

視床下部一下垂体後葉器官培養系による

Oxytocin 分泌の研究

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

萩庭 一元 牧野 恒久 鈴木 英明
菅原 正人 元山 鎮雄 飯塚 理八

Study on Oxytocin Secretion from the Guinea Pig Hypothalamo-neurohypophyseal Complex (HNC) in Organ Culture

Ichigen HAGIWA, Tsunehisa MAKINO, Hideaki SUZUKI,

Masato SUGAHARA, Shizuo MOTOYAMA and Rihachi IIZUKA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

概要 Oxytocin (OT) の分泌機序については神経分泌という特殊な動態をとることから、なお不明な点が少ない。一方、OT の分泌臓器は、従来の視床下部一下垂体後葉系にとどまらず、卵巣さらに胎盤と新たな展開が示されている。本研究では、視床下部一下垂体後葉レベルの OT 分泌機序解明のため、モルモットを用いた hypothalamo-neurohypophyseal complex (HNC) を使用することにより、より単純化した *in vitro* モデルを確立することとなった。このモデルは組織学的に細胞構築が保たれていること、培養期間中視床下部および下垂体後葉の OT 含量がほぼ一定を示していること、100mM KCl 添加培地での放出刺激に反応すること、さらにその際組織学的に変化を示さないこと等の検証により、充分機能しているものと考えられた。また、イオン交換クロマトグラフィーの溶出曲線により、測定分画が OT そのものであることも確認された。

本研究では、この HNC を用いて、OT 分泌機序に関する物質について検討を加えた。Prostaglandin (PG) では、D₂、E₂ には変化が認められなかったが、F_{2α} では有意の OT 分泌増加が認められた。一方、brain gut peptide を用いた実験では、cholecystokinin, gastrin では変化を認めなかったが、vasoactive intestinal polypeptide (VIP) において有意の OT 分泌増加を示した。OT が VIP 放出を促す報告もあるところから、OT と VIP には positive feedback 的な機構の可能性も示唆される。

Synopsis To clarify the mechanism of OT secretion of hypothalamus and pituitary origin, *in vitro*, the guinea pig hypothalamo-neurohypophyseal complex (HNC) was utilized in this study. The HNC, including paraventricular and supraoptic nuclei, was removed and maintained in Eagle's Minimal Essential Medium (pH 7.4) for 7 days at 37°C in a 95% air 5% CO₂ environment.

The OT content in the hypothalamus and the pituitary remained constant during the period of culture of the HNC. Synthetic OT, hypothalamus or pituitary extracts were eluted separately by ion exchange chromatography and the elution patterns obtained were similar. The stimulation of the HNC with 100mM KCl in the culture caused an increase in OT release.

These results suggest that the cultured HNC can be a useful *in vitro* model for studies of the OT secretion mechanism. After adding several substances to the culture medium, the amount of OT release from the HNC into the culture medium over a 20 minute period, was measured by our own radioimmunoassay.

The addition of prostaglandin F_{2α} to the HNC resulted in an increase in OT release while stimulation of D₂ or E₂ failed to increase. Stimulation of the HNC with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) produced an increase in OT release, suggesting the existence of a positive feedback effect of VIP on OT release.

Key words: Hypothalamo-neurohypophyseal complex • Oxytocin • Prostaglandin • Brain gut peptide

緒 言

近年 Oxytocin (OT) の測定系が確立されて以来, OT 分泌に関与する数多くの研究が行われ, 合成, 貯蔵, 放出の場である視床下部一下垂体後葉系への関心も高まっている。

一方, OT は視床下部で合成され, 神経分泌として下垂体後葉へ運ばれた後, 血中に放出されるという特殊な系路をもつ。このため, その器官としての機能を一つの単位としてとらえることに困難な点が多かった。

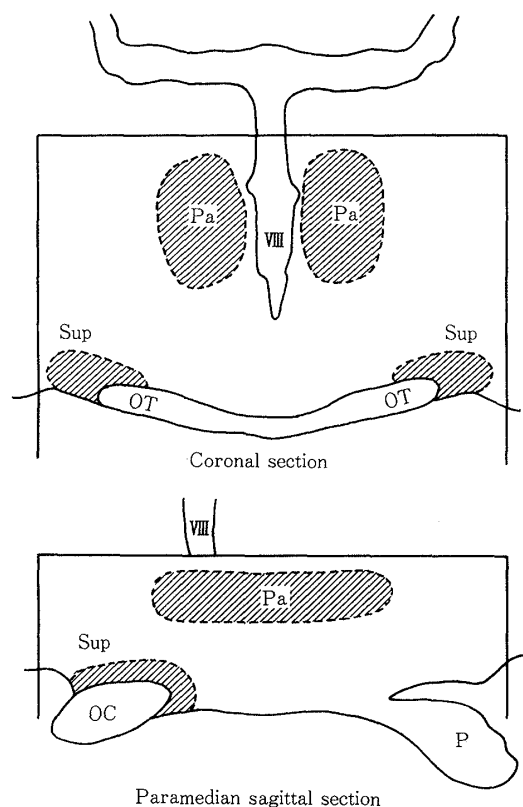
本研究はこれに対して, 視床下部と下垂体後葉を一つとしてとらえた, 視床下部一下垂体後葉複合体 (hypothalamo-neurohypophyseal complex, HNC) を作成した。これを器官として培養し, その合成, 貯蔵, 放出に関し検討を加えた。あわせて, OT 動態に影響を与える可能性のある伝達物質を HNC 培養系に加え, OT 放出の変化を観察し, 若干の所見を得たのでここに報告する。

研究方法

実験動物として, 平均体重250g の雄のモルモットを用いた。各実験系において性周期および体重差に著しい変動のないようにつとめた。HNC の作成は, モルモットを無麻酔下でギロチンにて断頭してから行つた。断頭後ポピドンヨード5%溶液に浸した後, 頭皮を剝離, 頭蓋骨を除去した。下垂体が下垂体茎によつて脳に接続されたまま一塊として脳を取り出し, さらに選択的に視床下部と下垂体を enbloc に取り出した。視床下部は図1の太線で示されるように, 前が視交叉より前方へ1mm, 後が下垂体茎より後方へ1mm, 側方が正中線より3mm, 厚さが4mm とし, 室傍核と視索上核を含む範囲とした。

作成した HNC はただちに, 器官培養皿 (Falcon #3037) 内で, 三角グリッド (Falcon #3014) 上に腹側を下にして置き, イーグル MEM 培養液 (MEM “ニッスイ”, カナマイシン60mg/l 含量, pH 7.4) 中に浸し, 37℃湿性95%空気・5%炭酸ガスの恒温器内で培養した。培養日の定義は, 断頭日を Day 0 とし, 以後 Day 1, Day 2 とした。

以上の手順で作成した HNC の器官培養系について次の実験を行つた。



Pa : Paraventricular nucleus, Sup : Supraoptic nucleus, OT : Optic tract, OC : Optic chiasm, P : Pituitary, VIII : Third ventricle.

図1 The range of cutting making the HNC.

1. 視床下部および下垂体の OT 含量

器官培養中の HNC の視床下部と下垂体を分離し, 各々を0.1N HCl 2ml とともにホモゲナイズした後, 遠心分離 (4℃, 1,900G, 20分間) し, 上清を分離, 抽出液の OT 濃度を RIA にて測定した。

2. イオン交換クロマトグラフィーによる溶出曲線の比較

1. と同様の手順で得た抽出液を, カルボキシメチルセルロース (CMC-23) を充填したカラム (10×200mm) に通し, 0.002M から0.4M の酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) を使用し, linear gradient で溶出した。溶液は1ml ごとに分画採取し, 各分画の OT 濃度を測定し溶出曲線を描いた。これを合成 OT と比較検討した。

3. HNC 培養液中への KCl 添加

器官培養中の HNC が神経内分泌細胞としての機能を保持しているかどうかを確認するため,

Day 1, Day 3およびDay 7のHNC培養液中に100mM KCl添加MEM培地(340m Osmol/kg)および同培地と等浸透圧のNaCl過剰培地を加え, 20分間に放出されたOT濃度をコントロールと比較した。

4. HNC培養液中へのProstaglandin (PG) 添加

3. と同様に培養液中にPGD₂, E₂およびF_{2α}の諸濃度を加え, 20分間に放出されるOT濃度をコントロールと比較した。PGを溶解するために使用したエタノールについてもOTに及ぼす影響の有無を比較した。

5. HNC培養液中へのbrain gut peptide 添加

3.4.と同様に培養液中にcholecystokinin (CCK), gastrin, およびvasoactive intestinal polypeptide (VIP)を加えOT濃度を検討した。なおOTの測定は中山の報告した方法に従い, ラジオイムノアッセイ法にて行つた⁴⁾。

研究成績

1. 視床下部および下垂体のOT含量

図2に器官培養中のHNCより得た, 視床下部および下垂体のOT含量の変化を経日的に示した。下垂体ではDay 0よりDay 1にかけてOT含量の若干の減少を認めたが, 全体として視床下部および下垂体とも培養期間中OT含量はほぼ一定であつた。下垂体は視床下部の約20倍のOTを含むことが示された。

2. イオン交換クロマトグラフィーによる溶出曲線の比較

図3に示したごとく, 合成OT, 視床下部および下垂体抽出液とも30mlから40mlの溶出部位に一致した一峰性のピークを得た。

3. HNC培養液中へのKCl添加

図4はKCl添加によるOT放出の変化を示した。Day 1, Day 3およびDay 7ともKCl添加培地ではコントロール培地に比べHNCからOT放出は有意に高かつた。一方, これと等浸透圧のNaCl過剰培地では, OT放出の促進効果は認められなかつた。

4. HNC培養液中へのPG添加

PGD₂およびE₂の添加では, 図5, 図6のように

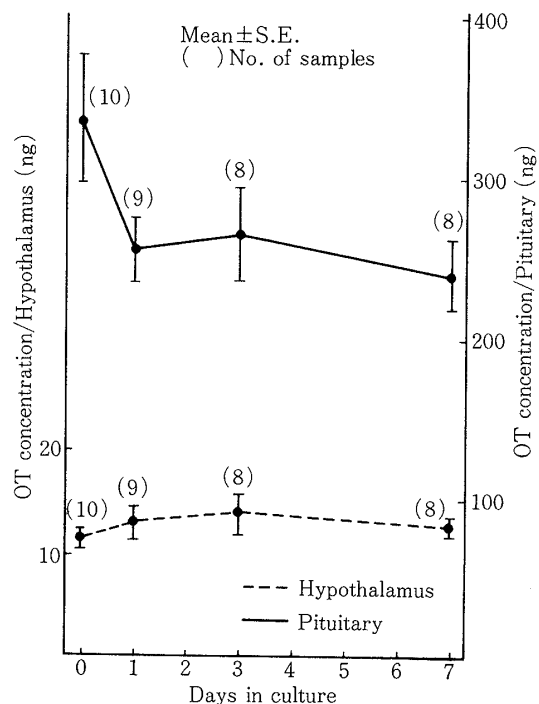


図2 Oxytocin content in hypothalamus and pituitary on various days in culture of HNC.

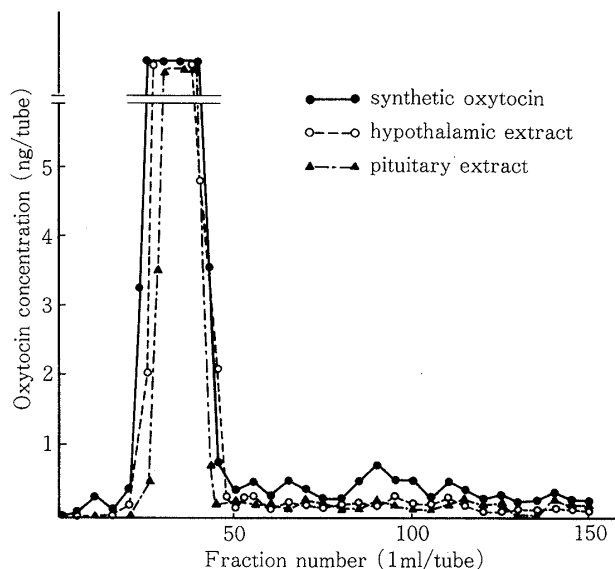


図3 Chromatography of synthetic oxytocin, hypothalamic and pituitary extracts on carboxymethyl cellulose.

諸濃度(10, 100, 500 μ g/ml)ともコントロールと有意差を認められなかつた。しかし, PGF_{2α}の500 μ g/ml添加培地では有意に高いOT放出を認めた(図7)。PGを溶解したエタノールによるOT放出の変動は認めなかつた。

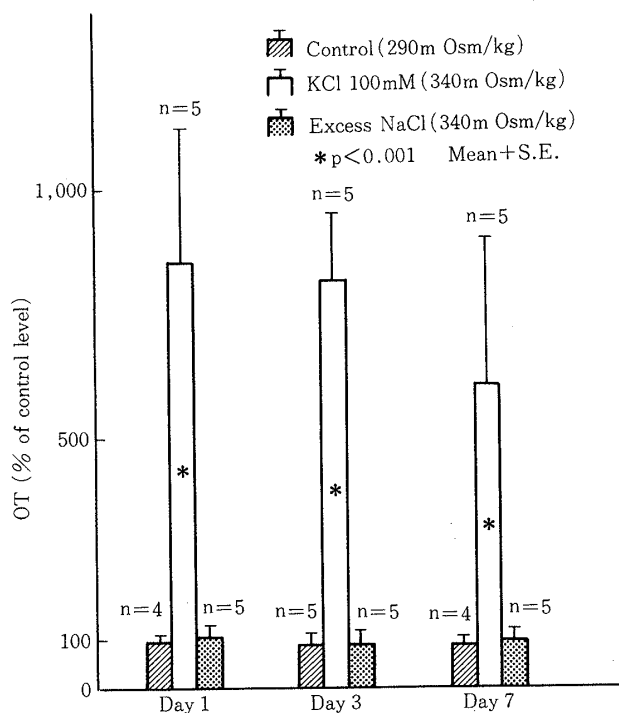


図4 The effect of 100mM of KCl on OT release from explants of HNC into the culture medium for 20 minutes.

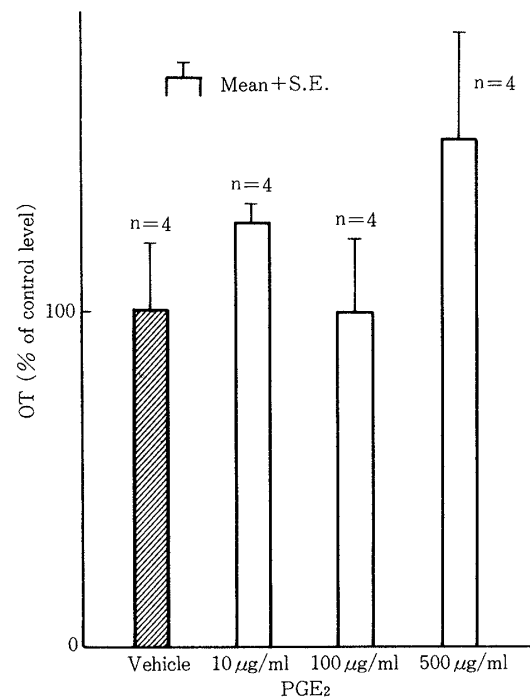


図6 The effect of PGE₂ on OT release from explants of HNC into the culture medium for 20 minutes on Day 1.

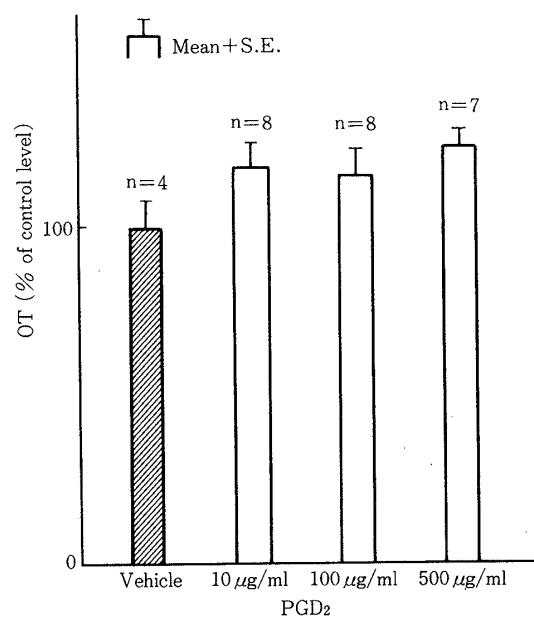


図5 The effect of PGD₂ on OT release from explants of HNC into the culture medium for 20 minutes on Day 1.

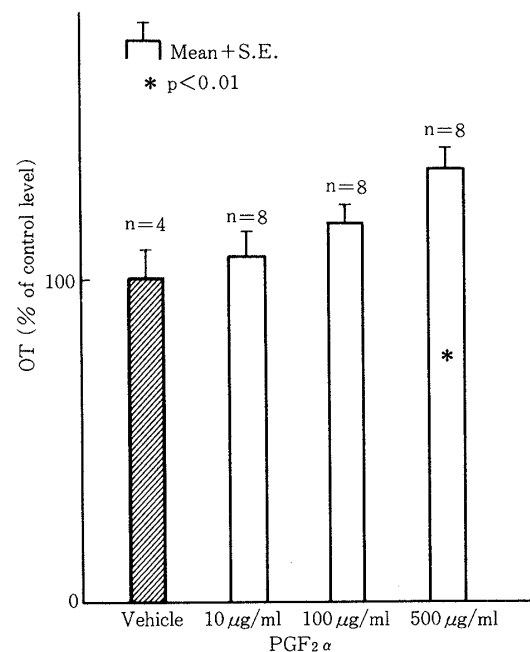


図7 The effect of PGF₂α on OT release from explants of HNC into the culture medium for 20 minutes on Day 1.

5. HNC 培養液中への brain gut peptide 添加

図8のCCKおよび図9のgastrinはともにOT放出の変化をもたらさなかつた。しかし、図10

のごとくVIPの添加培地では 10^{-6} M, 10^{-5} Mで、有意に高いOTの放出増加を示した。

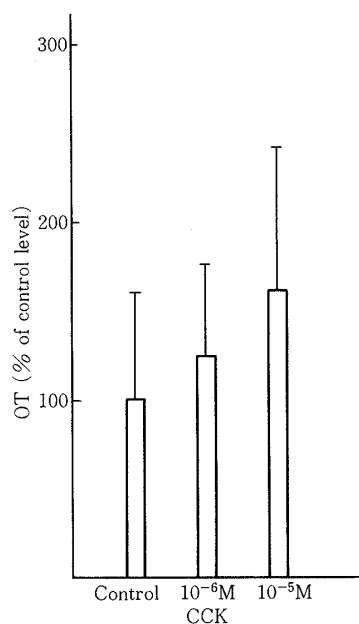


図8 The stimulation by cholecystokinin (CCK) on OT release from explants of HNC into the culture medium.

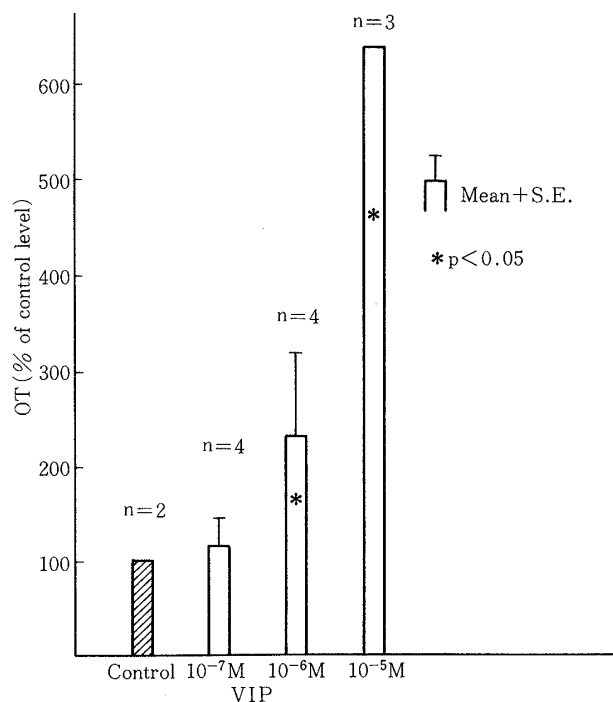


図10 The enhancement of OT release by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in vitro.

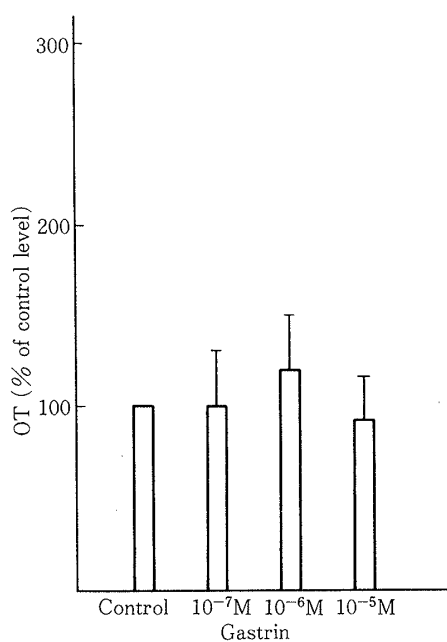


図9 The stimulation by gastrin on OT release from explants of HNC into the culture medium.

考 案

従来 OT は、下垂体後葉からのみ放出されると考えられていたが、近年 Flint et al.¹⁰⁾, Wathes et al.¹⁸⁾は卵巣からも OT が放出されることを示唆し、一方 Makino et al.¹³⁾は胎盤組織に Immunor-

active OT の存在を証明する報告を行つている。これらの研究は OT の生体内の作用機序を解明するためにも興味深いのであるが、一方 in vivo 系を用いた OT 研究を行うに際しては、諸因子が複雑に関与することとなり、実験系の単純化を試みるに障害となりうる。そこで本研究では、視床下部一下垂体後葉系以外の OT 動態に影響する諸因子を取り去り、単純に視床下部一下垂体後葉レベルでの OT の研究のためのモデルとして、in vitro モデルを確立した。

実験方法に示したごとく作成した HNC が器官培養に移されてからも OT 放出を経日的に示し、培養期間中視床下部および下垂体後葉における OT 含量がほぼ一定を維持したという事実は、OT が HNC より放出制御を受け機能していることを示していると考えられる。

器官培養中、室傍核の組織所見をみると、神経細胞は培養日数を経るに従つて変性する細胞も増加してくるが、Day 7においても細胞構築が保持され、神経細胞が優位を占めている⁵⁾。この組織所見は KCl 添加培地においても同様に細胞構築が

保たれていることが述べられており¹⁾, 100mM KCl 添加培地による放出刺激に反応して HNC より OT 放出が増加したことは, HNC が培養期間中を通して神経分泌細胞としての機能を保持し, OT 放出能力を有していることを示している。

一方, イオン交換クロマトグラフィーによる視床下部および下垂体抽出液と合成 OT との溶出曲線の比較は三者とも一致したピークを示したことで, 本研究で測定された物質は OT そのものと考えられる。

以上の検討により, HNC の器官培養系は OT 放出実験のモデルとして十分に耐えうるものと考えられた。

OT は分子量1,007で, 九つのアミノ酸からなるペプチドホルモンである。OT は視床下部の室傍核, 視索上核の小神経細胞内粗面小胞体上にニューロフィジンとして合成され, 軸索内を神経分泌として運ばれる。下垂体後葉に貯蔵され, 種々の放出刺激で開口分泌するといわれている。下垂体後葉からの放出刺激としては吸乳や腔壁および子宮頸管拡張⁹⁾ (Ferguson reflex) による末梢からの神経反射や, 上位中枢よりの刺激が考えられている。化学的刺激については種々の報告がなされているが, 統一的な見解を得るにいたっていない。PG の後葉系に対する作用を放出刺激としてとらえる報告は, Gillespie¹¹⁾, 幡²⁾, Cobo⁸⁾, Mcneilly et al.¹⁴⁾ によつてなされている。Gillespie は, ヒト男性および女性に PGE_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ を静注して, 幡は, 妊産婦および男性に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を静注し, それぞれ血中の OT 値の上昇を確認した。Cobo は授乳婦人に $\text{PGF}_{2\alpha}$ を, Mcneilly は授乳モルモットに PGE_1 , E_2 , $\text{F}_{1\alpha}$ を静注して射乳作用の増強をみたことから, PG の下垂体後葉への直接刺激作用を報告した。しかし Prilusky et al.¹⁶⁾ はラットに $\text{PGF}_{2\alpha}$ を腹腔内投与し, 射乳作用が減少したため下垂体後葉への直接抑制作用を報告し, 矛盾する結果となつている。本実験では $\text{PGF}_{2\alpha}$ の添加培地で OT 分泌の増加結果を得ており, 促進的作用機序の可能性が考察された。

PGD_2 は早石³⁾ によるとラットの中枢神経, とくに下垂体, 視床下部に多く分布することが報告さ

れている。これに伴い PGD_2 の合成酵素および分解酵素の分布も多く, OT 分泌機序への関与が考慮された。Arisawa⁶⁾ はラット下垂体前葉を PGD_2 添加培地に作用させると, LH, FSH の放出が増加することを報告している。しかし, 本実験系では PGD_2 添加による HNC からの OT 放出に対する影響は認められなかった。 PGD_2 の分布に種族差があるのか, また前葉, 後葉に作用機序の相違があるのかなお検討が必要と思われる。

神経伝達物質として注目されている brain gut peptide は数多くのペプチドが発見され, OT の分泌機序に関して何らかの関与を示すものと予想された。CCK は中枢神経系において免疫組織学的研究が行われ, イヌの室傍核, 視索上核で CCK, OT 共存ニューロンが証明されている¹²⁾。これは OT 分泌機序における CCK の関連を示唆するものの, 本実験では有意差を得るにいたらなかった。共存ニューロンが刺激的作用なのか抑制的作用なのか, また両者を兼ね備えているものか, なお検討が必要と思われる。

Gastrin に関しても, OT 分泌の変化はみられず, 関与の低いことが考えられた。VIP は大脳皮質をはじめ, 脳内に広く分布している。とくに, 視交叉上核では VIP 陽性細胞が密集しており, VIP 陽性細胞体と室傍核とに連絡のあることも報告されている¹⁷⁾。本実験系でも OT 分泌に対する VIP の関与は強く, 濃度依存的な分泌増加を示した。これは VIP の OT 分泌機序への関与を強く示唆しているものと考えられる。Ottesen¹⁵⁾ は female rat の頸静脈に VIP を注入し, OT, Vasopressin の血中濃度を測定したところ, 上昇したことを報告している。また OT が腸管の VIP を増加させるという報告もあり⁷⁾, OT と VIP の間に互に関与しあう positive feedback 的な機構の可能性が示唆された。

以上, HNC への添加実験においては, $\text{PGF}_{2\alpha}$ および VIP に OT 分泌機序に関与する可能性が認められた。 PGD_2 , E_2 および CCK, gastrin については positive data を得られなかった。しかし, 生体内において, いずれの機構が主たる役割を演じているかは今後なお検討を要するものと思われる。

る。一方OTは、前駆物質ともいえるニューロフィジンの関連が強く、今後ホルモットのニューロフィン測定確立等が、さらに詳しいOT放出機構の解明に役立つものと思われる。

文 献

1. 萩庭一元：視床下部一下垂体後葉器官培養系を用いたオキシトシン分泌機序の研究。慶應医学, 64: 727, 1987.
2. 幡 研一：Radioimmunoassayによる妊産婦血中Oxytocinの動態とその意義について。日産婦誌, 30: 472, 1978.
3. 早石 修：プロスタグランジン—最近の進歩から—。慶應医学, 58: 129, 1981.
4. 中山陽比古：ヒト妊娠時の血中オキシトシン動態。周産期医, 10: 553, 1983.
5. 鈴木英明：ホルモット視床下部一下垂体後葉器官培養系の確立とオキシトシン分泌の研究。慶應医学, 60: 553, 1983.
6. Arisawa, M.: Effect of prostaglandin D₂ on gonadotropin release from rat anterior pituitary in vitro. Fertil. Steril., 39: 93, 1983.
7. Bitar, K.N.: Neural release of VIP from the gut. Gastroenterology, 79: 1289, 1980.
8. Cobo, E.: Milk-ejecting activity induced by prostaglandin F_{2α}. Am. J. Obst. Gynecol., 118: 831, 1974.
9. Ferguson, J.K.W.: A study of motility of the intact uterus at term. Surg. Gynecol. Obstet., 73: 359, 1941.
10. Flint, A.P.F. and Sheidrick, E.L.: Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. Nature, 297: 587, 1982.
11. Gillespie, A.: Oxytocin release by infused prostaglandin. Br. Med. J., 1: 543, 1972.
12. Lcren, I.: Distribution of gastrin and CCK-like peptide in rat brain. Histochem., 59: 249, 1979.
13. Makino, T., Nakazawa, K., Ishi, K., Haginiwa, I., Nakayama, A. and Iizuka, R.: Detection of immunoreactive human placental oxytocin and its contractile effect on the uterine muscle. Endocrinol. Japon., 30: 389, 1983.
14. Mcneilly, A.S. and Fox, C.A.: The effect of prostaglandins on the guinea pig mammary gland. J. Endocrinol., 51: 603, 1971.
15. Ottesen, B.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulate oxytocin and vasopressin release from the neurohypophysis. Endocrinology, 115: 1648, 1984.
16. Prilusky, J. and Deis, R.P.: Inhibitory, effect of prostaglandin F_{2α} on oxytocin release and milk ejection in lactating rats. J. Endocrinol., 69: 395, 1976.
17. Sims, K.B.: Vasoactive intestinal peptide (VIP) in mouse and rat brain. Brain Reseach, 186: 165, 1980.
18. Wathes, D.C. and Swann, R.W.: Is oxytocin ovarin hormone? Nature, 297: 225, 1982.

(No. 6479 昭63・11・8 受付)