

ニホンザル視床下部電気刺激による gonadotropin 放出への影響について

愛媛大学医学部産科婦人科学教室 (主任：中嶋 晃教授)

棚 田 省 三

Gonadotropin Release Following Hypothalamic Electrical Stimulation of the Macaca Fuscata

Shozo TANADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Ehime University School of Medicine, Ehime

(Director : Prof. Akira Nakajima)

概要 下垂体からの luteinizing hormone (LH) の分泌に関する視床下部の働きについては、主に rat において研究されているが、よりヒトに近いと思われる霊長類においては、あきらかではない。そこで、ニホンザル *macacas fuscatus* において視床下部諸核に電極を刺入、電気刺激を加え、血中 LH の変化を調べた。その結果、① 弓状核、腹内側核においては、 $250\mu A$, $500\mu A$ の電気刺激と共に血中 LH 値は上昇した。② 室旁核、視索上核においては、 $250\mu A$, $500\mu A$ のいずれの刺激によっても血中 LH 量の変化は認められなかった。③ 視索前野において、血中 LH 量は内側核の $250\mu A$ の刺激によつては変化しなかったが、 $500\mu A$ の刺激によつては上昇した。また外側核の $250\mu A$, $500\mu A$ の刺激には、いずれも変化を認めなかった。④ 放出された LH の血中からの半減期は 35.4 分、33.4 分、48.4 分、43.1 分とヒト LH の血中よりの半減期に比べて、短かいものであつた。以上の実験結果から、下垂体よりの LH 分泌には、視床下部の弓状核、腹内側核が主に関与し、また視索前野内側核も関与しているが、弓状核、腹内側核とは異なることが明らかとなつた。

Synopsis The effect of electrical stimulation on hypothalamic nucleuses was studied by using a stereotaxic operation and *in vitro* bioassay of luteinizing hormone (LH) in the *macaca fuscata*. The results were as follows:

The serum LH level was increased when the arcuate nucleus or the ventromedial nucleus was stimulated at $250\mu A$ and $500\mu A$.

The serum LH level was not increased when the paraventricular nucleus or supraoptic nucleus was stimulated at $250\mu A$ and $500\mu A$.

When the medial preoptic nucleus was stimulated at $250\mu A$, the serum LH level was not increased. However, the stimulation of $500\mu A$ increased the serum LH level. The stimulation of the lateral preoptic nucleus did not increase the serum LH at $250\mu A$ and $500\mu A$.

The half lives of LH were 35.4 min., 33.4 min., 48.4 min., 43.1 min. These results were different from the half life of human LH.

The contribution of various hypothalamic nuclei to the release of LH was discussed.

Key words: Luteinizing hormone • Hypothalamus • Electrical stimulation • Macaca fuscata

緒 言

下垂体からの gonadotropin 分泌は視床下部から放出される luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) により調整され、血中 luteinizing hormone (LH) 量の維持が行われていると言われている。この LHRH が視床下部のどこで分泌されるかは重要な問題であり、強い関心がもたれて

いる。これまで LHRH の分泌部位に関する研究は、主に rat について種々の方法で検討されてきた。すなわち、切断による方法²⁾⁸⁾⁹⁾²¹⁾、電気刺激による方法⁴⁾⁶⁾²²⁾、sectioning と assay による方法¹⁵⁾²⁴⁾である。これらの報告によると、rat においては、下垂体前葉からの gonadotropin 分泌に影響するのは、主に視床下部弓状核 nucleus ar-

cuatus (NA) 及び腹内側核 nucleus ventromedialis hypothalami (VM) を中心とする向下垂体領域 hypophysiotropic area (HPA) 次いで内側視索前野 medial preoptic area (m-POA) などの領域が主として関与していると考えられている。一方, LHRH の局在を免疫組織化学的方法によつてみた報告¹⁾¹⁸⁾¹⁹⁾によると, gonadotropin 分泌の機序は, 動物により著しい相違があるといわれる。したがつてヒトにおいても rat の実験結果がそのままあてはまるとは考え難い。しかし, ヒトにおいては実験的制約がありその詳細は現在なお不明である。そこでよりヒトに近いと思われる霊長類での研究が必要とされるが, その報告は比較的少なく⁵⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁶⁾, しかも分泌に関しては, rat の HPA に相当する mediobasal hypothalamus (MBH) のみが関わり POA は無関係とするもの¹¹⁾と, MBH 以外に POA も関わっているとするもの¹⁴⁾があり, 相異なる結論を示している。

そこで今回の実験においては, メスニホンザルを用いて, MBH 及び POA の諸核に電極を刺入して, 電気刺激を加え, これによる影響を血清中 LH の bioactivity により測定した。これにより suahuman primate における下垂体よりの LH 放出に関しては, MBH のどの核が関与しているかを検討し, また POA の関与の有無については MBH と相異なる可能性があることを見いだし

た。

実験材料および方法

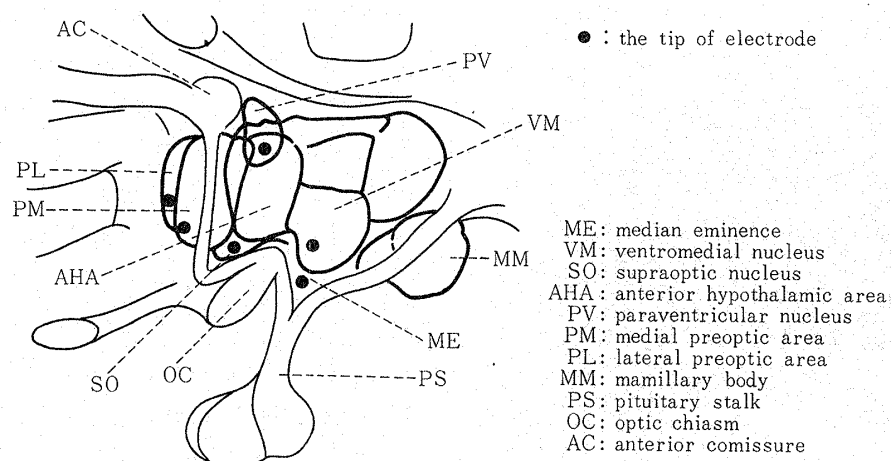
正常性周期をもつた 6 匹の成熟メスニホンザル *macacas fuscatus* (3,200g—6,500g) を用いた。これらのサルは温度 22℃, 湿度 40%—60%, 7:00 点灯, 19:00 消灯の一定条件のもとに個別の cage で約 3 カ月飼育した。飼料は, 水, 固型飼料を用い随時新鮮野菜, 果物を与えた。月経周期の 22~24 日に Urethane 1.2g/kg を腹腔内に注入して麻酔した。

まず電極を刺入すべき視床下部諸核の位置を決めるため, 前後, 側面からの X 線撮影を行つた。X 線写真上, 眼窩下縁—耳孔平面に対し, 解剖学的関係から, トルコ鞍後方突起の 0.2mm 上, 0.9 mm 前方を弓状核 nucleus arcuatus (NA) 後端とした。さらに *macaca fuscata* の brain map¹⁴⁾ により視床下部腹内側核 nucleus ventromedialis hypothalami (PV) 視床下部室旁核 nucleus paraventricularis hypothalami (PV) 視床下部視神経上核 nucleus supraopticus hypothalami (SO) 視索前野内側核 area preoptica medialis (PM) 視索前野外側核 area preoptica lateralis (PL) の三次元値を各サルにおいて, この map の体重—距離直線により補正しつつ求めた (図 1)。

電極の刺入は, 上記三次元値により stereotaxic に行つた。すなわち, 脳固定装置 (成重, 東大脳研型) を用いて, サル脳を固定し, 歯科用 drill に

図 1 Plane of frontal section

(D. T. Krieger et al. 1980¹²⁾)



て頭蓋骨を 1.5×1.0 cmの範囲にわたり除去した。同心円電極は、矢状静脈洞、第3脳室を避けるために、正中線に対し、右へ4度の角度をつけて、刺入した。電気刺激は1msec, 50Hzの矩形波を用い、30秒通電、30秒休止を10分間繰返した。電流の強さは、AN以外においては $250 \mu\text{A}$ 10分間、2時間休んでさらに $500 \mu\text{A}$ 10分間とした。ANにおいては $250 \mu\text{A}$ 10分間電気刺激して1時間休止し、さらに $250 \mu\text{A}$ 10分間刺激した後、70分間休止、その後 $500 \mu\text{A}$ の通電を行つた。

血液試料はArgyle medical kitを用いて経大腿静脈的に中心静脈にcanulationを行い、持続的に検体血漿を得た。刺激部の同定はpotassium ferricyanide, potassium ferrocyanideによるmarking法によつた。すなわち電気刺激、採血が終了した後、1mA 1分間の直流電流を通電し、canulationした頸動脈より、生理食塩水500mlを注入して血液灌流を行い、ついで0.5% potassium ferricyanide, potassium ferrocyanide solution 1,000ml (10% formic acid, potassium ferricyanide 5g, potassium ferrocyanide 5g, NaH_2PO_4 4.5g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 16.3g)を注入した。これによりblue spotが電極先端部に見られた(図2)。

検体血漿中のLHの測定はLeydig細胞におけるLH dependent testosterone productionを指標としたin vitro bioassay法²⁰⁾²³⁾により行つた。ratは6週齢から8週齢のC-57 blackを使用し

た。またstandardとしてはhuman pituitary LH 1st IRP for immunoassay Code No 68/40, National Institute of Biological Standards and Control, Londonを使用した。また検体試料はsteroid hormoneの影響をとりのぞくために、測定に先立ち、charcoal処理を行つた。Leydig cell suspension分注前にはrandomizationを行つた。生成されたtestosteroneの定量はradioimmunoassay (RIA)により行つた。抗血清にはrabbit anti testosterone-3-BAS-serumを使用し、標識hormoneとしてtestosterone 1, 2, 6, 7, - H^3 (the Radiochemical Center, Amersham England)を用いた。なおquality controlとしては、サル血清及びヒト去勢婦人血清を用いた。その値はそれぞれ $46.20 \pm 6.37 \text{ mIU/ml}$, $80.16 \pm 10.84 \text{ mIU/ml}$ であつた($n=13$)。assayの検定はmultiple 2+2 assay (symmetrical mode)⁷⁾で行い、感度は20 mIU/ml, 精度は $\lambda = -0.0521$ であつた。またLHの血中よりの半減期は、測定値を対数変換して直線回帰法によつて求めた。

結 果

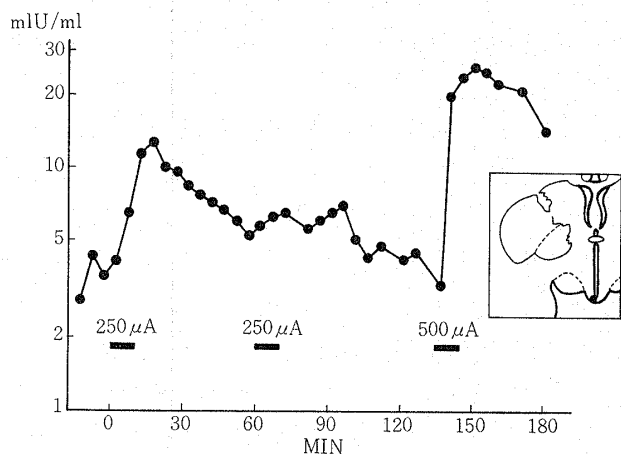
従来からLHRH分泌に関係ありとされる諸核について、果してサルでも同様な効果を及ぼすのかどうか検討した。これらのうち、視索前野内側核PM、及び視索前野外側核PLは、preoptic anterior hypothalamic area (POA-AHA)に属し、他はすべてmediobasal hypothalamus (MBH)に属する核である。以下各核毎に結果を示す。

弓状核AN：図3は弓状核に電気刺激を行つた例である。LH値の刺激前値は 3.54 mIU/ml であるが $250 \mu\text{A}$ の電気刺激開始直後から血中LH値は上昇し、20分後最高値 12.63 mIU/ml に達した。LHの上昇は一過性のものであり、このsemi-log plotにおいて直線的な血中LHの減衰が認められた。その血中からの半減期は、35.4分であつた。この後LH値は 5.19 mIU/ml まで減少したが、最初の刺激から60分後に行つた $250 \mu\text{A}$ の刺激によつてLH値は 6.86 mIU/ml と上昇したが、これは最初の $250 \mu\text{A}$ の刺激後の値に比べ低値を示している。その後、LH値は減少し、 3.25 mIU/ml とな

図2 The brain of the monkey. The electrode reaches supraoptic nucleus.



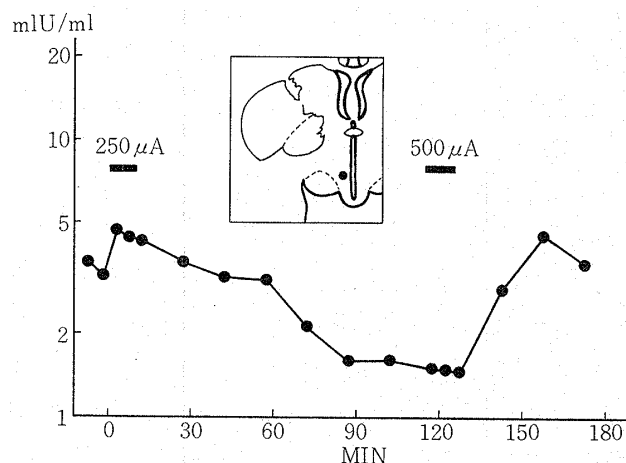
図3 Monkey plasma LH levels after electrical stimulation on "Arcuate nucleus".



つた。さらに2回目の刺激から70分後に500 μ Aの刺激を行うと、血中LH値は著明に上昇し、その頂値は15分後にみられ、26.48mIU/mlとなった。このLH値の上昇も一過性のものであり、以後急速に減少し semilog plot においても、直線的な血中LH値の減衰が認められた。その血中からの半減期は、33.4分であった。

腹内側核 VM：図4は、腹内側核を刺激したものである。前値は3.23mIU/mlであったが、250 μ Aの電気刺激直後より、血中LHは上昇が見られ、5分後に頂値5.01mIU/mlを示した。その後LH値はやはり指数函数的に減少した。その半減期は48.4分であった。LH値は1.44mIU/mlまで減少したが、ついで最初の刺激から2時間後に行つた500 μ Aの電気刺激により上昇し、45分後に頂値

図4 Monkey plasma LH levels after electrical stimulation on "Ventromedial nucleus".



6.45mIU/mlを示した。反応量は250 μ Aの刺激時に比べ5.01mIU/mlと6.45mIU/mlであまり差がなく、この核では250 μ Aでほとんど maximum であると考えられる。

室旁核 PV：図5は室旁核を刺激したものである。250 μ Aの電気刺激を行つた後に、LH値の上昇は認められなかつた。また2時間後に500 μ Aの刺激を行つた後にも、LH値の上昇は認められなかつた。

視索上核 SO：図6は視索上核を刺激したものである。250 μ Aの刺激を行つた後に、血中LH値の上昇は認められなかつた。また2時間後に500 μ Aの刺激を行つた後にもLH値の上昇は認められなかつた。

視索前野内側核 PM：図7は視索前野内側核を

図5 Monkey plasma LH levels after electrical stimulation on "Paraventricular nucleus".

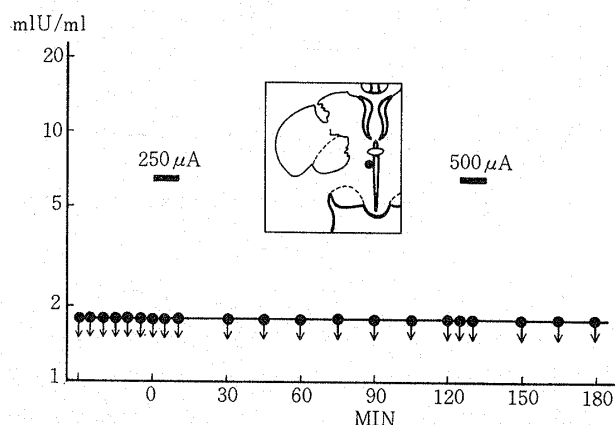


図6 Monkey plasma LH levels after electrical stimulation on "Supraoptic nucleus".

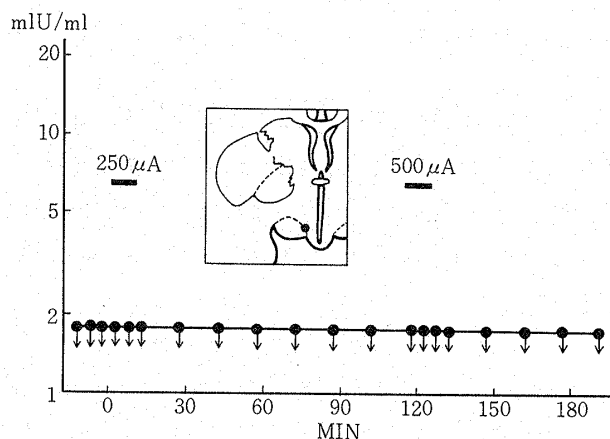


図7 Monkey plasma LH levels after electrical stimulation on "Medial preoptic nucleus".

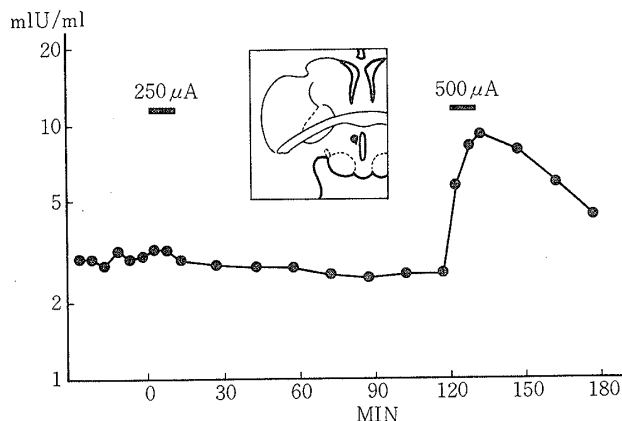
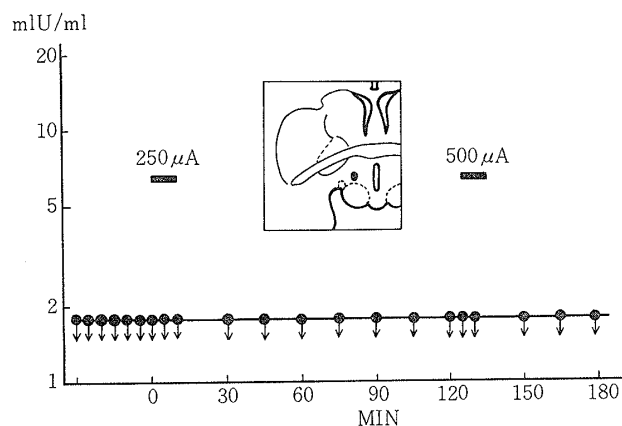


図8 Monkey plasma LH levels after electrical stimulation on "Lateral preoptic nucleus".



刺激したものである。刺激前値は、2.71mIU/mlであるが、250 μ Aの電気刺激を行っても血中LH値は著明な変動を示さなかつた。次いで2時間後に500 μ Aの電気刺激を行つてその直後よりLH値は上昇し、15分後に頂値を示し、その値は9.7mIU/mlであつた。その後LH値は他の諸核の刺激後の場合と同様に減少し、その半減期は43.1分であつた。

視索前野外側核 PL：図8は視索前野外側核を刺激したものであるが、250 μ Aの刺激の後血中LH値の上昇は認められなかつた。また2時間後に、500 μ Aの刺激を行つて後にも、血中LH値の上昇は認められなかつた。

考 案

今回の実験は、視床下部のどの核がLHRH放出に影響するかを調べたものである。ratにおい

ては、正中隆起部、内側視索前野の電気刺激を行うと、下垂体門脈血中のLHRH levelが上昇し³⁾、またLHRHの増減にほぼ一致して血中LHの増減がみられる¹⁷⁾。サルにおいても、正中隆起部の自発活動電位の強さと、血中LH濃度が正の相関のみられること⁵⁾、また外部より正中隆起を電気刺激すると血中LH値の上昇がみられること¹⁶⁾などから、ratと同様に電気刺激とLHRH、血中LH値は互いに相関していると考えられる。

サルのLH分泌調節における中枢神経系の果たす役割については、いくつかの報告がみられる⁵⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁴⁾¹⁶⁾。正中隆起、弓状核、腹内側核、松果体を含み、視索前野、視交叉上核を含まない領域、すなわちmediobasal hypothalamus (MBH)以外の脳構成部分と大脳半球を除去した赤毛ザルにおいてestradiolを負荷しても、血中LHのsurgeがみられる¹⁰⁾。また去勢した赤毛ザルを用いて、視床下部のelectrical activityを調べると、正中隆起を中心としてspontaneousなincreased firingがみられる。そのincreased firingの強弱と血中LH値の増減とは相関する⁵⁾。さらにMBHを直接電気刺激するとLH値は上昇するという¹⁶⁾。したがってサルにおいても、これらの部分がLHRH分泌を司っている可能性が考えられる。

今回、弓状核、腹内側核の刺激により、血中LH値は、直ちに上昇し、刺激後、一定時間の後に下降したが、室旁核、視索上核の刺激によつては、血中LH値の上昇をみなかつた。また、弓状核、腹内側核においては、一定時間後の反復刺激により、LH値は再度上昇し、250 μ A、500 μ Aの刺激に対しては、ある程度のdose responseを示しておりspontaneousなものではなく、電気刺激による反応であると考えられる。すなわち、弓状核、腹内側核がLH放出に関わっていると考えられる。

今回の実験と上記報告者の実験は、方法は異なるが、下垂体よりのLHの分泌に関しては弓状核—正中隆起、腹内側核が、中心的役割を果たす点については、共通の結果を得たことになる。この弓状核—正中隆起、腹内側核についてはすでにratにおいて同様のことが報告されているのは広く知られるところである。また室旁核、視索上核

については、むしろ、vasopressin 分泌, oxytocin 分泌に関連があるとされる核であることもよく知られている。

次いで POA については、Krey et al.¹¹⁾が赤毛ザルにおいて POA と MBH を切断しても LH 分泌、排卵は起こり、POA は LH 分泌に無関係であるとしている。しかし Norman et al.¹⁴⁾は、POA-AHA: preoptic anterior hypothalamic area を thermocoagulation による破壊、Hálasz knife による切断を行いこの際には LH の放出はなく estradiol 負荷による LH 放出は見られず、POA が LH 分泌に関わっているとしており、Krey et al.¹¹⁾の報告とは異なる結論を出している。

今回の実験においては、PM の $250\mu\text{A}$ の刺激においては、血中 LH 値の上昇は認められず、 $500\mu\text{A}$ の刺激により、血中 LH 値上昇が認められた。また PL については $250\mu\text{A}$ 、 $500\mu\text{A}$ のいずれの刺激によつても、血中 LH 値の上昇は認められなかつた PM については LH 上昇のためにより強い刺激を必要としたことになる。この点に関してこの PM においては LHRH 放出のための電気刺激の反応閾値が高く、より広い irritative focus を必要としたと考えられるが、また刺激の範囲が広まり、MBH の一部がこれに含まれたことも考えられる。しかし PM において $500\mu\text{A}$ の刺激に対し、LH 値は上昇したのに比べ、同じ POA 内の PL、さらに MBH 内の SO、VM の $500\mu\text{A}$ の刺激では LH 値の上昇がみられなかつた点から、 $500\mu\text{A}$ の刺激が MBH の一部を含んだとは考え難く、やはり PM においては、LHRH 放出のための電気刺激の閾値が高い、あるいは、より広い irritative focus を必要とすると考えらるべきである。すなわち、ニホンザルにおいては、下垂体からの LH 放出には、AN、VM を中心とする MBH が関与し POA も機序が異なるにしても、上に論述した様式のいずれかによつて関わりを持つと考える。

また Spies et al.¹⁶⁾は赤毛ザルを用いて MBH と preoptic-suprachiasmatic region (rostral hypothalamus: RH) の電気刺激を行い、その血中 LH 量を RIA で測定、比較している。これによると、MBH の電気刺激と RH の電気刺激のい

れによつても血中 LH の上昇はみられるが、RH の刺激時には、MBH の刺激時に比べ、血中 LH 値の上昇は有意に少ない。彼等の実験は POA の電気刺激が $1,000\mu\text{A}$ 、1msec、100Hz で行われており、今回の実験と直接比較することはできないが、彼等の実験においてもやはり MBH と POA-RH は gonadotropin 分泌に関わる態度は異なる可能性を示している。

rat においては Szentagotalli²¹⁾が下垂体よりの LH 分泌には HPA が第一段階の調節を行い、さらに POA が HPA に synaps する neuron をもち第二段階の調節を行うことを示し、現時点では、この考え方が、一般に受けいれられているが、サルにおける POA の果たす役割は、以上の如く明らかでない。しかし、今回の実験からも、primate においては、POA は LH 分泌にはなんらかの関わりをもっているが、AN、VM の MBH に比べるとその役割は減じていると考える。

御指導、御校閲を賜りました愛媛大学中嶋晃教授に心から感謝の意を表します。また直接御指導をいただいた、京都大学霊長類研究所大島清教授および愛媛大学杉並洋講師に深くお礼申しあげます。なお本研究の概要は第54回日本内分泌学会総会（岡山）において発表した。また本研究の一部は、文部省科研費 No. 448315 によつた。

文 献

1. Baker, B.L., Dermody, W.C. and Reel, J.R.: Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the mammalian hypothalamus. *Amer. J. Anat.*, 139: 129, 1974.
2. Blake, C.A., Weiner, R.I., Gorski, R.A. and Sawyer, C.H.: Secretion of pituitary luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in female rats made persistently estrous or diestrous by hypothalamic deafferentation. *Endocrinology*, 90: 855, 1972.
3. Chiappa, S.A., Fink, G. and Sherwood, N.M.: Immunoreactive luteinizing factor (LRF) in pituitary stalk plasma from female rats: Effects of stimulating diencephalon, hippocampus and amygdala. *J. Physiol.*, 267: 625, 1977.
4. Critchlow, V.: Ovulation induced by hypothalamic stimulation in the anesthetized rat. *Amer. J. Phys.*, 195: 171, 1958.
5. Dufy, B., Dufy-Barbe, L., Vincent, J.D. et Knobil, E.: Étude électrophysiologique des neurones hypothalamiques et régulation

- gonadotrope chez le singe rhésus. *J. Physiol.*, Paris, 75: 105, 1979.
6. *Everett, J.W., Krey, L.C. and Tyrey, L.*: The quantitative relationship between electrochemical preoptic stimulation and LH release in proestrous versus late-diestrous rats. *Endocrinology*, 93: 947, 1973.
 7. *Finney, D.J.*: Statical method in biological assay. 3rd ed. Charles Griffin Co., London, England.
 8. *Halász, B. and Pupp, J.*: Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotropic area. *Endocrinology*, 77: 553, 1965.
 9. *Halász, B. and Gorski, R.A.*: Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology*, 80: 608, 1967.
 10. *Hess, D.L., Wilkins, R.H., Moossy, J., Chang, J. L., Plant, T.M., McCormack, J.T., Nakai, Y. and Knobil, E.*: Estrogen-induced gonadotropin surges in decerebrated female rhesus monkeys with medial basal hypothalamic peninsulae. *Endocrinology*, 101: 1264, 1977.
 11. *Krey, L.C., Butler, W.R. and Knobil, E.*: Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function in the rhesus monkey. I. Gonadotropin secretion. *Endocrinology*, 96: 1073, 1975.
 12. *Krieger, D.T.*: Neuroendocrinology (eds. D. T. Krieger and J.C. Hughes), 7. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 1980.
 13. *Kusama, T. and Mabuchi, M.*: Stereotaxic atlas of the brain of *macaca fuscata*. University of Tokyo Press, Tokyo, University Park Press, Baltimore, Maryland and Manchester, England, 1970.
 14. *Norman, R.L., Resko, J.A. and Spies, H.G.*: The anterior hypothalamus: How it affects gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 99: 59, 1976.
 15. *Palkovits, M., Arimura, A., Brownstein, M., Schally, A.V. and Saavedra, J.M.*: Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content of the hypothalamic nuclei in rat. *Endocrinology*, 95: 554, 1974.
 16. *Spies, H.G., Norman, R.L., Quadri, S.K. and Clifton, D.K.*: Effects of estradiol-17 β on the induction of gonadotropin release by electrical stimulation of the hypothalamus in rhesus monkeys. *Endocrinology*, 100: 314, 1977.
 17. *Sarker, D.K., Chiappa, S.A., Fink, G. and Sherwood, N.M.*: Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*, 264: 461, 1976.
 18. *Sétáló, G., Vigh, S., Schally, A.V., Arimura, A. and Flerkó, B.*: Immunohistological study of the origin of LH-RH-containing nerve fibers of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 103: 597, 1976.
 19. *Silverman, A.J., Krey, L.C. and Zimmerman, E. A.*: A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammals. *Biology of Reproduction*, 20: 98, 1979.
 20. *Suginami, H., Yano, M. and Nakajima, A.*: A trial for the improvement of the *in vitro* bioassay for human luteinizing hormone. *Endocrinol. Japon*, 28: 95, 1981.
 21. *Szentágothai, J., Flerkó, B., Mess, B. and Halász, B.*: The hypophysiotrophic area of the hypothalamus. In *Hypothalamic control of the anterior pituitary*, 3rd ed., 118. Akademiai Kiado, Budapest, 1972.
 22. *Turgeon, J. and Barraclough, C.A.*: Temporal patterns of LH release following graded preoptic electrochemical stimulation in proestrous rats. *Endocrinology*, 92: 755, 1973.
 23. *Van Damme, M.-P., Robertson, D.M. and Diczfalusy, E.*: An improved *in vitro* bioassay method for measuring luteinizing hormone (LH) activity using mouse Leydig cell preparations. *Acta Endocrinol. (Kbh.)*, 77: 655, 1974.
 24. *Wheaton, J.E., Krulich, L. and McCann, S.M.*: Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the preoptic area and hypothalamus of the rat using radioimmunoassay. *Endocrinology*, 97: 30, 1975.

(No. 5223 昭58・1・10受付)