

ハト正中隆起外層の神経終末とタニサイトの 電子顕微鏡による相関解析

Electron microscopic analysis of the correlation between neuronal terminals and tanycytes in the external zone of the median eminence of the pigeon

蛭薙 観順 (HIRUNAGI Kanjun)¹⁾・岡村 哲浩 (OKAMURA Akihiro)²⁾・
吉村 崇 (YOSHIMURA Takashi)³⁾

- 1) 名古屋大学博物館
The Nagoya University Museum, Research and Education Section, Chikusa-ku, Nagoya 464-8601, Japan.
- 2) 名古屋大学大学院生命農学研究科 動物形態情報学分野
Laboratory of Animal Morphology and Function, Graduate School of Agricultural Sciences, Nagoya University
- 3) 名古屋大学大学院生命農学研究科 動物行動統御学分野
Laboratory of Animal Behavioral Physiology, Graduate School of Agricultural Sciences, Nagoya University

Abstract

The median eminence consists of neuronal terminals, glia, specifically tanycytes and astrocytes, and portal blood vessels. Neuronal terminals of the median eminence release hypothalamic hormones that are carried via portal blood vessels to adeno-hypophysial cells and control the secretion of adeno-hypophysial hormones. We have examined the relationships of gonadotropin releasing hormone (GnRH) terminals to vasoactive intestinal peptide (VIP) terminals in the median eminence of the pigeon, using light- and electron-microscopy. Confocal laser scanning microscopy and immunoelectron microscopy revealed that GnRH neuronal terminals have direct contact with VIP terminals. No synapse-like structure is observed between the two terminals. This result suggests a functional role of VIP in the regulation of GnRH secretion from the median eminence. In this study, VIP and GnRH terminals frequently are observed to make physical contact with the processes of tanycytes. Some VIP terminals are encased by end-feet of tanycytes near the basal lamina of the portal vessels. Although functional significance of this correlation between neuronal terminals and tanycytes are not clear in this study, morphological plasticity of tanycytes may regulate the secretion of hypothalamic hormones into the portal vessels.

はじめに

正中隆起は間脳の第三脳室の底部で、視床下部と下垂体前葉との接点である。その構造は第三脳室底部に面した部位から下垂体前葉と接する部位にかけて3つの部分から成る。脳室底部から上衣下層、内層(繊維層)、外層である。外層はさらに、網状層と柵状層に分かれる。柵状層に接する下垂体門脈系の毛細血管壁にはタニサイト(tanocyte)の突起、下垂体前葉ホルモン産生放出を調節する放出ホルモン/抑制ホルモンを含む視床下部-正中隆起路の軸索終末やモノアミン含有軸索終末が錯綜して分

布する。放出ホルモン／抑制ホルモンは脳内の神経細胞体で合成され、軸索内を移動し、正中隆起外層の神経終末より分泌される。分泌されたホルモンは下垂体の門脈系に入り、下垂体前葉に運ばれ、そこで下垂体細胞におけるホルモンの合成、分泌を調節する(Kobayashiら1970、井端 1994)。この系において、正中隆起は神経情報が液性情報に変換される場であり、神経終末間での分泌調節機構の存在も考えられる。一方タニサイトは正中隆起の第三脳室の上皮細胞であり、細胞体は正中隆起第三脳室上皮にあり、毛細血管壁に突起を延ばし、血管周囲腔の基底膜におわる。正中隆起の一般的な超微形態は1970年代には明らかにされており、さらに免疫組織化学法により、それぞれの神経終末も電子顕微鏡レベルで同定が可能となってきている。タニサイトの機能については本来がグリア細胞であり、神経的な情報伝達には関与することなく、構造的な支持機能を持つとされてきたが、1970年代に、タニサイトが第三脳室より、下垂体前葉の機能を調節する物質を吸収し、毛細血管に輸送するとする仮説が提唱された(Kobayashiら1972)。またBjelkとFuxe(1993)は正中隆起のタニサイトにより β -エンドルフィンが脳脊髄液から正中隆起外層に輸送されることを示唆している。近年、神経情報の伝達に関し、グリア細胞の関与が注目されている(Prevot, 2002)。鳥類正中隆起での情報伝達や分泌調節については研究が少なく、グリア細胞(タニサイト)の関与も明らかではない。本稿では、ハト正中隆起外層における性腺刺激ホルモン放出ホルモン(gonadotropin releasing hormone, GnRH)神経終末、血管作用性小腸ペプチド(vasoactive intestinal peptide, VIP)神経終末、及びそれらとタニサイト突起との相関的な分布に注目した。

材料と方法

野外で捕獲されて、屋外のケージで自然環境下で飼育されたハトの成鳥(体重320～420g)を実験に用いた。

(1) 光学顕微鏡によるGnRH免疫組織化学

ジエチルエーテルで麻酔したハトの心臓より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モル燐酸緩衝液を約300ml注入し、脳を固定した。正中隆起を含む脳ブロックを10、20、30%シュークロスを含む0.1モル燐酸緩衝液に順次移し、クライオスタットで50 μ mの凍結切片を作製した。切片はLSAB法によりGnRH抗体LRH13(東大院・理 朴 民根 博士提供)を使い免疫組織化学法で染色し、検鏡した。

(2) 共焦点レーザー走査顕微鏡による二重免疫標識

VIPはCy3標識、GnRHはFITC標識で観察した。免疫反応の陽性は共焦点レーザー走査顕微鏡で観察すると、それぞれ赤と緑で表示される。観察法の詳細は前稿を参照のこと(蛭薙ら, 2001)。

(3) 免疫電子顕微鏡

VIP終末とGnRH終末の観察

固定後の脳ブロックより50 μ mのビブラトーム切片を作製し、その切片を、それぞれVIP抗体(Cambridge Research Biochemicals社)とGnRH抗体(前出)を用い、LSAB法で免疫染色した。その後、切片をスライドガラス上にアラルダイトで包埋し、光学顕微鏡で免疫陽性の部位を確認し、必要箇所を切り出し、超薄切片作製のためアラルダイトで再包埋した。超薄切片は常法により、電子顕微鏡観察した。

免疫二重標識によるVIP終末とGnRH終末の観察

同一超薄切片上での両神経終末を観察するため免疫二重標識を行った。第一段階でGnRH抗体を使

いLSAB法で染色、第二段階でVIP抗体を使い金コロイド銀増感法で電子顕微鏡下での可視化を行った。金コロイド銀増感法では、VIP抗体処理のあと、二次抗体として、1nm金コロイドで標識されたヤギ抗ウサギIgG (AuroProbe, Amersham社)を用いた。ついで1nm金コロイドを銀増感キット (IntenSE, Amersham社)で増感した。両終末はそれぞれ電子顕微鏡下では、GnRH終末はDAB-オスミウム複合体を含む終末として、VIP終末は1nm金コロイドを核としたより径の大きなドット像を含む終末として観察される。

結果と考察

光学顕微鏡観察

ハト正中隆起の外層全域にわたり、GnRHの免疫陽性反応は認められる。特に、両背外側では反応は強く、神経終末が密集していると考えられる。外層では陽性反応が数珠状に連なる様子を呈しているが個々の神経終末の同定はできない。さらに門脈の毛細血管の基底膜と陽性終末との形態学的関係は光学顕微鏡では観察が困難である (Fig. 1)。

共焦点レーザー走査顕微鏡観察

VIP神経終末とGnRH神経終末を免疫二重標識した同一切片のコンピュータ合成像で観察した。両者とも正中隆起外層で、背腹方向に、並列し索条に分布している。血管周囲腔に面する部分では両者が直接に接触する像が観察される。個々の神経終末とみられる構造も確認できた (Fig. 2)。

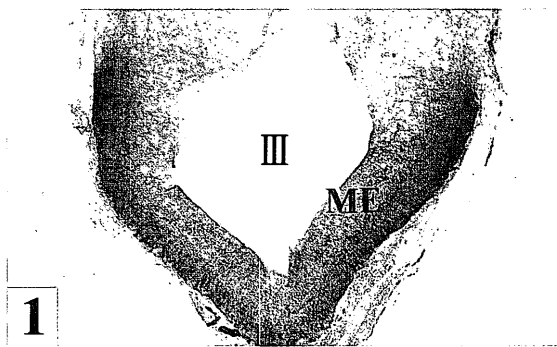


Fig. 1 Light microphotograph of a frontal section of the median eminence (ME) from a pigeon showing a dense GnRH-immunoreactivity (dark brown) in the external zone of the median eminence. III: third ventricle

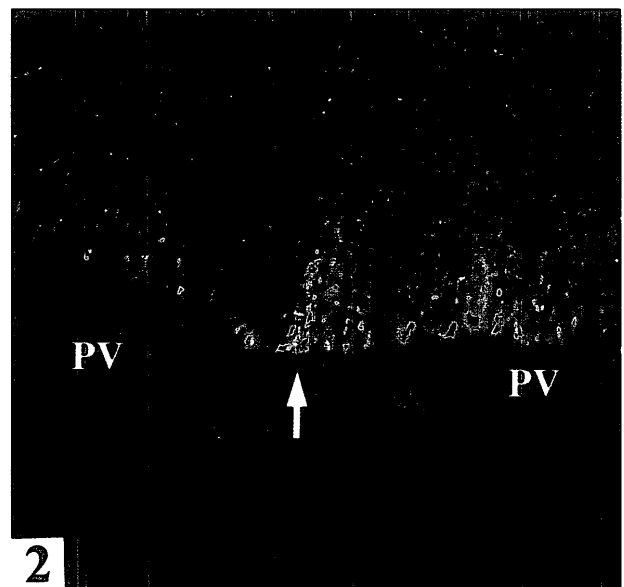


Fig. 2 Confocal microscopy of double immunolabelling in the median eminence. VIP (red) and GnRH (green) neuronal terminals are observed in the external zone of the median eminence. Arrow indicates a close association of VIP and GnRH terminals. PV: perivasculare space.

免疫電子顕微鏡観察

正中隆起外層のVIPおよびGnRH神経終末をそれぞれの抗体を用いた免疫標識超薄切片法で観察した。免疫陽性反応はDABとオスミック酸の複合体を形成することで、電子密度が高い像として観察される。免疫陽性神経終末は囊状、もしくは線維状をなし、内部に陽性顆粒が観察できる場合もある。正中隆起外層ではVIP神経終末のほうがGnRH神経終末より血管基底膜側に分布する傾向にある(Fig. 3)。GnRH終末では、終末の先端が基底膜方向に細い突起状に伸張する像が認められたが、その機能的な意味は不明である(Fig. 4)。VIPとGnRH神経終末の二重免疫標識超薄切片では、VIP終末は顆粒近くに銀増感像を含む。GnRH終末は前述のGnRH単独標識とほぼ同様の免疫陽性反応像を示す。二重免疫標識により、両者の細胞膜が直接接することが明らかとなった。この所見は本稿の共焦点レーザー走査顕微鏡の観察結果と一致する。その接触面にはシナプス構造は認められない。(Fig. 5)。形態学的には両者の情報伝達の様式を推測できないが、VIPニューロンとGnRHニューロンの関係について形態学的に検討した我々の研究では、外側中隔-視交叉前野でVIPニューロン終末がGnRHニューロンに投射することを観察しており(Kiyoshiら1998)、さらに、視床下部漏斗部ではGnRHニューロンの終末が漏斗部のVIPニューロンに投射するのを示唆する観察結果を得ている(蛭薙ら2001)。両ニューロンはその終末を正中隆起に投射しており、本稿では正中隆起での両者の密接な関係が明らかとなった。このような神経解剖学の結果より、GnRHの正中隆起からの分泌に関して、VIPが深く関与していることが示唆され、今後の生理学的な研究でそのメカニズムが解明されることが期待される。鳥類において、VIPおよびGnRHの生理作用は以下のようなものである。正中隆起から放出されるVIPは下垂体前葉からのプロラクチンの分泌を促進し、GnRHはLH分泌を促進する。

LHは繁殖現象を引き起こす重要なホルモンであり、その制御機構は家禽繁殖学の重要なテーマの一つである。鳥類において、VIPとGnRHの相互生理作用に関しては、ほとんど判っていないが、最近の免疫組織化学法で、ユキヒメドリで光条件によりVIPニューロンとGnRHニューロンが逆相関的に増減

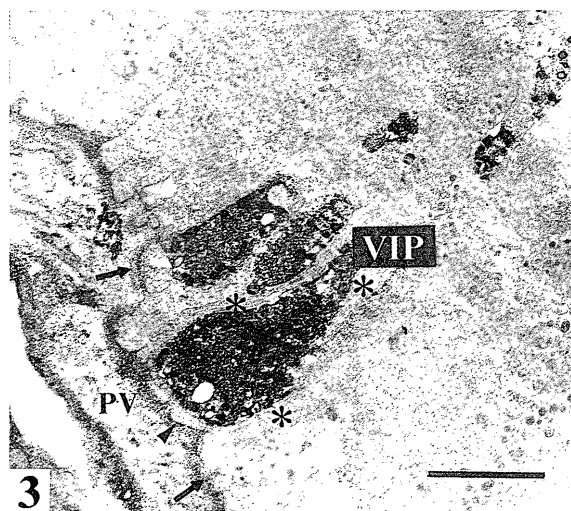
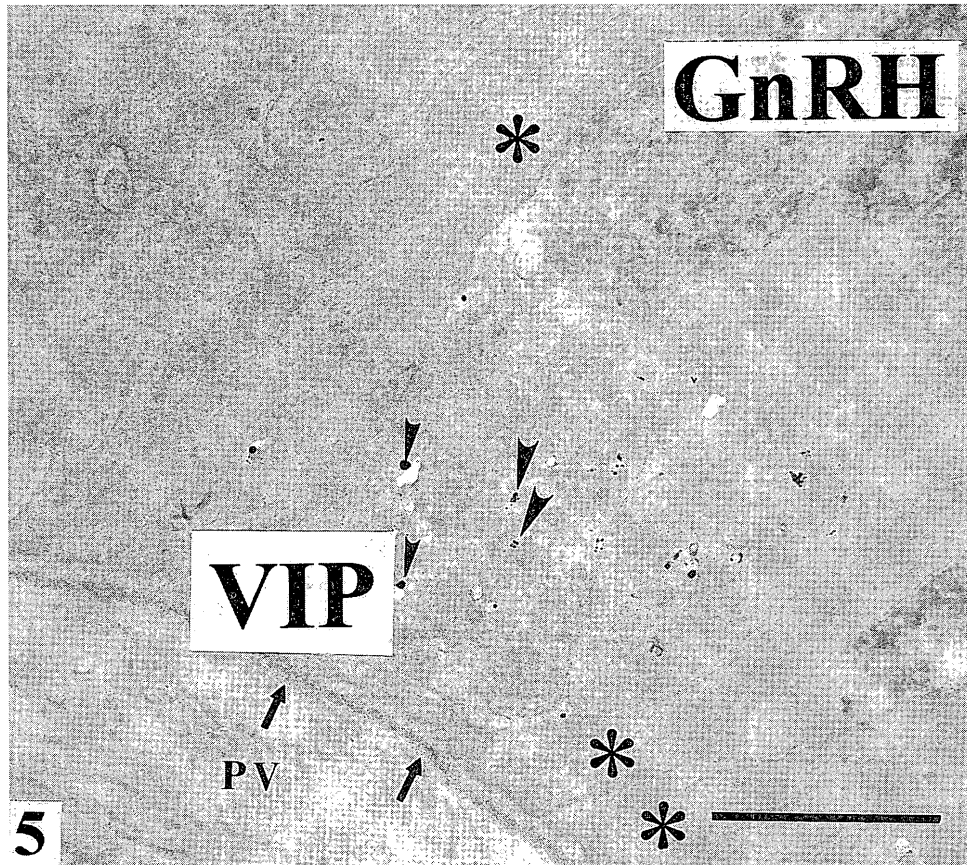


Fig. 3 Electron micrograph of VIP-immunoreactive neuronal terminals of the external zone of the median eminence in close proximity of the basal lamina (arrows) and perivascular space (PV). A VIP terminal (VIP) makes physical contact with the processes of tanycytes (asterisks). Arrow head indicates a process of tanycyte encasing VIP terminal. Bar: 1 μ m



Fig. 4 Electron micrograph of GnRH-immunoreactive neuronal terminals of the external zone of the median eminence in close proximity of the basal lamina (arrows) and perivascular space (PV). A GnRH terminal (GnRH) emits a thin process (arrow head) toward the basal lamina. GnRH terminals are closely associated with processes of tanycytes (asterisks). Bar: 1 μ m



5 Fig. 5 Electron micrograph of VIP- and GnRH-immunoreactive neuronal terminals of the external zone of the median eminence in close proximity of the basal lamina (arrows) and perivascular space (PV). VIP immunoreactivity is shown as silver-enhanced immunogold particles (arrow heads) in the terminal (VIP), GnRH-immunoreactivity is shown as deposits of osmium-DAB complex in the terminal (GnRH). A VIP terminal has direct contact with a GnRH terminal. Processes of tanyocytes (asterisks) have direct contact with VIP or GnRH terminals. Bar: 1 μ m

することが報告され、血中のLHやプロラクチン濃度の変動がVIPニューロンとGnRHニューロンの数の変動による可能性を示唆している (Saldanhaら、1994)。VIPとGnRHは相互に分泌の抑制作用をもつことも示唆され、正中隆起において両脳ホルモンの分泌終末が密接することは、正中隆起がその分泌調節作用の場である可能性が示唆される。

本稿では正中隆起外層における神経終末とタニサイト突起およびその突起の終足の関係に着目した。タニサイトは電子顕微鏡像において、突起内の豊富な線維構造により、神経終末と区別される。VIP終末およびGnRH終末ともに、タニサイト突起と接触する像が観察される (Figs. 3 と 4)。神経終末の先端部と基底膜との間にタニサイト突起 (終足) が入り、終末を包み込む像を観察される (Fig. 3)。さらに二重免疫標識超薄切片の観察においても、前述のようなタニサイト突起と神経終末との密な形態学的関係は確認できる (Fig. 5)。このような像より、神経終末からの脳ホルモンの分泌の制御にタニサイト突起が関与する可能性が示唆される。おそらくタニサイトの終足が神経終末と基底膜の間でシャッターの役割をするのであろう。放出ホルモンの分泌機能亢進状態と抑制状態における正中隆起タニサイト突起とGnRH神経終末の相関的な形態解析は鳥類の正中隆起では報告がない。しかしながら、最近、ラットにおいて性周期に伴い、GnRH神経終末とタニサイト突起との関係が変化することが

報告されている (Kingら 1994a, Kingら 1994b, KingとRubin 1995、Wittkowski 1998)。ラット正中隆起のGnRH終末がタニサイト突起の終末で包まれている電子顕微鏡像や、LH分泌が盛んな発情前期ではGnRH終末が下垂体門脈の基底膜と物理的に直接接するのに対して、生殖器系が退行している発情間期ではこのような電子顕微鏡像は観察されないとする報告がある(Prevotら1998、Prevotら1999)。本研究でこの点の解明を試みたが、ハトは季節繁殖性をはっきり示さないため、生理状態による解析は出来なかった。今後、環境の光条件を調節することで繁殖期および非繁殖期の生理状態を作出しやすいウズラを用いた研究が期待される。すなわち、GnRH分泌が亢進される長日処理群と、抑制状態にある短日処理群において正中隆起でのGnRH終末とタニサイト突起との形態学的な相関関係の変化や、タニサイトの形態的可塑性を電子顕微鏡レベルで検討することは非常に興味あるテーマである。

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。

文 献

- Bjelke, B. and Fuxe, K. (1993) Intraventricular β -endorphin accumulates in DARPD-32 immunoreactive tanyocytes. *Neuro Report*, **5**, 265-268.
- 蛭薙観順・岡村哲浩・清 健太郎・法橋光徳・福田勝洋 (2001) 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. *名古屋大学博物館報告*, **17**, 1-6.
- 井端泰彦 (1994) 視床下部諸神経核とその細胞構築および微細構造. 視床下部-下垂体系 形態と機能 (井端泰彦 著), 中外医学社, 東京, 10-38.
- King, J. C. and Letourneau, R. J. (1994a) Luteinizing hormone-releasing hormone terminals in the median eminence of rats undergo dynamic changes after gonadectomy, as revealed by electron microscopic image analysis. *Endocrinology*, **134**, 1340-1351.
- King, J. C. and Rubin, B. S. (1994b) Dynamic changes in LHRH neurovascular terminals with various endocrine conditions in adults. *Hormones and Behavior*, **28**, 349-356.
- King, J. C. and Rubin, B. S. (1995) Dynamic alterations in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal cell bodies and terminals of adult rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **15**, 89-106.
- Kobayashi, H., Matsui, T. and Ishii, S. (1970) Functional electron microscopy of the hypothalamic median eminence. *International Review of Cytology*, **29**, 282-381.
- Kobayashi, H., Wada, M. and Uemura, H. (1972) Uptake of peroxidase from the third ventricle by ependymal cells of the median eminence. *Zeitschrift für Zellforschung*, **127**, 545-551.
- 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 and Tissue Research*, **293**, 39-46.
- Prevot, V. (2002) Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, **14**, 247-255.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G. B. and Beauvillain, J. C. (1999) Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrus cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience*, **94**, 809-819.
- Prevot, V., Dutoit, S., Croix, D., Tramu, G. and Beauvillain, J. C. (1998) Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrus cycle of the rat. *Neuroscience*, **84**, 177-191.

- Saldanha, C. J., Deviche, P. J. and Silver, R. (1994) Increased VIP and decreased GnRH expression in photo-refractory dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). *General and Comparative Endocrinology*, **93**, 128-136.
- Wittkowski, W. (1998) Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. *Microscopy Research and Technique*, **41**, 29-42.