

視床下部性機能分化の蛍光組織化学的研究

A Fluorescence-Histochemical Study of Monoaminergic Neurons in the Hypothalamus in Relation to Sexual Differentiation

名古屋大学医学部産科婦人科学教室(主任 石塚直隆教授)

丸 山 孝 夫 Takao MARUYAMA

概要 Pfeiffer (1936) の報告以来, ラットにおいては性機能中枢の分化の臨界期は, 胎生期乃至新生仔期に存在する事は多くの報告がある. しかしヒトにおいてはこの性機能中枢の分化の臨界期がどの時期に存在するか未だ全く不明である.

視床下部隆起漏斗系に属するモノアミン作動ニューロンが, releasing hormone を介してゴナドトロピン放出に関与しており, そのニューロンの神経伝達物質がドーパミンである事は Fuxe (1964) 等の研究により証明されている.

著者は, 視床下部性機能中枢の分化と, 神経伝達物質が発現する時期はそのニューロンの機能が開始する時期に非常に関連の深いものと考えた. そこで神経伝達物質のモノアミンを特異的にその局在を細胞レベルで明確にとらえるとされる蛍光組織化学的方法 (Falck & Hillarp 1962) を用いて実験を行った. 先ず基礎実験として, 成熟ラットの視床下部性機能中枢と目される諸核のモノアミン蛍光を調べ, 次にラットの発育段階を追って視床下部のモノアミン蛍光を検索し, その性機能中枢分化の臨界期とされている, 生後5日目にモノアミン作動ニューロンの蛍光が初めて認められる事を確かめた.

次いで, ヒト胎児の視床下部モノアミン作動ニューロンの蛍光を22例の人工妊娠中絶児で検索し在胎5ヵ月以後の胎児の漏斗及び弓状核にこれを認めた.

ヒト胎児においてラットと同じ実験方法で, 漏斗, 弓状核にモノアミン蛍光を認めてもこれを直ちに同一ニューロンと見做すことは困難であるが, 漏斗の種属による差異或いは, サルにおける実験成績との類似性等を考慮するならば, ほぼ在胎5ヵ月以前にヒトの性中枢機能分化の臨界期が存在し, 視床下部隆起漏斗系の機能が開始される事を示唆するものと考えられる.

緒 言

外来性性ホルモンが, 哺乳動物の性管分化に影響を与える事は, 既に周知の事実であるが, 更にエストロゲン, アンドロゲン及び一部の合成ゲスターゲンが雌ラットの性機能中枢分化に影響を与えること, 及びその性中枢機能分化の臨界期が, 胎生期から新生仔初期に存在することは, Pfeiffer (1936) の報告以来多数の研究者によつて証明されて来ている. 併しヒトにおいては, 動物実験と同様な直接的証明方法は困難であるため, 視床下部性機能分化の時期は未だ全く不明に等しい.

この問題を究明する手掛りのひとつとして著者

は, 視床下部のモノアミン作動ニューロンに着目した.

その理由の第一は, これらのニューロン, 中でも隆起漏斗系に属するドーパミン作動ニューロンは, 恐らく各種の releasing hormone を介して下垂体のゴナドトロピン放出に, 最も主要な役割を演ずるものと推定されていることである. (Fuxe 1964, Schneider & Mc Cann 1969, Kamberi et al. 1970, Ahren & Fuxe 1971).

そして第二の理由として, Hyyppä (1969) は我々と同じ Falck & Hillarp の蛍光組織化学的方法を用いて, ラット視床下部の隆起漏斗系のニュー

ーロンに胎生第20日に、初めてモノアミン蛍光が出現する事を報告し、これは視床下部性機能分化の時期と一致すると述べている。

即ち、分化の途上にある特定のニューロン中に神経伝達物質が初めて発見される時期は、あたかもそのニューロンの属する神経系の機能が発現する時期に略々一致すると言うことが出来る。従つてこの方法により、視床下部性機能分化の時期はある程度推定し得ると考えられる。

そこで著者は、Falck & Hillarp (1962) が開発した蛍光組織化学的方法により、先ずラットにおいて基礎実験を行つた後、ヒト胎児視床下部のモノアミン作働ニューロンを観察し、胎生期のいつ頃からモノアミン蛍光が証明され得るかを検討し、ヒトにおける性中枢機能分化の臨界期を推定しようと試みた。

実験材料並びに実験方法

I. 実験材料

1. ラットによる基礎実験

ウイスター系ラットを使用した。即ち成熟ラット及び各発育段階における新生仔或いは未熟ラットを各グループ3匹乃至6匹、合計50匹を使用した。

固型飼料と水を自由に与え、一定の室温及び自然採光の環境下で飼育した。

正確に4日性周期の雌を選び、交配後妊娠が確定したものは分娩箱に移して飼育し、新生仔は分娩日を0日として生後日数を計算した。

2. ヒト胎児の実験

母体の疾患のため厳密な適応のもとに、人工妊娠中絶を施行し、娩出胎児の死亡確認後、家族の同意の得られた在胎第28週以前の22例について検討した。

胎児の在胎時期は、最終月経より計算した週数と体長 (crown-heel length) の測定値が必ずしも一致しなかつたので、すべて後者より推定した月数をもつて在胎月数とした。

II. 実験方法

実験方法は、Dahlström & Fuxe (1964) の方法に従つた。

即ち、ラットにおいては：

1. 凍結乾燥

断頭屠殺後、可及的速やかに開頭して脳組織片を採取し、これを直ちにアセトン、ドライアイス (-80°C 以下) 又は、液体窒素 (-190°C) で冷却したイソペンタン中に浸して瞬時に凍結せしめ、その後凍結乾燥器 (山本製作所製) にて5日乃至7日間、 -35°C で凍結乾燥の後、 -20°C で24時間、室温で12時間と順次復温乾燥する。

2. ホルマリンガスによる処理

凍結乾燥終了後ホルマリンガスにて、 80°C 1時間処理。

3. 包埋及び薄切封入

組織片を 60°C の軟パラフィンに真空包埋し、更に硬パラフィンで包埋した。この包埋組織片を前額面方向に 50μ 間隔で、 10μ の厚さの連続切片を作製し、無蛍光スライドガラスに載せ 65°C 乃至 70°C で加温伸展して、エンテラン (メルク社製) で封入する。

4. 検鏡

蛍光顕微鏡 (オリンパス社製) を使用した。光源は高圧水銀灯を用い、励起波長は $410\sim 480\text{m}\mu$ で、暗視野コンデンサーを使用し、二次フィルターは $490\text{m}\mu$ 以下を吸収するY-50を通して蛍光を観察した。

ヒト胎児においては：

ヒト胎児は、家族の承諾を得た後に、開頭して視床下部組織を採取後、アセトン、ドライアイスで冷却したイソペンタンの中に入れて凍結、以後はラットと同一条件下で凍結乾燥、ホルマリンガス処理、パラフィン包埋を行い、前額面方向で約 100μ 間隔で 10μ の厚さの連続切片を作製した。

尚、同時に各々の連続切片の一部をトルイジンブルー染色して、蛍光の組織内局在個所を確認した。

実験結果

I. ラット視床下部組織

ラットの性機能に関係の深い視床下部諸核のモノアミン蛍光を、生後日数を追つて検討した結果を表1に示す。

表1 Appearance of catecholamine fluorescence in the hypothalamus of the neonatal and adult rats

	Days after birth								
	Adult	32	20	14	12	10	6	5	4
Median Eminence	+	+	+	+	+	±~+	±~+	±~+	—
Nuc. Arcuatus	+	+	+	±~—	±~—	±~—	—	±~—	—
Nuc. Ventromed.	+	±~+	—	—	—	—	—	—	—
Nuc. Perivent.	+	+	+	±~—	±~—	—	—	—	—
Nuc. Paravent.	+	+	+	+	±	—	—	—	—
Nuc. Suprachias.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nuc. Preopticus	+	±	—	—	—	—	—	—	—

1. 成熟ラット：

正中隆起：外層に柵状になつた神経線維のモノアミン蛍光を認め、視床下部諸核中、最も強い蛍光である。（写真1）

弓状核：正中隆起より少々弱い蛍光で、第3脳室底左右に認め、神経線維及び細胞体（特に核周囲）にモノアミン蛍光を認める。

脳室周核：第3脳室に沿つて両側に、神経線維のモノアミン蛍光を認めるが細胞体は明瞭ではない。

脳室旁核：脳室周核に引続いた上方に拡る神経線維の蛍光を認める。

腹内側核：脳室周核の両外側に、神経線維の非常に弱い蛍光を認める。

視索前核：視索前野に中等度の神経線維の蛍光を認める。

視交叉上核：著者の実験では、蛍光は認められなかった。

又、視床下部諸核のモノアミン蛍光では、雌雄の差異は認められなかった。

性周期と視床下部、特に正中隆起の蛍光の強弱の関連性は、著者の実験では明確ではなかった。

2. 発育段階におけるラット：

生後5日目の新生仔に初めて、正中隆起及び弓状核に弱いモノアミン蛍光が出現した。（写真2）

生後12日目には、脳室周核、脳室旁核に蛍光が出現する。

生後20日目には、これらの蛍光が増強するのが

認められた。

生後30日、即ち思春期直前には腹内側核、視索前核にも蛍光が出現し、他の核においては成熟ラットとほとんど同じ程度の強いモノアミン蛍光になつた。

表2 Appearance of catecholamine fluorescence in the hypothalamus of human fetus

Gestation month	C.H.L.	Sex	Fluorescence	
			Infundibulum	Nuc. arcuatus
IV	11cm	M	—	—
	15	M	—	—
	16	F	—	—
V	17	M	—	—
	20	F	—	—
	20	M	—	—
	22	M	—	—
	24	F	+	+
VI	26.5	F	+	±
	26.5	F	—	—
	27	M	—	—
	27	M	—	—
	27.5	F	+	±
	27.5	F	—	—
	29	M	—	—
	29	M	+	+
VII	32	M	—	—
	32	M	—	—
	33	F	+	±
	33.5	F	—	—
	34	F	+	+
	35	F	—	+

C.H.L.: crown-heel-length

II. ヒト胎児視床下部組織：

22例のヒト胎児視床下部組織の、在胎月令別による隆起漏斗系に属するニューロンのモノアミン蛍光の検索結果を表2に示した。

表に示す如く隆起漏斗系に属するニューロンのモノアミン蛍光の出現は、必ずしも在胎月令との間に一定の傾向を示さないが、少なくとも胎生4ヶ月以前では全く蛍光を認めることが出来なかつた。

胎生5ヶ月に至つて、初めて弓状核及び漏斗に属するニューロンの一部に、神経線維の蛍光を僅かに認める例が出現する。（写真3）。

胎生6ヶ月においては、弓状核及び漏斗内神経線維に蛍光を認める例が増加する、併しこの様な線維は散在性で、網状構造を形成する所見はみられない。

写真4. は在胎28週の女児の第3脳室、弓状核、漏斗の全景でトリジンブルー染色による。各部位の番号は以下の蛍光顕微鏡写真の番号を示す。

胎生7ヶ月胎児では、弓状核において強い蛍光を示す多数の神経線維が認められ、これらが網状構造を形成する例も出現する（写真5）。これらの神経線維は、所々で瘤状の隆起（varicosity）が明瞭である。併し細胞体の蛍光は、はつきりしない。

漏斗においても、同様に明瞭な蛍光を示す神経線維の網状構造が認められる。

写真6は、写真5と同一の在胎28週、体長34cmの女児の漏斗の蛍光顕微鏡写真であるが、弓状核と同様に多数の神経線維終末の蛍光を認める。

写真7は、同一標本の異つた個所を示す。やはり同様に多数の神経線維の蛍光が認められるが、これら神経線維と capillary loop に属すると思われる毛細血管との関係は、明瞭でない。

写真8は、上記症例の漏斗の辺縁部を示す。細胞に乏しい外層の特徴をそなえた部分であるが、放射状に走行する明瞭なモノアミン蛍光を示す神経線維が認められる。

考 案

Falck & Hillarp (1962) によつて確立された蛍光組織化学法は、モノアミンの局在を細胞レベルで明確にとらえ、モノアミン作働ニューロンの走行を蛍光顕微鏡下に直接とらえることが出来る。直径 0.3μ 位までのモノアミンニューロンが検出可能であるといわれている。

本法の特異性については、藤原 (1967) によれば、

1. モノアミンの蛍光は黄緑色で、非特異性蛍光とは、色と輝きに差があるので充分区別し得る。ドーパミン或いはノルアドレナリンとセロトニンの鑑別には、セロトニンが黄または黄褐色蛍光を示すことにより明瞭に区別することが出来る。

2. ホルマリンガス処理によつて蛍光を発するためには、カテコールアミンの 3-hydroxy 基がホルマリンによる側鎖の閉環に必須であり、又第一または二級アミンであることも前提となる。

3. 第一級アミンであるドーパミン及びノルアドレナリンの蛍光は、緑色調が強いのに反し、第二級アミンであるアドレナリンの蛍光はより強い黄色調を帯びる。又アドレナリンの蛍光発現には、ノルアドレナリン及びドーパミンの蛍光よりホルマリンガス処理時間が長いことを必要とする。

4. トリプトファンやトリプタミンのようなインドールチラミンの蛍光はきわめて弱い、又三級アミンやメラトニンなどは蛍光を生じない。

5. ドーパはドーパミンと同一の蛍光を発するが、ドーパミン生合成過程においてドーパミンは、速やかに脱炭酸されてドーパミンに転化するので実際上は、ほとんど問題はない。

以上の諸点より本法の特異性はきわめて高いと考えることが出来る。

視床下部弓状核に細胞体を位置し、神経線維が漏斗外層内の capillary loop に終末している所謂隆起漏斗系ニューロンが、下垂体性ゴナドトロピンの分泌乃至放出の中樞支配を司さどる、重要な役割を有することは略々確認された事実である。Fuxe (1964) は、蛍光組織化学的検索によりラットにおいて、この隆起漏斗系がドーパミンを神

経伝達物質とすることを報告し, Ahren & Fuxe (1971), Fuxe et al. (1972) 等は, このニューロン内のドーパミンの転換率が性周期, 去勢, 性ステロイドその他種々の内分泌環境の変化により, 有意に変動することから上述の事実を裏付けている。

著者は, これらの成績を根拠として, 器官分化の段階において該当するニューロン内にドーパミンが出現し始めた時期が, そのニューロンの機能が開始された時期に相当すると推論し得ると考えた。

ラットにおいて, 視床下部諸核のモノアミン蛍光の発育段階における発現時期については, 既に Hyypä (1969), Smith & Simpson (1970), Loizou (1971) 等の報告があり, それによるとモノアミン蛍光は, 胎生20日目頃から弓状核, 脳室周核, 脳室旁核の神経線維に出現し, 正中隆起外層には生後5日目に初めて検出される。

著者の実験においても, 生後5日目に正中隆起及び弓状核に初めてモノアミン蛍光が検出された。

次いでヒト胎児において検討した結果, 胎生5ヶ月末より漏斗内にモノアミン蛍光を呈する神経線維の発現を認めた。

即ち, 著者の行った実験手技によつては, 胎生5ヶ月末のヒト胎児の隆起漏斗系ニューロンの分化段階は, 生後5日目のラットのそれに相当すると推定することが可能である。

周知の如く, ラット視床下部分化の臨界期は, androgen sterility などの実験により, 生後10日以前にあることが証明されておりこれより換算するならば, ヒト胎児視床下部性機能分化の時期は胎生5ヶ月以前にさかのぼるものと推察される。

勿論, 前言したようにラットとヒトの漏斗の組織構造は, きわめて相違しており, 又その機能も必ずしも同一ではないかも知れない。即ち, ラットなどにおいては, 漏斗の構造は内, 外2層に明瞭に区別され, モノアミン蛍光を示す神経線維は, 主として外層に柵状に集合して認められるのが普通である。併しこの2層構造は, 動物の進化

段階が進むにしたがつて不明瞭になり (Hanström 1953), 特にヒトにおいては, capillary loop を伴った外層組織の内層内への偏位 (Nach-Innervierung, Diepen 1962) が著明で, 内外2層を区別することが不可能となる。

したがってヒト漏斗組織内に認められた神経線維が, 単にモノアミン蛍光を示すという理由のみで, ラット正中隆起組織の隆起漏斗系ニューロンに相当すると推定することは, 早急に過ぎるかも知れない。

この場合, 対照とすべき成人の視床下部ニューロンのモノアミン蛍光組織化学的証明は, 技術的に不可能であるので未だ報告をみないが, Odake (1967) による成熟サル の漏斗組織中のモノアミン作働ニューロンの蛍光組織化学所見と, 著者の所見とが極めてよく一致することより, 著者はこれをヒトにおける隆起漏斗系ニューロンと推定出来ると考える。尚, 佐野 (1972) は, ヒト胎児の黒質線状体路のモノアミン蛍光が, やはり胎生5ヶ月頃より確認できることも, 認めており, 著者の成績と考え合わせると甚だ興味深いと思われる。

このような, ヒト視床下部機能分化の臨界期を直接的な手段により検討した報告は, そのアプローチの極めて困難なことより甚だ少いが, 何れも胎生期に視床下部一下垂体系の形態学的完成を示唆している。

例えば, 'Espinasse (1933), Niemineva (1950) は, 形態学的観察によりヒト胎児下垂体門脈は, 胎生前半期に完成されるがその capillary loop は, 後半期少くとも出生予定日前には完成されるとした。

Rinne (1964) は, 体長18cmのヒト胎児において初めて capillary が正中隆起を穿通する像が認められ, 更に体長32cmの胎児において, 初めて視床下部下垂体茎の神経線維の中の神経分泌物質が, capillary loop 内に侵入するのが認められると報告している。但し, これはゴナドトロピン分泌に関係した, 下垂体前葉及びその神経支配機構

に直接関連した成績とはいえない。

尚, 小林 (1968) は, ヒト胎児臍帯血中アンドロゲン濃度には, 男女差がないに対し生後直ちに男児に著明な血中アンドロゲン濃度の上昇が認められることより, 視床下部の性機能分化は生後に行われると推定している。

併しこの成績は, 視床下部性機能分化の臨界期が胎生期に存在する可能性を必ずしも否定するものではない。

著者は, 神経伝達物質を蛍光組織化学的に証明することにより, 該当するニューロン, したがってそのニューロンの属する神経支配機構の機能発現の時期, 即ち視床下部性機能中枢分化の臨界期を推定しようと試みた。

このようなアプローチによる, ヒト胎児視床下部性機能分化の研究成績を従来の研究報告と比較検討した結果, その妥当性を強調したい。

稿を終るに臨み, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました 恩師石塚直隆教授に 深甚なる謝意を表しますと共に, 終始御指導および御助言を戴きました中西勉講師に厚く御礼申し上げます。又研究を進めるにあたり御助言, 御協力を戴いた成田収講師はじめ教室員各位に感謝致します。

尚, 実験に際し懇切なる御指導, 御助言を戴いた名古屋大学農学部家畜生理学教室 五島治郎教授に 深謝致します。

本論文の要旨は昭和47年第12回日本先天異常学会総会および昭和47年第17回日本不妊学会学術総会において発表した。

文 献

- 藤原元始 (1967): 最新医学, 22: 100.
 石塚直隆, 川島吉良, 中西 勉, 須川 信, 西川 義雄 (1962): 産婦世界, 14: 925.
 小林拓郎 (1968): 日産婦誌, 20: 920.
 成田 収 (1965): 日産婦誌, 17: 517.
 中西 勉 (1967): 第17回日本医学会総会講演集,

1: 952.

- 佐野 豊, 小竹源也 (1968): 脳機能と生殖, 2: 1, 協同医書出版社, 東京.
 佐野錦司 (1969): 日産婦誌, 21: 1219.
 佐野 豊 (1970): 最新医学, 25: 2031.
 佐野 豊 (1972): 著者への私信.
 Ahren, K., Fuxe, K., Hamberger, L., Hökfelt, T. (1971): Endocrin. 88: 1415.
 Barraclough, C.A. (1966): Rec. Prog. Horm. Reser. 22: 503.
 Diepen, R. (1962): Der Hypothalamus im Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. 7: Springer-Verlag, Berlin, Göttingen. Heidelberg.
 Dahlström, A., Fuxe, K. (1964): Act. Physiol. Scand. suppl. 232: 1.
 Éspinasse, P.G. (1933): J. Anat. 68: 11.
 Fuxe, K. (1964): Z. Zellforsch. 61: 710.
 Fuxe, K., Hökfelt, T., Nilsson, O. (1969): Neuroendocrin. 5: 107.
 Falck, B. (1962): Act. Physiol. Scand. Suppl. 197: 1.
 Fuxe, K., Hökfelt, T., Nilsson, O. (1969): Neuroendocrin. 5: 257.
 Fuxe, K., Hökfelt, T., Nilsson, O. (1972): Act. Endocr. 69: 625.
 Hanström, B. (1953): Z. Zellforsch. 39: 241.
 Hillarp, N.-A., Falck, B. (1962): J. Histochem. Cytochem. 10: 348.
 Hyyppä, M. (1969): Z. Zellforsch. 98: 550.
 Kamberi, I.A., Mc Cann, S.M. (1969): Endocrin. 85: 815.
 Kamberi, I.A., Schneider, H.P.G., Mc Cann, S.M. (1970): Endocrin. 86: 278.
 Kamberi, I.A., Mical, R.S., Porter, J.C. (1970): Endocrin. 87: 1.
 König, J.F.R., Klippel, R.A. (1963): The RAT BRAIN, The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 Loizou, L.A. (1971): Z. Zellforsch. 114: 234.
 Loizou, L.A. (1972): Brain Research. 40: 395.
 Niemineva, K. (1950): Act. Paediat. 39: 366.
 Odake, G. (1967): Z. Zellforsch. 82: 46.
 Pfeiffer, C.A. (1936): Am. J. Anat. 58: 195.
 Rinne, U.K. (1964): Act. Neuroveget. 25: 310.
 Smith, G.C., Simpson, R.W. (1970): Z. Zellforsch. 104: 541.

(No. 2604 昭48・1・8 受付)

丸 山 論 文 附 図

写真1 成熟ラット正中隆起外層のモノアミン蛍光
(10×10)



写真2 生後5日目のラット正中隆起, 弱いモノア
ミン蛍光を認める. (20×10)

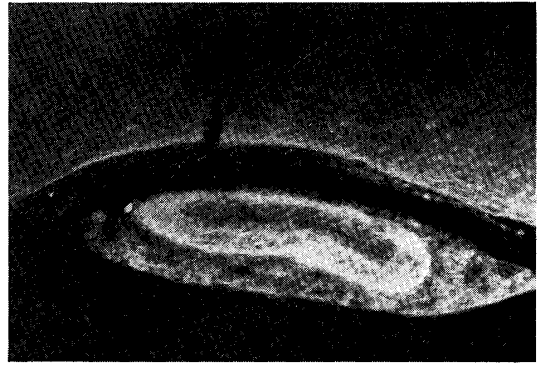


写真3 ヒト胎児胎生5カ月の漏斗, 僅かに神経線
維の蛍光を認める. (10×10)

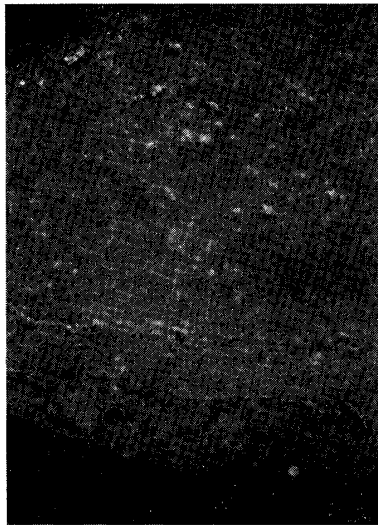


写真4 在胎28週身長34cmの女児の第3脳室, 弓状
核, 漏斗の全景をトルイジンブルー染色し
た. (4×10)

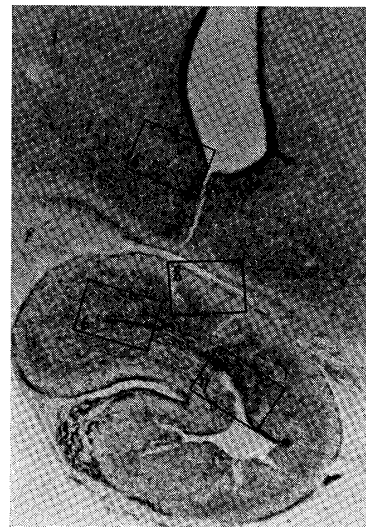


写真5 写真4の症例の5の部位. 在胎28週のヒト
胎児弓状核のモノアミン蛍光で, 神経線維
細胞体に認める. (10×10)

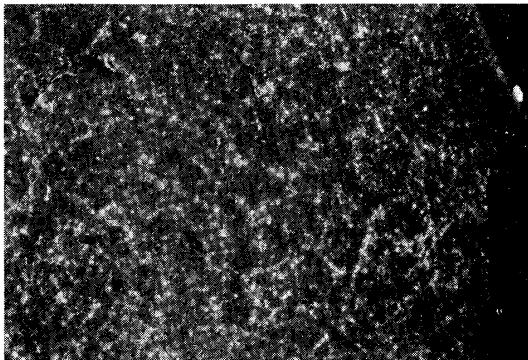


写真6 写真4の症例の6の部位で漏斗の神経線維
終末の蛍光を示す. (10×10)

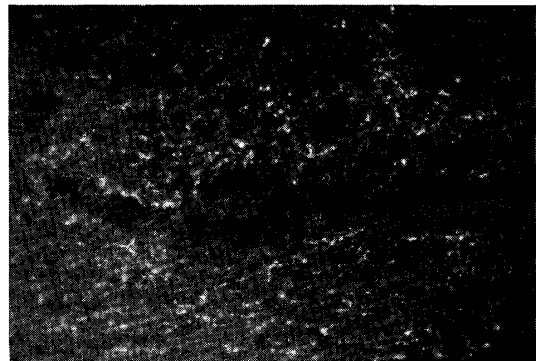


写真7 写真4の症例の7の部位で漏斗の異った個
所の神経線維終末の蛍光を示す. (10×10)

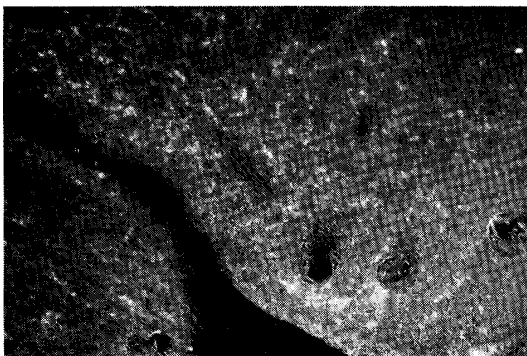


写真8 写真4の症例の8の部位で漏斗の辺縁部で
写真中央に放射状に走行するモノアミン神
経の蛍光が見られる. (10×10)

