周期性排卵における性ステロイドフィードバック 調節と視床下部外中枢神経機構の役割

横浜市立大学医学部第二生理学教室
(指導 横浜市立大学医学部 川上正澄教授)
久 保 勝 知 *

Role of Extrahypothalamic Control System in Steroid Feedback Regulation of Cyclic LH Release in the Female Rat.

Katsuharu KUBO *

Department of Physiology, Yokohama City University, School of Medicine,
Yokohama, Japan
(Director: Professor Masazumi Kawakami, M.D., Ph. D., Yokohama City
University, School of Medicine.)

ABSTRACT

To determine the central neuronal mechanisms essentially involved in the regulation of ovulatory LH release in cycling female rats, and to confirm the role of ovarian steroid feedback on the central regulatory mechanisms, the following experiments were carried out.

A) The effects of electrical stimulation of the preoptic area (MPO) upon unit firing in the periventricular arcuate nucleus (ARC) were investigated in Wistar female rats throughout the 4-day estrous cycle. Unit activity was recorded using a stereo-taxic oriented tungsten microelectrode under light urethane anesthesia. Repetitive stimulation of monophasic square waves varying only in current intensity was used. The following results were obtained. (a) An increase in activity of all ARC neurones recorded was induced by MPO stimulation on each day of the estrous cycle. (b) The minimum current (threshold) effective in increasing activity in the ARC neurones varied throughout the estrous cycle; the lowest threshold was observed in the proestrus and the highest on the first day of diestrus. Moreover, threshold current of MPO stimulation required to increase ARC activity was found to be elevated after long-term ovariectomy and markedly lowered to the level of proestrus by estrogen treatment, but less affected by progesterone. (c) The spontaneous activity of the MPO and ARC neurones were increased at proestrus in cycling rats and after estrogen injection in spayed rats.

B) To clarify the conflicting data in the literature on which a dual regulatory mechanism for gonadotrophin release has been proposed, the ovulatory responses to electrochemical stimulation (ECS) of the medial septal-preoptic complex were compared in pentobarbital-

*Present address: 兵庫医科大学第一生理学教室

Department of Physiology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan.

blocked normal proestrus and neonatally androgenized female rats. Increasing the stimulus strength enhanced the induction of ovulation in normal but not in androgenized rats. However, the ovaries in androgenized rats are relatively insensitive to LH, while pituitary responsiveness to LRH is identical. Therefore, the response to ECS was further evaluated in terms of plasma LH concentration. Radioimmunoassayable plasma LH was significantly elevated 30 min after ECS. Peak LH levels occurred 90 min after ECS and were returning toward baseline after 120 min. There was no difference in mean plasma LH values in normal and androgenized rats at any time in each stimulus strength. Stimulation of the diagonal band of Broca, antero-medial septum as well as MPO equally elicited similar LH responses in both animals.

C) Changes of plasma LH were investigated in ovariectomized rats to study the effects of electrolytic lesions of medial or lateral septum by platinum electrode or preoptichypothalamic deafferentation (supracommissural roof cut) upon plasma LH rise after ovariectomy, on decrease of LH secretion after a single injection of 20 μ g estradiol benzoate (EB) in long-term spayed rats, and on LH release induced by a second injection of EB or 5 mg progesterone given 72 hours after the first EB injection. Septal interruptions did not alter the time sequence and the level of plasma LH rise after ovariectomy, LH decrease created by the first injection of EB and LH release induced by progesterone in the afternoon of the injection. However, LH release in the afternoon of the day after the second injection of EB was remarkably reduced in rats with supracommissural roof cut in which all the transeptal fiber connections were completely transected. This reduction of LH release was not observed in the cases where in postcommissural component of stria terminalis was left untransected or even partially so. In the rats with either medial or lateral septal lesions, estrogen-induced LH release appeared to differ from intact spayed rats in timing and quantity of peak LH secretion on each afternoon of the second EB injection. The results were discussed in terms of central mechanisms involved in positive and negative feedback of estrogen and progesterone on LH secretion.

The former result suggests that endogenous estrogen secretion plays an essential role in the cyclic process to regulate ovulation by way of the specific facilitation of neuronal excitability in the final common pathway regulating LH release. Moreover, the later two studies suggest that the responsiveness of medial septal-preoptic complex to ECS is not deleteriously affected by neonatal androgen which in turn prevents the facilitatory effects of ovarian steroids on LH release after puberty, and that the amygdaloid-strial system may essentially be involved in the positive feedback mechanism of estrogen on ovulatory LH release. Extra-preoptic-hypothalamic elements, especially the amygdaloid-strial influences and the positive feedback effects of estrogen on it, may play the most important role in inducing and regulating the cyclic ovulatory LH secretion.

緒 言

哺乳類の成熟雌性生殖機能は周期的な排卵と発情行動によって特徴付けられる。24時間の照明調節下で飼育された成熟雌ラットは明白な4日及至5日の発情周期を示し、その発情前期から発情期にかけての限られた時間帯に発情行動を現し排卵を起す⁽⁴⁰⁾⁽⁵⁰⁾⁽¹⁵⁵⁾。この周期的な生殖機能の発現は発情前期午後のLH (Luteinizing hormone) 大量分泌即ちLH surgeを中心とする下垂体前葉—性腺系の周期的なホルモン分泌活動によって営まれている。下垂体LH分泌が下垂体門脈系を介して視床下部神経細胞からの化学伝達物質(下垂体向物質)によって支配されている事はHarrisやGuillemin等の人々の一連の研究によって明らかにされてきた⁽⁶¹⁾⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾。この様な視床下部正中隆起部に由来する下垂体向物質からLH分泌を促す単一のLH放出因子(LH-releasing factor, LH-RFLRF)が分離抽出され⁽²⁾⁽¹²¹⁾、更にLH-RHはデカペプチドである事が明らかになり⁽²²⁾⁽⁸³⁾、合成も可能になって来た⁽⁹²⁾。このデカペプチドはin vivo, in vitro共に下垂体からのLH放出を促す事が確認され、生理的なLH放出ホルモン(LH-RH, LRH)と考えられている⁽⁶⁾⁽⁶⁷⁾⁽¹²⁸⁾⁽¹⁴⁸⁾。LH分泌調節の鍵であるLH-RHを産生放出するLH-RHニューロンは視床下部内側底部から視交叉上部領域に広く存在すると考えられて来た⁽²⁸⁾⁽⁶⁴⁾が、最近の免疫組織化学的方法や放射免疫検定法の応用によって特に弓状核(periventricular arcuate nucleus, ARC)の一部に最も集中して局在している事⁽¹⁰⁹⁾⁽¹⁵⁶⁾が明かにされている。このLH-RHニューロンから下垂体門脈系に分泌されるLH-RHが生理的な排卵誘起性LH分泌に必須の役割りを果している事は明らかである⁽⁴⁰⁾⁽⁴⁹⁾⁽¹²⁰⁾⁽¹²²⁾⁽¹³⁴⁾。刺激⁽⁸⁾⁽²⁹⁾⁽⁴⁵⁾、破壊⁽¹⁷⁾⁽⁴⁸⁾、線維連絡切断実験⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾或いは下垂体柄込み実験⁽⁶⁴⁾等の結果はLH-RHニューロンを含む視床下部内側底部(medial basal hypothalamus, MBH)の神経機構が下垂体LHの基礎的分泌を維持し調節する最終共通路としての役割りを果している事を示している。しかしMBH領域の吻側の線維連絡切断⁽⁶²⁾や内側視床前野(medial preoptic area, MPO)及び前部視床下部(anterior hypothalamus, AH)領域の両側性破壊⁽³¹⁾⁽⁵⁰⁾⁽¹³⁸⁾は周期性排卵の発現を阻止する。一方ネプタールで自然排卵を阻止した正常雌ラット発情前期ではMPO領域の電氣的、電気化学的刺激によって排卵が誘起され⁽²⁷⁾⁽⁴³⁾⁽¹⁴³⁾、しかも排卵反応性はMBH刺激のそれより高い⁽¹⁴³⁾。これらの事実から、周期的排卵を誘起するLH surge発現にはMBHの吻側からの神経連絡が必要でありMPO-AH領域がLH surgeをもたらす神経刺激を形成するという二重調節機能の仮説が提起され支持されて来た⁽⁴⁰⁾⁽⁴⁹⁾⁽⁶²⁾。こうしたラット生殖機能の性分化は、胎生期にbipotentialである脳機能が新生児期にアンドロジェンの作用を受けるか否かによって決定される事が明らかになった⁽⁵⁵⁾⁽¹¹¹⁾⁽¹³⁵⁾。生後2~5日の雌ラットに少量のtestosteroneを投与するとpubertyに周期的排卵を起さず連続発情を示す⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁹⁾。この新生児期アンドロジェン化雌ラットのMBHを電気刺激すると正常雌と同様に排卵を誘起するが、MPO刺激反応性は正常雌より低い事実は周期的排卵性LH分泌の二重調節機能の分化を裏付けるものとされ、新生児期の性分化はMPO-AH領域へのアンドロジェン作用によると考えられてきた⁽⁸⁾⁽⁵⁷⁾⁽⁵⁹⁾。更にMPO領域の吻側背側の神経切断を行っても不正規ながら自然排卵を伴う発情周期が維持されるとの報告⁽⁶⁸⁾⁽⁸⁶⁾は、LH surgeをもたらす神経刺激はMPO領域に起因するものであり、二重調節機能のある程度の自動性を示すものと考えられてきた。しかしながらMPOの吻側背側切断動物の死亡率は極めて高く、生存例においては如何なる神経経路が残存していたのか不明であり、またLH分泌の変化も明確でない。更に二重機能の提起及び新生児期アンドロジェン作用部位の仮説の根拠になったアンドロジェン化雌ラットの排卵誘起MPO刺激反応性に対して異論が提示されてきた⁽⁴¹⁾⁽¹⁴²⁾。こうした事から周期的LH surge発現に関与する中枢神経系の中でMPO領域が本質的にはどのような役割りを果しているのか未だ解明されていないと言わねばならない。一方では周期的LH分泌調節の最終共通路をなすMPO-MBH系に対して大脳辺縁系や中脳部が影響を与えている事が明らかにされつつある。特に内側扁桃核系の刺激が種々の実験条件下に排卵を阻止した雌ラットで排卵性LH分泌を引き起こし⁽²¹⁾⁽⁸⁰⁾⁽¹⁵⁰⁾、外側扁桃核系や海馬系の興奮がLH分泌を抑制する⁽³⁸⁾⁽⁵²⁾⁽⁷⁹⁾⁽¹⁵¹⁾。中脳部興奮はLH分泌を促進或いは抑制するが、この作用は扁桃核系と海馬系とのcheck and balance機能を介してもたらされると言われて

いる⁽¹³⁷⁾。こうした事柄は視床下部外の中樞神経系も周期的 LH 分泌調節機能に重要な役割りを果している事を示唆している。しかし正常性周期において LH surge をもたらす trigger 刺激の発現は MPO 領域以下の最終共通路のみで行なわれ視床下部外神経機構はその最終共通路の活動を修飾して生体の置かれた環境に適應される役割りを果しているのか、或いは視床下部外神経機構からのインパルスが LH surge 発現に本質的に必要であるのか、未だ明らかではない。そこで“LH surge の発現に最も重要な神経刺激の形成には如何なる中枢神経機構が関与しているか”を追求する目的で本研究を始めた。

前述した LH 分泌調節中枢機構の解明に先立って、Everett と Sawyer は所謂“臨界時間 (critical period)”の神経活動 (neural surge) によって排卵性 LH surge がもたらされる事を明らかにし、その臨界時間の神経活動は 24 時間周期をもつ timing mechanism によって支配されている事を示した^{(44) (45)}。発情前期 critical period の神経活動をネブタールで抑制すると排卵は 24 時間遅延する⁽⁴⁴⁾、このネブタールで自然排卵を阻止されたラットの本来の critical period 時間に MPO-AH 領域または MBH 領域を刺激すると排卵が起る^{(29) (43) (143)}。更に正常性周期においては発情前期 critical period 以外の時期でも視床前野—視床下部を刺激する事によって排卵性 LH 分泌を起し得るが、排卵発現刺激閾値はいずれの日でも critical period に相当する午後の一定時間に最も低く、更に発情前期 critical period の刺激反応性は他の時期の反応性より著しく高い^{(69) (76)}。これらの事実は、neural surge を形成する中枢神経機構の興奮性は 24 時間周期で変動しているが、その興奮性が発情前期の特殊な内分泌環境において特異的に賦活される結果排卵性 neural surge をもたらす事を強く示唆している。一定の照明調節及び環境条件下では、この LH 分泌刺激神経機構の賦活には血中卵巣ステロイドホルモン動態が最も重要な役割りを果している事が指摘されて来た^{(18) (39) (125)}。特に発情周期に伴う循環血中のゴナドトロピンと卵巣ステロイドホルモンの分泌動態が明らかにされ^{(7) (53) (101) (105)}、非発情第 II 期から発情前期午前にかけてのエストロジェン大量分泌が排卵誘起 LH surge の発現に必須の役割りを果している事^{(47) (83) (125) (128)} が判ってきた。また LH 分泌に先行する少量のプロジェステロン分泌も LH surge 発現に一定の役割りを果している^{(19) (39) (46) (84)} かも知れない。エストロジェン分泌が LH surge をもたらす主要な要因である事はヒト^{(117) (149)} 等の月経周期においても明らかにされている。従ってエストロジェンの LH 分泌に対する促進的影響 (正フィードバック効果) を感受する中枢機構は neural surge を形成する中枢機構と同一乃至は極めて密接な関係を有している事は疑いない。更にエストロジェン、プロジェステロンは一定の内分泌環境では LH 分泌に対して抑制的 (負フィードバック効果) に働らく^{(22) (96) (102)}。こうした負のフィードバック感受機構と正フィードバック感受機構との局在性並びに相互関係は未だ明らかでない。近年の免疫組織化学的方法及び radioautography の応用によりエストロジェンやプロジェステロンを特異的、選択的に取り込む神経系は視床前野—内側底部視床下部という LH 分泌調節最終共通路系のみならず中脳部から前脳部—大脳辺縁系に広く分布している事が明らかになった^{(71) (89) (110) (133)}。本研究ではこれら各フィードバック感受中枢機構を分析し、その中から特にエストロジェン正フィードバック感受機構を明らかにする事により LH 分泌調節殊にその trigger 刺激の形成に最も本質的役割りを果す中枢神経機構の局在と特性を検討しようとした。その為に第一に、エストロジェン感受部位である事が明らかな LH 分泌調節の最終共通路である MPO-MBH 系の興奮性変動におけるステロイドホルモンの役割りを正常雌ラットを用いて電気生理学的に検索した。次いで LH surge 発現に最も重要な正フィードバック機序を欠く新生児期アンドロジェン化雌ラット^{(99) (136)} の内側底部中隔野—視床前野領域電気化学刺激による排卵性 LH 分泌反応を正常発情前期動物のそれと比較検討した。これによって従来から性分化をもたらす新生児期アンドロジェンの作用部位でありその結果雌性機能に分化した脳ではエストロジェン正フィードバック感受機構として LH surge に対する trigger 刺激の発現部位と考えられて来た内側中隔—視床前野領域の役割りを再検討しようとしたものである。この結果視床前野より上位の中樞機構の重要性が明らかになって来た。従来より視床前野と内側底部視床下部間の神経切断^{(16) (62) (63) (140)}、視床前野や視床下部の破壊実験^{(3) (9) (13) (17)}、ステロイド結晶植込み実験^{(26) (35) (91) (115) (131) (132)}、或

或いは分界条や脳弓の切断実験^{(20) (78, 139) (152)}等から視束前野—内側底部視床下部が夫々のステロイドフィードバック感受部位として重要視されて来たが、フィードバック機序における視床下部外神経系の役割りは明らかでない。そこで第三に Caligaris ら^{(23) (24)}の実験に準じて去勢雌ラットを用い、エストロジェン及びプロジェステロンの正負フィードバック効果に対して最終共通路に分散する中隔野領域の神経系切断・破壊はどのような影響を与えるかを検索して視床下部外神経系のフィードバック感受機構への関り方を検討した。以上の結果から LH surge をもたらすステロイドフィードバック感受機構として neural surge 形成に最も本質的な役割りを果す中枢神経機構について考察する。

実験方法及び実験材料

I 実験 I: MPO-MBH系神経興奮性の性周期における変動と、興奮性変動に対する性ステロイドの影響。

性的に成熟した(体重200~250g)ウィスター系雌ラットを恒温条件(室温22°~24°C)及び自動照明調節(14時間——05:00~19:00——明, 10時間暗)下で飼育し, 少なくとも2周期以上連続して4日発情周期を示した正常雌ラット群196匹, 及び同一月令で両側卵巢摘除後2~3週間経過した去勢群63匹を用いた。全ての実験動物は午前10時頃に体重kg当り1.2gのウレタンで麻酔した後, Albe-Fessard ら⁽¹⁾の条件で脳定位固定装置に腹位で固定し, 単一神経発火活動記録用電極, 皮質脳波記録用電極及び電気刺激用電極を脳内に定位挿入する為の開頭手術を行った。即ち頭部皮膚を正中線で切開して頭頂部頭蓋骨を露出し, 一侧の前頭葉直上部頭蓋骨内に2本のステンレス製木ネジを先端が脳表面に接触する様に1~1.5mm間隔でねじ込み, これを前頭葉皮質脳波(FC-EEG)記極用双極電極とした。次に脳内刺激電極としてステンレス線のはり合せ双極電極を内側視束前野領域(medial preoptic area, MPO)に植え込み, 歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。その後に単一発火活動(single unit activity, SUA)記録用微小電極を内側底部視床下部(medial basal hypothalamus, MBH)に刺入する為に頭蓋骨の当該部位を除去して開窓し, その部の硬膜を切開剥離した後, 開窓部を寒天(5%生食)の膜でおおった。寒天被膜は脳表面の乾燥を防ぎ呼吸及び血管運動性の脳動揺を最少にとどめる目的でなされた。手術終了後, 皮質脳波の記録を行い, 急性ウレタン麻酔効果から回復して正常の睡眠・覚醒脳波が持続した時点(通常ウレタン注射後2時間~3時間後)でSUA記録を開始した。SUA記録電極としてタングステン微小電極を用い, 電極から誘導した自発放電活動は前置増幅器(push-pull cathode-follower preamplifier, 日本光電製, ME-3B形)に導き, その出力をポリグラフ(日本光電製, RM-150形)に導いてFC-EEG, 心電図(針電極による標準第二肢導出)と共にペン書きオシログラフに連続的に記録した。更に発火の状態はオシロスコープ(日本光電製, VC-7型)で観察すると共に必要に応じてテープレコーダーに記録した。MPO及びMBHへの刺激電極植込みや微小電極挿入は前記albe-Fessardらのラット脳地図に基づいて行った。記録は全ての実験において午後1時から7時の間に得られたもののみを考察の対象とした。実験終了時に刺激及び微小電極に直流通電(10 μ A, 20sec)を行って電極先端部位の小破壊を作り, 後述の様に電極部位の組織学的検索を行った。

(実験1-A)

正常性周期群の発情前期, 発情期, 非発情第I期及び同第II期にある夫々の動物についてMBH-SUAを記録し, 自発放電活動の分析に必要な充分な時間(10分以上)記録した後に下記の如くMPO電気刺激の効果を検討した。刺激後刺激効果から回復した後に更に微小電極を進入させて別のSUAを記録し, 再び刺激の効果を観察するという具合に, 通常一匹の動物から数個のMBH-MUAを記録して刺激実験を行った。これ以上にも刺激実験が充分に行なわれず自発放電活動のみが記録されたSUAが多数あり, 自発放電分析に用いられた。

刺激は電子管刺激装置(日本光電製, MSE-3R型)を用いて単相性矩形波連続刺激を行った。刺激条件はパルス持続時間0.1msec, 頻度100Hz, 刺激時間は10secと一定にしたが, 負荷電流値は20 μ Aから200 μ A迄20 μ A間隔で10段階を設定した。刺激はまず最小電流(20 μ A)或は自発放電活動を変化させない強さの電流

で行い、順次1分～数分間隔で20 μ Aづつ刺激強度を強めた刺激を試み、刺激中或いは刺激後数sec 以内の放電頻度が、刺激前5～10分間の自发放電頻度の変動幅を明らかに越えて増加又は減少した最小有効刺激電流値を求めた。刺激効果は反復して確認した。但し刺激強度は200 μ Aを越える事はなく、また刺激を繰り返す場合には放電頻度が刺激前のレベルに回復してから行なった。この様にMBH-SUAの放電活動を有意に変化させる有効最小電流値をそのSUAに対するMPO刺激の“刺激閾値”とし、全ての記録したSUAについてこの“閾値”が求められた。尚、記録MBHと刺激MPOは常に同側性であって、反対側MPO刺激効果は本実験では追求しなかった。

(実験1-B)

次に去勢動物群を3群に分けた：①無処置動物群、②エストロジェン処理動物(5 μ gのesradiol benzoate—EB—を実験前々日及び前日の各午前10時に皮下注射した)、③エストロジェン処理後プロゲステロン投与動物(②のエストロジェン処理動物に実験当日の午前10時に2mg progesteroneを皮下注射した)。それぞれの動物について実験1-Aと同一の方法によって弓状核(ARC)ニューロンのSUAに対するMPO電気刺激効果と、“刺激閾値”を求めた。

(実験1-C)

更に無処置去勢動物から上記と同一の方法でARC-SUAを記録し、十分な時間(30分以上)自发放電活動を記録した後に、20 μ gのEBまたは2mgのprogesteroneを午後2～4時の間に単独皮下注射して、刺激前及び刺激後10～15分間隔にMPO刺激を与えて刺激効果と“刺激閾値”の時間経過とを観察した。

II. 実験2：正常発情前期雌ラットと新生児期アンドロジェン処理連続発情雌ラットとにおける内側中隔—視束前野(med—Sept—POA)領域の電気化学刺激の排卵及びLH分泌に及ぼす影響の比較。

実験1と同様の室温及び照明(14時間明、10時間暗)条件下で飼育されたSprague-Dowley系の2群の成熟雌ラットを用いた。一群は体重200～250gで2回以上連続して4日発情周期を示した正常性周期雌の発情前期動物(以下N群とする)を用いた。他群は新生児期アンドロジェン投与によって春機発動後膣垢が連続発情を示しているandrogen sterilized persistent estrous rats(以下A群とする)を用いた。A群動物の作成には同一系の妊娠ラットを購入して胎児を娩出させ、生後2.5日(生後60時間)の雌新生児に10 μ gのtestosterone-propionate(TP)を0.05mlのゴマ油に溶解して背側皮下に注射した。この投与量と投与時間で90～100%の完全連続発情動物を得る事は予備実験で確認した。同一母ラットから出産したTP処置雌新生児全匹に雄新生児を加えて、一母ラット当りの乳児数を8匹として自然哺育を続けさせ、生後28日に母ラットから分離させて以後はアンドロジェン処置雌ラットのみを1ケージに3～4匹入れて飼育した。生後60日より連日膣垢を検査し、2週間以上完全な連続発情を呈した動物のみを実験に用いた。

実験はN群・A群共に排卵阻止量のpentobarbital sodium(PB)32.5mg/kg体重当りを本実験におけるcritical period開始15～20分前、即ち13:40～13:45に腹腔内注射し(PB処理)。脳定位固定後一側の内側中隔—視束前野領域の電気化学刺激⁽⁴³⁾⁽¹⁴³⁾を行った。N群・A群共に以下の3群に分けた。

- ④ PB処理をしない無処理対照群
- ⑤ PB処理、手術対照群
- ⑥ PB処理、電気化学刺激群

更にA群においては、次の2群が設けられた。

- ⑦ エーテル麻酔下手術対照群
- ⑧ エーテル麻酔下電気化学刺激群

④、⑥両群はPBを投与せず手術時に短時間のエーテルが負荷された。⑤～⑧群はラット脳定位固定装置にDe Groot⁽³³⁾の固定条件で固定し、開頭後刺激電極挿入路に当る頭蓋骨をドリルで開口し、De Grootのラット脳地図に従って内側中隔—視束前野領域の任意の一点に刺激電極を一側性に刺入した。刺激電極としてはステンレス同心双極電極を用い内心を陽極として直流通電を行った。刺激には電子管刺激装置(Gra-

ss, S-8型)を用い, mA電流計を直列に入れて電流値を計測しつつ電流を指標とする刺激を行った。①及び④群の手術対照群の場合は電極を当該部位に刺入後一分間留置するのみであった。②及び③群の刺激群では20 μ A, 40 μ A又は80 μ Aを一分間通電してから電極を取り外し, 直ちに動物を固定器から解放した。手術及び刺激実験は全て14:30~15:30行なわれた。但し③群の場合には40 μ A刺激のみを用いて10:00, 14:00, 18:00の夫々の時間における刺激効果の比較を行った。一匹の手術及び刺激に費やされた時間は通常5分以内であり, ①, ③群の場合も正味のエーテル麻酔時間は3分程度であった。

全ての実験動物から下記のスケジュールに従って, エーテル軽麻酔下で外頸静脈から一回0.8mlが採血され, ヘパリン処理小試験管に移された。採血時間は③群では10:00am, 14:30pm, 15:30pm, 17:00pm及び翌朝10:00amであり, ①~④群の場合は10:00am, 手術対照或は刺激後30分, 90分, 180分及び翌朝10:00amであった。N群, A群の実験群に加えもう一群, 外頸静脈から心臓カテーテルを挿入留置した正常発情前期動物を用い, 無麻酔・無拘束下にcritical periodから夜間にかけて数回採血を行った。これは無処置・無麻酔動物における正常LHサージを観察し実験群の対照とする事が目的である。実験群において連続採血を行う場合, 3回目以降は0.9%食塩水に10% dextraneを加えた溶液を腹腔内注射によって補液し, 無処置発情前期動物では血漿分離後の赤血球を採血漿量と同量の乳酸リンガー液に混和して心臓カテーテルから体内に返還した。採血した血液は直ちに遠心沈澱を行って血漿を分離採取し, LH定量に用いる迄-20°Cで凍結保存をした。

全ての動物について実験翌朝10時に採血した後に両側の卵管を摘出して卵管膨大部の卵の有無・排卵数を顕微鏡下に観察した。卵管摘出後に後述する様に脳を取り出し, 組織学的に刺激電極先端部位の検索と刺激範囲の測定を行った。

III. 実験3: LH分泌に対する性ステロイドホルモンのフィードバック効果と, 中隔野領域の神経切断及び破壊の影響

実験1, 2と同一条件で飼育された体重200-250gのSprague-Dowley系成熟雌ラットを用いた。2回以上連続して4日乃至5日発情周期を示した動物を用い, 発情前期の前日の12:00-14:00に両側卵巢を摘出して以下の4つの実験群に分けた。

a) 去勢対照群(以下C群とする) 卵巢摘出の前日即ち非発情第I期から去勢後7週間に亘って午後17:00採血を行った群

b) 卵巢摘出後に外側中隔野を両側性に電氣的破壊を行った群(LS群)

c) 去勢後正中中部より内側中隔野を電氣的破壊を行った群(MS群)

LS群, MS群の破壊はエーテル麻酔下で脳定位固定した後に白金線電極を用いて直流通電(3mA, 15sec)によって行った。手術及び電極挿入は実験2の方法に準じて行なわれた。

d) 中隔野領域を通過して背側よりMPO-AH領域に到達する全ての神経連絡を分界条(stria terminalis, ST)及び脳弓(fornix)と共に, 前交連(anterior commissure)直上の高さで水平に切断する"roof-cut"⁽¹⁵²⁾を行った群(RC群)。このroof cutにはVoloshin-typeのwire knifeを自作して用いた。ラットをエーテル麻酔下でAlbee-Fessardの固定条件で脳定位固定器に固定して開頭し頭蓋骨を露出してからwire knifeの外筒の先端を頭蓋骨上正中縫合とBregmaとの交点に設置し, 硬膜の高さから5.5mmナイフ全体を刺入した。挿入後タングステン線ナイフを2.5mm外筒先端から突出させ, 吻側方向に180°数回にわたって半回転させた。

以上のLS或いはMS破壊またはroof cutは去勢4~5週後に行った。これらの手術群は手術前日から手術後3週間にわたって17:00pmに採血を受けた。4実験群の具体的な採血スケジュールは結果の項に示してある。

C群では去勢後第七週に, 他の3破壊群では破壊手術後第四週目に性ステロイドホルモンを投与した。まず

20 μ g の estradiol benzoate (EB) を 12:00 を皮下注射した。この第 1 回 EB 注射後全実験群を夫々 2 群に分け、一群では第 1 回 EB 投与 72 時間目に再度 20 μ g EB を皮下注射し、他群では第 1 回 EB 投与 72 時間目に 5 mg の progesterone を皮下注射した。全実験群において半数の動物は第 2 回ステロイド投与後は 10:00am に残り半数の動物は同じく 17:00pm に連日採血した。第二回目のステロイド投与後は全ての動物から 10:00am と 17:00pm の 2 回採血した。採血はエーテル軽麻酔下で心臓穿刺によって行い、ヘパリン処理小試験管に移された血液は直ちに遠心沈澱して血漿を分離採取し LH 濃度定量の為に凍結保存した。

試料の処理。

(脳の組織学的検索)

実験 1 の刺激電極及び微小電極先端部位の同定、実験 2 の電気化学刺激部位の検討、或いは実験 3 の脳破壊部位の検討を加える為に実験終了後次の処理を行った。即ち実験終了直後に開胸して心臓(左心室)にカニューレを刺入し、実験 1 及び 2 の動物では先ず 3% フェリシアン化カリ溶液と 3% フェロシアン化カリ溶液の等量混合液を約 5 ml 灌流し、次いで 10% フォルマリン溶液を 10~15 ml 灌流した。実験 3 の動物では 10% フォルマリン溶液のみを灌流した。これによって固定された脳を取り出し更に 10% フォルマリン溶液中にて固定した後に、脳の当該部位から凍結切片法により厚さ 60 μ の前額面連続組織切片を作成し、carbol-fuchsin 染色を行った。実験 1 及び 3 の場合は Nissle 染色も併用した。実験 1 及び 2 のステンレス刺激電極先端から直流通電によって遊離拡散した鉄イオンはフェリシアン化カリ、フェロシアン化カリによって青染される。実験 2 の場合はこの青色染色部を刺激範囲とした。タングステン微小電極の場合直流通電による破壊部位は極めて小さく(5~10 μ) SUA 記録ニューロンの同定が可能であった。

(血漿 LH 濃度測定)

血漿 LH 濃度は Niswender ら⁽¹⁰⁸⁾の方法に準じて Radioimmunoassay (RIA) にて定量した。LH-RIA kit は National Institute of Arthritis and Metabolic Disease (NIAMD) の Rat Pituitary Program から提供されたものを用い、試料は二重試験法にて定量された。LH 標準試料として NIAMD-Rat-RP-1 (力価は NIH-LH-S 1 の 0.3 倍)を用いた。

(有意性の判定)

平均値の差の検定には t 検定を用い、他の検定を利用する場合は当該箇所に記載した。有意性の判定は $P < 0.05$ を規準とし有意性の程度については記載しなかった。

結 果

I. MPO-MBH 系神経興奮性の性周期における変動と、性ステロイドの役割り。

1) 発情周期における ARC ニューロン発火活動の変化。

ARC 内に同定されたユニットの平均放電頻度には発情周期の時期によってまたユニットによって大きな差が認められた。一定の放電頻度が持続する定常放電型ユニット(229 ユニット)では平均放電頻度が発情前期動物で最も高く(平均 5.3 Hz)、非発情第 I 期では最も低い(平均 1.2 Hz)。両者の差は統計学的に有意である。発情期及び非発情第 II 期における平均放電頻度は発情前期と非発情第 I 期との中間値を示した(図-1 参照)。このような発情周期に伴う放電変化は定常放電型ユニットに限らず、全 ARC-SUA の 30% を占める群発放電型ユニット(群発火と無発火とを繰り返す放電様式) 98 ユニットでも認められ、群発火の放電頻度は発情前期(36 ユニット)及び発情期(25 ユニット)動物で高く、平均群発火放電頻度は平均 2~5 Hz で、最も頻度の高いユニットでは平均 15 Hz を記録した。非発情期では無発火間隔が延長するのみならず、発火相の平均放電頻度もほとんど 0.5 Hz 以下であった。本実験では更に MPO-SUA も記録された。その平均放電頻度は ARC ユニットより低いが発情周期に伴って ARC ユニットと同様の変化を示し、発情前期で最も高く、非発情第 I 期で最も低かった。そして発情期及び非発情第 II 期は両者の中間であった(図-1 参照)。

Fig. 1 Cyclic changes of mean unit firing rate in the arcuate nucleus (ARC) and the medial preoptic area (MPO) on the different days of the 4-day estrous cycle in rats. P, proestrus; E, estrus; DI and DII, first and second day of diestrus.

Fig. 2 Schematic illustration of the effect of MPO stimulation on unit activity in the medial basal hypothalamus. A): during different stages of 4-day estrous cycle. P, proestrus; E, estrus; DI DII, 1st and 2nd day of diestrus. B): in ovariectomized rats. a, nontreated; b, estrogen-primed; c, estrogen and progesterone-primed. Open circles, increased unit firing; solid circles, decreased unit firing; solid triangles, no change in unit firing. ARC, periventricular arcuate nucleus; VMH, ventromedial hypothalamic nucleus.

卵巣摘除後2～3週経った無処置去勢群におけるARCユニットの放電は一般に極めて低くほとんど0.5Hz以下であり、無発火ユニットでは群発火がほとんど認められず1分間に1～数発が散発する放電であった。EB処理及びEB処理progesterone投与動物における平均放電頻度は持続放電型ユニットでは正常性周期の発情期或いは非発情第II期のレベルに等しく、群発火型ユニットでは無発火と交替する群発火の放電頻度は比較的に低く平均群発火頻電頻度が1 Hzを越える事はなかった。

2) 発情周期におけるMPO刺激のARC-SUAに対する効果(実験1-Aの結果)

MPO及びMPOの吻側に隣接するブローカの対角帯核(Diagonal Band of Broca, DBB)領域の電気刺激は発情周期を通じてARCの自発放電を刺激中から刺激直後にかけて増加させた(刺激効果が確認されたARCユニット数は発情前期で18ユニット, 発情期22, 非発情第I期12, 同第II期14)。刺激によって増加した放電は刺激終了5 sec後には刺激前の放電頻度に戻った。ARCの背側にある腹内側核(ventromedial hypothalamus, VMH)や、VMHとARCとの境界領域のユニットの放電はMPO刺激により刺激中抑制された。またARCの腹側, median eminence (ME)領域から記録されたユニットの放電は刺激強度を強いても顕著な変化を示さず、ARCユニットの変化は特異的な変化であったと言えよう。

この様にARCニューロンに対するMPO刺激効果は発情周期を通じて一様であったが、“刺激閾値”は周期によって大きく変動した。同一発情周期では“閾値”はほとんど一定値を示し、MPO刺激の効果とDBB刺激効果とは等価であった。図3, 4に見られる様に“刺激閾値”は発情前期動物で最も低く40～60 μA であったのに対し、非発情第I期で最も高く(180～200 μA)、発情期(80～120 μA)、非発情第II期(80～120 μA)ではその中間であった。即ちARCユニットの放電を増加させるMPO-DBB領域の刺激閾値は性周期に依存する明らかな周期的変化を示した。

3) 去勢雌ラットのMPO-ARC系神経活動興奮性に対する性ステロイド投与の影響(実験1-B及び1-Cの結果)

MPO-DBB領域の刺激は無処置去勢群(14ARCユニット)、EB処理群(16ユニット)、EB処理Progesterone投与群(12ユニット)の全てのARCの放電活動を刺激中から刺激直後にかけて増加させた。しかし“刺激閾値”は無処置去勢群で180 μA と高いのに対し、性ステロイド投与の両群では40～60 μA と発情前期動物のレベルの閾値を示した。即ちEB投与により閾値が発情前期と同レベルに低下した。Progesterone投与はEB投与による効果をほとんど変化させず僅かに閾値を上げる傾向が認められた(図4参照)

EBの単独皮下注射後、ARCユニットを増加させるMPO刺激の刺激閾値は著明に低下した。図5に見られる様にステロイド投与前の閾値は180 μA 以上であるが、EB注射後は閾値が漸減し平均して注射後3.5時間には最小閾値40～60 μA に達した(12ユニット)。これに対しprogesterone注射後も閾値は若干低下し平均3.5時間後に最小値に達するがその最小閾値は8例中6例で160 μA 、2例で140 μA であった。EB単独投与後の閾値は発情前期レベルと同一であったが、progesterone単独投与後のそれは非発情第II期の閾値より明らかに($P < 0.05$ で有意)高かった。

II. 正常発情前期ラット(N群)と新生児期アンドロジェン処理ラット(A群)とにおける内側中隔一視束前野領域電気化学刺激の排卵及びLH分泌に及ぼす影響の比較。

1) 排卵から見た電気化学刺激効果の比較。

Pentobarbital (PB)で自然排卵を阻止したN群とA群(以下PB-N群, PB-A群と記す)の内側中隔一視束前野領域電気化学刺激による排卵誘起率と排卵数を表1にまとめて示す。N群では無処置対照群、無麻酔無拘束下採血群共に翌朝100%の動物に完全排卵(両側排卵数の合計が7以上を完全排卵とする)が得られた。PB-N手術対照群では排卵は全く認められなかったのに対して電気化学刺激群では排卵を誘起した。刺激群における排卵率は刺激強度と平行して増加し、平均排卵数もまた刺激と平行する傾向が認められた。80 μA における排卵誘起率は20 μA 及び40 μA に対して有意(Fisher's exact probability test⁽¹²⁹⁾, $P <$

0.05) に高かった。40 μ A における排卵誘起率は20 μ A のそれに対しては有意の差がないが、手術対照群に対しては有意であるので、40 μ A がPB-N 群の排卵誘発閾値と考える事が出来る。一方PB-A 群でも手術対照群では排卵が認められず、電気化学刺激群で排卵が誘起されたが、全ての刺激強度で排卵誘起率が50%以下であり刺激強度間の有意差が認められなかった。しかも全ての刺激における排卵誘起率は手術対照群とも有意の差がなかったので PB-A における排卵誘発刺激閾値を決定する事はできなかった。唯排卵数には刺激強度による有意の差が認められた。

Fig. 3 Examples of the effects of MPO stimulation on the spontaneous single unit firings in the ARC with simultaneous EEG recordings of the frontal cortex during the stages of the 4-day estrous cycle (P, proestrus; E, estrus; DI and DII, 1st and 2nd day of diestrus). In each stage of the cycle the upper record was obtained during sub-threshold stimulation, and the lower record during threshold stimulation. Under lines with current strength indicate the duration of repetitive stimulation (pulse duration, 0.1 ms; frequency, 100 Hz.)

Fig. 4 Changes in the threshold current (ordinate) of MPO stimulation which facilitated ARC unit activity during the 4-day estrous cycle (A) and in ovariectomized rats (B). Abscissa A: 4-day cycling rats. P, proestrus; E, estrus; DI and DII, 1st and 2nd day of diestrus. Abscissa B: spayed rats. a, non-treated; b, estrogen-primed; c, estrogen and progesterone-primed.

Fig. 5 Individual examples of changes in threshold current (ordinate) of MPO stimulation which increased ARC unit activity produced by the subcutaneous injection of 20 μg estradiol benzoate (o—o) or 2 mg progesterone (●—●) in spayed rats. The abscissa indicates the time (hours) after the injection of estrogen and progesterone administered at 14:00.

Table 1. Ovulatory response to unilateral electrochemical stimulation (ECS) of the medial basal septo-preoptic area in normal (N) and androgenized (A) pentobarbital-treated adult female rats.

ECS		OVULATION		
GROUP	μA	NO. OF RATS	%	NO. OF OVA*
N	80	8/8	100 ^a	11.1 $\pm$ 0.7 ^b
	40	11/21	52 ^a	8.4 $\pm$ 1.0
	20	3/17	18 ^a	8.3 $\pm$ 0.7
	SHAM	0/6	0 ^a	-
	CONTROL	6/6	100	9.3 $\pm$ 0.5
A	80	3/9	33	7.7 $\pm$ 1.9
	40	8/20	40	6.6 $\pm$ 1.3
	20	3/14	21	4.3 $\pm$ 2.8
	SHAM	0/6	0	-

* Mean $\pm$ S.E.

^a Sig. diff. from each other ($P < 0.01$) Fisher exact probability test⁽¹²⁹⁾

^b Sig. diff. from control ($P < 0.05$)

2) 血漿 LH 濃度による刺激効果の比較.

無麻酔無拘束発情前期動物の LH 分泌動態を図 6 に示した. 血漿 LH は本実験系の critical period (14:00~16:00) の後半から増加し始め, critical period 後 30 分~2 時間内に最高値に達した. LH 分泌の時間経過及び最高血漿 LH 濃度は個体によって大きな差異があり, 平均最高 LH 分泌時間及び平均最高 LH 濃度を決定する事は難しい. この LH 分泌動態のばらつきはエーテル麻酔下に採血のみ行った無処置対象発情前期動物においても認められ, 各個体の最高 LH 濃度は 14:30 (1/7 例), 15:30 (4/7 例), 17:00 (2/7 例) のいずれの採血時間にも認められ, その最高 LH 値は 100~1000 ng/ml の種々の値を示した. PB-N 手術対照群では午後における LH 濃度の上昇は認められず, むしろ若干の LH 濃度減少傾向が見られた (図 6 参照). しかしこの低下は午前の平均 LH 濃度に対して有意の変化ではなかった. N 群の 10:00 における平均血漿 LH 濃度は $31.3 \pm 1.4 \text{ ng/ml}$ RP-1 (平均 $\pm$ 標準偏差, 44 例) であったが, A 群のそれは $33.2 \pm 1.2 \text{ ng/ml}$ (35 例) と全く差がなかった. A 群の無処置対照群, 手術対照群共にその午後の血漿 LH 濃度或いは手術後の LH 値は午前値と有意差なく, 実験時間 (採血時間) を通じて一定の LH 濃度を示した.

以上の様に PB-N 群と PB-A 群との午前 10:00 の血漿 LH 値が等価であり, かつ夫々の手術対照群では排卵が誘起されず, その血中 LH 値の変化は無処置 PB 麻酔対照群と有意差がない. そこで刺激後の LH 分

Fig. 6 Plasma LH concentrations in unanesthetized control and pentobarbital-treated sham-stimulated proestrous female rats. (Data of Kubo, Mennin and Gorski, 1975¹⁵⁷)

泌反応を、10:00の血漿 LH 濃度を 1 とする相対的な濃度比をもって表わし、各個体間及び実験群間の比較を行った。これによって各個体の基礎分泌の差或いは RIA 測定系の差を消去する事にした。そして排卵の有無によらず刺激後30分又は90分における LH 濃度比が夫々の実験系 (PB-N, PB-A, E-A) の無処置対照群の血中 LH 濃度比の99%信頼限界を越えた場合を LH 分泌反応陽性とし、刺激後90分にわたって一度も99%信頼限界を越えない場合を LH 分泌反応陰性とした。表2に示した様に図一の刺激強度による LH 分泌反応陽性率は PB-N 群と PB-A 群で差がなく、また本実験の刺激強度範囲では LH 分泌反応の有無は刺激の強さに依らず、後述する様に刺激部位にのみ依存した。

Table 2. The proportion of normal (N) and androgenized (A) pentobarbital-treated rats which did or did not respond to electrochemical stimulation of the medial basal septo-preoptic area.

GROUP	CURRENT	NO. RATS STIMULATED	NO. RATS RESPONDING	NO. RATS NOT RESPONDING
N	20 μ A	17	12	5
A	20 μ A	16	12	4
N	40 μ A	22	14	8
A	40 μ A	21	16	5

電気化学刺激により LH 分泌反応を示した各個体の LH 濃度比変化を図7に、各実験系一各刺激強度の平均 LH 濃度比変化を図8に示した。図7では排卵陽性例を実線で、排卵陰性 LH 分泌反応陽性例を点線で示した。両動物群の全ての刺激強度について刺激後30分の LH 濃度は有意に高まっていたが、刺激の強さによる差は認められなかった。各個体別にみた最高 LH 濃度は刺激後30分にも現われているが、大多数は刺激後90分に最高に達しており、平均 LH 濃度でみると全ての刺激で90分が最高であった。そして40 μ A 及び80 μ A

での90分の平均値は30分値より有意に高かった。刺激後90分には刺激強度とLH分泌反応の相関が明らかに認められ、PB-N群では80 μ A刺激効果は40 μ Aのそれより有意に高く、両動物群において40 μ AでのLH分泌反応は20 μ Aのそれより有意に高かった。刺激後3時間のLH値は刺激後30分値に迄低下しており、刺激強度による差は認められなかった。そして40 μ A及び20 μ A刺激の全ての時間において、PB-N群とPB-A群との平均LH値の差は全く認められなかった。排卵とLH分泌の関係を見ると、PB-N群では排卵誘起最小ピークLH濃度比は1.92 (69.8ng/ml)であったのに対し、PB-A群では3.6 (118.6ng/ml)であった(図7参照)。

40 μ A刺激によるE-A実験系では10:00, 14:00, 18:00の夫々の刺激時間による排卵誘起率の差は認められなかったが、刺激後90分における最高LH濃度比をみると、14:00刺激の場合が他の刺激時間の効果より有意に高かった。18:00と10:00との刺激効果の差は認められなかった(図9参照)。

Fig. 7 The effects of unilateral electrochemical stimulation (ECS) on individual plasma LH levels in normal proestrous (N) and androgenized (A) pentobarbital-treated adult female rats. a, normal rats stimulated at 20 μ A; b, androgenized rats at 20 μ A; c, normal rats at 40 μ A; d, androgenized rats at 40 μ A. Solid line indicates LH levels in the rat which ovulation was induced by ECS, and dotted line LH levels in the rat failed to ovulate but responded to ECS. Dotted region represents 99% confidence limits of sham-stimulated rats in each N and A animals.

Fig. 8 Mean plasma LH levels of normal and androgenized pentobarbital-treated rats following unilateral electrochemical stimulation of the medial basal septo-preoptic area at 20 μ A, 40 μ A or 80 μ A.

TIME OF MPO-ECS	NO. RATS TESTED	NO. RATS OVULATED	NO. RATS LH-RISED
14:00	6	5	6
10:00	5	3	5
18:00	5	4	5

Fig. 9 Ovulation and LH secretion responded to unilateral electrochemical (EC) stimulation of the medial basal septo-preoptic area at different time in androgenized adult female rats. Upper table indicates the proportion of ovulation and LH secretion responded to the stimulation.

Fig. 10 Localization of electrode sites at which electrochemical stimulation at 20 μ A (a and b) or 40 μ A (d and e) elicited a LH response (solid circles) or no response (broken circles) in normal proestrous (N) or androgenized female (A) rats. a and d, series of frontal sections; b and e, horizontal overview (androgenized rats on the left, and normal rats on the right); c, schematic sagittal section of a rat brain illustrating the coordinate system utilized for electrode localization. A ventral plane (V) at the anterior border of the anterior commissure is taken as a-p 0. The plane of a hypothetical horizontal overview (H) just above the level of the anterior commissure is shown. Abbreviations: AC, anterior commissure; ACB, nucleus accumbens; AHA, anterior hypothalamus; DBB, diagonal band of Broca; LS, lateral septum; MPO, medial preoptic area; MS, medial septum; OC, optic chiasma; SCH, suprachiasmatic nucleus; ST, bed nucleus of stria terminalis.

3) LH 分泌反応を誘起した刺激部位の局在性とその拡がりについて。

直流通電によってステンレス内心電極先端から遊離し拡散する鉄イオンの青色染色範囲は鉄イオンによって刺激される部位の大きさを現わしている。刺激範囲の大きさは刺激部位には依存せず刺激強度に平行しており、脳前頭断面で実測した青色染色範囲（即ち電気化学的刺激範囲）の平均（±標準誤差）直径は $20\mu\text{A}$ 、 $40\mu\text{A}$ 、 $80\mu\text{A}$ の通電で夫々 $360\pm 64\mu$ 、 $468\pm 64\mu$ 、 $632\pm 76\mu$ であった。この刺激範囲の大きさは実験系または実験群によって全く差が認められなかった。刺激部位と刺激範囲の判定の為に 60μ の連続組織切片を用いて、図10-cに示した様に前交連正中中部前縁をO指標として（apO），前(a)後(p)に 180μ の間隔にとった前頭断面図に正確に写し取った。図10ではいくつかの前頭断面図に代表させて刺激部位を投影し、刺激範囲の大きさは先に示した青色染色範囲直径の平均値をもって示してある。

図10に示した様に LH 分泌反応を誘起した部位は PB-N 刺激群、PB-A 刺激群共に前交連の高さより腹側の内側正中中部に局在している。 $20\mu\text{A}$ 、 $40\mu\text{A}$ 刺激共に吻側では対角帯の前頭断面における水平脚と垂直脚との接合部に存在する腹側対角帯核及び背側対角帯核（吻側内側中隔核）の刺激で LH 分泌を誘起する。しかし対角帯の両肢接合部の外側寄りや背外側部の刺激即ち対角帯核の細胞群が直接刺激されない場合には LH 分泌は引き起こされない。尾側の方では MPO 及び正中視束前野（median preoptic area）やその底部更には視索上核（suprachiasmatic area, SCH）の刺激で LH 分泌を起した。後で両動物群の $20\mu\text{A}$ 、 $40\mu\text{A}$ 刺激に共通して LH 分泌を起した刺激部位は対角帯核、吻側内側中隔核、内側及び正中視束前野とその底部領域に広く分布していた。この LH 分泌誘起部位内では同一強度の刺激に対しては同等の LH 分泌反応性を示した。そして PB-N 実験系と PB-A 実験系との間には刺激局在性の差及び LH 分泌反応性の差は全く認められなかった。

Fig. 11 Influences of septal interruptions on the increase of plasma LH levels (and SD of mean) induced by ovariectomy (ovrex). Blood was collected at 17:00 in colony time in every case's except 1-a in control bled at 10:00. LS lesion, bilateral electrolytic lesions of lateral septum; MS lesion, electrolytic lesion of medial septum; roof cut, preoptic-hypothalamic deafferentation at the horizontal level of the anterior commissure. (unpublished data of Kubo and Gorski)

III. LH 分泌への性ステロイドフィードバック効果に対する中隔野領域の神経切断及び破壊 (Septal Interruption) の影響.

1) 去勢後 LH 分泌増加 (エストロゲン欠如に対する負フィードバック) に対する septal interruption の影響.

正常性周期を有する雌ラットの非発情第 II 期に両側卵巣摘出を行うと血中 LH 値は増加する. 特に平均血漿 LH 濃度は去勢後 10 日 ($197 \pm 20 \text{ ng/ml}$, 平均 $\pm$ 標準偏差) から直線的に増加して去勢後 40 日には最高値 ($557 \pm 50 \text{ ng/ml}$) を示す. この最高値は非発情午後の LH 値 ($22 \pm 2 \text{ ng/ml}$) の約 25 倍に達する. 40 日以後はこの最高値レベルを維持した (図 11 参照). 去勢 20 日目に内側或いは外側中隔野破壊を行った MS 群或いは LS 群では, 去勢後 20 日から 40 日にかけての直線的増加を全く変える事なく無処置去勢群 (C 群) と同一の平均血漿 LH 濃度を示した. 去勢後 35 日目に roof cut を行った RC 群では術後 5 日目に平均 LH 濃度の低下が認められ, 以後術後 20 日にかけて C 群の平均平衡値よりやや低い値で平衡状態を保っていた. しかしいずれの時点でも C 群の血漿 LH 濃度と有意の差がなく, roof cut によって LH 分泌は影響を受けなかったと言える.

2) 無処置去勢群 (C 群) における性ステロイド投与の LH 分泌に及ぼす影響.

C 群における第一回 $20 \mu\text{g}$ EB 投与, その 72 時間目の第二回 $20 \mu\text{g}$ EB 投与或いは 5 mg progesterone 投与の効果を図 12-A に示す. 第一回 EB 投与後血漿 LH 濃度は有意に低下し, その低いレベルを 3 日間維持した. この状態で第二回目の EB 投与を行うと投与日午後 LH 分泌増加傾向が認められ, 2 日目午後には大量の LH 分泌が誘起された. 3 日目午後の LH 濃度は第一回 EB 投与後第二回投与前のレベルと同一であったが, 同日午前値よりは有意に高かった. 一方第一回 EB 投与 72 時間後の progesterone 投与は投与日午後には大量の LH 分泌を誘起した. Progesterone 投与第 2~3 日では午前値・午後値共血漿 LH 濃度が progesterone 投与前のどの時点の LH 濃度よりも有意に低い値が持続した.

3) LH 分泌への性ステロイドフィードバック効果に対する septal interruption の影響.

(1)……図 12, B~D に示した如く septal interruption を受けた全ての群 (MS 群, LS 群, RC 群) において, 第一回 EB 投与後の血漿 LH 濃度の減少, 及びその 72 時間後の progesterone 投与により誘起される投与日午後的大量分泌は C 群のそれと全く有意差がなかった. MS・LS 両破壊群では破壊の大きさは完全破壊から約 1/3 の領域のみの部分破壊迄さまざまな程度であり, また RC 群の場合も 13 匹中 4 匹において分界条や脳弓の一部或は分界条床核から視床前野-視床下部への放散路の一部が切断されずに残っていた. しかしこれら全破壊群や完全切断群と部分破壊群や部分切断群の間には, 第一回 EB 投与後の LH 分泌低下及び LH 分泌低下及び progesterone 誘起 LH 大量分泌の量的及び時間経過の差が有意な現象としては認められなかった.

(2)……これに対し第二回 EB 投与後の LH 分泌は中隔野破壊によって大きな変化を受けた. MS・LS 両群共 LS 群の投与日午後を除いて投与第一~三日の全午後値が午前値より有意に高かった. しかし EB 2 回投与後のピーク LH 濃度の変化の個体差は極めて激しく, 個体毎の最高ピーク LH 分泌は両破壊群共 3 日間のいずれの日にも出現した. 従って各午後値の分散が大きく第二回 EB 投与後の 3 日間を通じて午後値間の有意差は同一群内においても両群間においても認められなかった. しかし平均 LH 濃度で見ると (図 12 参照) MS 群では最高ピーク平均値が第二回 EB 投与当日の午後に, LS 破壊群では投与第 3 日目午後に現われており, 対照群における最高ピーク LH 分泌の出現日——投与第 2 日目午後——より前後に 1 日ずつ偏位していた. この最高ピークの偏位と, 破壊部位や破壊の大きさとの相関は, 本実験では明らかにできなかった.

(3)……RC 群の第二回 EB 投与後の血漿 LH 濃度変化においては, 切断の程度による差がはっきりと認められた. RC 群 8 匹中 3 匹においては投与第 2 日目午後の LH 分泌が対照群 (C 群) のそれと全く同等に現われたのに対し, 残り 5 例では投与 2 日目午後の LH 分泌が完全に抑制された. 後者の 2 日目午後値は第二

Fig. 12 Effects of a priming injection of 20 µg estradiol benzoate (EB) and a second dose of 20 µg EB or 5 mg progesterone (PROG) administered 72 hours after the first EB injection on mean plasma LH levels (and SD of mean) in long-term ovariectomized rats with or without the septal interruptions: A) control spayed rats; B) spayed rats with lateral septal (LS) lesions; C) spayed rats with medial septal (MS) lesions; D) spayed rats with roof cut. The solid lines indicate LH levels before and after the first and second injection of EB. The broken lines indicate that after the second injection of progesterone after EB-priming. In the case of roof cut the cross hatched line shows the LH values after the second dose of EB in rats with histologically complete roof cut. Blood samples were collected at 10:00 (am, in abscissa) and 17:00 (pm), and any steroid was injected at noon. Intrinsic histologies in B) and C) demonstrate the examples of complete lesion and incomplete lesion of each LS and MS. (unpublished data of Kubo and Gorski)

回 EB 投与前の低 LH 値のレベルであったが、同日午前値に対しては有意に高い値（午前値 $117 \pm 13 \text{ ng/ml}$ 、午後値 $253 \pm 37 \text{ ng/ml}$ ）であった（図12D 参照）。

これら 8 例の神経切断状況を図13の脳組織切片図にまとめて示した。第二回 EB 投与 2 日目午後の LH 分泌が完全に抑制された 5 例では、吻側において前交連両側吻側枝間に、また尾側では両側内包間に縦走する全ての神経線維が完全に切断されていた。但し 5 例中 2 例では脳弓の postcommissural component の一部が切断されずに残っていた。これに対し対照群と同一の LH 分泌を示した 3 例では図13中の矢印で示した部分が切断されずに残っていた。この 3 例中 2 例では脳弓の pre- 及び post-commissural component が完全に切断されており、3 例に共通して切断されなかった部位には分界条の post-commissural component の一部或いは分界条床核から視床前野-視床下部に放散する線維群の一部が含まれていた。分界条の supracommissural component 中の視床下部に放散する線維群は 3 例全例において完全に切断されていた。

Fig. 13 Series of sections of individual transections reduced (A) or failed to reduce (B) LH secretion induced by the second dose of $20 \mu\text{g}$ estradiol benzoate (EB) 72 hours after EB-priming in the spayed rats with roof cut. Arrows in B) indicate the site of failure to cut. Abbreviations: ACB, nucleus accumbens; ARC, arcuate nucleus; BST, bed nucleus of stria terminalis; CA, anterior commissure; CH, commissura hippocampi; CI, internal capsule; CO, optic chiasma; CP, posterior commissure; DB, diagonal band of Broca; EX, fornix; GP, globus pallidus; LPO, lateral preoptic area; LS, lateral septum; MFB, medial forebrain bundle; MPO, medial preoptic area; MS, medial septum; SCH, suprachiasmatic nucleus; SM, stria medullaris thalami; ST, stria terminalis; V, lateral ventricle. (unpublished data of Kubo and Gorski)

考 察

性ステロイドホルモン (estrogen 及び progesterone) が脳内諸神経系の興奮性に特異的な影響を与えて神経内分泌機能の発現に大きな役割を果たしている。この事は川上と Sawyer⁽⁷⁴⁾⁽⁷⁵⁾ による脳内覚醒反応及び EEG after-reaction 誘発閾値に対する性ホルモン作用の研究に始まり、著者の研究成果⁽⁶⁰⁾⁽⁷³⁾⁽⁷⁹⁾⁽⁸⁷⁾ 即ち性的末梢刺激に対する脳内諸機構の反応性が性ステロイドによって特異的な影響を受けるという事実等により明らかにされつつある⁽¹¹⁾⁽³⁰⁾。本実験 I の結果は周期的排卵性 LH 分泌の最終共通路をなす視床前野領域 (後述

する様に対角帯や内側中隔を含む広範囲な神経系が関与しているが)一視床下部弓状核系(MPO-ARC系)の神経興奮性変動がラット発情周期における内因性エストロジェン環境の変動⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰⁵⁾と密接な関係を有していることを示している。ARCニューロン活動を促進するMPO刺激の“閾値”を指標とするMPO-ARC系の興奮性変化はMPO及びARC両ニューロン群の自発放電活動の変化に基因している。本実験結果は性周期における内因性エストロジェンのMPO及びARCニューロン活動に対する影響についての他の研究報告⁽³⁷⁾⁽⁹⁷⁾⁽¹⁰³⁾と一致している。これらMPO及びARCニューロン群の自発放電活動は性周期に伴って大きく変化し、発情前期に最も高い放電活動が記録されている。更にMPO-ARC系の興奮性はその内容としてMPOニューロン群の外來性刺激に対する感受性やARCニューロンの求心性刺激に対する反応性の変化も反映しており、内因性ステロイドがシナプス機構の伝達性或いは膜興奮性に直接的な影響を与えている事を暗示している。このMPO-ARC系興奮性変化にエストロジェンが最も重要な役割を果たしている事は、去勢後のエストロジェン投与により自発放電活動及び系興奮性が発情前期のレベルに迄高まる事実によって明らかであろう。少なくとも発情前期における興奮性の増大はそれ以前に大量に分泌される内因性エストロジェンの影響を最も強く受けていると考える事ができる。しかしLH分泌動態との関係を見ると、LH大量分泌(LH surge)と関連する内因性エストロジェンの系興奮性に対する影響が、エストロジェンのLH分泌抑制作用に相当する去勢後エストロジェン大量単独投与の効果と全く同一である。この事はMPO-ARC系興奮性を賦活するエストロジェン効果は非特異的な作用であって、エストロジェンのLH分泌に対する促進的又は抑制的影響の解離は下垂体前葉機能やより上位の中枢神経系との関係において現われる現象だと考えられる。中枢神経系内において標識エストロジェンを特異的に取り込み蓄積させる神経細胞群はMPO-ARC最終共通路のみならず大脳辺縁系や中脳部の特異的な神経系に広く分布している⁽⁹⁸⁾⁽¹¹⁰⁾。海馬一中隔野一最終共通路の神経系興奮性と発情周期との関連について研究した著者の結果⁽⁸⁸⁾はこれら上位のエストロジェン感受機構には発情周期に伴って興奮性が変動する系と変動しない系とが分離して含まれている事を示している。エストロジェンは夫々異った内分泌環境で別々の神経系に選択的に作用してLH分泌促進効果(即ち正のフィードバック効果)や抑制効果(負のフィードバック効果)を誘起し、連続的に変化する周期的神経内分泌現象を組織化しているものと考えられる。

視床前野及び対角帯核領域の電気刺激は発情周期を通じて一様にARCニューロン発火活動を促進している。ARCニューロン群にはLRH(LH releasing hormone)産生ニューロンの他にtubulo-infundibular dopamineニューロン等の機能を異にすると思われるニューロン群が含まれている⁽¹⁵⁾⁽¹⁴⁷⁾。これらニューロンのARC内分布は様でなく相互に局在して存在すると言われている。本実験ではARCニューロンの同定は行っておらず如何なる機能的ニューロンの発火活動を記録していたのか不明であるが、少なくともMPO刺激に対する反応は様であった。しかしMPO単発矩形波刺激による誘発スパイク発生の遅れ時間は様でない⁽⁸⁸⁾事から、MPOニューロン或いはMPOを通過する線維とのシナプス結合の各因子は様でないものと思われる。更に上位の大脳辺縁系との関係を見ると、海馬刺激に対して異った反応を示す2つのニューロンプールがARC内に存在する事が確かめられている⁽⁵²⁾⁽⁸⁸⁾。この事は、ARCニューロン群は上位脳との関連で異った機能的ニューロン群から構成されている事を示している。そしてこれらの異った機能的ニューロン群はゴナドトロピン分泌に関して夫々特異的な役割を受け持っていると推測される。例えばLRHニューロン等の神経内分泌ニューロンに対してDopamineニューロンが軸索一軸索的なシナプス結合をしてLRH分泌に促進的或いは抑制的な影響を及ぼしているとの報告もある⁽¹⁴⁾⁽⁵¹⁾⁽⁸²⁾⁽⁸⁹⁾。しかし本実験に見られる様に、全てのARCニューロンがMPO刺激によって同一の影響を受けている事実から、MPOニューロンとARCニューロンとの関係は基本的に一様であり、ARC内の異った機能的ニューロンも全て性ステロイド血中濃度に応じて非特異的で同一の興奮性変動を示すものと考え事ができる。

MPO刺激によるARCニューロン活動促進効果がLH分泌と深く関連している事は次の事実から明らかで

ある。即ちcritical period 直前のPB投与によって自然排卵を阻止した発情前期ラットではMPOを電気的或いは電気化学的に刺激したときARCニューロンの群発大活動レベル (multiple unit activity MUA) の上昇が認められた場合にのみ排卵が起り排卵性LH surge が誘起される⁽¹⁴⁴⁾。更にMPO刺激による排卵誘発は非発情第I期を除く他の発情周期にも認められるが、発情前期に排卵誘発刺激閾値が最も低くLH分泌量が最も高い⁽⁴²⁾⁽⁶⁹⁾⁽⁷⁶⁾事実等は、本実験でみられたMPO-ARC系興奮性の周期的変動がLH分泌機能の基本的な要因である事を裏付けている。MPO-ARC系には発情周期を通じて排卵性LH分泌を誘起し得る機能 (即ちMPOのARC活動促進機能) が内在しており、内因性エストロゲンによって系興奮性が著明に高められた時に発情前期critical periodにおけるLRH分泌の神経刺激が誘発されるものと思われる。このMPO-ARC系興奮性増大に加えて、発情前期のエストロゲン分泌の影響によって、下垂体LH含量が増加し⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰⁵⁾⁽¹²⁷⁾ 視床下部LRH含量もピークに達し⁽¹¹²⁾⁽¹¹⁶⁾、更に下垂体LH分泌細胞のLRH感受性が高められる事⁽⁵⁾⁽⁸⁶⁾⁽¹²⁴⁾⁽¹³³⁾等の複合的な結果が、発情前期における排卵性LH surge を誘起していると言えよう。エストロゲンによる視床前野一視床下部一下垂体系の賦活効果がLH surge を起す基礎的な機能であると考えられる。

Gorski と Barraclough⁽⁸⁾⁽⁵⁹⁾によってアンドロジェン化動物のMPO排卵誘起性が正常発情前期動物のそれより低い事が示され、加えてMPO-MBH間の神経切断が周期的LH分泌活動を消失させる事⁽⁶²⁾等から周期的LH分泌調節に関する視床前野領域と内側底部視床下部との二重調節機構 (dual regulatory mechanism) が提起された⁽⁵⁹⁾⁽⁸⁶⁾。更にMPOの前背外側のHalasz cut (preoptic frontal cut) によっても発情周期が不正規ながらも認められ自然排卵が出現する事⁽⁶⁸⁾⁽⁸⁹⁾から排卵性LH surge を起す刺激は少なくともMPO領域に由来するとの考え方を導いた。周期的排卵誘発LRH分泌放出はMPO-MBH系という閉鎖的な神経系の自動的活動に依存しておりMPO領域のtrigger刺激によって調節され、大脳辺縁系や中脳部の抑制的或いは促進的影響は直接LRH放出をtriggerするのでなくMPO領域の神経活動をmodifyする事により環境に適応したLH分泌反応を調節しているというのが現在の一般的な見解である。しかし周期的LRH分泌調節のtrigger機能をMPO領域という狭い神経系に限定して考える事には疑問がある。本実験で示された様に内側中隔野一対角帯核領域もMPO領域と同等に排卵性LH分泌反応を誘起する。この事はLRH分泌を引き起す神経刺激がMPO単独の機能としてもたらされるのではなく、内側中隔領域を含む複合的な神経活動の総合結果としてもたらされる事を意味しており、内側中隔一対角帯核系も周期的自然排卵発現機構の重要な神経系として考えなければならないだろう。

一方本実験IIで明らかに示した如くアンドロジェン化動物の内側中隔一視床前野領域の電気化学的刺激に対するLH分泌反応性は正常発情前期動物のそれと同価である。内側中隔一視床前野領域の電気化学刺激に対する反応性は新生児期アンドロジェン投与によって失なわれていない。本実験結果や他の報告⁽⁴²⁾⁽¹⁴⁶⁾にも認められる様に正常発情前期動物では電気化学刺激による刺激局所の広がりやLH分泌反応との間に明らかなpoint-to-point relationshipが認められるが、全く同等の関係がアンドロジェン化動物においても認められる。この事はアンドロジェン化動物の内側中隔一視床前野においても電気化学刺激効果は当該領域の生理的な興奮の広がりによって得られたものであり、適当な刺激がより上位の神経系よりもたらされるならば正常雌と同等のLRH分泌を引き起す能力を保持している事を示している。従って従来の見解の様に周期的LH分泌調節機序はMPO-MBH系という閉鎖神経系の機能としてとらえ、新生児期のアンドロジェン作用によってMPO領域の周期的trigger機能が喪失乃至は抑制される事によって非周期的LH分泌調節即ち雄性化がもたらされるとの考えは再検討されねばならないだろう。周期的LH分泌調節機序、換言すれば新生児期アンドロジェンによって雄性化する神経機能は内側中隔一視床前野領域より上位の神経系に存在するのではなかろうか。アンドロジェン化動物の内側扁桃核の電気的或いは電気化学的刺激によるLH分泌反応は正常発情前期動物のそれより劣るとの報告⁽⁴⁾⁽⁶⁷⁾や、新生児期アンドロジェン投与によってMPO内の分界条線維終末の分布が変化するとの報告⁽¹¹¹⁾は、新生児期アンドロジェンによって一義的に分化する神経系に内側

扁桃核一分界条系が重要な要素として含まれている事を示唆している。

従来アンドロジェン化動物の排卵誘起 MPO 刺激感受性（反応性）は発情前期動物におけるそれより低い^(8) 59)、高い⁽¹⁴²⁾ 或いは等しい⁽⁴¹⁾ と種々な報告がなされて来た。この混乱の原因はいずれも排卵を最終指標とする事にあると思われる。アンドロジェン化動物の卵巢の外因性 LH に対する感受性は正常雌卵巢より低く⁽¹⁰⁰⁾、著者らの実験によるとこの感受性の相違は外因性 LH 投与量として 5 乃至 10 倍にも及ぶ⁽¹⁰⁰⁾。本実験 II の結果でもアンドロジェン化動物における排卵誘起有効最小ピーク血漿 LH 濃度は発情前期動物のその 2 倍以上を必要とする事が示されている。しかも両動物群とも同一刺激強度に應ずる LH 分泌量の個体差は極めて大きく、LH 分泌が比較的低い場合のアンドロジェン化動物の排卵反応性は正常雌のそれより低くなるのは当然である。この為アンドロジェン化動物では排卵陽性率と刺激強度との相関が全く認められず排卵誘起刺激閾値を決定し得なかったのであろう。従ってアンドロジェン化動物と正常雌との LH 分泌機能の比較に際して排卵を指標とする事は不適当である。これに対しアンドロジェン化動物と発情前期動物の下垂体は共に合成 LRH に対して等しい LH 分泌反応を示す⁽¹⁰⁰⁾。下垂体 LH 分泌機能は新生児期アンドロジェンによって大きな影響を受けていないと思われる。従って両動物の中樞神経刺激効果の比較には下垂体 LH 分泌を指標とする事が最も適格で意義ある方法であろう。本実験で示された様に内側底部の中隔野一視束前野領域の電気化学刺激による LH 分泌反応性一刺激感受性と言っても良いは正常発情前期動物とアンドロジェン化動物とで等しいとの結論が最も妥当であろう。この事は内側底部中隔一視束前野領域の神経刺激に対する感受性及び MBH の LRH ニューロンの神経刺激に対する反応性は下垂体 LH 分泌細胞の LRH に対する感受性と同様に新生児期アンドロジェンによって有意な影響を受けていない事を意味している。のみならず正常性周期においては発情前期における MPO-MBH 系の LH 分泌能が最も高い事から、アンドロジェン化動物の内側底部中隔・視束前野領域一内側底部視床下部一下垂体前葉系の LH 分泌活性は最も高いレベルで維持されている事が考えられる。

正常の周期的排卵発現機序にはエストロジェン及びプロゲステロンの正のフィードバック効果が最も重要な役割りを果している。本実験 III で示した様に去勢雌ラットに大量の EB を投与し、二回目の EB 投与又は progesterone 投与による LH 大量分泌は、エストロジェン及びプロゲステロン夫々の LH 分泌に対する正のフィードバック効果を現わしている。しかしこの方法による両ステロイドホルモンの正フィードバック効果はアンドロジェン化雌ラットでは全く認められない⁽⁶⁹⁾。アンドロジェン化動物ではステロイドホルモン感受性が低下しており排卵性 LH 分泌に対するエストロジェン正フィードバック効果が減弱している⁽⁵⁵⁾。こうしたステロイドホルモンの正のフィードバック効果を感じて LH 分泌を促す中樞神経機構はどの神経系に存在するのであろうか。正常雌において視交叉後部の frontal Halasz cut を行うと自然排卵は阻止されエストロジェン及びプロゲステロンによる正フィードバック効果が消失する事から^(62) 63) 正のフィードバック機構には内側視束前野及び前部視床下部領域の神経活動尚至はこの領域を通過して内側底部視床下部に至る神経連絡が関与すると考えられる。アンドロジェン化動物での研究を基礎に提起された周期的 LH 分泌二重調節機能の考え方から、LH 分泌を促すエストロジェンの正フィードバック感受部位は MPO-MBH 系及び ME-anterior pituitary 系に含まれており、新生児期アンドロジェン作用による雄性化は MPO 領域の正フィードバック感受性の低下或いは消失に基づくものと考えられてきた⁽⁶⁷⁾。本実験 II 及び III の結果は中樞神経内の機能的分化を明らかにし、特にエストロジェン正フィードバックについては MPO 領域より上位の中樞神経系殊に扁桃核一分界条系及び中隔野が重要な役割りを果している事を示唆している。以下夫々のフィードバック感受部位について論及しながら周期的 LH 分泌に最も関与する神経機能について考察する。

去勢後に見られる血中 LH 濃度の増加、即ち性ステロイド特にエストロジェン欠如に対する負のフィードバックは中隔野破壊や roof cut によって何ら顕著な影響を受けていない。中隔野及びその上位から視束前野一視床下部領域に到達する神経系はこの負のフィードバック機構に一義的な役割りを果していない様に思

われる。中隔野神経切断が去勢後 LH 分泌増加に対して影響を与えない事は既に報告されており⁽¹³⁹⁾、エストロジェン欠如に対する負のフィードバック機構には視交叉領域から後部の MBH ニューロン群が関与している⁽¹²⁾と考えられる。LRH 産生ニューロンそのものもこの感受機構に含まれているのであろう。一方エストロジェン血中濃度増加による LH 分泌減少としてのエストロジェン負フィードバックも、中隔野破壊及び roof cut によって何らの影響も受けていない。従来諸家の直接的間接的諸研究の総合結果⁽¹³⁾⁽¹⁶⁾⁽²⁶⁾⁽³¹⁾⁽¹¹⁵⁾⁽¹³⁹⁾は、エストロジェン血中濃度上昇に基づく負フィードバック感受機構には MBH-ME 領域及び下垂体に関与している事を示しており、基本的にはエストロジェン欠如に基づく負フィードバック機構と密接な関係をもっているものと思われる。Smith と Davidson は去勢動物の MBH にエストロジェン結晶を植え込む事により、LH 分泌が抑制される事を明らかにした⁽¹³¹⁾。視床下部局所へのエストロジェン投与では下垂体の LRH に対する感受性は変化していない。これに対してエストロジェンの経血管投与では下垂体の LRH 感受性が低下し⁽¹⁰⁷⁾、後には増強する⁽⁹⁰⁾という二相性の影響が認められる。

性ステロイドフィードバックの二相性効果はプロジェステロンの LH 分泌への影響及び性行動への影響⁽²⁵⁾⁽¹⁰⁴⁾に明らかに認められる。本実験Ⅲの結果も去勢後エストロジェン投与72時間後のプロジェステロン投与により投与日午後 LH 大量分泌と翌日以後の分泌抑制という明らかな二相性効果が認められている。性行動についても本実験Ⅲの動物群全てについて Lordosis 反応を観察したところ、プロジェステロン投与群についてのみ初期の性行動促進効果とその後の長期（3週間以上に及ぶ）の抑制効果が認められた（Kubo and Gorski, 未発表）。この様な性行動に対する二相性効果は EB を2回投与した動物群では認められていない。このプロジェステロンの初期効果としての LH 分泌に対する正のフィードバック作用は中隔野破壊及び roof cut のいずれによっても著明な影響を受けていない。つまり中隔野領域乃至はその上位から視床前野一視床下部への神経連絡はプロジェステロン正フィードバック感受機構に直接的には関与していないものと思われる。一方従来の諸研究の総合結果⁽⁹⁾⁽¹³⁾⁽¹³⁹⁾は視交叉上部を通して吻側から MBH に到達する神経機構がこのフィードバックに本質的に必要である事を示している。Velasco と Taleisnik⁽¹⁵²⁾はエストロジェン処理去勢動物において分界条を切断するとプロジェステロンによる LH 分泌促進効果が減弱し、海馬からの抑制的情報をもたらす経路の一つである cortico-hypothalamic tract の切断によって LH 分泌促進効果が増加すると報告している。しかしながら扁桃核及び海馬より中隔野領域を通して視床前野一視床下部に至る神経経路を完全に切断した本実験では、プロジェステロンの LH 分泌促進効果が量的にも時間経過的にも変化しておらず、本フィードバック感受部位は一義的には中隔野より腹側の脳底部神経系に存在している事を示している。最近中脳部網様体がプロジェステロン感受部位として重要な役割りを果たしている事が明らかにされつつある。プロジェステロンの取り込みと蓄積は間脳よりも中脳部に最も高い⁽¹⁵⁴⁾。またプロジェステロン結晶をエストロジェン処理去勢雌ラットの脳部網様体に局所投与すると雌性性行動発現が促進されるが MPO-MBH 系の各部位への植込みでは促進効果が認められない⁽¹¹⁸⁾。更に著者の研究によると⁽⁶⁰⁾⁽⁸⁷⁾、中脳部網様体ニューロンの自発放電活動及び性特異的末梢刺激に対する反応性がプロジェステロンの局所的乃至全身的投与によって直接的且つ特異的に促進されている事が認められた。視床下部ニューロン群発火活動（multiple unit activity）のプロジェステロンに対する反応性は、視床下部への全ての線維連絡を切断したり視交叉後部の frontal cut によって変化する事⁽¹⁴⁵⁾からプロジェステロンの視床下部活動に対する影響は間接的であると考えられる。本実験Ⅰにも見られる様に MPO-ARC 系興奮性に対するプロジェステロンの影響は小さい。またエストロジェン処理雌ラットの MBH にプロジェステロン結晶を植込んでも血中 LH レベルの増加が見られないが、MPO への植込みでは6時間後に LH 濃度の上昇を見るという⁽⁷⁰⁾。以上の事実から、LH 分泌反応に対するプロジェステロン正フィードバックには中脳部網様体から内側底部中隔一視床前野及び前部視床下部への神経入力最も深く関与しているものと思われる。中脳部の電氣的・電気化学的的刺激は LH 分泌を促進或いは抑制するが、この効果は海馬系と扁桃核系のバランス機構を介して現われるとの考え方も

ある⁽¹³⁷⁾。本実験結果からは、プロゲステロン正フィードバック機構には、海馬系や扁桃核系を介する影響より、中脳部から直接脳底部、外側視床下部系（特に medial forebrain bundle 系）或いは脳室周囲系を介して嗅脳部や間脳部に影響を及ぼす神経系が重要な役割りを果している事を示唆している。排卵性 LH surge の発現に対するプロゲステロン正フィードバック作用の役割りや、性腺性プロゲステロンと副腎皮質性プロゲステロンの機能相関等未だ多くの疑問が残されているが、LH surge 発現直前のプロゲステロン分泌増加が LH 分泌調節に果たす役割りにはある限られた内分泌環境における中脳部網様体一視床下部系へのプロゲステロン作用が最も関係しているであろう。

従来、LH 分泌に対するエストロジェンの正フィードバック（促進的フィードバック）感受部位として下垂体 LH 分泌細胞そのものの関与が注目され、エストロジェンは LH 分泌細胞の LRH に対する感受性を高める事が指摘されて来た⁽⁵⁾⁽³⁸⁾⁽¹²⁰⁾⁽¹⁵³⁾。中枢神経系に対するフィードバック機構については、エストロジェンの全身投与に見られる早期発情（precocious puberty）の発現がエストロジェンの MPO-AHA 領域への局所投与によって誘起される事が最初に注目された⁽¹³⁰⁾。Sawyer⁽¹¹⁹⁾はこの MPO-AHA 領域へのエストロジェン結晶植込み効果は、当領域の扁桃核系入力への反応性に対する影響であろうと指摘している。本実験のエストロジェン正フィードバックに対する roof cut の影響を組織学的知見⁽³⁴⁾から詳細に検討すると、扁桃核内側核及び皮質核（cortico medial amygdala）から発して分界条の腹側部を構成し、postcommissural component として視床前野や対角帯核及び内側底部視床下部に放散する系がエストロジェン正フィードバックに最も深く関与している事を示唆している。扁桃核内側核群（cortico medial amygdala）の電気刺激や電気化学刺激は、連続照明による連続発情雌ラット⁽²¹⁾⁽¹⁵⁰⁾及び PB で自然排卵を阻止した発情前期動物⁽⁸⁰⁾で排卵を誘発する。しかし成熟雄ラットやアンドロジェン化雌ラットでは MPO 刺激では排卵を起す事ができるのに対して同一刺激を内側扁桃核に与えても最早排卵誘起 LH 分泌を起さない⁽⁴⁾⁽⁷⁷⁾。この事実は実験 II で見られた LH 分泌反応に対する発情前期動物とアンドロジェン化雌との MPO 刺激感受性（刺激に対する反応性）が等価であったのと極めて対照的である。一方 autoradiography によるエストロジェン（ $^{17}\beta$ -est radiol）感受ニューロンの研究⁽¹¹⁰⁾によって標識エストロジェン（ ^3H -estradiol- $^{17}\beta$ ）を高濃度に取り込むニューロンが扁桃核内側核群、分界床核、内側視床前野及び内側底部視床下部の第Ⅲ脳室周囲核群の一連の神経機構に認められる事は、これら扁桃核一分界条系の MPO-MBH 系に対する神経連絡がエストロジェンの正のフィードバックに重要な関係を有している事を示している。唯、この扁桃核一視床前野一内側底部視床下部系の標識エストロジェン取り込み率は新生児期アンドロジェンによって変化させられていないとの報告は⁽³⁴⁾、エストロジェン結合能力とフィードバック機能発現との関係について大きな問題を投げかけている。しかしながら本実験Ⅲと同一実験系において第二回 EB 全身投与或いは内側扁桃核局所投与により分界条床核及び MPO の電気活動が有意に高まった事実⁽⁷²⁾⁽⁸¹⁾は、扁桃核一分界条系の興奮がエストロジェン正フィードバックに深い関係をもっている事を機能的な側面から裏付けている。更に去勢雌ラットにエストロジェン処理した後に cortico medial amygdala にエストロジェンを植込むと、同部位の機械的刺激及び分界条の機械的刺激と同様に血漿 LH 濃度を有意に高める⁽⁸⁹⁾。より最近の Kalra と McCann の報告⁽⁷⁰⁾は、エストロジェン処理去勢ラットの内側扁桃核へのエストロジェン結晶植込みにより LH 分泌反応が得られる事を明らかにしている。更に Terasawa と Kawakami⁽¹⁴¹⁾及び Kawakami ら⁽⁷²⁾は夫々プロゲステロン投与により発情前期を一日延長させた非発情第 2 日（前者）或いは自然 5 日発情周期の非発情第 2 日（後者）においてエストロジェン結晶を内側扁桃核又は分界条床核に植え込むと当日午後の排卵性 LH 分泌が得られ本来の発情前期午前の卵管内に排卵を認めると報告している。前者は更に内側扁桃核へのエストロジェン植込みによる排卵誘起は分界条切断で阻止される事を示し、また後者の報告ではエストロジェン結晶の局所植え込みによる排卵誘起は MBH への植込みでは発現するが、MPO 及び前部視床下部では発現しない事を示している。Sawyer はかつて扁桃核の機能を総括した論文⁽¹¹⁹⁾において、扁桃核内側核皮質核群には排卵性 LH

分泌促進ニューロンとゴナドトロピン分泌抑制ニューロンとの2種の機能的細胞群が存在しており、エストロジェンの正のフィードバックは前者の活動を促進し後者の活動を抑制する事で周期的機能を発現させ周期的排卵性 LH 分泌を引き起す神経刺激を発現させているのではないかと示唆している。これらの報告及び本実験結果は、成熟雌ラットの発情周期における排卵性 LH surge を誘起するエストロジェンの正フィードバック作用には内側扁桃核一分界条系が最も本質的に重要な役割を果たしている事を明確に示している。更に前述した様に、新生児期アンドロジェン分泌による新生児期脳機能の雄性化への分化は、MPO 領域よりも扁桃核系の分化に負う所が大きいと思われる。周期的 LH 分泌調機構の中で MPO 領域（内側底部中隔一視束前野領域）の占める役割は閉鎖的な自動調節機能を有する系と考えるより、上位からの神経刺激を分析し統合して MBH の LRH ニューロンに対する trigger 刺激を構成する、言わば上位神経系に対する“Bias”なり“Gard”なりの役割を果たしているものと思われる。このような開放的な内側底部中隔一視束前野領域へは扁桃核一分界条系の trigger 刺激のみならず、近年 Taleisnik グループ、川上グループ或いは Sawyer グループ等によって明らかにされて来た海馬系の複合的な抑制系⁽⁵²⁾⁽⁷⁹⁾⁽¹⁵¹⁾或いは外側扁桃核群や中心灰白質一脳室周囲系が関与する抑制的情報⁽⁸³⁾⁽⁸⁵⁾がもたらされ、これら抑制系と扁桃核系の trigger 刺激との“check and balance”機能によって LH 分泌の周期的調節がなされているものと思われる。しかし一度周期的機能が分化した中枢神経系では統合領域である内側底部中隔一視束前野領域からも非常に限定された神経刺激がエストロジェンの正フィードバック効果の下に発現し得る事は、本実験Ⅲで完全 roof cut がなされた場合にも排卵誘起に最少必要な LH 分泌即ち本実験Ⅱより明らかな様に発情前期午前値に対して約2倍のピーク血漿 LH 濃度が得られる事に現われている。後に検討する様にこの LH 分泌はエストロジェンフィードバックには必ずしも依存していない所の、LRH ニューロン系の24時間リズム性に基づく現象とも思われるが、preoptic frontal cut 後の不正規な自然排卵を十分に説明し得る現象であると考えられる。

最後に、エストロジェンの LH 分泌促進反応（正フィードバック）に対する内側及び外側中隔の役割は、エストロジェン正フィードバックの発現そのものに関与するのではなく、エストロジェン正フィードバックによる LH 分泌の量的及び時間的制御に関係しているものと思われる。図12B,C で見た様に第二回 EB 投与後の対照去勢群の最高平均ピーク LH 分泌発現時間を、内側中隔破壊は24時間早め、外側中隔破壊は24時間遅らせている。この事実は内側中隔と外側中隔との機能的バランスがエストロジェンフィードバック効果発現の時間的調節に重要な役割を果たしている事を示している。一方性行動に対するエストロジェン作用に関して、中隔野の広汎な破壊は去勢雌ラットにおいて Lordosis 反応を誘発し促進するエストロジェン作用への感受性を高め Lordosis 反応発現を顕著に増加させる事実が報告されている⁽¹⁰⁶⁾。これらの結果は、エストロジェン正フィードバックに対する中隔野の量的・時間的制御機能は周期的性能全般に涉って普遍的な役割を果たしている事を意味している。この様な中隔野の機能には、中隔野との神経連絡の主流をなす⁽¹¹³⁾海馬系及び内側絨帯を介する中脳部・嗅脳部が深く関係しているものと思われる。特に海馬一中隔系は autoradiography による標識エストロジェン取り込みも比較的高く、エストロジェン感受部位に含まれると考えられている⁽⁸⁸⁾⁽¹¹⁰⁾。しかし海馬一中隔系の神経興奮性は性周期に伴って有意には変化しておらず⁽⁸⁸⁾、他の血漿エストロジェン濃度によって興奮性が変化する神経系とは異ったエストロジェン受容機構が海馬と中隔野ニューロンとのシナプス結合に存在するのかも知れない。

生殖機能の発現に関与する中枢神経活動の根底には24時間の生体時計機能（timing mechanism と表現しても良いと思う）が存在する事は疑いない。エストロジェン正フィードバック機構はこの timing mechanism を賦活する事により周期的 LH surge をもたらす neural surge を発現させているものと考えられる。発情前期以外の日には critical period が存在する事は既に明らかにされているが、アンドロジェン化動物においても内側中隔一視束前野領域刺激による LH 分泌反応には日内変動が認められ、所謂 critical period に相当する時間の LH 分泌反応が最も高い事が本実験で示された。この事は、timing mechanism は性ステ

ロイド環境の如何に拘らず存在している事を示唆している。更に本実験では全ての septal interruption 動物で第一回 EB 投与後及び第二回 EB 投与後において午後の血漿 LH 濃度が午前値よりも高いという日内変動が明らかに認められる事実は、timing mechanism そのものには中隔野より上位の神経機構を必ずしも必要としていない事を示している。長期去勢雌ラットにおける高い血漿 LH 濃度は LH 分泌の periodic pulse によって維持されている⁽¹⁶⁾⁽⁵⁴⁾。このリズム的な LH 分泌は PB を投与した去勢雌ラットにも認められる⁽¹⁰⁾。また MBH に対する如何なる入力もこの periodic LH discharge に関係していないとも報告されている⁽¹⁶⁾。これらの事実は LRH ニューロン及び下垂体 LH 分泌細胞自体に、神経刺激に依存しない LRH 或いは LH 産生放出力リズムが存在している事を示している⁽⁶⁰⁾。このリズム性は LRH ニューロン及び LH 分泌細胞の代謝リズムを表現しているものと思われる。今後は体内時計或いは代謝リズムの本態、及びこれらのリズムに対する性ステロイドフィードバックの関係についての検索を続けていかねばならないと考えている。

要 約

成熟雌ラットにおいて周期的 LH 分泌調節に重要な役割りを果たす性ステロイドフィードバックの中樞神経機序について、数実験を総合して検討した。実験結果は次の通りである。

1) 正常性周期の各時期に弓状核単一発火活動を促進する内側視束前野電気刺激の有効最小電流（閾値）をウレタン麻酔下急性実験で求めた。更に去勢雌ラットを用いて Estradiol Benzoate (EB) の単独または連続投与動物及び Progesterone (PROG) の単独又は EB 処理後投与動物において同閾値をみた。正常性周期において、閾値は発情前期に最低、非発情第 I 期に最高となる周期的変化を示した。去勢動物は高い閾値を示したが EB 投与により閾値は発情前期のレベル迄低下した。PROG は閾値をほとんど変化させなかった。

2) 内側底部の中隔一視束前野領域をステンレス電極の直流通電によって刺激してその結果誘発される LH 分泌を RIA 法で定量し、刺激に対するこの神経領域の LH 分泌反応性をネプタール処置発情前期ラット（正常雌）と新生児期アンドロジェン処理によって周期的排卵機能を失った連続発情ラット（雄性雌）とで比較した。刺激によって LH を分泌させた部位は正常雌では視索上核、内側視束前野から背側及び腹側対角帯核（内側底部中隔野）と広く分布し、当該部位内での LH 反応性は等価であった。雄性雌でも視索上核を除いた同一部位の刺激で LH 分泌を起し、同強度の刺激による LH 分泌反応は正常雌と量的、時間経過共に同等であった。

3) 去勢雌ラットに EB を投与し、その 3 日後に更に EB または PROG を投与した時に見られる LH 分泌へのエストロジェンまたはプロジェステロンの正・負饋還に対する内側或いは外側中隔野の選択的電氣的破壊或いは前交連上端における広範囲神経束切断の影響を RIA 法を用いて検索した。その結果エストロジェンの負饋還及びプロジェステロンの正饋還は中隔野破壊或いは神経束切断の影響を受けなかったが、エストロジェン正饋還は分界条が完全に切断された場合には完全に抑制された。またエストロジェン正饋還は中隔野破壊によって量的・時間経過共に強い影響を受けた。

LH 分泌調節中枢神経系の最終共通路をなすと考えられる内側底部中隔・内側視束前野一内側底部視床下部系の神経興奮性はエストロジェン血中濃度変化に応じて周期的に変動し、発情前期午後に最も高い興奮性を示す。この系の興奮性変動が発情前期 critical period における neural surge に深く関与している。しかし内側底部中隔・視束前野刺激による LH 分泌反応性が新生児期アンドロジェンによって影響を受けておらず、また LH 分泌に対するエストロジェン正饋還が中隔部の神経連絡切断、殊に分界条切断で強く抑制されている。この事実は LH 分泌が最終共通路をなす二重調節機能の自動的調節によるのではなく、より開放的な調節系によって調節されており、視床下部外因子特に内側扁桃核一分界条系がエストロジェン正饋還を受けて性分化の発現と周期的 LH 分泌調節機序に必須の役割りを果たしている事を示唆している。

謝 辞

稿を終るに当り終始変らぬ御指導と御校閲を賜りました恩師川上正澄教授に深く感謝致します。また終始御協力と御助言を戴きました兵庫医大・吉村寿人教授、横浜市大・瀬戸勝男助教授、共同研究者の California 大学・Gorski 教授と Mennin 博士及び妻に心から感謝致します。

尚本論文要旨は第47回、48回日本内分泌学会総会等に報告し、一部は欧文誌に発表した。

文 献

- 1) Albe-Fessard, D., Stutinsky, D. & Libouban, S.: Atlas Stéréotaxique du Diencephale du Rat Blanc. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 1966.
- 2) Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Follows, R. & Guillemin, R.: Chemistry of the hypothalamic releasing factors: Studies on a structure-function relationships, 375-413. Ed. by Ganong, W.F. & Martini, L., Frontiers in neuroendocrinology, Oxford University Press, New York, 1973.
- 3) Antunes-Rodrigues, J. & McCann, S.M.: Effect of suprachiasmatic lesions on the regulation of luteinizing hormone secretion in the female rat. Endocrinology, 81: 660-670, 1967.
- 4) Arai, Y.: Effect of electrochemical stimulation of the amygdala on induction of ovulation in different types of persistent estrous rats and castrated male rats with an ovarian transplant. Endocrin. Japon., 18: 211-214, 1971.
- 5) Arimura, A. & Schally, A.V.: Augmentation of pituitary responsiveness to LH-releasing hormone (LH-RH) by estrogen. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 136: 290-293, 1971.
- 6) Arimura, A. & Schally, A.V.: Hypothalamic LH- and FSH-releasing hormone: Reevaluation of the concept that one hypothalamic hormone controls the release of LH and FSH, 73-90. Ed. by Kawakami, M., Biological rhythms in neuroendocrine activity, Igaku Shoin, Tokyo, 1974.
- 7) Barraclough, C.A., Collu, R., Massa, R. & Martini, L.: Temporal interrelationships which exist amongst plasma LH, ovarian secretion rates, and peripheral plasma progesterone concentrations in the rat: effect of nembtal and exogenous gonadotropins. Endocrinology 88: 1437-1447, 1971.
- 8) Barraclough, C.A. & Gorski, R.A.: Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. Endocrinology, 68: 68-79, 1961.
- 9) Barraclough, C.A., Yarrarazaval, S. & Hatton, R.: Possible hypothalamic site of action of progesterone in the facilitation of ovulation in the rat. Endocrinology, 75: 838-845, 1964.
- 10) Beattie, C.W., Cambell, C.S., Nequin, L., Soyka, L.F. & Schwartz, N.B.: Barbiturate blockade of tonic LH secretion in the male and female rat. Endocrinology, 92: 1634-1638, 1973.
- 11) Beyer, C. & Sawyer, C.H.: Hypothalamic unit activity related to control of the pituitary gland, 255-288. Ed. by Ganong, W.F. & Martini, L., Frontiers in neuroendocrinology, Oxford University Press, New York, 1969.
- 12) Bishop, W., Fawcett, C.P., Krulich, L. & McCann, S.M.: Acute and chronic effects of hypothalamic lesions on the release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. Endocrinology, 91: 643-656, 1972.
- 13) Bishop, W., Kalra, P.S., Fawcett, C.P., Krulich, L. & McCann, S.M.: The effects of hypothalamic lesions on the release gonadotropins and prolactin in response to estrogen

- and progesterone treatment in female rats. *Endocrinology*, 91: 1404–1410, 1972.
- 14) Björklund, A., Moore, R.L., Nobin, A. & Stenevi, U.: The organization of tubero-hypophyseal and reticulo-infundibular catecholamines neuron systems in the rat brain. *Brain Res.*, 51: 171–191, 1973.
- 15) Björklund, A. & Nobin, A.: Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenalin cell groups in the rat diencephalon. *Brain Res.*, 51: 193–205, 1973.
- 16) Blake, C.A., Norman, R.L. & Sawyer, C.H.: Localization of inhibitory actions of estrogen and nicotin on release of luteinizing hormone in rats. *Neuroendocrin.*, 16: 22–42, 1974.
- 17) Bogdanove, E.M. & Halmi, N.S.: Effects of hypothalamic lesions and subsequent propylthiouracyl treatment on pituitary structure and function in the rat. *Endocrinology*, 53: 274–292, 1953.
- 18) Brown-Grant, K.: The induction of ovulation by ovarian steroids in the adult rat. *J. Endocrinol.*, 43: 553–562, 1969.
- 19) Brown-Grant, K. & Naftolin, F.: Facilitation of luteinizing hormone secretion in the female rat by progesterone. *J. Endocrinol.* 53: 37–46, 1972.
- 20) Brown-Grant, K. & Raisman, G.: Reproductive function in the rat following selective destruction of afferent fibres to the hypothalamus from the limbic system. *Brain Res.*, 46: 23–42, 1972.
- 21) Bunn, J.P. & Everett, J.W.: Ovulation in persistent-estrous rat after electrical stimulation of the brain. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 96: 369–371, 1957.
- 22) Burgus, R., Butcher, M., Ling, N., Monahan, M., Rivier, J., Fellows, R., Amoss, M., Blackwell, R., Vale, W. & Guillemin, R.: Structure moléculaire du facteur hypothalamique (LRF) d'origine ovine contrôlant la sécrétion de l'hormone gonadotrope hypophysaire de lutéinisation (LH). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 273: 1611–1613, 1971.
- 23) Caligaris, L., Astrada, J.J. & Taleisnik, S.: Stimulating and inhibiting effects of progesterone on the release of luteinizing hormone. *Acta Endocrin.*, 59: 177–185, 1968.
- 24) Caligaris, L., Astrada, J.J. & Taleisnik, S.: Release of luteinizing hormone induced by estrogen injection into ovariectomized rats. *Endocrinology*, 88: 810–815, 1971.
- 25) Caligaris, L., Astrada, J.J. & Taleisnik, S.: Biphasic effect of progesterone on the release of gonadotropin in rats. *Endocrinology*, 89: 331–337, 1971.
- 26) Chowers, I. & McCann, S.M.: Comparison of the effect of hypothalamic and pituitary implants of estrogen and testosterone on reproductive system and adrenal of female rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 124: 260–266, 1967.
- 27) Cramer, O.M. & Barraclough, C.A.: Effect of electrical stimulation of the preoptic area on plasma LH concentration in proestrous rats, *Endocrinology*, 88: 1175–1183, 1971.
- 28) Crighton, D.B., Schneider, H.P.G. & McCann, S.M.: Localization of LH-releasing factor in the hypothalamus and neurohypophysis as determined an in vitro method. *Endocrinology*, 87: 323–329, 1970.
- 29) Critchlow, V.: Ovulation induced by hypothalamic stimulation in the anesthetized rats. *Am. J. Physiol.*, 195: 171–174, 1958.
- 30) Cross, B.A.: Unit responses in the hypothalamus, 133–172. Ed. by Ganong, W.F. & Martini, L., *Frontiers in neuroendocrinology*, Oxford University Press, New York, 1973.
- 31) D'Angelo, S.A. & Kravatz, A.S.: Gonadotrophic function in persistent estrous rats with hypothalamic lesions. *Proc. Soc. exp. Biol.*

- Med., 104: 130–133, 1960. 32) Davidson, J.M.: Feedback control of gonadotropin secretion, 343–388. Ed. by Ganong, W.F., & Martini, L., *Frontiers in neuroendocrinology*, Oxford University Press, New York, 1969. 33) De Groot, J.: The rat forebrain in stereotaxic coordinates. N. J. Noord Hollandsche Uitgevers Maatschappij, Amsterdam, 1963. 34) De Olmos, J.S.: The amygdaloid projection field in the rat as studies with the cupric-silver method, 145–204. Ed. by Eleftheriou, R.E., *The neurobiology of the amygdala*, Plenum Press, New York, 1972. 35) Döcke, F. & Dörner, G.: A possible mechanism by which progesterone facilitates ovulation in the rat. *Neuroendocrin.*, 4: 139–149, 1969. 36) Dörner, G. & Döcke, F.: The influence of intrahypothalamic and intrahypophyseal implantation of estrogen or progesterone on gonadotropin release. *Endocrinol. exp.*, 2: 65–71, 1967. 37) Dyer, R.G., Pritchett, C.J. & Cross, B.A.: Unit activity in the diencephalon of female rats during the estrous cycle. *J. Endocrinol.*, 53: 151–160, 1972. 38) Eleftheriou, B.E. & Zolovick, A.J.: Effect of amygdaloid lesions on plasma and pituitary levels of luteinizing hormone. *J. Reprod. Fertil.*, 14: 33–37, 1967. 39) Everett, J.W.: Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the adult rat. *Endocrinology*, 43: 389–405, 1948. 40) Everett, J.W.: Neuroendocrine aspects of mammalian reproduction. *Ann. Rev. Physiol.*, 31: 383–416, 1969. 41) Everett, J.W., Holsinger, J.W., Jr., Zeilmaker, G.H., Redmond, W.C. & Quinn, D.L.: Strain differences for preoptic stimulation in cyclic, spontaneously persistent estrous, and androgen-sterilized rats. *Neuroendocrin.*, 6: 98–108, 1970. 42) Everett, J.W., Krey, L.C. & Tyrey, L.: The quantitative relationship between electrochemical preoptic stimulation and LH release in proestrous v.s. late-diestrous rats. *Endocrinology*, 93: 947–953, 1973. 43) Everett, J.W. & 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. 44) Everett, J.W. & Sawyer, C.H.: A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, 47: 198–218, 1950. ——— & ———: Estimated duration of the spontaneous activation which causes release of ovulating hormone from the rat hypophysis. *Endocrinology*, 52: 83–92, 1953. 45) Everett, J.W., Sawyer, C.H. & Markee, J.E.: A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology*, 44: 234–250, 1949. 46) Feder, H.H., Brown-Grant, K. & Corker, C.S.: Preovulatory progesterone. The adrenal cortex and the “critical period” for luteinizing hormone release in rats. *J. Endocrinol.*, 50: 29–39, 1971. 47) Ferin, M., Tempone, A., Zimmering, P.E. & Vande Wiele, R.L.: Effect of antibodies to 17β -estradiol and progesterone on the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 85: 1070–1078, 1969. 48) Flerkó, B.: Einfluss experimenteller Hypothalamuslaesionen auf die Funktion des Sekretionsapparates im weiblichen Genitaltrakt. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.*, 3: 65–86, 1953. 49) Flerkó, B.: Control of gonadotropin secretion in the female, 613–668. Ed. by Martini, L. & Ganong, W.F., *Neuro-*

- endocrinology, Academic Press, New York, 1966. 50) Flerkó, B. & Bárdos, V.: Pituitary hypertrophy after anterior hypothalamic lesions. *Acta Endocrinol. (Kbh.)*, 35: 375–380, 1960. 51) Fuxe, K., Goldstein, M., Hökfelt, T., Jonsson, G. & Lidbrink, P.: Dopaminergic involvement in hypothalamic function: extrahypothalamic and hypothalamic control. A neuroanatomical analysis. *Adv. Neurol.*, 5: 405–419, 1974. 52) Gallo, R.V., Johnson, J.H., Goldman, B.D., Whitmoyer, D.I. & Sawyer, C.H.: Effect of electrochemical stimulation of ventral hippocampus on hypothalamic electrical activity and pituitary gonadotropin secretion in female rats. *Endocrinology*, 89: 704–713, 1971. 53) Gay, V.L., Midgley, A.R.J. & Niswender, G.D.: Patterns of gonadotropin secretion associated with ovulation. *Fed. Proc.* 29: 1880–1887, 1970. 54) Gay, V.L. & Sheth, N.A.: Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats. *Endocrinology*, 90: 158–162, 1972. 55) Gorski, R.A.: Localization and sexual differentiation of the nervous structures which regulate ovulation. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 1: 67–88, 1966. 56) Gorski, R.A.: Influence of age on the response to perinatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology*, 82: 1001–1004, 1968. 57) Gorski, R.A.: Steroid hormones and brain function: Progress, Principles and problems, 1–26. Ed. by Sawyer, C.H. & Gorski, R.A., Steroid hormones & brain function, Univ. of California Press, Los Angeles, 1971. 58) Gorski, R.A.: The neuroendocrine regulation of sexual behavior, 1–58. Ed. by Newton, G. & Riesen A.H., Advance in Psychobiology, vol. 2, John Wiley & Sons, Inc., 1974. 59) Gorski, R.A. & Barraclough, C.A.: Effects of low dosage of androgen on the differentiation of hypothalamic regulatory control of ovulation in the rat. *Endocrinology*, 73: 210–216, 1963. 60) Gorski, R.A., Mennin, S.P. & Kubo, K.: The neural and hormonal bases of the reproductive cycle of the rat, 115–152. Ed. by Hedlund, L.W., Franz, J.M. & Kenny, A.D., Adv. Exp. Med. & Biol. Vol. 54, Biological rhythms and Endocrine function, Plenum Publishing Corp., New York, 1975. 61) Guillemin, R.: Hypothalamic control of the secretion of adenohypophyseal hormones. *Advan. Metab. Disord.*, 5: 1–51, 1971. 62) Halász, B. & Gorski, R.A.: Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology*, 80: 608–622, 1967. 63) Halász, B. & Pupp, L.: Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinology*, 77: 553–562, 1965. 64) Halász, B., Pupp, L. & Uhlárik, S.: Hypophysiotrophic area in the hypothalamus. *J. Endocrinol.*, 25: 147–154, 1962. 65) Harris, G.W.: Neural control of the pituitary gland, Edward Arnold, London, 1955. 66) Harris, G.W.: Humours and Hormones., *J. Endocrinol.*, 53: ii-xxiii, 1972. 67) Igarashi, M., Taya, K., Ishikawa, J. & Yamasaki, M.: Evidence for the existence of FSH-RH distinct from LH-RH/FSH-RH, 91-101. ed. by Kawakami, M., Biological rhythms in neuroendocrine activity, Igaku Shoin Ltd., Tokyo, 1974. 68) Kaasjager, W.A., Woodbury, D.M., van Diäten, J.A.M.J. & van Rees, G.P.: The role played by the preoptic region and the hypothalamus in spontaneous ovulation induced by progesterone., *Neuro-*

- endocrinol., 7: 54–64, 1971. 69) Kalra, P.S. & McCann, S.M.: Variations in the release of LH in response to electrochemical stimulation of preoptic area and of medial basal hypothalamus during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 93: 665–669, 1973. 70) Kalra, P.S. & McCann, S.M.: The stimulatory effect on gonadotropin release of implants of estrogen or progesterone in certain sites in the central nervous system. *Neuroendocrinol.*, 19: 289–302, 1975. 71) Kato, J. & Vilee, C.A.: Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat. *Endocrinology*, 80: 567–575, 1967. 72) Kawakami, M., Kimura, F. & Higuchi, T.: Localization and mechanism of stimulatory feedback action of estrogen: effect of limbic forebrain implantation of estradiol benzoate on advancement of ovulation. *Endocrin. Japon.*, 22: 327–338, 1975. 73) Kawakami, M. & Kubo, K.: Neuro-correlate of limbic-hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat: Change in limbic-hypothalamic unit activity induced by vaginal and electrical stimulation. *Neuroendocrinol.*, 7: 65–89, 1971. 74) Kawakami, M. & Sawyer, C.H.: Neuroendocrine correlates of changes in brain activity thresholds by sex steroids and pituitary hormones. *Endocrinology*, 65: 652–668, 1959. 75) Kawakami, M. & Sawyer, C.H.: Effects of sex hormones and antifertility steroids on brain thresholds in the rabbit. *Endocrinology*, 80: 857–871, 1967. 76) Kawakami, M. & Terasawa, E.: Effect of electrical stimulation of the brain on ovulation during estrous cycle in the rats. *Endocrinol. Japon.*, 17: 7–13, 1970. 77) Kawakami, M. & Terasawa, E.: A possible role of the hippocampus and the amygdala in the androgenized rat: Effect of electrical or electrochemical stimulation of the brain on gonadotropin secretion. *Endocrinol. Japon.*, 19: 349–358, 1972. 78) Kawakami, M. & Terasawa, E.: Role of limbic forebrain structures on reproductive cycles, 197–219. Ed. by Kawakami, M., *Biological rhythms in neuroendocrine activity*, Igaku Shoin, Ltd., Tokyo, 1974. 79) Kawakami, M., Terasawa, E., Kimura, F. & 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, 347–374. *Hormones and brain function*, Budapest 1971, Plenum Press, New York, 1973. 80) Kawakami, M., Terasawa, E., Kimura, P. & Wakabayashi, K.: Modulating effect of limbic structures on gonadotropin release. *Neuroendocrinol.* 12: 1–16, 1973. 81) Kawakami, M., Terasawa, E., Kimura, F., Higuchi, T. & Konda, N.: Changes in multi-unit electrical activity (MUA) in rat brain during the estrous cycle and after administration of sex steroids. *Prog. Brain Res.*, 39: 125–134, 1973. 82) Knigge, K.M. & Scott, D.E.: Structure and function of the median eminence. *Am. J. Anat.*, 129: 223–244, 1970. 83) Kobayashi, F., Hara, K. & Miyake, T.: Effect of steroids on the release of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinol. Japon.*, 16: 251–261, 1969. —: Causal relationship between luteinizing hormone release and estrogen secretion in the rat. *Endocrinol. Japon.*, 16: 261–267, 1969. 84) Kobayashi, F., Hara, K. & Miyake, T.: Facilitation of luteinizing hormone release by progesterone in proestrous rat. *Endocrinol. Japon.*, 17: 149–155, 1970. 85) 今田育秀: 大脳辺縁系のゴナドトロピン分泌抑制機序に関する

- る電気生理学的研究, 日本内分泌誌, 51: 524-545, 1975.
- 86) Köves, K. & Halász, B.: Location of the neural structures triggering ovulation in the rat. *Neuroendocrinol.*, 6: 180-193, 1970.
- 87) Kubo, K. & Gorski, R.A.: Progesterone action on the MRF neural activity in relation to sexual receptivity of female rats. I-III, (in press), 1967.
- 88) Kubo, K., Gorski, R.A. & Kawakami, M.: Effects of estrogen on neuronal excitability in the hippocampal-septal-hypothalamic system. *Neuroendocrinol.*, 18: 176-191, 1975.
- 89) Lawton, I.E. & Sawyer, C.H.: Role of amygdala in regulating LH secretion in the adult female rat., *Am. J. Physiol.*, 218: 622-626, 1970.
- 90) Libertun, C., Orias, R. & McCann, S.M.: Biphasic effect of estrogen on the sensitivity of the pituitary to luteinizing hormone-releasing factor (LRF)., *Endocrinology*, 94: 1094-1100, 1974.
- 91) Lisk, R.D.: Estrogen-sensitive centers in the hypothalamus of the rat., *J. Exptl. Zool.*, 145: 197-205, 1960.
- 92) Matsuo, H., Arimura, A., Nair, R.M.G. & Schally, A.V.: Synthesis of the porcine LH- and FSH-releasing hormone by the solid-phase method., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45: 822-827, 1971.
- 93) Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M.G., Arimura, A. & Schally, A.V.: Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43: 1334-1339, 1971.
- 94) Maurer, R.A. & Woolley, D.E.: ³H-estradiol distribution in female, adrogenized female, and male rats at 100 and 200 days of age., *Endocrinology*, 96: 755-764, 1975.
- 95) McCann, S.M., Ojeda, S.R., Fawcett, C.P. & Krulich, L.: Catecholaminergic control of gonadotropin and prolactin secretion with particular reference to the possible participation of dopamine., *Adv. Neurol.*, 5: 435-445, 1974.
- 96) McCann, S.M. & Ramirez, V.D.: The neuroendocrine regulation of hypophyseal luteinizing hormone secretion., *Rec. Prog. Horm. Res.*, 20: 131-181, 1964.
- 97) McDonald, P.G. & Gilmore, D.P.: The effect of ovarian steroids on hypothalamic thresholds for ovulation in the female rat., *J. Endocrinol.*, 49: 421-429, 1971.
- 98) McEwen, B.S. & Pfaff, D.W.: Chemical and physiological approaches to neuroendocrine mechanisms: attempts at integration, 267-335. Ed. by Ganong, W.F. & Martini, L., *Frontiers in neuroendocrinology*, Oxford University Press, New York, 1973.
- 99) Mennin, S.P. & Gorski, R.A.: Effects of ovarian steroids on plasma LH in normal and persistent estrous adult female rats., *Endocrinology*, 96: 484-491, 1975.
- 100) Mennin, S.P., Kubo, K. & Gorski, R.A.: Pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing factor in normal and androgenized female rats., *Endocrinology*, 95: 412-416, 1974.
- 101) Miyake, T.: Interrelationship between the release of pituitary luteinizing hormone and the secretion of ovarian estrogen and progesterone during estrous cycle of the rat, 139-149. Ed. by Ito, S., *Integrative mechanisms of neuroendocrine system*, Hokkaido University Medical Library Series No. 1, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, 1968.
- 102) Moore, C.R. & Price, D.: Gonad hormone functions, and the reciprocal influence between gonads and hypophysis with its bearing on the problem of sex hormone antagonism, *Am. J. Anat.*, 50: 13-72, 1932.
- 103) Moss, R.L., & Law, O.T.: The estrous cycle: its influence on single unit activity in

- the forebrain., *Brain Res.*, 30: 435–438, 1971. 104) Nadler, R.D.: A biphasic influence of progesterone on sexual receptivity of spayed female rats., *Physiol., Behav.*, 5: 95–97, 1970. 105) Naftolin, F., Brown-grant, K. & Corker, C.S.: Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma oestradiol concentrations in the normal oestrous cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle., *J. Endocrinol.*, 53: 17–30, 1972. 106) Nance, D.M., Shryne, J. & Gorski, R.A.: Septal lesions: effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release., *Hormone & Behav.*, 5: 73–81, 1974. —: Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones, *Hormone Behav.*, 6: 59–64, 1975. 107) Negro-Vilar, A., Orias, R. & McCann, S.M.: Evidence for a pituitary site of action for the acute inhibition of LH release by estrogen in the rat., *Endocrinology*, 92: 1680–1684, 1973. 108) Niswender, G.D., Midgley, A.R., Monroe, S.E. & Reichert, L.E.Jr.: Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with antiovine LH serum and ovine LH-¹³¹I. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128: 807–811, 1968. 109) Palkovits, M., Arimura, A., Brownstein, M., Schally, A.V. & Saavedra, J.M.: Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content of hypothalamic nuclei in rat., *Endocrinology*, 95: 554–558, 1974. 110) Pfaff, D. & Keiner, M.: Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat., *J. Comp. Neurol.*, 151: 121–157, 1973. 111) Pfeiffer, C.A.: Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads., *Am. J. Physiol.*, 58: 195–226, 1936. 112) Piacsek, B.E. & Meites, J.: Effects of oestration and gonadal hormones on hypothalamic content of luteinizing hormone releasing factor (LH-RH)., *Endocrinology*, 79: 432–439, 1966. 113) Raisman, G.: The connections of the septum. *Brain*, 89: 317–348, 1966. 114) Raisman, G. & Field, P.M.: Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res.*, 54: 1–29, 1973. 115) Ramirez, V.D., Abrams, R.M. & McCann, S.M.: Effect of estradiol implants in the hypothalamo-hypophyseal region of the rat on the secretion of luteinizing hormone. *Endocrinology*, 75: 243–248, 1964. 116) Ramirez, V.D. & Sawyer, C.H.: Fluctuation in hypothalamic LH-RF (luteinizing hormone-releasing factor) during the rat estrous cycle. *Endocrinology*, 76: 282–289, 1965. 117) Ross, G.T., Cargille, C.M., Lipsett, M.B., Rayford, P.L., Marshall, J.R., Strott, C.A. & Rodbard, D.: Pituitary and gonadal hormones in women during spontaneous and induced ovulatory cycles. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 26: 1–62, 1970. 118) Ross, J., Claybaugh, C., Clemens, L.G. & Gorski, R.A.: Short latency induction of estrous behavior with intracerebral gonadal hormones in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 89: 32–38, 1971. 119) Sawyer, C.H.: Function of the amygdala related to the feedback actions of gonadal steroid hormones, 745–762. Ed. by Eleftherious, B.E., *The neurobiology of the amygdala*, Plenum Press, New York, 1972. 120) Sawyer, C.H.: Some recent developments in brain-pituitary-ovarian physiology. *Neuroendocrinol.*, 17: 97–124, 1975. 121) Schally, A.V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M.G., Matsuo, H., Redding, T.W., Debeljuk, L. &

- White, W.F.: Isolation and properties of FSH- and LH- releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43: 393-399, 1971.
- 122) Schally, A.V., Arimura, A., Bowers, C.Y., Kastin, A.J., Sawana, S. & Redding, T.W.: Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary function. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 24: 497-581, 1968.
- 123) Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T. W., Nair, R.M.G., Debeljuk, L. & White, W.F.: The gonadotropin releasing hormone: One peptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones. *Science*, 173: 1036-1037, 1971.
- 124) Schally, A.V., Redding, T.W. & Arimura, A.: Effect of sex steroids on pituitary responses to LH- and FSH-releasing hormone in vitro. *Endocrinology*, 93: 893-902, 1973.
- 125) Schwartz, N.B.: Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight and vaginal cornification. *Am. J. Physiol.*, 207: 1251-1259, 1964.
- 126) Schwartz, N.B.: A model for the regulation of ovulation in the rat. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 25: 1-55, 1969.
- 127) Schwartz, N.B. & Bartosik, D.: Changes in pituitary LH content during the rat estrous cycle. *Endocrinology*, 71: 756-762, 1962.
- 128) Shirley, B., Wolinsky, J. & Schwartz, N.B.: Effects of a single injection of an estrogen antagonist on the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 82: 959-968, 1968.
- 129) Siegel, S.: *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1956.
- 130) Smith, E.R. & Davidson, J.M.: Role of estrogen in the cerebral control of puberty in female rats. *Endocrinology*, 82: 100-108, 1968.
- 131) Smith, E.R. & Davidson, J.M.: Feedback suppression of LH with maintained pituitary sensitivity: Evidence for a cerebral action of estrogen. *Neuroendocrinol.*, 14: 369-373, 1974.
- 132) Smith, E.R., Weick, R.F. & Davidson, J.M.: Influence of intracerebral progesterone on the reproductive system of female rats. *Endocrinology*, 91: 1129-1136, 1969.
- 133) Stumpf, W.E.: Estrogen-neurones and estrogen-neuron system in the periventricular brain. *Am. J. Anat.*, 129: 207-218, 1970.
- 134) Szentágothai, J., Flerkó, B., Mess, B. & Halász, B.: *Hypothalamic control of the anterior pituitary*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1968.
- 135) 竹脇 潔: 幼児における性ホルモンの効果, 協同医書出版社, 東京, 1966.
- 136) Taleisnik, S., Caligaris, L. & Astrada, J.J.: Sex difference in the release of luteinizing hormone evoked by progesterone. *J. Endocrinol.*, 44: 313-321, 1969.
- 137) Taleisnik, S. & Carrer, H.F.: Facilitatory and inhibitory mesencephalic influence on gonadotropin release, 335-345. Ed. by Lissák, K., *Hormones and brain function*, Budapest 1971, Plenum Press, New York, 1973.
- 138) Taleisnik, S. & McCann, S.M.: Effect of hypothalamic lesions on the secretion and storage of hypophyseal luteinizing hormone. *Endocrinology*, 68: 263-272, 1961.
- 139) Takeisnik, S., Velasco, M.E. & Strada, J.J.: Effect of hypothalamic deafferentation on the control of luteinizing hormone secretion. *J. Endocrinol.*, 46: 1-7, 1970.
- 140) Tejasen, T. & Everett, J.W.: Surgical analysis of the preoptic-tuberal pathway controlling ovulatory release of gonadotropins in the rat. *Endocrinology*, 81: 1387-1396, 1967.
- 141) Terasawa, E. & Kawakami, M.: Positive feedback site of estrogen in the brain on ovulation: possible role of the bed nucleus

- of stria terminalis and the amygdala., *Endocrinol. Jap.*, 21: 51–60, 1974.
- 142) Terasawa, E., Kawakami, M. & Sawyer, C.H.: Induction of ovulation by electrochemical stimulation in androgenized and spontaneously constant-estrous rats., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132: 497–501, 1969.
- 143) Terasawa, E. & Sawyer, C.H.: Electrical and electrochemical stimulation of the hypothalamo-adenohypophyseal system with stainless steel electrodes., *Endocrinology*, 84: 918–924, 1969.
- 144) Terasawa, E. & Sawyer, C.H.: Changes in electrical activity in the rat hypothalamus related to electrochemical stimulation of adenohypophyseal function., *Endocrinology*, 85: 143–149, 1969.
- 145) Terasawa, E. & Sawyer, C.H.: Diurnal variation in the effects of progesterone on multiple unit activity in the rat hypothalamus., *Expt. Neurol.*, 27: 359–374, 1970.
- 146) Turgeon, J. & Barraclough, C.A.: Temporal patterns of LH release following graded preoptic electrochemical stimulation in proestrous rats., *Endocrinology*, 92: 755–761, 1973.
- 147) Ungerstedt, W.: Stereotaxic mapping of monoamine pathways in the rat brain., *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, 367: 1–48, 1971.
- 148) Vale, W., Grant, G. & Guillemin, R.: Chemistry of the hypothalamic releasing factors: Studies on structure-function relationships, 375–413, Ed. by Ganong, W.F. & Martini, L., *Frontiers in neuroendocrinology*, Oxford University Press, New York, 1973.
- 149) Vande Wiele, R.L., Bogumil, J., Dyrenfurth, I., Ferin, M., Jewelewitz, R., Warren, M., Rizkallah, T. & Mikkall, G.: Mechanisms regulating the menstrual cycle in women., *Rec. Prog. Horm. Res.*, 26: 63–103, 1970.
- 150) Velasco, M.E. & Takeisnik, S.: Release of gonadotropins induced by amygdaloid stimulation in the rat., *Endocrinology*, 84: 132–139, 1969.
- 151) Velasco, M.E. & Takeisnik, S.: Effect of hippocampal stimulation on the release of gonadotropin., *Endocrinology*, 85: 1154–1159, 1969.
- 152) Velasco, M.E. & Takeisnik, S.: Effects of the interruption of amygdaloid and hippocampal afferents to the medial hypothalamus on gonadotrophin release., *J. Endocrinol.*, 51: 41–55, 1971.
- 153) Weick, R.F., Smith, E.R., Domingues, R., Dhariwal, A.P.S. & Davidson, J.M.: Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary., *Endocrinology*, 88: 293–301, 1971.
- 154) Whalen, R.E. & Luttige, W.G.: Differential localization of progesterone uptake in brain. Role of sex, estrogen pretreatment and adrenalectomy., *Brain Res.*, 33: 147–155, 1971.
- 155) Young, W.C. ed.: Sex and internal secretion.: Everett, J.W.: The mammalian female reproductive cycle and its controlling mechanisms, 457–555. Young, W.C.: The hormones and mating behavior, 1173–1239. Williams & Wilkins, Baltimore, 1961.
- 156) Zimmerman, E.A., Hsu, K.C., Ferin, M. & Kozlowski, G.P.: Localization of Gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in the hypothalamus of the mouse by immunoperoxidase technique. *Endocrinology*, 95: 1–6, 1974.
- 157) Kubo, K., Mennin, S.P. & Gorski, R.A.: Similarity of plasma LH release in androgenized and normal rats following electrochemical stimulation of the basal forebrain. *Endocrinology*, 96: 492–500, 1975.