

論文目録

氏名 横須賀 誠



学位論文
題目 脳内エストロゲン受容体含有細胞の発生に関する研究
— 脳の発育と性分化に対するエストロゲン受容体
の存在意義に関する考察 —

学位論文の基礎となる学術論文

題目 Transient expression of estrogen-receptor-like immuno-
reactivity (ER-LI) in the facial nucleus of the neonatal rat

著者名 Makoto Yokosuka and Shinji Hayashi

学術雑誌名 Neuroscience Research に発表・発表予定

(巻・号・頁) (15 ・ 1, 2 ・ 90 ~ 95)

発行年月 1992 年 10 月

題目 Transient expression of estrogen receptor-immunoreactivity
(ER-IR) in the layer V of the developing rat cerebral cortex

著者名 Makoto Yokosuka, Hiroaki Okamura and Shinji Hayashi

学術雑誌名 Developmental Brain Research に発表・発表予定

(巻・号・頁) (in press ~)

発行年月 1994 年 月

題目

著者名

学術雑誌名 に発表・発表予定

(巻・号・頁) (~)

発行年月 年 月

既発表学術論文

題目 Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: stimulatory effect of estrogen on NADPH-diaphorase activity.

著者名 Okamura H., M. Yokosuka, B.S. McEwen and S. Hayashi

学術雑誌名 Endocrinology に発表・発表予定

(巻・号・頁) (135・4・1705 ~ 1708)

発行年月 1994年 10月

題目 Induction of substance P-immunoreactivity by estrogen in neurons containing estrogen receptors in anteroventral periventricular nucleus of female but not male rat.

著者名 Hiroaki Okamura, Makoto Yokosuka and Shinji Hayashi

学術雑誌名 Journal of Neuroendocrinology に発表・発表予定

(巻・号・頁) (in press ~)

発行年月 1994年 月

題目 Estrogenic induction of NADPH-diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat.

著者名 Hiroaki Okamura, Makoto Yokosuka and Shinji Hayashi

学術雑誌名 Journal of Neuroendocrinology に発表・発表予定

(巻・号・頁) (in press ~)

発行年月 1994年 月

題目 脳の性分化
—発達段階の性ステロイドホルモンの作用を中心に—

著者名 横須賀 誠 林 巖 治

学術雑誌名 脳と精神の医学 に発表・発表予定

(巻・号・頁) (第5巻 第4号 ~)

発行年月 1994年 12月

脳内エストロジェン受容体含有細胞の
発生に関する研究

—脳の発育と性分化に対するエストロジェン受容体の
存在意義に関する考察—

1994年

岐阜大学大学院
連合獣医学研究科
(東京農工大学)

横須賀 誠

脳内エストロジェン受容体含有細胞の 発生に関する研究

—脳の発育と性分化に対するエストロジェン受容体の
存在意義に関する考察—

横 須 賀 誠

謝 辞

本文に入るに先立ち、本研究の遂行にあたりご指導賜りました以下の方々に感謝の意を表します。

- 1) 星野邦夫教授：先生には、東京農工大学家畜臨床繁殖学教室の教授として大学院への入学時から、全ての面でお世話頂きました。また、主指導教官として本研究に対し常にご指導を賜りました。
- 2) 笹本修司教授：先生には、主指導教官として本研究による学位論文作成にあたり、ご指導並びにご校閲を賜りました。
- 3) 田谷一善助教授：先生には、副指導教官として本研究による学位論文作成にあたり、ご指導並びにご校閲を賜りました。
- 4) 金田義宏教授：先生には、副指導教官として本研究による学位論文作成にあたり、ご校閲を賜りました。
- 5) 森裕司助教授：先生には、前東京農工大学家畜臨床繁殖学教室の助教授として、学位論文を作製するにあたりその方向性に対しご指導を頂きました。また、常に励まして頂き、研究の新しい流れを教えて頂きました。
- 6) 岡村裕昭博士：博士には、本研究を進めるに当たり、技術的な面から論文の作製まで全ての面でご指導を頂きました。
- 7) 加茂前秀雄助教授：先生には東京農工大学家畜臨床繁殖学教室の助教授として、常にご指導を頂きました。
- 9) 寺島俊雄博士：先生には、本研究に対し動物を提供して頂きました。また神経解剖学について、多くのご指導を頂き、またいろいろな情報を提供して頂きました。さらに、第4章の実験を行うに際し、トレーサーの技術的なご指導に加えて大脳皮質に関する情報やご意見を多数頂きました。
- 8) 市川眞澄博士：先生には、研究の方向性について神経解剖学の面から、多くのご指導および新しい情報を提供して頂きました。また、本研究を遂行するにあたり常に励まして頂きました。
- 10) 市川友行博士：先生には、神経発生学に関して多くの情報を提供して頂きました。また、第4章の実験に関してご意見を頂きました。
- 11) 折笠千登世博士：博士には、学位論文を作製するにあたり常に励まして頂きました。

- 1 2) 植田弘子氏：氏には、技術的な面で多くのご指導を頂きました。図 6-2 は、氏に染色して頂いた標本をもとに作成しました。
- 1 3) Dr. Geoffrey L. Greene：博士には、貴重な抗エストロゲン受容体抗体 (ER 715) を提供して頂きました。
- 1 4) Dr. Yoshio Osawa：博士には、貴重な抗アロマテース抗体 (R-8-1) を提供して頂きました。
- 1 3) Dr. Bruce S. McEwen：先生には、第 3 章および第 4 章 (4-1) の論文に対してご校閲を賜りました。また、東京都神経科学総合研究所にご滞在中には、常に新しい情報を提供して頂きました。
- 1 4) 林しん治博士：先生には抗ラット ER 血清 (AS 408) を提供して頂いたばかりでなく、本研究の立案から論文の作製までの全過程を通してご指導並びにご校閲を賜りました。また、本研究の一部は、先生に対する文部省科学研究費および厚生省長寿科学財団の補助金を受けて行われました。

以上の方々には謹んで深謝の意を表します。

また、東京都神経科学総合研究所・解剖発生学研究部門の諸技術員、および、東京農工大学・家畜臨床繁殖学教室の諸学兄にも心から厚く御礼申し上げます。

基礎となる学術論文

第3章：新生仔ラット脳内エストロジェン受容体の分布

Yokosuka M., Okamura H. and Hayashi S. (1994)
Ontogeny of neurons containig estrogen receptor
immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon and
the amygdala in the rat. (submitted)

第4章：新生仔ラット脳内におけるエストロジェン受容体の一過性の出現

4-1；大脳皮質第V層におけるエストロジェン受容体の一過性の出現

Yokosuka M., Okamura H. and Hayashi S. (1995)
Transient expression of estrogen receptor-immunoreactivity
(ER-IR) in the layer V of the developing rat cerebral cortex.
Developmental Brain Research 84. 99-108.

4-2；顔面神経核におけるエストロジェン受容体の一過性の出現

Yokosuka M. and Hayashi S. (1992)
Transient expression of estrogen receptor-like immunoreactivity
(ER-LI) in the facial nucleus of the neonatal rat.
Neuroscience Research 15. 90-95.

第5章：エストロジェン受容体とアロマターゼ含有神経細胞の脳内分布

Yokosuka M., Okamura H. and Hayashi S. (1994)
Neuronal aromatase and estrogen reseptor expression in the
neonatal rat forbrain: a double-stain immunohistochemical
study. (in preparation)

参考論文

第3章、第4章、第5章、第6章に関連して

脳の性分化－発達段階の性ステロイドホルモンの作用を中心に－ (1994)
横須賀 誠、林 しん治
脳と精神の医学 第5巻 第4号 401-410.

第7章に関連して

- 1) Okamura H., Yokosuka M., McEwen B.S. and Hayashi S. (1994)
Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: stimulatory effect of estrogen on NADPH-diaphorase activity.
Endocrinology 135. 1705-1708.
- 2) Okamura H., Yokosuka M. and Hayashi S. (1994)
Induction of substance P-immunoreactivity by estrogen in neurons containing estrogen receptors in anterovental periventricular nucleus of female but not male rat.
Journal of Neuroendocrinology 6. 609-615.
- 3) Okamura H., Yokosuka M. and Hayashi S. (1994)
Estrogenic induction of NADPH-diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat.
Journal of Neuroendocrinology 6. 597-601.

List of abbreviation —略語一覧—

I: Hormones, Neurotransmitters, Receptors and Enzymes.

(ホルモン、神経伝達物質、受容体、酵素)

- AR : androgen receptor
 アンドロジェン受容体
- AROM : aromatase
 アロマターゼ
- CCK : cholecystkinin
 コレシストキニン
- CGRP : calcitonin gene related peptide
 カルシトニン遺伝子関連ペプチド
- EB : estradiol benzoate
 エストラジオールベンゾエート
- END : β -endorphin
 β -エンドルフィン
- ENK : methionine-enkephalin
 メチオニン-エンケファリン
- ER : estrogen receptor
 エストロジェン受容体
- GTH : gonadotrophic hormone
 性腺刺激ホルモン
- GnRH (=LHRH) : gonadotrophin releasing hormone
 性腺刺激ホルモン放出ホルモン
- LH : luteinizing hormone
 黄体刺激ホルモン
- LHRH (= GnRH) : luteinizing hormone-releasing hormone
 黄体刺激ホルモン放出ホルモン
- P : progesterone
 プロジェステロン
- SP : substance P
 サブスタンスP
- TH : tyrosine hydroxylase
 チロシン脱水素酵素
- TP : testosterone propionate
 テストステロンプロピオネート

II: Immunohistochemistry and Others (免疫組織化学、その他)

- AChE: acetylcholine-esterase
アセチルコリンエステラーゼ
- ARG: autoradiography
オートラジオグラフィ
- BSA: bovine serum albumine
ウシ血清アルブミン
- cDNA: complementary DNA
相補的DNA
- DAB: 3,3'-diaminobenzidine
3,3'-ジアミノベンチジン
- IHC: immunohistochemistry
免疫組織化学
- NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
- NADPH-d: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate · diaphorase
ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸-ジアホラーゼ
- NOS: nitric oxide synthase
一酸化窒素合成酵素
- NBT: nitro blue tetrazolium
ニトロブルーテトラゾリウム
- PB: phosphate buffer
リン酸緩衝液
- PBS: phosphate buffer saline
リン酸緩衝液塩
- IR: -immunoreactivity or -immunoreactive
-免疫反応、または-免疫反応性
(ex. ER-IR: エストロジェン受容体免疫反応、または-免疫反応性)

III: Brain Structures (脳の解剖学的な構築名)

- 2n: optic nerve
視神経
- VII: facial nucleus
顔面神経核

- aco: anterior commissure, olfactory limb
前交連
- act: anterior commissure, temporal limb
前交連
- AHN: anterior hypothalamic nucleus
視床下部前核
- AMPN: anterior medial preoptic nucleus
前內側視束前核
- AOB: accessory olfactory bulb
副嗅球
- AOD: accessory olfactory nucleus, dorsal part
背側副嗅核
- APit: anterior pituitary
下垂體前葉
- ARH: hypothalamic arcuate nucleus
視床下部弓狀核
- AUD: auditory area
(大腦皮質) 聽覺野
- BLA: basolateral amygdala nucleus
扁桃體基底外側核
- BST: bed nucleus of the stria terminalis
分界狀床核
- BSTpr: bed nucleus of the stria terminalis, principal nucleus
分界狀床核、主核
- BSTif: bed nucleus of the stria terminalis, interfascicular nucleus
分界狀床核、線維束間核
- cc: corpus callosum
腦梁
- COAa: cortical amygdala nucleus, anterior part
扁桃體皮質核、前部
- COAp: cortical amygdala nucleus, posterior part
扁桃體皮質核、後部
- CP: caudate-putamen
尾狀被殼
- cpd: cerebral peduncle
大腦腳
- DG: dentate gyrus
齒狀回

- DMH: hypothalamic dorsomedial nucleus
視床下部背内側核
- fr: fasciculus retroflexus
反屈束
- fx: columns of the fornix
腦弓柱
- GPI: globus pallidus, lateral segment
淡蒼球、外節
- IC: inferior colliculus
下丘
- IRt: intermediate reticular zone
中間網樣體
- INF: infundibulum
下垂體莖
- int: internal capsule
內包
- LA: lateral amygdala nucleus
扁桃体外側核
- LH: lateral habenula
外側手網核
- LPO: lateral preoptic area
外側視束前野
- LSi: lateral septum nucleus, intermediate part
外側中隔核、中間部
- ME: median eminence
正中隆起
- MEApd: medial amygdala nucleus, posterodorsal part
扁桃體內側核、後背側部
- MEApv: medial amygdala nucleus, posteroventral part
扁桃體內側核、後腹側部
- MEPO: median preoptic nucleus
正中視束前核
- MH: medial habenula
內側手網核
- MM: medial mammillary nucleus
內側乳頭體核
- MPN: medial preoptic nucleus
內側視束前核

(MPNam : anterior region of the medial part of medial preoptic nucleus)

(内側視束前核中間部の前部)

MPNc: medial preoptic nucleus, central part

内側視束前核、中心部

MPO: medial preoptic area

内側視束前野

MS: medial septal nucleus

内側中隔核

mtt: mammillothalamic tract

乳頭体視床路

NLOT: nucleus of the lateral olfactory tract

外側嗅束核

och: optic chiasm

視交叉

opt: optic tract

視束

OVLt: organum vasculosum lamina terminalis

終板器官

PA: posterior amygdala nucleus

扁桃体後核

PM: premammillary nucleus

前乳頭体核

PIR: piriform cortex

梨状皮質

PPit: posterior pituitary

下垂体後葉

PVH: hypothalamic paraventricular nucleus

視床下部傍室核

PVa: hypothalamic periventricular nucleus, anterior part

視床下部脳室周囲核、前部

PVp: hypothalamic periventricular nucleus, posterior part

視床下部脳室周囲核、後部

PVpo: hypothalamic periventricular nucleus, preoptic part

視床下部脳室周囲核、視束前野部

RF: rhinal fissure

嗅溝

RMg: raphe magnus nucleus

大縫線核

- SCH: suprachiasmatic nucleus
視交叉上核
- SFO: subfornical organ
脳弓下器官
- SI: substantia innominata
無名質
- SLSI: sublenticular substantia innominata
レンズ核下無名質
- SO: supraoptic nucleus
視索上核
- SS: somatosensory area
（大脳皮質）体性感覚野
- st: stria terminalis
分界条
- SUM: supramammillary nucleus
乳頭体上核
- vhc: ventral hippocampal commissure
腹側海馬交連
- VIS: visual area
（大脳皮質）視覚野
- VL: lateral ventricle
側脳質
- VMH: hypothalamic ventromedial nucleus
視床下部腹内側核
- VMHvl: hypothalamic ventromedial nucleus, ventrolateral part
視床下部腹内側核、腹外側部
- V4: fourth ventricle
第4脳室
- V3: third ventricle
第3脳室
- V3m: third ventricle, mammillary recess
第3脳室、乳頭体陥凹

目次

謝辞	i
基礎となる学術論文	iii
参考論文	iv
略語一覧	v
第1章：総合緒言	1
1-1；緒言	2
1-2；機能的な性的二型と脳の形態学的な性差	2
(1) 性行動における性的二型	2
(2) 性行動以外にみられる性的二型	2
(3) 内分泌学的な性的二型	3
(4) 脳の形態的性差	3
1-3；哺乳類の性決定と性分化異常	4
(1) 哺乳類の性決定	4
(2) 哺乳類の脳の性分化異常	4
1-4；脳の性分化の臨界期	5
1-5；脳の性分化の原則とアンドロジェンの活性化経路	5
1-6；脳に対するエストロゲン作用と受容体	6
1-7；発育期脳内エストロゲン受容体の発現と免疫組織化学染色	6
1-8；実験の目的	7
第2章：総合的な実験方法と実験材料	9
(1) 動物	10
(2) 動物の処理	10
(3) 脳標本の準備	11
(4) 抗ラットエストロゲン受容体血清 (AS 408) について	12
(5) 免疫組織化学染色の方法	12
(6) エストロゲン受容体免疫組織化学染色の特異性の検定	14
(7) 使用抗体	15
図2-1：ER抗体のER抗原による吸収試験	16
第3章：新生仔ラット脳内エストロゲン受容体の分布	17
図3-1：出生当日の雌ラット中脳におけるER-I Rの分布	30
図3-2：出生当日の雌ラットの視束前野部位におけるER-I Rの分布	31
図3-3：出生当日の雌ラットの視床下部の後部領域におけるER-I Rの分布	32
図3-4：視床下部腹内側核腹外側核 (VMHvl) におけるER-I R含有神経細胞数の前後軸における変化	33
図3-5：出生当日の雌ラットの扁桃体におけるER-I Rの分布	34

図3-6: 出生当日の雌ラットにおけるER-I Rの分布	35
図3-7: 新生仔ラットの扁桃体におけるER-I Rの出現	36
図3-8: 新生仔ラットの副嗅球におけるER-I Rの非出現	37
図3-9: 内側視束前核中心部(MPNc)をふくむ位置におけるER-I Rの分布	38
図3-10: 新生仔ラットにおけるER-I Rの性差	39
図3-11: 生後10日齢新生仔ラットのMPN-BST(内側視束前核後部の背側部から分界状床核の腹側部にかけての部位)におけるER-I Rの性差	40
図3-12: 出生当日の精巣摘出とエストロゲン投与による新生仔脳内ER-I R出現への影響	41
図3-13: 出生当日の精巣摘出とアンドロゲン投与による新生仔脳内ER-I R出現への影響	42
図3-14: 出生当日の精巣摘出とアンドロゲン投与によるMPNc(SDN-POA)への影響	43
図3-15: 細胞質におけるER-I Rの出現	44

第4章: 新生仔脳におけるエストロゲン受容体の一過性の出現

45

4-1: 大脳皮質第V層におけるエストロゲン受容体の一過性の出現

46

図4-1-1: 大脳皮質および視床下部におけるER-I R	55
図4-1-2: 大脳皮質聴覚野におけるER-I Rの雌雄間における比較	56
図4-1-3: 大脳皮質におけるER-I Rの出現	57
図4-1-4: 大脳皮質におけるER-I Rが聴覚野であることの証明	58
図4-1-5: 大脳皮質体性感覚野および視覚野におけるER-I Rの出現	59
図4-1-6: 下丘へ投射する神経細胞とER-I R含有細胞の比較	60
表4-1: 大脳皮質と視床下部におけるER-I R出現の生後変化	61

4-2: 顔面神経核におけるエストロゲン受容体の一過性の出現

62

図4-2-1: 新生仔ラット顔面神経核におけるER-I Rの出現	68
図4-2-2: 後耳介筋へ投射する神経細胞とER-I R含有細胞の比較	69
図4-2-3: ER抗体のER抗原による吸収試験(大脳皮質および顔面神経核)	70

4-3: 新生仔マウス大脳皮質と顔面神経核におけるエストロゲン受容体の出現の検討

71

図4-3-1: 新生仔マウスの内側視束前野と視床下部におけるER-I Rの出現と顔面神経核における非出現	74
図4-3-2: 新生仔マウスの大脳皮質におけるER-I Rの出現	75

第5章：エストロゲン受容体とアロマターゼ含有神経細胞の脳内分布 76

図5-1： 出生当日雄ラットの視束前野部位におけるAROM-IRとER-IRの分布..... 90

図5-2： 出生当日雄ラットの視床下部の後部領域におけるAROM-IRとER-IRの分布
..... 91

図5-3： 出生当日雄ラットの分界状床核および扁桃体におけるAROM-IRとER-IRの
分布..... 92

図5-4： 出生当日ラット脳におけるAROM-IRとER-IRの重複分布..... 93

図5-5： 新生仔ラットにおけるAROM-IRとER-IRの反応性の性差..... 94

図5-6： MPN-BSTにおけるAROM-IR出現の発育に伴う変化と性差..... 95

図5-7： 内側視束前核中心部(MPNc)周囲におけるAROM-IRとER-IRの分布
..... 96

図5-8： 大脳皮質聴覚野におけるAROM-IRの非出現..... 97

図5-9： 顔面神経核内側亜核におけるAROM-IRの非出現..... 98

図5-10： 出生当日雄ラットと成体雄ラットの脳内AROM-IR出現の比較..... 99

図5-11： 発育に伴うVMHv1におけるAROM-IRとER-IRの出現の変化..... 100

図5-12： 成体ラット脳におけるAROM-IRの出現の性差..... 101

図5-13： 脳内で局所産生されたエストロゲンの脳内ERへの作用様式の発育期と成体の比較
..... 102

第6章：胎仔ラット脳内エストロゲン受容体の出現..... 103

図6-1：胎仔期脳(胎齢16日)におけるER-IRの出現(I)..... 108

図6-2：胎仔期脳(胎齢16日)におけるER-IRの出現(II)..... 109

図6-3：胎仔期脳(胎齢18日)におけるER-IRの出現..... 110

第7章：エストロゲン受容体と性腺刺激ホルモン放出ホルモンおよび一酸化窒素合成酵素の含有細胞との関係..... 111

図7-1：新生仔雄ラット脳(出生当日)における一酸化窒素合成酵素(NOS)活性の存在部位
..... 116

図7-2：新生仔雄ラット脳(生後3日齢)におけるER-IRとNOSの共存..... 117

第8章：総合考察..... 118

図8-1：これまで考えられていた周生期ラット脳へのエストロゲン作用..... 126

図8-2：新生仔ラット脳におけるエストロゲンによる性分化機序..... 127

図8-3：成体雌ラット脳に対するエストロゲン作用..... 128

図8-4：成体雄ラット脳に対するエストロゲン作用..... 129

文献..... 130

第1章
総合緒言

1-1 ; 緒言

哺乳類の性別を判定する際、外部生殖器の構造に認められる性的二型が最も有効な判定基準となる。性とは、遺伝子混合のメカニズムであるから、交尾行動やそれに関連した行動は全て外部生殖器の形状に合わせ、それらの接合にとって最も効率のよい姿勢をとるように発揮されている。例えば、四足歩行する哺乳類で外部生殖器が鼠径部に位置する種の雌は、交尾の際に雄の乗駕を許容して、臀部（陰部）を上げる姿勢をとる。

ところが、外観は雌でありながら雄型の性行動をとるものや、逆に雄的な外部生殖器を持ちながら雌型性行動をとる動物が存在する。また、ラットやマウスでは、生後の早い時期にエストロゲンやアンドロゲンで処理すると性行動パターンを遺伝的な性とは逆転させることができる。動物の行動パターンが脳で制御されていることを考えると、これらの事実は、脳にも性的二型が存在し、その性分化は遺伝子の直接的な影響より、むしろ発生期の性腺ホルモンから大きな影響を受けていることを示している。

1-2 ; 機能的な性的二型と脳の形態的な性差

(1) 性行動における性的二型

哺乳類の場合、性行動の雌雄パターンは性に固有のもので、異性型の性行動は示さないのが普通である。実験動物として最もよく研究されているラットの雌では、交尾の際に雄の乗駕（マウント）行動に反応して、脊柱を湾曲させる姿勢（ロードーシス）を示す。一方、雄ラットは、雌にマウントして、腰を前後させる行動（スラスト）が特徴である。一般的に、このロードーシスとマウントが、それぞれ雌型性行動および雄型性行動の指標とされている。

(2) 性行動以外にみられる性的二型

ロードーシスおよびマウント行動などの性行動以外にも、雌雄でその出現性が異なる行動や能力が認められている⁽⁷⁹⁾。例えば、ラットの輪廻し運動（Running Wheel Activity）は雌のほうが雄よりも活発に行なわれる。攻撃性（Aggression）も性差が認められる行動で、ラットやマウスでは雄のほうが雌よりも高い攻撃性を示す。グルコースやサッカロースに対する嗜好性は雌ラッ

トのほうが雄より高く、味覚嗜好性にも性的二型があることが示されている。その他、電気ショックに対する抵抗力にも性差が認められ、雌ラットのほうが雄ラットよりも強いことが示されている。

(3) 内分泌学的な性的二型

GTH 分泌パターンは哺乳類に共通に認められる性的二型である。ラットに限らず、性成熟に達した哺乳類雌の血中 GTH 分泌パターンは、LH サージを中心とした周期性のあるパターンを示す(194, 227, 247, 264)。雌で認められるこのパターンの1周期の長さは動物によって様々であり、ヒト(約28日)やウシ(約21日)では1ヶ月近い長さを示す一方、ラットやマウスでは4-5日である。また、ある季節に限りこの周期パターンが発現する動物(季節繁殖動物: ヒツジ、ヒグマ、ネコなど)や、イヌのように1回の周期の間隔が約4-7ヶ月もある動物も見られる。しかし、GTHの周期性分泌が認められることに基本的な差はない。成体雄でも、ヒグマのように雌の繁殖季節に合わせてGTHレベルが上昇する動物も存在するが、雌のような周期性分泌を示すことはない。従って、GTH分泌パターンは最も顕著な性的二型の一つであり、GTHの周期的分泌パターンを示すのが哺乳類の雌の特徴であるといえる。

(4) 脳の形態的性差

性行動やGTHの分泌は、主に間脳の視床下部で調節されているが、形態的な性差が視床下部領域を中心に認められている。脳には、組織学的に神経細胞体の集合からなる神経核と呼ばれる構造が存在するが、Raisman and Field⁽¹⁸²⁾がラットの視束前野背側部の神経核を構成する神経細胞のシナプス結合様式に性差があることを見出して以来、多くの神経核でその大きさや構成する神経細胞のシナプス形態に性的二型があることが報告されている(27, 48, 53, 55, 85, 126, 141, 143, 144, 163-166, 185, 265, 266)。また、ラット以外でも、マウス⁽²⁷⁾、ハムスター⁽⁸¹⁾、アレチネズミ⁽⁴¹⁾、イタチ⁽²⁴⁰⁾、ネコ⁽³³⁾、サル^(12, 32)、ヒト^(4, 120, 233)で、脳の形態的な性的二型が報告されている。従って、脳の構造的な性差の存在が基盤となって、行動や内分泌パターンなどの機能的な性的二型が発現されていると考えられる。

1-3 ; 哺乳類の性決定と性分化異常

(1) 哺乳類の性決定

哺乳類の性は、基本的にはY染色体を持つか否かで決定している。Y染色体を持つ雄(XY)では、Y染色体に乗っている性腺決定遺伝子 (sex determining region Y gene; ヒト: SRY⁽²²²⁾、マウス: Sry⁽⁸⁴⁾) によって未分化生殖腺から精巣が分化してくる。一方、Y染色体をもたない雌(XX)では、この遺伝子を持たないため卵巣が分化してくる。これを一次性決定と呼んでいる。この一次性決定で分化した性腺から分泌される物質によって、身体的な性や脳の性分化が誘導されるので、それらは二次性決定と呼ばれる。

(2) 哺乳類の脳の性分化異常

一次性決定に異常があると (XX性腺異形成症や、Klinefelter症候群など)、精神薄弱を伴う場合が多い。一方、二次性決定に異常を認める場合、重大な精神障害は示さないが、遺伝的な性 (性染色体、および性腺) と行動学的な性に相異が認められるという特徴がある。

例えば、遺伝的には雄性で精巣も発達しているが、外見や行動 (性的嗜好) が雌性という疾病がある。1953年に Morris⁽¹⁵⁶⁾ によってヒトで報告されたこの疾患は、精巣性雌性 (女性) 化症候群 (testicular feminization syndrome = TFS) と呼ばれるアンドロジェン受容体の欠損や減少が原因で起きる二次性決定の異常疾患である。この疾患はラット⁽⁵⁾ やマウス⁽¹²⁸⁾ でも発見されている。また、遺伝的には雌 (XX) であっても外見や行動は雄という疾患も存在する。副腎過形成などの先天性の原因で起こる場合や、流産防止治療のための母体への合成性ステロイドホルモン投与など医原性で起こることもある。また、このような現象は、ウシ、イヌ、ネコでも認められている^(150, 169)。

このように、哺乳類の脳の性分化には、性腺からの性ステロイドホルモンが重大な影響を及ぼしていることが示されている。また、二次性決定の異常では重大な精神障害を伴わないことから、脳の性分化は脳の発生過程の後半で決定されていると考えられる。

1-4 ; 脳の性分化の臨界期

発育期の性ステロイド環境を操作して、成熟後の性行動やGTH分泌パターンを変化させた動物では、脳の形態学的な性的二型にも変化が及んでいることが見出されている(28, 57-59, 78, 97)。

このことは、機能的な性的二型の基盤として脳の構造的な性差があることを支持している。脳の性分化の臨界期は、全て胎生期にある動物(ヒト、アカゲザル、ヒツジ)、ほとんどが胎生期で一部出生後にも及ぶ動物(イヌ)、胎生期から始り主に出生後にある動物(ラット、マウス、ハムスター、イタチ)など、種によって様々である(79)。

この中でも、ラットやマウスは脳の性分化の臨界期が生後に及んでいるため、性ステロイド環境の操作によって、脳の性分化をコントロールすることが容易に出来る。このため、哺乳類の脳の性分化機構解明の有用なモデル動物として広く用いられている。

1-5 ; 脳の性分化の原則とアンドロジェンの活性化経路

ラットやマウスにおける研究から、哺乳類の脳の性分化について、雌雄性を決定する第一要因は周生期のアンドロジェンで、アンドロジェン作用を受けると雄型脳に、この作用から免れると雌型脳になるという原則が示されている。一方で、エストロジェンにもアンドロジェンと同様の効果があることが示されている(3, 76)。

アンドロジェンが脳に作用するには、テストステロンが芳香化酵素(アロマターゼ)でエストロジェンになるか、 5α -還元酵素によって 5α -デヒドロテストステロン(5α -DHT)になる必要がある(133)。しかし、 5α -DHTには雌脳の雄性化作用がないことが報告されている。従って、アンドロジェンが及ぼす雌脳の雄性化作用は、脳内のアロマターゼによって局所産生されたエストロジェンの作用によるものと考えられるようになった。

哺乳類の脳内アロマターゼの存在は、ヒト(160)、アカゲザル(210)、マウス(87)の胎児(仔)や新生仔、その他オッポサム(34)やハムスター(96)でも確認されている。したがって、血中アンドロジェンから脳内で局所産生されるエストロジェンが脳の性分化に重要な働きをしているとする考えは、「アロマターゼ仮説」として、性ステロイドが誘導する哺乳類の脳の雄性化のモデルとして広く受け入れられている。

1-6 ; 脳に対するエストロゲン作用と受容体

脳に対するエストロゲン作用には、activationalな作用とorganizationalな作用とがある。activationalな作用とは、成体にエストロゲンを投与したときに一般的に認められる作用で、効果が一過性に発現される作用である。GTH分泌を一次的に抑制する作用や、去勢した成体雌にエストロゲンを与えた時にみられるGTH分泌の一時的な促進、および性行動発現の促進がこれにあたり、血中エストロゲン値の低下に伴い効果も消失する。一方、organizationalな作用とは、作用効果が機能的あるいは形態的に不可逆的に現れ、血中からエストロゲンが消失した後もその作用の結果が不可逆的に残る作用で、二次性徴の発現はその典型例である。脳の性分化に対するエストロゲン作用は、神経核の大きさやラットのGTH分泌パターンに不可逆的な性差を誘導することから、後者のorganizationalな作用と考えられる。これは、in-vivoでの研究(28, 57-59)や培養実験(241, 243, 248)の結果からも支持される。

標的器官にホルモンが作用して効果を発揮するには、受容体の存在が必要である。したがって、エストロゲン作用はエストロゲン受容体(ER)を介して発揮される。一般に、ERは細胞の核内に存在し、リガンドであるエストロゲンと複合体を形成することで遺伝子を活性化して、新しいタンパク質の合成を制御することでその作用を発揮すると考えられている。エストロゲンをリガンドとした遺伝子転写制御因子といえる核内ERに関して、哺乳類では、ヒト(80, 83)、ラット(111)、マウス(258)で、その遺伝子構造が明かにされている。一方、細胞膜に存在し、細胞内Ca²⁺イオン濃度や膜電位を変化させることで、速いニューロン活動に関与しているERの存在も考えられている(245)。しかし、後者のタイプについて、遺伝子構造などは未だ解析されていない。

脳の性分化に関係するエストロゲン作用はorganizationalな作用であることから、前者、すなわち核内の受容体を介した作用であると考えられる。

1-7 ; 発育期脳内エストロゲン受容体の発現と免疫組織化学染色

周生期のラット脳内におけるERの存在は、結合試験(135, 136)によって示されている。しかし、ERの解剖学的な存在部位については、生後2日齢(本研究では生後3日齢に相当する)の新生仔雌ラットの視床下部の一部領域について、オートラジオグラフィ(ARC)(205)で示されている

だけである。このため、エストロゲンによる雄性化は雌雄脳におけるERの分布の差によるものなのか、またERタンパクが発育期ラット脳のどの部位に存在して、エストロゲンによる雄性化作用が脳のどの部位で行なわれているのか十分には明らかとなっていない。

免疫組織化学染色 (IHC) は、検出したい物質に対する抗体を目的とする抗原と反応させることで、組織内の抗原の局在を知ろうというものである。この方法は、抗原抗体反応という極めて特異性の高い反応を基盤とするもので、ARGでは困難であった反応特異性や細胞内での受容体局在の検討を可能にしている。また、リガンドの投与を必要としないため、生理的条件下の脳を検討することができる。これは、エストロゲンの発育期脳への影響を検討する上で大変有用な手法である。さらに、異なった抗原を認識する抗体を同一切片に用いてIHCを行うことで、一つの神経細胞の持つ複数の性質を検討することができる。

1-8 ; 実験の目的

上述したように、ラットは哺乳類の脳の性分化機構解明の有用なモデルとして多くの研究が行われているにも関わらず、周生期の脳内ERの分布をIHCで検討した報告はない。IHCによるラット脳内ERの検討が進まなかった理由として、ラットに用いる特異的なER抗体が存在しなかったことが挙げられる。現在、ER抗体として最も広く使用されている抗ヒト乳癌ER抗体⁽⁸²⁾は、ラットに免疫して得られたものである。これを一次抗体としてIHCを行う場合、二次抗体として、抗ラットIgGを用いなければならないため、ラットの組織に使用すると、二次抗体が組織内の内因性イムノガンマグロブリンと結合して非特異的な反応が検出されてしまう。そのため、ラット組織のERの検出には、既存の抗ER抗体はあまり有用ではなかった。

近年、Hayashiらのグループ⁽¹⁷⁰⁾は、ラット子宮ERのcDNAをもとに、大腸菌システムでERタンパクを生産させ、これを抗原としてウサギに免疫することで抗ラットER血清を作成することの成功した。本研究は、このHayashiらのグループが作成した抗ER抗体を用いたIHCを中心に、以下の5つのアプローチを行った。これらのアプローチによって、周生期ラットの脳内エストロゲン局所産生部位、および、エストロゲン受容体タンパクの存在部位を解剖学的に明らかにし、脳の性分化に関するエストロゲンの作用部位を検討した。

- 1) エストロジェンの脳の性分化に対する作用が最も重要と思われる、新生仔期ラット脳内 ER の出現を IHC で検出し、出現部位および出現の性差を検討した (第 3 章)。
- 2) 新生仔期のみ出現する脳内 ER について検討し、性分化以外の脳の発育に関するエストロジェン作用を考察した (第 4 章)。
- 3) 二重免疫染色で脳の性分化の臨界期における ER 含有細胞とアロマターゼ含有細胞の分布関係を調べて脳内におけるエストロジェン局所産生部位を明かにし、エストロジェンが新生仔ラットの脳に及ぼす性分化機構を考察した (第 5 章)。
- 4) 胎仔ラット脳の ER の出現を調べて、ラット脳に ER タンパクが出現してくる時期を検討した (第 6 章)。
- 5) 性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) および一酸化窒素合成酵素 (NOS) と ER の共存を調べて、エストロジェンが GnRH 分泌や形態的な性差発現にどのような作用機構で関与しているのかを考察した (第 7 章)。

第2章 総合的な実験方法と実験材料

(1) 動物

基本的には、東京都神経科学総合研究所の解剖発生学研究部門で系代繁殖した Sprague-Dawley strain (以下SD) ラットを用いた。使用動物の胎齢および出生後日齢は以下のように決めた。繁殖用の雌を発情前期の午後から繁殖用の雄と一晩同居させ、翌朝、膣栓を確認した場合、これを胎齢の第1日目(胎齢1日)とした。出産予定日の前日から妊娠ラットの観察を行い、夜間を除いて約2時間の間隔で出産時刻を確定した。なお、本研究では出産の確認から24時間以内(出生当日)を生後1日齢とした。

ラット種におけるエストロゲン受容体(ER)免疫組織化学反応の特異性を検討するため、SDラットとは起源の異なる系統である、Fischer 344 (以下、F344)⁽¹²²⁾ラットを用いた。実験には、妊娠雌を日本クレア社より購入し、東京都神経科学総合研究所で出生した新生仔ラットを使用した。F344ラットの日齢の算定方法は、SDラットに準じた。

また、ラット種以外における反応特異性を検討するため、東京都神経科学総合研究所の寺島俊雄博士から提供して頂いたリーラー・マウスを使用した。このリーラー・マウスは、リーラー遺伝子についてヘテロ動物(C57BL/6J-rl/+)のペアを米国Jackson研究所より購入し、東京都神経科学総合研究所において兄妹交配を繰り返しているコロニーから提供を得たものである。実験には、同腹の野生型個体(+/+)の新生仔を使用した。マウスの日齢に関しても、その算定方法はSDラットに準じた。

(2) 動物の処理

新生仔期の性ステロイド環境がERタンパクの出現性に与える影響を調べるため、使用動物のうち何匹かのSDラットについて以下の処理を行った。

出生確認後24時間以内(生後1日齢)の雌ラットに対して、エストラジオールベンゾエート(EB: Sigma, St. Louis, MO, USA: 10mg/0.02ml sesame oil/head/day)、テストステロンプロピオネート(TP: Sigma, St. Louis, MO, USA: 100mg/0.02ml sesame oil/head/day)、あるいは、これらと同量(0.02ml/head/day)のゴマ油(sesame oil=Oil)を投与した。新生仔雄ラットについては、出生確認後24時間以内に精巣除去あるいは擬似手術し、雌と同様の外因性性ステロイド処理あるいはOil投与を施した。EB、TPおよびOilの投与は、出生当日から4日間、あるいは9日間連続して行い、

それぞれ生後5日齢、生後10日齢の時点で灌流固定した。

なお、これらのEBおよびTPの投与（投与方法）は、Jacobson et al.⁽⁹⁷⁾およびDöhler et al.⁽⁵⁸⁾が報告した、ラットの内側視束前核の中心核（MPN_c=SDN-POA）の大きさ⁽⁷⁸⁾に形態的な雌雄差を誘導できる方法で行った。また、この方法によるEB投与量は、生後41日齢の雌ラットに70%以上の割合で持続性発情型の不妊（残りは持続性非発情型の不妊を示す）を誘導することができる投与量である⁽³⁾。

（3）脳標本の準備

実験に用いた全ての動物は、経心臓法で灌流固定した。灌流固定は以下の方法で行った。

動物の麻酔

胎仔ラットを取り出すために、妊娠ラットをネンブタールで麻酔し、帝王切開術で胎仔を摘出した。摘出した胎仔ラットは、氷上で低温麻酔して灌流固定に備えた。生後1日齢から生後5日齢までの新生仔ラットは、胎仔ラットと同様に氷上で低温麻酔して灌流固定に備えた。生後7日齢から21日齢および成体ラットは、ネンブタールで麻酔して灌流固定に備えた。

灌流固定および固定標本の保存

0.1 M phosphate buffered saline（PBS, pH 7.4；以下 PBS）で前灌流をした後、約4℃に冷却した固定液（paraformaldehydeを4%の割合で含んだ0.1 M phosphate buffer = PB；以下 4% PFA）で固定を行った。灌流は、ペリスタティックポンプ（MICRO TUBE PUMP-MP3、TOKYO RIKAKIKAI Co. JAPAN）を用いて行った。

灌流液の量は、胎齢および日齢に応じて変化させた。胎仔には、30G注射針で約15 mlの固定液を20-30分かけて流した。生後1日齢から生後5日齢には、23G注射針で50 mlの固定液を20-30分かけて流した。生後5日齢から生後10日齢には、21G注射針で75 mlの固定液を15-20分かけて流した。生後10日齢から生後21日齢には、21G注射針で100 mlの固定液を流した。成熟ラットには、18G注射針で300 mlの固定液を流した。

灌流固定完了後、頭蓋から脳のみを取り出して4%PFAに移し、4℃で一晩後固定を行った。後固定終了後、標本をシュークローズ液（sucroseを30%含んだ0.1 M PB, pH 7.4）に移し、4℃で十分に

浸透させた。シュークロース液が浸透して標本が完全に沈んだのを確認した後、凍結防止液 (0.1 M PB, pH 7.4 に、シュークロースを 30%、ポリビニルピロリドン を 1%、およびエチレングリコールを 30% 含んだ液) に移し、切片作製まで -20℃ で保存した。

脳組織切片の準備

脳標本の切片作製は、凍結装置 (KOMATSU ELECTRONICS) の付いたマイクロトーム (YAMATO KOHJI) (以下、凍結マイクロトーム)、およびクリオスタット (LEITZ 製) で作製した。基本的に胎仔ラット脳はクリオスタットで 10 μm の前額断切片を作成し、ゼラチンコート (ゼラチンを 6%、クロムみょうばん = CrK(SO₄)₂ 12H₂O を 0.5% の割合で溶かした蒸留水に 15 分間浸し、これを 40℃ で一晩乾燥させたもの) したスライドグラスに貼りつけた。一方、新生仔ラット脳および成熟ラット脳では、基本的に、凍結マイクロトームでそれぞれ 40 μm または 30 μm の前額断の連続浮遊切片を作成した。連続浮遊切片は、各穴に PBS を満たした Nunc 社製 (日本インターメッド) の 24 穴マルチデッシュを用いて、実験に応じて群分けした。浮遊切片に対する免疫組織化学染色は、引き続いて、このマルチデッシュ内で行った。

(4) 抗ラットエストロジェン受容体血清 (AS 408) について

ER の免疫組織化学染色 (IHC) は、Hayashi のグループが作製した抗ラット ER 血清 (AS 408)^(89, 170) を用いた。この抗 ER 血清は、Koike et al.⁽¹¹¹⁾ が構造を決定した、ラット子宮 ER の cDNA を大腸菌に導入し、この大腸菌が産生した ER タンパクを抗原としてウサギに免疫することで作製したものである。抗原に用いたラット ER タンパクは、N 末端から数えて 61 番目のアミノ酸から、C 末端 (600 番目) の領域を含んでいる。この中には、ER タンパクのうち、DNA 結合ドメイン (181 から 267 番目) およびエストロジェン結合ドメイン (307 から 557 番目) が含まれている。

AS 408 の ER に対する反応特異性は、(イ) 成体ラット脳での *in situ* hybridization 組織化学による ER mRNA 発現部位と同一性が認められること、(ロ) プロジェステロン、コルチコステロン、およびテストステロンとは交叉反応しないこと^(89, 170)、また後述する (ハ) ER 抗原による吸収試験による結果から確認されている。この抗体は、また、エストロジェン結合型 ER とエストロジェン非結合型 ER の両者とも認識するという特徴を持っている^(89, 170)。

(5) 免疫組織化学染色の方法

免疫組織化学染色 (IHC) は原則的に、同日齢の同腹の雌雄からの標本を組にして行った。胎仔脳の切片はスライドガラスに張り付けた状態で、一方、新生仔脳および成体脳の切片は、前述したマルチデッシュを用いて浮遊法で行った。二重免疫組織化学染色はERの染色から先に行った。

エストロゲン受容体の免疫組織化学染色

浮遊切片、および、スライドガラスに貼りつけた切片をPBSで洗浄した後、内因性ペルオキシターゼ除去の目的で、過酸化水素 (hydrogen peroxide = H_2O_2) を3%含んだメタノールに15分間反応させた。次に、Triton X-100を1%の割合で含む0.05 M PBS (以下、PBST) で4-5回液を換えながら約1時間洗浄した。洗浄後、ブロッキング処理の目的で、ウシ血清アルブミン (BSA) を1% およびアジ化ナトリウム (NaN_3) を0.05%の割合で含むPBST (以下、BST-PBST) に、正常ヤギ血清 (NGS) を10%の割合で加えた液に、室温で約1時間反応させた。ブロッキング処理の後、一次抗体としてAS408をPBSTで20,000倍に希釈し、これに4℃で72時間反応させる。

一次抗体への反応終了後、PBSTで3-4回約1時間洗浄してから、二次抗体としてBSA-PBSTで希釈したbiotinylated goat anti-rabbit IgG (2.0 ml/ml; Vector Labs., Burlingame, CA, USA) に室温で1時間反応させた。反応終了後、再びPBSTで3-4回約1時間洗浄して、BSA-PBSTで希釈したavidin-biotin complex (4.5 ml each/ml; Vector Labs., Elite Kit) (以下、ABC液) に1時間反応させた。ABC液への反応終了後、PBSTで10分間、2回洗浄を行なった後、ERの単独染色の場合は0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) で、また他の抗体との二重染色の場合は0.175 M sodium acetate buffer (pH 7.4) で10分間、2回洗浄する。2回目の洗浄終了後、DAB溶液による発色反応を行う。DABによる発色反応は以下の2つ方法で行った。

(a) 通常の染色: 0.05 M Tris-HCl buffer にDAB (0.2 mg/ml; Sigma Chem. Co.)、および0.0025% hydrogen peroxideを加えた反応液で8分間反応させる。この場合、免疫組織化学反応は茶色になる。

(b) 増感染色: 0.175 M sodium acetate buffer に塩化ニッケル (nickel chloride, 25 mg/ml; Wako), DAB (0.2 mg/ml; Sigma Chem. Co.) および、これに0.0025%の割合で H_2O_2 を加えたDAB反応液で8分間反応させる。この場合、免疫組織化学反応は増感されて黒紫色になる。

DAB溶液による発色反応の終了は、ER単独の場合は0.05 M Tris-HCl bufferで行い、また、増感染

色場合は0.175 M sodium acetat buffer で洗浄することで行った。いずれの場合でも、その後さらにPBSで十分に洗浄する。PBSで洗浄終了後、貼りつけ切片の場合は、スライドグラスごと十分に乾燥させた後、また、浮遊切片はゼラチンコートしたスライドグラスに貼りつけて十分に乾燥させた後、上昇アルコール系列で脱水処理を行う。脱水後、キシレンで透徹して Biolite (Ouken, Japan) あるいは Permount (Fisher Scientific, USA.) を封入剤に用いてカバーグラスで封入する。

AS408によるIHCのコントロールとして、ERタンパクによる免疫を行う前のウサギから採取した血清(AS401)を一次抗体としたIHCを行った。また、脳の解剖学的な位置を確定するために、2%クレシル紫液、または、5%ニュートラルレッド液でニッスル染色を行った。

二重免疫組織化学染色

ERのIHCに続いて、他の抗体との二重免疫組織化学染色を行う場合は、増感染色によるERの発色反応の終了後、0.175 M sodium acetat buffer およびPBSTで十分に洗浄した後、BSA-PBSTで希釈した2種類目の一次抗体 (aromatase および LH-RH) の反応液に72時間、4℃で反応させた。以降の過程は発色反応の部分を除いてERのときと同じ方法で行った。二重染色の場合、ABC液による処理後、PBSTで10分間、2回洗浄を行なった後、0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) で10分間、2回洗浄し、0.05 M Tris-HCl buffer にDAB (0.2 mg/ml; Sigma Chem. Co.)、および0.0025%の割合でH₂O₂を加えた液に移し、8分間発色反応を行った。発色反応の終了はPBSに移すことで行った。

以降の処理は、ERのIHCの場合と同様に行った。なお、二種類目の一次抗体の希釈濃度などについては、各章の「材料と方法」に記載する。

(6) エストロジェン受容体免疫組織化学染色の特異性の検定

組織切片に対するこのER抗体(AS408)の反応特異性を調べるために、ER抗体の抗原による吸収試験を行った。ER-β-galactosidaseタンパクを発現した大腸菌を超音波粉碎しこれを遠心分離して得た沈渣分画に、AS408を12時間4℃でインキュベートした。さらにこれを遠心分離し、その上清分画を得た。これを、ER抗体吸収抗血清とした。対照群として、ERを持たない、β-galactosidaseタンパクのみを発現している大腸菌を用いて同様の処理を行い、最終的に得られた上清分画を、ER抗体非吸収抗血清(対照抗血清)とした。これら、ER抗体吸収抗血清およびER抗体非吸収抗血清

を一次抗体として IHC を行った。

図 2-1 に、生後 10 日齢の雌で行った吸収試験の結果を示した。A と C が、ER 抗体非吸収抗血清を用いた IHC の結果、B と D が ER 抗体吸収抗血清を用いた IHC の結果である。ER が発現している大腸菌の沈渣分画にインキュベートして得た ER 抗体吸収抗血清では、抗 ER 成分が吸着されてしまっているため、IHC を行っても特異的な ER 陽性反応は検出されない (B と D)。一方、ER が発現していない大腸菌の沈渣分画にインキュベートして得た ER 抗体非吸収抗血清 (対照抗血清) では、抗 ER 成分が吸着されずに残っているため、IHC によって ER タンパクの陽性反応が得られている。したがって、この抗ラット ER 血清 (AS408) は、新生仔ラットの脳内 ER タンパクを認識していることが証明された。

(7) 使用抗体

Anti-ER polyclonal antibody (AS408) の他に以下の抗体を使用した。

Anti-ER polyclonal antibody (ER715) : Dr. G.L. Greene (Chicago university) から寄贈を受けた。

Anti-ER polyclonal antibody (ER21) : National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIDDK), USA. から寄贈を受けた。

Anti-AROM polyclonal antibody (R-8-1) : Dr. Y. Osawa (Medical Foundation of Buffalo, inc. USA) から寄贈を受けた。

Anti-LH-RH polyclonal antibody: UCB Bioproducts. SA, Brussels, Belgium. から購入した。

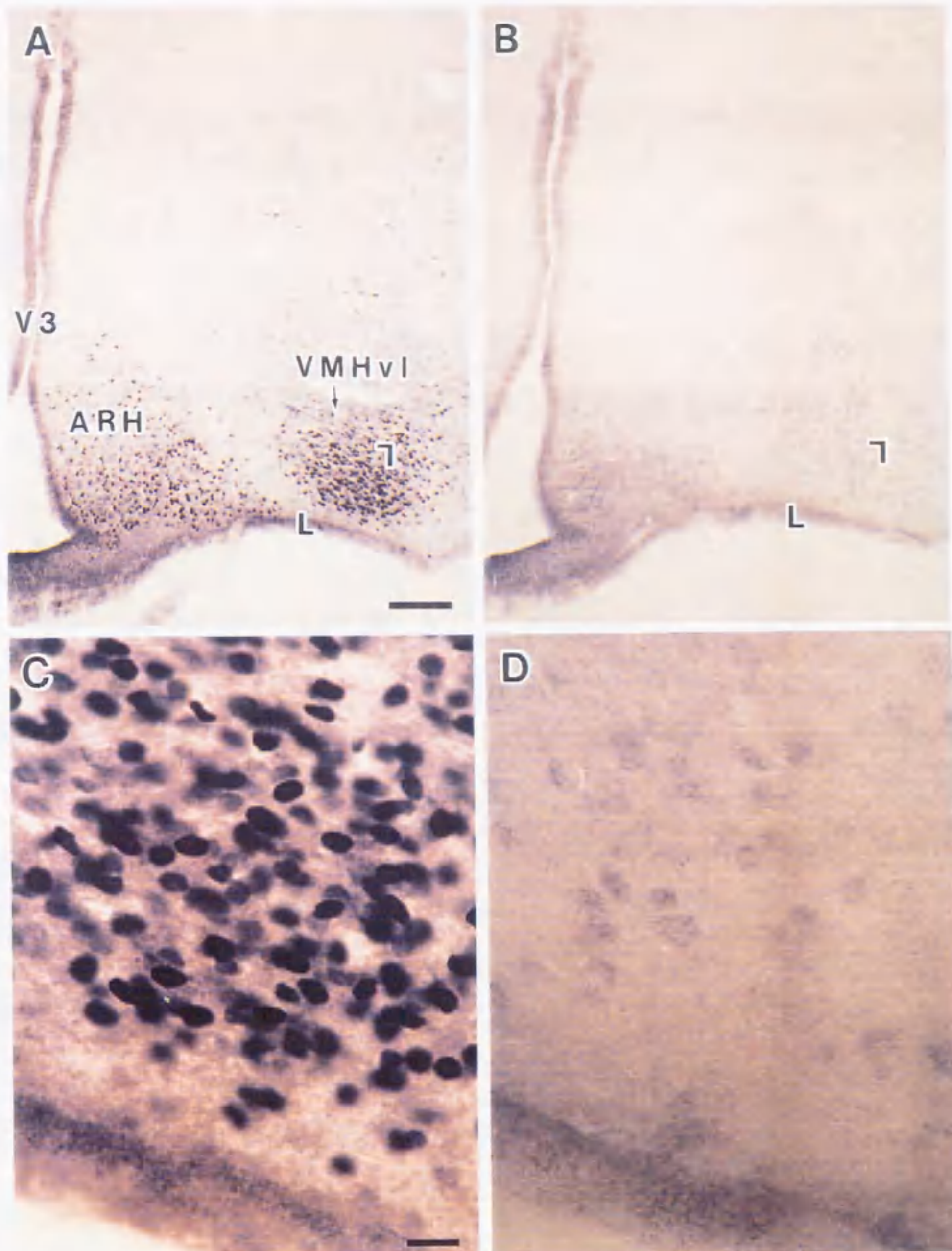


図2-1. ER抗体のER抗原による吸収試験

AとC: ERの融合タンパク質を発現していない大腸菌の溶解質液沈渣分画で処理し、ER抗体を吸収させなかったAS408でIHCした標本。視床下部の腹内側核腹外側部 (VMHv1) および弓状核 (ARH) にER-I Rが出現している。CはAの括弧で示した部位の拡大。

BとD: ERの融合タンパク質を発現している大腸菌の溶解質液沈渣分画で処理し、ER抗体を吸収させたAS408でIHCした標本。VMHv1およびARHに特異的なER-I Rは出現していない。DはBの括弧で示した部位の拡大。

V3 = 第3脳室。Scale bar in A = 100 μ m, C = 20 μ m.

第3章

新生仔ラット脳内エストロゲン受容体の分布

要旨

新生仔ラット脳内におけるER含有神経細胞の分布を、免疫組織化学染色(IHC)で検討した。新生仔ラットにおけるER免疫反応(ER-IR)は、特定の細胞群に存在する神経細胞の核内に存在していた。脳内におけるER-IRは、出生当日ですでに基本的には成体ラット脳と同様の分布パターンを示していた。すなわち、外側中隔核(LS)、終板器官(OVLT)、内側視束前核(MPN)、正中視束前核(MEPO)、分界条床核(BST)、視床下部脳室周囲核の視束前野部(PVpo)、外側手綱核(LH)、視床下部腹内側核の腹外側部(VMHvl)、視床下部弓状核(ARH)、視床下部脳室周囲核の後部(PVp)、扁桃体内側核の後背側部(MEApd)、扁桃体皮質核(COA)などに分布していた。基本的なER-IRの分布パターンに雌雄差は認められなかったが、MPN、VMHvlおよびARHでは、雌の方が雄よりも強い免疫反応性を呈すER-IRが多く認められた。また、MPN後部の背側部からBSTに移行する部位(以下、MPN-BST)でも、強く染まるER-IRの数は、雌のほうが雄よりも多く、雌のほうが雄よりもER-IRは広い範囲に分布していた。これらの性差は、生後10日齢以降の脳で明らかに認められた。これは、雌雄間における新生仔期の性ステロイドホルモン環境の差によってもたらされたものと考えられる。したがって、MPN-BSTは、性ステロイドホルモンによって誘導される脳の性分化に重要な部位であることが示唆される。

緒言

新生仔期の雌ラットに、アンドロジェン^(18, 19, 76, 236, 237)あるいはエストロジェン^(3, 237)を投与すると、成熟後のGTHの周期性分泌パターンは消失し⁽³⁰⁾、排卵も抑制される⁽¹⁹⁾。このような不妊雌では、ロードーシスなどの雌型性行動も消失しており、さらにアンドロジェンを投与すると雄型性行動を示すようになる。一方、出生当日に性腺を摘出した雄ラットに、卵巢を移植したり、雌性ホルモン(エストロジェン、プロジェステロン)を投与すると、雌ラットに見られるようなGTHの周期的分泌パターン^(88, 174)や、LHサージ^(42, 174, 255)、さらには、ロードーシスや母性行動⁽¹⁴⁶⁾などの発現を誘起することができる。このような、性ステロイドホルモン環境の操作による生殖機能の転換効果は、新生仔期のみ有効で、性成熟後に去勢したり性ステロイドホルモンを投与しても性転換の効果は見られない。したがって、ラットでは胎生後期から出生後

の数日間（周生期）が脳の性分化の臨界期と考えられている⁽⁷⁹⁾。この生殖機能の転換現象は、「雌の脱雌性化」および「雄の雌性化」と呼ばれ、周生期のアンドロゲン作用によると考えられる、脳の雄性化のモデルとして捉えられている。一方、胎生期や新生仔期の脳ではアロマターゼ活性が強く認められ、活発に血中アンドロゲンからエストロゲンが局所産生されていることが示されている⁽⁷⁹⁾。したがって、アロマターゼによってアンドロゲンから転換されたエストロゲンが、脳内のER含有細胞に作用することで脳の雄性化を誘導していると考えられている^(144, 149, 158)。これまでに、結合試験^(17, 130, 131, 135, 136, 184, 252)や、オートラジオグラフィ（ARG）^(31, 205, 206)、あるいは、*in situ* hybridization 組織化学⁽⁶¹⁾によって、胎生期あるいは新生仔期ラットの脳内におけるERの存在が示され、脳の性分化にエストロゲンが重要な役割をはたしていることが確実になっている。しかし、結合試験やARGは、リガンドとしてエストロゲンの投与を必要とするため生理的条件下のER発現状態を検討することは極めて困難である。さらに、結合試験では解剖学的な検討が、また、ARGでは特異的反応との区別がそれぞれ困難であるという問題点がある。一方、ERのmRNA発現は必ずしもERタンパクの出現とは一致しない^(138, 223)ことが示されているため、その発現部位が必ずしもエストロゲン作用部位とは断定できないという問題点がある。従って、生理的条件下での脳内ERの分布や、機能的ERの発現部位を知る為にもIHCによるERタンパクの脳内分布の検討は必要である。しかし、ラットは哺乳類の脳の性分化の研究に最もよく使われている動物であるにも関わらず、IHCによる新生仔期の脳内ERタンパク出現の検討は行われていない。

そこで、本実験では抗ラットER血清(AS408)を用いたIHCで、新生仔のラット脳内ERタンパクの分布を検討した。

材料と方法

動物と組織の準備

実験には、46匹の生後1、5、10、21日齢の無処置雌雄SDラット、および、24匹のTP、EBあるいはOil処理した生後5日齢、生後10日齢のSDラットを用いた。施行するIHC間のばらつきを最小限にするため、動物のサンプリングとIHCは、常に雌雄を同時に行った。すなわち、

同一の母親からの雌雄ラットについて、同時に IHC を行い比較検討した。

無処置動物は、氷による低温麻酔（出生当日の動物）もしくはネンブタールによって麻酔（生後 10 日齢と 21 日齢）した。経心臓法で還流固定を行い、4% PFA で後固定後、30% シュークローズ液に移した。完全に沈んだ後、切片作製まで凍結防止液に保存した。

MPNc (SDN-POA) の大きさに対して影響が認められる量のステロイド投与が、実際に新生仔ラット脳内 ER-IR の反応性に影響を及ぼすかどうかを検討するため、Jacobson et al.⁽⁹⁷⁾ および Dohler et al.⁽⁵⁸⁾ の方法によって、新生仔ラットのホルモン環境を以下のように変えて ER-IR の反応性を観察した。MPNc の大きさの性差は、受精後 32 日目（本研究の生後 10 日齢に相当）に完成することが報告されている⁽⁹⁸⁾。そこで、灌流固定時で生後 10 日齢に相当する TP 投与実験群でニッスル染色を行って、各群の MPNc の大きさを比較した。

EB および Oil 処理した動物は、次のように 3 匹ずつ 4 群に分けた。すなわち、(1) EB 投与雌（エストロゲン投与群）、および (2) その対照群として Oil 投与雌（雌の対照群）、(3) 出生当日に去勢した雄に Oil 投与した群（精巣摘出群）、および (4) その対照群として出生当日に擬似手術した雄に Oil を投与した群（雄の対照群）である。各群とも、出生当日から生後 4 日齢まで、毎日 EB あるいは Oil を投与し、生後 5 日齢に無処置動物と同様の方法で標本とした。

TP および Oil 処理した動物は、次のように 3 匹ずつ 4 群に分けた。すなわち、(1) TP 投与雌（アンドロゲン投与群）、および (2) その対照群として Oil 投与雌（雌の対照群）、(3) 出生当日に去勢した雄に Oil 投与した群（精巣摘出群）、および (4) その対照群として出生当日に擬似手術した雄に Oil を投与した群（雄の対照群）である。各群とも、出生当日から生後 9 日齢まで、毎日 TP あるいは Oil を投与し、生後 10 日齢に無処置動物と同様の方法で標本とした。

ER の免疫組織化学染色

IHC は、誤差を少なくするために、同腹・同日齢の雌雄標本について同時に行った。脳標本は凍結ミクロトームで 40 μ m の前額断および矢状断の連続切片に作製した。前額断切片は、内側中隔核 (MS) から前乳頭体核 (PM) レベルで作製した。矢状断切片は、各日齢とも 2 組の雌雄で、嗅球の全体が含まれるレベルで作製した。作製した連続切片に対して、ER の IHC および、解剖

学的な位置を確定するためのニッスル染色を、それぞれ1枚おきに行った。したがって、ERのIHCを施した標本、およびニッスル染色を施した標本は、それぞれ40 μ mおきの連続切片となる。

抗ER血清(AS408)を一次抗体に用いたIHC、および、ERタンパク免疫前ウサギ血清(AS401)によるコントロール染色は、第2章に記載した方法で行った。

ER-IR含有神経細胞の定量

ER-IR含有神経細胞数の計測は、MPNに関しては、図3-2Bに示したレベルを含む連続3枚のIHC切片で、VMHに関しては、図3-3Bに示したレベルを含む連続3枚のIHC切片をそれぞれ用いて行った。顕微鏡で200倍のレベルで観察し、camera lucidaを用いてER-IRをトレーシングペーパー上に点描し、各個体の各部位につき、それぞれ3枚の点の数を合計し、これを各個体の各部位のER-IR含有神経細胞数とした。個体間の計測領域は、隣接のニッスル染色切片を用いて対応させた。性別間における統計的検定には、Mann-Whitney U-testを用いた。P値は0.05以下を有意差ありとした。

結果

出生当日から生後21日齢を通じて、雌雄ラット脳でER-IRは特定の神経細胞群に分布していた。雌雄間および日齢間でER-IRの基本的な分布パターンに差は認められなかった。一部、ER-IRの出現に性差および日齢差が認められたが、詳細は後述することとし、基本的なER-IRの分布パターンの結果から示す。

出生当日の雌ラット脳を用いて、基本的な新生仔ラット脳内のER-IRの分布パターンを示すと、図3-1のようになる。強い反応を示すER-IRが、MPN、PVa、ARH、VMHvl、PVp、BST、MEApd、COAp、PAの各神経核に存在していた。また、弱い反応性ではあるが特異的なER-IRが、OVLT、LS、SI、MEPO、SFO、LH、SISLに認められた。詳しい出生当日雌ラットにおけるER-IRの分布状態は、図3-2、図3-3、図3-5、図3-6に示した。

また、新生仔ラット脳内ER-IRは、図3-5Cに示したように、細胞核内のみ認められ、細胞質には認められなかった。一方、成体ラットのARHでは、図3-15Dに示すように、細

胞質および神経線維に弱いER-IRを認めた。しかし、出生当日から生後21日齢の新生仔ラット脳の ARHでは(図3-15C)、このような像は全く観察されなかった。

以下に、脳の各部位におけるER-IRの有無と、ER-IRの分布状態を示す。

嗅球・中隔・視束前野

LSi(図3-6A、B)、OVLT、およびSIの前部(図3-1Aの網で示した部位)に、低密度の弱いER-IRが分布していた。一方、副嗅球(AOB)(図3-8)およびIslands of CallejaにER-IRは認められなかった。

視束前野領域では、AMPN(図3-2A)、PVpo(図3-2B)および、MPN(図3-2B、C、D)にER-IRが分布していた。MPN(図3-2B)におけるERの反応性を、図3-5Cに拡大して示した。視束前野領域および視床下部領域におけるER-IRは、概してこのMPNの例に代表されるような反応性を呈していた。また、生後10日齢以降のラット脳では、MPNの中心核(MPNc: Sexually dimorphic nucleus of the preoptic area= SDN-POAに相当する部位)の大きさに、雌雄差が明瞭に認められるようになるが⁽⁹⁸⁾、雌雄ともMPNcには極小数のER-IR、あるいは非常に弱いER-IRしか分布していなかった(図3-9)。

BSTにも、特異的反應を呈するER-IRが分布していた。BSTに分布するER-IRは、図3-2C、Dに示すように、PVpoおよびMPNの背外側部の2方向に向かって連続的な広がりを呈していた。

また、MEPOおよびSFOの周辺部にも、明瞭なER-IRが分布していた(図3-6D、E)。

視床下部領域

視床下部領域では、VMHvl、ARH(図3-3A、B)および、PVp(図3-3C、D)にER-IRが分布していた。また、DMHの腹側部とVMHの背側部の間にも、強いER-IRが散在していた(図3-3B)。VMHvlに分布するER-IRの数を、脳の前後方向で計測すると、図3-4に示すように2峰性の変化を呈していた。このグラフは、VMHvlにおけるER-IRの数の前後軸における変化を、完全な連続切片が得られた個体(出生当日は2個体、生後21日齢は3個体)

について示したものである。出生当日と生後 21 日齢の間に、2 峰性パターンの変化は認められなかった。グラフ中の 2 つのピークを網目で示したが、第 1 ピーク (Position I) は図 3-3 A に、第 2 ピーク (Position II) は図 3-3 B にそれぞれ相当する部位である。VMHvl の最後部、すなわち図 3-3 B に示した部位 (Position I) における ER-IR の出現密度は、脳全体を通じて最も高い部位であった。

他の視床下部領域、例えば、視交叉上核 (SCH)、視索上核 (SO)、視床下部傍室核 (PVH)、視床下部前核 (AHN)、前乳頭体核 (PM)、および内側乳頭体核 (MM) に ER-IR は認められなかった。

扁桃核群

扁桃核群のいくつかの部位にも、出生当日から ER-IR の分布が認められた。最前部に当たる SLSI では、小数の弱い ER-IR が散在していた (図 3-6 F、G)。さらに後部では、MEApd および COAp (Swanson のラット脳アトラス⁽²³⁴⁾の、扁桃核皮質核第 2、3 層に相当する部位) (図 3-5、図 3-7) に多くの ER-IR が分布していた。また、PA (図 3-1 G、H に位置を示す) にも分布していた。しかし、COAa (図 3-1 D、E に位置を示す) や MEApv (図 3-5) に、ER-IR は分布していなかった。

扁桃核群における ER-IR も、視床前野や視床下部における ER-IR と同様に、神経細胞の核内のみ認められた。しかしながら、その反応性は視床前野や視床下部とはやや異なっていた。図 3-5 D に示したように、扁桃核群における ER-IR は、どの細胞においても、視床前野の ER-IR (図 3-5 C) と比べてると、弱く、かすれるような反応を呈していた。

なお、図 3-7 に示したように、扁桃核群における ER-IR の分布パターンも、生後発達に伴う変化は認められなかった。

視床領域

視床領域において、ER-IR は LH (外側手綱核) に認められた (図 3-6 C)。しかし、MH (内側手綱核) をはじめ、他の視床領域に特異的な ER-IR の分布を認めることは出来なかった。

大脳新皮質領域

生後 10 日齢においてのみ、聴覚野周辺に ER-IR の出現を認めた (図 4-1-1 参照)。なお、この領域については、ER-IR の出現時期が、本実験では 10 日齢に限られるなど、他の部位と比べて出現パターンが大きく異なっていたため、別に実験を設けることにした。

したがって、大脳新皮質領域の ER-IR の出現については「第 4 章：4-1」で詳しく述べる。

顔面神経核

出生当日から生後 10 日齢にかけて、顔面神経核に ER-IR が強く出現していた (図 4-2-1 参照)。大脳新皮質と同様、顔面神経核における ER-IR の出現は、他の部位とは様式が異なっているため別に実験を行った。

したがって、顔面神経核における ER-IR の出現については「第 4 章：4-2」で詳しく述べる。

新生仔ラット脳内における ER-IR 出現の性差

ER-IR の反応性は、雌の方が雄よりも強く認められた。特に、この性差は生後 10 日齢以降の MPN や VMHvl で認められた (図 3-10)。図 3-10 の下のグラフに示したように、MPN および VMHvl における ER-IR 細胞数の性差は、生後 21 日齢の VMHvl でのみ有意に達していたが ($P < 0.05$)、概して、雌の方が雄よりも多い傾向を示している。

また、生後 10 日齢および生後 21 日齢において、MPN 後部の背側部から BST の腹側部にかけての部位 (MPN-BST) で、ER-IR の出現に明かな性差を認めた。図 3-11 に camera lucida で描いた ER-IR の分布の変化を、4 枚の連続切片 (40 μm 間隔) で、雌雄別に (雌；E-H、雄；I-L) 示した。基本的な分布域は同じであるが、MPN-BST では、雌に比べ雄の ER-IR の分布量が少なかった。一方、MPN 後部の腹側部では、雌雄で ER-IR の分布数に大きな差は認められなかった。図 3-10 に示した MPN における ER-IR の性差は、MPN-BST における性差の始まる部位で、図 3-10 A (雌) は図 3-11 E (雌の連続切片の始まりの図) に、図 3-10 B (雄) は、図 3-11 I (雄の連続切片の始まりの図) にそれぞれ相当する部位である。

ステロイド処理群の結果

エストロジェン投与、および、出生当日の精巣摘出処置の脳内 ER-IR の出現に及ぼす影響は、図 3-12 に示した。生後 5 日齢の AMPN において、出生当日から 4 日間 EB を投与した雌（図 3-12 C）では、対照群（図 3-12 A）に比べ ER-IR の出現が低くなっていた。一方、出生当日に去勢して 4 日間 Oil 投与した雄（図 3-12 D）では、擬似手術を施して 4 日間 Oil 投与した対照雄（図 3-12 B）に比べて ER-IR の出現が強くなっていた。

また、新生仔期のアンドロジェン投与が脳内 ER-IR の出現に及ぼす影響は、図 3-13 に示した。生後 10 日齢の VMHvl および ARH において、出生当日から 9 日間 TP を投与した雌（図 3-13 B）では、対照群（図 3-13 A）に比べて明かに ER-IR の出現が低かった。一方、出生当日に去勢して 9 日間 Oil 投与した雄（図 3-13 C）では、擬似手術を施して 9 日間 Oil 投与した対照雄（図 3-13 D）に比べて ER-IR の出現が強かった。また、アンドロジェン投与実験群における MPNc (SDN-POA) の大きさの比較は、図 3-14 で示した。出生当日から 9 日間 TP を投与した雌（図 3-14 B）では、対照雌（図 3-14 A）に比べて明かに MPNc は大きかった。一方、出生当日に去勢して 9 日間 Oil 処置した雄（図 3-14 C）では、擬似手術を施して 9 日間 Oil 処置した対照雄（図 3-14 D）に比べて、MPNc の大きさは小さかった。

考察

哺乳類の脳内における ER の発生は、現在までに、ARG（ラット^(31,205,206)、マウス^(74,102,213,214)）や、結合試験（ラット^(17,135,136,184)、マウス⁽⁷⁰⁾）、また、IHC では唯一、有袋類のブラジリアンオポッサム⁽⁶⁶⁾での報告がある。しかしながら、IHC で周生期ラット脳内の ER の発生を検討した報告はない。今回、本実験によって、出生当日から雌雄ラットとも脳内に ER タンパクが出現していることを IHC で明瞭に示すことができた。

ER-IR の新生仔ラット脳内における分布状態は、本研究とは異なる抗 ER 抗体 (H222)⁽⁸²⁾を用いたブラジリアンオポッサム⁽⁶⁶⁾の結果、および、ARG によって生後 2 日齢（本研究の算定方法では生後 3 日齢）マウスのエストロジェン取込部位を詳細に調べた唯一の報告⁽²¹⁴⁾の結果とほぼ同じであった。また、成体げっ歯類における ARG での報告^(113,181,229,231)、IHC^(89,110,123)あ

るいは、*in situ* hybridization 組織化学による報告⁽²¹⁶⁾ともほぼ同様であった。したがって、出生当日の雌雄ラット脳において、ERタンパクは成体ラットやマウスとほぼ同様の領域に分布していることが示された。

ARGによる生後2日齢（本研究の算定方法では生後3日齢）マウス⁽²¹⁴⁾におけるエストロジェン取込部位と、新生仔ラット脳のERタンパクの分布は以下の数箇所では異なっている。すなわち、新生仔マウスでは、前嗅核や Island of Calleja でエストロジェンの取込が認められているが、本研究においては、新生仔ラット脳の相当する部位にER-IRは認められなかった。また、マウスの視床下部領域では、Inter-anteromedial thalamic nucleus (IMA)、PVH、PMに強いエストロジェンの取込が認められているが、ラットではこれらに相当する部位に、ER-IRは全く認められなかった。しかし、本研究とは異なった抗ER抗体(H222)による検討ではあるが、IHCによる新生仔ブラジリアンオポッサム⁽⁶⁶⁾の結果と、本研究における結果には相異点は認められていない。したがって、新生仔マウス脳におけるエストロジェン取込部位と、新生仔ラット脳のER-IRの分布に差が認められるのは、用いた手法の違いによるものと思われる。例えば、本研究において新生仔脳のERタンパク陽性反応は、図3-5Cや図3-15Cに示したように、細胞核にのみ認められている。生後10日から60日のブラジリアンオポッサムにおいても、ER陽性反応は細胞核にのみ存在すると報告されている⁽⁶⁶⁾。これに対して、ARGによるエストロジェンの取り込みを示す銀粒子反応は、必ずしも細胞核内にのみ認められるわけではなく、細胞質や細胞膜あるいは神経線維の部位にも認められる場合がある。したがって、ARGによるエストロジェン結合部位の結果は、細胞核内のERのみならずその他のエストロジェン結合部位も含んでいると思われる。手法による反応性の違いが、ARGとIHCの結果に違いが見られる原因になっていると思われる。

ARG（ラット^(205,206)、マウス^(213,214,229)）でも示されているように、本研究においても新生仔の脳新皮質領域に明らかなERの存在を認めた。しかし、ER-IRの分布部位は、聴覚野を中心とした領域に限定されており、さらに本実験では生後10日齢でのみ出現が確認された。したがって、ER-IRの出現部位および出現時期に関しては、さらに詳しい解析が必要と思われるため前述したように、「第4章：4-1」にて詳細に検討する。また、顔面神経核にもER-IRの出現を認めたが、これまで顔面神経核にERが存在していることを示した報告はない。さらに、生後

21日齢および成体ラットでは同神経核にER-IRは認められていないことから、大脳新皮質と同様、ER出現は一過性のものと考えられる。したがって、顔面神経核に関してもさらに詳しい解析が必要と思われたため、前述したように「第4章：4-2」で詳細に検討する。

新生仔ラット脳におけるER-IRの性差

現在まで、哺乳類の新生仔脳において、エストロジェンの受容体に対する結合活性、およびERタンパクの出現性に性差があるとの報告はない。しかし、本研究では、新生仔ラット脳のいくつかの領域に、ER-IRの出現に性差があることを認めた。

基本的なER-IRの分布に性差は認められないが、強い反応性を示すER-IRの数は、雌のほうが雄よりも多いことが認められた。図3-10に示したように、MPNやVMHでは全体として、雌のほうが雄よりも強い反応性を示している。これらの領域においてER-IR数の性差が有意に達したのは、生後21日齢のVMHのみに留まっているが、いずれの日齢においても雌のほうが雄よりも多い傾向が認められている。この性差はMPN-BST領域でも顕著に認められ、図3-11に連続切片で示したように、雌にくらべ雄では強く染まるERの数が明かに少なかった。

雌脳におけるER-IRの出現性が雄脳に比べて優勢という事実は、脳の性分化に対するアンドロジェンの芳香化（Aromatization）の重要性を強く支持するものである。すなわち、雄の場合は周生期から精巣はアンドロジェンを分泌するため、血中アンドロジェン値は雌よりも有意に高いことが知られている。このアンドロジェンが、脳内のアロマターゼによってエストロジェンに転換され、これによってER-IRの出現性が抑制されていると考えられるからである。エストロジェンが成体脳のERの発現を抑制することは、遺伝子レベル^(117,211,221)、IHCによるタンパクレベル^(25,109,268)、さらに、結合試験によるER活性の測定⁽¹²⁷⁾によって報告されている。本研究でも、図3-12および図3-13に示すように、新生仔期のエストロジェンおよびアンドロジェン投与によってER-IRが低下し、また、出生当日に精巣摘出することで雄のER-IRが上昇することを示した。これらの結果は、新生仔期の脳内ER-IRも血中アンドロジェン由来のエストロジェンによって出現が抑制されることを示している。新生仔ラットでは、血中エストラジオール値に雌雄差は殆ど認められないが⁽⁶⁰⁾、血中アンドロジェン値は、雄のほうが雌よりも有意に

高いことが報告されている^(60,116,256)。さらに、ラット脳におけるアロマターゼ活性は、周生期に高いことが報告されている^(68,134,152)。これらの結果から、周生期の雄ラットでは、アロマターゼの作用によって雌よりも大量のエストロジェンが脳に作用していると考えられる。したがって、大量のエストロジェン作用を受けた後と考えられる生後10日齢以降の雄脳で、ER-IRの抑制が顕著に認められる結果となっているのであろう。Shinoda et al.⁽²⁰⁷⁾によると、IHCによるアロマターゼ陽性細胞は、MPNの外側辺縁部からBSTにかけて分布していると報告されている。この領域は、本実験でER-IRの出現に性差が認められた、MPN-BSTに相当する部位である。したがって、この領域において大量に局所産生されるエストロジェンが雄のER-IRを低下させ、これがER-IRの反応性に性差を生じる原因になっていると考えられる。そして、生後10日齢以降でこの性差が顕著になる事実は、それ以前、すなわち脳の性分化の臨界期に相当する時期に、血中アンドロジェンから転換されたエストロジェン作用が強く及ぼされていることを示唆している。

ER-IRの細胞核内分布

本研究において、新生仔脳のER-IRは核内にのみ認められた(図3-5C)。この結果は、IHCによる新生仔ブラジリアンオポッサム⁽⁶⁶⁾における報告と一致している。これに対して、図3-15Dに示すように、成体ラットのARHでは細胞質にもER-IRの出現を認めた。抗ER抗体として本研究とは別の抗体(H222)によるIHCでも、成体ブラジリアンオポッサム⁽⁶⁷⁾、成体モルモット⁽²⁶⁾、成体ラット⁽²⁴⁾、成体スunks⁽⁵⁰⁾、成体ヒツジ⁽⁹⁰⁾、成体フェレット⁽²³⁹⁾において、細胞質および神経線維におけるERの免疫陽性反応の出現が報告されている。さらに、この中でもTobet et al.⁽²³⁹⁾は成体フェレットで、ERの免疫陽性反応を示す神経線維は、雄の方が雌よりも明かに多いと報告している。本研究の結果を含め、注目すべき点として、細胞核以外にER免疫陽性反応が認められるのは、全て成体動物であるという点である。すなわち、細胞核以外におけるERタンパクの出現は、成体動物にみられる現象で発育期の動物には認められない現象であると考えられる。この考えは、ブラジリアンオポッサムにおいて、同じ研究者による報告であるにもかかわらず、新生仔の脳では核以外にERの免疫陽性反応は認められていないとしているのに対し⁽⁶⁶⁾、成体の脳では細胞質にもERの免疫陽性反応を認めると報告している⁽⁶⁷⁾こと

からも支持されると思われる。

新生仔の脳ではERは核内にのみ存在し、エストロゲン作用に対して、主に organizational な効果発現に関与するのに対し、成体脳ではERは核外にも存在し、遺伝子を介さない activational な効果発現を可能にしているのかもしれない。

ER-IRの分布部位と性的二型

本研究でER-IRが分布していた、AMPN、MPO (MPNを含む領域)、BST、VMHvl、ARH、あるいはMEApdは、GTH分泌や生殖行動発現の制御を司っている部位と考えられている。また、これらの部位は、多くの研究者によって形態学的な性的二型が報告されている部位である。例えば、AMPNはBleifer et al.⁽²⁷⁾、MPOはGorski et al.⁽⁷⁸⁾、BSTはDelAblil et al.^(48, 49, 86)、VMHvlとARHはMatsumoto and Arai^(141, 143, 144)、MEApdはNishizuka and Arai⁽¹⁶³⁻¹⁶⁶⁾ さらに Mizukami et al.⁽¹⁵⁵⁾によってそれぞれ報告されている。さらに、これら成体脳に認められる形態学的な性的二型は、周生期のアンドロゲンおよびエストロゲンの影響を大きく受けていることが示されている^(28, 57-59, 78, 79, 86, 88, 97, 141-144)。本実験においても、Gorski et al.⁽⁷⁸⁾の方法にしたがって、アンドロゲン処置や出生当日の精巣摘出がMPNc (SDN-POA)の大きさに及ぼす影響を検討したが、図3-14に示すように、彼らと全く同様の結果を得た。

以上の結果は、間接的ではあるが、血中アンドロゲンから脳内アロマターズによって転換されたエストロゲンのERを介した作用が、ラット脳における性的二型の発現に関与していることを強く示唆するものである。

副嗅球(AOB)もその大きさに性的二型が認められ、周生期の性ステロイドホルモン環境によって、その雌雄関係が逆転することが報告されている部位である^(200, 201)。しかし、図3-8に示すように、実験に用いた全ての個体で、AOBにER-IRを認めることは出来なかった。

したがって、視束前野、視床下部、扁桃体の性的二型の発現に対する周生期アンドロゲン由来のエストロゲン作用には、これらの部位に対する直接的な作用があると考えられる。しかし、AOBの性的二型の誘導に関する作用は、他の領域に対する性ステロイドホルモン作用を介した間接的な効果である可能性が考えられる。

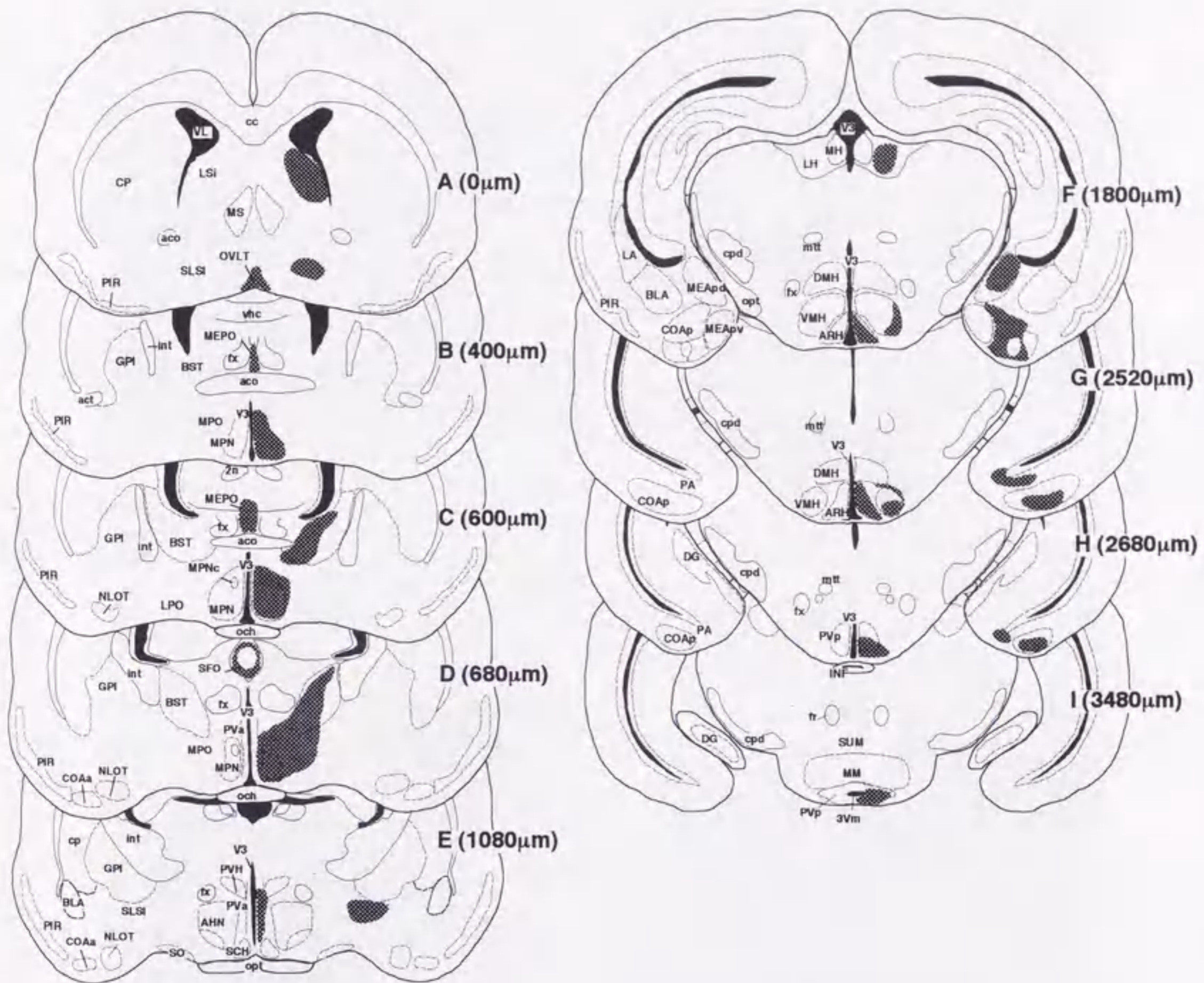


図3-1. 出生当日の雌ラット中脳におけるER-IRの分布

図中の網目はER-IRの分布領域を示す。切片A (= 0 μm) は第3脳室の吻端に相当する部位。図中右端の括弧内の数字は、切片Aから見た尾側方向への距離を示す。図中の略語は「略語一覧」を参照。

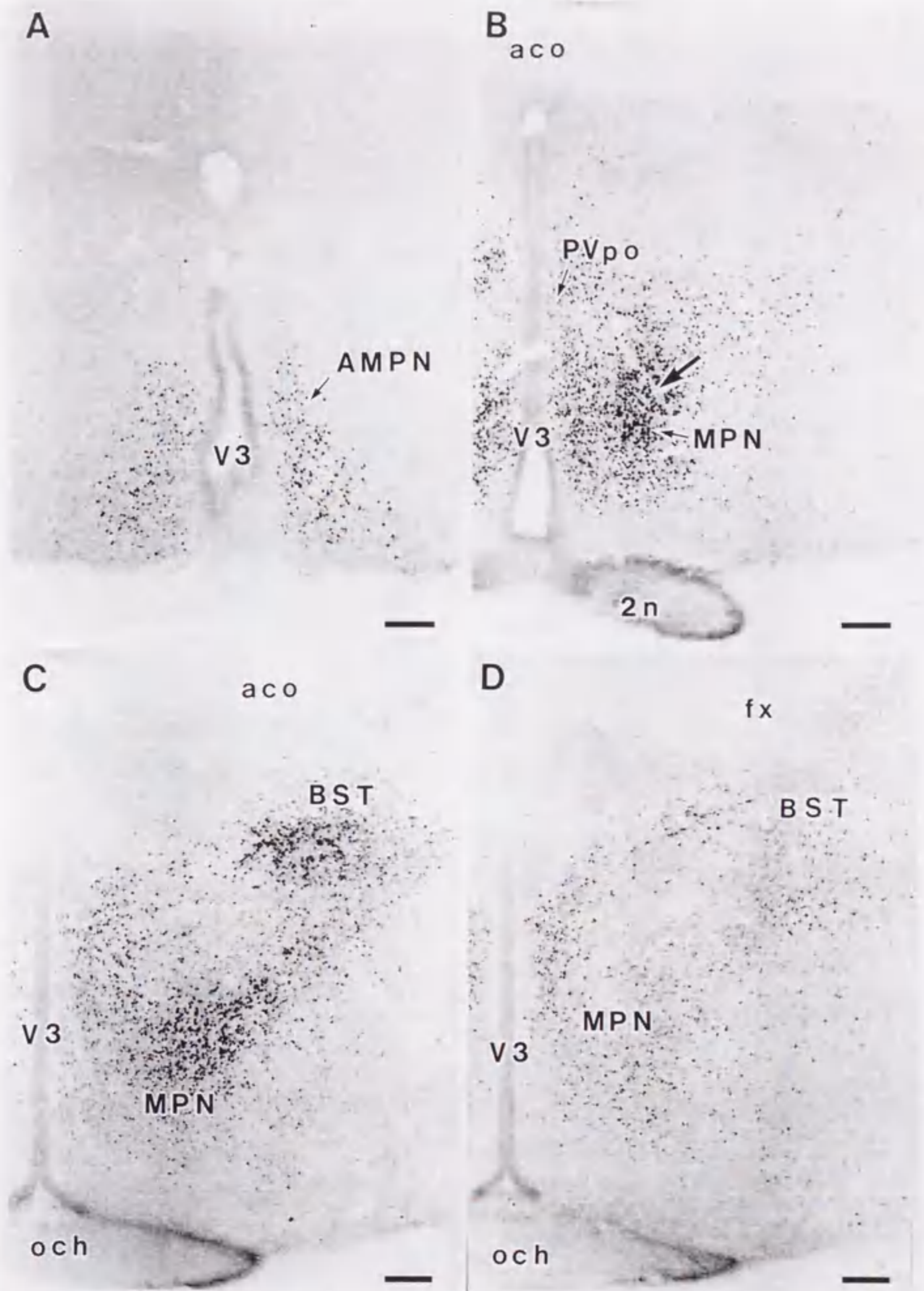


図3-2. 出生当日の雌ラットの視束前野部位におけるER-I Rの分布

A: 前内側視束前核 (AMPN) におけるER-I Rの分布。B: Aから160 μ m尾側。脳室周囲核の視束前野部 (PVpo) および内側視束前核 (MPN) におけるER-I Rの分布。

C: Aから320 μ m尾側。MPNおよび分界状床核 (BST) の腹側部におけるER-I Rの分布。D: Aから400 μ m尾側。MPNの後部および分界状床核 (BST) の腹側部領域におけるER-I Rの分布。本研究では、このMPNの背側部からBSTの腹側部を「MPN-BST」と呼ぶ。他の略語は「略語一覧」を参照。Scale bar in A-D = 100 μ m

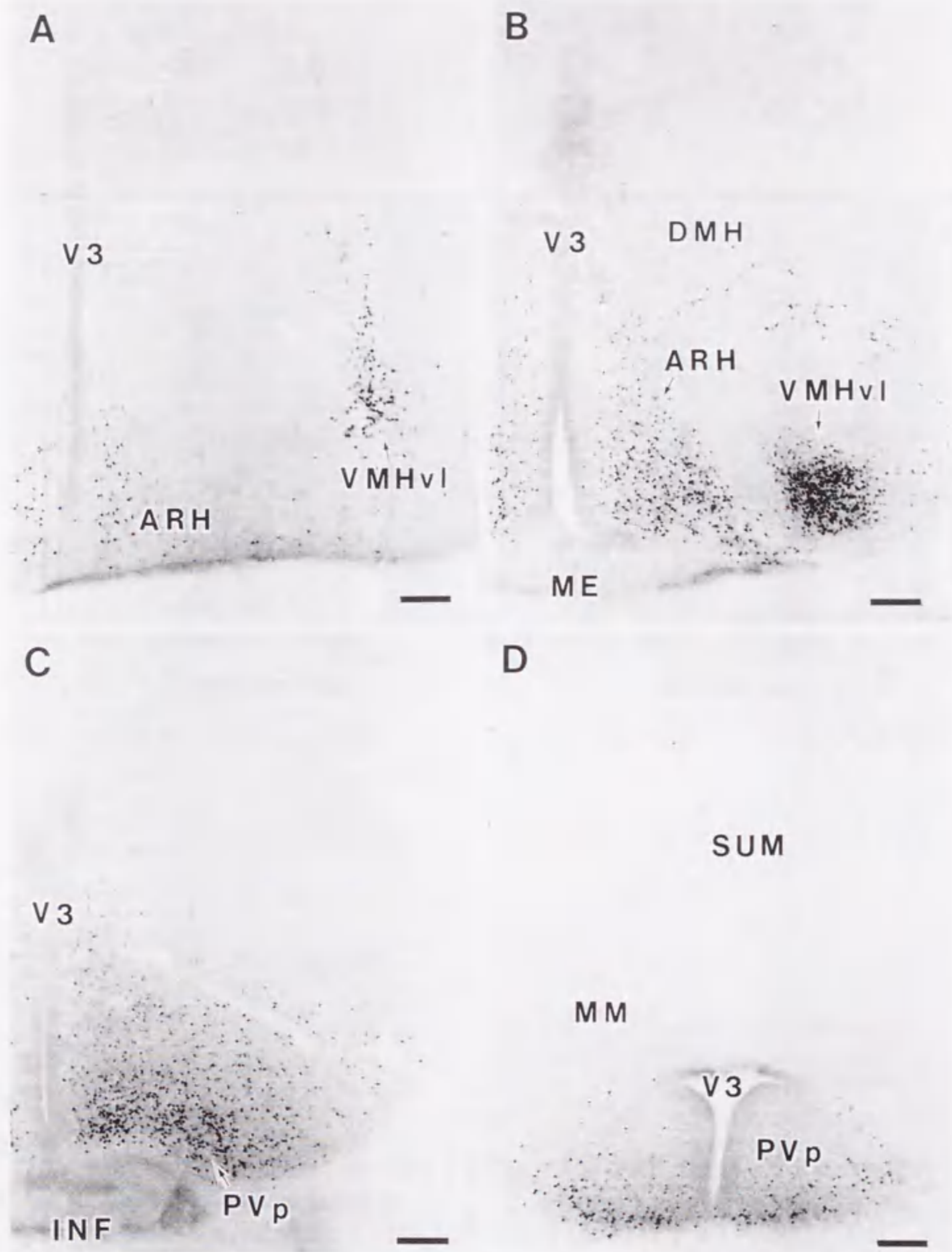


図3-3. 出生当日の雌ラットの視床下部の後部領域におけるER-IRの分布
 A: 視床下部腹内側核の腹外側部 (VMHvl) の前半部および弓状核 (ARH) におけるER-IRの分布。B: Aから640 μ m尾側。視床下部腹内側核の腹外側部 (VMHvl) の最後部、および弓状核 (ARH) におけるER-IRの分布。図3-1の切片Gに相当する部位。C: Aから840 μ m尾側。脳室周囲核の後部 (PVp) におけるER-IRの分布。D: Aから1200 μ m尾側。PVpにおけるER-IRの分布。他の略語は「略語一覧」を参照。Scale bar in A-D = 100 μ m

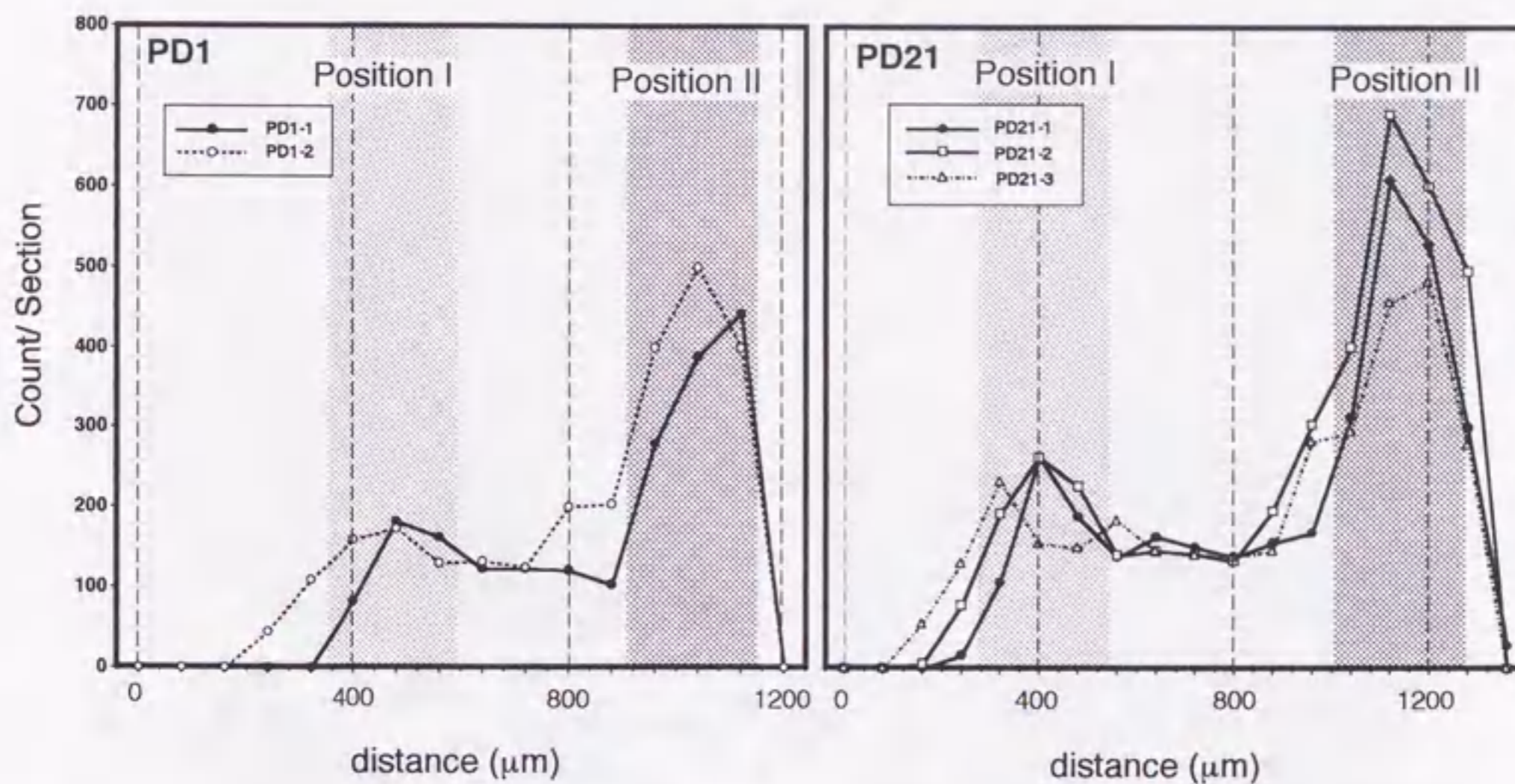


図3-4. 視床下部腹内側核の腹外側部 (VMHv1) におけるER-IR含有神経細胞数の前後軸における変化

完全な連続標本が得られた雌ラット (PD1=出生当日: 2例、PD21=生後21日齢: 3例) について示した。いずれの個体も、左右何れか一方側におけるER-IR陽性細胞数の変化。2ヶ所の網目の領域のうち Position-I は、図3-3・Aに相当する位置を、Position-II は、図3-3・Bに相当する位置をそれぞれ示す。横軸の数字は、組織学的に視床下部腹内側核が確認できた最初の切片からの距離を示す。

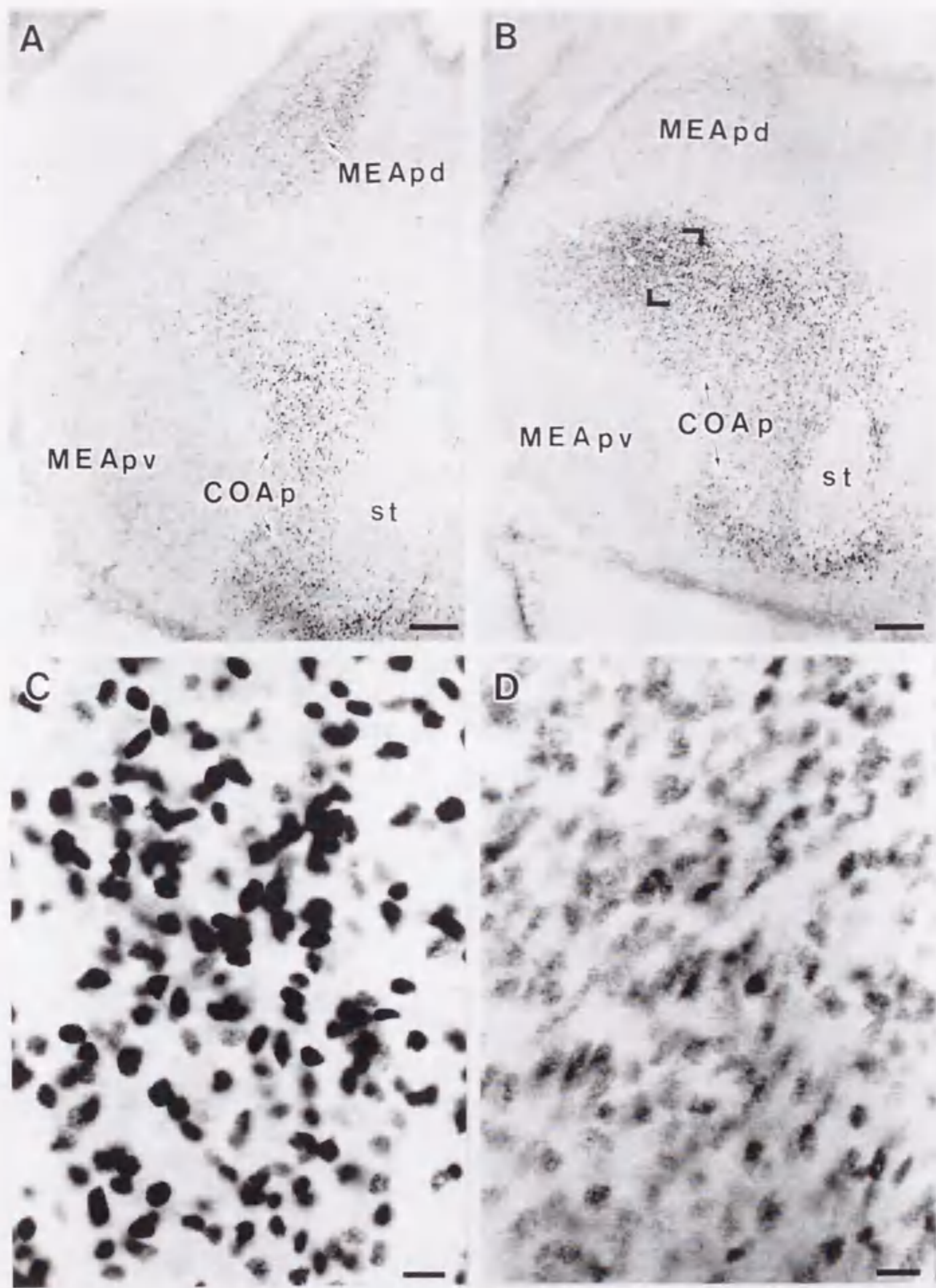


図3-5. 出生当日の雌ラットの扁桃体におけるER-I Rの分布

A: 扁桃体内側核の後背側部 (MEApd) および扁桃体皮質核の後部 (COAp) におけるER-I Rの分布。B: Aから160 μ m尾側。同じく、MEApdとCOApにおけるER-I Rの出現。A、Bともに、扁桃体内側核の後腹側部 (MEApv) にはER-I Rが出現していない。COApはSwanson (1992) のアトラスにおけるCOAp1の第2、3層を含む部位に相当。C: 図3-2・BにおけるMPN領域 (大きい矢印) のER-I Rの拡大写真。D: Bの括弧で示した部位の拡大写真。ER-I Rは核内にのみ出現している。また、扁桃体におけるER-I Rは、MPNに比べて弱い反応を示している。他の略語は「略語一覧」を参照。Scale bar in A and B = 100 μ m, C and D = 10 μ m.

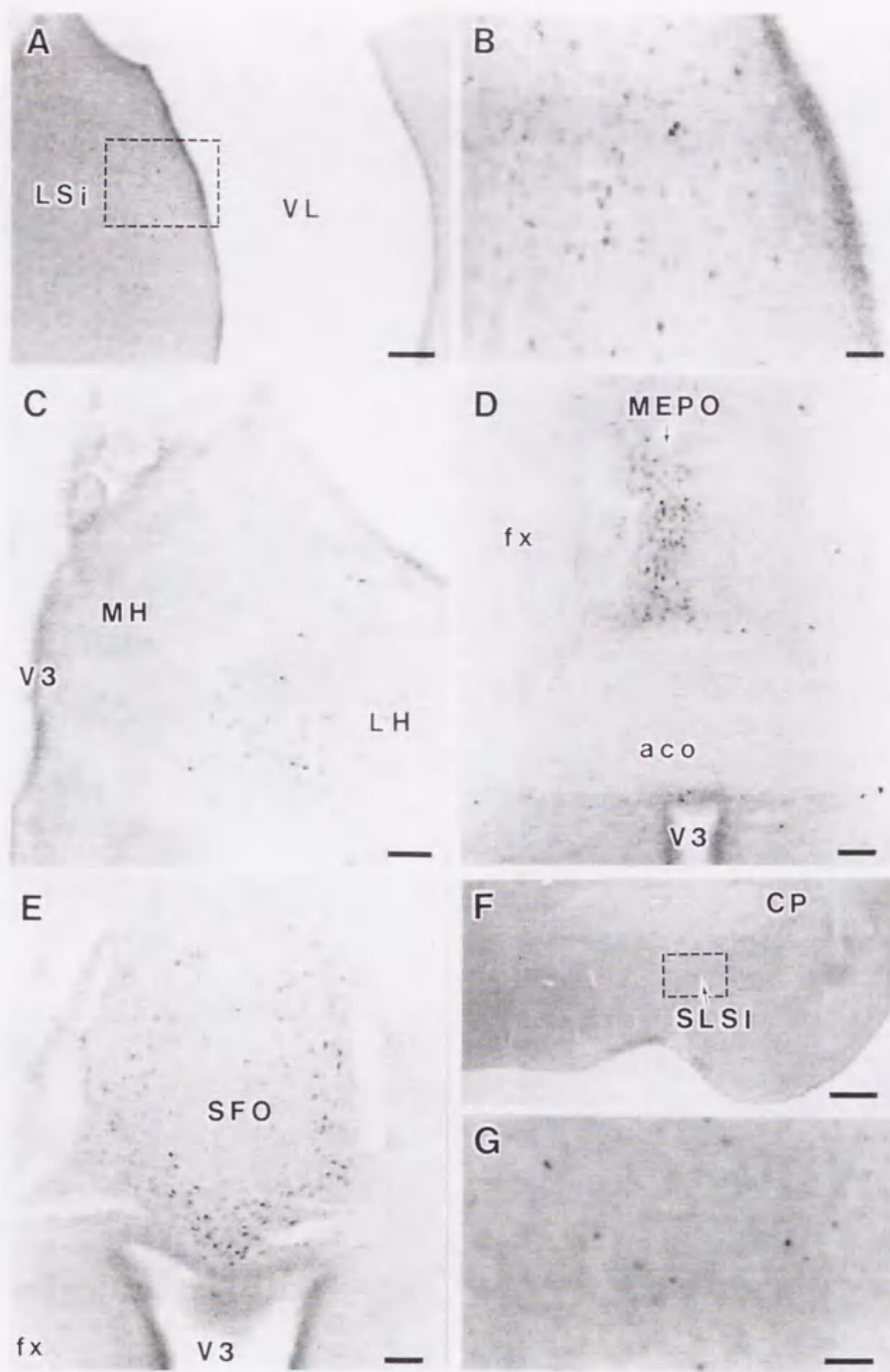


図3-6. 出生当日の雌ラットにおけるER-IRの分布

AとB: 外側中隔核の中間部 (LSi) におけるER-IR。BはAの点線で囲った部位の拡大。
 C: 外側手綱核 (LH) におけるER-IR。内側手綱核 (MH) にはER-IRは出現していない。
 D: 正中視束前野 (MEPO) におけるER-IR。E: 脳弓下器官 (SFO) におけるER-IR。
 FとG: レンズ核下無名質 (SLSI) におけるER-IRで、図3-1の切片Eに相当する位置。GはFの点線で囲った部位の拡大。他の略語は「略語一覧」を参照。

Scale bars: A=100 μ m, B=25 μ m, C, D and E=50 μ m. F=400 μ m and G=50 μ m

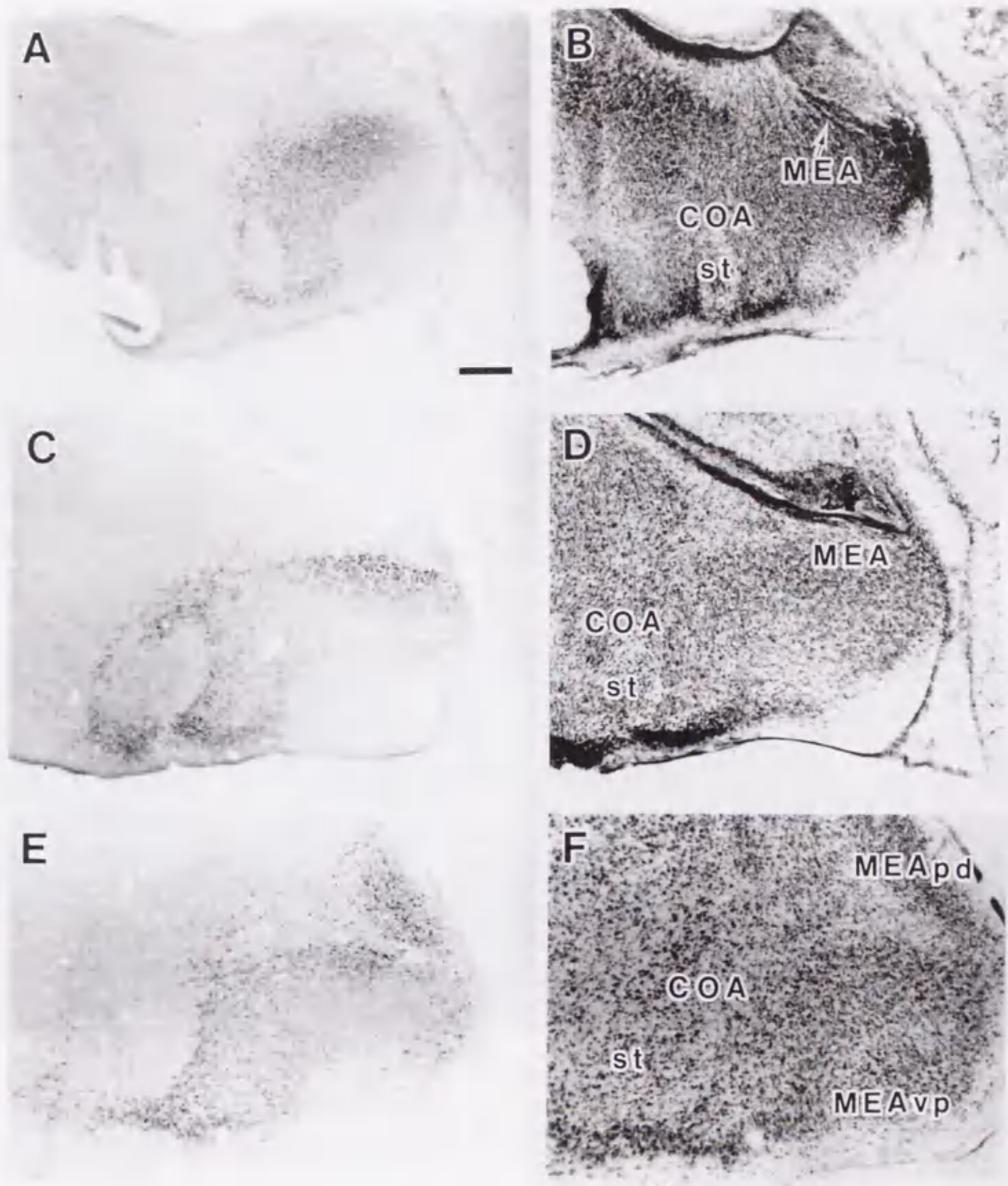


図3-7. 新生仔ラットの扁桃体におけるER-I Rの出現

左カラム (A、C、E) は、ERの免疫組織化学染色。右カラム (B、D、F) は、ニッスル染色したその隣接切片。扁桃体の内側核 (COA) におけるER-I Rの出現性は、出生当日 (A)、生後10日齢 (C)、生後21日齢 (E) で変化は見られない。略語は「略語一覧」を参照。Scale bar = 200 μ m.

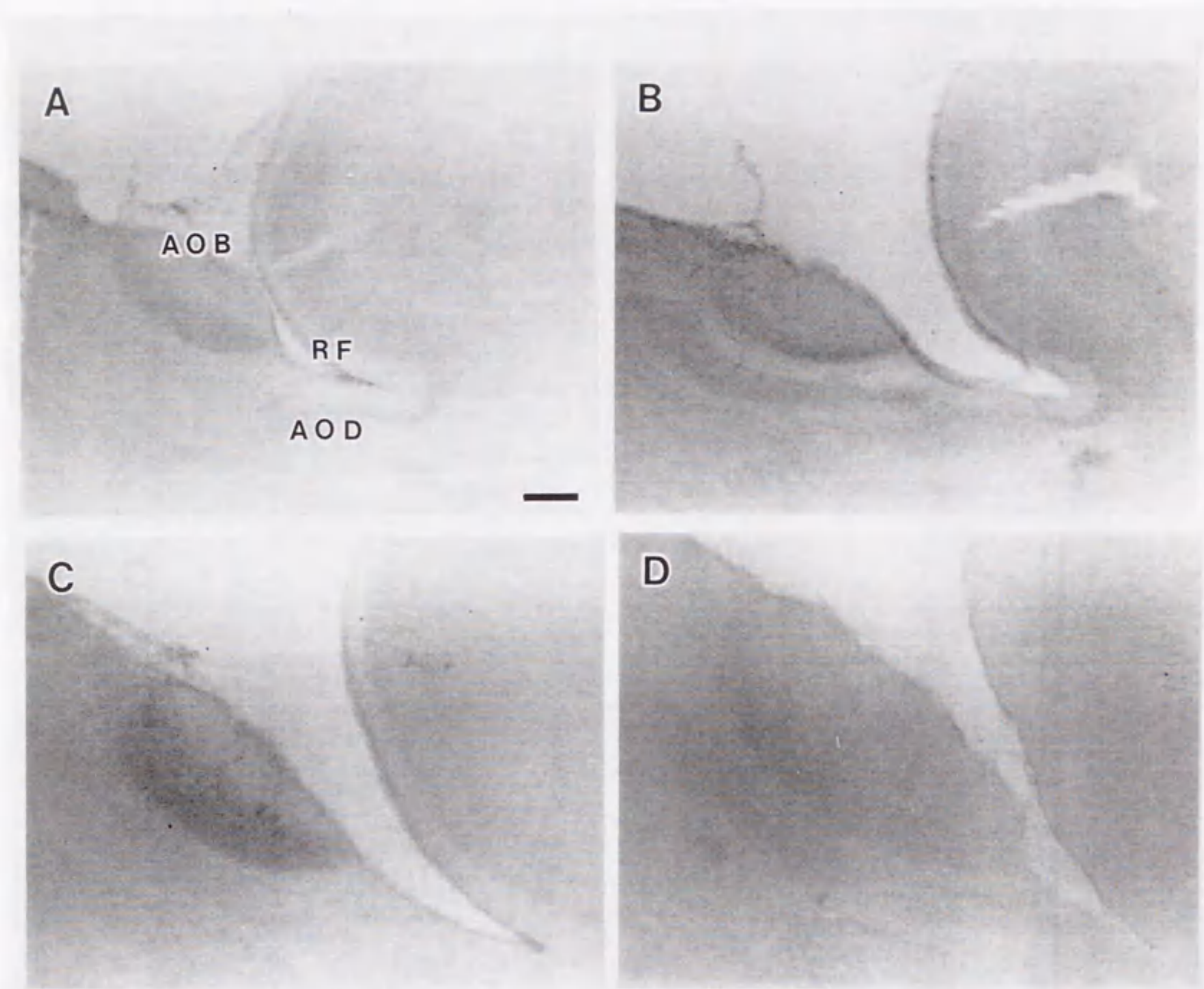


図3-8. 新生仔ラットの副嗅球におけるER-IRの非出現

出生当日 (A)、生後5日齢 (B)、生後10日齢 (C) および生後21日齢 (D) の雄ラットにおける副嗅球。いずれの日令でも副嗅球にER-IRは出現していない。

AOB: 副嗅球、RF: 鼻溝、AOD: 前嗅核。Scale bar = 200 μ m.

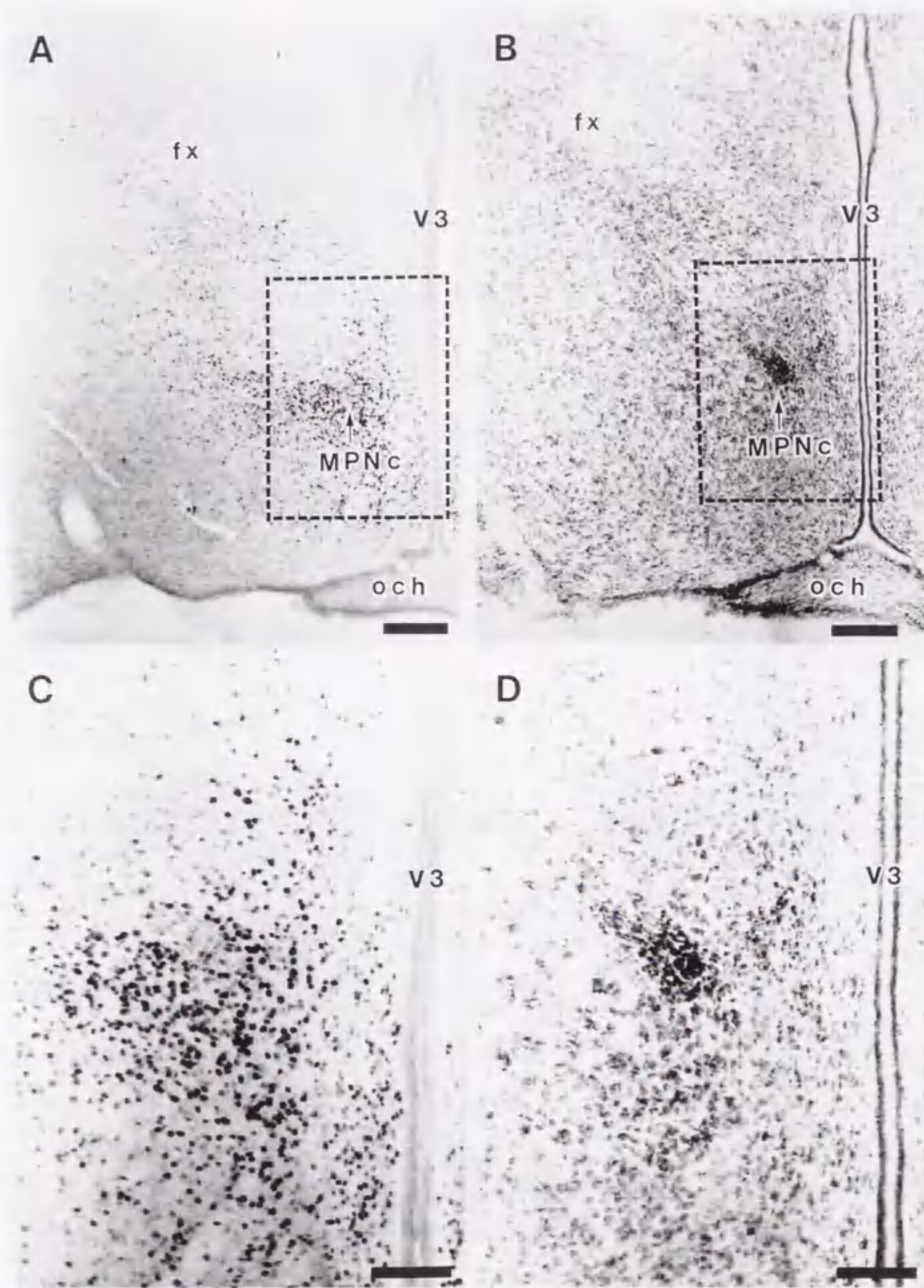


図3-9. 内側視束前核中心部 (MPNc) をふくむ位置におけるER-IRの分布
 新生仔ラットのMPNcにおけるER-IRの分布を生後10日齢の雌で示した。MPNcにはごく薄い反応しか認められない。濃い特異的なER-IRは、MPNcを避けるように分布している。AはERの免疫組織化学染色を行った標本。BはAの隣接切片で、ニッスル染色した切片標本。C、DはそれぞれA、Bの点線で囲んだ部位の拡大。他の略語は「略語一覧」を参照。

Scale bars: A and B = 20 μ m, C and D = 100 μ m

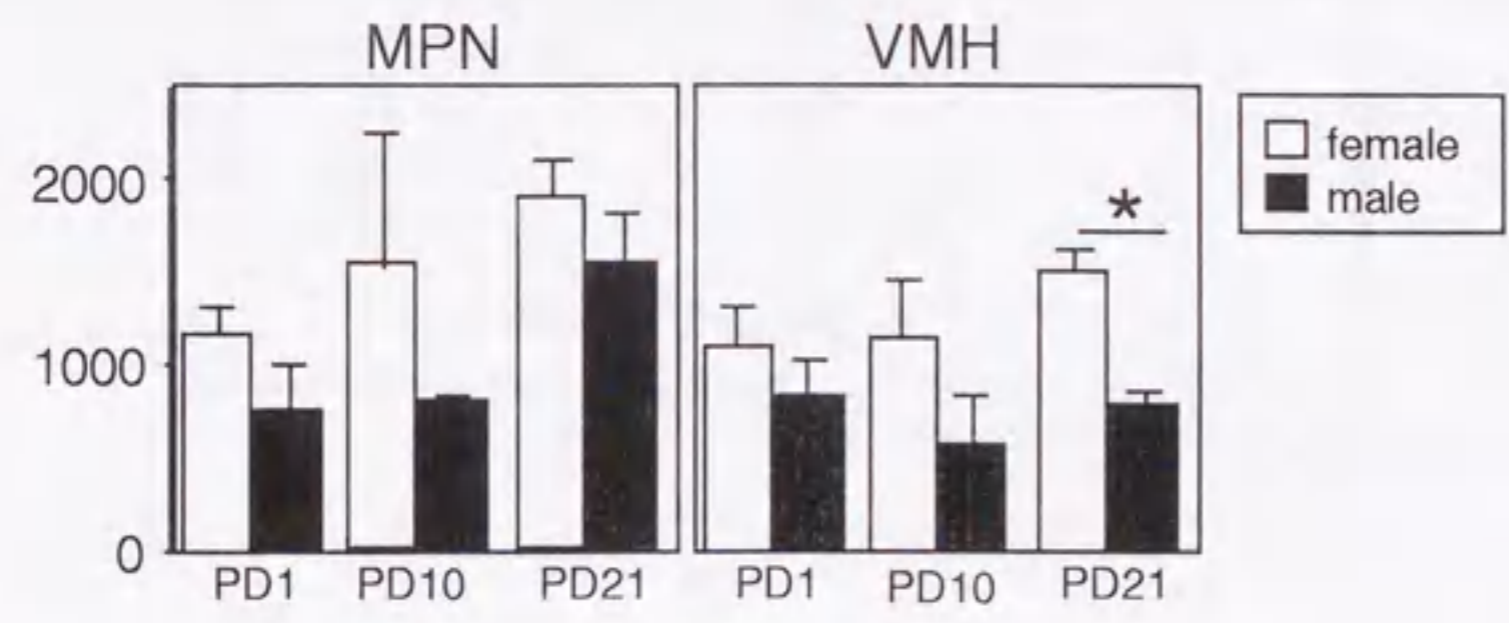
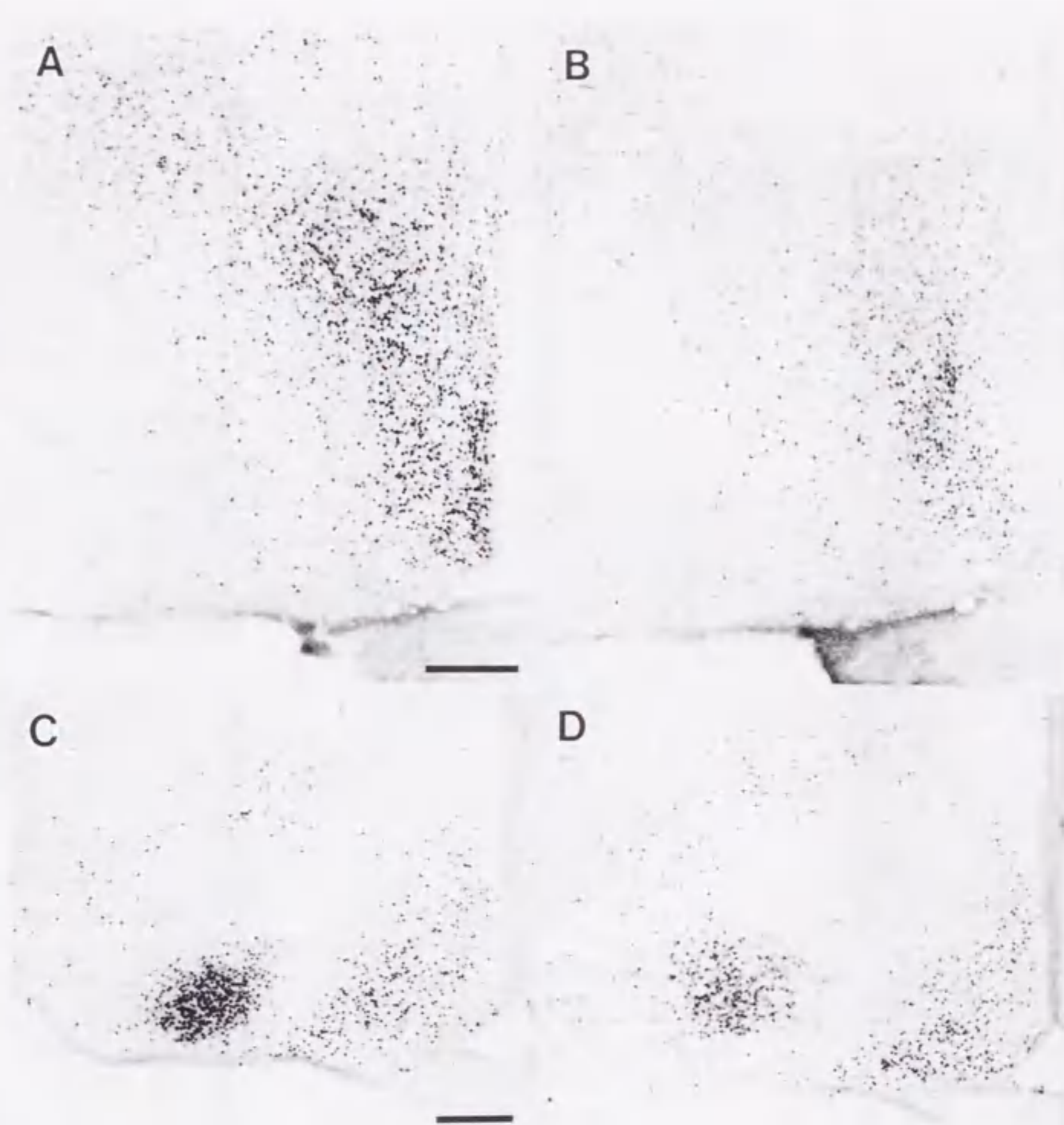


図3-10. 新生仔ラットにおけるER-I Rの性差

生後10日齢ラットにおけるER-I Rの雌雄差を、内側視束前核(MPN) (AとB) および視床下部腹内側核腹外側部(VMHv1) (CとD) の最後部で示した。AとCが雌、BとDが雄。下のグラフは、雌雄におけるこれらの部位のER-I Rの数(縦軸)を各日令(横軸)で比較したもの。MPNは図3-2のBを中心に含む連続3切片における合計。VMHv1は図3-3のBを中心に含む連続3切片における合計。Vertical bars indicate S.E.M.

*は、統計的に性差が有意であった組 (P<0.05) Scale bars: A and C =100μm.

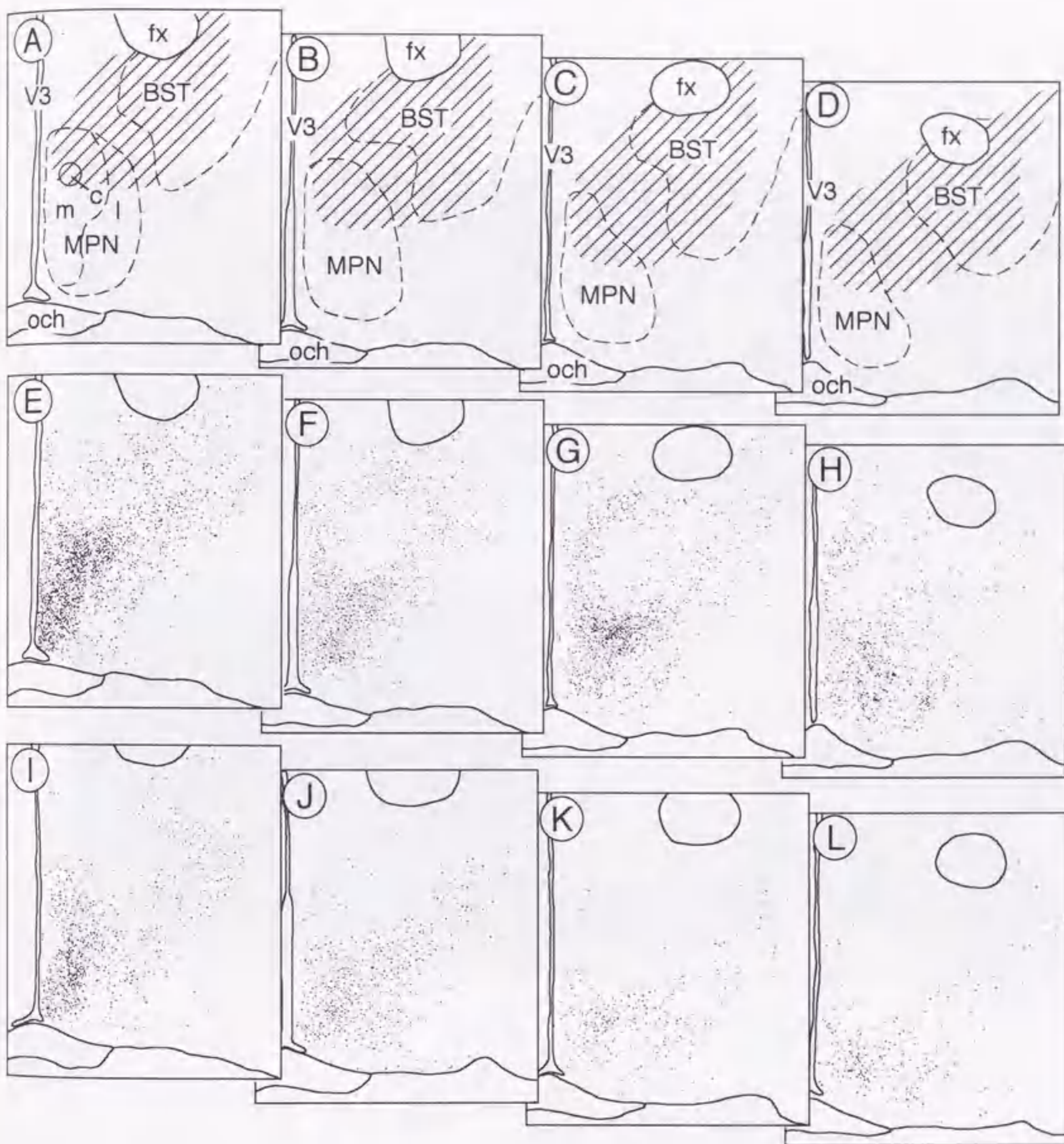


図3-11. 生後10日齢新生仔ラットのMPN-BST (内側視束前核後部の背側部から、分界状床核の腹側部にかけての部位) おけるER-IRの性差

Camera lucidaを用いて描いた、前後軸4枚の連続切片(40 μ m間隔)で示す。左側が頭側で右側が尾側。AからDは神経核の位置を示す。また、斜線部位はMPN-BST領域を示す。EからHの図が雌。IからLの図が雄。MPNのc、l、mはそれぞれMPNの中心部、外側部、内側部を示す。その他の略語は「略語一覧」を参照

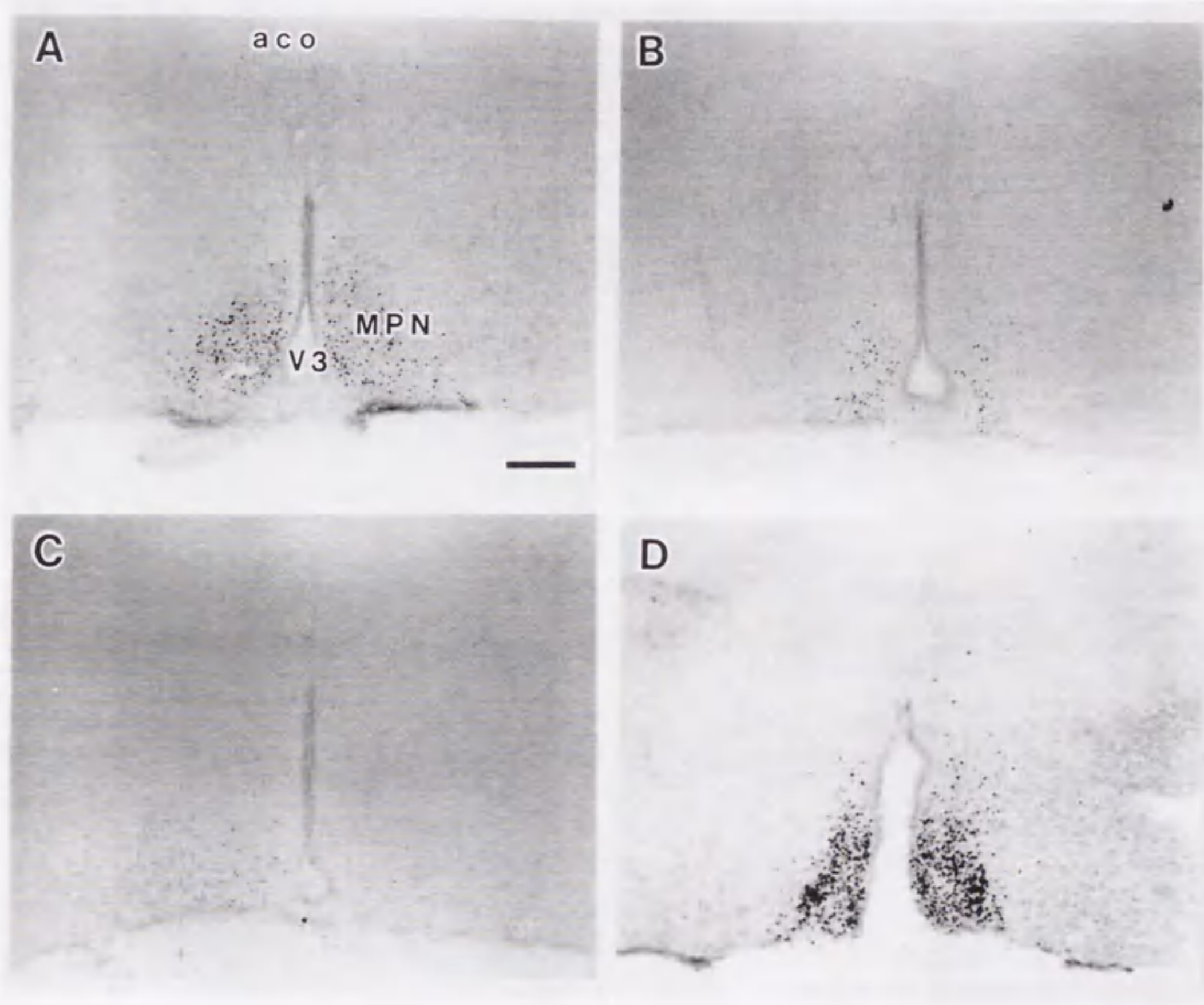


図3-12. 出生当日の精巣摘出とエストロジェン投与による新生仔脳内ER-IR出現への影響

A: 雌の対照群 (O i l の4日間投与) で、生後5日齢の雌。B: 雄の対照群 (出生当日に擬似手術+O i l の4日間投与) で、生後5日齢の雄。C: エストロジェン投与群 (EBの4日間投与) 生後5日齢の雌。D: 精巣摘出群 (出生当日に精巣摘出+O i l の4日間投与) 生後5日齢の雄。雌 (A) は雄 (B) よりも強い反応を示すERが多いが、雌にエストロジェンを投与すると (C) ERの反応は低下する。また、雄も去勢すれば (D) 強い反応を示すERの数が増える。略語は「略語一覧」を参照。Scale bar =50 μ m

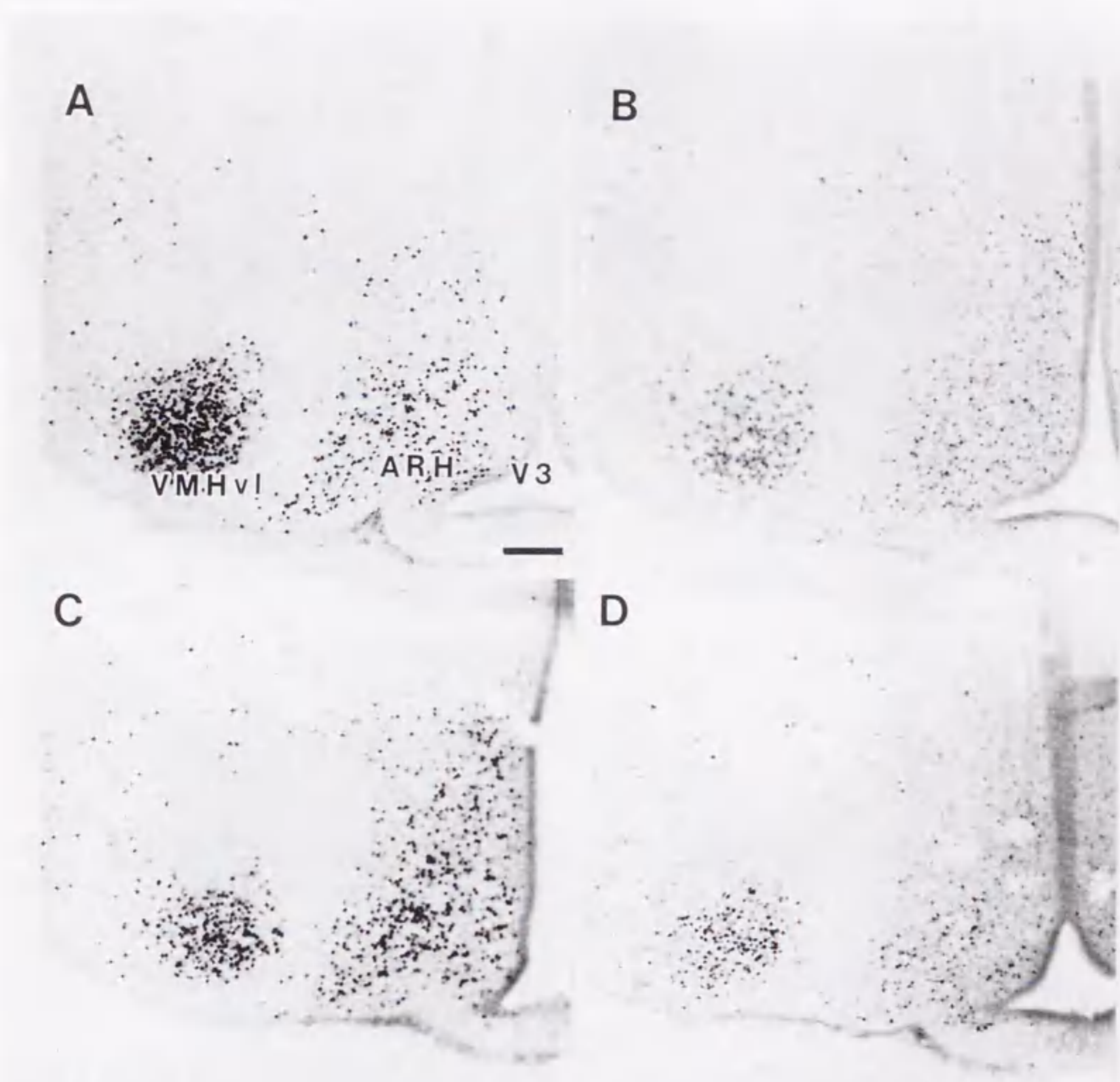


図3-13. 出生当日の精巣摘出とアンドロジェン投与による新生仔脳内ER-IR出現への影響。

A: 雌の対照群 (O i lの9日間投与) で、生後10日齢の雌。B: アンドロジェン投与群 (TPの9日間投与) で、生後10日齢の雌。C: 精巣摘出群 (出生当日に精巣摘出+O i lの9日間投与) で、生後10日齢の雄。D: 雄の対照群 (出生当日に擬似手術+O i lの9日間投与) で、生後10日齢の雄。雌 (A) は雄 (D) よりも強い反応を示すERが多いが、雌にアンドロジェンを投与すると (B) ERの反応は低下する。また、雄を去勢すれば (C) 強い反応を示すERが増える。略語は「略語一覧」を参照。Scale bar =100 μ m

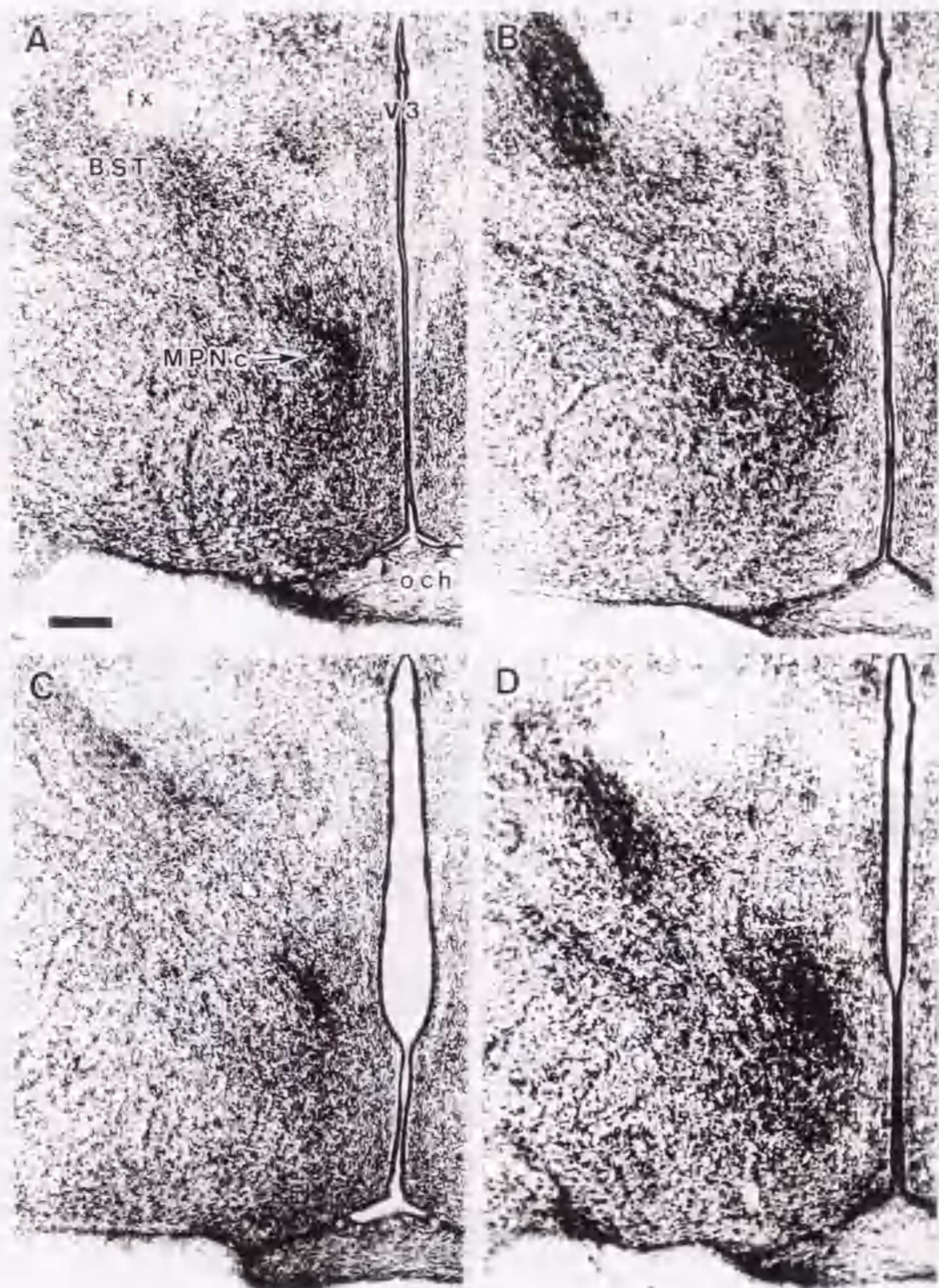


図3-14. 出生当日の精巣摘出とアンドロジェン投与によるMPNc (SDN-POA) への影響

A: 雌の対照群 (O i l の9日間投与) で、生後10日齢の雌。B: アンドロジェン投与群 (TPの9日間投与) 生後10日齢の雌。C: 精巣摘出群 (出生当日に精巣摘出+O i l の9日間投与) 生後10日齢の雄。D: 雄の対照群 (出生当日に擬似手術+O i l の9日間投与) で、生後10日齢の雄。Goskiらの報告 (78) のように雄 (D) のMPNcは雌 (A) よりも大きい。雌にアンドロジェンを投与すると (B) 雄のように大きくなる。また、雄を去勢すれば (C) 雌のように小さくなる。略語は「略語一覧」を参照。Scale bar = 200 μ m.

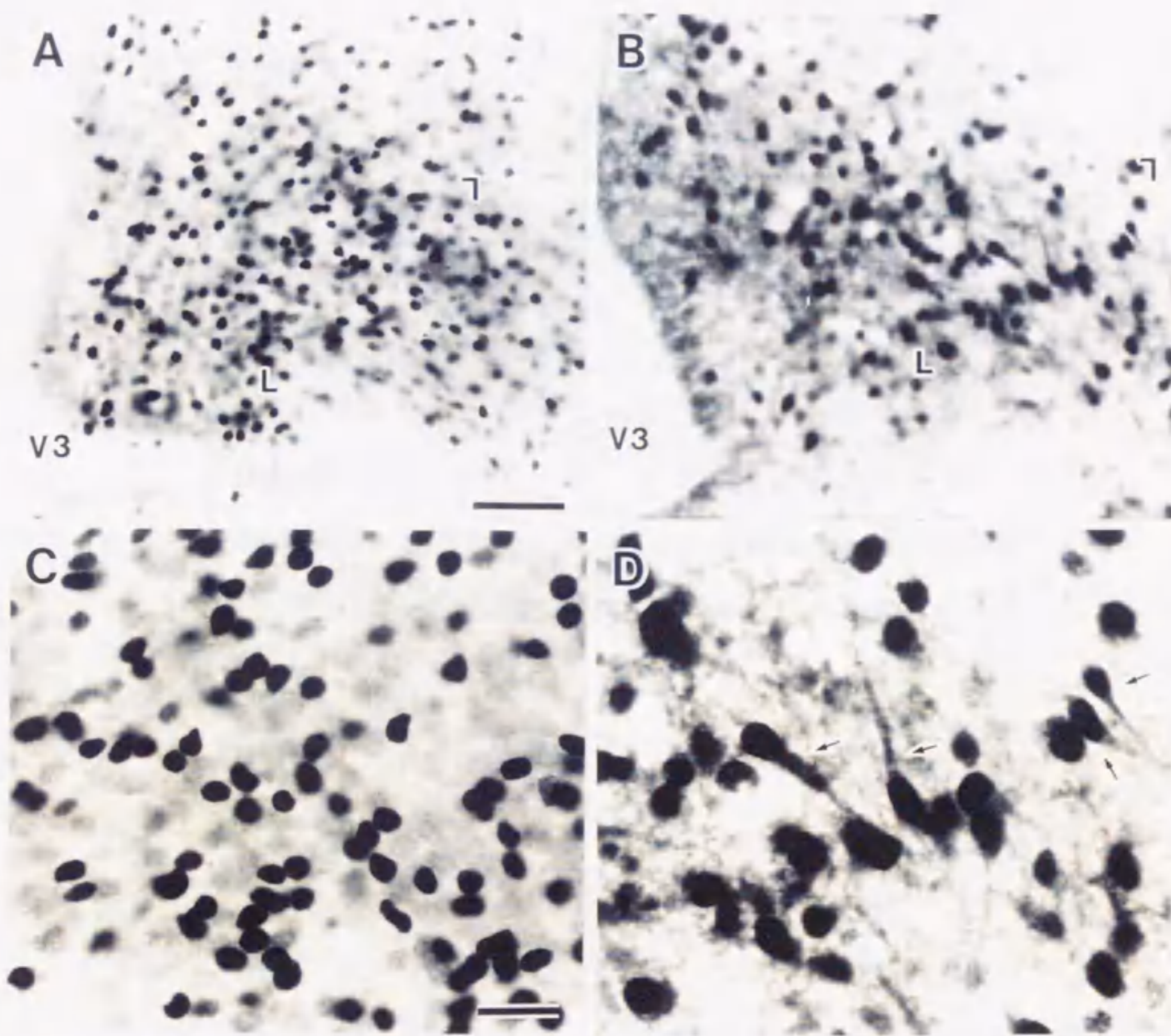


図3-15. 細胞質におけるER-IRの出現

左カラム(A、C)は生後21日齢雄ラットの視床下部弓状核(ARH)。右カラム(B、D)は生後90日齢雄ラットのARH。C、Dはそれぞれ、A、Bの括弧で示した部位の拡大(AとC、BとDはそれぞれ同じ倍率)。Dにおける矢印は、細胞質に出現したER-IRを示す。新生仔のARHでは細胞核以外にER-IRは認められないが、成体のARHではいくつかの核内ER-IR陽性細胞の細胞質にER-IRが出現する。V3=第3脳室。

Scale bar in A =50 μ m, C =20 μ m.

第4章

新生仔脳におけるエストロジェン受容体の 一過性の出現

- 4-1 : 大脳皮質第V層におけるエストロジェン受容体の一過性
の出現
- 4-2 : 顔面神経核におけるエストロジェン受容体の一過性の出現
- 4-3 : 新生仔マウス大脳皮質と顔面神経核におけるエストロジェン
受容体の出現の検討

4-1 : 大脳皮質第 V 層におけるエストロゲン受容体の一過性の出現

要旨

大脳皮質における ER-IR の出現を、新生仔および成体ラットで検討した。出生当日および生後 5 日齢の新生仔ラットでは、大脳皮質における ER-IR の出現は認められなかったが、生後 7 日齢、生後 10 日齢および生後 13 日齢では、聴覚野を中心とした領域に明瞭な ER-IR の出現が認められた。さらに生後 10 日齢においては、聴覚野領域における反応と比較すると弱い反応ではあるが、体性感覚野および視覚野にも特異的な ER-IR の出現を認めた。これらのなかで、生後 10 日齢ラットの聴覚野における ER-IR が最も顕著に出現していた。また、新生仔ラットの聴覚野第 III-IV 層のマーカである AChE 酵素組織化学染色と、ニッスル染色を併用して ER-IR の分布している領域を検討したところ、生後 7 日齢から生後 13 日齢における ER-IR の出現は一次聴覚野の第 V 層のニューロンに限定されていることが判った。しかし、この ER タンパクの陽性反応は生後 15 日齢では検出できなかった。一方、生後 21 日齢および成体ラットでは、第 V 層に出現するものよりは弱い ER-IR が、大脳皮質の第 II 層の広い領域に渡って散在的に分布していた。したがって、大脳皮質第 V 層における ER-IR の出現は、新生仔期における一過性の出現であることが判明した。聴覚野における出現が最も顕著に認められたが、この大脳皮質聴覚野における一過性の ER-IR の出現は、ラットの聴覚神経回路の成立と発達に関係しているのかもしれない。

緒言

胎仔期や新生仔期において、エストロゲンが間脳や扁桃体に存在する ER に作用して、生殖機能の性差発現に重要な役割を演じていることが示されている(17, 31, 66, 70, 77, 131, 138, 205, 206, 214, 241, 243)。一方、空間認知能力などの高次能力にも性差が認められ、これらの機能が大脳皮質や海馬の機能と深い関係にあることも報告されている

(47, 100, 228, 238, 259, 260)。実際、エストロジェンが、新生仔ラットの大脳皮質を構成する神経細胞の発育に影響を及ぼしていること、あるいは、その可能性が報告されている(45, 73, 125, 243, 244, 248, 253)。しかし、胎仔や新生仔の大脳皮質におけるエストロジェンの作用部位は、十分には明らかとされていない。現在までに、新生仔げっ歯類の大脳皮質に、エストロジェンの取り込み部位があることが Binding assay^(55, 70, 131) や ARG^(206, 213, 214) によって示されている。しかし、いくつかの点で、これらの手法は新生仔脳の ER 含有細胞の検討には不都合である。アイソトープラベルしたリガンドを用いる ARG は、エストロジェンを投与しているため、生理的条件下における ER 分布の検討は事実上不可能である。したがって、性差に関する検討も困難である。これは、Binding assay による方法にもあてはまる問題である。また ARG の場合、非特異的反応による影響が大きく、必ずしも解剖学的な検討に適しているとはいえない。また、Binding assay では、詳細な解剖学的検討は不可能である。この点、IHC は発育期の脳の ER 含有細胞の検討には有用である。しかし、哺乳類の胎仔および新生仔の大脳皮質における ER の出現を、IHCで示した報告はない。本研究では、この実験によって、新生仔ラット脳の大脳皮質における ER タンパクの出現を初めて示すことができた。

材料と方法

実験には、雌雄のSDラットを用いた。46匹の出生当日から生後21日齢（生後1, 5, 7, 10, 13, 15, 21日齢）の新生仔ラット、および8匹の4-6ヶ月齢の成体雌ラットを用いた。動物の処理は、第2章に示した方法で行った。実験に用いた全ての動物は麻酔下で4% PFA 固定液で灌流固定し、脳のみを同じ固定液で後固定した後、これを30% シュークローズに浸した。処理した脳標本は、前額断の40 μm の連続浮遊切片にした。連続切片は4群に分け、それぞれ、(1) AS408によるERのIHC、(2) AChE 酵素組織化学染色、(3) クレシル紫によるニッスル染色、および(4) AS401によるコントロール染色に用いた。

また、いくつかの生後 10 日齢の標本において、AS408 による ER-IR の positive control として、AS408 の代わりに、他の抗 ER 抗体 (ER-21⁽²⁴⁾: Dr. Greene より提供を受けた。ER-715⁽⁷¹⁾: NIDDK, USA. より提供を受けた) を一次抗体として、ER の IHC を行った。なお、全ての ER の IHC は、第 2 章に示した方法で行った。

Fischer 344

ラット種における、大脳皮質の ER-IR 出現の特異性を検討するため、同腹の生後 7、10、13 日齢の雌雄ラット (各日齢とも雌雄 2 匹づつ) を用いて、SD ラットと同様の検討を行った。

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 酵素組織染色

AChE 酵素組織染色は、新生仔ラットの一次聴覚野の第 III 層の深部、および、第 IV 層を示すマーカーとして知られている⁽¹⁹⁰⁾。したがって、ER-IR の出現している領域が聴覚野であることを確かめるために、生後 5 日齢、生後 10 日齢、および生後 15 日齢の脳に対して、ER の IHC を行った隣接切片で AChE 酵素組織染色を行った。AChE 酵素組織染色は、Tago et al.⁽²³⁵⁾ の方法で行った。浮遊切片を 0.1 M maleate buffer (pH 6.0) で 5 分間づつ 3 回洗浄し、室温で 2 時間 AChE 反応液にて反応させた。AChE 反応液は、0.1 M maleate buffer (pH 6.0) に、18 mM の acetylthiocholine iodide (Sigma, USA)、5 mM の potassium ferricyanide、30 mM の cupric sulfate、および 50 mM の sodium citrate を加えた液である。反応終了後、切片は 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で 5 分間づつ 5 回洗浄し、DAB-nickel 発色溶液 (50 mM Tris-HCl に DAB を 0.04%、hydrogen peroxide を 0.003%、nickel ammonium sulfate を 2.5% の割合で含んだ液) で 10 - 15 分間室温にて反応させた。発色反応は、50 mM の Tris-HCl (pH 7.6) に移すことで終了させた。50 mM Tris-HCl (pH 7.6) で十分に洗浄した後、ゼラチンコートしたスライドガラスに張り付けて十分に乾燥させた。その後の、脱水および透徹処

理は、ER の IHC 標本における処理と同様に行った。

ER-IR 含有細胞の定量化

ER-IR は、はっきりとした濃い青紫色の反応物として核内にのみ認められた。生後10日齢の雌雄各6個体について、図4-1-1Aに示した位置で、大脳皮質聴覚野(AUD)およびVMHにおけるER-IR数を顕微鏡倍率200倍で測定した。Camera lucidaを用いて、測定領域に0.1mm X 0.1mmのユニットフレームを当て、枠内に完全に入るER-IRだけをカウントした。個体間における測定部位は、ニッスル染色を施した隣接切片をもとに対応させた。得られた測定値は、一定面積(0.01mm²)当たりのER-IR陽性細胞密度として扱った。測定の際、IHCの反応の濃淡は考慮に入れなかった。

統計処理には、T-testのAspin-Welch変法を用いて行った。P値は0.05以下を有意差ありとした。

結果

実験に用いた全ての動物において、日齢や性別に関係なく、内側視束前野、視床、視床下部および扁桃体領域の特定部位にER-IRが認められた。これは、第3章の実験と同様の結果であった。これに対して、大脳皮質では、生後7日齢から生後13日齢および、生後21日齢と成体ラットに認められた(図4-1-3)。大脳皮質のER-IRは核内にのみ認められ、細胞質や神経線維には認められなかった(図4-1-1、図4-1-5)。

大脳皮質聴覚野(AUD)におけるER-IR陽性細胞の出現密度(0.01mm²当たりの陽性細胞数)は、雌雄ともVMHにおける出現密度より有意に低かった(P<0.05)(図4-1-2のグラフ)。また、同じ生後10日齢において、VMHにおけるER-IRの出現密度は、雌の方が雄より有意に高い(P<0.05)のに対し、大脳皮質聴覚野(AUD)におけるER-IRの出現密度に性差は認められなかった(図4-1-2のグラフ)。なお、VMHお

よび大脳皮質における ER-IR の出現に関して、左右における差は認められなかった。

大脳皮質における ER-IR の出現パターン

大脳皮質、視束前野、および視床下部における、生後発達に伴う ER-IR の出現パターンを、表 4-1 に示した。出生当日および生後 5 日齢ラットでは、大脳皮質に ER-IR は認められなかった。しかし、生後 7 日齢、生後 10 日齢および生後 13 日齢では、聴覚野(AUD)の第 V 層に明瞭な ER-IR が出現していた(図 4-1-3 A、図 4-1-4 C)。さらに、生後 10 日齢では、弱いながらも特異的な ER-IR が体性感覚野(SS)や視覚野(VID)にも出現していた(図 4-1-5)。生後 10 日齢における SS や VID の ER-IR は、AUD と同様に第 V 層に限局して認められたが、ER-IR の出現数や反応の強さは、AUD のそれに比べるとかなり低かった(図 4-1-1 と図 4-1-5 を比較参照)。しかし、生後 15 日齢では、大脳皮質に特異的な ER-IR を認めることはできなかった。これに対し、生後 21 日齢になると大脳皮質の第 II-III 層に ER-IR が出現していた(図 4-1-3 C)。成体ラットでも、同様の位置に出現していたが、かなり反応性は弱かった。また、生後 21 日齢および成体ラットにおける ER-IR は、生後 7 日齢から生後 13 日齢のラットとは異なり、大脳皮質の広い範囲に渡って散在的に分布していた。

一方、ER21⁽²⁴⁾および ER715⁽⁷¹⁾による IHC の結果も、抗ラット ER 血清(AS408)による IHC の結果と同様、雌雄に関係なく生後 10 日齢のラットでは、第 V 層にのみ ER-IR が出現していた。

F344 ラットにおける ER-IR の出現性は、SD ラットにおける結果と同様であった。

生後 10 日齢ラット聴覚野領域における ER-IR の確定

AChE 酵素組織染色によって、Robertson ら⁽¹⁹⁰⁾が報告したように、一次聴覚野の第 III 層の深部から第 IV 層にかけて、陽性線維の集まりとして AChE 活性を認めることができた。生後 10 日齢ラットにおいて、AChE 活性は、ER-IR の分布している領域

のちょうど上層に認められた(図4-1-4)。また、図4-1-4に示したように、接線方向におけるER-IRの出現部位は、AChE活性よりやや広い範囲に及んでいた。

また、第V層のニューロンであることを確定するために、6例の生後7日齢ラットについて、聴覚野の第V層から投射を受けている下丘に(63,191)、逆行性トレーサーとして5%ファーストブルーを0.4 μ l/headの割合で投与した。投与後、母ラットに戻し、生後10日齢(72時間後)に灌流固定して標本とした。常法に従ってERのIHCを施した後、蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、図4-1-6に示すように、ER-IRはトレーサーを取り込んだ細胞の存在する層(第V層)に出現していることがわかった。しかし、トレーサーは、ER-IRの出現している細胞には取り込まれていなかった。

以上の結果から、新生仔における大脳皮質のER-IRの出現部位は、一次聴覚野を中心とした第V層のニューロンであることが判明した。

考察

新生仔ラットおよびマウスの大脳皮質におけるエストロジェンの取り込み部位が、Binding Assay^(55, 70, 131)やARG^(204, 213, 214)で報告されている。IHCは、これらの手法のように、去勢および外因性にエストロジェンを投与する必要がないため、生理的条件下における新生仔ラット脳のERの分布を観察するのに有用な方法である、しかし、新生仔ラットの大脳皮質におけるERタンパクの出現は現在まで報告されてなかった。本実験は、哺乳類の大脳皮質におけるERの存在をIHCで示した最初の報告である。

表4-1に示したように、生後7日齢から生後13日齢の間に、AUDの第V層にER-IRが出現していた。さらに、生後10日齢においては、SSおよびVIDの第V層にもER-IRが明瞭に観察された。一方、出生当日および生後5日齢、生後21日齢および成体ラットの第V層にはER-IRは出現していなかった。したがって、大脳皮質の第V層におけるER-IRの出現は、新生仔期における一過性の出現であることが示された。

一方、第 V 層における反応に比べると、弱く、散在的な分布ではあるが、生後 21 日齢と成体ラットの第 II 層にも ER-IR が出現していた。成体ラットにおいて、エストロジェンの取り込み^(229,231)および *in situ hybridization* 組織化学による ER mRNA の存在⁽²¹⁶⁾が、大脳皮質の外層の広い範囲に認められるとの報告が出されている。さらに、それらの出現は、視床下部と比較するとかなり弱い反応であると報告されている。これは、本実験の成体ラットにおける結果とよく一致している。従って、第 II 層における ER-IR の出現は「成体パターン」と考えられる。

新生仔における大脳皮質の ER-IR 出現部位と出現時期は、ARG^(204, 206, 213, 214)や *in situ hybridization* 組織化学による結果⁽¹⁵³⁾と一致していない。上述したように、新生仔期において、ER-IR は生後 7 日齢から生後 13 日齢の間に、第 V 層に限局して分布していた。これに対し、ARG によって示されているエストロジェン取り込み部位は、出生後初期から大脳皮質の深部に認められ^(204,206,214)、さらに、その取り込み部位は、大脳皮質の全領域に渡っていると報告されている。また、Shughrue et al.⁽²¹³⁾と Miranda and Toran-Allerand⁽¹⁵³⁾は、大脳皮質における ER の分布は、生後発達に伴い深層部から表層部へ移動していると報告している。

これまでの新生仔大脳皮質における報告と、本実験における結果の不一致は、用いた手法による差であると考えられる。³H や ¹²⁵I で標識したリガンドを用いる ARG^(204, 206, 213, 214)では、特異的な受容体分子のみならず非特異的な結合活性も認識してしまうことが多い。従って、ARG による結果のほうが IHC の結果よりも、広い範囲で陽性反応が認められる理由の一つとして、この非特異的なエストロジェン結合反応が考えられる。一方、ER mRNA 発現と ER-IR 出現に認められる差は、遺伝子レベルの発現とタンパクレベルの出現との間に、一到しないものがあることを示していると考えられる。実際、Maggi et al.⁽¹³⁸⁾や Skipper et al.⁽²²³⁾は、成体脳において ER 遺伝子発現と ER タンパクの出現部位、およびエストロジェン結合部位が必ずしも一致をしていないと報告している。

この様に、ER の解剖学的な分布領域については、IHC と他の手法によって得られた結果に大きな相違点が認められている。しかし、一方で、大脳皮質における ER-IR の出現時期は、Binding assay^(70,131) や、¹²⁵I でラベルしたリガンドを用いた ARG⁽²¹³⁾ あるいは *in situ* hybridization⁽¹⁵³⁾ などによる、エストロゲン結合量や ER mRNA 発現量がピークに達する時期と一致している。過去の報告では、いずれも生後 5 日から 10 日齢の間に、エストロジェンの取り込み量、および ER mRNA 発現量のピークがあるとしている。本実験においても、第 V 層における ER-IR の出現は、生後 7 日齢から生後 13 日齢の間である。従って、新生仔ラットの第 V 層における ER-IR の一過性の出現は、新生仔の大脳皮質におけるエストロゲン結合量や ER mRNA の発現量がピークに達したことを反映していると考えられる。

げっ歯類において、大脳皮質に組織学的あるいは機能的に性差があることが報告されている^(53, 55, 56, 132, 176, 185)。なかでも、Reid and Juraska⁽¹⁸⁵⁾ は、成体ラットの大脳皮質の厚さには性差が認められるが、側頭皮質領域に限っては性差を認めないと報告している。彼らの示すところの側頭皮質領域は、聴覚野を含んだ領域に相当する部位である。本実験においても、視床下部では ER-IR の出現性に明らかな性差が認められているにも関わらず、大脳皮質聴覚野の ER-IR の出現性には性差は認められていない。従って、一次聴覚野第 V 層における一過性の ER-IR の出現は、周生期における性ホルモン作用が導く脳の性分化機構とは直接には関係が薄いように思われる。

また、SD ラットとは起源が異なる Fischer strain のラット (F344)⁽¹²²⁾ においても、同様の結果が得られたことは、本実験で得られた大脳皮質第 V 層における ER-IR の一過性出現は、ラット種に共通の現象であることを示唆している。大脳皮質第 V 層における ER-IR の出現が、生理的にどのような意味をもっているのかについてはまだよく分からない。しかし、生後 10 日齢を中心とした聴覚野における ER-IR の一過性出現がラット種に共通であること、さらに、ラットの聴覚能の獲得は生後 10 日齢位からで、安定した聴覚反応が得られるのが生後 14 日齢前後であると報告されている⁽³⁹⁾。この時

期は、聴覚野における ER-IR 出現のピークから消失する期間と一致している。したがって、ラット大脳皮質聴覚野における ER-IR の出現は、ラット聴覚能の成熟に何らかの関係があるのかもしれない。

AChE 酵素組織染色を用いた当初の目的は、ER-IR が出現している部位が一次性聴覚野領域であることを確かめるためであった⁽¹⁹⁰⁾。本実験においても、過去の報告通り、AChE 活性は聴覚野の第 III 層から第 IV 層にかけて見られ、ER-IR はちょうどその下層に出現していた。Robertson et al.⁽¹⁹⁰⁾ によると、聴覚野における AChE 活性の発現ピークは、生後 8 日から 10 日齢と報告されている。これは、本実験における ER-IR の出現ピークと非常に一致している。一方、発育期の大脳皮質における AChE 活性は、axonal guidance や synaptogenesis が活発に行われている領域を示すマーカーと考えられている^(112, 114, 188, 189)。したがって、ER-IR の出現と AChE 活性発現の平行性は、ER-IR の発現が、聴覚神経回路の発達に関与していることを示唆するとも考えられる。しかし、逆行性トレーサーによる結果は、大脳皮質第 V 層で ER-IR を含有している細胞が、下丘に投射する錐体ニューロンではないことを示している。したがって、遠心性ニューロンの発達に対して、新生仔期のエストロジェンが、直接に第 V 層の ER-IR を介して影響を及ぼしているとは考えにくい。今後さらに、新生仔ラットの大脳皮質第 V 層に一過性出現する ER タンパクについて、その生物学的意義の検討が必要である。

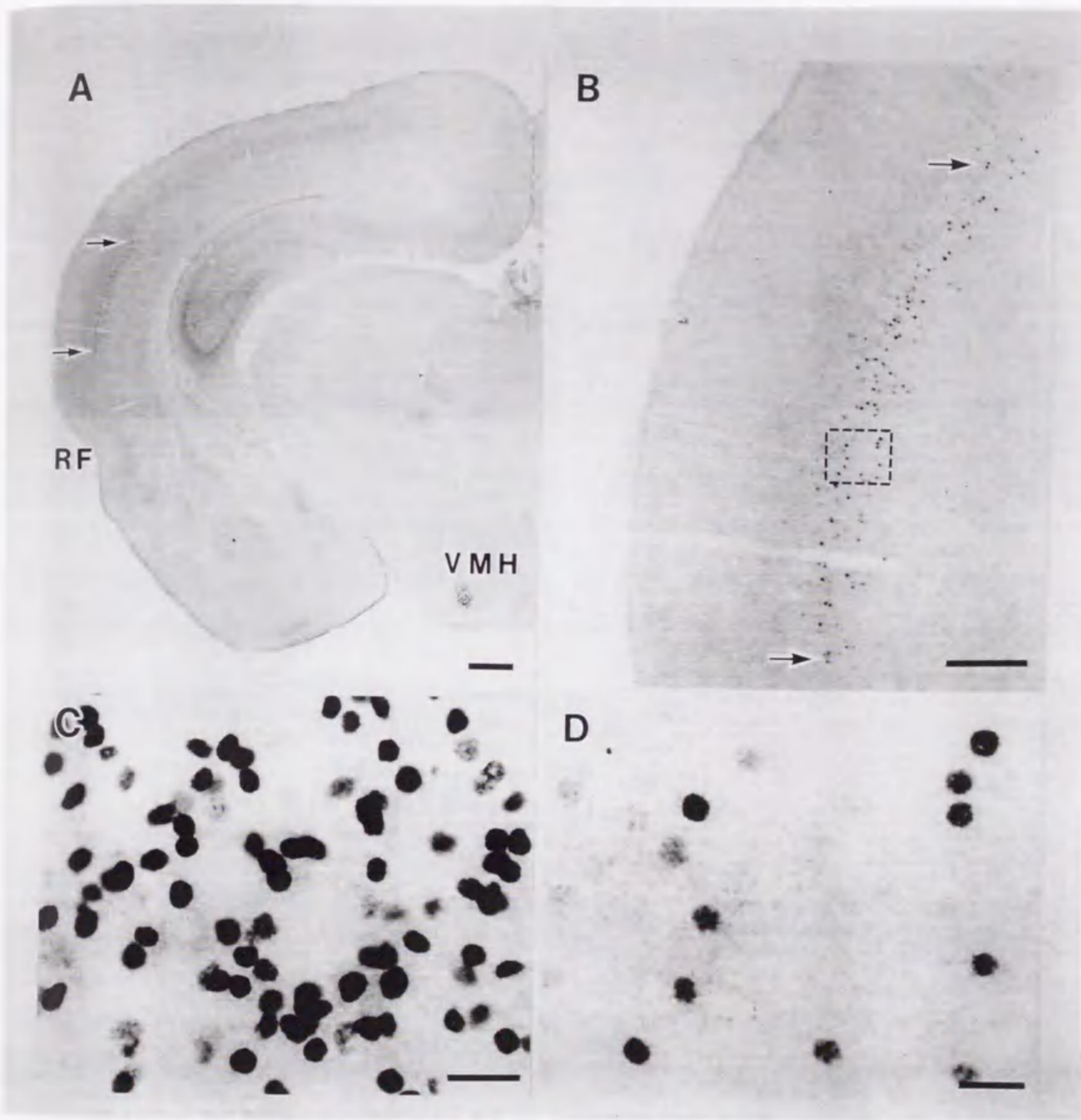


図4-1-1. 大脳皮質および視床下部におけるER-IR

A: 生後10日齢雌ラットの脳皮質聴覚野におけるER-IRの出現性を、同一切片上における視床下部腹内側核 (VMH) のER-IRの出現性と比較した。B: Aの矢印で示した大脳皮質領域の拡大。C: AのVMH領域の拡大。D: Bの点線で囲んだ部分の拡大。両領域におけるERの免疫反応性に差は認められないが、出現密度は大脳皮質 (D) のほうがVMH (C) より低い。RF: rhinal fissure. Scale bar in A = 500 μ m, B = 200 μ m, C and D = 20 μ m.

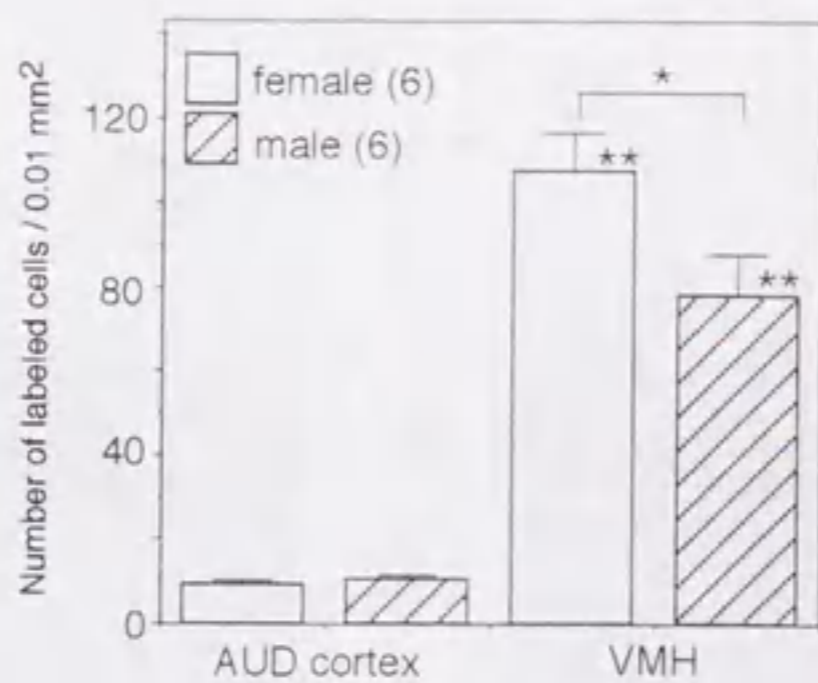
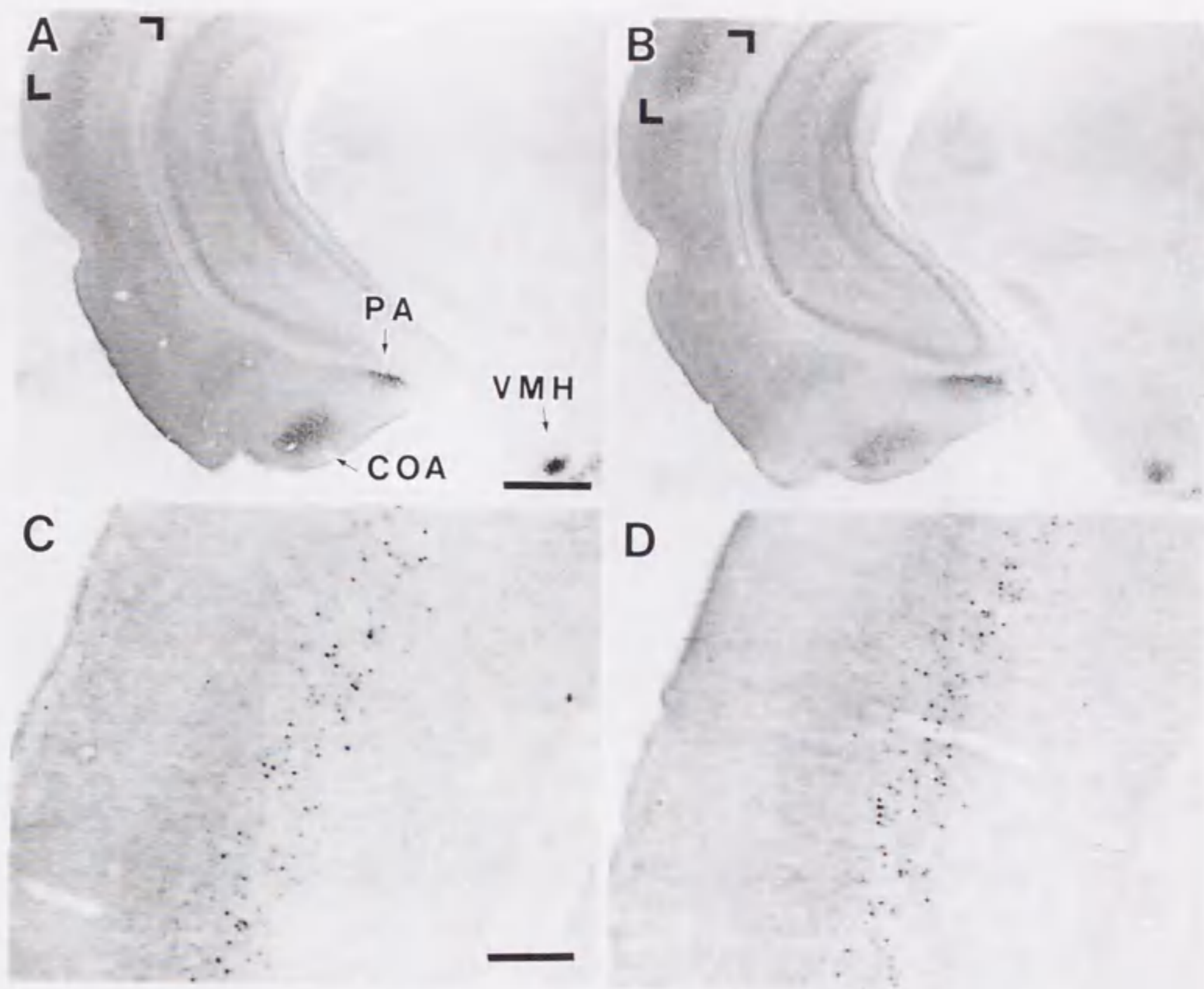


図4-1-2. 大脳皮質聴覚野におけるER-I Rの雌雄間における比較

雌雄の生後10日齢ラットにおけるER-I Rを、大脳皮質聴覚野 (AUD cortex) と視床下部腹内側核 (VMH) で比較した。左カラム (AとC) が雌、右カラム (BとD) が雄。CおよびDは、それぞれAおよびBの括弧内の拡大。VMHのER-I Rは、雌 (A) のほうが雄 (B) よりも多いが、同一切片の大脳皮質聴覚野では (C vs. D) ER-I Rの出現性に性差は認められない。下のグラフは、雌雄における両部位のER-I R細胞密度 (ER-IR cells/0.01mm²) を比較したもの。Vertical bars indicate S.E.M. Asterisks: significantly different between both sexes. Scale bars: A = 400μm, C = 100μm.

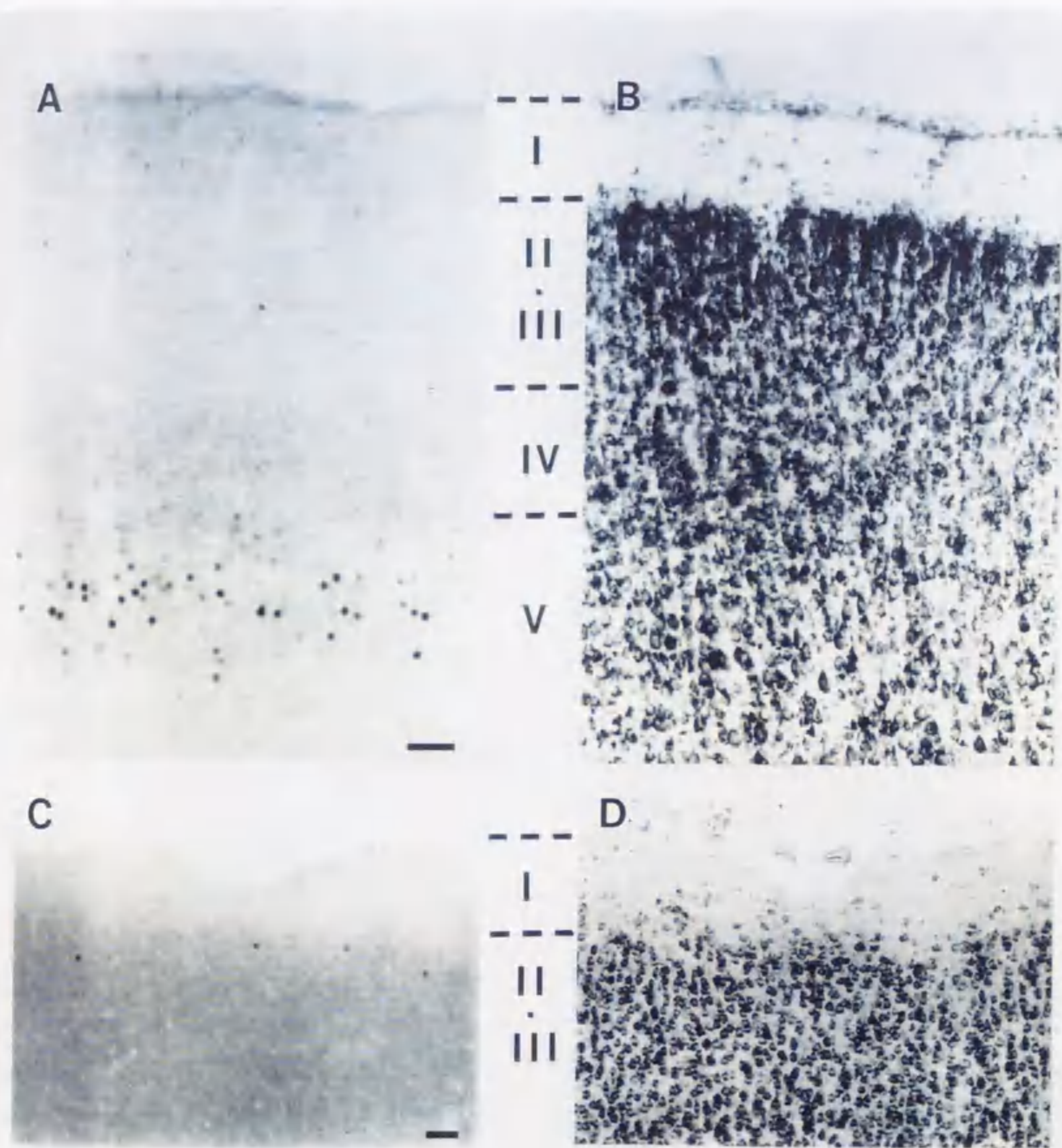


図4-1-3. 大脳皮質におけるER-IRの出現

AとB：生後10日齢の雌ラットにおける大脳皮質でのER-IR。AはERの免疫組織化学染色した切片。BはAの隣接切片で、ニッスル染色した切片。生後10日齢におけるER-IRの出現は第V層に局限されている。CとD：生後21日齢の雌ラットにおける大脳皮質でのER-IR。CはERの免疫組織化学染色をした切片。DはCの隣接切片で、ニッスル染色した切片。生後21日齢におけるER-IRの出現は、第II-III層に局限されている。I, II-III, IVおよびVは、それぞれ第I, II-III, IVおよびV層を示す。Scale bar in A and C = 50 μ m.

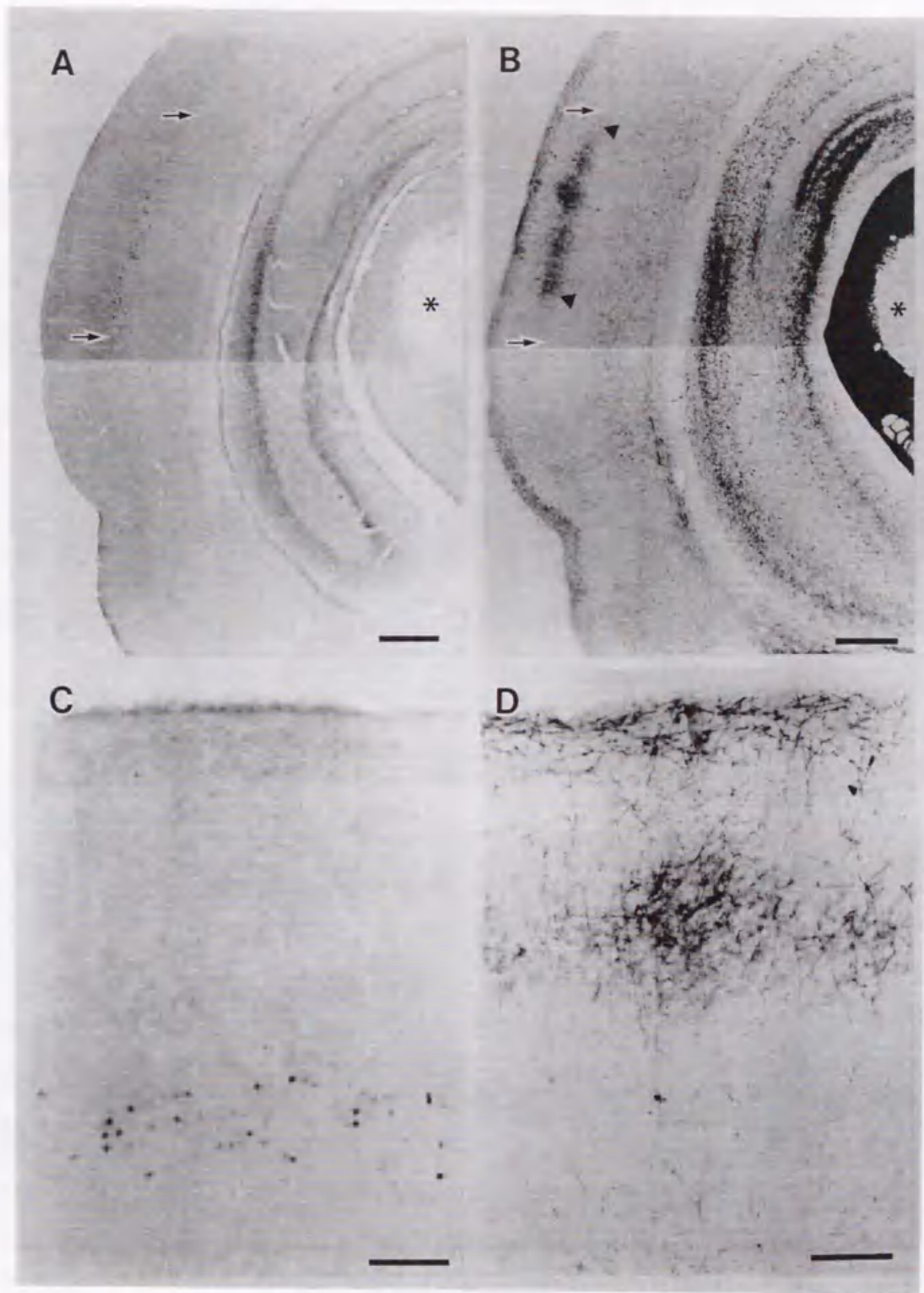


図4-1-4. 大脳皮質におけるER-IRが聴覚野であることの証明

AとC：生後10日齢雌ラットの大脳皮質におけるER-IRの出現。CはAのER-IR出現部位の拡大。矢印は接線方向のER-IRの出現領域を示す。BとD：隣接切片で行ったアセチルコリンエステラーゼ（AChE）酵素組織染色によるAChE活性反応。矢印は接線方向のER-IRの出現領域、矢印頭は接線方向のAChE陽性領域を示す。DはBのAChE陽性反応の領域の拡大。ER-IRは、AChE陽性反応のちょうど下層に出現している。AとBにおける右側のAsterisks (*)は、切片の左右方向を決めるときのマーキング。Scale bar in A and B = 400 μ m, C and D = 100 μ m.

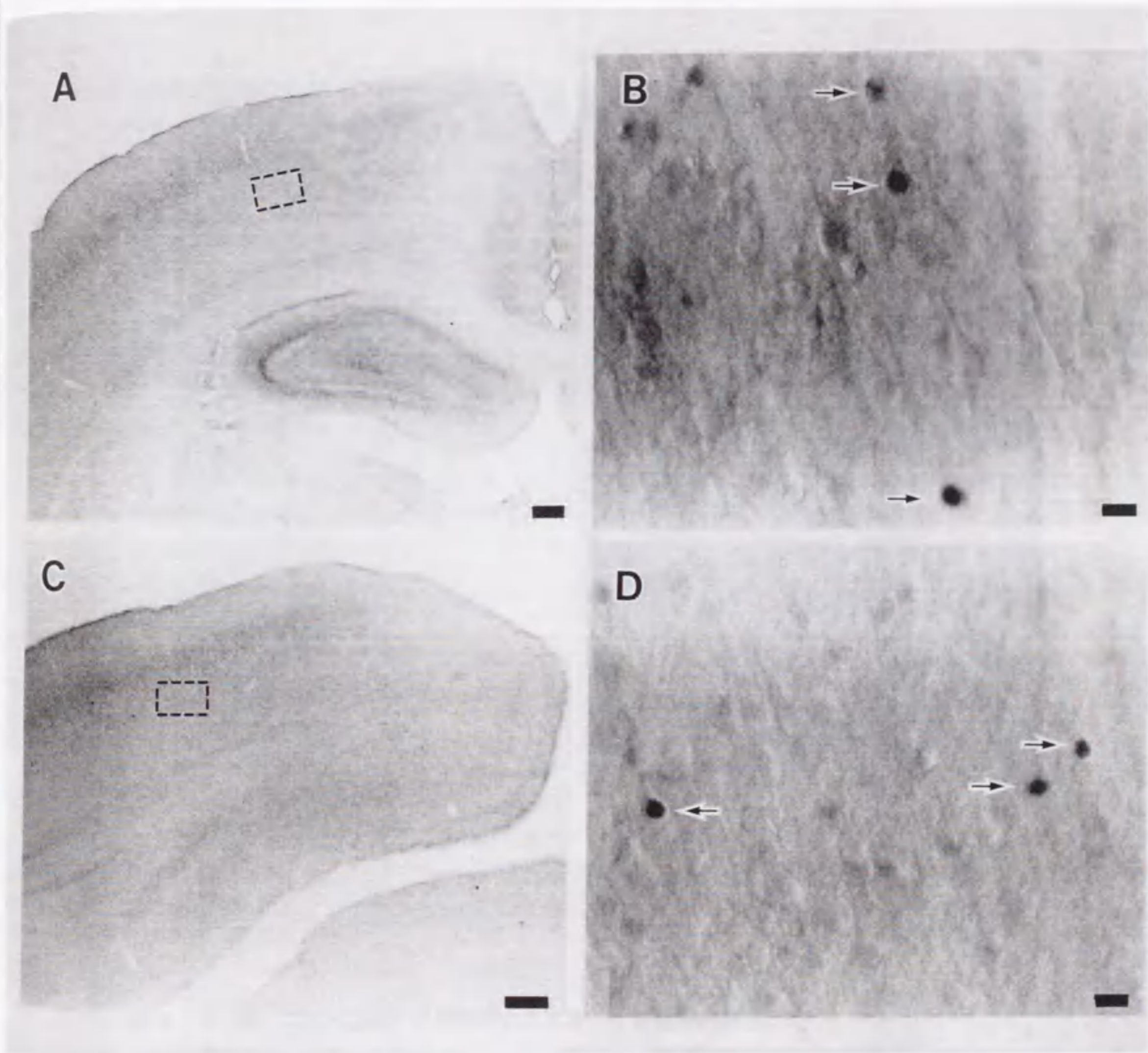


図4-1-5. 大脳皮質体性感覚野および視覚野におけるER-IRの出現

AとB：生後10日齢雌ラットの大脳皮質体性感覚野におけるER-IR。BはAの点線で囲った部位の微分干渉顕微鏡による拡大写真。CとD：生後10日齢雌ラットにおける大脳皮質視覚野におけるER-IR。DはCの点線で囲った部位の微分干渉顕微鏡による拡大写真。B、Dの図中の矢印はER-IR陽性細胞を示す。ER-IRの出現は核内に限局している。Scale bar in A and C = 200 μ m, B and D = 10 μ m.

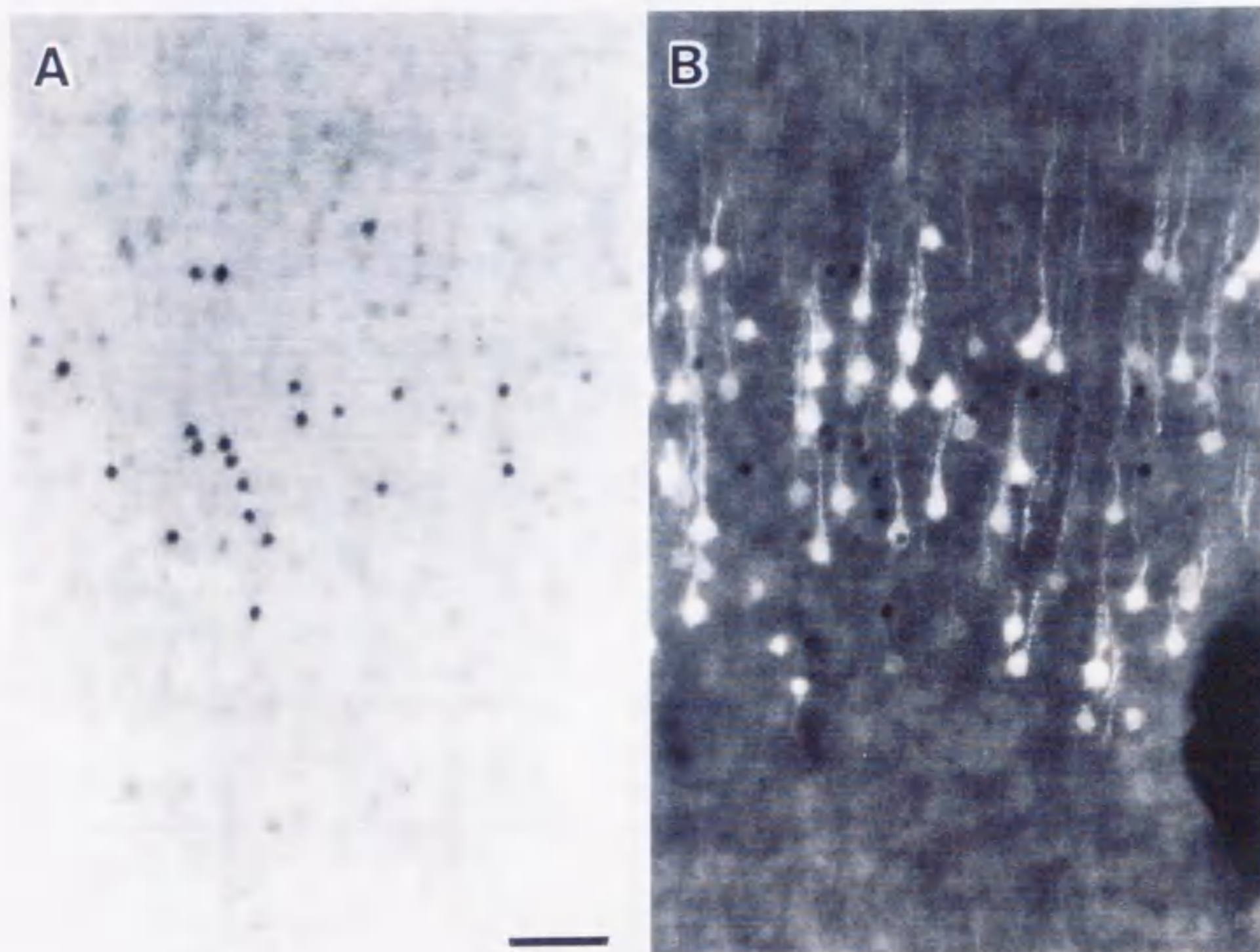


図4-1-6. 下丘へ投射する神経細胞とER-IR含有細胞の比較

下丘に逆行性トレーサー (Fast Blue=FB) を注入し、聴覚野第V層におけるトレーサー取り込み細胞とER-IR含有細胞の関係を検討した。A: 免疫組織化学染色によるER-IRを示した写真。B: Aと同一の切片を、蛍光顕微鏡で観察したFBの取込部位。蛍光反応を示しているのがトレーサー (FB) を取り込んだ第V層の錘体ニューロン。ER-IR含有細胞は下丘へ投射する錘体ニューロンではないことがわかる。Scale bar =50 μ m.

Age group (Number of rats)	Number of rats with ER-IR positive cells					
	Neocortex : layer V			Neocortex layer II	Hypothalamus	
	SS	AUD	VID		MPN	VMH
PD 1 (8)	0	0	0	0	8 +++	8 +++
PD 5 (6)	0	0	0	0	6 +++	6 +++
PD 7 (4)	0	4 ++	0	0	4 +++	4 +++
PD10 (12)	6 +	12 +++	8 +	0	12 +++	12 +++
PD13 (4)	0	4 +	0	0	4 +++	4 +++
PD15 (4)	0	0	0	0	4 +++	4 +++
PD21 (8)	0	0	0	8 +	8 +++	8 +++
Adult (8)	0	0	0	8 ±	8 +++	8 +++

表4-1. 大脳皮質と視床下部におけるER-IR出現の生後変化

大脳皮質第V層領域のうち、SSは体性感覚野、AUDは聴覚野、VIDは視覚野を示す。視床下部領域のうち、MPNは内側視束前核、VMHは視床下部腹内側核を示す。PDは生後日齢を、また()内の数は各日齢群の使用個体数で雌雄の合計を示す。表中の数字はそれぞれの領域でER-IRが出現していた各日齢群における個体数を示す。ER-IRの出現性：±かなり弱い、+弱い、++中程度、+++強い。

4-2 : 顔面神経核におけるエストロゲン受容体の一過性の出現

要旨

免疫組織化学染色 (IHC) によって、新生仔ラットの脳内 ER タンパクの出現部位を検討したところ、新生仔期の雌雄ラットの顔面神経核内側亜核に、明瞭な ER-IR の出現が認められた。一方、成体ラットの同神経核には ER-IR は認められなかった。また、顔面神経核内側亜核の運動ニューロンが支配する後耳介筋に逆行性トレーサーを注入し、ER-IR 含有ニューロンとの関係を検討した。しかし、トレーサーを取り込んだほとんどのニューロンに ER-IR は含まれていなかった。したがって、発育期にのみ ER-IR を一過性に出現する顔面神経核内側亜核のニューロンは、介在ニューロンあるいは未熟な運動ニューロンと思われる。

緒言

哺乳類の脳内における ER の組織学的な存在部位は、オートラジオグラフィ (ARG) や IHC、あるいは *in situ hybridization* 組織化学によって幅広く検討されている。しかし、脳全体、すなわち嗅球から脳幹の全範囲にかけて詳細に検討された例は少なく、ARG による、成体マウス⁽²²⁹⁾ および成体ラット⁽²³¹⁾、*in situ hybridization* 組織化学による成体ラット⁽²⁴⁰⁾ を挙げるに留まる。一方、胎生期および新生仔期の脳での検討となると、視床下部を中心とした部位における検討がほとんどで、性ステロイド受容体の発生に幅を広げたとしても、脳幹部における出現を報告した例は皆無に等しい。しかし、脳幹は、間脳で処理された生殖行動発現に関する情報の通過部位^(180, 195) であり、また、エストロジェンの体性感覚能への作用は、脳幹のオリブ小脳路 (olivo-cerebellar circuit) に対する作用と考えられて⁽²²⁴⁾。従って、発育期の脳に対するエストロジェンの幅広い作用機構を理解する上でも、脳幹部におけるエストロゲン作用部位すなわち ER 発現部位を検討することは重要である。本研究で、いままで検討されることがなかった脳幹を含めた範囲で、ラット脳内 ER の発生を IHC で検討したところ、顔面神経核における ER-IR の出現が観察された。しかし、成体ラットの同神経核に ER-IR は認められなかった。従って、顔面神経核における ER-IR の出現は、発育期における一過性のものであることが認められた。

材料と方法

実験には、雌雄の出生当日、生後3日齢、生後5日齢、生後11日齢、生後15日齢、生後21日齢、および成体のSDラットを用いた。動物の処置は、第2章に従って行った。すなわち、麻酔下で4%PFAで還流固定した後、脳標本を同固定液で後固定、さらに30%シュクロース液に浸透させた。脳標本は、凍結ミクロトームで40 μ mの連続浮遊切片に作製した。切片は、前額断および矢状断で作製した。前額断切片は、傍オリブ上核からオリブ下核の範囲で、矢状断切片は、嗅球を完全に含む傍正中線の位置で作製した。連続切片は3群に分け、(1)AS408によるERのIHC、(2)ニッスル染色、および(3)AS401によるコントロール染色を行った。IHCは、第2章に記述した方法に従って行った。また、IHCの反応特異性を検討するため、第2章の「エストロゲン受容体免疫組織化学染色の特異性の検定」にしたがい、ERの吸収試験を行った。

ER-IRが出現している細胞が運動神経であるか否かを検討するために、顔面神経核内側亜核の運動神経が投射する後耳介筋、およびそのコントロール群として、顔面神経核外側核の運動神経が投射する鼻唇筋に、それぞれ逆行性トレーサーとしてFast Blue (FB)を注入した。トレーサーの注入は、同腹の生後4日齢の雌雄ラットに行った。動物は低温麻酔し、先端が50-100 μ mのガラスキャピラリーを取り付けた1 μ lのマイクロシリンジを用いて、5%FB液を各部位について0.4 μ m注入した。手術後母ラットに戻し、24時間後に第2章に従って還流固定した。上述と同様に浮遊切片を作製した後、顔面神経核におけるトレーサー取り込みを蛍光顕微鏡(Nikon Optiphot)で観察、写真撮影を行った。観察後、同一切片に対してERのIHCを行い、トレーサーとER-IRの共存性を検討した。

結果

実験に用いた動物のうち、出生当日から生後11日齢の全ての新生仔ラットの顔面神経核にER-IRの出現を認めた。顔面神経核におけるER-IRの出現パターンは、出生当日から生後11日齢の間で相違は無く、いずれの日齢においても内側亜核にのみ認められ、顔面神経核を構成している他の亜核には出現していなかった(図4-2-1)。一方、生後15日齢、生後21日齢、および成体の顔面神経核にはER-IRは出現していなかった。

ER-IR は細胞核のみに認められ、細胞質に特異的な反応は認められなかった。また、生後 5 日齢の 1 個体において、5 枚の連続切片を用いて、内側亜核を構成する細胞に占める ER-IR 含有細胞の割合を測定した。その結果、左右とも約 50% であった (ER-IR 含有細胞数 : 構成細胞数 = 右側 157 : 294、左側 151 : 313)。また、ER-IR 陽性細胞と非陽性細胞の間で、DAB による発色反応以外には形態的な差は認められなかった。さらに、顔面神経核と同様に脳幹の運動神経核である、三叉神経運動核や疑核あるいは舌下神経核には、ER-IR の出現は認められなかった。

後耳介筋にトレーサーを注入した例では、顔面神経核内側亜核のみにトレーサーが取り込まれていた (図 4-2-2)。一方、鼻唇筋にトレーサーを注入した個体では、顔面神経核の外側亜核にのみトレーサーの取り込みを認めた。トレーサーは、注入した筋と同側の神経核の、軸索、樹状突起および細胞質に認められた。図 4-2-2 に示したように、いくつかの ER-IR 陽性細胞にトレーサーが含まれていたが、多くの ER-IR 陽性細胞にはトレーサーは含まれていなかった。また、トレーサーは同亜核の全体に渡って取り込まれていたが、ER-IR 陽性細胞は同亜核の腹側部を中心に出現していた。

考察

ARG (178, 179, 181, 229)、IHC (38, 198, 268)、*in situ hybridization* 組織化学 (216) によってラットおよびマウス脳内の ER 存在部位が示されている。しかし、脳幹部にかけて検討した例は少なく、成体ラット (216, 231) および成体マウス (229) で数例が報告されているのみである。Keefer et al. (103) は ARG で、成体ラットの脊髄の背角にエストロジェンの取り込みがあることを報告しているが、先に挙げた報告を含め、顔面神経核に ER が存在していることを示す報告はない。本実験でも、IHC で成体ラットの同神経核における ER の存在を検討したが、検出されなかった。これに対し、新生仔ラットの同神経核の内側亜核では、明かな ER-IR の出現を認めた。したがって、この内側亜核における ER-IR の出現は、新生仔における一過性のものである。また、吸収試験の結果、内側亜核の細胞核に出現している反応は、ER を発現した大腸菌の溶解質液沈渣分画にインキュベートした抗血清 (第 2 章の (6) を参照) による反応では認められなかった (図 4-2-3)。一方、顔面神経核の全体、特に外側核で細胞質に薄い反応物を認めたが、この反応は ER を発現

した大腸菌の溶解質液沈渣分画にインキュベートした抗血清を用いた IHC でも確認できた (図 4-2-3 G、H)。したがって、特異的な ER タンパクに対する陽性反応は、内側垂核を構成するニューロンの核内に認められるものに限られるといえる。

成体ラットのいくつかの脳神経核に、アンドロゲン受容体 (AR) が存在していることが *in vitro* で報告されている⁽²⁶⁷⁾。また、Simerly et al.⁽²¹⁵⁾ は、成体ラットの三叉神経運動核 (第 5 脳神経)、顔面神経核 (第 7 脳神経)、舌下神経核 (第 12 脳神経) の各脳神経核に AR の mRNA が発現していると報告している。さらに彼らは同じ論文で、これらの神経核に ER の mRNA は発現していないと報告している。Sheridan et al.⁽²⁰⁵⁾ は、ARG によって発育期のラット脳におけるエストロジェンの取り込み部位を内側視束前野、視床下部および扁桃体で検討しているが、中脳から延髄レベルの検討は行っていない。このことは、ARG による新生仔マウス脳の検討⁽²¹⁴⁾、IHC による発育期のブラジリアンオポッサム脳の検討⁽⁶⁶⁾、でも見られる。したがって、現在まで発育期動物の顔面神経核における ER の存在が示されていなかったのは、成体における結果から類推して、発育期の脳神経核における ER の検討を行わなかったためと思われる。

このような、新生仔における ER-IR の一過性の出現は、本研究の第 4 章：4-1 で示したように、大脳皮質でも認められている (第 4 章：4-1 の緒言と考察を参照)。性ステロイドホルモンの、脳の形態的および機能的な発育過程に及ぼす影響が、多くの研究者によって報告されている。例えば、神経細胞の大きさ^(97, 155)、神経核を構成する細胞数や大きさ^(167, 232, 262) あるいは、シナプスの形成^(140-142, 154, 164, 183, 262) への影響などである。これらは主に視束前野、視床下部および扁桃体における現象であり、成体において形態学的に性的二型が認められる部位である。そのため、性ステロイドホルモンがこれらの部位におよぼす上記の影響が、周生期の性ホルモンによる脳の性分化作用機構の一つであると考えられている。本研究の第 3 章、第 4 章：4-1 でも示したように、視束前野や視床下部における ER-IR の出現には性差が認められ、それは、周生期の雌雄における性ホルモン環境の違いによって生じたものと考えられている。これに対して、顔面神経核内側垂核における ER-IR および第 4 章：4-1 で示した大脳皮質聴覚野における ER-IR の出現に性差は認められなかった。したがって、顔面神経核内側垂核における ER-IR の出現は、大脳皮質聴覚野における ER-IR と同様、脳の性分化の誘導とは直接的には関係してい

ないと思われる。

顔面神経核を構成する運動神経とそれが支配する筋との関係は、多くの動物種で検討されている。ラットやマウスでは、大きく内側、中側、外側の3亜核に分類され、それぞれ、鼻唇筋、オトガイ筋、耳介筋に投射している^(9,94,139,209,254)。本実験で、生後4日齢ラットの鼻唇筋および耳介後筋に逆行性トレーサーを注入したところ、成体ラット同様、それぞれ外側亜核および内側亜核に取り込まれていた。したがって、成体ラットでみられる顔面神経核と顔面筋との投射関係は、新生仔ラットでも同じであることが明らかになった。

一方、ER-IRの出現している内側亜核において、トレーサーを含んだ運動神経のほとんどにER-IRは含まれていなかった。技術的な問題を考えて、両者の共存性を完全に否定することはできないが、本実験の結果だけではER-IR含有細胞が後耳介筋を支配する運動ニューロンであるとは断定できない。しかし、トレーサーを取り込んだ細胞はER-IR含有細胞の出現領域と同様に、内側亜核の腹側部を中心に存在していた(図4-2-1Bと図4-2-2を合せて参照)。このER-IRとトレーサーの分布の一致は、ER-IRの出現部位が後耳介筋を支配する運動神経の部位であることを示している。したがって、顔面神経核内側亜核のER-IR含有細胞は、介在神経あるいは完全には支配筋に到達していない未発達の運動神経である可能性が考えられる。

内側亜核からの樹状突起の分布パターンは、他の亜核(内側および外側)からのものと比べると異なっていることが報告されている⁽⁶⁹⁾。また、他の末梢性の顔面運動神経枝については不明であるが、後耳介枝は優先的に内側亜核と連絡していることが報告されている⁽²⁰²⁾。内側亜核へのpresynapticな投射も、中側亜核や外側亜核とは異なることが示されている^(93,246)。Travers and Norgren⁽²⁴⁶⁾によると、顔面神経核の中側亜核および外側亜核は、三叉神経運動核や舌下神経核の近くの網様体(RF)からの求心性の投射を主に受け、さらに赤核からの投射も受けている。これに対し、内側亜核は中脳、傍毛帯あるいは脳幹の腹側部に存在する橋部から延髄にかけての網様体から多くの投射を受けている。本実験で、ER-IRの出現が認められるのは内側亜核のみである。したがって、ER-IRの出現する部位は、同じ顔面神経核でも他の部位とは異なった性質や機能をもっている部位のように思われる。しかし、この形態的な性質の違いが、新生仔におけるER-IRの一過性出現とどう関係しているのかは分からない。

Ashwell and Watson⁽¹⁰⁾によると、マウスでは顔面神経核と支配筋との連絡は、胎生 17 日までにできあがり、その後、神経細胞死によって細胞の数は減少すると報告されている。細胞死は生後 10 日齢まで続き、出生当日に存在する運動神経のうち、実に 30% もの細胞が生後に細胞死を起こすと報告されている。しかし、細胞死は、顔面神経核の全体で起っているのに対し、本実験における ER-IR の出現部位は同核の内側亜核腹側部のみである。したがって、顔面神経核における ER-IR の出現が、同核の細胞死に直接関与しているとは考えにくい。

HRP を頸膨大部に注入すると、上部頸髄や、多くの脳幹部の神経核、小脳の深部、それに間脳の神経核が標識される。成体ラットで認められる下行性の投射は、大抵は新生仔でも確認できる。この中でも、新生仔期ラットの顔面神経核内側亜核と、三叉神経の中脳核の脊髄投射神経は、成体ラットより強く標識されると報告されている⁽¹¹⁹⁾。顔面神経核内側亜核における ER-IR の消失とともに、頸膨大部から顔面神経核に投射する神経の数も減少しているのかもしれない。

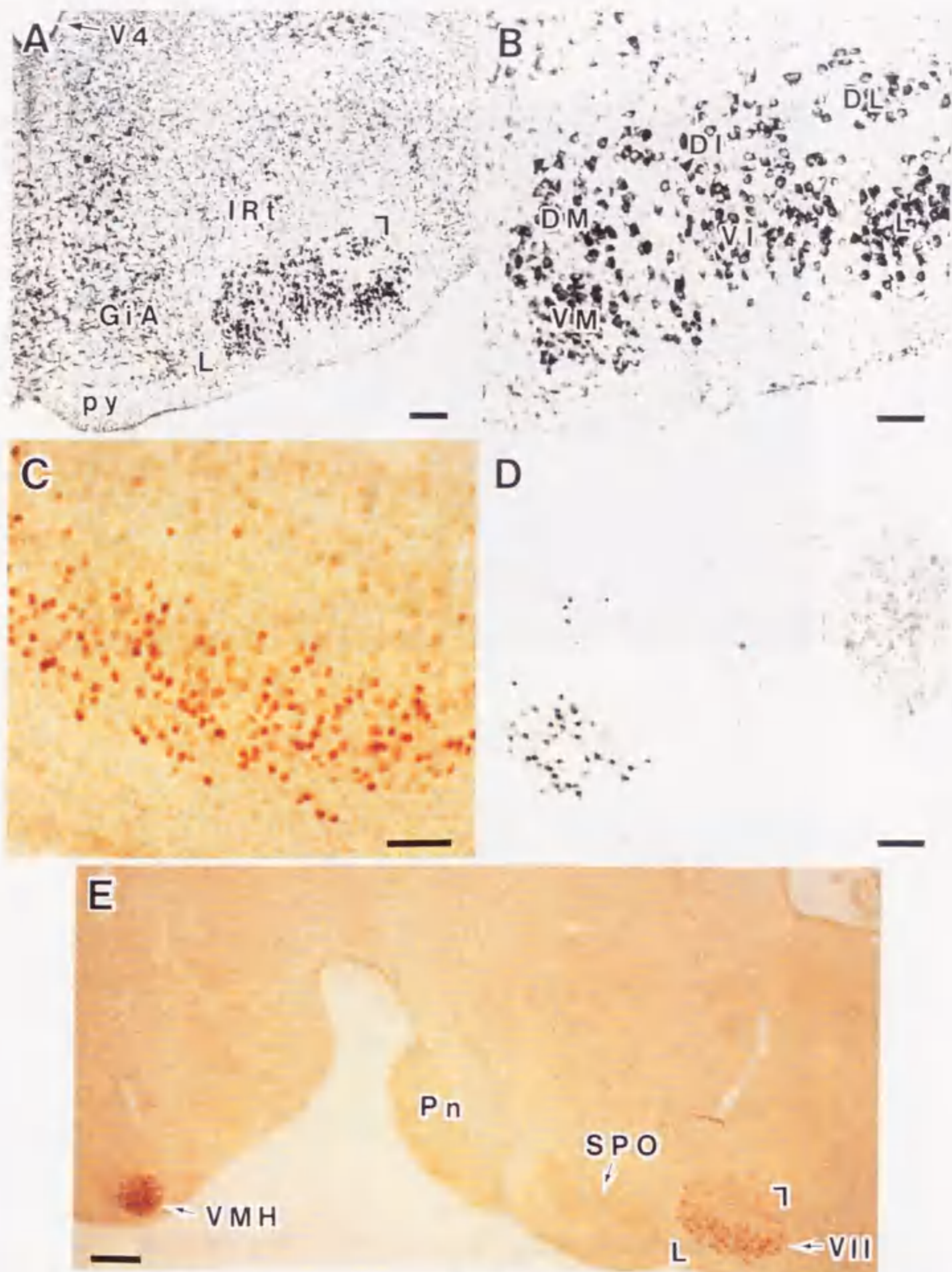


図4-2-1. 新生仔ラット顔面神経核におけるER-IRの出現

A: 生後5日齢雌ラットにおける顔面神経核の位置をニッスル染色した前額断切片で示す。B: Aの括弧で示した部位の拡大写真。C: Eの括弧で示した部位の拡大写真。生後5日齢雌ラットにおける顔面神経核のER-IR出現を矢状断切片で示した。D: Bの隣接切片におけるER-IRの出現。ER-IRが内側垂核のうち腹内側核(写真BのVMに相当する部位)に局限して分布していることを示す。E: 生後5日齢雌ラットにおける顔面神経核およびVMHのER-IR出現を矢状断切片で示した。Scale bar in A = 200 μ m, B = 100 μ m, C = 50 μ m, D = 100 μ m, and E = 200 μ m.

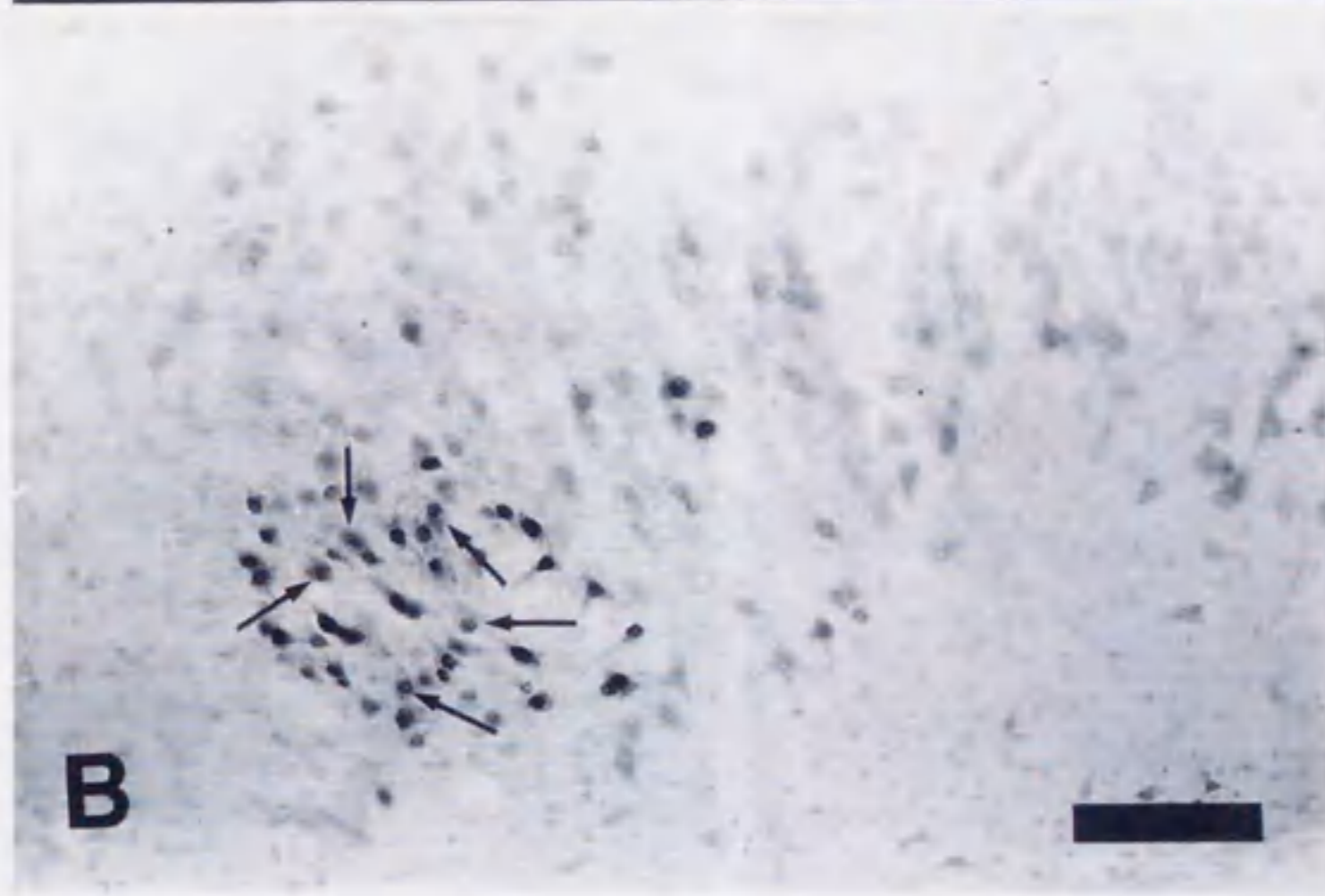
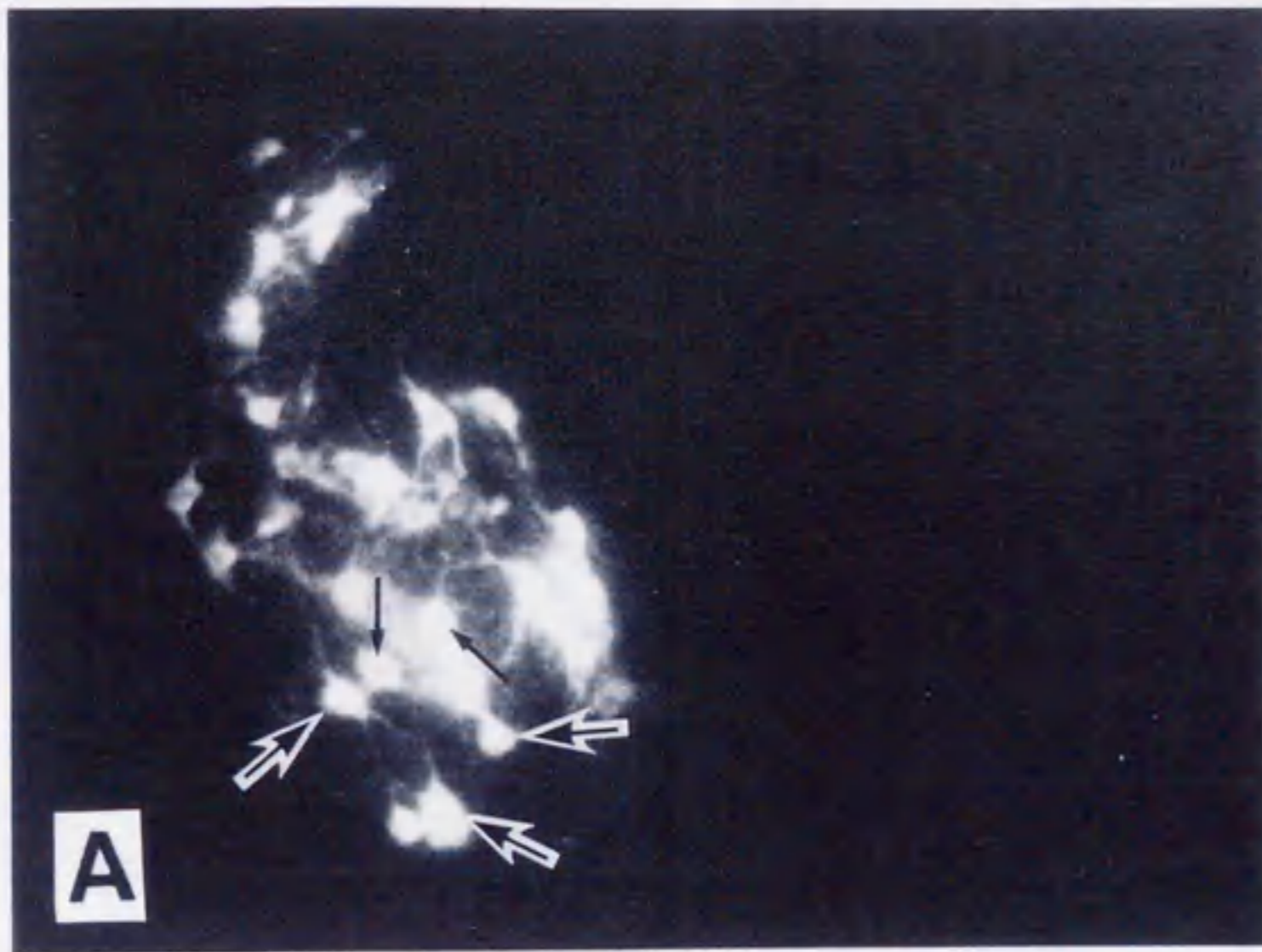


図4-2-2. 後耳介筋へ投射する神経細胞とER-IR含有細胞の比較

後耳介筋に逆行性トレーサー (Fast Blue=FB) を注入し、顔面神経核内側亜核におけるトレーサー取り込み細胞とER-IR含有細胞の関係を比較検討した。A: 蛍光顕微鏡による顔面神経核内側亜核におけるトレーサー取り込み像。B: Aと同一切片におけるER-IR。AとBの矢印はそれぞれ同じ細胞を示す。このように、いくつかの細胞では共存が認められるが、多くのER-IR含有細胞にFBは取り込まれていない。Scale bar = 100 μ m.

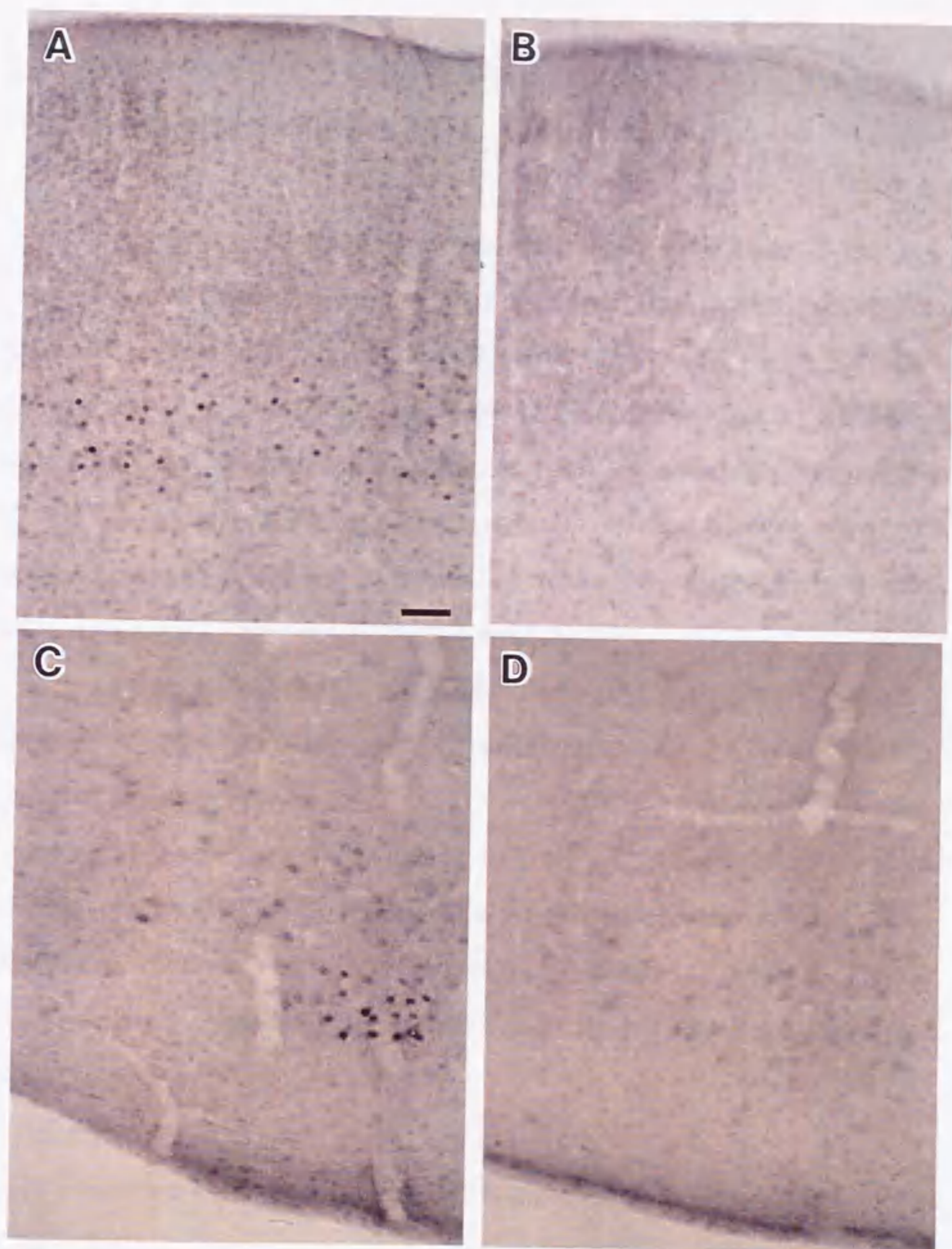


図4-2-3. ER抗体のER抗原による吸収試験（大脳皮質および顔面神経核）

左カラム（AとC）：融合タンパク質を発現していない大腸菌の溶解質液沈渣分画で処理し、ER抗体を吸収させなかったAS408で免疫組織化学染色（IHC）した標本。大脳皮質聴覚野（A）および顔面神経核内側垂核（C）にER-IgGが出現している。右カラム（BとD）：ERの融合タンパク質を発現している大腸菌の溶解質液沈渣分画で処理し、ER抗体を吸収させたAS408でIHCした隣接切片標本（Aに対してB、Cに対してD）。いずれも特異的なER-IgGは出現していない。

Scale bar in A = 50 μ m

4-3 : 新生仔マウスの大脳皮質と顔面神経核におけるエストロジェン受容体の出現の検討

ラット以外における、大脳皮質第V層および顔面神経核のER-IRの出現を検討するため、新生仔マウスを用いて、相同部位におけるER-IRの出現を検討した。使用したマウスは運動失調疾患モデルで、ホモ個体 (rl/rl) では大脳皮質の層構築に異常が認められるリーラーマウス (reeler mouse) である。このミュータントマウスのホモ個体に認められる層構築の異常は、大脳皮質を構成する神経細胞の、発育過程における移動障害に起因していることが知られている。したがって、マウスの大脳皮質第V層でもER-IRが認められた場合、このER-IRを含有する細胞の起源がお互いに同一であるのか、それとも、第V層という環境によってER-IRを出現させているのかを検討できると考え、このミュータントマウスを選んだ。

実験には生後7日齢と生後10日齢の同腹の雌雄マウスを用いた。動物の処理からERのIHCまで第2章に記載した方法にしたがって行った。切片は凍結ミクロトームで、40 μm の前額断および矢状断の連続浮遊切片に作製した。

なお、大脳皮質構築に異常を持つホモ個体の場合、細かい振戦を伴う失調性歩行を示すが、これは生後2週間以降のことで、生後7日齢から生後10日齢の時点では外観からホモ個体 (rl/rl) を野生型個体 (+/+) やヘテロ個体 (+/rl) から見分けることは出来ない。したがって、連続切片のうちERのIHCを行う隣接切片をニッスル染色し、大脳皮質および海馬の層構造に異常が存在することを確認することでホモ個体と判定した。

結果は次のようであった。

(1) 内側視束前野や視床下部では、SDラットと同様にER-IRが出現していた。図4-3-1 AおよびBに、MPO、ARH、VMHにおけるER-IRの出現を示した。

(2) 顔面神経核にER-IRは出現していなかった (図4-3-1 C、D)。

(3) 大脳皮質第V層には、ラットのようなER-IRを認めることはできなかった。一方、マウスではラットとは異なる大脳皮質の領域にER-IRが認められた。マウスでは、脳梁膨大後部皮質

(retrosplenial cortex) の第 II, III 層に ER-IR が分布していた (図 4-3-2)。しかし、その他の領域の大脳皮質に特異的な ER-IR は認められなかった。なお、大脳皮質の構築に異常を持つホモ個体 (nl/nl) では、同じく脳梁膨大後部皮質に ER-IR が出現していたが、層構造と同様に ER-IR も不規則に分布していた。

発育ステージ的には、生後 7 日齢から生後 10 日齢のマウスと、生後 7 日齢から生後 13 日齢のラットとは、ほぼ同時期と考えられる。したがって、ER タンパクの出現に関して、マウス脳でもラット脳と同様の現象が起こっていると仮定すれば、生後 7 日齢および生後 10 日齢のマウスの大脳皮質第 V 層や顔面神経核においても ER-IR の出現が認められるはずである。しかし、視束前野や視床下部ではマウスでもラットと同様に ER-IR が認められるのに対し、同一個体の大脳皮質聴覚野や顔面神経核内側亜核に ER-IR を認めることはできなかった。

ラット大脳皮質第 V 層における ER-IR の出現は、生後 10 日齢を中心とした比較的短い期間に限定されていることから (表 4-1 参照)、マウスでは、生後 7 日齢より以前にこの現象が終了している可能性も考えられる。しかし、ラット顔面神経核の ER-IR は、出生当日から断続的に出現していることから、顔面神経核に関しては、マウスにおける ER-IR の出現時期を外しているとは考えにくい。したがって、大脳皮質に関しては、さらに若いステージのマウスにおける検討も必要と思われるが、現時点の結果から考えて、大脳皮質第 V 層および顔面神経核内側亜核における ER-IR の出現は、ラットに特有の現象である可能性がある。

一方、マウスの大脳皮質における ER-IR 出現部位も、ラットと同様に、ARG によるエストロゲン結合部位と比べると極めて限られた部位に限定されていた。本実験における ER-IR の出現部位は、脳梁膨大後部皮質に限られているのに対し、ARG による生後 2 日齢マウス (当研究の換算では生後 3 日齢) の報告⁽²¹⁴⁾では、この領域を含んだ大脳皮質の広い範囲に渡ってエストロジェンの取り込みが認められている。このことは、第 2 章でも考察したように、ARG による結果は多くの非特異的な反応を含んでいる可能性を示すと同時に、大脳皮質におけるエストロゲン結合部位が、必ずしも核内 ER タンパクの出現と一致していないことを示唆すると思われる。

大脳皮質の構築に異常を持つホモ個体 (nl/nl) では、脳梁膨大後部皮質における ER-IR の分布も

層構造と同様に不規則に認められた。このことは、マウスの脳梁膨大後部皮質の第II. III層に分布するER-IR含有細胞の起源は、いずれも同一であり、移動後に位置する層（マウスの場合は第II. III層）の環境によって、その出現が制御されているのではないことを示している。新生仔マウスでは第V層にER-IRの出現を認めることはできなかったが、ラットの大脳皮質第V層における一過性の出現にも、同様のことがいえると考えられる。

しかし、ラット同様、新生仔マウスの大脳皮質に認められるER-IRの生物学的意義については不明である。マウスの脳梁膨大後部皮質の第II. III層に分布するER-IRについても、さらなる検討が必要である。

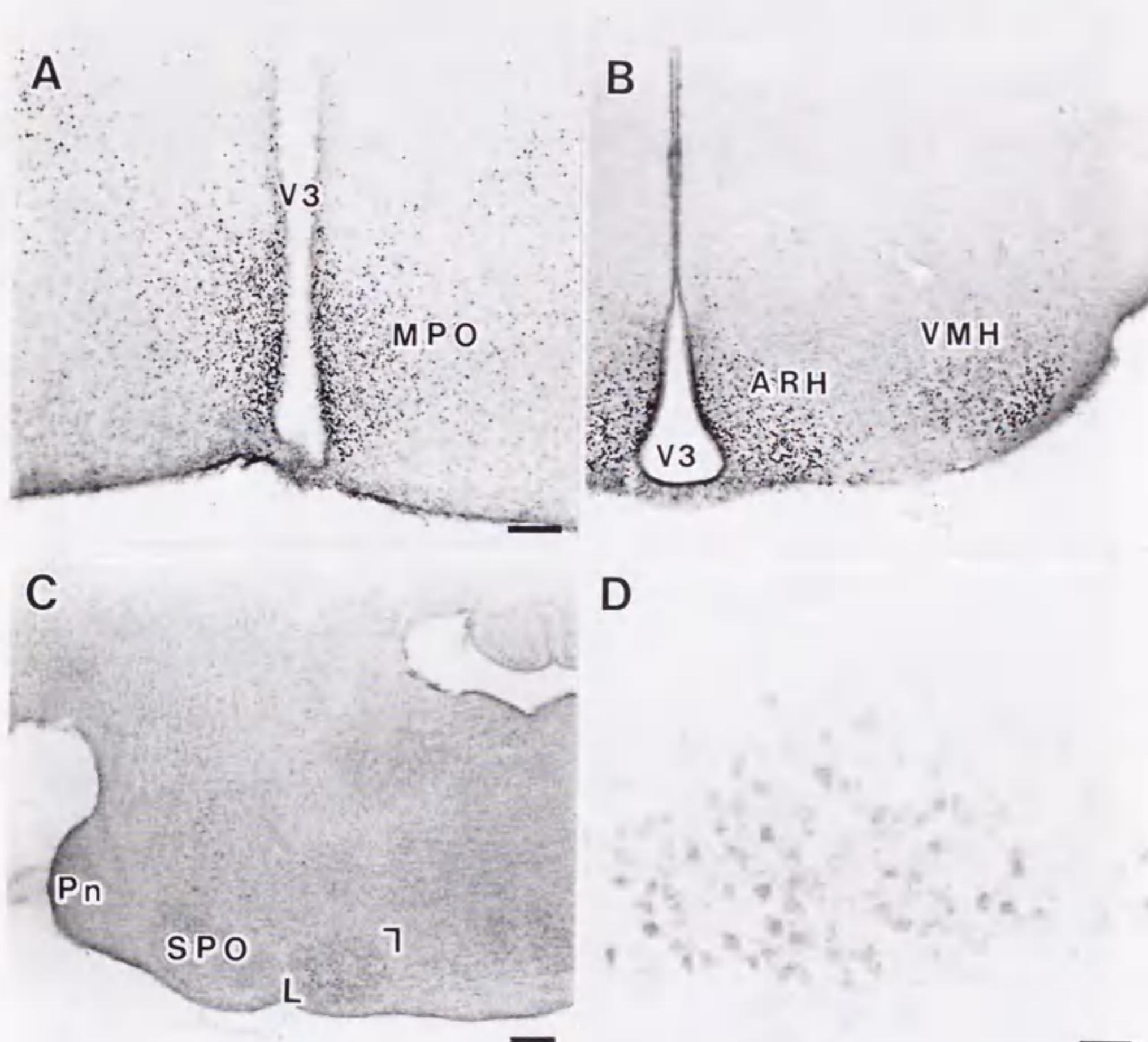


図4-3-1. 新生仔マウスの内側視束前野と視床下部におけるER-I Rの出現と顔面神経核における非出現

A: 生後7日齢雌マウスの、内側視束前野 (MPO) におけるER-I R (前額断)。B: 生後7日齢雌マウスの、視床下部腹内側核 (VMH) と弓状核 (ARH) におけるER-I R (前額断)。CとD: 生後7日齢雌マウスの、顔面神経核におけるER-I Rの非出現 (矢状断)。DはCの括弧で示した部位の拡大。内側視束前野や視床下部では新生仔ラットと同様にER-I Rが分布しているが、顔面神経核に特異的なER-I Rは観察されない。Scale bar in A = 100 μ m, C=200 μ m, D = 50 μ m.

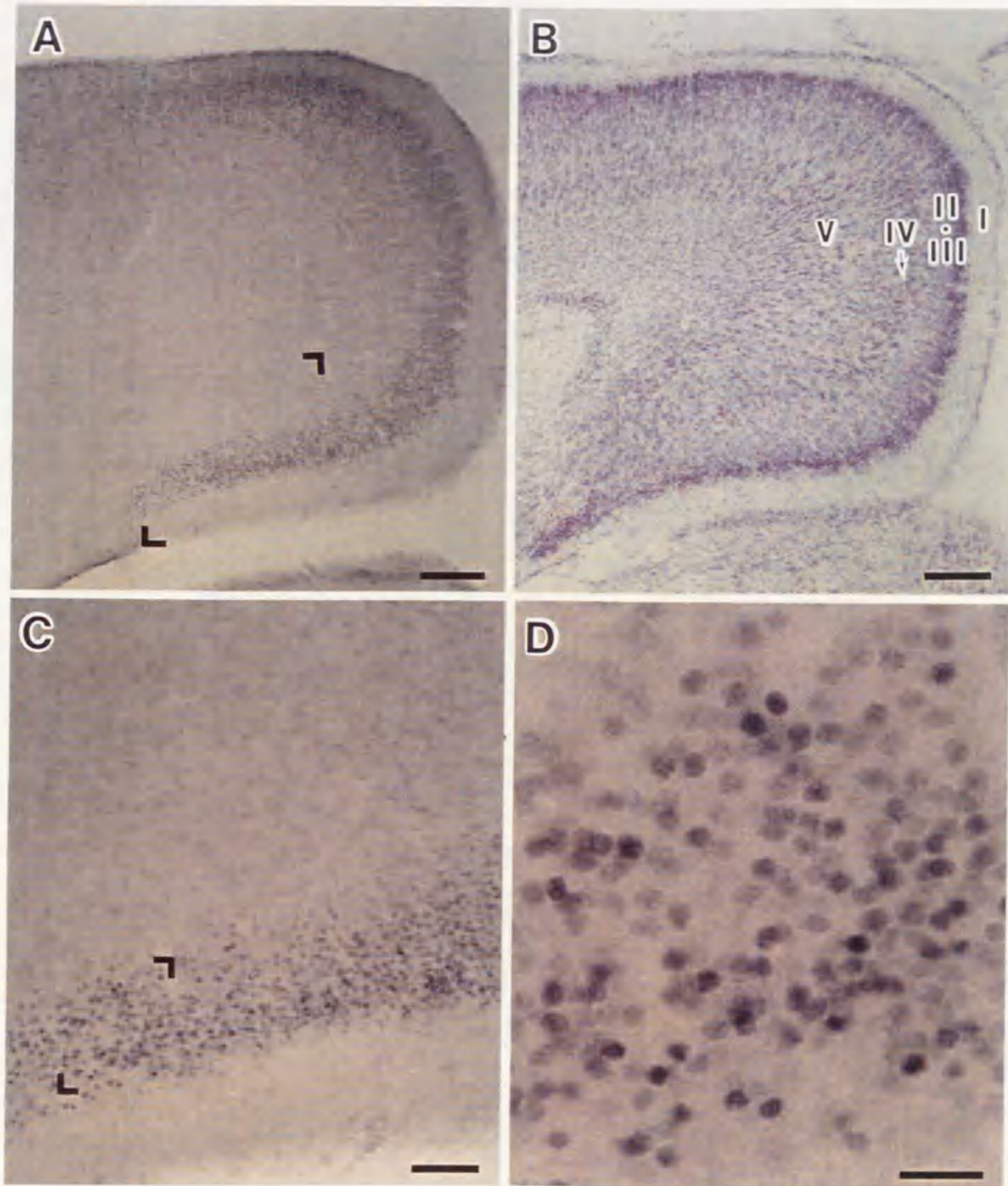


図4-3-2. 新生仔マウス的大脑皮質におけるER-IRの出現

A: 生後7日齢雌マウス的大脑膨大部後部皮質におけるER-IRの分布。B: Aの隣接切片をニッスル染色したもの。新生仔マウス的大脑皮質におけるER-IRは、大脑膨大部の第II-III層に出現している。CはAの括弧で示した部位の拡大。DはCの括弧で示した部位の拡大。ラット的大脑皮質と同様にER-IRは核内に出現している。Scale bar in A and B = 200 μ m, C = 50 μ m, D = 20 μ m

第5章
エストロゲン受容体とアロマテース含有神経細胞
の脳内分布

要旨

新生仔ラット（出生当日、生後5日齢、生後10日齢）および成体ラット（生後90日齢）の脳内における、ERとアロマターゼ（AROM）含有細胞の分布の関係を、二重免疫組織化学染色によって検討した。新生仔ラット脳において、ER免疫反応（ER-IR）とAROM免疫反応（AROM-IR）は、AMPN、中間部MPNの前部（MPN_{am}）、MPN後部の背側からBSTにかけての領域（MPN-BST）、VMH_{vl}およびMEAp_dで、重複して分布していた。なかでも、VMH_{vl}では多くのAROM-IR細胞にER-IRが共存している像が認められた。また、MPN-BSTでは、ER-IRとAROM-IRの出現性に明らかな性差を認めた。すなわち、濃く染まるER-IRは雌の方が雄より多く出現しているが、AROM-IRは雄の方が雌より濃い反応性を示していた。BSTとMEAp_d以外の領域で、生後発育にともなうAROM-IRの反応性の著しい低下が認められた。特に、AMPN、MPNの前半部、およびVMH_{vl}での低下が著しく、成体ラットのAMPNでは、AROM-IRはほとんど検出されなかった。これらの結果から、新生仔期に強いAROM-IRが観察されるAMPN、MPN_{am}、VMH_{vl}が、周生期の性ステロイドホルモンによって、性分化誘導作用を受ける重要な部分であることが示唆される。また、BSTおよびMEAp_dは、olfactory pathwayの一部として、一連の細胞群と考えることができる。したがって、生殖行動の発現に重要な役割を持つolfactory pathwayも、周生期のアンドロジェンからアロマターゼによって局所産生されるエストロジェンによって、性分化誘導されている可能性が示唆される。

緒言

前章までに、新生仔雌ラットにアンドロジェン投与すると雄性化を誘導できること^(18, 19, 76, 79, 236, 237)、雄ラットを出生当日に去勢すると、雌性化することができること^(44, 79, 88, 137, 146, 148)、雌ラットにエストロジェンを投与してもアンドロジェン処置とほぼ同様の雄性化を誘導することができること^(3, 58, 62, 76)を述べてきた。一方、1970年代の初頭から、胎仔（児）や新生仔（児）の脳内に、アンドロジェンをエストロジェンに変換する芳香化酵素（アロマターゼ）活性が存在していることが示されてきた^(133, 134, 159, 160, 257)。さらに、アンドロジェンと共に抗エストロジェン剤を投与するとラットの雄性化が抑制されること⁽¹⁴⁷⁾、アロマターゼ活性の抑制剤

を新生仔雄ラットに投与すると雌性化が誘導されること^(37,149)、 5α -DHTには雄性化作用がないこと⁽¹³³⁾が示されてきた。これらの実験結果は、新生仔ラット脳内のアロマテースによって、血中アンドロジェンから脳で局所産生されるエストロジェンによって、ラット脳の性分化が調節されていることを強く示唆している。バイオアッセイやPCR法で、新生仔ラットの内側視束前野、視床下部、扁桃体を含んだ領域^(121,134)、および、胎仔マウスの間脳^(1,87)におけるアロマテース活性あるいはアロマテース mRNA の発現が報告されている。また、IHC でもいくつかの成体哺乳類（ウズラ^(14,15,65)、マウス⁽¹⁶⁾、ラット^(99,196)）で、脳内アロマテース含有細胞の分布が検討されている。最近では Shinoda et al.⁽²⁰⁹⁾ が、IHC で周生期ラットの内側視束前野、分界状床核、および扁桃体核群におけるアロマテース活性の出現を報告している。しかし、発育期の哺乳類の、脳内における ER とアロマテースとの解剖学的な関係を検討した例はない。前章までに、新生仔ラット脳内における ER-IR の分布を明らかにしてきた。しかし、「アロマテース仮説」（第1章を参照）による、哺乳類の脳の性分化機構を検討するためには、脳の性分化の臨界期における ER とアロマテース含有細胞との関係を明らかにする必要がある。

そこで、本実験では二重免疫組織化学染色によって、新生仔ラット脳内における ER とアロマテースの解剖学的な分布関係を明らかにし、ラット脳の性分化を誘導していると考えられる、血中アンドロジェンから局所産生されるエストロジェンの脳内の作用部位を検討した。

材料と方法

動物と組織の準備

実験には、26匹の、出生当日、生後5日齢、生後10日齢および生後90日齢の雌雄SDラットを用いた。動物の固定および脳切片の作製は、第2章に記載した方法で行った。

免疫組織化学染色 (IHC)

脳切片標本は、全て凍結マイクロトームで作製した。凍結マイクロトームで $40\mu\text{m}$ の連続浮遊切片を作製し、これを4群に分類して、(a) ER の IHC、(b) AROM の IHC、(c) AROM と ER の二重免疫組織化学染色、および (d) ニッスル染色に、それぞれ使用した。

(a)のERのIHCは、第2章に示した増感染色で、黒紫色に発色させた。(b)のAROMのIHCには、抗ヒト胎盤AROM抗体(R-8-1; Dr. Osawaより提供を受けた)⁽¹⁰⁸⁾を一次抗体として用いた。BSA-PBST (pH 7.4)で、R-8-1を3,000倍希釈し、この液に4℃で72時間反応させた。それ以外はERの単独IHCと同様の方法を用いて、茶色に発色させた。(c)のERとAROMの二重免疫組織化学染色も、基本的に第2章で示した方法によって行った。最初に、増感染色によってERを黒紫色に発色させ、発色反応後、標本を十分に洗浄する。洗浄後、一次抗体としてBSA-PBSTで3,000倍希釈した抗アロマテース抗体(R-8-1)に4℃で72時間反応させる。R-8-1への反応終了後、増感しない方法でAROMのIHCを行った(茶色に発色させる)。(d)のニッスル染色は、1%クレシル紫液を用いて行った。

ER-IRとAROM-IRの定量

出生当日(雌雄各3個体)、生後10日齢(雌雄各4個体)および生後90日齢(雌雄各3個体)について、図5-5AおよびBで括弧に示した位置で、AROM-IRの濃度を測定した。また、生後10日齢の雌雄ラット各3個体について、MPN-BSTを含む領域でのER-IR陽性細胞数を測定した。ER-IRの測定は、AROM-IRを測定した同側を用いて、fxより腹側の部位で、内側視束前核が完全に含まれる範囲(縦1,500 μm 、横1,000 μm)で行った。ER-IRの測定には、AROM-IRの濃度を測定した切片を挟んだ、前後2枚の連続したERのIHC標本を用いた。AROM-IRの濃度およびER-IR陽性細胞数の測定は、いずれも、ZEISS社製の顕微鏡と連動させたVIDASコンピュータシステムで行った。AROM-IRは、色調を256段階に分けて、バックグラウンドの色調とAROMの陽性反応の色調の差をその個体のAROM-IR濃度とした。日齢間および雌雄間の比較は、各日齢の各性別ごとの濃度の平均値を算出して、相対値として比較した。一方、ER-IRは、個体ごと(2枚の切片)の合計値を各個体のER-IR数とし、これを各個体における領域当たりのER-IR陽性細胞数として扱った。AROM-IR濃度の日齢間における差の検定と、ER-IR陽性細胞数の雌雄間における差の検定は、分散分析(Anova)で行った。また、AROM-IR濃度の雌雄差の検定は、Welch法で行った。何れの場合も、P値は0.05以下を有意差ありとした。

結果

ラット脳における ER-IR と AROM-IR の分布パターン

出生当日

出生当日のラットにおいて、AROM-IR含有細胞および神経線維は、ER-IR含有細胞の存在している部位と、同じか、あるいは非常に近い領域に分布していた。図5-4に要約して示したように、ER-IRとAROM-IRは、AMPN、中間部MPNの前部(MPNam)(図5-4のCに相当する位置)、MPNの後部の背側部からBSTにかけての部分(MPN-BST)(図5-4のE、Gに相当する位置)、BSTpr、VMHvlおよびMEApdで分布が重複していた。

視束前野領域では、まずAMPNにおいて、AROM-IR細胞および線維、ER-IRとも、AMPN内に納まるように分布していた(図5-1A)。それより後方、MPNamの位置では、AROM-IR、ER-IRともPVpoおよびMPNに分布していた(図5-1B)。この部位において、ER-IRがMPNのほぼ全域にわたって出現しているのに対し、AROM-IRは主にMPNの中間から内側部に分布していた(図5-4C vs. D)。これら、視束前野の領域では、AMPNに代表されるように、はっきりとしたER-IRとAROM-IRの共存像は認められなかった(図5-1D)。さらに後方、MPNcを含む位置では、ER-IRはMPN全体およびその背側部からBSTの腹側部にかけて分布しているのに対し、AROM-IRはMPNcを囲むようにMPNの背側部からBSTの腹側部にかけて分布していた(図5-1C、図5-4E vs. F、図5-7参照)。さらに、そのすぐ後方の位置では、AROM-IRはMPNの背側部からBSTprの腹側部にかけて(MPN-BST)の部分で、「ふさ状」に分布していた(図5-4G、図5-7、図5-10C)。同領域におけるER-IRは、MPNの腹側部およびMPNの背側部からBSTにかけて、このAROM-IRの「ふさ」の周囲部に分布していた。一方、このAROM-IRの「ふさ」の中心部におけるER-IRの反応性は、「ふさ」の周囲に出現しているER-IRに比べて弱い反応性を示していた。(図5-1C、図5-4G vs. H)。

視床下部領域では、ER-IR、AROM-IRともVMHvlとPVpに分布していた。また、VMHvlの前後軸におけるAROM-IR分布は、ER-IRと同様にVMHvlの吻側部から尾側部にかけての全範囲で認められた。一方、ARHにはAROM-IRの出現は検出できなかった。図5-2と図5-4

(IからLを参照) に示したように、VMHvlにおいてER-IRとAROM-IRは、ほぼ同じ部位に分布しており、ER-IRと同様にVMHvlの最後部でAROM-IRの出現もピークを示していた。また、VMHvlではER-IRとAROM-IRのはっきりとした共存像が多数認められた(図5-2D)。PVpの背側部でもAROM-IRの出現領域に、弱いER-IRが分布していた(図5-4M vs. N)。

扁桃核群では、MEApdでER-IRとAROM-IRの分布が、重複していた(図5-3D、図5-4O vs. P)。ER-IRが出現しているCOApには、AROM-IRはごく少数しか分布していなかった。出生当日の脳において、ER-IRおよびAROM-IRの分布部位に性差は認められなかった。

生後5日齢

生後5日齢ラットでも、基本的なER-IRおよびAROM-IRの分布パターンは、出生当日のラットと同じであった。しかし、出生当日に比べ、AROM-IRの反応性の低下が認められた。特に、AMPN、MPNam、およびVMHvlにおけるAROM-IRの反応性は、BSTprやMEApdなどの領域と比べて低下が顕著に認められた。

生後10日齢

生後10日齢ラットになると、AROM-IRの反応性は生後5日齢よりもさらに低下していた。生後5日齢ラットと同様、引き続き、AMPN、MPNam、およびVMHvl(図5-11)におけるAROM-IRの反応性の低下が認められ、AMPNおよびMPNamでは、出生当日に認められたような強いAROM-IRは検出できなくなっていた。

また、第3章で述べたように、生後10日齢ではMPNc(SDN-POA)の構築がはっきりしてくるが、図5-7に示したように、MPNc内には特異的なAROM-IRを認めることはできなかった。

一方、生後10日齢になるとMPN-BSTにおけるER-IRおよびAROM-IRの反応性に性差が認められるようになった。図5-5に示したように、MPN-BSTにおけるER-IRの反応性は雌(図5-5A、C)の方が、雄(図5-5B、D)よりも強いが、同領域のAROM-IRの反応性は、逆に雄の方が雌よりも強かった。

生後 90 日齢

成体ラットでは、ER-IR の出現性については出生当日のラットと大きな相異は認められないが、AROM-IR の出現領域は、雌雄とも出生当日と比べると、かなり限定されていた。図 5-10 B に示したように、AMPN ではほとんど AROM-IR を検出することはできなかった。また、MPN-BST における AROM-IR の「ふさ」も、出生当日に比べると極端に反応性が弱くなっていた (図 5-10 C vs. D)。VMHvl における AROM-IR も出生当日と比べると著しく減少しており、成体ラットではごく少数の陽性細胞しか認められなくなっていた (図 5-11)。一方、MEApd における AROM-IR は、出生当日と比較するとやや低下してはいるが、成体でも依然として強い反応性を示していた (図 5-10 E vs. F)。

また、成体ラットでも AROM-IR の反応性に性差が認められ、雄の方が雌よりも多くの AROM-IR が分布していた (図 5-12)。

AROM-IR および ER-IR の性差

AROM-IR および ER-IR の脳内における分布パターンは、雌雄ではほぼ同じであった。しかし、それらの反応性には性差が認められた。AROM-IR 濃度は、出生当日から雄の方が雌よりも高い傾向にあったが、その性差は生後 10 日齢以降の MPN-BST で顕著に認められた ($P < 0.05$) (図 5-6; 上のグラフ)。ER-IR 陽性細胞数は、第 3 章の実験でも示したように、雌の方が雄よりも高い傾向があった (図 3-10 参照)。このように、AROM-IR と ER-IR の出現性の性差には、雌雄で相反性が認められた。

図 5-5 に示すように、生後 10 日齢ラットの MPN-BST において、濃く染まる ER-IR の数は、雌の方が雄よりも多かった (第 3 章および図 3-11 参照)。これとは逆に、同領域における AROM-IR の反応性は、雄の方が雌よりも強かった。これらの関係を数値化したのが、図 5-6 の下に示したグラフである。図 5-5 で括弧で示した部位 (MPN の背側部) における AROM-IR の濃度 (相対値) は、雄の方が雌に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。逆に、この領域の周辺における ER-IR 陽性細胞数は、雌の方が雄よりも多かった ($P < 0.05$)。

AROM-IR および ER-IR の発現性の性差は、成体ラットでも認められた。雌雄の MPN-BST お

よびVMHvlにおける AROM-IR の出現性を、図 5-12 で比較して示した。MPN-BST では生後 10 日齢と同様に (図 5-5 参照)、AROM-IR の出現性は、雄の方が雌に比べて明らかに高かった。VMHvl における性差はさらに顕著で、雌ではほとんど AROM-IR を認めることはできなかった。一方、ER-IR の出現性の雌雄の関係は、生後 10 日齢と同様に AROM-IR とは逆で、雌の方が雄よりも多数出現していた。

一方、成体でも依然として強い AROM-IR が認められる MEApd では、MPN-BST や VMHvl ほど明瞭な性差は認められなかった。

AROM-IR と ER-IR の同一細胞内共存関係

AMPN (図 5-1A) をはじめ、MPNam、MPN-BST (図 5-3B) および MEApd (図 5-3D) では、いくつかの細胞で、ER-IR と AROM-IR の同一細胞内共存像が認められた。これに対し、VMHvl では多くの AROM-IR 陽性細胞に ER-IR の共存が認められた (図 5-2D)。

大脳皮質第 V 層および顔面神経核内側亜核

第 4 章で示したように、新生仔期の 大脳皮質第 V 層および顔面神経核内側亜核に、一過性に ER-IR の出現を認めた。本実験で、生後 10 日齢の雌雄ラットで大脳皮質領域を、また出生当日から生後 10 日齢の雌雄ラットで顔面神経核について、それぞれ AROM-IR の検討を行った。しかし、両領域に、雌雄とも、いずれの日齢においても AROM-IR を検出することはできなかった (大脳皮質: 図 5-8、顔面神経核: 図 5-9)。

考察

ER および AROM それぞれの IHC、および ER と AROM の二重免疫組織化学染色を行って、新生仔ラット脳内における ER とアロマターゼ含有細胞との分布関係を検討したが、本実験で得られた所見をまとめると次のようになる。

(1) 出生当日および生後 5 日齢ラットでは、AMPN、MPNam、MPN-BST、BSTpr、VMHvl、および MEApd で、ER-IR と AROM-IR の分布が重複していた。さらに、これらの部位のいくつか

の細胞では、ER-IR と AROM-IR の同一細胞内共存像が認められた。特に、VMHvl では多くの AROM-IR に ER-IR が共存していた。

(2) 概して ER-IR の反応性は雌の方が雄よりも強いが、AROM-IR の反応性は、逆に雄の方が雌よりも強かった。生後10日齢以降のMPN-BST でこの性差が顕著に認められた。

(3) 生後発育にともない、脳内における AROM-IR の反応性は低下するが、そのパターンは次の2群に分けられ。

I: 新生仔期の初期（出生当日、生後5日齢）まで強く出現しているが、生後発育にともない完全に消えてしまうか、あるいは劇的に減衰する部位=AMPN、MPNam、VMHvl。

II: 出生当日に比べると反応性は減少するが、成体においても、引き続き強い反応性を示す部位=MPN-BST、BSTpr、MEApd。

1) I: AMPN、MPNam、および VMHvl について

AMPN、MPNam、および VMHvl における AROM-IR の発現性は、新生仔と成体では著しく異なっていた。上述したように、これらの領域では、出生当日では雌雄とも強く発現している一方、成体ではわずかに陽性細胞を認めるだけになる。特に、AMPN と MPNam における AROM-IR の出現は、出生当日および生後5日齢でのみ反応を認めるだけで、生後10日齢においてはほとんど検出されなくなる。

成体ラットにおいて、AMPN や MPN は GTH 分泌に対するエストロジェンのポジティブ・フィードバック作用部位と考えられている^(75,177,238)。また、新生仔雌ラットにアンドロジェンあるいはエストロジェンを投与すると、LH 分泌に対するエストロジェンのポジティブフィードバック作用が消失するが⁽³⁰⁾、この現象を誘導する効果は生後1週間までである。したがって、この生後1週間までが、ラット脳の性分化の臨界期と考えられている⁽¹⁰⁴⁾。一方、新生仔雄ラットを去勢すると、成熟後にエストロジェン処理することで LH 分泌に対するポジティブ・フィードバックを誘起する事ができる^(42,104)。従って、雄ラットの場合、周生期に精巣由来のアンドロジェンから転換されたエストロジェンが脳に作用することで、本来備わっているはずの LH に対するエストロジェンのポジティブ・フィードバック効果が失われると考えられている。

一方、オピオイドペプチドおよびカテコールアミンによる神経伝達機構がGTH分泌を制御していることが知られている。形態学的にも、AMPNあるいはMPNにオピオイドペプチド含有細胞や線維、およびカテコールアミン含有細胞の分布が認められている。さらに、出生当日から生後10日齢にかけて、雌ラットにオピオイド・アンタゴニストを投与すると、エストロジェンが誘導するLH分泌のポジティブ・フィードバック作用が抑制されることが報告されている⁽¹²⁴⁾。さらに、Simerly et al.^(217, 220)は、新生仔期に性腺を摘出したり、テストステロン処理を行うと、この領域におけるプロエンケファリン前駆物質含有細胞、およびチロシン水酸化酵素免疫陽性細胞の発現状態が変化することを報告している。

本実験で得られた、AMPNやMPNamにおけるAROM-IRの出現時期も、ラット脳の性分化の臨界期と一致している。従って、出生後の数日間のみAROM-IRが強く出現しているAMPNあるいはMPNamにおいて、雄ラット脳では、血中に大量に存在するアンドロジェンからエストロジェンが大量に局所産生され、これがオピオイドおよびカテコールアミンのシステムを修飾することで、本来備わっているはずのGTH分泌に対するエストロジェンのポジティブ・フィードバック機構を破壊していると考えられる。

VMHvlは、摂食行動、攻撃行動、生殖行動および下垂体ホルモンの制御に深く関与していることが知られている。そして、これらの行動や分泌パターンには、明らかな性的二型が認められている。Matsumoto and Arai⁽¹⁴⁴⁾は、形態学的にVMHの大きさが雄の方が雌よりも大きいことを報告している。また、VMHvlにおけるシナプス数は雄の方が雌より多いが、新生仔期にアンドロジェン処理した雌と新生仔期に去勢した雄とを比較すると、アンドロジェン処理した雌の方が去勢した雄よりも、シナプス数が多くなることを示している。彼らはさらに、生後7日に去勢した雄ラットと無処置の雄ラットの成熟後のVMHの大きさに差は認めないが、出生当日に去勢すると明らかにVMHの大きさは雌レベルになることを示している。本実験でも、出生当日では強いAROM-IRが認められるのに対し、生後5日齢ではすでに反応は著しく減衰しており、生後10日齢では少数のAROM-IR含有細胞しか観察されない(図5-10)。従って、VMHvlも、AMPNやMPNamと同様、出生後の早期にアンドロジェン由来の局所産生エストロジェンの作用を受けることで、形態的および機能的な性差が生じ、行動やホルモン分泌パターンに性差を誘

導しているものと考えられる。

2) II: MPN-BST、BSTpr、MEApdについて

第3章において、生後10日齢以降のMPN-BSTでは、ER-IRの出現性に明らかな性差があることを示したが(図3-11参照)、本実験によって、同領域ではAROM-IRの出現性にも性差があることが分かった。AROM-IRに見られる性差は、ER-IRの性差とは逆で、雄の方が雌よりも高くないという関係であった。この結果は、MPN-BSTにおいて、雄の方が雌にくらべて局所産生されるエストロジェンが多いため、大量のエストロジェンが雄におけるER-IRの出現を抑制していることを示唆している。第3章で示したように、新生仔ラットにアンドロジェンを投与するとER-IRを低下させることができる。また、新生仔期の血中アンドロジェン濃度は、雄の方が雌に比べ有意に高いことが知られており(44, 60, 115, 116, 256)、さらにラット脳では、アンドロジェンがアロマターゼ活性を上昇させることが確かめられている(193)。したがって、雄新生仔の場合、血中のアンドロジェン値が高いためこれがアロマターゼの活性を高め、一方で高まったアロマターゼ活性によってアンドロジェンから大量のエストロジェンが局所産生される。結果的に、雄のMPN-BSTの方が雌よりもエストロジェン値が高くなるため、雄のER-IRは雌に比べて抑制されるものと考えられる。さらに、これらの作用は生後1週間がピークのため、出生当日や生後5日齢よりも、それを過ぎた生後10日齢で性差が顕著になるものと思われる。

電気生理学的にも形態学的にも、MPN_{am}とMEApdが、BSTを介して互いに線維連絡していることが証明されている(35, 54, 105, 106, 218, 219)。一方、MEApdは副嗅球(AOB)からの投射を多く受ける部位である。したがって、MEApd、BSTpr、およびMPNの背側部は、副嗅覚系の一連の細胞群と考えることができる(29)。Segovia and Guillaumon(200)はその総説の中で、これら一連神経核には、全て形態学的に性的二型が認められ、olfactory pathwayの一部として機能的にも生殖行動やGTH分泌の制御に重要な部位であることを示している。したがってAROM-IRは、MEApdと内側視束前野や視床下部を結んでいる、olfactory pathwayに属する一連の細胞群に沿って分布しているといえる。

BSTprは、形態的に雄の方が雌よりも大きいことが知られている。新生仔雄を去勢したり、新生

仔雌にアンドロジェンを投与することで、成体におけるBSTprを構成する細胞数を制御できることから、この部位の形態学的な性差は、周生期におけるアンドロジェン作用依存性であると考えられている⁽⁴⁸⁾。また、この部位は雌ラットのGTH分泌および雄ラットの生殖行動調節にとっても重要な部位と考えられている。Beltramono and Taleisnik⁽²¹⁾は、雌ラットのBSTprに相当する部位 (lateral part of the BST) を発情前期に電気刺激すると、LHサージを誘導できることを示している。さらに、Valcouter and Sachs⁽²⁵⁰⁾は、雄ラットでこの部位を破壊すると、雄型性行動の発現が抑制されることを報告している。

MEApdも、形態的な性的二型が認められる生殖機能にとって重要な部位である。Nishizuka and Arai⁽¹⁶⁴⁻¹⁶⁷⁾は、雄ラットの扁桃体内側核 (MEApdに相当する部位) は雌ラットのそれよりも大きいことを示し、さらに、出生当日に雄を去勢すると、正常の雌レベルにしかないことを報告している。また、Beltramono and Taleisnik⁽²⁰⁾は、MEApdに相当する部位を電気刺激するとLHの分泌が上昇することを示している。

成体ラットにおいて、BSTprおよびMEApdは、コレシストキニン(CCK)免疫陽性細胞の分布部位とよく一致する⁽¹⁵¹⁾。CCKを内側視床前野にインプラントすると、下垂体前葉からのホルモン分泌を促進したり⁽¹⁰⁷⁾、雌ラットのロードーシス発現を促進する⁽¹³⁾ことが報告されている。さらに、これらの領域におけるCCK含有神経細胞の出現には性的二型が認められている⁽²¹⁵⁾。成体ラットのMEApdにおけるCCK免疫陽性細胞は、性周期の全ステージにおける雌と比べても雄の方がより多く出現している。さらに、新生仔雌にテストステロンを投与したり、出生当日に雄を去勢したりすると、この雌雄の関係を逆転させることができる⁽²¹⁵⁾。

Kendrick and Drewett^(105,106)は、雄ラットを去勢するとMEApdからMPNに投射する神経の絶対不応期が延長し、これにアンドロジェンあるいはエストロジェンを投与すると絶対不応期が短縮することを報告している。さらに、同じ実験で、 5α -DHTを投与しても絶対不応期の短縮は起こらなかった報告している。これらから、成体雄ラットのMEApdやMPNでは、アンドロジェンからアロマターズで局所産生されたエストロジェンが作用して、嗅覚情報の神経伝達を活性化しているのではないかと考えられている。

以上から、MPN-BST、BSTpr、MEApdにおいてER-IRとAROM-IRの分布が重複している生

物学的意義として以下のような事が考えられる。

(1) 新生仔期 (図5-13A) : この時期すでに雌雄で血中アンドロゲン値に性差あるため、アロマターゼ活性が存在する部位におけるエストロジェンの作用量に性差が生じる。エストロジェンは、ERを含んだアロマターゼ含有細胞あるいは、その周辺のER含有細胞に作用して、オピオイドペプチド、カテコールアミン、CCKなどの神経伝達物質を産生する神経細胞の性質やシナプス形態に対してorganizationalな作用を及ぼす。作用するエストロゲン量に性差があるため、神経伝達物質の性質およびシナプス形態に性差が生じる。このとき、線維連絡のある神経核は、投射する神経線維を介して互いに影響を及ぼし合うと考えられる。例えば、ARHにアロマターゼは存在しないが、VMHvlやMPNから投射を受けているため、ARHにおけるシナプス形態やARHの神経細胞に、VMHvlやMPNで受けたエストロジェンの影響が及ぼされるのではないだろうか。

(2) 成体 (図5-13B) : MPNの背側部、BSTpr、MEApdにおいては、成体脳でもエストロジェンがアンドロゲンから局所生産されていると考えられる。卵巣を有する雌は、血中に存在する遊離エストロジェンが直接これらの神経核に作用することで、一方、精巣を有する雄ではアロマターゼでアンドロゲンから局所生産されたエストロジェンがこれらの神経核に作用することで、CCKなどの神経伝達物質の産生調節が行なわれ、脳内における嗅覚情報伝達の活性化を誘導し、雌雄それぞれの生殖行動の賦活化が行われているものと思われる。一方、AROM-IRの出現に性差が認められる視床下部では、作用するエストロジェンの量によって雌雄それぞれに特有な反応が誘導されていると考えられる。

3) AROM-IRとER-IRの同一細胞内共存関係について

新生仔ラット脳において、AROM-IRとER-IRの分布が重複していた部位の中で、VMHvlでは多くの共存像が認められた (図5-2)。これに対し、その他の部位では、いくつかの細胞では共存が認められたが、VMHvlほど両者の一致は認められなかった。これらの結果から、VMHvlでは、アンドロゲンからのエストロゲン産生と、それに引き続くエストロジェンのERへの作用が、同一の細胞で行なわれていると考えられる。これに対し他の領域では、エストロジェン

の局所産生と、産生されたエストロジェンのERへの作用は、それぞれ異なった細胞で行われていることが示唆される。この差が、生理学的にどのような意味を持つのかは不明である。しかし、エストロジェンは脂溶性ステロイドホルモンであるため、細胞膜および細胞質内を容易に通過することができる。したがって、局所産生されたエストロジェンがER含有細胞に作用するために、必ずしも同一細胞内でアロマターゼとERが共存する必要性はない。ERの近くでエストロジェンが局所産生されれば、拡散によってエストロジェンは十分にその周囲のERに作用することができると考えられる。VMHvl比べてER-IRが広い範囲に分布している視束前野では、同一細胞内にERが共存しないことで局所産生したエストロジェンの拡散が容易となり、広い範囲にエストロジェンが供給できているのかも知れない。

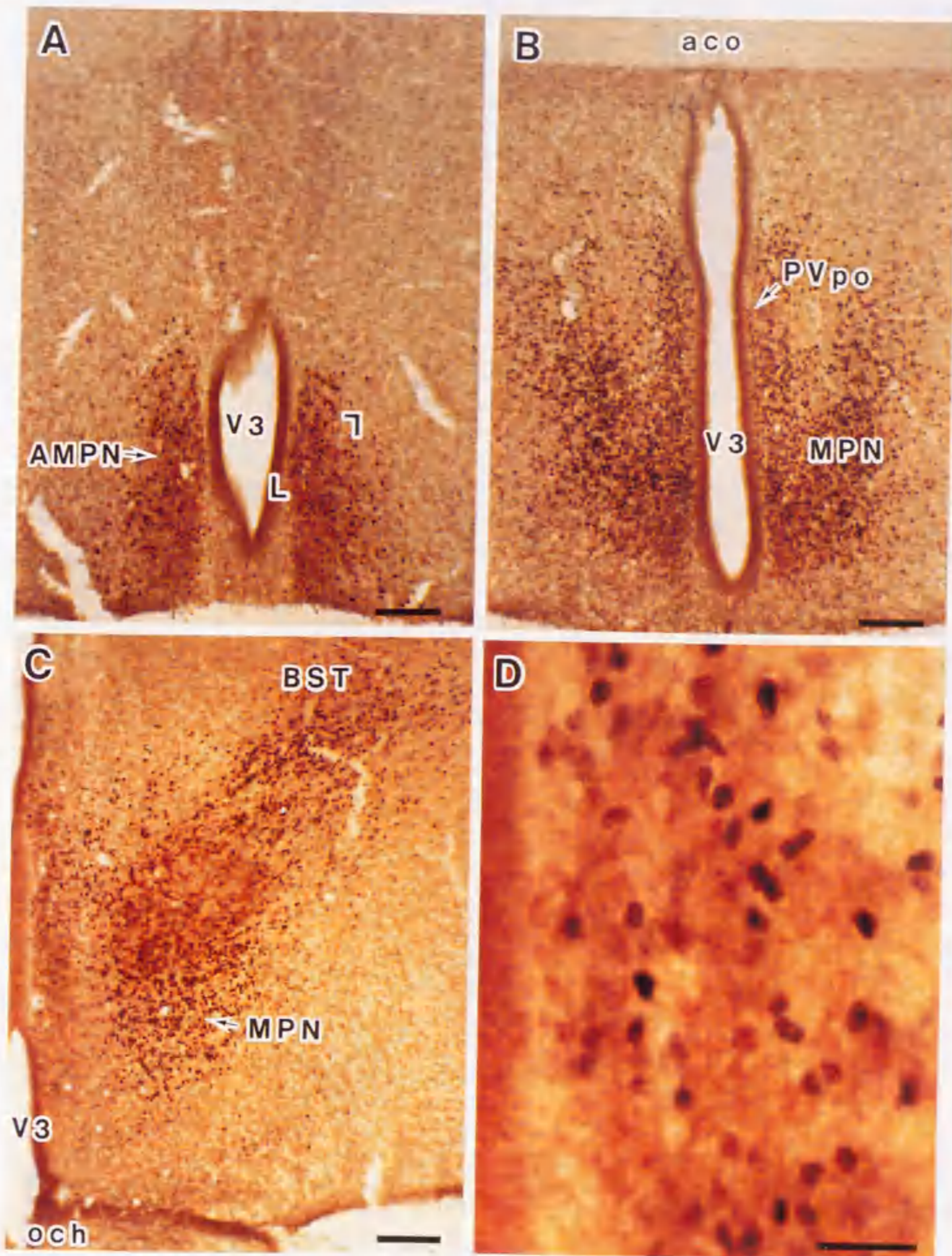


図5-1. 出生当日雄ラットの視束前野部位におけるAROM-IRとER-IRの分布
 A: 前内側視束前核 (AMPN) におけるAROM-IRとER-IRの分布。B: 脳室周囲核
 の視束前野部 (PVpo) および内側視束前核 (MPN) の中間部におけるAROM-IRと
 ER-IRの分布。C: MPNおよび分界状床核 (BST) の腹側部におけるAROM-IRと
 ER-IRの分布。D: Aの括弧で示した部位の拡大。他の略語は「略語一覧」を参照。
 Scale bar in A-C = 50 μ m, D = 25 μ m.

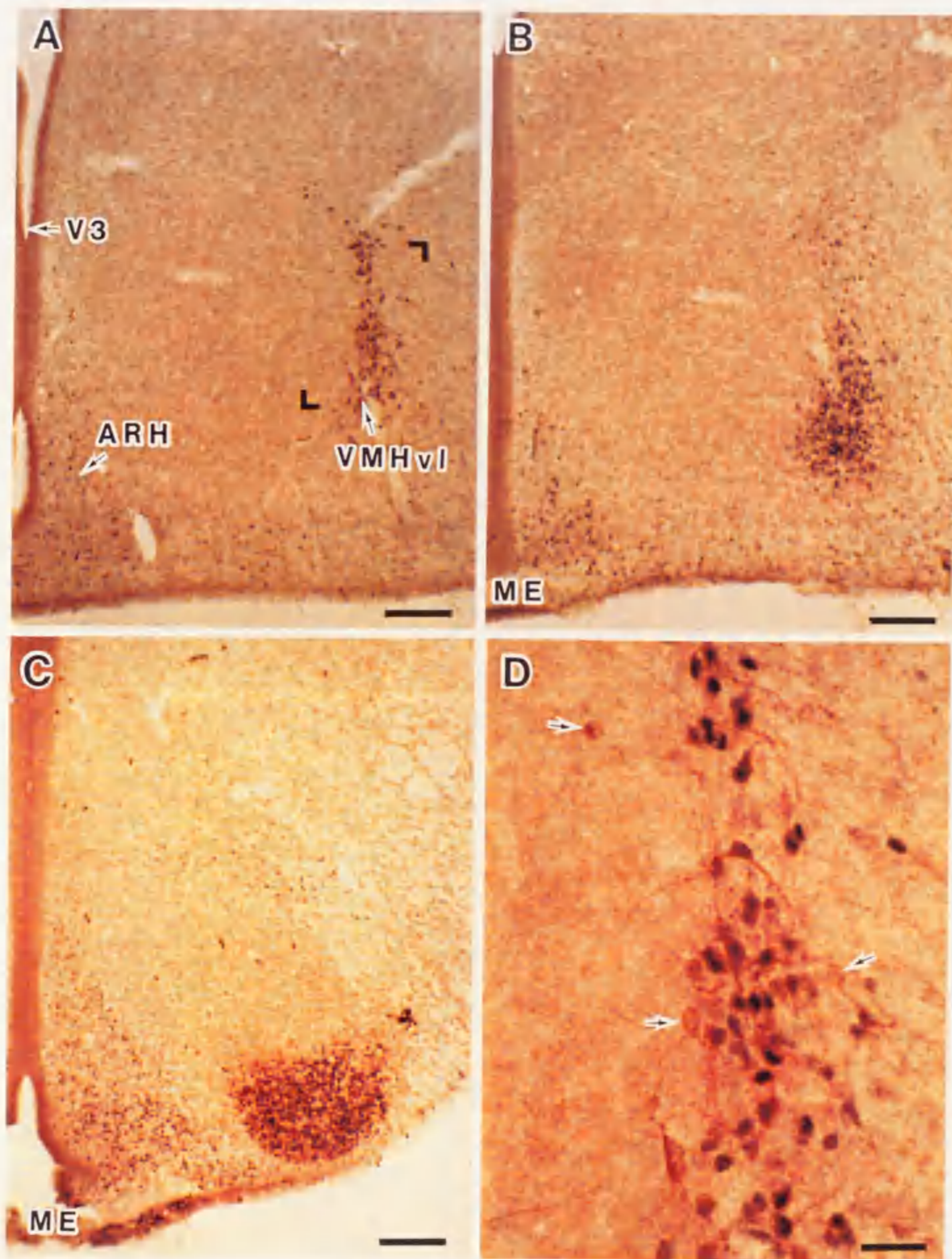


図5-2. 出生当日雄ラットの視床下部の後部領域におけるAROM-IRとER-IRの分布
 A: 視床下部腹内側核の腹外側部 (VMHvl) の前部および弓状核 (ARH) におけるAROM-IRとER-IRの分布の関係。B: VMHvlの中間部およびARHにおけるAROM-IRとER-IRの分布の関係。C: VMHvlの最後部およびARHにおけるAROM-IRとER-IRの分布の関係。いずれの位置においても、ARHにおけるAROM-IRの出現は認められない。D: Aの括弧で示した部位の拡大。ほとんどのAROM-IR陽性細胞にER-IRが含まれている。矢印はER-IRを含まないAROM-IR陽性細胞を示す。他の略語は「略語一覧」を参照。Scale bar in A-C = 50 μ m, D = 25 μ m.

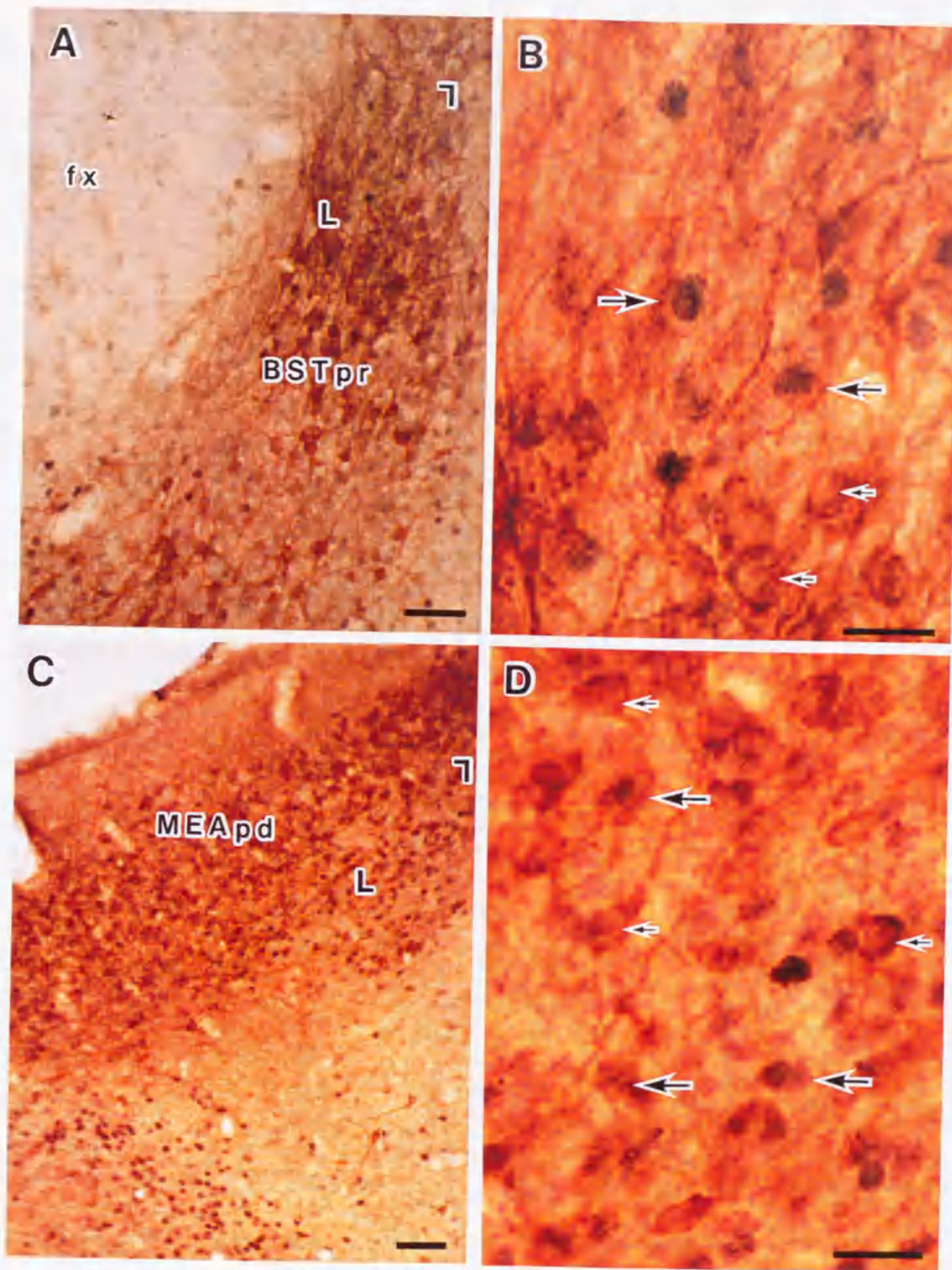


図5-3. 出生当日雄ラットの分界状床核および扁桃体におけるAROM-IRとER-IRの分布

AとB：分界状床核主部（BSTpr）におけるAROM-IRとER-IRの分布の関係。
 B：Aの括弧で示した部位の拡大。CとD：扁桃体内側核後背側部（MEApd）における
 AROM-IRとER-IRの分布の関係。D：Cの括弧で示した部位の拡大。B、Dに示し
 た大きい矢印はAROMとERの共存、小さい矢印はAROMのみの細胞を示す。

他の略語は「略語一覧」を参照。Scale bar in A, C = 50 μ m, B, D = 20 μ m.

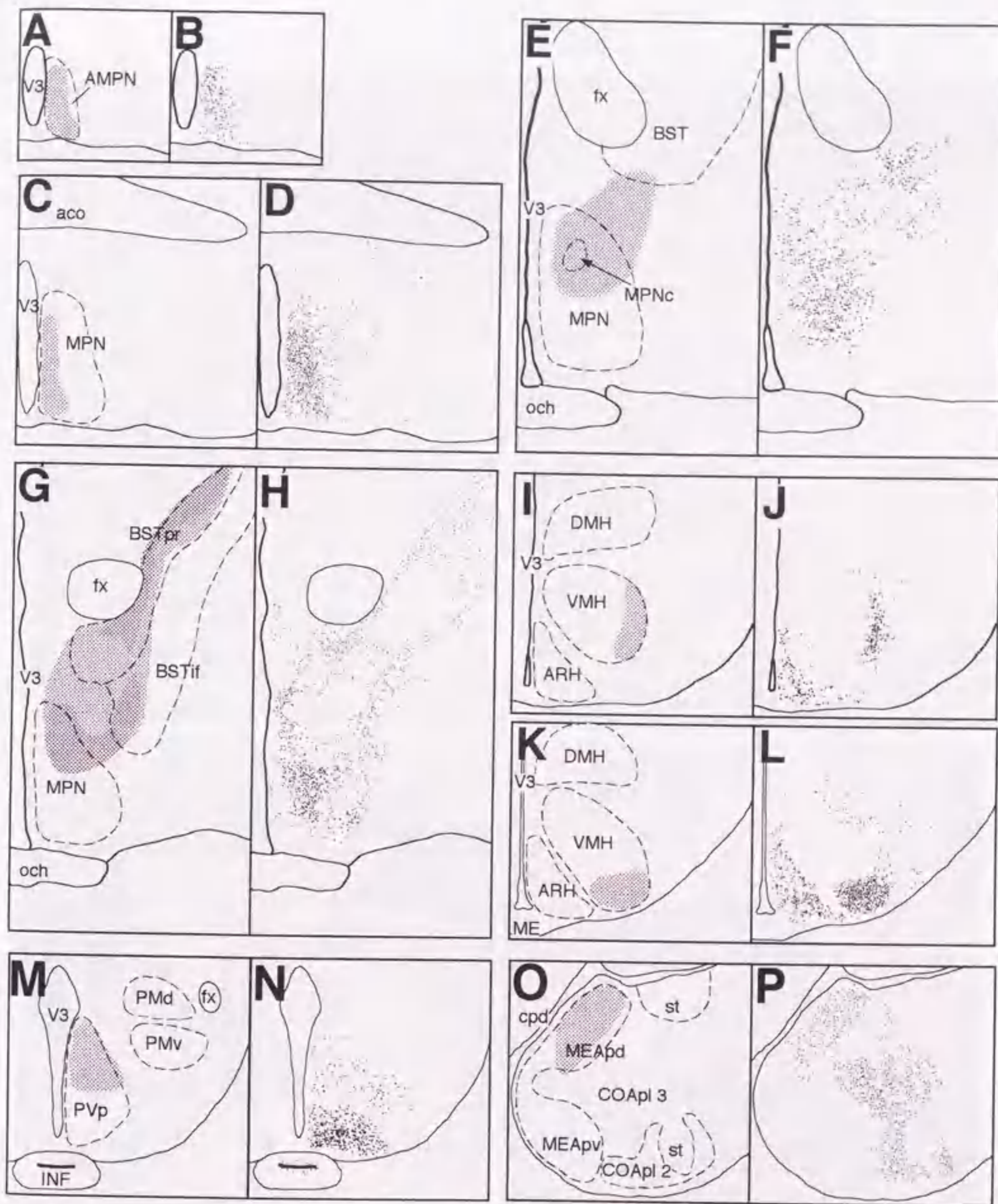


図5-4. 出生当日ラット脳におけるAROM-IRとER-IRの重複分布
 左カラム(A、C、E、G、I、K、M、O)はAROM-IRの分布領域。図中の網目がAROM-IRの分布領域を示す。Gにおける濃度の差は、出現濃度の違いを示す。右カラム(B、D、F、H、J、L、N、P)は同一部位のER-IR陽性反応の分布をしめす。AROMとERの二重免疫染色した標本から作製した。ER-IRの分布は二重染色した標本からCamera lucidaを用いて描いた。COApl 2およびCOApl 3は、それぞれ、扁桃皮質核後外側部の第2層および第3層を示す(文献234を参照)。図中のその他の略語は「略語一覧」を参照。

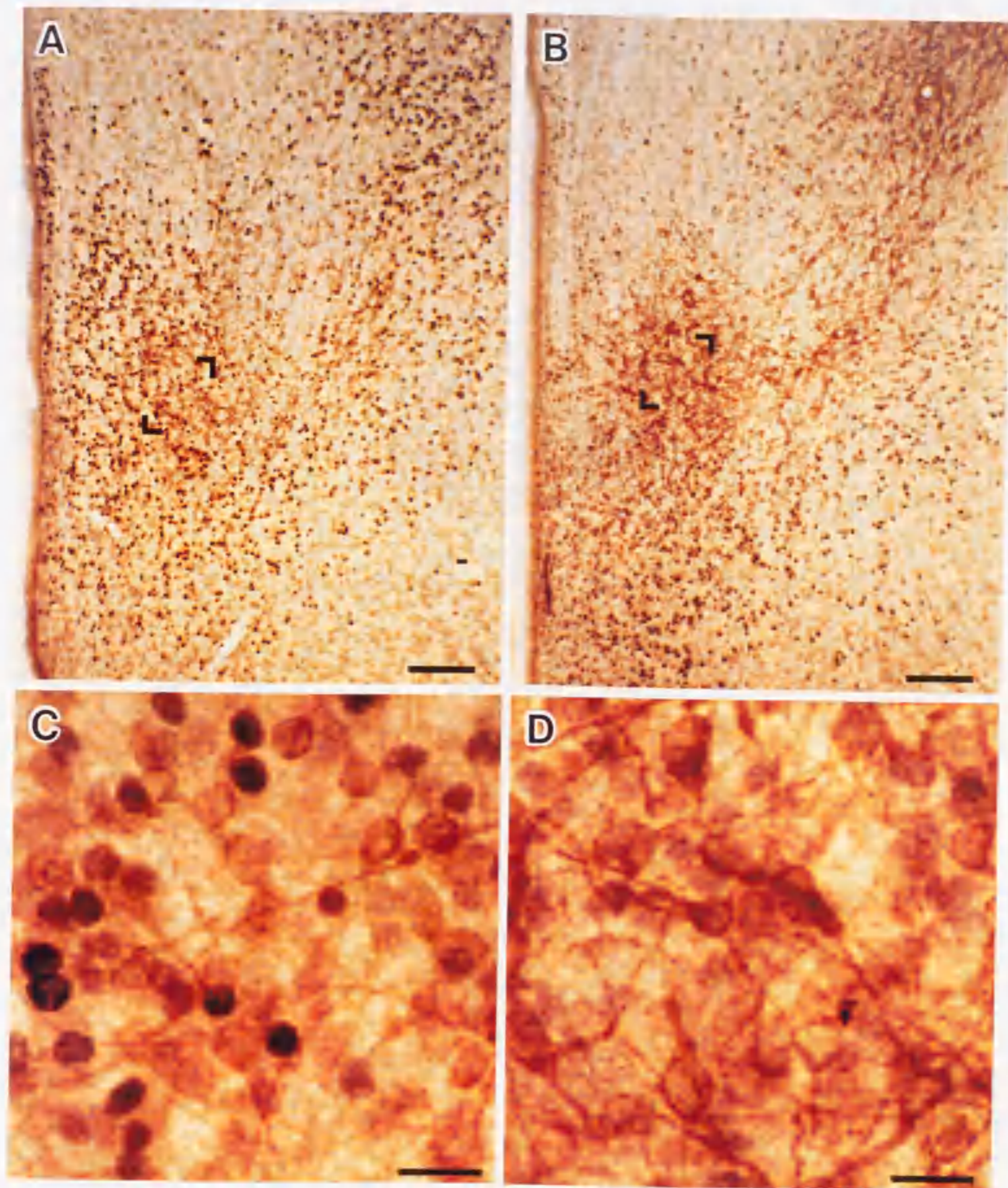


図5-5. 新生仔ラットにおけるAROM-IRとER-IRの反応性の性差
 生後10日齢ラットのMPN-BST（内側視束前核後部の背側部から、分界状床核の腹側部にかけての部位）におけるAROM-IR（茶色の反応物）とER-IR（黒い反応物）反応性の雌雄差。ER-IRは雌（AとC）の方が雄（BとD）より優勢だが、AROM-IRは雄（BとD）の方が雌（AとC）よりも優勢である。Scale bars: A and B = 50 μ m, C and D = 20 μ m.

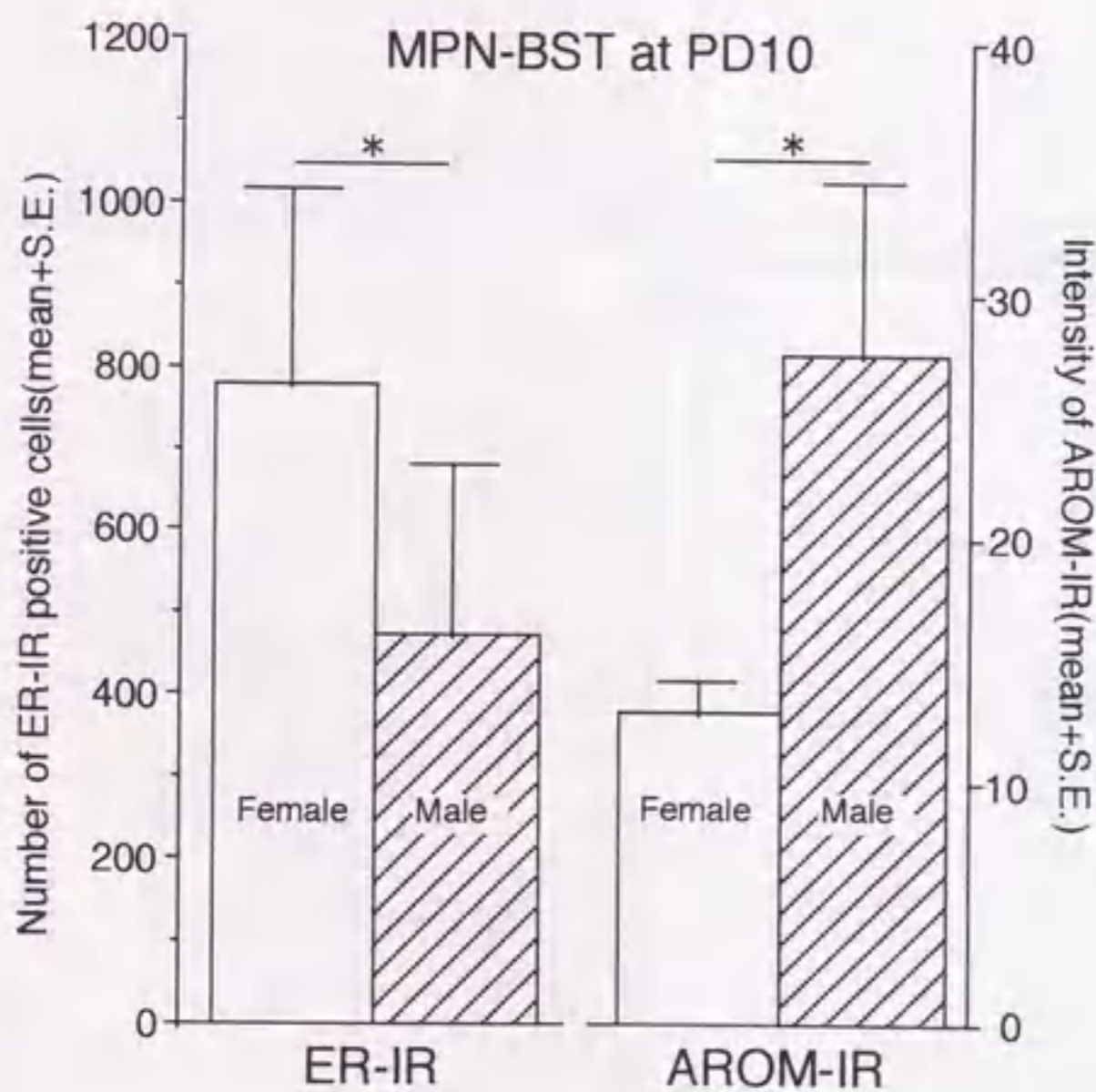
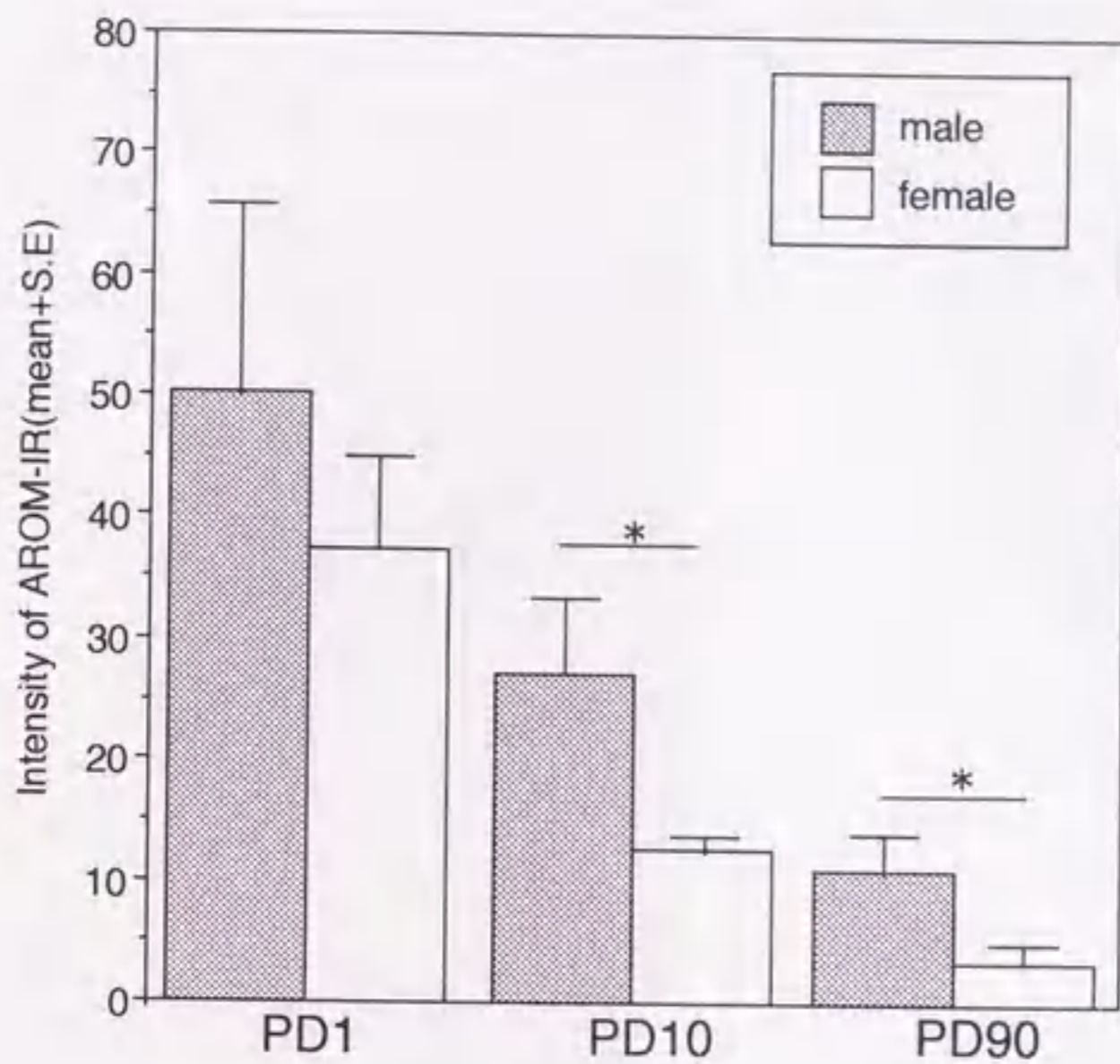


図5-6. MPN-BSTにおけるAROM-IR出現の発育に伴う変化と性差
 グラフ上: MPNの背側部 (図5-5の位置における括弧で示した部位) におけるAROM-IRの濃度 (相対値) の発育に伴う変化。AROM-IRは発育に伴い低下していた。また、出生当日では反応性に有意な性差は認められないが、生後10日齢および成体では雄の方が雌より濃い反応を示している。

グラフ下: 生後10日齢の雌雄ラットのMPN-BSTを含む領域における、ERとAROMの出現性の性差。ER-IRの数は、図5-5で示した領域の前後の切片におけるER-IR陽性細胞数の合計。AROM-IRは、グラフ上のPD10と同じデータ。ER-IRは雌の方が雄より多いが、AROM-IRは雄の方が雌より濃い反応を示す。

*統計的に性差が有意であった組 ($P < 0.05$)

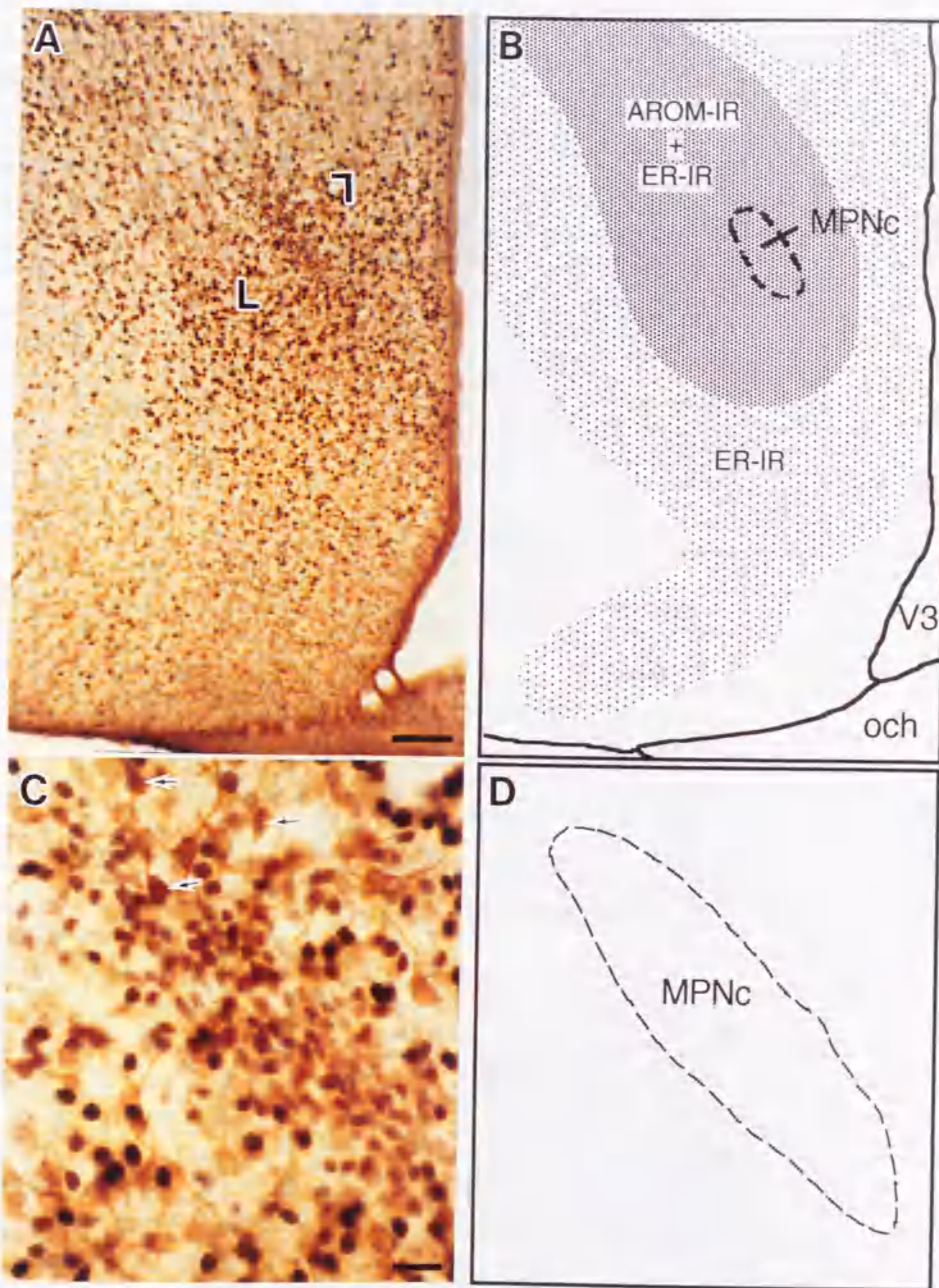


図5-7. 内側視束前核中心部 (MPNc) 周囲におけるAROM-IRとER-IRの分布
 A: 新生仔ラットのMPNc周囲におけるAROM-IRとER-IRの分布を、生後10日齢雌で示した。B: AにおけるAROM-IRおよびER-IRの分布領域を模式的に示す。AROM-IRはMPNc周辺を”ふさ”状に囲んで分布している。C: Aの括弧で示した部分の拡大で、写真中の矢印はAROM-IRとER-IRの共存を示す。MPNcに特異的なAROM-IRは認められない。また、ER-IRは、図3-9で示したようにMPNcにはごく薄い反応しか認められない。Dは写真Cのうち、MPNcの解剖学的な領域を示す。略語は「略語一覧」を参照。Scale bars: A = 100 μ m, C = 20 μ m.

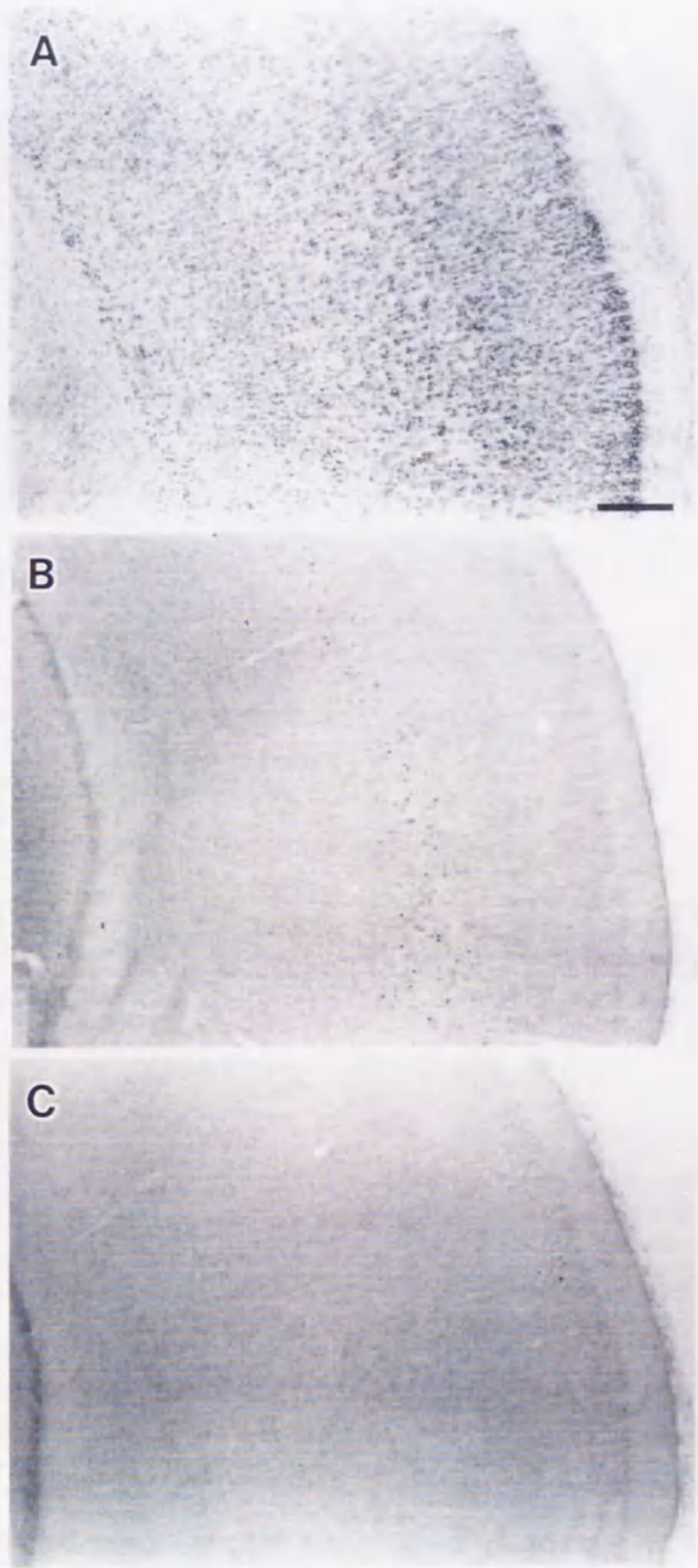


図5-8. 大脳皮質聴覚野におけるAROM-IRの非出現

A: ニッスル染色した生後10日齢雄の大脳皮質聴覚野。B: Aの隣接切片におけるER-IRの分布。第V層に限局してER-IRが帯状に分布している。(C) Bの隣接切片におけるAROMの免疫組織化学染色の結果。AROM-IRはどの層にも認められない。

Scale bar in A = 200 μ m.

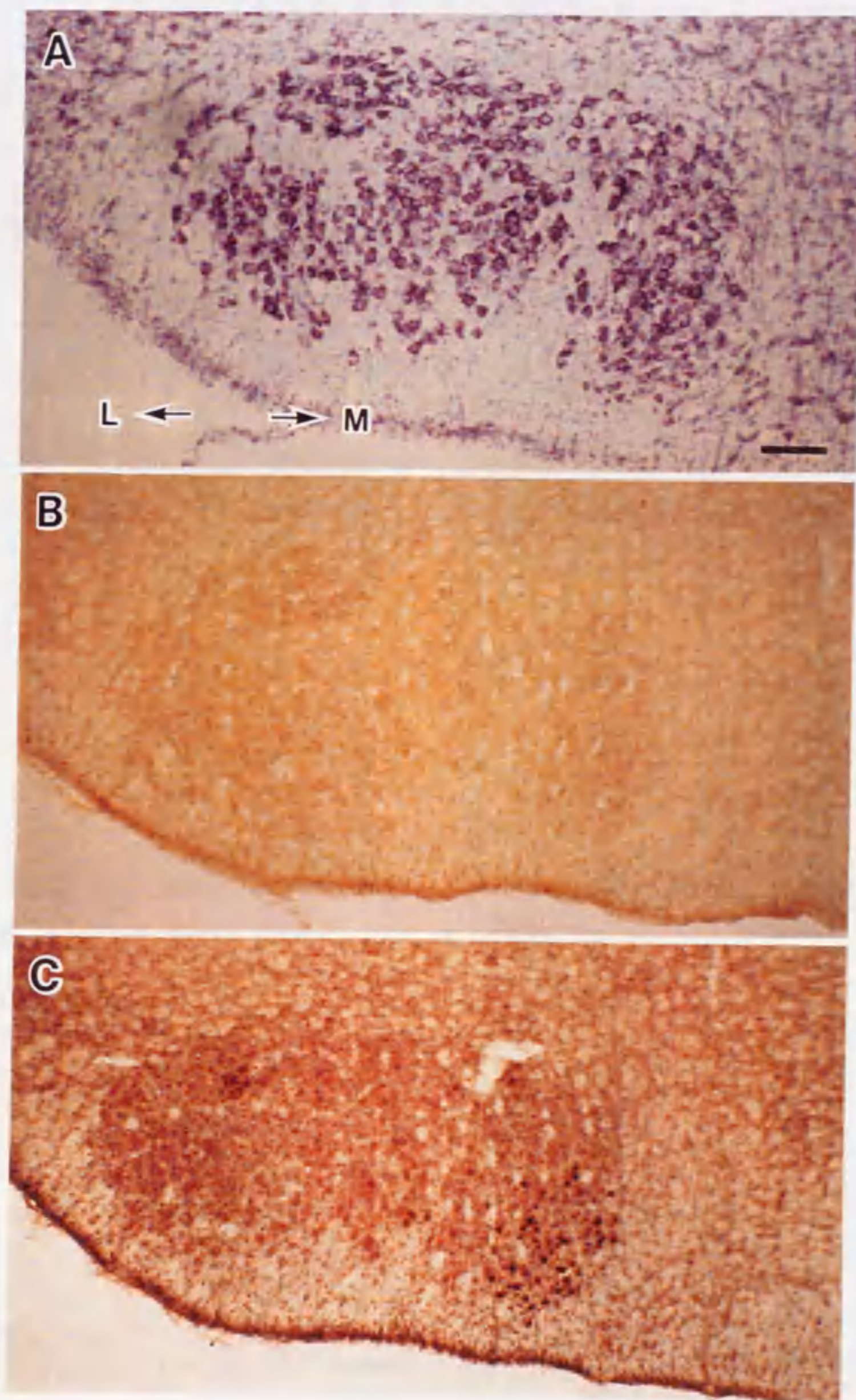


図5-9. 顔面神経核内側垂核におけるAROM-IRの非出現

A: 生後5日齢雄の顔面神経核を示す(ニッスル染色)。Lは外側方向、Mは内側方向。B: Aの隣接切片におけるAROMの免疫組織化学染色の結果。AROM-IRは認められない。C: Bの隣接切片におけるERとAROMの二重免疫染色の結果。ER-IRが内側垂核に出現しているが、AROM-IRは認められない。Scale bar in A = 100 μ m.

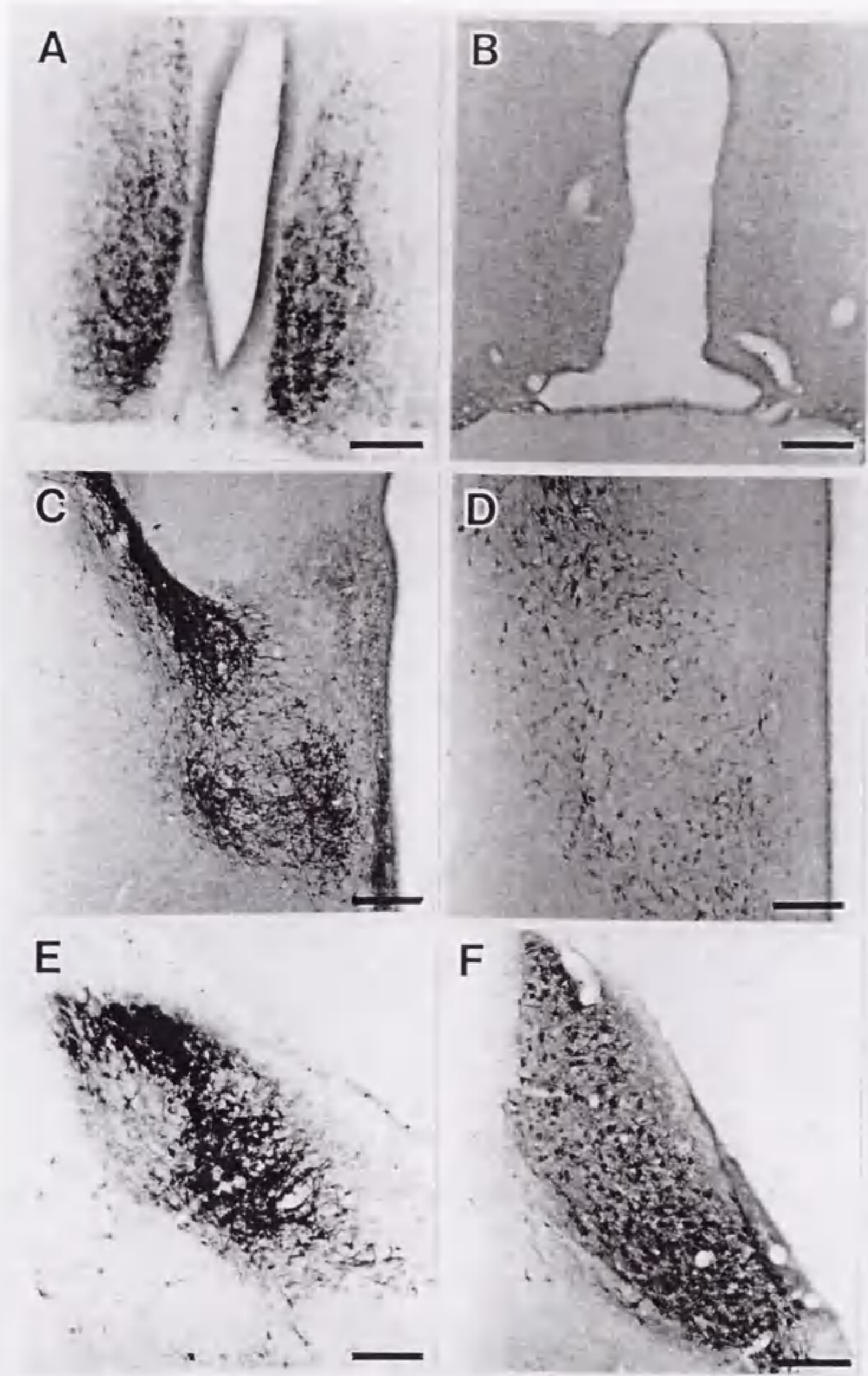


図5-10. 出生当日雄ラットと成体雄ラットの脳内AROM-IR出現の比較
 左カラム (A, C, E) は出生当日の雄ラット。右カラム (B, D, F) は生後90日齢の雄ラット。
 AとB: 前内側視束前核 (AMPN)。CとD: 内側視束前核の後部の背側部から分界状床核の腹側部
 にかけての部位 (MPN-BST)。”ふさ”状にAROM-IRが分布している。EとF: 扁桃体内
 側核の後背側部 (MEApd)。いずれの領域でも、出生当日に比べ成体でのAROM-IRの反応は
 弱くなっているが、AMPN (B) では殆ど消失しているのに対し、MEApd (F) では成体でも強
 い反応が認められている。

Scale bar in A = 100 μ m, B = 200 μ m, C = 200 μ m, D = 200 μ m, E = 100 μ m, F = 200 μ m.

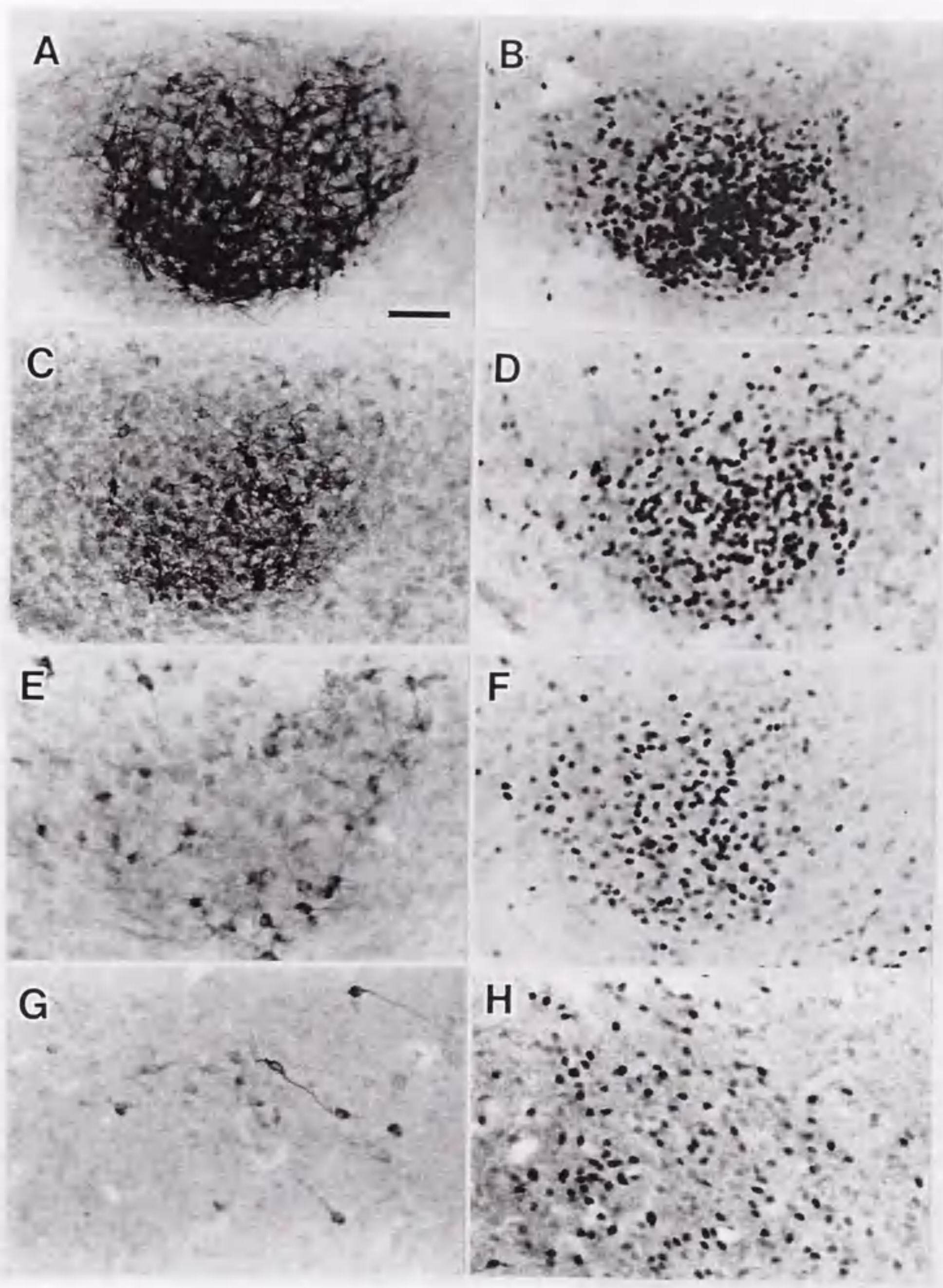


図5-11. 発生に伴うVMHv1におけるAROM-IRとER-IRの出現の変化
 上から、出生当日 (AとB)、生後5日齢 (CとD)、生後10日齢 (EとF)、生後90日齢
 (GとH) 雄ラットの、視床下部腹内側核の腹外側部 (VMHv1) における、AROM-IR
 (左カラム) およびER-IR (右カラム) の反応性の生後変化を示す。AROM-IR陽性細
 胞は、生後10日齢 (E) までに劇的に減少している。Scale bar = 50 μ m.

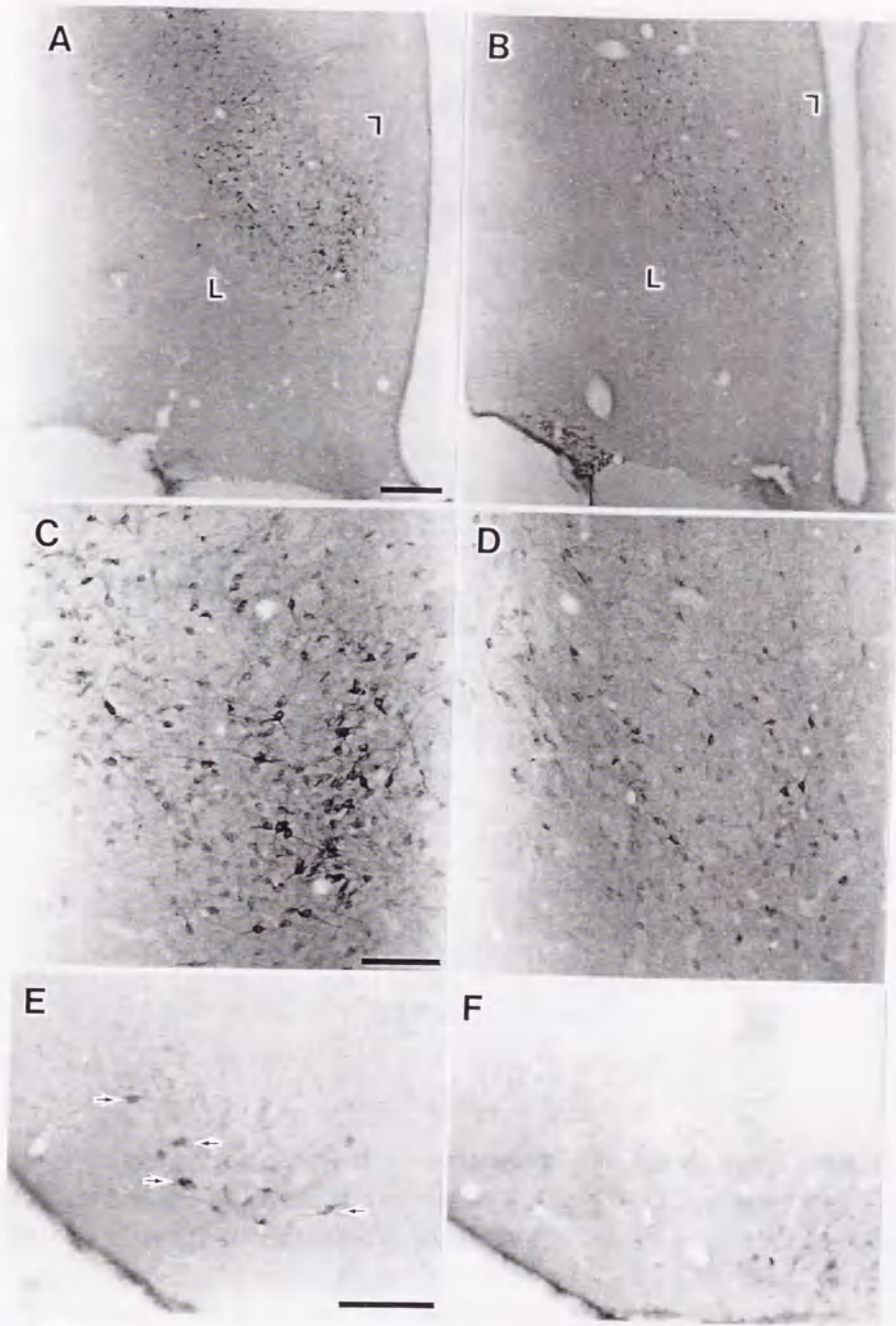
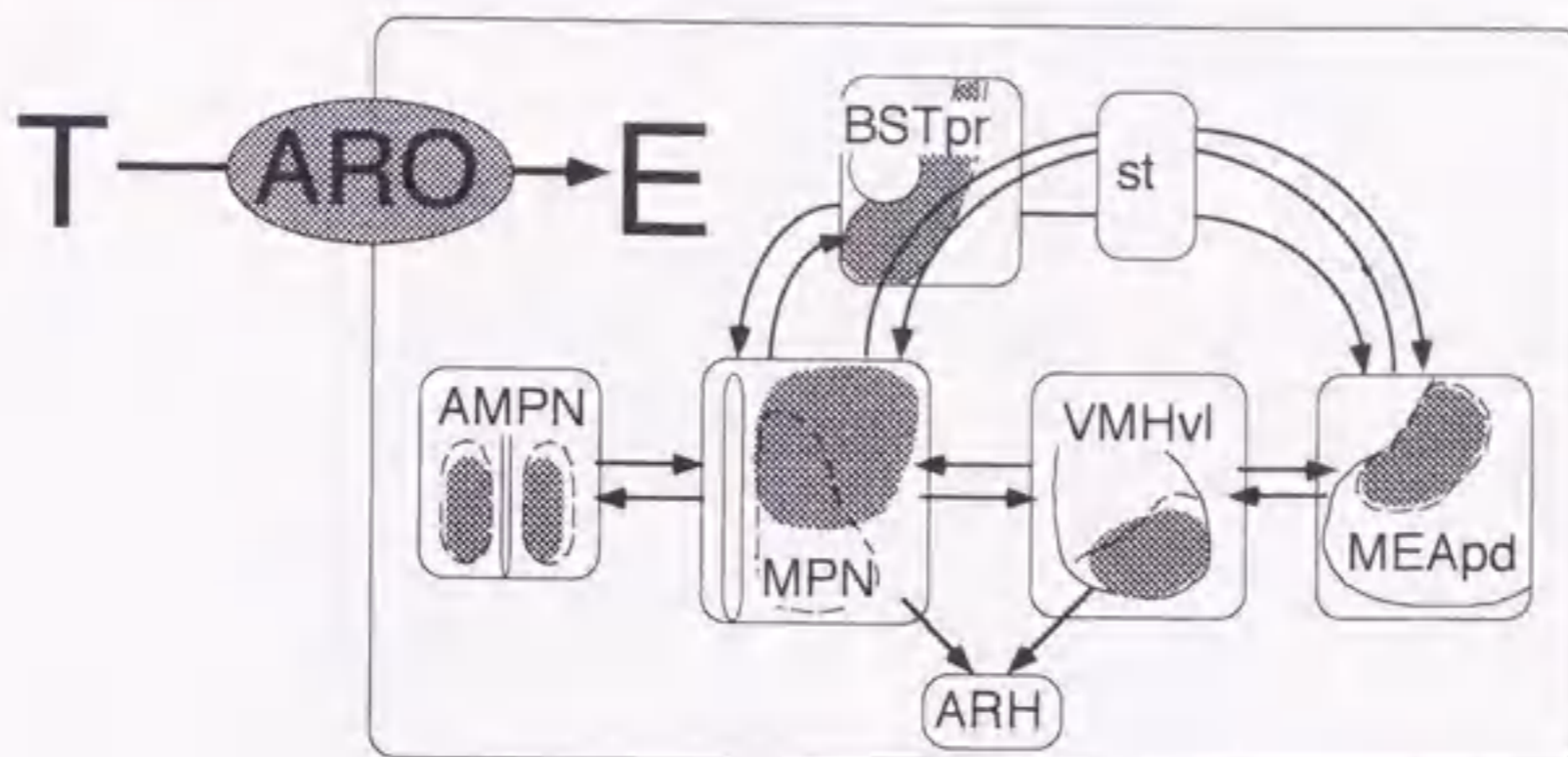


図5-12. 成体ラット脳におけるAROM-IRの出現の性差
 左カラム (A、C、E) は雄、右カラム (B、D、F) は雌。いずれも生後90日齢ラット。AとB：
 MPN-BSTにおけるAROM-IRの出現。CとD：それぞれAとBの括弧で示した部位の拡大。
 EとF：VMHにおけるAROM-IRの出現。Eの矢印はAROM-IR陽性細胞 (一部) を示す。
 いずれの領域でも、雄に比べ雌のAROM-IRは弱く、雌のVMH (F) に特異的なAROM-IR
 は見られない。Scale bar in A = 200 μ m, C = 100 μ m, E = 100 μ m.

A: Perinatal periods = organizational effects



B: Postpubertal periods = activational effects

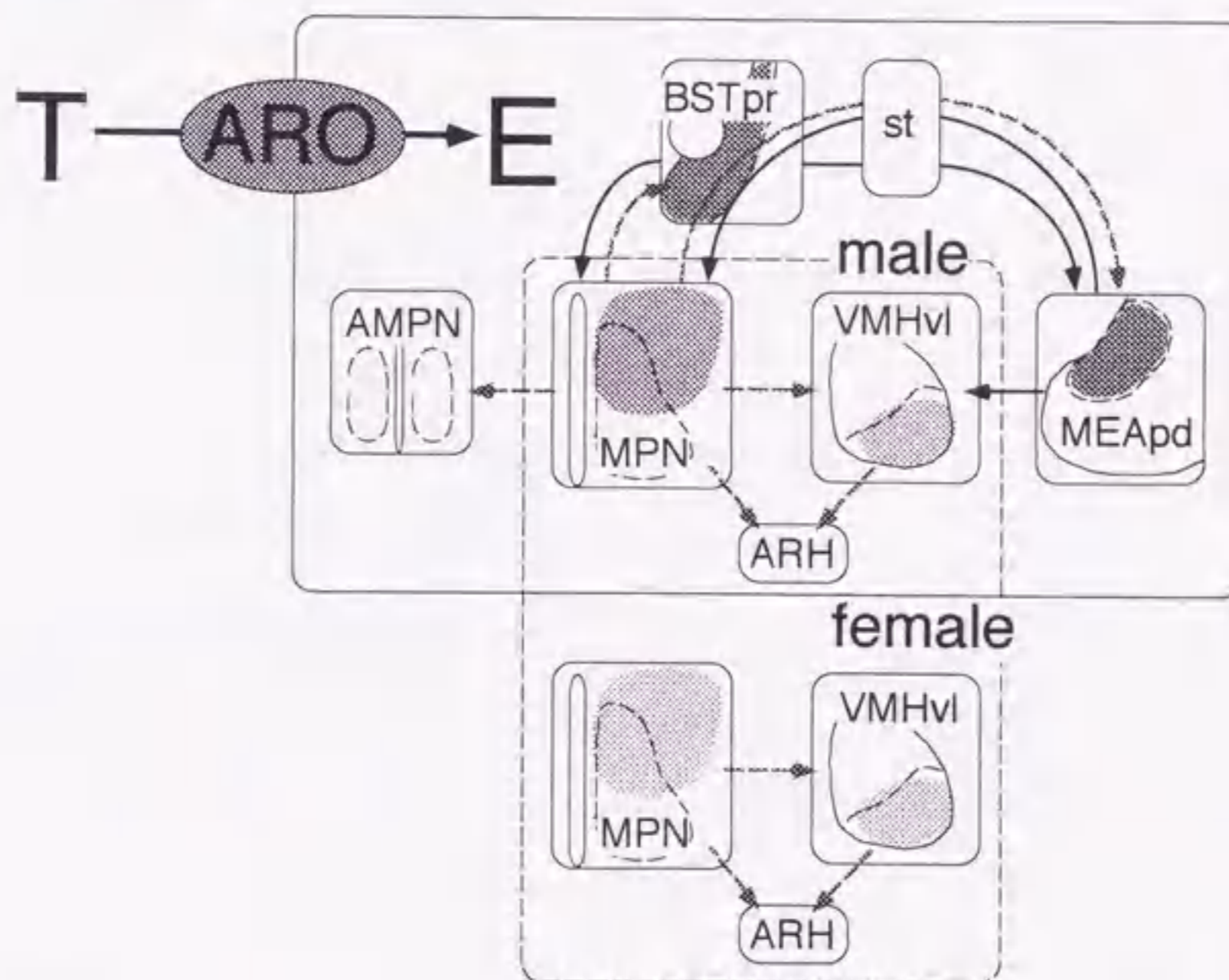


図5-13. 脳内で局所産生されたエストロジェンの脳内ERへの作用様式の発育期と成体の比較

A: 周生期脳における organizational な作用。脳内で局所産生されたエストロジェンは、視床下部を中心にした AMPN や VMHvl に作用し、相互間の線維連絡の形成に影響を及ぼす。血中のアンドロジェン値に性差があるため、これらの神経核ではアロマターゼから産生されるエストロジェン量に性差が生じる。このため、エストロジェンの作用量に性差が生じ、これがひとつの原因となって脳の性分化が誘導されると考えられる。

B: 成体脳における activational な作用。成体では BSTpr や MEApd など vomeronasal pathway を中心に activational な作用を及ぼすと考えられる。特に、雄では副嗅球からの情報の視床下部への伝達を活性化し、雄性行動の賦活化に関与するものと思われる。

図中、網目で示した部位がアロマターゼの分布が認められる部位。濃さの違いは、免疫組織化学の反応の強さに差があることを示す。矢印の方向は、アンドロジェンからアロマターゼで脳内で局所産生されたエストロジェンの作用が及ぼされる方向を示す。略語は「略語一覧」を参照。

第6章

胎仔ラット脳内エストロジェン受容体の出現

緒言

第3章の実験で、出生当日にはすでに成体と同様の領域にERタンパクが出現していることを示した。雄ラット胎仔の場合、胎齢18日前後に弱いアンドロジェンのサージが起こり、これがラット脳の性分化の始まりと考えられている^(115,116,256)。一方、出生後の去勢で雄ラットの雌性化が誘導できることから(第1章を参照)、胎生期の性ステロイド作用による脳の性分化作用は、出生後の作用ほど決定的な効果を及ぼすものではないと考えられる。しかし、子宮内で雄胎仔に挟まれて発生してきた雌胎仔は、両側とも雌胎仔であった場合に比べ雌型生殖機能が低下していること、また、ラット脳内アロマターズの活性ピークは出生直前に認められる^(68,152)ことから、ラット胎生期における性ステロイド作用も、脳の性分化にとって無視できないことが示唆されている。

ここでは、胎生期アンドロジェンサージの発現時点において、エストロジェンが胎仔ラット脳に作用する可能性があるのか、すなわち、胎生期における脳の性分化の臨界期の初期からエストロジェンが脳に作用する可能性があるか否かを確かめるために、胎仔ラット脳におけるERタンパクの発生時期の検討を行った。

材料と方法

実験には胎齢14、16、18日のSDラット胎仔を用いた。第2章で示した方法にしたがって、該当妊娠齢の妊娠ラットをネンブタールで麻酔し、帝王切開で胎仔を摘出した。摘出した胎仔ラットは低温麻酔し、30Gの注射針を用いて1匹あたり約15mlの固定液を20-30分かけて流して灌流固定した。固定終了後、胎仔全体(胎齢14日および胎齢16日)あるいは頭部全体(胎齢18日)を4%PFAに移し、4℃で一晩後固定を行った。後固定後、30%シュウクロース液に移し完全に沈むまで4℃で保存した。胎仔脳切片の作製は、クリオスタット(LEITZ製)で行った。10 μ mの前額断切片を作成し、ゼラチンコートしたスライドガラスに直接貼りつけた。乾燥後、スライドガラスごとPBSで洗浄した。これ以降は、スライドガラスに張り付けた状態で行うこと以外、全て浮遊切片におけるERのIHCと同様の方法で行った。なお、胎齢18日では生殖腺の観察による雌雄の判別を行ったが、胎齢14日および胎齢16日については行わなかった。

結果

胎齢 14 日では、下垂体前葉（下垂体神経葉）に弱い ER-IR が認められたが、視床下部など脳内には特異的な ER-IR の出現を認めることはできなかった。

胎齢 16 日では、内側視束前野 (MPO) で弱い ER-IR の出現を、また、ARH や VMH (図 6-1 A、B) に比較的強い ER-IR が認められた。さらに、顔面神経核内側垂核にも ER-IR の出現が認められた (図 6-2)。胎齢 14 日に比べて、下垂体前葉における ER-IR の反応性は上昇していた (図 6-1 A、B)。

胎齢 18 日では、MPN (図 6-3 A、B) および MPN の背側から BST にかけての部分 (MPN-BST) にも明らかな ER-IR が認められた。また、組織学的にも ARH および VMH の区別が明瞭化し、ER-IR の分布状態が、新生仔で見られる状態に近くなっていた (図 6-3 C、D、E)。この胎齢における ER-IR の出現性に、雌雄差は認められなかった。

考察

胎生期の脳内 ER の出現に関する形態学的検討はマウスで行われており、Stumpf and Sar⁽²³⁰⁾、Gerlach et al.⁽⁷⁴⁾、Keefer and Holderegger⁽¹⁰²⁾ による報告がある。これらによると、マウス脳における ER の出現時期は胎齢 13 日から胎齢 14 日の間である。一方、ラット胎仔脳における ER 出現の検討も、MacLusky et al.⁽¹³⁵⁾ によるレセプターアッセイで検討されているが、マウスのように形態学的に検討された例はない。したがって、胎生期のラット脳内にエストロジェンの取り込み部位が存在していることは確かめられているが、ER が、胎生期のいつからどの部位に出現してくるのかについては十分に検討されていない。

本研究で、胎齢 14 日から胎齢 18 日にかけて IHC で組織学的に検討した結果、次のようなことが示唆された。

- (1) ラット脳内において ER タンパクが出現し始める時期は、胎齢 14 日から胎齢 16 日の間であると考えられる。
- (2) ラットの下垂体における ER タンパクの出現は、内側視束前野や視床下部よりも早く、胎齢 14 日以前である。

(3) 性分化の中心部位と考えられる、MPN、BST、VMH、ARH における ER の出現時期は、VMH が最も早く、ついで MPN と BST、およびほとんど同時に ARH の順であった。

ラット脳における ER-IR の発現してくる時期が、ARG やレセプターアッセイによるマウス脳における ER の出現時期より約 1 日から 2 日遅れているのは、妊娠期間などから考えてラットのほうがマウスに比べやや発育が遅いことに起因すると思われる。発育段階的には、ラットの胎齢 14 日から胎齢 15 日は、マウスの胎齢 13 日から胎齢 14 日にほぼ一致すると思われる。したがって、ラットとマウスの脳内 ER の発生時期は、ほぼ同じと考えられる。

胎仔ラット血中にアンドロジェンが認められるようになるのは、胎齢 17 日からであることが報告されている^(44,256)。また、Shinoda et al.⁽²⁰⁷⁾ は IHC によって、胎齢 16 日ラットの内側視床前野にアロマターゼの免疫陽性細胞が分布していることを報告している。雄の胎仔ラットでは、胎齢 19 日に第一回目の弱いアンドロジェンサージがあるといわれている^(115,256)。この胎仔期のアンドロジェンサージは、生後 2 日以内に起こる第二回目のアンドロジェンサージに比べるとその血中濃度は約 1/3 の値で、上昇率も 2 倍には達しないものである。しかし、この一回目のサージが、ラット脳の性分化の臨界期の始まりと考えられている。本実験で、胎齢 18 日の MPO、VMH、ARH に明瞭な ER-IR を認めたことから、アロマターゼの存在を考慮すると、胎齢 19 日のアンドロジェンサージの影響を MPO におけるエストロジェンの局所産生を介して受けている可能性がある。したがって、ラット脳は胎生の末期においても、アンドロジェン由来のエストロジェン作用を MPO で受けていることが示唆される。

エストロジェンは性分化に対する効果以外にも、一般的なレベルで脳の発生過程に影響を及ぼしていると考えられる。Toran-Allerand et al.⁽²⁴⁴⁾ は、胎齢 17 日マウス脳の視床前野から視床下部にかけての組織を培養して、エストロジェンにインシュリン共役性の細胞成長促進効果があることを示している。一方、Altman and Bayer^(6,7,8) によって、視床前野および視床下部における神経核の起源が詳細に調べられているが、それによると、起源の分化発生のピークは、VMH が胎齢 13 日、MPN が胎齢 14 日から胎齢 15 日、ARH が胎齢 15 日である。本実験で得られた、それぞれの神経核における ER-IR 出現はその 2-3 日後である。したがって、これら視床前野や視床下部の神経核では、神経細胞の分裂のピークから 2-3 日後に ER-IR が出現し始めて、エスト

ロジェン作用による神経細胞の成熟に関与しているのかもしれない。

また、胎齢 16 日では、すでに顔面神経核内側亜核に ER-IR の出現が認められた。マウスでは、胎生期（胎齢 17 日前後）に、顔面神経核と支配する顔面筋との連絡が完成すると報告されている⁽¹⁰⁾。胎生期のエストロジェンが、運動神経あるいは介在神経の働きを介して、ラットの顔面神経核の神経細胞の成熟に関与しているのかもしれない。

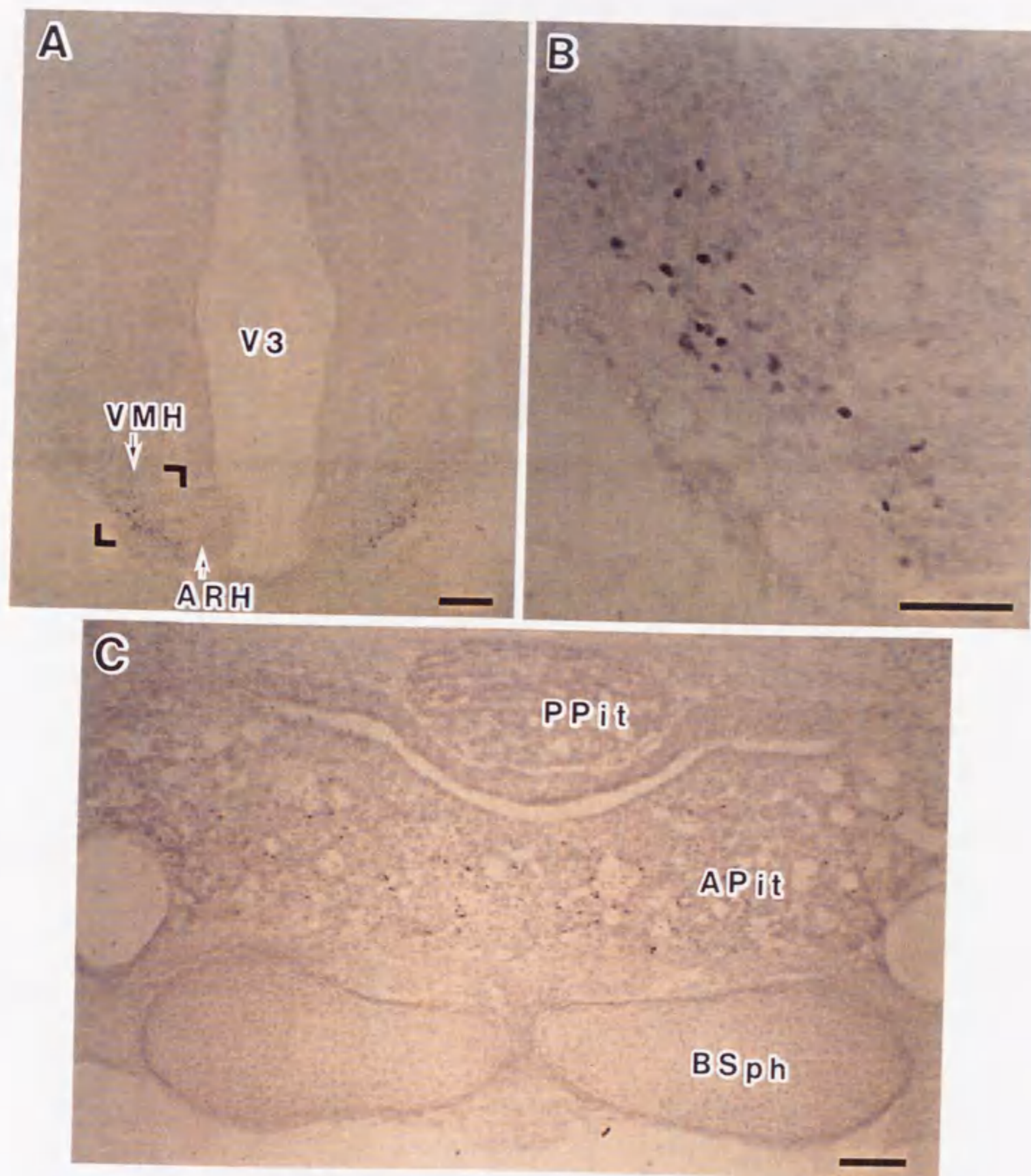


図6-1. 胎仔期脳（胎齡16日）におけるER-IRの出現（I）
 A：視床下部腹内側核（VMH）におけるER-IRの出現。B：Aの括弧で示した部位の拡大。C：下垂体前葉におけるER-IRの出現。APit=下垂体前葉、BSph=蝶形基底骨、PPit=下垂体後葉。Scale bar in A=100 μ m, B= 50 μ m, C=100 μ m.

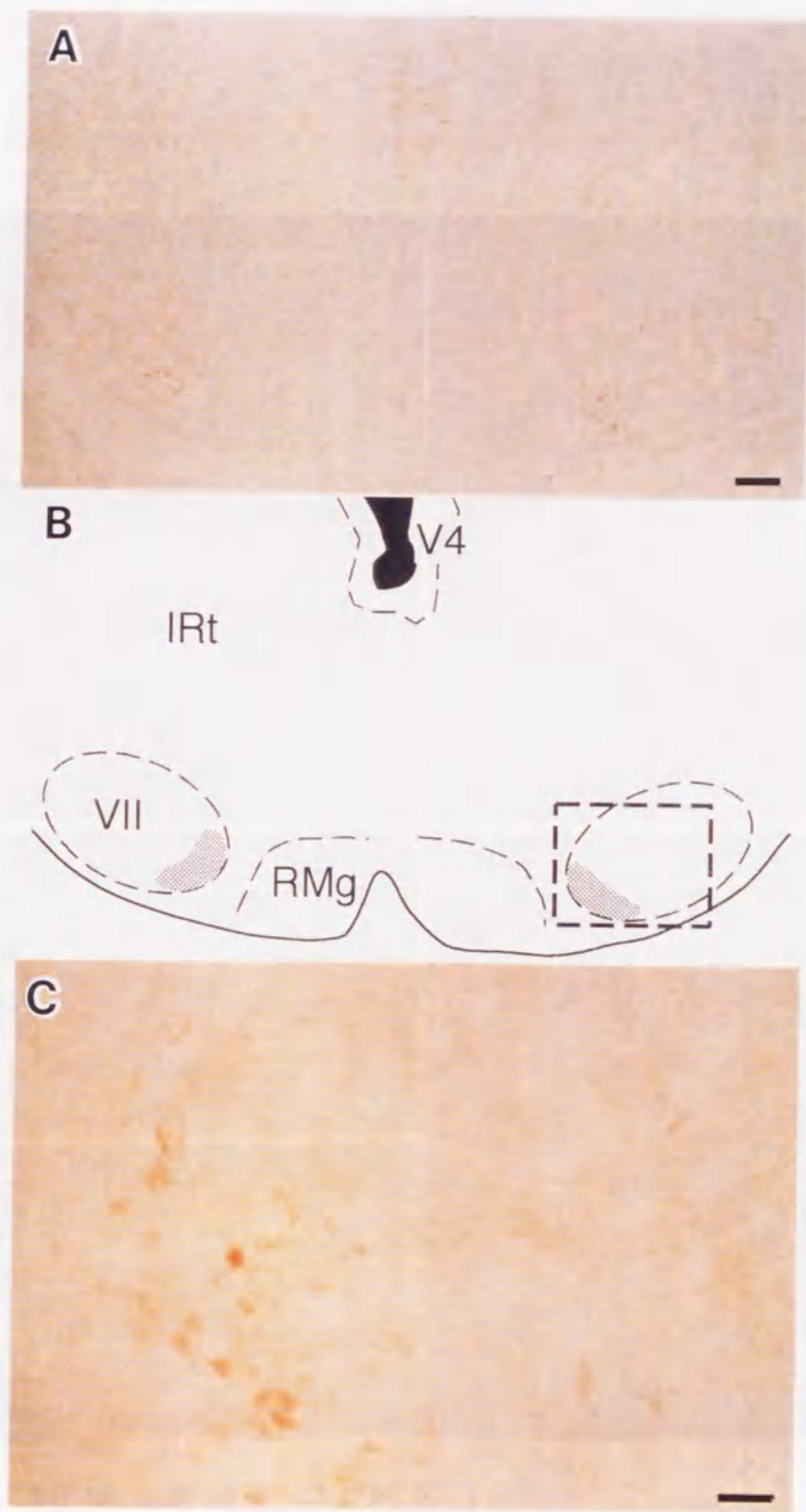


図6-2. 胎仔期脳（胎齢16日）におけるER-IRの出現（I I）
 顔面神経核内側亜核におけるER-IRの出現。新生仔ラット脳と同様、胎生の16日でも
 顔面神経核内側亜核にER-IRが出現している。A：胎仔の顔面神経核内側亜核における
 ER-IRの出現（免疫組織化学染色した切片標本）。B：Aの形態学的な位置を示した模
 式図。網目の領域は、AでのER-IR出現領域を示す。C：Bで点線で囲った部位に相当
 する、Aにおける部位の拡大。略語は「略語一覧」を参照。Scale bar in A = 100 μ m, C = 20 μ m

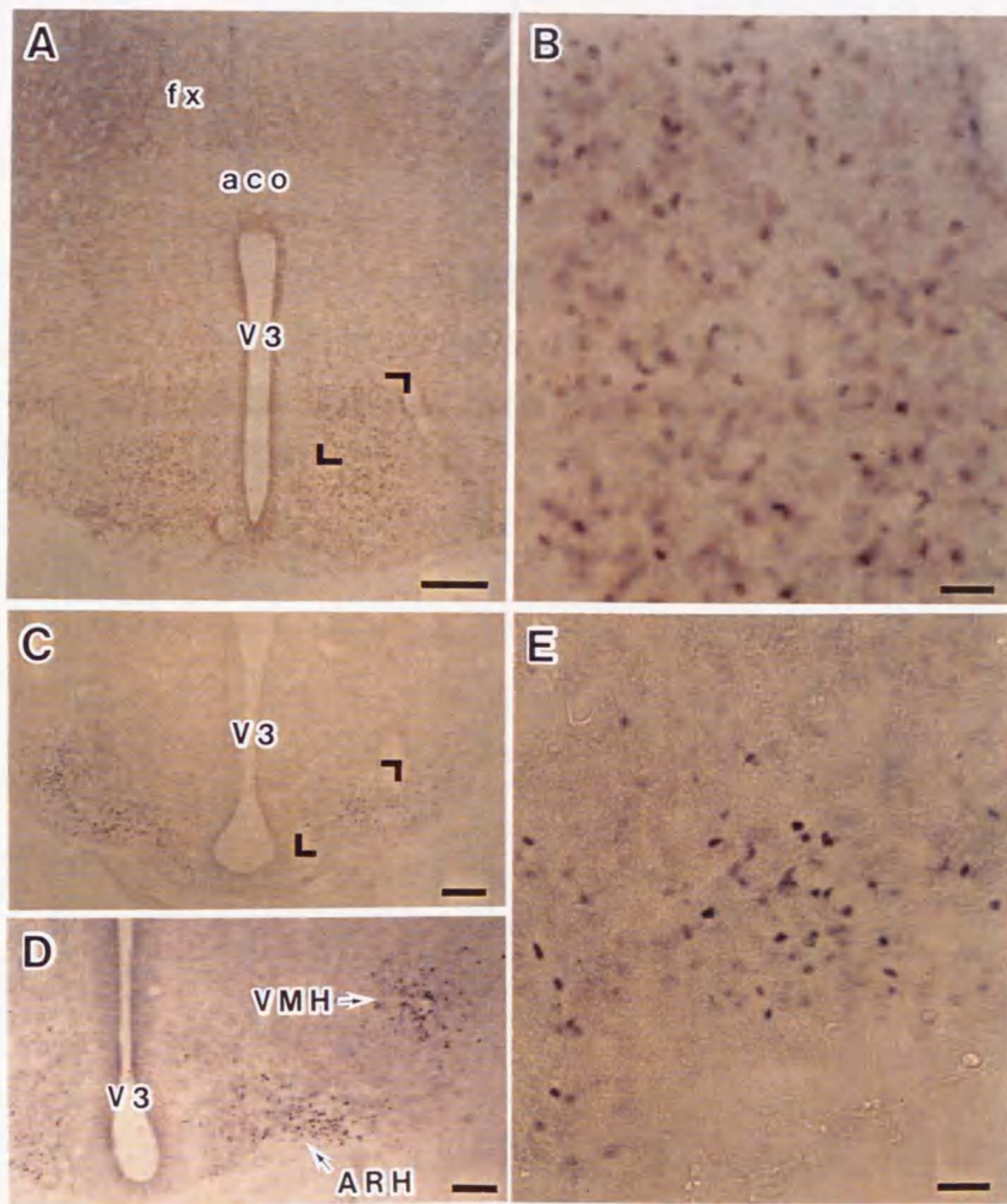


図6-3. 胎仔期脳（胎齢18日）におけるER-I Rの出現

A：内側視束前野におけるER-I Rの出現。B：Aの括弧で示した部位の拡大。C：視床下部腹内側核（VMH）および弓状核（ARH）におけるER-I R。D：Cよりさらに尾側の位置におけるVMHとARHでのER-I Rの出現。E：Cの括弧で示した部位の拡大。

Scale bar in A, C, D = 100 μ m. B, E = 20 μ m

第7章
エストロジェン受容体と
性腺刺激ホルモン放出ホルモンおよび
一酸化窒素合成酵素の含有細胞との関係

緒言

前章までに、周生期ラット脳におけるERタンパクの出現部位と、新生仔ラット脳におけるエストロゲン局所産生部位（アロマターズの分布）を明らかにしてきた。しかし、第1章の総合緒言で言及したように、エストロゲンの標的細胞、すなわちER含有細胞がどのような物質を産生する細胞なのかを明らかにすることも、IHCによるアプローチの重要な目的である。成体ラット脳で、エストロゲンの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌に対する調節機構の解明を目的に、GnRH自身およびGnRHの分泌制御に関連していると考えられている、神経伝達物質とERタンパクとの同一細胞における共存が検討されている。その結果、GnRHニューロンにERは共存しないこと^(91,208)が示されると同時に、gamma-aminobutyric acid (GABA)⁽⁶⁴⁾、neurotensin (NT)⁽¹¹⁾、calcitonin gene related peptide (CGRP)⁽⁹²⁾、substance P (SP)⁽¹⁷¹⁾などの神経伝達物質とERの共存が示されている。したがって、エストロゲンがこれらの神経伝達物質の産生を直接調節することで、間接的にGnRHの分泌を制御していることが示唆されている。一方、新生仔ラット脳における検討は、神経の発育に関連するタンパクであるGAP-43との関係が示唆されているが^(46,212)、具体的にERとの共存を示した報告はない。

近年、脳の神経細胞に対する一酸化窒素 (NO) の作用が注目されている。成体の脳では長期増強 (LTP) 機構への効果が注目の中心だが、発育期脳では形態学的な空間形成への関与が注目されている⁽⁷²⁾。すなわち、NOのシナプスへの影響が、神経回路が完成された成体脳ではシナプス増強という形で発揮される一方、神経回路が未完成の発育期脳では、回路の形成そのものに影響を与えている可能性が考えられている。筆者は共同研究で成体ラット脳のVMHvlやMPNにおいて、ER-IRとNO合成酵素 (NOS) の指標であるNADPH-diaphorase (NADPH-d) 酵素反応⁽⁹⁵⁾が共存していることを示した^(172,173)。一方、成体ラットのVMHvlやMPNには、シナプス形態に性差が認められ、それが周生期の性ステロイドホルモン作用の影響で誘導されていることが示されている。したがって、周生期のエストロゲン作用がNOSの産生調節を介して、シナプス形態の性差誘導に関与している可能性がある。ここでは、新生仔ラット脳内におけるGnRHとERの共存およびNOSとERの共存を調べ、ラット脳の性差発現に対するエストロゲン作用機構を考察した。

材料と方法

動物と脳標本:

実験には、生後1日齢、生後3日齢、生後10日齢の雌雄ラット10匹を使用した。動物の処置は第2章にしたがい、4% PFAで灌流固定した。脳標本は、凍結マイクロトームで40 μm の浮遊切片に作製した。

組織化学染色

(1) ERとGnRHの二重染色

ERのIHCを行った浮遊切片に対し、さらに抗LH-RH抗体を用いて、GnRHタンパク含有細胞のIHCを行った。ERのIHCは第2章に記載した(b)の増感染色で行い、黒紫色に発色させた。発色反応後、PBSTで十分に洗浄した後、同一切片をBSA-PBSTで50,000倍希釈した抗LH-RH抗体(UCB Bioproducts, Belgium)に4°Cで72時間反応させた。その後の処理は、第2章に記載した方法で行った。

(2) ERとNOSの二重染色

NOSの検出方法として、NADPH-diaphorase (NADPH-d) 酵素組織染色を用いた⁽²⁵¹⁾。凍結マイクロトームで作製した浮遊切片を0.1M PB (pH 7.4)で洗浄した後、NADPH-d反応液(NBTを0.1 mg/ml、 β -NADPHを1.0 mg/ml、Triton-X 100を0.3%の割合で含んだ0.1M PB)に37°Cで40-60分間反応させた。反応の終了は、0.1M PBで洗浄することで行った。NADPH-dの観察用の切片は、この段階で反応を終了させ、スライドガラスに貼りつけて封入した。

また、NOSとERの共存関係を検討するために、NADPH-dの染色を施した同一の切片に対し、第2章の方法にしたがってERのIHCを行った。なお、NADPH-d反応は青紫色の為、ERの発色反応は、(a)の方法を用いて茶色に発色させた。その後の処理は、ERとGnRHの二重染色と同様に、第2章に記載した方法で行った。

結果

新生仔ラット脳内におけるER-IRとLH-RH免疫組織反応(LH-RH-IR)との、同一細胞内における共存像は認められなかった。

一方、NADPH-d活性は、視束前野および視床下部、尾状被殻、および大脳皮質に存在していた。視束前野および視床下部では図7-1に示すように、OVLt、MEPO、VMHvlなどに認められ、このうち、OVLtやVMHvlではER-IRとの共存が認められた(図7-2)。しかし、MEPOではER-IRとNADPH-dの特異的な共存像は認められなかった。生後10日齢の大脳皮質におけるNADPH-dの存在は広い範囲に及んでいたが、聴覚野を中心としたER-IRの出現とは著しく異なっていた。このため、生後10日齢ラットの大脳皮質で、ER-IRとNADPH-dの共存像は全く認められなかった。また、新生仔ラット脳でのNADPH-d活性の出現性に性差は認められなかった。

考察

成体ラット脳で報告されているように^(91,208)、発育期ラット脳でもER-IRとLH-IR-IR(すなわちGnRH)の共存は認められなかった。このことは、周生期雌ラットへのエストロゲン投与によるGTH分泌の脱雌性化は、GnRHニューロンにエストロゲンが直接作用し、GnRHニューロン自体の性質を脱雌性化することで誘導される現象ではないことを示している。GnRHニューロンの起源は脳の外のolfactory placode(嗅板)であり、ここから発生に伴って視束前野や視床下部に移動して来ることが知られている⁽¹⁹⁹⁾。ラットでは、胎齢19日には移動を終えていることから、GnRHニューロンの移動にエストロゲンが直接影響を与え、これがGTH分泌パターンの脱雌性化を誘導しているとは考えにくい。実際、ラットではGnRHニューロン分布の性差や、周生期の性ステロイドホルモン投与がGnRHニューロンの分布に影響を及ぼすとの報告はない。

したがって、GTH分泌パターンに対するエストロゲンのorganizationalな作用はGnRHニューロンに対する直接作用ではなく、GnRHニューロン活動を制御する神経回路に対する作用を介した、間接的な影響であると考えられる。エストロゲン作用が内側視束前野や視床下部、あるいは扁桃体などに対して与える形態的变化、あるいはそれらに分布する神経伝達物質の性質を変化させることが、結果的にGTHの分泌パターンの変化として発現されているのであろう。

OVLTやVMHvlにおいてNADPH-d、すなわちNOSとER-IRの共存が認められたことは、これらの部位に投射してくるニューロンおよび投射するニューロンのシナプス形成に、周生期のエストロジェンがNOSの産生調節を介して関与している可能性を示唆している。NOの発育期脳に対する作用は十分には解明されていないが、発生後期の脳において、シナプスの形成や分離、あるいは神経線維網の形状に対して影響を及ぼしているのではないかと考えられている(52,72,129,249)。図7-2に示したように、NADPH-d活性はAROM-IRと同様に、VMHvlではER-IRの出現領域とほぼ同じ部位に認められるが、ARHには全く認められてない。この分布の同一性から、VMHvlでアンドロジェン由来のエストロジェンがNOSの産生を直接制御している可能性が示唆される。OVLTやVMHvlにおけるERとNOSの共存は、周生期ラット脳に対するエストロジェンのorganizationalな作用機構の一つとして、NOSの産生をエストロジェンが直接制御することで、NOの発生を調節する経路が存在していることを意味しているのかもしれない。

一方、雌雄でNADPH-dの染色性に差を認めなかったことから、エストロジェンがNOSをどのように制御し、それがシナプス形態の性差発現にどう関連する可能性があるのかについては不明である。成体ラットの子宮では、エストロジェンはNOSの産生を抑制していることが報告されているが(263)、成体ラット脳のMPNやVMHvlでは、逆にエストロジェンがNOSの発現を促進していることが示されている(172,173)。したがって、エストロジェン作用に対するNADPH-dの発現が成体脳と同様の動きを示すと考えれば、新生仔雄のVMHvlでは雌に比べてNOSが優位に誘導され、これがNOの発生量に性差を生じることになり、結果的にシナプス形態に性差が発現されると仮定される。

しかし、酵素組織化学染色による今回の結果からだけでは、この仮説を検討することはできない。新生仔ラットに対する去勢や性ステロイドホルモン投与の処理が、新生仔脳内NOSの出現に対して影響を及ぼしていることを、IHCによるタンパクレベル、あるいは*in situ* hybridization組織化学によるmRNAレベルで証明する必要があると思われる。

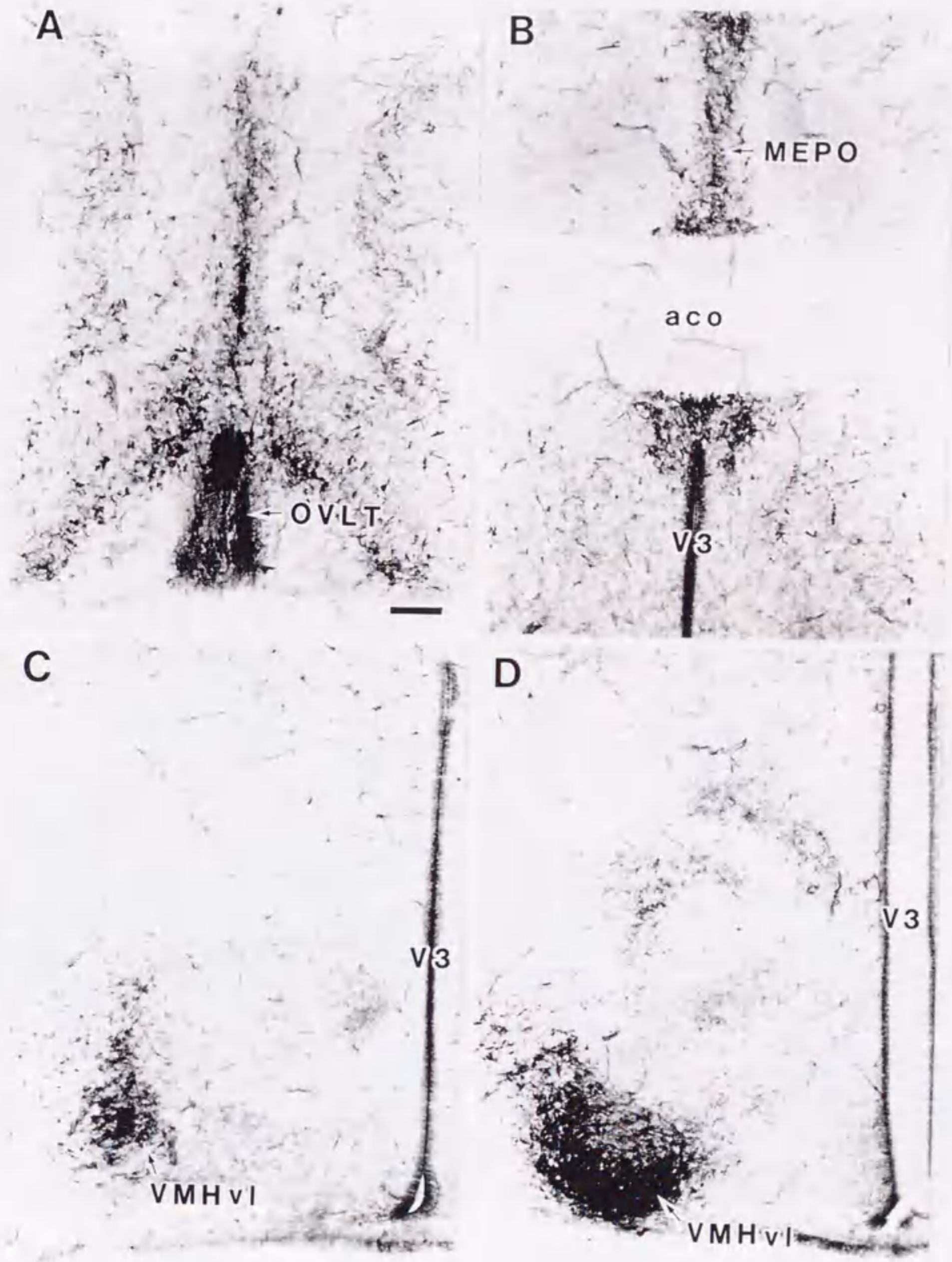


図7-1. 新生仔雄ラット脳（出生当日）における一酸化窒素合成酵素（NOS）活性の存在部位
 NOS脳内分布の指標として、NADPH-d酵素組織染色を施した。NADPH-d活性陽性反
 応は、ER-I Rも分布している、終板器官（A：OVL）、正中視束前野（B：MEPO）、
 視床下部腹内側核腹外側部（CとD：VMHv1）を中心に認められた。他の略語は「略語一覧」
 を参照。Scale bar = 100 μ m.

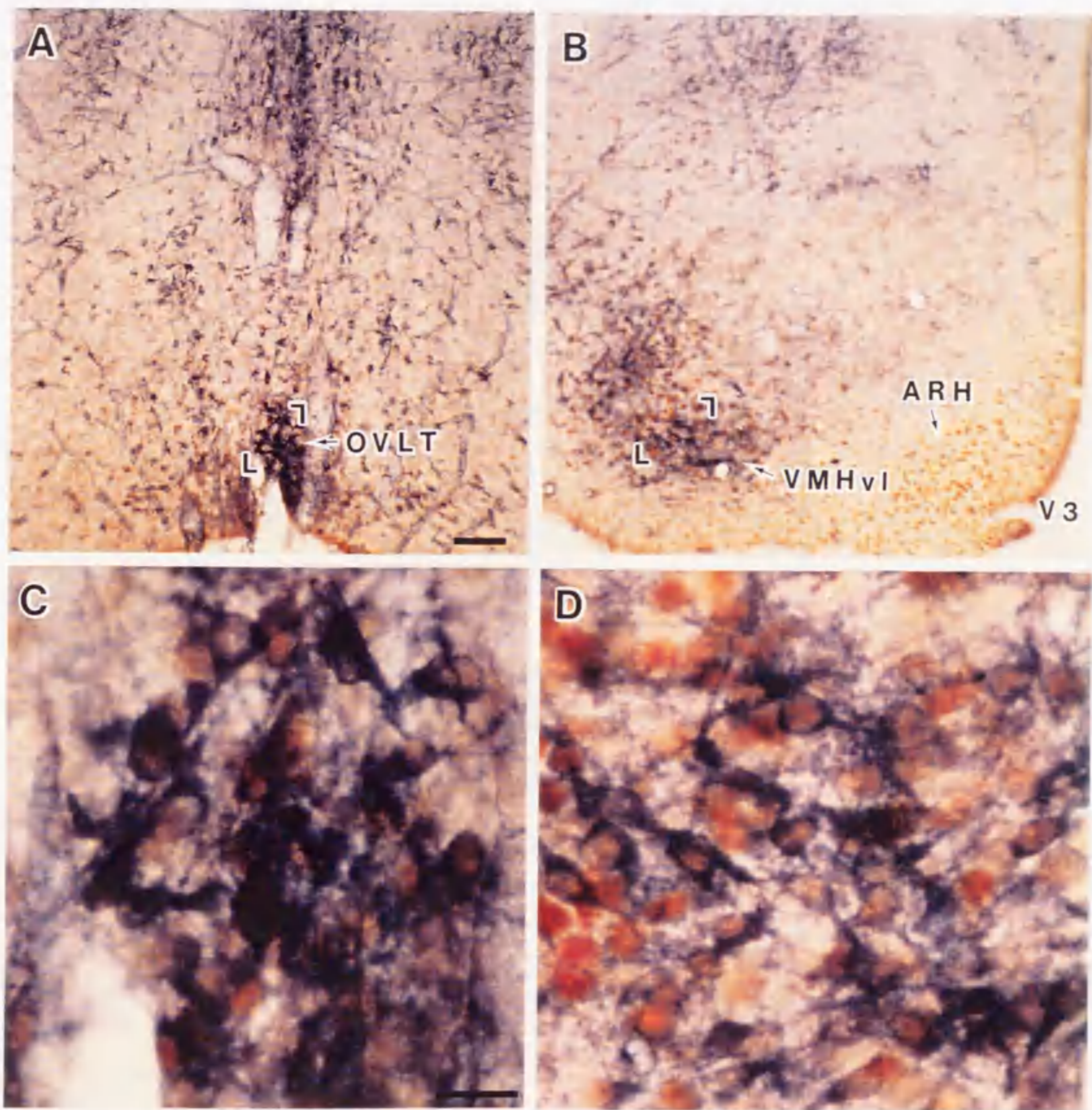


図7-2. 新生仔雄ラット脳（生後3日齢）におけるER-IRとNOSの共存
 AとC：OVLTにおけるER-IRとNADPH-dの共存像。C：Aの括弧で示した部位の拡大。BとD：視床下部腹内側核の腹外側部（VMHvl）における、ER-IRとNADPH-dの共存像。D：Bの括弧で示した部位の拡大。視床下部弓状核（ARH）にER-IRは認められるが、NADPH-d陽性反応は認められない。他の略語は「略語一覧」を参照。Scale bars in A = 100 μ m, C = 20 μ m.

第8章 総合考察

周生期ラット脳内エストロゲン受容体の出現とその生物学的意義

本研究で得られた、結果を要約すると次のようになる。

(1) 周生期ラット脳にも、雌雄で同様の部位に ER-IR の存在が確認された。ER-IR の分布域は、基本的には成体ラットと同じで、AMPN、MPN、BST、VMHvl、ARH、MEApd、COAp など、生殖機能と深い関係をもつ部位であった。また、周生期ラットでは、大脳皮質第 V 層や顔面神経核内側垂核に ER-IR が一過性に出現していた。

(2) 出生当日および生後 5 日齢の脳では、AMPN、MPN、BST pr、VMHvl、MEApd で ER-IR と AROM-IR の分布が重複していた。また、AROM-IR は発育にともなって低下し、特に AMPN と VMHvl での減少が著しく認められた。一方、新生仔の大脳皮質第 V 層や顔面神経核内側垂核には AROM-IR は検出されなかった。

(3) 視束前野や視床下部における ER-IR は、雌のほうが雄よりも強かった。これとは逆に、AROM-IR は、雄のほうが雌よりも強かった。

(4) 視束前野や視床下部の ER-IR は、新生仔にエストロゲンおよびテストステロン投与することでその反応性を抑えることができた。しかし、大脳皮質第 V 層や顔面神経核の ER-IR は、テストステロン投与では抑えられなかった。

ER とアロマターゼの分布が重複している部位は、すなわちアンドロゲンによる脳の雄性化誘導に重要な部位と考えられる。両者の分布が重複していた部位は、雄ラットの交尾行動の発現⁽¹⁸⁰⁾ や雌ラットの LH サージ発現に必要な部位^(75,177,238) である AMPN や MPN、雌ラットの交尾行動^(180,195) や成長ホルモンやインスリンなどの下垂体ホルモンの分泌^(22,23) あるいは、攻撃行動^(40,175) や摂食行動⁽¹⁶¹⁾ の調節中枢と考えられている VMHvl、各種のオピオイドペプチド産生細胞を含み GTH の分泌制御に関与していると考えられている ARH⁽¹⁰¹⁾、あるいは、フェロモンと深い関係がある AOB と相互に線維連絡し、雄性行動の制御部位と考えられている MEApd や COA であった^(51,118)。このように、成体ラットで性的二型が認められる行動や下垂体からのホルモン分泌を制御している領域において、ER 含有細胞の分布 (ER-IR の分布部位) とエストロゲン局所産生部位 (AROM-IR の分布部位) が一致する事実は、脳で局所産生されるエストロゲンが、脳の雄性化に主要な作用を及ぼすという考えを強く支持している。

これまでも、脳の雌雄性を決定する第一要因であるアンドロジェンは、脳内のアロマターゼによってエストロジェンに転換されて作用すると考えられていた。しかし、脳のどの部位でその作用が発揮されているのかについて十分には明かにされていなかった(図8-1)。本研究によって、成体ラット脳において生殖機能を制御している部位が、周生期のアンドロジェンによる性分化誘導部位であることが示されたといえる。一方、これらの神経核は、成体ラットでは相互に線維連絡していることが知られている(35, 36, 43, 197, 218, 219)。従って、図8-2に示すように、周生期の血中アンドロジェン由来のエストロジェンは、ER含有細胞が分布するこれらの神経核に直接作用するだけでなく、線維連絡のある他の神経核とも相互に影響を及ぼしあうことで、脳の性分化を誘導していると考えられる。

一方、本研究で周生期脳のER-IRの出現部位を検討していく過程で、大脳皮質第V層や顔面神経核内側亜核において、ER-IRの一過性出現という現象を観察することができた。その生物学的意義は不明であるが、周生期ラット脳に対して、性分化とは異なるエストロジェン作用の効果が存在していると考えられる。この考えは、大脳皮質第V層および顔面神経核内側亜核におけるER-IRの出現が、それぞれ新生仔期および胎生期から新生仔期の期間に限定され、共にAROM-IRの分布が認められないという本研究の結果と、周生期ラットの血中には、雌雄で同レベルの遊離エストロゲンが存在している⁽⁶⁰⁾ことから強く示唆される。

大脳皮質第V層や顔面神経核内側亜核が、脳の機能的性差に直接関与していることを示す報告は無いことから、脳の性分化誘導との直接的な関係は薄いと思われる。しかし、大脳皮質聴覚野からCOAに対して神経線維の投射があることが報告されている⁽¹⁹²⁾。したがって、聴覚系のニューロンが情動中枢に直接作用して、性行動の発現に何らかの影響を及ぼしている可能性は考えられる。また、顔面神経核は、新生仔期からセロトニン陽性線維が多数分布する部位である⁽²⁰³⁾。新生仔雌ラットに、セロトニン合成阻害剤であるPCPA(p-chlorophenylalanine)を投与すると、雌の雄に対する誘惑行動であるear-wigglingの発現が抑制されることが報告されている⁽²⁶¹⁾。したがって、周生期の顔面神経核へのエストロジェン作用がセロトニンシステムに何らかの影響を与えて、ear-wiggling発現の性差に関与している可能性が考えられる。しかし、ear-wigglingは運動神経の支配で発現するのではなく、毎秒25回に及ぶ首振り運動のため、あたかも耳を震わせ

ているように見えるともいわれており、現段階では顔面神経核のERが性差発現に直接関与しているとは考えにくい。大脳皮質や顔面神経核に発現するER-IRは、その出現が一過性であるということに加え、アンドロゲン投与に直接には影響されないという点からも、視束前野や視床下部のER-IRとは出現の意義そのものを異にしていると思われる。

血中遊離エストロゲンから雌脳の雄性化が防がれている理由として、胎生期および新生仔期のエストロゲン結合タンパク (α -Feto Protein = AFP) の存在で説明しようとする考えがある (158, 242)。脳の性分化の臨界期にある動物の血中には、成体に比べ高い AFP 活性が存在する。このため、血中の遊離エストロゲンは、性分化の臨界期の脳には作用できないとする考えである。しかし、McCarthy et al. (145) の行った、新生仔ラット脳内に ER mRNA のアンチセンスを投与する実験から、GTHの周期的分泌パターンを示す正常な雌型の脳になるためには、周生期のエストロゲン作用が必要であることが示唆されている。したがって、AFPによる周生期ラット脳に対するエストロゲン不活化作用 (158, 242) が存在するとしても、その作用は完全なものではなく、ある程度の量の遊離エストロゲンは周生期の脳に作用できると思われる。大脳皮質第V層や顔面神経核におけるER-IRの出現も、この周生期脳への遊離エストロゲン作用が存在する可能性を支持する現象と思われる。

したがって、脳の性分化の臨界期において遊離エストロゲンが脳に作用しないことが雌脳の発育を保護しているのではなく、雄に比べて雌は相対的にエストロゲンの作用量が少ないことが、雌脳の発生を誘導していると考えたほうがいいのではないだろうか。

脳内におけるエストロゲン局所産生部位と脳の性分化誘導

本研究の結果を基に、周生期脳のERへの作用を図8-2に示した。周生期ラットでは主に胎盤由来と思われる血中エストロゲン値に性差は認められないが、雄ラットでは、血中アンドロゲン値は出生前後にピークを迎え、生後3日間は雌の4倍以上の値を示すようになることが報告されている (60)。したがって、血中アンドロゲン値の差が、周生期ラット脳における雌雄間の決定的な差となる。一方、標的器官である脳には、雌雄ともAMPN、MPNam、後部MPNの背側部からBSTの腹側部にかけての部位 (MPN-BST)、BSTpr、VMHvl、MEApdでERとアロマテ

ースが重複して分布している(図5-4参照)。これらの部位で、血中アンドロジェンをもとにエストロジェンが局所産生され、ERを含有するアロマターゼ細胞の場合は同一細胞に、共存しない場合は周辺のER含有細胞に、それぞれ作用するのであろう。この場合、エストロジェンは脂溶性のステロイドホルモンであることから、ER含有細胞に作用するために必ずしもERとアロマターゼが同一細胞に共存する必要性はないと思われる。この時点で、血中アンドロジェン値の雌雄差が、そのまま脳に作用するエストロジェン値の雌雄差となり、これが脳の性分化の重要な要因となっていると考えられる。

ラット脳の性分化の臨界期が、胎生の末期から生後約一週間とする考えは、周生期の性腺摘出や性ステロイドホルモンの投与が、成熟後のGTH分泌やMPNcの大きさに与える不可逆的変化の有無から考察されたものである(文献の186,187, および第1章を参照)。本研究で得られた、AROM-IRの生後発達にともなう反応性の変化はこの考えを支持している。すなわち、AMPNやMPNの中間部(MPNam)などGTH分泌の制御に重要と思われる部位では、AROM-IRの強い反応は出生当日と生後5日齢でしか検出できなかった。これは、AMPNやMPNamにおけるエストロジェンの局所産生は、生後5日齢までがピークであることを示唆している。この結果は、AMPNやMPNamに、強いアロマターゼ活性が存在している期間がすなわちラット脳の性分化の臨界期であり、AMPNやMPNamがラットのGTH分泌パターンの性決定に重要な部位であることを示唆している。

げっ歯類のGTH分泌機構は、アカゲザルなど霊長類とは異なり、周生期の性ステロイドホルモン作用の影響を強く受けることが示されている。ラットでは、成熟後の雄を去勢して雌性ホルモンを投与しても周期的なGTH分泌パターンを発現させることは出来ない(42,88,174)。一方、アカゲザルでは、性成熟後の雄を去勢して卵巣を移植すると、雌の様に性周期を示すことが報告されている(168)。このことから、霊長類では脳の性分化の臨界期におけるアンドロジェン作用は、GTHの周期的分泌機構に対して決定的な影響を及ぼしていないことを示している。しかし、アカゲザル(210)やヒト(160)の胎仔(児)脳にも、アロマターゼ活性が存在していることが報告され、さらに行動学的な実験からも、げっ歯類と同様に脳の性分化の臨界期におけるアンドロジェン作用が、脳の性分化に重要な影響を及ぼしていることが示唆されている。

げっ歯類と霊長類の発育脳におよぼす、アンドロゲン作用の性分化誘導の違いは次の様に考えられる。げっ歯類では、AMPNやMPN_{am}におけるアロマターゼ活性のピークと発育期の雄脳における血中アンドロゲン値のピークが一致している。そのため、脳で局所産生されるエストロゲンもピークに達して、未分化のGTH分泌機構に決定的な作用が及んでしまう。一方、霊長類でも雄胎仔における、血中アンドロゲン値の優位性が報告されており⁽²⁾、げっ歯類と同様に、アンドロゲンが脳の性分化を誘導していると考えられている。しかし、ラットのような周生期のアンドロゲンサージ発現については明かにされていない。したがって、アロマターゼ活性のピークと血中アンドロゲン値のピークが一致するげっ歯類に比べ、霊長類では、アンドロゲンによるGTH分泌機構に対する作用は比較的弱いのではないだろうか。

AROM-IRとERの分布が重複しているMPN-BST、BST_{pr}、MEA_{pd}は、olfactory pathwayを構成する一連の機能的な構造としてまとめることができる。成体ラットのこれらの部位は、形態学的な性的二型が認められるばかりでなく、そこに分布するCCKやSPといったGTH分泌の制御に関与する神経伝達物質の発現パターンにも性差が認められている。アンドロゲンから局所産生されたエストロゲンは、副嗅覚系の神経回路にも性差を誘導し、GTH分泌および生殖行動の性差発現に関与していると考えられる。

アンドロゲンから転換されたエストロゲンが脳に及ぼすorganizationalな作用は一様ではなく、部位によって異なった反応性を示すようである。例えば、成体ラットにおけるMPN_c(SDN-POA)⁽⁷⁸⁾、BST_{enc}(本研究のBST_{pr}に相当する部位)⁽⁴⁸⁾、VMH_{vl}⁽¹⁴⁴⁾、MEA_{pd}^(165,166)の各領域は雄のほうが雌よりも大きい。AVPV(本研究のAMPNに相当する部位)(文献157と文献162の総説を参照)や視束前野の傍分界状核(parastrial nucleus of the preoptic area = PSN)⁽⁴⁹⁾は雌のほうが雄よりも大きい。このことは、周生期の性ステロイドホルモン作用は、必ずしも神経核を大きくするように誘導するのではなく、部位によっては小さくする方向に誘導していることを示している。実際、Murakami and Arai⁽¹⁵⁷⁾は、AVPVではMPN_cとは異なり、新生仔へのテストステロン投与がNeuronal deathを促進していることを示している。

また、エストロゲンの作用はERが分布している神経核に対する直接作用ばかりではなく、投射する線維を介して、他の神経核にも作用が及んでいると考えられる。例えば、本研究では

ARHにAROM-IRの分布は認められていない。しかし、周生期のアンドロジェン作用がARHに投射する線維のシナプス形態に性差を誘導していることが報告されている⁽¹⁴³⁾。AOBもその全容積に性差が認められる部位である⁽²⁰¹⁾にもかかわらず、ER-IRおよびAROM-IRは分布していない。したがって、アロマターゼ活性を持たないARHは、線維連絡のあるAMPNやVMHvlが受けたアンドロジェン由来のエストロジェンの作用を、AMPNやVMHvlからの投射線維、あるいはARHからそれらの神経核に投射する線維を介して受けていると考えられる。また、ER-IRおよびAROM-IRの両方とも分布していないAOBは、相互に線維連絡のあるMEApdやVMHvlに対するエストロジェンの作用を、投射回路を介して間接的に受けていると考えられる。

なお、AOBの性差発現に関しては、アンドロジェン受容体を介しての作用も考えられる。しかし、アンドロジェン受容体がAOBに存在しているという報告は無い。したがって、AOBの性差発現にエストロジェンが関与しないとしても、形態学的な性差を誘導するアンドロジェン作用効果は、アンドロジェン受容体を含有する他の神経核から間接的に及ぼされるものと考えられる。

以上のように、周生期の血中アンドロジェン量の雌雄差に端を発する、ラット脳の性分化誘導機構はつぎのようにまとめることができる。すなわち、脳内のアロマターゼによって、アンドロジェンの雌雄差はエストロジェン量の雌雄差になる。エストロジェンは、ER含有細胞に対する直接作用ばかりでなく、投射する神経線維を介して他の領域に対しても作用を及ぼす。このエストロジェン作用によって、神経核の大きさや神経伝達物質の発現が修飾される。しかし、エストロジェンの作用量に性差があるため、修飾の度合にも性差が生じる。これが最終的に、脳に形態的および機能的な性差を発現させる原因になっていると考えられる。

成体ラット脳におけるエストロジェン作用

周生期脳に対するアンドロジェン作用が導く性差は、最終的にはエストロジェン作用量の違いによってもたらされた結果と考えられる。これに対し、成体で認められるエストロジェン作用の雌雄差は、作用する脳の器質的な差を反映していると考えられる。したがって、周生期脳に対するエストロジェン作用と、成体脳に対するエストロジェン作用が導く効果は基本的に異なると考えられる。

周生期のエストロゲン作用で、器質的な変化を誘導された後の成体脳に対するエストロゲン作用とその効果を雌（図8-3）と雄（図8-4）に分けて考えてみた。

周生期の脳と同様に、作用するエストロゲン量に性差は存在するが、ERの存在部位には基本的性差はない。しかし、周生期とは異なり、エストロゲンの標的部位に器質的な性差が存在している。したがって、雌雄の同じ部位で同量のエストロゲン作用が及んだとしても、発現される効果は雌雄で異なったものになる可能性がある。例えば、成熟後に去勢した雌雄ラットに対し、全く同様にエストロゲンおよびプロジェステロンを投与しても、内側視束前野に誘導される substance P (SP) 免疫陽性細胞の数には性差が認められている⁽¹⁷³⁾。したがって、成体脳のなかでも、形態学的に性差が認められる部位で発揮されるエストロゲン作用の効果は、雌雄で異なったものになっていると考えられる。このような、相同領域での同じホルモンに対する反応性の違いが、結果的に、行動学的あるいは内分泌学的な性差として発現されるであろう。

雄ラットにおける性行動の発現には、アンドロゲンと同時にエストロゲンの存在が必須であることが示されている⁽²²⁵⁾。また、アロマターズの抑制剤を雄ラットに投与すると、雄の性行動が抑制されることが報告されている^(37, 149, 226)。本研究でも、成体雄ラット脳の MPN-BST、BST pr、MEApd といった olfactory pathway を構成する一連の細胞群に、ER-IR と AROM-IR が重複して分布していることが認められた。したがって、これらの神経核にアンドロゲンから局所産生されたエストロゲンが作用することで、成体雄ラットの副嗅覚系の神経伝達を活性化し、結果的に雄型性行動の発現を高めているものと考えられる。

雄の性行動発現の鍵を握っているのも、アンドロゲン由来のエストロゲンであると考え、哺乳類の雄は、結局、その発生から行動発現まで、雌性ホルモンであるエストロゲンによってコントロールされていると言っても過言ではないのかもしれない。

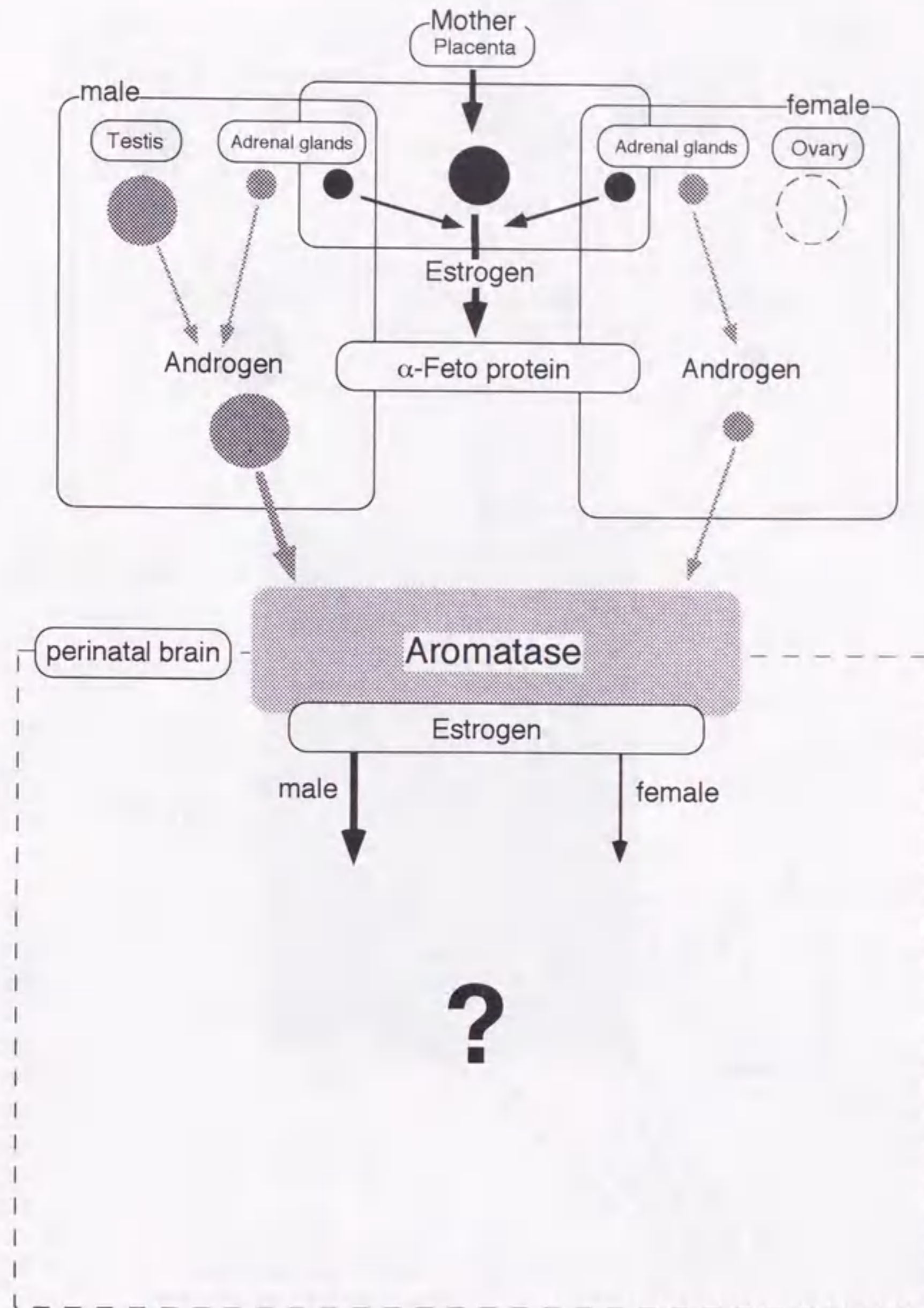


図8-1. これまで考えられていた周生期ラット脳へのエストロゲン作用

雄ラットの場合、主に精巣から分泌されるアンドロゲンによって脳の雄性化が誘導される。この場合、アンドロゲンはアロマターゼによってエストロゲンに転換されて、性的に未分化の脳に作用するが、脳のどの部位でこの作用が起こっているのかについては明らかではなかった。また、主に胎盤由来と思われるエストロゲンは、周生期動物の血中 α -フェトプロテインに結合して不活化すると考えられている。(図中矢印の方向は作用の及ぶ方向を、また、矢印の太さは作用の強さを示す。○の大きさは作用する性ステロイドホルモンの量の相対的な大きさを示す)

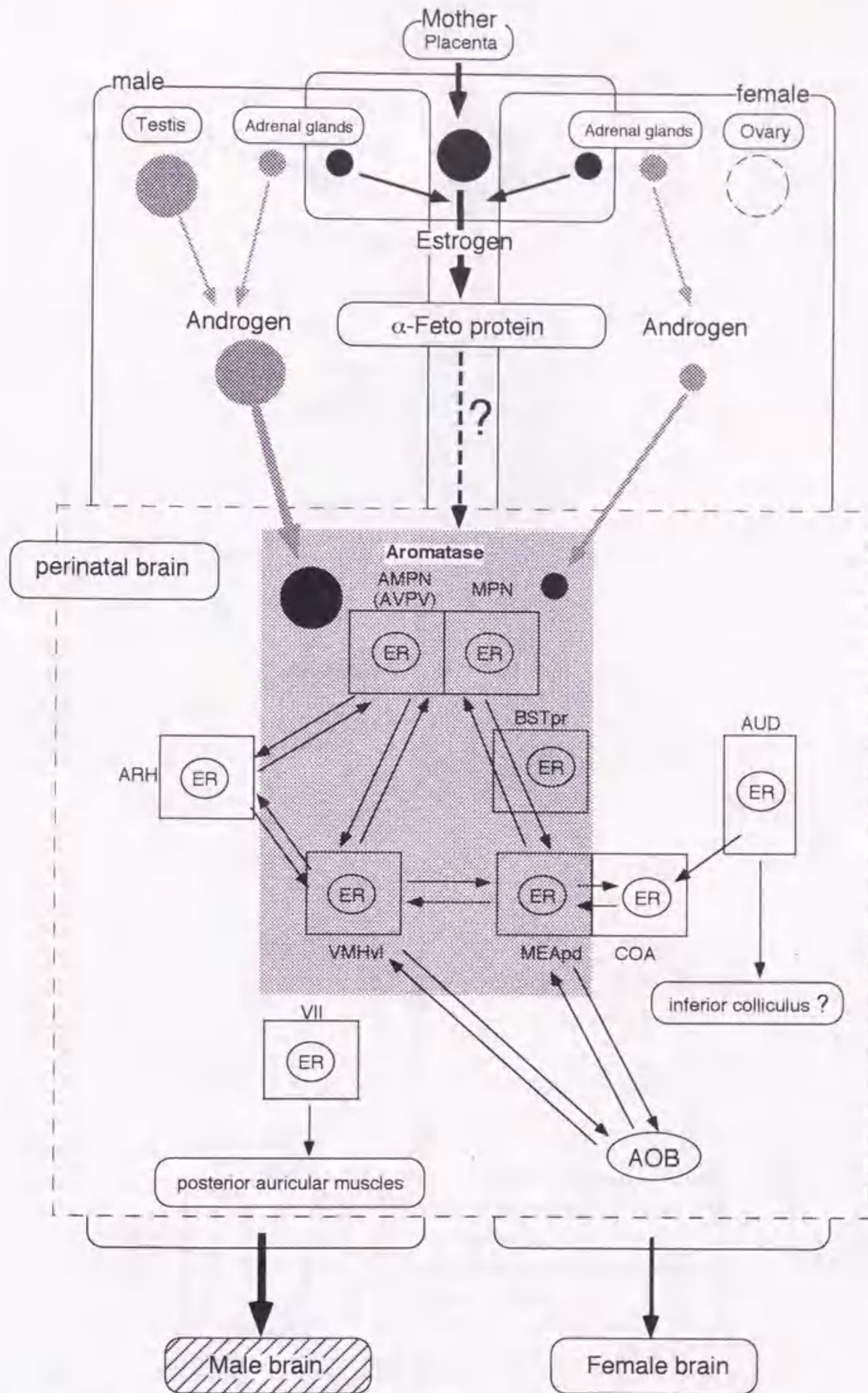


図8-2. 新生仔ラット脳におけるエストロゲンによる性分化機序

周産期において相対的にエストロゲンの作用量が多いことが脳の雄性化を誘導すると考えられる (α フェトプロテインによる遊離エストロゲンの不活化作用は不完全なものと考えられる: 点線矢印で示す)。点線で囲った部位は周産期の脳でエストロゲンの作用が及ぶ領域を示す。また、網目の部位はエストロゲンが局所産生される(アロマターゼ活性の存在する)部位を示す。図中、黒色矢印はエストロゲンの、また灰色矢印はアンドロゲンのそれぞれ作用の及ぶ方向を示す。線の太さは性ステロイドホルモン作用の強さを示す。○の大きさは性ステロイドホルモンの相対的な量を示す。

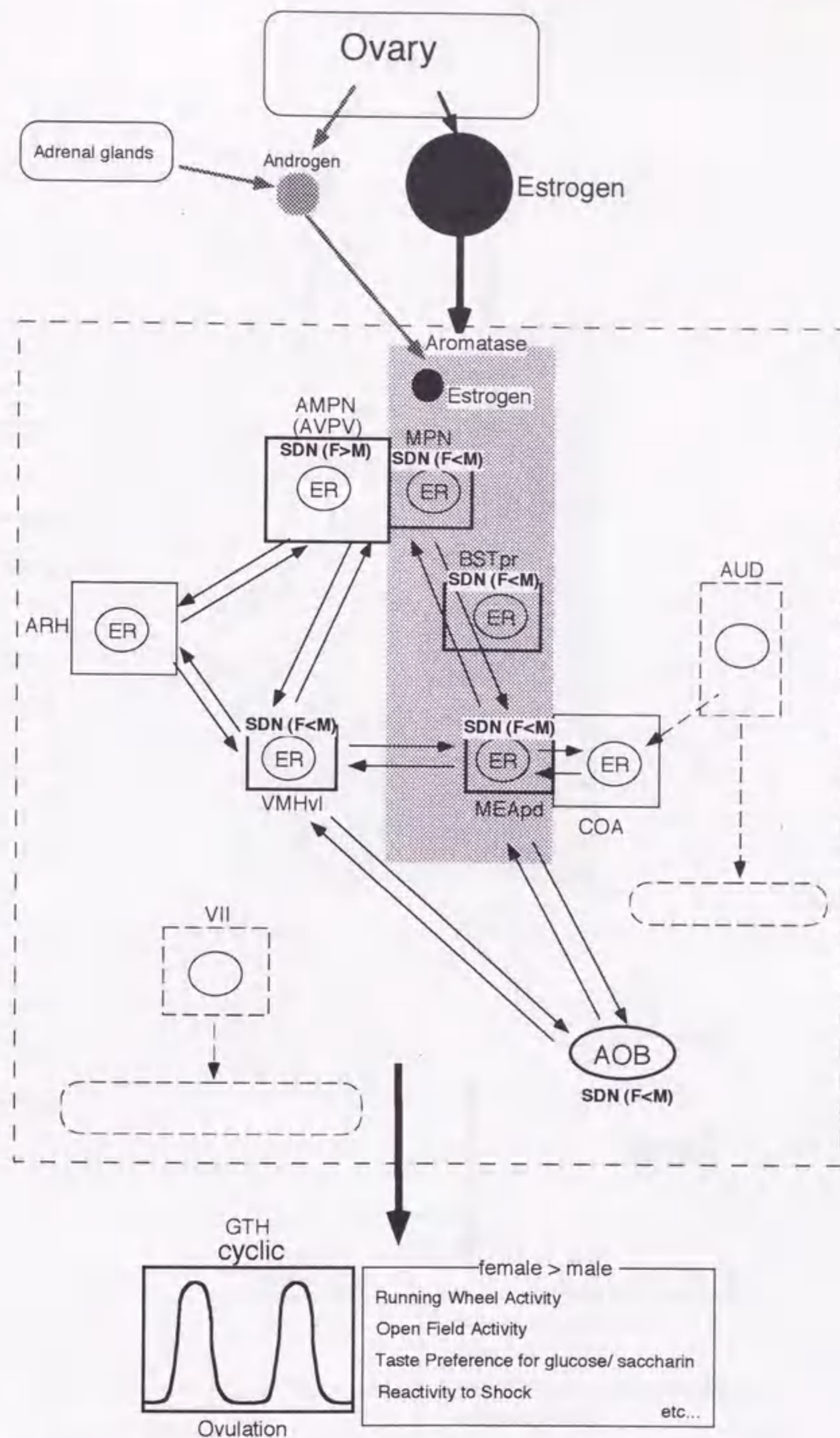


図8-3. 成体雌ラット脳に対するエストロゲン作用

内側視東前野や視床下部にエストロゲンが作用して、雌型のGTH分泌パターンや行動を示す。MPNの背側部、BSTpr、MEApdにはアロマターゼ活性が認められ、アンドロジェンからエストロゲンが局所産生されていると思われる。大脳皮質聴覚野や顔面神経核にはERは存在せず、エストロゲンは作用しないと考えられる。(矢印の方向はエストロゲン作用の及ぶ方向を、また矢印の太さは作用の強さを示す。SDNは性的二型が認められる神経核を示す。F>Mは雌のほうが雄より大きいことを、F<Mはその逆を示す。)

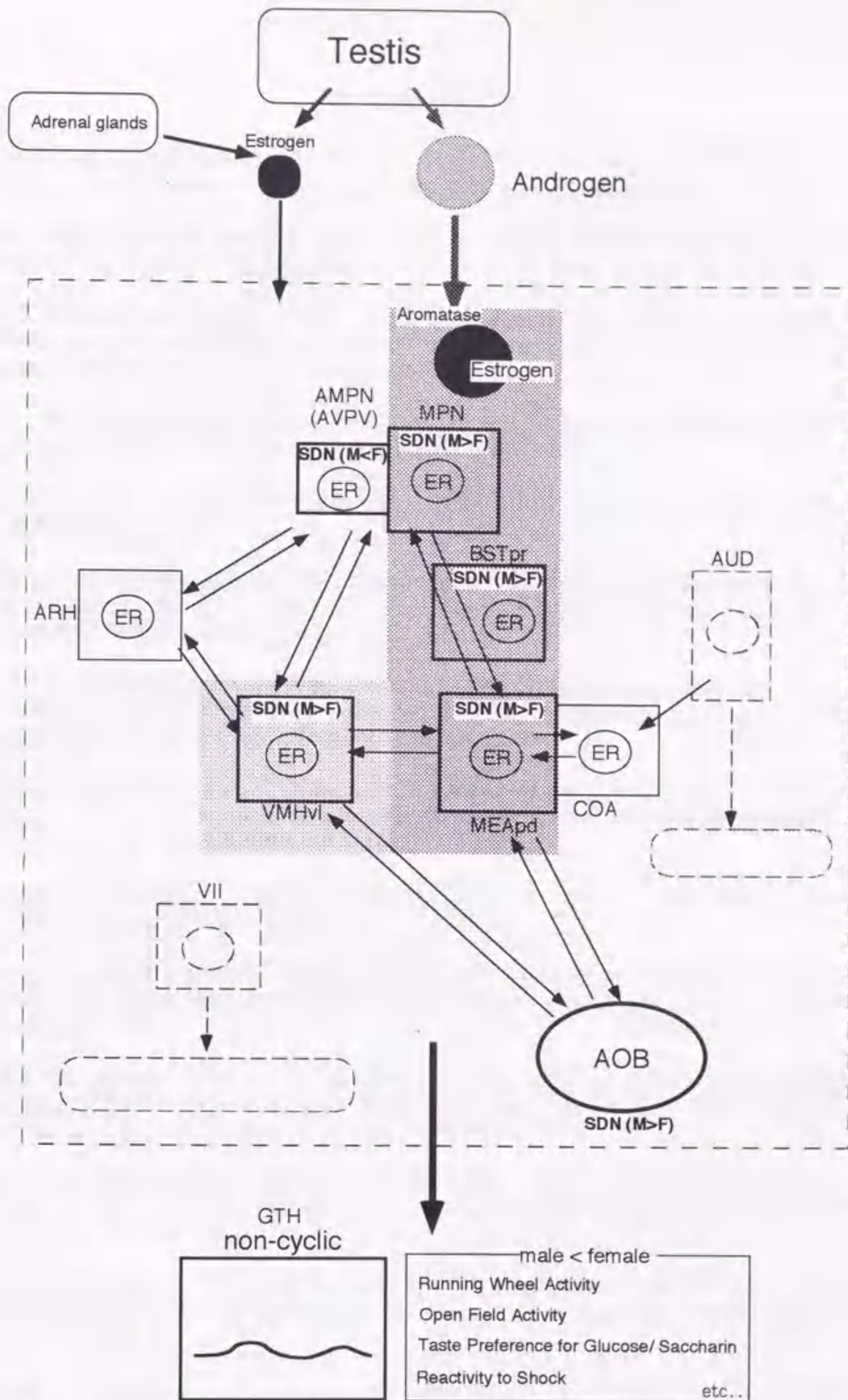


図8-4：成体雄ラット脳に対するエストロゲン作用

内側視床前野や視床下部に対するエストロゲン作用がアンドロゲン作用と協調して、雄型のGTH分泌パターンや行動を発現すると考えられる。MPNの背側部、BSTpr、MEApdに加え、VMHvlにも弱いアロマターゼ活性が認められ、アンドロゲンからエストロゲンが局所産生されてERに作用していると思われる。雌脳と同様に、大脳皮質聴覚野や顔面神経核にはERは存在せず、エストロゲンは作用しないと考えられる。(矢印の方向はエストロゲン作用の及ぶ方向を、また矢印の太さは作用の強さを示す。SDNは性的二型が認められる神経核を示す。F>Mは雌のほうが雄より大きいことを、F<Mはその逆を示す。)

References

- 1) Abe-Dohmae, S., Tanaka, R. and Harada, N. (1994). Cell type- and region-specific expression of aromatase mRNA in cultured brain cells. *Mol. Brain Res.* 24, 153-158.
- 2) Abramovich, D.R. and Rowe, P. (1973). Foetal plasma testosterone levels at mid-pregnancy and at term: relationship to foetal sex. *J. Endocrinol.* 56, 621-622.
- 3) Aihara, M. and Hayashi, S. (1989). Induction of persistent diestrus followed by persistent estrus is indicative of delayed maturation of tonic gonadotropin-releasing systems in the rat. *Biol.Reprod.* 40, 96-101
- 4) Allen, L.S., Hines, M., Shryne, J.E. and Gorski, R.A.(1989). Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *J. Neurosci.* 9, 497-506.
- 5) Allison, J.F., Stanley, A.J., and Gumbreck, L.G. (1965). Male pseudo-hermaphroditic rats. *Anat. Rec.* 153, 85-86.
- 6) Altman, J. and Bayer, S.A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. I. autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182, 945-972.
- 7) Altman, J. and Bayer, S.A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. II. correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J. Comp. Neurol.* 182, 973-994.
- 8) Altman, J. and Bayer, S.A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. III. ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *J. Comp. Neurol.* 182, 995-1016.
- 9) Ashwell, K.W. (1982). The adult mouse facial nerve nucleus: morphology and musculotopic organization. *J. Anat.* 135, 531-538.
- 10) Ashwell, K.W. and Watson, C.R.R. (1983). The development of facial motoneurons in the mouse - neuronal death and innervation of the facial muscles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 77, 117-141.
- 11) Axelson, J.F. Shannon, W. and Van Leeuwen, F.W. (1992). Immunocytochemical localization of estrogen receptors within neurotensin cells in the rostral preoptic area of the rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 136, 5-9.
- 12) Ayoub, D.M., Greenough, W.T. and Juraslka, J.M. (1983). Sex differences in dendritic structure in the preoptic area of the juvenile macaque monkey brain. *Science.* 219, 197-198.
- 13) Babcock, A.M., Bloch, G.J. and Micevych, P.E. (1988). Injection of cholecystokinin into the ceryromedial hypothalamic nucleus inhibit lordosis behavior. *Physiol. Behav.* 43, 195-199.
- 14) Balthazart, J., Foidart, A., Surlemont, C. and Harada, N. (1990). Neuroanatomical specificity in the co-localization of aromatase and estrogen receptors. *J. Neurobiology.* 22, 143-157.
- 15) Balthazart, J., Foidart, and Harada, N. (1990). Immunocytochemical localization of aromatase in the brain. *Brain Res.* 514, 327-333.
- 16) Balthazart, J., Foidart, A., Surlemont, C. and Harada, N. (1991). Distribution of aromatase-immunoreactive cells in the mouse forebrain. *Cell Tissue Res.* 263, 71-79.

- 17) Barbanel, G. and Assenmacher, I. (1980). Postnatal development of estradiol receptor in female and male rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 18, 227-239.
- 18) Barraclough, C.A. (1961). Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology*, 68, 62-67.
- 19) Barraclough, C.A. and Gorski, R.A. (1960). Evidence that hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology*. 68, 68-79.
- 20) Beltramono, C. and Taleisnik, S. (1978). Facilitatory and inhibitory effects of electrochemical stimulation of the amygdala on the release of luteinizing hormone. *Brain Res.* 144, 95-107.
- 21) Beltramono, C. and Taleisnik, S. (1980). Dual action of electrochemical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis on the release of LH. *Neuroendocrinology*, 30, 238-242.
- 22) Bernardis, L.L. and Frohman, L.A. (1970). Effect of lesion size in the ventromedial hypothalamus on growth hormone and insulin levels in weaning rats. *Neuroendocrinology*, 6, 319-328.
- 23) Bernardis, L.L. and Frohman, L.A. (1971). Plasma growth hormone responses to electrical stimulation of the hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinology*, 7, 193-201.
- 24) Blaustein, J.D. (1992). Cytoplasmic estrogen receptors in rat brain: immunocytochemical evidence using three antibodies with distinct epitopes. *Endocrinology*. 131, 1336-1342.
- 25) Blaustein, J.D. (1993). Estrogen receptor immunoreactivity in rat brain: rapid effects of estradiol injection. *Endocrinology*, 132, 1218-1224.
- 26) Blaustein, J.D., Lehman, M.L., Turcotte, J.C. and Greene, G. (1992). Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pig hypothalamus. *Endocrinology*. 18, 227-239.
- 27) Bleier, R., Byne, W. and Siggelkow, I. (1982). Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J. Comp. Neurol.* 212, 118-130.
- 28) Block, T.J. and Gorski, R.A. (1988). Cytoarchitectonic analysis of the SDN-POA of the intact and gonadectomized rat. *J. Comp. Neurol.* 275, 604-612.
- 29) Brennan, P., Kaba, H. and Keverne, B. (1990). Olfactory recognition: a simple memory system. *Science*. 250, 1223-1226.
- 30) Brown-Grant, K. (1973). Steroid hormone administration and gonadotrophin secretion in the gonadectomized rat. *J. Endocrinol.* 62, 319-332.
- 31) Brown, T.J., MacLusky, N.J., Toran-Allerand, C.D., Zielinski, J.E. and Hochberg, R.B. (1989). Characterization of 11β -methoxy- 16α -[125 I] iodoestradiol binding: neuronal localization of estrogen-binding sites in the developing rat brain. *Endocrinology*. 124, 2074-2088.
- 32) Bubenik, G. A. and Brown, G.M. (1973). Morphologic sex differences in primate brain areas involved in regulation of reproductive activity. *Experientia*. 29, 619-621.

- 33) Calaresu, F. R. and Henry, J.L. (1971). Sex difference in the number of sympathetic neurons in spinal cord of the cat. *Science*. 173, 343-344.
- 34) Callard, G. V., Petro, Z. and Ryan, K.J. (1978). Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in central nervous system. *Endocrinology*. 103, 2283-2290.
- 35) Canteras, N.S., Simerly, R.B. and Swanson, L.W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* 324, 143-179.
- 36) Chiba, T. and Murata, Y. (1985). Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain Res. Bull.* 14, 261-272.
- 37) Christensen, L.W. and Clemens, L.G. (1974). Blockade of testosterone-induced mounting behavior in the male rat with intracranial application of the aromatization inhibitor, androst-1,4,6-triene-3,17-dione. *Endocrinology*. 97, 1545-1551.
- 38) Cintra, A., Fuxe, K., Harfstrand, A., Agnati, L.F., Miller, L.S., Greene, J.L. and Gustafsson, J.A. (1986). On the cellular localization and distribution of estrogen receptors in the rat tel- and diencephalon using monoclonal anti-bodies to human estrogen receptor. *Neurochem. Int.* 8, 587-595.
- 39) Clopton, B.M. (1986). Neural correlates of development and plasticity in the auditory, somatosensory, and olfactory systems. *In*: W.T. Greenough and Juraska, J.M. (eds.), *Developmental neuropsychobiology*. pp.363-386. Academic Press, Orlando.
- 40) Colpaert, F.C. and Wiepkema, P.R. (1976). Effects of ventromedial hypothalamic lesions on spontaneous intraspecies aggression in male rats. *Behav. Biol.* 16, 117-125.
- 41) Commins, D. and Yahr, P. (1984). Adult testosterone levels influence the morphology of sexually dimorphic area in mongolian gerbil brain. *J. Comp. Neurol.* 224, 132-140.
- 42) Corbier, P. (1985). Sexual differentiation of positive feedback: effect of hour of castration at birth on estradiol-induced luteinizing hormone secretion in immature male rats. *Endocrinology*. 116, 142-147.
- 43) Corodimas, K.P. and Morrell, J.I. (1990). Preoptic area estradiol-concentrating neurons project to the hypothalamus in female rats. *Exp. Brain Res.* 80, 381-386.
- 44) Csernus, V. (1986). Production of sexual steroids in rats during pre- and early postnatal life. *Exp. Clin. Endocrinol.* 88, 1-5.
- 45) Curry, J.J. and Heim, L.M. (1966). Brain myelination after neonatal administration of oestradiol. *Nature*. 209, 915-916.
- 46) Dani, J.M., Armstrong, D.M. and Benowitz, L.I. (1991). Mapping the development of the rat brain by gap-43 immunocytochemistry. *Neuroscience*. 40, 277-287.
- 47) Dawson, J.L.M., Cheung, Y.M. and Lau, R.T.S. (1975). Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol. Psychol.* 3, 213-229.

- 48) Del Abril, A., Segovia, S and Guillamón, A. (1987). The bed nucleus of the stria terminalis in the rat: regional sex difference controlled by gonadal steroids early after birth. *Dev. Brain Res.* 32, 295-300.
- 49) Del Abril, A., Segovia, S and Guillamón, A. (1990). Sexual dimorphism in the parastrial nucleus of the rat preoptic area. *Dev. Brain Res.* 52, 11-15.
- 50) Dellovade, T.L., Blaustein, J.D. and Rissman, E.F. (1992). Neural distribution of estrogen receptor immunoreactive cells in the female musk shrew. *Brain Res.* 595, 189-194
- 51) De Olmos, J., Hardy, H. and Heimer, L. (1978). The afferent connections of the main and accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. *J. Comp. Neurol.* 181, 213-244.
- 52) Derer, P. and Derer, M. (1993). Ontogenesis of NADPH-diaphorase neurons in the mouse forebrain. *Neurosci. Lett.* 152, 21-24.
- 53) De Vries, Buijjs, R. M. and Swaab, D. F. (1981). Ontogeny of the vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projection in the rat brain-presence of a sex difference in the lateral septum. *Brain Res.* 218, 67-78.
- 54) De Vries, G.J., Gonzales, C.L. and Yahr, P. (1988). Afferent connections of the sexually dimorphic area of the hypothalamus of male and female gerbils. *J. Comp. Neurol.* 271, 91-105.
- 55) Diamond, M.C.(1987). Sex differences in the rat forebrain. *Brain Res. Rev.* 12, 235-240.
- 56) Diamond, M.C.(1978). Johnson, R.E. and French, R.G., Changes in cerebral cortical morphology due to gonadectomy. *Anat. Rec.* 190, 382.
- 57) Döhler, K.D., Coquelin, A., Davis, F., Hines, M., Shryne, J.E., Sickmoller, P.M., Jarzab, B. and Gorski, R.A. (1986). Pre- and postnatal influence of estrogen antagonist and an androgen antagonist on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Neuroendocrinology.* 42, 443-448.
- 58) Döhler, K.D., H.Hines, A. Coquelin, F. Davis, J.E. Shryne, and Gorski, R.A. (1982). Pre- and postnatal influence of diethylstilboestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the female rat brain. *Neuroendocrinol. Lett.* 4, 361-365
- 59) Döhler, K.D., Srivastava, S. S. M., Shryne, Jarzab, B., Sipos, A. and Gorski, R.A. (1986). Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. *Neuroendocrinology.* 38, 297-301.
- 60) Döhler, K.D. and Wuttke, W. (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology.* 97, 898-907.
- 61) DonCarlos, L.L., and Handa, R.J. (1994). Developmental profile of estrogen receptor mRNA in the preoptic area of male and female neonatal rat. *Dev. Brain Res.* 79, 283-289.
- 62) Doughy, C., Booth, J., McDonald, P.G. and Parrott, R.F. (1975). Effects of oestradiol-17 β , oestradiol benzoate and the synthetic oestrogen RU 2858 on sexual differentiation in the neonatal female rat. *J. Endocrinol.* 67, 419-424.

- 63) Faye-Lund, H. (1985). The neocortical projection to inferior colliculus in the albino rat. *Anat. Embryol.* 173, 53-70.
- 64) Flugge, G., Oertel, W.H. and Wuttke, W. (1986). Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/ anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology.* 43, 1-5.
- 65) Foidart, A., de Clerck, A., Harada, N. and Balthazart, J. (1994). Aromatase-immunoreactive cells in the quail brain: effects of testosterone and sex dimorphism. *Physiol. Behav.* 55, 453-464.
- 66) Fox, C.A., Ross, L.R. and Jacobson, C.D. (1991). Ontogeny of cells containing estrogen receptor-like immunoreactivity in the Brazilian opossum brain. *Dev. Brain Res.* 63, 209-219.
- 67) Fox, C.A., Ross, L.R. Handa, R.J. and Jacobson, C.D. (1991). Localization of cells containing estrogen receptor-like immunoreactivity in the Brazilian opossum brain. *Brain Res.* 546, 96-105.
- 68) Fredrick, W.G. and Sergio, R.O. (1982). Changes in aromatase activity in the rat brain during embryonic, neonatal, and infantile development. *Endocrinology.* 111, 522-529.
- 69) Friauf, E. (1986). Morphology of motoneurons in different subdivisions of the rat facial nucleus stained intracellularly with horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 253, 231-241.
- 70) Friedman, W.J., McEwen, B. S., Toran-Allerand, C.D. and Gerlach, J.L. (1983). Perinatal development of hypothalamic and cortical estrogen receptors in mouse brain: methodological aspects. *Dev. Brain Res.* 11, 19-27.
- 71) Furlow, J.D., Ahrens, H., Mueller, G.D. and Gorski, J. (1990). Antisera to synthetic peptides recognize native and denatured rat estrogen receptors. *Endocrinology.* 127, 1028-1032.
- 72) Gally, J.A., Read Montague, P., Reeke, G.N. Jr. and Edelman, G.M. (1990). The NO hypothesis: possible effects of a short-lived, rapidly diffusible signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 3547-3551.
- 73) García, E.P., Denari, J.H. and Rosner, J.M. (1973). Uptake and metabolic effects of estradiol in the guinea pig cerebral cortex. *Steroids Lipids Res.* 4, 248-256.
- 74) Gerlach, J.L., McEwen, B.S., Toran-Allerand, C.D. and Friedman, W.J. (1983). Perinatal development of estrogen receptors in mouse brain assessed by radioautography, nuclear isolation and receptor assay. *Dev. Brain Res.* 11, 7-18.
- 75) Goodman, R.L. (1978). The site of the positive feedback action of estradiol in the rat. *Endocrinology.* 102, 151-159.
- 76) Gorski, R.A. (1963). Modification of ovulatory mechanisms by postnatal administration of estrogen to the rat. *Am. J. Physiol.* 205, 842-844.
- 77) Gorski, R.A. (1993). Editorial: estradiol acts via the estrogen receptor in the sexual differentiation of the rat brain, but what does this complex do? *Endocrinology.* 133, 431-432.

- 78) Gorski, R.A., Gordon, J.H., Shryne, J.E. and Southam, A.M. (1978). Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148, 333-346.
- 79) Goy, R.W. and McEwen, B.S. (1980). *Sexual differentiation of the brain.* Cambridge MIT Press. Massachusetts.
- 80) Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P. and Chambon, P. (1986). Human estrogen receptor cDNA: sequence, expression, and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
- 81) Greenough, W.T., Carter, C. S., Steerman, C and DeVoogd, T. J. (1977). Sex differences in dendritic patterns in hamster preoptic area. *Brain Res.* 126, 63-72.
- 82) Greene, G.L., Bobel, N.B., King, W.J. and Jensen, E.V. (1984). Immunochemical studies of estrogen receptors. *J. Steroid. Biochem.* 20, 51-56.
- 83) Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. and Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 231, 1150-1154.
- 84) Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. and Levell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature.* 346, 245-250.
- 85) Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M. and McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J. Neurosci.* 10, 1286-1291.
- 86) Guillamón, A., Segovia, S. and del Abril, A. (1988). Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Dev. Brain Res.* 44, 281-290
- 87) Harada, N. and Yamada, K. (1992). Ontogeny of aromatase messenger ribonucleic acid in mouse brain: fluorometrical quantitation by polymerase chain reaction. *Endocrinology.* 131, 2306-2312.
- 88) Harris, G.W. (1964). The upjohn lecture of the endocrine society. sex hormones, brain development and brain function. *Endocrinology.* 75, 627-648.
- 89) Hayashi, S. and Okamura, H. (1992). Factors regulating Sexual differentiation of the brain: Neonatal steroid treatment and development of the reproductive brain in the rat. *In* : Yokoyama, A.(eds.) *Brain Control of the Reproductive System.* pp49-68. Japan Scientific Societies press, CRC Press, Tokyo .
- 90) Herbison, A.E., Robinson, J.E. and Skinner, D.C. (1993). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinol.* 57, 751-759.
- 91) Herbison A.E. and Theodosis, D.T. (1992). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience.* 50, 283-298.
- 92) Herbison, A.E. and Theodosis, D.T. (1992) Immunocytochemical identification of oestrogen receptors in preoptic neurons containing calcitonin gene-related peptide in the male and female rat. *Neuroendocrinology.* 56, 761-764.

- 93) Hinrichsen, C.F.L. and Watson, C.D. (1983). Brain stem projections to the facial nucleus of the rat. *Brain Behav. Evol.* 22, 153-163.
- 94) Hinrichsen, C.F.L. and Watson, C.D. (1984). The facial nucleus of the rat: Representation of facial muscles revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anat. Rec.* 209, 407-415.
- 95) Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M. and Vincent, S.R. (1991). neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2811-2814.
- 96) Hutchison, R. E., Hutchison, J. B., Steimer, T., Steel, E., Powers, B., Walker, A. P., Herbert, J. and Hastings, H. (1991). Brain aromatization of testosterone in the male syrian hamster: effects of androgen and photoperiod. *Neuroendocrinology.* 53, 194-203.
- 97) Jacobson, C.D., Csernus, V.J., Shryne, J.E. and Gorski, R.A. (1981). The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *J. Neurosci.* 1, 1142-1147.
- 98) Jacobson, C.D., Shryne, J.E., Shapiro, F. and Gorski, R.A. (1980). Ontogeny of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 193, 541-548.
- 99) Jakab, R.L., Horvath, T.L., Leranth, C., Harada, N. and Naftolin, F. (1993). Aromatase immunoreactivity the rat brain: gonadectomy-sensitive hypothalamic neurons and an unresponsive "limbic ring" of the lateral septum-bed nucleus-amygdala complex. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 481-498.
- 100) Joseph, R., Hess, S. and Birecree, E. (1978). Effects of hormone manipulations and exploration on sex differences in maze learning. *Behav. Biol.* 24, 364-377.
- 101) Kalra, S.P. (1993). Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory lutenizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr. Rev.* 14, 507-538.
- 102) Keefer, D. and Holderegger, C. (1985). The ontogeny of estrogen receptors: brain and pituitary. *Dev. Brain Res.* 19, 183-194.
- 103) Keefer, D.A., Stumpf, W.E. and Sar, M. (1973). Estrogen-topographical localization of estrogen-concentrating cells in the rat spinal cord following 3H-estradiol administration. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 143, 414-417.
- 104) Kelly, D.D. (1991). Sexual differentiation of the nervous system. *In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessell, T.M. (eds.) Principles of neural science, Third Edition.* pp959-973. Elsevier, New York.
- 105) Kendrick, K.M. and Drewett, R.F. (1979). Testosterone reduces refractory period of stria terminalis neurons in the rat brain. *Science.* 204, 877-879.
- 106) Kendrick, K.M. and Drewett, R.F. (1980). Testosterone-sensitive neurons respond to oestradiol but not to dihydrotestosterone. *Nature.* 286, 67-68.
- 107) Kimura, E., Mitsugi, N., Arita, J., Akema, T. and Yoshida, K. (1987). Effects of preoptic injections of gastrin, cholecystokinin, secretin, vasoactive intestinal peptide and PHI on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in ovariectomized estrogen-primed rats. *Brain Res.* 410, 315-322.

- 108) Kitawaki, J., Yoshida, N. and Osawa, Y. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of aromatase cytochrome P-450. *Endocrinology*. 124, 1417-1423.
- 109) Koch, M. (1990). Effects of treatment with estradiol and parental experience on the number and distribution of estrogen-binding neurons in the ovariectomized mouse brain. *Neuroendocrinology*. 51, 505-514.
- 110) Koch, M. and Ehret, G. (1989). Immunocytochemical localization and quantitation of estrogen-binding cells in the male and female (virgin, pregnant, lactating) mouse brain. *Brain Res.* 489, 101-112.
- 111) Koike, S., Sakai, M. and Muramatsu, M. (1987). Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA. *Nucleic Acids Res.* 15, 2499-2513.
- 112) Kostovic, I and Rakic, P. (1984). Development of prestriate visual projections in the monkey and human fetal cerebrum revealed by transient cholinesterase staining. *J. Neurosci.* 4, 25-42.
- 113) Krieger, M.S., Morrell, J.I. and Pfaff, D.W. (1976). Autoradiographic localization of estradiol-concentrating cells in the female hamster brain. *Neuroendocrinology*. 22, 193-205.
- 114) Krompotic-Nemanic, J., Kostovic, I., Kelovic, Z., Nemanic, D. and Mrzljak, L. (1983). Development of the human fetal auditory cortex: growth of afferent fibers. *Acta Anat.* 116, 69-73.
- 115) Lalau, J.D., Aubert, M.L., Carmignac, D.F., Grégoire, I. and Dupouy, P.J. (1990). Reduction in testicular function in rats. I. reduction by a specific gonadotrophin-releasing hormone antagonist in fetal rats. *Neuroendocrinology*. 51, 284-288.
- 116) Lalau, J.D., Aubert, M.L., Carmignac, D.F., Grégoire, I. and Dupouy, P.J. (1990). Reduction in testicular function in rats II. reduction by a dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology*. 51, 289-293.
- 117) Lauber, A.H., Mobbs, C.V., Muramatsu, M. and Pfaff, D.W. (1991). Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose. *Endocrinology*. 129, 3180-3186.
- 118) Lehman, M.N. and Winans, S.S. (1982). Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res.* 240, 27-41.
- 119) Leong, S.K., Shieh, J.Y. and Wong, W.C. (1984). Localizing spinal-cord-projecting neurons in neonatal and immature albino rats. *J. Comp. Neurol.* 228, 18-23.
- 120) LeVay S (1991). A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science*. 253, 1034-1037.
- 121) Lieberburg, I., Krey, L.C. and McEwen, B.S. (1979). Sex differences in serum testosterone and in exchangeable brain cell nuclear estradiol during the neonatal period in rats. *Brain Res.* 178, 207-212.
- 122) Lindsey, J. R. (1979). Historical Foundations. *In*: Baker, H.J., Lindsey, J. R. and Weisbroth, S.H.(eds.), *The laboratory Rat*, Vol. 1, pp.1-36. Academic Press, London.
- 123) Liposits, Z., Kallo, I., Coen, C.W., Paull, W.K. and Flerko, B. (1990). Ultrastructural analysis of estrogen receptor immunoreactive neurons in the medial preoptic area of the female rat brain. *Histochemistry*. 93, 233-239.

- 124) Lira, S.A., Phipps Jr, D.W. and Sarkar, D.K. (1986). Loss of estrogen-positive feedback action on LH release during prepubertal period in rats treated postnatally with an opiate antagonist. *Neuroendocrinology*. 44. 331-337.
- 125) Litteria, M. and Thorner, M.W.(1976). Inhibitory action of neonatal estrogenization in the incorporation of [³H] lysine into cortical neuroproteins. *Brain Res.* 103, 584-587.
- 126) Loy, R. and Milner, T. A. (1980). Sexual dimorphisms in extent of axonal sprouting in rat hippocampus. *Science*. 208, 1282-1284.
- 127) Lusting, R.H., Mobbs, C.V., Bradlow, H.L., McEwen, B.S. and Pfaff, D.W. (1989). Differential effects of estradiol and 16 α -hydroxyestrone on pituitary and preoptic estrogen receptor regulation. *Endocrinology*. 125, 2701-2709.
- 128) Lyon, M.F. and Hawkes, S.G. (1970). An x-linked gene for testicular feminization of the mouse. *Nature*. 227, 1217-1219.
- 129) Ma, L., Ishizaki, Y., Morita, I. and Murata, S. (1991). Presence of nitric oxide synthase activity in the neurons of the rat embryonal cerebrum. *Neurosci. Lett.* 132, 23-25.
- 130) MacLusky, N.J., Chaptal, C. and McEwen, B.S. (1979). The development of estrogen receptor systems in the rat brain and pituitary: perinatal development. *Brain Res.* 178, 129-142.
- 131) MacLusky, N.J., Chaptal, C. and McEwen, B.S. (1979). The development of estrogen receptor systems in the rat brain and pituitary: postnatal development. *Brain Res.* 178, 143-160.
- 132) MacLusky, N.J., Clark, A.S., Naftolin, F. and Goldman-Rakic, P.S. (1987). Estrogen formation in the mammalian brain: possible role of aromatase in sexual differentiation of the hippocampus and neocortex. *Steroids*. 50, 459-474.
- 133) MacLusky, N.J., Philip, A., Hurlburt, C. and Naftolin, F. (1984). Estrogen metabolism in neuroendocrine structures. In : Serono symposia publications from raven press volume 13, Celotti, F., Naftolin, F. and Martini, L. [eds.] *Metabolism of hormonal steroids in the neuroendocrine structures*, pp 103-116. Raven Press, New York.
- 134) MacLusky, N.J., Philip, A., Hurlburt, C. and Naftolin, F. (1985). Estrogen formation in the developing rat brain: sex differences in aromatase activity during early post-natal life. *Psychoneuroendocrinol.* 10, 355-361.
- 135) MacLusky, N.J., Chaptal, C. and McEwen, B.S. (1979). The development of estrogen receptor systems in the rat brain and pituitary: perinatal development. *Brain Res.* 178, 129-142.
- 136) MacLusky, N.J., Chaptal, C. and McEwen, B.S. (1979). The development of estrogen receptor systems in the rat brain and pituitary: postnatal development. *Brain Res.* 178, 143-160.
- 137) MacLusky, N.J. and Naftolin, F. (1981). Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*. 211 1294-1303.
- 138) Maggi, A., Susanna, L., Bettini, E., Mantero, G. and Zucchi, I. (1989). Hippocampus: a target for estrogen action in mammalian brain. *Mol. Endocrinol.* 3, 1165-1170.

- 139) Martin, M.R. and Lodge, D. (1977). Morphology of the facial nucleus of the rat. *Brain Res.* 123, 1-12.
- 140) Matsumoto, A. (1991). Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain. *Psychoneuroendocrinology.* 16, 25-40.
- 141) Matsumoto, A and Arai, Y. (1976). Effect of estrogen on early postnatal development of synaptic formation in the hypothalamic arcuate nucleus of female rats, *Neurosci. Lett.* 2, 79-82.
- 142) Matsumoto, A and Arai, Y. (1981). Effect of androgen on sexual differentiation of synaptic organization in the hypothalamic arcuate nucleus: An ontogenetic study. *Neuroendocrinology.* 33, 166-169.
- 143) Matsumoto, A. and Arai, Y. (1980). Sexual dimorphism in "wiring pattern" in the hypothalamic arcuate nucleus and its modification by neonatal hormone environment. *Brain Res.* 190, 238-242.
- 144) Matsumoto, A., and Arai, Y. (1986). Male-female difference in synaptic organization of the ventromedial nucleus of the hypothalamus in the rat. *Neuroendocrinology.* 42, 232-236.
- 145) McCarthy, M.M., Schlenker, E.H. and Pfaff, D.W. (1993). Enduring consequences of neonatal treatment with antisense oligodeoxynucleotides to estrogen receptor messenger ribonucleic acid on sexual differentiation of rat brain. *Endocrinology.* 133, 433-439.
- 146) McCullough, J. and Quadagno, D.M. (1974). Neonatal gonadal hormones: effect on maternal and sexual behavior in the male rat. *Physiol. Behav.* 12, 183-188.
- 147) McDonald, P.G. and Doughty, C. (1972). Inhibition of androgen-sterilization in the female rat by administration of an antioestrogen. *J. Endocrinol.* 55, 455-456.
- 148) McEwen, B.S. (1981). Neural gonadal steroid actions. *Science.* 211, 1303-1311.
- 149) McEwen, B.S., Lieberburg, I., Chaptal, C. and Krey, L.C. (1977). Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Horm. Behav.* 9, 249-263.
- 150) Meyers-Wallen, V.N. (1993). Genetics of sexual differentiation and anomalies in dogs and cats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47, 441-452.
- 151) Micevych, P., Akesson, T. and Elde, R. (1988). Distribution of cholecystokinin-immunoreactive cell bodies in the male and female rat: II. bed nucleus of the stria terminalis and amygdala. *J. Comp. Neurol.* 269, 381-391.
- 152) Michnovicz, J.J., Hahn, E.F. and Fishman, J. (1987). 19-Hydroxylation and aromatization of androgens of the developing rat brain. *Endocrinology.* 121, 1209-1214.
- 153) Miranda, R.C. and Toran-Allerand, C.D. (1992). Developmental expression of estrogen receptor mRNA in the rat cerebral cortex: a nonisotopic *in situ* hybridization histochemistry study. *Cereb. Cortex.* 2, 1-15.
- 154) Miyakawa, M. and Arai, Y. (1987). Synaptic plasticity to estrogen in the lateral septum of the adult male and female rats. *Brain Res.* 436, 184-188.
- 155) Mizukami, S., Nishizuka, M. and Arai, Y. (1983). Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp. Neurol.* 79, 569-575.

- 156) Morris, J. M. (1953). The syndrome of testicular feminization in male pseudohermaphrodites. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 654, 1192-1211.
- 157) Murakami, S. and Arai, Y. (1989). Neuronal death in the developing sexually dimorphic periventricular nucleus of the preoptic area in the female rat: effect of neonatal androgen treatment. *Neurosci. Lett.* 102, 185-190.
- 158) Naftolin, F., Garcia-Segura, L.M., Keefe, D., Leranth, C., Maclusky, N.J. and Brawer J.R. (1990). Estrogen effects on the synaptology and membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Biol. Reprod.* 41, 21-28.
- 159) Naftolin, F., Ryan, K. J., Davies, I.J., Reddy, V.V., Flores, F., Petro, Z. and Kuhn, M. (1975). The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Res. Prog. Hormone Res.* 31, 295-319.
- 160) Naftolin, F., Ryan, K. J. and Petro, Z. (1971). Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 33, 368-370.
- 161) Nance, D.M. (1976). Sex differences in hypothalamic regulation of feeding behavior in the rat. *In: Riesen, A.H. and Thompson, R.F. [eds.] Advances in Psychobiology, Volume 3*, pp 75-123. Wiley, Chichester.
- 162) Nishizuka, M. (1992). Sexual differentiation and neuronal plasticity of synaptic organization during and after the brain development. *In: Yokoyama, A. (eds.) Brain Control of the Reproductive System.* pp21-48. Japan Scientific Societies press, CRC press, Tokyo.
- 163) Nishizuka, M. and Arai, Y. (1981). Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Res.* 212, 31-38.
- 164) Nishizuka, M. and Arai, Y. (1981). Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: Implications for sexual differentiation of the brain. *Brain Res.* 213, 422- 426.
- 165) Nishizuka, M. and Arai, Y. (1983). Regional difference in sexually dimorphic synaptic organization of the medial amygdala. *Exp. Brain Res.* 49, 462-465.
- 166) Nishizuka, M. and Arai, Y. (1983). Male-female differences in the intra-amygdaloid input to the medial amygdala. *Exp. Brain Res.* 52, 328-332.
- 167) Nordeen, E.J., Nordeen, K.W., Sengelaub, D.R. and Arnold, A.P. (1985). Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science.* 229, 671-673.
- 168) Norman, R.L. and Spies, H.G. (1986). Cyclic ovarian function in a male macaque: additional evidence for a lack of sexual differentiation in the physiological mechanisms that regulate the cyclic release of gonadotropins in primates. *Endocrinology.* 118, 2608-2610.
- 169) Ohno, S. (1979). Major sex-determining genes. *Monogr. Endocrinol.* 11, 1-140.
- 170) Okamura, H., Yamamoto, K., Hayashi, S., Kuroiwa, A. and Muramatsu, A. (1992). A polyclonal antibody to the rat oestrogen receptor expressed in *Escherichia coli*: characterization and application to immunohistochemistry. *J. Endocrinol.* 135, 333-341.

- 171) Okamura, H., Yokosuka, M. and Hayashi, S. (1994). Induction of substance P-immunoreactivity by estrogen in neurons containing estrogen receptors in anteroventral periventricular nucleus of female but not male rat. *J. Neuroendocrinol.* 6, 609-615.
- 172) Okamura, H., Yokosuka, M. and Hayashi, S. (1994). Estrogenic induction of NADPH-diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* 6, 597-601.
- 173) Okamura, H., Yokosuka, M. McEwen, B.S. and Hayashi, S. (1994). Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: stimulatory effect of estrogen on NADPH-diaphorase activity. *Endocrinology.* 135, 1705-1708.
- 174) Olster, D.H. and Blaustein, J.D. (1991). Progesterone facilitates lordosis, but not LH release, in estradiol pulse-primed male rats. *Physiol. Behav.* 50, 237-242.
- 175) Panksepp, J. (1971). Effects of hypothalamic lesions on mouse-killing and shock-induced fighting in rats. *Physiol. Behav.* 6, 311-316.
- 176) Pappas, C.T.E., Diamond, M.C. and Johnson, R.E. (1978). Effects of ovariectomy and differential experience on rat cerebral cortical morphology. *Brain Res.* 154, 53-60.
- 177) Petersen, S.L. and Barraclough, C.A. (1989). Suppression of spontaneous LH surges in estrogen-treated ovariectomized rats by microimplants of antiestrogens into the preoptic brain. *Brain Res.* 484, 279-289.
- 178) Pfaff, D.W. (1968). Autoradiographic localization of radioactivity in the rat brain after injection of tritiated sex hormones. *Science.* 161, 1355-1356.
- 179) Pfaff, D.W. (1968). Uptake of estradiol- 17β - ^3H in the female rat brain: An autoradiographic study. *Endocrinology.* 82, 1149-1155.
- 180) Pfaff, D.W. (1980). Estrogens and brain function. *In: Chapter 7 Hypothalamic mechanisms.* pp106-127. Springer-Verlag, New York.
- 181) Pfaff, D., and Keiner, M. (1973). Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 151, 121-158.
- 182) Raisman, G. and Field, P.M. (1971). Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. *Science.* 173, 731-733.
- 183) Raisman, G. and Field, P.M. (1973). Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res.*, 54, 1-29.
- 184) Reddy, V.V.R., Rajan, R. and Daly, M.J. (1980). Estrogen metabolism in neural tissues of six-day-old rats. *Brain Res.* 197, 443-452.
- 185) Reid, S.N.M. and Juraska, J.M. (1992). Sex differences in the gross size of the rat neocortex. *J. Comp. Neurol.* 321, 442-447.
- 186) Rhees, R.W., Shryne, J.E. and Gorski, R.A. (1990). Onset of the hormone-sensitive prenatal period for sexual differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female rats. *J. Neurobiol.* 21, 781-786.

- 187) Rhees, R.W., Shryne, J.E. and Gorski, R.A. (1990). Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Dev. Brain Res.* 52, 17-23.
- 188) Robertson, R.T. (1987). A morphogenic role for transiently expressed acetylcholinesterase in developing thalamocortical systems? *Neurosci. Lett.* 75, 259-264.
- 189) Robertson, R.T., Gragnola, T.G. and Yu, J. (1988). Investigations of the origins of transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex. *Dev. Brain Res.* 41, 1-23.
- 190) Robertson, R.T., Mostamand, F., Kageyama, G.H., Gallard, K.A. and Yu, J. (1991). Primary auditory cortex in rat: transient expression of acetylcholinesterase activity in developing geniculocortical projections. *Dev. Brain Res.* 58, 81-95.
- 191) Roger, M. and Arnault, P. (1989). Anatomical study of the connections of the primary auditory area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 287, 339-356.
- 192) Romanski, L.M. and LeDoux, J.E. (1993). Information cascade from primary auditory cortex to the amygdala: corticocortical and corticoamygdaloid projections of temporal cortex in the rat. *Cereb. Cortex.* 3, 515-532.
- 193) Roselli, C.E. and Resko, J.A. (1984). Androgens regulate brain aromatase activity in adult male rats through a receptor mechanism. *Endocrinology.* 114, 2183-2189.
- 194) Rowlands, I.W. and Weir, B.J. (1984). Mammals: Non-primate eutherians *In: Lamming, G. E. [eds.] Marshall's physiology of reproduction, volume 1, reproductive cycles of vertebrates. Chapter 7. pp386-454. Churchill Livingstone, Hong Kong.*
- 195) Sakuma, Y. (1992). Brain control of female sexual behavior. *In: Yokoyama A. (eds.) Brain Control of the Reproductive System. pp141-163. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.*
- 196) Sanghera, M.K., Simpson, E.R., McPhaul, M.J., Kozlowski, G., Conley, A.J. and Lephart, E.D. (1991). Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology.* 129, 2834-2844.
- 197) Saper, C.B., Swanson, L.W. and Cowan, W.M. (1975). The affection of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169, 409-442.
- 198) Sar, M. and Parikh, I. (1986). Immunohistochemical localization of estrogen receptor in rat brain, pituitary and uterus with monoclonal antibodies. *J. Steroid Biochem.* 24, 497-503.
- 199) Schwanzel-Fukuda, M., Morrell, J.I. and Pfaff, D.W. (1985). Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis of the rat. *J. Comp. Neurol.* 238, 348-364.
- 200) Segovia, S. and Guillamon, A. (1993). Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res. Rev.* 18, 51-74.
- 201) Segovia, S., Orensanz, L.M., Valencia, A. and Guillamón, A. (1984). Effects of sex steroids on the development of the accessory olfactory bulb in the rat: a volumetric study. *Dev. Brain Res.* 16, 312-314.

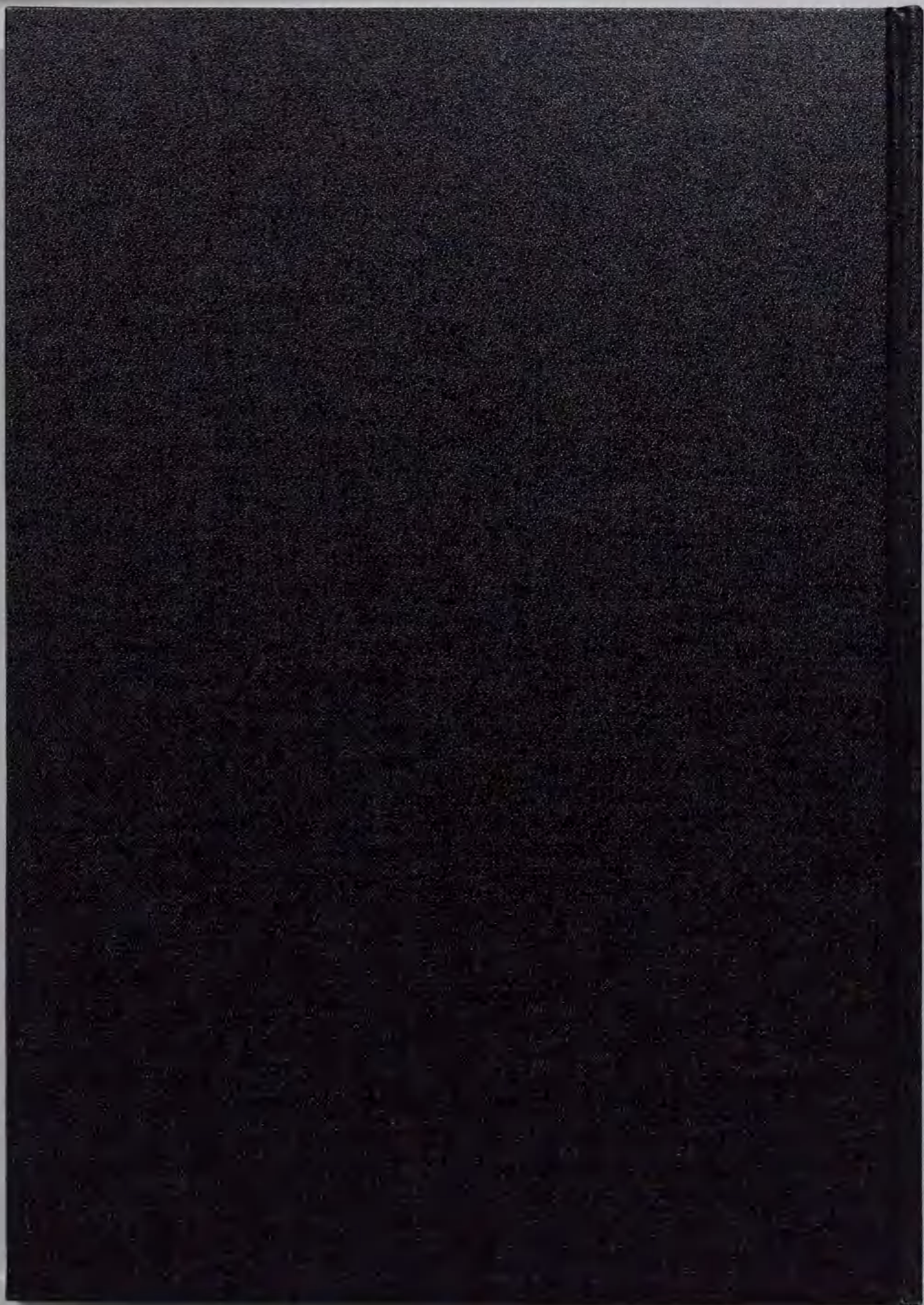
- 202) Senba, E. and Egger, M.D. (1986). The facial "motor" nerve of the rat: Control of the vibrissal movement and examination of motor and sensory components. *J.Comp.Neurol.* 247, 144-158.
- 203) Senba, E., Tohyama, M., Shiotani, Y., Kawasaki, Y., Kubo, T., Matsunaga, T., Emson, P.C. and Steinbusch, H.W.M. (1985). Peptidergic and aminergic innervation of the facial nucleus of the rat with special reference to ontogenetic development. *J. Comp. Neurol.* 238, 429-439.
- 204) Sheridan, P.J. (1979). Estrogen binding in the neonatal neocortex. *Brain Res.* 178, 201-206.
- 205) Sheridan, P.J., Sar, M. and Stumpf, W.E. (1974). Autoradiographic localization of ^3H -estradiol or its metabolites in the central nervous system of the developing rat. *Endocrinology.* 94, 1386-1390.
- 206) Sheridan, P.J., Sar, M. and Stumpf, W.E. (1975). Estrogen and androgen distribution in the brain of neonatal rat. *In*: Stumpf, W.E. and Grant, L.D. (eds.) *Anatomical Neuroendocrinology.*, pp. 134-141. Karger, New York.
- 207) Shinoda, K., Nagano, M. and Osawa, Y. (1994). Neuronal aromatase expression in preoptic, strial, and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *J. Comp. Neurol.* 343, 113-129.
- 208) Shivers, B.D., Harlan, R.E., Morrell, J.I. and Pfaff, D.W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature.* 304, 345-347.
- 209) Shohara, E. and Sakai, A. (1983). Localization of motoneurons innervating deep and superficial facial muscles in the rat: A horseradish peroxidase and electrophysiologic study. *Exp. Neurol.* 81, 14-33.
- 210) Sholl, S. A., Goy, R. W. and Kim, K. L. (1989). 5α -reductase, aromatase, and androgen receptor levels in the monkey brain during fetal development. *Endocrinology.* 124, 627-634.
- 211) Shughrue, P.J., Bushnell, C.D. and Dorsa, D.M. (1992). Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology.* 131, 381-388.
- 212) Shughrue, P.J. and Dorsa, D.M. (1993). Gonadal steroids modulate the growth-associated protein GAP-43 (neuromodulin) mRNA in postnatal rat brain. *Dev. Brain Res.* 73, 123-132.
- 213) Shughrue, P.J., Stumpf, W.E., MacLusky, N.J., Zielinski, J.E. and Hochberg, R.B. (1990). Developmental changes in estrogen receptors in mouse cerebral cortex between birth and postweaning: studied by autoradiography with 11β -methoxy- 16α -[^{125}I] iodoestradiol. *Endocrinology.* 126, 1112-1124.
- 214) Sibug, R.M., Stumpf, W.E., Shughrue, P.J., Hochberg, R.B. and Drews U. (1991). Distribution of estrogen target sites in the 2-day-old mouse forebrain and pituitary gland during the 'critical period' of sexual differentiation. *Dev. Brain Res.* 61, 11-22.
- 215) Simerly, R.B. (1990). Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends Neurosci.* 13, 104-110.

- 216) Simerly, R.B., Chang, C., Muramatsu, M. and Swanson, L.W. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 294, 76-95.
- 217) Simerly, R.B., McCall, L.D. and Watoson, S.J. (1988). Distribution of opioid peptides in the preoptic region: immunohistochemical evidence for a steroid-sensitive enkephalin sexual dimorphism. *J. Comp. Neurol.* 276, 442-459.
- 218) Simerly, R.B. and Swanson, L.W. (1986). The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 246, 312-342.
- 219) Simerly, R.B. and Swanson, L.W. (1988). Projections of the medial preoptic nucleus: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270, 209-242.
- 220) Simerly, R.B., Swanson, L.W., Handa, R.J. and Gorski, R.A. (1985). Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 40, 501-510.
- 221) Simerly, R.B., and Young, B.J. (1991). Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones. *Mol. Endocrinol.* 5, 424-432.
- 222) Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Forter, J.W., Frischauf, A-M., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P.N. (1990). A gene from human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 346, 240-244.
- 223) Skipper, J.K., Young, L.J., Bergeron, J.M., Tetzlaff, M.T., Osborn, C.T. and Crews, D. (1993). Identification of an isoform of the estrogen receptor messenger RNA lacking exon four and present in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7172-7175.
- 224) Smith, S.S. (1994). Female sex steroid hormones: from receptors to networks to performance-actions on the sensorimotor system. *Prog. Neurobiol.* 44, 55-86.
- 225) Södersten, P., Eneroth, P., Mode, A. and Gustafsson, J.-Å. (1985). Mechanisms of androgen-activated sexual behavior in rats. *In: Gilles, R. and Balthazart, J. [eds.] Neurobiology.* pp48-59. Springer-Verlag, Berlin.
- 226) Södersten, P., Eneroth, P., Hansson, T., Mode, A., Johansson, D. Näslund, B., Liang, T. and Gustafsson, J.-Å. (1986). Activation of sexual behavior in castrated rats: the role of oestradiol. *J. Endocrinol.* 111, 455-462.
- 227) Spies, H. G. and Chappel, S.C. (1984). Mammals: Non-human primate. *In: Lamming, G. E. [eds.] Marshall's physiology of reproduction, volume 1, reproductive cycles of vertebrates.* Chapter 8. pp 659-712. Churchill Livingstone, Hong Kong.
- 228) Stewart, J., Skvarenina, A. and Pottier, J. (1975). Effects of neonatal androgens on open-field behavior and maze learning in the pre-pubescent and adult rat. *Physiol. Behav.* 14, 291-295.
- 229) Stumpf, W.E. and Sar, M. (1974). Hormone-architecture of the mouse brain with ³H-estradiol. *In: W.E. Stumpf and L.D. Grant (eds): Anatomical Neuroendocrinology.* pp. 82-103. Karger, New York.

- 230) Stumpf, W.E. and Sar, M. (1978). Estrogen target cells in fetal brain. *In*: Dorner, G. and Kawakami, M. (eds) *Hormones and Brain Development*. pp. 27-33. Elsevier, North-Holland.
- 231) Stumpf, W.E., Sar, M. and Keefer, D.A. (1975). Atlas of estrogen target cells in rat brain. *In*: W.E. Stumpf and L.D. Grant (eds) *Anatomical Neuroendocrinology*. pp.104-119. Karger, New York.
- 232) Suzuki, Y., Ishii, H. and Arai, Y. (1983). Prenatal exposure of male mice to androgen increases neuron number in the hypogastric ganglion. *Dev. Brain Res.* 10, 151-154.
- 233) Swaab, D.F. and Fliers, E. (1985). A sexually dimorphic nucleus in the human brain. *Science*. 228, 1112-1115.
- 234) Swanson, L.W. (1992). *Brain maps: structure of the rat brain*. Elsevier, Amsterdam.
- 235) Tago, H., Kimura, H. and Maeda, T. (1986). Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 1431-1438.
- 236) Takasugi, N. (1952). Einflüsse von androgen und oestrogen auf die ovarien der neuheborenen und reifen, weiblichen ratten. *Annot. Zool. Japon.* 25, 120-127.
- 237) Takewaki, K. (1962). Some aspects of hormonal mechanism involved in persistent estrus in the rat. *Experientia*. 18, 1-6.
- 238) Terasawa, E., Wiegand, S.J., Bridson, W.E. (1980). A role for medial preoptic nucleus on afternoon of proestrus in female rats. *Am. J. Physiol.* 238, 533-539.
- 239) Tobet, S.A., Chickering, T.W., Fox, T.O. and Baum, M.J. (1993). Sex and regional differences in intracellular localization of estrogen receptor immunoreactivity in adult ferret forebrain. *Neuroendocrinol.* 58, 316-324.
- 240) Tobet, S.A., Zahnister, D.H. and Baum, M.J. (1986). Sexual dimorphism in the preoptic/ hypothalamic area of ferrets: effects of adult exposure to sex steroids. *Brain Res.* 364, 249-257.
- 241) Toran-Allerand, C.D. (1976). Sex steroids and development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res.* 106, 407-412.
- 242) Toran-Allerand, C.D. (1984). On the genesis of sexual differentiation of the central nervous system: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of α -fetoprotein. *In*: De Vries, G.J., De Bruin, J.P.C., Uylings, H.B.M. and Corner, M.A. [eds.] *Progress in brain research volume 61, sex differences in the brain*. pp 63-98. Elsevier, Belgium.
- 243) Toran-Allerand, C.D. (1991). Organotypic culture of the developing cerebral cortex and hypothalamus: relevance to sexual differentiation. *Psychoneuroendocrinology*. 16, 7-24.
- 244) Toran-Allerand, C.D., Ellis, L. and Pfenninger, K.H. (1988). Estrogen and insulin synergism in neurite growth enhancement in vitro: mediation of steroid effects by interactions with growth factors? *Dev. Brain Res.* 41, 87-100.
- 245) Towle, A.C. and Sze, P.Y. (1983). Steroids binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal seroids. *J. Steroid. Biochem.* 18, 135-143.

- 246) Travers, J.B. and Norgren, R. (1983). Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 220, 280-298.
- 247) Tyndale-Biscoe, C.H. (1984). Mammals: marsupials. *In: Marshall's physiology of reproduction, volume 1, reproductive cycles of vertebrates.* Chapter 6. pp386-454. Churchill Livingstone, Hong Kong.
- 248) Uchibori, M. and Kawashima, S. (1985). Effects of sex steroids on the growth of neuronal processes in neonatal rat hypothalamus-preoptic area and cerebral cortex in primary culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* 3, 169-176.
- 249) Uehara-Kunugi, Y., Terai, K., Taniguchi, T., Tooyama, I. and Kimura, H. (1991). Time course of in vitro expression of NADPH-diaphorase in cultured rat brain neurons: comparison with in vivo expression. *Dev. Brain Res.* 59, 157-162.
- 250) Valcourt, R.J. and Sachs, B.D. (1979). Penile reflexes and copulatory behavior in male rats following lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res. Bull.* 4, 131-133.
- 251) Vincent, S.R. and Kimura, H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience.* 46, 755-784.
- 252) Vito, C.C., and Fox, T.O. (1982). Androgen and estrogen receptors in embryonic and neonatal rat brain. *Dev. Brain Res.* 2, 97-110.
- 253) Wade, G.N. and Feder, H.H. (1974). Stimulation of [³H] leucine incorporation into protein by estradiol-17 β or progesterone in brain tissues of ovariectomized guinea pigs. *Brain Res.* 73, 545-549.
- 254) Watson, C.R.R., Sakai, S. and Armstrong, W. (1982). Organization of the facial nucleus in the rat. *Brain Behav. Evol.* 20, 19-28.
- 255) Weiland, N.G. and Barraclough, C.A. (1984). Neonatal castration of male and female rats affects luteinizing hormone responses to estrogen during adulthood. *Biol. Reprod.* 31, 942-949.
- 256) Weisz, J. and Ward, I.L. (1980). Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology.* 106, 306-316.
- 257) Westley, B.R. and Salaman, D.F. (1976). Role of oestrogen receptor in androgen-induced sexual differentiation of the brain. *Nature.* 262, 407-408.
- 258) White, R., Lees, J.A., Needham, M. and Parker, M. (1987). Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 1, 735-744.
- 259) Williams, C.L., Barnett, A.M. and Meck, W.H. (1990). Organizational effects of early gonadal secretions on sexual differentiation in spatial memory. *Behav. Neurosci.* 104, 84-97.
- 260) Williams, C.L. and Meck, W.H. (1991). The organizational effects of gonadal steroids on sexually dimorphic spatial ability. *Psychoneuroendocrinol.* 16, 155-176.
- 261) Wilson, C.A., Pearson, J.R., Hunter, A.J., Tuohy, P.A. and Payne, P.A. (1986). The effect of neonatal manipulation of hypothalamic serotonin levels on sexual activity in the adult rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 1175-1183.

- 262) Wright, L.L. and Smolen, A.J. (1983). Neonatal testosterone treatment increases neuron and synapse numbers in male rat superior cervical ganglion. *Dev. Brain Res.* 8, 145-153.
- 263) Yallampalli, C., Byam-Smith, M. Nelson, S.O. and Garfield, R.E. (1994). Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology.* 134, 1971-1974.
- 264) Yen, S.S.C. and Lein, A. (1984). *Mammals: Man In: Lamming, G. E. [eds.] Marshall's physiology of reproduction, volume 1, reproductive cycles of vertebrates. Chapter 9. pp713-788. Churchill Livingstone, Hong Kong.*
- 265) Yu, W.A. (1982). Sex difference in the regeneration of the hypoglossal nerve in rats. *Brain Res.* 238, 404-406.
- 266) Yu, W. A. (1989). Administration of testosterone attenuates neuronal loss following axotomy in the brain-stem motor nuclei of female rats. *J. Neurosci.* 9, 3908-3914.
- 267) Yu, W.A. and McGinnis, M.Y. (1986). Androgen receptor levels in cranial nerve nuclei and tongue muscles in rats. *J. Neurosci.* 6, 1302-1307.
- 268) Yuri, K. and Kawata, M. (1991). The effect of estrogen on the estrogen receptor-immunoreactive cells in the rat medial preoptic nucleus. *Brain Res.* 548, 50-54.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

