ラット前庭神経核における CGRP 含有細胞ならびに線維の局在について

——免疫組織化学的研究——

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：村上 泰教授）

紀 平 晋 也

LOCALIZATION OF CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE-LIKE IMMUNOREACTIVITIES IN THE VESTIBULAR NUCLEI OF THE RAT BY LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC STUDIES

SHINYA KIHIRA, M.D.

Department of Otorhinolaryngology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

The distribution and fine structure of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive (CGRP-LI) cells and fibers in the vestibular nuclei of the rat were investigated by light and electron microscopic immunocytochemistries.

In addition to the previous report that CGRP-LI cells were found in the lateral vestibular nucleus, the present study clarified that they are found also in the inferior vestibular nucleus, medial vestibular nucleus and nucleus X. The lateral vestibular nucleus contains a high density of CGRP-LI cells. They are medium in size and multipolar in shape. CGRP-LI cells in the inferior vestibular nucleus are small to medium in size and triangular or pea shaped. CGRP-LI cells in the medial vestibular nucleus and nucleus X are both few in number and small in size. Possible colocalization of CGRP with acetylcholine, γ -aminobutyric acid or substance P in the single neuron of the vestibular nuclei might be suggested.

CGRP-LI fibers are more extensively distributed in various areas throughout the vestibular nuclei, though previous studies reported that they were found in the lateral vestibular nucleus and inferior vestibular nucleus. A number of CGRP-LI fibers are clearly observed in the inferior vestibular nucleus.

Under electron microscopic analysis, CGRP-LI endproducts are diffusely localized throughout the cytoplasm and some of CGRP-LI dendrites are identified to receive synaptic inputs from non-immunoreactive axon terminals with small spherical vesicles.

It seems likely that CGRP is participated both in the intrinsic neurons in the vestibular nuclei or in the reciprocal innervations between the vestibular nuclei and the reticular formation or the cerebellum.

Key words: 前庭神経核, CGRP, 免疫組織化学法, ラット

A 93-1898-13010

1. はじめに
平衡反射系の一次中継核である前庭神経核は、前庭

迷路の他、中脳、小脳、脳幹、脊髄等と線維連絡を有し、身体の姿勢と運動の制御において重要な役割をは

たしている。しかし、その神経回路網は複雑で、投射路における神経伝達物質の固定や機能に関していまだ不明な点が多い¹⁾。

従来、前庭神経核における神経伝達物質としては、古典的神経伝達物質であるアセチルコリン (以下 Ach と略す)²⁾⁻⁴⁾、アミノ酸系の γ -アミノ酸 (以下 GABA と略す)⁷⁾⁻¹³⁾、グルタミン酸 (以下 Glu と略す)¹⁴⁾、アスパラギン酸 (以下 Asp と略す)¹⁵⁾、グリシン (以下 Gly と略す)¹¹⁾、および神経ペプチドであるサブスタンス P (以下 SP と略す)⁶⁾、エンケファリン (以下 Enk と略す)⁸⁾、ニューロペプチド Y (以下 NPY と略す)¹⁶⁾等が種々の実験方法を用いて報告されてきた。一方、近年注目されている神経伝達物質の一つであるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (以下 CGRP と略す) についても前庭神経核における存在が報告されている。

CGRP は、37個のアミノ酸鎖よりなるペプチドであり、カルシトニン遺伝子からの選択的な組み換えにより見出された¹⁷⁾。CGRP は広く神経系に分布しており¹⁷⁾⁻²²⁾、脳幹部においては、運動神経系²³⁾⁻²⁵⁾、知覚神経系^{10,26)}に存在するとされている。そして、神経伝達物質、あるいは神経調節物質として働いていると考えられている。

前庭神経系における CGRP は、末梢前庭器においては、その含有細胞の局在、微細構造、機能について報告がなされている^{23,29)}。また前庭神経核においても免疫組織化学法^{10,21)}あるいはオートラジオグラフィ法を用いて^{23,30)}、その存在については既に報告されているが、局在を含め詳細な検討はいまだなされていない。

ラットの前庭神経核は、下核、内側核、上核、外側核の4つの亜核、および周辺の小さな細胞群よりなるが、本研究の目的は、ラットの同部における CGRP 陽性細胞ならびに陽性線維の局在について免疫組織化学的に検討すると共に、その微細構造を電顕的に明らかにすることによって、複雑な前庭神経系の機能の一端を解明することにある。

2. 実験方法

体重約 140-180gr の雄性 Wistar 系ラット14匹を用いた。細胞体の観察には、前処置として、灌流の36-48時間前にペントバルビタール(10mg/100gr 体重、腹腔内投与)麻酔下に、6 μ g/ μ l 濃度のコルヒチン 60 μ g を側脳室に注入した。神経線維の観察にはコルヒチンに

よる前処置を行わなかった。

光顕用には、ペントバルビタール麻酔下に氷冷 0.1M リン酸緩衝食水 (pH7.4, 以下 PBS と略す) 300ml を左心室より灌流後、4% paraformaldehyde, 0.2% picric acid, 0.35% glutaraldehyde を含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4, 以下 PB と略す) 200ml を用いた灌流固定を行った。脳幹を摘出し、上記の固定液から glutaraldehyde を除いた同配合の固定液に 4°C で 1 日浸漬した後、さらに 20% sucrose を含む 0.1MPBS 中に 2 日間浸漬を行った。続いて組織を急速凍結し、クリオスタットにて、厚さ 20 μ m の前額面連続凍結切片を作製し、浮遊切片法による peroxidase-antiperoxidase (以下 PAP と略す) 免疫組織化学法³¹⁾を行った。ラット脳幹より得られた各切片を、0.3% Triton X-100 を含む 0.1MPBS (以下 PBS-Triton と略す) に 4°C にて一晚浸漬し、100倍希釈の牛血清 (以下 BS と略す) を含む 0.1MPBS-0.3% Triton に室温で 1 時間浸漬を行った。続いて第一抗体として抗 CGRP 血清 (3000倍希釈, Amersham 社製) と 4°C 7 日間反応させ、0.1MPBS-0.3% Triton で切片を洗浄後、抗ウサギ IgG (200倍希釈, Miles Yeda 社製, 以下 GAR と略す) と 90分間室温にて反応させた。同様に洗浄後、PAP 複合体 (200倍希釈, DAKO 社製) と 1 時間室温にて反応させた。これら免疫反応後、切片を 0.015% H_2O_2 を含む 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (以下 DAB と略す) にて発色させた。さらにそれぞれの切片における前庭神経亜核の境界を明確にするため、cresyl violet による対比染色も併せて行った。

電顕観察用には、組織を光顕観察用と同様に、灌流、脳幹摘出、後固定ののち、0.1MPBS に 1 日浸漬した。マイクロスライサー (堂坂 EM 社製) にて 0.1MPBS 内で厚さ 40 μ m の前額面浮遊切片を作製し、avidin-biotin-peroxidase complex (以下 ABC と略す) 免疫組織化学法³²⁾を行った。各切片は 0.1MPBS-0.015% Triton に 4°C にて 1 日浸漬し、同様に BS, 抗 CGRP 血清と反応し、0.1MPBS-0.015% Triton にて洗浄後、ビオチン化した抗ウサギ IgG (Vectastain ABC kit, Vector 社製) と 90分間室温にて反応させた。洗浄後 ABC (Vectastain ABC Kit, Vector 社製) と 1 時間室温に反応させ、DAB にて発色させた。免疫反応は、一部の切片をスライドガラスにのせ、光顕下に神経細胞あるいは神経線維の発色にて確認した。続いて 1% 四酸化オスミウム (0.1MPBS で溶解) にて 1 時間浸漬し、アセトンにより脱水の後エポン 812 樹脂に包埋し

図1 ラット前庭神経核における CGRP 陽性細胞の分布, 以下図2も同様である。上方が吻側, 下方が尾側で, 約200 μ m おきにその分布を示す。SV: 上核, LV: 外側核, MV: 内側核, IV: 下核, X: X核

図2 ラット前庭神経核における CGRP 陽性線維の分布。

た, 厚さ約1 μ mの切片を作成し, 光顕下に免疫反応を示す神経細胞や線維を確認ののち超薄切片を作製し, 酢酸ウラニルにて染色後, JEM 200CX 電子顕微鏡にて観察した。

3. 結 果

光顕下に行った CGRP 陽性細胞ならびに線維の分布をそれぞれ図1, 図2に示す。

CGRP 陽性細胞は, 外側核, 下核, 内側核, X核に認められたが, 上核にはみられなかった。外側核には, 大型のダイテルス型細胞の他, 中型, 小型の細胞が存在するが, CGRP 陽性細胞は, 多極性の中型細胞 (直径20-30 μ m) で, 核の中央から背側寄りに多く密に認められた (図3-A)。ダイテルス型細胞には CGRP 様免疫反応はみられなかった。下核には種々の大きさの細胞が存在するが, CGRP 陽性細胞は, 多形性の小型から中型の細胞 (直径15-25 μ m) で, 外側寄りに少数存在した (図3-B)。下核の吻側に多いダイテルス型細胞に似た大きな細胞には CGRP 様免疫反応はみられなかった。内側核には中型で多形性の細胞が多いが, 種々の大きさの細胞が存在する。CGRP 陽性細胞は, それらのうちの球形や紡錘形をした小型の細胞 (直径

10-20 μ m) で, 散在して少数認められ (図3-C), 背側, 尾側寄りに多い傾向がみられた。X核には, 小型の細胞 (直径10-20 μ m) のみ存在するが, CGRP 陽性細胞は, そのうちの少数において認められた (図3-D)。

CGRP 陽性線維は, いずれの亜核にも認められたが, 特に下核の背外側から腹内側にかけて多くみられた (図4-A)。下核に特徴的な縦走する線維には, CGRP 様免疫反応はみられなかった。上核では, CGRP 陽性線維の亜核内での局在はみられなかったが, 一部外側寄りに背内側から腹外側へ走行する線維が認められた (図4-B)。外側核では, 背側から腹側へ走行する CGRP 陽性線維が, 中央より背側に少数認められた (図4-C)。また, 外側核の腹側を外側より内側へ走行する線維にも, 少数の CGRP 様免疫反応が認められた。内側核や, X核においても, CGRP 陽性線維は少数ながら認められた。

次に, 電顕による CGRP 陽性細胞ならびに線維の微細構造について述べる。CGRP 陽性細胞では, 免疫反応陽性物質は, 細胞質全体にびまん性に認められ, 特徴的な細胞小器官への局在はみられなかった (図5, 6)。また CGRP 陽性細胞の核は楕円形で, 核膜に陥凹を持つものも認められた (図6)。CGRP 陽性細胞の樹状突起では, 暗調を呈する免疫反応陽性物質の集積が認められ, 免疫反応陰性の終末がその表面にシナプス形成

図3 前庭神経核における CGRP 陽性細胞 (×250). A. 外側核では多極性の中型の細胞に認められる. B. 下核では多形性の小型から中型の細胞に認められる. C. 内側核では小型の細胞に少数認められる. D. X核では小型の細胞に少数認められる.

をしているものも散見された(図7). 免疫反応陰性の終末には, 多くのミトコンドリアが存在し, 一部に小さな球形の終末小胞のシナプス膜への集積が認められた. また, 終末に近いと思われる神経線維においても, その内部にはミトコンドリア, 終末小胞と共に暗調を呈する陽性反応物質が認められた(図8).

4. 考 察

前庭神経核は, 前庭迷路の他, 外眼筋支配の核群や, 網様体, 小脳, 脊髄などとの線維連絡があるとともに, 左右前庭神経核間の交連線維や, 核内 intrinsic neuron の存在も知られている^{35)~40)}.

前庭神経核における神経伝達物質あるいは神経修飾物質としては, Ach, GABA, Glu, Asp, Gly, SP, Enk, NPY, CGRP などが知られている. Ach の存在は, ムスカリン性受容体や合成酵素である choline acetyltran-

sferase (以下 ChAT と略す)^{2)~6)} の証明によって, いずれの垂核にも存在するとされ, なかでも内側核に多く存在するといわれている. そして, Ach は前庭神経⁴¹⁾ や, 内側前庭脊髓路⁴²⁾ に関与していると考えられている. GABA の存在は, 合成酵素である glutamic acid decarboxylase (以下 GAD と略す) が証明されることにより, GABA 含有細胞が内側核や下核に, GABA 含有線維が内側核背側部や外側核背側部に多いとされている⁹⁾¹²⁾. そして, 小脳前庭路⁷⁾⁸⁾, 内側前庭脊髓路⁹⁾⁴³⁾, 尾側前庭脊髓路⁹⁾, 前庭中脳路¹⁰⁾¹¹⁾, intrinsic neuron¹³⁾ において抑制性神経伝達物質として働いていると考えられている. Glu は前庭中脳路¹⁴⁾ において興奮性神経伝達物質として, Asp はいずれの垂核にも存在し, 前庭脊髓路など¹⁵⁾ において興奮性神経伝達物質として, Gly は交連線維¹¹⁾ や前庭脊髓路⁴⁴⁾ において抑制性神経伝達物質として関与しているといわれて

図 4

図 4 前庭神経核における CGRP 陽性線維 (×125). A. 下核の背外側より腹内側に多く認められる. 上方が背側, 左方が外側を示す. B. 上核の背内側より腹外側へ走行する線維に認められる. 上方が背側, 左方が内側を示す. C. 外側核の背側から腹側へ走行する線維に認められる (▲). 上方が背側, 左方が外側を示す.

いる. SP は, 免疫反応陽性細胞が内側核尾側寄りや, 下核, 上核, X 核にみられ, 陽性線維は内側核背側部に多く, 前庭脊髓路あるいは網様体との相互の線維連絡に関与していると考えられている⁹⁾. また Enk も SP と同様に, 前庭脊髓路や網様体との相互の神経伝達に関与していると考えられており, その陽性細胞は, 内側核吻側寄りや, 下核, X 核にみられ, 陽性線維はいずれの垂核にもみられるが, 特に内側核背側部に多いとされている⁹⁾. NPY については, 免疫陽性反応を呈する細胞は内側核, 下核に存在し, 陽性線維は下核に最も多く上核には認められないとされている¹⁶⁾.

以上のように, CGRP 以外の神経伝達物質については, 前庭神経核における局在や機能が比較的良く検討されているが, CGRP については, いまだ十分な解明はなされていない. 従来の, オートラジオグラフィー

法による CGRP 結合部位を調べた研究からは, 前庭神経内側核に多いとされてきた²²⁾³⁰⁾のみである. また, 免疫組織化学法を用いた研究からは, 比較的詳しく検討されたものでも, CGRP 陽性細胞は外側核のみに, CGRP 陽性線維は下核, 外側核のみに存在するとされてきた¹⁹⁾. しかし, 本研究では, CGRP 陽性細胞は外側核のみならず, 下核, 内側核, X 核にも認められ, CGRP 陽性線維は上核や内側核, X 核にも認められた. さらに CGRP 陽性細胞や線維の形態や垂核内における局在も明らかとなった. 以上述べたような, 本研究の結果と以前の報告の相違は, 抗 CGRP 血清の相違や免疫組織化学反応における反応時間や浮遊法が否かといった方法の相違に起因すると考えられる.

次に, ここで検討したラット前庭神経核の CGRP について, その投射路について考察する. 前庭神経核に

図5 外側核の CGRP 陽性細胞. 免疫反応陽性物質は細胞質全体にび漫性に認められる. bar は $2\mu\text{m}$ を表す. N: 核. m: ミトコンドリア. r: 粗面小胞体.

図7 外側核の CGRP 陽性の樹状突起. 免疫反応陰性の終末がその表面にシナプスを形成しており(▲), 小型で球形の終末小胞のシナプス膜への集積が認められる(▲). bar は $2\mu\text{m}$ を表す. m: ミトコンドリア.

図6 外側核の CGRP 陽性細胞. 核膜の陥凹が認められる. bar は $2\mu\text{m}$ を表す. N: 核. m: ミトコンドリア. r: 粗面小胞体.

図8 外側核の CGRP 陽性の終末に近い線維. ミトコンドリア, 終末小胞(▲)と共に免疫反応陽性物質(↑)が認められる. bar は $2\mu\text{m}$ を表す. m: ミトコンドリア.

おいてみられた CGRP 陽性線維はいずれの亜核にも存在することより, 前庭神経核に入力を送る前庭迷路, 外眼筋支配の核群, 網様体, 小脳, 脊髄, 交連線維のいずれの線維投射への関連も考えられる. しかし, 前庭神経の求心線維では, CGRP の存在が報告されていないこと¹⁾, 中脳前庭路ではその投射領域である内側核に CGRP 陽性線維の少ないこと, 脊髄前庭路ではその投射する X 核に CGRP 陽性線維の少ないこと, 反対側前庭神経核からの交連線維では, その主たる起始核の一つである上核において CGRP 陽性細胞のみられないことより, これら投射路における CGRP の関与は少ないと考えられる. 小脳においては, 前庭神経に線維を送る室頂核には CGRP 陽性細胞は認められない⁴⁵⁾が, プルキンエ細胞にはその存在が報告されてい

ること¹⁹⁾⁴⁶⁾, 網様体においても CGRP 陽性細胞を認めること¹⁹⁾²¹⁾, 加えて小脳皮質前庭神経核路, 網様体前庭神経核路は前庭神経核のいずれの亜核にも投射していること³³⁾より, 前庭神経核の CGRP 陽性線維は, 小脳皮質, 網様体由来していると考えられる (図9).

また, 前庭神経核からの出力線維には, 前庭中脳路, 前庭小脳路, 前庭網様体路, 前庭脊髄路, 交連線維が挙げられる. 前庭中脳路については, その起始する上核には CGRP 陽性細胞が認められず, 内側核吻側にも少なかったことより, 前庭神経核の CGRP 陽性細胞が外眼筋支配の核群へ投射している可能性は少ない. また前庭脊髄路では, その終末部である Rexed の分類の脊髄第7, 8層に CGRP を認めない²¹⁾⁴⁶⁾ことから, 前

図9 前庭神経核への主な入力線維。前庭神経核の CGRP 陽性線維は、網様体、小脳由来である可能性が考えられる。

図10 前庭神経核からの主な出力線維。前庭神経核の CGRP 陽性細胞は網様体、小脳へ投射している可能性が考えられる。

庭神経核の CGRP が脊髄へ投射しているとも考えにくい。逆に、小脳の苔状線維に CGRP がみられること⁴⁵⁾、網様体に CGRP 陽性線維を認めること^{19,21)}より、前庭神経核の CGRP 陽性細胞は、小脳あるいは網様体へ投射していると考えられる(図10)。さらに、前庭神経核には、CGRP 陽性細胞、陽性線維が共に存在することより、それらのニューロンは神経核外部へ投射する以外に intrinsic neuron として機能する可能性も高い。

CGRP は末梢神経系においては、心血管系、消化器系、内分泌系、呼吸器系⁴⁷⁾、泌尿生殖器系⁴⁸⁾等への作用が知られている。しかし、その中枢神経系における作用は不明な点が多い。ただ、CGRP は神経系において、SP¹⁶⁾⁽²⁷⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾、ChAT²³⁾⁽²⁵⁾、GAD⁴¹⁾、Galanin²⁶⁾等との神経細胞内での共存が報告されている。前庭神経核では、内側核の小型の細胞に Ach, GABA, SP を含有する細胞がみられ、下核の小型から中型の細胞に GABA, SP を含有する細胞がみられ、X核では SP 含有細胞がみられる⁶¹⁾とされている。CGRP は、内側核

の小型細胞や、下核の小型から中型の細胞、X核の細胞にも認められたことから、CGRP が前庭神経核においても Ach, GABA, SP と共存する可能性があり、それら神経伝達物質の作用を修飾していることが考えられる。だが、共存の証明やどのような作用を行っているかについては、今後の研究を待たねばならない。

実験動物の脳幹部における CGRP 含有細胞の電顕を用いた微細構造の研究は孤束核⁵²⁾や、疑核、舌下神経核⁵³⁾、顔面神経核⁵⁴⁾においては報告されているが、前庭神経核においてはいまだなされてない。その理由の一つに、前庭神経核における CGRP 陽性細胞や線維が比較的少数で散在しており、免疫組織化学反応も弱いことから、電顕的に観察することが困難であることが挙げられる。本研究においても、CGRP 陽性細胞や線維の微細構造を検討するにあたり、電顕下に免疫反応陽性物質をとらえることは難しかった。しかし、本研究の結果からは前庭神経核における CGRP について、少なくとも次のようなことがいえよう。すなわち、ラット前庭神経核における CGRP 陽性細胞の微細構造は、免疫反応物質が細胞質全体にびまん性にみられると共にミトコンドリア、粗面小胞体などの細胞小器官がかなり良く発達していること、精円形の核を持ちその一部に陥凹がみられたことより、孤束核における CGRP 陽性細胞⁵²⁾と形態が類似している。しかし、免疫反応物質が細胞質全体には認められず、ゴルジ装置への反応物質の集積のみられる疑核や舌下神経核の運動神経細胞⁵⁵⁾とは異なっており、機能の差が免疫陽性反応の局在性にも反映されている可能性も高い。また、下核において、CGRP 陽性の樹状突起にシナプス形成を行う免疫反応陰性の終末は、小型で球形の終末小胞を含んでいることより、それらの終末が一次前庭神経の終末⁵⁶⁾であることが考えられ、前庭神経核の CGRP 陽性細胞の一部は、一次前庭神経の入力をうけている可能性が示唆された。

5. ま と め

ラット前庭神経核における CGRP の分布について、免疫組織化学的手法を用いて光顕的ならびに電顕的に検討した結果、以下のとおり結論した。

1) CGRP 陽性細胞は、外側核に多く、下核、内側核、X核にも認められた。そして、Ach, GABA, SP との共存の可能性が示唆された。

2) CGRP 陽性線維はいずれの重核にもみられたが、下核に多く、外側核、内側核、X核には少なかつ

た。

3) 前庭神経核の CGRP は、小脳、網様体との線維連絡あるいは intrinsic neuron に関与する可能性が高いと考えられた。

参考文献

- 1) Raymond J, Demémes D and Nicoullon A: Neurotransmitters in vestibular pathways. *Prog Brain Res* 76: 29-43, 1988.
- 2) Rotter A, Birdsall NJM, Field PM et al: Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. II. Distribution of binding of [³H] propylbenzylcholine mustard in the midbrain and hindbrain. *Brain Res Rev* 1: 167-183, 1979.
- 3) Wamsley JK, Lewis MS, Young WS et al: Autoradiographic localization of muscarinic cholinergic receptors in rat brainstem. *J Neurosci* 1: 176-191, 1981.
- 4) Burke RE and Fahn S: Choline acetyltransferase activity of the principal vestibular nuclei of rat, studied by micropunch technique. *Brain Res* 328: 196-199, 1985.
- 5) Burke RE and Fahn S: The effect of selective lesions on vestibular nuclear complex choline acetyltransferase activity in the rat. *Brain Res* 360: 172-182, 1985.
- 6) Jones BE and Beaudet A: Distribution of acetylcholine and catecholamine neurons in the cat brainstem: a choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 261: 15-32, 1987.
- 7) Fonnum F, Storm-Mathisen J and Walberg F: Glutamate decarboxylase in inhibitory neurons. A study of the enzyme in purkinje cell axons and boutons in the cat. *Brain Res* 20: 259-275, 1970.
- 8) Okada Y and Shimada C: Gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration in a single neuron—localization of GABA in Deiters' neuron. *Brain Res* 107: 658-662, 1976.
- 9) Nomura I, Senba E, Kubo T et al: Neuropeptides and γ -aminobutyric acid in the vestibular nuclei of the rat: an immunohistochemical analysis. I. Distribution. *Brain Res* 311: 109-118, 1984.
- 10) Precht W, Baker R and Okada Y: Evidence for GABA as the synaptic transmitter of the inhibitory vestibulo-ocular pathway. *Exp Brain Res* 18: 415-428, 1973.
- 11) Precht W, Schwindt PC and Baker R: Removal of vestibular commissural inhibition by antagonists of GABA and glycine. *Brain Res* 62: 222-226, 1973.
- 12) Pérez de la Mora M, Possani LD, Tapia R et al: Demonstration of central γ -aminobutyrate-containing nerve terminals by means of antibodies against glutamate decarboxylase. *Neurosci* 6: 875-895, 1981.
- 13) Houser CR, Barber RP and Vaughn JE: Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in the dorsal lateral vestibular nucleus: evidence for an intrinsic and extrinsic gabaergic innervation. *Neurosci Lett* 47: 213-220, 1984.
- 14) Demémes D and Raymond J: Radioautographic identification of [³H] glutamic acid labeled nerve endings in the cat oculomotor nucleus. *Brain Res* 231: 433-437, 1982.
- 15) Kumoi K, Saito N and Tanaka C: Immunohistochemical localization of γ -aminobutyric acid- and aspartate-containing neurons in the guinea pig vestibular nuclei. *Brain Res* 416: 22-33, 1987.
- 16) Yamazoe M, Shiosaka S, Emson PC et al: Distribution of neuropeptide Y in the lower brainstem: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 335: 109-120, 1985.
- 17) Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG et al: Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue specific RNA processing. *Nature* 304: 129-135, 1983.
- 18) Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR et al: Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J Neurosci* 4: 3101-3111, 1984.
- 19) Kawai Y, Takami K, Shiosaka S et al: Topographic localization of calcitonin gene-related peptide in the rat brain: an immunohistochemical analysis. *Neurosci* 15: 747-763, 1985.
- 20) Shimada S, Shiosaka S, Emson PC et al: Calcitonin gene-related peptidergic projection from the parabrachial area to the forebrain and diencephalon in the rat: an immunohistochemical analysis. *Neurosci* 16: 607-616, 1985.
- 21) Skofitsch G and Jacobowitz DM: Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system. *Peptides*

- 6 : 721-745, 1985.
- 22) Henke H, Tschopp FA and Fischer JA : Distinct binding sites for calcitonin gene-related peptide and salmon calcitonin in rat central nervous system. *Brain Res* 360 : 165-171, 1985.
- 23) Takami K, Kawai Y, Shiosaka S et al : Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide-and choline acetyltransferase-like immunoreactivity in neurons of the rat hypoglossal, facial and ambiguous nuclei. *Brain Res* 328 : 386-389, 1985.
- 24) Batten TFC, Appenteng K and Saha S : Visualisation of CGRP and ChAT-like immunoreactivity in identified trigeminal neurones by combined peroxidase and alkaline phosphatase enzymatic reactions. *Brain Res* 447 : 314-324, 1988.
- 25) Batten TFC, Lo VKF, Maqbool A et al : Distribution of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the medulla oblongata of the cat, in relation to choline acetyltransferase-immunoreactive motoneurons and substance P-immunoreactive fibres. *J Chen Neuroanat* 2 : 163-176, 1989.
- 26) Moore RY : Cranial motor neurons contain either galanin-or calcitonin gene-related peptide like immunoreactivity. *J Comp Neurol* 282 : 512-522, 1989.
- 27) Skofitsch G and Jacobowitz DM : Calcitonin gene-related peptide coexists with substance P in capsaicin sensitive neurons and sensory ganglia of the rat. *Peptides* 6 : 747-754, 1985.
- 28) Tanaka M, Takeda N, Senba E et al : Localization of calcitonin gene-related peptide in the vestibular end organs in the rat: an immunohistochemical study. *Brain Res* 447 : 175-177, 1988.
- 29) Tanaka M, Takeda N, Senba E et al : Localization, origin and fine structure of calcitonin gene-related peptide-containing fibers in the vestibular end-organs of the rat. *Brain Res* 504 : 31-35, 1989.
- 30) Sexton PM, McKenzie JS, Mason RT et al : Localization of binding sites for calcitonin gene-related peptide in rat brain by in vitro autoradiography. *Neurosci* 19 : 1235-1245, 1986.
- 31) Sternberger LA, Hardy Jr. PH, Cuculis JJ et al : The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18 : 315-333, 1970.
- 32) Hsu SM, Raine L and Fanger H : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem cytochem* 29 : 577-580, 1981.
- 33) Brodal A : Anatomy of the vestibular nuclei and their connections in Kornhuber HH (ed). *Vestibular system, Handbook of sensory physiology Vol. VI*. Springer-Verlag, Berlin, 1974, pp239-352.
- 34) Akaike T : Neuronal organization of the vestibulospinal system in the cat. *Brain Res* 259 : 217-227, 1983.
- 35) Peterson BW and Coulter JD : A new long spinal projection from the vestibular nuclei in the cat. *Brain Res* 122 : 351-356, 1977.
- 36) Peterson BW, Mannz RA and Fukushima K : Properties of a new vestibulospinal projection, the caudal vestibulospinal tract. *Exp Brain Res* 32 : 287-292, 1978.
- 37) Carleton SC and Carpenter MB : Afferent and efferent connections of the medial, inferior and lateral vestibular nuclei in the cat and monkey. *Brain Res* 278 : 29-51, 1983.
- 38) Rubertone JA, Mehler WR and Cox GE : The intrinsic organization of the vestibular complex: evidence for inter nuclear connectivity. *Brain Res* 263 : 137-141, 1983.
- 39) Corvaja N and Pompeiano O : Identification of cerebellar corticovestibular neurons retrogradely labeled with horseradish peroxidase. *Neurosci* 4 : 507-515, 1979.
- 40) Gacke RR : Location of commissural neurons in the vestibular nuclei of the cat. *Exp Neurol* 59 : 479-491, 1978.
- 41) Matsuoka I and Domino EF : Cholinergic mechanisms in the cat vestibular system. *Neuropharmacol* 14 : 201-210, 1975.
- 42) Jones BE, Paré M and Beaudet A : Retrograde labeling of neurons in the brain stem following injections of [³H] choline into the rat spinal cord. *Neurosci* 18 : 901-916, 1986.
- 43) Blessing WW, Hedger SC and Oertel WH : Vestibulospinal pathway in rabbit includes GABA-synthesizing neurons. *Neurosci Lett* 80 : 158-

- 162, 1987.
- 44) Werman R, Davidoff RA and Aprison MH: Inhibitory action of glycine on spinal neurons in the cat. *J Neurophysiol* 31: 81-95, 1968.
- 45) Sugimoto T, Itoh K and Mizuno N: Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in neuronal elements of the cat cerebellum. *Brain Res* 439: 147-154, 1988.
- 46) Daniel LM, Richard EC and Susan MC: A light and electron microscopic study of calcitonin gene-related peptide in the spinal cord of the rat. *Exp Neurol* 99: 699-708, 1988.
- 47) Goodman EC and Iversen LL: Calcitonin gene-related peptide: novel neuropeptide. *Life Sci* 38: 2169-2178, 1986.
- 48) Samuelson UE, Dalsgaard CJ, Lundberg JM et al: Calcitonin gene-related peptide inhibits spontaneous contractions in human uterus and fallopian tube. *Neurosci Lett* 62: 225-230, 1985.
- 49) Lee Y, Kawai Y, Shiosaka S et al: Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain Res* 330: 194-196, 1985.
- 50) Gulbenkian S, Merighi A, Wharton J et al: Ultrastructural evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P in secretory vesicles of peripheral nerves in the guinea pig. *J Neurocytol* 15: 535-542, 1986.
- 51) Kawai Y, Emson PC, Hillyard CJ et al: Immunohistochemical evidence for the coexistence of calcitonin gene-related peptide and glutamate decarboxylase-like immunoreactivities in the Purkinje cells of the rat cerebellum. *Brain Res* 409: 371-373, 1987.
- 52) Morishima Y, Takagi H, Akai F et al: Light and electron microscopic studies of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive neurons and axon terminals of the nucleus of the tractus solitarius of the rat. *Brain Res* 344: 191-195, 1985.
- 53) Streft WJ, Dumoulin FL, Raivich G et al: Calcitonin gene-related peptide increases in rat facial motoneurons after peripheral nerve transection. *Neurosci Lett* 101: 143-148, 1989.
- 54) Schwarz DWF, Schwarz IE and Fredrickson JM: Fine structure of the medial and descending vestibular nuclei in normal rats and after unilateral transection of the vestibular nerve. *Acta Otolaryngol* 84: 80-90, 1977.
-
- 稿を終えるにあたり、御校閲を賜わり貴重な御助言を頂きました京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室村上泰教授に心から感謝いたします。本研究は京都府立医科大学第二解剖学教室井端泰彦教授の御指導によりなされたものであることを付記し、深甚の謝意を捧げます。また、直接の御指導を頂きました京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室久青勇講師、小野寿之講師に感謝いたします。
- 本論文の要旨は、第48回日本平衡神経科学会総会(奈良、1989年)、第91回日本耳鼻咽喉科学会総会(東京、1990年)において口演した。
-
- (1990年7月21日受稿 1990年9月6日受理 急載)
別刷請求先 〒602 京都市上京区釜座通丸太町上ル
春帯町355-5
京都第二赤十字病院耳鼻咽喉科 紀平晋也