

## 連続照明下での雌ラット脳内モノアミン濃度の変化について

獨協医科大学越谷病院産婦人科

\*テキサス大学サン・アントニオ校細胞・分子生物学教室

大蔵 健義 萩野 信義\* 矢追 良正

## Changes in Monoamine Concentrations in Developing Female Rat Brains Under Continuous Light

Takeyoshi OHKURA, Nobuyoshi HAGINO\* and Yoshimasa YAOI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Koshigaya Hospital, Dokkyo University**School of Medicine, Saitama**\*Department of Cellular and Structural Biology,**The University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas, U.S.A.*

**概要** ラットを連続照明下 (continuous light : LL) で飼育すると周期的明暗下 (14hr light—10hr dark : LD) に比べ、思春期が早期に発来する。この機序を解明するために、ラット脳内の norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT) の各濃度を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定し、LL と LD とを比較検討した。LD 下で生まれた雌ラットを生後半日以内に LD 又は LL で飼育し、生後10, 20, 30, 40 日に断頭して視床下部と脳幹を摘出した。これに小脳を除いた残りの脳(残脳: RB) を加えた3部位に分けて、ただちに抽出操作を行い、HPLCにてNE, DA, 5-HTの各濃度を測定した。用いたラット数はLD, LLの各日齢とも5~7匹であった。実験成績は次の通りであった。

1) NE: 視床下部のNE濃度は両群とも同じように上昇した。LDとLLの各日齢間に有意差はなく、40日齢では両群とも10日齢の約3倍に増加した。2) DA: LDでは視床下部のDA濃度は30日齢まで変化はみられなかったが、40日齢で急激に上昇した(30日齢の2.5倍)。一方LLでは30日齢で有意に上昇(20日齢の1.8倍)したが、30日齢と40日齢との間に有意差はなかった。3) 5-HT: LDでは脳幹と視床下部の5-HT濃度はともに20日齢で有意に上昇した。一方LL, 10日齢の5-HT濃度は、脳幹, 視床下部ともLDに比べて有意に上昇していた。4) RBでは各濃度とも、LD, LL間に著しい違いは認められなかった。

生後から思春期にかけての連続照明が脳内、特に視床下部のDAと5-HT濃度に影響を与えることを明らかにした。LLは視床下部の5-HT濃度をLDよりも早く増加させ、次いで視床下部DA濃度をLDよりも早期に上昇させた。これらの事実から、LLでは思春期が早期に発来するものと推察された。

**Synopsis** Norepinephrine (NE), dopamine (DA) and serotonin (5-HT) concentrations in the hypothalamus were measured by HPLC on days 10, 20, 30 and 40 of age in Sprague-Dawley albino female rats after continuously exposed to light (LL). When rats were housed under a lighting schedule (14hr light and 10hr dark : LD), the NE concentration increased linearly. The DA concentration remained lower on days 10, 20 and 30 of age, but a sudden increase in the DA concentration appeared on day 40 of age. An increase in the 5-HT concentration occurred at day 20 of age, and remained at the same level thereafter. LL exerts profound effects on DA and 5-HT concentrations in the hypothalamus; an increase in the 5-HT concentration appeared at day 10 of age, and the peak concentration of DA was reached at day 30 of age. The inference is then that LL exerts effects on the metabolism of 5-HT and DA and promotes the increase in 5-HT and DA concentrations in the hypothalamus, and that the advanced appearance of 5-HT and DA in the hypothalamus seems to correspond with the advancement of puberty onset. Indeed, LL exerted its effects on puberty onset and advanced it.

**Key words:** Continuous light • Norepinephrine • Dopamine • Serotonin • Puberty onset

## 緒言

生後雌ラットを連続照明 (continuous light: LL) 下で飼育すると周期的明暗下 (light-dark cycle: LD) に比べ5日, 思春期の発来が促進される<sup>1)</sup>. LL下での思春期発来の促進はどのようにして起こるのであろうか. LD下での雌ラットの思春期発来に関して norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT) などの視床下部モノアミン (monoamines) が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>2)~4)</sup>. また, ラットでは prolactin (PRL) が思春期発来の時期決定因子として重要な役割を演じているといわれている<sup>3)4)</sup>. 下垂体からの PRL の分泌には serotonin が関与している<sup>5)~7)</sup> ことがよく知られているが, 照明条件が脳内 serotonin 濃度に影響を与えることも報告されている<sup>8)9)</sup>. 以上のことから, LD と LL で思春期発来の時期に差があるのは, 脳内の NE, DA, 5-HT の各濃度に LD と LL で差が生じるのではないかと考えられ, 生後日齢とともに脳内モノアミン濃度が LD と LL でどのように変化するかについて検討したので報告する.

## 実験方法

### 1. 実験動物

Sprague-Dawley 系雌ラットを用い, 生後半日以内に14hr light—10hr dark (LD: 午前5時~午後7時明, 生下時と同じ照明条件) と24時間連続照明(LL)の, どちらかの照明条件下で飼育した. 固形飼料と水は自由に摂取させた.

### 2. 実験方法

LD, LL とも生後10, 20, 30, 40日に断頭して視床下部 (hypothalamus) と脳幹 (brain stem) を摘出した. 組織の摘出は拡大解剖鏡を用いて行った. 視床下部は視束交叉を前方の境界とし, 乳頭体を後方の境界とした. 側方は視床下部外側を境界とした. 上方は前交連から視床下部溝にかけて摘出した. 脳幹は脳橋, 延髄, 中脳を含むものとした. さらに小脳を除去した残りの脳(残脳: rest of the brain) を加えた3部位に分けて, ただちに抽出操作を行い, 続いて高速液体クロマト

グラフィー (HPLC) にて NE, DA, 5-HT の各濃度を測定した. 用いたラット数は LD, LL の各日齢とも5~7匹であった. その内訳は, LD では10, 20, 30, 40日の各日齢とも6匹であった. LL の10, 20, 30, 40日の各日齢ラット数は, それぞれ5, 7, 7, 6匹であった. 3部位の組織試料の抽出操作は既に発表した方法<sup>10)</sup>で行った.

HPLC の条件は次の通りである. 液体クロマトグラフィー用ポンプ (Model 396-31 pump, Laboratory Data Control Co.) に電気化学検出器 (Bio Analytical System, Inc.) を組み合わせて用いた. 電気化学検出器は炭素電極 (RE-1) を使用した. カラムは, Ultrasphere IP (Beckman) を用い, 移動相は0.1M-クエン酸緩衝液 (pH 4.8), 0.09 mM オクチル硫酸ナトリウム, 8.75% (V/V) メタノール含有を使用し, 流速1.2ml/min にて測定した. NE, DA, 5-HT は, それぞれ2, 4, 11分で溶出した.

統計学的処理は分散分析 (ANOVA) 後, Fisher's PLSD (protected least significant difference) を用いて多重比較を行った. LD と LL との比較には1%と5%の有意水準で検討した. LD と LL のそれぞれの群内での日齢間のモノアミン濃度の比較には, 5%の有意水準で各濃度の大きさの順序を決めた.

## 実験成績

### 1. Norepinephrine (NE)

#### 1) 視床下部

日齢が増加するにつれて, LD, LL とも NE 濃度は大幅に増加した (表1). しかし, どの日齢でも, LD と LL 間の NE 濃度に有意差は認められなかった (表1).

#### 2) 脳幹

LD では20日齢と40日齢の NE 濃度は軽度が増加したが, LL では40日齢の NE 濃度のみが, 10~30日齢に比べて有意に高値であった (表1). LD, LL 間の NE 濃度には有意差は認められなかった (表1).

表1 Changes with age in norepinephrine concentrations (ng/g·wet tissue) in the three regions of developing female rat brains under light-dark cycles (LD) or continuous light (LL)

Lighting condition	Regions of the brain	Days of age				Order of concentration
		10	20	30	40	
L D	Hypothalamus	784.7±32.3 <sup>a</sup>	1,968.3±35.2 <sup>b</sup>	2,486.1±104.3 <sup>c</sup>	2,825.8±117.6 <sup>d</sup>	a<b<c<d
	Brain stem	647.4±38.0 <sup>a</sup>	778.8±41.1 <sup>b</sup>	698.5±46.3 <sup>c</sup>	931.5±33.8 <sup>d</sup>	a<b<d,c<d NS: a vs. c, b vs. c
	Rest of the brain	322.0±15.9 <sup>a</sup>	443.6±6.0 <sup>b</sup>	402.3±12.5 <sup>c</sup>	442.2±21.7 <sup>d</sup>	a<b,c,d NS: b vs. c vs. d
L L	Hypothalamus	811.1±42.0 <sup>a</sup>	1,889.3±113.3 <sup>b</sup>	2,295.6±123.9 <sup>c</sup>	2,624.4±71.5 <sup>d</sup>	a<b<c<d
	Brain stem	721.4±9.6 <sup>a</sup>	756.0±26.5 <sup>b</sup>	715.2±9.8 <sup>c</sup>	992.3±30.2 <sup>d</sup>	d>a,b,c NS: a vs. b vs. c
	Rest of the brain	300.7±10.5 <sup>a</sup>	345.7±13.4 <sup>b</sup>	317.6±9.3 <sup>c</sup>	478.5±41.2 <sup>d</sup>	d>a,b,c NS: a vs. b vs. c

Values are the mean±SEM of 5–7 determinations. The order of concentration was determined by statistical analysis at a 5% level of significance. NS: Not significant.

表2 Changes with age in dopamine concentrations (ng/g·wet tissue) in the three regions of developing female rat brains under light-dark cycles (LD) or continuous light (LL)

Lighting condition	Regions of the brain	Days of age				Order of concentration
		10	20	30	40	
L D	Hypothalamus	227.0±25.9 <sup>a</sup>	241.0±25.9 <sup>b</sup>	274.9±52.8 <sup>c</sup>	680.5±89.6 <sup>d</sup>	d>a,b,c NS: a vs. b, vs. c
	Brain stem	129.0±28.5 <sup>a</sup>	139.8±14.1 <sup>b</sup>	122.9±9.4 <sup>c</sup>	104.8±6.0 <sup>d</sup>	NS: a vs. b vs. c vs. d
	Rest of the brain	374.3±12.5 <sup>a</sup>	575.8±13.8 <sup>b</sup>	681.4±33.8 <sup>c</sup>	1,037.0±61.2 <sup>d</sup>	a<b,c<d NS: b vs. c
L L	Hypothalamus	275.8±38.1 <sup>a</sup>	246.5±23.1 <sup>b</sup>	485.2±18.0 <sup>c</sup>	425.8±31.9 <sup>d</sup>	a,b<c,d NS: a vs. b, c vs. d
	Brain stem	126.0±12.1 <sup>a</sup>	120.7±12.3 <sup>b</sup>	114.9±6.6 <sup>c</sup>	113.3±3.9 <sup>d</sup>	NS: a vs. b vs. c vs. d
	Rest of the brain	352.5±6.9 <sup>a</sup>	610.9±28.6 <sup>b</sup>	689.1±22.1 <sup>c</sup>	993.8±28.8 <sup>d</sup>	a<b<c<d

Values are the mean±SEM of 5–7 determinations. The order of concentration was determined by statistical analysis at a 5% level of significance. NS: Not significant.

### 3) 残脳

LDでは、20～40日齢のNE濃度が10日齢に比べて有意に高値であったが、LLでは40日齢のみが10～30日齢に比べて高値であった(表1)。20日齢(p<0.01)と30日齢(p<0.01)でLD, LL間のNE濃度に有意差が認められた(表1)。

## 2. Dopamine (DA)

### 1) 視床下部

LDのDA濃度は30日齢までは有意な変化は認められなかったが、40日齢で大幅に増加した(表

2)。LLでは、20日齢までDA濃度は有意な変化を示さなかったが、30日齢と40日齢で有意に大きく増加した(表2)。しかし、30日齢と40日齢との間に有意差はなかった。LDとLL間のDA濃度の有意差は30日齢(p<0.01)と40日齢(p<0.05)で認められた(表2)。つまり、LLはLD, 40日齢でのDA濃度の上昇を、より早く出現させた。

### 2) 脳幹

LD, LLとも10～40日齢のDA濃度に日齢間の有意差はなかった。LD, LL間の有意差も認めら

表3 Changes with age in serotonin concentrations (ng/g·wet tissue) in the three regions of developing female rat brains under light-dark cycles (LD) or continuous light (LL)

Lighting condition	Regions of the brain	Days of age				Order of concentration
		10	20	30	40	
LD	Hypothalamus	496.7±29.3 <sup>a</sup>	892.2±62.8 <sup>b</sup>	854.8±119.7 <sup>c</sup>	984.7±47.2 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> < <sup>b,c,d</sup> NS: <sup>b</sup> vs. <sup>c</sup> vs. <sup>d</sup>
	Brain stem	698.7±35.7 <sup>a</sup>	1,049.8±23.7 <sup>b</sup>	828.8±55.3 <sup>c</sup>	802.3±18.8 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> < <sup>c</sup> < <sup>b</sup> NS: <sup>a</sup> vs. <sup>d</sup> , <sup>c</sup> vs. <sup>d</sup>
	Rest of the brain	391.1±29.5 <sup>a</sup>	378.2±16.4 <sup>b</sup>	362.2±28.7 <sup>c</sup>	497.8±62.4 <sup>d</sup>	<sup>d</sup> > <sup>a,b,c</sup> NS: <sup>a</sup> vs. <sup>b</sup> vs. <sup>c</sup>
LL	Hypothalamus	712.2±42.6 <sup>a</sup>	700.2±25.6 <sup>b</sup>	854.4±48.4 <sup>c</sup>	1,039.2±33.7 <sup>d</sup>	<sup>d</sup> > <sup>c</sup> > <sup>a,b</sup> NS: <sup>a</sup> vs. <sup>b</sup>
	Brain stem	1,099.9±53.4 <sup>a</sup>	848.4±32.5 <sup>b</sup>	782.4±36.3 <sup>c</sup>	848.6±15.7 <sup>d</sup>	<sup>a</sup> > <sup>b,c,d</sup> NS: <sup>b</sup> vs. <sup>c</sup> vs. <sup>d</sup>
	Rest of the brain	362.5±11.5 <sup>a</sup>	377.2±29.1 <sup>b</sup>	417.0±14.6 <sup>c</sup>	498.3±28.2 <sup>d</sup>	<sup>d</sup> > <sup>a,b,c</sup> NS: <sup>a</sup> vs. <sup>b</sup> vs. <sup>c</sup>

Values are the mean±SEM of 5–7 determinations. The order of concentration was determined by statistical analysis at a 5% level of significance. NS: Not significant.

れなかった(表2)。

### 3) 残脳

LD, LLとも日齢とともにほぼ直線的な増加を示したが, LD, LL間に有意差は認められなかった(表2)。

## 3. Serotonin (5-HT)

### 1) 視床下部

LDでは, 20~40日齢の5-HT濃度が10日齢よりも有意に高値であったが, 20~40日齢間に有意差は認められなかった(表3)。LLでは20日齢までは有意な変化を示さなかったが, 30日齢と40日齢にかけて直線的に増加した(表3)。LD, LL間の5-HT濃度の有意差は10日齢( $p<0.01$ )と20日齢( $p<0.05$ )で認められた(表3)。つまり, LLはLD, 20日齢での5-HT濃度の上昇を, より早く出現させた。

### 2) 脳幹

LDでは, 20日齢の5-HT濃度は有意に上昇し, 30日齢で有意な減少を示したが, 10日齢よりは高値であった。40日齢と30日齢との間に有意差は認められなかった(表3)。LLでは, 10日齢の5-HT濃度が, 20~40日齢に比べて有意に高値であったが, 20~40日齢間の5-HT濃度には有意差は認められなかった(表3)。LD, LL間の5-HT濃度の有意差は10日齢( $p<0.01$ )と20日齢( $p<0.01$ )

で認められた(表3)。つまり, LLはLD, 20日齢での5-HT濃度の上昇をより早く出現させた。

### 3) 残脳

LD, LLとも40日齢の5-HT濃度が, 10~30日齢に比べて有意に上昇したが, 10~30日齢間の5-HT濃度には有意差がなかった(表3)。

LD, LL間の5-HT濃度に有意差は認められなかった(表3)。

## 考 案

日齢が増すとともに, LDでのNE濃度は視床下部で大幅な増加を示したが, 他の部位ではごく軽度の変化が観察されただけであった。成熟ラットの脳内NE濃度は視床下部で最も高いと報告されている<sup>11)</sup>。雌雄混合ラットのNE濃度の生後増加でも, 14日齢以後では視床下部を含む間脳で最も大きかったという<sup>12)</sup>。我々の結果は, これらの報告とよく一致していた。前述のNomura et al.の報告<sup>12)</sup>では, DA濃度の生後増加は脳辺縁系一線条体で著明であったが, 間脳と脳幹では, 30日齢, 60日齢になっても増加は認められなかったという。また, 5-HT濃度について同報告は, 間脳, 脳幹, 脳辺縁系一線条体で軽度の増加が30日齢と60日齢で認められたという。我々のDA濃度の生後増加は, 残脳(脳辺縁系一線条体を含む)で最も著明であった。また, LD, 40日齢の視床下

部で DA 濃度は著明に増加した。前述の報告では 40日齢の DA 濃度を測定していないので比較することはできないが、一般にこの時期 (LD) の視床下部と DA に関して次のように報告されている。雌ラットでは 21日齢以後血中 PRL が増加を始める<sup>13)</sup>。この増加してくる PRL が視床下部 DA, つまり tubero-infundibular DA (TIDA)-system の DA 代謝回転を刺激すると報告<sup>14)15)</sup>されており、増加する PRL を抑えるためにこの時期の DA 濃度が上昇するのは合目的である。本実験では、5-HT 濃度 (LD) が視床下部と脳幹の 20日齢で有意に増加することを明らかにした。この時期は血中 PRL が増加する<sup>13)</sup>時期であり、serotonin が PRL 分泌に関与<sup>5)~7)</sup>していることとよく一致した。脳幹はすべての serotonin の細胞体が集合しているところであるが、LD, 30日齢では、20日齢よりも 5-HT 濃度は減少を示した。

LD と LL 間のモノアミン濃度の顕著な差異は視床下部の DA と 5-HT 及び脳幹の 5-HT で認められた。LL は、LD の 20日齢で出現する 5-HT 濃度の増加をもっと早期に出現させたことになる。照明条件がラット脳内の 5-HT 濃度に影響を与え、照明は脳内の 5-HT 濃度を増加させる<sup>8)9)</sup>ことが報告されている。恐らくこの 5-HT 濃度の早期の上昇が、血中 PRL をも早期に増加させるのではないかと推察される。LL では、5-HT 濃度は 20日齢から 40日齢にかけて直線的に増加した。しかし、この研究では血中 PRL を測定していないので、仮にこの 5-HT 濃度の早期の上昇が血中 PRL の早期の上昇をもたらしたとすれば、続いて起こる DA 濃度の早期の増加もクリアカットに説明することができる。未熟雌ラットを高 PRL 血症にすると思春期の発来が促進される<sup>16)17)</sup>。また、我々が行った飼育条件下で雌ラットの思春期発来は、LLの方が LD より 5日早くなる<sup>1)</sup>。しかし、高 PRL 血症が必ずしも思春期発来を促進しないとの報告もある。戸澤<sup>18)</sup>は、生後第 3 週以前においては PRL が性成熟を抑制する作用をもつことを報告している。さらに、第 4 週以降では高 PRL による思春期発来の促進は認められなかったが、低 PRL によって思春期発来の遅延が認められたこ

とから、あるレベルの血中 PRL は円滑な性成熟のために必要であると報告している。血中 PRL を測定して本実験を行うと、LL での思春期発来の機序がさらに解明されるのではないかと思われる。今回の実験では視床下部の NE 濃度には LD と LL 間で差異は認められなかったが、LH-RH の放出には NE 代謝回転の亢進が指摘されており<sup>3)</sup>、今後検討を要する。

本研究は、Council for Tobacco Research 137M の援助により行われた。

## 文 献

1. Hagino N, Sako T, Nakamoto O, Kunz Y, Saito H. Prevention of continuous light-induced anovulation in rats by early exposure to constant light. *Biol Reprod* 1983; 29: 355-361
2. Advis JP, Simpkins JW, Chen HT, Meites J. Relation of biogenic amines to onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1978; 103: 11-16
3. Wuttke W, Honma K, Lamberts R, Höhn KG. The role of monoamines in female puberty. *Federation Proc* 1980; 39: 2378-2383
4. Ojeda SR, Aguado LI, Smith (White) S. Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: The rat as a model<sup>1</sup>. *Neuroendocrinology* 1983; 37: 306-313
5. Kamberi IA, Mical RS, Porter JC. Effect of melatonin and serotonin on the release of FSH and prolactin. *Endocrinology* 1971; 88: 1288-1293
6. Lawson DM, Gala RR. The influence of pharmacological manipulation of serotonergic and dopaminergic mechanisms on plasma prolactin in ovariectomized estrogen-treated rats. *Endocrinology* 1978; 102: 973-981
7. López F, González D, Aguila E. Possible direct effect of serotonin on pituitary prolactin secretion: In vivo and in vitro studies. *Hormone Res* 1987; 25: 160-170
8. Scheving LE, Harrison WH, Gordon P, Pauly JE. Daily fluctuation (circadian and ultradian) in biogenic amines of the rat brain. *Am J Physiol* 1968; 214: 166-173
9. Wesemann W, Rotsch M, Schulz E, Sturm G, Zöfel P. Circadian rhythm of serotonin binding in rat brain-1. Effect of the light-dark cycle. *Chronobiol Int* 1986; 3: 135-139
10. Ohkura T, Lee JW, Hagino N. Effect of exogenous dopamine on hypothalamic

- dopamine and norepinephrine concentrations in the neonatal brain in rats. *Int J Dev Neurosci* 1986 ; 4 : 129—133
11. *Glowinski J, Iversen LL*. Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of [<sup>3</sup>H] norepinephrine, [<sup>3</sup>H] dopamine and [<sup>3</sup>H] DOPA in various regions of the brain. *J Neurochem* 1966 ; 13 : 655—669
  12. *Nomura Y, Naitoh F, Segawa T*. Regional changes in monoamine content and uptake of the rat brain during postnatal development. *Brain Res* 1976 ; 101 : 305—315
  13. *Döhler KD, Wuttke W*. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. *Endocrinology* 1975 ; 97 : 898—907
  14. *Olson L, Fuxe K, Hökfelt T*. The effect of pituitary transplants on the tubero-infundibular dopamine neuron in various endocrine states. *Acta Endocrinol (Kbh)* 1972 ; 71 : 233—244
  15. *Annunziato L, Moore KE*. Prolactin in CSF selectively increases dopamine turnover in the median eminence. *Life Sci* 1978 ; 22 : 2037—2042
  16. *Wuttke W, Döhler KD, Gelato M*. Oestrogens and prolactin as possible regulators of puberty. *J Endocrinol* 1976 ; 68 : 391—396
  17. *Advis JP, Ojeda SR*. Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rat: Ovarian site of action. *Endocrinology* 1978 ; 103 : 924—935
  18. 戸澤秀夫. 雌ラットの性成熟過程におけるプロラクチンの役割について. *日産婦誌* 1993 ; 45 : 1015—1022
- (No. 7587 平6・11・11受付)
-