

博 士 論 文

ウナギの飲水行動を調節している

神経回路網の探索

平成14年11月

椋 田 崇 生

目次

序論	1
第1章 ウナギの飲水行動に関与している脳部位-脳地図の構築と脳室周囲器官の同定	
要旨	2
はじめに	2
材料と方法	2
結果	4
考察	11
付図・付表	14
第2章 ウナギの飲水関連筋に投射しているニューロン	
要旨	30
はじめに	30
材料と方法	31
結果	32
考察	34
付図・付表	36
第3章 カテコールアミンによるウナギの glossopharyngeal-vagal motor complex の活動変化とそれを支配する神経核	
要旨	44
はじめに	44
材料と方法	45
結果	46
考察	48
付図・付表	50
総合的考察と結論	56
謝辞	60
関連論文	61
引用文献	61

序論

飲水行動は体内水分の恒常性維持のために大部分の脊椎動物にとって欠かすことができない。これまで飲水行動の神経調節機序は、哺乳類を用いて古くから数多くの研究が進められてきたが、現在でも決定的な飲水行動の神経回路モデルは提唱されていない。哺乳類の飲水行動はいくつかのステップからなる：‘渇きを感じ’、‘水を探し’、‘水場へ移動し’、‘水を口に含み’、‘水を飲み込む(嚥下)’。これら各ステップには、それぞれを制御する個々の神経回路が存在する。それらの存在が哺乳類の飲水行動の神経調節機序を複雑にしていると思われる。一方、魚類は水中に生活し、呼吸のために絶えず口腔-咽頭腔内が水で満たされているので、ただ1回の飲水のときには、‘渇きを感じた’あとに‘嚥下する’だけで飲水行動が完了する。(連続的な飲水のときには、飲水のために‘口を開き’、‘水を口に含む’ことが必要である)。このように、飲水行動が単純である魚類は、その神経調節機序も哺乳類より単純であることが予測できるので、魚類は、飲水行動の神経調節機序の解析と神経回路モデルの構築に適した動物であると思われる。

魚類のなかでもウナギは他の魚類にくらべ外科的手術に耐性があることなどから、飲水行動の解析に用いられ、飲水調節因子が次々と明らかにされてきた (Hirano, 1974; Takei *et al.*, 1979, 1998; Ando & Nagashima, 1996; Ando *et al.*, 2000a, b)。海水ウナギの飲水は、angiotensin II (ANGII)、acetylcholine (ACh) などの血中投与によって促進され、atrial natriuretic peptide (ANP)、arginine vasotocine (AVT) などの血中投与によって抑制される (Ando *et al.*, 2000a, b)。これらの因子の血中投与は、哺乳類の飲水行動にも同様な効果をもたらすことから (Fitzsimons, 1998)、ウナギも哺乳類と同様な経路を経て、飲水調節が行われていることが考えられる。ANG II や ANP などの飲水調節因子は血液脳関門を通過できない。したがって、これらの因子は脳室周囲器官とよばれる血液脳関門を欠いている特別な脳部位だけに作用し、飲水行動を変化させる (Fitzsimons, 1998; Simon, 2000)。一般に哺乳類では、7 部位が脳室周囲器官として同定されており、そのなかでも視床下部の organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT)、subfornical organ (SFO) が飲水に関与していることが明らかにされている (Fitzsimons, 1998)。ウナギの場合、飲水調節因子が次々と明らかにされている一方で、ウナギの脳室周囲器官を含め、飲水行動に関与している脳部位の検討はまだほとんど進められていない。そこで第1章では、ウナギの飲水行動を調節する神経回路の解析に欠かすことのできない脳地図の作製とともに、ウナギの脳室周囲器官(飲水行動の調節に関わる神経回路網への入力部位)の同定を行った。

ウナギの飲水行動は、脳のいかなる神経回路で調節がなされたとしても、最終的には口腔から食道までの飲水に関与している筋(飲水関連筋)の調和のとれた動きによって成し遂げられる。これには飲水関連筋を支配する運動ニューロンの存在が欠かせない。第2章では、飲水関連筋を支配する脳内運動ニューロン(神経回路網からの出力部位)の同定を試み、組織学的特性を検討した。さらに、第3章では、これら飲水関連筋を支配する運動ニューロンの機能的特性を解析した。

第1章 ウナギの飲水行動に関与している脳部位

—脳地図の構築と脳室周囲器官の同定

要旨

これまで我々の研究室ではウナギの飲水行動を調節している因子を明らかにしてきたが、飲水行動の神経調節機序の解析はおこなわれていなかった。そこで、本研究ではウナギの飲水行動に関与している脳部位を調べるために、Klüver-Barrera 染色した切片にもとづいて、嗅球 (OB) から延髄 (MO) におよぶウナギの脳地図を作製し、哺乳類で嚥下関連神経核と考えられている glossopharyngeal motor nucleus (MNIX) と vagal motor nucleus (MNX) をウナギの延髄で同定した。ウナギの MNIX と MNX には明瞭な境界はなく、一緒になって前後に長い神経核複合体を形成していたので、この複合体を glossopharyngeal- vagal motor complex (GVC) と呼ぶことにした。

ウナギの腹腔に Evans blue (EB) を注射すると、saccus dorsalis (SD)、epiphysis (E)、magnocellular preoptic nucleus (PM)、nucleus anterior tuberculi (NAT)、area postrema (AP) が血中からの EB で染色された。EB は血中でアルブミンと結合し EB-アルブミン複合体を形成するため血液脳関門を通過することはできない。この結果は、SD、E、PM、NAT、AP が血液脳関門を欠いている部位であることを示している。また、これらの脳部位のなかでも、PM、NAT、AP のニューロンは明らかに EB を取り込んでいた。したがって、これらの脳領域は血中からの飲水調節因子を受容する脳室周囲器官であると考えられる。

はじめに

これまでウナギを用いた飲水行動の解析から、哺乳類と同様な血中飲水促進因子が同定されてきた。海水ウナギの飲水は、angiotensin II (ANGII)、acetylcholine (ACh) などの血中投与によって促進され、atrial natriuretic peptide (ANP)、arginine vasotocine (AVT) などの血中投与によって抑制される (Ando *et al.*, 2000a, b)。また、これらの因子の頭蓋内投与によっても、血中投与の場合と同様な飲水行動の変化が見られることから、これらの物質が体循環を介して直接脳に作用していると考えられる。しかし、脳には血液脳関門があるので、一般にこれらの血中因子は脳に漏れ出すことはなく、作用する部位としては、血液脳関門を欠いている特定の脳部位である脳室周囲器官に限られる。哺乳類では、血中飲水調節因子が脳室周囲器官に作用し、脳の神経回路によって飲水行動が調節されていることが知られている (Fitzsimons, 1998)。そこで、本研究では、ウナギの腹腔内に色素 Evans blue (EB) を注射しウナギの脳室周囲器官を識別することにした。また、それに先立って、脳の神経回路の解析に欠かすことのできない詳細な脳地図を、比較解剖学的に嗅球から延髄までの脳全体にわたって作製した。

材料と方法

Klüver-Barréra 染色

体重約 200 g の養殖ニホンウナギ *Anguilla japonica*, Temminck & Schlegel, 1847 を購入し、20°C の人工海水中で 1 週間以上飼育したものをを用いた。断頭後、氷温下で頭蓋表面の筋を除去し、固定液が効果的に脳に浸透するように頭蓋の左右を切り開いたのちに、4 % paraformaldehyde (PFA; Kanto Chemical, Tokyo, Japan) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) で固定した(4 °C・12 時間)。脳を頭蓋から単離し、エタノール系列で脱水し、キシレンで透徹したのちにパラフィンに包埋した。その後、マイクロームを用いて横断面および矢状断面切片(厚さ 7 µm)を作製した。

Klüver & Barréra (1953) にもとづいて、神経細胞体と有髄神経線維を染め分けた。

脱パラフィンした切片を蒸留水 (DW) で十分に洗浄したのち、酢酸水溶液 (20 drops of 10 % acetic acid in 100 ml) に 5 分間浸し、その後、95 % エタノールに数分間浸した。有髄神経線維を染色するために 95 % エタノールに十分なじませた切片を Louxol Fast Blue MSB (LFB; Chroma-Gesellschaft, Könger, Germany) solution (1.0 g LFB in 1000 ml of 95 % ethanol) で染色した(58 °C・24 時間)。95 % エタノールで余分な染色液を洗い落とし DW になじませたのち、0.05 % 炭酸リチウム水溶液に数分間浸し、70 % エタノールに 5 回切片を浸すことで染め分けを行った。切片を DW で洗浄したのち、神経細胞体を染色するために、Cresyl Violet (CV; Katayamakagaku, Tokyo, Japan) solution (0.1 g CV and a few drops of 10 % acetic acid in 10 ml DW, then filtered prior to incubation) で染色した(室温・30 分)。切片を DW で洗浄し、エタノール系列で脱水、キシレンで透徹後封入した。作製した標本を、カラーデジタルカメラ (Dimage EX, Minolta, Tokyo, Japan) を備えた光学顕微鏡 (BH-2, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し写真撮影した。

Evans blue 投与

Evans blue (EB) は、血中でアルブミンと結合し EB-アルブミン複合体を形成するので (Clasen *et al.*, 1970; Saria & Lundberg, 1983)、病的状態 (Zucker *et al.*, 1983; Uyama *et al.*, 1998; Bemana *et al.*, 1996) を除けば血液脳関門を通過することはできない。この特性から、哺乳類では血液脳関門を欠いている脳部位、すなわち脳室周囲器官を調べるためのトレーサーとして、EB は一般に用いられている (Weiss & Cobbett, 1992; Jurzak *et al.*, 1994)。

EB (Kanto Chemical, Tokyo, Japan, 5.0 mg / ml) を phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) に溶かし、0.1 % 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222, Sigma Chemical, MO, USA) で麻酔したウナギの腹腔内に 1.0 ml 注射した。注射 5 日後、再びウナギを MS-222 で麻酔し、動脈球から生理食塩水 (100 ml) を灌流して脱血したのち、断頭し脳を固定した(固定法は Klüver-Barréra 染色のとときと同様)。その後、脳を 30 % sucrose in 0.1 M PB で置換し(4 °C・一晚)、OCT Compound (Sakura, Finetechnical, Tokyo, Japan) で包埋後、クリオスタットで横断面切片(厚さ 30 µm)を作製し、PBS で洗浄し封入した。作製した標本を、モノクローム冷却式 CCD カメラ (C5985, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を備え

た落射式蛍光顕微鏡 (Labophot-2, Nikon, Tokyo, Japan; Ex = 510-560 nm, Em = 590 nm) で観察し写真撮影した。

結果(記載)

外部形態

ウナギの脳の外部形態を FIG. 1-1 に示す。ウナギの脳は前後に長く、嗅球 (olfactory bulb, OB) から延髄 (medulla oblongata, MO) まで約 1.5 cm に達する。側面観では、背側に 4 つの膨らみが吻尾方向に認められる; OB、終脳 (telencephalon, Tel)、視蓋 (optic tectum, TeO)、小脳 (cerebellum, Ce)。これらは、OB が比較的小さい以外はほぼ同じくらいの大きさである。OB は Tel に密着していて、吻尾方向に長く、吻側に収束した卵形を呈する。TeO レベルでは脳幹部が腹側に張り出し、inferior lobe of the hypothalamus (IL) を形成する。ウナギの延髄は明瞭な境界なしに脊髄に移行する。脳幹領域には 10 対の脳神経が認められる (I, olfactory nerve; II, optic nerve; III, oculomotor nerve; IV, trochlear nerve; V, trigeminal nerve; VI, abducens nerve; VII, facial nerve; VIII, octaval nerve; IX, glossopharyngeal nerve, X, vagal nerve)。また、延髄と脊髄の移行部から数対の spinooccipital nerve (SO) が伸びる。

背側面観では、OB、Tel、TeO が一対の半球からなっていることがわかる。一方、Ce は半球構造をとらないが、尾側縁にくびれが 2 箇所認められる。Ce 尾側の MO 正中域には吻尾方向に細長い深いくぼみがあり、第四脳室 (fourth ventricle, V4) の一部を形成する。さらに V4 の尾側はわずかにくぼみ、area postrema (AP) に相当する。脱血をおこなっていない脳標本では AP は赤色を呈する。腹側面観では、IL のすぐ尾側に saccus vasculosus (SV) があり、赤色の円盤状構造 ($\phi = 1.0$ mm) を呈する。同様な構造はニジマスでも認められる (Meek & Nieuwenhuys, 1998)。

脳地図

ウナギの脳地図を FIG. 1-2 に示す。本記載はこれまでに報告された次の魚類の神経解剖学的記載を参考に行った: ヨーロッパウナギ (Meredith & Roberts, 1986, 1987; Meredith *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1989; Wullimann *et al.*, 1991; Molist *et al.*, 1993)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998)、ボラ (Díaz-Regueira & Anadón, 1992)、キングヨ (Peter & Gill, 1975; Morita & Finger, 1987a, b; Goehler & Finger, 1992)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ナマズ (Kanwal & Caprio, 1987)、そのほかの硬骨魚類 (Nieuwenhuys *et al.*, 1998)。神経核や神経線維束の名前は基本的に Wullimann *et al.* (1996) あるいは Meek & Nieuwenhuys (1998) に従った。

嗅球 (olfactory bulb, OB). OB は、3 つの層からなるが、それらの境界は不明瞭である (Plane 1)。これらの層は内側から、internal cellular layer (ICL)、external cellular layer (ECL)、glomerular layer

(GL) に相当する。このような層構造はゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) でも観察されている。どの層も小さな神経細胞体 (ca. 5 μm) からなり、GL の細胞体は他の層より高密度である。

終脳 (telencephalon, Tel). Tel は正中にある telencephalic ventricle (VT) で 左右の半球に分けられる。Tel の半球は dorsal telencephalic area と ventral telencephalic area からなる。dorsal telencephalic area (D) は小さな顆粒状の細胞体からなる (Planes 2, 3)。D は尾側に向かって、central zone of the D (Dc)、medial zone of the D (Dm)、dorsal zone of the D (Dd)、lateral zone of the D (DI) に分けられる。このような形態はキンギョ (Peter & Gill, 1975) でも観察されている。さらに尾部では、脳表面のくびれ部分を境に、DI は dorsal part (DId) と ventral part (DIv) に細分される (Plane 4)。DIv はゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) の posterior zone of the D に対応している。脳表面では、Dm と Dd の境界部にくびれがあり (Planes 3, 4)、これはゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) の結果から、sulcus ypsiloniformis (SY) と同定できる。Dd は細胞体が密集していることで特徴づけられる (Plane 4)。ventral telencephalic area (V) は 5 つの神経核にわけられる; dorsal nucleus of the V (Vd)、ventral nucleus of the V (Vv)、lateral nucleus of the V (VI)、supracommissural nucleus of the V (Vs)、postcommissural nucleus of the V (Vp) (Planes 2-4)。同様な 5 つの神経核はゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも見られている。

Nerve tracts. medial olfactory tract (MOT) は Vv の腹側を走行し、Tel 中部まで達する (Planes 2, 3)。一方、lateral olfactory tract (LOT) は、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) と同様に、吻部で消失する。左右の半球は、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) と同様に、尾部で anterior commissure (Cant) で連絡される (Plane 4)。尾部では間脳 (diencephalon, Die) に向かう median forebrain bundle (MFB) と lateral forebrain bundle (LFB) が識別できる (Planes 4-6)。

間脳 (diencephalon, Die). Die は Tel の尾側にあり 7 つの領域にわけられる; preoptic area、epithalamus、dorsal thalamus、ventral thalamus、hypothalamus、posterior tuberculum、preteetum。これはゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) と同様な形態である。Die の吻部正中域には背腹方向に伸びる細長い第三脳室 (third ventricle, V3) が開口する (Planes 4-9)。Wullimann *et al.* (1996) はこの脳室を diencephalic ventricle と呼んでいるが、本記載では哺乳類の脳との比較を容易にするために、V3 を用いた。V3 という名称はキンギョ (Peter & Gill, 1975) などをはじめ、様々な魚類 (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも用いられている。V3 は尾側に向かうにつれて、腹側部が横方向に広がり、infundibulum (INF) (Planes 8-10) と recess lateralis (RL) (Planes 9-11) を形成する。このような V3 の構造はキンギョ (Peter & Gill, 1975)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも見られている。

Preoptic area. preoptic area は V3 吻部を取り囲む領域で、もともと吻部の V3 は parvocellular preoptic nucleus (PP, < 5 μm) (Plane 4) と magnocellular preoptic nucleus (PM) (Plane 5) によって囲ま

れる。ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やニジマス (Nieuwenhuys *et al.*, 1998) では、PP を anterior part of the PP と posterior part of the PP に細分しているが、ウナギでは PP で明確な境界が見られないのでこの領域のニューロンを一括して PP とした。PM は大きな細胞体 (ca. 20 μm) で特徴づけられ、PP の背側に位置する (Plane 5)。V3 の腹側縁は suprachiasmatic nucleus (SC) によって囲まれる (Planes 5, 6)。さらに、SC の腹側に optic tract (OT) と optic chiasm (CO) が腹側方向に伸び出す (Plane 5)。このような形態はゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも見られる。Plane 4 の PP 直下の正中域は、ニジマス (Pérez *et al.*, 2000) で示されている vascular organ of the lamina terminalis (OVL) に相当するかもしれない。

Epithalamus. epithalamus は habenular nucleus (Ha)、saccus dorsalis (SD)、epiphysis (E; pineal gland) からなる。Ha は V3 の背側部を取り囲む神経核で、染色態度から 2 つに識別される; dorsal habenular nucleus (Had) と ventral habenular nucleus (Hav) (Planes 5, 6)。SD は VT と V3 を覆うように吻側に向かって伸び出す (Planes 2-6)。このような構造はキンギョ (Peter & Gill, 1975)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも認められている。

Thalamus. dorsal thalamus は epithalamus の尾側にあつて、3 つの神経核が識別される; anterior thalamic nucleus (A)、dorsal posterior thalamic nucleus (DP)、central posterior thalamic nucleus (CP)。A は Hav の腹側にあり (Plane 6)、A の尾側には、DP と CP が V3 に沿って位置する (Planes 7-9)。ventral thalamus は ventromedial thalamic nucleus (VM) と ventrolateral thalamic nucleus (VL) からなる (Plane 6)。

Hypothalamus. hypothalamus は thalamus の腹側にあつて、大きく 3 つの領域にわけられる; periventricular region、tuberal region、inferior lobes (IL)。periventricular region は RL 周囲に相当し、saccus vasculosus (SV) (Planes 11-14) と the nucleus recessi lateralis (NRL) (Planes 8-12) からなる。NRL はヨーロッパウナギ (Molist *et al.*, 1993) やゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) の dorsal zone of the periventricular hypothalamus に対応している。ウナギの tuberal region は INF (Planes 7-10) によって占められ、吻部 INF 周囲を anterior tuberal nucleus (NAT) (Planes 7-10) が、尾部を posterior tuberal nucleus (NPT) (Plane 11) が取り囲む。このような構造はニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも見られる。tuberal region は、キンギョ (Peter & Gill, 1975) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) の medial tuber に相当するようである。IL は、キンギョ (Peter & Gill, 1975)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) と同様に、腹側方向に張り出し、その外側域は diffuse nucleus of the inferior lobe (DIL) に相当する (Planes 7-12)。ウナギの INF の腹側正中域を median eminence (ME) とする報告もあるが (Tsuneki, 1986)、同じ領域を hypothalamus-hypophysial tract とするニジマスの報告もある (Pérez *et al.*, 2000)。

Posterior tuberculum. posterior tuberculum (TP) は mesencephalon (Mes) への腹側移行部で、thalamus の尾側にあたり、V3 に沿って尾側方向に伸びる。TP の最吻部には periventricular nucleus

of the posterior tuberculum (TPp) があり (Planes 7-10)、その腹側正中部には paraventricular organ (PVO) があって、INF に面する (Planes 8, 9)。このような構造はニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも観察されている。PVO は血管系がよく発達していることで特徴づけられる。TPp の側方には preglomerular nucleus (PG) がある (Planes 7-10)。周縁部には nucleus tori lateralis (NTL) があるが (Planes 7-9)、これはキンギョ (Peter & Gill, 1975) の nucleus diffusus tori lateralis に相当する。このような形態はヨーロッパウナギ (Molist *et al.*, 1993) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも観察されている。TP の最尾端正中域の ventral thalamus と hypothalamus の間には corpus mamillare (CM) があるが (Plane 11)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) の CM ほど細胞体が密集しない。

Pretectum. pretectal region は Mes への背側の移行部で、太い posterior commissure (Cpost) で特徴づけられる (Planes 7-9)。Cpost の直下には subcommissure organ (SCO) があり、よく発達した ependymal cells が V3 周縁部に配列する (Planes 7-9)。同様な形態の SCO はキンギョ (Peter & Gill, 1975) やゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) でも観察されている。SCO の側方には ventral part of the periventricular pretectal nucleus (PPv) と dorsal part of the periventricular pretectal nucleus (PPd) があり (Planes 8, 9)、PPd の背側には paracommissural nucleus (PCN) がある (Plane 8)。PCN の側方には吻尾方向に並ぶ 2 つの神経核があり、より吻側のものが parvocellular superficial pretectal nucleus (PSP) (Plane 7) で、尾側のものが central pretectal nucleus (CPN) (Plane 8) である。

Nerve tracts. postoptic commissure (Cpop) は CO のすぐ尾側にある (Plane 6)。dorsomedial optic tract (DOT) は optic tectum (TeO) に向かって背側方向に伸びるが (Planes 6, 7)、ventrolateral optic tract (VOT) は尾側方向に伸びる (Planes 6-11)。fasciculus retroflexus (FR) は、epithalamus では Had や Hav のすぐ尾側にあらわれ (Plane 7)、中脳 (mesencephalon, Mes) の interpeduncular nucleus (NIn) が現れる領域に向かって尾側方向に伸びる (Plane 13)。horizontal commissure (Chor) は Die の吻部腹側に現れ (Plane 6)、背側に向かって伸び (Plane 7)、Die-Mes 領域を通過して尾側に伸びる (Planes 7-9)。

中脳 (mesencephalon, Mes). mesencephalon (Mes) は背側に大きくふくらんだ TeO によって覆われる幅の広い mesencephalic ventricle (VMes) によって特徴づけられ、次の 3 つの領域にわけられる； optic tectum (TeO)、tegmentum、torus semicircularis。

Optic tectum. TeO は明瞭な階層構造をなし、神経細胞体は脳室周縁部に密集して配列し、periventricular gray zone (PGZ) を形成する (Planes 6-15)。TeO の腹側正中部には吻尾方向に長い torus longitudinalis (TL) が VMes に向かって突出する (Planes 7-15)。TL の直上には commissura tecti (Ctec) があり、左右の TeO を連絡する (Planes 8, 9)。詳細な TeO の神経解剖学はヨーロッパウナギ (Molist *et al.*, 1993) で行われている。

Tegmentum. tegmentum は VMes の腹側実質部に相当し、大きな細胞体 (> 20 μm) を有する。tegmentum の最吻部にある nucleus ruber (NR) の細胞体は円-卵形を呈する (ca. 25 μm) (Planes 9,

10)。NR の正中側で PPv の尾側には nucleus of the medial longitudinal fascicle (NMLF) があり (Plane 10)、その細胞体は巨大で円-卵形を呈する (ca. 40 μm)。tegmentum 吻部では VMes に面してよく発達した血管系が認められ、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) の vascular lacuna of area postrema (Vas) に対比できる (Planes 10, 11)。NMLF の側方には rostral tegmental nucleus (RT) がある (Plane 10)。ヨーロッパウナギでは RT は tegmentum lateral group と記載されている (Molist *et al.*, 1993)。NMLF の尾側には卵形 (ca. 10 μm) の細胞体が正中域に分布し (Planes 11-13)、これらの細胞体は、分布位置から3つのクラスターにわけられる; oculomotor nucleus (MNIII) (Planes 11, 12)、Edinger-Westphal nucleus (EW) (Plane 12)、trochlear nucleus (MNIV) (Plane 13)。同様な配列はヨーロッパウナギ (Molist *et al.*, 1993)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも見られている。VMes の腹側縁は脳室側に張り出し、lateralis valvulae (NLV) を形成し (Planes 11, 12)、尾側で rhombencephalon の valvula cerebelli と癒合する (Planes 13, 14)。NLV の腹側には、ヨーロッパウナギ (Molist *et al.*, 1993) と同様に nucleus lateralis profundus mesencephali (LPM) がある (Plane 12)。tegmentum の尾側部には腹側正中域に interpeduncular nucleus (NIn) がある (Plane 13)。

Torus semicircularis. torus semicircularis (TS) は VMes の腹側域に相当し、その脳室縁は VMes に向かって張り出す (Planes 10-14)。TS は尾部では、より外側の ventrolateral nucleus of the torus semicircularis (TSvl) とより正中側の central nucleus of the torus semicircularis (TSc) に分けられる (Planes 11-14)。

Nerve tracts. 吻尾方向に伸びる神経束が2つ識別される; 正中領域を走行する medial longitudinal fascicle (MLF) (Planes 10-27) と、より外側の lateral longitudinal fascicle (LLF) (Planes 10-16)。MLF は NMLF に始まり、一方、LLF は TS 直下に出現する (Plane 10)。両者ともに 菱脳 (rhombencephalon, Rho) に向かって尾側に伸びる。TeO から TS や tegmentum の外側に沿って tractus tectobulbaris (TTB) が腹側正中方向に伸びる (Planes 11-14)。TTB の線維の多くは、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) と同様に、NIn のすぐ吻側にある ansulate commissure (Cans) を通って正中を横断する (Planes 11, 12)。oculomotor nerve (III) は MNIII に始まり、正中腹側域を腹側に向かって伸びる (Plane 12)。

菱脳 (rhombencephalon, Rho). Rho は、Ce を含む metencephalon と、延髄と V4 を含む myelencephalon からなる。

Metencephalon. Ce はさらに3つの領域に分けられる; valvula cerebelli, corpus cerebelli, caudal cerebellar region。valvula cerebelli は VMes に向かって張り出す正中中部で、3つの層からなる; outer molecular layer (SMo)、intermediate ganglionic layer (SGa)、deep granular layer (SGr) (Planes 13-15)。corpus cerebelli も valvula cerebelli と同様に、SMo、SGa、SGr からなる (Planes 16-22)。SGa の神経細胞体は顆粒状を呈する SGr の細胞体 (ca. 5 μm) よりも大きく、SGr の縁辺部に局在することから、

rainbow trout (Meek & Nieuwenhuys, 1998) のプルキンエ細胞に対比できるかもしれない。granular eminence (EG) は Ce と延髄の連絡部に現れ (Plane 15) 尾側に続く (Planes 15-22)。caudal cerebellar region は metencephalon と延髄を crista cerebellaris (CC) で結合させる領域である (Planes 17-25)。同様な形態はヨーロッパウナギ (Meredith & Roberts, 1987; Meredith *et al.*, 1987)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも見られている。Ce の腹側部には cerebellar commissure (Ccer) がある (Planes 15-18)。

Myelencephalon. V4 は、isthmus レベルで非常に狭いが (Planes 13, 14)、そのすぐ尾側で急激に幅を広げ (Planes 15-18)、さらに尾側へ伸びる。V4 の幅は延髄中部で最大になり (Planes 17, 18)、尾部に向かって次第に狭くなる (Planes 19-26)。V4 の側壁は、ニジマス (Nieuwenhuys *et al.*, 1998) と同様に、くびれによって背部の CC と腹部の the facial lobe (LVII) にわけられる (Planes 20-23)。LVII は、尾側では vagal lobe (LX) にかわる (Planes 24-26)。

延髄は吻側の isthmus レベルで Mes (Plane 13) に、尾側の obex (OX) レベルで脊髄 (Plane 27) に移行する。延髄最吻部にある nucleus isthmi (NI) は比較的側方に位置する (Planes 13, 14)。このような形態はヨーロッパウナギ (Molist *et al.*, 1993) と同様である。NI の腹側正中側には locus coeruleus (LC) があり、LC はゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) と同様に、比較的大きな神経細胞体 (ca. 20 μm) からなる (Planes 13, 14)。LC の尾側には trigeminal motor nucleus (MNV) があり (Planes 15-18)、MNV の腹側には superior olive (OS) が位置する (Plane 17)。さらに尾側には octavolateral efferent nucleus (OEN) (Planes 20-23)、facial motor nucleus (MNVII) (Planes 21-23) と glossopharyngeal motor nucleus (MNIX) と vagal motor nucleus (MNX) の両方からなる神経核複合体 (Planes 24-27) が V4 にそって配列する。本研究では MNIX と MNX からなるこの神経核複合体を glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) と呼ぶことにする (Planes 24-27) (FIG. 1-3)。GVC の腹側には、チョウザメ (Adrio *et al.*, 2000) やネコザメ (Anadón *et al.*, 2000) で報告されているような多極形あるいは紡錘形の細胞体 (ca. 20 μm) からなる spinooccipital motor nucleus (NSO) が OX レベルを越えて尾側方向に伸びる (Planes 26, 27)。

延髄中部では、medial octavolateral nucleus (MON) が crista cerebellaris (CC) の直下に現れる (Planes 17-23)。MON の腹側の細胞群は吻尾方向に3つの神経核にわけられる; anterior octaval nucleus (AON) (Plane 17)、magnocellular octaval nucleus (MaON) (Plane 19)、descending octaval nucleus (DON) (Planes 20-23)。octavolateral area からは3つの神経が出る; anterior lateral line nerve (ALL) (Planes 17-19)、posterior lateral line nerve (PLL) (Planes 20-23)、octaval nerve (VIII) (Planes 17-21)。octavolateral area の形態はヨーロッパウナギ (Meredith & Roberts, 1987; Meredith *et al.*, 1987) やゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) とよく似ている。

octavolateral area の腹側部には、背腹方向に伸びた紡錘形を呈する巨大な細胞体 (ca. 90 × 50 μm) が左右で対をなす (Plane 17)。局在位置や形態から判断すると、この1対のニューロンはマウスナー細

胞 (Mauthner cells, MCs) と同定できる。同様な形態のニューロンはヨーロッパウナギ (Meredith & Roberts, 1987; Meredith *et al.*, 1987) やキンギョ (Meek & Nieuwenhuys, 1998)、そのほかの魚類 (Zottoli, 1978) でも報告されている。

延髄の腹側正中部には raphe nucleus があり、吻方向から順に superior raphe nucleus (RS)、intermediate raphe nucleus (RInt)、inferior raphe nucleus (RInf) にわけられる。RS は NIn のすぐ尾側に現れる (Plane 14)。残りの神経核は MLF の腹側に現れる; RInt (Planes 19, 20)、RInf (Planes 21-26) (FIG. 1-3)。延髄の腹側部全体にわたって神経線維が網状に発達する。この構造は、ヨーロッパウナギ (Roberts *et al.*, 1989) やゼブラフィッシュ (Wullmann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) の reticular formation (RF) に相当する。RF のなかには多極形や卵形を呈する大きな神経細胞体 (> 25 μm) が散在している (Planes 13-27)。これらの細胞体のなかには、直径 35 μm に達するものもある (Planes 15-18)。

OX の尾側の正中域には吻尾方向に伸びる area postrema (AP) があり、神経細胞体は小さく (ca. 5 μm)、顆粒状を呈し、背側表面から深部に向かって散在する。AP の背表面には多数の毛細血管が認められる (Plane 27)。AP の腹外側には、小さな細胞体 (< 10 μm) が散在する commissural nucleus of the Cajal (NCC) と medial funicular nucleus (NFM) が認められる (Plane 27)。

Nerve tracts. 吻尾方向に伸びる神経束のうち、MLF は OX レベルを超えてさらに尾側に伸びるのに対し (Planes 10-27)、LLF は延髄吻部で消失する (Plane 17)。tractus tectobulbaris cruciatus (TTBc) は planes 15 から 23 までの間で認められる。descending trigeminal root (DV) と secondary gustatory tract (SGT) は Mes で現れ (Plane 15)、OX レベルを超えて尾側に伸びる (Plane 27)。vestibulo-spinal tract (TVS) も同様に Mes で現れ (Plane 15)、RF と平行して OX レベルを超えて尾側に伸びる (Plane 27)。TVS の同様な伸びはゼブラフィッシュ (Wullmann *et al.*, 1996) やニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998) でも観察されている。commissure ventralis rhombencephali (Cven) は V4 や 中心管 (central canal, C) のすぐ腹側にある (Planes 14-27)。

FIG. 1-2B の planes 13-27 から得た結果をもとに、延髄の主要な神経核の分布を FIG. 1-3 に示す。V4 周囲には、MNV、MNVII、GVC が吻尾方向に配列し、個々の神経核の吻尾長は、それぞれ約 450 μm 、500 μm 、1700 μm である (left half in FIG. 1-3)。また、MNV と MNVII、MNVII と GVC の間隔は、それぞれ 300 μm と 50 μm である。延髄腹部では、RS、RInt、RInf が正中にならび、OS、OEN、NSO が側方に位置する (right half in FIG. 1-3)。OEN は MNVII のすぐそばにあり (Planes 21-23)、NSO は GVC の腹側にある (Planes 26, 27)。

脳から出た V (level of planes 13-15)、VII (level of planes 15-16) と IX あるいは X (level of planes 19-26) で神経節が認められる (data not shown)。これらの神経節にある神経細胞体は円形を呈する (> 20 μm)。これらの神経節は、それぞれヒトの semilunar ganglion、geniculate ganglion、jugular ganglion、nodose ganglion (Martini *et al.*, 2000) に相当するのかもしれない。

脳室周囲器官

血液脳関門を欠いている脳部位を識別するために、EB をウナギの腹腔に注射した。外部形態的に SD、E、AP が明瞭に染色された (FIG. 1-4A)。さらに横断面切片では、PM (FIGS. 1-4B, D; corresponding to Plane 5 in FIG. 1-2B) と NAT (FIG. 1-4E; corresponding to Planes 8-10 in FIG. 1-2B) が EB 陽性であった。しかしながら、明らかな EB 陽性ニューロンは PM、NAT、AP だけ認められ、SD と E では EB 陽性ニューロンの確認はできなかった (FIG. 1-4C)。PM (FIG. 1-4D) や NAT (FIG. 1-4E) の EB 陽性ニューロンは大きく ($> 20 \mu\text{m}$)、V3 に沿って分布していた。また、AP の EB 陽性ニューロンは小さく ($< 5 \mu\text{m}$)、AP 全体に散在していた (FIG. 1-4F)。

考察

本研究では、Klüver-Barrera 染色した切片をもとに、比較解剖学的にニホンウナギの嗅球から延髄におよぶ脳地図を作製した。これまでヨーロッパウナギを用いて、Die の pretectal area (Wullimann *et al.*, 1991)、Mes (Molist *et al.*, 1993)、octavolateral area を中心とした 延髄吻部 (Meredith & Roberts, 1986, 1987; Meredith *et al.*, 1987;) で詳細な神経解剖学はあるが、ウナギの脳全体におよぶ形態記載はドーパミンを含有するニューロンの局在に限られ (Roberts *et al.*, 1989)、神経回路網の構築に十分な脳地図はつくられていなかった。この脳地図はウナギでおこなわれた初めての総合的な神経解剖学的記載である。ニホンウナギの脳の形態はヨーロッパウナギのそれとよく一致している。また、脳地図が作製されている他の魚種と比較すると、ニホンウナギの脳の形態は、基本的にゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys, 1998)、キンギョ (Peter & Gill, 1975; Morita & Finger, 1987a, b; Goehler & Finger, 1987; Meek & Nieuwenhuys, 1998)、ナマズ (Kanwal & Caprio, 1987) のものとよく似ている。しかしながら、魚種によって異なる構造も見られる;特に延髄の MNVII、MNIX、MNX の組織化は魚種間で異なる。哺乳類では、これら MNVII、MNIX、MNX は嚙下に関与する筋 (嚙下関連筋) に投射する運動神経核であることがよく知られている (Jean, 1990; Diamant, 1993)。FIG. 1-5 はこれまで様々な魚種で報告されてきた3つの組織化様式を示す。type I では、3つの神経核が一緒になって1つの運動神経核の複合体を形成するので、MNVII、MNIX、MNX を区別することはできない。このような組織化様式はロクエラザメ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936)、ツノザメ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936; Anadón *et al.*, 2000)、マフグ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936)、チョウザメ (Adrio *et al.*, 2000)、アミウナギ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936)、ターポン (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936) で認められる。ニホンウナギは type II に属する。このタイプは MNVII はわかれているが、MNIX と MNX が一緒になって1つの運動神経核の複合体を形成する。本研究では、この複合体を GVC (FIG. 1-3) と命名した。同様な組織化様式は、ヤツメウナギ (Ariëns-Kappers, 1936)、アミア (Meek & Nieuwenhuys, 1998)、ナマズ (Kanwal & Caprio, 1987)、ゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996)、ニジマス (Meek & Nieuwenhuys,

1998)などで認められる。type IIIでは、MNVIIがわかれ、さらにMNX もいくつかの細胞群を形成する。このようなこのような組織化様式は、タラ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936)、エンジェルフィッシュ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936)、フグ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936)、マンボウ (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936)、キングヨ (Morita & Finger, 1987a, b; Goehler & Finger, 1987; Meek & Nieuwenhuys, 1998)で見られる。、FIG. 1-5 では、比較のために哺乳類の MNVII、MNIX、MNX の組織化様式を示す (Coil & Norgren, 1979; Geis & Wurster, 1980; Weaber, 1980; Kalia, 1981; Wild, 1981; Kalia & Sullivan, 1982; Stuesse, 1982; Stuesse & Powell, 1982; Takayama *et al.*, 1982; Chernicky *et al.*, 1983; Katz & Karten, 1983; Barbas-Henry & Lohman, 1984; Yoshida *et al.*, 1984; Miceli & Malsbury, 1985; Shaprio & Miselis, 1985; Hamilton *et al.*, 1987; Won *et al.*, 1998)。哺乳類では、延髄尾部にある運動神経核は3つに分けられる; MNVII、nucleus ambiguus (NA)、dorsal motor nucleus of the vagus (DMX)。NAはMNIXとMNXの複合体である。DMXは副交感神経節前ニューロンからなる。哺乳類では、MNVIIやNA、DMXは嚥下関連筋を支配することがよく知られているので (Jean, 1990; Diamant, 1993)、ウナギのMNVIIやGVCは‘嚥下’を引き起こす運動神経核かもしれない。実際、我々は運動ニューロンの逆行性標識で、ウナギのGVCがbranchial muscles、opercular muscle、pharyngeal muscle、upper esophageal sphincter、esophageal body muscleといった嚥下関連筋に投射していることを観察している (第2章)。

ウナギの腹腔にEBを注射すると、SD、E、PM、NAT、APが染色される (FIG. 1-4)。EBは血中でアルブミンと結合してEB-アルブミン複合体を作り、EB-アルブミン複合体は血液脳関門を通過できないことがよく知られているので (Clasen *et al.*, 1970; Saria & Lundberg, 1983)、これらの脳部位は血液脳関門を欠いており、ウナギの脳室周囲器官であると考えられる。これらの脳部位のうち、PM (FIG. 1-4B, D)、NAT (FIG. 1-4E)、AP (FIG. 1-4F)ではニューロンが明らかにEBを取り込んでいる。脳室周囲器官は2つのタイプがあり、一方は内分泌腺の役割を担うものと、もう一方は血液脳関門を通過できない血中因子を受容し、脳に情報を送る感覚受容の役割を担うものである (Simon, 2000)。本研究で識別された脳室周囲器官のうち、EBのニューロンへの取り込みが確認されたPM、NAT、APは血中因子を受容する‘感覚受容のための脳室周囲器官 (Simon, 2000)’であると考えられる。そのうちウナギのPMとNATは視床下部にありV3に隣接する。哺乳類の場合、V3に近接するsubfornical organ (SFO)とorganum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT)は、血中angiotensin II (ANG II)を受容し飲水行動を促進させる脳室周囲器官であることがよく知られている (Fitzsimons, 1998)。ウナギではANG IIの脳内作用部位はまだ同定されておらず、また、V3周囲の発生様式は哺乳類と魚類では異なるのでこれらの動物の間でV3周囲の脳室周囲器官の相同性を詳細に検討しなければならないが、PMとNATは、それらの局在位置から、血中ANG IIを受容するウナギの‘渇きの受容’に関わる部位であると考えられる。

本研究ではPM、NATが‘渇きの受容’の部位であり、GVCが‘嚥下’の出力部位であると想定した。

飲水行動 は入力部位から出力部位までの神経回路が制御しているので、今後さらに、入力部位から出力部位までの神経連絡を明らかにしなければならないが、そのような神経連絡を調べるためにも本研究で作製した脳地図は重要である。

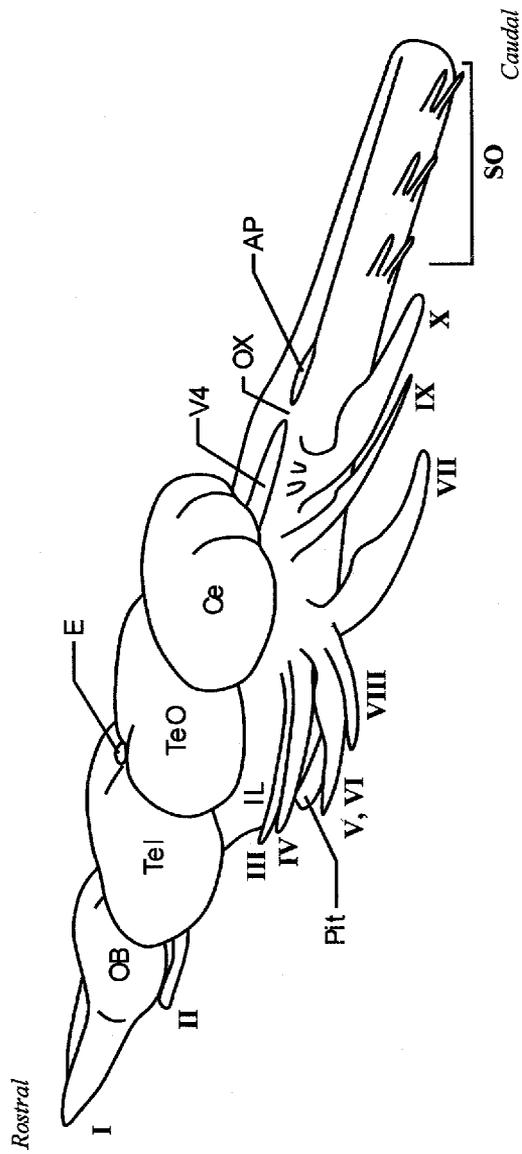


FIG. 1-1 External morphology of the eel brain (left-lateral view). The length from the rostral tip of the olfactory bulb (OB) to the caudal end of the area postrema (AP) was approximately 10 mm. All names are abbreviated (cf. TABLE 1-1).

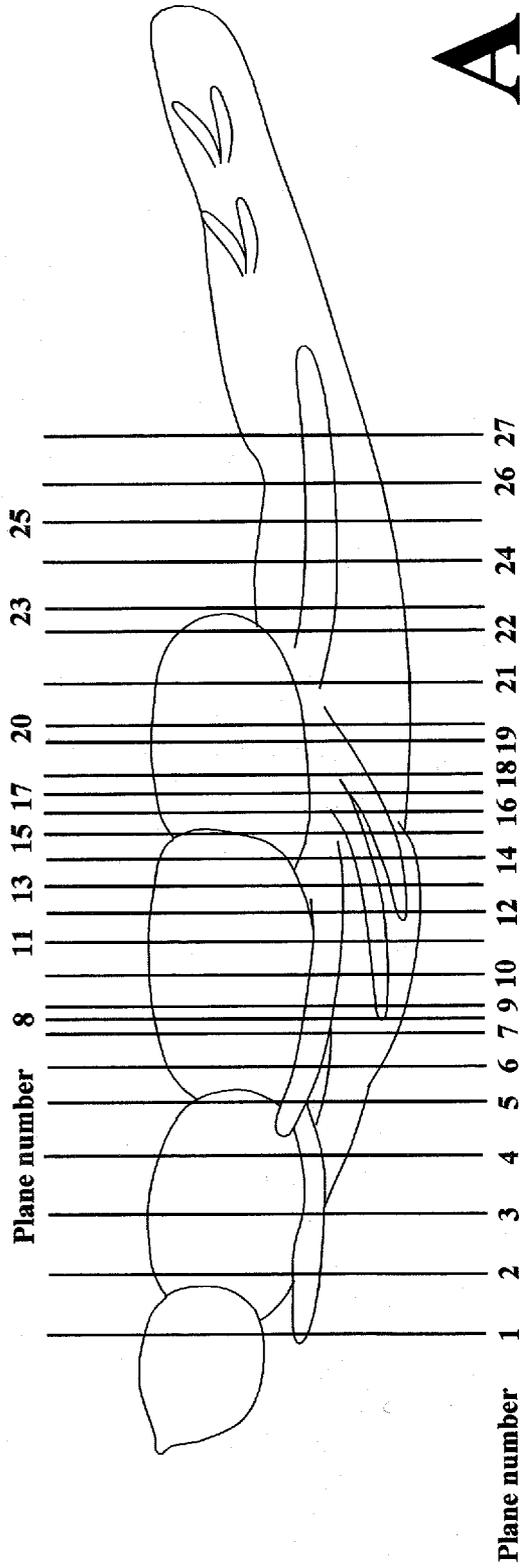


FIG. 1-2 Brain atlas of the Japanese eel. Lateral view of the eel brain indicating the position of levels (planes) illustrated in the following series of cross sections (A). Plane numbers (1-27) were given orderly from the rostral OB to caudal medulla oblongata (MO). Klüver-Barrera's staining (left-half) and schematic drawing (right half) of each plane (B). Somata and fibers are violet- and light blue-colored, respectively. Blood vessels are not shown in the schematics. Scales (200 μ m) are identical in all planes (1-27). The names of nuclei and nerve trunks are abbreviated (cf. **TABLE 1-1**).

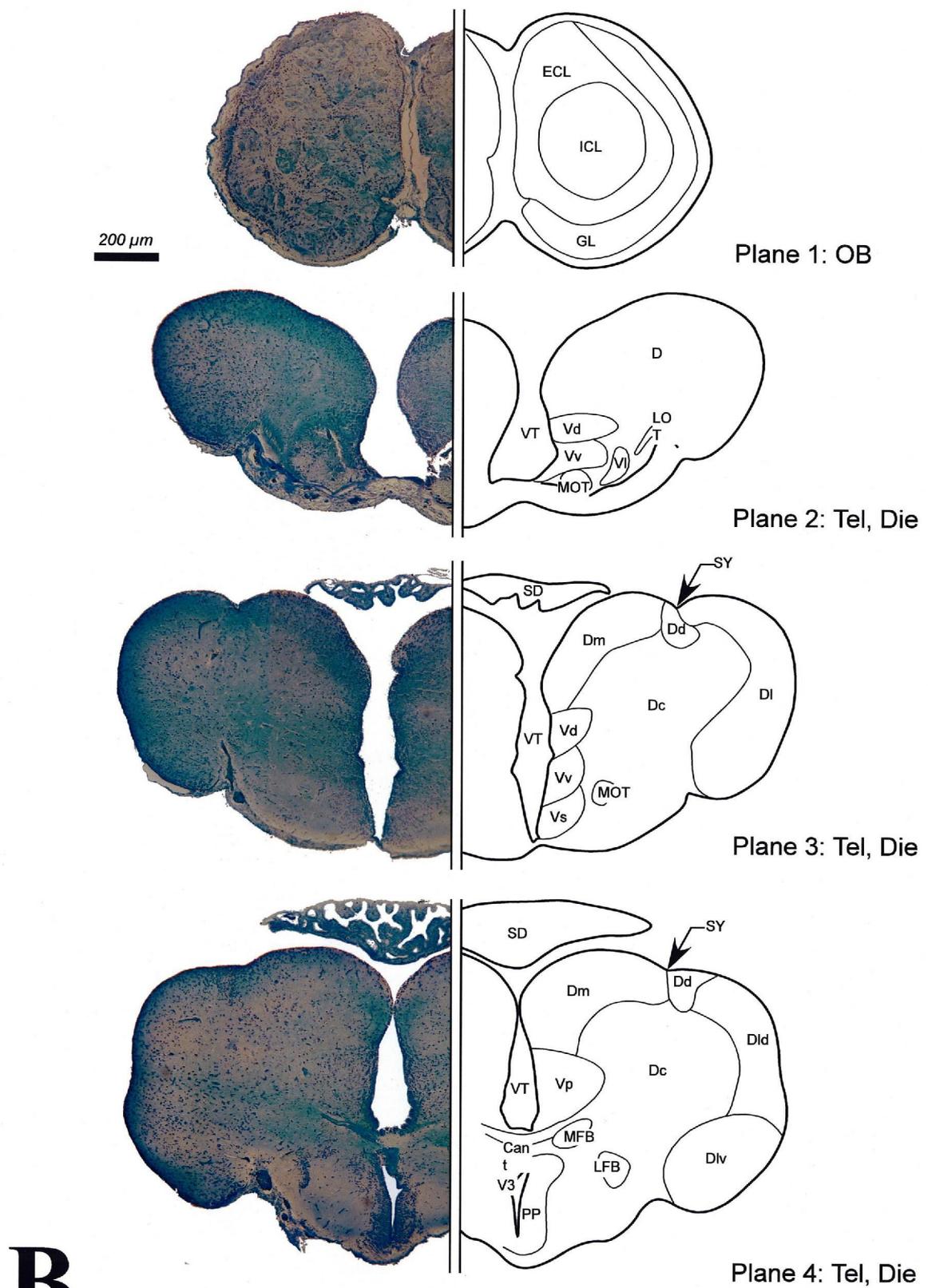
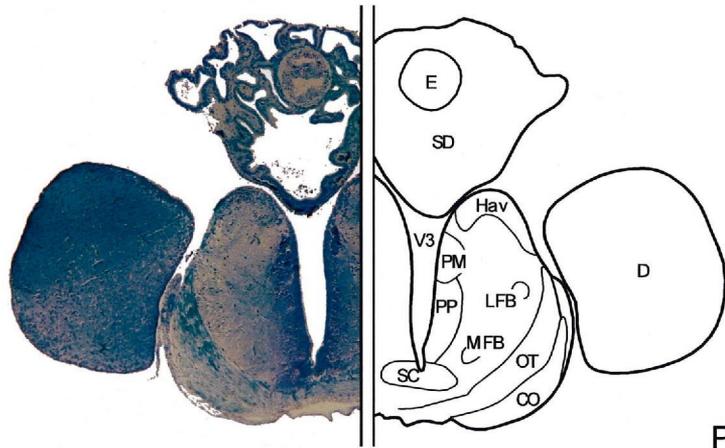
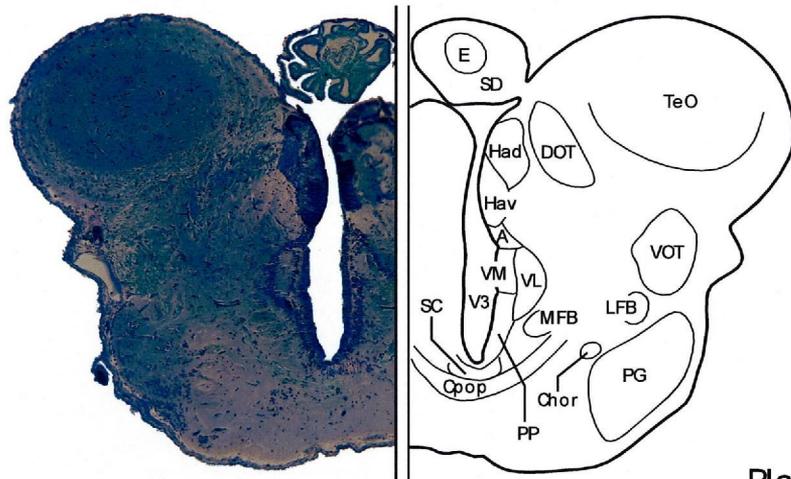


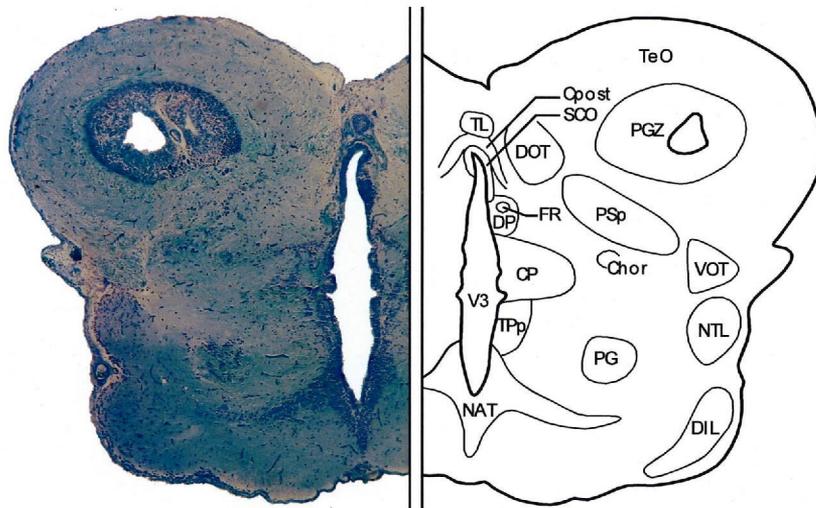
FIG. 1-2 (Continued)



Plane 5: Die, Mes

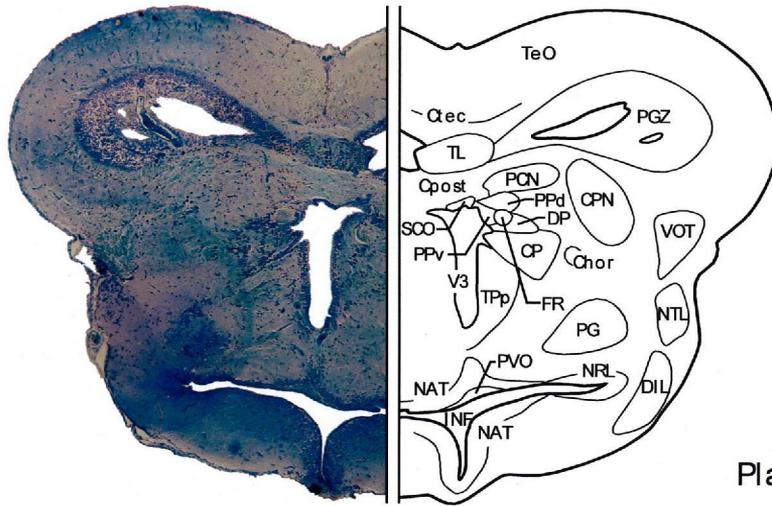


Plane 6: Die, Mes

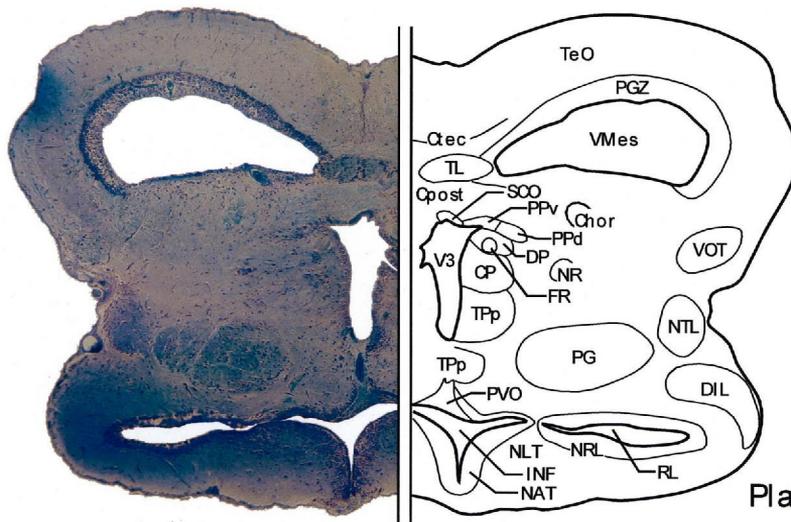


Plane 7: Die, Mes

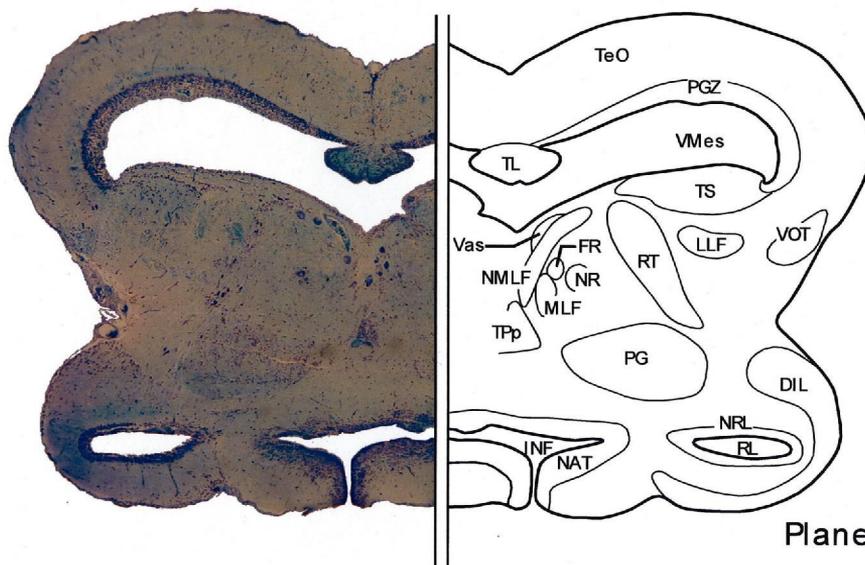
FIG. 1-2 (Continued)



Plane 8: Die, Mes



Plane 9: Die, Mes



Plane 10: Die, Mes

FIG. 1-2 (Continued)

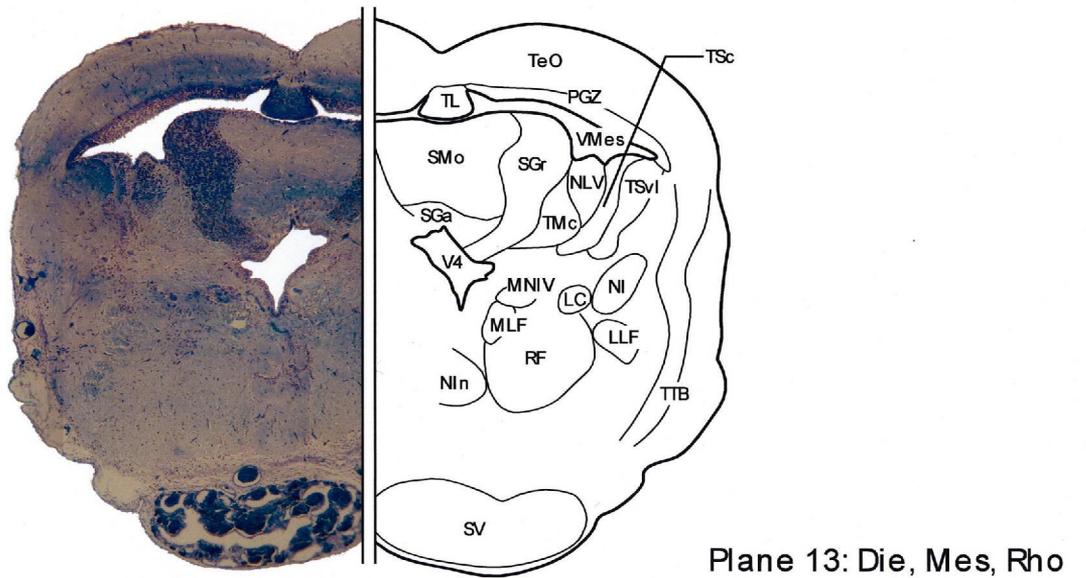
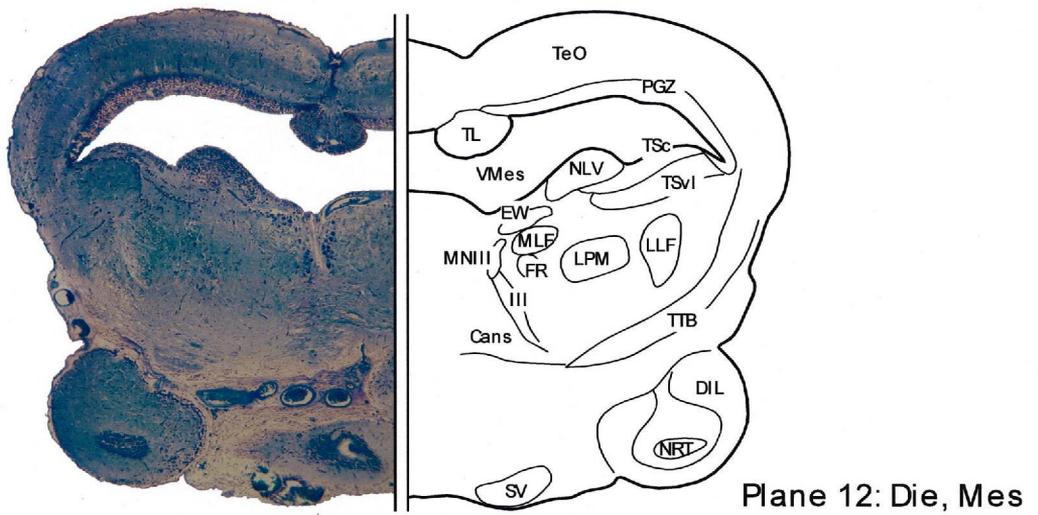
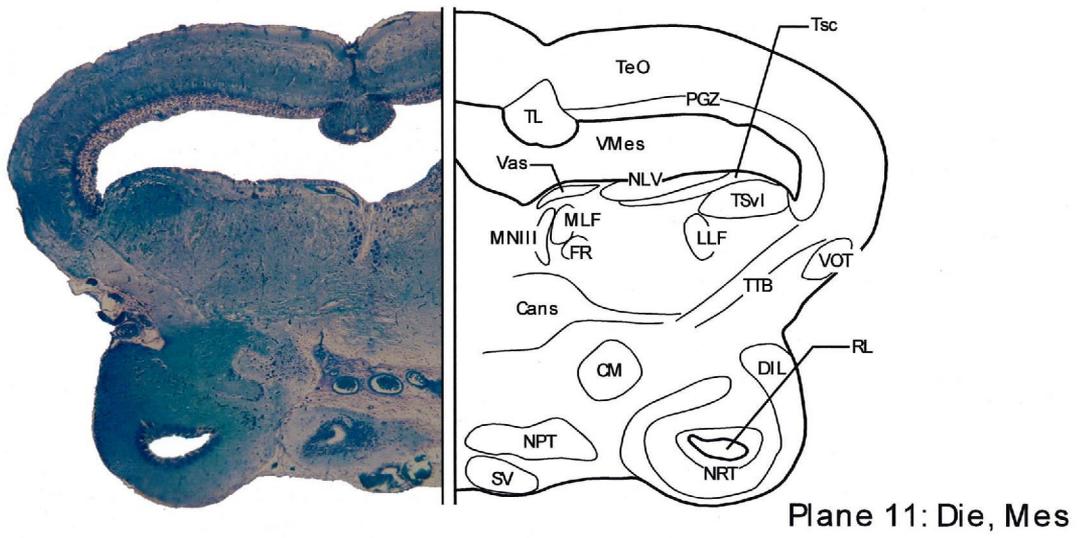
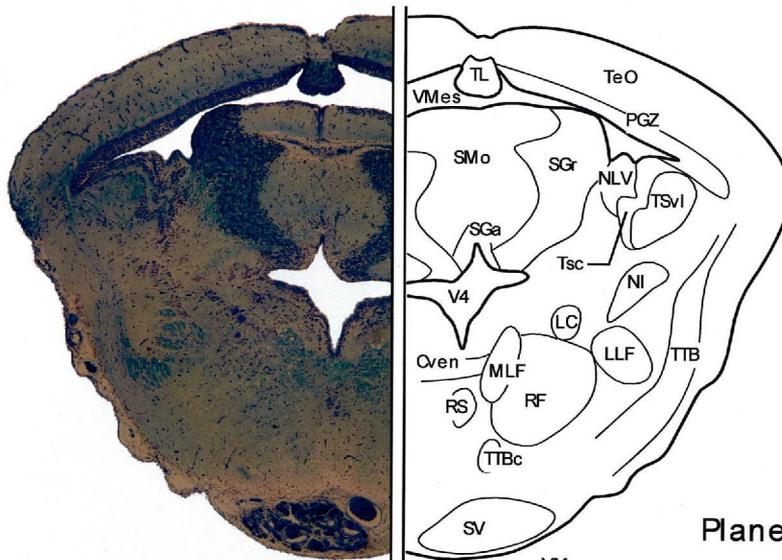
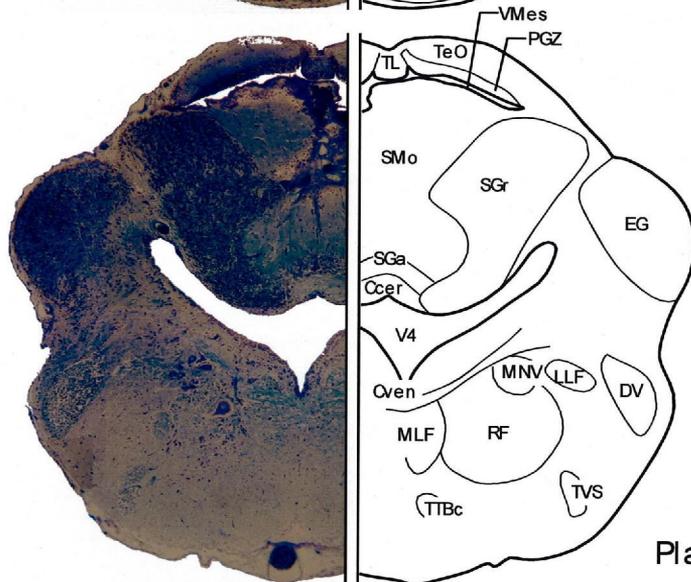


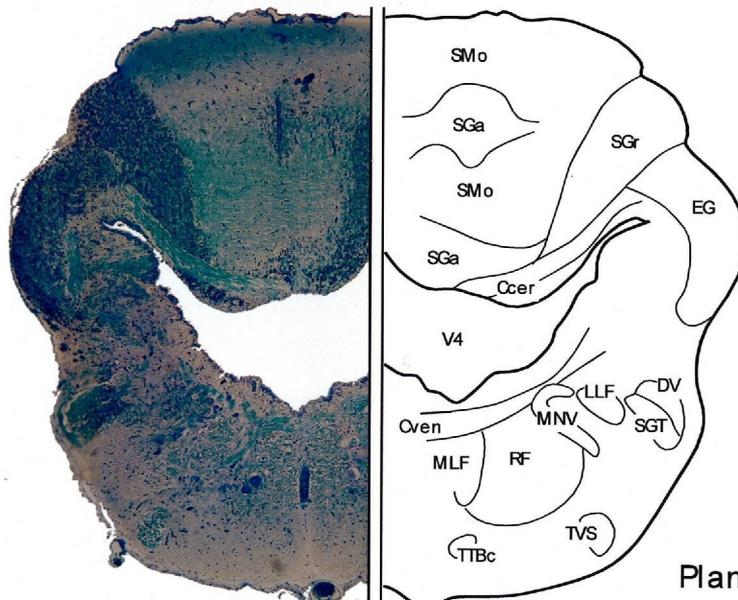
FIG. 1-2 (Continued)



Plane 14: Die, Mes, Rho

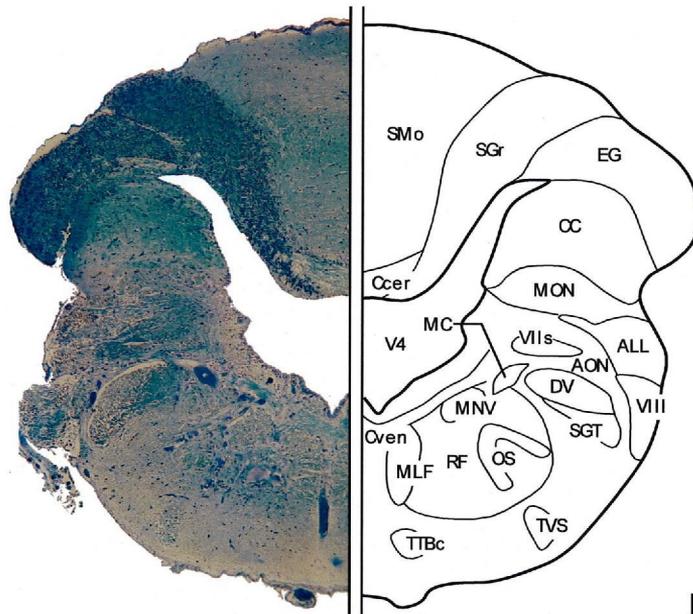


Plane 15: Mes, Rho

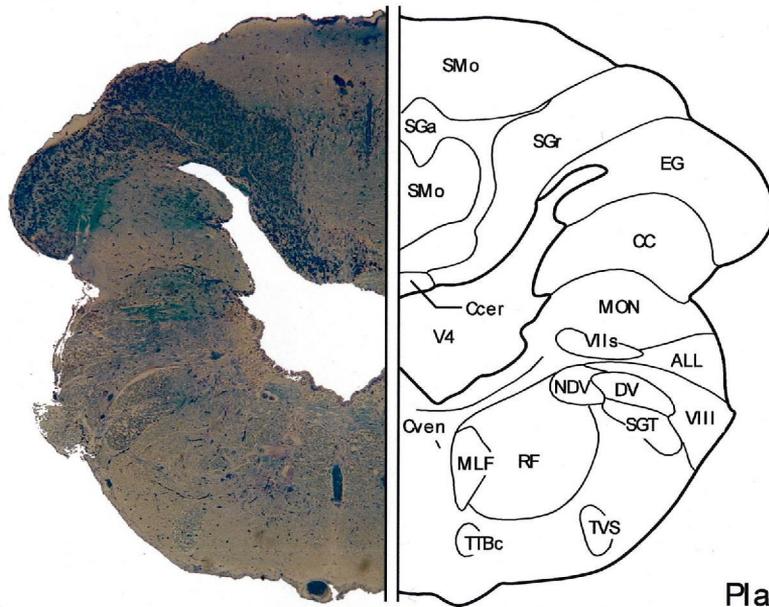


Plane 16: Rho

FIG. 1-2 (Continued)



Plane 17: Rho



Plane 18: Rho

FIG. 1-2 (Continued)

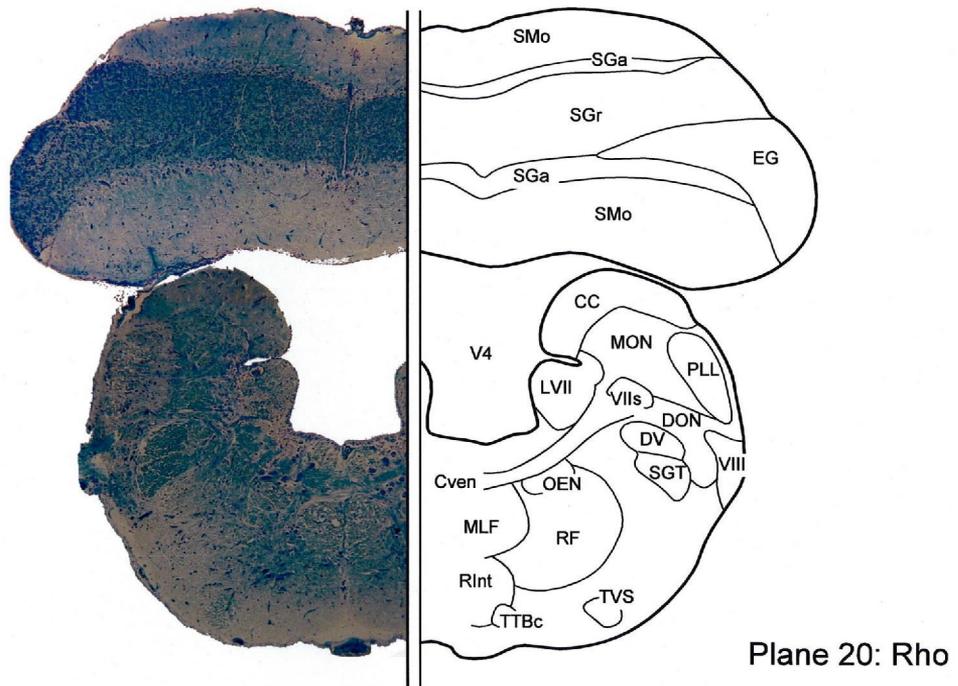
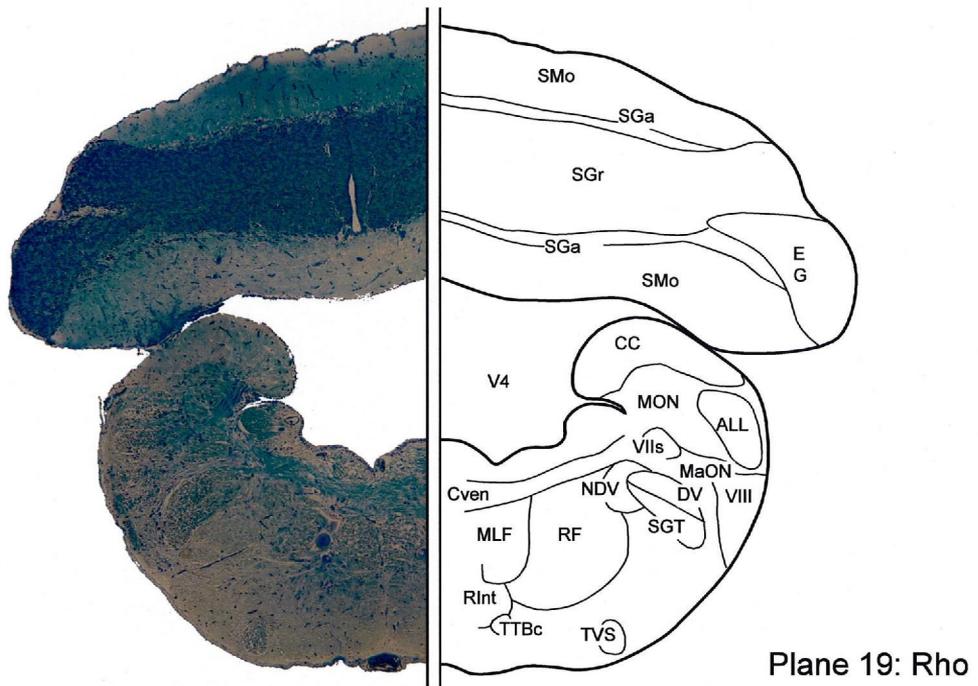


FIG. 1-2 (Continued)

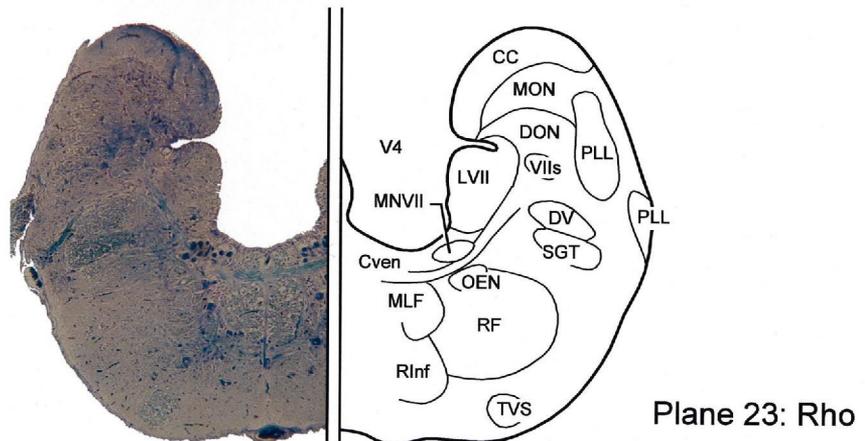
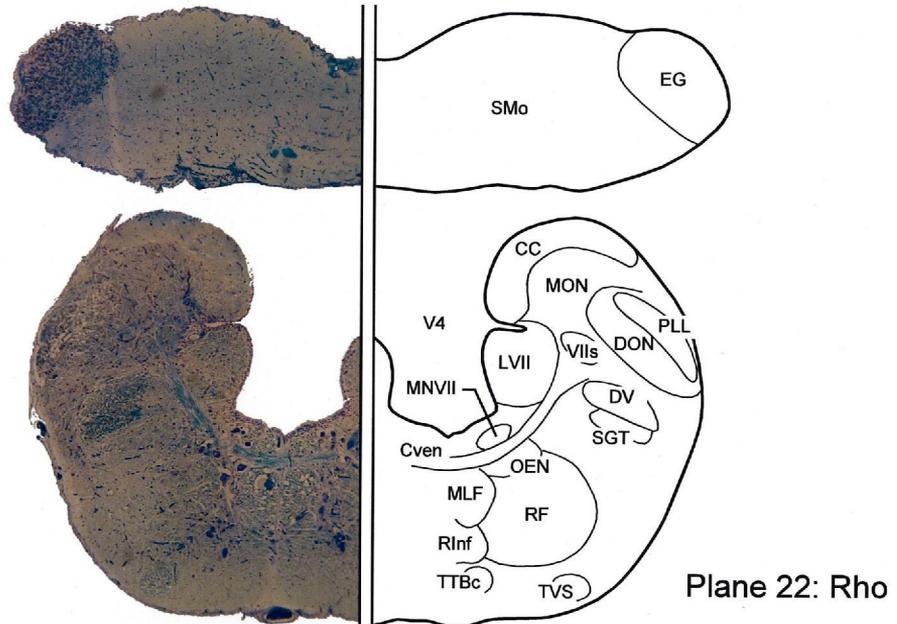
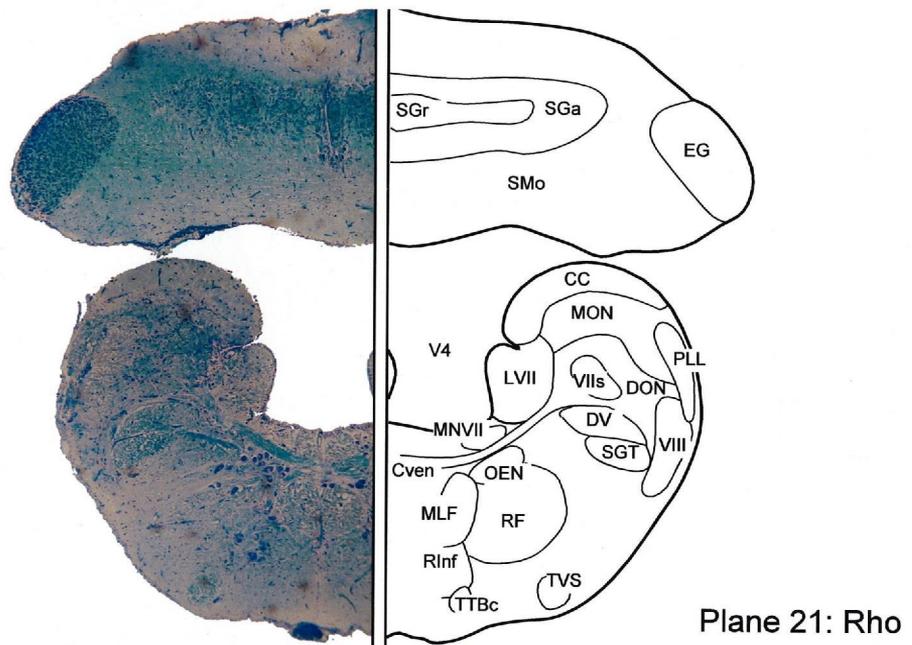
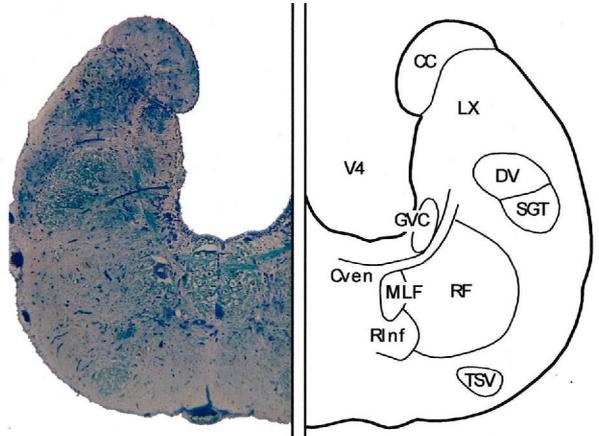
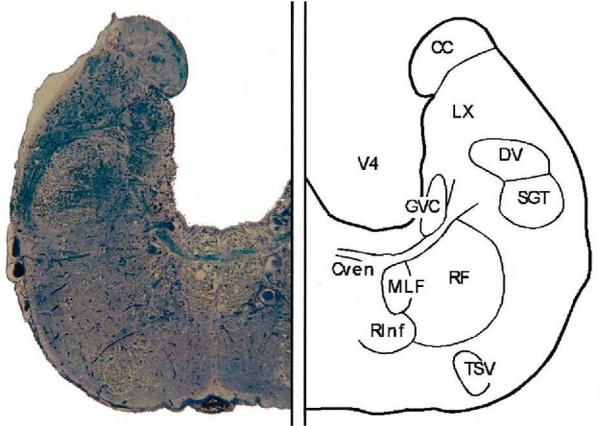


FIG. 1-2 (Continued)

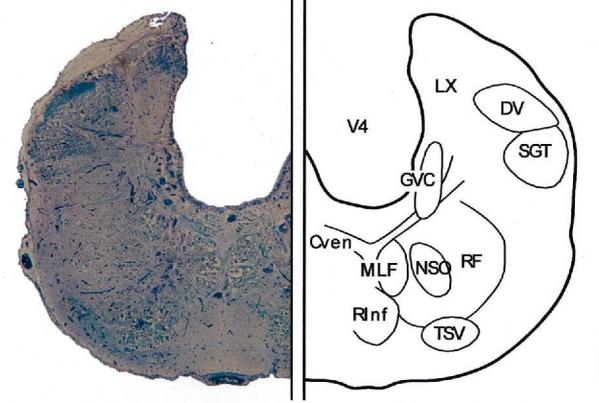
200 μ m



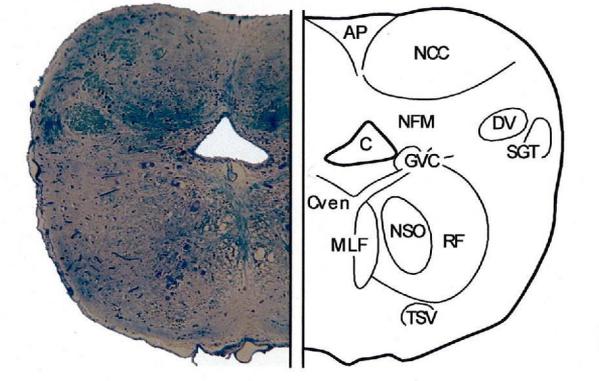
Plane 24: Rho



Plane 25: Rho



Plane 26: Rho



Plane 27: Rho

FIG. 1-2 (Continued)

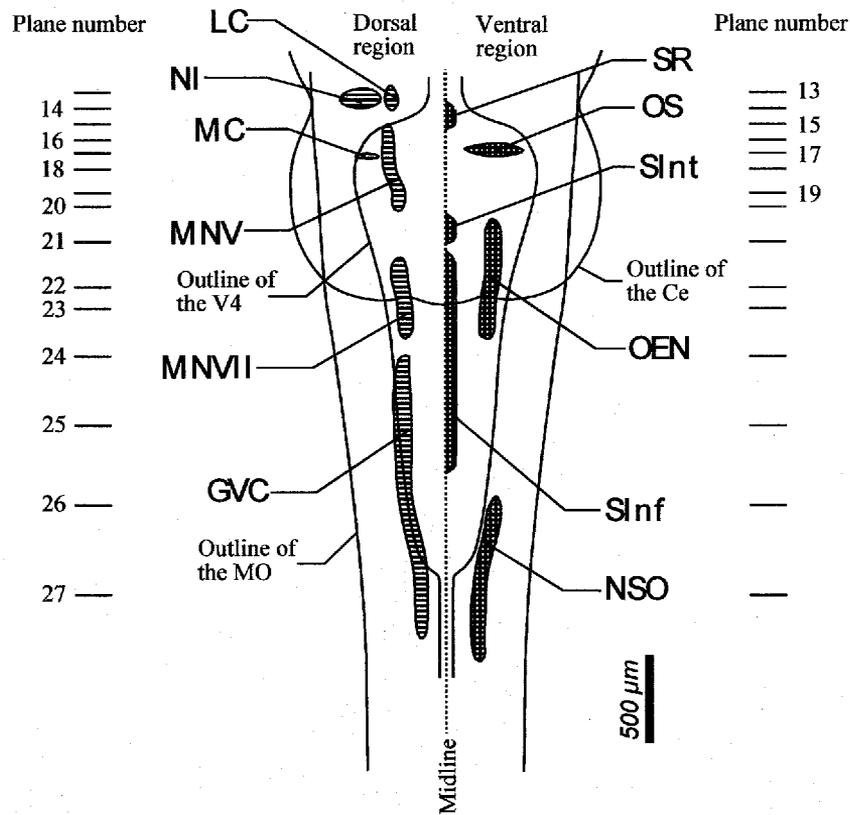


FIG. 1-3 A longitudinal distribution of various motor nuclei in the medulla oblongata (MO) (dorsal view). The figure is constructed schematically from the data of planes 13-27 in Fig. 1-2B. The left half indicates dorsal distribution and the right half does the ventral. All nuclei are abbreviated (cf. TABLE 1-1).

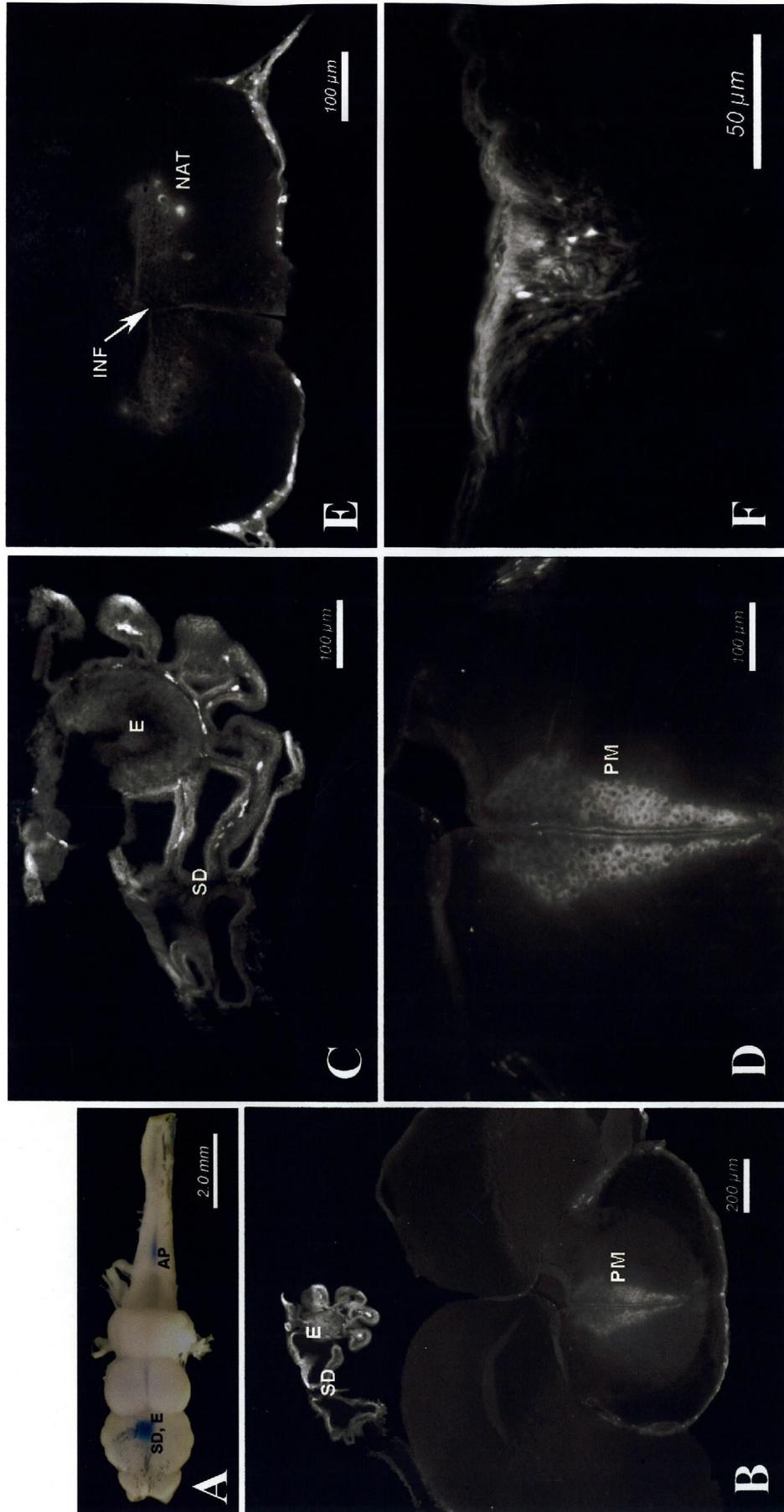


FIG. 1-4 Brain regions stained by peripheral Evans blue (EB). **A:** External view from the dorsal. **B:** Cross section of the rostralmost diencephalon (Die), corresponding to Plane 5 in FIG. 1-2B. **C:** High magnification of the epithalamus (saccus dorsalis, SD; epiphysis, E). **D:** High magnification of the magnocellular pre-optic nucleus (PM). **E:** Cross section of the middle diencephalon (ventral part), corresponding to Plane 10 in FIG. 1-2B. **F:** High magnification of the area postrema (AP), corresponding to the dorsal part of Plane 27 in FIG. 1-2B. INF, infundibulum; NAT, nucleus anterior tubercis.

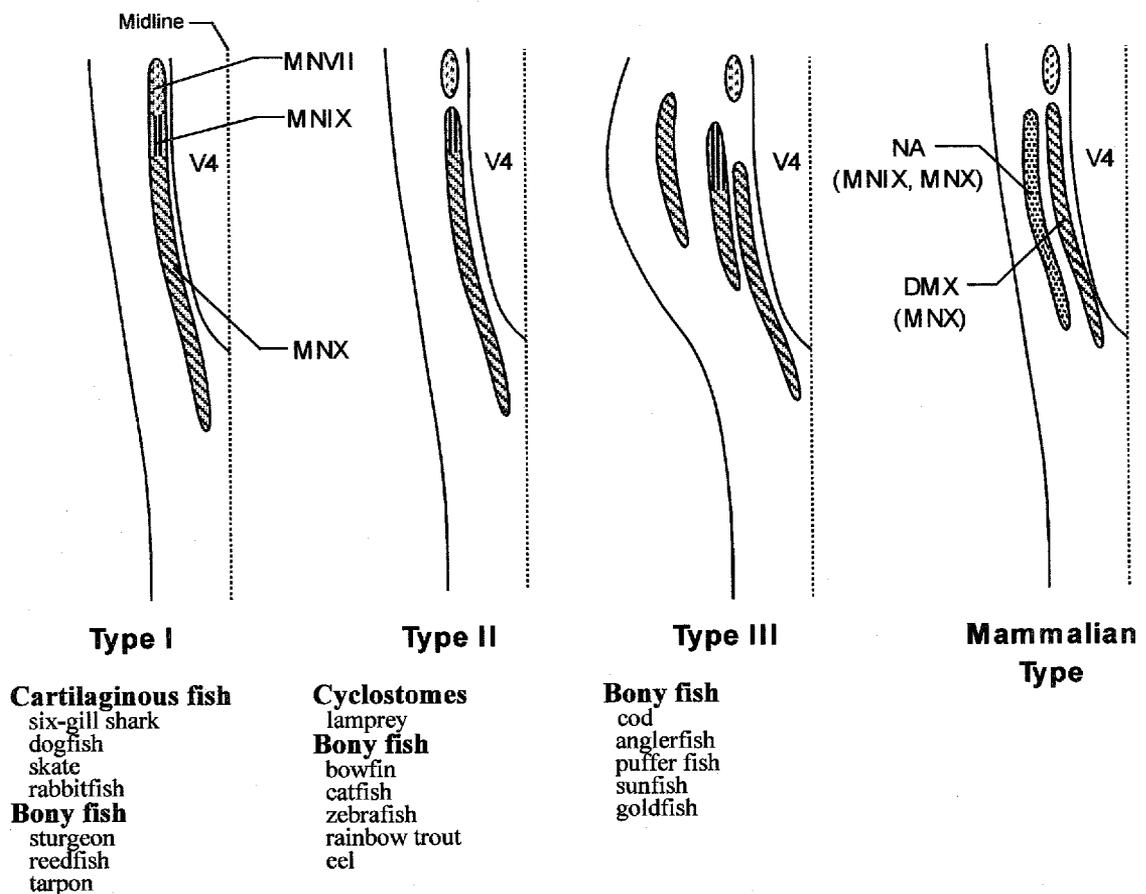


FIG. 1-5 Comparison of the configuration in swallowing-associated motor nuclei in the medulla oblongata (MO) between fish and mammals in only the left half of the MO (dorsal view, upper is the rostral direction). Dotted column indicates the facial motor nucleus (MNVII). Horizontal and oblique stripes show the glossopharyngeal motor nucleus (MNIX) and the vagal motor nucleus (MNX), respectively. Under each configuration pattern (Type I-III), fish names are listed. In mammalian type, the MNIX and the MNX is not separated within the nucleus ambiguus (NA), thus indicates as bold dot. V4 shows the fourth ventricle. These configuration patterns are classified following morphological data from various fish; eel (present study), dogfish (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936; Anadón *et al.*, 2000), sturgeon (Adrio *et al.*, 2000), bowfin (Nieuwenhuys *et al.*, 1998), catfish (Kanwal & Caprio, 1987), zebrafish (Wullimann *et al.*, 1996), and goldfish (Morita & Finger, 1987b; Goehler & Finger, 1992; Nieuwenhuys *et al.*, 1998), and other fish (Ariëns-Kappers *et al.*, 1936).

TABLE 1-1 Index for the neuroanatomy of the Japanese eel brain

Abbreviation	Nomenclature	Appearance in Fig. 1-2		Abbreviation	Nomenclature	Appearance in Fig. 1-2	
		Area	Plane			Area	Plane
A	anterior thalamic nucleus	Die	6	LPM	nucleus lateralis profundus	Mes	12
ALL	anterior lateral line nerve	Rho	17-19	LVII	facial lobe	Rho	20-23
AON	anterior octaval nucleus	Rho	17	LX	vagal lobe	Rho	24-26
AP	area postrema	Rho	27	MaON	magnocellular octaval nucleus	Rho	19
Cans	ansulate commissure	Mes	11, 12	MC	Mauthner cell	Rho	17
Cant	anterior commissure	Tel	4	Mes	mesencephalon		
CC	crista cerebellaris	Rho	17-25	MFB	median forebrain bundle	Tel, Die	4-6
Ccer	cerebellar commissure	Rho	15-18	MLF	medial longitudinal fascicle	Mes, Rho	10-27
Ce	cerebellum	Rho		MNIII	oculomotor nucleus	Mes	11, 12
Chor	horizontal commissure	Die, Mes	6-9	MNIV	trochlear nucleus	Mes	13
CM	corpus mamillare	Die	11	MNV	trigeminal motor nucleus	Rho	15-17
CO	optic chiasm	Die	5	MNVII	facial motor nucleus	Rho	21-23
CP	dorsal central thalamic nucleus	Die	7-9	MNX	vagal motor nucleus	Rho	
CPN	central pretectal nucleus	Die	8	MO	medulla oblongata	Rho	
Cpop	postoptic commissure	Die	6	MON	medial octavolateral nucleus	Rho	17-23
Cpost	posterior commissure	Die	7-9	MOT	medial olfactory tract	OB, Tel	2-3
Ctec	commissura tecti	Mes	8, 9	NAT	anterior tuberal nucleus	Die	7-10
Cven	commissura ventralis rhombencephali	Rho	14-27	NCC	commissural nucleus of the Cajal	Rho	27
				NDV	nucleus of the descending trigeminal root		18, 19
D	dorsal telencephalic area	Tel	2-5	NFM	medial funicular nucleus	Rho	27
Dc	central zone of the D	Tel	3, 4	NI	nucleus isthmi	Rho	13, 14
Dd	dorsal zone of the D	Tel	3, 4	NIIn	interpeduncular nucleus	Mes	13
Die	diencephalon			NLV	nucleus lateralis valvula cerebelli	Mes	11-14
DIL	diffuse nucleus of the inferior lobe	Die	7-12	NMLF	nucleus of the MLF	Mes	10
DI	lateral zone of the D	Tel	3	NPT	posterior tuberal nucleus	Die	11
Did	dorsal part of the DI	Tel	4	NR	nucleus ruber	Mes	9, 10
Dlv	ventral part of the DI	Tel	4	NRL	nucleus recessi lateralis	Die	8-12
Dm	medial zone of the D	Tel	3, 4	NSO	spinooccipital motor nucleus	Rho	26, 27
DON	descending octaval nucleus	Rho	20-23	NTL	nucleus tori lateralis	Die	7-9
DOT	dorsomedial optic tract	Die	6, 7	OB	olfactory bulb	Tel	
DP	dorsal posterior thalamic nucleus	Die	7-9	OEN	octavolateral efferent nucleus	Rho	20-23
DV	descending trigeminal root	Rho	15-27	OS	superior olive	Rho	17
E	epiphysis	Die	5, 6	OT	optic tract	Die	5
ECL	external cellular layer	OB	1	OX	obex	Rho	
EG	granular eminence	Rho	15-22	OVLT	vascular organ of the lamina terminalis	Die	4
EW	Edinger-Westphal nucleus	Mes	12	PCN	paracommissural nucleus	Die	8
FR	fasciculus retroflexus	Die, Mes	7-12	PG	preglomerular complex	Die	7-10
GL	glomerular layer	OB	1	PGZ	periventricular gray zone of the optic tectum	Mes	7-15
GVC	glossopharyngeal-vagal motor complex	Rho	24-27	Pit	pituitary		
Ha	habenular nucleus	Die	5, 6	PLL	posterior lateral line nerve	Rho	20-23
Had	dorsal habenular nucleus	Die	6	PM	magnocellular preoptic nucleus	Die	5
Hav	ventral habenular nucleus	Die	5, 6	PP	parvocellular preoptic nucleus	Die	4-6
ICL	internal cellular layer	OB	1	PPd	dorsal part of the periventricular pretectal nucleus	Die	8, 9
IL	inferior lobe of the hypothalamus	Die		PPv	ventral part of the periventricular pretectal nucleus	Die	8, 9
INF	infundibulum	Die	8-10				
LC	locus coeruleus	Rho	13, 14				
LFB	lateral forebrain bundle	Tel, Die	4-6				
LLF	lateral longitudinal fascicle	Mes, Rho	10-16				
LOT	lateral olfactory tract	OB, Tel	2				

TABLE 1-1 Index for the neuroanatomy of the Japanese eel brain

Abbrevi- ation	Nomenclature	Appearance in Fig. 1-2		Abbrevi- ation	Nomenclature	Appearance in Fig. 1-2	
		Area	Plane			Area	Plane
PSP	parvocellular superficial pretectal nucleus	Die	7	TTBc	tractus tectobulbaris cruciatus	Rho	14-22
PVO	paraventricular organ	Die	8, 9	TVS	vestibulo-spinal tract	Rho	15-27
RF	reticular formation	Mes, Rho	13-27	V	ventral telencephalic area	Tel	2-4
Rho	rhombencephalon			V3	third ventricle	Die	4-9
RInf	inferior raphe nucleus	Rho	21-26	V4	fourth ventricle	Rho	13-26
RInt	intermediate raphe nucleus	Rho	19-20	Vas	vascular lacuna of area postrema	Mes	10, 11
RL	recess lateralis	Die	9-11	Vd	dorsal nucleus of the V	Tel	2, 3
RS	superior raphe nucleus	Rho	14	VI	lateral nucleus of the V		2
RT	rostral tegmental nucleus	Mes	10	VL	ventrolateral thalamic nucleus	Die	6
SC	suprachiasmatic nucleus	Die	5, 6	VM	ventromedial thalamic nucleus	Die	6
SCO	subcommissural organ	Die	7-9	VMes	mesencephalic ventricle	Mes	9-14
SD	saccus dorsalis	Die	3-6	VOT	ventrolateral optic tract	Die	6-11
SGa	intermediate ganglionic layer	Rho	13-21	Vp	postcommissural nucleus of the V	Tel	4
SGr	granular layer	Rho	13-21	Vs	supracommissural nucleus of the V	Tel	3
SGT	secondary gustatory tract	Rho	16-27	VT	telencephalic ventricle	Tel	2-4
SMo	outer molecular layer	Rho	13-22	Vv	ventral nucleus of the V	Tel	2, 3
SO	spinooccipital nerve			I	olfactory nerve		
SV	saccus vasculosus	Die	11-14	II	optic nerve		
SY	sulcus ypsiloniformis	Tel	3, 4	III	oculomotor nerve		
Tel	telencephalon			IV	trochlear nerve		
TeO	optic tectum	Mes	6-15	V	trigeminal nerve		
TL	torus longitudinalis	Mes	7-15	VI	abducens nerve		
TPp	periventricular nucleus of the posterior tuberculum	Die	7-10	VII	facial nerve		
TS	torus semicircularis	Mes	10-14	VIIIs	sensory root of the facial nerve	Rho	17-23
TSc	central nucleus of the TS	Mes	11-14	VIII	octaval nerve		
TSvl	ventrolateral nucleus of the TS	Mes	11-14	IX	glossopharyngeal nerve		
TTB	tractus tectobulbaris	Mes	11-14	X	vagal nerve		

第2章 ウナギの飲水関連筋に投射しているニューロン

要旨

本研究では、ウナギの飲水に関与している筋(飲水関連筋)から逆行性標識することで、これらの筋に投射しているニューロンを同定した。蛍光色素である Evans blue (EB) をウナギの7つの飲水関連筋に注射した; sternohyoid muscle、3rdbranchial muscle、4th branchial muscle、opercular muscle、pharyngeal muscle、upper esophageal sphincter (UES)、esophageal body muscle。sternohyoid muscle は‘開口’を引き起こし(開口関連筋)、残りの筋は‘嚥下’に関与する筋(嚥下関連筋)である。EB で逆行性に染色されたニューロンはすべて延髄尾部に同側性に認められた。第1章で作製した脳地図に基づいて、sternohyoid muscle に投射しているニューロンは spinooccipital motor nucleus (NSO)、残りの嚥下関連筋に投射しているニューロンは glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) のニューロンであると同定された。GVC ではニューロンの配列が筋の配列と対応していた (viscerotopic arrangement)。したがって、GVC のニューロンが吻尾方向に順番に発火すれば、‘嚥下’は完了すると考えられる。これら NSO や GVC ニューロンは、choline acetyltransferase (ChAT) の抗体で免疫染色すると大部分が ChAT 様免疫陽性反応を示すので、acetylcholine (ACh) を神経伝達物質として用いていると考えられる。延髄のニューロンとはべつに、pharyngeal muscle、UES、esophageal body muscle に EB を注射すると、迷走神経の神経節でも EB で染色されたニューロンが観察された。これらのニューロンは、その局在位置や形態から判断すると、感覚ニューロンであることが示唆される。また、これらのニューロンは ChAT 様免疫陽性反応を示さないので、ACh を神経伝達物質に用いていない可能性が高い。哺乳類の‘嚥下’の神経調節機序をもとに、これらの結果からウナギの飲水行動の神経調節機序を示した。ウナギの飲水行動を制御している神経回路は、哺乳類の‘嚥下’を制御している神経回路に相当しているのかもしれない。

はじめに

ウナギは水中で生活し、呼吸のために常に口腔-咽頭腔内に水が保持されているので、1回だけの飲水であれば水を飲み込むこと‘嚥下’だけで飲水行動は完了する(連続的な飲水の場合、‘口に水を含み’、‘嚥下’することで飲水行動は完了する)。一般に哺乳類では、‘嚥下’は機能的に口腔相、咽頭相、食道相の3相に分けられる (Doty, 1968; Cunningham *et al.*, 1990; Cunningham & Sawchenko, 1990, 2000; Miller, 1999)。哺乳類と同様に、ウナギでも‘嚥下’はこれらの3相に分けられる: sternohyoid muscle の収縮は口腔底にある舌骨を引き下げて開口をもたらす、口腔容積を増やす。結果として、口腔内に水が侵入する。つづいて sternohyoid muscle の弛緩は口を閉じさせ、口腔内圧が高められるので、水は咽頭へと送り込まれる(口腔相)。branchial muscles と opercular muscle の収縮は鰓列と鰓孔を閉鎖させ水の流出を防ぎ、さらに、pharyngeal muscle の収縮は咽頭腔内圧を高め、UES

が弛緩することで水は咽頭から食道に送られる(咽頭相)。最後に、esophageal body muscle の蠕動で水は胃に送られ(食道相)、『嚥下』は完了する。本研究では、これら飲水関連筋に Evans blue を注射し、逆行性標識することで、これらの筋を支配しているニューロンの脳内局在部位を調べた。さらに、これらのニューロンが ACh を神経伝達物質に使っているかどうか調べるために、anti-ChAT antibody を用いて免疫染色を行った。

材料と方法

Evans blue による逆行性標識

体重約 200 g の養殖ウナギ *Anguilla japonica*, Temminck & Schlegel, 1847 を購入し、20°C の人工海水中で 1 週間以上飼育したものをを用いた。逆行性標識に用いられる色素は様々であるが、Evans blue (EB) は生体に無毒な色素で (Borges *et al.*, 1985; Cobbett & Weiss, 1990; Weiss & Cobbett, 1992)、神経を切断しなくても容易に神経線維に取り込まれ、また、蛍光が比較的長持ちするので、本研究では EB を用いた。EB (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) に溶かし (5.0 mg / ml)、約 20 μ l を 7 つの飲水関連筋に注射した (FIG. 2-1); sternohyoid muscle (n = 5)、3rd branchial muscle (n = 4)、4th branchial muscle (n = 4)、opercular muscle (n = 3)、pharyngeal muscle (n = 4)、upper esophageal sphincter (UES) (n = 3)、esophageal body muscle (middle part of the esophagus) (n = 7)。sternohyoid muscle は、コイ (Sibbing, 1982) と同様に、頸・胸部に始まり口腔底にある舌骨尾部に停止する筋である。branchial muscles は鰓弓に付着する筋である。opercular muscle は鰓蓋を裏打ちする筋である。pharyngeal muscle は咽頭背側部の粘膜下にある筋である。UES は咽頭-食道の狭窄部に相当し、食道体は UES より尾側の食道筋である。本実験では心臓レベルの食道体に注射した。本実験では sternohyoid muscle を開口関連筋、それ以外の筋を嚥下関連筋と呼ぶことにする。EB 注射は、0.1 % 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222, Sigma, MO, USA) 麻酔下のウナギ 1 匹に対して 1 つの筋の左側だけで行った。opercular muscle への注射は、鰓孔から注射針を挿入し筋に注射した。それ以外の筋への注射は対象とした筋を外科手術で露出させ注射し、その後縫合した。いずれの注射でも EB の漏れを防ぐために注射後数分間は注射針を抜かずにおいた。EB 注射したウナギを水槽に戻し 4 日間飼育した後、再び MS-222 麻酔下で、100 ml 生理的食塩水で脱血し、100 ml 4 % paraformaldehyde (PFA; Kanto Chemical, Tokyo, Japan) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) で灌流固定した。ウナギの頭部の筋を除去し、固定液が効果的に脳に浸透するように頭蓋の左右を切り開いたのちに、4 % PFA in 0.1 M PB で後固定した (4 °C・12 時間)。その後、脳を単離し、30 % sucrose in 0.1 M PB で置換した (4 °C・一晚)。OCT Compound (Sakura, Finetechnical, Tokyo, Japan) で包埋後、クリオスタットで横断面切片 (厚さ 30 μ m) を作製した。切片を PBS で洗浄後、一時的に PBS で封入し、モノクローム冷却式 CCD カメラ (C5985, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) を備えた落射型蛍光顕微鏡 (Labophot-2, Nikon, Tokyo, Japan; Ex = 510-560 nm, Em = 590 nm) で EB の蛍

光像を観察し写真撮影した。本研究では、非常に弱い蛍光を発しているニューロンは、時間経過とともに注射部位から同一筋内に拡散した微量の EB を取り込んだものであるという判断のもと、蛍光の強さに関わらず、蛍光を発しているニューロンすべてを EB 陽性であると見なした。EB 陽性ニューロンの吻尾方向の位置を表すために obex (OX) からの距離を示した;「+」を付したものは OX から吻側、「-」を付したものは OX から尾側を意味する。

anti-choline acetyltransferase antibody による免疫染色

蛍光顕微鏡観察を終えたプレパラートのカバーガラスをはずし、anti-choline acetyltransferase (ChAT) antibody を用いて peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法で免疫染色を行った。切片を PBS で洗浄し 5% H₂O₂ in methanol で内因性ペルオキシダーゼの除去を行った(室温・30分)。その後、非特異的結合を防ぐために、blocking solution (PBS containing 0.1% Triton X-100, 3% normal goat serum and 5% bovine serum albumin) で処理し(室温・2時間)、rabbit anti-choline acetyltransferase (anti-ChAT) polyclonal antibody (AB143, Chemicon, California, USA) (1:500) で反応させた(4℃・96-120時間)。この抗体 (AB143) はエンジェルフィッシュの脊髄で ChAT を認識するのに用いられている (Sakamoto *et al.*, 1999)。その後、goat anti-rabbit IgG (AB132, Chemicon) in blocking solution (1:400) で反応させ(4℃・2時間)、rabbit peroxidase-anti-peroxidase complex (PAP; PAP18, Chemicon) in blocking solution (1:100) でインキュベートした(4℃・2時間)。発色は、遮光して 1% CoCl₂ と 1% NiSO₄(NH₄)₂ SO₄ をそれぞれ 1 ml 含んだ 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Nakalai Tesque, Tokyo, Japan) 溶液 50 ml に 4-5 分間浸して行った。なお、各操作の間に切片を PBS で 5 分間 3 回洗浄した。その後、切片を水洗後、脱水、透徹して封入した。対照実験として、一次抗体を用いずに一連の処理をしたところ、陽性反応は認められなかった。作製した標本はカラーデジタルカメラ (Dimage EX, Minolta, Tokyo, Japan) を備えた光学顕微鏡 (BH-2, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し写真撮影した。本研究で用いた脳部位の名称は第1章で作製した脳地図に従った。

結果

開口関連筋に投射している spinooccipital motor nucleus

左側の sternohyoid muscle (n=5) に EB を注射すると、延髄尾部の左腹側部にある 15-28 個の神経細胞体が同側性に染色された (FIG. 2-2A)。これらの細胞体は吻尾方向に散在し (+240 to -960 μm from the OX)、中でも +160 - -40 μm のレベルに最も多く分布していた。この領域以外では EB 陽性ニューロンは認められなかった。EB 陽性細胞体は大きく (ca. 20 μm)、多極形あるいは紡錘形を呈していた。同様な形態は、チョウザメ (Adrio *et al.*, 2000) やネコザメ (Anadón *et al.*, 2000) の spinooccipital nerve (SO) の運動ニューロンとして報告されている。また、SO は一般に sternohyoid muscle を含む鰓下筋群を支配することが知られているので (Romer & Parsons, 1977)、これら EB 陽性ニューロンはウナ

ギの *spinooccipital motor nucleus (NSO)* に相当すると考えられる。EB で逆行性標識を行った同一切片で ChAT 抗体による免疫染色を行ったところ、大部分の EB 陽性ニューロンは ChAT 様免疫陽性であった (FIG. 2-2B)。

嚥下関連筋に投射している glossopharyngeal-vagal motor complex

branchial muscles、opercular muscle、pharyngeal muscle、UES、esophageal body muscle のいずれの筋でも、左側の筋に EB を注射すると同側性に延髄尾部左側の *glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC)* にある神経細胞体が逆行性に標識された。左側 GVC 以外の領域では、EB 陽性細胞体は認められなかった。

3rd branchial muscle (n = 4) に EB を注射すると、EB 陽性ニューロンは +1640 to +1600 μm の範囲で 20-32 個認められた (FIG. 2-2D)。一方、4th branchial muscle (n = 4) では、+1360 to +640 μm の範囲で 13-21 個認められた (FIG. 2-2G)。これら EB 陽性細胞体は紡錘形を呈していた (ca. 10 μm)。

opercular muscle (n = 3) に EB を注射すると、+1470 to +1350 μm の範囲で 19-34 個の EB 陽性ニューロンが観察された (FIG. 2-2J)。これら EB 陽性細胞体は卵形あるいは円錐形を呈していた (ca. 10 μm)。

pharyngeal muscle (n = 4) に EB を注射すると、EB 陽性ニューロンが +390 to +240 μm の範囲で 14-29 個認められた (FIG. 2-2M)。分布域のなかでも、+300 μm のレベルで最も多くの EB 陽性ニューロンが観察された。どの細胞体も紡錘形を呈していた (ca. 10 μm)。

UES (n = 3) に EB を注射すると、EB 陽性ニューロンが +600 to +30 μm の範囲で 16-30 個認められた (FIG. 2-2P)。+250 μm のレベルでもっとも多くの EB 陽性ニューロンが観察された。細胞体は卵形を呈していた (ca. 10 μm)。

middle part of the esophageal body muscle (n = 7) に EB を注射すると、EB 陽性ニューロンが +150 to -30 μm の範囲で 17-33 個認められた (FIG. 2-2S)。これらの細胞体は紡錘形を呈していた (ca. 10 μm)。

EB で逆行性標識を行った同一切片で ChAT 抗体による免疫染色を行ったところ、大部分の EB 陽性ニューロンは ChAT 様免疫陽性反応を示した (FIG. 2-2E, H, K, N, Q, T)。

pharyngeal muscle、UES、esophageal body muscle への注射では、脳内だけでなく延髄から出た迷走神経 (X) の神経節の神経細胞体も EB で染色された (FIG. 2-5)。これらの細胞体は円形を呈しており (20-30 μm)、ChAT 様免疫陽性反応は示さなかった。

FIG. 2-3 は各筋への EB 投与で染色された GVC ニューロンの分布域をまとめたものである。口に近い branchial muscles や opercular muscle などの筋群には GVC 吻部のニューロンが投射し、胃に近い pharyngeal muscle や esophageal muscles などの筋群には GVC 尾部のニューロンが投射していた。これは筋群の配列とそれらを支配する GVC ニューロンの配列が対応していることを示している

(viscerotopic arrangement)。FIG. 2-4 は EB 陽性 の NSO ニューロンと GVC ニューロンの立体的な分布模式図である。NSO と GVC は互いに近接して局在しており、より背側に GVC、腹側に NSO が位置していた。

考察

本研究ではウナギの飲水関連筋に投射している運動ニューロンの局在を明らかにした。延髄尾部から脊髄にかけての腹側深部にある NSO は sternohyoid muscle に直接投射している。また、NSO ニューロンは ChAT を含有しているので、ACh を神経伝達物質として使っていると考えられる。実際、単離された sternohyoid muscle は ACh によって収縮させられる (Kozaka & Ando, unpublished observation)。sternohyoid muscle の収縮はウナギの開口を引き起こし、結果として口腔内に水が流入することになる。

GVC は branchial muscles、opercular muscle、pharyngeal muscle、UES、esophageal body muscle などの嚥下関連筋に同側性に直接投射している (FIG. 2-2, left lane)。GVC の EB 陽性細胞体の形態はナマズ (Kanwal & Caprio, 1987)、ボラ (Díaz-Regueira & Anadón, 1992、チョウザメ (Adrio *et al.*, 2000) の内臓性運動ニューロンの形態によく似ているので、これらのニューロンはウナギの内臓性運動ニューロンで、同側性の神経支配によって‘嚥下’が制御されていると考えられる。また、大部分の EB 陽性ニューロンは ChAT 免疫陽性反応を示すので (FIG. 2-2, middle lane)、神経伝達物質に ACh を使っていることが考えられる。実際に、単離された UES や esophageal body muscle に ACh を与えると強い収縮が生じる (Kozaka & Ando, unpublished observation)。

筋に EB を注射することで筋組織中にある毛細血管から体循環系に EB が入り込み、結果として、血液脳関門を欠いている脳室周囲器官が EB で染色される可能性も考えられる。しかしながら、NSO や GVC はこれまで知られている脳室周囲器官には含まれておらず、EB の腹腔内投与でウナギの NSO や GVC は染色されない (第1章)。

pharyngeal muscle、UES、esophageal body muscle に EB を注射すると、X の神経節にある多数の細胞体が EB で染色された (FIG. 2-5)。これら EB 陽性細胞体の局在位置や形態から判断すると、これらは感覚ニューロンであると考えられる。同様な神経節はエイ (Barry, 1987)、ナマズ (Kanwal & Caprio, 1987)、メクラウナギ (Matsuda *et al.*, 1991) でも観察されている。哺乳類の X では jugular ganglion (JG) と nodose ganglion (NG) の2つが知られており、ともに内臓性感覚ニューロンからなる (Bieger & Hopkins, 1987)。しかしながら、本研究では、EB で染色されたニューロンを含む神経節が哺乳類の JG あるいは NG のどちらに対比できるか判断できない。これら EB で染色された内臓性感覚ニューロンは咽頭や食道からの情報を受け取り脳へ入力しているに違いないが、脳のどの部位に入力しているかはウナギではまだ同定できていない。エイ (Barry, 1987)、ナマズ (Kanwal & Caprio, 1987)、メクラウナギ (Matsuda *et al.*, 1991)、ギンザメ (Lázár *et al.*, 1992)、キンギョ (Morita & Finger, 1987)、ボラ

(Díaz-Regueira & Anadón, 1992) では内臓性感覚ニューロンが延髄の vagal lobe (LX) や commissural nucleus the of the Cajal (NCC) に投射することが示されている。これらの魚類と同様に、ウナギでも LX や NCC が識別されているので (第1章)、ウナギの内臓性感覚ニューロンも LX や NCC に投射していることが考えられる。

本研究結果から、以下のようなウナギの飲水行動の神経調節機序を考える (FIG. 2-6A)。NSO ニューロンはその神経終末から ACh を放出し sternohyoid muscle を収縮させ開口させる。その結果、口腔内に水が入る。吻部 GVC ニューロンは branchial muscles や opercular muscle を収縮させ咽頭腔内圧を上昇させる。咽頭腔内圧は中部 GVC ニューロンによって支配されている pharyngeal muscle の収縮によってさらに高められる。同時に、中部 GVC ニューロンによって支配されている UES が弛緩すれば、咽頭腔内の水は食道に送られることが考えられる。UES を弛緩させる因子はまだ同定されていないが、UES は ACh で収縮するので (Kozaka & Ando, unpublished observation)、中部 GVC の活動が抑制され、神経終末からの ACh の放出が抑えられれば UES の弛緩が生じる (第3章)。食道に達した水は、尾部 GVC ニューロンによって支配される esophageal body muscle の蠕動運動で胃に送られると考えられる。GVC ニューロンは viscerotopic arrangement を呈しているため、これらのニューロンが吻部から尾部に向かって順に発火すれば‘嚥下’が完了することになる。嚥下関連筋からの求心性入力には JG あるいは NG を介して延髄に入ってくる。これら求心性情報は LX や NCC (LX-NCC) に入ると予想される。LX-NCC から GVC への直接投射はキンギョ (Goehler & Finger, 1992) で示されているので、ウナギも LX-NCC が GVC の活動を制御しているのかもしれない。そうだとすれば JG あるいは NG から GVC までの神経回路はウナギの‘嚥下’の反射弓であると考えられる。

FIG. 2-6 に予想されるウナギの飲水行動の神経調節機序と哺乳類の‘嚥下’の神経調節機序 (Jean, 1990; Diamant, 1993) を示す。ウナギの飲水行動に関与している LX-NCC、NSO、GVC は系統発生的にそれぞれ哺乳類の nucleus tractus solitarius (NTS)、hypoglossal motor nucleus (MN XII) と upper cervical motor nuclei (C1-3)、nucleus ambiguus (NA) と dorsal motor nucleus of the vagus (DMX) と相同であることが知られている (Romer & Parsons, 1977; Matsuda *et al.*, 1991; Wullimann *et al.*, 1996)。ウナギの飲水行動の神経調節機序 (FIG. 2-6A) ではまだ不明な部分もいくつかあるが、本研究で示したウナギの飲水関連筋の神経支配様式や他の魚類から予測される求心性情報の入力様式は、哺乳類の‘嚥下’の神経調節機序 (FIG. 2-6B) で見られるものと大部分一致し、それらを構成する個々の神経核もウナギと哺乳類の間で相同であるため、ウナギの飲水行動を制御している神経回路が、哺乳類の‘嚥下’を制御している神経回路に相当すると考えられる。今後、ウナギの飲水行動に関する神経回路網の解明にはさらなる組織学的、電気生理学的手法を用いた研究が必要とされる。

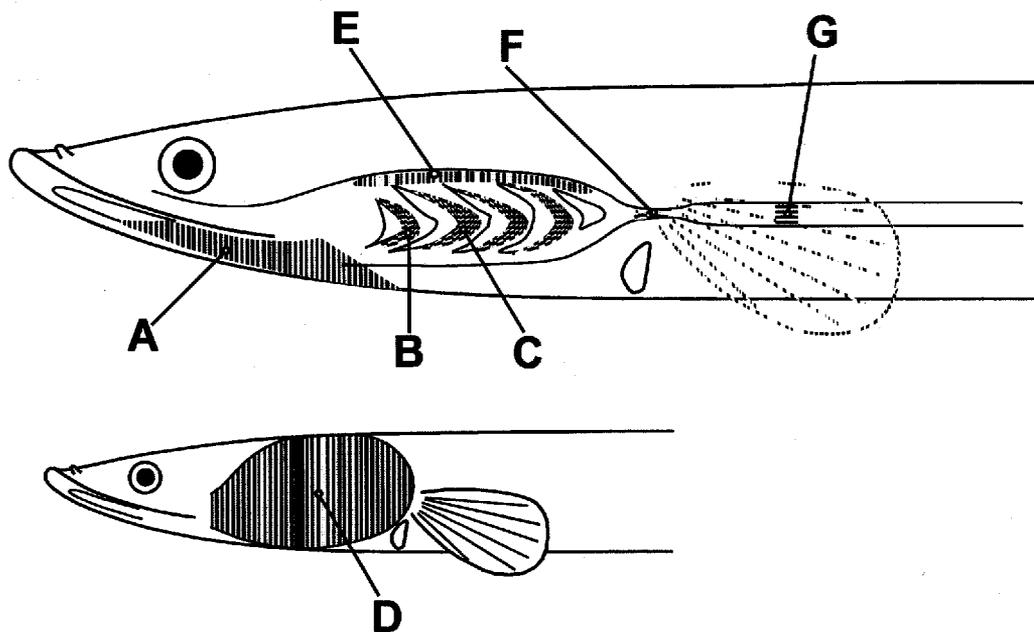


FIG. 2-1 Injection sites of Evans blue (EB). Approximately 20 μ l of EB (5.0 mg / ml PBS) was injected into the sternohyoid muscle (A), the 3rd branchial muscle (B), the 4th branchial muscle (C), the opercular muscle (D), the pharyngeal muscle (E) the upper esophageal sphincter muscle (F), and the esophageal body muscle (G). Each EB injection was made only left-sidedly in each eel.

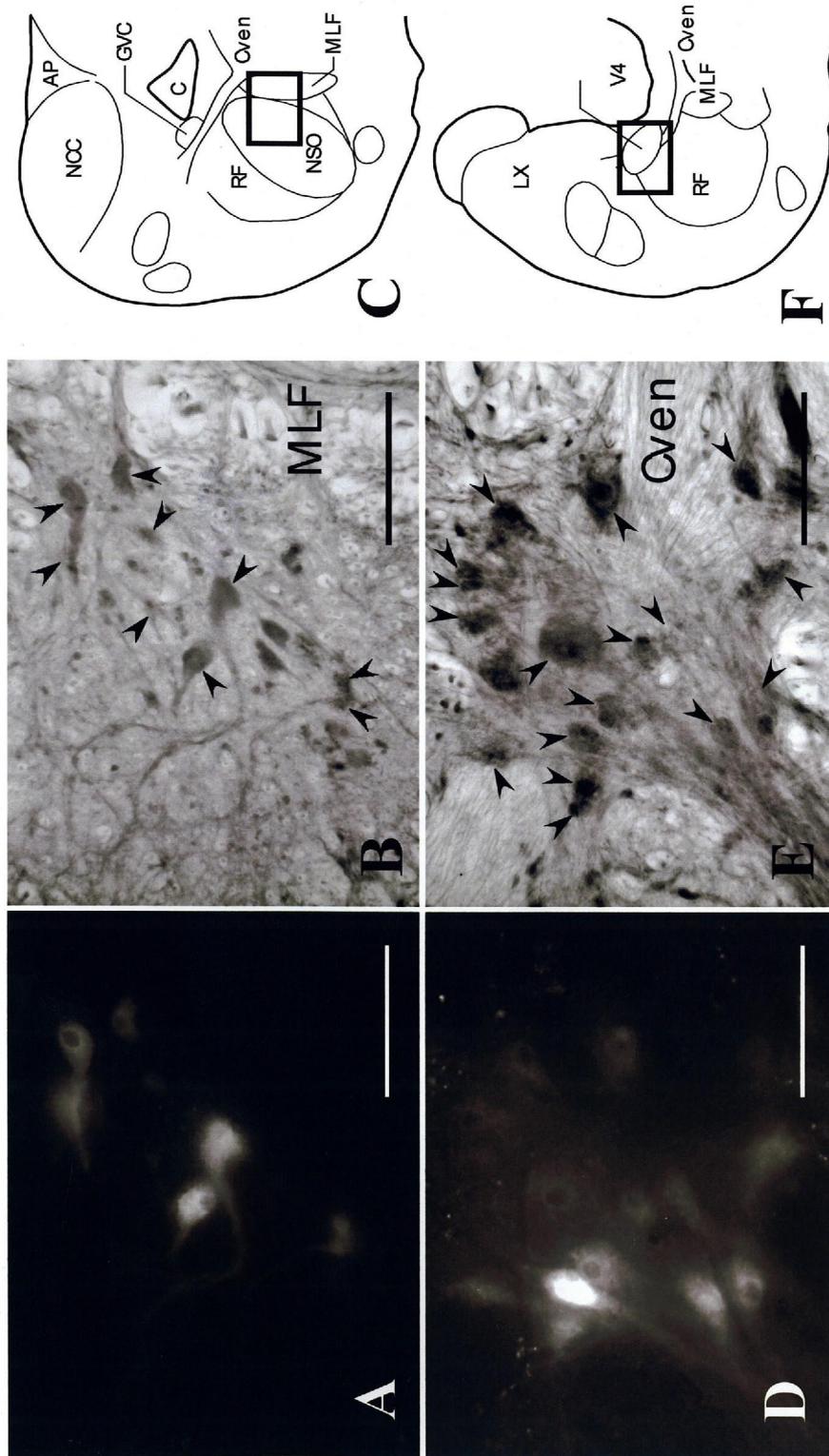


FIG. 2-2 Medullary neurons (cross section) taking up Evans blue (EB) injected into the drinking-associated muscles (**A, D, G, J, M, P, S**). The identical preparations were also stained with anti-choline acetyltransferase (anti-ChAT) antibody (see **MATERIALS AND METHODS**; **B, E, H, K, N, Q, T**). Arrowheads in the second lane indicate neurons identified as EB-positive neurons in the first lane. Areas of these two lanes are shown as thick rectangles in the third lane (**C, F, I, K, L, R, U**), which is drawn following the eel brain atlas. AP, area postrema; C, central canal; Cven, commissura ventralis; GVC, glossopharyngeal-vagal motor complex; LX, vagal lobe; MLF, median longitudinal fascicle; NCC, commissural nucleus of Cajal; NSO, spinooesophageal-vagal motor complex; RF, reticular formation; V4, fourth ventricle. The upper array (**A, B, C**) shows caudal medullary neurons ($-10 \mu\text{m}$ from the OX) projecting to the sternohyoid muscle. The 2nd array (**D, E, F**) shows neurons ($+1640 \mu\text{m}$ from the OX) projecting to the 3rd branchial muscle. The 3rd (**G, H, I**; $+1300 \mu\text{m}$ from the OX), the 4th (**J, K, L**; $+1320 \mu\text{m}$ from the OX), the 5th (**M, N, O**; $+330 \mu\text{m}$ from the OX), the 6th (**P, Q, R**; $+480 \mu\text{m}$ from the OX) and the 7th (**S, T, U**; $-30 \mu\text{m}$ from the OX) arrays show medullary neurons projecting to the 4th branchial muscle, to the opercular muscle, to the pharyngeal muscle, to the esophageal sphincter muscle, and to the esophageal body muscle, respectively. Notice the ipsilateral uptake of EB. Horizontal bars show $100 \mu\text{m}$.

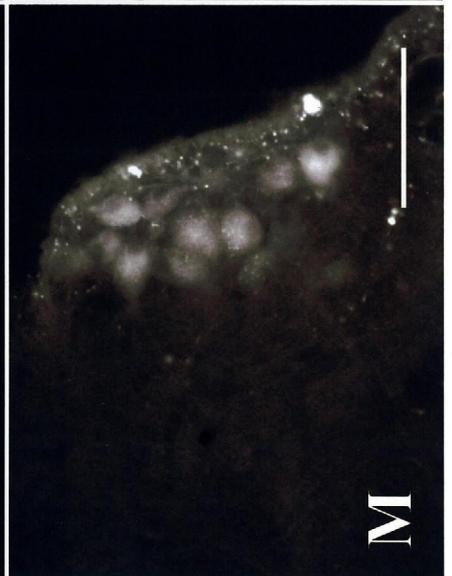
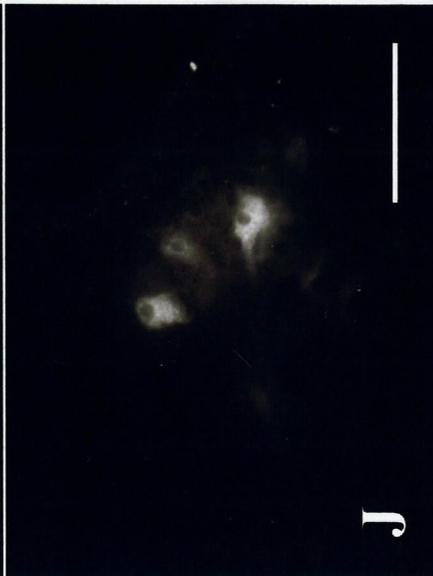
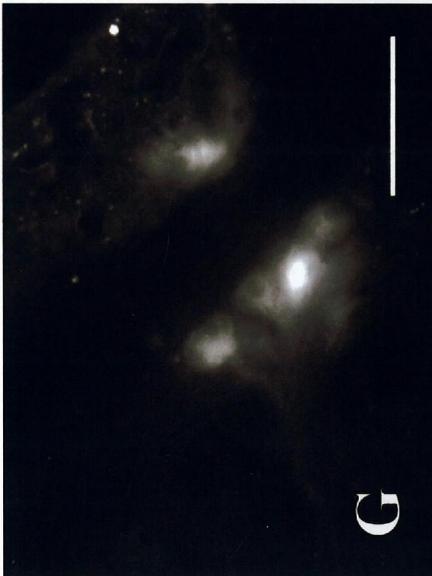
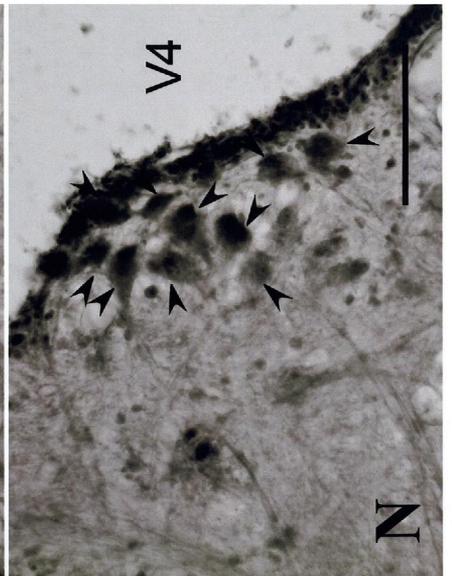
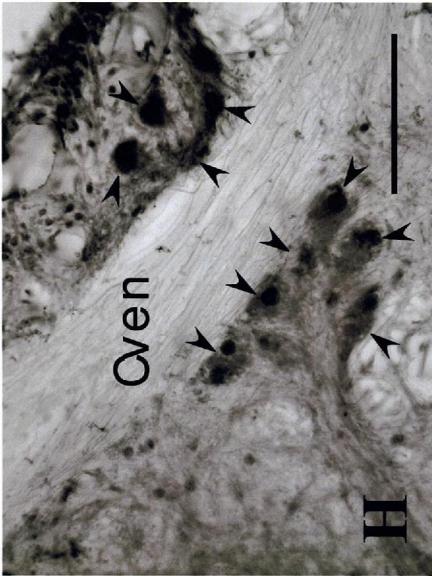
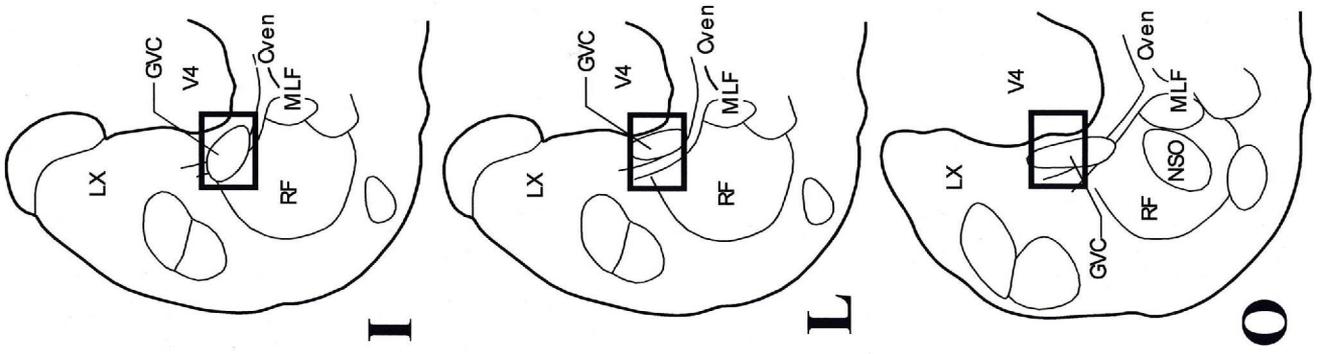


FIG. 2-2 (Continued)

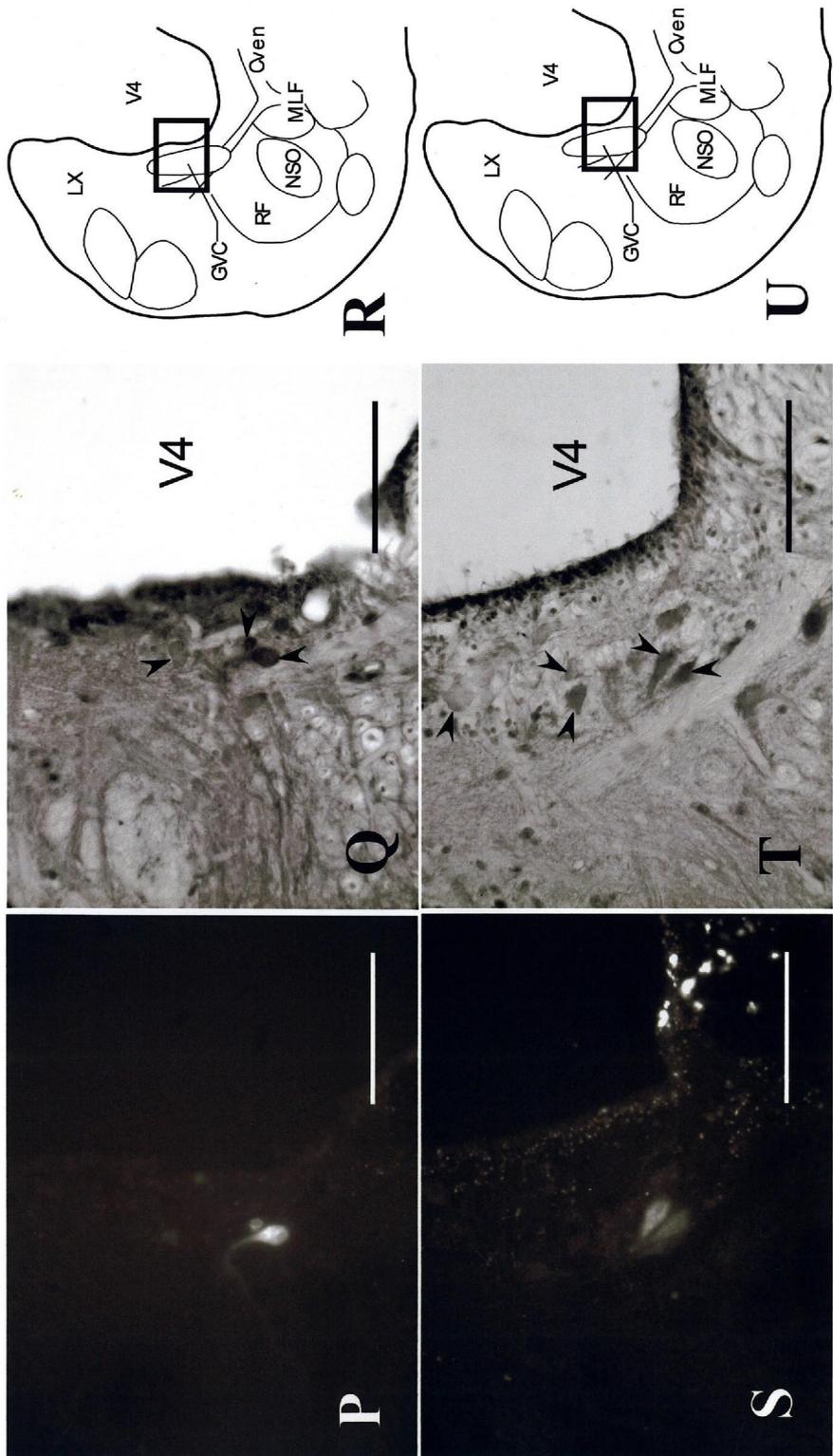


FIG. 2-2 (Continued)

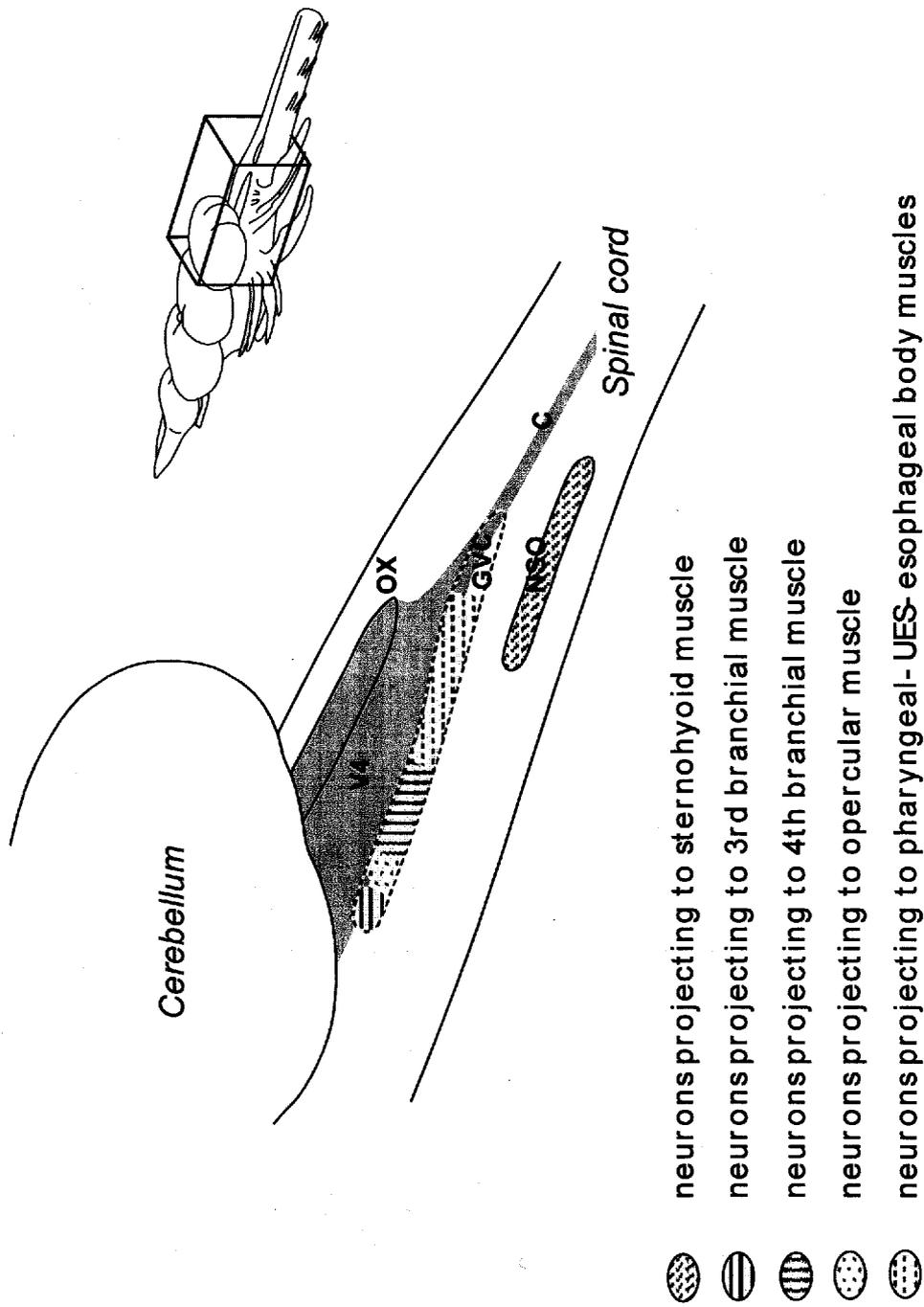


FIG. 2-4 Stereoscopic distribution of the medullary motoneurons associated with drinking behavior. Only left columns of the NSO and the GVC are shown. C, central canal; GVC, glossopharyngeal-vagal motor complex; NSO, spinooccipital motor nucleus; OX, obex; V4, fourth ventricle.

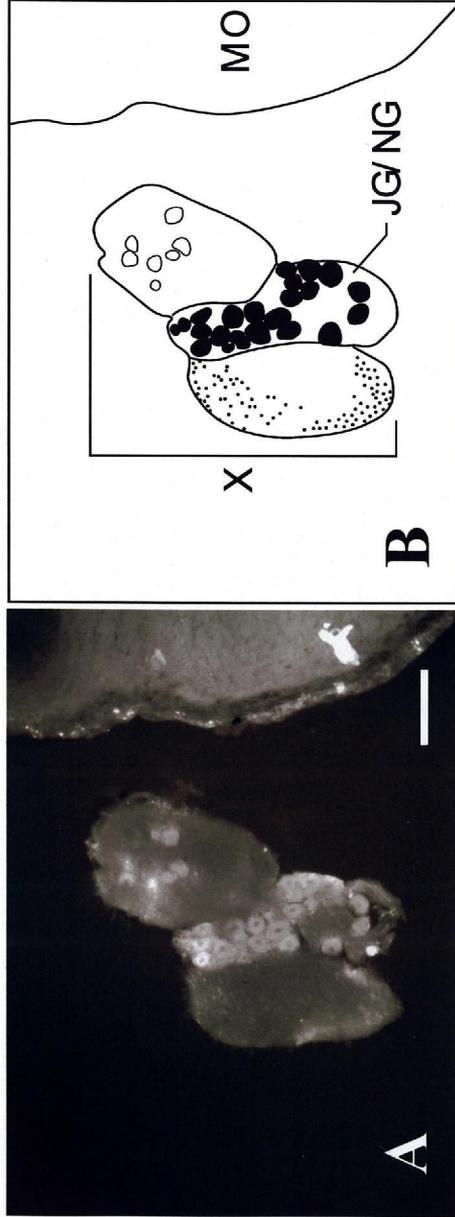


FIG. 2-5 EB-positive neurons in a ganglion (cross section) adjacent to the medulla oblongata (MO). After injection of EB into the pharyngeal muscle, the upper esophageal sphincter muscle, and the esophageal body muscle, some neurons in a ganglion of the vagal nerve (X) were stained by EB (A), but not immunoreactive with anti-ChAT antibody. A schematic drawing is shown in B. Apparent EB-positive somata are indicated as filled circles, obscures as open circles, and fibers as dots. Horizontal bar shows 100 μ m.

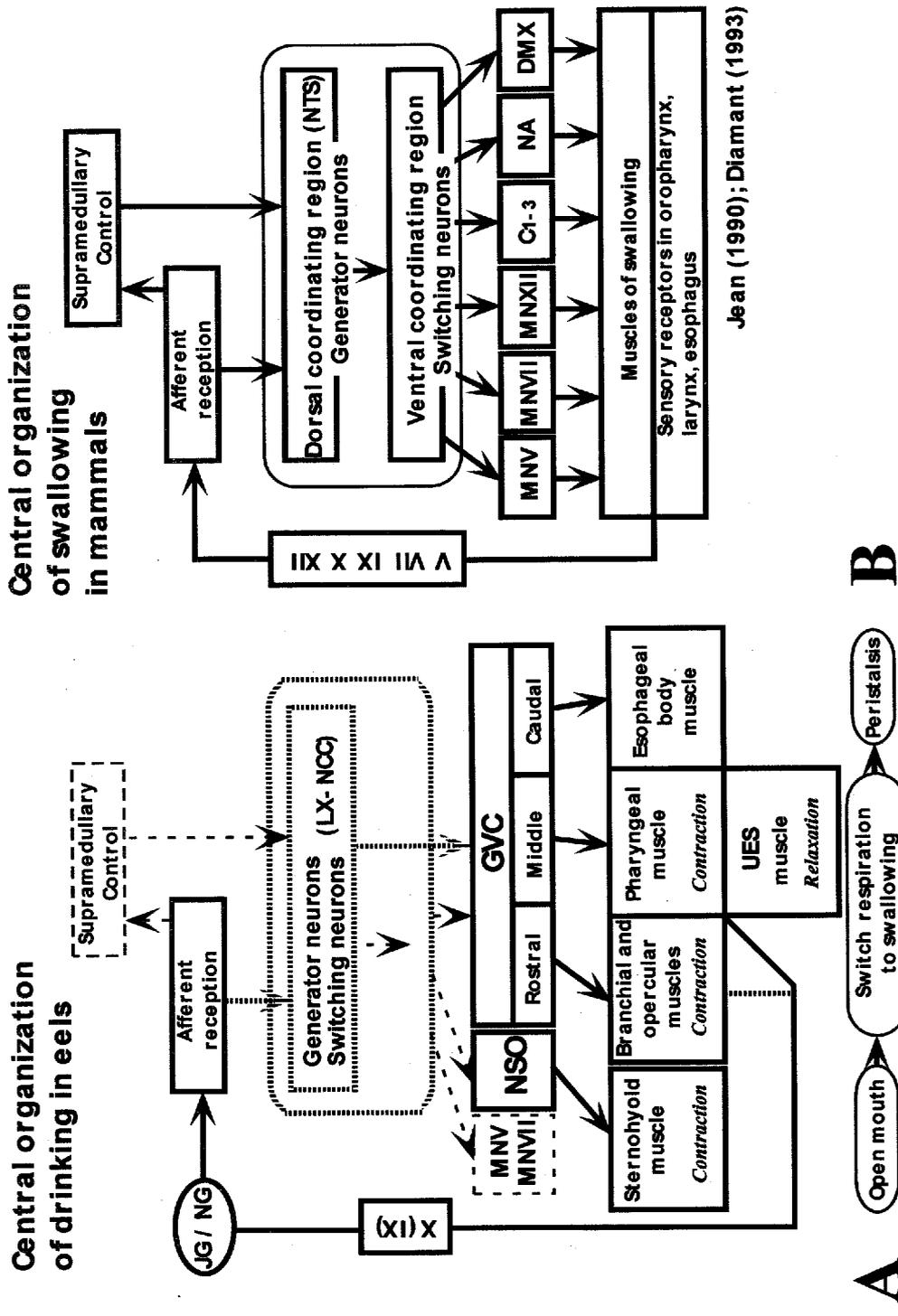


FIG. 2-6 A plausible model for the central organization of drinking behavior in the eel (A). The model is constructed following the mammalian model described by Jean (1990) and Diamant (1993) (B), where sensory ganglia are omitted for simplification. The hypoglossal motor nucleus (MN XII) and the upper cervical motor nucleus (C1-3) in mammals correspond to the spinocervical motor nucleus (NSO) in fishes, and the nucleus tractus solitarius (NTS) in mammals to the vagal lobe and the commissural nucleus of Cajal (NCC) in fishes. The eel glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) comprises the glossopharyngeal motor nucleus (MN IX) and the vagal motor nucleus (MN X), corresponding to the nucleus ambiguus (NA) and the dorsal motor nucleus of the vagal nerve (DMX) in mammals (see text). Thick solid lines and boxes indicate the results revealed in the present study, while dotted ones are anticipated from the results in other fish. Thin broken lines and boxes show still fictive processes in the eel. Although the trigeminal (MN V) and the facial (MN VII) motor nuclei are not stained by EB injected into the seven muscles treated in the present study, involvement of both nuclei in drinking cannot be ruled out.

第3章 カテコールアミンによるウナギの glossopharyngeal-vagal motor complex の活動変化とそれを支配する神経核

要旨

ウナギの飲水行動では、咽頭領域の筋の収縮とともに upper esophageal sphincter (UES) が弛緩しなければ咽頭から食道に水は送られない。したがって、UES の弛緩はウナギの飲水行動の律速段階であると考えられる。そこで本研究では、UES を支配している glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) の活動抑制が UES の弛緩をもたらすと考え、GVC ニューロンの活動を抑制する物質の探索を行った。GVC の周りにメスで切り込みを入れ、他の脳領域からの神経連絡を完全に絶ったウナギの脳標本(ブロック脳)に dopamine (DA)、noradrenaline (NA)、adrenaline (AD) をそれぞれ作用させ、これら catecholamines (CAs) の効果を細胞外記録した。いずれの CAs でも、発火頻度が有意に抑えられた。CAs の抑制効果の強さは次のとおりであった: AD > DA >> NA。次に GVC を支配し、CAs を含むニューロンの局在を調べるために、anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH) antibody を用いて、ウナギ延髄尾部 (vagal lobe (LX) から area postrema (AP) までの領域) で免疫染色を行った。GVC の周囲や GVC ニューロンの細胞体にオーバーラップするように非常に多くの TH 様免疫陽性神経線維が観察されたが、GVC ニューロンは TH 様免疫陽性反応を示さなかった。TH 様免疫陽性細胞体は LX、commissural nucleus of the Cajal (NCC)、AP、reticular formation (RF)、GVC で観察された。LX、NCC、AP の TH 様免疫陽性細胞体は小さく (<10 μm)、円形や涙滴形を呈し、RF の TH 様免疫陽性細胞体は大きく (>20 μm)、多角形を呈していた。このうち、NCC と AP のニューロンは GVC に神経線維を伸ばすものが観察された。これらの結果は、NCC や AP が GVC を CAs によって抑制性支配していることを示唆している。

はじめに

ウナギの飲水行動では、咽頭領域の筋の収縮によって咽頭腔内圧が上昇し、咽頭腔の水が食道に向かって押しやられる。このとき、食道入口に相当する狭窄状態の upper esophageal sphincter (UES) が弛緩しなければ水は食道に送られない。したがって UES の弛緩はウナギの飲水の律速段階であると考えられる。UES の弛緩機序として、UES を支配するニューロンが弛緩物質を放出することで弛緩を引き起こす場合と UES 支配ニューロンの活動が抑制されることで弛緩を引き起こす場合が考えられる。第2章で示したように、UES を支配する glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) のニューロンのほとんどは acetylcholine (ACh) を神経伝達物質に用いている可能性が高く、また、UES は ACh で収縮することが知られているので (Kozaka & Ando, unpublished observation)、後者の弛緩機序の可能性が高い。そこで、本研究では GVC の活動を抑える物質の探索を試みた。抑制物質として、まず、ACh に拮抗する物質である catecholamines (CAs) を考えた。GVC の周りにメスで切り込みを入れ、他の脳

領域からの神経連絡を完全に絶ったウナギの脳標本(ブロック脳)に dopamine (DA)、noradrenaline (NA)、adrenaline (AD) をそれぞれ作用させ、神経活動を細胞外記録した。さらに、GVCを支配しているニューロンの局在を調べるために、CA合成系の律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の抗体を用いてウナギの脳の免疫染色を行った。

材料と方法

Glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) からの細胞外記録

ウナギを断頭後、氷温下ですばやく頭部の筋を除去した。これ以後はあらかじめ 95% O₂ 5% CO₂ で通気しておいた cerebrospinal fluid (CSF; 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM MgSO₄, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, pH 7.4) 中で処置・操作した。ウナギの前頭-頭頂部から側頭部と右上顎部から右側頭部にかけての頭蓋を除去し、脳の背側面および右側面を露出させた。メスで脳標本を正中で切断し右脳を切除後、左脳の正中面(切断面)が上面になるように脳をアクリル板に木綿糸で固定し灌流槽に標本を設置した。その後、脳標本の GVC 周囲にメスで切れ込みを加え、GVC と他の領域との神経連絡を完全に遮断した(ブロック脳) (FIG. 3-1)。灌流槽にブロック脳標本をセットし、95% O₂ 5% CO₂ で通気している CSF を室温下で灌流した。灌流槽の液はアスピレーターで排水した。本研究では、dopamine (DA, 10⁻⁶ M)、noradrenaline (NA, 10⁻⁶ M)、adrenaline (AD, 10⁻⁶ M) を含む CSF を灌流し、それぞれの CAs の効果をみた。CAs の濃度は予備実験の結果にもとづいて決定された。

不関電極には AgAgCl ワイヤー を用い灌流槽中に固定した。記録電極にはテフロンコートされたタングステンワイヤー (50 μm in tungsten diameter) (Cat. No. 7955, A-M systems, Washington, USA) を用いた。記録部位は obex から吻側に向かって 600 μm から 400 μm の GVC 領域とした。この領域は upper esophageal sphincter (UES) を支配している運動ニューロンが局在する(第2章)。記録電極はマニピュレーター (MO-102, Narishige, Tokyo, Japan) で操作し、各個体の記録部位から 2-4 回記録した。神経活動はオシロスコープ (high cut > 3 kHz, low cut < 15 Hz; VC-9, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) で増幅した後に PowerLab (4s, ADInstruments, California, USA) に出力し、Power Macintosh G3 (DT 266, Apple Computer, California, USA) で連続記録・解析した。

CAs による GVC の神経活動の変化をくらべるために、CAs の灌流前 50 秒間と CAs の灌流を行って最大効果が現れ始めてから 50 秒間の発火頻度の平均を求め、その変化量を paired t-test によって検討した。

anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH) antibody による免疫染色

体重約 200 g の養殖ニホンウナギ *Anguilla japonica*, Temminck & Schlegel, 1847 を購入し、20°C の人工海水中で 1 週間以上飼育したものをを用いた。0.1% 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222,

Sigma, MO, USA) 麻酔下にあるウナギ ($n = 8$) を、100 ml 生理的食塩水で脱血し、100 ml 4 % paraformaldehyde (PFA; Kanto Chemical, Tokyo, Japan) in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) で灌流固定した。ウナギの頭部の筋を除去し、固定液が効果的に脳に浸透するように頭蓋の左右を切り開いたのちに、4 % PFA in 0.1 M PB で後固定した ($4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot 12$ 時間)。その後、脳を単離し、30 % sucrose in 0.1 M PB で置換した ($4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot$ 一晚)。OCT Compound (Sakura, Finetechnical, Tokyo, Japan) で包埋後、クリオスタットで vagal lobe (LX) から area postrema (AP) までの延髄尾部の横断面切片 (厚さ $30\text{ }\mu\text{m}$) を作製した。切片を PBS で洗浄後、peroxidase-anti-peroxidase (PAP) 法で免疫染色を行った。切片を PBS で洗浄し 5 % H_2O_2 in methanol で内因性ペルオキシダーゼの除去を行った (室温 $\cdot 30$ 分)。その後、非特異的結合を防ぐために、blocking solution (PBS containing 0.1 % Triton X-100, 3 % normal goat serum and 5 % bovine serum albumin) で処理し (室温 $\cdot 2$ 時間)、rabbit anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH) polyclonal antibody (AB152, Chemicon, California, USA) (1: 500) で反応させた ($4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot 96$ -120 時間)。同様の抗体は、ギンザメ (Meek *et al.*, 1993)、キンギョ (Morita & Finger, 1987a; Hornby & Piekut, 1990)、トゲウオ (Ekström *et al.*, 1990)、カワハギ (Funakoshi *et al.*, 2002) で TH を捕らえるのに用いられている。その後、goat anti-rabbit IgG (AB132, Chemicon) in blocking solution (1: 400) で反応させ ($4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot 2$ 時間)、rabbit peroxidase-anti-peroxidase complex (PAP; PAP18, Chemicon) in blocking solution (1: 100) で反応させた ($4\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot 2$ 時間)。発色は、遮光して 0.05 % 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Nakalai Tesque, Tokyo, Japan) 溶液 50 ml に 4-5 分間浸して行った。なお、各操作の間に切片を PBS で 5 分間 3 回洗浄した。その後、切片を水洗後、脱水、透徹して封入した。対照実験として、一次抗体を用いずに一連の処理をしたところ、免疫陽性反応は認められなかった。作製した標本を、カラーデジタルカメラ (Dimage EX, Minolta, Tokyo, Japan) を備えた光学顕微鏡 (BH-2, Olympus, Tokyo, Japan) で観察し写真撮影した。本研究で用いた脳部位の名称は第1章で作製した脳地図に従った。

結果

Catecholamines (CAs) による GVC の活動変化

GVC 周囲にメスで切れ込みを入れ、ほかの脳領域からの神経連絡を絶ったウナギのブロック脳標本を用いて、DA (10^{-6} M)、NA (10^{-6} M)、AD (10^{-6} M) を含む CSF を灌流し、GVC から細胞外記録をおこなった。本実験では 7 個体分の脳を用いて、それぞれの CAs で 19 回検討した。個々の CAs の GVC に対する効果の一例を FIG. 3-2 に示し、本実験のまとめを TABLE 3-1 に示す。いずれの CAs も GVC の発火頻度を有意に減少させ (paired t-test: AD, $P < 0.001$; DA, $P < 0.001$; NA, $P < 0.01$)、抑制性の効果を示した。また、発火頻度を増加させる興奮性の効果は認められなかった。本研究で検討した 3 種類の CAs のうち、抑制効果は AD が最も強く、DA がそれに続いた。NA は AD や DA にくらべて著しく弱い傾向にあった。そこで、Welch t-test によって、これら 3 種類の CAs の効果に有意な差がある

かどうか検定したところ、AD と DA との間では抑制効果に有意な差は認められなかったが、NA と AD あるいは DA との間では抑制効果に有意な差が認められた ($P < 0.001$)、NA は AD や DA にくらべ明らかに効果が弱かった。

延髄尾部の tyrosine hydroxylase (TH) 様免疫陽性反応

ウナギの延髄尾部を anti-tyrosine hydroxylase (anti-TH) antibody で免疫染色すると、4つの領域 (vagal lobe, LX; commissural nucleus of the Cajal, NCC; area postrema, AP; reticular formation, RF) で TH 様免疫陽性細胞体が観察された (FIGS. 3-3, 3-4)。また、TH 様免疫陽性神経線維は AP、NCC、LX、RF に加え、GVC でも観察された (FIGS. 3-3, 3-4)。それ以外の領域では TH 様免疫陽性反応は観察されなかった。

Vagal lobe. LX は延髄尾部の背側域である (FIGS. 3-3A-C, 3-4A)。TH 様免疫陽性細胞体は脳室周囲に分布し、吻側では細胞体が LX の輪郭に沿って配列していたが (FIG. 3-3A, B)、尾部では細胞体が散在的に分布していた (FIG. 3-3C)。TH 様免疫陽性細胞体は円形のものが大部分であったが涙滴形を呈するものも見られた ($< 10 \mu\text{m}$) (FIG. 3-4A)。LX 背側部-脳室周囲にかけて粒状 (数 μm) の TH 様免疫陽性線維が多く見られた (FIGS. 3-3A-C, 3-4A)。全体的に LX の TH 様免疫陽性ニューロンは明るく染色され茶褐色を呈していた。

Commissural nucleus of the Cajal. NCC は延髄と脊髄の移行部背側にあつて LX につながる領域である (FIGS. 3-3D-G, 3-4B)。TH 様免疫陽性細胞体は吻部の正中近くに見られるが (FIGS. 3-3D, 3-4B)、尾部では TH 様免疫陽性細胞体が観察できず、TH 様免疫陽性線維だけが NCC 全体にわたって見られた (FIG. 3-3E-G)。TH 様免疫陽性細胞体の形態は円形、涙滴形、紡錘形 ($< 10 \mu\text{m}$) を呈し (FIG. 3-4B)、LX のものとよく似ていた。吻部 NCC の TH 様免疫陽性線維は正中近くに多く分布し、正中を横切って左右の NCC TH 様免疫陽性細胞体の間で網状構造を呈するものや粒状 (数 μm) を呈するものが見られた (FIG. 3-3B)。さらに、腹側に向かって伸びる TH 様免疫陽性線維もあり、中心管 (central canal, C) の側方を通って GVC 付近に伸びるのが観察された (FIG. 3-3D)。尾部では NCC 全体にわたって粒状 (数 μm) の TH 様免疫陽性線維が多数分布していた (FIG. 3-3E-G)。LX と同様に、NCC の TH 様免疫陽性ニューロンも明るく染色され茶褐色を呈していた。

Area postrema. AP は延髄から脊髄にかけての背側正中域に相当する (FIGS. 3-3E-G, 3-4C)。TH 様免疫陽性細胞体は円形や紡錘形 (ca. $10 \mu\text{m}$) を呈するものが見られた (FIG. 3-4C)。延髄背側表面近くに局在する AP 浅部のニューロンは背側に向かって短い線維を伸ばし、脳室表面を覆っている上衣細胞に達していた (FIG. 3-4C)。しかし、腹側へ伸びる線維は観察できなかった (FIG. 3-4C)。一方、AP 深部に局在するニューロンは背側への線維はほとんど観察できなかったが、腹側に伸びる線維は長く、NCC の正中域や C の側方を通って GVC のレベルで終末するものや、GVC のレベルで向きを変え、descending trigeminal root - secondary gustatory tract (DV-SGT) の腹側に向かうものが見

られた (FIGS. 3-3E, F, 3-4C)。AP の TH 様免疫陽性ニューロンは LX や NCC の TH 様免疫陽性細胞体よりも濃く染色され赤褐色を呈していた。

Reticular formation. 本研究で検討した延髄尾部全域の DV-SGT の腹側から RF にかけての広い領域で TH 様免疫陽性ニューロンが観察された (FIG. 3-3A-G)。TH 様免疫陽性細胞体は GVC の外側にあり、これらは吻側のものほど大きく ($>30 \mu\text{m}$)、細胞体が1つ程度であるのに対し (FIGS. 3-3A-C, 3-4D)、尾側のもは小さく (ca. $20 \mu\text{m}$)、数個認められた (FIGS. 3-3E-G, 3-4E)。細胞体の形態は多角形で、基本的に3方向に神経突起の基部を向けており、とくに吻側のもは背側、外側、腹側に基部を向けていた (FIGS. 3-3A, C, 3-4D)。TH 様免疫陽性線維は基本的に延髄の腹-外側に広範囲にわたって分布していたが (FIGS. 3-3A-G, 3-4D, E)、吻側の TH 様免疫陽性ニューロンは背側に向かって線維を伸ばし、DV-SGT 直下に至るものや (FIG. 3-3A)、median longitudinal fascicle (MLF) 付近に線維を伸ばすものも見られた (FIG. 3-3A-D)。DV-SGT の腹側には粒状 (数 μm) の TH 様免疫陽性線維が多数分布し (FIG. 3-3A-G)、longitudinal catecholaminergic bundle (LCB) (Ma, 1997; Funakoshi *et al.*, 2002) に相当する。この領域のニューロンは、AP ニューロンと同様に、比較的濃く染色され(赤褐色)、神経線維の走向もはっきりとわかるほどであった。

Glossopharyngeal-vagal motor complex. ウナギでは glossopharyngeal motor nucleus と vagal motor nucleus が連続し吻尾方向に長い柱状構造をなしており、GVC と呼ばれている (第1章)。この領域では TH 様免疫陽性細胞体は認められなかったが、他の部位では認められないほど多くの TH 様免疫陽性線維が観察された (FIGS. 3-3A-G, 3-4C-F)。大部分を占める粒状 (数 μm) の TH 様免疫陽性線維は GVC ニューロンの細胞体周囲に密集していたり、細胞体にオーバーラップしていたりするものもあった。大部分は線維の起始となる細胞体は確認できなかったが、AP 深部にあるニューロンから伸びる線維が GVC 付近に達しているのが数例観察された (FIGS. 3-3F, 3-4C)。

考察

GVC 周囲にメスで切れ込みを入れることで他の領域から GVC への神経連絡を絶ったウナギのブロック脳標本に dopamine (DA)、noradrenaline (NA)、adrenaline (AD) を作用させると、どの CAs を作用させた場合でも有意に発火頻度の減少がみられる (FIG. 3-4, TABLE 3-1)。これは、CAs は GVC に直接作用し、その活動を抑制する効果があることを示唆している。とくに AD と DA はその抑制効果が強いので、GVC を支配するニューロンが神経伝達物質としてこれらの物質を使っている可能性が高い。

GVC を支配し CAs を含むニューロンの局在を調べるために、ウナギの延髄尾部を anti-TH antibody で免疫染色すると、NCC と AP に細胞体を有するニューロンから TH 様免疫陽性神経線維が GVC に達している。このことは、NCC と AP のニューロンが GVC を支配し、その終末で AD あるいは DA を放出することで GVC の活動を抑制している可能性を示唆している。

本実験結果から、ウナギの飲水行動の律速段階である UES の収縮と弛緩の機序を考察する (FIG.

3-5)。ウナギの UES を支配するニューロンは choline acetyltransferase の抗体によって染色されるので、神経伝達物質に ACh を用いている可能性が高い(第2章)。また、ウナギの UES は ACh によって収縮することが示されている (Kozaka & Ando, unpublished observation)。肉眼解剖学的に見ると、ウナギの UES は常に収縮し、狭窄状態が保たれているので、UES を支配している GVC ニューロンの神経終末では継続して ACh が放出されている。このときは GVC を支配する NCC や AP は不活性な状態であることが考えられる。この状態では、いくら咽頭領域の筋が収縮し、咽頭腔内圧が上昇したとしても、咽頭腔の水は食道には送られない。しかし、NCC や AP が活性化され、その神経終末で AD あるいは DA が放出されると、GVC の活動は抑えられ、ACh の放出も抑制される。結果として、収縮していた UES は弛緩し(狭窄状態から開放され)、上昇した咽頭腔内圧によって押された水が食道に進入する。

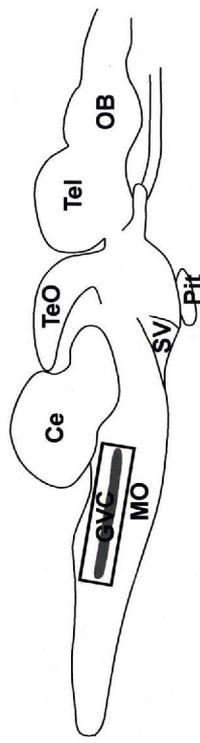
NCC は内臓性感覚ニューロンが投射する部位であることが知られている (Barry, 1987; Kanwal & Caprio, 1987; Morita & Finger, 1987; Matsuda *et al.*, 1991; Díaz-Regueira & Anadón, 1992; Lázár *et al.*, 1992)。ウナギでは内臓性感覚ニューロンの投射部位はまだ明らかではないが、咽頭から内臓性感覚ニューロンが脳に向かって伸びていることが示されている(第2章)。ウナギの内臓性感覚ニューロンも他の魚類と同様に NCC に投射しているなら、咽頭での圧刺激などの情報が NCC に伝達されることによって NCC が活性化されることは十分考えられる。

AP は血液脳関門を欠いた脳室周囲器官である(第1章)。本実験で GVC への投射が観察された AP ニューロンは、延髄表層の毛細血管がよく発達した領域の腹側にあるが、同様な位置のニューロンも血中からの Evans blue で染色されているので (FIG. 1-4F)、このニューロンも血中因子を受容することが考えられる。哺乳類では AP ニューロンは apomorphine や cytotoxic drugs などの血中からの嘔吐誘発因子を受容し、‘嘔吐’を引き起こすことが示されている (Borison, 1989)。一般に、嘔吐は横隔膜を含めた腹部の横紋筋の働きによって胃内圧が高められることで急激に胃内容物が食道を上昇する。しかし、胃内容物の嘔吐に先立って何も嘔吐されない‘空嘔吐’が誘発されることがある。これは、胃内容物の上昇に伴う食道圧の上昇が強制的に UES を弛緩させているのではなく、AP ニューロンに嘔吐誘発因子が作用することによって UES が弛緩しているからかもしれない。

本研究では、UES の弛緩機序のひとつの可能性を示した。飲水行動の最も重要な UES の弛緩に関与していると思われる神経回路の一部を明らかにできたことは飲水行動の神経調節機序を解析するうえで大変意味深い。今後、飲水行動の神経調節機序をさらに詳細に検討するためにも、NCC や AP の活性化がいかんにして生じ、GVC の活動を抑制するのか解析することは必須である。



A



B

FIG. 3-1 Brain area examined responsiveness to some catecholamines. Recording preparation is the medullary area enclosed by quadrates in photograph (A) and its scheme (B). The preparation containing glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) is interrupted neuronal communication from other brain area by incising by a razor's edge. Ce, cerebellum; MO, medulla oblongata; OB, olfactory bulb; Pit, pituitary; SV, saccus vasculosus; Tel, telencephalon, TeO

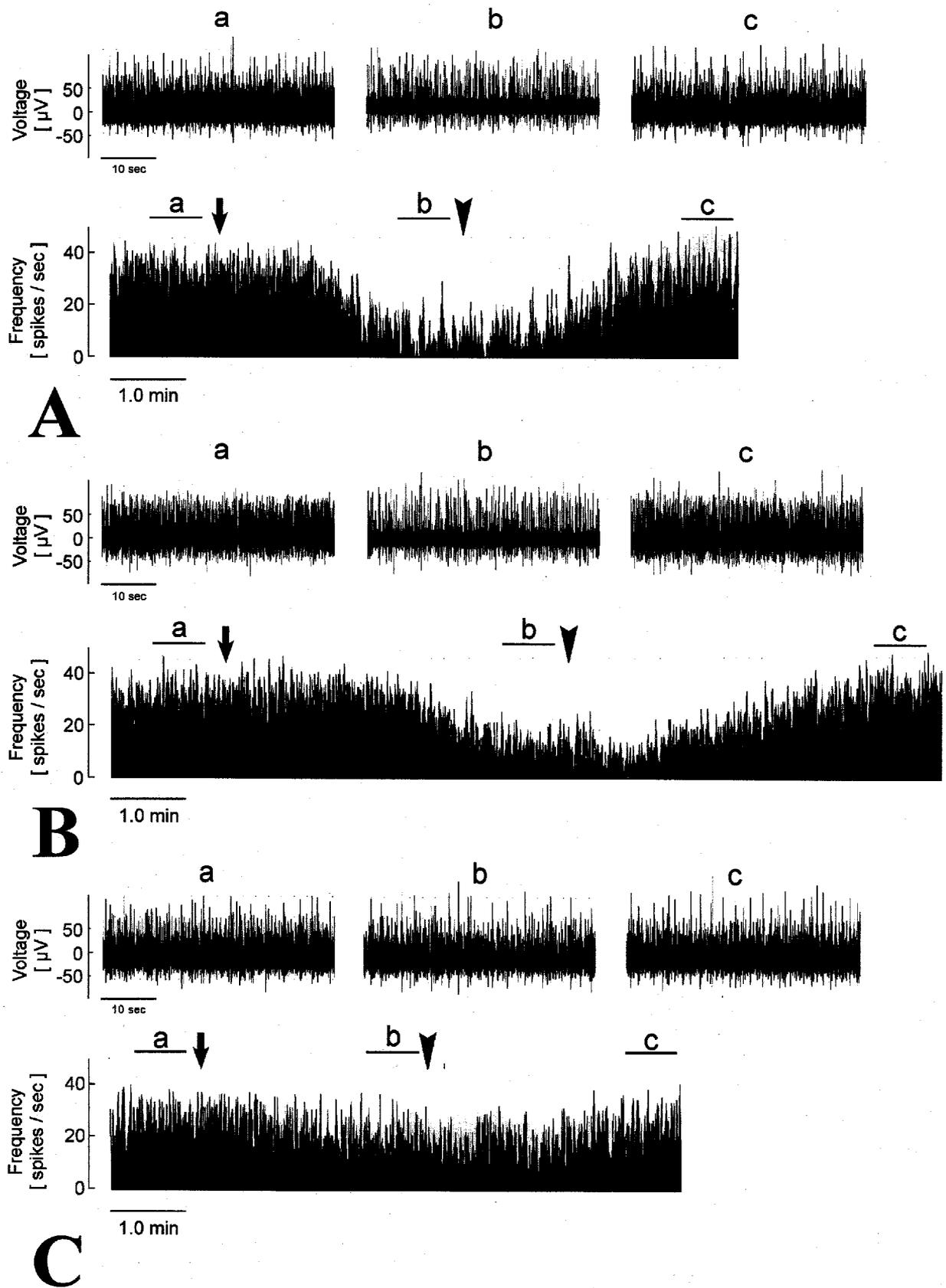


FIG. 3-2 Effects of adrenaline (AD, 10^{-6} M) (**A**), dopamine (DA, 10^{-6} M) (**B**) and noradrenaline (NA, 10^{-6} M) (**C**) on neuronal activity of the glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) in the eel. Upper traces show direct recordings in three intervals (ca. 40 sec) showed by horizontal bars with alphabets (a, b, c) in lower traces 'Frequency'. Arrows indicate points to change from normal cerebrospinal fluid (CSF) perfusion into DA-, NA- or AD-containing CSF perfusion and arrowheads indicate points to remove into normal CSF perfusion again.

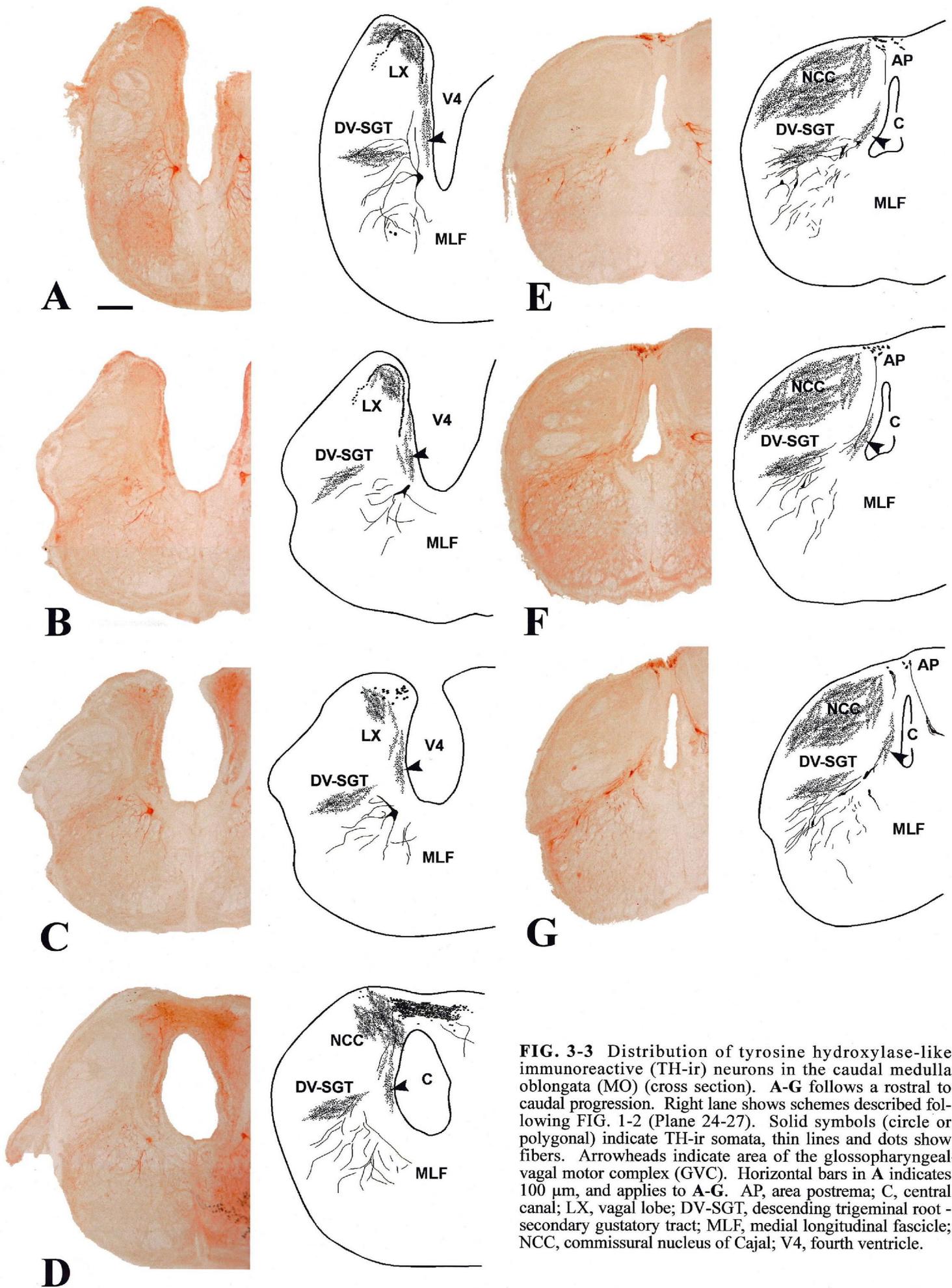


FIG. 3-3 Distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive (TH-ir) neurons in the caudal medulla oblongata (MO) (cross section). **A-G** follows a rostral to caudal progression. Right lane shows schemes described following FIG. 1-2 (Plane 24-27). Solid symbols (circle or polygonal) indicate TH-ir somata, thin lines and dots show fibers. Arrowheads indicate area of the glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC). Horizontal bars in **A** indicates 100 μ m, and applies to **A-G**. AP, area postrema; C, central canal; LX, vagal lobe; DV-SGT, descending trigeminal root - secondary gustatory tract; MLF, medial longitudinal fascicle; NCC, commissural nucleus of Cajal; V4, fourth ventricle.

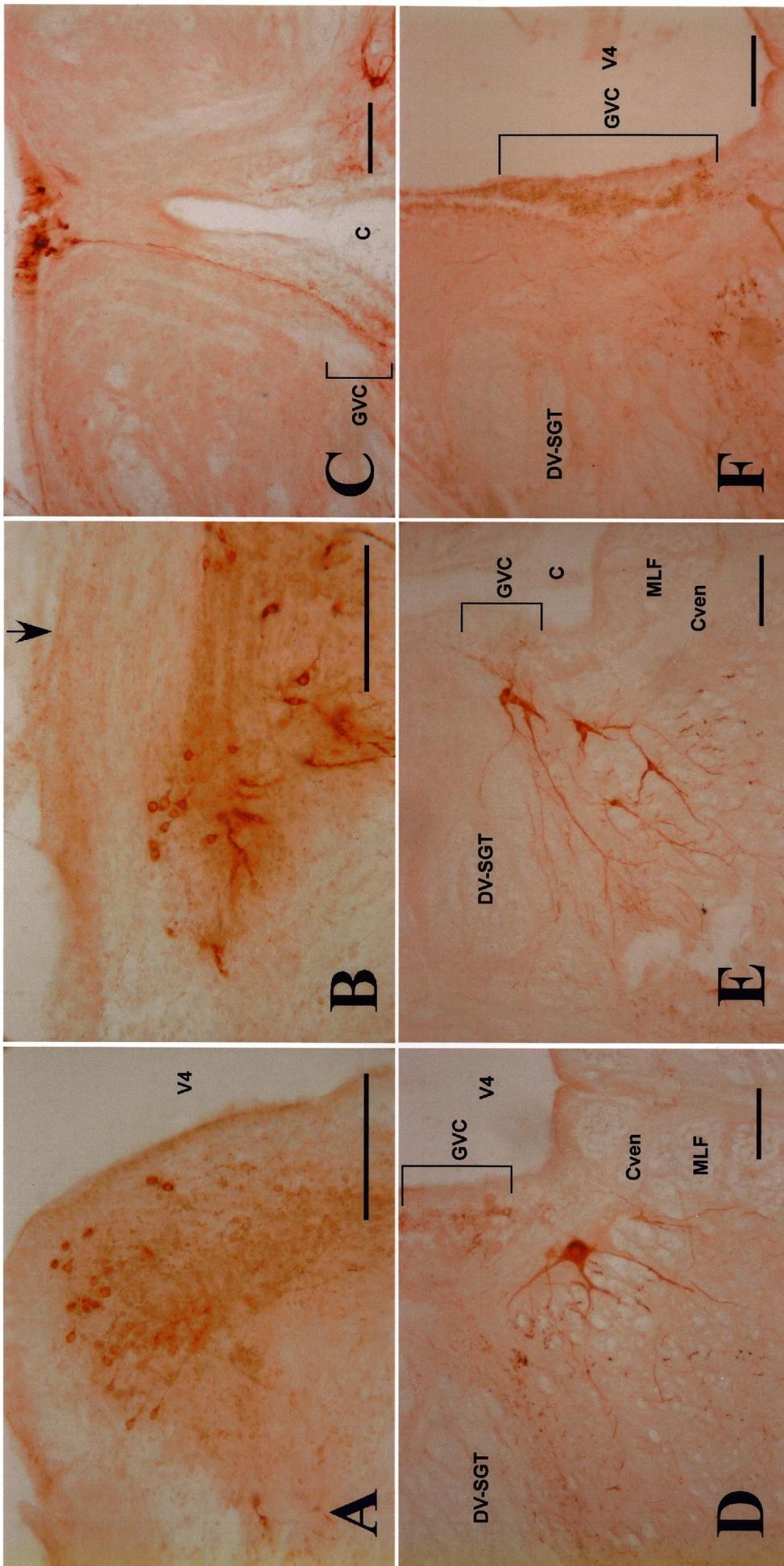


FIG. 3-4 High-magnification of the tyrosine hydroxylase-like immunoreactive (TH-ir) neurons in the vagal lobe (LX, **A**), the commissural nucleus of Cajal (NCC, **B**), the area postrema (AP, **C**), the reticular formation (RF, **D** rostral and **E** caudal), and the glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC, **F**). Horizontal bars show 100 μ m. Arrow in the figure **B** indicates midline level. C, central canal; Cven, commissura ventralis; DV-SGT, descending trigeminal root - secondary gustatory tract; MLF, median longitudinal fasciculus; NCC, commissural nucleus of the Cajal; V4, fourth ventricle.

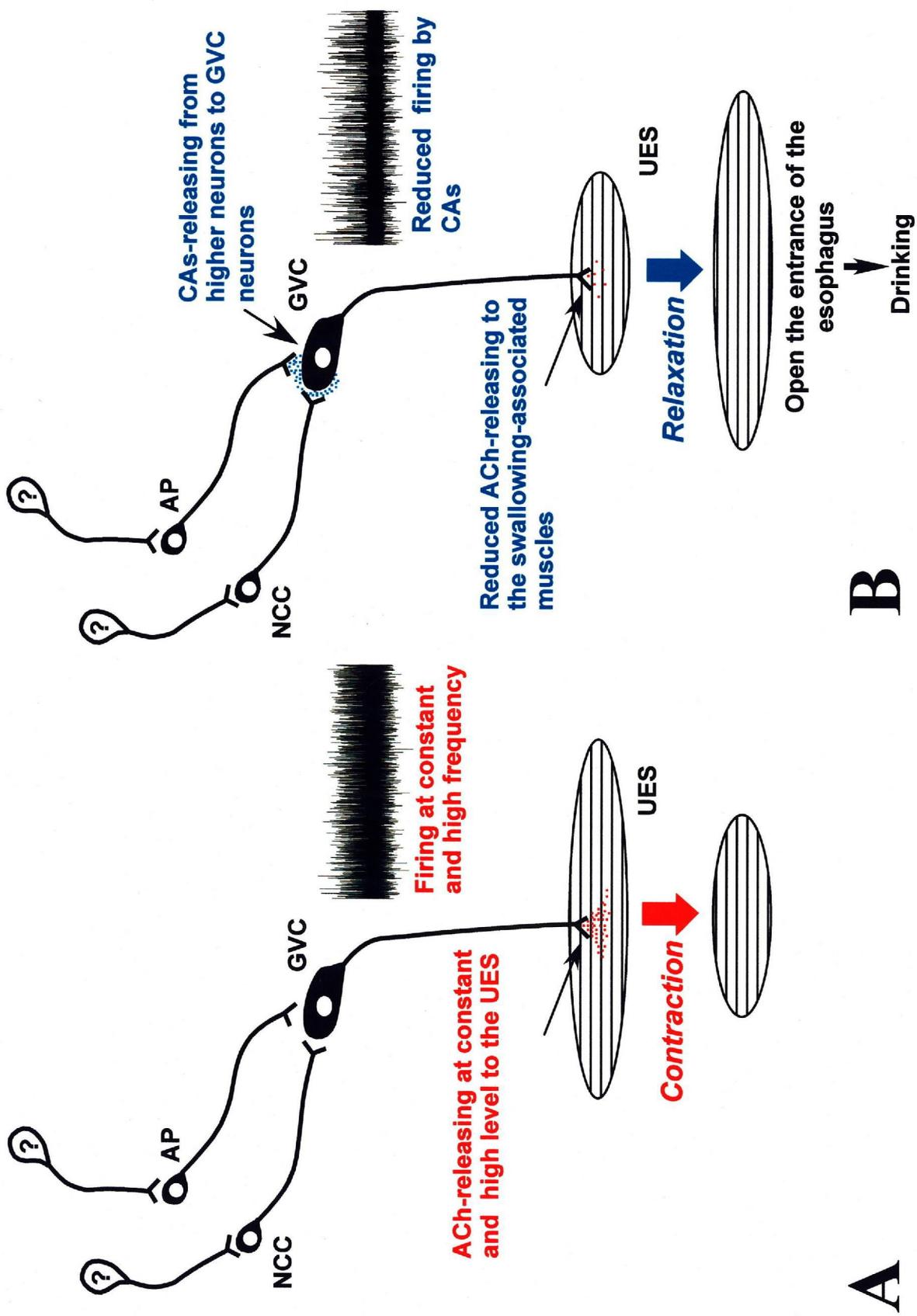


FIG. 3-5 A plausible mechanism of contraction (A) and relaxation (B) in the upper esophageal sphincter (UES). In the relaxation mechanism (B), catecholamines (CAs) from the area postrema (AP) and the commissural nucleus of Cajal (NCC) may inhibit activity of the glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) neurons and reduce acetylcholine (ACh)-releasing at the nerve ends of the GVC neurons, leading to relax the UES. Direct recordings of GVC neuronal activities also show for comparison of each other.

TABLE 3-1 Effects of catecholamines in firing rate on the eel glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC).

Treatment	Number of eels	Before (spikes /sec)	After (spikes /sec)	Difference (spikes /sec)
Adrenaline (AD, 10^{-6} M)	7	33.4 ± 1.3	$15.4 \pm 1.3^{**}$	-18.0 ± 1.1
Dopamine (DA, 10^{-6} M)	7	35.5 ± 1.3	$21.5 \pm 1.6^{**}$	-14.0 ± 1.2
Noradrenaline (NA, 10^{-6} M)	7	34.9 ± 2.5	$31.8 \pm 2.4^*$	-3.2 ± 0.6

Data are shown as means \pm SEM.

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ are compared between before and after treatment of each catecholamine by paired t-test.

総合的考察と結論

これまで飲水行動の神経調節機序はおもに哺乳類を用いて古くから数多くの研究が進められてきたが、現在でも決定的なモデルは提唱されていない。これは、哺乳類の飲水行動を調節している神経回路網があまりに複雑なためであると考えられる。一方、魚類は水中に生活し、呼吸のために絶えず口腔内に水があるので、嚥下だけで飲水行動は完結する。このことは、魚類の飲水行動を調節している神経回路は哺乳類よりは単純で、モデルとしては優れていることを暗示している。魚類の飲水行動は、外科的手術に耐性があることから、ウナギを用いて飲水調節因子の同定が行われてきたが (Hirano, 1974; Takei *et al.*, 1979, 1998; Ando & Nagashima, 1996; Ando *et al.*, 2000a, b)、それを調節している神経回路の解析は行われていない。そこで本研究では、ウナギの飲水行動に関与している脳の神経回路を組織学的、電気生理学的に明らかにすることを試みた。

動物の行動を制御している神経回路の解析をするためには詳細な脳地図が必須である。魚類ではゼブラフィッシュ (Wullimann *et al.*, 1996) やメダカ (Anken & Bourrat, 1998) の脳地図が示されているが、ウナギではまだ作製されていない。そこで第1章では、ウナギの脳切片を Klüver & Barrera 染色し、嗅球から延髄にいたる詳細なウナギの脳地図を作製した。この脳地図で哺乳類の嚥下中枢の構成要素とされている nucleus ambiguus (NA) と dorsal motor nucleus of vagus (MNX) に相当する神経核を識別した。この神経核は吻尾方向に長い円柱状の構造をしており、glossopharyngeal motor nucleus と vagal motor nucleus を含むことから、これを glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) と呼ぶことにした。

飲水行動の神経調節機序の解析では、まず、ウナギの血液脳関門のない脳部位(脳室周囲器官)を間脳領域で2部位 (magnocellular preoptic nucleus, PM; anterior tuberal nucleus, NAT)、延髄で1部位 (area postrema, AP) を同定した(第1章)。ウナギの飲水行動は血中の種々の飲水調節因子によって調節されているが (Ando *et al.*, 2000a)、angiotensin II (ANG II) や atrial natriuretic peptide (ANP) のような因子は、血液脳関門があるために一般に血液から脳に入ることはない。しかし、ウナギにこれらの因子を血中投与したときと頭蓋内投与したときとは同じ飲水効果を示す (Kozaka & Ando, unpublished observation)。これは、これらの因子が PM、NAT、AP に作用しているからであると考えられる。仮に、飲水促進因子である ANGII が AP に作用すれば、AP ニューロンは活性化され、その神経終末から adrenaline (AD) あるいは dopamine (DA) が GVC ニューロンに放出されることが考えられる(第3章)。GVC ニューロンは他の嚥下関連筋とともに upper esophageal sphincter (UES) も支配し(第2章)、高い頻度で自発発火しているので、その神経終末では継続して acetylcholine (ACh) が放出され、UES は収縮状態を保持していることが考えられる(第3章)。そこに AP からの AD あるいは DA が作用すれば、GVC ニューロンの神経終末からの ACh の放出は抑制され、結果として UES は弛緩する。UES の弛緩は、咽頭腔の水を食道に送るためのゲートを開くことになり飲水を促進させる。このような機序は、ANGII が飲水促進因子としてウナギの飲水行動に影響をおよぼすことと矛盾しない。

しかしながら、哺乳類では視床下部の脳室周囲器官である *vasculosum of the lamina terminalis* (OVLT)、*subfornical organ* (SFO) に ANGII が作用することで飲水が促進されることが知られている (Fitzsimons, 1998)。また、ラットでは、AP に ANG II の受容体が多数存在し (Sirett *et al.*, 1977)、血中とともに脳脊髄液中の ANG II も受容することが示されているが (van Houten *et al.*, 1983)、この部位に ANG II を作用させても飲水に何ら効果は認められない (Brooks *et al.*, 1983)。先に考えたウナギの AP-GVC 回路はウナギの嚥下、とくに咽頭相を調節している回路に相当する。嚥下が飲水行動そのものである魚類では、嚥下を調節する神経回路の活性化が飲水をもたらすが、‘渇き’を感じてからいくつかのステップを経て、最終的に嚥下によって飲水行動が完了する哺乳類では、たとえ嚥下の神経回路が活性化されたとしても直接飲水として行動が発現されることはないと思われる。しかし、哺乳類でも AP に血中因子が作用することで UES が弛緩する。哺乳類の嘔吐は、*apomorphine* や *cytotoxic drugs* などの血中嘔吐誘発因子が AP ニューロンに作用することでも生じる (Borison, 1989)。胃内容物の嘔吐に先立って何も嘔吐されない‘空嘔吐’が誘発されるが、これは胃内容物の上昇に伴う食道圧の上昇によるものではなく、AP ニューロンに嘔吐誘発因子が作用することによって UES が弛緩しているからかもしれない。また、哺乳類では AP は血中 ANG II を受容することで‘圧受容反射’に関与していることがよく知られている (Cox *et al.*, 1990; Collister *et al.*, 1996; Ferguson & Bains, 1997; Liu *et al.*, 1999; Sanderford & Bishop, 2002)。ウナギでも AP への ANGII の作用が‘圧受容反射’に関与しているとすれば、AP を介して促進される飲水は血圧に依存して生じる、いわゆる‘反射的な飲水’であることが考えられる(‘渇き’が意識にのぼっていないと考えるほうが妥当かもしれない)。しかし、このような‘反射的な飲水’によってウナギの体内の水分維持が可能なのは、常に海水中に生息しているときに限られると思われる。このような状態であれば体からの脱水は一定量が保たれるので、呼吸のために口腔-咽頭腔内に保持された水を一定の割合で嚥下することで失った水は補償される。しかしながら、淡水から海水に移動した場合、急激な脱水が生じることは容易に考えられる。このような場合、呼吸の間に行われる‘反射的な飲水’だけでは体内の水の損失は補われず、意識的に‘水を飲む’ことが必要ではないだろうか。次々と口に水を取り込むためには口を開閉しなければならない。このときには *spinooccipital motor nucleus* (NSO) によって支配される *sternohyoid muscle* が働く(第2章)。NSO は哺乳類の *hypoglossal motor nucleus* (MNXII) と *upper cervical motor nuclei* (C1-3) に相当し、これらは意識下で制御されている。このとき、ウナギは、‘渇き’が意識にのぼり、その結果、‘口に水を含み’、‘嚥下する’ことによって飲水行動は完了するので、‘渇き’を感じ、‘口に水を含み’ことを調節する神経回路が活性化されなければならない。これは、‘渇き’を感じてから嚥下までのステップが意識下で制御されている哺乳類の飲水行動を最も単純化したものと見ることができる。ウナギでは AP が‘反射的な飲水’を引き起こすなら、間脳領域の脳室周囲器官である PM や NAT が ANGII を受容し、いわゆる‘渇き’を感じていると思われる。‘渇きを感じ’、‘口に水を含み’、‘嚥下する’ステップを経るこのタイプのウナギの飲水行動では、PM や NAT から‘口に水を含み’ことを調節する神経回路に情報が入力され、最終的に

嚙下の神経回路が活性化されているのかもしれない。これは、ANGII が OVLT や SFO に作用すると、嚙下の前に存在するいくつかのステップを調節している神経回路が活性化され、これらの神経回路を經由してきた情報が最終的に嚙下の調節回路に入力される哺乳類の飲水行動の神経調節機序ときわめてよく似ている。

これらはまだ想像の域を脱しないが、今後、PM や NAT、AP への ANGI Ⅱ の局所投与によって、ウナギの飲水行動がどのように変化するのか、脳のどの部位が活性化されるのか、また、AP への ANGI Ⅱ の局所投与によって UES はどのような挙動を示すのか検討を行っていくことでウナギの飲水行動を詳細に解析したい。

GVC は、哺乳類の嚙下関連筋を支配している nucleus ambiguus (NA) や dorsal motor nucleus of the vagus (DMX) に対比できることがよく知られている (Romer & Parsons, 1977)。本研究では、ネコザメ (Withington-Wray *et al.*, 1986)、ナマズ (Kanwal & Caprio, 1987)、ギンザメ (Lázár *et al.*, 1992) と同様に、ウナギの GVC も viscerotopic arrangement を呈していることを明らかにした(第2章)。しかしながら、哺乳類の NA はウナギ GVC の組織化とは異なり、reverse-viscerotopic arrangement を呈することが知られている: 吻部 NA ニューロンはより尾部の上部消化管 (食道など) を支配し、尾部ニューロンはより吻部の上部消化管 (咽頭・喉頭など) を支配している (Lawn, 1966; Bieger & Hopkins, 1987)。一般に、哺乳類などの咽頭・喉頭領域の筋群は発生学的に branchial arches (pharyngeal arches) に由来することがよく知られているので、ウナギの吻部 GVC ニューロン (branchial muscles を支配) はウサギやラットの尾部 NA ニューロン、尾部 GVC ニューロンは吻部 NA ニューロン に対比できる。ウナギ GVC とウサギやラット NA に見られる topologic arrangement の違いは Windle (1933) によって記載されたネコ胚発生期のニューロンの移動でうまく説明できる: ネコの胚発生の早い段階では第四脳室に沿って吻尾方向に伸びる1つの柱状神経核が認められるが、しだいにこの柱状神経核の吻部にあるニューロンが順番に延髄の腹-尾側に向かって移動し、これら移動したニューロンからなるクラスターが NA、移動しなかったものが DMX をそれぞれ形成する (Windle, 1933)。この移動によって、柱状神経核の吻部にあったニューロンが NA では尾部に、遅れて移動してきた尾部ニューロンが NA の吻部に位置することになる。この柱状神経核にウナギの GVC で見られる viscerotopic arrangement が存在しなければ、移動によって形成された NA がよく組織化された reverse-viscerotopic arrangement を呈すことはないと考えられる。ウナギ GVC と哺乳類 NA との間には組織化の違いが存在するが、その違いも、上述のように哺乳類の個体発生を追うことでうまく説明できるので両者を相同なものを見なすことは適当であると考えられる。

ウナギの飲水行動を制御している神経回路が哺乳類の嚙下を制御している神経回路に相当すると考えた(第2章)。しかしながら、哺乳類では trigeminal motor nucleus (MNX) と facial motor nucleus (MNVII) も嚙下を制御している神経回路の構成要素であるのに対し、ウナギでは第2章で扱った飲水関連筋から MNX や MNVII が逆行性に標識されることはなく、ウナギの飲水行動を制御している神

経回路の構成要素であるかどうかは未だ不明である。本研究では、開口をもたらす *sternohyoid muscle* の神経支配は調べたが、これに拮抗する筋はウナギでは十分に同定できておらず、本研究でも扱っていない。コイ (Maeda *et al.*, 1986) やベタ (Gorlick, 1989) では MNV によって神経支配される *adductor mandibulae* が *sternohyoid muscle* の拮抗筋として知られており、この筋が収縮すると口が閉じる。また、口腔内容積の増減に関与する筋として、MNVII によって支配される *adductor operculi* や *levator operculi* が知られているが (Maeda *et al.*, 1986; Gorlick, 1989)、ウナギではこれらの筋はまだ同定されていない。ウナギの場合もこれらの筋が存在するなら、MNV や MNVII によって支配されている可能性は極めて高い。今後、ウナギの鰐顔面-咽頭領域の詳細な解剖学的検討が求められる。

ウナギをはじめとする魚類は水を介した呼吸を行うので、呼吸と嚥下との切り替えは口腔から鰓列-鰓孔に向かわせる水の流れ(呼吸)を口腔から食道に向かわせる水の流れ(嚥下)に変えることである。解剖学的に見ると、これは咽頭領域の筋 (e.g., *branchial muscles and opercular muscle*) の単純な弛緩と収縮によると考えられ、哺乳類のように筋の数も多くなく、筋の作用機序も複雑ではないと思われる(少なくともヒトでは約 30 対の筋が呼吸と嚥下との切り替えに関わっていることが一般に知られている)。魚類であっても哺乳類であっても、このような呼吸から嚥下への切り替えは、概念的に‘切り替えニューロン’と呼ばれる脳の介在ニューロンが関与していると考えられる。しかしながら、呼吸と嚥下との切り替えに関して、古くから研究が行われている哺乳類でさえ、介在ニューロンの機能特性はあまり解析されていない。これは筋群の調和のとれた動きを制御するために莫大な数の介在ニューロンが存在しているためかもしれない。ウナギではまだ検討されていないが、呼吸と嚥下との切り替えの単純性からみても介在ニューロンは哺乳類ほど多くなく、ウナギによるこれら介在ニューロンの解析には大いに期待がもてる。本研究は脊椎動物全体のモデルとなりうるであろうウナギの飲水行動の神経調節機序の解析を行ってきたが、脊椎動物の呼吸と嚥下との切り替えに関わる神経調節機序の根本的モデルの構築といった側面もある。将来的に構築されたウナギの神経調節機序と、哺乳類をはじめとする陸上脊椎動物の神経調節機序の比較機能形態学的研究は、脊椎動物が水中から陸上に生活域を変えることで生じた飲水行動の変化(‘水の探索’などの新たなステップを増やす変化)や呼吸様式の変化(水を介した呼吸から空気を介した呼吸への変化)といった環境適応が、それらの行動を制御する神経調節機序にどのように変化をもたらしたのか理解する上で大変意義深いものであると思われる。

稿を終わるにあたり、広島大学総合科学部総合生理学研究室の安藤正昭教授には終始ご指導、ご教示いただいた。同研究室の坂本竜哉博士、同大学同学部脳科学研究室の筒井和義教授、浮穴和義博士、鳥取大学医学部機能形態学統御学講座形態解析学分野の井上貴央教授、海藤俊行博士、長武均氏には有益なご助言を賜るとともに試料作製法をご指導いただいた。鶴見大学歯学部解剖学教室の小寺春人博士、後藤仁敏博士、広島大学生物生産学部水族生理学研究室の植松一眞教授、広島文化短期大学の満嶋明博士、足寄動物化石博物館の澤村寛博士には有益なご助言を賜った。高瀬一郎氏、小坂朋大氏、松永雄三氏をはじめ、広島大学総合科学部総合生理学研究室および脳科学研究室の学生諸氏には積極的に議論に参加していただいた。ここに記して厚く御礼申しあげる。本研究の一部は、文部科学省ならびに水産庁研究補助金の支援のもと行われた。

関連論文

- Ando, M., Fujii, Y., Kadota, T., Kozaka, T., Mukuda, T., Takase, I. & Kawahara, A. (2000a). Some factors affecting drinking behavior and their interactions in seawater-acclimated eels, *Anguilla japonica*. *Zoological Science* **17**, 171-178.
- Ando, M., Mukuda, T., & Takase, I. (2000b). Integrated aspects of osmoregulation in eels acclimated to sea water. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* **6**, 85-94.
- Mukuda, T & Ando, M. (2003). Medullary motor neurons associated with drinking behavior of Japanese eel *Anguilla japonica*, *Journal of Fish Biology* **62**, 1-12.

引用文献

- Adrio, F., Anadón, R., & Rodriguez-Moldes, I. (2000). Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the central nervous system of a chondrosteian, the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Journal of Comparative Neurology* **426**, 602-621.
- Anadón, R., Molist, R., Rodriguez-Moldes, I., Lopez, J. M., Quintela, I., Cervino, M. C., Barja, P. & Gonzalez, A. (2000). Distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in the brain of an elasmobranch, the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Journal of Comparative Neurology* **420**, 139-170.
- Anken, R. & Bourrat, F. (1998). Brain atlas of the medakafish. 91p. INRA.
- Ando, M., Fujii, Y., Kadota, T., Kozaka, T., Mukuda, T., Takase, I. & Kawahara, A. (2000a). Some factors affecting drinking behavior and their interactions in seawater-acclimated eels, *Anguilla japonica*. *Zoological Science* **17**, 171-178.
- Ando, M., Mukuda, T., & Takase, I. (2000b). Integrated aspects of osmoregulation in eels acclimated to sea water. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* **6**, 85-94.
- Ariëns-Kappers, C. U., Huber, G. C. & Crosby, E. C. (1936). The comparative anatomy of the nervous system of vertebrates, including man, 2 vols. New York: MacMilan.
- Barbas-Henry, H. A. & Lohman, A. H. (1984). The motor nuclei and primary projections of the IXth, Xth, XIth and XIIth cranial nerves in the monitor lizard, *Varanus exanthematicus*. *Journal of Comparative Neurology* **226**, 565-579.
- Barry, M. A. (1987). Central connections of the IXth and Xth cranial nerves in the clearnose skate, *Raja eglanteria*. *Brain Research* **425**, 159-166.
- Beasley, D., Shier, D. N., Malvin, R. L. & Smith, G. (1986). Angiotensin-stimulated drinking in marine fish. *American Journal of Physiology* **250**, R1034-R1038.
- Bernana, I., Takahashi, E., Nakamura, T., Kuyama, H & Nagao, S. (1996). OPC-21268, a nonpeptide arginine vasopressin (AVP) V1 receptor antagonist reduces brain edema and protects blood-brain barrier in cold brain injured rats. *Advances in Neurotrauma Research* **8**, 12-14.

- Bieger, D. & Hopkins, D. A. (1987). Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *Journal of Comparative Neurology* **262**, 546-562.
- Borges, L. F., Elliott, P. J., Gill, R., Iversen, S.D. & Iversen, L. L. (1985). Selective extraction of small and large molecules from the cerebrospinal fluid by Purkinje neurons. *Science* **228**, 346-348.
- Borison, H. L. (1989). Area postrema: chemoreceptor circumventricular organ of the medulla oblongata. *Progress in Neurobiology* **32**, 351-390.
- Brooks, M. J., Hubbard, J. I. & Sirett, N. E. (1983). Extracellular recording in rat area postrema in vitro and the effects of cholinergic drugs, serotonin and angiotensin II. *Brain Research* **261**, 85-90.
- Chernicky, C. L., Barnes, K. L., Ferrario, C. M. & Conomy, J. P. (1983) Brainstem distribution of neurons with efferent projections in the cervical vagus of the dog. *Brain Research Bulletin* **10**, 345-351.
- Clasen, R. A., Pandlfi, S. & Hass, G. M. (1970). Vital staining, serum albumin and the blood-brain barrier. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **29**, 266-284.
- Cobbett, P. & Weiss, M. L. (1990). Voltage clamp recordings from identified dissociated neuroendocrine cells of the adult rat supraoptic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* **2**, 267-269.
- Coil, J. D. & Norgren, R. (1979). Cells of origin of motor axons in the subdiaphragmatic vagus of the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System* **1**, 203-210.
- Collister, J. P., Hornfeldt, B. J. & Osborn, J. W. (1996). Hypotensive response to losartan in normal rats. Role of Ang II and the area postrema. *Hypertension* **27**, 598-606.
- Cox, B. F., Hay, M. & Bishop, V. S. (1990). Neurons in area postrema mediate vasopressin-induced enhancement of the baroreflex. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* **258**, H1943-H1946.
- Cunningham, E. T. Jr., & Sawchenko, P. E. (1990). Central neural control of esophageal motility: a review. *Dysphagia* **5**, 35-51.
- Cunningham, E. T. Jr., & Sawchenko, P. E. (2000). Dorsal medullary pathway subserving oromotor reflexes in the rat: implications for the central neural control of swallowing. *Journal of Comparative Neurology* **417**, 448-466.
- Cunningham, E. T. Jr., Donner, N. W., Jones, B. & Point, S. W. (1990). Anatomical and physiological overview. In: Normal and abnormal swallowing: imaging in diagnosis and therapy (Jones, B. & Donner, N. W., eds.), pp. 119-146. New York: Springer Verlag.
- Diamant, N. E. (1993). Physiology of the esophagus. In *Gastrointestinal Disease* (Sleisenger, M. H. & Fordtran, J. S., eds.), pp. 319-330. Philadelphia: Saunders.
- Díaz-Regueira, S. & Anadón, R. (1992). Central projections of the vagus nerve in *Chelon labrosus* Risso (Teleostei, O. Perciformes). *Brain, Behavior and Evolution* **40**, 297-310.
- Doty, R. W. (1968). Neural organization of deglutition. In: *Handbook of physiology: alimentary canal* (Code, C. F., ed.), pp. 1861-1902. Washington DC:

- American Physiological Society.
- Ekström, P., Honkanen, T. & Steinbuch, W. M. (1990). Distribution of dopamine-immunoreactive neuronal perikarya and fibers in the brain of a teleost, *Gasterosteus aculeatus* L. comparison with tyrosine hydroxylase- and dopamine- β -immunoreactive neurons. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **3**, 233-260.
- Ferguson, A. V. & Bains, J. S. (1997). Actions of angiotensin in the subformal organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **24**, 96-101.
- Fitzsimons, J. T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiological Reviews* **78**, 583-686.
- Font, E. (1991). Localization of brainstem motoneurons involved in dewlap extension in the lizard, *Anolis equestris*. *Behavioural Brain Research* **45**, 171-176.
- Funakoshi, K., Nakano, M., Atobe, Y., Kadota, T., Goris, R. C. & Kishida, R. (2002). Catecholaminergic innervation of the sympathetic preganglionic cell column of the filefish *Stephanolepis cirrhifer*. *Journal of Comparative Neurology* **422**, 204-216.
- Geis, G. S. & Wurster, R. D. (1980). Horseradish peroxidase localization of cardiac vagal preganglionic somata. *Brain Research* **182**, 19-30.
- Goehler, L. E. & Finger, T. E. (1992). Functional organization of vagal reflex system in the brain stem of the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Neurology* **319**, 463-478.
- Gorlick, D. L. (1989). Motor innervation of respiratory muscles and an opercular display muscle in siamese fighting fish *Betta splendens*. *Journal of Comparative Neurology* **290**, 412-422.
- Hamilton, R. B., Pritchard, T. C. & Norgren, R. (1987). Central distribution of the cervical vagus nerve in old and new world primates. *Journal of the Autonomic Nervous System* **19**, 153-167.
- Hirano, T. (1974). Some factors regulating water intake by the eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Experimental Biology* **61**, 737-747.
- Hornby, P. J. & Piekut, D. T. (1990). Distribution of catecholamine-synthesizing enzymes in goldfish brain: presumptive dopamine and norepinephrine neuronal organization. *Brain Behavior and Evolution* **35**, 49-64.
- Jean A. (1990). Brainstem control of swallowing: localization and organization of the central pattern generator for swallowing. In *Neurophysiology of the jaws and teeth* (Taylor, A., ed.), pp. 294-321. London: MacMillan Press.
- Johnson, A. K. & Gross, P. M. (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB Journal* **7**, 678-686.
- Jurzak, M., Müller, A. R., Schmid, H. A. & Gerstberger, R. (1994). Primary culture of circumventricular organs from the rat brain lamina terminalis. *Brain Research* **662**, 198-208.
- Kalia, M. (1981). Brain stem localization of vagal preganglionic neurons. *Journal of the Autonomic Nervous System* **3**, 451-481.
- Kalia, M. & Sullivan, J. M. (1982). Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **211**, 248-264.

- Kanwal, J. S. & Caprio, J. (1987). Central projections of the glossopharyngeal and vagal nerves in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*: clues to differential processing of visceral inputs. *Journal of Comparative Neurology* **264**, 216-230.
- Katz, D. M. & Karten, H. J. (1983). Subnuclear organization of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve in the pigeon *Columba livia*. *Journal of Comparative Neurology* **217**, 31-46.
- Kaufman, S. (1984). Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. *Journal of Physiology (London)* **349**, 389-396.
- Klüver, H. & Barrera, E. (1953). A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **12**, 400-403.
- Lázár, G., Szabo, T., Libouban, S., Ravaille-Veron, M. & Toth, P. (1992). Central projections and motor nuclei of the facial, glossopharyngeal, and vagus nerves in the mormyrid fish *Gnathoneus petersii*. *Journal of Comparative Neurology* **325**, 343-358.
- Liu, J. -L., Murakami, H., Sanderford, M., Bishop, V. S. & Zucker, I. H. (1999). ANG II and baroreflex function in rabbits with CHF and lesions of the area postrema. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* **277**, H342-H350.
- Ma, P. M. (1997). Catecholaminergic systems in the zebrafish. III. Organization and projection pattern of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. *Journal of Comparative Neurology* **381**, 411-427.
- Maeda, N., Kumegawa, M., Ukai, M., Kaneko, T., Kurihara, N., Sato, A. & Miyoshi, S. (1986). Anatomical and functional differences in the adductomandibulae muscle between *Zaco platypus* and *Carassius gibelio langsdorfi* of the cyprinidae family. *Anatomischer Anzeiger* **161**, 267-276.
- Maler, L. & Ellis, W. G. (1987). Inter-male aggressive signals in weakly electric fish are modulated by monoamines. *Behavioral Brain Research* **25**, 75-81.
- Mason, S. T. (1984). Catecholamines and Behavior. Cambridge: Cambridge University Press.
- Matsuda, H., Goris R. C. & Kishida, R. (1991). Afferent and efferent projections of the glossopharyngeal-vagal nerve in the hagfish. *Journal of Comparative Neurology* **311**, 520-530.
- Martini, F. H., Timmons, M. J & McKinley, M. P. (2000). Human Anatomy (3rd ed). 866 p. New Jersey: Prentice Hall.
- Meek, J., Joosten, H. W. J. & Hafmans, T. G. M. (1993). Distribution of noradrenaline-immunoreactivity in the brain of the mormyrid teleost *Gnathonemus petersii*. *Journal of Comparative Neurology* **328**, 145-160.
- Meek, J. & Nieuwenhuys, R. (1998). Holosteand and teleosts. In: Nieuwenhuys, R., Ten Donkelaar, H. J. & Nicholson, C. (eds.). The central nervous system of vertebrates, vol. 2, pp. 759-937. Berlin: Springer-Verlag.
- Meredith, G. E. & Roberts, B. L. (1986). The relationship of saccular efferent neurons to the superior olive in the eel, *Anguilla anguilla*. *Neuroscience Letters* **68**, 69-72.
- Meredith, G. E. & Roberts, B. L. (1987). Distribution and morphological characteristics of efferent neurons innervating end organs in the ear and lateral line of the European eel. *Journal of Comparative Neurology*

- 265, 494-506.
- Meredith, G. E., Roberts, B. L. & Maslam, S. (1987). Distribution of afferent fibers in the brainstem from end organs in the ear and lateral line in the European eel. *Journal of Comparative Neurology* **265**, 507-520.
- Miceli, M. O. & Malsbury, C. W. (1985). Brainstem origins and projections of the cervical and abdominal vagus in golden hamster: a horseradish peroxidase study. *Journal of Comparative Neurology* **237**, 65-76.
- Miller, A. J. (1999). The neuroscientific principles of swallowing and dysphagia. San Diego: Singular Publishing Group, Inc.
- Molist, P., Maslam, S., Velzing, E. & Roberts, B. L. (1993). The organization of the cholinergic neurons in the mesencephalon of the eel, *Anguilla anguilla*, as determined by cholin acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase enzyme histochemistry. *Cell and Tissue Research* **271**, 555-566.
- Morita, Y. & Finger, T. E. (1987a). Area postrema of the goldfish, *Carassius auratus*: Ultrastructure, fiber connections, and immunocytochemistry. *Journal of Comparative Neurology* **256**, 104-116.
- Morita, Y. & Finger, T. E. (1987b). Topographic representation of the sensory and motor roots of the vagus nerve in the medulla of goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Neurology* **264**, 231-249.
- Mukuda, T. & Ando, M. (2002). Medullary motor and sensory neurons associated with drinking behavior of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Journal of Fish Biology*
- Peter, R. E. & Fryer, J. (1983). Endocrine functions of the hypothalamus of actinopterygians. In: Davis, R. F. & Northcutt, R. G. (eds.). *Fish neurobiology*, vol. 2. pp. 165-201. Ann Arbor, MI: University of Michigan Press.
- Pérez, S. E., Yáñez, J., Marín, O., Anadón, R., González, A. & Rodríguez-Moldes, I. (2000). Distribution of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of the adult trout and tract-tracing observations on the connections of the nuclei of the isthmus. *Journal of Comparative Neurology* **428**, 450-474.
- Peter, R. E. & Gill, V. E. (1975). A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Neurology* **159**, 69-102.
- Roberts, B. L., Meredith, G. E. & Maslam, S. (1989). Immunocytochemical analysis of the dopamine system in the brain and spinal cord of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Anatomy and Embryology* **180**, 401-412.
- Romer, A. S. & Parsons, T. S. (1977). The vertebrate body. Philadelphia: Saunders.
- Sakamoto, H., Yoshida, M., Sakamoto, T. & Uematsu, K. (1999). Development of the myotomal neuromuscular system in embryonic and larval angelfish, *Pterophyllum scalare*. *Zoological Science* **16**, 775-784.
- Salia, A. & Lundberg, J. M. (1983). Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *Journal of Neuroscience Methods* **8**, 41-48.

- Sanderford, M. & Bishop, V. S. (2002). Central mechanisms of acute ANG II modulation of arterial baroreflex control of renal sympathetic nerve activity. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* **282**, H1592-H1602.
- Sang, Q. & Goyal, R. K. (2001). Swallowing reflex and brain stem neurons activated by superior laryngeal nerve stimulation in the mouse. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* **280**, G191-G200.
- Shaprio, R. E. & Miselis, R. R. (1985). The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **238**, 473-488.
- Sibbing, F. A. (1982). Pharyngeal mastication and food transport in the carp (*Cyprinus carpio* L.): A cineradiographic and electromyographic study. *Journal of Morphology* **172**, 223-258.
- Simon, E. (2000). Interface properties of circumventricular organs in salt and fluid balance. *News in Physiological Sciences* **15**, 61-67.
- Simpson, H. B., Tobias, M. L. & Kelley, D. B. (1986). Origin and identification of fibers in the cranial nerve IX-X complex of *Xenopus laevis*: Lucifer yellow backfills *in vitro*. *Journal of Comparative Neurology* **244**, 430-444.
- Sirett, N. E., McLean, A. S. Bray, J. J. & Hubbard, J. I. (1977). Distribution of angiotensin II receptors in rat brain. *Brain Research* **122**, 299-312.
- Stuesse, S. L. (1982). Origins of cardiac vagal preganglionic fibers: a retrograde transport study. *Brain Research* **236**, 15-25.
- Stuesse, S. L. & Pawell, K. S. (1982). Cardiac preganglionic fibers in neonatal rats: a comparison with cervical vagal components. *Neuroscience Letters* **34**, 7-12.
- Szekely, G. & Matesz, C. (1988). Topography and organization of central nerve nuclei in the sand lizard, *Lacerta agilis*. *Journal of Comparative Neurology* **267**, 525-544.
- Takayama, K., Ishikawa, N. & Miura, M. (1982). Sites of origin and termination of gastric vagus preganglionic neurons: and HRP study in the rat. *Journal of the Autonomic Nervous System* **6**:211-223.
- Takei, Y., Hirano, T. & Kobayashi, H. (1979). Angiotensin and water intake in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology* **38**, 183-88.
- Takei, Y., Tsukada, T. & Tanakadate A. (1998). Evolution of water intake in seawater adaptation in eels using synchronized drop counter and pulse injector system. *Zoological Science* **15**, 677-82.
- Tsuneki, K. (1986). A survey of occurrence of about seventeen circumventricular organs in brains of various vertebrates with special reference to lower group. *Journal für Hirnforschung* **27**, 441-470.
- Uyama, O., Okamura, N., Yanase, M., Narita, M., Kawabata, K. & Sugita, M. (1988). Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **8**, 282-284.
- van Houten, M., Schiffirin, E. L., Mann, J. F. E., Posner, B. I. & Boucher, R. (1980). Radioautographic localization of specific binding sites for blood borne

- angiotensin II in rat brain. *Brain Research* **186**, 480-485.
- van Houten, M., Mangiapane, M. L., Reid, I. A. & Ganong, W. F. (1983). [Sar, Ala]angiotensin II in cerebrospinal fluid blocks the binding of blood-borne [¹²⁵I]angiotensin II to circumventricular organs. *Neuroscience* **10**, 1421-1426.
- Weaver, F. C. (1980). Localization of parasympathetic preganglionic cell bodies innervating the pancreas within the vagal nucleus and nucleus ambiguus of the rat brain stem: evidence of dual innervation based on the retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Journal of the Autonomic Nervous System* **2**, 61-69.
- Weiss, M. L. & Cobbett, P. (1992). Intravenous injection of Evans blue labels magnocellular neuroendocrine cells of the rat supratoptic nucleus in situ and after dissociation. *Neuroscience* **48**, 383-395.
- Windle, W. F. (1933). Neurofibrillar development in the central nervous system of cat embryos between 8 and 12 mm. long. *Journal of Comparative Neurology* **58**, 643-723.
- Wild, J. M. (1981). Identification and localization of the motor nuclei and sensory projections of the glossopharyngeal, vagus, and hypoglossal nerves of the cockatoo (*Cacatua roseicapilla*), Cacatuidae. *Journal of Comparative Neurology* **203**, 351-357.
- Withington-Wray, D. J., Roberts, B. L. & Taylor, E. W. (1986). The topographical organization of the vagal motor column in the elasmobranch fish, *Scyliorhinus canicula* L. *Journal of Comparative Neurology* **248**, 95-104.
- Won, M. H., Matsuo, K., Oh, Y. S. & Kitoh, J. (1998). Brainstem topology of the vagal motoneurons projecting to the esophagus and stomach in the house musk shrew, *Suncus murinus*. *Journal of the Autonomic Nervous System* **68**, 171-181.
- Wullmann, M. F., Hofmann, M. H. & Meyer, D. L. (1991). Histochemical, connectional and cytoarchitectonic evidence for a secondary reduction of the pretectum in the European eel, *Anguilla anguilla*: A case of parallel evolution. *Brain, Behavior and Evolution* **38**, 290-301.
- Wullmann, M. F., Rupp, B. & Reichert, H. (1996). Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas. 144 p. Switzerland: Birkhauser Verlag.
- Yoshida, Y., Mitsumasu, T., Miyazaki, T., Hirano, M. & Kanaseki, T. (1984). Distributions of motoneurons in the brain stem of monkeys, innervating the larynx. *Brain Research Bulletin* **13**, 413-419.
- Yuan, C. S. & Barber, W. D. (1993). Area postrema: gastric vagal input from proximal stomach and interactions with nucleus tractus solitarius in cat. *Brain Research Bulletin* **30**, 119-125.
- Zottoli, S. J. (1978). Comparison of Mauthner cell size in teleosts. *Journal of Comparative Neurology* **178**, 741-758.
- Zucker, D. K., Wooten, G. F. & Lothman, E. W. (1983). Blood-brain barrier changes with kainic acid-induced limbic seizures. *Experimental Neurology* **79**, 422-443.