

学位論文

性ホルモン分泌障害が成長期マウスの記憶・学習能力
に及ぼす影響

学位申請者 石川 絵海

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

展開医科学専攻

顎口腔頸部医科学講座 歯科矯正学分野

主指導教員： 香西 克之 教授

2013 年

目 次

緒言	1
試料ならびに方法	
Ⅰ．性ホルモン分泌障害が記憶・学習能力の変化についての検討	5
1．実験動物	5
2．8方向放射迷路を用いた作業記憶の検討	6
Ⅱ．性ホルモン分泌障害による海馬の神経病理学的変化についての検討	8
1．海馬錐体細胞の形態計測学的検討	8
2．ChAT 免疫組織化学染色および陽性細胞数の検討	11
3．CCK-4 免疫組織化学染色および陽性細胞数の検討	12
Ⅲ．性ホルモン分泌障害による血清中チロキシン濃度の変化についての検討	13
結果	
Ⅰ．性ホルモン分泌障害による記憶・学習能力の変化	
1．実験期間中の体重変化	15
2．習得訓練の実施回数	16
3．作業記憶の変化	16
Ⅱ．性ホルモン分泌障害による海馬の神経病理学的変化	20
1．海馬錐体細胞の組織学的変化	20
2．海馬錐体細胞数の変化	23
3．ChAT 免疫組織化学染色像および陽性細胞数の変化	25
4．CCK-4 免疫組織化学染色像および陽性細胞数の変化	29
考察	
Ⅰ．実験方法と装置について	
1．性腺摘出術について	33
2．実験期間中の体重変化について	34
3．8方向放射状迷路について	35
Ⅱ．実験結果について	
1．学習試験結果について	36
2．性ホルモンの分泌障害による海馬の神経病理学的変化について	38

3. 性ホルモン分泌障害によるチロキシン濃度の変化について	41
総括	44
謝辞	47
参考文献	48

緒 言

性ホルモンは、主として生殖線から分泌され、生殖系の成長発達を誘発および促進させることにより、性行動などの生殖機能を調整するステロイドホルモンの総称である。また、その働きは生殖機能の調節ばかりでなく、心血管系、中枢神経系において、正常細胞の増殖や分化などに関与する遺伝子発現を調節しており、それらの器官の成長発育にも重要な役割を果たしていることが知られている (Mendelsohn and Karas, 1999, Lorenzo 2003, Wang *et al.*, 2004, 松脇ら, 2007)。Kannel らは、40 歳代前半から 50 歳代前半の女性において、閉経により心血管系疾患の発生率が明らかに高くなることを示した (Kannel *et al.*, 1976)。また、更年期に入り、血中女性ホルモンが大きく減少すると、骨吸収が促進され、更年期骨粗鬆症が発症すると報告されている (Eriksen *et al.*, 1988, 米田, 2002)。さらに、男子性腺機能低下症では、男性ホルモン低下により骨吸収亢進、骨形成抑制をきたし、骨量の減少を惹起することが示されている (名和田ら, 1995)。

性ホルモンは、主に男性ホルモンと女性ホルモンに分けられ、男性では精巣からテストステロンが、女性では卵巣からエストラジオール (以下、 E_2) が分泌される (Guyton and Hall, 2005)。テストステロンは、精巣や副腎皮質で合成された後に血流を通して標的細胞に運ばれ、細胞内で 5α -リアクターゼによってジヒドロテストステロン (以下、DHT) に変換される。DHT は、テストステロンよりも生理活性が高く、細胞質や核内のアンドロゲンレセプター (以下、AR) に結合してその活性を発揮する (Gentile *et al.*, 2010)。また、一部のテストステロンは、アロマターゼによって E_2 に変換される (Banks *et al.*, 1991)。卵巣で合成された E_2 も標的細胞内の核内に存在するエストロゲンレセプター

(以下、ER) に結合し、標的遺伝子の転写を活性化することによってそのシグナルが伝達される。その後、各種レセプターや成長因子など、細胞の機能を調節する数多くのタンパク質が作られる (図1)。

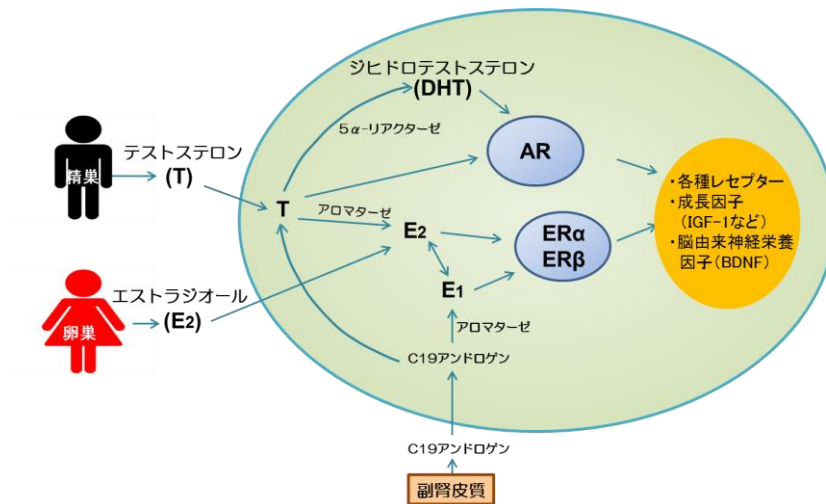


図1 性ホルモン代謝

これまでに、性ホルモンが老齢期の中枢神経系に及ぼす影響については、いくつか報告がなされている。Manly らは、高齢女性におけるアルツハイマー病型認知症患者の血中エストラジオール濃度が有意に低いことを (Manly *et al.*, 2000)、Tang らは女性に女性ホルモン補充療法を行うことにより、アルツハイマー病などの認知症発症率が減少すること、発症年齢が延期することをそれぞれ報告した (Tang *et al.*, 1996)。

アルツハイマー病は、脳神経細胞が消失することにより認知症を呈する進行性の神経変性疾患であり、70歳前後の女性に多いと言われている (Jorm *et al.*, 1987)。発症原因は未だ明確にはされていないが、いくつかの説が挙げられている。一つは、神経伝達物質の異常に起因するという説である。アルツハイマー

病患者や記憶障害患者の体内では、様々な神経伝達物質の減少が見られる (Bowen *et al.*, 1976, Perry *et al.*, 1977)。神経伝達物質には、アセチルコリン、ドーパミン、グルタミン酸、ノルアドレナリン、セロトニンが挙げられるが、記憶・学習能力の形成に関わるアセチルコリンの減少については多くの報告がなされている (村上ら, 2002, Miyamoto *et al.*, 1987, Hasselmo and Sarter, 2011, Perry *et al.*, 1999)。もう一つは、閉経期以降の急激なエストロゲン産生量の低下に起因するとした説である (Manly *et al.*, 2000, LeBlanc *et al.*, 2001)。実際に、48 週齢時に卵巣を摘出したラットにおいては学習能力が低下するものの、60 週齢まで女性ホルモンを投与することによって、その間の運動感覚や学習行動が改善されたとの報告がある (Zhao *et al.*, 2008)。また、アルツハイマー病を発症した閉経女性において、エストロゲンを 6~8 週間投与することにより、言語記憶、意味記憶、視覚記憶などのテストにおいて有意な改善が認められたとの報告もある (Asthana *et al.*, 2001, Ohkura *et al.*, 1994)。

一方、男性においてもアルツハイマー病患者の血中テストステロン濃度が、対照群と比較し有意に低いと報告されており (Moffat *et al.*, 2004)、加齢に伴うテストステロン産生量の低下がアルツハイマー病の発症に関与していることが示唆された (Hogervorst *et al.*, 2001)。実際に、雄性マウスに精巣摘出術を施すことによって男性ホルモン産生量を減少させると、脳内のアミロイド β (以下、 $A\beta$) 量が増加し、その後、男性ホルモンを投与すると、 $A\beta$ の増加は抑制されたとの報告もある (Park *et al.*, 2010)。また、ヒトにおいても前立腺癌の治療のために男性ホルモンの血中濃度を低下させることによって、血中の $A\beta$ 量は増加し (Gandy *et al.*, 2001)、記憶障害や認知症の発症率が高まると報告されている (Gillett *et al.*, 2003)。

以上のことより、女性のみならず男性においても、高齢期における性ホルモ

ン分泌量の低下が、さまざまな認知症を惹起している可能性が考えられる。しかしながら、性ホルモンの分泌障害により中枢神経系の機能低下が惹起される機序については未だ明らかにされていない。また、胎生期においても性ホルモンが性分化に関与しているとの報告もあるが (Arnold *et al.*, 1984)、出生直後から成長期にかけて、性ホルモンが脳の成長発育に対してどのような影響を及ぼしているかについては、未だ明らかにされていない。さらに、性ホルモン分泌障害と記憶・学習能力の関連性については、胎生期ラットへのエストロゲン投与実験により、中枢からの集合電位や興奮性シナプス後電位の増加が報告されている (Yokosuka *et al.*, 2008) が、出生直後からの性ホルモン分泌障害が記憶・学習能力に及ぼす影響とその機序は未だ明らかにされていない。

本研究では、出生直後性腺摘出術を施した、性ホルモン分泌障害モデルマウスを用いて、性ホルモン分泌障害が成長期の記憶・学習能力に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

試料ならびに方法

I. 性ホルモン分泌障害による記憶・学習能力の変化についての検討

1. 実験動物

実験には、C57BL/6J マウス 96 匹 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) を用いた。生後 5 日齢時に偽手術を施したものを対照群 (雄性 12 匹、雌性 12 匹)、性腺摘出術を施したものを実験群 (雄性 36 匹、雌性 36 匹) とした (図 2)。

ジエチルエーテル (ナカライテスク, 京都) による吸入麻酔下で、対照群には偽手術を、実験群には精巣摘出術 (以下、ORX) および卵巢摘出術 (以下、OVX) を行った。また、実験群 72 匹のうち雄性 24 匹、雌性 24 匹の計 48 匹のマウスに対して、生後 16 週齢時より DHT および E₂ 投与を行った。DHT (50pg/day) (Fluka, Milwaukee, WI, USA) あるいは E₂ (25pg/day) (ナカライテスク) を 5% ベンジルアルコール (片山化学工業, 大阪)、およびコーンオイル (Sigma Aldrich, 東京) により溶解、希釈したカプセルをジエチルエーテル (ナカライテスク) による吸入麻酔下にて背部皮下に埋入することによって投与した。

すべてのマウスを、生後 20 日目に離乳させ、その後はマウス飼育繁殖用固形飼料 (CE-2, 日本クレア, 東京) を用いて飼育した。水および飼料は十分かつ自由に摂取できるように調整した。また、動物飼育室では蛍光灯による人工照明を行い、点灯を 8 時、消灯を 20 時とした。

なお、本研究は、広島大学動物実験委員会審査会にて承認 (A06-190) を得た上で実施された。

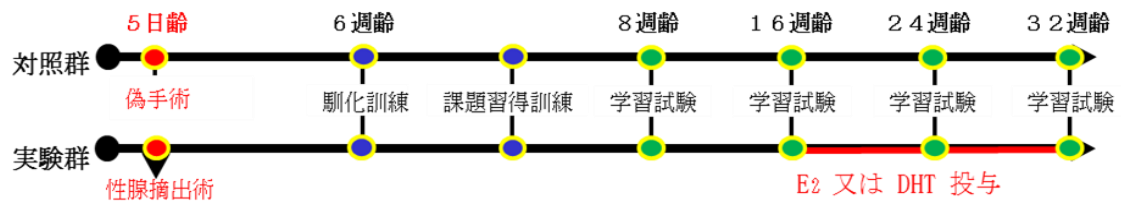


図 2：タイムスケジュール



図 3：8 方向放射状迷路

2. 8 方向放射状迷路を用いた作業記憶の検討

1) 実験装置

本実験で使用した 8 方向放射状迷路では、床からの高さ 10cm、アームの長さ 35cm、アームの幅 10cm、中央のプラットフォームの直径 32cm にそれぞれ設置されている。また、各アームの先端には報酬ペレット (50mg) を置くための器が設置されている (図 3)。

実験中のマウスの行動は、装置上方に設置された CCD カメラ（WAT-241, ワテック, 山形）にて撮影し、実験中の行動をコンピューター上で確認するとともに、専用ソフトにより分析した（Radial Maze, Bioserve Inc., Rostock, Mecklenburg-Vorpommern, Germany）。また、実験期間を通して装置を同じ場所に固定し、三角形、長方形、円形の目印を装置周囲の同一箇所に配置した。

2) 評価方法

実験装置や環境に馴れるために、6 週齢時より馴化訓練を 2 日間行った。1 日目には、複数のマウスを迷路内に入れ、すべてのアームに報酬ペレットを置いて、摂食確認を行った。2 日目には、迷路内に 1 匹ずつマウスを入れ、再び摂食確認を行った。2 日間の馴化訓練終了後、課題習得訓練を開始した。

作業記憶の検討では、すべてのアームの先端に置かれた報酬ペレットをマウスが自由に採ることができるよう設定した。1 試行は、① 5 分以内に 8 アームの先端の餌をすべて取り終えるまで、あるいは② 5 分経過するまでとした。5 分以内に 8 選択中 6 個以上のペレットを獲得できた試行が 3 日間連続した時点で、課題を習得したと見なした。

その後、ヒトの幼少期、学童期、思春期に相当する 8、16、24、32 週齢の計 4 時点において、学習試験を行った（図 2）。実験は午後 8 時から 10 時までの間に実施し、学習試験開始前 3 日間に限り食餌制限（通常量の約 80～90%）を設けた。また、作業記憶を評価するために、以下に記す 5 項目について検討を行った（表 1）。なお、有意差検定には Student - t 検定を用い、危険率 5 %未満を有意差ありと判定した。

表 1：検討項目

・習得訓練実施回数	：課題習得までの平均試行回数
・平均所要時間	：1 試行終了までに要した時間の平均（最大 5 分）
・学習試験達成率	：1 試行を 5 分以内に達成できた割合
・平均誤選択数	：一度餌を取り終えたアームに再び入った回数
・平均全選択数	：正選択数＋誤選択数

II. 性ホルモン分泌障害による海馬の神経病理学的変化についての検討

1. 海馬錐体細胞の形態計測学的検討

1) 実験動物

実験には、C57BL/6J マウス 200 匹 (Jackson Laboratory)を用いた。生後 5 日齢時に偽手術を施したものを対照群 (雄性 28 匹、雌性 28 匹)、性腺摘出を施したものを ORX 群 (雄性 24 匹)、OVX 群 (雌性 24 匹)、性腺摘出後に性ホルモン投与を行ったものを ORX+DHT (雄性 24 匹)、ORX+E₂ (雄性 24 匹)、OVX+DHT (雌性 24 匹)、OVX+E₂ (雌性 24 匹) とした。

2) 組織標本の作製

ペントバルビタール (ソムノペンチル, 共立製薬, 東京) による深麻酔下にて、4%パラホルムアルデヒド (pH 7.4) (片山化学工業、大阪) による灌流固定を行った。その後、大脳を摘出し、通法に従いパラフィン包埋した後、ロータリーミクロトーム (HM315, MICROM Lab., Walldorf, Land Baden-Württemberg, Germany) により、Bregma -1.46mm から -1.82mm の範囲 (図 4) に位置した厚さ 6 μ m の組織切片を抽出し (図 4)、ニッスル染色

を施した。染色に先立ち、37℃、80%アルコールによる脱ミエリン処理を行った。十分な水洗の後、クレジールバイオレット水溶液（Sigma, St. Louis, MO, USA）に20分間浸漬し、70および95%アルコールにて余剰染色液を除去した後に、脱水、封入操作を行った。その後、右側海馬CA1およびCA3領域の錐体細胞を光学顕微鏡（BH2-RFCA, オリンパス, 東京）により観察した（図5）。

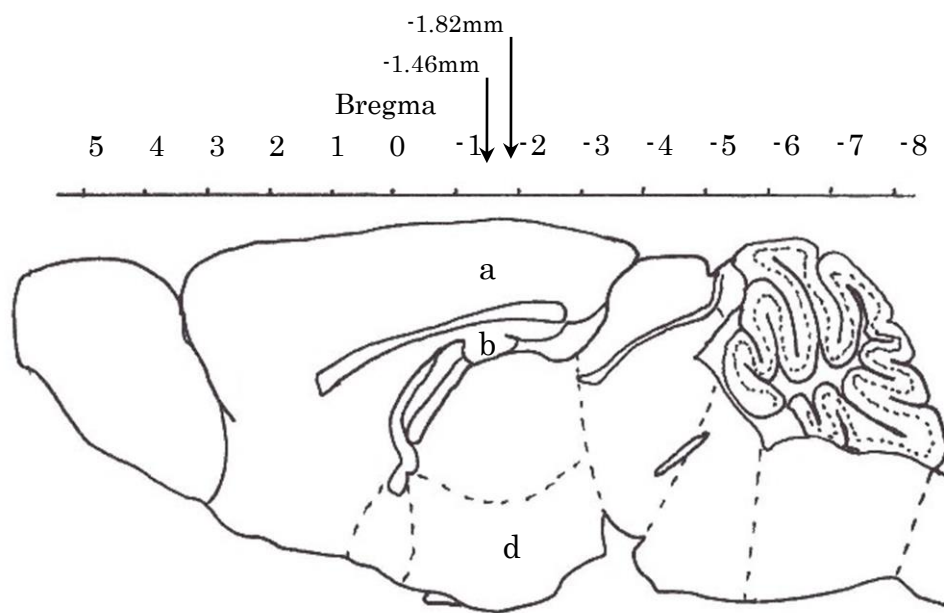


図4 : マウス脳図譜（矢状断）

a : 大脳皮質

b : 海馬

d : 視床下部

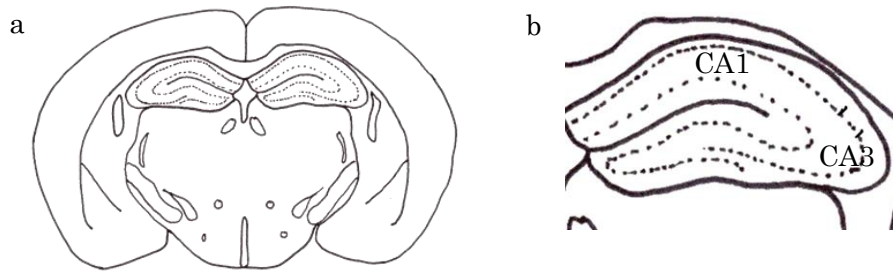


図 5 脳図譜（前頭断）

a Bregma -1.82mm

b 海馬 CA1, CA3 領域の拡大図

3) 錐体細胞数の算定

錐体細胞数については、杠の方法に準じ（杠, 1990）、組織切片 10 枚毎に抽出した各切片の右側海馬 CA1 および CA3 領域の錐体細胞数（以下、N1 および N3）を算定した。

N1、全錐体細胞数 Nt1、標本間隔 P の間には、以下の関係が成り立つ。

$$Nt1 = N1 \times P$$

本実験では 10 枚毎に算定したので $P=10$ とし、 $Nt1 = N1 \times 10$ となる。同様に、 $Nt3 = N3 \times 10$ が成立する。なお、Konigsmark は、この計算式により全錐体細胞数は約 10% の誤差で近似的に求められると報告している（Konigsmark, 1970）。

有意差検定には Student - t 検定を用い、危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

2. ChAT 免疫組織化学染色および陽性細胞数の検討

1) 実験動物

実験Ⅱ-1 で使用した、C57BL/6J マウス 200 匹 (Jackson Laboratory) を用いた。生後 5 日齢時に偽手術を施したものを対照群 (雄性 28 匹、雌性 28 匹)、性腺摘出を施したものを ORX 群 (雄性 24 匹)、OVX 群 (雌性 24 匹)、性腺摘出後に性ホルモン投与を行ったものを ORX+DHT (雄性 24 匹)、ORX+E₂ (雄性 24 匹)、OVX+DHT (雌性 24 匹)、OVX+E₂ (雌性 24 匹) とした。また、切片の抽出についても、実験Ⅱ-1 と同様に行い、コリンアセチルトランスフェラーゼ (以下、ChAT) 免疫組織化学染色を行った。

2) 組織標本の作製

通法にしたがい、脱パラフィン操作を行なった後に、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するために 0.3% H₂O₂ メタノール (片山科学工業) に 30 分間浸漬した。その後、リン酸緩衝液 PH=7.4 (以下、PBS) (三菱化学ヤトロン、東京) により十分洗浄した。次に、希釈した正常血清によるブロッキングを行い、一次抗体としてウサギ抗 Choline Acetyltransferase ポリクローナル抗体 (ab68779, Abcam, 東京) を滴下し、一晚インキュベートした。PBS (三菱化学ヤトロン) による洗浄後、ビオチン化二次抗体および ABC キット (Vectastain Elite ABC kits, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を使用し、順次反応させた。その後、3,3'-diaminobenzidine (以下、DAB) (425011, ニチレイ, 東京) による発色を行い、蒸留水で洗浄した。ヘマトキシリン (林純薬工業, 大阪) による対比染色を行い、右側海馬 CA1 および CA3 領域 (図 5) の錐体細胞を光学顕微鏡 (BH2-RFCA, オリンパス) 下で観察するとともに、画像解析ソフト (BZ-8100, キーエンス, 大阪) を用いて ChAT 陽性細胞数の

算定を行った。

3. CCK-4 免疫組織化学染色および陽性細胞数の検討

1) 実験動物

実験Ⅱ-1 で使用した、C57BL/6J マウス 200 匹 (Jackson Laboratory) を用いた。生後 5 日齢時に偽手術を施したものを対照群 (雄性 28 匹、雌性 28 匹)、性腺摘出を施したものを ORX 群 (雄性 24 匹)、OVX 群 (雌性 24 匹)、性腺摘出後に性ホルモン投与を行ったものを ORX+DHT (雄性 24 匹)、ORX+E₂ (雄性 24 匹)、OVX+DHT (雌性 24 匹)、OVX+E₂ (雌性 24 匹) とした。また、切片の抽出についても、実験Ⅱ-1 と同様に行い、CCK-4 免疫組織化学染色を行った。

2) 組織標本の作製

通法にしたがい、脱パラフィン操作を行った後に、内因性ペルオキシダーゼ活性を除去するため、0.3% H₂O₂ メタノール (片山科学工業) に 30 分間浸漬した。その後、PBS (三菱化学ヤトロン) により十分洗浄した。次に、希釈した正常血清によるブロッキングを行い、一次抗体として抗 CCK-4 ウサギポリクローナル抗体 (ab62074, Abcam) を滴下し、一晩インキュベートした。PBS (三菱化学ヤトロン) による洗浄の後、ビオチン化二次抗体および ABC キット (Vectastain Elite ABC kits, Vector Laboratories) を使用し、順次反応させた。その後、3,3'-diaminobenzidine (以下、DAB) (425011, ニチレイ) による発色を行い、蒸留水で洗浄した。ヘマトキシリン (林純薬工業) による対比染色を行い、右側海馬 CA1 および CA2 領域の分子層および放射状層の CCK-4 陽性細胞数を、光学顕微鏡 (BH2-RFCA, オリンパス) 下で観察するとともに、画像解析ソフト (BZ-8100, キーエンス) を用いて、CCK-4 陽性細胞数の算定を行った (図 6)。

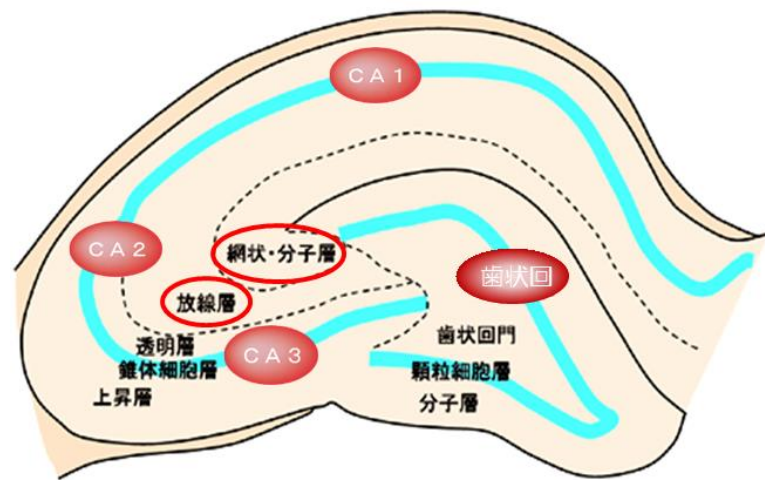


図 6 海馬領域拡大図

Ⅲ. 性ホルモン分泌障害による血清中チロキシン濃度の変化についての検討

1. 実験動物

実験Ⅱ-1 で使用した、C57BL/6J マウス 200 匹のうちの 96 匹 (Jackson Laboratory) を用いた。生後 5 日齢時に偽手術を施したものを対照群 (雄性 12 匹、雌性 12 匹)、性腺摘出を施したものを ORX 群 (雄性 12 匹)、OVX 群 (雌性 12 匹)、性腺摘出後に性ホルモン投与を行ったものを ORX+DHT (雄性 12 匹)、ORX+E₂ (雄性 12 匹)、OVX+DHT (雌性 12 匹)、OVX+E₂ (雌性 12 匹) とした。

2. ELISA 法

8、16、24、32 週齢時に、ジエチルエーテル (ナカライテスク) による吸入麻酔下にてマウス尾部を切断し、外側尾静脈から血液を採取した。これを、血清分離剤 Optiprep (コスモバイオ, 東京) と混合し、20℃、1000g、30 分間遠心分離することにより、血清を採取した。MOUSE/RAT/ THYROXINE (T4) ELISA Kit (コスモバイオ) を使用し、マイクロプレートウェルのフォーマット

にスタンダード試薬ならびに血清をそれぞれ滴下し、T4-enzyme 溶液を加え、60 分間インキュベートした。その後、TMB Substrate (コスモバイオ, CA., USA) で発色させ、15 分後に反応停止液を加えた。15 分以内に ELISA reader (VERSAmax, Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA) を用いて、450nm にて吸光度測定を行った。

結果

I. 性ホルモン分泌障害による記憶・学習能力の変化

1. 実験期間中の体重変化

雌雄両性ともに、24 および 32 週齢時に、対照群と比較して ORX および OVX 群が有意に大きい値を示した。また、実験期間を通して、雌雄両性で、E₂ および DHT 投与群は、対照群との間に有意差を示さなかった（図 8）。

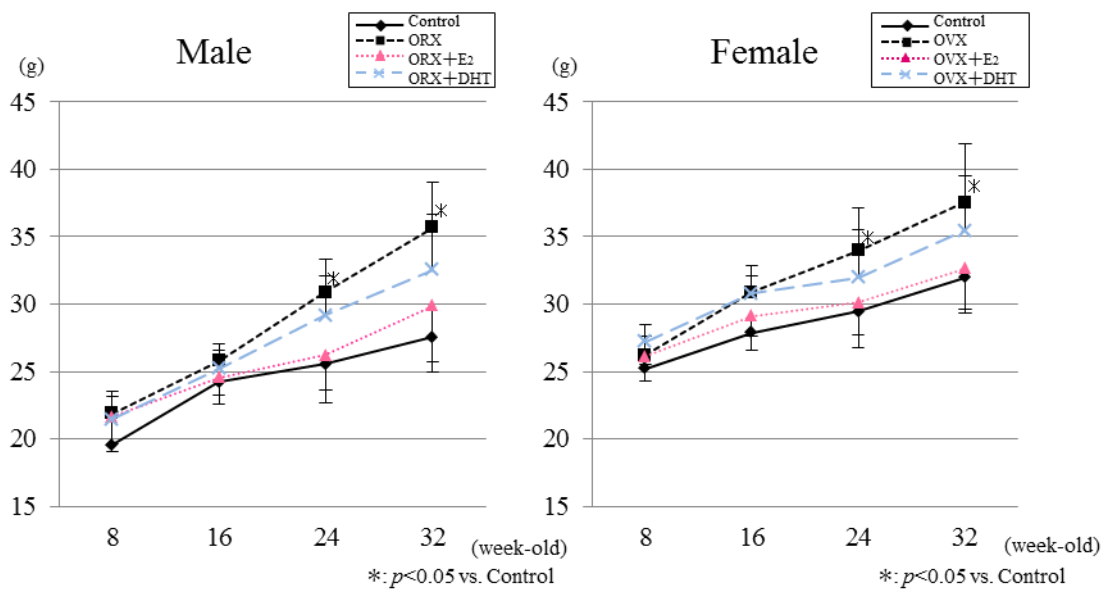


図 8：実験期間中の体重変化

2. 習得訓練の実施回数

学習試験前に実施した課題習得訓練の実施回数については、雌雄両性ともに、両群間で有意差を認めなかった。その平均は、雄性対照群で 4.4 回、実験群で 4.5 回、雌性対照群で 4.1 回、実験群で 4.4 回であった。このことより、学習試験前の両群のマウスに、学習能力の差がないことが明らかとなった（図 9）。

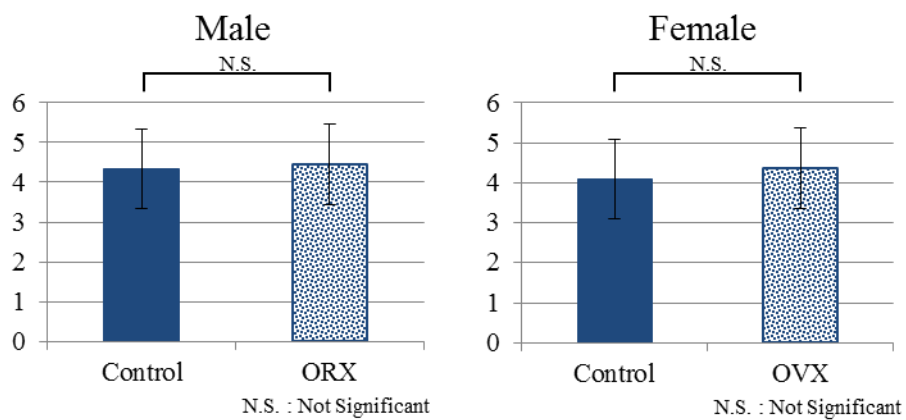


図 9：課題習得訓練の実施回数

3. 作業記憶の変化

1) 平均所要時間

対照群では、雌雄両性ともに 1 試行あたり約 150 秒の時間を要した。また、実験期間を通して、ORX および OVX 群は、対照群と比較して有意に長い時間を要した。しかしながら、32 週齢時において、それ以前に認められていた ORX+E₂ および OVX+E₂ 群と対照群との間の有意差が消失した(図 10)。

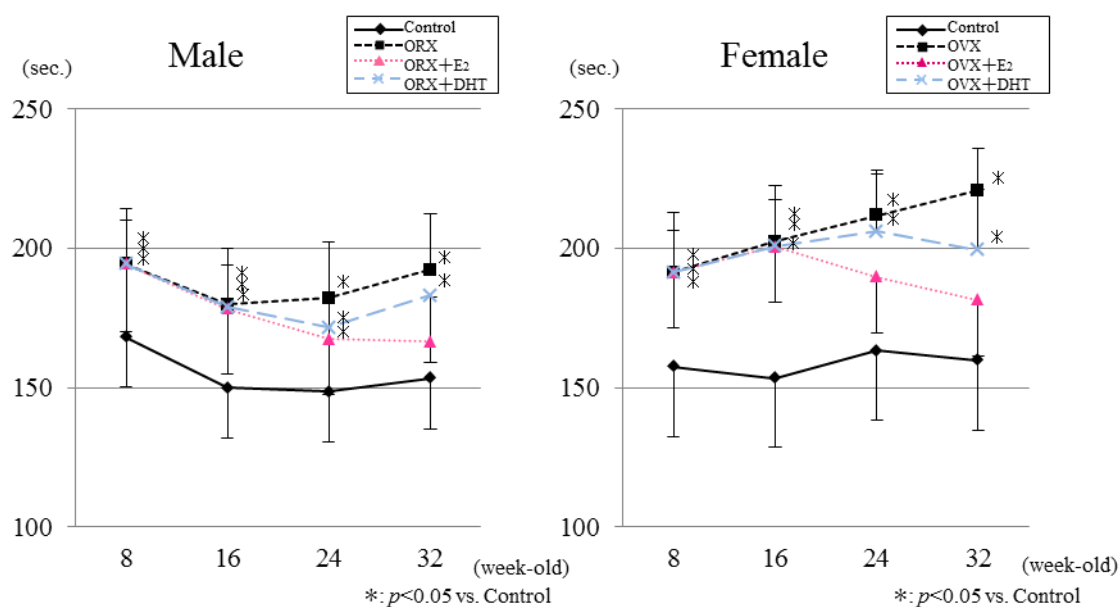


図 10：平均所要時間

2) 学習試験達成率

雄性では、実験期間を通してすべての群で有意差が認められなかった。一方、雌性では、対照群と比較して、24 週齢時に OVX 群が、32 週齢時に OVX および OVX+DHT 群が有意に低い値を示した（図 11）。

	8w	16w	24w	32w
Cont. Male	98.3	100.0	98.3	100.0
ORX	96.6	95.0	95.0	95.0
ORX+E ₂	96.6	95.0	96.6	96.6
ORX+DHT	96.6	95.0	96.6	98.3

	8w	16w	24w	32w
Cont. Female	98.8	98.3	100.0	100.0
OVX	96.6	95.0	93.3 *	91.6 *
OVX+E ₂	96.6	95.0	96.6	96.6
OVX+DHT	96.6	95.0	95.0	93.3

*: $p < 0.05$ vs. Control

図 11：学習試験達成率

3) 平均誤選択数

実験期間を通して、雌雄両性のすべての実験群で、対照群と比較して有意に大きい値が認められた。しかしながら、雌雄両性において、 E_2 投与群の値が徐々に減少し、対照群に近づく傾向を示した (図 12)。

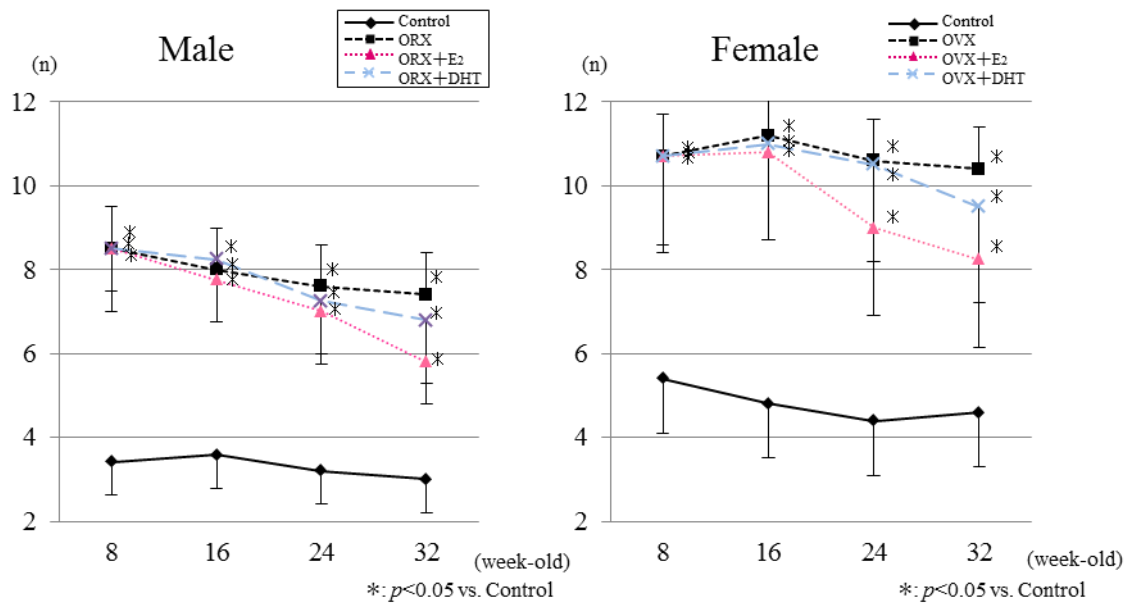


図 12 : 平均誤選択数

4) 平均全選択数

雄性では、16 週齢時までは、すべての実験群が対照群と比較して有意に大きい値を示した。しかしながら、24 週齢時の ORX+E₂ 群と、32 週齢時の ORX+E₂ および ORX+DHT 群において、対照群との間に有意差が認められなくなった (図 13)。

雌性では、雄性と同様、16 週齢時まではすべての実験群が対照群と比較して有意に大きい値を示した。しかしながら、24 および 32 週齢時では、 E_2 投与群においてのみ、対照群との間に有意差が認められなくなった (図 13)。

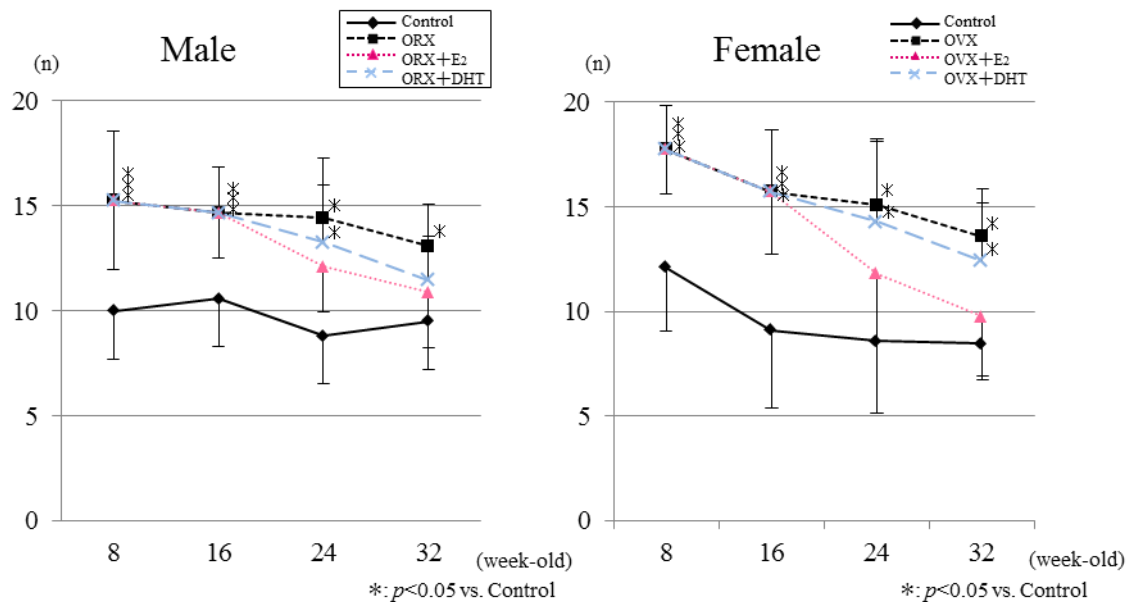


図 13：平均全選択数

Ⅱ．性ホルモン分泌障害による海馬の神経病理学的変化

1．海馬錐体細胞の組織学的変化

1) CA1 領域

雄性の CA1 領域の海馬錐体細胞は、実験期間を通して、対照群において 3～4 層で緊密に配列していた。一方、実験群では、週齢が高くなるにしたがって細胞密度が減少し、32 週齢時では特に ORX および ORX+DHT 群で細胞の空胞変性様所見が明らかとなった (図 14)。

雄性と同様に、雌性の海馬錐体細胞も、実験期間を通して、対照群では 3～4 層で緊密に配列していた。一方、実験群では、週齢が高くなるにしたがって細胞密度が低下し、32 週齢時では特に OVX および OVX+DHT 群で錐体細胞の小型化あるいは萎縮、さらに空胞変性様の変化が明らかとなった (図 15)。

Male

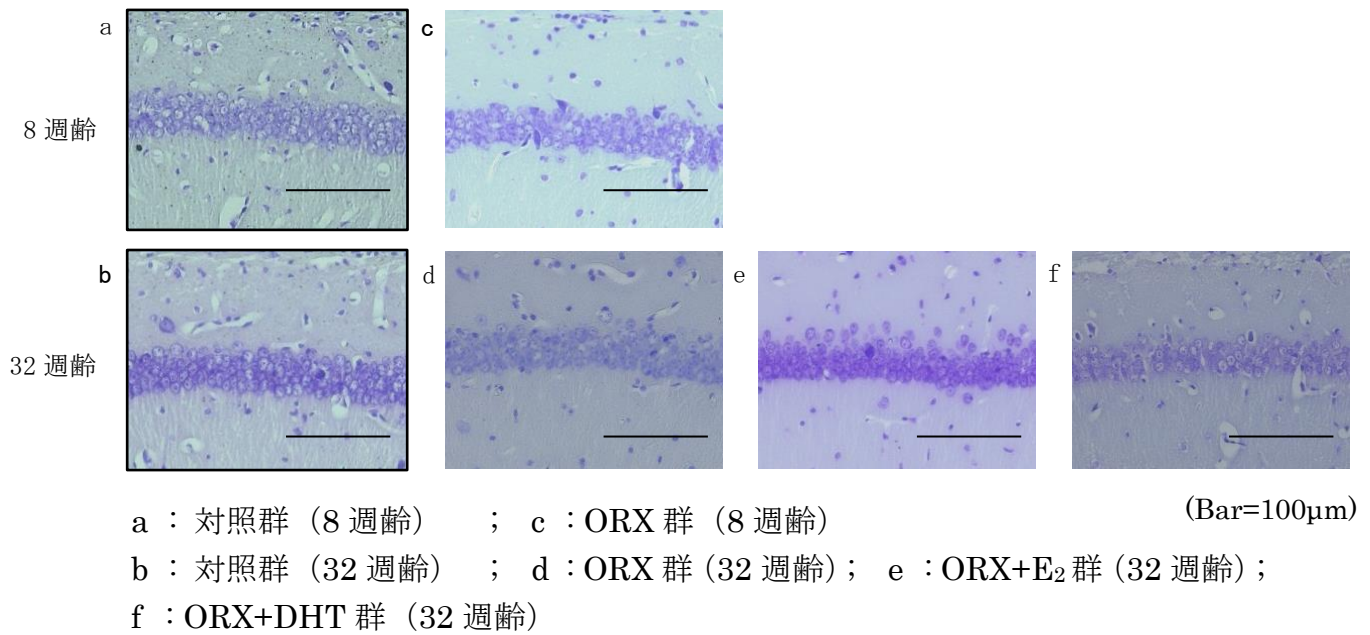


図 14：雄性マウス海馬 CA1 領域の錐体細胞 Nissl 染色像

Female

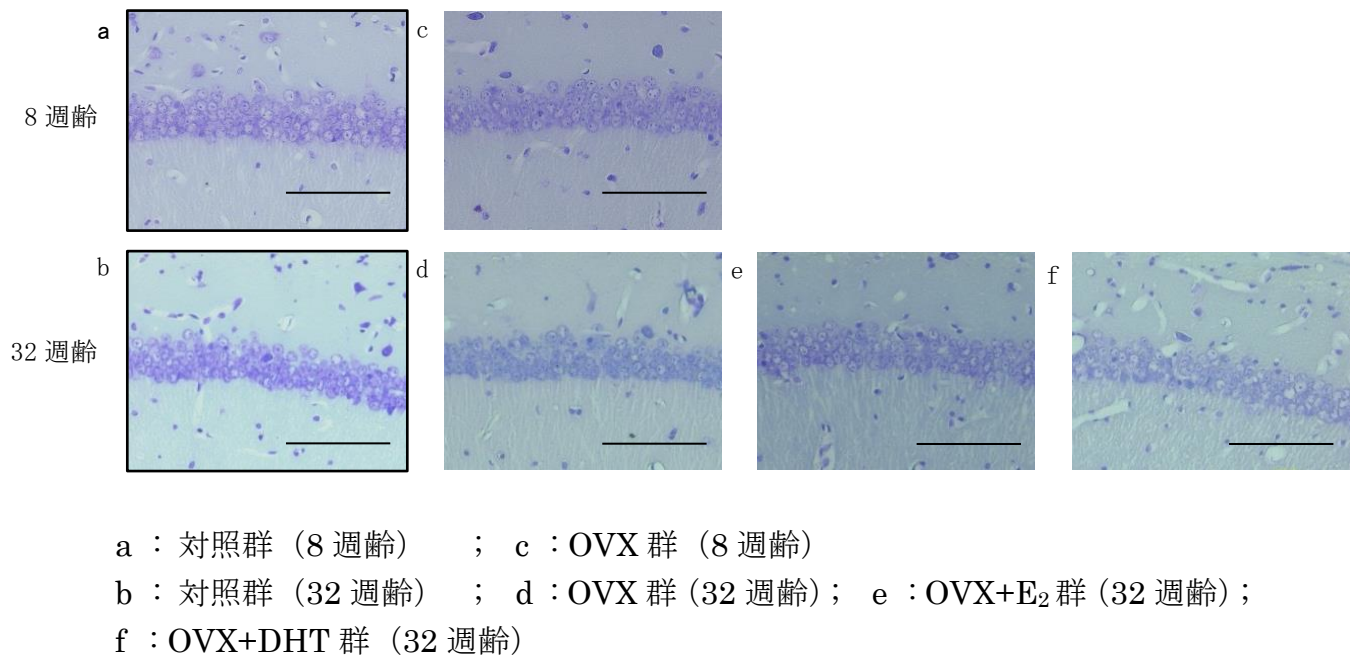


図 15：雌性マウス海馬 CA1 領域の錐体細胞 Nissl 染色像

2) CA3 領域

雄性の海馬錐体細胞については、すべての群において、週齢が高くなるにしたがって、その形態が不規則になるとともに密度が減少した。実験群においては、32 週齢時で細胞の小型化あるいは萎縮、さらに空胞変性様所見が特に顕著に認められた。さらに、ORX 群においては細胞層の厚径も減少していた(図 16)。

雌性についても雄性と同様、すべての群において、週齢が高くなるにしたがって、個々の細胞形態が不規則になり、細胞密度が減少した。OVX 群では 8 週齢時から、錐体細胞の小型化あるいは萎縮、空胞変性様変化が認められた。32 週齢時では、OVX および OVX+DHT 群でその傾向が顕著となった。しかしながら、OVX+E₂ 群では、細胞密度は減少しているものの、32 週齢時においても正常な細胞形態が維持されているものが多かった (図 17)。

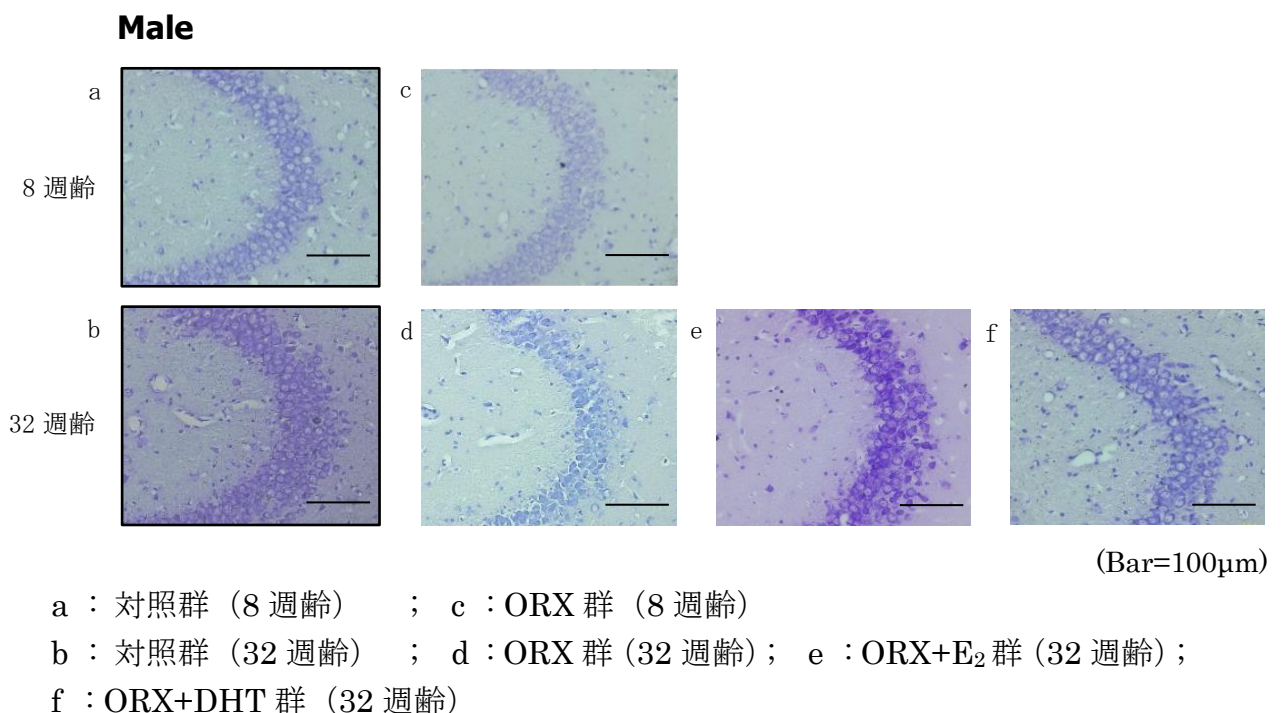


図 16 : 雄性マウス海馬 CA3 領域の錐体細胞 Nissl 染色像

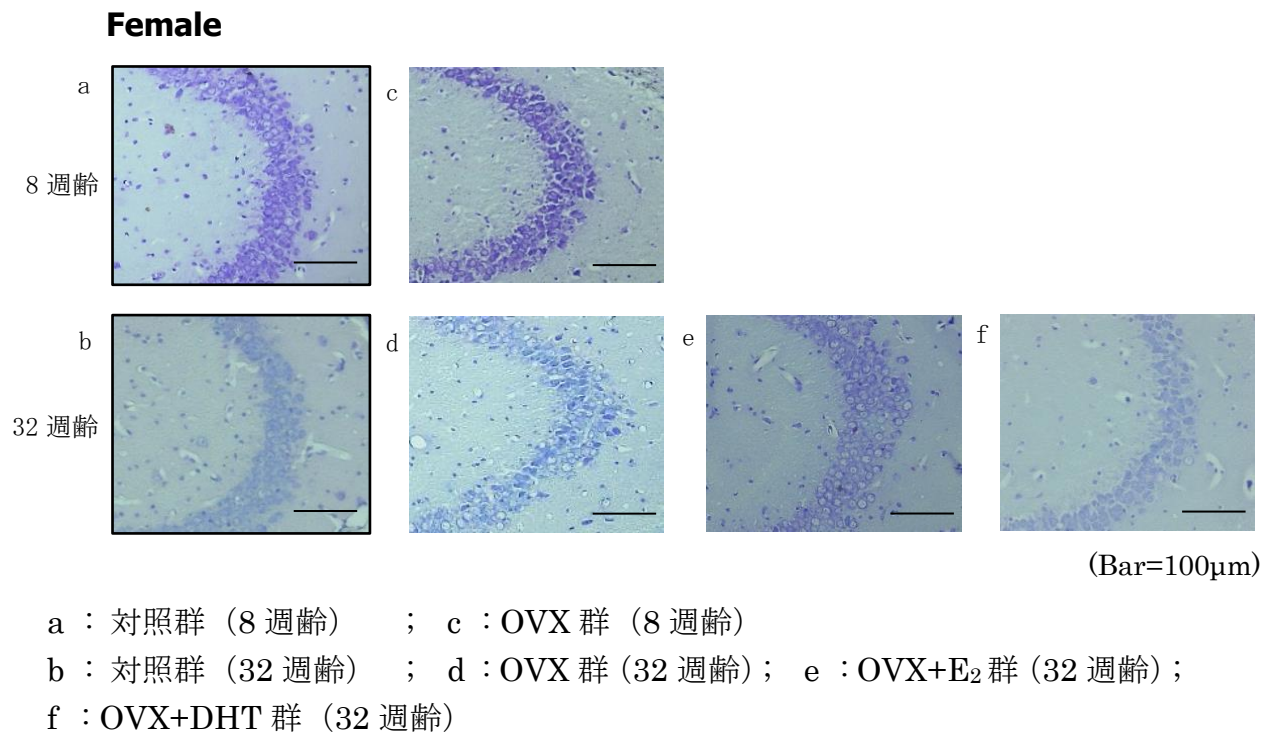


図 17：雌性マウス海馬 CA3 領域の錐体細胞 Nissl 染色像

2. 海馬錐体細胞数の変化

1) CA1 領域

対照群の錐体細胞数は、雌雄両性において、実験期間を通してほぼ一定の値を示した。実験群では、対照群と比較してやや少ない傾向を示し、その傾向は雌性でより顕著であった。しかしながら、実験期間を通して全群間で有意差は認められなかった(図 18)。

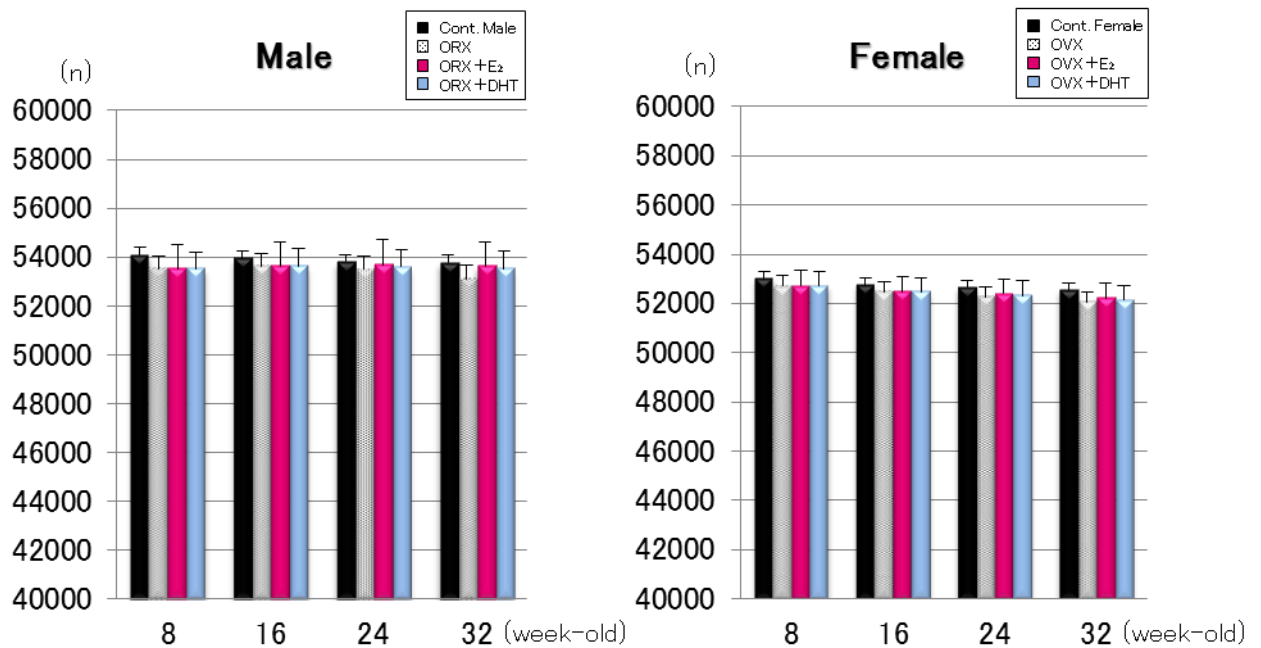


図 18：海馬 CA1 領域の錐体細胞数

2) CA3 領域

雄性の対照群では、週齢が高くなるにしたがって錐体細胞数が減少する傾向を示した。また、実験群においても週齢が高くなるにしたがって減少傾向を認め、特に ORX 群においてその傾向は強かった。さらに、24 および 32 週齢時においては、ORX 群と比較して ORX+E₂ および ORX+DHT 群は有意に高い値を示し、32 週齢時の ORX+DHT 群では、対照群との間に有意差が認められなくなった (図 19)。

雄性と同様、雌性においても、特に OVX および OVX+DHT 群において、週齢の増加とともに細胞数は減少した。また、24 および 32 週齢時においては、OVX 群と比較して OVX+E₂ 群が有意に高い値を示し、32 週齢時の OVX+E₂ 群では対照群との間に有意差が認められなくなった (図 19)。

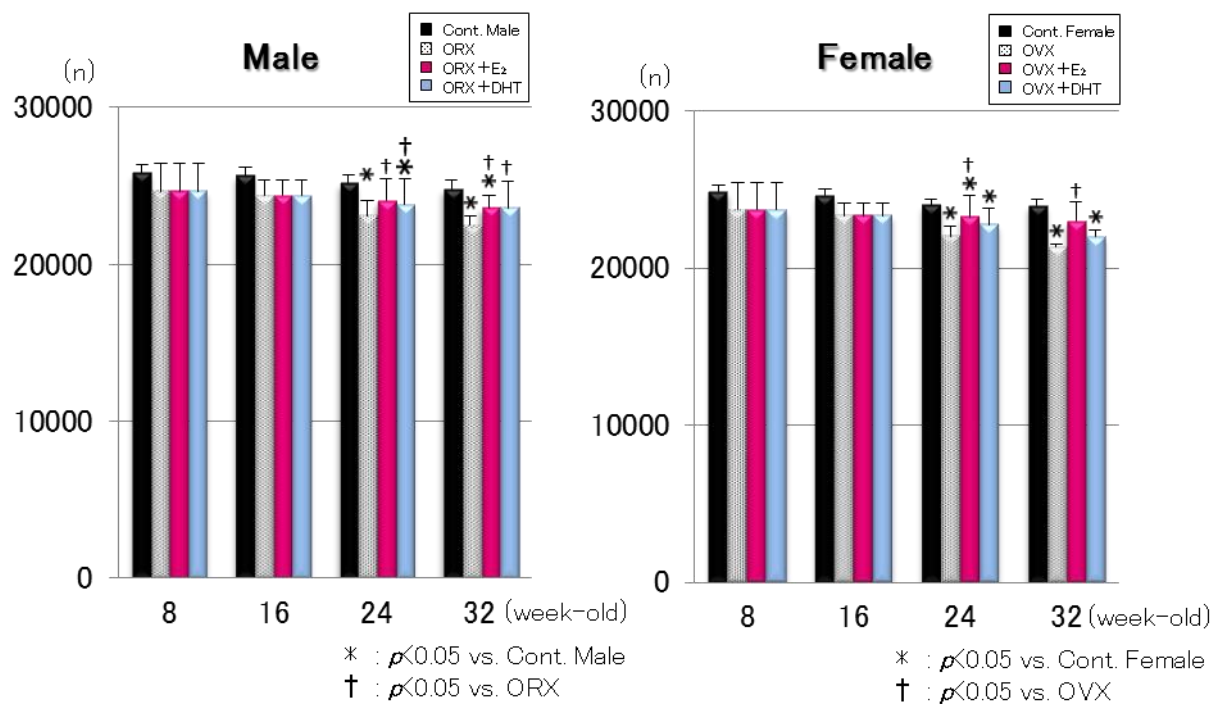


図 19 : 海馬 CA3 領域の錐体細胞数

3. ChAT 免疫組織化学染色像および陽性細胞数の変化

1) CA1 領域

雌雄両性の ChAT 陽性細胞は、細胞質が茶褐色に染色され、核の萎縮が認められた。また週齢が高くなるにしたがい、細胞は小型化し、歪んだ形状を呈した。雄性の ChAT 陽性細胞数は、対照群において、実験期間を通して約 13000~14000 個程度の強発現を示した。一方、実験群では実験期間を通して約 12000~13000 個程度で、対照群と比較して有意に少ない値を示した(図 20、22)。

雌性の対照群では、実験期間を通して約 13000 個程度とほぼ一定した値が認められた。一方、実験群では約 12000 個程度と雄性と同様、対照群と比較して有意に小さい値を示した (図 21、22)。

Male

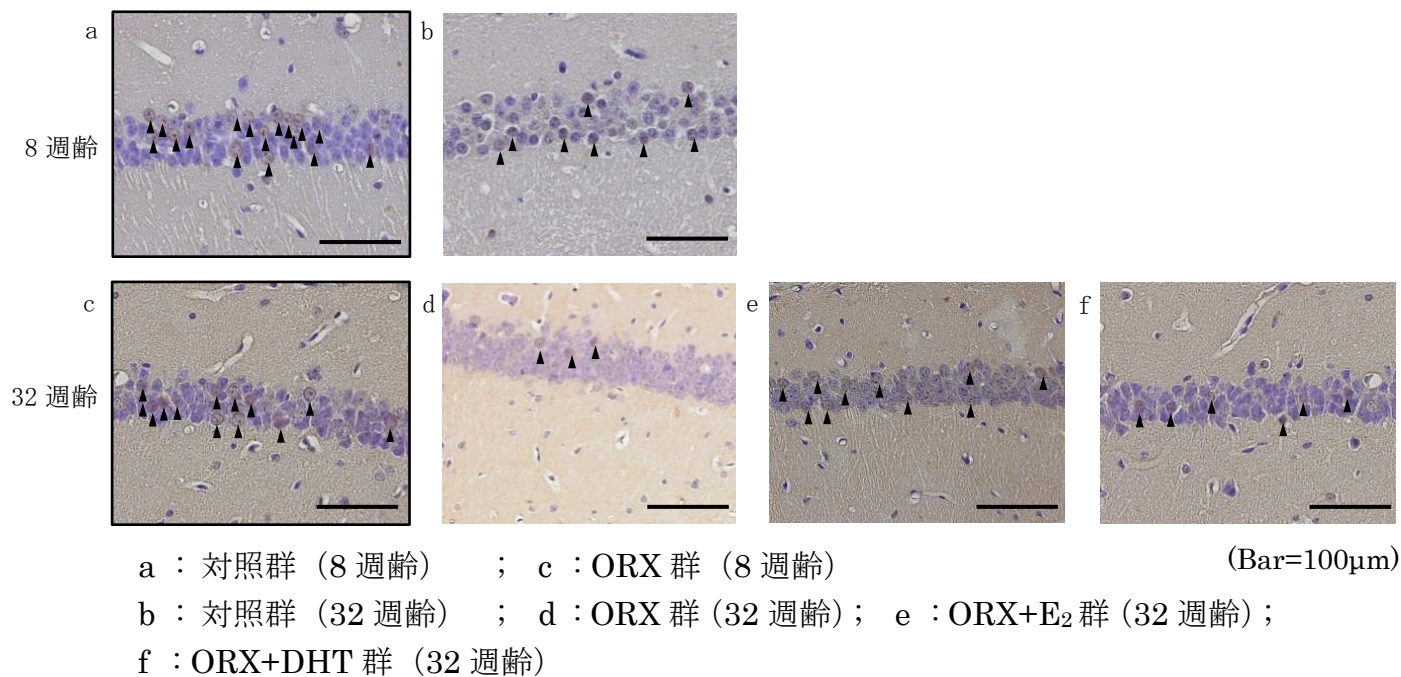


図 20 : 雄性マウス海馬 CA1 領域の ChAT 免疫組織化学染色像

Female

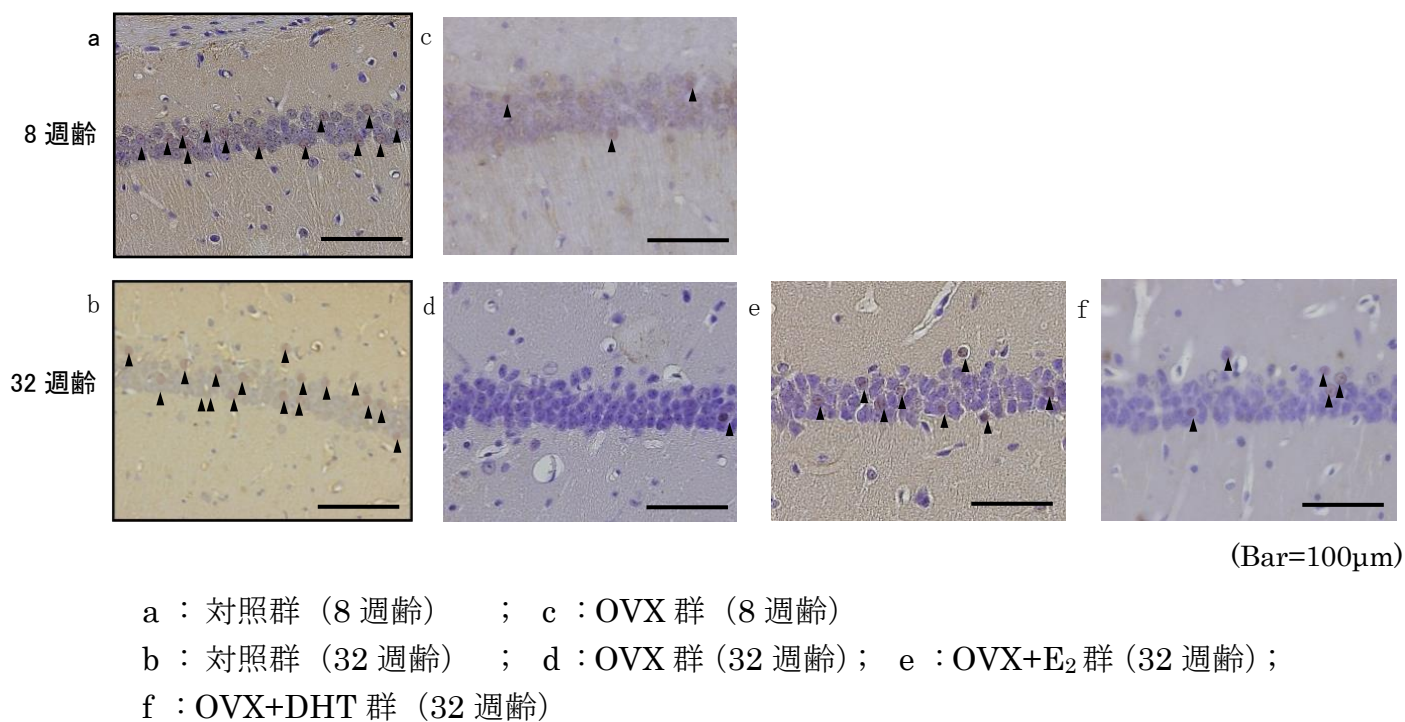


図 21 : 雌性マウス海馬 CA1 領域の ChAT 免疫組織化学染色像

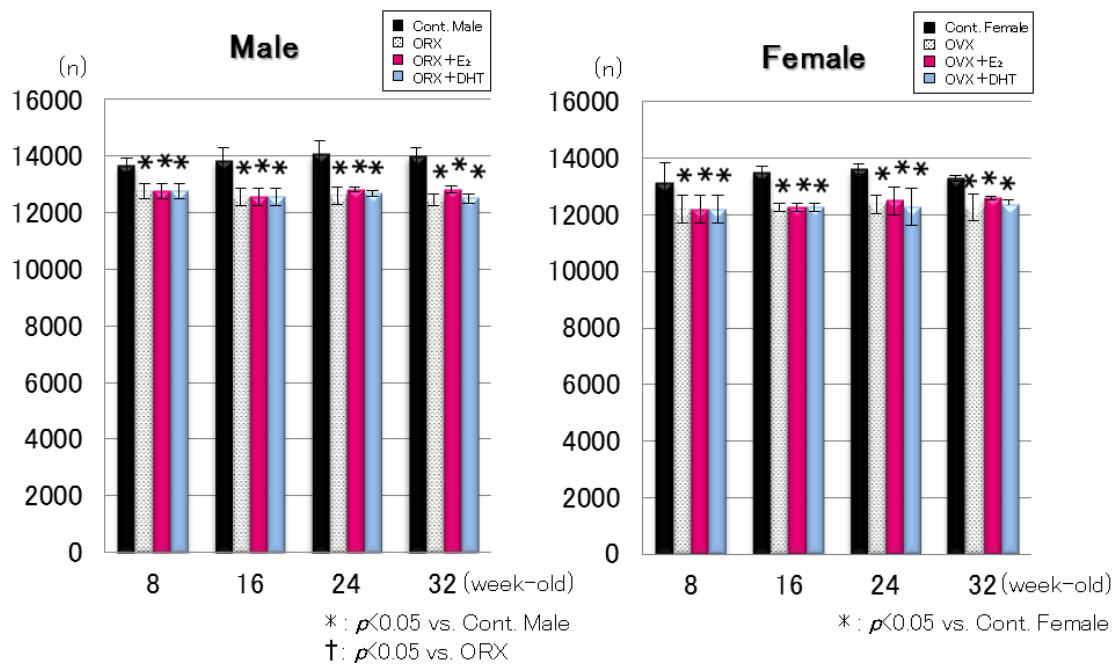


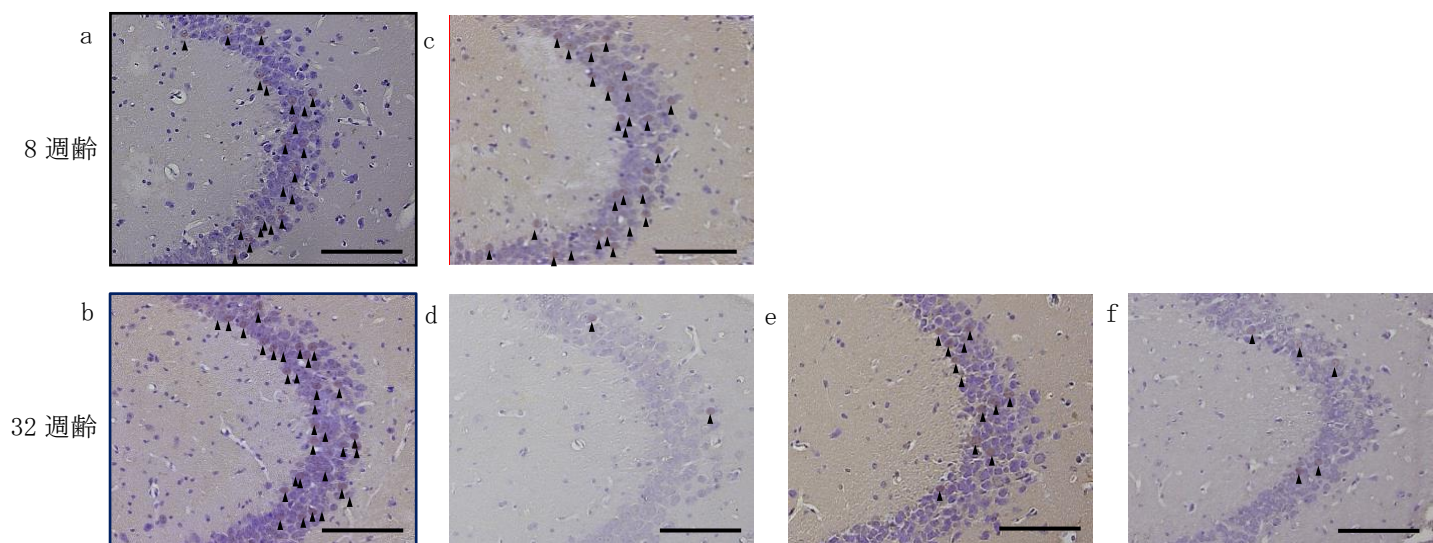
図 22：海馬 CA1 領域の ChAT 陽性細胞数

3) CA3 領域

雄性の ChAT 陽性細胞数は、対照群において、週齢が高くなるにしたがい徐々に増加する傾向を示した。一方、実験群では、実験期間を通して陽性細胞数の増加は認められず、対照群より有意に小さな値を示した。また、CA1 領域と同様に対照群の ChAT 陽性細胞は、32 週齢時においても強い発現を示したが、OVX 群ではきわめて低い発現が認められた(図 23, 25)。

雌性においても同様に、対照群においては実験期間を通して強い発現が認められた。16 週齢時までは、すべての実験群において、対照群と比較して有意に小さい値を示したが、E₂ 投与群において、24 週齢時以降、徐々に陽性細胞数は増加し、32 週齢時には対照群との間に有意差が認められなくなった。また、32 週齢時の OVX+E₂ 群の ChAT 免疫染色像においても陽性細胞の強発現が認められた (図 24、25)。

Male

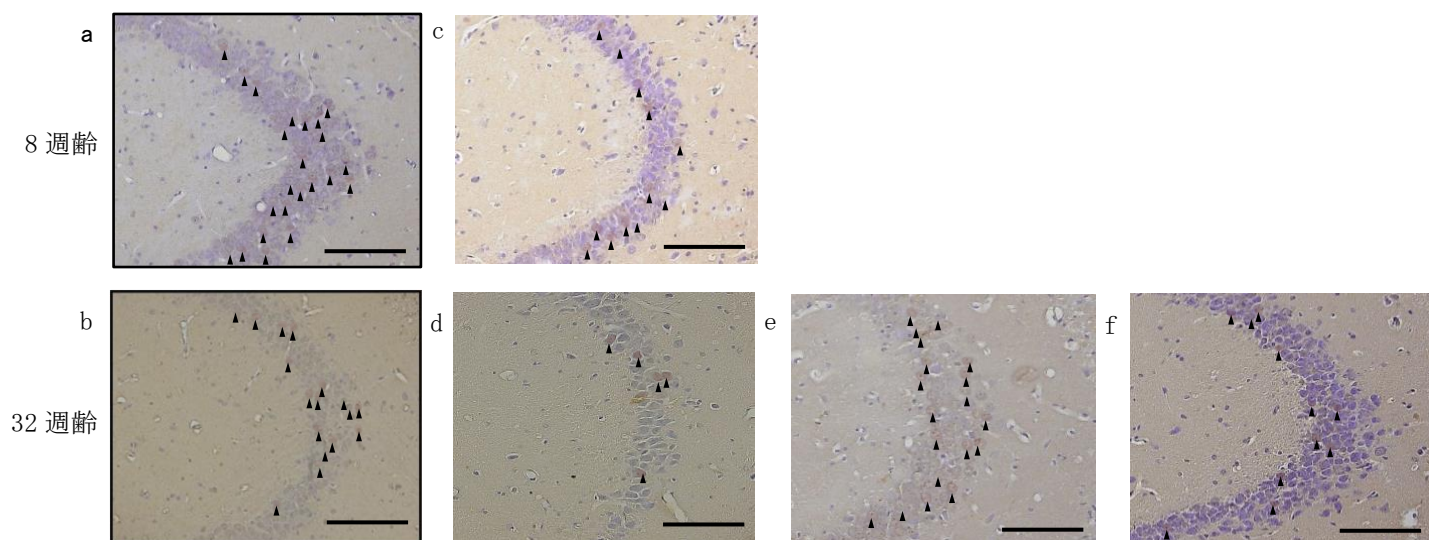


(Bar=100μm)

a : 対照群 (8 週齢) ; c : ORX 群 (8 週齢)
 b : 対照群 (32 週齢) ; d : ORX 群 (32 週齢) ; e : ORX+E₂ 群 (32 週齢) ;
 f : ORX+DHT 群 (32 週齢)

図 23 : 雄性マウス海馬 CA3 領域の ChAT 免疫組織化学染色像

Female



(Bar=100μm)

a : 対照群 (8 週齢) ; b : 対照群 (32 週齢)
 c : OVX 群 (8 週齢) ; d : OVX 群 (32 週齢) ; e : OVX+E₂ 群 (32 週齢) ;
 f : OVX+DHT 群 (32 週齢)

図 24：雌性マウス海馬 CA3 領域の ChAT 免疫組織化学染色像

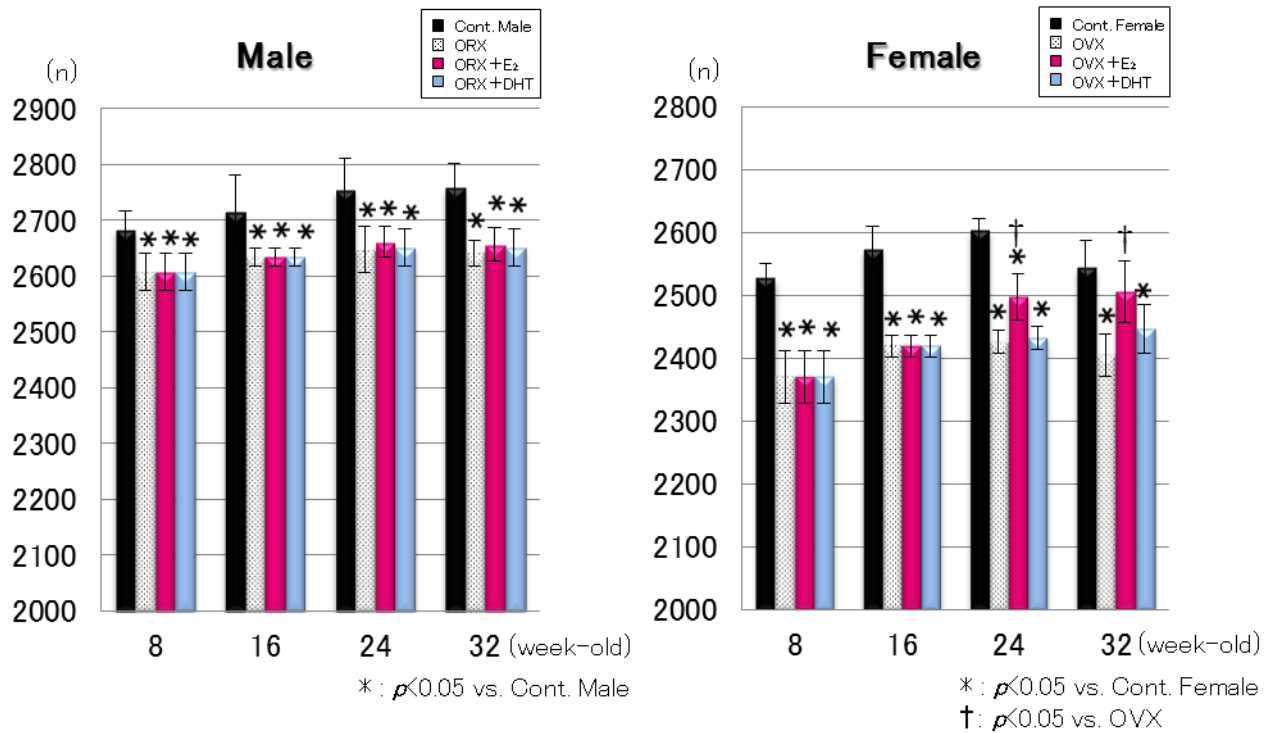


図 25：海馬 CA3 領域の ChAT 陽性細胞数

4. CCK-4 免疫組織化学染色像および陽性細胞数の変化

雌雄両性の CCK4 陽性細胞も、ChAT 陽性細胞と同様細胞質が茶褐色に染色され、核の萎縮が認められた。また週齢が高くなるにしたがい、細胞は小型化し、歪んだ形状を呈した。

雌雄両性の対照群および実験群を問わず、週齢が高くなるにしたがって CCK-4 陽性細胞数は増加する傾向を示した。また、8 および 16 週齢時までは、すべての群において有意差が認められなかったものの、24 週齢時では、対照群と比較して ORX および ORX+DHT 群が有意に大きい値を示した。さらに、32 週齢では ORX および ORX+E₂ 群において有意に大きい値が認められた(図 26、28)。

雌性においても、8 および 16 週齢時までは、すべての群間で有意差を認めなかった。しかしながら、24 および 32 週齢時では、対照群と比較して OVX および OVX+DHT 群が有意に大きい値を示した(図 27、28)。また、32 週齢時の CCK-4 免疫染色像においても同様の所見が認められた。

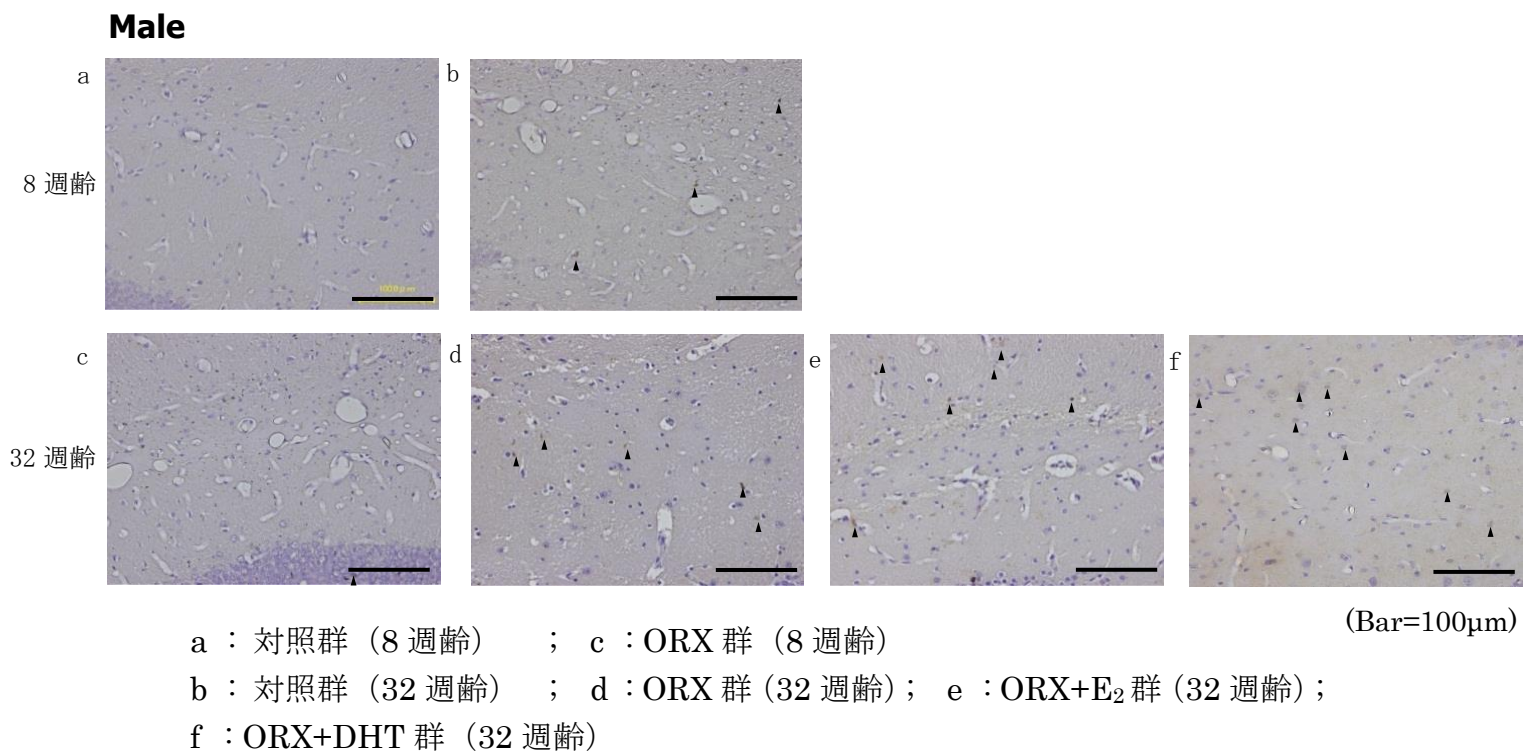
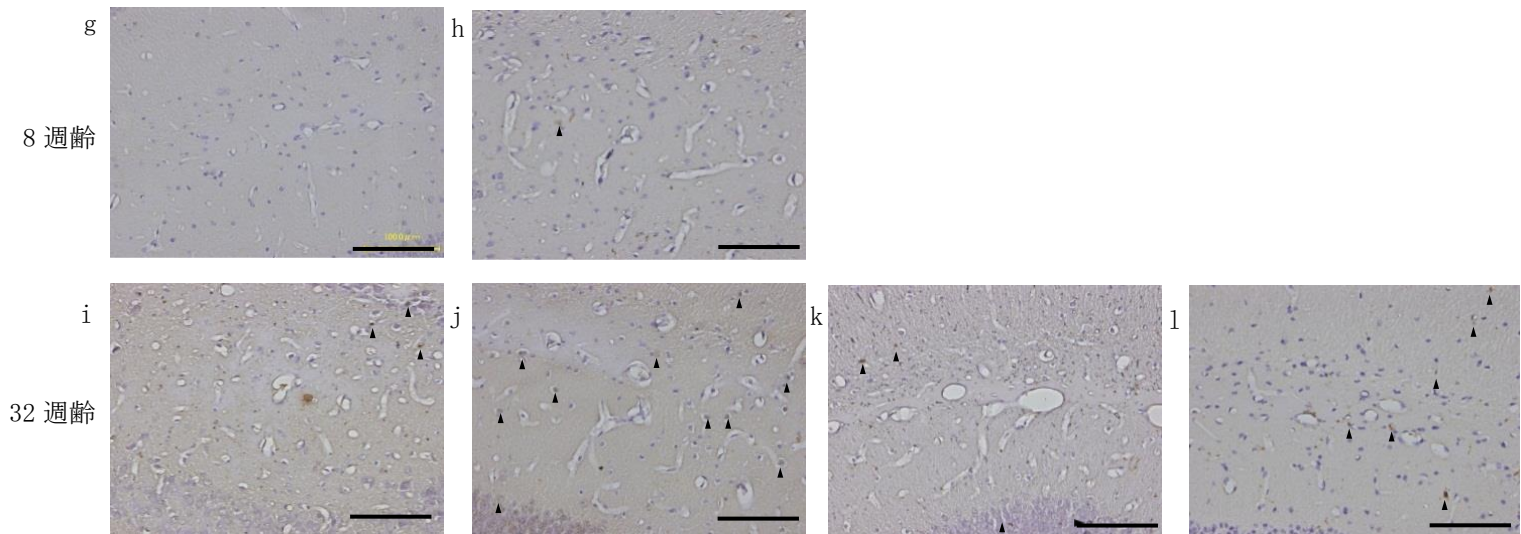


図 26：雄性マウスにおける CCK-4 免疫組織化学染色像

Female



(Bar=100μm)

a : 対照群 (8 週齢) ; c : OVX 群 (8 週齢)
b : 対照群 (32 週齢) ; d : OVX 群 (32 週齢) ; e : OVX+E₂ 群 (32 週齢) ;
f : OVX+DHT 群 (32 週齢)

図 27 : 雌性マウスにおける CCK-4 免疫組織化学染色像

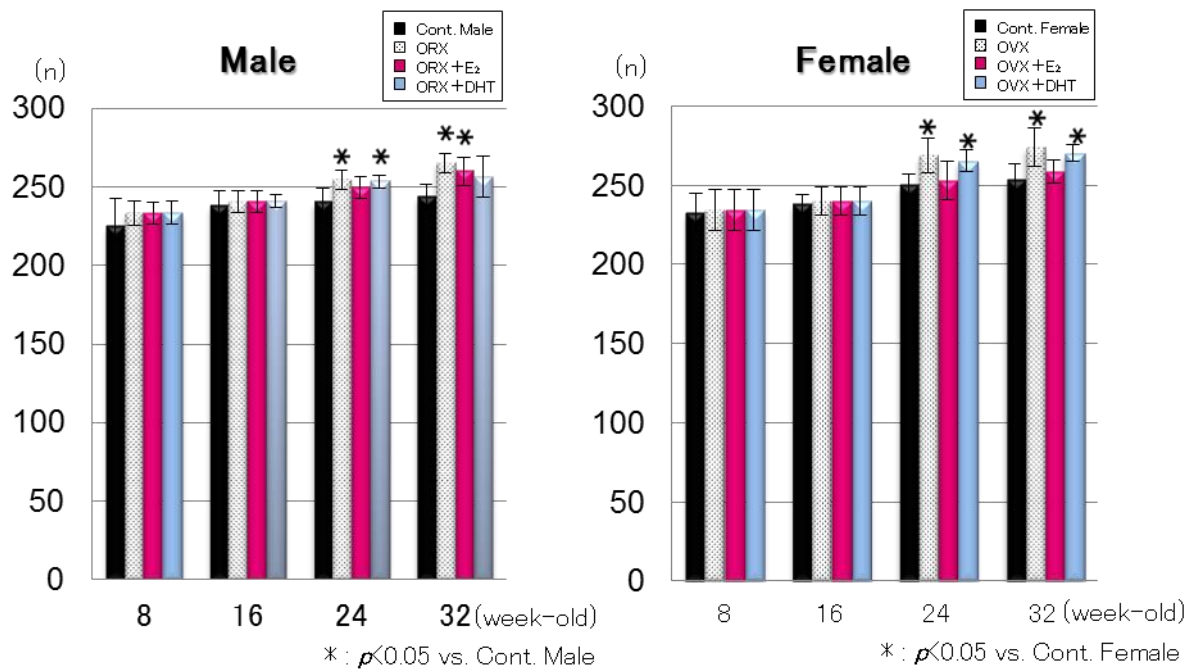


図 28 : CCK-4 陽性細胞数

IV. 性ホルモン分泌障害による血清中チロキシン濃度の変化

雄性では、すべての群において、血清チロキシン(以下、T4)濃度は週齢の増加とともに低下する傾向を示した(図 29)。また、実験期間を通して、対照群と比較して ORX 群は有意に低い値を示した。一方、E₂ の投与により T4 濃度の低下は若干抑制され、24 および 32 週齢時に、ORX 群と比較して有意に大きい値を示したものの、対照群との間には依然有意差が認められた。

雌性においても、実験期間を通して、対照群と比較して実験群は有意に小さい値を示した。しかしながら、雄性と同様、雌性においても、E₂ 投与群では、24 および 32 週齢時において、週齢の増加に伴う T4 濃度の低下は抑制され、OVX 群と比較して有意に大きい値を示した。また、それ以前に見られた対照群との間の有意差が認められなくなった(図 29)。

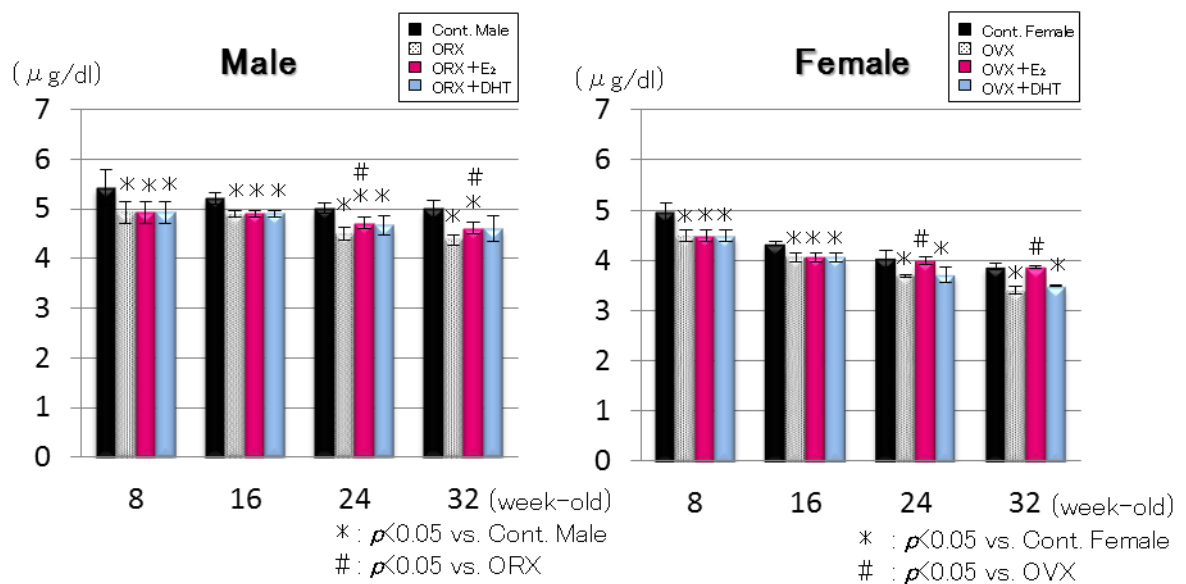


図 29 : 血清中 T4 濃度

考察

I. 実験方法と装置について

1. 性腺摘出術について

最近、ヒトを対象とした疫学的研究や薬の治験的研究により、加齢に伴うエストロゲン産生量の低下がアルツハイマー病の発症と密接な関係にあるとの報告がなされている（岩佐ら, 1997、Barron *et al.*, 2012）。卵巣は、女性ホルモンを産生する臓器であるため、卵巣を取り除くと、性ホルモン分泌障害が起こり、閉経と同様の現象が観察される（名和田ら, 1995）。性ホルモン分泌障害を人為的に惹起させるために、げっ歯類や犬を対象とした卵巣摘出（OVX）実験モデルが広く用いられている。北村らは、55 週齢の高齢ラットに OVX を行くと、6 週以内に術前と比較して体重が約 20% 増加し、腰椎の骨密度は OVX の 6 週後より徐々に減少し始め、15 週後には著明な減少を呈したと報告している（北村ら, 2009）。また、成熟ラットの卵巣摘出を行うと、卵巣摘出後 6 週後に対照群の平均体重より約 11% 増加し、腰椎の骨密度は漸次減少したと述べている。

一方、雄性の性ホルモン分泌障害モデル作製には、精巣摘出術（ORX）が用いられている。精巣は男性ホルモンの約 95% を産生しているため、精巣を摘出すると、血中男性ホルモン量は急激に低下する（岩本ら, 2005、宮川ら, 2005）。また、男性の骨粗鬆症はアンドロゲン欠乏に起因している（Boonen *et al.*, 1997、Daniell, 1997）ことから、性腺摘出術により性ホルモン分泌障害が惹起され、体重の増加や骨量の低下などの全身症状が術後 6 週間より現れると考えられる（Inada *et al.*, 2011）。したがって、本研究では、術後約 8 週より中枢神経系に

対する影響について検討することとした。

また、学習試験はその後、16、24、32 週齢時にも実施した。マウスは出生直後に性ホルモンが大量に分泌される第一次成長期を迎え、3 週齢頃までが哺乳期、8 週齢前後までが幼少期とされている。その後、12 週齢頃より第二次成長期を迎え、性ホルモン分泌量が再度増加し、最終的に 16 週齢前後で成長が終了する（谷向ら,1992）。したがって、本研究で設定した 8 週から 32 週齢の間には性ホルモンの分泌が盛んに行われる時期が 2 回含まれ、成長期において性ホルモンが中枢神経系に及ぼす影響を検討する上できわめて適切な設定と考えられる。

2. 実験期間中の体重変化について

Wade and Gray は、エストロゲンが脂肪組織での脂質代謝に直接影響を与えると報告している（Wade and Gray, 1979）。また、男性の体内で男性ホルモンが女性ホルモンへ変換され（新井, 2004）、雌雄両性ともに脂肪細胞にはエストロゲン受容体が存在し、エストロゲンが脂肪量の調節を行い、脂肪組織の増殖を制御している（Pedersen *et al.*, 1992）。さらに、Yamaguchi らは、女性ホルモンにはノルエピネフリンによる脂肪分解促進作用があると報告している（Yamaguchi *et al.*, 2002）。実際、Roy らは、雌ラットにおいて卵巣摘出により種々の組織重量が変動するが、脂肪組織重量の増加が最も顕著で、体脂肪量は約 2 倍になったと報告している（Roy and Wade, 1977）。

男性においても、脂肪蓄積の程度は血中テストステロン値と反比例し、性腺機能低下症の男性では体脂肪の有意な増加を認め、テストステロン投与によって減少するという報告が見られる（Yanase *et al.*, 2008）。また、Fan らは、40 週齢の AR ノックアウトマウス（以下、ARKO マウス）における肥満機序を検討した結果、雄性の ARKO マウスにおいて特異的に白色脂肪分解酵素の発現低

下を認め、腹部内臓周囲の白色脂肪組織の増加と肥満をきたしたと報告している (Fan *et al.*, 2005)。上記のことから、雌性ではエストロゲンが、雄性ではエストロゲンとジヒドロテストステロンの両者が、脂質代謝に強く影響していることが明らかとなった。

本研究結果より、8 および 16 週齢時では全群間で有意差が認められなかったものの、24 および 32 週齢時では OVX 群および ORX 群の体重が有意に大きい値を示した。しかしながら、雌雄両性ともに E₂ や DHT を投与することによって、対照群との間に有意差は認められなくなった。このことから、今回、性腺摘出術を施したマウスでは体重増加が認められ、性ホルモン投与により雌雄両性のマウスにおいて体重の減少が認められ、これまでの研究結果を裏付ける結果となった。

3. 8 方向放射状迷路について

記憶とは、脳の中で記銘、保持、想起の 3 つの過程が連携することで成立する。知覚情報は、短期記憶の貯蔵庫である海馬に伝えられる。しかしながら、この容量には限りがあり、長時間多くの情報を貯蔵できない。そこで、情報を上書きすることで記憶と忘却を繰り返す。短期記憶が、言語・イメージ・シンボルなどの情報に変換され、記憶のネットワークに組み込まれることにより長期記憶となり、その貯蔵庫である大脳皮質に伝えられる (Atkinson and Shiffrin, 1971)。実験動物において、この 2 つの貯蔵庫モデルを確立させるためには、人間が訓練を行い課題を学習させることが必要になる。迷路課題を用いた学習試験が、その代表的な実験方法と言われている。

これまでに、高架式十字迷路や Morris 水迷路が学習試験に広く用いられてきた。しかしながら、高架式十字迷路は高所における不安状態を実験動物に与え、

Morris 水迷路は泳ぐという身体機能に負荷を与えることが、その欠点として知られている (Belviranli *et al.*, 2012、Morris, 1981)。一方、本実験で用いた 8 方向放射状迷路は、このような精神的、身体的負担を負荷させることなく実験を行うことが可能で、非常に有用であると考えられている (Olton and Samuelson, 1976)。また、8 方向放射状迷路は、報酬を与えて学習・記憶能力を検討することのできる装置である。記憶を形成させるため、課題を遂行させ、正解すれば餌などの報酬を与えることから、動物へのストレスも少なく、学習しやすいことが大きな特徴である。

マウスはアームの先端に置かれたペレットを目指して、各アームを出入りする。一度入って餌を取り終えたアームに再び入ると誤選択とするが、この試行を繰り返すことによって、マウスは一度侵入して餌を食べ終えたアームには二度と入ることなく、8 方向の先端にあるすべての餌を食べ終わると中央のプラットフォームに留まり、それ以上はアーム選択を行わなくなる。これは、マウスが移動しながら迷路の周辺の物象をランドマークにして自分の現在の位置を把握し、要領よく餌を獲得しているからである。したがって、この報酬系 8 方向放射状迷路では、空間の地図が確実にないと課題を遂行できないと考えられ、高次の記憶を検討する上で非常に適した装置と言える。

II. 実験結果について

1. 学習試験結果について

これまで、エストロゲンが認知機能に及ぼす影響について多数の報告がなされている。El-Bakri らは 30 週齢の高齢ラットの卵巣を摘出し、OVX 群と OVX+E₂ 群に分け、Morris 水迷路にて記憶・学習能力を検討した。その結果、OVX 群において対照群と比較し空間・認知能力の有意な低下がみられ、その一

方で E₂ 投与群では対照群との有意差は認められなかった (El-Bakri *et al.*, 2004)。また、Singh らは、16 週齢時に卵巢摘出した成熟ラットにおいて、摘出後より 3 週目にエストロゲンを投与し、Morris 水迷路にて学習能力を検討したところ、運動感覚や学習行動が改善されたと報告している (Singh *et al.*, 1994)。また、外科手術により卵巢を摘出した女性、もしくは自然閉経した女性にエストロゲンを補充することによって、記憶の改善を認めたとの報告もある (Phillip and Sherwin, 1992、Resnick *et al.*, 1997)。一方、雄性においても、48 週齢高齢マウスの、精巣摘出術 45 日後に Morris 水迷路による学習試験を行った結果、記憶・学習能力が低下した (Cui *et al.*, 2008)。

本研究結果より、平均所要時間は、実験期間を通して、実験群で対照群と比較して有意に長かったが、雌雄両性ともに、エストロゲンを投与することによって 32 週齢時には対照群との間に有意差が認められなくなった。さらに、平均誤選択数や平均全選択数も、実験期間を通して、雌雄両性ともに実験群が対照群と比較して有意に大きな値を示したが、E₂ 投与によって改善する傾向が認められた。

これらのことより、高齢動物の性ホルモン分泌障害モデルにおける検討結果と同様に、出生直後からの性ホルモン分泌障害は、記憶・学習能力に関わる神経伝達物質や錐体細胞の減少、T₄ の低下などの変化を介して記憶・学習能力を低下させるが、E₂ を投与することによってそれが改善されることが明らかとなった。すなわち、出生直後からの成長期においても、エストロゲンが中枢神経系の成長発育に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

2. 性ホルモンの分泌障害による海馬の神経病理学的変化について

側頭葉の内側にある海馬は、さまざまな中枢機能に深くかかわることで知ら

れているが、とりわけ記憶との関連は最も注目されている課題である。海馬は、短期記憶の形成・保持、長期記憶への変換過程を担っている (Marr, 1971)。また、記憶喪失症の男性患者において、心臓発作による一過性の虚血により海馬体内の CA1 や CA3 領域の錐体細胞層のみが破壊され、記憶障害が生じたことから、海馬の中でも特に錐体細胞層が記憶形成に強く関わっていることが示唆される (Zola-Morgan *et al.*, 1986)。

本研究において、CA1 領域の錐体細胞は、実験期間を通して対照群では緊密に配列していたが、実験群では疎らな配列を示した。しかしながら、同領域の海馬錐体細胞数は、実験期間を通して雌雄両性ともに対照群と比較して実験群でやや少ない傾向を示したものの、両群間に有意差は認められなかった。

一方、海馬 CA3 領域の錐体細胞については、対照群と比較して ORX 群と OVX 群において細胞層の厚みが減少し、その数も 24 および 32 週齢時に有意に小さい値を示した。しかしながら、雌雄両性ともに、E₂ 投与群で性腺摘出群と比較して、24 および 32 週齢時では有意に高い値を示した。すなわち、CA1 領域とは異なり、CA3 領域では、学習試験結果と同様の錐体細胞数の変化が生じていることが明らかになった。

その理由として、次のことが考えられる。今回用いた 8 方向放射状迷路は、空間認知能力を検討する実験装置であるが、Nakazawa らはこの空間認知能力を CA3 領域の錐体細胞が制御していると述べている (Nakazawa *et al.*, 2002)。すなわち、CA3 領域の数ある錐体細胞の中でのいくつかの特定の細胞のみが同時に活性化することで、ある特定の場所の空間認知を行うことが明らかにされている (O'Keefe and Nadel, 1978)。今回、CA3 領域での錐体細胞数が減少していたことから、8 方向放射状迷路の空間認知を行っていたある特定の細胞も同時に減少していると推察され、その結果、学習能力が低下したと考えられる。

また、海馬周辺皮質に到達した知覚情報は、主に嗅内野を介して海馬歯状回、CA3 領域、CA1 領域、海馬台の各領域に投射され、情報処理が行われた後に CA1 領域から出力される (Nakazawa *et al.*, 2002)。したがって、本研究では CA1 領域の錐体細胞数に変化が認められなかったが、より長期の検討を行うと、CA3 領域からの情報伝達量の低下に起因して、CA1 領域の錐体細胞数の減少や廃様萎縮などが起こり得ると考えられる。しかしながら、今回は成長期における検討であり、活発な細胞の分化や増殖により、細胞数自体の増加などの要因も加わり、CA1 領域の錐体細胞数に有意差が認められなかったものと推察される。

近年、女性ホルモンが海馬の神経細胞に深く関与しているとの報告がある。Okajima らは、エストロゲンが知覚神経内のカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の産生を促し、それがプロスタグランジンの産生を増加させること、プロスタグランジンには知覚神経刺激作用があり、そのシグナルが脳幹に伝わることによってインスリン様成長因子 (IGF-1) の産生を促すこと、IGF-1 はさまざまな作用を有しているが、その一つに海馬内神経細胞の再生や機能の改善効果を有することを報告した (Okajima and Harada., 2008)。また、ER は雌雄両性ともに視床下部と下垂体を中心として脳内に広く分布しており、海馬もそのうちの 1 つであると報告されている (Kato *et al.*, 1995)。したがって、エストロゲンが海馬に存在する ER に直接働きかけるだけでなく、プロスタグランジンや IGF-1 など成長因子の影響が雌雄両性ともに E₂ 投与群で錐体細胞数が改善した一因であると考えられる。

これまでの研究により、海馬において重要な神経伝達物質として、アセチルコリンやグルタミン酸がよく知られている (Hasselmo *et al.*, 1995, Huerta and Lisman., 1993, Davis *et al.*, 1999)。また、アルツハイマー病患者では、アセ

チルコリン産生量が著しく減少していること (Bowen *et al.*, 1976、Perry *et al.*, 1977)、アセチルコリン神経系が記憶の形成に対して重要な役割を担っていることなどが報告されている (Rush, 1988)。さらに、海馬のアセチルコリン受容体の分布は、雄と比較して雌ラットの方が多い (Hörtnagl *et al.*, 1993)。これらのことより、本研究では、海馬 CA1 および CA3 領域において、アセチルコリンを生成するコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 陽性細胞の発現を検討することとした。

ChAT 陽性細胞数は、実験期間を通して、雌雄両性ともに対照群と比較して実験群で有意に小さい値を示した。また、ORX および OVX 群ともに、対照群と比較して有意に小さい値を示したが、32 週齢時には OVX+E₂ 群と対照群との間に有意差が認められなくなった。ChAT 陽性細胞数が実験群で減少していたことから、これが記憶・学習能力低下の大きな原因の一つであると考えられる。さらに、CA1 領域の錐体細胞数は、雌雄両性ともに全群間で有意差が認められなかったものの、CA1 領域の ChAT 陽性細胞数は実験群で低下していたことから、錐体細胞の機能的な低下は CA1 領域でもすでに起こっていたと言えよう。

また、52 週齢雌ラットの卵巣摘出によって ChAT 活性が低下するが、E₂ を投与することによって ChAT 活性が再び上昇すると報告されている (Gibbs *et al.*, 2000)。本研究においても、OVX+E₂ 群において、CA3 領域の ChAT 陽性細胞数は 32 週齢時に対照群との間の有意差を示さなくなったが、投与した E₂ が錐体細胞内の ER に結合することにより、上記のようなエストロゲン作用が作働したことによる結果と推察できる。さらに、雄性においては、E₂ 投与群で変化が認められなかった理由として、海馬内のアセチルコリン受容体数が雌性と比較して少なく、その結果が十分に現れなかったのではないかと推察される。

Handelmann らは、ラットの海馬には多くの CCK 含有細胞が存在し、海馬

の CCK ニューロンは錐体細胞の活性を修飾する介在ニューロンに作用すると報告している (Handelman *et al.*, 1981)。また、CCK 陽性細胞は海馬に多く、介在ニューロンから、抑制性シナプスの興奮により放出される GABA の放出を促すことで、錐体細胞を障害していると報告されている (Freund and Buzsáki, 1988, Miller and Lupica *al.*, 1994)。さらに、抑制性シナプスの興奮により放出される GABA は脳腸管ペプチドの 1 種である CCK-4 と共存しており、この CCK-4 が記憶の想起を妨げることが示されている (Freund and Buzsáki, 1988)。したがって、本研究でも、記憶の想起を妨げる働きを担っていると考えられる CCK-4 陽性細胞の発現を検討した。

本研究結果より、8 および 16 週齢時では、すべての群間に有意差は認められなかったが、24 および 32 週齢では性腺摘出群(ORX、OVX 群)が対照群より有意に多い CCK-4 陽性細胞を発現した。また、32 週齢では、雄性の DHT 投与群、雌性の E₂ 投与群において対照群との有意差が認められなくなった。これらのことから、雄性への DHT 投与と雌性への E₂ 投与が GABA の放出を防ぎ、CCK-4 の産生を抑制していると考えられた。

3. 性ホルモン分泌障害によるチロキシン濃度の変化について

甲状腺ホルモンの血中濃度は、視床下部や下垂体で調節されている (Lizcano and Rodríguez, 2011)。甲状腺からは、トリヨードチロニン (以下、T3) またはチロキシン (以下、T4) が分泌される。分泌されたこれらの甲状腺ホルモンは、サイロキシン結合グロブリン (以下、TBG) と結合して血液中を巡り、血液脳関門を通過した T4 のみが脳への作用活性を発揮する。

これまでに、T4 が脳へ及ぼす影響についていくつかの報告がなされている。すなわち、T4 の脳内代謝は成長発育とともに変化し、甲状腺ホルモン分泌量と

密接に関連していること (Tanaka *et al.*, 1982)、脳の発生過程において T4 が記憶に関係するシナプス形成に関与する遺伝子発現を調節していることが報告されている (Porterfield and Hendrich., 1993)。また、甲状腺ホルモンが脳の発育に不可欠であることは、クレチン症の患者において知能低下や発育障害といった臨床症状が認められることから明らかである (伊藤ら, 2006)。さらに、動物実験においても同様に、生後間もなく甲状腺機能低下を起こさせると、大脳、小脳の発達はいずれも障害される (Soebijanto *et al.*, 2009)。

一方、離巢性の鳥に見られる早期学習の 1 つである刷り込みは、未熟なヒナにとって、母親からの保護を確実に受けながら生きていくために必須の学習であると考えられているが、刷り込み学習のトレーニングを開始すると、脳内に T4 が流入することが報告されている (Yamaguchi *et al.*, 2012)。また、刷り込み学習を行わなかったヒナに対しても、T4 を投与することにより後発的に刷り込みを完了することができたと報告している。したがって、核内に存在する性ホルモンレセプターに結合して、その作用を発揮する T4 は、記憶の形成および改善に効果を発揮すると言えよう。

また、森らは 6 週齢雄性ラットの皮下に E₂ を投与した群と無処置の群に分け、28 日後に TBG mRNA を抽出した。その結果、E₂ 投与群が、無処置群と比較し有意に高い値を示したことから、エストロゲンにはサイロキシン結合グロブリン (以下、TBG) の合成を促進する作用があることが明らかにされた。(森ら, 1992)。同様に、Glinoe らは成獣の雌性のアカゲザルに E₂ を投与することにより、血中 TBG 濃度が上昇したと報告している (Glinoe *et al.*, 1977)。したがって本研究では、雌雄両性において、記憶・学習に重要な役割を果たしている T4 について検討することとした。

本研究結果では、雌雄両性において、対照群の血清中チロキシン濃度は、週

齢が高くなるにしたがい減少する傾向を認めた。また、実験期間を通して、対照群と比較して OVX および ORX 群が、有意に低い血清中チロキシン濃度を示した。これらのことから、出生直後からの性ホルモン分泌障害に起因して血中 T4 濃度の減少は加速し、これが記憶学習能力の低下につながると考えられる (図 30)。さらに、雌性では、24 および 32 週齢時に、E₂ 投与群で対照群との間の有意差が認められなくなったことは、前述のエストロゲンと T4 との関連性を裏付ける結果と考えられる。一方、雄性においては、これまでの研究で DHT と T4 との関係を報告したものはなく、実験データにおいても DHT 投与群の標準偏差が大きかったことに起因して、対照群との有意差が認められなかったものと考えられる。

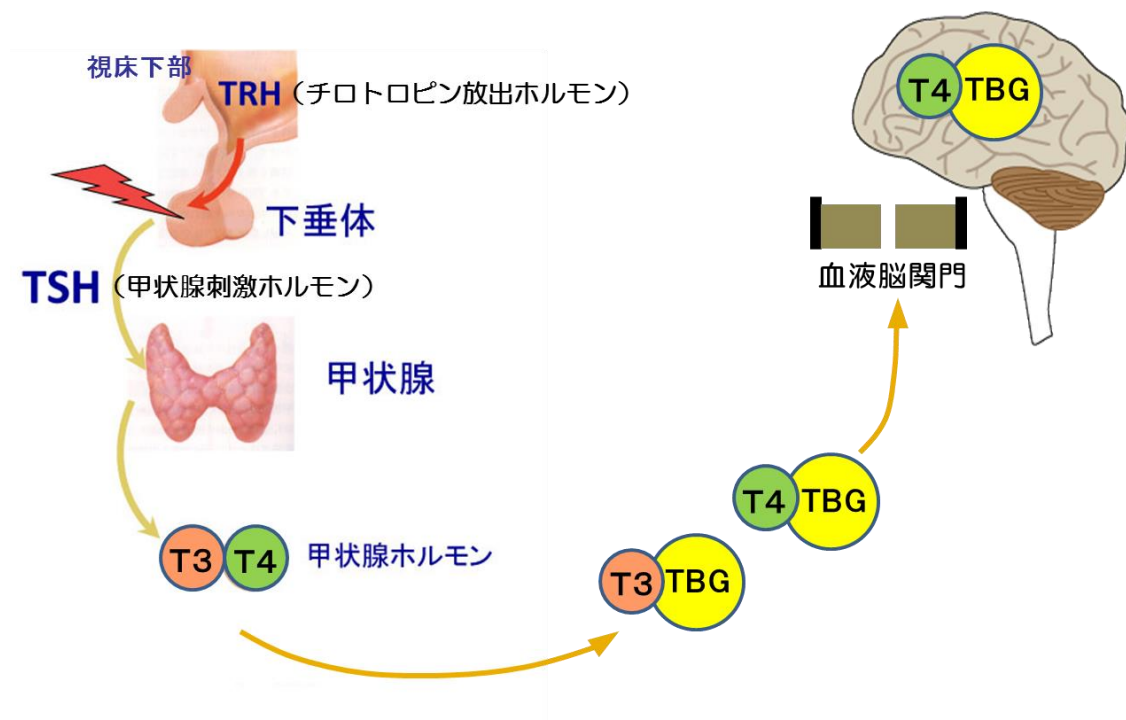


図 30 血液中チロキシン代謝

総括

出生直後に性腺摘出術を施行することによって惹起される性ホルモン分泌障害が、成長期における記憶・学習能力に及ぼす影響について、行動評価学および神経病理学的な検討、血中チロキシン濃度の計測などを行ったところ、以下のような結果が得られた。

1. 学習試験結果から、平均所要時間は実験群で対照群と比較して有意に長かった。また、雌雄両性ともに、32 週齢時において E_2 投与群で対照群との間に有意差が認められなくなった。学習試験達成率については、実験期間を通して雌雄両性ともに、すべての群で有意差が認められなかったものの、雌性では 24 週齢時で OVX 群が、32 週齢時では OVX および DHT 投与群が有意に低い値を示した。平均誤選択数および平均全選択数は、雌雄両性において性腺摘出群が対照群と比較して有意に大きい値を示したが、 E_2 投与により改善傾向を示した。
2. 海馬錐体細胞は、実験期間を通して、雌雄両性の対照群において緊密に配列していた。一方、実験群では、週齢が高くなるにしたがって細胞密度が減少し、32 週齢時では特に性腺摘出群、DHT 投与群で錐体細胞の小型化あるいは萎縮、さらに空胞変性様の変化が認められた。また、CA1 領域の錐体細胞数は、雌雄両性の対照群において、実験期間を通してほぼ一定の値を示した。実験群では、対照群と比較してやや少ない傾向を示し、そ

の傾向は雌性でより顕著であったが、実験期間を通して全群間で有意差は認められなかった。一方、CA3 領域においては、雌雄両性のすべての群において、週齢が高くなるにしたがって錐体細胞数が減少する傾向を示し、特に性腺摘出群においてその傾向は強く認められた。さらに、24 週齢時においては、雄性では性腺摘出群と比較し、E₂ 投与群および DHT 投与群が、雌性では E₂ 投与群が有意に大きい値を示し、32 週齢時には、雄性で DHT 投与群と、雌性では E₂ 投与群と対照群との間に有意差が認められなくなった。

3. CA1 および CA3 領域の ChAT 陽性細胞数は、雌雄両性ともに実験期間を通して性腺摘出群で有意に小さい値を示した。しかしながら、CA3 領域において、32 週齢時に雌性のみ E₂ 投与群と対照群との間に有意差が認められなくなった。
4. CCK-4 陽性細胞数は、雌雄両性ともに、24 および 32 週齢時に、対照群と比較して実験群において有意に大きい値を示した。しかしながら、32 週齢時に雄性の DHT 投与群と、雌性の E₂ 投与群で対照群との間に有意差が認められなくなった。
5. 血清中チロキシン濃度は、雌雄両性の対照群において加齢とともに減少する傾向を認めた。また、実験期間を通して、性腺摘出群では対照群と比較して有意に低い値を示した。一方、32 週齢時には、ORX+DHT および OVX+E₂ 群で、対照群との間に有意差が認められなくなった。

以上のことより、性腺摘出群において学習試験の平均所要時間は有意に長くなり、全選択数も有意に大きい値を示した。しかしながら、雌雄両性において、 E_2 を投与することによって改善傾向を示し、雄性の DHT 投与群では対照群との間の有意差が認められなくなった。また、CA3 領域の海馬錐体細胞数および ChAT 陽性細胞数の有意な減少と CCK-4 陽性細胞数の有意な増加が明らかとなった。さらに、血清 T4 濃度も有意に小さい値を示したことから、出生直後からの性ホルモン分泌障害により、脳の成長発育が著しく障害されていることが明らかになった。

これらのことより、成長期における性ホルモン分泌障害は、海馬 CA1、CA3 領域の錐体細胞数の低下、神経伝達物質であるアセチルコリンの低発現、記憶の想起を妨げる CCK-4 の強発現、さらに、記憶の形成や改善に効果を発揮する T4 濃度の低下などを介して、神経機能を低下させ、作業記憶に関連する記憶・学習能力を著しく低下させることが明らかになった。また、雌性では E_2 が、雄性では時期特異的に E_2 と DHT が、海馬の錐体細胞数の増加や維持、さらにアセチルコリンの放出促進、血液中の T4 値の増加などを引き起こすことにより、海馬をはじめとする中枢の成長発育に深く関与している可能性が強く示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御教示、御支援ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科総合健康科学部門（小児歯科学）香西克之教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文の作成にあたり、御教示いただきました同研究科統合健康科学部門（歯科麻酔学）入船正浩教授、同研究科統合健康科学部門（生体構造・機能修復学）里田隆博教授、同研究科応用生命科学部門（先端歯科補綴学）津賀一弘准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の立案、遂行において終始御指導を頂きました医歯薬保健学研究科応用生命科学部門（歯科矯正学）大谷淳二助教に深く御礼申し上げます。さらに、本研究の遂行に御協力、御理解をいただきました歯科矯正学研究室の皆様ならびに関係各位に厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えて頂き、これまで私を支え、理解を示してくれた家族に心から感謝します。

参考文献

Arnold AP, Gorski RA.: Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 7: 413-442, 1984.

新井康允: 中枢の性分化 - 女の脳・男の脳 - . *日本臨牀.* 62(2): 281-292, 2004.

Asthana S, Baker LD, Craft S, Stanczyk FZ, Veith RC, Raskind MA, Plymate SR.: High-dose estradiol improves cognition for women with AD. *Neurol.* 57: 605-612, 2001.

Atkinson RC, Shiffrin RM.: The control of short-term memory. *Sci Am.* 225: 82-90, 1971.

Banks PK, Meyer K, Brodie AM.: Regulation of ovarian steroid biosynthesis by estrogen during proestrus in the rat. *Endocrinol.* 129: 1295-1304, 1991.

Barron AM, Pike CJ.: Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed).* 4: 976-997, 2012.

Belviranli M, Atalik KE, Okudan N, Gökbel H.: Age and sex affect spatial and emotional behaviors in rats: The role of repeated elevated plus maze test. *Neurosci.* 27: 1-9, 2012.

Boonen S, Vanderschueren D, Cheng XG, Verbeke G, Dequeker J, Geusens P, Broos P, Bouillon R.: Age-related (type II) femoral neck osteoporosis in men: biochemical evidence for both hypovitaminosis D- and androgen deficiency-induced bone resorption. *J Bone Miner Res.* 12: 2119-2126, 1997.

Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN.: Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain.* 99: 459-496, 1976.

Cui HX, Li S, Gu P, Shi GM.: Effects of androgen on learning and memory ability and hippocampus neurons in SAMP8 mouse. *Jieyou Xuebao* 39: 365-369, 2008.

Daniell HW.: Osteoporosis after orchiectomy for prostate cancer. *J Urol.* 157: 439-444, 1997.

Davis, A.M., Ward, S.C., Selmanoff, M., Herbison, A.E., McCarthy, M.M.: Developmental sex differences in amino acid neurotransmitter levels in hypothalamic and limbic areas of rat brain. *Neurosci.* 90:1471-82, 1999.

El-Bakri NK, Islam A, Zhu S, Elhassan A, Mohammed A, Winblad B, Adem A.: Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors: relationship to Morris water maze performance. *J Cell Mol Med.* 8: 537-544, 2004.

Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL.: Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science.* 241(4861): 84-86, 1988.

Fan W, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Sato T, Kawano H, Kato S, Nawata H.: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes.* 54: 1000-1008, 2005.

Freund TF, Buzsáki G.: Alterations in excitatory and GABAergic inhibitory connections in hippocampal transplants. *Neurosci.* 27: 373-385, 1988.

Gandy S, Naslund J, Nordstedt C.: Alzheimer's disease. Molecular consequences of presenilin-1 mutation. *Nature.* 411: 654-656, 2001.

Gentile MA, Nantermet PV, Vogel RL, Phillips R, Holder D, Hodor P, Cheng C, Dai H, Freedman LP, Ray WJ.: Androgen-mediated improvement of body composition and muscle function involves a novel early transcriptional program including IGF1, mechano growth factor, and induction of

{beta}-catenin. J Mol Endocrinol. 44: 55-73, 2010.

Gibbs RB, Gabor R.: Long-term treatment with estrogen and progesterone enhances acquisition of a spatial memory task by ovariectomized aged rats. Neurobiol Aging. 21: 107-116, 2000.

Gillett MJ, Martins RN, Clarnette RM, Chubb SA, Bruce DG, Yeap BB.: Relationship between testosterone, sex hormone binding globulin and plasma amyloid beta peptide 40 in older men with subjective memory loss or dementia. J Alzheimers Dis. 5: 267-269, 2003.

Glinioer D, McGuire RA, Gershengorn MC, Robbins J, Berman M.: Effects of estrogen on thyroxine-binding globulin metabolism in rhesus monkeys. Endocrinol. 100: 9-17, 1977.

Guyton AC, Hall JE.: Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Elsevier Ed., Rio de Janeiro, 2005.

Handelmann G, Meyer DK, Beinfeld MC, Oertel WH.: CCK-containing terminals in the hippocampus are derived from intrinsic neurons: an immunohistochemical and radioimmunological study. Brain Res. 224: 180-184, 1981.

Hasselmo ME, Sarter M.: Modes and models of forebrain cholinergic neuromodulation of cognition. Neuropsychopharmacol. 36: 52-73, 2011.

Hogervorst E, Williams J, Budge M, Barnetson L, Combrinck M, Smith AD.: Serum total testosterone is lower in men with Alzheimer's disease. Neuro Endocrinol Lett. 22: 163-168, 2001.

Hörtnagl H, Berger ML, Havelec L, Hornykiewicz O.: Role of glucocorticoids in the cholinergic degeneration in rat hippocampus induced by ethylcholine aziridinium (AF64A). J Neurosci. 13: 2939-2945, 1993.

Huerta PT, Lisman JE.: Heightened synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons during a cholinergically induced rhythmic state. Nature. 364:

723-725, 1993.

Lizcano F, Rodríguez JS.: Thyroid hormone therapy modulates hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocr J.* 58: 137-142, 2011.

伊藤尚志, 横田行史, 田久保憲行, 柴山啓子, 大津成之, 下浜真里子, 狐崎雅子, 釧持学, 野渡正彦, 松浦信夫, 山上祐次, 石井正浩.: 濾紙血 TSH, freeT4 同時測定によるクレチン症マスキング~当院における 5 年間の結果~. *日マス・スクリーニング学会誌.* 16: 45-51, 2006.

Inada M, Matsumoto C, Miyaura C.: Animal models for bone and joint disease. Ovariectomized and orchidectomized animals]. *Clin Calcium.* 21: 164-170, 2011.

岩佐弘一, ト部 諭, 本庄英雄.: 老人性痴呆と予防の可能性 ホルモン補充療法によるアルツハイマー病の予防的効果について. *婦人科治療.* 74: 281-285, 1997.

岩本晃明, 馬場克幸, 中澤龍斗.: 加齢による Androgen 減退の実態. *Geriatr Med.* (老年医学) 43: 183-189, 2005.

Jorm AF, Korten AE, Henderson AS.: The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand.* 76: 465-479, 1987.

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P.: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* 270: 1491-1494, 1995.

Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T.: Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med.* 85: 447-452, 1976.

北村 文月, 山本 昌恵, 今本 喜久子, 新穂 千賀子.: 卵摘による閉経モデルラットへのエストロゲン補充の影響. *滋賀医大看護学ジャーナル.* 7(1): 4-10, 2009.

Konigsmark BW: Methods for the counting of neurons. In: Nauta WJH, Ebesson SOE, eds. *Research Methods in Neuroanatomy*. Springer-Verlag, Berlin, 315-340, 1970.

LeBlanc ES, Janowsky J, Chan BK, Nelson HD.: Hormone replacement therapy and cognition: systematic review and meta-analysis. *J Am Med Assoc*. 21: 1489-1499, 2001.

Lorenzo J.: A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J Clin Invest*. 111: 1641-1643, 2003.

Manly JJ, Merchant CA, Jacobs DM, Small SA, Bell K, Ferin M, Mayeux R.: Endogenous estrogen levels and Alzheimer's disease among postmenopausal women. *Neurol*. 54: 833-837, 2000.

Marr, D.: Simple memory: A theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 262: 23-81, 1971.

松脇貴志, 西原真杉: 性ステロイドの中樞作用. *Hormone Front Gynecol*. 14(2): 123-129, 2007.

Mendelsohn ME, Karas RH: The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 340: 1801-1811, 1999.

Miller KK, Lupica CR.: Morphine-induced excitation of pyramidal neurons is inhibited by cholecystokinin in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *J Pharmacol Exp Ther*. 268(2): 753-761, 1994.

Miyamoto M, Kato J, Narumi S, Nagaoka A.: Characteristics of memory impairment following lesioning of the basal forebrain and medial septal nucleus in rats. *Brain Res*. 419: 19-31, 1987.

宮川康, 辻村晃, 高田晋吾, 奥山明彦: 男性更年期における精巣機能. *Pharma Medica* 23: 25-29, 2005.

村上千夏, 加藤龍二, 鍋島麗子, 鎌田邦栄, 中村幹雄.: 八放射迷路課題の空間学習過程に対する慢性 scopolamine 投与の影響. 杏林医会誌 33(4): 358-365, 2002.

Moffat SD, Zonderman AB, Metter EJ, Kawas C, Blackman MR, Harman SM, Resnick SM.: Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. Neurol. 62: 188-193, 2004.

森祐一, 村田善晴, 今村修治, 谷能之, 三浦義孝, 大磯ユタカ, 妹尾久雄, 松井信夫: Estrogen によるラット Thyroxine-Binding Globulin(TBG)遺伝子発現の促進. 日内分泌会誌 68: 310-310, 1992.

Morris RGM: Spatial localization does not require the presence of local cues. Learn Motiv. 12: 239-260, 1981.

名和田新, 田中誠一, 高柳涼一: 骨粗鬆症とステロイドホルモン. 診断と治療 83: 840-846, 1995.

Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Kato A, Carr CA, Johnston D, Wilson MA, Tonegawa S.: Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. Science. 297: 211-218, 2002.

Ohkura T, Isse K, Akazawa K, Hamamoto M, Yaoi Y, Hagino N.: Evaluation of estrogen treatment in female patients with dementia of the Alzheimer type. Endocr J. 41(4): 361-371, 1994.

Okajima K, Harada N.: Promotion of insulin-like growth factor-I production by sensory neuron stimulation; molecular mechanism(s) and therapeutic implications. Curr Med Chem. 15: 3095-3112, 2008.

O'Keefe J, Nadel J.: The hippocampus as a cognitive map. Clarendon Press, Oxford, 1978.

Olton DS, Samuelson RJ.: Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. J Exp Psychol. 2: 97-116, 1976.

Park JH, Bonthius PJ, Tsai HW, Bekiranov S, Rissman EF. Amyloid beta precursor protein regulates male sexual behavior. *J Neurosci.* 30: 9967-9972, 2010.

Pedersen SB, Børglum JD, Møller-Pedersen T, Richelsen B.: Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 85: 13-19, 1992.

Perry E, Perry R, Blessed G, Tomlinson BE.: Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *Lancet.* 1: 189, 1977.

Perry E, Walker M, Grace J, Perry R: Acetylcholine in mind; A neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* 22: 273-280, 1999.

Phillips SM, Sherwin BB.: Variations in memory function and sex steroid hormones across the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinol.* 17: 497-506, 1992.

Porterfield SP, Hendrich CE. The role of thyroid hormones in prenatal and neonatal neurological development-current perspectives. *Endocr Rev.* 14: 94-106, 1993.

Resnick SM, Metter EJ, Zonderman AB.: Estrogen replacement therapy and longitudinal decline in visual memory. A possible protective effect? *Neurol.* 49: 1491-1497, 1997.

Roy EJ, Wade GN.: Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Horm Behav.* 8: 265-274, 1977.

Rush DK.: Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behav Neural Biol.* 50: 255-274, 1988.

Singh M, Meyer EM, Millard WJ, Simpkins JW.: Ovarian steroid deprivation

results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 644: 305-312, 1994.

Soebijanto K, 佐竹宏之, 權藤健二郎, 花井敏男.: 発達の遅れを主訴とした中枢性甲状腺機能低下症の2乳児例. *脳と発達.* 41: 344-344, 2009.

Tanaka K, Inada M, Mashio Y, Ishii H, Naito K, Nishikawa M, Takahashi K, Imura H.: Characteristics of rT3 5'-monodeiodination in rat brain: comparison with T4 and T3 5'-monodeiodinations. *Acta Endocrinol (Copenh).* 101: 371-376, 1982.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, Andrews H, Mayeux R.: Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet.* 348(9025): 429-432, 1996.

谷向務, 吉田定宏, 二ノ宮裕三.: マウス哺乳期の味覚受容とその発達変化について. *小児歯誌* 30(2): 369-369, 1992

Wade GN, Gray JM.: Gonadal effects on food intake and adiposity: a metabolic hypothesis. *Physiol Behav.* 22: 583-593, 1979.

Wang C, Cunningham G, Dobs A, Iranmanesh A, Matsumoto AM, Snyder PJ, Weber T, Berman N, Hull L, Swerdloff RS. : Long-term testosterone gel (AndroGel) treatment maintains beneficial effects on sexual function and mood, lean and fat mass, and bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2085-2098, 2004.

米田俊之: 新しい骨のバイオサイエンス. 羊土社, 東京, 114-130, 2002.

Yamaguchi S, Aoki N, Kitajima T, Iikubo E, Katagiri S, Matsushima T, Homma KJ.: Thyroid hormone determines the start of the sensitive period of imprinting and primes later learning. *Nat Commun.* 3: 1081, 2012.

Yamaguchi M, Katoh S, Morimoto C, Sakayama K, Shiosaka T, Masuno H, Okuda H.: The hormonal responses of lipoprotein lipase activity and lipolysis in adipose tissue differ depending on the stage of the estrous cycle in female

rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 26: 610-617, 2002.

Yanase T, Fan W, Kyoya K, Min L, Takayanagi R, Kato S, Nawata H.: Androgens and metabolic syndrome: lessons from androgen receptor knock out (ARKO) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 109: 254-257, 2008.

Yokosuka M, Ohtani-Kaneko R, Yamashita K, Muraoka D, Kuroda Y, Watanabe C.: Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias. *Toxicol In Vitro*. 22(1): 1-9, 2008.

杠岳文：乳頭体の細胞計測学的研究—正常加齢と痴呆疾患について—。慶應医学. 67: 35-50, 1990.

Zhao FG, Wang WJ, Zhou WJ.: Effect of gengnianchun recipe on learning memory function and hippocampal cholinergic system in ovariectomized rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*. 28: 234-237, 2008.

Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG.: Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci*. 6: 2950-2967, 1986.