

早稲田大学審査学位論文

博士（人間科学）

セロトニン神経の性差と生殖制御における役割

Sex difference in serotonergic neurons and
the role of serotonin on reproduction

2015年1月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

伊藤 広幸

ITO, Hiroyuki

目次

第1章 緒言	3
1-1. セロトニン神経	3
1-2. 生殖制御におけるセロトニン神経の役割	5
1-3. 脳の発達とセロトニン神経	6
1-4. 生殖機能制御におけるエストロゲンとエストロゲン受容体	7
第2章 縫線核セロトニン神経の性差と部位差	9
2-1. 序	9
2-2. 材料と方法	10
2-3. 結果	14
2-4. 考察	20
第3章 縫線核セロトニン神経の生後発達	25
3-1. 序	25
3-2. 材料と方法	26
3-3. 結果	29
3-4. 考察	34
第4章 セロトニン神経による視床下部エストロゲン受容体発現の調節	38
4-1. 序	38
4-2. 材料と方法	38
4-3. 結果	42
4-4. 考察	46
結語	50

引用文献52
謝辞65
研究業績66

セロトニン神経の性差と生殖制御における役割

第1章 緒言

1-1 セロトニン神経

セロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)は、アミノ酸のL-トリプトファンから生合成されるインドールアミンであり、体内において腸と脳に多く存在している。哺乳類の脳においては神経伝達物質として神経細胞から分泌され、本能行動、情動、生殖など多くの機能の制御にかかわっている。セロトニンを神経伝達物質とするセロトニン神経の細胞体は中脳から延髄にかけて存在する縫線核にあり、脳や脊髄の広範囲に神経投射している (Tork, 1985, Parent et al., 1981)。セロトニン神経の機能には性差があることが知られており、脳内セロトニン量にも性差が報告されている。

L-トリプトファンからセロトニンへの生合成経路は、L-トリプトファンから5-hydroxytryptophan (5-HTP)への変換と、5-HTP からセロトニンへの変換の2段階を経る(図. 1)。L-トリプトファンから5-HTP への変換にはトリプトファン水酸化酵素が必要であるが、パラクロロフェニルアラニン(PCPA)はトリプトファン水酸化酵素を阻害する作用があり (Koe and Weissman, 1966)、セロトニンの機能を解析する際によく用いられる。

ラットにおいてはPCPA投与が雄における雌型性行動であるロードーシス行動を促進すること (Kakeyama and Yamanouchi, 1993)、雌における雄型性行動を亢進させること (Matsumoto and Yamanouchi, 1997)などから、セロトニン神経は性行動の性差形成にも関与していると考えられる。生殖機能の多くの中

枢がある視床下部では、ラットにおいてセロトニン神経線維の量に性差がある (Patisaul et al., 2008) ことや、脳内セロトニン含量は雌の方が多 (Carlsson et al., 1985; Kakeyama et al., 2002) が示されている。

中脳的主要な縫線核は背側縫線核(Dorsal Raphe nucleus, DR)および正中縫線核(Median Raphe nucleus, MR)であり、主として前脳にセロトニン神経線維を投射している。DR と MR の神経投射部位は必ずしも同じではなく、DR は新皮質や海馬などに対するものが多く、MR は特に視床下部などに投射しているものが多いとされている(Azmitia and Segal, 1978; Jacobs and Azmitia, 1992)。延髄には大縫線核 (nucleus Raphe Magnus, RMg)、不確縫線核、淡蒼縫線核などがあり、これらの部位のセロトニン神経はおもに脊髄へ神経投射している(Tork, 1985) (図 2)。

トリプトファン水酸化酵素の活性は雌のほうが雄より高いことが報告されている(Carlsson and Carlsson, 1988a)。また、セロトニン神経には PCPA に対して感受性を示すものと示さないものがあることも報告されている (Tohyama et al., 1988)。しかし、セロトニン神経そのものの性差に関しては詳しい解析がない。縫線核におけるセロトニン神経の性差を調べるため、第 2 章ではセロトニン合成阻害作用を持つ PCPA を雌雄ラットに投与したのちに、DR, MR, および RMg のセロトニン免疫陽性細胞数を計測し比較した。

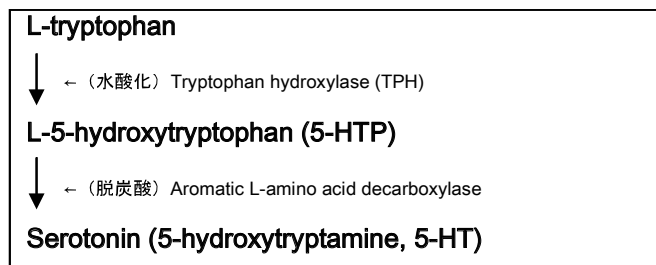


図.1 Serotonin synthesis pathway.
PCPA is an irreversible inhibitor for the synthesis of 5-HTP.

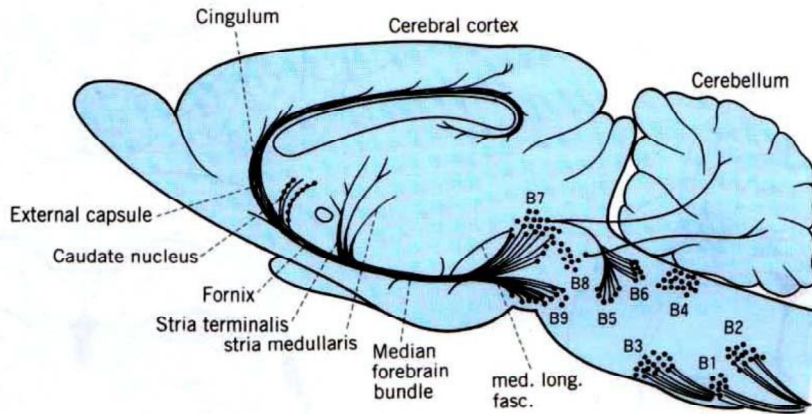


図.2 Main serotonin-containing pathways in the rat. (Tohyama and Takatsuji, 1998)

1-2. 生殖制御におけるセロトニン神経の役割

セロトニン神経の働きは本能行動を含む、感覚、運動、生理現象と多岐にわたる。その中でも、セロトニン神経による生殖機能制御に関して多くの結果がラットで報告されている。ラットの DR を破壊するとロードーシス行動が強まること (Kakeyama and Yamanouchi, 1996) から、セロトニン神経が雌性行動発現に抑制的に働く。MR を破壊すると雄性行動が増加することから雄の性行動には MR が抑制的に働く (Kondo and Yamanouchi, 1997)。また、出産直後のラットの MR を破壊または下部切断すると、一連の母性行動をまったく示さなくなることから、母性行動では MR のセロトニン神経が促進的働きをもつと考えられる (Yurino et al., 2001)。排卵日前日の午前中に DR を破壊すると排卵が起こらなくなること (Maekawa et al., 1999) や、卵巣除去ラットに対し DR 周囲の神経線維を切断した後に膣刺激による偽妊娠を誘起させるとプロラクチンのノクターナルサージが消失する (Maekawa et al., 1998) ことから、DR のセロト

ニン神経は排卵と妊娠の開始と維持に重要な働きをもっている。生殖行動以外でも攻撃行動 (Carrillo et al., 2009)、日内周期(サーカディアンリズム) (Quay, 1968)、摂食行動 (Blundell, 1984)などにセロトニン神経が関わっているという数多くの報告がある。

1-3. 脳の発達とセロトニン神経

DR、MR および RMg におけるセロトニン神経は胎生 14-15 日目に細胞分裂が終了する (Wallace and Lauder, 1992)。出生後は視床下部や中脳縫線核のセロトニン濃度について変化はなく、雌雄差もない (Watts and Stanley, 1984)という報告がある。一方、脳全体のセロトニン量は雌では生後 8 日から 12 日ごろに急激に増加し性差が生じるという報告もある(Ladosky and Gaziri, 1970)。このように、報告によって違いがあるが、出生後から思春期までの間にセロトニン神経系の機能的変化が生じる可能性が考えられる。最近、ラット背側縫線核の外側部、背側部、腹側部でセロトニン神経細胞数や視床下部神経核への投射量に違いがあることが報告された(Kanno et al., 2008)。しかし、出生後の縫線核セロトニン神経の発達について調べたものは少ない。セロトニン神経の働きの性差やそのものの性差を考えるには生後の縫線核におけるセロトニン神経の発達を知る必要がある。そこで、生殖機能をはじめ多くの機能に関わる中脳の背側縫線核 (DR) と正中縫線核 (MR) セロトニン神経の生後の発達を雄ラットにおいて調べた (3章)。

1-4. 生殖機能制御におけるエストロゲンとエストロゲン受容体

セロトニン神経が強く関わる雌ラットの性行動や排卵の制御に重要なのは卵巣から分泌されるエストロゲンである。雌ラットの排卵前日に分泌される大量のエストロゲンは前腹側脳室周囲核(AVPV)など視索前野に働いて排卵を引き起こす(Terasawa et al., 1980)とともに発情状態を誘起し、発情した雌は雄のマウンティング行動によりロードーシス行動を発現するようになる。エストロゲンはロードーシス促進センターである視床下部腹内側部(VMH) (Pfaff and Sakuma, 1979a; Pfaff and Sakuma, 1979b)に作用 (Barfield and Chen, 1977) し、抑制センターである外側中隔(LS)の抑制力(Yamanouchi, 1997)を解除する (Satou and Yamanouchi, 1999)ことで、発情状態を生じさせると考えられている。このような生殖機能に関わるほとんどの部位にエストロゲン受容体(ER)が存在する(Shughrue et al., 1997)。雌ラットの脳内では性周期にそって ER mRNA の発現が変化することが報告されている (Helena et al., 2006; Shughrue et al., 1992)

生殖機能制御にはエストロゲンと ER 量が重要である。エストロゲン受容体は分子構造の違いから ER α と ER β のサブタイプに分けられ (Kuiper et al., 1996)、脳内分布は一様ではない。エストロゲン受容体 α もしくは β の mRNA の分布を網羅的に調べた Shughrue et al., 1997 の解析では、分布に大きな差がある部位として、下垂体ホルモン分泌を制御している視床下部弓状核 (ARC)、ロードーシスを制御している視床下部腹内側核腹外側部 (vlVMN)、排卵に重要な視索前野脳室周囲核(AVPV)はすべて ER α の発現が ER β より多い。オキシトシンなど分娩に関わるホルモンを分泌する、下垂体後葉を制御する二つの神経核のうち視床下部室傍核では ER α が多く、視索上核では逆に ER β が多

い (Simerly and Young, 1991)。ER α 遺伝子のノックアウトマウスでは排卵や雌性行動や排卵が抑制されることから、生殖機能を制御する神経回路では ER α が重要な役割をもっていることが示されている (Ogawa et al., 1999)。

神経細胞において、エストロゲンは核内で ER に結合する。ER は複合体を形成し、DNA 上のエストロゲン応答配列 (ERE) を認識し、転写因子として調節をおこなう。エストロゲンはダウンレギュレーション機構による ER の量の調節やプロゲステロン受容体量の調節を行っており (Parsons et al., 1982)、雌性行動であるロードーシス発現調節に関わっている。ERE はエストロゲンやプロゲステロン受容体の蛋白産生に関する DNA 鎖に存在する (Kato et al., 1992)。

神経細胞における ER α 発現はエストロゲンにより調節されている。卵巣除去ラットにエストロゲンを投与すると AVPV, VMN, ARC N の ER α 発現は投与 24 時間後には低下する (Yamada et al., 2009) ことや、ER mRNA の低下も見られる (Lauber et al., 1991)。一方、神経入力により VMN の ER α 発現が制御されていることが、片側 VMN 破壊で反対側の ER α 免疫陽性細胞数の増加が見られることから明らかにされている (Shimogawa et al., 2014)。しかし、セロトニン神経が脳内 ER 発現にどのような影響をもつか全く調べられていない。第 4 章では視床下部エストロゲン受容体の発現制御に対するセロトニン神経系の役割を調べるためセロトニン合成阻害剤 (PCPA) 投与を行った後に、AVPV、VMN、ARC N におけるエストロゲン α 受容体の免疫陽性細胞数を測定した。

第2章 縫線核セロトニン神経の性差と部位差

2-1. 序

セロトニンを神経伝達物質としているセロトニン神経系は自律神経系や本能行動など多岐にわたる重要な働きを持っている。セロトニン神経の細胞体は下位脳幹の縫線核に集中している(Tork, 1985)。その中でも中脳の背側縫線核(DR)と正中縫線核(MR)には脳内のセロトニン神経の半分以上が存在しており、前脳に投射している(Azmitia and Segal, 1978; Parent et al., 1981; Kanno et al., 2008)。大縫線核(RMg)などの延髄の縫線核は主として脊髄に投射している(Tork, 1985)。

縫線核のセロトニン神経は生殖生理や性行動などの性分化機構に重要な働きをしている。排卵のメカニズムは性的二型であり、DRのセロトニン神経が関与している(Maekawa et al., 1999)。背側縫線核の破壊やセロトニン合成阻害剤のパラクロロフェニルアラニン(PCPA)を雄ラットに投与するとロードーシスが促進される(Kakeyama and Yamanouchi, 1993)ことから雌特有の性行動であるロードーシスはDRのセロトニン神経により抑制されている。一方で、MRを破壊すると雌ラットにおける雄の性行動が促進される(Matsumoto and Yamanouchi, 1997)。このように、異性行動はそれぞれの性においてセロトニン神経系により抑制されている。

脳におけるセロトニン含有量にも性差がみられ、特に視索前野や視床下部腹内側核では雌のほうが多い(Carlsson et al., 1985; Kakeyama et al., 2002)。ヒトにおいては脳内セロトニン量が低いと、うつのような行動の障害を引き起こ

す。うつのは発症には性差があり、女性が男性の二倍多いと報告されている(Weissman and Olfson, 1995)。ラット視床下部におけるセロトニン神経線維の分布にも性差があることが報告されている(Patisaul et al., 2008)。これらのことは、DR や MR から投射しているセロトニン神経線維に性差があることを示している。

さらにラットにおいてセロトニンの合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素の量は雄よりも雌のほうが多い(Carlsson and Carlsson, 1988a)。PCPA はトリプトファン水酸化酵素の阻害剤の一つである(Koe and Weissman, 1966)。PCPA に対しては感受性の異なるセロトニン神経細胞がある(Tohyama et al., 1988)。

今回の実験では、セロトニン神経の性質を調べる第一歩として雌雄ラットを生殖腺除去し、1週間後から4日連続でPCPAを投与し、DR、MR、RMgの各縫線核のセロトニン免疫陽性細胞数を計測した。視床下部におけるセロトニン投射については背側縫線核のサブディビジョンにより量的に差異がある(Kanno et al., 2008)ことから、DRについては背内側部(dDR)、腹外側部(vDR)、背外側部(IDR)に分けて計測した。

2-2. 材料と方法

2-2-1 動物

8週齢のWistar系雌ラット(230-280g)16匹、雄ラット(320-380g)16匹を高杉実験動物(埼玉)より購入した。飼育は一定サイクルの照明(明:暗=14:10、消灯19時)下、一定温度(19-24℃)下、水と餌は自由摂取とした。麻酔下で

すべてのラットの性腺を除去し、1週間後から PCPA もしくは生理食塩水の腹腔内投与を開始した。本研究はすべて早稲田大学実験動物指針（承認番号 08J012, 09J006）に従って行った。

2-2-2 セロトニン合成阻害剤の投与

性腺除去の1週間後、100 mg/kg b.w. DL-parachlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA, 200 mg/ 1 ml saline, Sigma-Aldrich Co., MO, USA) の4日連続投与を開始し、投与時間は正午に行った。100 mg/kg b.w.の PCPA を3日間投与するとラット脳のセロトニンは大きく減少する(Koe and Weissman, 1966)ことから、今回の投与量を設定した。それぞれ8匹の雌雄ラットに PCPA を投与し、対照群としてそれぞれ8匹に生理食塩水を投与した。最終投与の1日後、灌流固定した。

2-2-3 脳固定と切片作成

PCPA 最終投与の約24時間後、ノボ・ヘパリン(2 ml/kg body weight, 持田製薬)を腹腔内注射して10分程度経過させたのち、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル 3 ml/kg body weight, 共立製薬)による深麻酔下で50 mM リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を左心室からペリスタポンプを用いて体重の2/3程度注入した。連続して4%パラホルムアルデヒドを含む50 mM PB溶液による灌流固定を行い、迅速に脳摘出を行った。摘出した脳は4%パラホルムアルデヒドを含む50 mM PB溶液に浸漬し後固定(4 °C, 1日)し、その後30%スクロースを含む50 mM PBに入れ4 °Cで保存した。4-5日後、背側縫線核を含む範囲の

中脳をクライオスタットにより厚さ 40 μm の凍結切片にし、洗浄後塩化マグネシウムおよびスクロースを含むクライオプロテクタントに浸し-20 ° C で保存した。

2-2-4 セロトニン免疫染色

切片を 50 m M リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 3 回洗浄したのち、0.6 %過酸化水素を含む 50 m M PBS に浸し内因性ペルオキシターゼを不活性化した。次に 5 %ウサギ正常血清(Normal Rabbit Serum, NRS, Chemicon, CA, USA)の入った 0.1 %Triton-X-100 - 50 m M PBS に 1 時間浸し非特異的結合のブロッキングを行った。その後セロトニン一次抗体(Goat anti-serotonin. 1:25000, ImmunoStar, WI, USA)がはいった 0.1 % Triton-X-100, 5 %NRS- 50 m M PBS に浸し、4 °C で 48 時間インキュベートした。インキュベート後、50 m M PBS による 3 回の洗浄ののち、二次抗体(Rabbit anti Goat IgG, 1:1000, Chemicon, CA, USA)の入った 0.1 % Triton-X-100 と 5 %NRS を含む 50 m M PBS で 2 時間室温にてインキュベートした。50 m M PBS による 3 回の洗浄後 Enzyme streptavidin-HRP (1:300, Dako Corp. CA,USA)、および 0.1 %Triton-X-100 の入った 50 m M PBS に室温で 2 時間浸し、二次抗体を標識した。50 m M PBS による 3 回の洗浄後 DAB metal enhanced kit (34065, Thermo Fisher Scientific, IL, USA)を用いて氷上で発色させた。ゼラチンコートスライドガラスに載せ、数日乾燥させたのち上昇系エタノールで脱水しキシレンで透徹させマリノールを用いて封入した。

2-2-5 各縫線核におけるセロトニン免疫陽性細胞数測定

中脳の背側縫線核を含む部分を光学顕微鏡に接続したデジタルカメラ (PDMC II/OLYMPUS)により画像を撮影しコンピュータに取り込んだ。取り込んだ画像を Photoshop CS (ver.8.0.1 Adobe Systems Inc.) により処理し背側縫線核の各部位と正中縫線核、大縫線核における一辺 0.2 ミリメートルの正方形枠内のセロトニン免疫陽性細胞数を計測した。背側縫線核は背内側部(dDR: dorsal raphe nucleus, dorsal part)、腹内側部(vDR: dorsal raphe nucleus, vental part)、背外側部(IDR: dorsal raphe nucleus, lateral part)に分けて計測した。直径 13 pixel (=7.96 μm)以上で、突起の形状などから神経細胞とわかるものをセロトニン免疫陽性細胞と判定した。細胞数計測にあたりラット脳アトラス(Paxinos and Watson, 2007)を参照した(図. 3)。一つの個体で 3 枚のスライドから写真を撮影し、それぞれの数を合計し 1 立方ミリメートルあたりの数(密度)に換算して提示した。

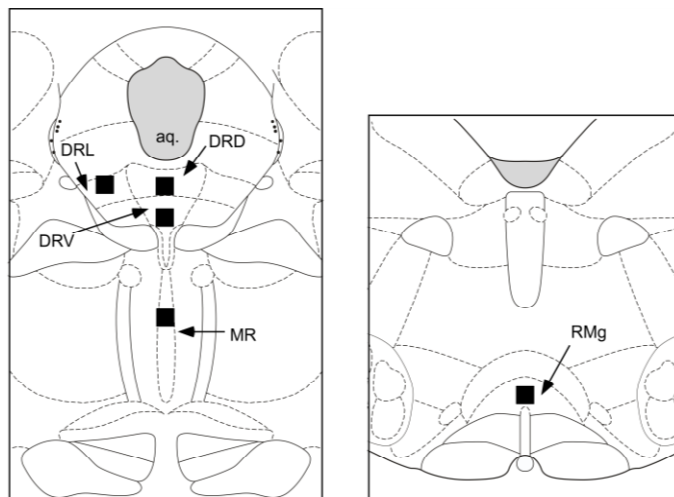


図. 3 5-HT-immunoreactive cells were counted in the frame (0.2 \times 0.2 mm) in the right side of the subdivisions of the dorsal raphe nucleus (IDR; lateral part, dDR; dorsal part, vDR; vental part), medial region of the median raphe nucleus (MR) and medial region of the nucleus raphe magnus (RMg). Figures were modified from Fig. 100 and 126 of Paxinos and Watson (2007).

2-2-6 視床下部におけるセロトニン神経線維

セロトニン神経末端における PCPA の効果を観察するため、視床下部中央部を含む切片を作成し、前述と同様の方法でセロトニンの免疫染色を行った。光学顕微鏡下で視床下部腹内側核のセロトニン免疫陽性線維を観察した。

2-2-7 統計処理

Student's t test もしくは one-way analysis of variance (ANOVA)、および Tukey の post hoc test を SPSS(ver. 13.0J, SPSS inc.)を用いて行った。 $p < 0.05$ のとき統計的に有意とみなした。

2-3. 結果

2-3-1 背側縫線核 (DR)

DR における雌雄生殖腺除去ラットの PCPA 投与群と対照群を比較した。 1 mm^3 あたりのセロトニン免疫陽性細胞数は雌雄差が認められなかった (図. 4 及び図. 5-1)。雌において PCPA 投与群と対照群を比較すると密度はほぼ同等であった。一方雄では PCPA 投与群のほうが対照群に比べ有意に低かった($p < 0.05$) (図. 5-1)。

DR を三つの区域に分けて計測した結果では、セロトニン免疫陽性細胞は雌雄にかかわらず IDR における密度が最も大きかった。しかし IDR では PCPA 投与による対照群との有意差は認められなかった(図. 5-2)。vDR と dDR において PCPA 投与群では、対照群と比較してセロトニン免疫陽性細胞が少なく、有意差

が認められた($p < 0.05$)。雌では DR の各部位においても DR 全体と同様に PCPA 投与群と対照群で有意差は認められなかった。

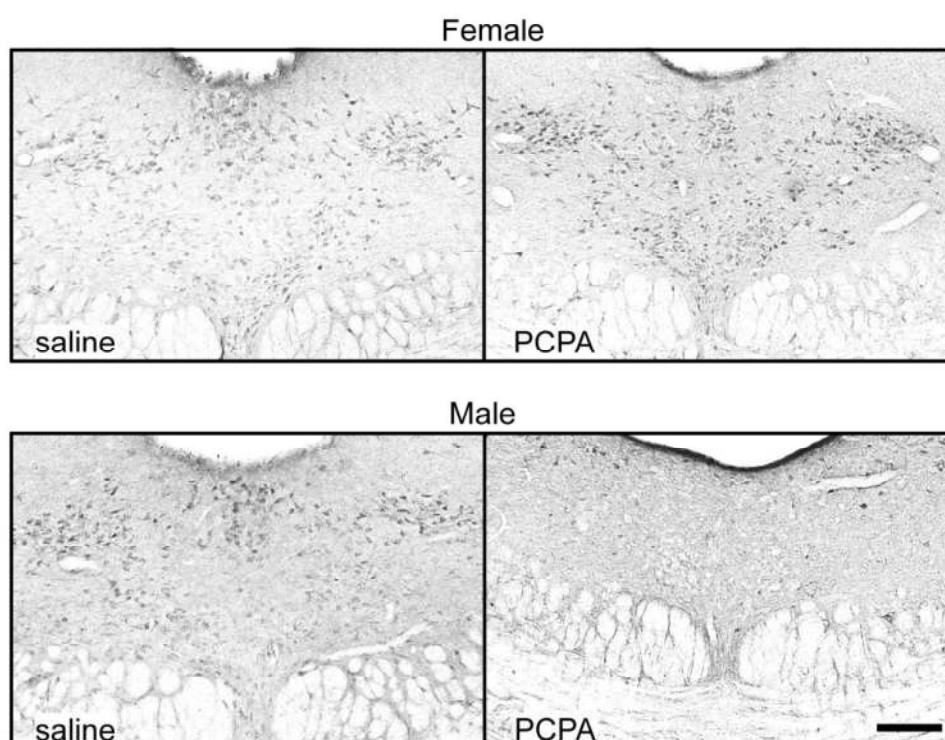


図. 4 Representative photographs of 5-HT-ir cells at the dorsal raphe nucleus in the saline or PCPA-treated female and male rats. Less immunoreactivity was seen in the PCPA-treated male rat. Black bar indicates 0.2 mm.

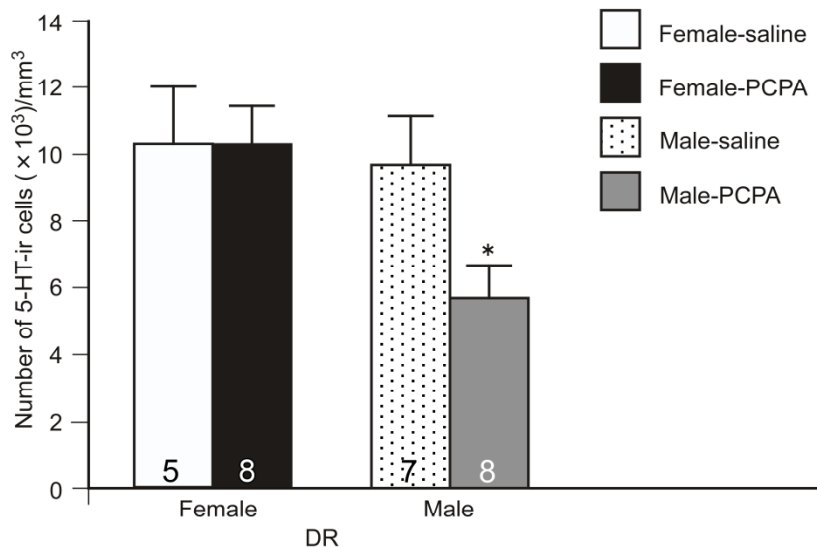


図. 5-1 Mean numbers of 5-HT-ir cells per 1mm^3 (density) in the dorsal raphe nucleus (DR) in the saline or PCPA-treated female and male groups. Bar on the top of each column shows SEM. * $p < 0.05$ vs. saline treated group

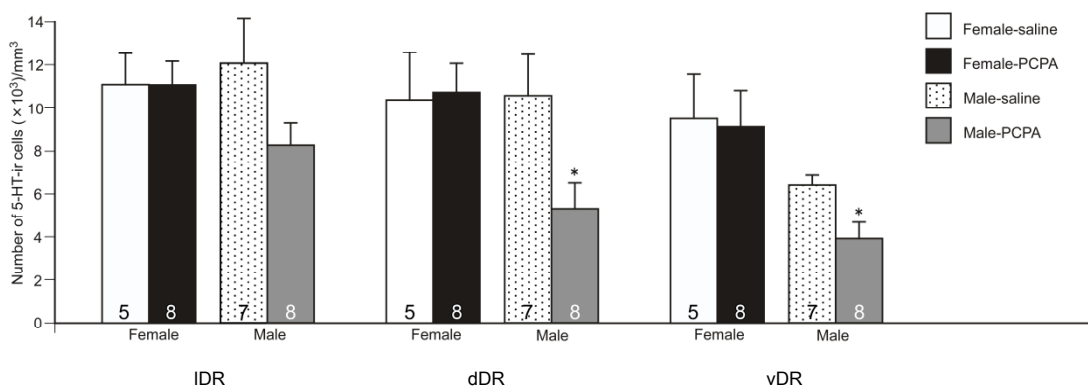


図. 5-2 Mean numbers of 5-HT-ir cells per 1mm^3 (density) in the subdivisions of the dorsal raphe nucleus (DR) in the saline or PCPA-treated female and male groups. IDR; lateral part, dDR; dorsal part, vDR; ventral part. Bar on the top of each column shows SEM. * $p < 0.05$ vs. saline treated group

2-3-2 正中縫線核 (MR)

MRにおけるPCPA投与群と対照群のセロトニン免疫陽性細胞数に雌雄差は認められなかった。雄ではPCPA投与群と対照群を比較すると有意にPCPA投与群が少なかった($p < 0.05$) (図. 6 及び図. 7)。

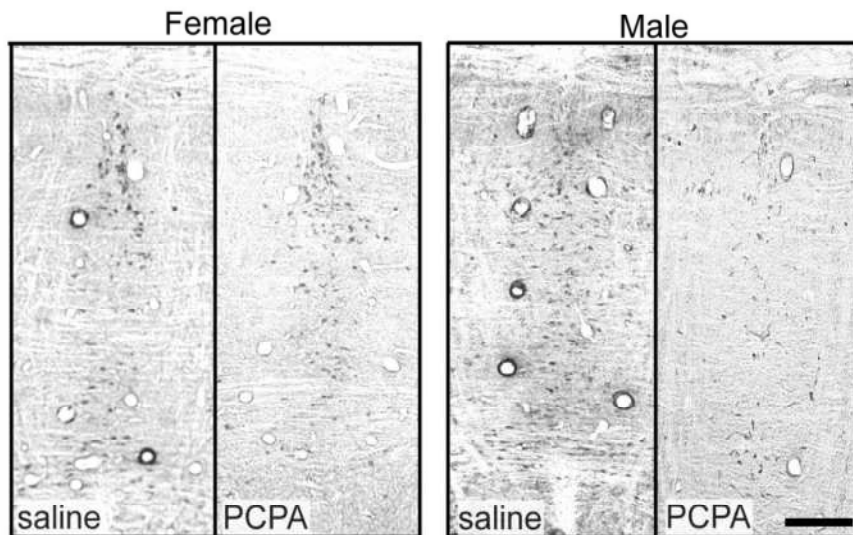


図. 6 Representative photomicrographs of 5-HT-ir cells at the median raphe nucleus in the saline or PCPA-treated female and male rats. Less immunoreactivity was seen in the PCPA-treated male rat. Black bar indicates 0.2 mm.

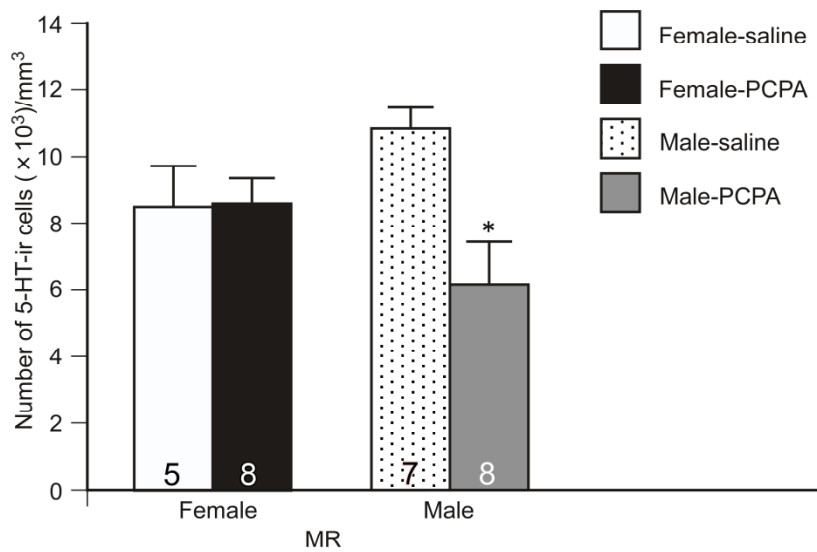


図. 7 Mean numbers of 5-HT-ir cells per 1mm³ (density) in the median raphe nucleus (MR) in the saline or PCPA-treated female and male groups. Bar on the top of each column shows SEM. *p<0.05 vs. saline treated group

2-3-3 大縫線核 (RMg)

RMg では DR, MR に比べセロトニン免疫陽性細胞数の密度は小さかったが、対照群において雌雄差は認められなかった。また雌雄とも PCPA 投与群と対照群に有意差は認められなかった(図. 8 及び図. 9)。

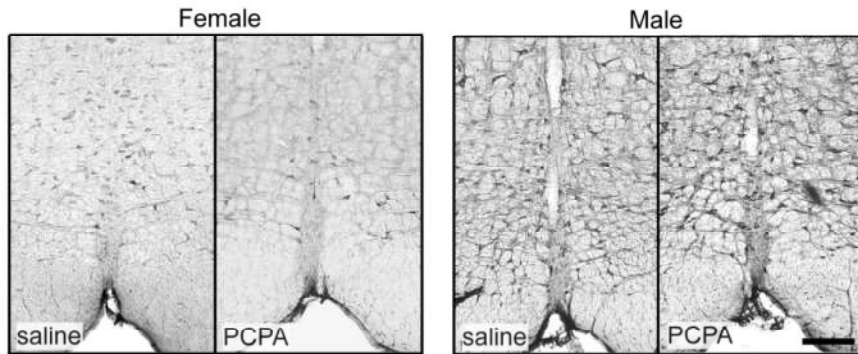


Figure 8. Representative photomicrographs of 5-HT-ir cells at the nucleus raphe magnus in the saline or PCPA-treated female and male rats. Black bar indicates 0.2 mm.

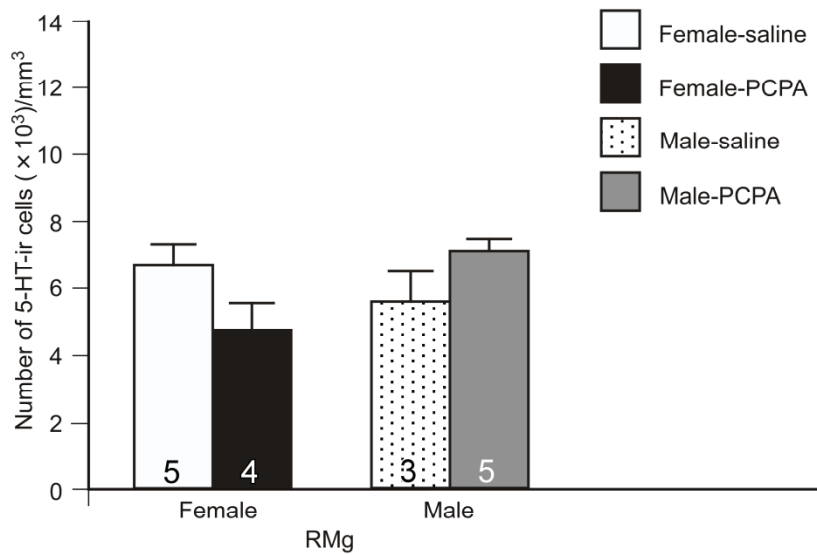


Figure 9. Mean numbers of 5-HT-ir cell per 1mm³ (density) in the nucleus raphe magnus (RMg). Bar on the top of each column shows SEM.

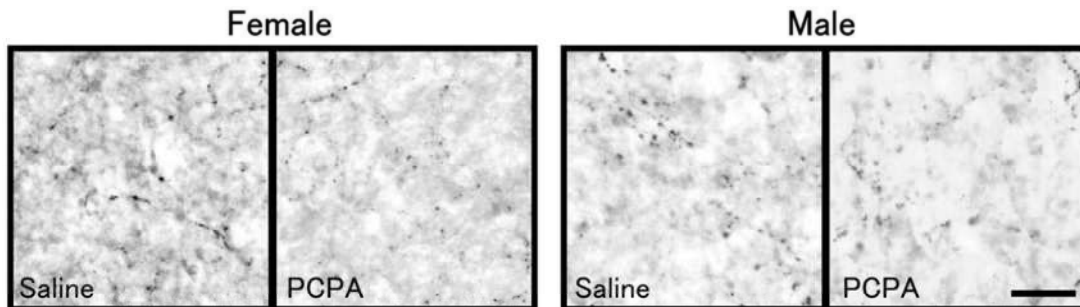


図. 10. Representative photomicrographs of 5-HT-ir fibers at the ventromedial hypothalamic nucleus in the saline or PCPA-treated female and male rats. Less 5-HT-ir fibers were seen in the PCPA-treated rats. Black bar indicates 20 μ m.

2-3-4 視床下部におけるセロトニン免疫陽性神経線維

雌雄のすべての群で視床下部にセロトニン免疫陽性線維がみられた。雌雄ともに視床下部腹内側核において対照群のほうが PCPA 群よりも多い傾向がみられた。セロトニン免疫陽性線維の見え方に関して性差は見られなかった (図.10)。

2-4. 考察

本結果では、RMg におけるセロトニン免疫陽性細胞数は雌雄ともに PCPA 投与にかかわらずほぼ同程度であった。雄について DR および MR に関して PCPA 投与群では対照群に比べ有意に密度が小さかったが、雌ではほぼ同程度であり、有意差は認められなかった。これらの結果からセロトニン神経の PCPA に対する反応性には性差があること、および中脳、延髄縫線核の比較により部位差があることが示された。ラット縫線核におけるセロトニン神経細胞にはエストロゲン β 受容体が存在し、セロトニン神経系にはエストロゲンを含むステロイドホ

ルモンが作用することが報告されている(McEwen, 2002)。しかし今回の実験では生殖腺除去を行っていることからステロイドホルモンの影響がほとんどない条件での結果であると考えられる。しかし、セロトニン神経に対する性ステロイドの影響は1週間以上続く可能性もあり、セロトニンの発現にエストロゲンやアンドロゲンが作用する可能性を否定することはできない。

今回の結果ではPCPA投与の有無にかかわらずDRとMRを比較するとセロトニン免疫陽性神経細胞密度に有意差は認められなかった。しかしわれわれの研究室から報告された雄ラットを用いた実験ではDRのほうがMRよりもセロトニン免疫陽性細胞密度が大きいことが示されている(Kanno et al., 2008)。今回の結果と異なる結果が生じた理由は計測方法の違いによるものと考えられるだろう。今回は0.2 mm四方の方形枠を作成し、それを神経核内の最も高密度に分布している場所に当てはめて枠内の陽性細胞を計測している。セロトニン神経細胞の分布は神経核内においても一様ではなく集中している部分があるためである。Kanno et al. (2008)における計測方法はラット脳アトラス (Paxinos and Watson, 1998) を参考に神経核の3つの副領域それぞれ全体の陽性細胞数を計測している。

生殖腺除去雄ラット中脳縫線核については今回の結果は精巣除去していない雄のセロトニン免疫陽性細胞はPCPAによって減少するというRamos et al. (2000)の結果と同じである。雄ラットにおいてPCPA腹腔内投与後の脳内セロトニン量が減少するという報告は多い(Koe and Weissman, 1966; Kornum et al., 2006)。すなわち雄ラットではPCPAの脳内神経細胞でのセロトニン合成および分泌を阻害する効果が高いものと考えられる。雄ラットにいくつかのセロトニ

ン阻害剤を異なった方法で投与した実験では PCPA の効果に部位差異があることが示されている(Kornum et al., 2006)。今回の実験でも雄ラットの RMg では PCPA によりセロトニン免疫陽性細胞は減少しなかったが DR, MR では減少するという、部位差がみられた。

今回の実験では性腺除去雌ラットにおいては、DR, MR, RMg のすべてで PCPA がセロトニン神経の免疫陽性細胞数を減少させないことが確認された。同様の結果として、雌ラットに高用量の PCPA を投与すると、RMg と DR のセロトニン免疫陽性細胞体数は変化しないが RMg の染色性の強さが減少するという報告がある(Carlton et al., 1987)。PCPA によるセロトニン含有量の減少を神経細胞体と神経終末で比較すると神経終末のほうが大きいという報告もある(Aghajanian et al., 1973)。この現象は、vlVMN における 5-HT-ir 神経線維の密度が、対照群に比べ PCPA 投与群では低いことから免疫組織化学的に確認されたといえる。さらに、雌ラットの DR では、PCPA によりセロトニン量が減少するが RMg では減少しないという報告(Steinman et al., 1987)がある。これらの報告および今回の実験から、PCPA に対しセロトニン作動性神経細胞体におけるセロトニン合成と、神経終末におけるセロトニンの分泌に関して雌と雄で異なる反応をされると考えられる。言い換えると、PCPA は縫線核により一様ではなく、また、一つの神経細胞においてもセロトニン合成を行っている部位の中で違いがある。

いくつかの報告によるとセロトニン神経には PCPA に感受性を持つ細胞と持たない細胞の 2 種類がある(Aghajanian et al., 1973; Tohyama et al., 1988)。この二種類の細胞の構成が今回の実験における縫線核によるセロトニン神経の PCPA に対する反応性の部位差や性差を作り出すと考えられる。

雌ラットにおけるセロトニン合成の代謝回転率は雄よりも高いことが示されている(Rosecrans, 1970)。ヒトでは女性の脳のほうが男性の脳よりもセロトニン合成率が高い(Nishizawa et al., 1997)。トリプトファン水酸化酵素の許容量(Carlsson and Carlsson, 1988a)、および活性 (Vaccari et al., 1977)は雌のほうが雄よりも高いことが報告されている。加えて、PCPA に対するトリプトファン水酸化酵素の活性に部位差があることが示されており(Harvey and Gal, 1974)、また脳内で活性を持つトリプトファン水酸化酵素には1型と2型があること(Knapp and Mandell, 1972)も示されている。特に2型が脳内でのセロトニン合成の主な酵素であるとされている (Walther et al., 2003)。 PCPA は酵素分子に取り込まれることにより、トリプトファン水酸化酵素の働きを阻害する (Koe and Weissman, 1966; Sanders-Bush et al., 1974)ことから、PCPA に対する応答性の部位差や性差は神経細胞における酵素の分子レベルの違いが引き起こしているものかもしれない。Alenina et al.(2009)の報告では、トリプトファン水酸化酵素2型酵素のノックアウトマウスは、脳内5-HT量の大幅な低下をもたらすことから、トリプトファン水酸化酵素の2型が脳内のセロトニン産生の主要な酵素であるとしている。これらの報告に基づくと、性質の異なるセロトニン神経細胞は、トリプトファン水酸化酵素2型のPCPAに対する反応性の違いに起因すると考えられる。

DRにおいてはグリア細胞が栄養因子を介してシナプスを安定化することでセロトニン神経の回復に関わる(Ramos et al., 2000)という報告がある。この報告をもとにすると、セロトニン神経のシナプス結合に関連するグリア細胞の機能もPCPAに対する反応性の性差や部位差に影響を与える可能性が示唆される。

PCPA投与や中脳縫線核破壊は雄、雌双方の性行動に対しそれぞれ他方の性行

動を促進する(総説 Yamanouchi, 1997)ことから、中脳縫線核のセロトニン神経細胞がもつ抑制的働きは雌性行動の性差に対して重要である。脳内における基本的なセロトニン量は雄に比べ雌では多いことが確認されている(Kato, 1960; Carlsson et al., 1985; Carlsson and Carlsson, 1988b)。特に視床下部では顕著である(Kakeyama et al., 2002)。これらの機能的な性差はその機能のセロトニン神経系を含む神経回路の差異によるものと考えられる。一方、今回の実験結果は神経細胞そのものの性質が機能的な性差を作り出す可能性を示している。RMgにおいて今回の実験ではPCPAに対する反応性に性差は認められなかった。しかしながらPCPAは、延髄から下行するセロトニン神経の投射先である脊髄におけるセロトニン含有量を低下させる(Bourgoin et al., 1980)。つまり、下行するセロトニン神経系において、PCPAに対するセロトニン神経の応答性は神経細胞体と神経終末では異なっている可能性を示している。精巣挙筋に下行神経を伸ばしている前角細胞のセロトニン神経線維およびセロトニン神経線維の分布は雄の方が雌に比べて優位である(Kojima and Sano, 1984)。

セロトニン神経細胞の性質に関する性差や部位差はヒトにおける精神疾患やストレス応答の性差に関連すると考えられる。加えて、今回の実験で得られた結果はセロトニンに関連する薬物の投与には性差を十分考慮する必要性を示唆するものである。今後このようなセロトニン神経そのものの性差形成を生じさせるメカニズムをさらに明らかにする必要がある。

第 3 章 縫線核セロトニン神経の生後発達

3-1. 序

第 1 章で示したように、セロトニン神経は多くの生殖機能制御に重要な役割をもっており、脳内のセロトニン量にも性差があることが知られている。特に、視床下部の内側視索前野 (POA)、視床下部腹内側核 (VMH) および中隔のセロトニン含量に性差があると考えられ、雌において高いことが報告されている (Carlsson and Carlsson, 1988b; Kakeyama et al., 2002)。また、視床下部のセロトニン神経線維の分布には性差があることが示されている (Patisaul et al., 2008)。つまり、DR や MR からのセロトニン神経投射分布には性差があると考えられる。

さらに、第 2 章で明らかにしたように、脳内のセロトニン神経細胞には雌雄差と部位差があることが明らかになった (Ito and Yamanouchi, 2010)。

性差とその性機能は胎児期にアンドロゲンの影響下で発達するものと考えられている(総説 山内, 2006)。DR および MR のセロトニン神経は胎生 12-13 日目には原基の細胞から分化が始まり、15 日目までに分裂がほぼ完了する (Lauder, 1990)。さらに、胎児期のセロトニン神経系の形態学的発達を調べた報告もされている (Altman and Bayer, 1978)。性差や生殖機能へのセロトニン神経の役割を明らかにするためには、性分化の生じる生後の縫線核におけるセロトニン神経の発達を調べる必要がある。本実験では、そのような観点から、出生後から思春期前までの DR および MR のセロトニン神経の発達を調べた。生後 5 日から 30 日までの雄ラットを用いて、それぞれの部位のセロトニン神経細胞数を免疫組織化学的手法により解析した。

3-2. 材料と方法

3-2-1 動物

6匹のWistar系妊娠ラットおよび8週齢の雄ラットを高杉実験動物(埼玉)より購入し、出産した雄ラットおよび成熟雄ラットを実験に使用した。飼育は、一定周期の照明(明:暗=14:10 7:00点灯)、一定温度(22-24 °C)の部屋で行い、水および餌は自由摂取とした。出生した子ラットの個体数は、出生日に10個体に統一した。出生日を1日齢として、5日齢5頭、15日齢5頭、30日齢5頭、成熟個体4頭の雄ラットを実験に使用した。8週齢ラットはエーテル麻酔下で精巣除去を行い、1週間後に灌流固定した。5, 15, 30日齢ラットは精巣除去をせず、その日に灌流固定を行った。本研究はすべて早稲田大学実験動物に関する指針(承認番号08J012)に従いおこなった。

3-2-2 切片作成および5-HT免疫組織化学

血液抗凝固剤のノボ・ヘパリン(2 ml/kg body weight, 持田製薬)を腹腔内注射して10分程度経過させたのち、ペントバルビタールナトリウム(2 ml/kg body weight, 大日本住友製薬)による深麻酔下で50 m mol/L (M)リン酸緩衝生理食塩水(PBS, pH7.4)を左心室からペリスタポンプを用いて体重の2/3程度注入した。連続して4%パラホルムアルデヒドの入った50 mM PBによる灌流固定を行い、迅速に脳摘出を行った。摘出した脳は4%パラホルムアルデヒドを含む50 mM PB液で後固定(24時間・4 °C)し、30%スクロースを含む50 mM PBに入れ4 °Cで保存した。背側縫線核を含む範囲の中脳をクライオスタットにより厚さ50 μmの凍結切片にし、50 mM PBSによる3回の洗浄後、MgCl₂およびグリセロ

ールを含む 50 mM PBS に浸し-20 °C で保存した。切片は 3 枚おきの 4 シリーズとし、5 日齢以外はそのうちの 1 シリーズを染色した。5 日齢は 4 シリーズのうち 2 シリーズを染色し、1 枚おきの標本とした。

切片を 50 mM PBS で 3 回洗浄したのち、0.6 %過酸化水素を含む 50 mM PBS に 30 分浸すことで内因性ペルオキシターゼを不活性化した。次に 5%ウサギ正常血清(Normal Rabbit Serum, NRS, Chemicon-Millipore, Billerica, MA)の入った 0.4 %Triton-X-100 の入った 50 mM PBS に 1 時間浸し非特異的結合のブロッキングを行った。その後セロトニン一次抗体(Goat anti-serotonin. 1:25000, ImmunoStar, CA, USA.20079)がはいった 0.4 %Triton-X-100, 5 %NRS-50mM PBS に浸し 4 °C で 48 時間インキュベートした。この抗 5-HT 抗体は広範に使用されており(Lu et al., 2001; Kanno et al., 2008)、抗体特異性についても報告されている(Takeoka et al., 2009)

50 mM PBS による 3 回の洗浄ののち、二次抗体(Rabbit anti Goat IgG, 1:1000, Chemicon-Millipore)の入った 0.4 % Triton-X-100 と 5 %NRS を含む 50mM PBS で 2 時間室温にてインキュベートした。50 mM PBS による 3 回の洗浄後 Enzyme streptavidin-HRP (1:300, Dako Corp. Carpinteria, CA) と 0.4 %Triton-X-100 の入った 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(TBS)に室温で 2 時間浸し二次抗体を標識した。0.1 M TBS による 3 回の洗浄後 0.05 % DAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate, Dojin, Kumamoto)、0.05 %塩化ニッケル(II)六水和物および 0.01 % 過酸化水素を含んだ 0.1M Tris-HCl緩衝液に入れ発色させた。ゼラチンコートスライドガラスに載せ、1日乾燥させたのちエタノールで脱水しキシレンで透徹させマリノールを用いて封入した。

3-2-3 DR および MR の面積測定

DR の面積を測定するため、dDR、vDR、IDR の 5-HT-ir 神経細胞のクラスター外縁部をコンピュータ上でフリーハンドにて描画した。描画したものの面積は Image J (ver.1.33u , NIH, USA)を用いて測定した。幼若ラットでは DR 内の各区分の境界を明確にすることが困難であったため dDR、vDR、IDR については面積測定を行わなかった。MR の面積測定も同様に行った。

3-2-4 セロトニン免疫陽性細胞数計測

DR の 3 つの部位でセロトニン神経細胞体が明瞭な部分を中心に光学顕微鏡によりデジタルカメラ(PDMC II /Olympus)を用いて撮影しコンピュータに取り込んだ。画像を Photoshop CS (Adobe Systems Inc.) により処理し dDR、vDR、IDR の各部位と MR におけるセロトニン免疫陽性細胞数をラット脳図 (Paxinos and Watson, 2007) および発生脳アトラス (Paxinos et al., 1994)を参照して (図. 11A)計測した。

計測にあたり、突起の形状などから神経細胞とわかるものをセロトニン免疫陽性細胞と判定した。DR および MR の画像に 0.2 ミリメートルの正方形枠をあてはめ、その中の細胞数を計測した(図. 11B)。DR の 3 つの部位が明瞭なものを中心に前後 3 枚のスライドを選び、それぞれの数を合計し 1 立方ミリメートルあたりの合計 (密度) に換算し、その個体の値とした。

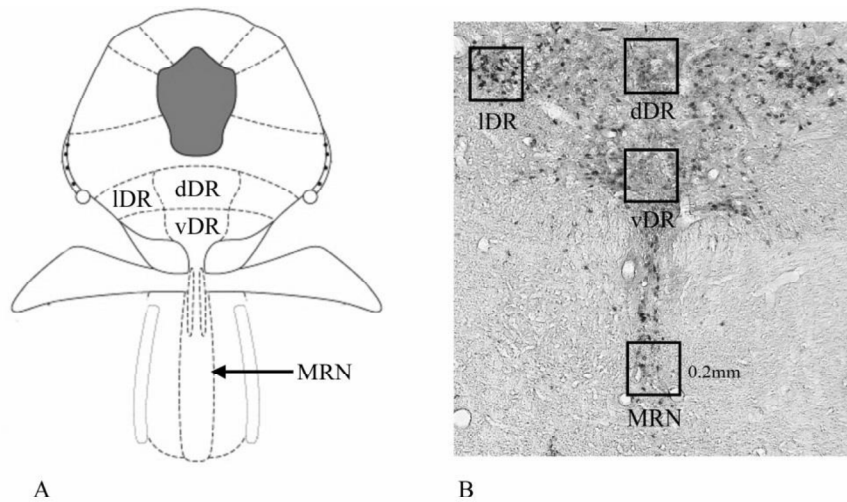


図. 11. A: Schematic illustrations of samples from the midbrain dorsal and median raphe nucleus (DR and MR, respectively). The DR was divided into 3 subdivisions: dorsal, ventral and lateral (dDR, vDR and IDR, respectively). (drawn from Paxinos and Watson, 2007).
 B: 5-HT-immunoreactive cells were counted in a 0.2-mm² frame in digital images of the subdivisions of the DR and MR

統計処理

DR および MR の各部位と日齢ごとのグループに関して、面積および 5-HT-ir 神経細胞密度比較のため 1 元配置の分散分析と Fisher の LSD 検定を行った。

3-3. 結果

3-3-1 セロトニン免疫陽性神経細胞の分布

背側縫線核

DR の平均面積は、5 日齢: $0.39 \pm 0.03 \text{ mm}^2$ 、15 日齢: $0.70 \pm 0.003 \text{ mm}^2$ 、30 日齢: $0.64 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ 、成熟ラット: $0.61 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ であった。5 日齢では 15 日齢、30 日齢および成熟ラットに対して有意に小さかった ($P < 0.05$) (図. 12)。

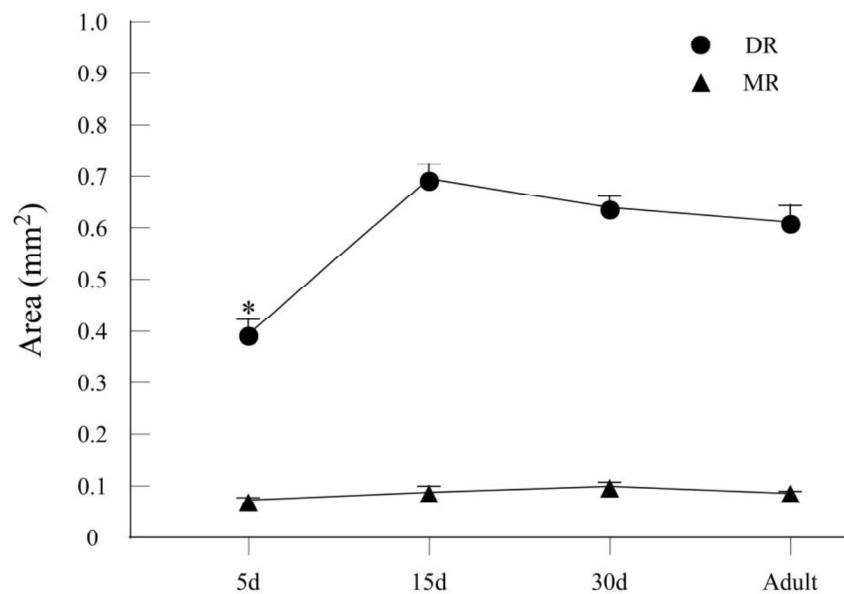
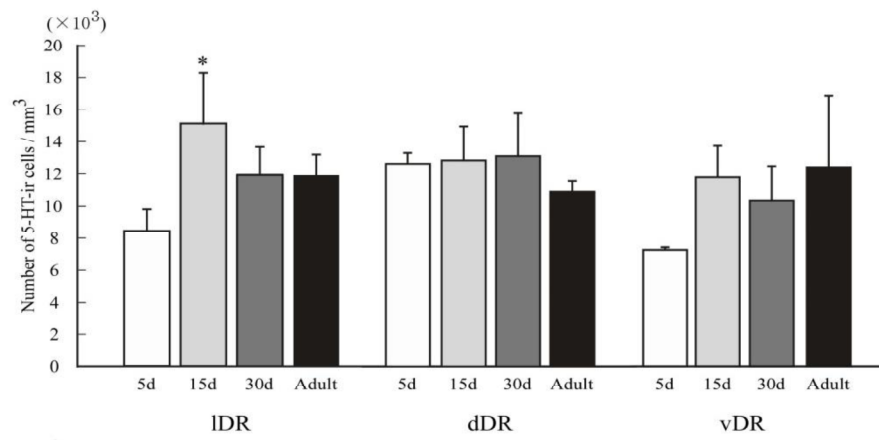


図. 12 Mean areas of the DR and MR of male rats aged 5, 15, and 30 postnatal days and of orchidectomized adult rats

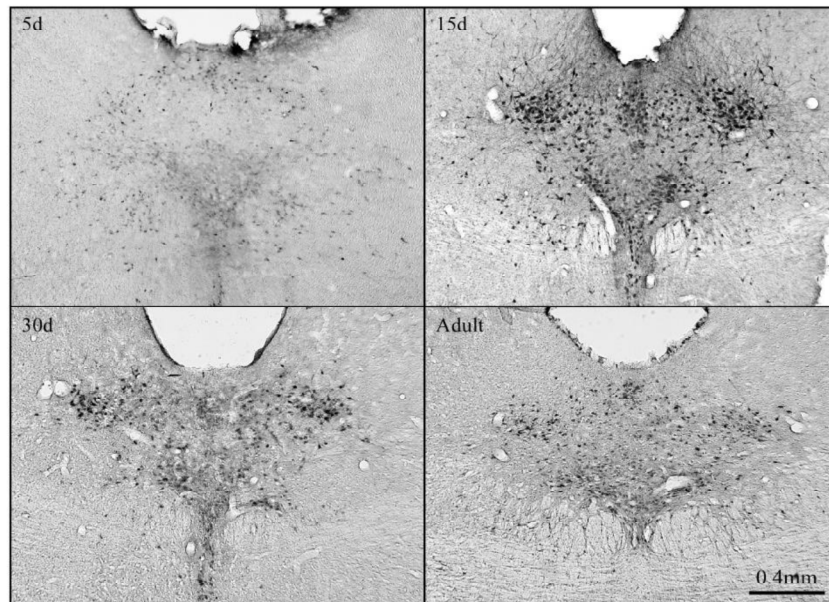
成熟ラットの DR のセロトニン免疫陽性(5-HT-ir)神経細胞は dDR、vDR、IDR の 3 つの集団に明瞭に確認された。

5 日齢ラット DR の 5-HT-ir 神経細胞が見られる領域は成熟ラットより小さいばかりではなく、3 つの領域は明瞭ではなく、5-HT-ir 神経細胞は DR 全体に分布していた。また、染色性も弱い傾向にあった。15 日齢ラットの DR では 3 つの集団が明らかに区別できた。特に IDR では強く見られた。15 日齢以降の DR 内分布を比較すると、IDR では狭い範囲に 5-HT-ir 神経細胞が集中している傾向にあった

(図. 13AB)。



A



B

图 13 A: Mean density of 5-HT immunoreactive cells in the dDR, vDR and IDR of male rats aged 5, 15, and 30 days and in orchidectomized adult rats.
B: Representative photomicrographs of the DR of male rats aged 5, 15, and 30 days and of adult rats.

正中縫線核

MR の平均面積は 5 日齢: $0.07 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ 、15 日齢 $0.09 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ 、30 日齢: $0.10 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ 、成熟ラット: $0.09 \pm 0.01 \text{ mm}^2$ であった(図. 12)。

MR の 5-HT-ir 神経細胞のみられる領域は 5 日、15 日、30 日齢とも明瞭で成熟ラットのものと比較して明確な違いは認められなかった (図. 14B)。

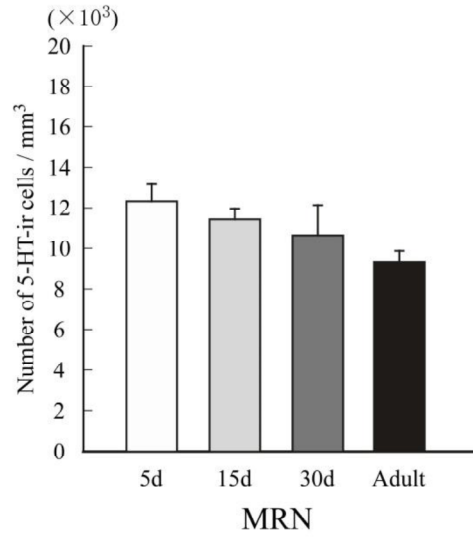
3-3-2 セロトニン免疫陽性神経細胞数

背側縫線核(DR)

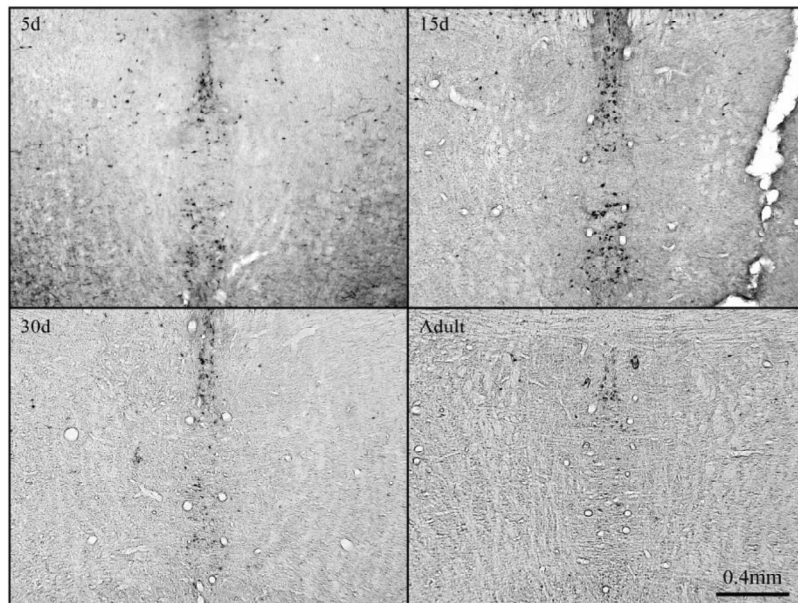
成熟ラットの IDR における 1 mm^3 中の 5-HT-ir 神経細胞数(密度)は 11917 ± 1272 であった。5 日齢のラットでは、 7600 ± 871 で、15 日齢では、 15067 ± 3172 となり、有意に高くなった($P < 0.05$) (図. 13A)。15 日齢と 30 日、成熟ラット間では有意差が認められなかった。5 日齢 dDR の 5-HT-ir 神経細胞数は 11200 ± 1228 で、成熟ラット 5-HT-ir 神経細胞数、 10875 ± 650 と違いはなかった。vDR でも同様に 5 日齢における 5-HT-ir 神経細胞数は 8200 ± 942 で、成熟ラットの 12375 ± 4488 より少なかったが統計的には差が見られなかった。

正中縫線核(MR)

MR における 5-HT-ir 神経細胞数(密度)を計測した結果 5 日齢では 11400 ± 918 であり、15 日齢 (11433 ± 544)、30 日齢 (10667 ± 1487) 成熟ラット (9333 ± 540) と比較して大きな差異は認められなかった(図. 14A)。



A



B

⊠. 14. A: Mean density of 5-HT immunoreactive cells in the MR of male rats aged 5, 15, and 30 days and of orchidectomized adult rats.

B: Representative photomicrographs of the MR in male rats aged 5, 15, and 30 days and in adult rats.

3-4. 考察

本研究では、DR の面積は出生 5 日から 15 日にかけて急速に増加し、30 日齢では成熟ラットよりわずかに小さい程度であった。MR では 15 日から 30 日齢にかけての増加はみられなかった。DR のセロトニン神経細胞の新生は胎生期に終了していることが報告されている (Lauder, 1990) ことから、DR の面積の増加は、樹状突起や軸索側枝、神経膠細胞といった神経網の増加による可能性がある。一方、MR は 5 日齢ですでに成体の大きさに達していると考えられる。このように、DR と MR とで面積の発達の仕方に違いがあるといえる。

面積と同様に 1DR における 5-HT-ir 細胞の密度は、出生 5 日から 15 日齢まで増加し、30 日齢では成熟ラットに比較してわずかに少ない結果であった。変化をしない dDR や vDR とは異なっている。一方、面積と同じように、MR においては 5 日齢から成熟ラットまで 5-HT-ir 細胞密度は変化がなかった。DR の各領域の 5-HT-ir 細胞数に違いがあることは、これらの部位の機能的な差異を反映していると考えられる。

前脳と中脳の 5-HT 量に関しては雄ラットでは出生後から 12 日齢までに増加することが報告されている (Ladosky and Gaziri, 1970)。5-HT の生合成は DR に多く存在するトリプトファン水酸化酵素 (TPH) が律速因子であり、TPH 量は生後 24 時間に最大となり、TPH 活性は MR よりも DR で高いことが成熟ラットにおいて確かめられている (Park et al., 1986)。最近の報告では、延髄の縫線核において TPH の活性および 5-HT トランスポーターの免疫陽性は生後 12 から 13 日において高まることが示唆されている (Liu and Wong-Riley, 2010)。また、同様の現象は 5-HT 受容体に関する報告されている (Liu and Wong-Riley, 2005, 2008)。5-HT および TPH 活性の増加する期間は、今回の実験結果で明

らかになった DR の面積や IDR の 5-HT-ir 神経細胞の密度が増加する期間、生後 5 日から 15 日と一致すると考えられる。

MR は面積と 5-HT-ir 神経細胞発現が生後 5 日齢と成熟ラットに違いがなかったことから、MR の形態的発達 は出生後のわずかな期間で終了することが示唆される。MR の TPH 活性は生後の初期においては DR より低い が、DR と同じパターンの増加を示す (Park et al., 1986) という報告がある。この結果は今回の MR の面積と 5-HT-ir 神経細胞に生後変化がなかったという今回の結果と一致しない。この不一致は出生後における MR の 5-HT の合成と分泌バランスの違いによって生じている可能性がある。したがって、出生後の DR と MR はセロトニン神経細胞におけるセロトニン発現制御の違いと、形態的な違い両方に生じる可能性がある。

出生前後 5 日の周産期において、アンドロゲンが雄型の脳機能を生じさせることが知られている (総説 Gorski, 1971) ことから、出生後の 5-HT 神経発達にも性ホルモンが大きな影響を与えている可能性はある。Ladosky and Gaziri (1970) の報告では、雌ラットに対し出生日にアンドロゲンを投与すると、出生後早期の血液中 5-HT の上昇といった、雄型の特徴を示すようになる。一方で、中脳縫線核において、出生後の時期には 5-HT 濃度に性差はないこと (Watts and Stanley, 1984) が示されている。しかし、今回の実験は、雄ラットの脳の性分化の臨界期以後に調べているものであり、今回の結果は脳の形態的発達中における変化であると考えることができる。さらに、思春期の前に、アンドロゲンの血中濃度は非常に低いことから、IDR における生後 5 日から 15 日齢における 5-HT の発現増加にはアンドロゲンは影響していないとも考えられる。

出生後の 5-HT 神経の役割は多岐にわたる重要な働きを持っている。生殖に関して、新生期の PCPA 投与は、雌ラットの膻開口を遅らせ、雌性行動の受容行動を減少させるとともに雄ラットの性行動を高める (Hyypa et al., 1972)。雄マウスにおいてアンドロゲン受容体の発現は、生後 2 週齢における 5-HT 再取込み阻害薬の投与により影響を受ける (Soga et al., 2012)。これらの知見は、5-HT 神経系の生後発達は、雌雄哺乳類の正常な生殖機構形成に必須であることを示している。近年の研究では、出生後初期の雄ラットに対し 5-HT 再取込み阻害薬や 5-HT 受容体アゴニスト投与を行い、5-HT 神経系を増強するとデキサメタゾン投与による行動異常や不安傾向を防ぐことが示されている (Nagano et al., 2012)。

IDR は DR の領域の中で最大のセロトニン神経細胞のクラスターをもつ (Takeuchi et al., 1982)。DR からは 5-HT 神経線維が視床下部に投射しており、POA や VMN は DR のなかでも主に IDR からの投射量が多い (Kanno et al., 2008)。成熟雄ラットの DR においては各領域での 5-HT 発現は一様ではない。第 2 章で示したように、雄ラットの PCPA 投与に対する感受性が IDR は vDR や dDR とは異なる (Ito and Yamanouchi, 2010)。このような IDR の特徴は、今回の結果に示されたような DR 内の領域の中でも IDR が生後発生におけるセロトニン神経のセロトニン発現に関して特殊であることと一致するものである。

DR と MR の発達の違いについても考える必要がある。DR と MR はともに VMN や POA などの視床下部に 5-HT 神経線維を投射しているが、DR からの投射はおもに同側性であるのに対し、MR からの神経投射は両側性である (Kanno et al., 2008)。さらに DR からの 5-HT 供給は視床下部の各神経核で異なっているが、MR からの 5-HT 供給は視床下

部の各神経核に同等である (Kakeyama et al., 2002)。

蛍光免疫組織化学による研究(Loizou 1972)では、32日齢ラットの中脳と間脳における 5-HT 神経線維の量は成熟ラットと差異がなかったが、16日齢では成熟ラットより少なかった。この研究において、生後の期間において VMN の 5-HT 神経終末はほとんど見られなかったが、POA の神経終末の量は生後 3 週で成熟ラットと同等であった。一方、免疫組織化学およびオートラジオグラフ法による解析では、視床下部の 5-HT 神経系は生後 9 日齢までにいくつかの内分泌学的な機能を制御する程度に発達が完了していると報告されている (Ugrumov et al., 1986)。ラットにおいて、皮質に対する 5-HT 神経投射の発達には部位差がある (Dori et al., 1996)。5-HT 神経細胞体のシナプス構成は部位差があり、それぞれ別の機能をもっている (Dori et al., 1998)。このように脳の 5-HT 神経系の発達は部位と機能の差異がある。

5-HT 発現の DR と MR の差、および DR を構成する各部位ごとの差は生後発達における 5-HT 神経系の役割の違いに原因があると考えられ、機能と縫線核の関係、およびその発達について関連させ、詳細な検討を進めることが必要である。

第4章

セロトニン神経による視床下部エストロゲン受容体発現の調節

4-1. 序

生殖機能制御にはエストロゲン受容体 (ER) α が重要なサブタイプであると考えられ(Ogawa et al., 1999)、雌性行動に重要な腹内側核腹外側部 (vIVMN)、下垂体ホルモン分泌制御に関わる弓状核 (ARCN)、排卵に重要な視索前野の前腹側脳室周囲核 (AVPV) に多くの ER α が存在している (Simerly et al., 1991; Shughrue et al., 1997)。多量のエストロゲン投与は雌ラットにおいてこれらの部位の ER α を減少させることが報告されている (Yamada et al., 2009)。このエストロゲンによる ER α のネガティブフィードバックは神経核におけるエストロゲン感受性の制御において重要である。一方で、神経入力が ER α の発現に影響を及ぼすことも示されている (Shimogawa et al., 2014)。

しかし、生殖機能に多くの影響を与えているセロトニンが視床下部の ER 発現にどのように影響を及ぼしているか調べられていない。この実験においてはその点を明らかにする第一歩として、卵巣除去ラットにセロトニンの合成阻害剤であるパラクロロフェニルアラニン (PCPA) を投与し(実験 1)、または背側縫線核(DR)を破壊 (実験 2) して AVPV、ARCN もしくは vIVMN の ER α 免疫陽性細胞数を計測した。

4-2 材料と方法

4-2-1 動物

11 匹の 8 週齢 Wistar 系雌ラットを高杉実験動物(埼玉)より購入し実験に用いた。一定周期の照明(明:暗 = 14:10 点灯 7 時)、一定温度

(19-24 °C)の部屋で飼育し、水および餌は自由摂取とした。セロトニン合成阻害剤投与開始1週間前(実験1)、または背側縫線核(DR)破壊時(実験2)にすべてのラットに対しイソフルラン麻酔下で卵巣除去をした。本研究はすべて早稲田大学実験動物に関する指針(承認番号 No. 08J003, 08J012, 2013-A097)に従いおこなった。

4-2-2 PCPA投与(実験1)

卵巣除去1週間後、6匹のラットに100 mg/kg body weight の DL-parachlorophenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA, Sigma, 200 mg/ 1 ml saline)の腹腔内投与を開始し4日間連続投与した。投与は午前中の後半におこなった。この投与量は同量を3日間投与するとラット脳内セロトニンがほとんど枯渇するという報告 (Koe and Weissman, 1966) から決定した。5匹の卵巣除去ラットには対照群として、生理食塩水を投与した。

4-2-3 DR破壊(実験2)

卵巣除去と同時にDR破壊(DRL)を午前午後にかけてイソフルラン麻酔下で行った。歯のバーを内耳の位置から3.3 mm下に設定した脳定位固定装置に9匹のラットを固定し、0.7 mmの電極をブレグマから6.5 mm下、7.8 mm後ろ、中央に下ろした。高周波破壊装置(RGF-4A; Radionics Inc., Burlington, MA, USA)を用い、電流を流し0.7 mm径の電極端を1分間52-54 °Cに保った。7匹は偽手術群(Sham)として、電極をDRL群と同じ位置に下ろし、電流は流さなかった。

[DR破壊に関する動物実験は主に古波蔵大祐が行ったものであり、伊藤が計測・解析を行った]

4-2-4 固定および切片作成

PCPA 最終投与の 1 日後(実験 1)、または脳手術 7 日後(実験 2)、灌流固定した。血液抗凝固剤のノボ・ヘパリン(2ml/kg body weight, 持田製薬)を腹腔内注射し、10 分程度経過後、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル 3 ml/kg body weight, 共立製薬)による深麻酔下で 50 mM リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を左心室からペリスタポンプを用いて体重の 2/3 程度注入した。連続して 4 %パラホルムアルデヒドの入った 50 mM PB 液による灌流固定を行い、迅速に脳摘出を行った。摘出した脳は後固定として 4 %パラホルムアルデヒドの入った 50 mM PB 液に 4°C 下で一晩浸漬し、その後 30 %スクロースを含む 50 mM PB に入れ 4 °C で保存した。数日後、脳が沈んだことを確認した後、視床下部を含む範囲をクライオスタットにより厚さ 40 μ m(実験 1)または 50 μ m(実験 2)の凍結切片にし、洗浄後、塩化マグネシウムおよびスクロースを含むクライオプロテクタントに浸し、-20 °C で保存した。切片は 3 枚ごとの 4 シリーズを作成し、そのうちの 1 シリーズを染色した。

4-2-5 ER α 免疫組織化学

切片を 50 mM リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 3 回洗浄したのち、H₂O₂ 3 %を含むメタノールに 10 分間浸し、内因性ペルオキシターゼを不活性化した。次に 10 %ヤギ正常血清(Normal Goat Serum, NGS, Millipore, Temecula, CA,USA)の入った 0.1 %Triton-X-100 – 50 mM PBS に 90 分浸し非特異的結合のブロッキングを行った。その後 ER α 一次抗体(Rabbit anti-ER α . 1:400,000, C1355, Millipore, Billerica, MA, USA)の入った 0.1 % Triton-X-100, 5 %NGS- 50 mM PBS に浸し、4°C で 72 時間インキュベートした。インキュベート後、50 mM Tris-HCl buffer (TBS)による

3 回の洗浄ののち、二次抗体 (biotinylated goat anti-rabbit IgG ,1:1000, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), 0.1 % Triton-X-100, 10 %NGS を含む 50mM TBS で 2 時間室温にてインキュベートした。50 mM TBS による 3 回の洗浄後 Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) および 0.02 %Triton-X-100 の入った 50 mM TBS に室温で 1 時間浸し二次抗体を標識した。50 mM TBS による 3 回の洗浄後 DAB metal enhanced kit (34065, Thermo Fisher Scientific, IL, USA)を用いて氷上で発色させた。ゼラチンコートスライドガラスに載せ、2 日乾燥させたのち上昇系エタノールで脱水しキシレンで透徹させマリノール(Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)を用いて封入した。

4 - 2 - 6 ER α 免疫陽性細胞数計測

背側縫線核を含む中脳を光学顕微鏡に接続したデジタルカメラ (DP72, Olympus)により撮影しコンピュータに取り込んだ。取り込んだ画像を Photoshop CS (Adobe Systems Inc.) により処理し、一辺が 0.2 ミリメートルの正方形枠内の免疫陽性細胞数を計測した。AVPV については 2 枚の切片を用いて計測した。vIVMN および ARC についてはブレグマから尾側に 2.28 から 2.76mm の範囲から 3 枚の切片を選択し計測した。vIVMN では吻側と尾側とで ER α の免疫陽性細胞数に差異が認められているため(Shimogawa et al., 2014)、吻側の部分を選択した。

ER α 免疫陽性細胞数の計測に当たり、2 名の計測者が独立に計測し、その傾向には大きな差異が認められなかったため、計測値を平均して掲示した。細胞数計測にあたりラット脳アトラス(Paxinos and Watson, 2007)を参照した (図. 15)。

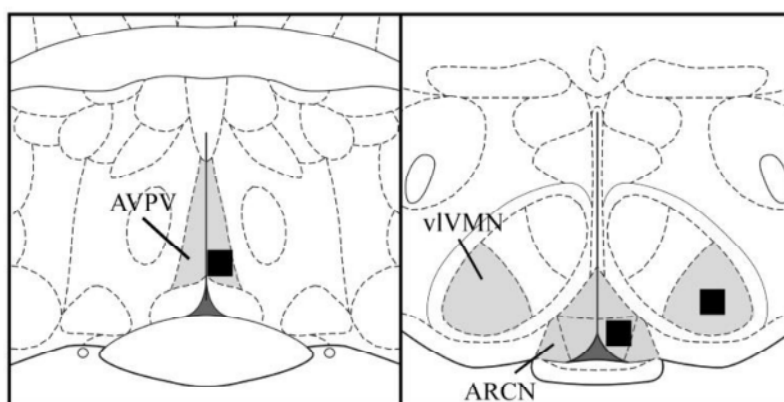


図. 15 Schematic illustration of the counting area for ER α -ir cells in the anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area (AVPV), ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus (vIVMN), and arcuate nucleus (ARCNU) in female rats. ER α -ir cells were counted within a $0.2 \times 0.2 \text{ mm}^2$ area in digital images of these nuclei.

4-2-7 統計処理

すべてのグループについて Student's T-test により統計処理し

(StatView 5.0. SAS institutes, Cary, NC, USA)、 $p < 0.05$ のとき有意とした。

4-3. 結果

4-3-1 ER α 免疫陽性細胞数に対する PCPA 投与の効果

PCPA 投与群と生理食塩水投与群の AVPV における ER α 免疫陽性細胞数を光学顕微鏡下において比較すると生理食塩水投与群では脳室の周囲に密集して観察されるのに対し、PCPA 投与群では AVPV の広範囲にわたって ER α 免疫陽性細胞が分布している(図. 16A)。 1 mm^3 あたりの ER α 免疫陽性細胞数(密度)の平均値を比較すると、生理食塩水群では 19125 ± 3778 であり、PCPA 投与群では 41198 ± 4024 であり有意に PCPA

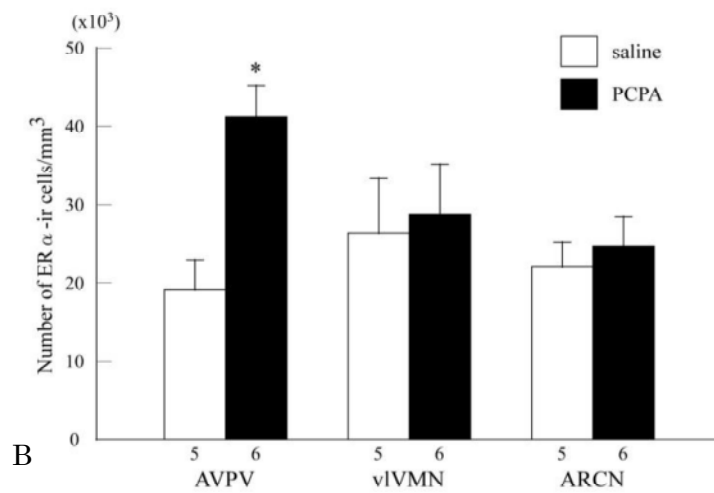
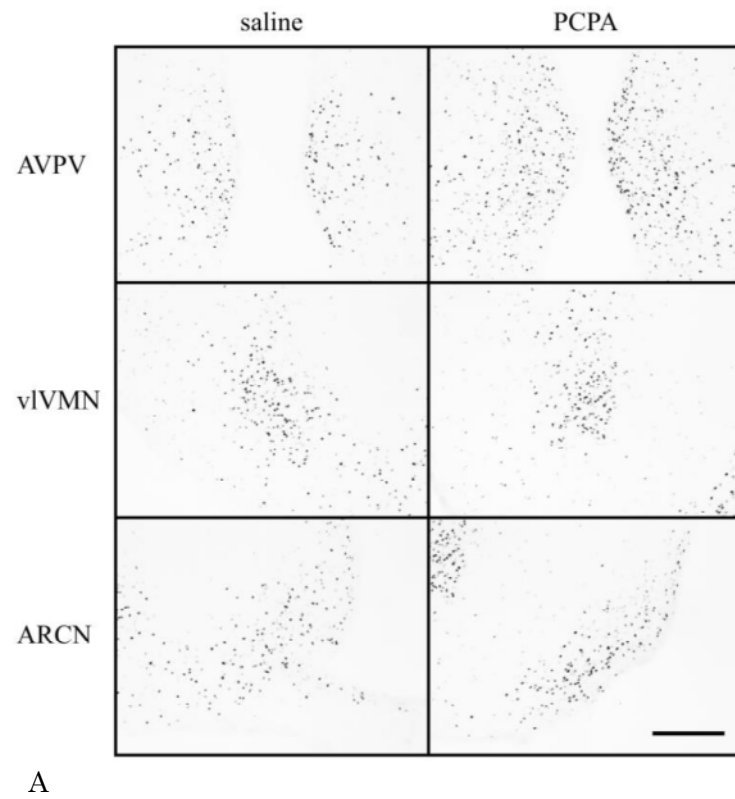


图.16 A: Representative photomicrographs showing ER α -ir cells in the AVPV, vIVMN, and ARCn in saline- or PCPA-treated female rats. Scale bars indicate 200 μ m.

B: Mean numbers of ER α -ir cells per mm³ (density) in the AVPV, vIVMN, and ARCn in female rats. Error bars on the top of each column show \pm SEM. *p < 0.05 vs. saline-treated group.

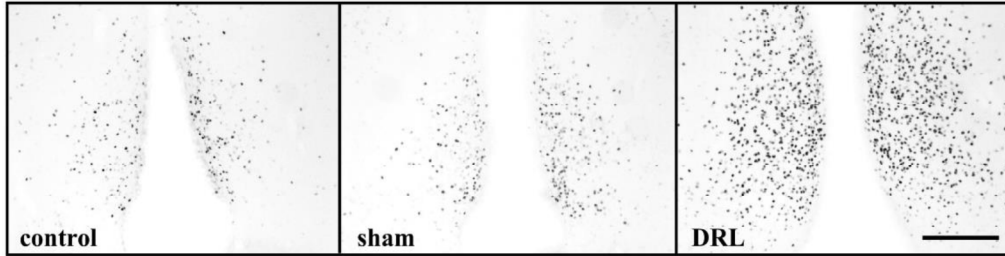
投与群で多かった($P < 0.05$)。vIVMN および ARCN の生理食塩水投与群においては 26375 ± 6888 と 22063 ± 3147 であり PCPA 投与群と有意差は認められなかった(図. 16B)。

4-3-2 ER α 免疫陽性細胞数に対する縫線核破壊(DRL)の効果

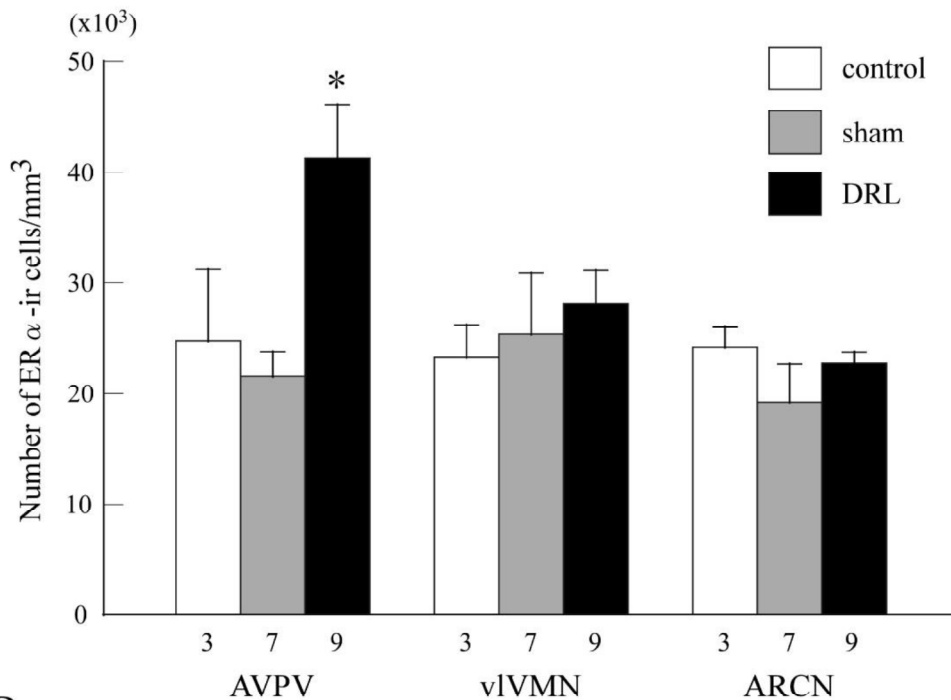
PCPA 投与群において、ER α の免疫陽性細胞は AVPV の範囲に広範囲に観察された。しかし、偽手術群では、第三脳室の近傍に存在していた(図. 17A)。AVPV における ER α 免疫陽性細胞密度は、対照群では 21563 ± 2235 であり、偽手術群では 24778 ± 6415 であった(図. 17B)。DRL 群では 41282 ± 4812 であり、偽手術群と比較して有意に高かった($p < 0.05$)。vIVMN と ARCN において ER α 免疫陽性細胞密度は対照群、偽手術群、DRL 群の間で差がなかった。

4-3-3 縫線核破壊部位の特定

すべてのラットについて組織学的検索を行い、DR の吻側と尾側の端部を除き、DR の大部分が破壊されていることを確認した。しかし正中縫線核は破壊されていない(図. 18)。DRL 処置ラットの大半で傷は被蓋野に達していた。



A



B

Fig. 17 A: Representative photomicrographs showing ER α -ir cells in the AVPV, vIVMN, and ARCN in the control, sham, and dorsal raphe-lesioned (DRL) groups. Scale bars indicate 200 μ m.

B: Mean numbers of ER α -ir cells per mm³ (density) in the AVPV, vIVMN, and ARCN. Error bars on the top of each column show \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. sham group.

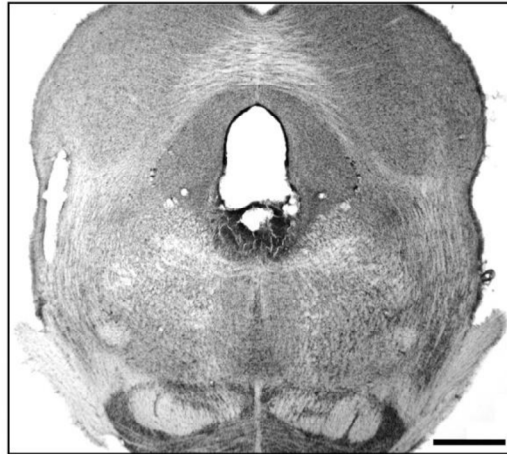


図.18 Representative photomicrograph of the site of the lesion in the dorsal raphe nucleus. Scale bar indicates 1 mm.

4-4. 考察

本実験において、AVPVにおけるER α の免疫陽性細胞数はPCPA投与群では生理食塩水投与群に比べ多かったが、vIVMNおよびARCNでは差異が認められなかった。さらにDRを高周波破壊してAVPV、vIVMNおよびARCNのER α 免疫陽性細胞数を計測した実験においてもAVPVにおいてのみER α が増加する。これらの結果はおもにDRのセロトニン神経系がAVPVにおけるER α 免疫陽性細胞の発現に対し抑制的に働いており、セロトニン産生を阻害したことによりAVPVのER α 免疫陽性細胞数が増加したと考えられる。

AVPVはGnRHのサージ状分泌に重要な部位である（Wiegand and Terasawa, 1982）。AVPVにおいてはER α と β の両方が存在することが示されている（Greco et al., 2001）。おもにER α がGnRHの制御に関与していると考えられており、ER α ノックアウトマウスでは排卵が起こ

らない (Ogawa et al., 1998)。

AVPV における ER α を持っているキスペプチンニューロンが GnRH の分泌を制御する報告 (Smith et al., 2006; Adachi et al., 2007) がある。排卵発現にかかわるメカニズムにおいて AVPV はもっとも重要な部位の一つと言える。AVPV における ER α のダウンレギュレーションには部位差がある (Yamada et al., 2009)。このようにエストロゲンは AVPV に作用し排卵を引き起こす。

PCPA を投与することによる脳内セロトニン量の低下は、黄体形成ホルモン (LH) サージや排卵などを抑制する (Burri et al., 1987)。排卵については DR およびセロトニンの 2A2C 受容体によって制御されていることが示されている (Maekawa et al., 1999)。また DR からのセロトニン神経は POA に投射している (Kanno et al., 2008)。AVPV において観察されるセロトニン線維は少なく、AVPV 外側の疎性に細胞が集まる部分に高密度で分布している (Simerly and Swanson, 1987; Simerly et al., 1985)。逆行性神経トレーサーを用いた実験では、GnRH ニューロンは DR から AVPV に投射する (Hahn and Coen, 2006)。免疫組織化学的解析および微細構造解析によると、内側視索前野における ER α 含有神経細胞はセロトニン神経投射を受けている可能性がある (Kallo et al., 1992)。以上の考察と今回の実験結果より、DR からのセロトニン神経投射が ER α の発現を制御している可能性は生殖において重要なメカニズムであると考えられる。しかしながら、DR のセロトニン神経が排卵抑制をもたらす AVPV における ER α の制御にいかにかかわっているか完全には明らかとはなっていない。

vIVMN においては PCPA によるセロトニン阻害や DR 破壊による ER α の発現に影響しなかった。vIVMN には ER α が多く分布しており、

ラットの雌性行動を制御する（総説 Pfaff et al., 2006）。PCPA 投与によるセロトニン阻害によってロードーシス行動は促進される（Zemlan et al., 1973; Yamanouchi et al., 1984）。同様に DR 破壊はロードーシス行動を高める（Takeyama and Yamanouchi, 1996）。VMN には多量のセロトニン神経線維が含まれており、分布には性差がある（Patisaul et al., 2008）。VMN は DR からおもに同側性のセロトニン神経投射を受けており、MR からは両側性のセロトニン神経投射を受けている（Kanno et al., 2008）。セロトニン神経毒を用いた行動学的実験では、ロードーシス抑制機構の神経投射はセロトニン系であることが示されている（Luine et al., 1983）。しかしながら VMN へ投射するセロトニン神経は ER α の発現制御に関与しないと考えられるが、VMN への神経投射が VMN における ER α の発現に影響することは報告(Shimogawa et al., 2014)されている。

ARCN においても多くの ER α 免疫陽性細胞が確認されており、下垂体のホルモン分泌を制御することが知られている。最近の報告では、ARCN が摂食のメカニズムにかかわることも示されている。セロトニン受容体アゴニストの ARCN への注入は雌ラットにおいて摂食に影響を及ぼす（Steffens et al., 2008）。またマカク類の ARCN におけるセロトニン量が性ホルモンによって変化することが示されている（Centeno et al., 2007）。ARCN へのセロトニン神経入力 は VMN と同様に重要な働きを持っているが、今回の実験結果からはセロトニンと DR は、ARCN における ER α の発現調節に対し重要な作用を持っていないと考えられる。

縫線核からのセロトニン神経線維は脳と脊髄の広範にわたって作用を及ぼす。しかしながらセロトニン神経系と各神経核における各種の

ホルモン受容体との関係性は報告されていない。このような関係性の研究は生殖の分野のみならず、神経内分泌のさまざまな現象を理解するために必要であると考えられる。

結語

本研究は、セロトニン神経の性差および発達を明らかにするとともに、セロトニン神経系の生殖制御における役割を探るためにエストロゲン受容体(ER)との関係性を検討したものである。

第2章において、生殖腺除去雌雄ラットにおけるセロトニンの合成阻害剤である PCPA に対する反応性をセロトニン発現細胞数によりしらべたが、DR と MR の反応性が雌雄で異なることが明らかになった。DR は雌生殖機能の排卵、性行動、妊娠制御に影響力を持つことが知られており、一方、MR は雄の性行動に影響がある。このようなセロトニンの働きの違いの根底に、縫線核のセロトニン神経そのものの性差が反映されているのであらうと考えられる。

一方、この実験では、延髄の RMg には PCPA に対する反応性に性差はなかった。延髄の縫線核は脊髄にセロトニン神経を投射しており、その機能に雌雄差がないのかもしれないが、その点は科学的な解析が必要である。

第3章では、生後5日から30日までの縫線核セロトニン神経の発達を検討したが、DR と MR では異なった発達パターンが見られた。DR の面積は5日から15日にかけて急激に増加するが、MR は5日にすでに成体と同じ程度であった。セロトニン神経細胞密度も DR の三つの区域の中で背外側部(IDR)では5日から15日に急激に増加が見られたが、背内側、腹内側の二つの区域ではそのような増加は見られなかった。DR の背外側部は成体において、他の領域より明瞭なセロトニン神経細胞のクラスターが見られ、生殖に関係する前脳の部位への投射もほかの部位より多いことなどを考えると、DR の外背側部はその

機能の発達への反映として、異なった生後発達があるであろう。

MR は面積と同様、セロトニン神経細胞密度の変化は 5 から 30 日、さらに成体に至るまであまり変わりがなく、5 日ですでに機能的にも成体に近いものがある可能性がある。生体における前脳への投射も両側に同じ程度の投射があることなど、DR とは異なっていることも考慮すべきであろう。

第 4 章では、雌ラットにおいて、視床下部の中で、特に視索前野前腹側脳室周囲核 (AVPV) の ER α 発現を背側縫線核からのセロトニン神経が抑制していることが明らかになった。vIVMN や ARCN ではそのような働きは見られなかった。AVPV は排卵機構においてエストロゲンが作用する部位として知られているが、今回示された AVPV の ER α 発現抑制が排卵調節にどのように関与するのか今後の実験が必要である。

本研究で得られたいくつかのセロトニン神経の性質や働きは、セロトニン神経による生殖機能制御や性差形成のメカニズムを解明する基盤となると考えられると同時に、ホルモン感受性の高い乳がんなどの原理解明、さらにはセロトニン神経障害により生じる病気に対する薬物の開発、また男女への投与の違いなどを考える時に重要なものとなるであろう。

引用文献

Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K. and Maeda, K., Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats, *J Reprod Dev*, 53 (2007) 367-78.

Aghajanian, G.K., Kuhar, M.J. and Roth, R.H., Serotonin-containing neuronal perikarya and terminals: differential effects of P-chlorophenylalanine, *Brain Res*, 54 (1973) 85-101.

Alenina, N., Kikic, D., Todiras, M., Mosienko, V., Qadri, F., Plehm, R., Boye, P., Vilianovitch, L., Sohr, R., Tenner, K., Hortnagl, H. and Bader, M., Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (2009) 10332-7.

Altman, J. and Bayer, S.A., Development of the diencephalon in the rat., *J Comp Neurol*, 182 (1978) 945-1010

Azmitia, E.C. and Segal, M., An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat, *J Comp Neurol*, 179 (1978) 641-67.

Barfield, R.J. and Chen, J.J., Activation of estrous behavior in ovariectomized rats by intracerebral implants of estradiol benzoate, *Endocrinology*, 101 (1977) 1716-25.

Blundell, J.E., Serotonin and appetite, *Neuropharmacology*, 23 (1984) 1537-51.

Bourgoin, S., Oliveras, J.L., Bruxelle, J., Hamon, M. and Besson, J.M., Electrical stimulation of the nucleus raphe magnus in the rat. Effects on 5-HT metabolism in the spinal cord, *Brain Res*, 194 (1980) 377-89.

Burri, R., Petersen, S.L. and Barraclough, C.A., Effects of

p-chlorophenylalanine on hypothalamic indoleamine levels and the associated changes which occur in catecholamine dynamics and LH surges in estrogen-treated ovariectomized rats, *Brain Res*, 416 (1987) 267-76.

Carlsson, M., Svensson, K., Eriksson, E. and Carlsson, A., Rat brain serotonin: biochemical and functional evidence for a sex difference, *J Neural Transm*, 63 (1985) 297-313.

Carlsson, M. and Carlsson, A., In vivo evidence for a greater brain tryptophan hydroxylase capacity in female than in male rats, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 338 (1988a) 345-9.

Carlsson, M. and Carlsson, A., A regional study of sex differences in rat brain serotonin, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 12 (1988b) 53-61.

Carlton, S.M., Steinman, J.L., Hillman, G.R. and Willis, W.D., Differential effects of p-chlorophenylalanine on indoleamines in brainstem nuclei and spinal cord of rats. II. Identification of immunohistochemically stained structures using computer-assisted image enhancement techniques, *Brain Res*, 426 (1987) 310-22.

Carrillo, M., Ricci, L.A., Coppersmith, G.A. and Melloni, R.H., Jr., The effect of increased serotonergic neurotransmission on aggression: a critical meta-analytical review of preclinical studies, *Psychopharmacology (Berl)*, 205 (2009) 349-68.

Centeno, M.L., Reddy, A.P., Smith, L.J., Sanchez, R.L., Henderson, J.A., Salli, N.C., Hess, D.J., Pau, F.K. and Bethea, C.L., Serotonin in microdialysate from the mediobasal hypothalamus increases after progesterone administration to estrogen primed macaques, *Eur J Pharmacol*, 555 (2007) 67-75.

Dori, I., Dinopoulos, A., Blue, M.E. and Parnavelas, J.G., Regional differences in the ontogeny of the serotonergic projection to the cerebral cortex, *Exp Neurol*, 138 (1996) 1-14.

Dori, I.E., Dinopoulos, A. and Parnavelas, J.G., The development of the synaptic organization of the serotonergic system differs in brain areas with different functions, *Exp Neurol*, 154 (1998) 113-25.

Gorski RA ,Gonadal hormones and perinatal development of neuroendocrine function. In: Martini L, Ganong WF eds *Frontiers in Neuroendocrinology* Oxford Univ Press.(1971) pp 237-290 31

Greco, B., Allegretto, E.A., Tetel, M.J. and Blaustein, J.D., Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment, *Endocrinology*, 142 (2001) 5172-81.

Hahn, J.D. and Coen, C.W., Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats, *J Comp Neurol*, 494 (2006) 190-214.

Harvey, J.A. and Gal, E.M., Septal tryptophan-5-hydroxylase: divergent response to raphe lesions and parachlorophenylalanine, *Science*, 183 (1974) 869-71.

Helena, CV., de Oliveira Poletini M., Sanvitto, GL., Hayashi, S., Franci, CR., Anselmo-Franci, JA., Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *J Endocrinol.* (2006);188(2):155-65.

Hyypa, M., Lampinen, P. and Lehtinen, P., Alteration in the sexual behaviour of male and female rats after neonatal administration of p-chlorophenylalanine, *Psychopharmacologia*, 25 (1972) 152-61.

Ito, H. and Yamanouchi, K., Sex and regional differences in decrease of serotonin-immunoreactive cells by parachlorophenylalanine in rat raphe nuclei, *Neurosci Res*, 67 (2010) 33-9.

Jacobs, B.L. and Azmitia, E.C., Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol Rev*, 72 (1992) 165-229.

Takeyama, M. and Yamanouchi, K., Lordosis in male rats: the facilitatory effect of mesencephalic dorsal raphe nucleus lesion, *Physiol Behav*, 51 (1992) 181-4.

Takeyama, M. and Yamanouchi, K., Female sexual behaviors in male rats with dorsal raphe nucleus lesions: treatment with p-chlorophenylalanine, *Brain Res Bull*, 30 (1993) 705-9.

Takeyama, M. and Yamanouchi, K., Inhibitory effect of baclofen on lordosis in female and male rats with dorsal raphe nucleus lesion or septal cut, *Neuroendocrinology*, 63 (1996) 290-6.

Takeyama, M., Negishi, M. and Yamanouchi, K., Facilitatory effect of ventral cut of dorsal raphe nucleus on lordosis in female rats, *Endocr J*, 44 (1997) 589-93.

Takeyama, M., Umino, A., Nishikawa, T. and Yamanouchi, K., Decrease of serotonin and metabolite in the forebrain and facilitation of lordosis by dorsal raphe nucleus lesions in male rats, *Endocr J*, 49 (2002) 573-9.

Kallo, I., Liposits, Z., Flerko, B. and Coen, C.W., Immunocytochemical characterization of afferents to estrogen receptor-containing neurons in the medial preoptic area of the rat, *Neuroscience*, 50 (1992) 299-308.

Kanno, K., Shima, S., Ishida, Y. and Yamanouchi, K., Ipsilateral and contralateral serotonergic projections from dorsal and median raphe nuclei to the forebrain in rats: immunofluorescence quantitative analysis, *Neurosci Res*, 61 (2008) 207-18.

Kato, R., Serotonin content of rat brain in relation to sex and age, *J Neurochem*, 5 (1960) 202.

Kato, S., Tora, L., Yamauchi, J., Masushige, S., Bellard, M. and Chambon, P. A far upstream estrogen response element of the ovalbumin gene contains several half-palindromic 5'-TGACC-3' motifs acting synergistically. *Cell* 68 (1992):731–742.

Knapp, S. and Mandell, A.J., Parachlorophenylalanine--its three phase sequence of interactions with the two forms of brain tryptophan hydroxylase, *Life Sci I*, 11 (1972) 761-71.

Koe, B.K. and Weissman, A., p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin, *J Pharmacol Exp Ther*, 154 (1966) 499-516.

Kojima, M. and Sano, Y., Sexual differences in the topographical distribution of serotonergic fibers in the anterior column of rat lumbar spinal cord, *Anat Embryol (Berl)*, 170 (1984) 117-21.

Kondo, Y., Yamanouchi, K. and Arai, Y., P-chlorophenylalanine facilitates copulatory behavior in septal lesioned but not in preoptic lesioned male rats, *J Neuroendocrinol*, 5 (1993) 629-33.

Kondo, Y. and Yamanouchi, K., Potentiation of ejaculatory activity by median raphe nucleus lesions in male rats: effect of p-chlorophenylalanine, *Endocr J*, 44 (1997) 873-9.

Kornum, B.R., Licht, C.L., Weikop, P., Knudsen, G.M. and Aznar, S., Central serotonin depletion affects rat brain areas differently: a qualitative and quantitative comparison between different treatment schemes, *Neurosci Lett*, 392 (2006) 129-34.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A., Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 5925-30.

Ladosky, W. and Gaziri, L.C., Brain serotonin and sexual differentiation of the nervous system, *Neuroendocrinology*, 6 (1970) 168-74.

A.H. Lauber, C.V. Mobbs, M. Muramatsu, D.W. Pfaff, Estrogen receptor messenger RNA expression in rat hypothalamus as a function of genetic sex and estrogen dose, *Endocrinology* 129 (1991) 3180–3186.

Lauder, J.M., Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal, *Ann N Y Acad Sci*, 600 (1990) 297-313; discussion 314.

Liu, Q. and Wong-Riley, M.T., Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats, *J Appl Physiol* (1985), 98 (2005) 1442-57.

Liu, Q. and Wong-Riley, M.T., Postnatal changes in the expression of serotonin 2A receptors in various brain stem nuclei of the rat, *J Appl Physiol* (1985), 104 (2008) 1801-8.

Liu, Q. and Wong-Riley, M.T., Postnatal changes in tryptophan hydroxylase and serotonin transporter immunoreactivity in multiple brainstem nuclei of the rat: implications for a sensitive period, *J Comp Neurol*, 518 (2010) 1082-97.

Loizou, L.A., The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat, *Brain Res*, 40 (1972) 395-418.

Lu, H., Ozawa, H., Nishi, M., Ito, T. and Kawata, M., Serotonergic neurones in the dorsal raphe nucleus that project into the medial preoptic area contain oestrogen receptor beta, *J Neuroendocrinol*, 13 (2001) 839-45.

Luine, V.N., Frankfurt, M., Rainbow, T.C., Biegon, A. and Azmitia, E., Intrahypothalamic 5,7-dihydroxytryptamine facilitates feminine sexual behavior and decreases [3H]imipramine binding and 5-HT uptake, *Brain Res*, 264 (1983) 344-8.

Maekawa, F. and Yamanouchi, K., Effect of deprivation of serotonin by p-chlorophenylalanine on induction and maintenance of pseudopregnancy in female rats, *Brain Res Bull*, 39 (1996) 317-21.

Maekawa, F., Tsukahara, S., Tsukamura, H., Maeda, K.I. and Yamanouchi, K., Inhibitory effect of neural transections of dorsal raphe nucleus on induction of nocturnal prolactin surge by vaginal stimulation in ovariectomized rats, *Brain Res*, 813 (1998) 195-9.

Maekawa, F., Tsukahara, S., Tsukamura, H., Maeda, K.I. and Yamanouchi, K., Prevention of inhibitory effect of dorsal raphe nucleus lesions on ovulation and LH surge by 5-HT 2A/2C receptor agonists in female rats, *Neurosci Res*, 35 (1999) 291-8.

Matsumoto, T., Kondo, Y., Sachs, B.D. and Yamanouchi, K., Effects of p-chlorophenylalanine on reflexive and noncontact penile erections in male rats, *Physiol Behav*, 61 (1997) 165-8.

McEwen, B., Estrogen actions throughout the brain, *Recent Prog Horm Res*, 57 (2002) 357-84.

Nagano, M., Liu, M., Inagaki, H., Kawada, T. and Suzuki, H., Early intervention with fluoxetine reverses abnormalities in the serotonergic system and behavior of rats exposed prenatally to dexamethasone, *Neuropharmacology*, 63 (2012) 292-300.

Nishizawa, S., Benkelfat, C., Young, S.N., Leyton, M., Mzengeza, S., de Montigny, C., Blier, P. and Diksic, M., Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 5308-13.

Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S. and Pfaff, D.W., Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice, *Endocrinology*, 139 (1998) 5070-81.

Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S. and Pfaff, D.W., Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999) 12887-92.

Parent, A., Descarries, L. and Beaudet, A., Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]5-hydroxytryptamine, *Neuroscience*, 6 (1981) 115-38.

Park, D.H., Snyder, D.W. and Joh, T.H., Postnatal developmental changes of tryptophan hydroxylase activity in serotonergic cell bodies and terminals of rat brain, *Brain Res*, 378 (1986) 183-5.

Parsons B., Rainbow TC., MacLusky NJ., McEwen BS., Progesterone receptor levels in rat hypothalamic and limbic nuclei., *J Neurosci*. 2 (1982)10:1446-52.

Patisaul, H.B., Fortino, A.E. and Polston, E.K., Sex differences in serotonergic but not gamma-aminobutyric acidergic (GABA) projections to the rat ventromedial nucleus of the hypothalamus, *Endocrinology*, 149 (2008) 397-408.

Paxinos, G., Watson, C., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th and 6th ed., Academic Press, New York., 1998 and 2007.

Pfaff, D.W. and Sakuma, Y., Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus, *J Physiol*, 288 (1979a) 189-202.

Pfaff, D.W. and Sakuma, Y., Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus, *J Physiol*, 288 (1979b) 203-10.

Pfaff DW., Sakuma Y., Kow L-M., Lee AWL. and Easton A., Hormonal, neural, and genomic mechanisms for female reproductive behaviors, motivation, and arousal, in: J.D. Neill Ed. , *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, vol. 34, Third Edition, Elsevier, New York, (2006), 1825-1919.

- Quay, W.B., Differences in circadian rhythms in 5-hydroxytryptamine according to brain region, *Am J Physiol*, 215 (1968) 1448-53.
- Rajendren, G., Dudley, C.A. and Moss, R.L., Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats, *Physiol Behav*, 50 (1991) 705-10.
- Ramos, A.J., Tagliaferro, P., Lopez, E.M., Pecci Saavedra, J. and Brusco, A., Neuroglial interactions in a model of para-chlorophenylalanine-induced serotonin depletion, *Brain Res*, 883 (2000) 1-14.
- Rosecrans, J.A., Differences in brain area 5-hydroxytryptamine turnover and rearing behavior in rats and mice of both sexes, *Eur J Pharmacol*, 9 (1970) 379-82.
- Sakai, M. and Yamanouchi, K., Effects of estrogen, androgen, and phytoestrogen on retrieving and licking behaviors in nulliparous and male rats, *Zoolog Sci*, 24 (2007) 894-8.
- Sanders-Bush, E., Gallager, D.A. and Sulser, F., On the mechanism of brain 5-hydroxytryptamine depletion by p-chloroamphetamine and related drugs and the specificity of their action, *Adv Biochem Psychopharmacol*, 10 (1974) 185-94.
- Satou, M. and Yamanouchi, K., Effect of direct application of estrogen aimed at lateral septum or dorsal raphe nucleus on lordosis behavior: regional and sexual differences in rats, *Neuroendocrinology*, 69 (1999) 446-52.
- Shimogawa, Y., Maekawa, F. and Yamanouchi, K., Unilateral lesion increases oestrogen receptor alpha expression in the intact side of the ventromedial hypothalamic nucleus in ovariectomised rats, *J Neuroendocrinol*, 26 (2014) 258-66.

Shughrue, P.J., Bushnell, CD. and Dorsa, DM., Estrogen receptor messenger ribonucleic acid in female rat brain during the estrous cycle: a comparison with ovariectomized females and intact males. *Endocrinology*. (1992); 131(1):381-8.

Shughrue, P.J., Lane, M.V. and Merchenthaler, I., Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system, *J Comp Neurol*, 388 (1997) 507-25.

Simerly, R.B., Swanson, L.W. and Gorski, R.A., The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism, *Brain Res*, 330 (1985) 55-64.

Simerly, R.B. and Swanson, L.W., The distribution of neurotransmitter-specific cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus: implications for the control of gonadotropin secretion in the rat, *Brain Res*, 400 (1987) 11-34.

Simerly, R.B. and Young, B.J., Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus by sex steroid hormones, *Mol Endocrinol*, 5 (1991) 424-32.

Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A. and Clarke, I.J., KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season, *Endocrinology*, 148 (2007) 1150-7.

Soga, T., Wong, D.W., Putteeraj, M., Song, K.P. and Parhar, I.S., Early-life citalopram-induced impairments in sexual behavior and the role of androgen receptor, *Neuroscience*, 225 (2012) 172-84.

Steffens, S.M., da Cunha, I.C., Beckman, D., Lopes, A.P., Faria, M.S., Marino-Neto, J. and Paschoalini, M.A., The effects of metergoline and 8-OH-DPAT injections into arcuate nucleus and lateral hypothalamic area

on feeding in female rats during the estrous cycle, *Physiol Behav*, 95 (2008) 484-91.

Steinman, J.L., Carlton, S.M., Haber, B. and Willis, W.D., Differential effects of p-chlorophenylalanine on indoleamines in brainstem nuclei and spinal cord of rats. I. Biochemical and behavioral analysis, *Brain Res*, 426 (1987) 297-309.

Takeoka, A., Kubasak, M.D., Zhong, H., Roy, R.R. and Phelps, P.E., Serotonergic innervation of the caudal spinal stump in rats after complete spinal transection: effect of olfactory ensheathing glia, *J Comp Neurol*, 515 (2009) 664-76.

Takeuchi, Y., Kimura, H. and Sano, Y., Immunohistochemical demonstration of the distribution of serotonin neurons in the brainstem of the rat and cat, *Cell Tissue Res*, 224 (1982) 247-67.

Terasawa, E., Wiegand, S.J. and Bridson, W.E., A role for medial preoptic nucleus on afternoon of proestrus in female rats, *Am J Physiol*, 238 (1980) E533-9.

Tohyama, I., Kameyama, M. and Kimura, H., Quantitative morphometric analysis of two types of serotonin-immunoreactive nerve fibres differentially responding to p-chlorophenylalanine treatment in the rat brain, *Neuroscience*, 26 (1988) 971-91.

Tohyama, M. and Takatsuji, K., The serotonin system. In *Atlas of Neuroactive substances and their receptors in the rat*, Oxford Press, 1998, pp.42-53

Tork, I., Raphe nuclei and serotonin containing systems. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, Academic Press Australia, 1985, pp. 43-78.

Ugrumov, M.V., Taxi, J., Mitskevich, M.S. and Tramu, G., Development of the hypothalamic serotonergic system during ontogenesis in rats. Immunocytochemical and radioautographic study, *Brain Res*, 395 (1986)

75-84.

Vaccari, A., Brotman, S., Cimino, J. and Timiras, P.S., Sex differentiation of neurotransmitter enzymes in central and peripheral nervous systems, *Brain Res*, 132 (1977) 176-85.

Wallace AJ, Lauder MJ. Development of the serotonergic system in rat and chick embryos. In: A.Bjorklund., T.Hokfelt., M.Tohyama., editors. *Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS, Handbook of Chemical Neuroanatomy: Elsevier*. (1992). pp. 619-645.

Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. and Bader, M., Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform, *Science*, 299 (2003) 76.

Watts, A.G. and Stanley, H.F., Indoleamines in the hypothalamus and area of the midbrain raphe nuclei of male and female rats throughout postnatal development, *Neuroendocrinology*, 38 (1984) 461-6.

Weissman, M.M. and Olfson, M., Depression in women: implications for health care research, *Science*, 269 (1995) 799-801.

Wiegand, S.J. and Terasawa, E., Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat, *Neuroendocrinology*, 34 (1982) 395-404.

Yamada, S., Noguchi, D., Ito, H. and Yamanouchi, K., Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor alpha-immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain, *Neurosci Lett*, 463 (2009) 135-9.

Yamanouchi, K., Brain mechanisms inhibiting the expression of heterotypical sexual behavior in rats. In K.-I. Maeda, Tsukamura, H., and Yokoyama, A. (Ed.), *Neural Control of Reproduction-Physiology and Behavior*, Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, (1997), pp. 219-235.

山内兄人, 脳の構造の性差と性分化(2006) 山内兄人.,新井康允 編, 脳の性分化, 裳華房

Yamanouchi, K., Nakano, Y., Fukuda, M. and Arai, Y., Mesencephalic central gray as supraspinal neural substrates for lordosis reflex: deprivation of serotonergic influence by p-chlorophenylalanine., *Zoolog Sci*, 1 (1984) 126-31.

Yurino, H., Tsukahara, S., Koranyi, L. and Yamanouchi, K., Inhibitory effect of postpartum lesions or cuts in median raphe nucleus on maternal behavior in female rats, *Zoolog Sci*, 18 (2001) 1225-30.

Zemlan, F.P., Ward, I.L., Crowley, W.R. and Margules, D.L., Activation of lordotic responding in female rats by suppression of serotonergic activity, *Science*, 179 (1973) 1010-1.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、尊敬する多くの方々から数限りないご支援とご指導を賜りました。主査を務めてくださった早稲田大学人間科学学術院教授の山内兄人先生に深く御礼申し上げます。また副査を務めてくださった早稲田大学人間科学学術院の榊原伸一先生と千葉卓哉先生、東京医療学院大学 佐久間康夫先生に衷心より御礼申し上げます。また、現在指導を賜っている信州大学 森泉哲次先生に尊敬と感謝の念を申し上げます。

実験、研究の過程では神経内分泌研究室のメンバーとして、真理追求のために多くの時間を過ごすことができたことをうれしく思います。実験を共同して行い、助けていただいた古波蔵大祐さん、下川雄二さんをはじめ皆様に心より御礼申し上げます。

国立大学法人信州大学、独立行政法人科学技術振興機構の関係各位に、研究活動のご理解をいただき学位論文作成を進めることができました。ここに記して深く感謝の意を表します。

研究業績

《学位論文》

1. 中脳縫線核セロトニン神経系の発達と性差 早稲田大学大学院
人間科学研究科 修士論文 2010

《原著論文》

1. Shunji Yamada, Daisuke Noguchi, Hiroyuki Ito, Korehito Yamanouchi; Sex and regional differences in decrease of estrogen receptor α -immunoreactive cells by estrogen in rat hypothalamus and midbrain, *Neuroscience Letters*, 463 (2) 2, 135-139. 2009
2. Hiroyuki Ito, Korehito Yamanouchi; Sex and regional differences in decrease of serotonin-immunoreactive cells by parachlorophenylalanine in rat raphe nuclei. *Neuroscience Research*, 67 (1), 33-39. 2010
3. Hiroyuki Ito, Tetsuji Moriizumi, Yuji Shimogawa, Korehito Yamanouchi; Postnatal changes in the number of serotonin-immunoreactive cells in midbrain raphe nuclei of male rats. *Anatomical Science International*, 89 (4), 199–206. 2013
4. Hiroyuki Ito, Yuji Shimogawa, Daisuke Kohagura, Tetsuji Moriizumi, Korehito Yamanouchi; Inhibitory role of the serotonergic system on estrogen receptor α expression in the female rat hypothalamus, *Neuroscience Letters*, 583, 194-198. 2014

《国際学会》

1. Hiroyuki Ito, Shunji Yamada, Daisuke Noguchi, Korehito Yamanouchi; Sex and regional differences in number of estrogen receptor α immunoreactive cells in the rat brain, 12th annual meeting of Society for Behavioral Neuroendocrinology, Groningen University, The Netherlands, Supple.-P2-51, July 2008

2. Hiroyuki Ito, Korehito Yamanouchi; Sex difference of p-chlorophenylalanine-sensitivity in serotonin-immunoreactive cells in rat raphe nuclei, 16th International Congress of Comparative Endocrinology, Hong Kong University, Hong Kong, China, Supple. -P-49, June 2009
3. Hiroyuki Ito, Yuji Shimogawa, Korehito Yamanouchi; Effects of serotonin-synthesis inhibitor, parachlorophenylalanine, on number of estrogen receptor α immunoreactive cells in gonadectomized female and male rats, The 7th International Congress of Neuroendocrinology, Rouen University, France. Supple. -P1-45, July 2010

《国内学会》

1. 伊藤広幸, 野口大輔, 山田俊児, 山内兄人; ラット脳におけるエストロゲン α 受容体免疫陽性細胞数の部位差と雌雄差, 第 78 回日本動物学会大会, 弘前大学, 2007 年 9 月
2. 伊藤広幸, 山内兄人; 雄ラット中脳縫線核におけるセロトニン免疫陽性細胞数の出生後変化, 第 79 回日本動物学会大会, 福岡大学, 2008 年 9 月
3. 伊藤広幸, 山内兄人; セロトニン合成阻害剤投与ラットにおける縫線核セロトニン免疫陽性細胞数の性差, 第 80 回日本動物学会大会, 静岡グランシップ, 2009 年 9 月
4. 伊藤広幸, 山内兄人; 縫線核セロトニン免疫陽性細胞数に対する p-chlorophenylalanine 投与効果の性差, 第 32 回日本神経科学学会大会, 名古屋国際会議場, 2009 年 9 月
5. 伊藤広幸, 下川 雄二, 古波蔵 大祐, 山内 兄人; 雌ラット脳内エストロゲン受容体 α 発現に対するセロトニン神経系の役割, 第 85 回日本動物学会大会, 東北大学, 2014 年 9 月