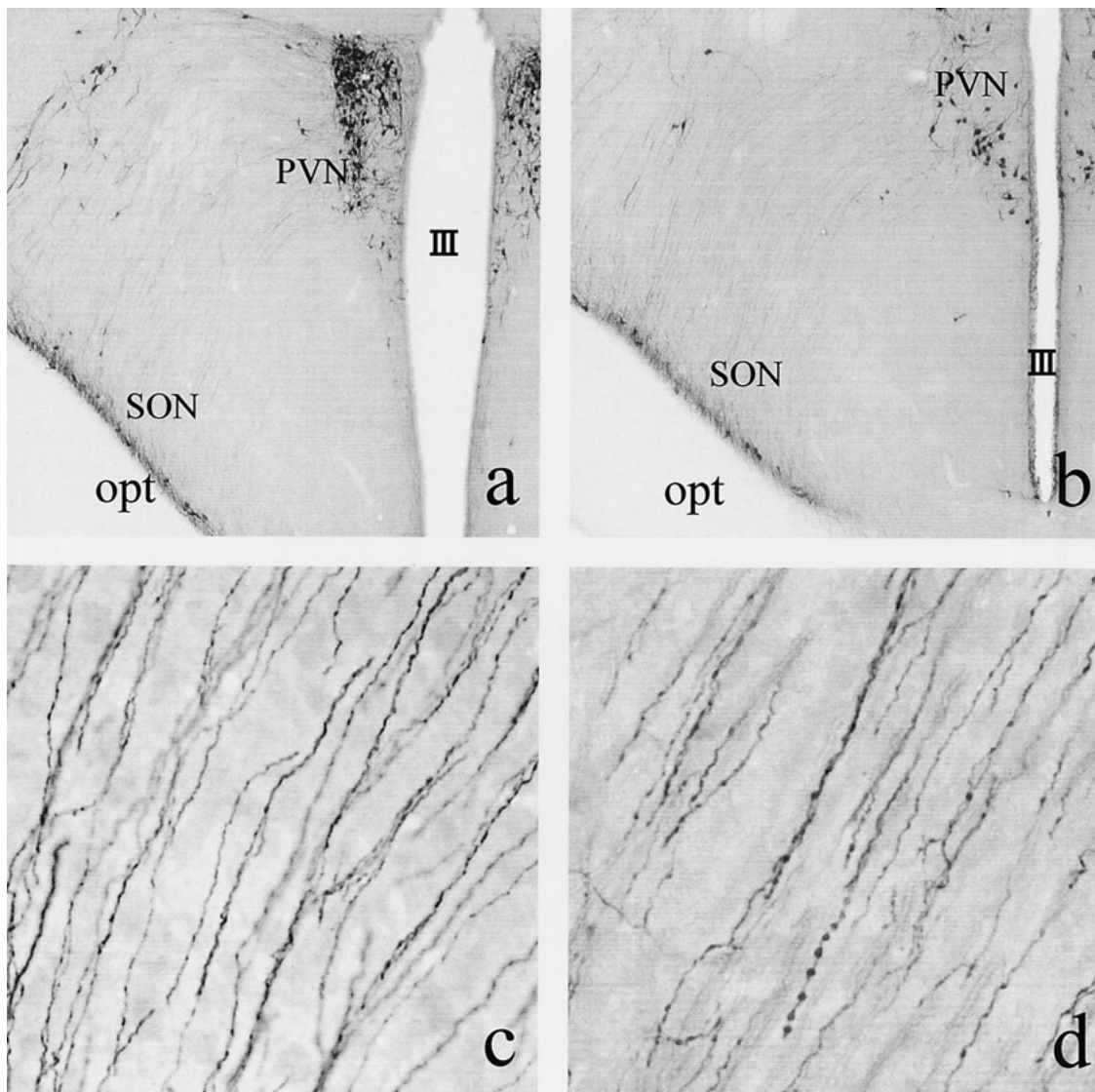


Fig.4; Arginine Vasopressin immunoreactive in the area of the hypothalamus during the non-hibernating (a, c=high magnification) and hibernating (b, d=high magnification) chipmunk. PVN; paraventricular nucleus, SON; supraoptic nucleus. ; third ventricle, opt; optic tract.

た (Fig.9; arrow head). 冬眠期におけるHBは、遠位部でしばしば径の大きいものが観察された (Fig.9; arrow).

## 考 察

概年リズムと視床下部下垂体路 (hypothalamo-hypophysial tract; HHT)は、密接に関わりをもっている。特に、視床下部の神経分泌核である室傍核と視索上核は体内の水分の調節に深い関わりがある<sup>11)</sup>。概年リズムの一つである冬眠は、様々な生理機能を低下させて環境に適応しているが、エネルギーの消費の削減だけではなく体内の水分の調節も変化している。室傍核、及び視索上核で分泌されるヴァソプレシン

(VP)は、下垂体後葉から血液中に放出され、腎臓内の尿細管系の上皮細胞の受容体を介して水分再吸収によって調節を受けている<sup>12,13)</sup>。冬眠から覚醒の際には、生理機能が急激に通常値に復帰することが知られている<sup>14)</sup>が、水分量の調節機構も例外ではない<sup>15)</sup>。本研究において、VP免疫陽性ヘリング小体(HB)が非冬眠期から冬眠期の季節の進行と伴にその大きさが変化し、冬眠半ばで最大となり後半では僅かに小さくなるといった変化を示した。この免疫組織学的及び電子顕微鏡的観察からHBにVPの集積がなされ、その後もともどることが明らかになり、HHTの概年リズムへの深い関わりが示唆された。

視床下部で産生され、軸索流で運ばれる分泌顆粒は、多くの動物で $100 \sim 300 \mu\text{m}^2$ であるが、キクガシラコ

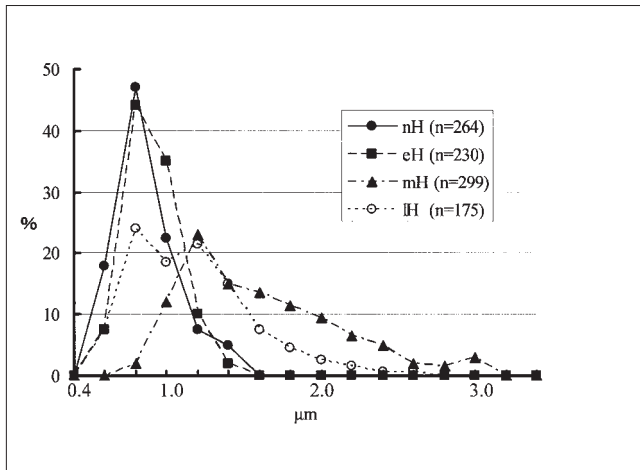


Fig.5; Seasonal changes of the diameter of arginine vasopressin immunoreactive Herring bodies during non-hibernating(nH), early hibernating(eH), middle hibernating(mH), and late Hibernating(IH) bats.

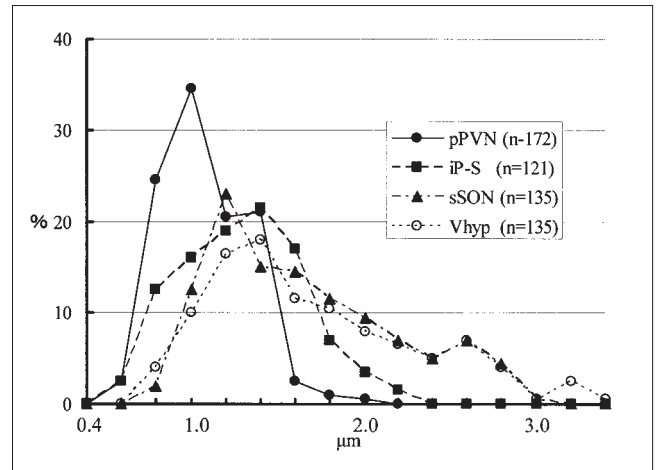


Fig.7; Regional changes of the diameter of arginine vasopressin immunoreactive Herring bodies during hibernating bats. pPVN; para-paraventricular nucleus, iP-S; inter-paraventricular nucleus and supraoptic nucleus, sSON; superior-supraoptic nucleus, vHyp; ventral-hypothalamus.

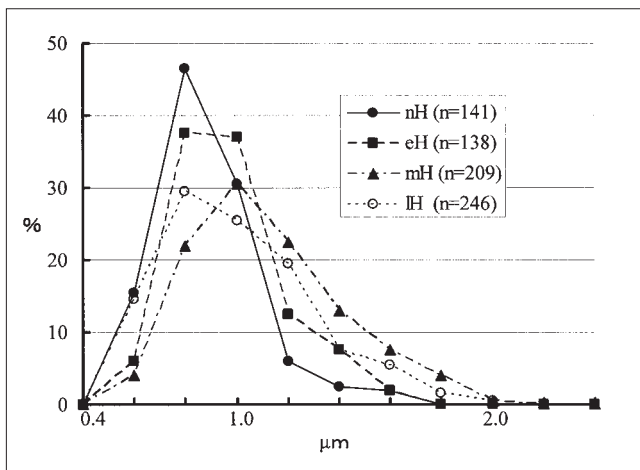


Fig.6; Seasonal changes of the diameter of methionine enkephalin immunoreactive Herring bodies during non-hibernating(nH), early hibernating(eH), middle hibernating(mH), and late Hibernating(IH) bats.

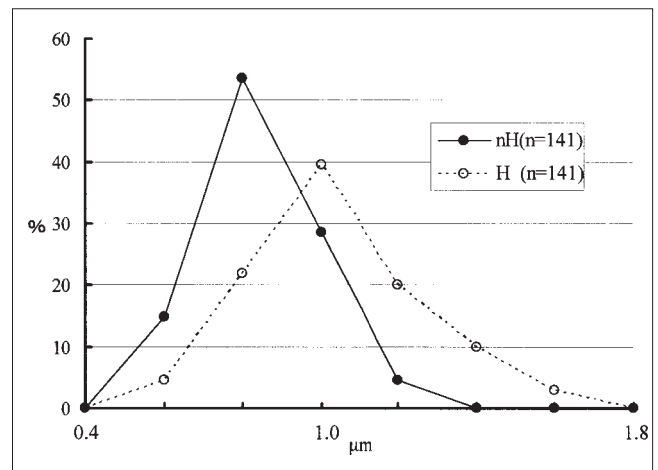


Fig.8; Seasonal changes of the diameter of arginine vasopressin immunoreactive Herring bodies during non-hibernating(nH), and hibernating(H) chipmunk.

ウモリでは100~200  $\mu\text{m}$  とわずかに小さかった。しかし、HB への集積は電子顕微鏡の観察から多くの動物の場合と同じであった。これまで HB への集積形態の季節的な変化については記載がなかったが、HB が顕著に現れる冬眠の過程を経時的に観察することで、集積が一定の部位で集中的に起こるのではなく不規則に起こることが明らかにされ、経時的に大きさを変化させ、位置的にも経時的に移動させることから、冬眠から覚醒への準備であることが示唆された。

HHT での HB を伴った VP 陽性部位は、神経線維と HB に顕著に観察されたが、エンケファリン

(Enk) 陽性部位は、神経線維では明確ではなく、HB にも VP 陽性の標本ほど顕著ではなかったが、非冬眠期と冬眠期での大きさには明らかな差が観察された。Enk などのオピオイドの VP 分泌への関与は、エンドルフィンやエンケファリンが食塩負荷によって血漿の VP 濃度を上昇させるという報告<sup>16)</sup>や、ヒトでオピオイドが VP 分泌を促進するという報告<sup>17,18)</sup>が示すように、Enk が VP の分泌と深く関わっている。本研究の Enk 免疫陽性部位の非冬眠期と冬眠期で、VP 陽性標本と同様に HB の形態の変化を示すという結果は、HHT においても Enk が VP の分泌促進に深く

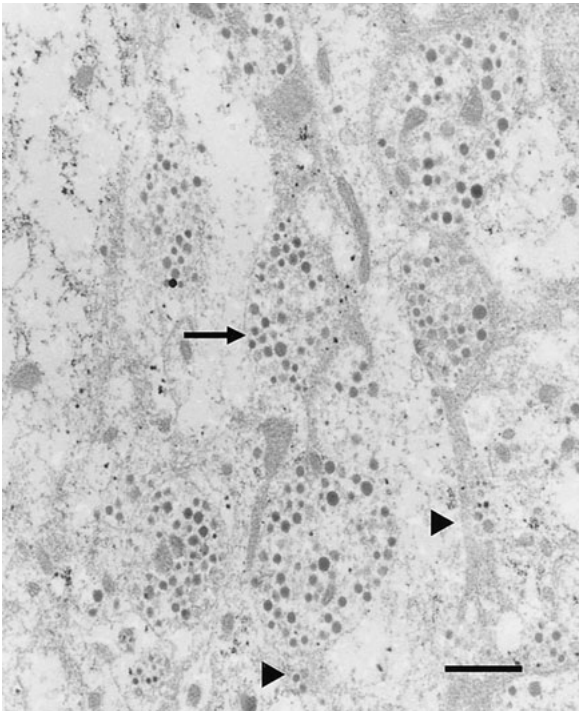


Fig.9; Electron micrograph of longitudinal section of axons containing numerous neurosecretory granules. arrow; Herring body showed large diameter at the distal region, arrow head; Neurofiber contained slightly secretory granules, Scal bar = 1  $\mu$ m

関わっていることを示唆している。

## 文 献

- 1) Wang, LCH; Hibernation and the endocrine. Hibernation and Torpor in mammals and birds eds. Lyman, CP, Willis, JS, Malan, and Wang, LCH, London, Academic Press, 1982, pp206-236
- 2) Watts, AG: Structure and function in the conceptual development of mammalian neuroendocrinology between 1920 and 1965. BRESR-100778; No. of pages; 31 4C: 7, 11, 2010
- 3) Hendrickson, AE et al.: An autoradiographic and electronmicroscopic study of retino-hypothalamic connections. Z Zellforsch 135: 1-26, 1972
- 4) Moore, RY Lenn, NJ: A retiohypothalamic projection in the rat. J Comp Neurol 146: 1-14, 1972
- 5) Schaechter, JD Sadun, AA: A second hypothalamic nucleus receiving retinal input in man: The paraventricular nucleus. Brain Res 340: 243-250, 1985
- 6) Kallen, FC: The cardiovascular system of bats; structure and function. The biology of bats. Vol 3 ed. Wimsatt Academic Press, New York 1977, pp289-483
- 7) Reit, OB Davis, WH: Thermoregulation in bats exposed to low ambient temperature. Proc Soc Exp Biol Med 121: 1212-1215, 1966
- 8) Ferris, CF et al.: Vasopressin immunoreactivity in the anterior hypothalamus is altered during the establishment of dominant/subordinate relationship between hamsters. Neurosci 29: 675-683, 1989
- 9) Pow, DV Morris JF: Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohypophysial peptides by exocytosis. Neurosci 32: 435-439, 1989
- 10) Sternberger, LA: The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. Immunocytochemistry 3rd ed. John Wiley and Sons, New York, 1986, pp. 90-209
- 11) Verbalis, JG Robinson AG: Neurophysin and vasopressin; newer concepts of secretion and regulation. The pituitary gland Imura, H ed, Raven Press, New York. pp307-339, 1985
- 12) Brownstein MJ et al: Synthesis, transport and release of posterior pituitary hormones. Science 207: 373-378, 1980
- 13) Robertsson, G Athar, S: The interaction of blood osmolality and blood volume in regulating plasma vasopressin in man. J Clin Endocri Metab 42: 613-620, 1976
- 14) Kondo, N et. al: Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. Cell 125: 161-172, 2006
- 15) Thrasher TN et al: Thirst and vasopressin release in the dog; an osmoreceptor or sodium receptor mechanism? Amer J Physiol 238: 333-339, 1980
- 16) Rossier, J et al: Hypothalamic enkephalin neurons may regulate the neurohypophysis. Nature 277: 653-655, 1979
- 17) Lightman, SL Forsling, ML: Evidence for endogenous opioid control of vasopressin release in man. J Clin Endocri Metab 50: 569-571, 1980
- 18) Miller, M: Role of endogenous opioids in neurohypophyseal function of man. J Clin Endocrin Metab 50: 1016-1019, 1980

## Morphological and seasonal changes in the nerve fibers on the hypothalamo-hypophyseal tract at a circannual rhythm

Kazuo OHTOMO\* Kohko FUKUHARA\*\* Yi WU\*\*\*

\* Department of Occupational therapy, Akita University Graduate School of Health Sciences,

\*\* Department of 2<sup>nd</sup> Anatomy, Akita University School of Medicine

\*\*\* College of Life Science, Guangzhou University, China

Various physiological activities decline and energy metabolism is suppressed in hibernation, one part of the circannual rhythm. Recent experiments have suggested that the hypothalamo-hypophyseal tract (HHT) plays a significant role in the neural control of hibernating rhythms. The HHT is primarily concerned with the secretion of neurosecretory hormones in the hypothalamus. The morphological and seasonal changes of immunopositive nerve fibers arginine vasopressing (aVP) and methionine enkephalin (mEnk) in the HHT were observed immunohistochemically and analyzed by computer microscopic image analysis. It was clear that mEnk participated in these changes. It was also clear that there is a disparity in HB morphological change depending on the species of hibernator.