

新生児雌ラット視床下部内手術のคอร์チコステロン 日周リズム発現に及ぼす影響

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/9079 |

新生児雌ラット視床下部内手術のコルチコステロン 日周リズム発現に及ぼす影響

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

大 屋 栄 一

(昭和58年5月20日受付)

ラットのコルチコステロン (CS) 日周リズムの中枢性機序を個体発生学的に検討するために2つの実験を行った。はじめに、新生児期雌ラットの視床下部内に40 μ gのコーチゾン・アセテート (CA) のマイクロ・ペレットを両側に埋入した。CS日周リズムは21, 28, 35, 56, 120日齢で尾切開部より同一個体で6時間毎の反復採血を行った。偽手術群はパラフィン・ペレットを埋入した。対照群として背部皮下に投与したものを作製した。偽手術群と対照群は28日齢でCS日周リズムの発現をみたが、視床下部前部にCAを埋入した群は1週遅れ35日齢で発現した。しかし、内側底部にCAを埋入した群では120日齢で初めて有意なCS日周リズムを示し、著明に遅延した。全群とも性周期は正常であった。この結果は、新生児期に埋入したCAは局所で作用し、視交叉上核からの日周リズムの伝達路の発達を長期に抑制するためと考えられる。次いで、生後2日齢と10日齢で視交叉上核と弓状核の間に視床下部切断を行った。偽手術群として大脳皮質と海馬の一部を切断したものを作製した。初めの実験と同様の採血スケジュールに従ってCS日周リズムの発現を調べた。対照群と偽手術群は21日齢で有意なCS日周リズムを示した。2日齢切断ではCS日周リズムは28日齢で発現した。しかし、10日齢切断では28日齢と35日齢では低い頂値をもつ有意なCS日周リズムを示したが、21日齢、56日齢、120日齢では消失していた。個々のラットでの判定では、約半数が120日齢までCS日周リズムを示さなかった。性周期は2日齢切断は正常であり、10日齢切断は全例消失していた。この結果は、視床下部での神経連絡網は生後2日齢では未発達で可塑性を有しているが、10日齢でほぼ完成し可塑性を消失していることを示している。

Key words Circadian rhythm, Corticosterone, Hypothalamus, Cortisone implantation, Transection

地球上の多くの生物の生命現象には自転周期の約24時間を一周期とする日周リズムがみられる。ラットのコルチコステロン (CS) 分泌も、フィードバック機構とストレス反応の他にドラマチックな振幅をもつ日周リズムを示す。その変動は夜行性のラットではヒトと逆に、夕刻に頂値を示し明期に底値を示す¹⁾²⁾。CS日周リズムは他の多くの日周リズムと同じく、振幅、位相、周期の3つの要素をもち、明暗、摂食などの外部因子 (同調因子) に同調し、多くの酵素誘導や免疫系の日内変動を駆動している。CS日周リズムは恒常暗

一自由摂食などの恒常条件下では、24~25時間の個体固有の周期でフリーランすることから、内因性の日周リズムと考えられる³⁾。

CS分泌に日周リズムがあるのは、下垂体からのACTH分泌に日周リズムがあり、さらに上位の視床下部でのCRF分泌に日周リズムがあるからと考えられる⁴⁾⁵⁾。この視床下部での第一の自律性発振体 (oscillator) は、Mooreら⁶⁾の破壊実験以後、視床下部前部にある視交叉上核であると考えられるようになった。又、網膜から視交叉上核を経て視床下部各部へ放射す

Effect of Intrahypothalamic Implantation of Cortisone Acetate and Hypothalamic Transection on the Onset of Circadian Corticosterone Rhythm in Neonatal Female Rats. Eiichi Ooya, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

る細い神経伝達路(網膜一視床下部投射路)が解剖学的に証明され、ますます注目されるようになった⁷⁾⁸⁾。

この視交叉上核の昼夜の活動は¹⁴Cでラベルした2-deoxyglucoseの取り込み実験から、生後早い時期(生後1~2日)に出現すると考えられる⁹⁾。ところが、CS日周リズムは生下時にはみられず生後3~4週目の離乳期前後である¹⁰⁾。この時期は開眼に引き続き、脳内のミエリン形成とグリア増殖の盛んな時期である。発振体の機能が準備されているにもかかわらず下垂体-副腎系の日周リズムとして発現するには、視床下部での神経連絡網の発達が必要であると推測される。Kriegerら¹¹⁾とMiyaboら¹²⁾は新生児期に副腎皮質ホルモンを皮下投与すると、CS日周リズム発現が遅延することを報告している。これはcritical period内に皮下投与した副腎皮質ホルモンが視床下部に作用し、神経連絡網の発達を遅延させるためと考えられた。又、Hayashiら¹³⁾は新生児期の視床下部切断が性周期発現に及ぼす影響を調べ、2日齢切断では正常であったが、10日齢切断では性周期が消失したと報告した。視床下部前部と内側底部とのゴナドトロピンに関する神経連絡網の可塑性は10日齢では消失していることを指摘した。

著者はラットのCS日周リズム発現に関する視床下部神経連絡網の発達と可塑性を検討するために、(1)生後3日齢に微量のコーチゾン・ペレットを視床下部に直接埋入する実験、(2)生後2日齢と10日齢で視交叉上核より尾側で視床下部を切断する実験を行った。

従来の実験の多くが断頭採血によるグループ・データであり、振幅や位相のズレ(phase-shift)などの詳細な解析には不十分であった点を改良し、すでに報告した尾切開部からの微量サンプルによる測定法¹⁴⁾で、個々のラットでのCS日周リズムを経時的に解析し新たな知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 実験動物と動物管理

Sprague-Dowley系SPF成熟妊娠ラットを出産予定日より1週間以上前に静岡実験動物より購入した。室温23±2°C、湿度60%の外部より隔離された部屋で、8~20時が明、20~8時が暗の人工照明下で、オリエンタル固型飼料を自由摂食させて飼育した。出産日を毎日朝夕チェックし、出産日をDay 1とし、24時間以内に雄の仔ラットを捨て、雌の仔ラット8~10匹からなるlitterを作製した。離乳は21日齢の採血後の23日齢に行い、実験群別に3~5匹の群居飼育を行った。ケージはウレア製の不透明ケージを用い、おがくずを敷き使用した。

2. 体重と摂食量測定および採血と全血CS測定法

1) 体重と摂食量測定

生後3, 7, 14, 20, 27, 34, 55, 120日に体重を測定し、体重増加と一般的所見を観察した。28日齢以後の採血の前々日の19時30分、前日の8時と19時30分に、群居飼育の各ケージの固型飼料の重量を測定し、ラット1匹あたりの昼夜の摂食量を表わした。

2) 採血と全血CS測定法

21日齢、28日齢、35日齢、56日齢、120日齢の8時、14時、20時、2時の各6時間毎に連続48時間にわたり採血した。ただし120日齢は24時間のみとした。ラットの尾部の血管部位にカミソリで切開を加え、マイクロピペット(ACCU-FILL 90 Beton, Dickinson Co.)で10μl採血し、200μlの蒸留水で溶血させ、直ちに-20°Cで凍結保存を行った。採血はストレスを考慮して、平均20秒、長くとも1分以内に完了した。凍結保存した試料は後日室温に放置し融解後、全血のまま Gomez-Sanchezら¹⁵⁾の方法に準じた radioimmunoassay 法で、全血CSを測定した。測定はすべて duplicate で行った。この方法の intra-assay 変動係数は朝と夕のプールした試料で、それぞれ6.3%と5.4%であり、inter-assay 変動係数は9.6%である。

3. 開眼、腔開口と性周期の観察

13日齢より朝夕開眼の有無をチェックし、33日齢より朝夕腔開口の有無をチェックした。性周期は60日齢から75日齢まで毎日綿棒で腔スメアを採取し観察した。

4. 新生児期視床下部コーチゾン埋入実験

生後3日齢の雌ラットで Hayashi¹⁶⁾¹⁷⁾の方法に準じて歯科用セメントで作製した自家製ヘッドホルダーで頭部を固定し、更にラット用定位脳手術装置(高橋製)を用い、氷麻酔下でマイクロ・ペレットを両側視床下部に埋入した。コーチゾン・アセテート(CA)埋入群(CA群)のマイクロ・ペレットはコーチゾン・アセテート(Sigma, St. Luis, U.S.A.)、パラフィン(38~44°C融解)、チャコール・ボーン(American Norit Co.)を重量比50%, 45%, 5%で作製した。偽手術群(Sham群)のマイクロ・ペレットはパラフィンとチャコール・ボーンの重量比95%, 5%で作製した。CA群とSham群のマイクロ・ペレット重量をメトラ(Mettler ME 22)で測定した結果、1個の平均重量は79.1±0.7μgと72.5±1.7μgであった。従ってCAペレットには約40μgのCAが含まれ、CA群のラットは両側で約79μgのCAが埋入されることになる。ラットをペレット埋入部位によって次の3群に分け、各々にSham群を作った。(1) anterior hypothalamus (AH)群: 前視索野, 前視床下部核, 視交

又上核を含む前部視床下部領域 (CA-AH 群 10 匹, Sham-AH 群 9 匹) (2) medial basal hypothalamus (MBH) 群: 腹内側核および背内側核, 弓状核を含む内側底部視床下部領域 (CA-MBH 群 8 匹, Sham-MBH 群 7 匹) (3) subcutaneous (SUBC) 群: 背部の皮下組織 (CA-SUBC 群 8 匹, Sham-SUBC 群 11 匹) である。

5. 幼若期視床下部切断実験

生後 2 日齢と 10 日齢の雌ラットを歯科用セメントで作製した自家製ヘッドホルダーを用いて, ラット用定位脳手術装置に固定し, 視交叉上核と弓状核の間で視床下部切断を行った。即ち, カミソリを細工した幅 3 mm (2 日齢用) と 4 mm (10 日齢用) のナイフを定位脳手術装置にとりつけ, Bregma より 2 mm 尾側で脳底骨に達するまで切りおろした。これを Cut 群とした (Day 2-Cut 群 5 匹, Day 10-Cut 群 10 匹)。偽手術は同様のナイフを 3 mm 切りおろし, 大脳皮質と海馬の一部を切断した。これを Sham 群とした (Day 2-sham 群 4 匹, Day 10-Sham 群 13 匹)。未処置ラットを対照群とした (Cont. 群 9 匹)。生後 2 日齢の手術は氷麻酔下で行い, 生後 10 日齢の手術を 10% ネプタール 0.08 ml の麻酔下で行った。

6. ストレス実験

実験ラットを生後 90 日齢で, 新奇環境に対する情動ストレスと考えられている open field テスト¹⁸⁾を行った。Open field 装置は底面の直径 60 cm, 上縁の直径 80 cm, 高さ 47 cm のステンレス製の半円錐型をしている。灰白色に塗装され, 床面の中心から 31 cm の高さに 100 W の白熱電灯が設置され均等に照明されている。前日 13~15 時に採血し前値とした。当日同一時刻に open field 装置内に 3 分間置き, 15 分後に採血し, これを後値とした。

7. 臓器重量と脳の組織学的検索

実験ラットは 121 日齢でネプタール麻酔下で開胸し, 下行大動脈を鉗子でクリップし, 心臓の左心室に 10% ホルマリン・バッファーを注入し, 脳組織を灌流固定し, 下垂体 (ホルマリン固定されたもの), 副腎, 卵巣, 子宮の湿重量をメトラにて測定した。各々の臓器重量は体重 100 g あたりで表わした。手術群と偽手術群で全例の脳を hematoxylin-eosin で染色し, 埋入部位と切断部位を組織学的に確認した。開胸時肉眼的に肺炎の所見がないことを確認した。

8. 統計処理と日周リズムの判定

CS 日周リズムのグループ・データについては経時的変化の有意性を一元配置分散分析法 (ANOVA 法), 頂値と底値の差の有意差を Newman-Keuls 法で検定した¹⁹⁾。個々のラットでの CS 日周リズムの判定

は Wilson ら²⁰⁾ のものを参考にして, (1) 頂値が 2 日とも 20 時か 2 時である。(2) 頂値と底値の振幅が Cont. 群のもの平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差の範囲内にある。(3) 連続した 2 日間で各々の時間の値に正の相関がある。(4) その相関係数が Cont. 群での平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差の範囲内にある。以上のうち, 24 時間採血では (1) と (2), 48 時間採血では (1) から (4) のすべてを満たすものを日周リズムがあると判定した。なお採血 1 日目の 8 時の値はストレスの影響が強い可能性もあり除外して判定した。体重, 臓器重量, ストレス実験は Student's-t 検定を行った。

成 績

I. 新生児期視床下部とコーチゾン埋入実験

1. 一般的所見と性周期

実験ラットは各群とも有意な差がなく体重の増加を示し順調に成長した。又, 発毛や行動にも異常は認めなかった。手術操作による直後の死亡率は, CA 群 25%, Sham 群 20%, SUBC 群 14% であったが発育途中での死亡はなく, 埋入したコーチゾンの全身への影響はなかった。開眼は CA-AH 群が 14.0 ± 0.5 日, CA-MBH 群が 14.1 ± 0.4 日, Sham-AH 群が 15.1 ± 0.8 日, Sham-MBH 群が 14.4 ± 0.4 日, CA-SUBC 群が 13.8 ± 0.7 日, Sham-SUBC 群が 14.3 ± 0.7 日であった。Control 群である Sham-SUBC 群と有意な差がみられたのは Sham-AH 群 ($p < 0.05$) のみであり, 他の群では有意差はみられなかった。腔開口は, CA-AH 群が 41.0 ± 2.1 日, CA-MBH 群が 44.5 ± 5.2 日, Sham-AH 群が 37.0 ± 1.1 日, Sham-MBH 群が 36.8 ± 0.7 日, CA-SUBC 群が 35.9 ± 1.1 日, Sham-SUBC 群が 37.6 ± 0.9 日であり, Sham-SUBC 群に対して CA-AH 群 ($p < 0.001$) と CA-MBH 群 ($p < 0.001$) が有意に遅延し, CA-SUBC 群 ($p < 0.005$) が早かった。しかし, 性周期は全群で 4~5 日の正常な性周期であった。

2. 摂食と CS 日周リズム

図 1 は昼夜の摂食量を示している。各群とも測定をはじめた 27 日齢より夜間の摂食量が多かった。ケージ毎の測定のため試料数が少なく統計処理できないが, CA-MBH 群では 34 日齢, 55 日齢で昼間摂食量が Sham 群に比して多いようである。CA-AH 群は Sham 群と差異は認められないようである。

図 2 は皮下投与した SUBC 群の CS 日周リズムであるが, 21 日齢では各点とも低値で平坦なパターンを示した。28 日齢では CA-SUBC 群も Sham-SUBC 群も同様に 20 時に頂値をもつ有意な ($p < 0.01$) 日周リズムを示した。以後 35 日齢, 56 日齢と頂値は高くなっ

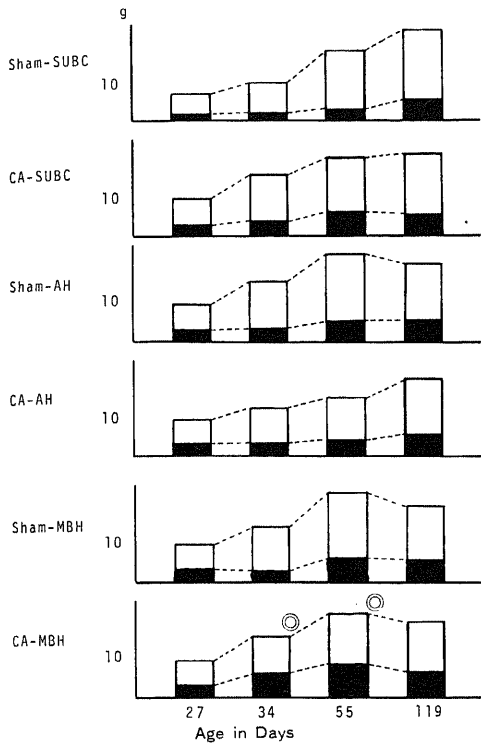


Fig. 1. Effect of sham or CA implantation on food intake. The nocturnal feeding rhythm was first evident at 28 days of age in all groups. In the CA-MBH rats (C), the day-night difference of food intake tended to be smaller compared with those of other groups. Solid and open columns represent the food consumption (g/a rat) of light and dark period.

た。

図3は視床下部前部に埋入したAH群である。CA-AH群は21日齢、28日齢とも有意な日周リズムを示さなかった。35日齢で有意な ($p < 0.01$) 日周リズムがみられたが、頂値はCA-AH群で $8.7 \pm 1.9 \mu\text{g/dl}$ 、Sham-AH群で $18.3 \pm 1.5 \mu\text{g/dl}$ であり、CA-AH群の振幅は35日齢で有意に ($p < 0.01$) 抑制されていた。しかし、56日齢と120日齢ではCA-AH群とSham-AH群はともにSham-SUBC群と同じ程度の振幅を示した。

内側底部の視床下部に埋入したMBH群は図4に示した。Sham-MBH群の日周リズムの発現、振幅ともSham-SUBC群と同様であった。これに反し、CA-MBH群は28日齢までは低値で平坦なパターンであり、35日齢と56日齢ではCSの分泌はみられるが、統計上有意な日周リズムはみられず、120日齢ではじめ

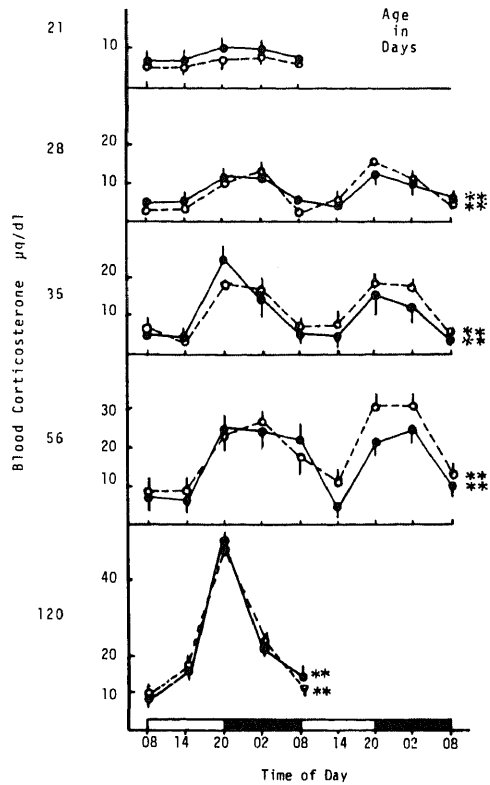


Fig. 2. Mean Levels \pm SE in blood corticosterone in rats given sham (\circ , $n=11$) or CA pellets (\bullet , $n=8$) subcutaneously. Light and dark periods are shown by open and solid areas below the figures. Asterisks designate P values (** $p < 0.01$; * $p < 0.05$) calculated by ANOVA and Newman-Keuls test for grouped data.

て有意な ($p < 0.05$) 日周リズムを示した。即ち、CA-MBH群ではCSの分泌はあるが、日周リズムの発現は著明に遅延した。

個々のラットでのペレット埋入部位とCS日周リズムの有無を前述の著者の判定基準にもとづき示したのが図5である。Sham-AH群で28日齢に2匹、56日齢で1匹が日周リズムを示さなかったが、Sham-MBH群は全例で日周リズムを示した。CA-AH群では、28日齢で9匹が日周リズムを示さなかったが、35日齢と56日齢では10匹全例が日周リズムを示した。しかし、120日齢では2匹が再びリズムを示さなかった。CA-MBH群では28日齢で8匹、35日齢で4匹、56日齢で2匹、120日齢で2匹が日周リズムを示さなかった。SUBC群は28日齢以後全例で日周リズムを示した。

このように個々のラットでのデータは、グループ・データとよく一致し、コーチソンの視床下部へ

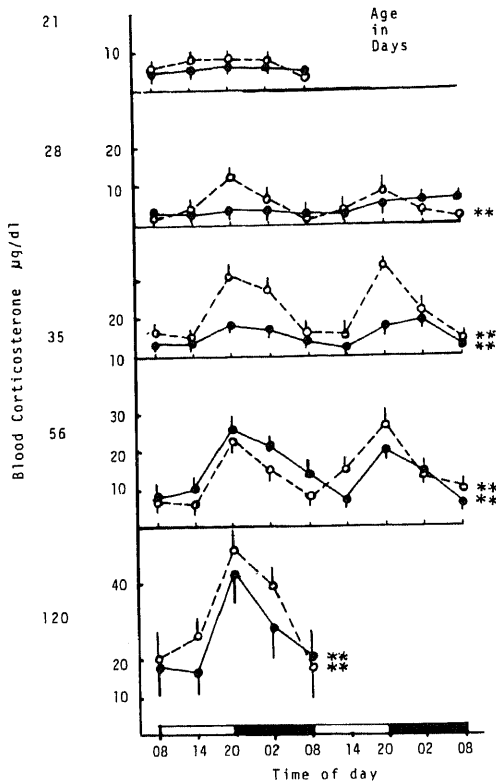


Fig. 3. Mean Levels \pm SE in blood corticosterone in rats given sham (\circ , $n=8$) or CA pellets (\bullet , $n=10$) in the anterior hypothalamus. ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

の埋入はCS日周リズムの発現を遅延させ、又、その影響は視床下部の内側底部に埋入した群で大きかった。

3. ストレス実験

90日齢でopen fieldテストを実施し、その結果を表1に示した。前値はCA-AH群が最も高く、CA-SUBC群が最も低かった。Sham群では3群とも7.6, 7.9, 8.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ と一定していた。テスト後の値は、全群とも有意な ($p<0.02$) CS値の増加をみた。この後値は56日齢の頂値よりやや低い値であった。

4. 臓器重量

臓器重量は表2に示した。すべて体重100gあたりに換算して表わしている。CA-MBH群で、下垂体 ($p<0.05$) と副腎 ($p<0.01$) が小さかった。CA-AH群では、副腎 ($p<0.01$) が小さかった。体重や性腺重量に有意な差はなかった。

II. 幼若期視床下部切断実験

1. 一般的所見と性周期

実験ラットは各群とも有意な差がなく体重の増加を示し順調に成長した。手術操作による術後4日での死

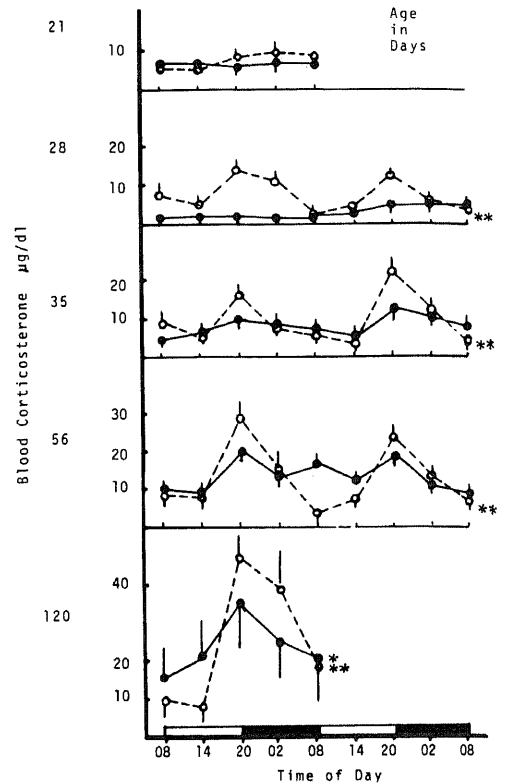


Fig. 4. Mean Levels \pm SE in blood corticosterone in rats given sham (\circ , $n=7$) or CA pellets (\bullet , $n=8$) in the medial basal hypothalamus. ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

亡率は、Day 10-Cut群は53.3%、Day 2-Cut群は7.1%、Day 10-Sham群は0%、Day 2-Sham群は14.3%、Cont.群は0%であった。発毛は全群正常であったが、Day 10-Cut群で採血後ケージ内をすばやく回転走行するものが多く、一部のラットは頭部や尾部を損傷しており、情動行動上の変化がうかがわれた。開眼はDay 10-Cut群は 16.5 ± 0.5 日、Day 10-Sham群は 15.9 ± 0.8 日、Day 2-Cut群は 16.4 ± 1.7 日、Day 2-Sham群は 16.5 ± 1.7 日、Cont.群は 16.2 ± 0.7 日であった。Day 10-Sham群がやや早い。他のすべての群と同様に有意な差はなかった。腔開口はDay 10-Cut群は 34.7 ± 2.7 日、Day 10-Sham群は 40.3 ± 3.2 日、Day 2-Cut群は 36.6 ± 1.8 日、Day 2-Sham群は 38.3 ± 1.5 日、Cont.群は 39.6 ± 2.1 日であった。Cont.群に対してDay 10-Cut群 ($p<0.001$) とDay 2-Cut群 ($p<0.005$) は早期に腔開口がみられた。性周期はDay 10-Cut群10匹中8匹が連続発情を示し、2匹が連続非発情を示し、全例性周期を欠如していた。他の群では全例4~5日の正常性周期であった。

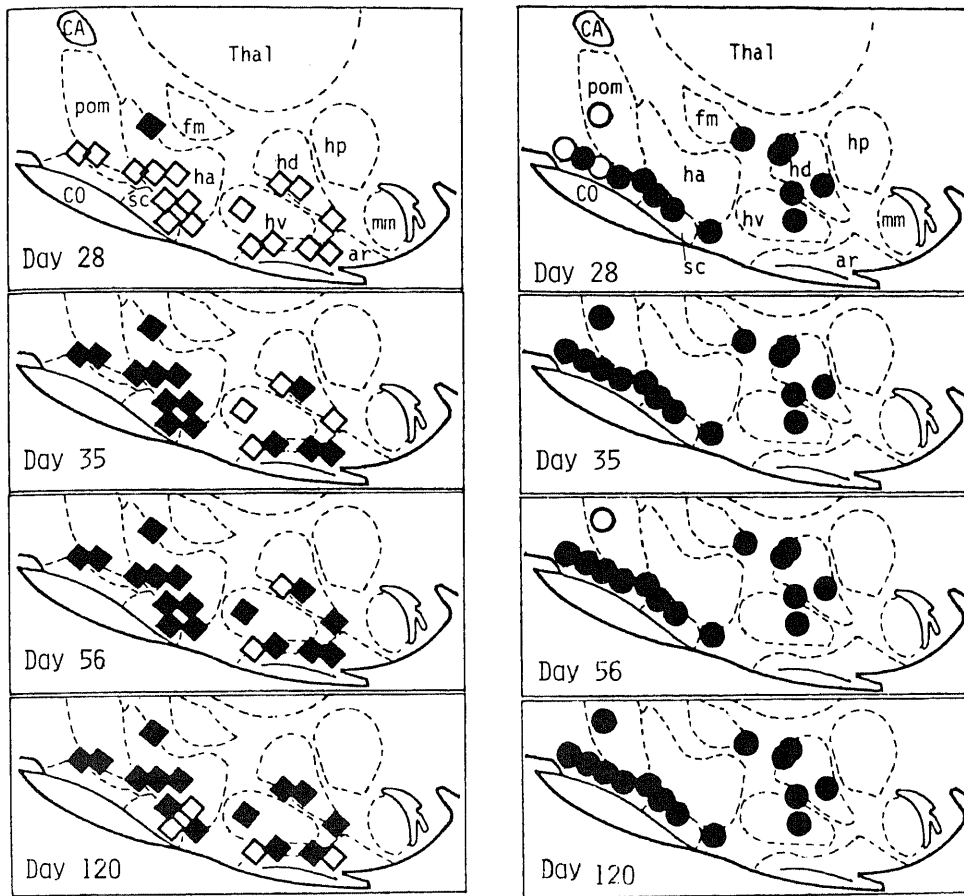


Fig. 5. Parasagittal diagrams depicting the loci of sham (circles) and CA micropellets (quadrangles). Open symbols indicate the absence, solid symbols the presence of a circadian corticosterone rhythm in individual rats. ar=arcuate nucleus; CA=anterior commissure; CO=optic chiasma; fm=paraventricular nucleus; ha=anterior hypothalamic nucleus; hd=dorsomedial hypothalamic nucleus; hp=posterior hypothalamic nucleus; hv=ventromedial hypothalamic nucleus; mm=medial mamillary nucleus; pom=medial preoptic nucleus; sc=suprachiasmatic nucleus; Thal=thalamus.

Table 1. Responses of sham or CA implantation to open field stress. Each group represents a mean \pm SE. P values calculated by student's t-test.

| Treatment | Animals n | Blood corticosterone ($\mu\text{g}/\text{dl}$) | | p |
|------------|--------------|--|----------------|---------|
| | | before stress | after stress | |
| Sham- SUBC | 11 | 8.3 \pm 1.7 | 17.5 \pm 2.9 | < 0.02 |
| CA- SUBC | 8 | 5.0 \pm 1.9 | 15.3 \pm 2.4 | < 0.005 |
| Sham- AH | 8 | 7.6 \pm 1.9 | 21.0 \pm 1.3 | < 0.001 |
| CA- AH | 10 | 11.5 \pm 2.2 | 18.1 \pm 1.3 | < 0.05 |
| Sham- MBH | 7 | 7.9 \pm 3.0 | 18.9 \pm 3.1 | < 0.05 |
| CA- MBH | 8 | 8.8 \pm 1.7 | 15.6 \pm 1.9 | < 0.02 |

Table 2. Effect of sham or CA implantation on organ weights on day 120 (mean \pm SD). Significantly different from sham-implanted group by student's *t*-test.

| Treatment | Animals n | Body weight g | Pituitary mg/100 g BW | Adrenals mg/100 g BW | Ovarys mg/100 g BW | Uterus mg/100 g BW |
|-----------|--------------|------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Sham-SUBC | 11 | 324.8 \pm 37.9 | 7.3 \pm 0.8 | 25.5 \pm 3.2 | 32.9 \pm 5.7 | 195.6 \pm 39.8 |
| CA-SUBC | 8 | 303.3 \pm 23.5 | 6.6 \pm 1.2 | 23.4 \pm 1.8 | 30.4 \pm 5.7 | 202.5 \pm 43.1 |
| Sham-AH | 8 | 293.8 \pm 35.9 | 7.0 \pm 1.3 | 26.2 \pm 3.2 | 32.6 \pm 5.4 | 216.1 \pm 58.4 |
| CA-AH | 10 | 285.1 \pm 31.3 | 5.7 \pm 1.7 | 18.6 \pm 3.9** | 33.1 \pm 6.6 | 173.2 \pm 30.1 |
| Sham-MBH | 7 | 293.1 \pm 14.7 | 5.9 \pm 1.6 | 26.5 \pm 3.5 | 30.9 \pm 5.5 | 193.5 \pm 47.9 |
| CA-MBH | 8 | 264.3 \pm 37.3 | 3.7 \pm 1.4* | 18.9 \pm 2.3** | 32.7 \pm 8.1 | 199.8 \pm 29.9 |

**P < 0.01; *P < 0.05.

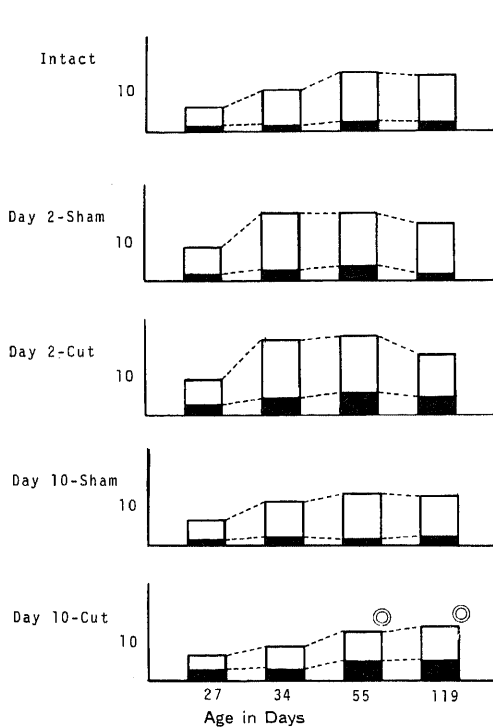


Fig. 6. Effect of sham or hypothalamic transection on food intake. In rats given hypothalamic transection at day 10 (⊙), the day-night difference of food intake tended to be smaller compared with those of other groups.

た。

2. 摂食とCS日周リズム

図6は昼夜の摂食量を示している。各群とも27日齢より夜間の摂食量が多いが、Day 10-Cut群とDay 2-Cut群では他の群に比して昼間の摂食量の比率が大きかった。一部で2日間にわたって測定したが再現性を示した。

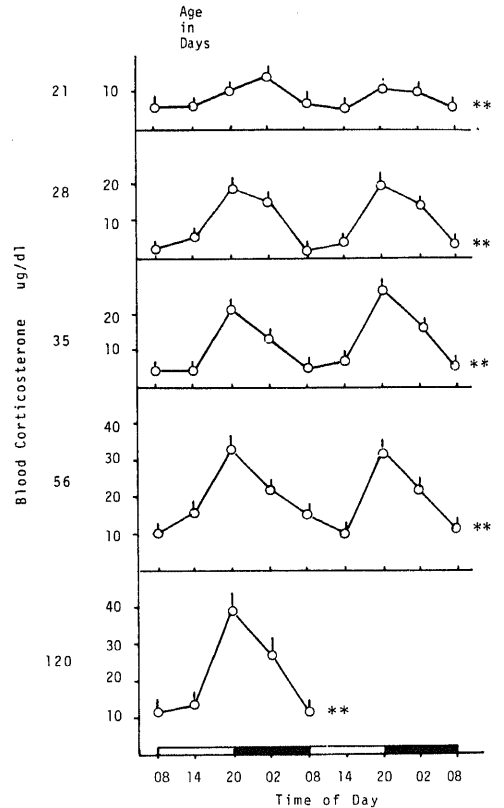


Fig. 7. Mean Levels \pm SE in blood corticosterone in rats (control group, n=9). Light and dark periods are shown by open and solid areas below the figures. **p < 0.01; p < 0.05.

Cont.群のCS日周リズムを図7に示した。21日齢で低値ながらも20時に頂値をもつ有意な(p < 0.01)日周リズムが出現していた。28日齢以後、次第に振幅をましていった。

図8はDay 2-Cut群のCS日周リズムである。

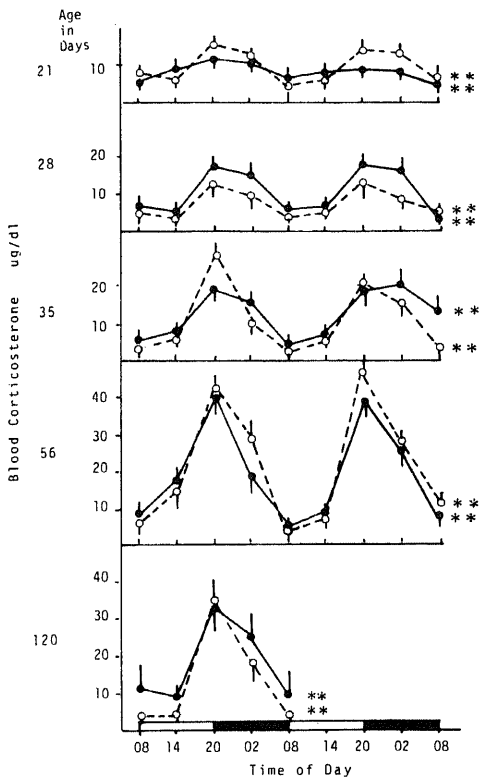


Fig. 8. Mean Levels±SE in blood corticosterone in rats given sham (○, n=4) or hypothalamic transection (●, n=5) at day 2. **p<0.01; *p<0.05.

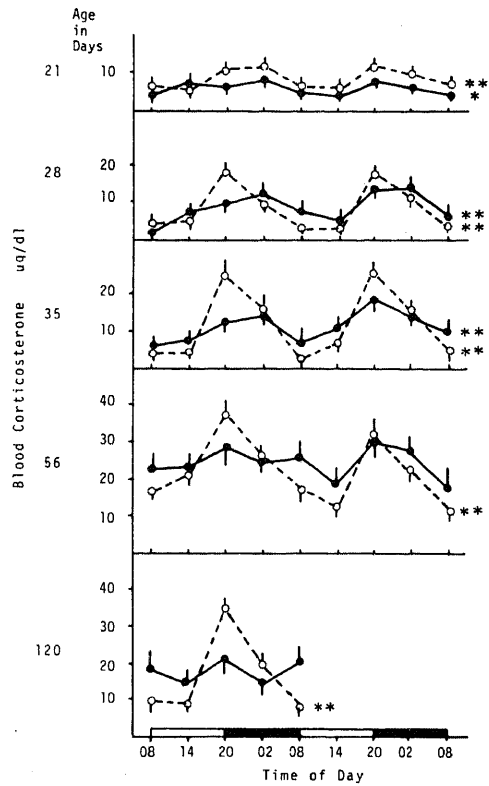


Fig. 9. Mean Levels±SE in blood corticosterone in rats given sham (○, n=13) or hypothalamic transection (●, n=10) at day 10. **p<0.01; *p<0.05.

破線で示した Day 2-Sham 群では Cont. 群と差異はなかった。Day 2-Cut 群では 21 日齢で 20 時に低い頂値をみるが有意な日周リズムはない。しかし、28 日齢以後は Cont. 群と差異なく振幅をまし有意な (p<0.01) 日周リズムを示した。

図 9 は Day 10-Cut 群である。破線で示した Day 10-Sham 群は Cont. 群と差異はみられず、正常な日周リズム発現をみた。一方 Day 10-Cut 群は 28 日齢と 35 日齢では振幅は小さいが有意な (p<0.01) 日周リズムがみられたが、56 日齢、120 日齢では再び日周リズムは消失していた。

個々のラットでの CS 日周リズムの有無を表 3 にまとめた。Day 10-Sham 群や Day 2-Sham 群は 28 日齢以後はほとんどの例で出現していた。Day 2-Cut 群も 28 日齢以後 5 匹中 4 匹が日周リズムが示した。一方 Day 10-Cut 群は 28 日齢で 10 匹中 3 匹、その後も半数で日周リズムが認められなかった。CS 日周リズムなしと判定した CS 分泌パターンでフリーランや位相のずれを示したものはなかった。即ち、2 日齢の視床

Table 3. Presence of a circadian corticosterone rhythm in individual rats after hypothalamic transection.

| Cut at | Age (d) | Cut | Sham-Cut |
|--------|---------|------|----------|
| Day 2 | 21 | 3/5 | 4/4 |
| | 28 | 4/5 | 4/4 |
| | 35 | 4/5 | 3/4 |
| | 56 | 5/5 | 4/4 |
| | 120 | 4/5 | 4/4 |
| Day 10 | 21 | 2/10 | 9/13 |
| | 28 | 3/10 | 13/13 |
| | 35 | 6/10 | 12/13 |
| | 56 | 5/10 | 13/13 |
| | 120 | 4/10 | 13/13 |

下部切断は性周期や CS 日周リズム発現に影響を与えなかったが、10 日齢の視床下部切断は性周期の完全な消失と CS 日周リズムの発現の遅延もしくは一部で欠如がみられた。

Table 4. Responses of sham or hypothalamic transection to open field stress. Each group represents a mean \pm S.E. P values calculated by student's t-test.

| Treatment | Animals n | Blood corticosterone (μ g/dl) | | P |
|-------------|--------------|------------------------------------|----------------|--------|
| | | before stress | after stress | |
| Control | 9 | 16.8 \pm 5.8 | 53.2 \pm 3.4 | <0.001 |
| Day 2-Sham | 4 | 10.0 \pm 3.4 | 52.4 \pm 2.6 | <0.001 |
| Day 2-Cut | 5 | 15.8 \pm 8.1 | 45.2 \pm 1.9 | <0.01 |
| Day 10-Sham | 13 | 13.6 \pm 3.0 | 60.2 \pm 2.5 | <0.001 |
| Day 10-Cut | 10 | 29.5 \pm 4.6 | 53.6 \pm 4.9 | <0.005 |

Table 5. Effect of sham or hypothalamic transection on organ weights on day 120 (mean \pm SD). Significantly different from sham-implanted group by student's t-test.

| Treatment | Animals n | Body weight g | Pituitary mg/100g BW | Adrenals mg/100g BW | Ovarys mg/100g BW | Uterus mg/100g BW |
|-------------|--------------|-------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| Control | 9 | 256.9 \pm 6.7 | 7.3 \pm 0.4 | 25.4 \pm 1.1 | 28.7 \pm 0.9 | 244.4 \pm 21.8 |
| Day 2-Sham | 4 | 290.8 \pm 10.2* | 6.8 \pm 0.5 | 31.8 \pm 1.1** | 27.5 \pm 2.4 | 199.9 \pm 2.2 |
| Day 2-Cut | 5 | 278.6 \pm 17.7 | 5.5 \pm 0.4* | 26.2 \pm 2.8 | 27.5 \pm 1.9 | 268.4 \pm 38.6 |
| Day 10-Sham | 13 | 243.3 \pm 5.2 | 6.6 \pm 0.3 | 27.4 \pm 1.3 | 27.7 \pm 1.4 | 214.9 \pm 8.8 |
| Day 10-Cut | 10 | 198.9 \pm 16.1 | 6.5 \pm 0.8 | 33.7 \pm 4.2 | 20.7 \pm 1.2** | 211.5 \pm 28.5 |

** P<0.01; * P<0.05

3. ストレス実験

90日齢に open field テストを実施した。その結果を表4に示した。前値は Day 10-Cut 群が高かったが、Cont.群と有意な差はなかった。テスト後の値は、全群とも有意な ($p<0.01$) 値の増加をみた。しかし、個々のラットの成績では、Day 10-Cut 群の10匹中2匹は前値が高いためストレスに対してCS値は減少した。又、open field テスト時に観察した3分間の自発走行量は Cont.群が 81.2 ± 4.3 であったのに対し、Day 10-Cut 群は 27.5 ± 3.5 と著明に減少 ($p<0.001$) していた。Day 10-Sham 群は 97.2 ± 3.7 で増加 ($p<0.02$)、Day 2-Sham 群は 66.5 ± 1.3 で減少 ($p<0.05$) していた。Day 10-Cut 群は強い情動行動上の異常が示唆された。

4. 臓器重量と脳の組織学的検索

臓器重量は表5に示した。Day 10-Cut 群では卵巣が小さく ($p<0.01$)、副腎は大きい傾向にあった。Day 2-Cut 群では、下垂体が小さく ($p<0.05$)、Day 2-Sham 群では副腎が大きかった ($p<0.01$)。

脳の組織学的検索では、Day 10-Cut 群では切断部

位にグリアの浸潤がみられ、物理的に前部と内側底部の間の線維連絡が断たれていた。一部の例では空隙をみるものもあった。Day 2-Cut 群では、新生児期の神経切断の跡が明瞭にみられ、その部位ではニューロンの細胞体が欠けていたがグリアの浸潤は殆んどみられなかった。両者とも多少の水頭症を伴っていた。

考 察

1. CS 日周リズムについて

副腎皮質ホルモンの日周リズムは、Pincus²¹⁾がヒト正常男子で17-KSの尿中排泄に昼夜の差をみとめたことにはじまる。Guillemin¹⁹⁾やHalberg²²⁾がラットでの血中CS日周リズムをはじめて報告した。

Wilson²³⁾は、眼球摘出ラットで尾静脈採血で4時間毎の連続44時間の血中CS日周リズムを観察し、10週後に個々のラットがフリーラン・リズムを示すことを証明した。CS日周リズムが locomotive activity 日周リズムなどと同様に、単に環境からの入力に対して受動的に反応する外因性リズムではなく、生体固有の計時機構によって形成される内因性リズムであること

を示した。

Critchlow ら²²⁾は明暗サイクルを逆転することで、CS 分泌の頂値は 12 時間ずれ、暗期直前に位相がずれること (phase-shift) を報告した。Coover ら²³⁾や Johnson ら²⁴⁾は、明期開始後 1 時間だけの摂水スケジュールで、CS 日周リズムの頂値が摂水開始直前へずれることを報告した。Krieger²⁵⁾は明期開始後 2 時間だけの摂水、摂食の条件で約 15 日後に同様の phase shift がみられることを報告した。Takahashi ら²⁶⁾は恒常明や盲目条件下で同様の phase-shift が起こることを報告した。CS 日周リズムには明暗、摂食、摂水などの外部因子が強く働きかけ、そのスケジュールに同調してくる。それらの同調因子が全く存在しない条件下では脱同調し、生体個有のフリーラン・リズムを示す。

CS 日周リズムは生体において重要なリズムであるが、このリズムは他の多くの生体リズムと連動している。Gibbs ら²⁷⁾は盲目ラットで running activity と CS の間に相関がみられることを報告した。Takahashi ら²⁸⁾は盲目ラットと連続照明下の正常ラットで、CS 日周リズムと摂食リズムが parallel に位相変化することを示した。又、Honma ら²⁹⁾は連続照明下で locomotor activity と体温と CS 日周リズムがきれいに連動してフリーランすることを示している。すべての生体の日周リズムは一つの主時計によって駆動していることが推測される。

Hiroshige ら⁹⁾は視床下部 CRF 活性を bioassay し、CS 日周リズムより 4 時間先行する日周リズムを示すことを報告した。Ixart ら⁵⁾も CRF 活性と ACTH を bioassay し、明期開始より CRF 活性、ACTH、CS は、それぞれ 9.4 時間、10.3 時間、14.4 時間に頂値を示すことを報告した。一方、Krieger らはコルチコステロイド分泌の全くみられない Addison 病患者で異常な高値を示す ACTH 分泌に日周性を示すことを報告した。これらの事実は、CRF → ACTH → CS という分泌系がそれぞれ日周リズムをもって作動し、その間の連結 (coupling) と統合 (integration) が CS 日周リズムを形成していると考えてよい。又、副腎の CS 分泌を介してのフィードバックと視床下部一下垂体の ACTH 分泌の日周性とは独立したシステムであると考えられる。

最近になって視床下部の主たる計時機構＝自律性発振体として視交叉上核が注目されている。Moore ら⁶⁾が成熟ラットで視交叉上核の両側電気破壊を行い、CS 日周リズムの消失を初めて確認した。この実験は 24 時間 4 点の断頭採血で術後 21 日目だけの観察であることが問題であった。しかしその後、視交叉上核破壊で

種々の日周リズム消失が報告された。飲水と活動量³¹⁾、脳波記録による睡眠と覚醒サイクル³²⁾、心拍数³³⁾、CS と体温と TSH³⁴⁾、などである。しかし、Watanabe ら³⁵⁾は視交叉上核破壊ラットで活動量と CS を観察したところ、日周リズムは消失していたが両者は連結し (coupling) ながら 1~2 時間周期のウルトラディアン・リズムを示したと報告した。これらの破壊実験とは別に、Inoue ら³⁶⁾はラットで視交叉上核を含んだ視床下部島を作り、周囲との線維連絡を断ち島内に電極を挿入し、神経細胞の電気活動を記録した。その結果、島内からは日周リズムが検出されるが島外では消失していた。これらの実験結果は、視交叉上核がラットの各種日周リズムの自律性発振体であることを強く示すものである。

ラットの CS 日周リズムは生下時には存在しない。Allen ら¹⁹⁾が初めて CS 日周リズムが生後 30~32 日目に発現することを報告した。その後様々の報告がなされたが多くは生後 3~4 週目の出現で一致している。この一週間の差異は、ラットの系、性、飼育条件 (明暗の時間、離乳時期、ハンドリングやストレスの有無)、採血の条件によるものと考えられる。日周リズムの個体発生には、開眼や脳の発達が必要であるが、前述した様々の外部因子による同調も重要である。Levin ら³⁷⁾は、盲目仔ラットも正常母親と同一ケージに飼育すると、4 週目に夜間に高い頂値をもつ CS 日周リズムが出現することを報告した。高橋ら³⁸⁾は盲目仔ラットを、生母とは phase-shift した育母ラットに育てさせると、育母に同調し、その後自己個有の周期でフリーランすることを報告した。Miyabo ら³⁹⁾は、生下時からの授乳・摂食に同調した CS 日周リズムを示すことを報告した。CS 日周リズムの個体発生には、明暗と摂食の他に母親の存在が強い同調因子として働き相互に関係していると思われる。

2. CS 日周リズム研究方法について

以前の CS 日周リズムの研究は、ストレスの影響をおそれて断頭採血が主であったが、これでは各点はグループ・データとしてしか表わされず、又ラットの匹数も多く必要となり個体発生の研究やフリーランや phase-shift の証明には不適當であった。Krieger ら⁴⁰⁾は尾静脈より採血し、同一個体から経時的に CS の変動をはじめ観察した。その後多くの研究者が尾部からの採血法を採用して改良を加えている。著者らの研究室では、尾切開部より 10 μ l 採血し、蒸留水に溶血させて全血のまま assay を行っている⁴¹⁾。全血のために測定値はヘマトクリットの影響を受けるが、実際には無視しうる範囲内である。この方法では生後 15 日齢での 5 点採血も可能であり、生後 21 日齢での連続 2 日

間採血もラットには負担とならない。又、連続2日間採血で日周リズムの再現性と手技の誤差をチェックできるようになった。Wilsonら³⁾は連続2日間採血法では、2日目の頂値が低いことを指摘し、blood lossとストレスへの順応ではないかと述べている。本実験も同様に2日目の頂値が低い傾向がみられた。

この様に serial に同一個体でCS変動を観察できるようになったが、個々のラットでの日周リズムの有無の判定については統一的なものはない。Kriegerら⁴⁰⁾は、目で見て、(1)2日間連続日周パターンに再現性がないもの、(2)頂値時刻がばらつくもの、(3)明らかな周期はあっても正常とは異なる頂値と底値時刻をもつもの、(4)24時間以内に2つ以上の頂値がみられるもの、これら4つがないものを正常日周リズムが「ある」ものとしている。しかし、これは視覚的判定でしかない。高橋ら³⁹⁾は総説の中で、4時間間隔の48時間採血で、1日目と2日目の頂値時刻が一致した場合、あるいはずれが4時間以内である場合を「あり」と判定している。しかし、頂値の位相のみの一致で日周リズムを判定することは疑問であり、振幅の要素も加味されるべきと考える。Wilsonら²⁰⁾は、ラットのCS日周リズムがサイン・カーブよりも鋭い頂値をもつ動揺を示すことより、経験的にフリーラン・リズムの4つの判定基準を示した。(1)頂値が2日間で4時間以内のずれである。(2)2日間のそれぞれの値が正の相関をもつ。(3)その相関係数が正常群での平均相関係数 $\pm 2 \times$ 標準偏差の範囲内にある。(4)頂値と底値の比が正常群での平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差の範囲内にある。本実験は正常明暗条件下の6時間間隔の採血であるため、少し変更して著者の判定基準とした。実際的には(1)と(2)で「あり」と判定されたものの殆んどは、(3)と(4)で「なし」とされることはなかった。

3. コーチゾンの視床下部埋入の影響について⁴¹⁾

新生児ラットに大量の副腎皮質ホルモンを1回皮下投与すると、CS日周リズム発現が遅延することをKriegerら¹¹⁾⁴²⁾が初めて報告した。即ち、コーチゾン・アセテート500 μg を生後2日齢に皮下投与すると、30日齢でCS日周リズムは抑制されているが、80日齢では正常の日周リズムがみられた。同時に拘束ストレスとエーテル・ストレスには正常に反応しているため、彼女らは単なるコルチコイド投与による下垂体-副腎系の発育抑制と考えられなかったとした。Miyaboら¹²⁾は、同様のコーチゾン投与で雌は55日齢にCS日周リズムが出現したが、雄では95日齢にも出現せず130日齢で初めて出現し、著明な性差がみられることを報告した。Costら⁴³⁾は同じく30日齢ではCS日周リズムはなく70日齢で出現し、同時に腔開口はステロイド投与

群は遅延するが、性周期は正常であったと報告した。一方Ulrichら⁴⁴⁾、Turnerら⁴⁵⁾や伊藤ら⁴⁶⁾は、断頭採血や心臓穿刺採血法であるがステロイド投与による遅延は1週間前後であると報告している。これらの実験結果の差異はラットの種や飼育環境やステロイド投与時期の違いとともに、大部分の実験は異なった個体での朝夕2回採血により^{11)43)~46)}、CS日周リズムの判定も2点での単なる検定であることも加味していると考えられる。しかし、新生児期に大量の副腎皮質ホルモンを投与するとCS日周リズム発現が遅延することで一致している。

この機序については、Howardら⁴⁷⁾の生後2日齢マウスへのコルチコステロイド投与で成熟時に大脳皮質や小脳のDNAレベルが減少したという報告と、Shapiroら⁴⁸⁾のコルチコステロンによるシナプス形成抑制効果の報告から、脳の生化学的かつ形態的变化によることが示唆されている。即ち、新生児期に皮下投与された副腎皮質ホルモンは脳-血液門門を通り直接脳に作用し、神経連絡網の発達を抑制し変化させるものと考えられる。

一方、新生児期の副腎皮質ホルモン大量投与は全身(とくに免疫系)にも影響を与え、高い死亡率、体重増加の遅延、発毛抑制や下痢などが多くみられ、胸腺や脾や末梢リンパ球数の抑制がみられる。これらは“corticoid runt”⁴⁸⁾と呼ばれる。このため副腎皮質ホルモン投与によるCS日周リズム発現遅延が特異的なものではなく、全身的发育遅延の非特異的結果であることを否定し切ることはできない。本実験ではこの点を避けるため直接脳内にコーチゾンをペレットとして埋入した。その結果、体重の差異はなく、死亡も手術直後以外になく、発毛遅延や下痢もみられなかった。埋入されたコーチゾンは全身的に作用せず、もっぱら脳内で作用したものと考えてよい。

新生児ラットについてのコルチコイドの脳内直接埋入実験は本実験がはじめてである。成熟ラットについてはFeldmanら⁴⁹⁾⁵⁰⁾が種々行っている。彼ら⁴⁹⁾は200 μg のコーチゾン脳内埋入後21日で片側副腎摘出後の代償性肥大が起こらず、70日後も副腎は萎縮したままであると報告した。又、60 μg と200 μg のコーチゾンとコルチコステロンを脳内に埋入し、48時間後ストレスに対するCS分泌の抑制を報告した⁵⁰⁾。彼らの実験も断頭採血法で、サンプル数も少なく長期に血中CS値の変動を調べたものがないことが問題である。彼らは脳内に埋入したコルチコイドは局所で長期に作用をおよぼすと考えている。本実験は投与したコーチゾンは彼らに比べて体重あたりで計算すれば約4~5倍にあたり、十分な効果をおよぼしたと考えられ、下

垂体と副腎の萎縮は一致する結果である。一方、Grimm ら⁵¹⁾は副腎皮質ホルモンの正中隆起への埋入後のストレス反応におよぼす影響を2日目より21日目まで観察したところ、埋入したステロイドの種類により差異を認めたため、埋入したステロイドは溶出して下垂体門脈を経て、単なるフィードバックとして下垂体に働く可能性を示唆した。しかし、本実験でのCA-MBH群が56日齢で日周リズムが消失していたのは、底値が高く頂値が低くなっているためであり、フィードバックで予想される底値と頂値とも低く抑制されるパターンと相違している。又、著者は予備実験としてアイソトープでラベルしたコーチゾンを成熟ラットの脳内に埋入し、1, 3, 5週でペレットを回収しカウントしたが、3週、5週でカウント値は20~25%に低下していた。このことより、著者は埋入されたコーチゾンは単なるフィードバックとして働くのではなく、3週まで殆んどが局所で吸収され、そのまま局所のneurogenesisに抑制的に作用すると考えられる。

本実験でコーチゾンの作用は埋入部位により差異がみられた。MBHへの埋入はCS日周リズムの発現を強く遅延し、下垂体や副腎の萎縮も強く、昼間の摂食率も高かった。これはこの部分が視交叉上核からの日周リズムに関する神経線維やCRF産生に関係する神経細胞が多いため、コーチゾンのneurogenesisに対する抑制の影響が強くあらわれたと考えられる。又、摂食リズムのパターンは成熟ラットでの両側腹内側核破壊により昼間摂食率が30~40%になるという報告⁵²⁾と一致し、MBHへのコーチゾン埋入は腹内側核へも強い影響をおよぼしたと思われる。

AHへのコーチゾン埋入群のうち2匹は、日周リズムの自律性発振体と考えられる視交叉上核にペレットが埋入されているが、CS日周リズムは正常に出現した。日周リズムの消失には視交叉上核の完全な破壊が必要とされ³⁴⁾、この点本実験のコーチゾンの埋入は視交叉上核への破壊作用は軽度であり、パラフィン・ペレットのみのSham群がすべて正常日周リズムを示したことと合わせて考えると、埋入されたコーチゾン・ペレットはもっぱら局所での薬理学的作用が主であると考えられる。

本実験では性周期に変化はみられなかった。腔開口は全身のコレチコイド大量皮下投与で遅延する報告⁴⁹⁾と一致した。コレチコイドの新生児期脳内埋入はCRF系の神経連絡網の発達を抑制するが、ゴナドトロピン系には不可逆的变化を起さなかったと考えてよい。新生児期のコレチコイド投与はCS日周リズムを遅延するが、同時期の性ステロイド投与は性行動を変化させ

る。例えば雌ラットに新生児期にアンドロゲンを投与すると、性周期を示さなくなり連続発情となる。同様に性ステロイドの脳内埋入は脳の性分化に変化をきたす。Hayashi ら⁵³⁾は、新生児期ラットの視床下部内にとりてアンドロゲンを埋入すると連続発情を誘導すると報告している。この機序についてMatsumoto ら⁵⁴⁾は、電顕による検索を行い、性ステロイドはシナプスの形成を促進し雌型と雄型の脳ではシナプスの形態に永久的な差異がみられることから説明している。本実験によるコレチコイドがシナプス形成を抑制し、しかも一過性である点と比べると対照的でステロイドの種類によるneurogenesisの差がうかがわれる。

本実験でopen field ストレスはすべて正常な反応を示した。CA-MBH群で下垂体-副腎は萎縮しており、56日齢の日周リズムは消失していたが、情動刺激に対する下垂体-副腎系の反応は保たれており、視床下部コーチゾン埋入は副腎のCS分泌機能を障害することなくCS日周リズムのみを抑制したと考えられる。CS日周リズムと情動刺激に対するCS分泌反応の中枢性機序は独立したものであると思われる。

4. 視床下部切断の影響について

前述の如く多くの切断実験や破壊実験より、視交叉上核がラットの各種日周リズムの自律性発振体であることはまちがいない。この視交叉上核にラットの生物時計の主時計があるとしても、具体的な行動上や内分泌の日周リズムの発現にはこの振動を脳内の各担当部位に伝える神経経路が必要である。視交叉上核の入力機構⁵⁵⁾は大きく2つに分けられ、1つは網膜-視床下部路を介する視神経からの入力で両側性で非常に細い線維であり、もう1つは脳幹の縫線核からのものであり、セロトニン作動性の強力な抑制入力と考えられる。一方出力機構についてSwanson ら⁵⁶⁾はオートラジオグラフィ法で①正中隆起②内側前脳束③脳室周囲系へ投射する3群に分けた。このうち正中隆起への投射路が下垂体前葉および後葉ホルモンの調節に関与していると考えられている。内側前脳束への投射路は視床下部外側核(摂食中枢)と、一部腹内側核(満腹中枢)からでた腹側樹状突起と連絡しており、食欲の発生が摂食リズムに関係していると思われる。3番目の脳室周囲系への投射は、広汎に視床下部に投射しており、腹内側核と背内側核と密接な連絡があると考えられている。

本切断実験は上述の神経連絡網の可塑性についての個体発生学的研究である。成熟ラットでの視床下部の前額断はHalasz ら⁵⁷⁾が行い、術後1週4週の断頭2点採血で午前値の上昇によるCS日周リズム消失を報告している。この切断部位はoptic chiasma 後部で視

交叉上核の尾側の半ドーム状の前額断である。同様の切断を Lengvari ら⁵⁹⁾が行っているが、術後6週毎の観察で30週以後に明暗に一致した日周リズムの出現をみている。彼らの実験は心臓採血であり完全な同一個体反復採血ではなく、又、視交叉上核より尾側かどうかについての組織学的検討が不十分である。しかし、このような切断の効果が観察期間に影響をうけることは脳梁切断実験でもみられる。Moberg ら⁵⁹⁾は成熟ラットの脳梁切断後1週でCS日周リズムは消失したと報告したが、Lengvari ら⁶⁰⁾は術後3週には回復したと報告している。このことは切断が神経連絡網を切断するという以外に、非特異的な損傷を脳全体に与えると考えられる。又、この脳梁切断は本実験の偽手術と殆んど同じ操作であり、この部分の切断はCS日周リズムに直接的影響を与えず、非特異的脳損傷の影響を一過性に与えたと考えてよい。

一方、本切断実験とは異なるが成熟ラットで視床下部島を Halasz のナイフで作製し、視床下部に侵入する神経連絡網切断の影響をみたのが Dunn ら⁶¹⁾と Wilson ら⁶²⁾である。前者では7週と11週の2点採血ではCS日周リズムの消失、後者では尾切開部採血法で術後7~8週でCS分泌の頂値はみられたが24時間周期とは一致しなかったと報告した。作製された視床下部島は視交叉上核を含んでいるため、辺縁系や中脳領域からの視床下部への入力もCS日周リズムには必要である可能性を示唆した。しかし体液性の連絡は否定的と考えられると同時に、成熟ラットでは切断による神経連絡網の可塑性は少なく、長期に影響を残すことを示している。

成熟前期における切断の影響については、Ramaley ら⁶³⁾が生後22日齢のラットで視交叉上核の前方での前額断を行い、術後10日目のCS日周リズムは出現しているが、同核の尾側での切断は術後23日目までは阻止されていたと報告した。しかし、それ以上長期には観察していない。

新生児期には Hayashi ら⁶⁴⁾が視交叉上核や前視索野と弓状核や腹内側核との間で切断を行ったのが初めてである。性周期は正常であり、CS分泌は頂値はやや低いが30日齢より明らかな日周リズムの出現をみている。本実験の2日齢切断はこの結果を再確認したものである。この結果は、視交叉上核より正中隆起部へのCS日周リズムおよび性周期に関する伝達路は2日齢ではまだ完成していないため、脳の発達とともに伝達路が切断溝をこえて新たに連絡するためと考えられる。一方、今回はじめて行った10日齢切断は2日齢切断と大きく異なる結果を得た。即ち、グループ・データで振幅の低いリズムが28日、35日齢で出現する

が56日齢以降で消失している。個々のラットでのリズムの有無をみても、偽手術群が全例で日周リズムを示したのに対して、10日齢切断の群で全期間を通して約半数しかCS日周リズムがみられなかった。従ってCS日周リズムの伝達路は生後2~10日の間にその主なるものが完成すると考えられる。しかし、前述の成熟ラットの報告では殆んど日周リズムが消失するのに、なぜ半数例で日周リズムが認められたかが疑問である。それには、①10日齢切断でも神経線維連絡網が次第に回復してくる。②視交叉上核以外の内側底部視床下部に第2の自律性発振体がある。③切断部外側に代償的に連絡網が完成してくる、などの説明が考えられる。脳の組織学的検索で2日齢ではミエリン化した神経線維が切断溝を横断していくが、10日齢切断ではみられない。又、性周期についても10日齢切断では全例不規則であったことより、10日齢切断の効果は永久的であると考えられ、①の可能性は否定的である。内側底部視床下部に第2の自律性発振体があるとすれば、明暗の入力は切断されるためフリーラン・リズムを示すはずであるが、本実験では認められず②の可能性も否定的である。本実験の切断は前述した視交叉上核から出力する3つの伝達路をすべて切断しているが、結果は③の可能性を強く示唆している。

一方、性周期ははっきりと2日齢切断で正常、10日齢切断は全例不規則と区別されたのに反して、CS日周リズムでは2つの差異は余り明確ではない。これはゴナドトロピン分泌に関係した伝達路は視床下部の比較的正中部に集中しているのに対して、CRF産生に関係する伝達路は視床下部正中部にあるものが主であるが、他に広汎に外側にもみられるためと考えられる⁶⁵⁾。この伝達路の差異が永久的な消失と一過性の消失という異なった結果をもたらすと思われる。

摂食リズムはすべての群で夜間摂食が多く、Cut群では昼間摂食の比率が高くなったが逆転してはいない。この結果は、1つには群居飼育のグループ・データのため、個々のラットの摂食リズムを十分に反映していないためと、もう1つには Krieger⁶⁶⁾の視交叉上核破壊ラットでも腹内側核が正常ならば摂食制限に同調したCS日周リズムを示すという報告と同じように、摂食リズムに腹内側核が大きな役割を示しているためと考えられる。

情動刺激である open field ストレス反応がみられたことは、コーチゾン埋入実験と同様に、日周リズムとストレス反応の中枢性機序の差異を示していると考えられる。

ラットの CS 日周リズムの中樞性機序を個体発生学的に検討し、次の結果を得た。

(1) コーチゾン・アセテートのマイクロ・ペレットを新生児期視床下部に埋入すると、CS 日周リズム発現は遅延し、その影響は視床下部前部により内側底部で強かった。摂食リズムも昼間摂食率の増加を示したが、全身の成長や、行動、性周期に影響をおよぼさなかった。

これは埋入されたコーチゾンは局所で作用し、CRF 産生・分泌に関係する神経連絡網に長期に抑制効果を与えるためと考えられる。

(2) 生後 2 日齢と 10 日齢で視床下部切断を行うと、2 日齢切断では CS 日周リズム、性周期、摂食リズムとも影響をおよぼさなかったが、10 日齢切断では CS 日周リズムは約半数で生後 120 日齢までの全期間で出現せず、性周期は全例で消失し、摂食リズムにも影響を与えた。

これは視床下部での CS 日周リズムの神経連絡網は生後 2 日齢では未発達で、10 日齢前後ではほぼ完成するためと考えられる。しかし、CS 日周リズムに関係する伝達路と性周期に関係するものとは差異があると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を賜った服部絢一教授に深謝致します。本研究を遂行するにあたり、直接の御指導を賜った宮保進前助教授（現 福井医科大学教授）、久田友一郎前講師、東京都神経科学総合研究所林鎮治先生、ならびに御助言をいただいた研究室の各位に深く謝意を表します。また実験に助力いただいた清水幸子嬢に感謝します。

本論文の要旨は第 52 回と第 54 回日本内分泌学会総会において発表した。また、本研究は文部省科学研究費総合 A、高等動物の環境適応機構のリズム学的解析の援助によった。

文 献

- 1) Guillemin, R., Dear, W. E. & Liebelt, R. A. : Nychthemeral variations in plasma free corticosteroid levels of the rat. *Proc. Soc. Exp. Med.*, **101**, 394-395 (1959).
- 2) Halberg, F., Peterson, R. E. & Silber, R. H. : Phase relations of 24-hour periodicities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma, and total body activity. *Endocrinol.*, **64**, 222-230 (1959).
- 3) Wilson, M. M., Rice, R. W. & Critchlow, V. : Evidence for a free-running circadian rhythm in pituitary-adrenal function in blinded adult female rats. *Neuroendocrinol.*, **20**, 289-295 (1976).
- 4) Hiroshige, T. & Sakakura, M. : Circadian rhythm of corticotropin-releasing activity in the hypothalamus of normal and adrenalectomized rats. *Neuroendocrinol.*, **7**, 25-36 (1971).
- 5) Ixart, G., Szafarczyk, A., Belugou, J. & Assenmacher, I. : Temporal relationships between the diurnal rhythm of hypothalamic corticotrophin releasing factor, pituitary corticotrophin and plasma corticosterone in the rat. *J. Endocrinol.*, **72**, 113-120 (1977).
- 6) Moore, R. Y. & Eichler, V. B. : Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, **42**, 201-206 (1972).
- 7) Campbell, C. B. G. & Ramaley, J. A. : Retinohypothalamic projections: Correlations with onset of the adrenal rhythm in infant rats. *Endocrinol.*, **94**, 1201-1204 (1974).
- 8) Stanfield, B. & Cowan, W. M. : Evidence for a change in the retino-hypothalamic projection in the rat following early removal of one eye. *Brain Res.*, **104**, 129-136 (1976).
- 9) Fuchs, J. L. & Moore, R. Y. : Development of circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: A study using the 2-deoxy [1-¹⁴C] glucose method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1204-1208 (1980).
- 10) Allen, C. & Kendall, J. W. : Maturation of the circadian rhythm of plasma corticosterone in the rat. *Endocrinol.*, **80**, 926-930 (1967).
- 11) Krieger, D. T. : Effect of neonatal hydrocortisone on corticosteroid circadian periodicity, responsiveness to ACTH and stress in prepuberal and adult rats. *Neuroendocrinol.*, **16**, 355-363 (1974).
- 12) Miyabo, S. & Hisada, T. : Sex difference in ontogenesis of circadian adrenocortical rhythm in cortisone-primed rats. *Nature*, **256**, 590-592 (1975).
- 13) Hayashi, S. & Mizukami, S. : Effects of transection of anterior connections to the medio-basal hypothalamus on the onset of sexual cycles in neonatal female rats. *Exp. Neurol.*, **63**, 211-219 (1979).
- 14) 宮保 進・中村 毅 : ダイコクネズミ尾静脈全血を用いたコルチコステロンの測定. *医学と生物学*, **93**, 375-377 (1976).
- 15) Gomez-Sanchez, C., Murry, B. A., Kem, D. C. & Kaplan, N. M. : A direct radioimmunoassay

- of corticosterone in rat serum. *Endocrinol.*, **96**, 796-798 (1975).
- 16) **Hayashi, S.**: Failure of intrahypothalamic implants of antiestrogen, MER-25, to inhibit androgen-sterilization in female rats. *Endocrinol. Jap.*, **21**, 453-457 (1974).
- 17) **Hayashi, S.**: Influence of intrahypothalamic implants of antioestrogen or aromatase inhibitor on development of sterility following neonatal androgenization in female rats. *J. Steroid Biochem.*, **11**, 537-541 (1979).
- 18) 北中 勇: 下垂体-副腎皮質系に関する精神内分秘学的研究(第2編). 日本内分秘学会雑誌, **51**, 240-246 (1975).
- 19) **Winer, B. J.**: Statistical principles in experimental design. 2nd ed., p514-603. McGraw-Hill Book Comp., New York, 1971.
- 20) **Wilson, M. M. & Greer, M. A.**: Evidence for a free-running pituitary-adrenal circadian rhythm in constant light-treated adult rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **154**, 69-71 (1977).
- 21) **Pincus, G.**: A diurnal rhythm in the excretion of urinary ketosteroids by young men. *J. Clin. Endocrinol.*, **3**, 195-199 (1943).
- 22) **Critchlow, V., Liebelt, R. A., Bar-Sela, M., Mountcastle, W. & Lipscomb, H. S.**: Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat. *Am. J. Physiol.*, **205**, 807-815 (1963).
- 23) **Coover, G. D., Goldman, L. & Levine, S.**: Plasma corticosterone levels during extinction of a lever-press response in hippocampectomized rats. *Physiology & Behavior*, **7**, 727-732 (1971).
- 24) **Johnson, J. T. & Levine, S.**: Influence of water deprivation on adrenocortical rhythm. *Neuroendocrinol.*, **11**, 268-273 (1973).
- 25) **Krieger, D. T.**: Food and water restriction shifts corticosterone, temperature, activity and brain amine periodicity. *Endocrinol.*, **95**, 1195-1201 (1974).
- 26) **Takahashi, K., Inoue, K. & Takahashi, Y.**: Parallel shift in circadian rhythm of adrenocortical activity and food intake in blinded and intact rats exposed to continuous illumination. *Endocrinol.*, **100**, 1097-1107 (1977).
- 27) **Gibbs, F. P.**: Correlation of plasma corticosterone levels with running activity in the blinded rat. *Am. J. Physiol.*, **231**, 817-821 (1976).
- 28) **Takahashi, K., Inoue, K., Kobayashi, K., Hayafuji, C., Nakamura, Y. & Takahashi, Y.**: Effects of food restriction on circadian adrenocortical rhythm in rats under constant lighting condition. *Neuroendocrinol.*, **23**, 193-199 (1977).
- 29) **Honma, K. & Hiroshige, T.**: Internal synchronization among several circadian rhythms in rats under constant light. *Am. J. Physiol.*, **235**, 243-249 (1978).
- 30) **Krieger, D. T. & Gewirtz, G. P.**: The nature of circadian periodicity and suppressibility of immunoreactive ACTH levels in Addison's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **39**, 46-52 (1974).
- 31) **Stephan, F. K. & Zucker, I.**: Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1583-1586 (1972).
- 32) **Ibuka, N. & Kawamura, H.**: Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res.*, **96**, 76-81 (1975).
- 33) **Saleh, M. A. & Winget, C. M.**: Effect of suprachiasmatic lesions on diurnal heart rate rhythm in the rat. *Physiology & Behavior*, **19**, 561-564 (1977).
- 34) **Abe, K., Kroning, J., Greer, M. A. & Critchlow, V.**: Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin. *Neuroendocrinol.*, **29**, 119-131 (1979).
- 35) **Watanabe, K. & Hiroshige, T.**: Phase relation between episodic fluctuations of spontaneous locomotor activity and plasma corticosterone in rats with suprachiasmatic nuclei lesions. *Neuroendocrinol.*, **33**, 52-59 (1981).
- 36) **Inoue, S. & Kawamura, H.**: Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5962-5966 (1979).
- 37) **Levin, R., Fitzpatrick, K. M. & Levine, S.**: Maternal influences on the ontogeny of basal levels of plasma corticosterone in the rat. *Hormones & Behavior*, **7**, 41-48 (1976).
- 38) 高橋清久・村上 昇・早藤知恵子・山崎 潤・高

橋康郎：ラットにおける副腎皮質活動リズムの同調機構。蛋白質・核酸・酵素，27，213-226 (1982).

39) Miyabo, S., Yanagisawa, K., Ooya, E., Hisada, T. & Kishida, S.: Ontogeny of circadian corticosterone rhythm in female rats: Effects of periodic maternal deprivation and food restriction. *Endocrinol.*, 106, 636-642 (1980).

40) Krieger, D. T.: Effect of ocular enucleation and altered lighting regimens at various ages on the circadian periodicity of plasma corticosteroid levels in the rat. *Endocrinol.*, 93, 1077-1091 (1973).

41) Miyabo, S., Ooya, E., Hayashi, S.: Effect of intrahypothalamic implantation of cortisone acetate on the onset of circadian corticosterone rhythm in neonatal female rats. *Neuroendocrinol.*, 33, 47-51 (1981).

42) Krieger, D. T.: Circadian corticosteroid periodicity: Critical period for abolition by neonatal injection of corticosteroid. *Science*, 178, 1205-1207 (1972).

43) Cost, M. G. & Mann, D. R.: Neonatal corticoid administration: Retardation of adrenal rhythmicity and desynchronization of puberty. *Life Science*, 19, 1929-1936 (1976).

44) Ulrich, R., Yuwiler, A. & Geller, E.: Neonatal hydrocortisone: Effect on the development of the stress response and the diurnal rhythm of corticosterone. *Neuroendocrinol.*, 21, 49-57 (1976).

45) Turner, B. B. & Taylor, A. N.: Persistent alternation of pituitary-adrenal function in rat by prepuberal corticosterone treatment. *Endocrinol.*, 98, 1-9 (1976).

46) 伊藤真次・広田良二：新生時コーチゾールおよびエストジオール処置ラットにおける副腎皮質日周リズムの発達について。日本内分泌学会雑誌，54，227-237 (1978).

47) Howard, E.: Reductions in size and total DNA of cerebrum and cerebellum in adult mice after corticosterone treatment in infancy. *Exp. Neurol.*, 22, 191-208 (1968).

48) Schapiro, S.: Influence of hormones and environmental stimulation on brain development, p63-73. In D. H. Ford, ed., *Influence of hormones on the nervous system*, Karger, Basel, 1970.

49) Feldman, S., Conforti, N. & Davidson, J. M.: Long-term effects of intracerebral corticoid im-

plants. *Acta Endocrinologica*, 55, 440-450 (1967).

50) Feldman, S., Conforti, N., Chowers, I. & Davidson, J. M.: Differential responses to various ACTH-releasing stimuli in rats with hypothalamic implants of corticosteroids. *Neuroendocrinol.*, 5, 290-302 (1969).

51) Grimm, Y. & Kendall, W.: A study of feedback suppression of ACTH secretion utilizing glucocorticoid implants in the hypothalamus: The comparative effects of cortisol, corticosterone, and their 21-acetates. *Neuroendocrinol.*, 3, 55-63 (1968).

52) 永井克也：摂食行動の時計機構。続バイオリズムのその機構(須田, 早石, 中川編), 190-202頁, 講談社, 東京, 1978.

53) Hayashi, S. & Gorski, R. A.: Critical exposure time for androgenization by intracranial crystals of testosterone propionate in neonatal female rats. *Endocrinol.*, 94, 1161-1167 (1974).

54) Matsumoto, A. & Arai, Y.: Precocious puberty and synaptogenesis in the hypothalamic arcuate nucleus in pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) treated immature female rats. *Brain Res.*, 129, 375-378 (1977).

55) 西野仁雄：視交叉上核と他中枢部位との解剖学のおよび機能的連絡。続バイオリズムとその機構(須田, 早石, 中川編), 203-214頁, 講談社, 東京, 1978.

56) Swanson, L. W. & Cowan, W. M.: The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.*, 160, 1-12 (1975).

57) Halasz, B., Slusher, M. A. & Gorski, R. A.: Adrenocorticotrophic hormone secretion in rats after partial or total deafferentation of the medial basal hypothalamus. *Neuroendocrinol.*, 2, 43-55 (1967).

58) Lengvari, I. & Liposits, Zs.: Return of diurnal plasma corticosterone rhythm long after frontal isolation of the medial basal hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinol.*, 23, 279-284 (1977).

59) Moberg, G. P., Scapagnini, U., Groot, J. & Ganong, W. F.: Effect of sectioning the fornix on diurnal fluctuation in plasma corticosterone levels in the rat. *Neuroendocrinol.*, 7, 11-15 (1971).

60) Lengvari, I. & Halasz, B.: Evidence for a diurnal fluctuation in plasma corticosterone levels after fornix transection in the rat. *Neuroendocrinol.*, 11, 191-196 (1973).

- 61) **Dunn, J. & Critchlow, V.** : Pituitary-adrenal function following ablation of medial basal hypothalamus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **142**, 749-754 (1973).
- 62) **Wilson, M. M. & Critchlow, V.** : Absence of a circadian rhythm in persisting corticosterone fluctuations following surgical isolation of the medial basal hypothalamus. *Neuroendocrinol.*, **19**, 185-192 (1975).
- 63) **Ramaley, J. A. & Sieck, G.** : Adrenal-gonadal function in rats with frontal hypothalamic transections. *Neuroendocrinol.*, **18**, 55-64 (1975).
- 64) **Hayashi, S., Hisada, T., Ooya, E. & Miyabo, S.** : Sexual cyclicity and diurnal corticosterone secretion in rats given hypothalamic transection at two days of age. *Endocrinol. Japon.*, **28**, 535-540 (1981).
- 65) **Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J. & Vale, W. W.** : Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: An immunohistochemical study. *Neuroendocrinol.*, **36**, 165-186 (1983).
- 66) **Krieger, D. T. & Hauser, H.** : Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science*, **197**, 398-399 (1977).

Effects of Intrahypothalamic Implantation of Cortisone Acetate and Hypothalamic Transection on the Onset of Circadian Corticosterone Rhythm in Neonatal Female Rats Eiichi Ooya, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori) School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **92**, 518-535 (1983)

Key words: Circadian rhythm, Corticosterone, Hypothalamus, Cortisone implantation, Transection.

Abstract

Two experiments were performed to examine the ontogeny of the circadian corticosterone (CS) rhythm in female rats.

In the first experiment, micropellets of 40 μ g cortisone acetate (CA)-paraffin mixture were implanted bilaterally in the anterior or medial basal hypothalamus of neonatal female rats. Twenty-four or 48-hour patterns of blood CS were obtained serially in individual rats at 21, 28, 35, 56 and 120 days of age. Sham-operated rats were implanted with pellets of paraffin alone. Control rats were given the same pellets in the back subcutaneously. Sham-operated and control rats showed a well-defined circadian CS rhythm on day 28. CA implantation in the anterior hypothalamus, however, caused a delay in the onset of the circadian CS by 1 week together with a diminished amplitude. In rats with CA pellets in the medial basal hypothalamus, the CS rhythm was not fully established even on day 56, but was evident in most cases on the 120th day. All experimental rats had the normal sexual cycle. It is suggested that neonatal CA treatment exerts its effect by inhibiting the development of the efferent neural pathways carrying circadian signals from the suprachiasmatic nuclei.

In the second experiment, hypothalamic transection between the suprachiasmatic and arcuate nuclei was performed in 2-day- and 10-day-old female rats. Sham-operated rats were transected from the cingulate cortex to the dorsal hippocampus structure. Samples of blood CS were obtained according to the same schedules as in the first experiment. Control and sham-operated rats showed a significant circadian CS rhythm on day 21. In rats given hypothalamic transection on day 2 a circadian CS rhythm appeared on day 28. When the same procedure was given to

10-day-old rats, a CS rhythm with low-amplitude appeared transiently on days 28 and 35, but later on the group data showed no significant CS rhythm. Analysis of individual CS patterns revealed that the circadian rhythm was lost in about half of the animals. The sexual cycle was normal in 2-day-transectional rats, but was abnormal in all 10-day-transectional rats. It is suggested that the anterior connections of the medial basal hypothalamus are necessary for transmission of circadian signals to the pituitary and that these structures are still plastic and not yet established until 10 days of age.