視床下部神経分泌細胞における放出ホルモンの 分泌調節機序に関する研究

II. 神経分泌細胞の神経性調節と化学伝達物質について

横浜市立大学医学部第2生理学教室 (主任: 川上正澄教授)

佐 久 間 康 夫

Effects of Limbic Stimulation and the Microiontophoresis of Aminergic Drugs on the Single Unit Activity of Hypothalamic Neurosecretory Cells

Yasuo SAKUMA

Department of Physiology, Yokohama City University School of Medicine
Yokohama, Japan (Director: Prof. M. Kawakami)

Attempts were made to investigate the chemical nature of hypothalamic afferents from the extrahypothalamic structures which participate in the control of hypothalamic neurosecretory cells. Experimental procedures were described in the preceding report, except that of the electrical stimulation and the microiontophoresis. Some part of data obtained in this study were referred in the preceding report for improvement of statistic reliability. For electrical stimulation, side-by-side bipolar electrodes were placed in the medial preoptic area (MPO), medial amygdala (mAMYG) and dorsal hippocampus (dHPC) from the parietal surface of the brain and fastened to the cranium by dental resin. Microiontophoresis of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and acetylcholine (ACh) was carried out by using five-barrelled glass pipette on the antidromically activated units in the medial basal hypothalamus by the median eminence stimulation. Extracellular potentials were recorded by the central barrel of each electrode. One of the outer barrels was filled with physiological saline and used for control purpose.

(1) Electrical stimulation of the MPO with train pulses of 0.2 msec duration and 300 μ A intensity in 100 Hz for 5 sec, induced facilitation and inhibition in 26.4% and 9.4% of 106 tests, respectively. By the mAMYG stimulation with 500 μ A, facilitation was seen in 18.8% and inhibition in 10.4%, of 96 tests. The HPC stimulation induced facilitation in 10.0% and inhibition in 23.3% of 90 tests.

(2) Facilitatory effect of the MPO was most frequently seen in the ovariectomized and estrogen primed rats (58.8% of the tests). In contrast, the inhibitory effect of the dHPC was striking in the diestrus-I (40.0%).

(3) Microiontophoresis of NE induced facilitation in 60.0% and inhibition in 10.6%

of 66 identified cells. DA induced facilitation in 45%, and inhibition in 11.7% of 60 tests. Ach induced facilitation in 41.4%, and inhibition in 13.8% of 58 tests.

(4) By NE infusion, facilitation was most commonly seen in the proestrus (70.6%). Inhibition was most readily elicited by Ach infusion on the diestrus-I (30%). Facilitative effect of DA was eminent in the diestrus-I (81.8%).

(5) Successive administration of NE and DA on identical units revealed that in 56.0%, the units were responsive to only one agent and the other was effectless. 25.5% of the units responded to both of NE and DA.

(6) The coincidence of effects, either facilitation or inhibition, between that of electrical stimulation and of the microiontophoresis, was calculated on 46 units. The facilitatory effect of the MPO was most commonly mimicked by NE infusion (81.8%), and the inhibitory effect of the dHPC by Ach infusion (46.7%). NE also mimicked facilitatory effect of mAMYG stimulation (73.3%).

(7) Intraventricular infusion of 20 μ g of NE induced significant increase of serum LH ($p < 0.05$ to saline) when measured by radioimmunoassay, whereas DA resulted in a decrease of LH ($p < 0.01$).

緒 言

視床下部神経分泌細胞から下垂体門脈に対して行われる放出ホルモン分泌の調節に関与する神経伝達物質については、各種の伝達遮断剤が排卵を阻止することを認めた Sawyer ら^{44), 46)} の先駆的報告以来、多くの研究がある。カテコールアミンの第3脳室内への投与が、適当な条件のもとで黄体形成ホルモン (LH) の分泌を起こすことは Kamberi ら²⁰⁾, Schneider & McCann⁴⁸⁾, Karja ら¹⁹⁾ などによる一連の報告が行われているが、今日のところ、LH の放出を起こす生理的な伝達物質が具体的に何であるかについては結論が得られていない⁴⁹⁾。

LH の放出、あるいは排卵の誘発には、脳内諸部位の電気刺激、電気化学刺激が有効である。視床下部正中底部の刺激が排卵を誘発することは Harris 以来良く知られている事実であり¹⁷⁾、この現象は視床下部正中底部に局在する黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) 分泌性の神経分泌細胞^{41), 45)} が賦活された結果と考えられる。同時に LH-RH 活性が認められない⁸⁾ とされている内側視索前野 (MPO)^{3), 13), 25)} や扁桃核内側部 (mAMYG)^{53), 57)} の電気刺激、電気化学刺激によっても排卵が誘発されたり、LH の分泌が起こり、これに対し海馬 (HPC) の刺激は自然排卵を抑制し⁵⁶⁾、また MPO の刺激による LH 放出を阻止する²⁹⁾。これらの刺激効果が、神経経路によって視床下部正中底部に伝達されていることは、特定の神経経路の選択的切断によって刺激が無効となったり³⁸⁾、自然排卵が起こらなくなる観察^{10), 30)}、あるいは脳内各部位の電気刺激が視床下部正中底部の電気活動に及ぼす影響²³⁾ から明らかである。

視床下部神経分泌細胞に対するこれらの神経性入力機序が、その経路ごとに特異的な神経伝達物質によって興奮の伝達を行っている可能性については、排卵誘発や LH 分泌を指標として、脳内各部位の刺激を特異的に遮断する薬剤から分析する試みが行われている^{6), 12), 42), 57)}。しかしながら、これらの研究が必ずしも一致した結論に達していないのは、指標とする排卵、あるいは LH 分泌が複雑な生体機序の一部であって、遮断剤が非特異的に作用してしまう可能性によることが考えられる。

そこで本研究では、視床下部正中底部に、電気生理学的に同定した神経分泌細胞を対象として脳内諸部位の電気刺激の効果と、ノルエピネフリン、ドーパミン及びアセチルコリンの微小電気泳動投与の効果とを、同

一の細胞で比較, 検討し, 刺激部位から神経分泌細胞へ至る神経経路の化学的性質について考察した. さらに, 性周期や卵巣ホルモン投与などの体内内分泌環境の変化が, 電気刺激や微小電気泳動に対する細胞の反応性に与える影響を観察し, 卵巣ホルモンのフィードバック調節に関与する経路についても検討を行った.

実験材料及び方法

実験動物及び基本的手技は既報第 I 報⁴¹⁾に記載した. 本実験では予め, 腹臥位で脳定位固定装置に動物を装着し, MPO, mAMYG 及び HPC にステンレス線製並列双極電極を *Albe-Fessard* ら²⁾ の脳地図に従って頭頂部より刺入し, 即時重合樹脂を用いて頭骨に固定したネジと接着した. しかるのち, 動物を背臥位とし, 正中隆起 (ME) を腹側より露出し, 神経分泌細胞の逆行性興奮誘発のための刺激電極を下垂体柄起始部の ME 表面に置いた. 記録及び薬物投与のための微小電極は, ME 表面から視床下部弓状核 (ARC) を目標として視床下部正中底部に刺入した.

単一放電活動の記録及び薬物の微小電気泳動的投与には, 5 槽のガラス毛细管電極を使用した. 電極は外径 3 mm パイレックスガラス管を素材とし, 川上²²⁾の方法により作成した. 電極先端の直径は 1 μ 以内とし, 記録槽の直流抵抗は 15~50 Mohm, また, 薬物投与槽の抵抗は 10 Mohm 以上のものを用いた. 5 槽電極の中心槽を記録槽とし, 導出のために 0.5 M 酢酸ナトリウム溶液を充填した. なお, 溶液には *pontamine sky blue 6B* を 2% の濃度で混和し, 記録終了後の電極位置検索のため, 染色が可能になるようにした.

残る 4 槽には, それぞれ以下の溶液を充填した. 1 M-Acetylcholine Chloride (Ach), 0.1 M-Norepinephrine bitartrate (NE), 0.5 M-Dopamine hydro chloride (DA), 0.15 M-NaCl. 何れの溶液も pH は 3~4 に調整した. これらの溶液は *Tasaki* ら⁵¹⁾の方法により, 電極の使用直前に充填を行った.

薬物の投与は, 逆行性興奮誘発によって, 第 I 報に述べた神経分泌細胞と想定される特徴を示した細胞, 即ち誘発された波形に屈曲があり, A, B-スパイクの分離を示したもののみに限った. なお, これらの逆行性興奮の検討は第 I 報に記載した. 投与は *Curtis*¹⁰⁾, *Moss* ら³⁷⁾の方法に従い, 電気泳動的に行った. 微小電極からの薬物の駆出には, 何れも正の電流を用い, 5~40 nA, 5 秒間の通電により単一放電活動に変化を認めた. 0.15 M-NaCl 槽の通電に対する反応を対照とし, さらに薬物の効果の判定には *Curtis & Koizumi*¹¹⁾の基準を参考にした. 本実験では投与による単一放電活動の変化が対照の 40% 以上の増加, 又は減少を示した時を有意な反応と考えた.

記録終了後 10 μ A の負電流を記録槽に 10 分間通電し, 電極先端より染色剤を遊出させた. 10% ホルマリンの心臓灌流ののち, 脳を固定し, 60 μ の切片を作成, 染色後記録部位の同定を行った.

第 5 節で述べた性腺刺激ホルモンの定量法は *Niswender* ら³⁹⁾の方法に従いラジオイムノアッセイ法によって行った.

本文中では以下の略号を用いた. Pe: 自然性周期発情前期; DI: 自然性周期非発情第 1 日; OvX: 卵巣摘出無処置; OvX+E: 卵巣摘出後エストロゲン処置; OvX+P: 卵巣摘出後プロゲステロン処置.

結 果

1. 脳内諸部位の電気刺激が視床下部正中底部神経分泌細胞に及ぼす効果について

脳内 MPO, mAMYG 及び HPC に刺入したステンレス線並列双極刺激電極の 0.15 M-NaCl 溶液中での初期抵抗は 30-70 kohm であった. この電極を通じてパルス幅 0.2 msec の陰性矩形波を, 100 Hz の繰り返し頻度で 5 秒間投与した. 刺激の強度は MPO では 300 μ A, mAMYG では 500 μ A, HPC では 100 μ A とした. これらの刺激強度では, 種々の内分泌環境を通じ, 前頭葉皮質から記録した脳波に発作波を誘発することがないことを確めた. いろいろの内分泌環境下で MPO 刺激に対してはのべ 106 例, mAMYG では 96 例, HPC では 90 例の, それぞれ逆行性興奮の誘発により同定された視床下部正中底部の神経分泌細胞の反応を観察した (Table 1).

種々の内分泌環境下に於ける観察を合計すると, MPO の刺激によって, 26.4% (28 例) に刺激中及び刺

Table 1. Responses of antidromically identified ARC units to the electrical stimulation of the MPO, m-AMYG and d-HPC under various endocrine conditions.

Total			Proestrus	Diestrus I	Ovx.	Ovx. + EE	Ovx. + P
MPO	106	↑ 28(26.4%)	8(40.0%)	5(19.2%)	2(10.0%)	10(58.8%)	3(13.0%)
		↓ 10(9.4%)	5(25.0%)	2(7.7%)	0	2(11.8%)	1(4.3%)
		± 68(64.2%)	7(35.0%)	19(73.1%)	18(90.0%)	5(29.4%)	19(82.6%)
m-AMYG	96	↑ 18(18.8%)	9(47.4%)	2(8.3%)	1(5.6%)	5(33.3%)	1(5.0%)
		↑ 10(10.4%)	4(21.1%)	1(4.2%)	2(11.1%)	2(13.3%)	1(5.0%)
		± 68(70.8%)	6(31.6%)	21(87.5%)	15(83.3%)	8(53.3%)	18(90.0%)
d-HPC	90	↑ 9(10.0%)	3(17.6%)	1(10.0%)	2(11.1%)	2(13.3%)	1(5.0%)
		↑ 21(23.3%)	4(23.5%)	4(40.0%)	3(16.7%)	5(33.3%)	5(25.0%)
		± 60(66.7%)	10(58.8%)	5(50.0%)	13(72.2%)	8(53.3%)	14(70.0%)

↑ : increased

↓ : decreased

% : no change

激終了後も持続する放電頻度の増加を認めた。9.4% (10例) では刺激により放電が抑制された。mAMYG の刺激では18.8% (18例) において促進, 10.4% (10例) で抑制をみた。このように, MPO と mAMYG の刺激に対しては, 促進性の反応が相対的に優勢であったのに対し, HPC 刺激に対しては促進性反応の 10.0% (9例) に対し, 抑制性反応の23.3% (21例) と, 抑制性反応の方が2倍の頻度で認められた。

内分泌環境の変化に伴って, 刺激の効果には種々の変動が認められた。MPO 刺激による促進反応の惹起は Ovx+E (17例中10例; 58.8%) 及び Pe (20例中8例; 40%) で特に顕著であった。抑制反応にも, やや共通の傾向が認められた。mAMYG 刺激による促進反応は Pe で最も著しく (19例中9例; 47.4%), Ovx+E がこれに次いだ (15例中5例; 33.3%)。抑制反応は Pe, Ovx, Ovx+E で相対的に高率を示した。HPC 刺激が相対的に高い頻度で促進反応を起こしたのは Pe であったが, その比率は高くなかった (17例中3例; 17.6%)。これに対し, HPC 刺激による抑制性の反応は, 特に DI (10例中4例; 40%) 及び Ovx+E (15例中5例; 33.3%) で高率を示した。

この結果から, MPO から視床下部正中底部の神経分泌細胞に至る促進性経路の興奮性は, Pe 及び Ovx+E において上昇しているものと思われる。MPO 刺激に対する抑制性反応の比率も Pe 及び Ovx+E で増加していることから見て, これらの内分泌環境における興奮性の上昇が, 一定の程度刺激部位である MPO の興奮閾値の低下によっている可能性が考えられるが, 同時に視床下部正中底部に至る興奮伝達機序に内分泌環境が作用していることも無視できない。mAMYG の刺激では, MPO と同様 Pe と Ovx+E で促進性の反応の頻度が高かったが, HPC からの系に関しては, 特に抑制性機能が DI で賦活されている所見を得た。何れの部位の刺激についても, MPO 刺激と同様に, 内分泌環境の変化が系のどの段階で作用しているかは明らかでない。視床下部神経分泌細胞の膜の段階での感受性が, 内分泌環境によって受ける変化については以下の実験で調べた。

2. 微小電気泳動法による薬物投与が神経分泌細胞の活動に及ぼす効果について

ME からの逆行性興奮誘発によって同定した神経分泌細胞に対し, NE, DA 及び Ach の微小電気泳動的投与を行い, 単一放電活動に及ぼす効果を観察した (Table 2)。薬物の投与に先立って, 何れの場合も NaCl 槽からの通電を行い, 細胞の活動に変化が起らないことを確かめた。電気泳動的投与は 0~40 nA, 5秒間の通電によって行い, 保持用電流は加えなかった。投与は2分間の間隔をおいて, 段階的に強度を増加して行った。何れの薬物についても, 投与に用いた電流の大きさと反応の間に相関関係が認められた。NE 投与による促進反応の dose-responses 関係の一例を Fig. 1 に示した。一般に反応は通電開始後 0.5~1.0 秒

Table 2. Responses of identified ARC units to the microiontophoresis of NE, DA and Ach.

		NE				DA				Ach			
		↑40	↓7	±19	—	↑27	↓7	±26	6***	↑24	↓8	±26	8*(2**)
NE	66	↑40	—	—	—	12	2	21	5	17	4	16	5
		↓7	—	—	—	2	3	1	1	3	1	0	1
		±19	—	—	—	13	2	4	0	4	3	10	2
		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DA	60	↑27	12	2	13	—	—	—	—	12	5	8	2
		↓7	2	3	2	—	—	—	—	5	0	2	0
		±26	21	1	4	—	—	—	—	7	3	16	0
		6***	5	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Ach	58	↑24	17	3	4	—	—	—	—	—	—	—	—
		↓8	4	1	3	—	—	—	—	—	—	—	—
		±26	16	0	10	—	—	—	—	—	—	—	—
		8*(2**)	5	1	2	—	—	—	—	—	—	—	—

↑ : increased ↓ : decreased ± : no change

* : not tested with NE

** : not tested with DA

*** : not tested with NE

Ovx.+Estrogen.

Fig. 1. An example of the relation of dose-response of an antidromically identified arcuate (ARC) neuron to the microiontophoresis of norepinephrine (NE).

の潜時で発現し、通電終了後数秒から十数秒の後効果を伴うものが多かった (Fig. 2). 継時的に行った NE, DA, Ach の投与が、それぞれ異った反応を惹起した観察は、NaCl 槽からの電流投与の効果を参照すると、微小電気泳動の効果が電流によるのではなく、投与された薬物の作用であることを示している。

NE の投与は、種々の内分泌環境下の動物で、のべ66の同定された神経分泌細胞に対して行い、40例(60.6%)で放電活動の促進を認めた。19例(28.8%)は無反応で、7例(10.6%)で抑制が起こった。60例については更に DA の効果を調べた。DA は27例(45.0%)で促進反応、7例(11.7%)で抑制反応を起こした。残る26例(43.3%)では無効であった。これらの細胞のうち、58例については引き続いて Ach の投与を行い、24例(41.4%)で促進、8例(13.8%)で抑制を観察した。残る26例(44.8%)は Ach に対して

Fig. 2. Variable responses of an identical ARC neuron to the microiontophoresis of dopamine (DA), NE and acetylcholine (Ach).

反応を示さなかった。

同一の細胞に対して NE, DA, Ach を継時的に投与した場合の、それぞれの薬物に対する反応態度の関連を調べた。NE と DA の双方を投与した60例のうち、促進及び抑制の何れを問わず、両者に対して反応を示したものは19例 (31.7%) あった。これに対し NE のみに反応し DA には反応を示さなかった細胞は22例 (36.7%)、逆に DA のみに反応した細胞は15例 (25.0%) 観察された。4例は NE, DA の何れにも反応しなかった。即ち、NE と DA については、共通の反応性を示す細胞は NE だけに反応する細胞より低い割合を示した。これに対し NE と Ach に対する反応では、総数58例のうち25例 (41.7%) が、DA と Ach に対する反応では総数58例のうち22例 (37.9%) が、それぞれ投与した薬物の双方に反応し、一方の薬物だけに反応する細胞よりも、これら共通の反応性を有する細胞の方が何れも高い割合をしめた (Fig. 3)。

これらの観察から、本実験で投与した3種の薬物の中では、視床下部神経分泌細胞の活動に最も影響を与えるのは NE であり、これと比較すれば反応性のある細胞の比率は小さいが DA 及び Ach についても過半数が反応性を示すことが確認された。これらの反応のうち、NE によるものは、促進性反応と抑制性反応の比率が6対1と、促進性反応の頻度が圧倒的であったのに対し、Ach に

Fig. 3. Relationship between the responses elicited by two drugs out of DA, NE and Ach in the antidromically identified ARC neurons.

対する反応では3対1で，比較的抑制性反応の頻度が高かった．DA 投与に対するこの比率はほぼ4対1であった．単一の細胞に対する複数の薬物の投与の効果から考えると，視床下部正中底部においてはNEに反応する系と，DAに反応する系の2系列があり，Achはこの双方に有効であることが想定された．

3. 内分泌環境の変動に伴って神経分泌細胞にみられる薬物反応性の変化について

動物の自然性周期及び各種の内分泌学的処置に伴って起こる視床下部正中底部神経分泌細胞の反応性の変化を Table 3 に示す．

Table 3. Changes of the responsiveness of the antidromically identified ARC units to the microiontophoresis according to the endocrinological variations.

	Total		Proestrus	Diestrus I	Ovx	Ovx + E	Ovx + P
NE	66	↑40(60.6) ↓7(10.6) ±19(28.8)	12(70.6) 1(5.9) 4(23.5)	7(58.3) 2(16.7) 3(25.0)	7(63.6) 1(9.1) 3(27.3)	8(53.3) 1(6.7) 6(40.0)	6(54.5) 2(18.2) 3(27.3)
DA	60	↑27(45.0) ↓7(11.7) ±26(43.3)	7(50.0) 0 7(50.0)	9(81.8) 0 2(18.2)	3(27.3) 4(36.4) 4(36.4)	6(46.2) 2(15.4) 5(38.5)	2(18.2) 1(9.1) 8(72.7)
Ach	58	↑24(41.4) ↓8(13.8) ±26(44.8)	11(78.6) 1(7.1) 2(14.3)	4(40.0) 3(30.0) 3(30.0)	3(27.3) 1(9.1) 7(63.6)	2(18.2) 3(27.3) 6(54.5)	4(33.3) 0 8(66.6)

NE に対する反応性は Ovx+E を除く内分泌環境下にあつては，ほぼ75%の細胞が促進，抑制何れかの反応を示した．Ovx+E では反応は60%の細胞に見られた．これらの反応のうち，促進が目立って多かったのは Pe で17例中12例（70.6%）が NE の投与に対して放電頻度の増加を起こした．NE に対する抑制性の反応は DI（12例中2例；16.7%）及び Ovx+P（11例中2例；18.2%）で相対的に多く，Pe（17例中1例；5.9%）及び Ovx+E（15例中1例；6.7%）で少なかった．

DA に対する反応性は DI で最も高く（11例中9例；81.8%），Ovx+P で最も低かった（11例中3例；27.3%）．このうち抑制性の反応は，卵巣摘出及びホルモン処置を行った群のみに見られ，Ovx で最も高い比率を示した（11例中4例；36.4%）．

Ach に対する反応性は Pe で最も高く14例中12例（85.7%）が促進及び抑制反応を示した．Ach に対する促進反応は Pe で高率を示した（14例中11例；78.6%）．これに対し抑制反応の比率は DI で最も高かった（10例中3例；30.0%）．

内分泌環境に伴う神経分泌細胞の薬物反応性の変化の機序については，細胞の膜自体の感受性の変化による可能性だけでなく，投与した薬物と同一，あるいは近似の作用をもつ物質を神経伝達物質とする系が特定の内分泌環境下で賦活，抑制されているために，神経分泌細胞の興奮状態に変化を与えるために必要な薬物の量が異なってくるとも考えられる．

4. 脳内諸部位の刺激効果と薬物の微小電気泳動的投与の効果の関係について

のべ46の同定された神経分泌細胞については，脳内諸部位の電気刺激の効果及び薬物の微小電気泳動的投与の効果を継時的に観察した（Table 4）．表に見られるように MPO 刺激によって活動の促進を示した22例のうち，18例（81.8%）は NE の投与により同様の促進反応を起こした．DA の投与は22例の細胞の過半数（14例；63.6%）で無効で，6例（27.8%）に促進反応を起こしたにとどまった．MPO 刺激が促進を起こした細胞のうち，14例については，Ach の投与も行ったが，それぞれ6例（42.8%）が促進反応と無反

Table 4. Correlation of effects on the identified ARC units between the electrical stimulation and the microiontophoresis.

			NE			DA			AcH		
			↑	↓	±	↑	↓	±	↑	↓	±
MPO	46	↑22	18	2	2	6	2	14	6	2	6
		↓6	4	1	1	3	1	2	2	2	2
		±18	8	3	7	9	1	8	10	4	4
m-AMYG	45	↑15	11	0	4	3	2	10	8	0	7
		↓10	8	1	1	3	2	3	1	5	2
		±20	12	3	5	13	1	6	9	3	3
d-HPC	43	↑5	4	0	1	4	0	1	2	0	2
		↓15	8	3	4	3	1	11	0	7	1
		±23	16	1	6	12	3	6	11	1	9

応をさせた。MPO 刺激に対する抑制反応と、薬物投与の効果の間には特に相関は認められなかった。

mAMYG 刺激については、電気刺激が促進反応を起こした15例のうち、NE は11例 (73.3%) に促進反応を起こした。Ach は8例 (53.3%) を促進した。これに対し DA は大多数 (10例; 66.7%) で無効で、僅かに3例 (20.0%) で促進を起こしたにとどまった。HPC 刺激により促進反応を示した5例では、NE、DA の投与に対しても促進反応を示すのが認められた。HPC 刺激に対しては、15例 (34.8%) で抑制反応を認めた。これらの細胞では8例 (53.3%) が NE に対して促進反応、DA に対しては11例 (73.3%) までが無反応であった。Ach を投与した8例中7例 (87.5%) が HPC 電気刺激と同じく抑制効果を示した。

この結果から、脳内諸部位に発して視床下部正中底部神経分泌細胞に至る、促進性及び抑制性の神経経路の化学的性質を推論すると、MPO からの系は主として促進性であって、この系の効果は NE の微小電気泳動的投与により、模倣された。mAMYG からの系については促進性がやや優勢ではあったものの、抑制性反応もかなり観察され、このうち促進性反応の観察された細胞では NE 及び Ach の双方によって電気刺激の効果が模倣された。mAMYG からの抑制性影響についても Ach が同様の効果を示した。HPC からの促進性入力、NE 及び DA によって同様の効果を得ることができた。HPC 刺激に対して抑制反応を示した細胞は、Ach の微小電気泳動投与によって同様に抑制反応を示すものが大多数であったことから、この抑制系が Ach 作動性である可能性が考えられる。この抑制機序に対し、NE 作動性の拮抗的促進機序が存在することが、HPC 及び mAMYG の刺激により抑制を受ける細胞の大多数が NE の投与で逆に促進を受けることから想定された。

5. 薬物の第3脳室内への投与が血漿中の性腺刺激ホルモンに及ぼす影響について

発情前期の午後、13時30分にペントバルビタール-Na 塩 (Nembutal®) を 31.5 mg/kg 投与して LH の放出をブロックした動物において、第3脳室に定位的に刺入した先端 100 μ のガラス製カニューレを通じて、それぞれ 20 μ g の NE、DA 及び epinephrine bitartrate (EP) を何れも 10 μ l の溶液として投与した。対照には 0.15 M NaCl を投与し、sham operated group には開頭し、カニューレを刺入し、直ちに抜去した動物を用いた。採血は投与後30分で行った。

NE の投与により、血漿中 LH 濃度には、NaCl を投与した動物に対して有意 ($p < 0.05$) の増加が認められた (Fig. 4—8)。これに対し、同量の DA の投与は LH の著しい ($p < 0.01$) 減少を起こした。卵胞刺激ホルモン (FSH) の血中濃度は NE の脳室内投与で著しい ($p < 0.01$) 低下を示した。DA による FSH の減少は統計学的には有意でなかった。

Fig. 4. Example of responses of an antidromically activated ARC neuron to the medial preoptic (MPO) stimulation and the microiontophoresis.

Fig. 5. Responses of an antidromically activated ARC neuron to medial amygdalar (AMYG) stimulation and the microiontophoresis.

Fig. 6. Inhibitory effects of the hippocampal (HPC) stimulation and the microiontophoresis of ACh on the activity of an identified ARC neuron. Upper column of each traces: cortical EEG; Middle column: integrated unit activity.

Fig. 7. Relationship between the effects of electrical stimulation and the microiontophoresis.

Fig. 8. Effects of intraventricular infusions of catecholamines on serum LH and FSH.

考 察

本実験では視床下部正中底部の神経分泌細胞に対する脳内諸部位からの神経性入力とその化学的性質について検討を行った。

排卵の生理的過程に MPO と視床下部正中底部の間を結ぶ神経路が不可欠であることは、広く認められている^{16), 32), 52)}。本実験で検索の対象とした ME に軸索を直接送っている神経分泌細胞のうち、4分の1以上が MPO の電気刺激によって促進反応を示した。この促進反応は MPO の電気刺激、電気化学刺激が、下垂体からの LH の放出を促進し^{3), 25)}、また排卵を誘発する観察^{9), 13), 25), 54)}と考え併せると、Terasawa and Sawyer⁵⁴⁾や Kawakami ら²⁷⁾の述べているように LH の放出と直接関連する現象の可能性がある。MPO の刺激効果が神経路を介して、視床下部正中底部に至り、そこで興奮を放出因子分泌性の神経分泌細胞に伝達した結果現われていることは、化学的にシナプス伝達を遮断すると考えられている物質の投与により排卵が阻止されることから推論される。Sawyer ら⁴⁶⁾は古く交尾直後のウサギにアトロピンやダイベナミンを投与すると排卵が阻止されることを観察した。また、レセルピン投与も排卵阻止に有効である^{7), 40)}。このような処置を行った動物でも、MPO の刺激により排卵の誘発⁴⁰⁾、LH の放出を起こすことが知られているが、この際、刺激の効果は著しく低下する⁴³⁾という。また、Crighton ら³⁾によれば、MPO 刺激が LH の放出を起こすが、MPO 自体には LH-RH 活性は認められないという。これらの観察は何れも視床下部正中底部の神経分泌細胞に対し、神経性の入力、神経伝達物質を介して調節を行っていることを示唆している。

一方、本実験で試みた薬物の微小電気泳動的投与によって、視床下部正中底部の神経分泌細胞に、最も著明な活動の促進を起こしたのは NE であった。カテコールアミン類が LH-RH の分泌調節に関与していることは、今日広く認められているところであるが、実際に、どの化合物が、どのような形式で LH-RH 調節を行っているかについては結論が得られていない。組織化学的研究により、視床下部正中底部には DA が高濃度に蓄積されていることが明らかにされ^{14), 58)}、この物質の LH-RH 分泌調節における役割が注目されて多くの研究が行われた。Fuxe ら^{11), 18)}は一連の系統的研究により、ME の DA 末端が LH-RH の放出を抑制すると述べている¹⁸⁾。これに対し McCann ら^{36), 48)}、Kamberi ら²⁰⁾は DA が LH-RH 放出を起こす神経伝達物質であると考えている。本実験の結果は DA の微小電気泳動的投与が 45% の神経分泌細胞に活動の促進を起こしたが、これらの細胞の多くは MPO 刺激には反応していない。また、第3脳室内への DA 投与によっても、LH の分泌抑制が起こっており、本実験の結果から DA は神経分泌細胞の活動を調節す

る促進性伝達物質として作用しているとは考え難い。DA に関しては、我々はむしろ ME におけるシナプス前抑制様機序による LH-RH 分泌抑制機序への関与を想定している^{28),41)}。

本実験の結果から推論すると、神経分泌細胞に対する促進性神経伝達物質として最も考え易いのは NE である。NE は 60.6% の細胞の活動を促進し、しかもこれらの細胞の殆んどが MPO 刺激によっても促進反応を示している。NE (又は EP) が LH 放出を促進するという観察は古くは Markee ら³⁵⁾ が下垂体前葉に投与し、おそらくは拡散による ARC-ME への到達の結果排卵の誘発に成功した報告がある。Kalra ら¹⁹⁾ は去勢ラットにプロゲステロンを投与して起こる LH 分泌に NE が関与すると述べており、また最近 Sawyer ら⁴⁵⁾ はウサギで NE が LH の放出を起こすのに対し、DA は逆に抑制を起こすことを認め、しかも DA は長期間にわたって NE 投与に対する LH 分泌反応を阻止すると述べている。また、Tima and Fierko⁵⁵⁾ は持続照明や MPO-視床下部正中底部神経路の切断によって、持続発情状態となったラットの第 3 脳室に NE を投与し、排卵を誘発することに成功しており、これらの報告は、本実験の結果と基本的に一致していると考えられる。

微小電気泳動投与による NE の投与の際、動物の内分泌環境による反応性の差が認められた。この変化が神経分泌細胞に対する卵巣ホルモン、あるいは下垂体前葉ホルモン等の直接のフィードバック作用の結果であるのか、あるいは内分泌環境に伴って、MPO から神経分泌細胞へ至る系の活動水準が変化し、その結果 NE 投与に対する閾値が低下していることによるのかは、本実験の限りでは明瞭でなく、この両者の可能性とも否定できないように思われる。視床下部正中底部に存在するカテコールアミンの量が性周期あるいは内分泌環境に伴って変動を示し、Pe 又は Ov_x+E で相対的に高い値を示すという観察^{5),34)} は後者の可能性を支持するものであろう。

一方、神経分泌細胞に対する抑制性の神経経路には HPC の関与が考えられた。海馬刺激による LH の分泌抑制は Velasco and Taleisnik⁵⁶⁾ によって報告されており、Kawakami ら²⁹⁾ も、慢性実験では HPC 刺激は血中 LH に影響を与えないが、本実験と同様の急性実験による HPC 刺激では下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌を抑制すると述べている。本実験では、これら HPC 刺激によって抑制を受ける神経分泌細胞の多くのものが、同様に Ach によって抑制されたことから、一つの可能性として、HPC からの抑制経路が Ach 作動性であることが考えられる。動物の内分泌環境に伴う HPC の抑制効果が、微小電気泳動投与による Ach の効果と平行して変化を示し、DI で最も顕著であったことも、この推論を支持するものと思われる。Ach に対する反応性が DI で最も高くなる機序についても、NE の場合と同様の可能性が想定される。視床下部の Ach 含量については合成、代謝に関与する酵素活性が非発情期に発情期より高いという観察がある³³⁾。

mAMYG の性腺刺激ホルモン分泌調節機能については、この部の電気刺激、電気化学刺激が排卵を誘発することが報告されており^{24),31),53)} 扁桃核が下垂体からの性腺刺激ホルモン分泌に促進的な役割を演じていることが推察される。しかし、一方では Conrey and de Groot⁴⁾ 以来、この領域が抑制野であるとの報告もある。本実験では、電気刺激及び NE と Ach の投与に際して、何れも共通に促進的反應を惹起する傾向がうかがえたが、同時に、抑制を示す細胞群も無視できず、mAMYG から視床下部に至る系については明確な結論を出すことができなかった。Velasco and Taleisnik⁵⁹⁾ は扁桃核から視床下部への促進性神経伝達物質を検討する目的でアトロピン及びレセルピンの投与を行ったが、何れも扁桃核の刺激効果には影響しなかったといい、Saul and Sawyer⁴²⁾ は扁桃核刺激によるウサギの排卵はアトロピンで阻止されたがレセルピンは無効であったと述べており、扁桃核から視床下部に至る系の性質については更に検討を加えるべき問題であろう。

結 語

正中隆起部に軸索を送る視床下部正中底部の神経分泌細胞の活動に対する脳内諸部位の電気刺激の効果を調べ、これと薬物の微小電気泳動投与に対する反応から、それぞれの経路の化学的性質を考察した。動物の

内分泌環境による反応性の変化と、薬物の第3脳室内投与が性腺刺激ホルモンの分泌動態に及ぼす影響を考え併せると、排卵促進性のMPOからの興奮の伝達はノルエピネフリン投与により、抑制性のHPCからの興奮伝達はアセチルコリン投与により模倣されるように思われた。ドーパミン投与の効果は、本実験で調べたMPO, HPC, mAMYGの何れの刺激とも顕著な一致を認めなかった。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜った川上正澄教授ならびに数々の御助言、御教示を戴いた第2生理学教室の皆様には深甚なる謝意を表します。

なお本論文の一部は第1回神経内分泌シンポジウムにおいて報告した。

文 献

- 1) Ahrén, K.; Fuxe, K.; Hamberger, L., and Höckfelt, T.: Turnover changes in the tubero-infundibular dopamine neurons during the ovarian cycle of the rat. *Endocrinology* 88: 1425-1424, (1971).
- 2) Albe-Fessard, D.; Stutinsky, F., and Liboubin, S.: *Atlas Stéréotaxique du Diencephale du Rat Blanc*. (Editions du CNRS, Paris 1966).
- 3) Clemens, J.A.; Shaar, C.J.; Kleber, J. W., and Tandy, W. A.: Areas of the brain stimulatory to LH and FSH secretion. *Endocrinology* 88: 180-184, (1971).
- 4) Conrey, K., and de Groot, J.: Limbic involvement in the regulation of luteinizing hormone release. *Fed. Proc.* 23: 109, (1964).
- 5) Coppola, J.A.: Brain catecholamines and gonadotropin secretion. In Martini and Ganong (eds.) *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1971; pp. 129-144, (Oxford University Press, New York 1971).
- 6) Coppola, J.A.; Leonardi, R.G., and Lippmann, W.: Ovulatory failure in rats after treatment with brain norepinephrine depletors. *Endocrinology* 78: 225-228, (1966).
- 7) Craven, R.P., and McDonald, P.G.: The effect of intrahypothalamic infusions of dopamine and noradrenaline on ovulation in reserpinetreated female rats. *J. Endocrinol.* 58: 319-326, (1973).
- 8) Crighton, D.B.; Schneider, H. P. G., and McCann, S. M.: Localization of LH-releasing factor in the hypothalamus and neurohypophysis as determined by an *in vitro* method. *Endocrinology* 87: 323-329, (1970).
- 9) Critchlow, V.: Ovulation induced by hypothalamic stimulation in the anesthetized rat. *Amer. J. Physiol.* 195: 171-174, (1958).
- 10) Curtis, D.R.: Microiontophoresis. In Nastuk (ed.) *Physical Techniques in Biological Research*. Vol. V. *Electrophysiological Methods*, Part A; pp. 144-192, (Academic Press, New York 1958).
- 11) Curtis, D.R., and Koizumi, K.: Chemical transmitter substances in brain stem of cat. *J. Neurophysiol.* 24: 80-90, (1961).
- 12) Everett, J.W.: Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. *Physiol. Rev.* 44: 373-431, (1964).
- 13) Everett, J.W., and Radford, H.M.: Irritative deposits from stainless steel electrodes in the preoptic rat brain causing release of pituitary gonadotropin. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 108: 604-609, (1961).
- 14) Fuxe, K.: Cellular localization of monoamines in the median eminence and infundibular stem of some mammals. *Acta physiol. scand.* 58: 383-384, (1963).
- 15) Fuxe, K.; Höckfelt, T., and Jonsson, G.: Participation of central monoaminergic neurons in the regulation of anterior pituitary secretion. In Martini and Meites (eds.) *Neurochemical Aspects of Hypothalamic Function*; pp. 61-83, (Academic Press, New York 1970).
- 16) Halász, B., and Pupp, L.: Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotropic area. *Endocrinology* 77: 553-562, (1965).
- 17) Harris, G.W.: Central control of pituitary secretion. In Field, Magoun and Hall (eds.) *Handbook of Physiology*, Section I, Vol. II; pp. 1007-1038, (Amer. Physiol. Soc., Washington, D.C. 1960).
- 18) Höckfelt, T.: The possible ultrastructural identification of tubero-

- infundibular dopamine containing nerve endings in the median eminence of the rat. *Brain Research* 5 : 121-123, (1967).
- 19) Kalra, P.S. ; Kalra, S.P. ; Kruhlich, L. ; Fawcett, C.P. and McCann, S.M. : Involvement of norepinephrine in transmission of the stimulatory influence of progesterone on gonadotropin release. *Endocrinology* 90 : 1168-1176, (1970).
- 20) Kamberi, I.A. ; Mical, R.S., and Porter, J.C. : Luteinizing hormonereleasing activity in hypophysial stalk blood and elevation by dopamine. *Science* 166 : 388-390, (1969).
- 21) Kamberi, I.A. ; Mical, R.S., and Porter, J.C. : Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines and indolamines on LH release. *Endocrinology* 87 : 1-12, (1970).
- 22) 川上正澄 : 生理学的実験法, 倉智, 坂元, 鈴木 編, 現代産科婦人科大系 5B2 ; pp. 131-187, (中山書店, 東京 1974).
- 23) Kawakami, M., and Sakuma, Y. : Evidences for possible heterosynaptic inhibition of neuroendocrine cells in the median eminence. *Neuroendocrinology*, submitted for publication.
- 24) Kawakami, M. ; Seto, K., and Yoshida, K. : Influences of the limbic system on ovulation and on progesterone and estrogen formation in rabbit's ovary. *Japan. J. Physiol.* 16 : 254-273, (1966).
- 25) Kawakami, M., and Terasawa, E. : Effect of electrical stimulation of the brain on ovulation during estrous cycle in the rats. *Endocrinol. japon.* 17 : 7-13, (1970).
- 26) Kawakami, M., and Terasawa, E. : Acute effect of neural deafferentation on timing of gonadotropin secretion before proestrus in the female rat. *Endocrinol. japon.* 19 : 449-459, (1972).
- 27) Kawakami, M. ; Terasawa, E., and Ibuki, T. : Changes in multiple unit activity of the brain during the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 6 : 30-48, (1970).
- 28) Kawakami, M. ; Terasawa, E. ; Kimura, F., and Kubo, K. : Correlated changes in gonadotropin release and electrical activity of the hypothalamus induced by electrical stimulation of the hippocampus in immature and mature rats. In Lissak (ed.) *Hormones and Brain Function* ; pp. 347-374, (Akadémiai Kiadó, Budapest 1973).
- 29) Kawakami, M. ; Terasawa, E. ; Kimura, F., and Wakabayashi, K. : Modulating effect of limbic structures on gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 12 : 1-16, (1973).
- 30) 貴邑富久子, 川上正澄 : ラット海馬の性周期に及ぼす影響, 日本内分泌学会雑誌 43 : 1059, (1968).
- 31) Koikegami, H. ; Yamada, T., and Usui, K. : Stimulation of amygdaloid nuclei and periamygdaloid cortex with special reference to its effects on uterine movements and ovulation. *Folia psychiat. neurol. japon.* 8 : 7-31, (1954).
- 32) Köves, K., and Halász, B. : Location of the neural structure triggering ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 6 : 180-193, (1970).
- 33) Libertun, C. ; Timiras, P.S., and Kragt, C.L. : Differences in the hypothalamic cholinergic system before and after puberty : inductive effect of testosterone. *Neuroendocrinology* 12 : 73-85, (1973).
- 34) Lichtensteiger, W. : Cyclic variations of catecholamine content in hypothalamic nerve cells during the estrous cycle of the rat, with a concomitant study of the substantia nigra. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 165 : 204-215, (1969).
- 35) Markee, J.E. ; Everett, J.W., and Sawyer, C.H. : The relationship of the nervous system to the release of gonadotropin and the regulation of the sex cycle. *Recent Progr. Hormone Res.* 7 : 139-163, (1952).
- 36) McCann, S.M. ; Kalra, P.S. ; Donoso, A.O. ; Bishop, W. ; Schneider, H.P.G. ; Fawcett, C.P., and Kruhlich, L. : The role of monoamines in the control of gonadotropin and prolactin secretion. In Knigge, Scott, and Weindl (eds.) *Brain-Endocrine Interaction. Median Eminence : Structure and Function* ; pp. 224-235, (Karger, Basel 1972).
- 37) Moss, R.L. ; Urban, I., and Cross, B.A. : Microelectrophoresis of cholinergic and aminergic drugs on paraventricular neurones. *Amer. J. Physiol.* 223 : 310-318, (1972).
- 38) Nauta, W.J.H. : An experimental study of the fornix system in the rat. *J. comp. Neurol.* 104 : 247-272, (1956).
- 39) Niswender, G.D. ; Midgley, A.R. ; Monroe, S.E., and

- Reichert, L.E. : Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH-¹³¹I. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 128 : 807-811, (1968).
- 40) Rubinstein, L., and Sawyer, C.H. : Role of catecholamines in stimulating the release of pituitary ovulatory hormone (s) in rats. *Endocrinology* 86 : 988-995, (1970).
- 41) 佐久間康夫 : 視床下部神経分泌細胞における放出ホルモンの分泌調節機序にする研究, (I) 神経分泌細胞の電気生理学的特性と体液性調節について, 日本内分泌学会雑誌52 : 1-20, (1976).
- 42) Saul, G.D., and Sawyer, C.H. : Atropine blockade of electrically induced hypothalamic activation of the rabbit adenohypophyses. *Fed. Proc.* 16 : 112, (1957).
- 43) Sawyer, C.H. ; Critchlow, B.V., and Barraclough, C.A. : Mechanism of blockade of pituitary activation in the rat by morphine, atropine and barbiturates. *Endocrinology* 57 : 345-354, (1955).
- 44) Sawyer, C.H. ; Everett, J.W., and Markee, J.E. : A neural timing factor in the mechanism by which estrogen induces the release of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 44 : 218-233, (1949).
- 45) Sawyer, C.H. ; Hilliard, J. ; Kanematsu, S. ; Scaramuzzi, R., and Blake, C.A. : Effects of intraventricular infusions of norepinephrine and dopamine on LH release and ovulation in the rabbit. *Neuroendocrinology* 15 : 328-337, (1974).
- 46) Sawyer, C.H. ; Markee, J.E., and Townsend, B.F. : Cholinergic and adrenergic components in the neuro-humoral control of the release of LH in the rabbit. *Endocrinology* 44 : 18-37, (1974).
- 47) Schneider, H.P.G., and McCann, S.M. : Possible role of dopamine as transmitter to promote discharge of LH-releasing factor. *Endocrinology* 85 : 121-132, (1969).
- 48) Schneider, H.P.G., and McCann, S.M. : Release of LH-releasing factor (LRF) into the peripheral circulation of hypophysectomized rats by dopamine and its blockade by estradiol. *Endocrinology* 87 : 249-254, (1970).
- 49) Schwarz, N.B., and McCormack, C.E. : Reproduction : gonadal function and its regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 34 : 425-472, (1972).
- 50) Szentágothai, J. ; Flerkó, B. ; Mess, B., and Halász, B. : Hypothalamic Control of the Anterior Pituitary. (Akadémiai Kiadó, Budapest 1962).
- 51) Tasaki, K. ; Tsukahara, Y. ; Ito, S. ; Wayner, M.J., and Yu, W.Y. : A simple, direct and rapid method for filling microelectrodes. *Physiol. Behav.* 3 : 1009-1010, (1968).
- 52) Tejasen, T., and Everett, J.W. : Surgical analysis of the preopticotuberal pathway controlling ovulatory release of gonadotropins in the rat. *Endocrinology* 81 : 1387-1396, (1967).
- 53) 寺沢 肇 : 排卵の中枢機序に関する研究 (I), 連続発情ラットにおける排卵ホルモン放出時の脳活動に関する研究, 日本内分泌学会雑誌, 46 : 1081-1096, (1971).
- 54) Terasawa, E., and Sawyer, C.H. : Changes in electrical activity in the rat hypothalamus related to electrical stimulation of adenohypophyseal function. *Endocrinology* 85 : 143-149, (1969).
- 55) Tima, L., and Flerkó, B. : Ovulation induced by norepinephrine in rats made anovulatory by various experimental procedures. *Neuroendocrinology* 15 : 346-354, (1974).
- 56) Velasco, M.E., and Taleisnik, S. : Effect of hippocampal stimulation on the release of gonadotropin. *Endocrinology* 85 : 1154-1159, (1969).
- 57) Velasco, M.E., and Taleisnik, S. : Release of gonadotropins induced by amygdaloid stimulation in the rat. *Endocrinology* 84 : 132-139, (1969).
- 58) Wurtman, R.J. : Brain catecholamines and the control of secretion from the anterior pituitary gland. In Meites (ed.) *Hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus : Assay and Chemistry* ; pp. 184-194, (Williams and Wilkins, Baltimore 1970).