

原著：秋田大学保健学専攻紀要19(1)：31 - 37, 2011

## 冬眠動物視床下部におけるオレキシン免疫陽性部位の 季節変化について

大友和夫\* 福原紅子\*\* 呉 毅\*\*\*

### 要 旨

摂食飲水行動がほとんどない冬眠期では、冬眠動物は様々な生理現象を低下させエネルギー消費を抑えて生活している。適切な摂食行動は、摂食中枢と満腹中枢によって行われている。この制御は複雑な神経系によるが、摂食中枢と満腹中枢はそれぞれ視床下部の外側核と腹内側核にあるとされてきた。しかし、この部位に局在する神経伝達物質が特定されなかったためにこの分野の研究が進まなかった。

近年、この部位に局在するオレキシンの発見により、この部位の役割が明らかになってきた。本研究は、オレキシンの抗体を用いて、概年リズムにおける視床下部の様々な領域でのオレキシン免疫陽性部位の形態学的変化について明らかにし、冬眠導入の引き金とひとつと考えられる摂食行動と冬眠機構との関係について検討した。

### はじめに

苛酷な自然環境への適応であり、概年リズムの一つである冬眠は、心拍数や呼吸数の減少そして体温の低下といった様々な生理現象の変化を伴って約半年の間活動量を抑えて生活する<sup>1,2)</sup>。冬眠の引き金は、自然環境変化の中でも低気温のための食物の激減によるところが大きい<sup>3)</sup>。冬眠動物の体重は、冬眠の前に蓄えた褐色脂肪などの影響を受けて活動が盛んな非冬眠期に比べて一般的に重くなる<sup>4)</sup>。しかし、冬眠期において、ほとんどの冬眠動物は、餌を食べずに限られた量の褐色脂肪をエネルギー源とするために冬眠期間中は極力エネルギー消費を抑え、覚醒の時期まで生命を維持する<sup>5,6)</sup>。

動物は、実験的に視床下部腹内核を破壊すると食欲を増し、肥満になり、視床下部外側核を破壊すると摂食しなくなる。これらのことから腹内側核には満腹中枢があり、そして外側核に摂食中枢が存在することが知られている<sup>7)</sup>。

視床下部外側核は、破壊実験<sup>8)</sup>ばかりではなく、刺激による摂食行動の誘発<sup>9)</sup>、血糖値低下による活性化神経細胞の存在<sup>9)</sup>などから摂食行動に関与することが示唆されていたが、この部位に関与する神経伝達物質が見つかっておらず研究が進んでいなかった。しかし、近年、オレキシンが外側核とその周辺の特定の神経細胞に局在し、その機能についても明らかになってきている<sup>10)</sup>。オレキシンにはオレキシンAとBの2種類のサブタイプがあり、受容体に対する親和性は、2種の受容体で異なり、Aの方が親和性が高い<sup>8)</sup>。オレキシンは、視床下部にその陽性細胞が限られており、薬理学的実験からも摂食に関わっているとの報告がある<sup>8)</sup>。さらに、オレキシンが睡眠と覚醒、そしてエネルギー代謝の制御に密接に関連しているという報告もある<sup>8)</sup>。

活発に摂食活動を行っている非冬眠期と摂食活動はもとより飲水行動もほとんど見られない冬眠期において、摂食との関わりが深い視床下部におけるオレキシン免疫陽性神経細胞及び神経線維の季節による形態学的変化を捉えることは、冬眠機構の解明はもとより、

\* 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

冬眠

視床下部

オレキシン

免疫組織化学

摂食機構の理解にとっても有益であると考える。本研究はオレキシンAの抗体を用いて視床下部に免疫陽性神経細胞の構造と分布の季節変化、及び、ほとんど脳全体に投射線維を送るとされるオレキシン線維の中で、摂食行動や睡眠行動と密接な関係を持つ部位における神経線維の分布の季節変化について検討した。

## 方法と材料

### 1. 動物

キクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequi-*

*numu*) (体重：17~30 g, 雄6匹) シマリス (*Tamias sibiricus aciatics*) (体重：70~100 g, 雄5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)の動物を用いた。実験は「秋田大学動物実験指針」に準じて行った。

### 2. 固定, 切片作成

非冬眠期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

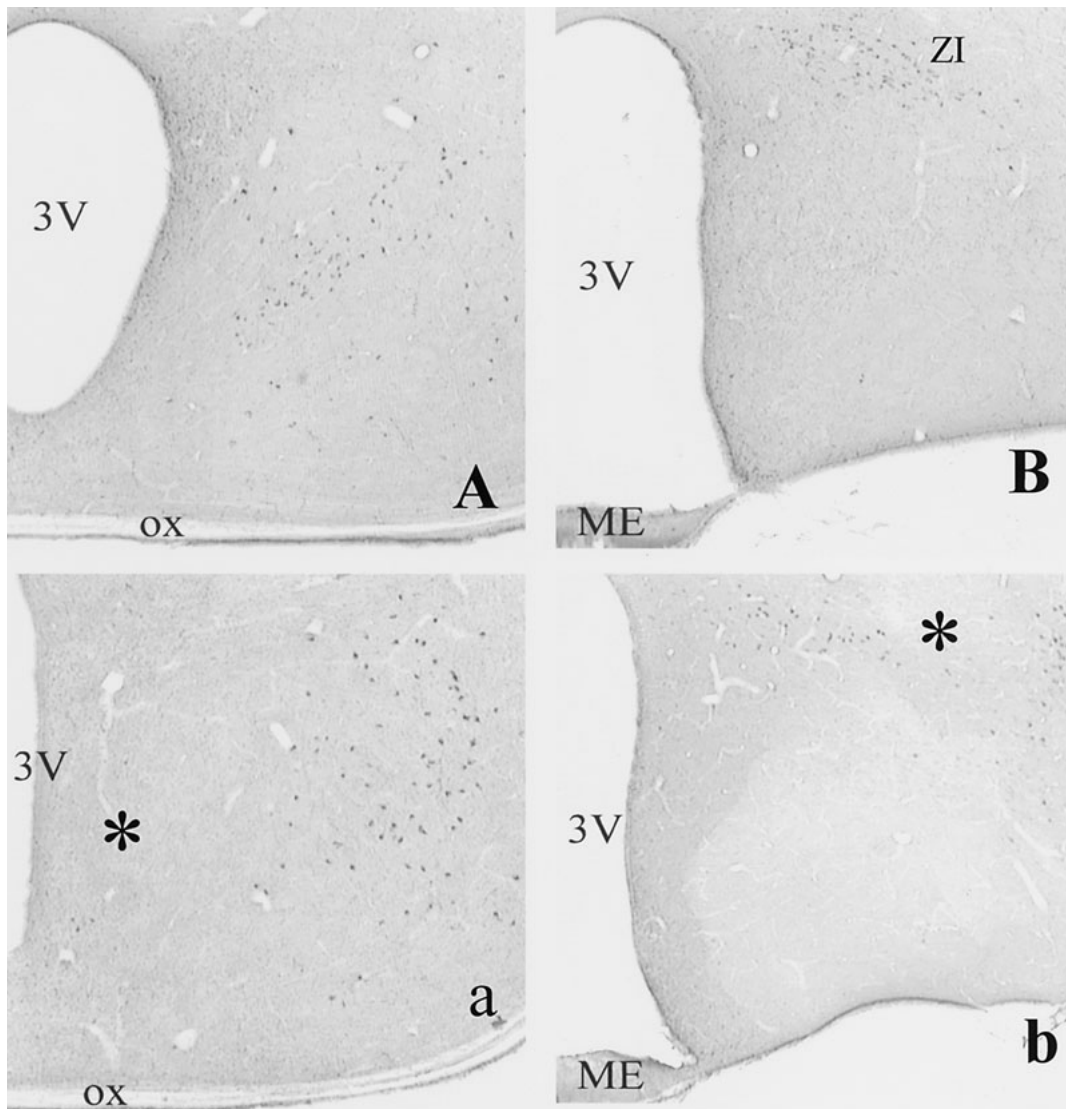


Fig.1; Disubstitution of orexin A immunoreactive neurons on coronal sections in two rostrcaudal levels of of the bat hypothalamus. A and a; Photomicrographs of orexin A immunoreactive neurons in the non-hibernating(A) and hibernating(a) bat hypothalamus at the level of optic chiasm. B and b; Photomicrographs of immunoreactive neurons in the non-hibernating(B) and hibernating(b) bat hypothalamus at the level of median eminence. 3V; third ventricle, OX; optic chiasm, ME; median eminence, ZI; zona incerta, \*; absent area of orexin A immunoreactive neurons.

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。

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をFree floatingで、peroxidase-antiperoxidase method (PAP法)を用いて行った<sup>11)</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（オレキシンA抗体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,

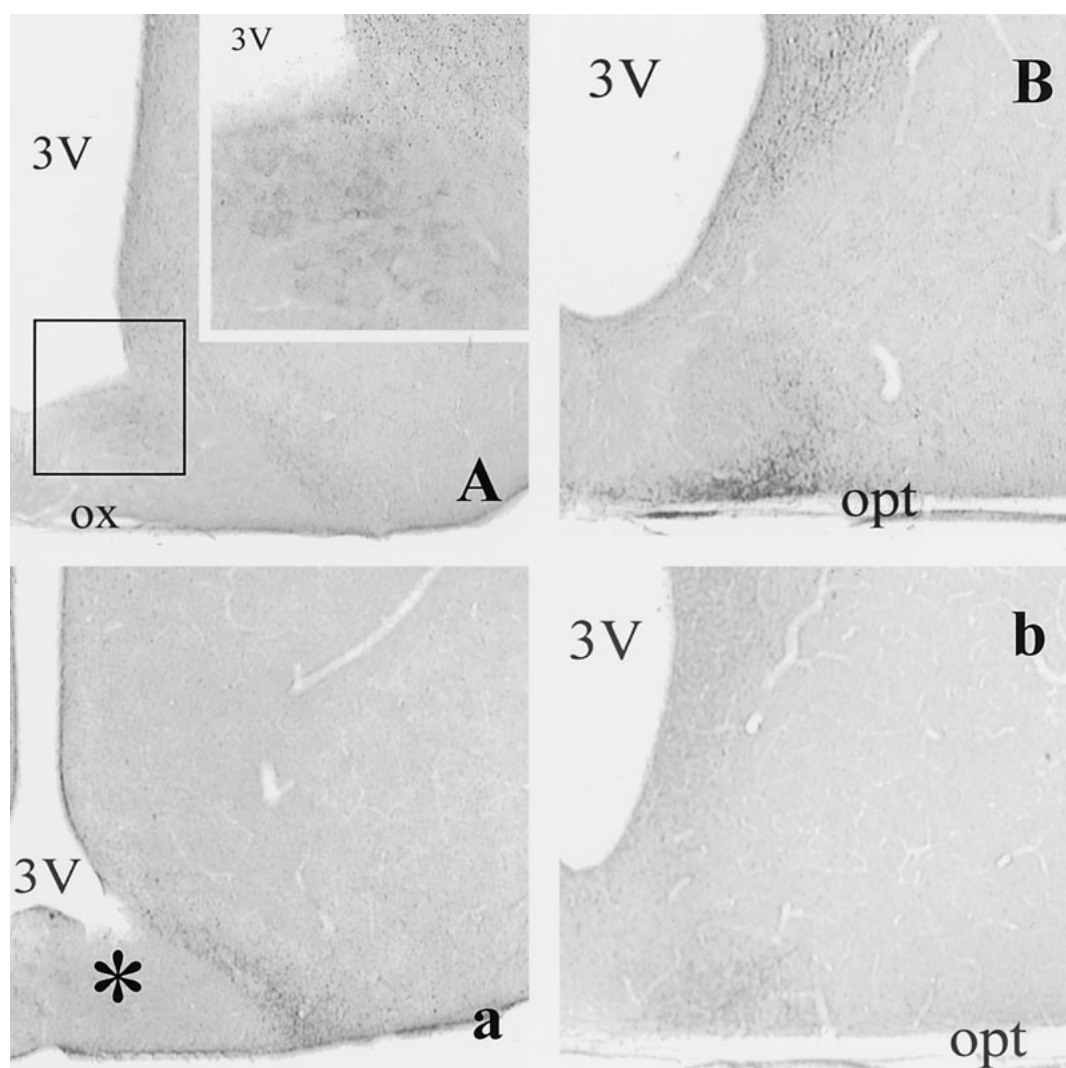


Fig.2; Distribution of orexin A immunoreactive fibers on coronal sections in two rostrocaudal levels of the bat hypothalamus. A and a; Potomicrographs of orexin A immunoreactive fibers in the non-hibernating(A) and hibernating(a) bat hypothalamus at the level of rostral suprachiasmatic nucleus. B and b; Potomicrographs of orexin A immunoreactive fibers in the non-hibernating(B) and hibernating(b) bat hypothalamus at the level of caudal suprachiasmatic nucleus. inset; higher magnification of the square region. 3V; third ventricle, ox; optic chiasma, opt; optic tract, \*; absent area of orexin A immunoreactive terminal.

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 50 mM 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.

## 結果

### 1. キクガシラコウモリ

キクガシラコウモリにおいて, オレキシン免疫陽性神経細胞は, 非冬眠期で視床下部外側核に小型の神経細胞が散在していた (Fig.1A, B). 特に, 背内側部の不確帯 (正中隆起レベル) で, 陽性細胞の密度が高かった (Fig.1B) 冬眠期では外側核の内側部 (視神経交叉; OX レベル) (Fig.1a) と尾側 (正中隆起; ME レベル) 背側部 (Fig.1b) で陽性神経細胞の減少が観察された. 特に, 第 3 の脳室外側部の脳室近傍

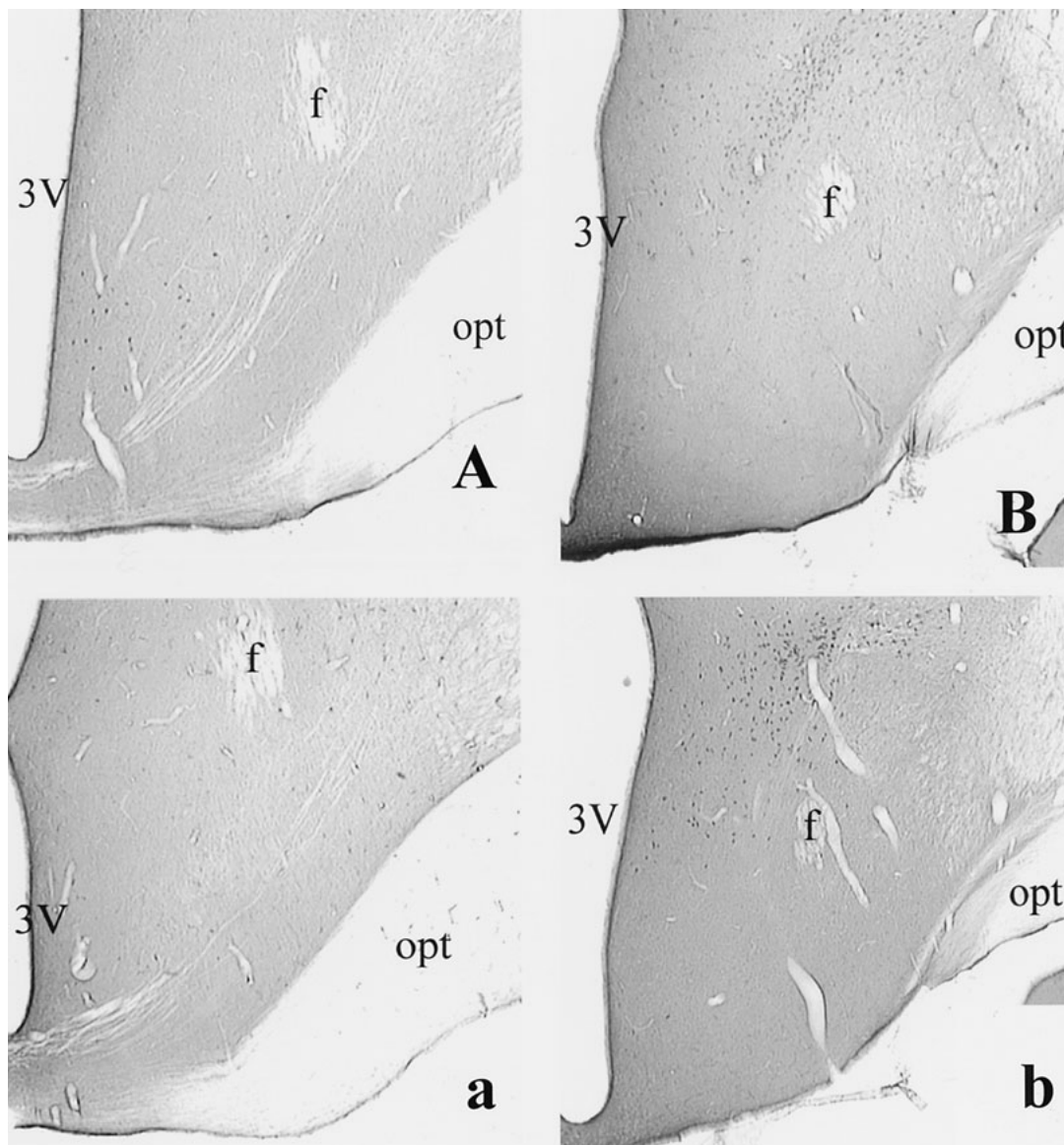


Fig.3; Distribution of orexin A immunoreactive neurons on coronal sections in two rostrcaudal levels of the chipmunk hypothalamus. A and a; Photomicrographs of orexin A immunoreactive neurons in the non-hibernating(A) and hibernating(b) chipmunk hypothalamus at the level of separated optic tract. B and b; Photomicrographs of orexin A immunoreactive neurons in the non-hibernating(B) and hibernating(b) bat hypothalamus at the level of tuberal region. 3V; third ventricle, opt; optic tract.

(Fig.1a ; \* ) 及び外側核背側部の不確帯 (Fig.1b ; \* ) で顕著であった。

免疫陽性投射線維は視交叉上核吻側部レベルの視交叉上核背外側部の核境界領域で顕著に観察され (Fig.2A, a), さらに, 非冬眠期の背外側側部神経細胞上に神経終末部が多数観察された (Fig.2A, inset) が, 冬眠期ではほとんどが消失していた (Fig.2a ; \* ). 視交叉上核尾側部レベルでは, 腹外側部に観察され (Fig.2B, b), 非冬眠期に強い陽性線維が視神経交叉の背側部で観察された (Fig.2B). 冬眠期において,

陽性線維は, 非冬眠期に比べて疎であった (Fig.2b).

## 2. シマリス

シマリスにおいて, オレキシン免疫陽性神経細胞は, 非冬眠期では, 視床下部吻側部レベルで第3の脳室腹外側と脳弓の間で少数観察された (Fig.3A) が, 冬眠期では観察されなかった (Fig.3a). 視床下部尾側レベルでは, 非冬眠期で, 外側核外側部, 特に, 脳弓の背内側部に集中して観察された (Fig.3B). 冬眠期では, 脳弓内側部の陽性神経細胞が減少していた

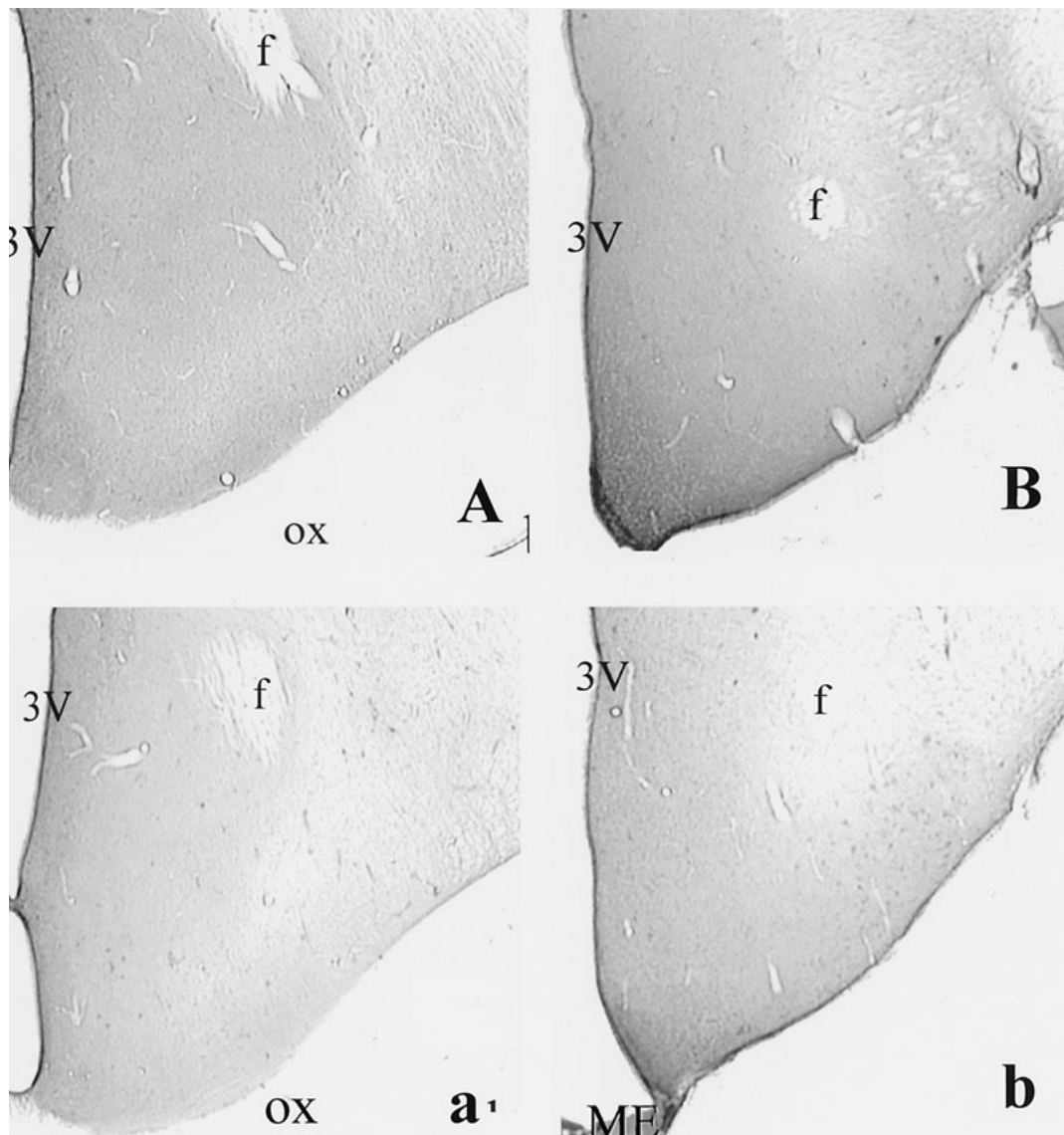


Fig.4; Distribution of orexin A immunoreactive fibers on coronal sections in the rostral and caudal levels of the chipmunk hypothalamus. A and a; Photomicrographs of orexin A immunoreactive neurons in the non-hibernating(A) and hibernating(a) chipmunk hypothalamus at the level of optic chiasm . B and b; Photomicrographs of orexin A immunoreactive fibers in the non-hibernating(B) and hibernating(b) chipmunk hypothalamus at the level of median eminence. ox; optic chiasma, 3V; third ventricle, f; fornix, ME; median eminence.

(Fig. 3b).

免疫陽性神経線維は、視交叉上核では、非冬眠期で、核全体に陽性線維が観察されたが (Fig. 4A), 冬眠期では、視交叉上核背側部で陽性線維が観察されなかった (Fig. 4a). 正中隆起レベルにおいて、弓状核にびまん性に観察され、非冬眠期と冬眠期で反応の差は観察されなかった (Fig. 3.B, b).

## 考 察

冬眠は様々な生理現象の低下を伴うが、本研究では、摂食飲水行動の低下、睡眠、覚醒の変化に注目した。オレキシンは摂食行動の増加<sup>8)</sup>、飲水量の増加<sup>12)</sup>、覚醒時間の延長<sup>13)</sup>などの作用があることが知られている。キクガシラコウモリにおいて、オレキシン免疫陽性神経細胞が、冬眠期において、外側核の内側部 (視神経交叉; OX レベル) (Fig. 1a) と尾側 (正中隆起; ME レベル) 背側部 (Fig. 1b) で減少していた。これは、外側核の内側部と背側部が外側核の陽性神経細胞の減少が見られなかった他の部位に比べて、摂食飲水行動、睡眠時間の延長と深いかかわりがあることを示唆している。一方、シマリスにおいては、脳弓内側部の陽性神経細胞が減少しており、この部位が摂食飲水行動、睡眠時間の延長に外側核の他の部位に比べて密接な関係を示唆した。背側部の関りは、その部位形態や陽性細胞の分布に差はあるが、両動物で共通していた。しかし、キクガシラコウモリでは、外側核内側部における陽性細胞の季節変化が顕著であり、よりこれらの生理現象に関わっていることが示唆された。今回の2種の動物では、視床下部への求心路の一つである網膜からの線維に大きな差があるなど、様々な差異があるためにこの様な差が生じたものと考えられる。伝道路の差による摂食飲水行動、睡眠等に関する機構の詳細な検討が今後の課題である。

他の神経伝達物質、エンケファリン、ヴァソプレシン、血管拡張腸管ホルモン (VIP) 等においては、その陽性部位の季節変化は比較的明確な差として観察された<sup>14,15,16)</sup>。しかし、本研究において、外側核のオレキシン免疫陽性細胞の分布変化が、冬眠期での外側核内側部と背側部の一部の変化にとどまった。さらにオレキシンの投射経路であり概日リズムの発信核である視交叉上核での線維は、季節による分布の変化がやはり部分的であることが観察された。これまでに観察された神経伝達物質の機能は、それぞれ睡眠、抗利尿作用そして血管拡張など主に単一の生理現象に関与するものである。それらに比べるとオレキシンは、摂食行動<sup>7)</sup>、睡眠・覚醒の制御<sup>13)</sup>、エネルギーの代謝<sup>5,6)</sup>等、

複数の生理現象を制御している。さらに冬眠現象は摂食行動やエネルギー代謝は抑制され、睡眠はむしろ拡張するといった様に、生理現象の制御が相反する方向に起こっている。冬眠現象において、オレキシンの機能が一方では促進的に、他方では抑制的にはたらくことになるので、これまでの神経伝達物質の季節変化のように鮮明な差として出現しなかったことが示唆された。

## 文 献

- 1) Licht P, Zucker I, et al.: Circannual rhythms of plasma testosterone and luteinizing hormone levels in golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Biol Reprod* 27: 411-418, 1982
- 2) 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
- 3) Pengelley, ET Asmundson, SM: Free-running periods of endogenous circannual rhythm in the golden-mantled ground squirrel, *Citellus lateralis*. *Comp Biochem Physiol* 30: 177-183, 1969
- 4) Funakoshi, T Uchida, TA: Studies on physiological and ecological adaptation of temperate insectivorous bats hibernation and winter activity in some cave-dwelling bats. *Japanese J ecology* 28: 237-261, 1978
- 5) 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
- 6) Reit, OB Davis, WH: Thermoregulation in bats exposed to low ambient temperature. *Proc Soc Exp Biol Med* 121: 1212-1215, 1966
- 7) Ohmura, Y: Input-output organization in the hypothalamus relating to food intake behavior. *Handbook of the Hypothalamus Vol 2 Physiology of the Hypothalamus*, Marange, PJ Panksepp, J eds, New York Marcel Dekker pp 557-620, 1980
- 8) Sakurai, T et al.: Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92: 573-585, 1998
- 9) Faraco LL et al.: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the

- hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98 : 365-376, 1999
- 10) Moriguchi T et al.: Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced hypoglycemia. *Neurosci Lett* 264 : 101-104, 1999
- 11) Sternberger, Jr LA: The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. *Immunocytochemistry* 3rd ed. John Wiley and Sons, New York, 1986, pp. 90-209
- 12) Kunii, K et al.: Orexin/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 842 : 256-261, 1999
- 13) Hagan, JJ et al.: Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 10911-1916, 1999
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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

## Immunohistochemical localization and seasonal variation in orexin innervation in the hypothalamus of two hibernators

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

Hibernation is a seasonal phenomenon to which some mammalian hibernators respond by temporarily suppressing their vital parameters in response to low ambient temperature and shortages of food and water. Appropriate feeding behavior is regulated by the feeding centre and satiety centre. This is regulated by a complex nervous system, but the feeding centre and satiety centre are each located in the hypothalamus lateral nuclei and the ventromedial nucleus. However, as the neurotransmitters localised here have not been identified, research has not progressed. Recently the roles of these sites have been clarified following the discovery of localised orexins. This study uses orexin antibodies to clarify the morphological changes due to circannual rhythms in orexin immunopositive sites in various regions of the hypothalamus, and investigates the connection between hibernation and feeding behaviour, thought to be a hibernation trigger.