視床下部前部における LH-RH 分泌調節：
視交叉後方切断後の LH-RH 投与による
血中 LH, Estrogen, Progestin の反応について

東京医科歯科大学医学部

産科婦人科学教室

小 山 嵩 夫, 齊 藤 幹

テキサス大学医学部

解剖, 神経生理

萩 野 信 義

Effects of Anterior Hypothalamic Deafferentation on
Plasma LH Response to LH-RH in the Baboon

Takao KOYAMA, Motoi SAITO

Department of Obstetrics and Gynecology

Tokyo Medical and Dental University

Tokyo 113, Japan

Nobuyoshi HAGINO

Department of Anatomy

The University of Texas

Health Science Center at San Antonio

San Antonio, Texas 78284, U.S.A.

Abstract

We reported previously that a biphasic LH release (within 30 min and 90~150 min after LH-RH injection) was observed in normal menstruating baboons (non-human primates). Plasma immunoassayable LH-RH reached a maximum within 4 min after injection and was undetectable within 60 min. Plasma estrogen and progestin were elevated within 45 min. No plasma LH release with increment of plasma estrogen and progestin was observed in saline injected baboons. This study was performed to investigate the mechanism of biphasic LH release by LH-RH injection.

Synthetic LH-RH (100 μ g) was injected sc into four female retrochiasmatic deafferented baboons. Blood samples collected 30 and 2 min before injection and 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 and 180 min after injection were assayed for LH, estrogen and progestin. In four baboons plasma LH peak was observed within 30 min after injection and plasma es-

trogen and progesterin were elevated within 45 min. However, plasma LH peak within 90~150 min was not observed. These results infer that exogenous LH-RH exerts an effect on the pituitary to release LH within 30 min after injection. Increased estrogen and progesterin exert the effect on the higher brain area (extrahypothalamic area) and the anterior hypothalamus to facilitate release of endogenous LH-RH, which subsequently release LH within 90~150 min in cooperation with exogenous LH-RH which may be considered to participate LH synthesis in the pituitary. Thus, it seems likely that the extrahypothalamic area (for example; limbic system) and the anterior hypothalamus have an important role in regulating LH-RH secretion and subsequent LH release in the baboon.

ま え が き

下垂体 gonadotropin 分泌調節の中核部位として大脳辺縁系から視床下部前方が推察されている^{4) 6) 12) 13)}
^{14) 19) 20)}が、その詳細は不明である。

最近 baboon において LH-RH 投与後血中 LH の放出 pattern に 2 峰性が認められ、それとともに血中 estrogen, progesterin が増加することがわかってきた¹⁵⁾。この LH 放出機序を解明するために視床下部前方にナイフを入れ、視床下部前部とそれより上位中枢との連絡が遮断されたと考えられる baboon を用い、LH-RH 投与後の血中 LH, estrogen, progesterin を測定し、正常周期の baboon に LH-RH を投与した場合の結果と比較することによって、検討を加えてみた。

実 験 方 法

少なくとも 3 周期以上にわたり正常月経周期を有することを sex skin および腔細胞所見で確認した 12 頭の baboon (*Papio cynocephalus*, キイロヒヒ) を使用した。動物はすべて個々の“おり”に収容し、室温は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持し、照明は午前 5 時より 14 時間の人工照明を用いた。実験時の月経周期上の stage の判定には sex skin と腔内容物の細胞所見及び血中 progesterin 値を用いた。

正常周期の黄体期の 6 頭の baboon に合成 LH-RH (Ay-24,031, Ayerst Research Labs., Canada) 100 μg を皮下投与し、又 control として生理食塩水 1 ml を 5 頭の baboon の黄体期に投与して経時的に 3 時間迄採血した。詳細については以前に報告した¹⁵⁾。

別の 4 頭の正常月経周期をもった baboon において、月経終了後数日後に脳定位固定装置に“Halász”knife をつけて、視交叉後縁に沿ってナイフを入れ、内側視索前野 (mPOA) 及び関係上位諸部位と視床下部弓状核 (ARC) との線維連絡を遮断 (“Halász Cut”) した^{7) 9)}。切断を加えてから平均約 6 ヶ月間自然に放置した後、黄体中期に LH-RH 100 μg を皮下投与し、投与前 30 分、2 分及び投与後 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 分に採血した。

血液サンプルは 4°C にて遠沈後、血漿に分離し、Assay まで -20°C にて保存し、血中 LH, estrogen, progesterin を測定した。血中ホルモンの測定法などについては以前に述べたもの¹⁵⁾とはほぼ同様である。

LH-RH 投与後の血中 LH, progesterin の反応はホルモン濃度の絶対値で表現する一方、必要に応じて投与後 180 分までの反応曲線を作製し、投与前のレベルとの間の面積計算を行うことによって量的にも検討した。血中 estrogen の反応は % 増加率でもってみた。推計学的処理は students' t-test により行なった。

結 果

結果はすべてグラフでもって Figure 1から3までに図示した。このうち正常周期黄体期において、LH-RH 又は生理食塩水投与後の血中 LH, estrogen, progesterin の反応 (Fig. 1~2) については、本実験においては control に相当するものであるが、詳細はすでに以前に報告した¹³⁾ので、ここでは要点だけにとどめたい。即ち LH-RH 投与後、30分以内と 90~150分に2峰性の血中 LH の増加が認められ、同時に血中 estrogen, progesterin も投与後30~45分に増加が認められた。

視床下部前部にナイフを入れた4頭の baboon においては、LH-RH 100 μ g 投与により、投与後30分以内の血中 LH 放出は認められたが、90~150分の後半の LH 放出は認められなかった (Fig. 3)。LH-RH 投与により血中 estrogen, progesterin も投与後30~45分に増加傾向を示したが、正常周期の黄体期に投与した場合の増加よりは絶対値、増加率ともに低めであった。なお LH-RH 100 μ g 投与により、投与した黄体期の長さには control に比べて、著明な変化は認められなかった。

Fig. 1. Plasma concentrations of LH (upper row), estrogen (middle row, concentration expressed as per cent of preinjection value) and progesterin (bottom) following the administration of 100 μ g LH-RH sc during the luteal phase of the cycle.

Fig. 2. Plasma concentrations of LH (upper row), estrogen (middle row, concentration expressed as per cent of preinjection value) and progesterin (bottom) following the administration of 1 ml saline during the luteal phase of the cycle.

考 察

合成 LH-RH 100 μ g 皮下投与により, 血中 LH-RH は投与後 4 分以内にピークをつくり, 60 分後にはほとんどの例において, 検出不能までに減少している¹⁵⁾. LH-RH 投与後 30 分以内に認められる LH の増加は投与された (外因性) LH-RH により下垂体内にすでに存在していたものが放出されたものであり, 後半の 90~150 分の LH 放出は増加してきた estrogen, progesterin と外因性 LH-RH などが協力してつくりだしたものではないか¹⁵⁾, 又は下垂体には視床下部からの LH-RH とは無関係な LH 放り出リズムも存在しているのかも知れない²⁴⁾と以前の実験において推論した。

今回は視交叉後縁に沿って切断を加えたことが, 後半の 90~150 分の LH の放出に影響を与えたことが明らかであり, このことは LH-RH 産生細胞が視索前領域と中隔核領域に存在していると考えれば^{17) 18) 22)}, LH-RH 産生ニューロンの神経細胞内でつくられた LH-RH は軸索流動によって正中隆起外層へ運ばれる²⁾が, この連絡が遮断されたことが推察される。又 LH-RH 産生細胞が視床下部弓状核や正中隆起部に存在している^{20) 23) 27) 28)}と考えれば, これらの部分と視交叉後方との間の線維連絡が断たれたものと考えられる。このことは "Halász" Cut により切断部より上位中枢からの control が断たれ, そのため内因性の LH-RH の供給に影響が出た為と考えられる。従って後半の LH 放出には切断を加えた部分又はそれより上位中枢への働きかけが必要であり, 後半の LH 放出には内因性の LH-RH が関与していることが推察される。後半の LH 放出

Fig. 3. Plasma concentrations of LH (upper row), estrogen (middle row) and progesterone (bottom) following the administration of 100 μ g LH-RH sc during the luteal phase in four retrochiasmatic deafferented baboons.

に必要な上位中枢への刺激としては、増加してきた estrogen⁵⁾²⁵⁾, progesterone¹⁰⁾¹¹⁾²⁶⁾ が考えられる。“Halász” Cut を加えた baboon においても、血中 estrogen, progesterone が増加してきたにもかかわらず後半の LH 放出が認められないことに対する1つの解釈としては、下垂体からの LH 放出に関して促進的に作用する性ステロイドホルモンの中核における作用部位が主として“Halász”Cut を加えた領域より、より上位に存在しているとも考えられるが³⁾⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾¹⁶⁾、詳細は不明である。しかし生理食塩水投与においても、投与後30～45分に血中 estrogen, progesterone の増加が認められたにもかかわらず後半の LH 増加は観察されていない。これは1つには後半の LH 放出には外因性 LH-RH の存在の必要性を示唆していると考えられる。即ち増加してきた estrogen, progesterone と外因性 LH-RH とが協力して下垂体内における新たな LH の合成に参加し、この LH が内因性 LH-RH によって刺激され後半の LH 放出として認められるのではないかと推論される。これは合成 LH-RH が下垂体内における LH の合成に加っている²⁰⁾ことを示唆しているとも考えられよう。

今回の実験により、下垂体からの LH 放出（とくに後半の放出）には内側視索前野が重要な役割をもち、血中 estrogen, progesterone の増加もこれに関与していることが推察されることから、これまでの概念である LH の周期的分泌調節の center は視索前核—視床下部前部に存在し、この部分は性ステロイドホルモンのフィードバック機構における重要な領域¹⁾⁵⁾⁹⁾であり、又間接的に内側視索前野より上位の神経系に支配されている¹²⁾¹⁶⁾²⁶⁾という考え方を今回の結果は支持するものといえる。

“Halász”Cut を受けた baboon において，LH-RH 投与後の血中 estrogen, progestin の増加が正常周期の黄体期に投与された後の estrogen, progestin の増加より少なめであることから，切断により視床下部前部以上の中枢支配が失われた場合，性腺の働きに影響があらわれてきたことが推察され，baboon においても月経，卵胞成熟，排卵，黄体形成などに，他の実験動物ですでにいわれている様な，向下垂体域⁸⁾や視索前野を含む視床下部前部領域以上の中枢部位の支配が考えられる⁷⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁹⁾²⁰⁾．又“Halász”Cut を受けた直後しばらく月経異常などが認められたが，1～2周期後には月経周期は sex skin の上では正常周期と同じ pattern を示し，実験時（平均約6ヶ月後）迄ほとんどの例において外見上正常 pattern が繰返えされたが，切断の生殖機能全体に及ぼす影響の判定には sex skin や膣細胞の周期性変化などの他に，下垂体中の gonadotropin 量や，詳細な血中ホルモンの測定，子宮内膜や卵巣の形態学的な検索なども必要であり，さらに長期間の観察が必要と考えられる⁷⁾．

今回の実験から，LH-RH 分泌及び続いて起こる LH 放出に関して内側視索前野から視床下部前部にかけての領域が重要な役割をもっていること，及びこの調節に関してこれら領域より，より上位の中枢支配が baboon においても存在することが示唆された．

結 語

正常月経周期をもった4頭の baboon の視交叉後縁に沿って“Halász”knife を入れ連絡を遮断した後，LH-RH100 μ g を皮下投与し，その後の血中 LH, estrogen, progestin を測定し，正常周期に投与した場合と比較検討して次の結果を得た．

1) 正常周期黄体期においては LH-RH 投与後30分以内と90～150分に2峰性の血中 LH の増加が認められたが，視床下部前部に“Halász”knife を加えた baboon においては LH-RH 投与により，30分以内の増加は認められたが，90～150分の後半の LH 増加は認められなかった．

2) 正常周期及び“Halász”knife を加えた baboon とともに LH-RH 投与後30～45分に血中 estrogen, progesterin の上昇を認めたが，増加の程度は切断を加えた baboon の方が少なかった．

3) 以上の結果から，LH-RH 分泌及びそれに続く LH 放出に関して内側視索前野—視床下部前部が重要な役割をもっていること及び，より上位中枢の調節機序の存在が，baboon においても推察される．

稿を終るにあたり，合成 LH-RH を提供していただいた Dr. M.L.Givner 及び baboon LH-RIA の抗原，抗体を提供していただいた Dr. V.C.Stevens, Dr. J.W.Goldzieher に感謝します．本論文の要旨は第24回日本内分泌学会東部々会総会1976年10月，東京において発表した．

文 献

- 1) Barraclough, C.A. and Haller, E.W.: Positive and negative feedback effects of estrogen on pituitary LH synthesis and release in normal and androgen-sterilized female rats. *Endocrinology* 86: 542–551, 1970.
- 2) Barry, J. and Dubois, M.P.: Immunofluorescence study of the preoptic-infundibular LH-RH neurosecretory pathway of the guinea pig during the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 15: 200–208, 1974.
- 3) Brown-Grant, K.: The role of steroid hormones in the control of gonadotrophin secretion in adult female mammals. 269–284, Eds., by Sawyer, C.H. and Gorski, R.A., *Steroid Hormones and Brain Function*, University of California Press, Los Angeles, 1971.
- 4) Davidson, J.M.: Feedback control of gonadotrophin secretion. 343–388, Eds. by Ganong, W.F. and Martini, L., *Frontiers in Neuroendocrinology*, 1969, Oxford Univ. Press, New York, 1969.

- 5) Everett, J.W.: Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 43: 389–405, 1948.
- 6) Everett, J.W.: The preoptic region of the brain and its relation to ovulation. 101–121, Ed. by Villet, C.A. *Control of Ovulation*, Pergamon Press, Oxford, 1961.
- 7) Hagino, N.: Hypothalamic regulation of ovulation and menstruation in the baboon (in preparation).
- 8) Halász, B., Pupp, L., and Uhlarik, S.: Hypophysiotropic area in the hypothalamus. *J. Endocrinol.*, 25: 147–154, 1962.
- 9) Halász, B. and 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.
- 10) Kaasjager, W.A., Woodbury, P.M., van Deiten, J.A.M.J. and van Rees, G.P.: The role played by the preoptic region and the hypothalamus in spontaneous ovulation and ovulation induced by progesterone. *Neuroendocrinology* 7: 54–64, 1971.
- 11) Kawakami, M., Seto, K., Terasawa, E. and Yoshida, K.: Mechanisms in the limbic system controlling productive functions of the ovary with special reference to the positive feedback of progestin to the hippocampus. *Prog. Brain Res.*, 27: 69–102, 1967.
- 12) Kawakami, M. and Terasawa, E.: Role of limbic structure on reproductive cycles. In: *Biological Rhythms in Neuroendocrine Activity*, edited by M. Kawakami, pp.197–219, Igaku Shoin, Tokyo, 1974.
- 13) Kawakami, M. and Kimura, F.: Acute and chronic effects of the fornix section on cyclic gonadotropin secretion and ovulation. *Endocrinol. Japon.* 22: 43–48, 1975.
- 14) Köves, K. and Halász, B.: Location of the neural structures triggering ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 6: 180–193, 1970.
- 15) 小山嵩夫: LH-RH による LH 放出機構について, 日本内分泌学会雑誌 52: 881–897, 1976.
- 16) 久保勝知: 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, 日本内分泌学会雑誌 53: 42–78, 1977.
- 17) Mess, B.: Site and onset of production of releasing factors. In: *Progress in Endocrinology*, edited by Gual, C. and Ebling, F.J.G., pp. 564–570, Excerpta Medica, Amsterdam, 1969.
- 18) Motta, M., Piva, F., and Martini, L.: New findings on the central control of gonadotrophin secretion. *J. Reprod. Fertil. [Suppl.]*, 20: 27–42, 1973.
- 19) Norman, R.L., Resko, J.A. and Spies, H. G.: The anterior hypothalamus: How it affects gonadotrophin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 99: 59–70, 1976.
- 20) Palkovits, M., Arimura, A., Brownstein, M., Schally, A.V., and Saavedra, J.M.: Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content of hypothalamic nuclei in rat. *Endocrinology* 95: 554–558, 1974.
- 21) Redding, T.W., Schally, A.V., Arimura, A. and Matsuo, H.: Stimulation of release and synthesis of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in tissue cultures of rat pituitaries in response to natural and synthetic LH and FSH releasing hormone. *Endocrinology* 90: 764–770, 1972.
- 22) Schneider, J.P.G., Grignton, D.R. and McCann, S.M.: Suprachiasmatic LH-releasing factor. *Neuroendocrinology* 5: 271–280, 1969.
- 23) Sétáló, G., Vigh, S., Schally, A.V., Arimura, A. and Flerko, B.: LH-RH containing neural elements in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 96: 135–142, 1975.
- 24) Seyler, L.E. and Reichlin, S.: Episodic secretion of luteinizing hormone releasing factor (LRF) in the human. *J. Clin. Endo-*

- crinol. Metab 39: 471-478, 1974. 25) Terasawa, E. and Kawakami, M.: Positive feedback sites of estrogen in the brain on ovulation: Possible role of the bed nucleus of stria terminalis and the amygdala. Endocrinol. Japan. 21: 51-60, 1974.
- 26) Velasco, M.E. and Taleisnik, S.: Effects of the interruption of amygdaloid and hippocampal afferents to the medial hypothalamus on gonadotropin release. J. Endocrinol. 51: 41-55, 1971. 27) Wheaton, J.E., Krulich, L., and McCann, S.M.: Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the preoptic area and hypothalamus of the rat using radioimmunoassay. Endocrinology 97: 30-38, 1975. 28) Zimmerman, E.A., Hsu, K.C., Ferin, M. and Kozlowski, G.P.: Localization of gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in the hypothalamus of the mouse by immunoperoxidase technique. Endocrinology 95: 1-6, 1974.