

原著：秋田大学医学部保健学科紀要18(2)：17-24, 2010

## 生体リズムに關与する視床下部下垂体路の免疫組織学的三次元 (3D) 解析

大友和夫

### 要 旨

視床下部下垂体路 (hypothalamo-hypophysial tract; HHT) のアルギニンヴァゾプレシン (AVP) 陽性神経回路の三次元 (three-dimensional; 3D) 解析の有用性について検討した。HHT は視床下部における室傍核、視索上核、そして正中隆起を経由し、下垂体後葉に達する経路である。室傍核では AVP 陽性神経細胞の細胞構築と神経線維の吻側と尾側に立体的な配列が、二次元像では捕えることができなかった構造として鮮明に観察された。室傍核と視索上核の間の神経線維も同様であったが、稀に吻側から尾側に向かい切片を超えて走行する線維も観察された。ヘリング小体と神経線維の構造も 3D 観察から明らかになった。

### I. はじめに

視床下部下垂体路 (hypothalamo-hypophysial tract; HHT) は生体リズムを考える上で非常に重要な伝導路であり<sup>1)</sup>、我々もこれまでに免疫組織学的及び電子顕微鏡観察の結果について報告してきた<sup>2,3,4)</sup>。HHT は室傍核、視索上核の神経細胞の軸索が正中隆起を経て、下垂体後葉におよぶものである。従って、その神経伝達物質の主たるものは、神経分泌核である室傍核、視索上核で産生されるヴァゾプレシンである<sup>5,6,7)</sup>。本研究では、その一つであるアルギニンヴァゾプレシン (AVP) の HHT での陽性反応を示す神経要素の三次元構造について検討した。

複雑な神経回路網は、神経科学において機能解析のための基礎であり、様々な方法<sup>8,9,10)</sup>を用いて、大脳皮質<sup>11)</sup>、小脳皮質<sup>12)</sup>、大脳基底核<sup>13,14)</sup>、海馬<sup>15)</sup>、視床下部神経回路網<sup>16)</sup>、脊髄<sup>17)</sup>などで詳細に研究されてきた。HHT における神経回路網も例外ではなく、AVP 神経回路だけを取り上げても非常に複雑である。従って、二次元の観察では、細胞構築及び線維の走行の詳細な解析のためには限界がある。そこで三次元的な解析が

現実的な手段として有用であると考えられている<sup>19)</sup>。

三次元解析は、光学顕微鏡レベルでは、神経細胞の形態的分析や神経線維の走行についての解析が行われた。電子顕微鏡的解析では、シナプスの形態と接触部位の形態について分析され、特に、小脳プルキンエ細胞の樹状突起の棘での分析は大きな成果をあげ、その応用として、分子生物学的な伝達形態にまでおよんでいる<sup>20,21,22)</sup>。光学顕微鏡レベルでの三次元解析は、傾斜光を利用したもの<sup>19)</sup>や、偏光を利用したもの<sup>19)</sup>があり、偏光を利用したものでは動画での解析もなされている<sup>23)</sup>。また、近年特に開発が進み用いられているものとして、共焦点レーザー顕微鏡による三次元的研究<sup>24,25,26)</sup>があるが、蛍光染色を用いた資料での解析であるために、用途が限られる面がある。

本研究で使用した装置 (True-View 3D Heah, edge 社) は、傾斜光で左右 1 枚ずつの写真でステレオ写真をつくり、三次元的に解析するもので、免疫組織化学で染色した標本にとって有用である。

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

Key Words: 概年リズム  
三次元構造  
ヴァゾプレシン  
視床下部  
免疫組織化学

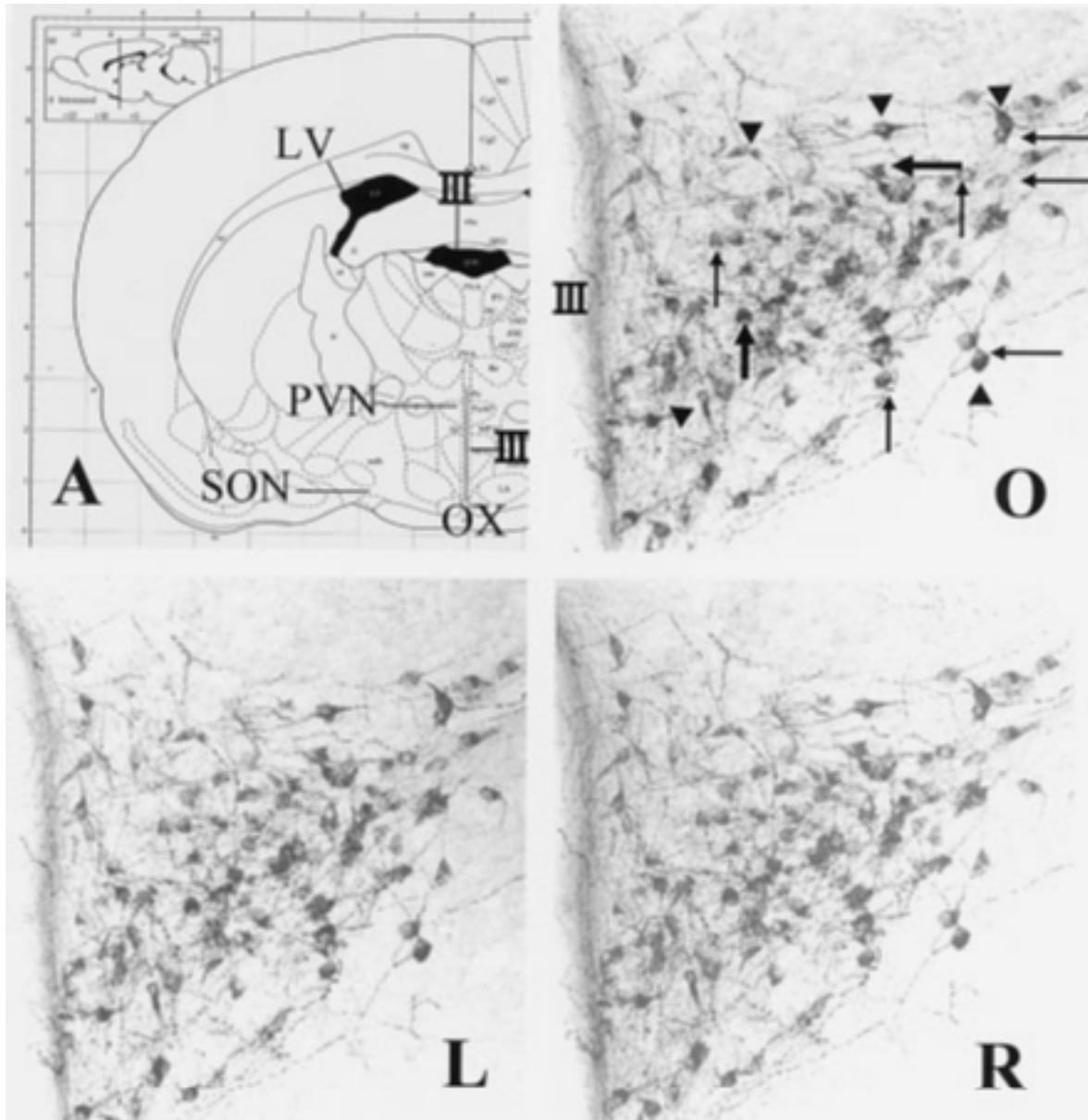


Fig. 1; Vasopressinergic cell bodies and fibers in the paraventricular nucleus during the non-hibernating bat. A; Referential schematic diagram of the example showing a rat brain coronal section at the level of mid paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON). A drawing of a section of the rat brain cut in a sagittal plane showing the coronal plane level (vertical line) in the inset. O; two-dimensional (2D) imaging photograph. L and R; Use the cross-eyed viewing method to see the image in stereoscopic 3D. LV; lateral ventricle, III; third ventricle, OX; optic chiasm, arrow head; rostral (shallow) layer cell bodies, thin arrow; middle layer cell bodies, thick arrow; caudal (deep) layer cell bodies

## II. 方法と材料

### 1) 動物

雄のキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) (体重: 17.3~34.8g, 7匹) は、環境省の許可を得て男鹿市門前の海蝕洞で採集された。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。

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

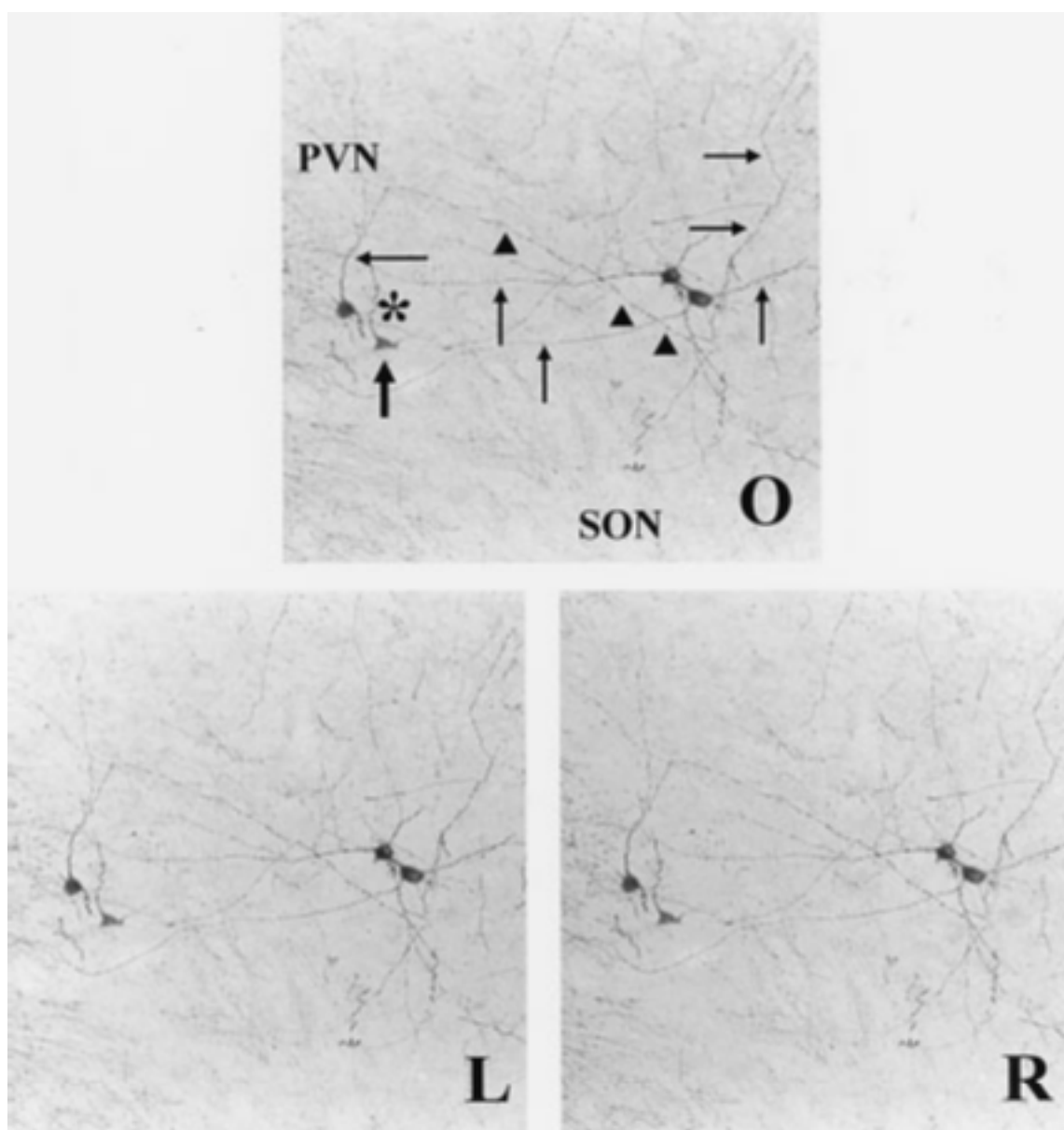


Fig. 2; Vasopressinergic cell bodies and fibers in the lateral paraventricular nucleus during the non-hibernating bat. O; two-dimensional (2D) imaging photograph. L and R; Use the cross-eyed viewing method to see the image in stereoscopic 3D. PVN; the paraventricular nucleus side. SON; the supraoptic nucleus side, arrow head; rostral (shallow) layer cell bodies, thin arrow; middle layer cell bodies, thick arrow; caudal (deep) layer cell bodies, aster; rost-caudal fiber

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 (10~15 ml : 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、脳は取り出され、灌流固定液と同じ溶液で一晩浸漬固定が行われた。

切片は Vibratome で 50  $\mu$ m 厚の冠状断の連続切

片を作成した。

### 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>27)</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 次抗体 (SP-22 : 1000 倍希釈に 0.5% albumin bovine ; Sigma, USA,

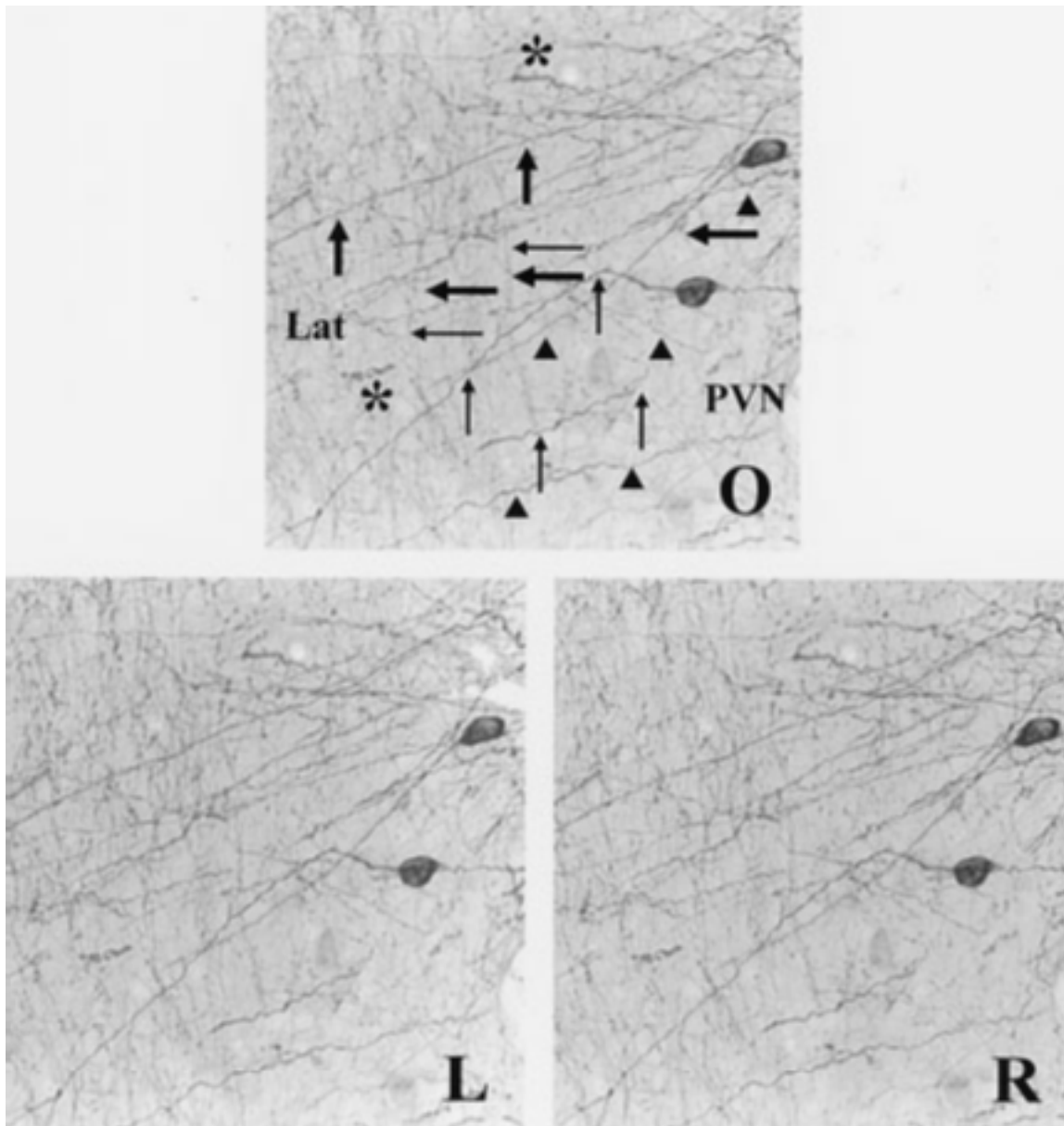


Fig. 3; Vasopressinergic cell bodies and fibers in the lateral paraventricular nucleus (PVN) during the non-hibernating bat. O; two-dimensional (2D) imaging photograph. L and R; Use the cross-eyed viewing method to see the image in stereoscopic 3D. PVN; the paraventricular nucleus side, Lat; the lateral side, arrow head; rostral (shallow) layer fibers, thin arrow; middle layer fibers, thick arrow; caudal (deep) layer cell bodies, aster; rost-caudal fiber

normal goat serum; Vector, USA を pH 7.4 の 0.01M PBS に溶解し, 4 °C 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, 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グラスに貼付し, エタノール系列 (50~100%) で脱水後, 吻側を上 (浅層) にして, Permount; Fisher, USA で封入した.

#### 4) 三次元観察

edge 社の True-View 3D Head を Zeiss 社 160 mm upright microscope stands に装着して, 二次元観察, 三次元観察を併用し, 配光は 100% : 0 :

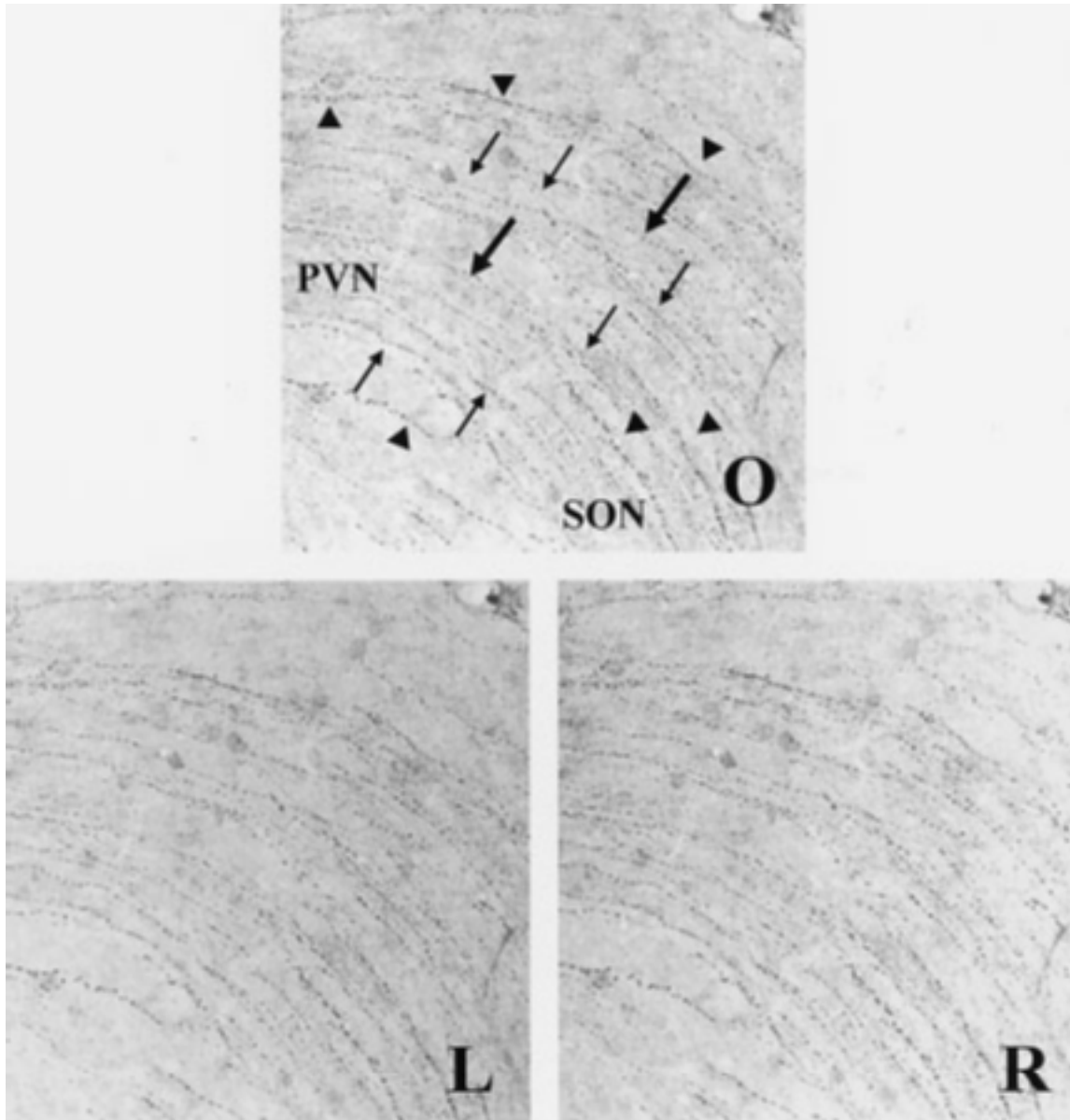


Fig. 4 ; Vasopressinergic fibers between the paraventricular nucleus and the supraoptic nucleus during the hibernating bat. O ; two-dimensional (2D) imaging photograph. L and R ; Use the cross-eyed viewing method to see the image in stereoscopic 3D. PVN ; the paraventricular nucleus side, SON ; the supraoptic nucleus side, arrow head ; rostral (shallow) layer cell bodies, thin arrow ; middle layer cell bodies, thick arrow ; caudal (deep) layer cell bodies

0, 0 : 100% : 0, 0 : 0 : 100%で撮影した。撮影した左右一組のステレオ写真は、裸眼交差法で観察した。

### Ⅲ. 結 果

#### 1. 神経細胞体

室傍核における AVP 陽性細胞は、核中央部の 1 切片で平均 53 個分布していた。細胞体は吻側 (Fig. 1,

O ; 矢頭), 尾側 (Fig. 1, O ; 太矢印), そして中間層 (Fig. 1, O ; 細矢印) でほぼ均一に配列していた (Fig. 1, L, R ; ステレオ写真)。染色性の濃淡は深度に関係なかった。神経線維は吻側から尾側を貫くものは稀で、中間層付近で内側から外側に向かい核内を横断するものが多かった。

#### 2. 神経回路網

室傍核の外側には少数の強染色する細胞体が観察さ

れた (Fig. 2). 細胞からは不規則な方向に向かう神経線維が観察された. それらの神経線維は吻側から尾側に滑らかに移動する長い線維を持ちお互いに交叉して外側方向に向かう (Fig. 2. O, L, R). 尾H側にある細胞体からは神経線維が吻側までのびて連続切片的の次の切片にまでおよぶものがあり, しばしばらせん状に走行するものが観察された (Fig. 2. O, aster).

HHTに含まれない背側と腹側を結ぶ AVP 弱陽性の線維は, 中間層の線維と尾側の線維が重なって走行するものが多く (Fig. 3. O), 二次元写真では両線維を区別することが困難であったが, 三次元写真では, 容易に見分けることができた (Fig. 3. L, R). これらの線維と HHT 線維と交差するが複雑な絡み合いはなく吻側と尾側に並行して走っていた (Fig. 3, O; 細矢印, 太矢印).

### 3. 神経線維

室傍核視覚索上核を結ぶ神経線維は, 二次元像では平行に走る線維として観察された (Fig. 4. O). しかし, 三次元的に観察すると交差することはほとんどないが, 吻側と尾側にずれながら走行していることが明らかになった (Fig. 4. L, R).

また, 冬眠期動物の HHT での線維に現れるヘリング小体は非冬眠期に比べて顕著になるが, 神経線維に均一にこの小体がついていないことが三次元的観察から明らかになった (Fig. 4. L, R).

## IV. 考 察

AVP 陽性神経要素の分布については, 免疫組織化学的詳細に報告されている<sup>6, 28, 29</sup>. しかし, 三次元的に解析された報告はない. 本研究では, 室傍核内の神経細胞と線維の細胞構築, 室傍核外側部の細胞体と線維の走行, HHT の中で最も長い線維である室傍核と視索上核の間の線維について検討した.

三次元的解析を行うためには, 厚切り切片を用いる必要があり, 本研究では, 50  $\mu$ m の厚さの切片を作成して観察した. 厚い切片はその中に多くの情報が含まれるが, 抗体の浸透度を上げる工夫が必要である<sup>19</sup>. 十分な浸透の結果, 鮮明な三次元像を得ることができた.

室傍核における神経細胞は, 吻側から尾側に比較的規則正しい配列であった. しかし, それらの細胞から出る線維は複雑に配列していることが観察され, 連続切片における観察と合わせて細胞構築を検討する必要性が示唆された.

免疫反応の強弱には抗体の浸透性と関与することが,

考えられていたが, 細胞の存在深度に関係がないことから, その細胞の持つ AVP 抗原の量に比例することが示唆された.

室傍核外側部の AVP 陽性神経要素は, 核内に比べ疎であるために, その三次元構造の把握が容易であった. このことは, さらに厚い標本での観察で, その細胞構築が広い範囲で理解することができる可能性が示唆された.

室傍核外側でしばしば観察された Z 軸方向の線維は切片を越えた検討が必要であり, その機能の解明とともに今後の課題である.

室傍核近傍の HHT 線維に交叉する AVP 陽性線維は反応が弱い, 三次元構造は鮮明に観察され, HHT 線維と交互に走行していることが明らかになり, 線維と線維が接することがなく, 小脳分子層における水平線維とプルキンエ細胞<sup>11</sup>のようなシナプス形成がないことが示唆された.

HHT の室傍核と視索上核の間の線維は, 冬眠動物において, ヘリング小体が大きくなるが<sup>3, 4</sup>, この小体と線維の三次元構造が鮮明に観察され, これまで不明であったヘリング小体と線維の関係が明らかになった. このことで冬眠から覚醒の間のヘリング小体の大きさの変化を三次元構造から明確にできる可能性が示唆された.

## 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) Ohtomo K, Fukuhara K: Seasonal changes in the immunoreactive fibers of hypothalamohypophysial tract in the horse shoe bat and chipmunk. Acta Anat Nippon 73: 374, 1998
- 3) Ohtomo K, Fukuhara K: Morphological difference and seasonal changes of immunoreactive fibers of hypothalamohypophysial tract in the horse shoe bat and chipmunk. Acta Anat Nippon 74: 104, 1999
- 4) Ohtomo K, Fukuhara K: Seasonal changes of the nerve fibers in the hypothalamohypophysial tract of some hibernators. Acta Anat Nippon 75: 109, 2000
- 5) Wang, QP, Guan JL, et al.: The neurotensinergic synaptic innervation of vasopressin containing neurons in the rat hypothalamic paraventricular

- nucleus. *Brain Res* 834 : 25-31, 1999
- 6) Yang J, Yang Y, et al.: Arginine vasopressin is an important regulator in antinociceptive modulation of hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Neuropeptide* 41 : 165-176, 2007
  - 7) Yang J, Yuan H, et al.: Arginine vasopressin in hypothalamic paraventricular nucleus is transferred to the nucleus raphe magnus to participate in pain modulation. *Peptides* 30 : 1679-1682, 2009
  - 8) Kosaka T, Kosaka K: Neuronal gap junctions in the rat main olfactory bulb, with special reference to intra glomerular gap junction. *Neurosci Res* 45 : 189-209, 2003
  - 9) Choi A, Kim JY, et al.: Effects of PDMS curing ratio and 3D micro-pyramid structure on the formation of an in vitro neural network. *Current Appl Phys* 9 : 294-297, 2009
  - 10) Li Z, Leung M, et al.: Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials* 31 : 404-412, 2010
  - 11) Szentagothai J: The 'module-concept' in cerebral cortex architecture. *Brain Res* 95 : 475-496, 1974
  - 12) Ito M: Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol* 78 : 272-303, 2006
  - 13) Kelly RM, Strick PL: Macro-architecture of basal ganglia loops with the cerebral cortex; use of rabies virus to reveal multisynaptic circuits. *Prog Brain Res* 143 : 449-459, 2004
  - 14) Houk JC, Bastianen C, et al.: Action selection and refinement subcortical loops through basal ganglia and cerebellum. *Philos Trans R Soc* 362 : 1578-1573, 2007
  - 15) Freund TF, Buzsaki G: Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6 : 347-470, 1996
  - 16) Boudaba C, Tasker JG: Internuclear coupling of hypothalamic magnocellular nuclei by glutamate synaptic circuits. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol* 291 : 102-111, 2006
  - 17) Kiehn O: Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Ann Rev Neurosci* 29 : 279-306, 2006
  - 18) Young JK, Stanton GB: A three-dimensional reconstruction of the rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 26 : 278-283, 1991\*\*) Hermes, MLHG: Central vasopressin infusion prevents hibernation in the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Neurobiol* 86 : 6408-5411, 1989
  - 19) Clements RJ, Mintz EM, et al.: High resolution stereoscopic volume visualization of the mouse arginine vasopressin system. *J Neurosci Meth* 187 : 41-45, 2010
  - 20) Otsu Y, Bormuth V, et al.: Optical monitoring of neuronal activity at high frame rate with a digital random-access multiphoton (RAMP) microscope. *J Neurosci Meth* 173 : 259-270, 2008
  - 21) Helmstaedter M, Briggman KL, et al.: 3D structure imaging of the brain with photons and electrons. *Curr Opin Neurobiol* 18 : 633-641, 2008
  - 22) Janoos F, Mosaliganti K, et al.: Robust 3D reconstruction and identification of dendritic spines from optical microscopy imaging. *Med Image Anal* 13 : 167-179, 2009
  - 23) Clements RJ, Mintz EM, et al.: <http://bioweb.kent.edu/Faculty/Pages/Clements/vasopressin.html>.
  - 24) Jinno S, Aika Y, et al.: Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical dissector using confocal laser scanning microscope. *Brain Res* 814 : 55-70, 1998
  - 25) Wouterlood FG, Bockers T, et al.: Synaptic contacts between identified neurons visualized in the confocal laserscanning microscope. Neuro-anatomical tracing combined with immunofluorescence detection of post-synaptic density proteins and target neuron-markers. *J Neurosci Meth* 128 : 129-142, 2003
  - 26) Wouterlood, FG, Boekel, AJ, et al.: Counting contacts between neurons in 3D in confocal laser scanning images. *J Neurosci Meth* 171 : 296-308, 2008
  - 27) Sternberger, LA: The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (APA) method. *Immunocytochemistry* 3rd ed. John Wiley and Sons, New York, 1986, pp 90-209
  - 28) Ani, H, Ueta Y, et al.: Upregulation of the expression of vasopressin gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of the lithium-induced diabetes insipidus rat. *Brain Res* 772 : 161-166, 1997
  - 29) Panayotacopoulou, MT, Goudsmit, E, et al.: Simultaneous detection of tyrosin hydroxylase-immunoreactivity and vasopressin mRNA in

neurons of the human paraventricular and supraoptic nucleus. Brain Res 855 : 181-185, 2000

Immunohistochemical and three dimensional (3D) analysis on  
the hypothalamo-hypophysial tract related in  
the circannual rhythm of the hibernator

Kazuo OHTOMO

Department of Occupational Therapy, Akita University Graduate School of Health Sciences

The effectiveness of a three-dimensional (3D) analysis of arginine vasopressin (AVP) immunopositive neural network was investigated through the hypothalamo-hypophysial tract (HHT) related in the circannual rhythm of the hibernator. The HHT is the pathway getting through the neurohypophysis by way of the paraventricular nucleus, supraoptic nucleus and median eminence. In 3D images, constructions of AVP immune-positive neurons and fibers tract that make up the hypothalamic system are clearly visible. These 3D images provide details and features regarding spatial structure not apparent in 2-dimensional images: in particular, the arrangement of the neuron core of the paraventricular nucleus. The fibers between paraventricular nucleus and supraoptic nuclei with Herring's bodies demonstrated delicate shapes in the animals during hibernation season.