

共焦点レーザー走査顕微鏡と光学顕微鏡を組み合わせた
免疫組織化学法によるハト視床下部漏斗部のVIPニューロンと
GnRHニューロンの形態解析

Morphological relationship between VIP-and GnRH-like immunoreactive
neurons by confocal laser scanning and light microscopic analyses
in the hypothalamic infundibular region of the pigeon

蛭薙 観順 (HIRUNAGI Kanjun)¹⁾・岡村 哲浩 (OKAMURA Akihiro)²⁾・
清 健太郎 (KIYOSHI Kentaro)²⁾・法橋 光徳 (HOKKYO Mitsuyoshi)²⁾・
福田 勝洋 (FUKUTA Katuhiro)²⁾

1) 名古屋大学博物館

The Nagoya University Museum

2) 名古屋大学大学院生命農学研究科動物形態学情報学分野

Laboratory of Animal Morphology and Function, Graduate School of Agricultural Sciences, Nagoya University

Abstract

The hypothalamic infundibular region of the birds comprise neuronal elements immunoreactive (ir) for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH). By use of immunohistochemical double-labeling techniques, we have investigated the morphological relationships between these two types of peptidergic neuronal elements in the infundibular area of the pigeon at light microscopic levels. Serial sectioned images of confocal laser scanning microscopy revealed that GnRH-like-ir fibers or button-like structures were in close apposition to VIP-like-ir cell bodies or processes (probably dendritic processes). These results were confirmed by a method for combining confocal and conventional light microscopic examinations of Vibratom sections processed for double-labeling immunohistochemistry. This method showed that these close apposition of two types of peptidergic neuronal elements were observed in a subependymal area of infundibular region dorsal to the median eminence. These data suggest that GnRH fibers innervate subependymal VIP neurons of the infundibular region near the median eminence. The infundibular regions of the bird are possible sites of interaction between VIP and GnRH neuronal systems.

はじめに

鳥類の繁殖現象は視床下部—正中隆起—腺性下垂体—性腺軸においてホルモン支配されている。そのなかで視床下部漏斗部は神経からの情報が液性情報に変換される正中隆起に隣接する領域であり、古くから生殖現象を支配する重要な脳内領域の一つと考えられている。しかしながらここは脳深部に位置し、機能解明のための生理学的アプローチがきわめて困難な領域であり、また分布するニューロンも小型である。近年、ニューロンが産生する物質である神経ペプチドを、抗原抗体反応を利用して可視化する免疫組織化学法が発達・普及し、目的とする物質を含むニューロンの脳内分布や、異種の物質を含む細胞との関係を形態学的に解析出来るようになった。本研究では、ハトの視床下部漏斗部におい

て、神経ペプチドとして、血管作用性小腸ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) と性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone, GnRH) を含むニューロンの存在と相互関係を形態学的に解析する。鳥類脳内にVIPを産生するニューロンの存在は他の研究でも報告されているが、脳内での生理学的役割はほとんど判っていない (Yamadaら、1982、KorfとFahrenkrug、1984、KuenzelとBlähser、1994、Asteら、1995、Hirunagiら、1995)。GnRHは視床下部のニューロンで産生され、軸索内を正中隆起に移動し、そこで神経終末より下垂体門脈系に放出されて腺性下垂体の細胞に作用するとされている。生殖現象を支配するきわめて重要な脳内ホルモンであり、種の異なる鳥類脳内のGnRHニューロンの分布に関する報告は多い (Mikamiら、1988、KuenzelとBlähser、1991、TeruyamaとBeck、2000)。鳥類脳内VIPニューロンの投射先について、ハト外側中隔VIPニューロンが他種のニューロンを神経支配することを免疫電子顕微鏡観察で示唆した (Hirunagiら、1994)。さらに、Kiyoshiら (1998) は両者の形態学的関係に着目し、ハト外側中隔—視交叉前野でVIPニューロンがGnRHニューロンに投射することを共焦点レーザー走査顕微鏡と透過電子顕微鏡を用いた二重免疫標識法で示唆した。しかし、これまで、鳥類視床下部漏斗部でのVIPニューロンとGnRHニューロンとの形態学的関係については一報のみである (TeruyamaとBeck、2001)。本研究では免疫組織化学法により、共焦点レーザー走査顕微鏡、及び共焦点レーザー走査顕微鏡と通常の光学顕微鏡での同一試料の観察法で両者の形態学的関係を検討した。

材料と方法

ハト：名古屋市及び名古屋市郊外で捕獲されて、野外の飼育ケージで自然環境下で飼育されてハトの成鳥 (体重320～420グラム) を使用した。

脳の固定：麻酔したハトの心臓より固定液 (4%パラホルムアルデヒドと0.1%グルタルアルデヒドを含む0.1モル燐酸緩衝液) を注入し全身に還流した。脳を取出し、視床下部漏斗部を含む脳ブロックを切り出し、さらに4%パラホルムアルデヒドを含む0.1モル燐酸緩衝液に飽和ピクリン酸水溶液15%を追加した固定液で固定した。

共焦点レーザー走査顕微鏡を使った二重免疫標識：上述の脳ブロックより50 μ mの凍結切片を作製した。VIP抗体 (1:1000) (Cambridge Research Biochemicals社) とGnRH抗体 (1:2000) (LRH-13、東大院・理 朴 民根博士提供) を一次抗体とし、切片を4℃で72時間浸漬した。二次抗体としてVIP抗体にはCy3標識ヤギ抗ウサギIgG (1:200) (Jackson Immunoresearch社)、GnRH抗体にはFITC標識ヤギ抗マウスIgG (1:200) (Biosource International社) を用いて、両者の混合液で室温2時間浸漬した。切片はスライドガラス上に褪色防止剤 (FluoroGuard) (BioRad社) で封入し、即座に観察・写真撮影した。今回使用したGnRH抗体の特異性に関してはKiyoshiら (1998) に記載している。観察は共焦点レーザー走査顕微鏡MRC1024 (BioRad社) で行った。VIP免疫陽性ニューロンとGnRH免疫陽性ニューロンを同一視野で解析するため、VIPニューロンの可視化は蛍光標識Cy3を波長543nmのヘリウムネオンレーザーで、GnRHニューロンの可視化は蛍光標識FITCを波長488と514nmのアルゴンレーザーで切片を走査し励起した像を得た。

同一切片による共焦点レーザー走査顕微鏡と光学顕微鏡の免疫標識：脳ブロックより50 μ mのビブラトーム切片を作製した。ビブラトーム切片を50%エタノール液に30分浸漬した。つづいてVIP抗体とGnRH抗体を一次抗体とした蛍光免疫組織化学法を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した (前項と同様)。観察後、同一の切片に通常光学顕微鏡で観察可能な免疫組織化学法を施した。二次抗体として、VIP抗体にはビオチン標識ブタ抗ウサギIgG (1:50) (Dako社)、GnRH抗体にはビオチン標識

ヤギ抗マウスIgG (1:50) (Dako社)を用い、両者の混合液に4°Cで一晩浸漬した。次いでHRP標識ストレプトアビジン (1:80) (Dako社)で4°Cで一晩浸漬した (LSAB法)。常法によりDABで可視化し、脱水後、アラルダイト樹脂を用いてスライドガラスに封入した。通常の光学顕微鏡下で共焦点レーザー走査顕微鏡で観察したニューロンを探しだし、写真撮影した。

結 果

(1) 共焦点レーザー走査顕微鏡を使った二重免疫標識による解析

ハト視床下部漏斗部でのVIPニューロンとGnRHニューロンとの神経解剖学的な共焦点レーザー走査顕微鏡による解析は、VIP免疫陽性反応はCy3の励起情報を疑似的に赤で表示し、GnRH陽性反応はFITCの励起情報を疑似的に緑で表示して行った。これら赤チャンネルと緑チャンネルとを同一の画面に合成し相互の形態学的関係をみた。

正中隆起に隣接する漏斗領域腹側部で、二重標識した凍結切片 (厚さ $50\ \mu\text{m}$) において、VIP細胞体、VIP線維、GnRH線維の三種の免疫陽性構造が認められた。凍結切片の厚さ方向での $1\ \mu\text{m}$ 間隔の断層観察 (切片の0点より顕微鏡ステージを連続的に1, 2, 3 μm 垂直方向に移動し4視野を観察)を行った。その結果、VIP細胞体とGnRH線維およびGnRHバリコースが三次元的に極めて近接している像やVIP細胞体から伸びる樹状突起とみられる突起とGnRH線維およびGnRHバリコースが三次元的に極めて近接している像が得られた (Fig. 1)。

(2) 同一切片による共焦点レーザー走査顕微鏡と光学顕微鏡の免疫二重標識による解析

二重標識したピプラトーム切片 (厚さ $50\ \mu\text{m}$) を用いた共焦点レーザー走査顕微鏡の観察では上述

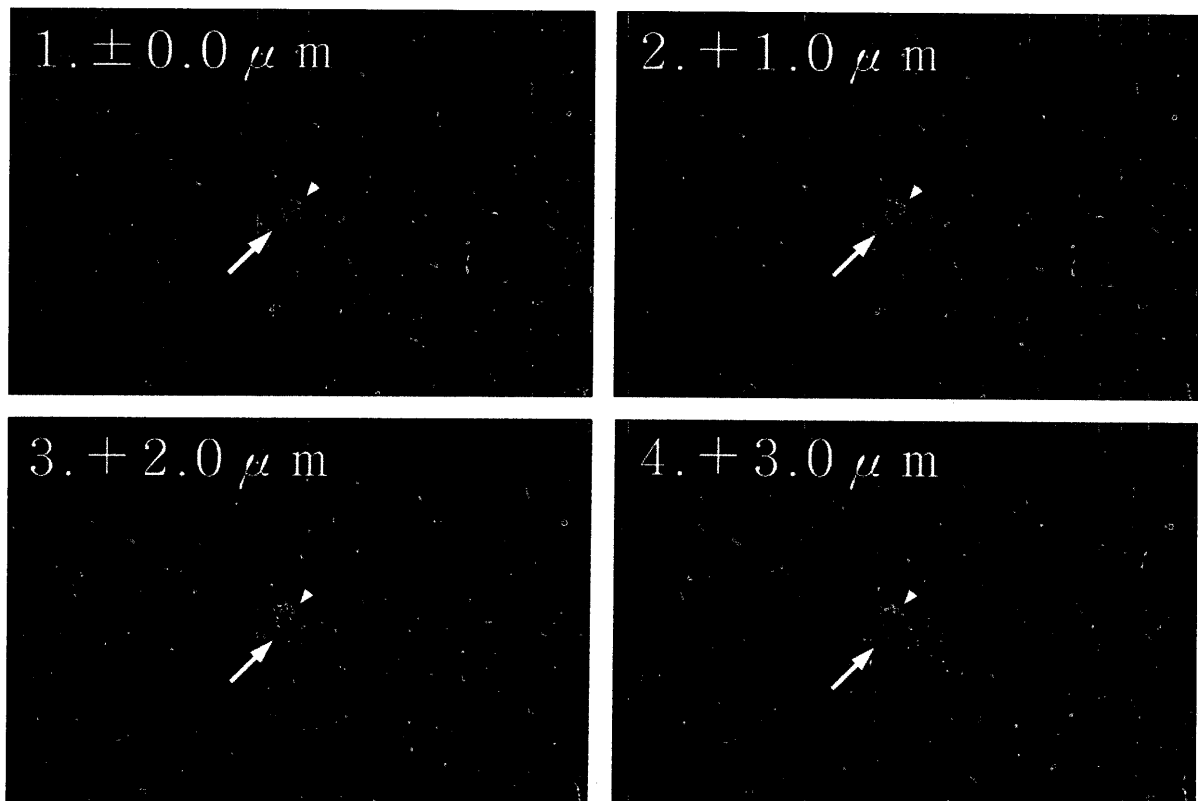


Fig. 1. Confocal microscopy of the infundibular region. Figure panels are confocal scanning projections of 4 serial $1\ \mu\text{m}$ images of tissue double-stained for VIP (red, arrows) and GnRH (green, arrowheads). GnRH fiber contacts with VIP soma.

(1) の場合より二重標識の感度は若干劣っていたが、VIP細胞体、VIP突起とGnRH線維とが認められた、これらが極めて近接する像も得た (Fig. 2)。このような結果は(1)のものと同様であった。さらに共焦点レーザー走査顕微鏡で観察された同一の細胞体と線維を通常の免疫組織化学 (LSAB法) でDABを用いて可視化した (Fig. 4)。これにより、退色のない免疫反応像を低倍で観察することが可能となり、切片全体像のなかで、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察されたVIP細胞体、VIP突起とGnRH線維との局所的な形態学的関係を正確に把握できた。その結果、VIPニューロンの細胞体は正中隆起の背側の漏斗領域で第三脳室上衣の直下に位置することが明らかとなった (Fig. 3)。

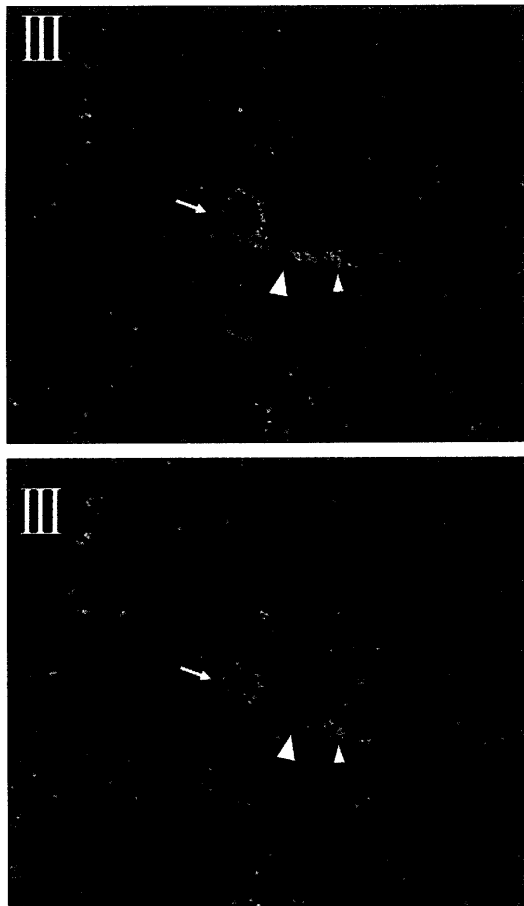


Fig. 2. Confocal microscopy of the infundibular region. Figure panels are confocal scanning projections of 2 serial 1 μm images of tissue double-stained for VIP (red) and GnRH (green). Arrows indicate VIP soma. Large arrowheads indicate VIP process (probably dendritic process). Small arrowheads indicate GnRH fiber. *III*: third ventricle

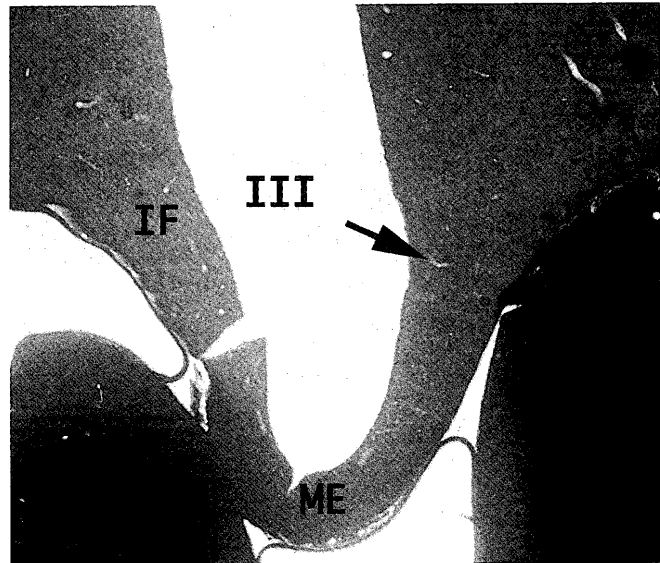


Fig. 3. Light microscopic photomicrograph of same tissue of Fig. 2. Arrow indicates infundibular region of Fig. 2. *IF*: infundibular region, *ME*: median eminence, *III* third ventricle (600 \times)

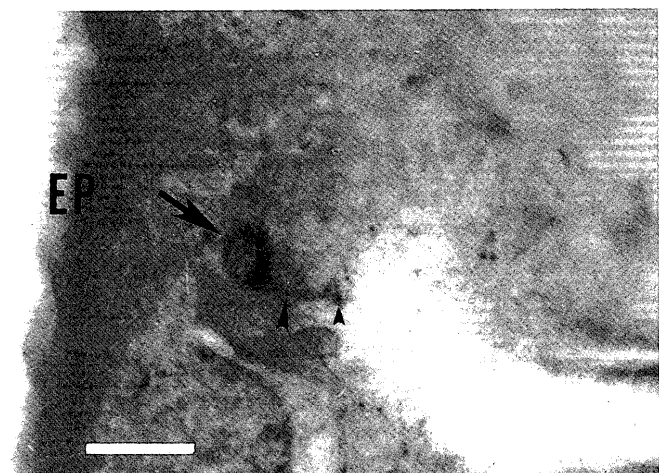


Fig. 4. Light microscopic photomicrograph of DAB immunohistochemistry of same tissue of Fig. 2. Arrow, large arrowhead and small arrowhead correspond to those of Fig. 2. *EP*: ependymal layer, *Bar*: 20 μm

考 察

神経ペプチドであるVIPの鳥類脳内での生理学的役割はまだ解明されていない。最近、VIPが鳥類脳内で光情報の受容や伝達に関与する可能性が示唆されている。1988年にSilverらが、鳥の外側中隔と漏斗部で、視物質抗体に陽性反応を示す小型ニューロンを報告し、これらが生殖周期に関与する脳深部光受容細胞であるとした。同時にこの種の細胞がVIPをも含むことを二重免疫標識法で示した。鳥類の繁殖現象にとって外界の光刺激が重要な役割をなすことは古くから知られている。光情報が生殖を支配することは、機能的には、脳内で光受容系と生殖制御系、すなわち視床下部一下垂体系との神経回路のつながりが考えられる (Hirunagi, 1998 の総説を参照)。免疫組織化学により脳内の GnRH ニューロンや VIP ニューロンの分布が明らかとなり、外側中隔ではVIPニューロン細胞体と線維とGnRHニューロン細胞体と線維とが共存し、視交叉前野ではVIP線維や神経終末とGnRHニューロン細胞体や線維が共存することが明らかになっている。この両者の形態学的関係を明らかにするため、Kiyoshiら (1998) はハト外側中隔一視交叉前野において共焦点レーザー走査顕微鏡と電子顕微鏡を用いて検討し、VIPニューロンがGnRHニューロンを神経支配することを示唆した。さらに、Saldanhaら (2001) はキジバトの視交叉前野で、視物質免疫陽性線維がGnRHニューロンの樹状突起に終末することを電子顕微鏡レベルで報告した。また、ウズラの外側中隔で、VIP線維がGnRHニューロンの細胞体に接触していることが光学顕微鏡レベルで、最近、報告された (TeruyamaとBeck, 2001)。以上に挙げた研究は、GnRHニューロンが脳深部光受容細胞より直接的な投射を受ける可能性を示し、二つのペプチダージックニューロン系の相互関係の解析の端緒となった。光と繁殖のメカニズムの解明にとって、この二系の関係解明が重要な課題の一つとなろう。

一方、視床下部漏斗領域でも、VIPニューロンの存在は報告されている。本稿では、VIPニューロンがGnRHニューロンからの投射を受ける可能性を示唆した。これまでの研究によると、VIPニューロンもGnRHニューロンとともに正中隆起に投射する (岡村ら, 1997)。正中隆起に投射するGnRHニューロンの軸索の側枝の一部が漏斗VIPニューロンに投射し、そのVIPニューロンの軸索は正中隆起に投射すると、GnRHニューロンの軸索の経路途中に位置するGnRHニューロンのVIPニューロンの投射は、VIPニューロン系とGnRHニューロン系との二つの系の機能的関係の上で、フィードバック的な回路を形成する事も考えられる。このことは、二つの系が並列的に存在する正中隆起での機能的相互作用もしくは調節があることを暗示している。視床下部漏斗領域でのこの二つの系の関係については、本稿の結果と一致ない報告もある。TeruyamaとBeck (2001) はウズラの漏斗領域で、免疫組織化学法によりGnRH免疫陽性の線維とVIP免疫陽性の線維とが共存することを報告した。この点は本稿の結果と一致するが、彼らの研究ではGnRH線維とVIP細胞との明確な接触は認めれないとしている。手技的に彼らは通常の光学顕微鏡による解析である。一方、我々の観察では、より高感度の共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、三次元的な解析の結果、両者に接触がある可能性を示唆した。これ以上の両者の形態学的関係の解析は光学顕微鏡の限界を越えたものであり、電子顕微鏡による軸索終末の超微形態の解析によらなければならない。今後の電子顕微鏡解析においては、本稿で用いた方法により、ビブラトーム切片的共焦点レーザー走査顕微鏡観察後の試料を光学顕微鏡で観察し、引き続き同一切片から超薄切片を作製し、透過電子顕微鏡で観察する方法が有効である。

謝 辞

本研究で使用したハトは名古屋大学大学院生命農学研究科の足立明人博士より提供されました。GnRH抗体は東京大学大学院理学研究科の朴 民根博士が作製されたものを使わせて頂きました。御厚意に感謝いたします。

引用文献

- Aste, N., Viglietti-Panzica, C., Fasolo, A. and Panzica, G. C. (1995) Mapping of neurochemical markers in quail central nervous system: VIP- and SP-like immunoreactivity. *J. Chem. Neuroanat.* **8**: 87-102.
- Hirunagi, K. (1998) Extra-retinal photoreceptors in birds –A morphological and functional consideration–. *Anim. Sci. Technol.* (Jpn.) **69**: 533-545.
- Hirunagi, K., Kiyoshi, K., Adachi, A., Hasegawa, M., Ebihara, S. and Korf, H.-W. (1994) Electron – microscopic investigations of vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive terminal formations in the lateral septum of the pigeon. *Cell Tissue Res.* **278**: 415-418.
- Hirunagi, K., Rommel, E. and Korf, H.-W. (1995) Ultrastructure of cerebrospinal fluid-contacting neurons immunoreactive to vasoactive intestinal peptide and properties of blood-brain barrier in the lateral septal organ of the duck. *Cell Tissue Res.* **279**: 123-133.
- Kiyoshi, K., Kondoh, M., Hirunagi, K. and Korf, H.-W. (1998) Confocal laser scanning and electron-microscopic analyses of the relationship between VIP-like and GnRH-like-immunoreactive neurons in the lateral septal-preoptic area of the pigeon. *Cell Tissue Res.* **293**: 39-46.
- Korf, H.-W. and Fahrenkrug, J. (1984) Ependymal and neuronal specialization in the lateral ventricle of the Pekin duck, *Anas platyrhynchos*. *Cell Tissue Res.* **217**: 217-227.
- Kuenzel, W. J. and Blähser, S. (1991) The distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and fibers throughout the chick brain (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res.* **264**: 411-495.
- Kuenzel, W. J. and Blähser, S. (1994) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing neurons: distribution throughout the brain of the chick (*Gallus domesticus*) with focus upon the lateral septal organ. *Cell Tissue Res.* **275**: 91-107.
- Mikami, S., Yamada, S., Hasegawa, Y. and Miyamoto, K. (1988) Localization of avian LHRH-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the domestic fowl, *Gallus domesticus*, and the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Cell Tissue Res.* **251**: 51-58.
- 岡村哲浩、清 健太郎、福田勝洋、蛭薙観順 (1997) 「ハト視床下部漏斗部におけるVIP免疫陽性ニューロンとGnRH免疫陽性ニューロンとの形態学的関係」第124回日本獣医学会講演要旨、173頁
- Saldanha, C. J., Silverman, A. J. and Silver, R. (2001) Direct innervation of GnRH neurons by encephalic photoreceptors in birds. *J. Biol. Rhythms* **16**: 39-49.
- Silver, R., Witkovsky, P., Horvath, P., Alones, V., Barnstable, C. J. and Lehman, M. N. (1988) Coexpression of opsin- and VIP-like-immunoreactivity in CSF-contacting neurons of the avian brain. *Cell Tissue Res.* **253**: 189-198.
- Teruyama, R. and Beck, M. M. (2000) Changes in immunoreactivity to anti-cGnRH-I and -II are associated with photostimulated sexual status in male quail. *Cell Tissue Res.* **300**: 413-426.
- Teruyama, R. and Beck, M. M. (2001) Double immunocytochemistry of vasoactive intestinal peptide and cGnRH-I in male quail: photoperiodic effects. *Cell Tissue Res.* **303**: 403-414.
- Yamada, S., Mikami, S. and Yanaihara, N. (1982) Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing neurons in the hypothalamus of the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Cell Tissue Res.* **226**: 13-26.