Hypothalamo-pituitary-ovarian Function in Female Japanese Monkeys (*Macaca fuscata*) in the Non-mating Season

Ryuzo TORII and Hideo NIGI*

*Institute for Experimental Animals, Shiga University of Medical Science, Seta tsukinowa-cho Ohtsu-shi, Shiga 520-21 and *Division of Wild Animal Medicine, Nippon Veterinary and Animal Science University, 1-7-1 Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180, Japan*

(Received 8 September 1992/Accepted 4 November 1992)

We investigated the mechanism of reduction of hypothalamo-pituitary-ovarian function in female Japanese monkeys in the non-mating season. We administered PMSG and LH-RH to 19 females in the non-mating and in the mating season. When PMSG was administered every day for 12 to 14 days to seven monkeys in the non-mating season, follicle development was observed together with an increase in serum estradiol-17 β (E₂), but there was no rise in serum LH in two animals and little increase in five others. Follicle involution began about ten days after PMSG administration, and no ovulation occurred. These findings show that secretion of LH by the pituitary in response to positive feedback by the E₂ secreted by the follicles which had developed was inadequate to induce ovulation. Serum LH levels increased markedly in five females after a single iv injection of LH-RH in the mating season, but not at all in the non-mating season, even when five-times the dose was administered. These data show that the LH-secreting function of the pituitary is definitely reduced in the non-mating season. When LH-RH was administered to seven monkeys following PMSG administration, an LH surge was observed in all animals, and ovulation occurred in four animals. These findings suggest that one reason for the reduction in pituitary-ovarian function in the non-mating season was a decline in LH-RH secretion by the hypothalamus. —KEY WORDS : induced ovulation, Japanese monkey, LH-RH, non-mating season, pituitary-ovarian function

メスニホンザルの非交尾期の視床下部—下垂体—卵巣機能

鳥居 隆三・和 秀雄*

滋賀医科大学医学部附属動物実験施設

*日本獣医畜産大学野生動物学教室

ニホンザルは、交尾期と非交尾期が明らかな季節繁殖動物であり、その生殖現象の季節変動については、多くの報告がある。著者らも、その性腺機能が、オスにおいても [8,9,18,19]、メスにおいても [1,5,6,9]、非交尾期には著しく低下することを明らかにしてきた。野崎 [12] は、飼育室の照明時間・温度の操作やメラトニンの投与実験 [13-15] の結果を総説としてまとめ、メラトニン投与や照明時間の短日・長日処

理だけではニホンザルの季節繁殖リズムは変わらなかったが、照明時間と温度の同時操作によって、リズムを変え得ることを明らかにし、中枢機能が重要な役割を演じていることを示唆した。

一方、著者らは、ほとんどのメスニホンザルが無排卵・無月経になる非交尾期の排卵誘起実験 [9,20] を通じて、非交尾期の性腺機能の低下が中枢機能の低下に由来するであろうと推定するに至った。

本論文では、非交尾期の排卵誘起に用いたPMSGおよびLH-RHの負荷に対する反応から明らかにし得た、非交尾期のニホンザルの視床下部-下垂体-卵巣系の機能について報告する。

材料および方法

実験に用いたメスニホンザルは、野生由来の推定年齢6～10歳の19頭である。これらの動物の入手および飼育管理は、日本実験動物学会および日本霊長類学会の動物実験に関する指針に則って行われた。動物はいずれも、有害獣駆除による捕獲後、滋賀医科大学動物実験施設に搬入され、1～4年間飼育されていたものである。これらの動物は、温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12時間照明（午前8時～午後8時）に設定された飼育室の個別ケージ（W920×D700×H850mmまたはW655×D750×H1,250mm）で飼育され、午前にサル用固形飼料（CMK-1、日本クレア（株）、20g/kg/day）、午後にサツマイモ（100g/head/day）が給餌され、飲水は常時給水とした。

実験開始前の1～4年間、これらのサルの月経周期は床に落ちた出血の有無によって、また、適宜行われた腹腔鏡観察によって、排卵の有無が確認された。非交尾期の実験は、2～3ヵ月間の無月経・無排卵を確認した後の7～8月に、また交尾期の実験は、規則的な月経周期および排卵が確認された12月に、各々行った。

本論文の実験は、以下の3つの部分に分けて行われた。

実験-1. 非交尾期におけるPMSG単独連日投与実験

非交尾期におけるPMSG投与によって発育した卵巣から分泌される E_2 に対する下垂体の反応を検討し、さらに、PMSGのみの投与によって排卵を誘発し得るか否かを確認するために、PMSG（セロトロピン：帝国臓器製薬（株）、製造番号A621）25 I.U./kgを、7頭のサルに12～14日間連日筋肉内投与した。その間、適宜、腹腔鏡によって卵巣を観察するとともに、橈側皮静脈から、毎回2～2.5mlのホルモン測定用の採血を行い、血中Estradiol- 17β (E_2)、Progesterone (P)およびLuteinizing hormone (LH)の測定を行った。

実験-2. 交尾期および非交尾期におけるLH-RH単回投与実験

交尾期と非交尾期における、下垂体のLH分泌予備能を比較検討するため、LH-RH投与を行った。交尾期の2頭および非交尾期の3頭に、LH-RHとして合成LH-RH（ルタミン：第一製薬（株）、製造番号GN12）を静脈内投与し、投与後5, 10, 15, 20, 30, 60および120分目の血中LH値の測定を行った。交尾期においては、1頭では月経周期（28日周期）の7日目に、もう1頭では31日周期の20日目に、LH-RH 100 μg を投与し、さらに、各々7日後に200 μg のLH-RHを投与し、投与量による反応の差異をみた。非交尾期においては、2頭では100 μg 、1頭では200 μg のLH-RH投与後の反応をみた後、100 μg 投与の1頭と200 μg 投与の1頭に、交尾期同様、それぞれ7日後に1 mgのLH-RHを投与して、その後の反応を見た。

実験-3. 非交尾期におけるPMSGとLH-RHによる排卵誘起実験

非交尾期の下垂体の機能をさらに検討するため、PMSG投与によって卵巣を発育させた後、LH-RHのみの投与によって排卵が誘起できるか否か、排卵誘起の試みを行った。7頭を用い、実験-1と同様にPMSG 25 I.U./kgを連日筋肉内投与し、腹腔鏡によって卵巣の成熟を確認した後（投与後7～11日）、LH-RHとして合成LH-RH（コンセラル：武田薬品（株）、製造番号S016）10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を、2時間間隔で排卵が確認できるまで5日間を限度として筋肉内投与した。ただし、夜間（午前0時～午前8時）の投与は行わなかったため、最高投与回数は、1日8回であった、また、腹腔鏡による卵巣の観察とともに、適宜、橈側皮静脈より2～2.5mlの採血を行い、 E_2 、PおよびLHの測定を行った。

以上の実験における卵巣の卵巣の発育および排卵の確認のための腹腔鏡観察は、塩酸ケタミン 5 mg/kgと塩酸キシラジン 1 mg/kgの混合麻酔下で、Nigam [7]の方法に準じて行った。採血は、腹腔鏡観察と同時に行った場合を除いて、採血のみの場合は、無麻酔下でその都度保定して行った。採取した血液材料は、遠心分離（3,000rpm, 15分）後、ホルモン測定に供するまで -20°C で保存した。なお、血中 E_2 、PおよびLHの測定は、各々RIAにて行った [10, 11]。

Fig. 1. Serum estradiol-17 β (E₂), progesterone (P) and LH levels after PMSG administration to female Japanese monkeys in the non-mating season

成 績

実験－1

PMSG 投与前の卵巣は、全7例において、扁平で表面にわずかに凹凸がある休止期の状態 [7] を呈し、大卵胞の発育はみられなかった。PMSG 投与開始後5日目頃から、卵巣は全体として腫脹し始め、表面はなめらかになって卵胞が発育し始めた様相を呈した。PMSG を投与し続けると、卵胞の発育はさらに顕著になり、投与開始後10日目前後に、複数個の卵胞が排卵直前と判断される状態 [20] に成熟した。しかし、さらに PMSG の投与を続けると、いずれも排卵には至らないまま、やがて退縮し始め、投与中止後2週間前後で、ほぼ処置前の大きさに退縮した。Fig. 1 は、この時の血中 E₂、P および LH 値の動態を示す1例である。PMSG 投与開始後、E₂ 値は徐々に増加し始め、6日目から著明な増加が認められた。しかし、卵胞が成熟しきった9日目を境に、最高値を示した E₂ 値は、その後急速に減少した。血中 LH 値は、7例中2例においてほとんど変化せず、低値のまま推移したが、5例においては、E₂ 値が最高値を示す頃 (Fig. 1 の例では投与9日目) から僅かな増加がみられた。血中 P 値は全例において、PMSG 投与期間中は0.2~0.7 ng/ml の低値がみられた。

これら7例の血中ホルモン値の動態は、各々のホル

モンの増加開始日や値に多少の個体差は認められたが、基本的には Fig. 1 に示した推移と同様であった。

実験－2

Fig. 2 は、交尾期と非交尾期における、LH-RH 投与後の血中 LH 値の推移を示している。交尾期 (上段) においては、LH-RH 100 μ g の投与に対して、月経周期の20日目に投与した個体 (No. 95) では LH 値の明らかな増加がみられたが、月経周期7日目に投与した個体 (No. 118) ではごくわずかな増加にとどまった。しかし、7日後に LH-RH 200 μ g を投与した場合には、月経周期の14日目および27日目にあたる両者とも、投与後30分目 (後者の No. 95 は20分目と30分目が同一値) を最高値とする著明な LH 値の増加がみられた。一方、非交尾期 (下段) においては、LH-RH 100 μ g の投与の2頭 (No. 90 および No. 93) でごくわずかな LH 値の増加が見られたが、200 μ g 投与の1頭 (No. 112) ではほとんど増加がみられず、さらに、7日後に LH-RH 1mg の大量投与を行った2頭 (No. 93 および No. 112) でも、著明な増加はみられなかった。

実験－3

PMSG で卵胞を発育させた後、LH-RH の投与に切り替えて排卵誘起を試みたところ、7例中4例において排卵が確認された。Fig. 3 は、排卵した4例中の1例の血中ホルモン値の推移を示している。実験－

Fig. 2. Serum LH levels after iv LH-RH administration to two female Japanese monkeys (●: No. 118 ○: No. 95) in the mating season (top) and to three females (X: No. 112 △: No. 90 ▲: No. 93) in the non-mating season (bottom)

1 同様、各々のホルモンの増加開始時期や値、さらには LH-RH 投与開始から排卵に至るまでの時間には多少の個体差はみられたが、基本的な動態は Fig. 3 と同様であった。排卵の有無に拘らず、7 例いずれも PMSG の連日投与によって、実験-1 と同様、複数の卵巣が成熟し、 E_2 値の明らかな増加がみられた。卵巣が成熟したと判断できた時点で、LH-RH の投与に切り替えたことにより、 E_2 値は急速に低下し、入れ替わるようにして LH 値のサージ様の急激な増加がみられ、4 例においては LH-RH への切り替え後 26~89 時間で排卵が確認された。しかし、残る 3 例においては、サージ様の LH 値の増加は、排卵した個

体と同様に認められたものの、LH-RH への切り替え後 5 日目においても排卵には至らなかった。

考 察

著者ら [20] は、非交尾期のメスニホンザルに、FSH 作用を有する PMSG の投与によって、卵巣を賦活化させ得ること、および、卵巣が成熟した時点で hCG を投与することによって排卵させ得ることをすでに報告してきた。しかし hCG への切り替えを行わず、PMSG の投与を続けた実験-1 の成績は、卵巣は成熟しても排卵には至らず、PMSG 投与開始後 10 日目前後から退縮し始め、 E_2 値も低下することを明らかにした。この時、 E_2 のポジティブ・フィードバックによると思われる LH 値の増加は、7 例中 2 例においては全くみられず、他の 5 例においても、わずかにみられる程度であった。このことは、发育した卵巣から分泌された E_2 はポジティブ・フィードバックによって視床下部、下垂体を刺激・賦活化するが、下垂体からは排卵に必要な量の LH が分泌されなかったことを示している。まったく LH が増加しなかった 2 例と、わずかながら増加がみられた 5 例の差は、おそらく中枢機能の低下の程度の差によるものであろうが、いずれにせよ、中枢機能が著しく低下していることは明らかである。しかし、この結果だけでは、視床下部と下垂体のどちらの機能低下なのか明らかにすることはできない。

実験-2 の成績は、少なくとも LH-RH に対する下垂体の LH 分泌能が、非交尾期のメスニホンザルにおいては、交尾期よりも著しく低下していることを示し得た。この場合、交尾期における実験において、月経周期の異なる時期に LH-RH を投与したことによる下垂体の感受性差、および、100 µg 投与の 7 日後に 200 µg の投与を行ったことに対する考慮を払う必要があろう。しかし、月経周期の異なる時期に LH-RH の投与を受けた 2 頭が同様の反応を示したこと、および、非交尾期においても、1 回目投与の 7 日後に 2 回目の投与を行った実験条件は交尾期と同じであることから、これらの成績を比較し、非交尾期のメスニホンザルの下垂体の LH-RH に対する LH 分泌能が著しく低下していると結論することは妥当であると思われる。

一方、PMSG の投与によって卵巣を成熟させた後、LH-RH を投与した実験-3 では、7 例中 4 例で

Fig. 3 Serum estradiol-17 β (E_2), progesterone (P) and LH levels after PMSG and LH-RH administration to female Japanese monkeys in the non-mating season. The arrow indicates ovulation.

排卵が確認された。排卵しなかった3例も含めた全例において、LH-RH投与後LH値のサージ様の著明な増加がみられたことは、この実験系においては、下垂体のLH-RHに対するLH分泌能が十分に賦活化されていたことを示している。すなわち、下垂体は、実験-2において、1 mgもの大量のLH-RHの投与に対してもほとんど反応を示さなかったが、実験-3において、PMSG前処置後のLH-RH投与に対しては排卵に至るほどのLH分泌を示していた。前処置なしにLH-RHを投与した実験-2においては、各々の個体の中枢機能が低下した状態がそのまま反応に現れているのに対して、実験-3では、LH-RH投与前にPMSG投与による E_2 の増加という前処置が行われており、ここにみられた非交尾期の下垂体のLH分泌能の差は、PMSGの前処置によるところが大きいと考えられる。

以上の成績は、非交尾期の機能低下した下垂体は、PMSGの投与によって発育した卵胞から分泌される E_2 のポジティブ・フィードバックによって、視床下部からのLH-RHの刺激があれば排卵を誘発するに十分な量のLHを分泌し得るほどに賦活化されること、一方、視床下部の賦活化は不十分であり、排卵に必要な十分量のLHを下垂体から分泌させるには至らず、排卵を誘発するには、外部からのLH-RHの投与が必要であることを示唆している。すなわち、ニホンザルの非交尾期における無月経・無排卵の要因の

一つとして、視床下部を含む上位中枢の機能低下、とりわけ視床下部の神経機構としてのLH-RHパルスジェネレーターの機能低下が考えられる。

野崎ら[12,16]は、エストロゲンの投与実験から、メスニホンザルの季節繁殖リズムは、エストロゲンのネガティブ・フィードバック機構の本体装置(パルス調節器)の感受性差、すなわち季節差によって生じると論じており、視床下部を含む上位中枢が極めて重要な役割を果していることを示している。

すなわち、メスニホンザルの非交尾期においては、光周期、ストレス、フェロモン、栄養状態等の外部環境からの刺激あるいは変化に伴って、LH-RHパルスジェネレーターへの入力に変化し、LH-RHの分泌様相に変化が生じる結果、下垂体-卵巣機能の低下がみられるのではないかと推測される。

ところで、PMSGで卵胞を成熟させた後にLH-RHの投与に切り替えた実験-3において、7例中3例で排卵は誘発されなかった。通常、視床下部からのLH-RHとそれに伴う下垂体からのLHの分泌は間欠的に行われていること[2-4]から、今回はLH-RHの投与方法として、間欠的投与を試みた。しかし、間欠的に行った時にも投与量が多すぎる場合はむしろ持続的投与に近い状態となり、これは下垂体の感受性の低下を招く恐れがあること[17,21]を考慮して、LH-RHの投与は、夜間の8時間は休止し、最高でも1日8回の投与を行うにとどめた。その結果、全例におい

てサージ様の急激な LH の増加が認められ、かつ、少なくとも 4 例において排卵が確認された事実から判断して、今回の投与方法が不適切であったとは考え難い。鳥居・和 [20] は、PMSG-hCG による排卵誘起実験の中で、PMSG による卵巣の反応の個体差や、hCG に切り替えるタイミングを誤ると排卵を誘発し得ないこともあることを示唆している。今回の排卵に至らなかった 3 例においても、個体の感受性や LH-RH への切り替えのタイミングの問題が、重要な役割を果たしていることが考えられる。さらには、鳥居・和 [20] は非交尾期の排卵誘起および人工授精による授精例が妊娠を維持できなかったことを報告し、中枢機能低下の検討の重要性を示唆した。

今後、卵巣機能が低下した非交尾期の個体への、微量の LH-RH の投与が間欠的かつ持続的に行える専用ポンプの使用を試み、交尾期と同じ下垂体-卵巣系の機能を維持し得る方法を検討したい。ニホンザルの非交尾期の性腺機能低下の要因を明らかにし、それを克服することは、ニホンザルの実験動物化の課題の一つである周年繁殖への道にもつながるものと思われる。

要 約

メスニホンザルの非交尾期にみられる性腺機能の低下の要因について検討するため、19頭を用いて LH-RH, PMSG 投与実験を行った。7 頭に PMSG を 12~14 日間連日投与したところ、卵胞の成熟とそれに伴う E_2 値の増加がみられたが、LH 値は 2 頭で全く増加がみられず、他の 5 頭でもその増加は極めてわずかであった。また、投与 10 日目以降は、卵胞も退縮し排卵は見られなかった。これは、発育した卵胞から分泌された E_2 のポジティブ・フィードバックによっても、下垂体から十分量の LH が分泌されず、排卵に至らなかったことを示している。また 5 頭に LH-RH を単独 1 回投与した時、交尾期では LH 値に明らかな増加がみられたが、非交尾期では 5 倍量の投与量にも拘らず LH 値の増加はみられず、非交尾期の下垂体は高度な機能低下にあることを示していた。さらに、7 頭に PMSG を連日投与後、LH-RH を投与することにより、全頭で LH のサージ様の増加がみられ、内 4 頭で排卵がみられた。これらの成績から、非交尾期のメスニホンザルの性腺機能の低下の理由の一つとして、視床下部の LH-RH 分泌機能を含む上位

中枢の機能低下が示唆された。

文 献

- [1] Ando, A., Nigi, H., and Ohsawa, N. (1973). Urinary estrogens as an index for estimating the time of ovulation. *Exp. Anim. Suppl.*, **22**, 479-487.
- [2] Clarke, I. J. and Cummins, J. T. (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (Gn-RH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, **111**, 1737-1739.
- [3] Dierschke, D. J., Bhattacharya, A. N., Atkinson, L. E., and Knobil, E. (1970). Circoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology*, **87**, 850-853.
- [4] Levine, J. E., Pau, K. Y., Ramirez, V. D., and Jackson, G. L. (1982). Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology*, **111**, 1449-1455.
- [5] Nigi, H. (1975). Menstrual cycle and some other related aspects of Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Primates*, **16**, 207-216.
- [6] Nigi, H. (1976). Some aspects related to conception of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Primates*, **17**, 81-87.
- [7] Nigi, H. (1977). Laparoscopic observations of ovaries before and after ovulation in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Primates*, **18**, 243-259.
- [8] Nigi, H., Tiba, T., Yamamoto, S., Floresheim, Y., and Ohsawa, N. (1980). Sexual maturation and seasonal changes in reproductive phenomena of male Japanese monkey (*Macaca fuscata*) at Takasakiyama. *Primates*, **21**, 230-240.
- [9] 和 秀雄 (1982). ニホンザル-性の生理, どうぶつ社, 東京.
- [10] Nigi, H. and Torii, R. (1983). Periovalutary time courses of plasma estradiol and progesterone in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Primates*, **24**, 410-418.
- [11] 和 秀雄・鳥居隆三 (1991). ニホンザル (*Macaca fuscata*) の排卵前後の血清 LH 動態. *実験動物*, **40**, 401-405.
- [12] 野崎真澄 (1991). ニホンザルの季節繁殖リズムの発現機序. *霊長類研究*, **7**, 103-125.
- [13] Nozaki, M., Mori, Y., and Oshima, K. (1990). Effects of artificial manipulation of photoperiod on reproductive seasonality of the female Japanese monkey. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **36**, 219-223.
- [14] Nozaki, M., Tsushima, M., and Mori, Y. (1990). Diurnal changes in serum melatonin concentrations under indoor and outdoor environments and light suppression of night-time melatonin secretion in the female Japanese monkey. *J. Pineal Res.*, **9**, 221-230.
- [15] Nozaki, M., Mori, Y., and Oshima, K. (1991). Environmental and internal factors affecting seasonal breeding of Japanese monkeys. In *Topics in Primatology*, (Symposium. Proc. XIIIth Congr. Int. Primatol. Soc.), Vol. 3, pp. 301-317, Matano, S., Tuttle, R., Ishida, H. and Goodman, M. (eds.), University Tokyo Press, Tokyo.
- [16] Nozaki, M., Watanabe, G., and Taya, K. (1991).

- Marked seasonal changes in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion in the female Japanese monkey. *Endocrinology*, **128**, 1291-1297.
- [17] Smith, M. A. and Vale, W. W. (1981). Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on cytodex beads. *Endocrinology*, **108**, 752-759.
- [18] Tiba, T. und Nigi, H. (1975). Unregelmässig aufgebaute Zellgemeinschaftendes Samenepithels beim free-renging Japanischen Makak (*Macaca fuscata*) in der Paarungszeit. *Primates*, **16**, 379-398.
- [19] Tiba, T. und Nigi, H. (1980). Jahreszeitliche Schwankung in der Spermatogenese beim "free-ranging" Japanischen Makak (*Macaca fuscata*). *Zool. Anz. Jena.*, **204**, 371-387.
- [20] 鳥居隆三・和 秀雄(1992). ニホンザルの非交尾期における誘起排卵と人工授精による人工繁殖の試み. 実験動物, **41**, 243-246.
- [21] Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchison, J. S., Plant, T.M, Belchetz, P. E., and Knobil, E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*, **109**, 376-385.