

原著：秋田大学医短紀要 7：109-116, 1999.

冬眠動物における頸動脈小体の季節変化について

Seasonal changes on the carotid body in the hibernatable animals

大友和夫* 福原紅子** 吉崎克明*

Kazuo OHTOMO* Kohko FUKUHARA** Katsuaki YOSHIKAZAKI*

ABSTRACT:

The carotid body as an arterial chemosensory organ regulates respiration, and its parenchymal cells contain several neuropeptides. Therefore, it would be of interest to identify differences in the physiological state and the distribution of several neuropeptides between hibernating and non-hibernating animals. We examined immunohistochemically the distribution of several neuropeptides in the carotid bodies of two mammalian species to study the role of the organ in the hibernation, focusing on differences in the vital signs between the hibernation and nonhibernation periods.

Hibernation represents a physiological adaptation to the severe environment during winter. Vital signs such as respiration rate, heart rate and body temperature in hibernating animals are markedly decreased and the depression and heart rate in particular could result in hypoxia.

Respiration rate and heart rate during hibernation were less than one tenth of those during non-hibernation.

Intense immunoreactivities for tyrosine hydroxylase(TH) and glutamate(Glu) was observed as small groups in the glomus cells of the carotid body during the non-hibernation phase. In the hibernating animals, mild. methionin-enkephaline(Met-Enk) immunoreactivities were evident in almost all glomus cells and some nerve fibers.

In the electron microscopic observation, the visible difference of the size and morphology observed the mitochondria in glomus cells of the both animals.

秋田大学医療技術短期大学部

*総合基礎教育

**秋田大学医学部 解剖学第二講座

Key Words : carotid body,

hibernation,

immunohistochemistry,

electron microscopy

はじめに

頸動脈小体は内、外頸動脈の分岐部に存在する卵円形の小体である。この小体は血中の酸素と二酸化炭素の分圧などが適当刺激となる呼吸運動反射に関与する化学受容体(chemoreceptor)と考えられている。小体内には主細胞(chief or glomus cells), 支持細胞(sustentacular cells)と舌咽, 迷走, 交感神経に由来する神経終末との特異な複合体をつくり, 洞様血管が豊富に分布しそれらは糸球(mini-gloma)¹を形成し, さらに結合組織性被膜から進入する結合組織性中隔によって小葉に分けられている。

一方, 冬眠動物における冬眠現象は, 冬の間の過酷な自然環境への適応であり, 様々な生理学的現象の劇的な変化を伴う。その中の1つに呼吸数の減少が上げられる。その回数は非冬眠期のその数十分の1程度まで減少する²。これは少なからず生体内で一種の酸素欠乏症(hypoxia)を引き起こしていると考えられる。

このような生理学的現象の変化が化学受容体としての頸動脈小体の中でどのような変化を示すか, 数種ペプチドの変化を免疫組織学的にさらに特に主細胞の変化を超微細構造学的に観察した。

これまでに中枢神経系においては, 様々なペプチドの局在に関する季節変化についての報告がなされてきたが, 化学受容器である頸動脈小体における季節変化の報告はなく, 類似した生理現象と考えられる酸素欠乏状態での様々な変化についての報告がある。

材料と方法

男鹿市門前の海蝕洞で環境庁の許可を得て採集されたキクガシラコウモリ(*Rhinolophus ferrumequinum*)の雄(体重: 19.5~23.5g)25匹とシマリス(*Tamias sibiricus aciacicus*)の雄(体重: 85~110g)20匹が使用された。コウモリの冬眠状態の個体は自然環境での冬眠期(10月から翌年4月まで)の動物が使用され, シマリスは実験室で徐々に温度を下げ, 日照時間を短くし, 冬眠状態に導いた動物を使用した。

心臓から直接採取した血液は, acid-base/gas

analyzer (ABL30, Radiometer Copenhagen, Sweden)で血液ガス分圧を測定し, 呼吸数は, strain gauge (D-FAE-5-512 T11, Minebea Co., Japan)をamplifire (AS1201, NEC, Japan)に接続し計測, 体温は, 動物の耳介皮膚温をinfrared-beam type thermometer (SK-8100, Sato Keiryoki, Japan)で計測した。

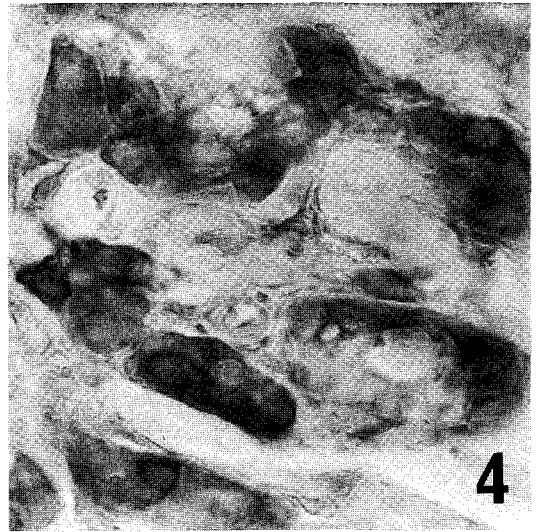
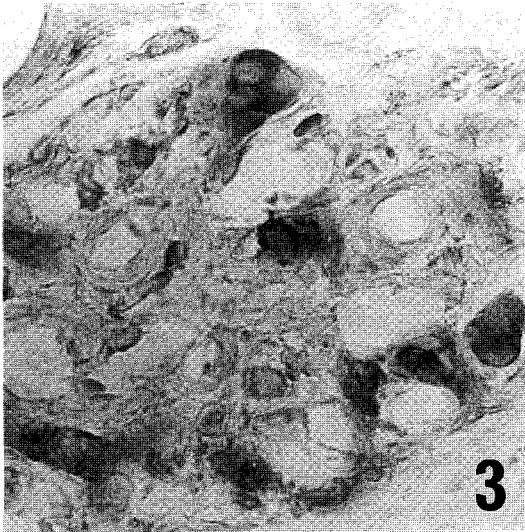
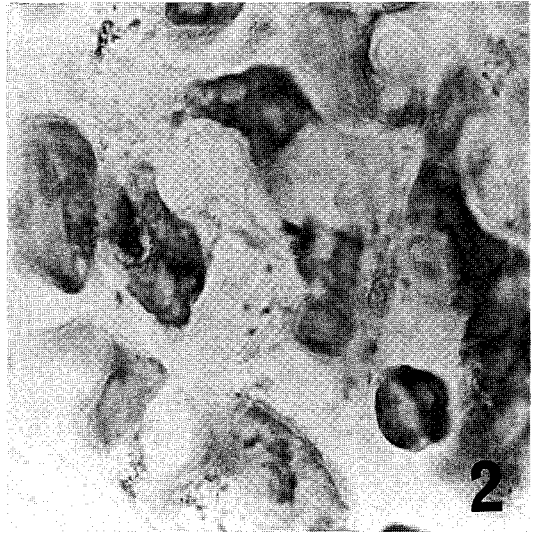
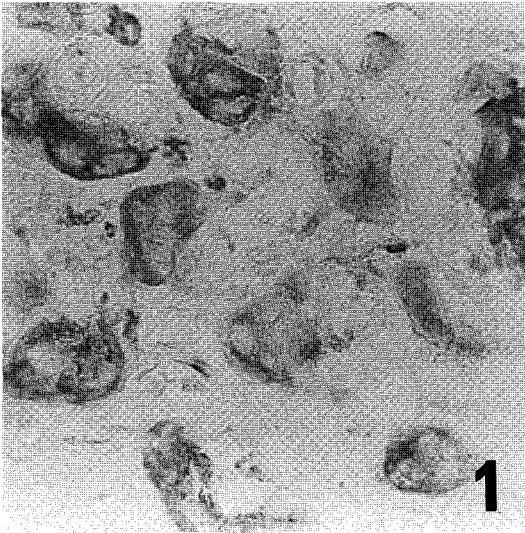
非冬眠期の動物はネンブタール(sodium pentobarbital: 25mg/kg)で腹腔内麻酔が施され, 冬眠動物は覚醒を防ぐために無麻酔(低温麻酔)下で灌流固定が行なった。灌流固定はカニューレを左心室から上行大動脈に挿入し, 心室部を鉗子で結紮して, はじめに生理食塩水(10~15ml), 次いで固定液(100~150ml: 10~15/min)の順で灌流した。固定液は4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid(電顕のためには2% glutaraldehydeを加えた)を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解したものをを用いた。1時間後脳を取り出し, 灌流液と同じ固定液で一晩浸漬固定を行なった。

免疫反応は10 μ mのcryotome切片およびparaffin切片を作製し, peroxidase-antiperoxidase method (PAP法)³を用いて行なった。切片作成後0.01Mリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄, 0.3%過酸化水素水で内在性peroxidaseをブロックした後に1次抗体(TH, Met-Enk, Glu: Chemicon社USAを1000から2000倍希釈に0.5% albumine bovine: Sigma, USA, 3% normal goat serum Vector社, USA, をpH7.4の0.01M PBSに溶解)で4 $^{\circ}$ Cで3日間反応させた。0.01M PBSで洗浄後, 第2抗体(goat anti-rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch社, USA, をPBSで200倍に希釈)を室温で2時間反応させた。0.01M PBSで洗浄後, peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) (Dacopatts社, Denmark, 0.01M PBSで200倍に希釈)を室温で2時間反応させた。50mMトリス塩酸緩衝液で洗浄置換後, 0.05% diaminobentidin (Sigma社, USA: 50mMトリス塩酸緩衝液で0.01%か酸化水素水を含む)を室温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され, エタノール系列(50~100%)

で脱水後 Permount (Fisher 社, USA) で封入し, BH-2 (Olympus 社, Japan) Axiophoto (Zeiss 社, Germany) で観察した。

電子顕微鏡試料は固定, 脱水後, エポンに包埋, 6 μ m の連続切片を作成し, トルイジン青

で染色後光顕で観察, 部位の選定を行ない, 超薄切片を作製後, 酢酸ウランおよび Reynolds の鉛で2重染色を施し観察(1200EX, JEOL, Japan)した。



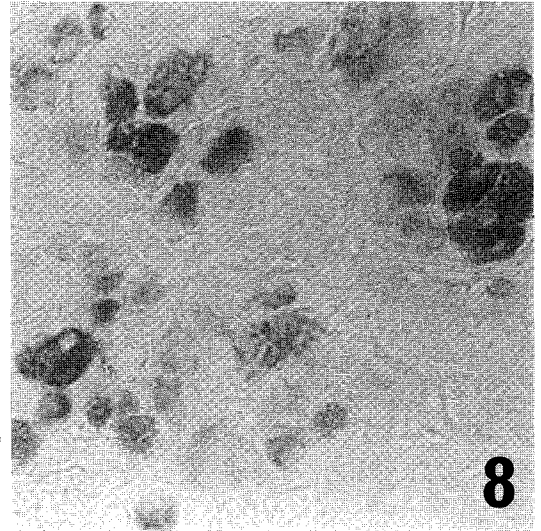
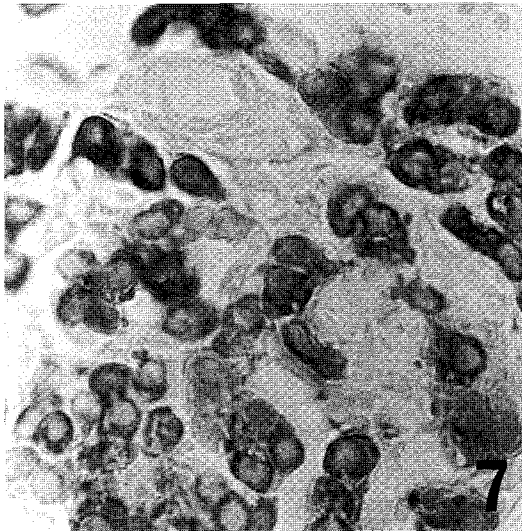
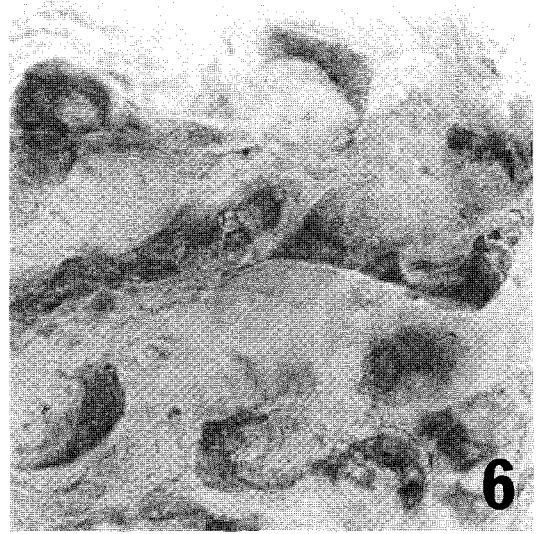
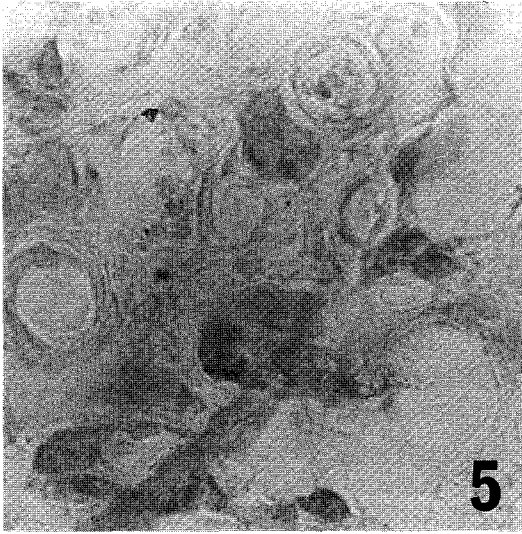
Figs.1 and 2: Photomicrographs showing the changes in TH immunoreactive materials in the carotid body of chipmunks during non-hibernation (Fig.1) and hibernation (Fig.2).
Figs.3 and 4: Photomicrographs showing the changes in Met-Enk immunoreactive materials in the carotid body of chipmunks during non-hibernation (Fig.3) and hibernation (Fig.4).

結 果

1) 生理学的結果

非冬眠期におけるシマリスの血中酸素分圧が150mmHg (n = 1) であるのに対し、冬眠期においては119.4mmHg (未補正) であった。冬眠

から覚醒過程での心拍数および呼吸数の計測の結果 (n = 1), 体温10.5℃ では、それぞれ毎分42回と33回, 体温18.2℃ では、毎分420回と216回であった。体温の上昇は40から45分で10.0℃ の上昇であった。



Figs 5 and 6: Photomicrographs showing the changes in Glu immunoreactive materials in the carotid body of chipmunks during non-hibernation (Fig.5) and hibernation (Fig.6).

Figs 7 and 8: Photomicrographs showing the carotid body of hibernating horse shoe bat exhibiting TH- (Fig.7) and Glu- (Fig.8) immunoreactivity.

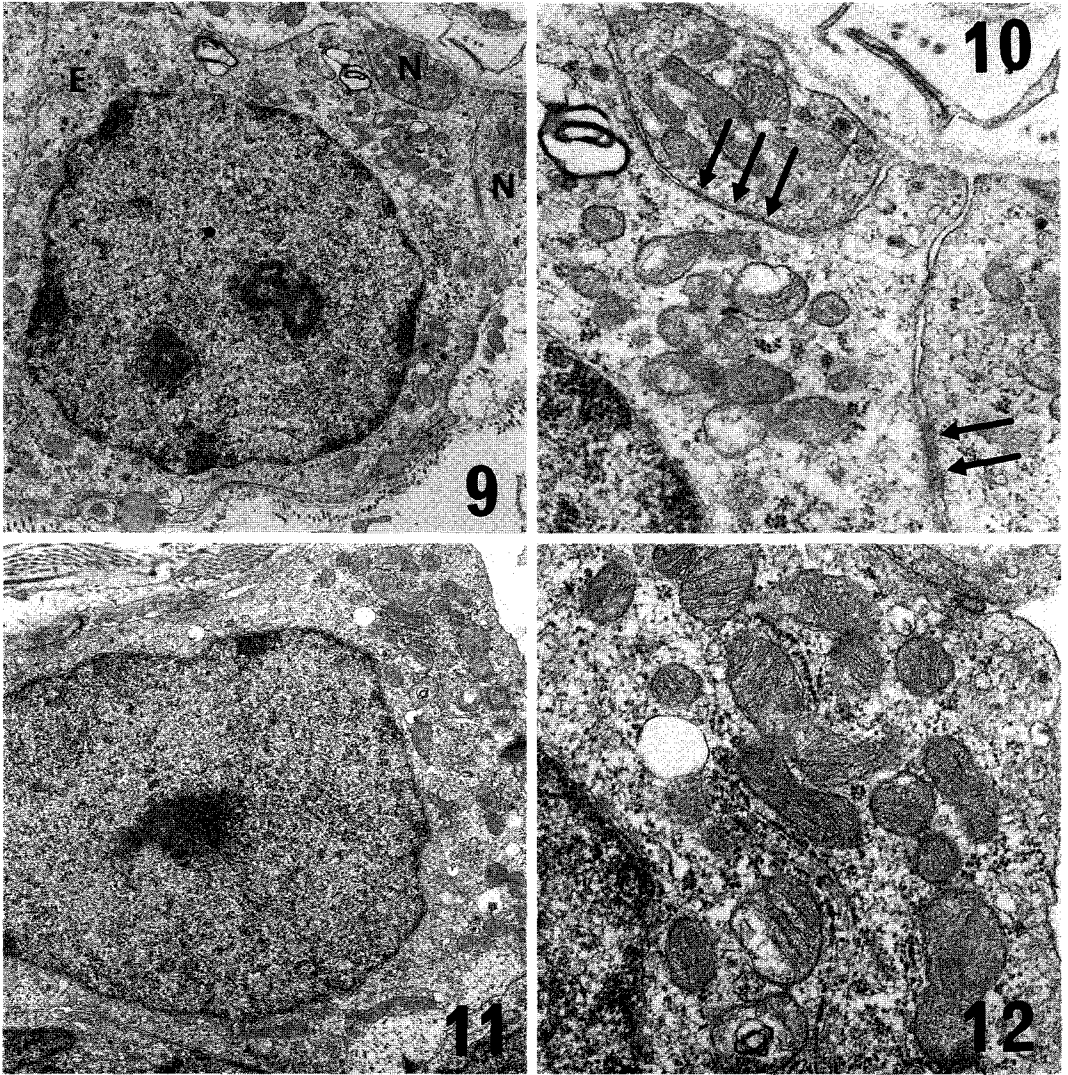


Fig.9: Electron micrograph of a glomus cell of a non-hibernating chipmunk. Note the electron dense-cored vesicles (E) in the glomus cell and large nerve ending (N). x10,000

Fig.10: High magnification electron micrograph of the cytoplasmic area occupied by mitochondria showed in the Fig.9. The cytoplasmic membrane of glomus cell contacted by a terminal button (arrow). x30,000

Fig.11: Electron micrograph of a glomus cells of a hibernating chipmunk. Note a large number of mitochondria accumulated on the one side. X10,00

Fig.12: High magnification electron micrograph of the cytoplasmic area occupied by large mitochondria showed in the Fig.11. x30,000

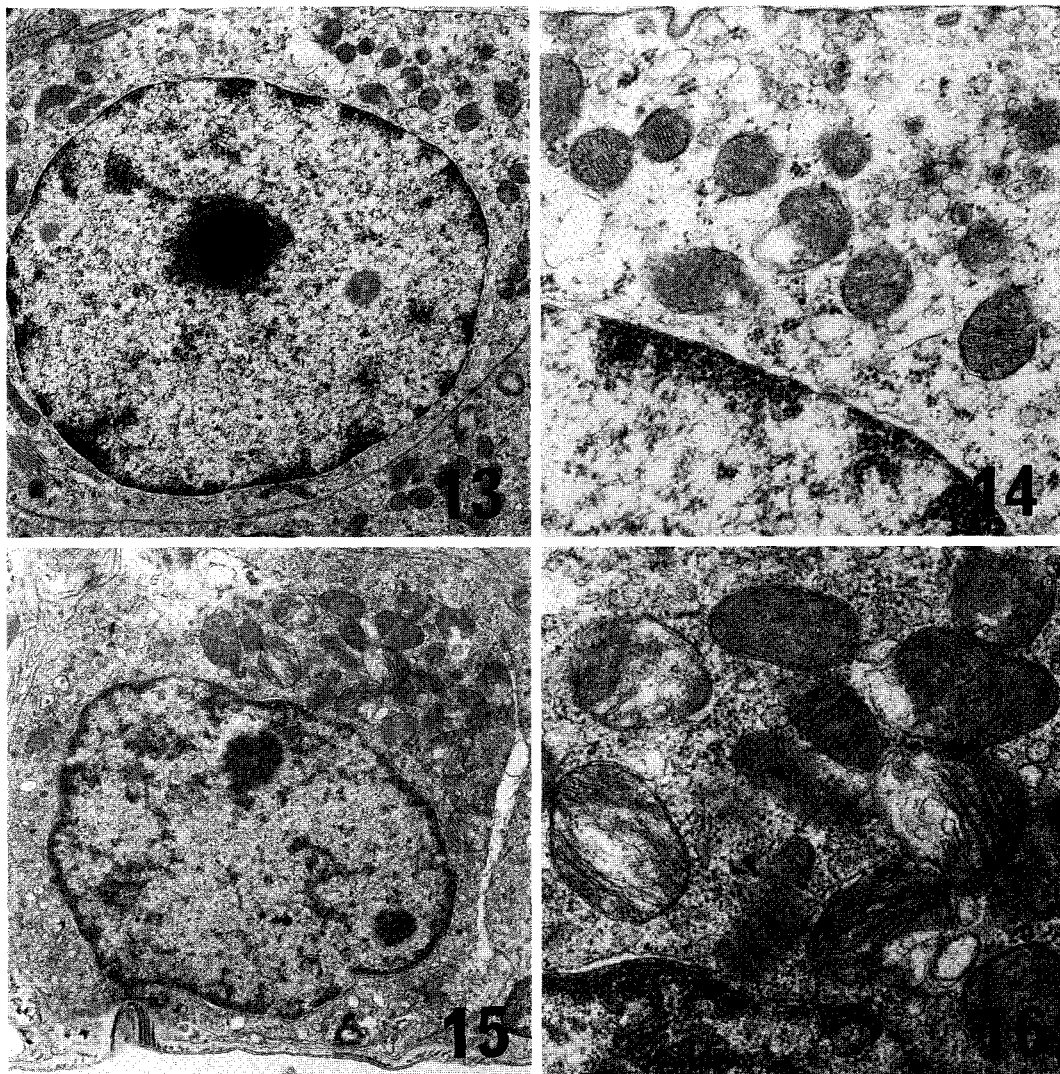


Fig.13: Electron micrograph of a glomus cell of a non-hibernating horse shoe bat. Note the mitochondria scattered in the cytoplasm of the glomus cell. x10,000

Fig.14: High magnification electron micrograph of the cytoplasmic area occupied by mitochondria showed in the Fig.13. x30,000

Fig.15: Electron micrograph of a glomus cell of a hibernating horse shoe bat. Note the accumulation of large mitochondria. x10,000

Fig.16: High magnification electron micrograph of cytoplasmic area occupied large mitochondria showed in the Fig.15. x30,000

2) 組織化学的結果

シマリスにおけるTHの免疫反応は冬眠期および非冬眠期において主細胞の細胞質および神経線維に観察された (Figs. 1, 2)。細胞質への反応は冬眠期においてより強く、反応部位も細胞質全体に存在していた (Figs. 1, 2)。コウモリにおけるTHの免疫反応は paraffin 切片での観察でシマリスのそれよりも強い反応が観察された (Fig. 7)。

シマリスおよびコウモリの Met-Enk の免疫反応は非冬眠期 (Fig. 3) および冬眠期 (Fig. 4) で観察されたが、冬眠期においてより免疫反応が強くそして細胞質全体におよぶ主細胞が多く観察された (Figs. 3, 4)。

シマリスにおける Glu の免疫反応は非冬眠期 (Fig. 5) および冬眠期 (Fig. 6) で主細胞への陽性反応が観察され、いずれも弱い反応であったが、冬眠期においてやや強い反応として観察された (Fig. 6)。コウモリにおいても Glu の免疫反応は観察されたが、今回観察したペプチドの中では、最も弱い反応であった (Fig. 8)。

3) 電子顕微鏡的結果

シマリスおよびコウモリにおける非冬眠期動物において主細胞の細胞質に比較的均一に散在して観察されたミトコンドリアは、冬眠期において集積して存在していた (Figs. 9-16)。さらにそのミトコンドリアの直径は非冬眠期に比べて冬眠期の方が、径が1.5倍から2倍程度に大きくなっていた。ミトコンドリアの内部クリステの形変化を示さなかった (Figs. 10, 12, 14, 16)。

考 察

主細胞は副腎髄質細胞と同様、Golgi 装置で産生された限界膜に包まれた電子密度の高い物質を含む顆粒小胞を開口分泌で血中に放出する⁴⁾。イヌにおいて主細胞は2型に区別され、それらは副腎髄質の adrenaline 産生細胞と noradrenaline 産生細胞に対応する^{5,6)}。これらの細胞に含まれる monoamine の量や性質は動物種によって異なる^{7,8)}。本結果でのシマリスにおけるTHの中程度の免疫陽性細胞が散在的である

のに対し、コウモリでは、ほとんどの主細胞が強い免疫反応を示しておりこれらを支持している。さらに冬眠期におけるTH免疫活性の増加は、hypoxiaにおいて、主細胞で神経伝達物質の変化を導くとした Wang 等 ('98)⁹⁾ 結果を支持している。

さらに主細胞はアミン以外に enkephalins^{4,6,10)} を含むほか、化学受容や伝達に関わるペプチド類の含有も認められている¹¹⁾。コウモリとシマリスにおいても Met-Enk, Gly, VP および VIP 存在が確認され、さらにこれらはいずれも非冬眠期に比べ冬眠期に免疫反応産物が増加していた。これらのことはそれぞれの物質が低酸素状態において血管壁の変化に対応するための変化であることを示唆している。

頸動脈小体に分布する神経線維には substance P, VIP, NPY などのペプチドの含有が免疫組織化学的に証明されている¹²⁻¹⁴⁾。これらのペプチドは洞様血管の壁に終末する神経線維に含まれ、コウモリおよびシマリスでも同様の所見が観察された。そしてこれらは冬眠期および非冬眠期両方で観察され、冬眠期においてこの洞様血管の径の縮小と合わせ考えるとこれらの物質により、低酸素状態の情報血管壁に伝えられ収縮する可能性が示唆された。

低酸素状態における主細胞のミトコンドリアの変化は副腎および脊髄神経節細胞などで報告がある¹⁵⁾。この変化はミトコンドリア自体が様々な物質の産生に関与する場合と本来の機能であるエネルギーの補給が考えられている。この小体の主細胞における変化は、この細胞が酸素に極めて密接に反応することから、Mills and Jöbsis (1972)¹⁶⁾ による低酸素条件下で主細胞が興奮し、隣接する求心性の自由終末終末を発火させるという仮定を支持している。

参考文献

- 1) Garfia A; Glomus tissue in the vicinity of the human carotid sinus. *J Anat* 130, 1-12, 1980.
- 2) Cranford JA; Body temperature, heart rate and oxygen consumption of normothermic

- and heterothermic western jumping mice (*Zapus princeps*). Comp. Biochem. Physiol. 74, 595-599, 1983.
- 3) Sternberger LA; The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In Immunocytochemistry, 3rd ed. John Wiley and Sons, New York, pp. 90-209, 1986.
 - 4) Hansen JT; Freeze-fracture study of the carotid body. Amer J Anat 148, 295-300, 1977.
 - 5) Kobayashi S; Fine structure of the carotid body of the dog. Arch Histol Jap, 30, 95-120, 1968.
 - 6) Kobayashi S, Uchida T, Fujita T, Nakao K, Yoshimasa T, Imura H, Mochizuki T, Yanagihara C, Yanagihara T and Verhofstad AAJ; Immunocytochemical demonstration of the co-storage of noradrenalone-Arg6-Gly7-Leu8 in the carotid body chief cells of the dog. Arch Histol Jap 46, 713-722, 1983.
 - 7) Kobayashi S; Comparative cytological studies of the carotid body I. Demonstration of monoamine storing cells by correlation chromaffin reaction and fluorescence histochemistry. Arch Histol Jap 33, 319-339, 1971.
 - 8) Böck P; The Paraganglia. In, Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Bd IV, Teil 8. Springer-Verlag Berlin, 1982.
 - 9) Wang, Z-Z, Dinger B, Fidone, SJ and Stensaas LJ 1998, Changes in tyrosine hydroxylase and substance P immunoreactivity in the cat carotid body following chronic hypoxia and denervation. Neuroscience 83, 1273-1281, 1998.
 - 10) Varndell IM, Tapia FJ, De Mey J, Rush RA, Bloom SR and Polak JM; Electron immunocytochemical localization of enkephalin-like material in catecholamine-containing cells of the carotid body, the adrenal medulla, and pheochromocytomes of man and other mammals. J Histochem Cytochem 30, 682-690, 1982.
 - 11) Fidone SJ, Gonzalez C, Dinger BG and Hanson CR; Mechanisms of chemotransmission in the mammalian carotid body. Prog Brain Res 74, 169-179, 1986.
 - 12) Lundberg JM, Hökfelt T, Fahrenkrug J, Nilsson Gand Terenius L; Peptides in the cat carotid body (glomus caroticum): VIP-, enkephalin-, and substance P-like immunoreactivity. Acta Physiol Scand 107, 278-281, 1979.
 - 13) Wharton J, Polak JM, Pearse AGE, McGregor GP, Bryant MG, Bloom SR, Emson PC, Bisgard GE and Will JA; Enkephalin-VIP-, substance P-like immunoreactivity in the carotid body Nature 284, 269-271, 1980.
 - 14) Kondo H, Iwanaga T and Nakajima T; Immunocytochemical study on the location of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. Cell Tissue Res 227, 291-295, 1982.
 - 15) Zancanaro C, Maratesta M, Vogel P and Fakan S; Ultrastructure of the adrenal cortex of hibernating, arousing, and euthermic dormouse, Muscardinus avellanarius. Anat Rec, 249, 359-364, 1997.
 - 16) Mills E and Jöbsis FF; Mitochondrial respiratory chain of carotid body and chemoreceptor response to changes in oxygen tension. J Neurophysiol 35, 405-428, 1972.