

ラットの放射状迷路学習および  
海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす  
思春期後の餌形状の影響

2010 年度筑波大学博士論文

高瀬 堅吉

## 目次

はじめに	1
第1章 序論	4
第1節 空間学習の性差に関する研究動向	4
1. ヒトにおける報告	
2. ラットにおける報告	
第2節 空間学習の性差出現に関わる三つの要因	9
1. 脳の性分化	
2. 成熟後の性腺ステロイドホルモン環境	
3. 出生後の外部環境	
第3節 空間学習に関わる海馬体の役割	16
1. 海馬体の構造	
2. 海馬体の機能	
3. 海馬体におけるアセチルコリンの役割	
第4節 本研究の目的	29
第2章 離乳後の餌形状がラットの海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響	
第1節 離乳後に餌形状を操作したラットの海馬アセチルコリン系の検討【実験1、2】	31
第2節 第2章の考察	41
第3章 思春期後の餌形状がラットの放射状迷路学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響	

ルコリン系の性差出現に及ぼす影響

第 1 節	思春期後に餌形状を操作したラットの放射状迷路学習の検討 【実験 3】	47
第 2 節	思春期後に餌形状を操作したラットの海馬アセチルコリン系の 検討【実験 4】	52
第 3 節	通常飼育したラットの海馬アセチルコリン系の発達変化の検 討【実験 5】	56
第 4 節	第 3 章の考察	60
第 4 章	総合考察	64
第 5 章	結論および今後の課題と展望	67
第 1 節	結論	67
第 2 節	今後の課題と展望	68
概要		69
引用文献		73

はじめに

多くの報告が、ヒトを含む哺乳類の空間学習に性差が存在することを示唆している (Beatty, 1984; Williams and Meck, 1984; Jones et al., 2003; Jonasson, 2005)。空間学習の性差出現に関わる神経機構は全て明らかにされているわけではないが、雄は雌に比べて、空間学習を測定する多くの課題 (空間学習課題) で優れた成績を示している (Einon et al., 1980; Galea and Kimura, 1993; Endo et al., 1994; Seymoure et al., 1996; Dabbs Jr. et al., 1998; Moffat et al., 1998; Cimadevilla et al., 1999; Lacreuse et al., 1999; Silverman et al., 2000; Saucier et al., 2002; Takase et al., 2005)。

中隔核およびブローカの対角帯核から海馬体へと投射するコリン作動性ニューロン (海馬アセチルコリン系) は空間学習において重要な役割を果たすことが示唆されている (Jakab and Leranth, 1995; Walsh et al., 1996; Cassel et al., 2002)。実際、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの上昇は空間学習課題の成績を改善する (Fadda et al., 2000; Liu et al., 2000; Marriott and Korol, 2003)。さらに、アセチルコリンの分泌に伴い海馬体ではシータ波が発生し、シータ波は記憶に深く関わりと示唆されている長期増強や細胞増殖を引き起こすことが報告されている (Pavlides et al., 1988; Givens and Olton, 1990; Stewart and Fox, 1990; Mohapel et al., 2005; Tozuka et al., 2005)。自由行動状態のラットの海馬体において細胞外アセチルコリンレベルを24時間測定した報告は、アセチルコリンレベルが、ラットが眠っている明期に低く、活動する暗期に高いことを示し、暗期におけるアセチルコリンレベルは、雄が雌に比べて高いことを示している (Masuda et al., 2005)。

一連の報告は、空間学習の性差の神経機構に海馬アセチルコリン系が深く関わることを示唆している。

ラットの場合、出生後の外部環境が空間学習や海馬アセチルコリン系の性差出現に影響を及ぼすことが報告されている。例えば、外的刺激が多い豊環境で飼育されたラットでは、雄が雌に比べて空間学習課題の一つである放射状迷路課題で優れた成績を示すが、外的刺激が少ない貧環境で飼育された場合、雌が雄に比べて優れた成績を示した (Einon et al., 1980)。また、狭いケージで4日間個別飼育されたラットでは、雄は放射状迷路課題の成績が低下し (Mitsushima et al., 2001)、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルも低下したが (Mitsushima et al., 1998)、雌には影響が見られなかった (Masuda et al., 2005)。これらの報告は、空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に出生後の外部環境が影響することを示唆している。

外部環境の一つである餌形状もまた、ラットの空間学習の性差出現に影響を及ぼすことが報告されている。固形餌で飼育されたラットでは、雄が雌に比べて放射状迷路課題で優れた成績を示したが、固形餌を砕いて作成した粉餌で飼育した場合、雌の成績が改善し、性差は認められなかった (Endo et al., 1994)。しかし、餌形状が海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響は未だ明らかにされていない。そこで、実験1では、Endo et al. (1994) の方法に従い、3週齢の離乳以降、固形餌で飼育したラットと、固形餌を砕いて餌形状を変えた粉餌で飼育したラットの海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差を *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて検討した。次に実験2では、海馬体へと投射するコリン作動性ニューロンの数を、抗コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 抗体を用いたコリン作動性ニューロンの免疫組織化学

により検討した。

Krasnoff and Weston (1976) は、空間学習の性差が、思春期前では認められず、思春期後に出現することを報告している。これは、思春期後の何らかの要因が空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に関わっていることを示唆している。そこで、実験3、4では、性成熟が完成する6週齢以降（思春期後）、固形餌で飼育したラットと、固形餌を砕いて餌形状を変えた粉餌で飼育したラットの放射状迷路学習の性差を調べ（実験3）、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差を*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて検討した（実験4）。また、Krasnoff and Weston (1976) の報告は、海馬アセチルコリン系の性差が、思春期前では見られず、思春期後に出現することを示唆しているため、実験5では、4週齢の思春期前のラットと9～12週齢の思春期後のラットの海馬体における細胞外アセチルコリンレベルを*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて比較検討した。

## 第1章 序論

### 1.1 空間学習の性差に関する研究動向

#### 1.1.1 ヒトにおける報告

近年、多くの空間学習課題において、男性は女性に比べて優れた成績を示すことが報告されてきた。報告された性差は決して顕著な差ではないが、少なくとも白人の成人男女では再現性を持って確認された (Maccoby and Jacklin, 1974)。McGee (1979) はヒトの空間学習能力を二つに分類し、その性差を論じている。一つは空間視覚化能力である。これは、二次元もしくは三次元の物体が絵として呈示された際に心的回転を遂行する能力である。もう一つは空間定位能力である。これは、自己またはある対象を空間内に定位する能力であり、地図読解課題や視覚迷路学習課題、そして複雑な幾何的図形の並びから単純な図形を見つけ出す埋没図課題などにより測定することができる。いずれの空間学習課題においても男性は女性に比べて良い成績を示し、この知見は確かであるように思われた。しかし、研究対象が白人の成人男女から他の対象へと広がりを見せるに伴い、報告間での研究結果の不一致が認められるようになった (Sherman, 1978; McGee, 1979; Hines, 1982)。

不一致は二つ認められる。一つは空間学習の性差における人種差の存在である。白人の成人男女で認められた空間学習の男性優位の性差は、黒人で認められた性差と矛盾し、黒人を対象とした研究では女性優位の性差が認められている (Schratz, 1978; Jahoda, 1980)。もう一つは空間学習の性差出現時期の不一致である。Maccoby and Jacklin (1974) は、空間学習の男性優位の性差は、思春期後では認められるが、思春期

前では認められないことを報告した。しかし一方で、空間学習の男性優位の性差は思春期前に既に認められるという報告も存在する (Keogh, 1971; Herman and Siegel, 1978)。実際、Roberts (1971) は、空間学習課題の一つであるWISC Block Design Testで、思春期前の6歳から12歳の白人男児が白人女児に比べて優れた成績を示したと報告している。上述の空間学習の性差に関わる人種差の存在や、性差出現時期の不一致は、空間学習の性差が生物学的要因のみで説明できないことを示唆している (Sherman, 1978; Nash, 1979)。

空間学習の性差を生物学的要因により説明したX染色体関連説は、X染色体上の遺伝子が空間学習能力を低下させるため、X染色体を二つ持つ女性が、それを一つしか持たない男性に比べて空間学習能力が劣ると説明している。X染色体関連説は、様々な空間学習課題を用いて検討され、初期の研究ではこの説を支持する結果が得られた (Stafford, 1961)。しかし、その後の研究結果はこの説を支持しなかった (McGee, 1979, 1982; Vandenberg and Kuse, 1979)。

ターナー症候群の患者を対象とした研究も、X染色体関連説を支持しない研究の一例である。ターナー症候群の女性はX染色体を一つしか持っていない。しかし、X染色体関連説から予測される結果とは異なり、空間学習課題において、患者は健常な女性と比べてとりわけ悪い成績を示した (Money, 1964)。以降、X染色体関連説は考慮されなくなったが、ターナー症候群の患者を対象とした研究は、空間学習の性差出現に性腺ステロイドホルモンが関与しているのではないかという新たな生物学的要因に基づく仮説を導いた。それは、ターナー症候群の主症状に卵巣の瘢痕化による二次性徴の欠如、認知機能の低下が認められ、その治療に性腺ステロイドホルモンの投与が用いられたためであった。しか



し、1980年代以前にこの仮説を検証した研究結果は、それを支持しなかった。当時の研究は、正常レベルより高い濃度のアンドロジェン、エストロジェン、プロジェステロンに暴露された女性の空間学習能力が、健常な女性と比べて差がないことを報告している(Reinisch et al., 1979)。

Baker and Ehrhardt (1974)、McGuire et al. (1975)が行った研究も、周産期に副腎由来のアンドロジェンに大量暴露された先天性副腎皮質過形成症の女性で、空間学習能力が健常な女性と比べて差がないことを報告している。しかし、1980年代以降の副腎皮質過形成症の患者を対象とした研究は、一転して患者の女性が優れた空間学習能力を示したと報告している(Resnick and Berenbaum, 1982)。

以降、空間学習の性差に関する研究は、その要因が生物学的要因に基づくのか、またはそれ以外の要因に基づくのかという点が議論されなくなり、新しい仮説、すなわち空間学習の性差出現に及ぼす性腺ステロイドホルモンの影響に注目が集まった。そして、アンドロジェンが直接作用するのか、または芳香化の後、エストロジェンに変換されて作用するのかという作用機序が研究の焦点となった。この点について、アンドロジェン受容体を欠くアンドロジェン不応症の男性が健常女性と同様に運動性知能指数よりも言語性知能指数で高いスコアを示すことから、エストロジェン受容体は脳の雄性化に寄与しない可能性が示唆されている(Masica et al., 1969)。実際、妊娠中にエストロジェンやプロジェステロンに曝露された母親から生まれた女性の空間学習能力は、健常な女性と比べて差が認められない(Reinisch et al., 1979; Hines, 1982)。さらに、Hines and Shipley (1983)は、妊娠期間の5ヶ月間、合成エストロジェンであるジエチルスチルベストロールを摂取した母親から生まれた女性でも、健常な女性と比べて空間学習能力に差が認められな

いことを明らかにしている。一連の研究は、エストロゲンではなくアンドロゲンが空間学習の性差出現に影響を及ぼすと示唆している。

これまでの研究動向を概観すると、ヒトの空間学習の性差出現において、出生前のアンドロゲン曝露、それに伴う脳の性分化が空間学習の性差出現の要因であるという説が多くの研究者に支持されている。しかし、ヒトを対象とした研究は、内分泌系に異常を呈した患者を対象としており、被験者数は極めて少ない。さらに、空間学習の性差そのものが顕著な差ではないため、課題の種類や年齢のばらつきなどに注意を払う必要がある。従って、上述の研究結果は慎重に解釈されなければならない。また、空間学習の性差が、ある人種に限定して認められる点や、性差出現時期に不一致が認められる点は、空間学習の性差が生物学的要因のみでは説明できないことを示唆している。

#### 1.1.2 ラットにおける報告

ヒトの空間学習の性差出現要因を明らかにするためには、学習の性差についての適切な動物モデルを構築する必要がある。ラットでは、Lashley三型迷路課題やHebb-Williams迷路課題のような空間学習課題の成績に既に性差が認められており、ヒトの空間学習の性差の研究から予測されるように雄は雌に比べて優れた空間学習能力を示すことが知られていた (Beatty, 1979)。この理由から、空間学習の性差の研究には現在でもラットが頻繁に用いられており、本研究でもラットを対象に実験を行った。

ラットを対象とした一連の先行研究は、1) 空間学習の性差が思春期後までは顕在化しないこと (Krasnoff and Weston, 1976)、2) 思春期後の去勢は空間学習の雄性優位の性差に影響を与えないことを明ら

かにした (Joseph et al., 1978)。この二つの結果は、空間学習の性差出現に、脳に及ぼす性腺ステロイドホルモンの活性作用ではなく形成作用、すなわち脳の性分化が重要であることを示唆している。また、脳の性分化の重要性を支持するように、新生仔期のホルモン環境の操作は、雌雄ラットの空間学習能力に多大な影響を及ぼしている。例えば、新生仔期のプロピオン酸テストステロン投与は、雌の空間学習能力を改善するが (Dawson et al., 1975; Stewart et al., 1975; Joseph et al., 1978)、同時期の精巣摘除は雄の空間学習能力を減弱すると報告されている (Dawson et al., 1975; Joseph et al., 1978)。一連の研究結果を通じて、ラットでは脳の性分化が空間学習の性差出現に重要な役割を果たすと考えられるようになった。

その後の研究では、ヒトの研究と同様にアンドロジェンが直接作用するのか、または芳香化酵素によりエストロジェンに変換されて作用するのかということが研究の焦点となった。この点について、抗アンドロジェン作用を示す酢酸シプロテロンを投与すると雄の空間学習能力は減弱することが報告されている (Joseph et al., 1978)。さらに、新生仔期にエストロジェンを投与すると雄の成体期における空間学習能力は改善されるというよりは、むしろ減弱されることから、エストロジェンは、空間学習課題の成績上昇に重要ではないことが示唆された。しかし残念なことに、新生仔期にテストステロン、ジヒドロテストステロン、およびエストロジェンを雌雄それぞれに投与して、空間学習能力を同一実験内で検討した研究は現在まで例が無く、同様に、エストロジェン受容体の拮抗剤や、芳香化酵素や還元酵素の阻害剤の影響を検討した研究も見られない。従って、これらの基礎的な知見が得られるまでは、空間学習の性差出現に及ぼす性腺ステロイドホルモンの影響は不明瞭なま

までである。

ラットの空間学習の性差出現要因については、初期の研究から生物学的要因、すなわち性腺ステロイドホルモンの関与が広く支持され、出生後の外部環境の関与は考慮されなかった。しかし、Einon (1980) は、離乳後から外的刺激が多い豊環境で飼育されたラットでは空間学習に雄性優位の性差が認められるが、外的刺激が少ない貧環境で飼育されたラットでは逆に雌性優位の性差が認められることを報告した。また、17方向放射状迷路を用いたTees et al. (1981) の研究は、恒暗条件下で飼育されたラットで、より性差が顕著になることを報告している。さらに、Endo et al. (1994) は、通常の給餌環境下で飼育したラットでは空間学習に雄性優位の性差が認められるが、通常給餌で用いられる固形餌を砕いて作成した粉餌で飼育したラットでは、雌の空間学習能力が改善され、性差が認められないことを報告している。これらの結果は、出生後の外部環境も空間学習の性差出現に重要な役割を果たすことを示唆する。

## 1.2 空間学習能力の性差出現に関わる3つの要因

前節で述べたように、ヒトおよびラットの空間学習の性差出現要因に、脳の性分化が広く支持されている。しかし、出生後の外部環境が性差出現に影響を及ぼす可能性も否定できない。本節では、これらの要因に加え、成熟後の性腺ステロイドホルモン環境、すなわち性腺ステロイドホルモンの活性作用も含めて、それぞれについて概説していく。

### 1.2.1 脳の性分化

ラットでは、周生期の精巣から分泌されるアンドロジェンが、性腺刺激ホルモン分泌様式の雌雄差や性行動の雌雄差の決定要因になること

が知られている。雄の精巣を出生後数日以内に摘出すると、遺伝的に雄でありながら、成熟後の性腺刺激ホルモンが周期的分泌パターンを示すようになり、内分泌学的に雌性化し、性行動のパターンも雌性化する。一方、雌に生後1週間以内にアンドロジェンを投与すると成熟してから無排卵になり、遺伝的には雌でありながら性周期を示さなくなり、雄の性行動を示すようになる。このことから、性腺刺激ホルモンの内分泌調節機構や性行動の神経調節機構はラットでは新生仔期においては未分化で、この時期に精巣から分泌されたアンドロジェンが脳に影響を及ぼすことによって脳に性分化が起こることがわかる (Phoenix et al., 1959; Pfaff, 1966; Gorski et al., 1978)。

脳の性分化の敏感期は動物によって異なり、妊娠期の長い種では胎生期に起こる。ヒトの脳の性分化の敏感期については、実験不可能であるので詳細は不明であるが、ヒト胎児の血中アンドロジェン濃度を調べてみると、男性胎児では妊娠16週あたりをピークとして、12〜24週の間には胎児の精巣から大量のアンドロジェンが分泌されることが知られており、このアンドロジェンのシャワーによって男性胎児の脳が性分化すると考えられている (Winter et al., 1976; Griffin et al., 1980)。

アンドロジェンの代謝経路には、 $5\alpha$ -還元酵素の働きにより $5\alpha$ -ジヒドロテストステロンになる経路と、芳香化酵素の働きによって $17\beta$ -エストラジオールになる経路がある。ラットを用いた研究から、アンドロジェンの代わりにエストロジェンを投与すると脳の性分化が誘起可能であることが明らかにされた。また逆に、アンドロジェンと芳香化酵素阻害剤を同時に投与するとアンドロジェンの効果が無くなることや、単独で $5\alpha$ -ジヒドロテストステロンを投与してもやはり効果がないことが報告されている。これらの結果を踏まえ、現在では周生期に精巣から

分泌されるアンドロジェンが、芳香化酵素の働きにより脳内でエストロジェンに変換されて、それが作用して脳が性分化すると説明されている。しかしながら、エストロジェンの投与は空間学習能力を雄性化しないことが既に報告されており、このことはラットの空間学習の性差出現要因が性分化のみに求められないことを示唆している (Joseph et al., 1978)。

性分化という概念はPhoenix et al. (1959) が初めに提唱した。その後、多くの研究が行われ、性分化について大きく二つの事柄が明らかにされた。一つは、性分化はエストロジェンが脳領域の神経細胞新生に影響を与えた結果起こる現象ではなく、性分化開始時に存在する細胞にプログラム細胞死を引き起こす、いわゆる細胞の「刈り込み」によって成立する現象であるということである (McCarthy and Konkle, 2005)。例えば、視索前野の性的二型核は、成体期のラットでは、雄が雌に比べて5倍から7倍の大きさであるが、出生後間もないラットでは雌雄間に大きさの差は認められない。そして、出生後1週間以内に雌の視索前野の性的二型核で細胞死が引き起こされ、その結果、形態学的な性差が形成されることがその後明らかとなった。この細胞死は出生直後のアンドロジェンまたはエストロジェンの投与で抑制された。このような生後間もない頃の敏感期に形成された形態学的性差は頑強であり、一生涯維持される。

性分化について解明された二つ目の事柄は、性分化に伴う性特異的なシナプス形成が経験依存的ではないという点である。例えば、視覚野のシナプス形成は網膜から直接的または間接的に伝達される刺激に依存して行われ、バレル野のシナプス形成も頬髭から伝達される刺激に依存して行われる。しかし、性分化に伴うシナプス形成はホルモン依存的であり、とりわけエストロジェンが重要な役割を果たしている。そして近

年、この細胞内メカニズムについても解明が進んでいる (Simerly, 2002; Morris et al., 2004)。

では、果たして空間学習に深く関わりと示唆されている海馬体においても性分化は起こりうるのでしょうか。新生仔期のラットの海馬体では、少量の芳香化酵素と多くのエストロジェン受容体の発現が認められ、生後1週間以内に成体期のラットのレベルまで減少することが知られている (O'Keefe et al., 1990, 1993; MacLusky et al., 1994; Miranda et al., 1994)。そのため、アンドロジェンが芳香化を受けてエストロジェンに変換され、それが終脳でも性分化を起こすという仮説が一部の研究者によって提唱されている。そしてこの研究は、終脳におけるエストロジェンレベルが新生仔期の雌に比べて雄で高いことを示し、そのため終脳が性分化し、雄性ラットは空間学習に適した神経機構を備えると解釈している。例えば、雄の海馬体は雌に比べて大きく、形態学的性差を認める報告がある (Madeira and Lieberman, 1995; Nuñez et al., 2000)。この性差は生後1週間以内に形成され、視索前野の性的二型核と同様に、性特異的なプログラム細胞死によって形成されることを支持する報告もある (Hilton et al., 2003; Nuñez et al., 2003)。しかしながら、性差は小さく、再現性が無いとの報告も一方であり (McCarthy and Konkle, 2005)、海馬体が性分化するか否かについては依然として議論の余地がある。

### 1.2.2 成熟後の性腺ステロイドホルモン環境

遺伝的雌雄の決定に引き続いて起こる生殖腺の性分化により、遺伝的雄には精巣が、雌には卵巣がそれぞれ備わる。このような生殖腺の性分化はY染色体上にある精巣決定因子によって引き起こされ、これは

sex-determining regionと呼ばれる14塩基対の遺伝子であることが確認された (Sinclair et al., 1990)。精巣はアンドロジェンを主に分泌し、卵巣はエストロジェンを主に分泌する。しかしながら、ヒトやラットにおいて、思春期前はこれら性腺ステロイドホルモンの血中濃度に性差は認められず、思春期後に差が出現することが報告されている (Döhler and Wuttke, 1975; Winter et al., 1976; Griffin et al., 1980; Boron and Boulpaep, 2002)。

成熟後の性腺ステロイドホルモン環境が空間学習の性差に及ぼす影響はヒトで報告されているが、いずれも男性優位の性差が示されている。ヨーロッパや北米で行われた大規模調査研究は、男性の血中テストステロン濃度が秋に高く春に低いことを明らかにした。この血中テストステロン濃度の季節性の変動に相関して空間学習能力も変動することが報告されている (Kimura and Hampson, 1994)。また、血中テストステロン濃度は早朝に最も高いことが知られているが、この概日性の変動も空間学習能力と相関する (Moffat and Hampson, 1996)。女性では月経周期を通じて血中エストロジェン濃度が変動するが、この変動に伴い空間学習能力も同様に変動する (Hampson, 1990a, b)。

一方、ラットでは、思春期後の去勢は空間学習に影響を及ぼさないことが報告された (Joseph et al., 1978)。しかし、その後の研究は、放射状迷路課題、モリス水迷路課題において、去勢後に成績が低下することを明らかにし、アンドロジェンやエストロジェンの補充により低下した成績が改善することを示した (Daniel et al., 1997, 2006; Bimonte-Nelson et al., 2003; El-Bakri et al., 2004; Sandstrom et al., 2006)。また、空間学習に深く関わりと示唆されている海馬体で、去勢後に神経細胞のスパイン密度が減少すること、そして、減少したスパイ



ンは、アンドロジェンやエストロジェンの補充により増加することが報告された (Woolley and McEwen, 1992; Leranth et al., 2003)。

さらに、記憶に深く関わりと示唆されている長期増強も、成熟後の性腺ステロイドホルモン環境の影響を受けることが明らかにされている。長期増強とはシナプス前神経細胞の軸索に高頻度刺激を与えることにより、それまでよりも大きなシナプス後電位が得られ、長時間にわたってシナプス伝達効率が上昇する現象である。この長期増強後のシナプス後電位の大きさは、去勢した雌性ラットでは低下し、エストロジェンの補充により回復することが知られている (Córdoba Montoya and Carrer, 1997)。また、長期増強後のシナプス後電位の大きさは雌の性周期を通じて変動し、エストロジェンの血中濃度が最も高い発情前期の午後に最も大きいことが報告された。さらに、雄の長期増強後のシナプス後電位の大きさは、発情前期の雌と差が認められないことが明らかにされた (Warren et al., 1995)。この結果は、発情前期の雌の空間学習能力が雄と比べて差が認められないことを示唆している。しかし、放射状迷路学習の訓練は性周期をそろえて実施できないため、発情期や発情間期のエストロジェンレベルの影響で雌の成績が低下すると解釈されている。しかし、去勢して発情間期と同じエストロジェンレベルを常に示す雌の空間学習能力は通常の雌と比べて高いため、長期増強の研究結果から予測される学習課題の成績は得られていない (Stackman et al., 1997)。またヒトでも同様に、エストロジェンの血中濃度が低い黄体期に女性は優れた空間学習能力を示すことが報告されている (Hampson, 1990a, b)。

### 1.2.3 出生後の外部環境

現在まで、多くの空間学習課題において男性優位の性差が報告されて

きたが (Maccoby and Jacklin, 1974)、研究対象が白人の成人男女から広がりを見せると、報告間の不一致が認められた (Sherman, 1978; McGee, 1979; Hines, 1982)。報告間の不一致とは空間学習の性差の人種差と性差出現時期の不一致である。つまり、白人の成人男女で認められた空間学習の男性優位の性差は、黒人で認められた性差とは逆であり (Schratz, 1978; Jahoda, 1980)、性差出現時期も思春期後であるという報告と思春期前であるという報告が混在している (Keogh, 1971; Maccoby and Jacklin, 1974; Herman and Siegel, 1978)。このように、空間学習の男性優位の性差がある人種に限定して認められる点や、性差出現時期に報告間で不一致が認められる点は、空間学習の性差出現に先述の生物学的要因以外の要因、すなわち出生後の外部環境が影響を及ぼすことを示唆している (Sherman, 1978; Nash, 1979)。

Einon (1980) はラットの空間学習について雄性優位の性差を報告したが、この性差は離乳後から豊環境で飼育されたラットでのみ認められた。また、17方向放射状迷路を用いた Tees et al. (1981) の研究では、恒暗条件下で飼育されたラットは、性差がより顕著であった。さらに、Juraska et al. (1985) はラットを外的刺激の少ない貧環境で飼育した場合には、海馬体の樹状突起の数は雄が雌に比べて多いが、外的刺激の多い豊環境で飼育した場合には、雌の方が多いことを明らかにした。

Juraska et al. (1988) は、脳の性分化および出生後の外部環境という各要因が、空間学習能力の発達に与える影響の程度を示す大変興味深い報告を行った。すなわち、出生後間もなく去勢した雄性ラットを貧環境または豊環境で飼育し、海馬体の樹状突起の数を測定した。その結果、去勢した雄を貧環境で飼育した場合は、樹状突起の数が通常の雄に比べて減少していたが、豊環境で飼育した場合は通常の雄と比べて差が認め

られなかった。この結果は、アンドロジェン不在により雌性化した海馬体が出生後の外部環境により通常の雄と同じように機能する可能性を示している。また、Endo et al. (1994) は、通常給餌環境で用いられる固形餌で飼育したラットでは空間学習に雄性優位の性差が認められるが、固形餌を砕いて餌形状を変えた粉餌で飼育した場合、雌の空間学習能力が改善され、性差が消失することを報告した。この結果も、出生後の外部環境が空間学習の性差出現に重要な役割を果たすことを示唆している。とりわけ興味深い点は、Endo et al. (1994) の研究が、空間学習の性差出現に対して影響がないと考えられていた通常の固形餌の給餌が性差出現に関与することを示唆した点である。空間学習の性差出現要因を検討した研究に用いられたラットは、すべて固形餌給餌で飼育されたと考えられる。この点を鑑みると、過去の先行研究で得られた知見、すなわち、脳の性分化が空間学習の性差出現に影響を及ぼす可能性をさらに検討する必要がある。そして、その検討を行う以前に、まず基準となる飼育環境がどちらかの性にとって不利に働くかもしれない状況を統制して検討を進めなければ、空間学習の性差が生物学的要因に帰属するものなのか否かを結論づけることはできない。

### 1.3 空間学習に関わる海馬体の役割

海馬体は哺乳類の中樞神経系の中で比較的詳しく研究されている脳領域である。理由は二つある。一つは、形態学的に極めて特徴的な構造を有している点である。海馬体は、海馬、歯状回 (dentate gyrus)、海馬台複合体、嗅内皮質 (entorhinal cortex) から成る。海馬体の内部は、神経細胞の細胞体と、その神経網が層状に並び、非常に精緻な層を形成している。海馬、歯状回、海馬台複合体の一部は細胞層が単層であり、

その上下を低細胞密度の層と無細胞層が挟んでいる。一方、海馬台複合体の残りの部分と嗅内皮質は複数の層から成る。

海馬体が詳細に研究されている二つ目の理由は、1950年代前半頃から海馬体が学習、記憶に重要な役割を果たすことが報告され始めたからである。とりわけ、Scoville and Milner (1957) の報告は後の神経心理学研究に多大な影響を与えた。これは、H.M.という患者の報告であった。彼は癲癇治療の目的で両側の海馬体を含む内側側頭葉を切除する手術を受けたが、その後、新しい情報を学習し、長期的に記憶する機能に障害を呈した。この報告を境に、学習、記憶の神経機構を理解する目的で、海馬体は形態学、生理学、心理学などの分野で盛んに研究されるようになった。現在では海馬体と学習、記憶との関係は疑いの無いものとなっている。また、空間学習に海馬体が重要な役割を果たすことが、ラットなどの動物を対象とした実験から明らかにされた。本節では、空間学習に関わる海馬体の構造的、機能的特徴を述べ、続いて、空間学習に重要な役割を果たすと考えられる海馬アセチルコリン系の働きについて詳説する。

### 1.3.1 海馬体の構造

巨視的に観察すると、海馬は細長く伸ばされた構造をしていて、その長軸方向がアルファベットのC型に湾曲している。軸の吻側は中隔核付近から始まり、間脳を巻き込むように外尾側の側頭葉へと伸びている。海馬の長軸を「septotemporal軸 (septotemporal axis)」、短軸を「transverse軸 (transverse axis)」と呼ぶ (Fig. 1)。

海馬体の一領域である歯状回は三層から成る。中心を成す「顆粒細胞層 (granule cell layer)」、そのすぐ下に細胞密度が極めて低い「分子

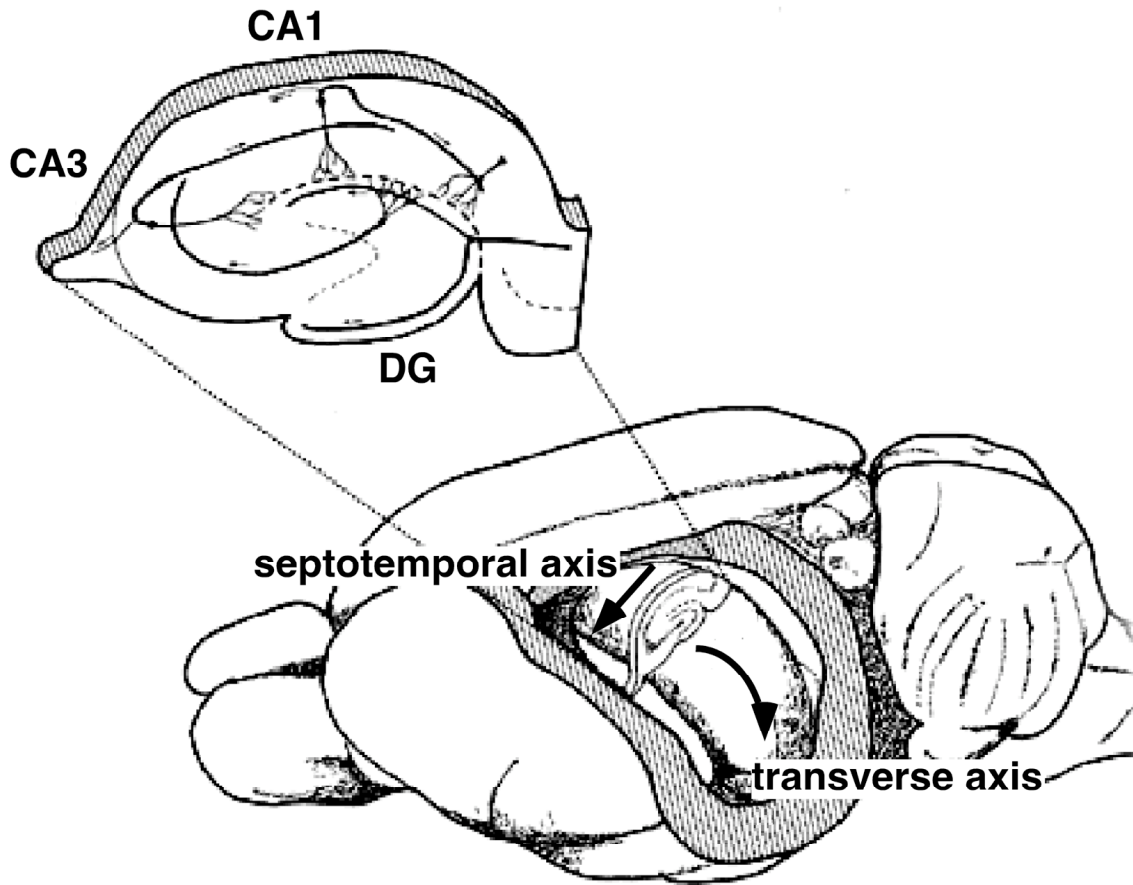


Fig. 1 The schematic illustration of the hippocampal formation in rats. DG, dentate gyrus. (The Synaptic Organization of the Brain, Ed: Gordon M. Shepherd, Oxford University Press (2003) より改変)

層 (molecular layer)」、そして上に位置する「多形細胞層 (polymorphic cell layer)」の三層である。多形細胞層は、別名「歯状回門」とも呼ばれる。一方、海馬では「錐体細胞層 (pyramidal cell layer)」と呼ばれる主要層があり、その上下にさらに細かい層が存在する (Fig. 2)。

歯状回の主要な細胞は顆粒細胞であり、海馬では錐体細胞である。海馬の錐体細胞層は細胞の大きさと形から、さらにCA1、CA2、CA3と三つに分類される (Lorente de Nó, 1934)。歯状回の顆粒細胞は樹上突起を細胞体層と垂直の方向に伸ばし、そこで数種類の細胞とシナプスを形成している。この樹上突起は、顆粒細胞の細胞体の尖った頂点様の部分のみから起始している。また、顆粒細胞の軸索は、そのシナプス終末の独特な外見から「苔状線維」と呼ばれ、苔状線維は細胞体の基底部から起始し、歯状回門へと伸長している。苔状線維は歯状回門に存在する「苔状細胞」と呼ばれる介在細胞など、いくつかの神経細胞に投射している。また、苔状線維は歯状回門を出ると束になり、CA3の透明層 (stratum lucidum) に入り込む。

海馬の錐体細胞は、細胞体層を挟んで両方向に樹上突起を伸ばしているため、「多極細胞」と呼ばれ、尖端樹上突起は、細胞体の頂点側から起始し、海馬の中心方向へ伸びている。CA3ではこの樹状突起は、透明層、放線層 (stratum radiatum)、網状分子層 (stratum lacunosum-moleculare) の三領域を縦に貫いている。逆により短い基底樹状突起は細胞の底辺から上昇層 (stratum oriens) に伸びている

Lorente de Nó (1934) は、海馬をCA1、CA2、CA3の三つに分類した。Lorente de NóはCA4を分類したが、これは歯状回門に相当し、現在CA4という言葉はラットの脳では使われていない。そして、CA3に存在する錐体細胞は歯状回の苔状線維からの入力を受けているがCA1と

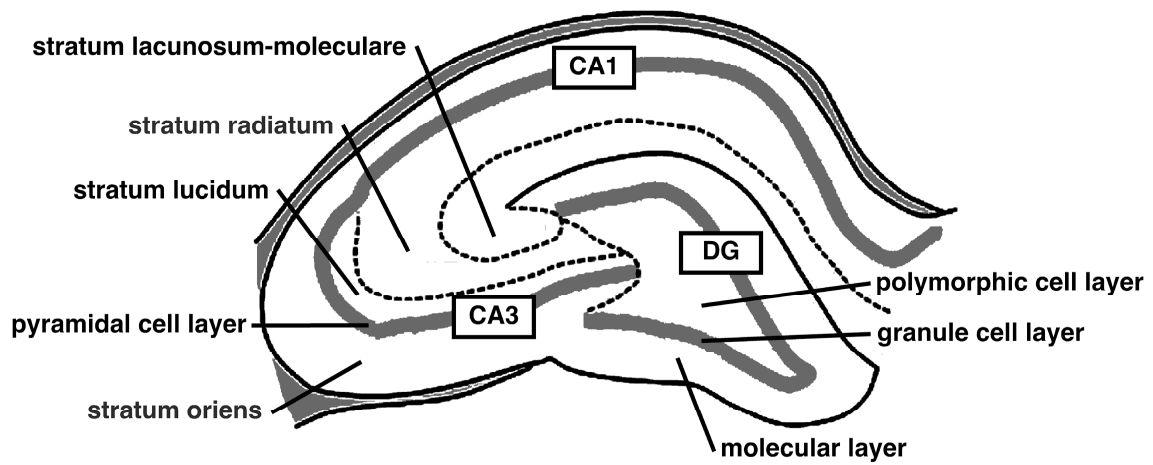


Fig. 2 The schematic illustration of the coronal section of the hippocampal formation in rats. DG, dentate gyrus. (The Synaptic Organization of the Brain, Ed: Gordon M. Shepherd, Oxford University Press (2003) より改変)

CA2の錐体細胞は受けていない。

一般に興奮性入力スパイン上にシナプスを形成するが、錐体細胞の樹状突起はスパインに覆われている。とりわけ、苔状線維がシナプスを形成するCA3の錐体細胞の近位樹状突起にある棘状瘤は、神経系でも特に巨大なスパインである。棘状瘤は複雑に枝分かれしており、棘状瘤一個は苔状線維ボタン一個で覆われている。その他のCA3の錐体細胞のスパインと、CA1の錐体細胞のスパインは大脳皮質に似た標準的なスパインを形成しており、このスパインも興奮性のシナプスを形成する。

海馬には介在細胞も存在し、それは主にガンマアミノ酪酸（GABA）を放出するGABA作動性ニューロンである。存在する場所やシナプス標的によって、大きく三つに分類できる。軸索-軸索間細胞、籠細胞、重層状細胞である。その名前が示すように、軸索-軸索間細胞は、錐体細胞の軸索起始部にシナプスを形成している。籠細胞は、一つの錐体細胞に対して多重にシナプスを形成しており、その神経網が錐体細胞の細胞体を包む籠のようになっていることから籠細胞と呼ばれている。重層状細胞は、錐体細胞の先端樹状突起と基底樹状突起の両方に投射している。つまり、この三種の介在細胞の軸索出力の標的には領域的にほとんど重なりはないが、樹状突起については、三種いずれも放線層や上昇層に投射しており、近傍の錐体細胞からの局所入力を受けている（Buhl et al., 1996; Halasy et al., 1996a, b）。また、介在細胞同士の間にも、相互抑制を行う回路が存在することも明らかにされた。相互抑制回路は、介在細胞の活動を同期させ、後述するシータ波やガンマ波など、さまざまな周波数の振動を発生させる役割を担っていると考えられている（Jefferys and Whittington, 1996）。

海馬体のおおまかな神経回路は1900年頃から知られているが、詳細は



その後の研究によって解明されたものである (Fig. 3)。Andersen et al. (1971) は海馬体の各部位を一方向につなぐ特徴的な回路の重要性を主張し、これを「三シナプス性回路」と名付けた。感覚情報の多くは嗅内皮質を通じて海馬に流れ込むので、嗅内皮質を三シナプス性回路の開始地点と考えることが多い。嗅内皮質は隣り合った二つの皮質領域から情報を受けている。それらは、嗅周囲皮質 (perirhinal cortex)、嗅後部皮質 (postrhinal cortex) と呼ばれ、複数の感覚情報を嗅内皮質に送っている (Burwell, 2000)。この入力 of の多くは興奮性である (Martina et al., 2001)。また、膨大部後方皮質 (retrosplenial cortex) も感覚情報の源となっている (van Groen and Wyss, 1992; Wyss and van Groen, 1992)。

嗅内皮質の第二層に存在する神経細胞は貫通線維を経由して、歯状回や海馬CA3領域に投射している。貫通線維という名前は軸索が海馬台複合体を貫いて投射していることに由来している。内側嗅内皮質の細胞は歯状回分子層の中間層に特異的に投射し、一方、外側嗅内皮質は分子層の外側三分の一の部分に投射している。これらの二種の貫通線維は、CA2やCA3の網状分子層にも同様の投射パターンを形成している。

嗅内皮質第三層の神経細胞は歯状回やCA3には投射せず、CA1や海馬台複合体の一部である海馬支脚 (subiculum) に投射している。この投射は層の構造が不明瞭で、むしろ形態的に秩序を持って配置される。つまり、外側嗅内皮質から伸びる軸索はCA1と海馬支脚の境界付近の網状分子層に投射しており、内側嗅内皮質はCA3寄りのCA1網状分子層と海馬台複合体の一部である前海馬支脚 (presubiculum) の分子層に投射している。

歯状回は三シナプス性回路の次のステップを担っている。歯状回は苔

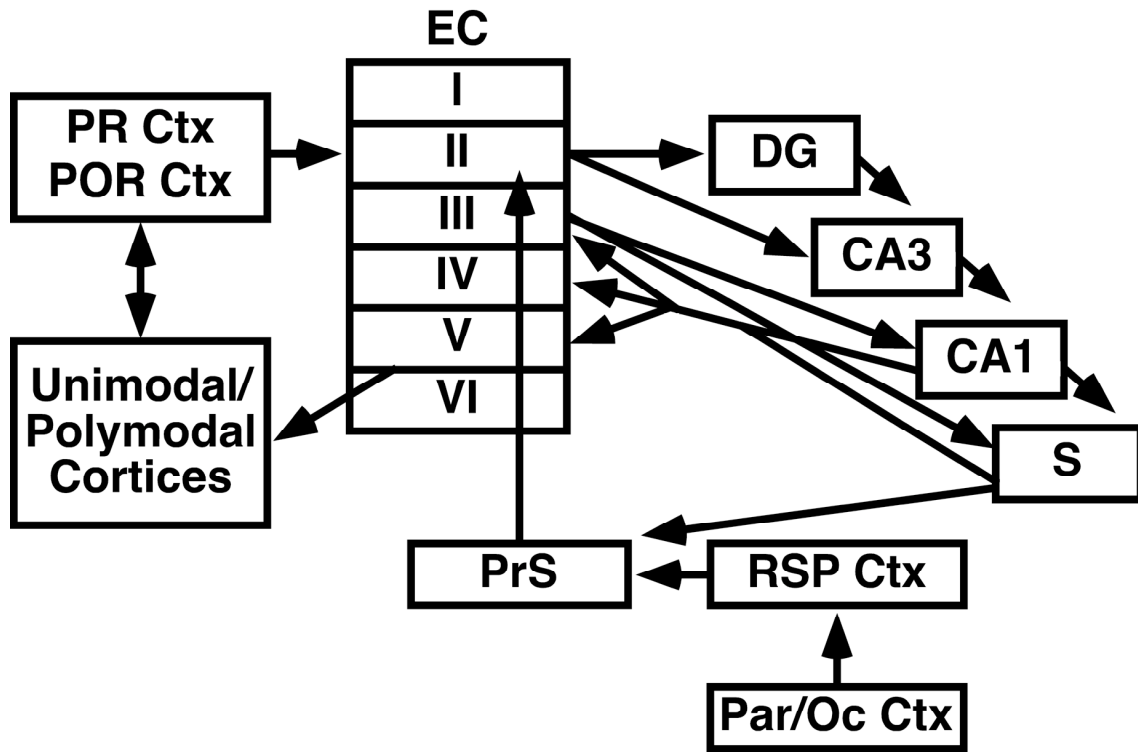


Fig. 3 The schematic illustration of the neural circuit in the hippocampal formation in rats. Ctx, cortex; DG, dentate gyrus; EC, entorhinal cortex; Par/Oc Ctx, parietal or occipital cortex; POR Ctx, postrhinal cortex; PR Ctx, perirhinal cortex; PrS, presubiculum; RSP Ctx, retrosplenial cortex; S, subiculum. (The Synaptic Organization of the Brain, Ed: Gordon M. Shepherd, Oxford University Press (2003) より改変)

状線維を通じてCA3の錐体細胞の近位樹状突起に投射している。顆粒細胞は、また歯状回門の苔状細胞に投射し、この苔状細胞は、CA1錐体細胞だけでなくCA3錐体細胞にも強い投射をしている。このうちCA1錐体細胞への投射軸索はシャッフアー側枝と呼ばれている。CA1の錐体細胞は嗅内皮質の深層と海馬支脚に投射している。海馬支脚もまた嗅内皮質の深層に投射している。そして深層の嗅内皮質は、始めに嗅内皮質に情報を送っていた他の皮質へと投射している。Fig. 3には描いていないが、海馬体内では他にも様々な情報の伝達が相互に行われており、特定の皮質領域から嗅内皮質へと入力された情報は、上述の興奮性回路を通じて海馬体全体を巡り、最終的に同じ場所に回帰する。情報はこの回路を巡回する間に加工され、この処理工程がおそらく長期記憶に情報を留めるために重要であると考えられている。学習中の空間情報も上述の三シナプス性回路を辿り、長期的には皮質へ記憶されると考えられる。

### 1.3.2 海馬体の機能

海馬体の機能について有力な説は学習、記憶との関係である（Milner et al., 1998; Eichenbaum, 2000）。ある脳部位が損傷されると、非可逆的に重度の順行性健忘が生じることは、100年近く前から既に知られていた。こうした患者は、毎日の生活で起こった出来事の記憶を想起することができない。つまり、学習、記憶機能が障害されている。現在では、海馬体を含む脳の損傷で、こうした症状が引き起こされることが明らかにされている。

最もよく知られた例は、H.M.という男性患者である。彼は若い頃、生命が危ぶまれる程の重度の癲癇を煩っていた。1953年、H.M.は両半球の海馬体を含む内側側頭葉を切除する手術を受けた。この手術は癲癇

発作を軽減させたが、劇的な副作用が現れた。H.M.は手術後から、新しい情報を長い間保持しておくことが出来なくなった。しかし、H.M.の精神状態は概ね正常であった。

その後も両側の海馬体に損傷がある患者の例が続々と報告された。1986年、患者R.B.の症例が、Zola-Morgan et al. (1986) によって報告された。R.B.は冠動脈バイパスの手術中、脳虚血に陥った。事故発生から5年後にR.B.は神経心理学的な試験を受けた。H.M.の場合と同様に、R.B.は顕著な学習、記憶障害を呈したが、手術前の記憶に関しては、ほとんど障害が認められなかった。R.B.の死後、脳を解剖したところ、症状に関係していそうな病理的な変異は、海馬CA1の錐体細胞の完全な脱落のみであった。R.B.の健忘はH.M.よりも症状が軽かったので、学習、記憶障害の程度は、海馬体や周辺の皮質がどの程度の範囲まで損傷を受けたかに依存していると考えられる。いずれにせよ、海馬体を含む脳障害が、臨床上、重篤な健忘症を引き起こすことは明らかである。

ラットやマウスなどの動物で学習、記憶障害を評価する試験法は、ヒトの試験法とはずいぶんと多くの側面で異なっているが、海馬体の破壊でヒトと類似した学習、記憶障害が生じることが知られている。空間学習課題の一つにモリス水迷路がある。この課題では、ラットを乳白色の水を満たした小さなプールに入れて強制的に泳がせる。プールには動物からは見えないように小さなプラットフォームを水面下に置いておく。このプラットフォームは動物が水から逃避できるための浅瀬となっている。ラットは試験を繰り返すうちに実験室の様々な外的刺激、すなわち空間情報を手がかりにプラットフォームの場所を学習していく。そして、水泳開始時点からプラットフォームへ到達する時間は徐々に短縮されていく。海馬体を破壊された動物では、この試験の成績が劇的に低下し、実質上

まったくプラットホームの位置を覚えることができなくなる (Eichenbaum et al., 1990)。また、同じく空間学習課題の一つである放射状迷路でも同様の結果が認められている (Olton, 1983)。

海馬体の神経細胞はある環境に置かれると、何らかの刺激によって活性化されることが電気生理学的実験によって示された。例えば、迷路内を自由に走り回るラットの海馬体神経細胞の個々の活動を記録すると、特定の細胞は迷路の特定の場所を通過する時に活動することが解る。これは「場所細胞」と呼ばれる海馬体の細胞である。こうしたデータから、外界を認知するための地図が海馬体の中に形成されているものと推測されている (O'Keefe, 1979)。より一般的な意味では、海馬体の神経細胞は、様々に活性化されるユニットの組み合わせ、つまり集成体として働くことで、現在の経験を内部表象していると考えられることもできる。おそらく、こうした海馬体の内部表象と、大脳新皮質に存在するより詳細な経験情報が相互作用することによって、長期的な記憶が形成されるのであろう (Wilson and McNaughton, 1993, 1994)。これらの電気生理学的なデータが示唆することは、海馬体の神経細胞がある特定の情報に選択的に反応する訳ではなく、むしろ行動のすべてを表す内部表象を一時的に記憶しておく、いわば短期記憶貯蔵庫として働いているということである。この内部表象が後に再生されることで、大脳新皮質の長期的な記憶に置き換えられていくのだらう (Eichenbaum, 2001; Haist et al., 2001)。実際、徐波睡眠中に海馬体で覚醒時の行動が内部再生されることが、既に示唆されている (Hoffman and McNaughton, 2002)。

海馬体は非常に特徴的な電場の揺らぎ活動を示すが、これが学習、記憶に関与している可能性がある。動物が環境を探索する時には、5-10 Hzのシータ波の脳波が記録される (O'Keefe, 1979; Buzsáki, 1989,

2002)。探索をやめ、静かにしている時は、シータ波の変わりに、不規則に生じる大きな鋭波が記録される。これら二つのタイプの脳波は相互に排他的であって、同時には生じない。シータ波を出している時は、海馬体は新しい内部表象を獲得しており (Huerta et al., 2000; Mehta et al., 2000)、一方、鋭波を出しているとき、または徐波睡眠中には、海馬体は新皮質へと記憶の固定を促進しているとの説もある (Sutherland and McNaughton, 2000; Jarosiewicz et al., 2002)。そして、このシータ波の発生に、アセチルコリン系が重要な役割を果たしていると考えられる。

### 1.3.3 海馬体におけるアセチルコリンの役割

海馬体への最も重要な調節性入力の一つは中隔核およびブローカ対角帯からの入力で、これらに起始核を持つコリン作動性ニューロンは脳弓を介して海馬体に入る。歯状回では、とりわけ歯状回門に強い投射が認められ、わずかではあるが分子層にも投射が見られる。中隔核およびブローカ対角帯から歯状回へはグルタミン作動性ニューロンやGABA作動性ニューロンの投射も認められるが、中隔核からの全投射のうち30～50%、ブローカ対角帯からの全投射のうち50～75%はコリン作動性である (Amaral and Kurz, 1985; Wainer et al., 1985)。電子顕微鏡を用いた詳細な検討は行われていないが、歯状回に存在する多くの神経細胞がコリン作動性の神経支配を受けている。実際、Deller (1999) は苔状細胞がコリン作動性の神経支配を受けていることを示している。CA1は後述するCA3とほぼ同程度か、もしくはわずかに弱い投射を中隔核から受けている (Nyakas et al., 1987)。CA3への中隔核およびブローカ対角帯からの投射は、主に上昇層に終始しており、放線層に投射するのは少ない (Nyakas et al., 1987; Gaykema et al., 1990)。

これらのコリン作動性ニューロンの活動に引き続いて起こる海馬体でのアセチルコリン分泌によりシータ波が発生する (Stewart and Fox, 1990)。シータ波は海馬体で起こる長期増強に影響を及ぼす。

長期増強は Bliss et al. によって発見された (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; Bliss and Lømo, 1973)。長期増強はおそらくもっとも盛んに研究されているシナプス可塑性である。その理由は学習、記憶への関与が示唆されているためである (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Nicoll, 1999; Bennett, 2000)。長期増強の機構については現在でもなお議論の余地があるが、以下のような意見の一致が得られている。まず、長期増強は25–200 Hzの高頻度の連発刺激を、特定のシナプス経路に与えることで誘導される。高頻度刺激の時間帯を長期増強の誘導層と呼ぶ。誘導層の後の時間帯を発現相と呼び、ここでは刺激への応答は、高頻度刺激前より50–200%ほど増強している。発現相が誘導相よりも長いことが長期増強の特徴である。通常、誘導相は数秒から1分程度であるが、発現相は数日に及び得る。

もっと短い繰り返し刺激でも長期増強を引き起こすことが可能である。無麻酔の覚醒動物の海馬体は先述のコリン作動性ニューロンの活動に伴い5–10 Hzのシータ波が観察される。シータバースト刺激は、このシータ周期で短い連発刺激を繰り返すような刺激パターンであるが、この刺激は長期増強を効率よく誘導する (Magee and Johnston, 1997; Thomas et al., 1998)。とりわけ、シナプス前細胞とシナプス後細胞の両者を同時にシータ周期で連続刺激する方法は、シータバーストペアリングと呼ばれ、さらに効率よく長期増強を誘導できる。シータ周期の神経活動は実際に探索行動中の脳で観察されるので、シータバースト刺激は単なる高頻度刺激よりも生理的だと考えられている。

Pavlidis et al. (1988) は、シータ波の頂点に同期させて高頻度連続刺激を与えると、長期増強がより容易に生じることを見出した。これらの研究結果は、海馬体でのアセチルコリン分泌が学習に重要な役割を果たすことを示唆している。実際、アセチルコリン受容体を遮断するスコポラミンをラットに投与すると、用量依存的に海馬体のシータ波が抑制され、学習課題の成績が低下することが報告されている (Givens and Olton, 1990)。また、コリン作動性ニューロンを選択的に破壊したラットにコリン作動性ニューロンを移植すると、シータ波が回復して損傷による学習能力の低下も部分的に解消されることが明らかとなっている (Buzsáki et al., 1987; Nilsson et al., 1987; Shapiro et al., 1989)。これらの知見は、海馬体のアセチルコリンレベルと学習能力の間の正の相関関係を示唆し、空間学習の雄性優位の性差が海馬体のアセチルコリンレベルの性差に基づく可能性を示唆している。もし、海馬体のアセチルコリンレベルに雄性優位の性差が認められた場合、その性差が、引き続いて起こる長期増強の過程に影響を与えることが考えられる。実際、Masuda et al. (2005) は、雄性ラットの海馬体の細胞外アセチルコリンレベルが雌性ラットに比べて高いことを報告している。

#### 1.4 本研究の目的

これまでの研究から、空間学習の性差出現の神経機構に海馬アセチルコリン系が関わっていること、さらに、ラットの空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に飼育環境が影響することが示唆された。餌形状もまた、ラットの空間学習の性差出現に影響を及ぼし、Endo et al. (1994) は、ラットが固形餌で飼育された場合、雄は雌に比べて放射状迷路課題で優れた成績を示したが、固形餌を砕いて作成した粉餌で飼育



した場合、雌の成績が改善され、雄と同等の成績を示すことを報告した。興味深い点は、空間学習の性差出現に対して影響がないと考えられていた通常の固形餌の給餌が性差出現に関与することを示唆した点である。しかし、餌形状が海馬アセチルコリン系の性差に及ぼす影響は明らかにされていない。そこで、実験1では、Endo et al. (1994)の方法に従い、3週齢の離乳以降、固形餌で飼育したラットと、固形餌を砕いて餌形状を変えた粉餌で飼育したラットの海馬体における細胞外アセチルコリンレベルを*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて検討した。次に実験2では、海馬体へと投射するコリン作動性ニューロンの数を、抗ChAT抗体を用いたコリン作動性ニューロンの免疫組織化学により検討した。

Krasnoff and Weston (1976)は、空間学習の性差が、思春期前では見られず、思春期後に出現することを報告している。これは、思春期後の何らかの要因が空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に関わっていることを示唆している。そこで、実験3、4では、思春期後、固形餌で飼育したラットと、固形餌を砕いて餌形状を変えた粉餌で飼育したラットの放射状迷路課題の成績を調べ（実験3）、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルを*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて検討した（実験4）。また、Krasnoff and Weston (1976)の報告は、海馬アセチルコリン系の性差が、思春期前では見られず、思春期後に出現することを示唆しているため、実験5では、4週齢の思春期前のラットと9～12週齢の思春期後のラットの海馬体における細胞外アセチルコリンレベルを*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて検討した。

## 第2章 離乳後の餌形状がラットの海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響

### 2.1 離乳後に餌形状を操作したラットの海馬アセチルコリン系の検討【実験1、2】

実験1、2では、空間学習に深く関わりと示唆されている海馬体が、離乳後に給餌する餌の形状の影響で機能的、構造的に変化しているのかという点を検討するため、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルを *in vivo* マイクロダイアリシス法により（実験1）、さらにまた、海馬体へと投射するコリン作動性ニューロンの数を、抗ChAT抗体を用いたコリン作動性ニューロンの免疫組織化学により検討する（実験2）。

#### 方法

##### 1. 被験体

Wistar系雌性ラットを妊娠させた。妊娠させたラットは午前5時から午後7時までを明期とする人工照明下(230 lux)、室温約23℃の状況で、プラスチックケージ（縦47 cm、横31 cm、高さ20 cm）で飼育し、固形餌および水は自由摂取とした。出産の日、同腹仔を10匹（雄5匹、雌5匹）に調整した。3週齢で離乳させ、雌雄別々にプラスチックケージ（同上サイズ）に2～3匹ずつで飼育し、固形餌（Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan）または粉餌による給餌を開始した（Fig. 4）。餌はケージ内に設置したアルミニウム皿（直径13.5 cm、高さ4 cm）に入れて与え（Fig. 5）、自由摂取とすべく、アルミニウム皿は常に餌で満たされた。粉餌

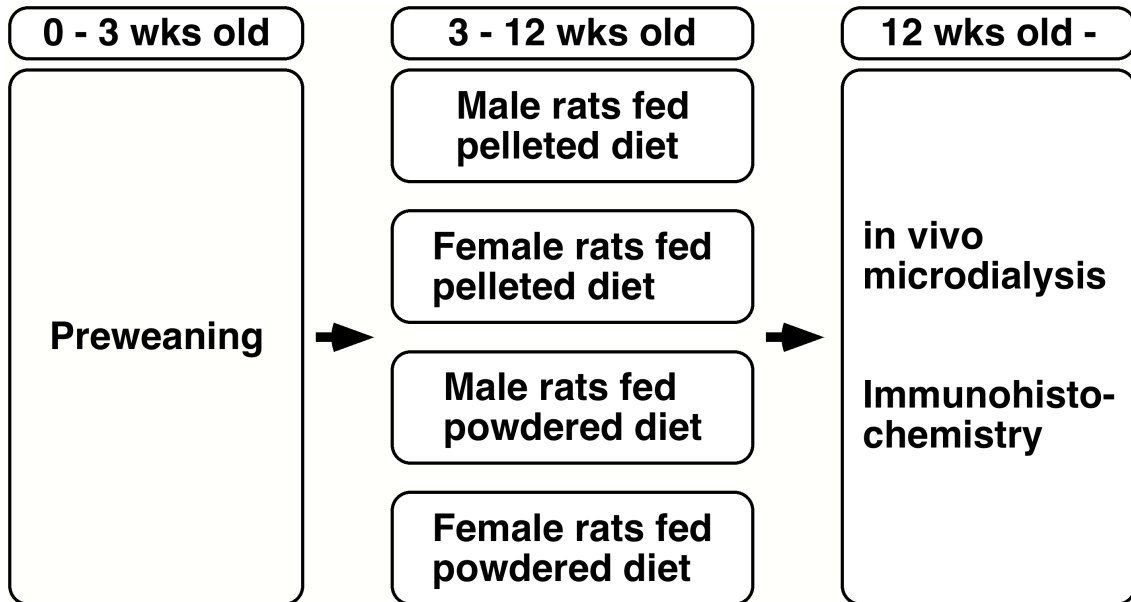


Fig. 4 The schematic illustration of the experimental schedule in Experiment 1 and 2. The pups were weaned at postnatal day 21 and unisex groups of 2-3 rats were housed in plastic cages. They were fed either pelleted or powdered diet made by grinding the pelleted diet. Both sexes of rats were used for the experiments at 12 weeks old.

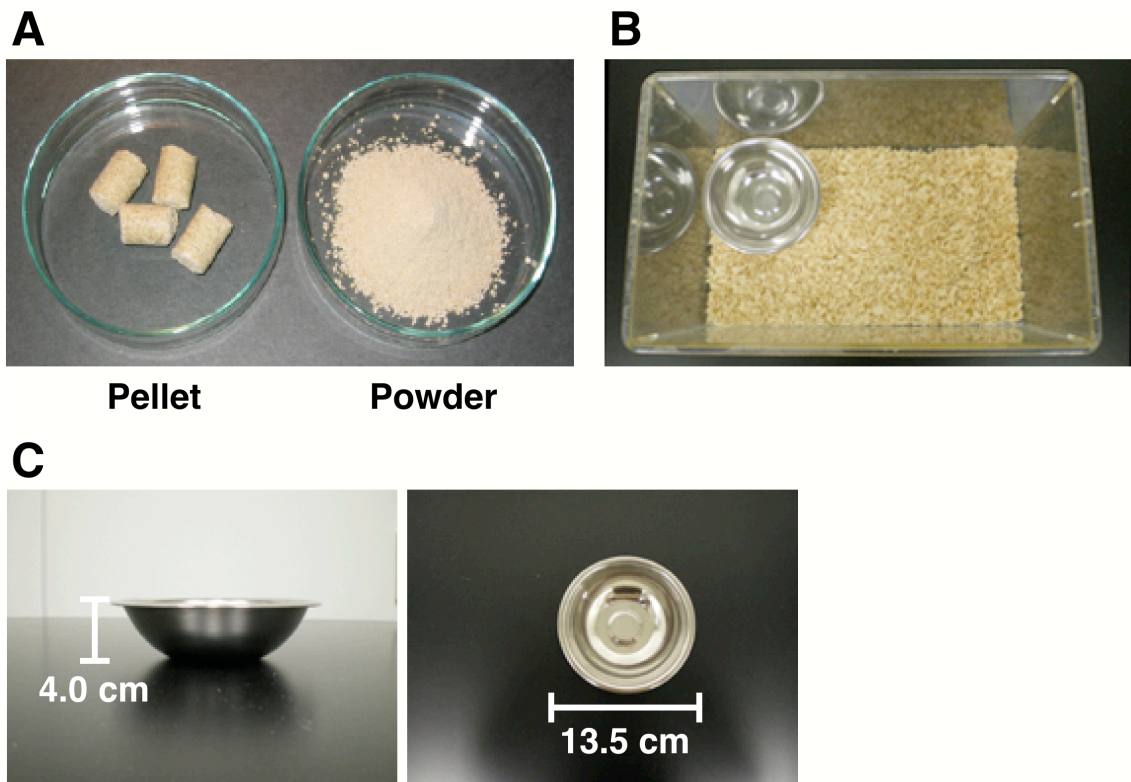


Fig. 5 The photograph of the pelleted and powdered diet (A). The location of the cup (B). The size of the cap (C).

は、はじめに固形餌をハンマーで砕き、次にそれらを電動ミキサーですらに細かく砕き、最後にふるいにかけて作成した (Fig. 5)。固形餌を与えられたラットはアルミニウム皿から餌を取り出し、皿の近くで餌を食べたが、アルミニウム皿から餌を持ち出してケージ内の皿から離れた場所で食べるものもいた。粉餌を与えられたラットはアルミニウム皿から餌を手ですくい、または顔を粉餌に埋めて餌を食べた。

海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの測定および中隔核およびブローカ対角帯核におけるコリン作動性ニューロン数の測定に12週齢のラットを用いた。アセチルコリンレベルの測定に用いたのは、固形餌を給餌した雄7匹、固形餌を給餌した雌6匹、粉餌を給餌した雌雄各6匹であった。中隔核およびブローカ対角帯におけるコリン作動性ニューロン数の測定に用いた被験体は、各群3匹であった。

## 2. *in vivo* マイクロダイアリシス法

ペントバルビタール麻酔下 (31.5 mg/kg, i.p.) で、ラットの海馬CA1からCA3領域内にステンレススチール製ガイドカニューラ (直径0.51 mm) を脳定位的に植え込み、デンタルセメントを用いて固定した。各座標は、Albe-Fessard et al. (1966) の脳地図に基づき、イヤーパーから3.0~3.5 mm前方、正中より3.0 mm側方、脳表面より2.1-2.2 mm下方とした。前後の座標は下記の式を用いて性別と体重に基づき調節した。

雄性ラット ;  $Y = 2.64 + 0.0021X$ 、

雌性ラット ;  $Y = 2.53 + 0.0025X$ 、

Y = イヤーパーからの距離 (mm)、X = 体重 (g)。ガイドカニュー

ラ植え込み後、マイクロダイアリシス実験前日まで、内部にはダミー用のスタイレットを挿入、留置した。術後のラットは、円筒形ケージで個別に飼育し、 $10.7 \pm 1.1$ 日を術後の回復にあてた。この間、雌性ラットの性周期を確認するために膣垢検査を行った。膣垢検査を行う際、実験者は雌性ラットに触れるため、膣垢検査を行わない雄性ラットも雌性ラットと同じ時間触れた。

マイクロダイアリシス実験前日に、軽いエーテル麻酔下でガイドカニューラからスタイレットを引き抜き、先端が1 mmの長さの半透膜から成るプローブを、ガイドカニューラを介して海馬CA1からCA3領域内に刺入した。プローブ刺入直後より、無麻酔、無拘束下で、人工脳脊髄液（147 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>）をマイクロダイアリシスポンプ（CMA/102, Carnegie Medicin, Sweden）を用いて、1.2  $\mu$ l/分の流速で流し始めた。実験開始後は、20分ごとに24時間にわたり、灌流液の採取を行った。雌性ラットは、非発情第1日から非発情第2日にかけて灌流液の採取を行った。

実験終了後はラットの腹腔内にペントバルビタールを注射し、深麻酔を施した。その後、ラットの心臓を露出し、10%ホルマリン溶液を満たしたカニューレを心房に刺入、35 ml/分の流速で15分間の送液を行い、灌流固定した。固定後、脳を摘出し、25%スクロースを含む10%ホルマリン溶液を満たした容器に脳を保存、室温の環境に留置して後固定を行った。48時間後、脳を溶液から取り出し、粉末状のドライアイスで凍結、クライオスタット（MA-101, Yamato Koki Co., Miyagi, Japan）を用いて、50  $\mu$ mの厚さの凍結切片を作成した。組織切片の染色は行わなかった。切片の観察は光学顕微鏡（BX-60, Olympus）の100倍の倍率下で行い、海馬CA1からCA3領域内におけるマイクロダイアリシスプローブ刺

入部位を確認した (Fig. 6)。

### 3. 細胞外アセチルコリンレベルの定量

採取した灌流液中のアセチルコリンレベルは、エチルホモコリンを内部標準物質として、酵素カラムと電気化学検出器を組み合わせた高感度エゼリンフリー高速液体クロマトグラフィシステム (HPLC) (HTEC-500)により定量した。デカスルホン酸ナトリウム (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 200 mg/lを含む0.1 mMリン酸緩衝液 (pH 8.5) を移動相として、150  $\mu$ l/分の流速でHPLC内に流した。灌流液25  $\mu$ lに、エチルホモコリン (100 nM) 25  $\mu$ lを内部標準物質として添加し、その混合溶液を、オートインジェクターを用いてHPLCに注入した。スチレンポリマー分離カラム (AC-GEL, Eicom Co., Japan) により分離された混合溶液中のアセチルコリンをアセチルコリンエステラーゼおよびコリンオキシダーゼが固定された酵素カラム (AC-ENZYMPAK, Eicom Co.) にて、過酸化水素に変換した。その過酸化水素を、プラチナ電極を備えた電気化学検出器により検出した。最小検出量は5–10 fmol/サンプルであった。また、定量したアセチルコリンレベルは、*in vitro*実験から算出した各プローブの回収率で補正し、脳内における局所濃度を算定した。回収率の平均値は $13.0 \pm 0.9\%$ であった。

### 4. 免疫組織化学

明期 (午前5時から午後7時) の9時から10時の間でラットの腹腔内にペントバルビタールを注射し、深麻酔を施した。その後、ラットの心臓を露出し、ヘパリンを含む0.1 Mリン酸緩衝食塩水 (pH 7.4) を満たしたカニューレを心房に刺入、35 ml/分の流速で1分間の送液を行い、脱

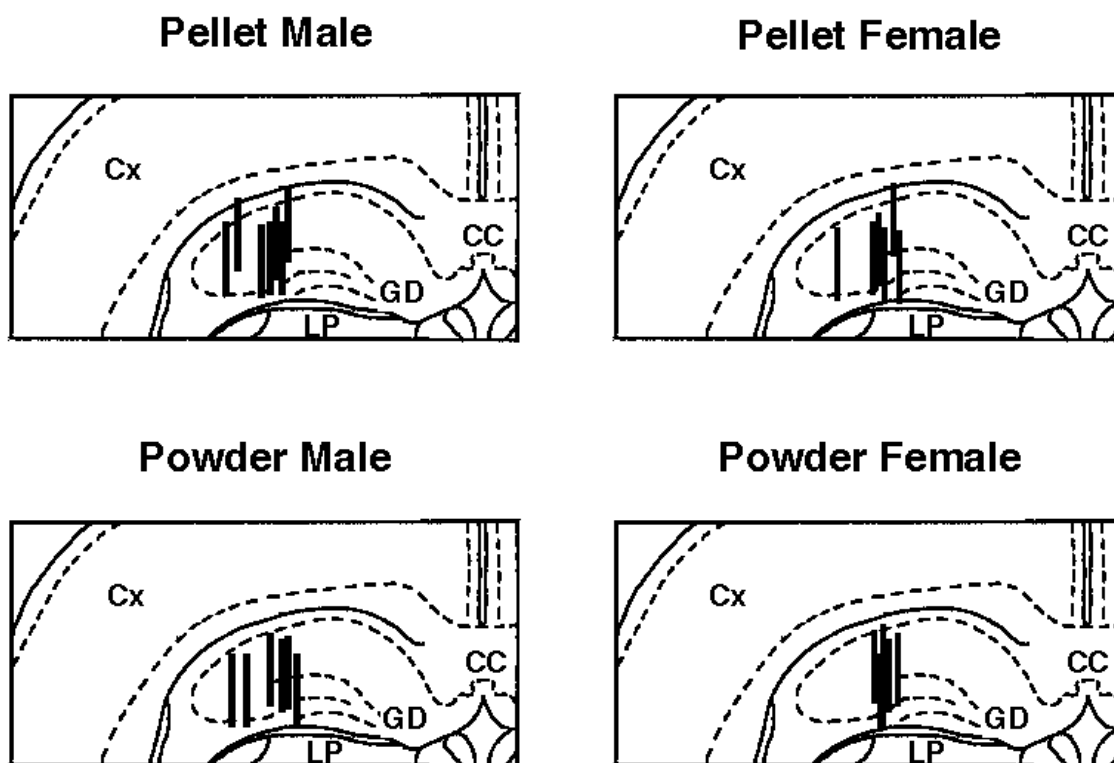


Fig. 6 Schematic illustrations showing locations of the 1.0-mm-long tip of the microdialysis probe in the rat brain. Each probe is represented by a black bar. CC, corpus callosum; Cx, cortex; GD, dentate gyrus; LP, lateral posterior nucleus.



血した。次に、0.2%グルタルアルデヒドを含む4%パラホルムアルデヒド溶液を満たしたカニューレに置換、先程と同じ流速で15分間の送液を行い、灌流固定した。固定後、脳を摘出し、2%パラホルムアルデヒド溶液を満たした容器に保存、4℃の環境に留置して後固定を行った。24時間後、25%スクロースを含む0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) を満たした容器に脳を保存、再び4℃の環境に留置した。48時間後、脳を溶液から取り出し、粉末状のドライアイスで凍結、クライオスタット (OT/FAS, Bright, Cambridgeshire, UK) を用いて、30  $\mu\text{m}$ の厚さの冠状切片を作成した。作成した切片を、0.4% Triton Xを含むリン酸緩衝食塩水に室温で30分間漬け、次に、0.1% Triton Xと3%正常ウサギ血清を含むリン酸緩衝食塩水に室温で60分間漬け、ブロッキングを行った。その後、0.1% Triton Xと3%正常ウサギ血清を含むリン酸緩衝食塩水を溶媒として500倍に希釈した抗ChAT抗体 (AB144P, Chemicon) に室温で24時間漬け、反応させた。一次抗体との反応後、0.1% Triton Xと3%正常ウサギ血清を含むリン酸緩衝食塩水を溶媒として500倍に希釈した二次抗体 (AP106B, Chemicon) に室温で2時間漬け、反応させた。最後に、アビジン-ビオチン化-ホースラデッシュペルオキシダーゼ-複合体法によりニッケル-ジアミノベンチジンで発色させた。組織切片はシリコンコートされたスライドガラスに載せ、脱水し、封入した。

## 5. 組織学的解析

切片の観察は光学顕微鏡 (BX-60, Olympus) のによって100倍の倍率下で行った。中隔核およびブローカ対角帯に対応する切片は、Paxinos and Watson (1986) の脳地図を用いて、各ラットにつき2から4枚を同定した (中隔核はplate15-16、ブローカ対角帯はplate19-20、Fig. 7)。

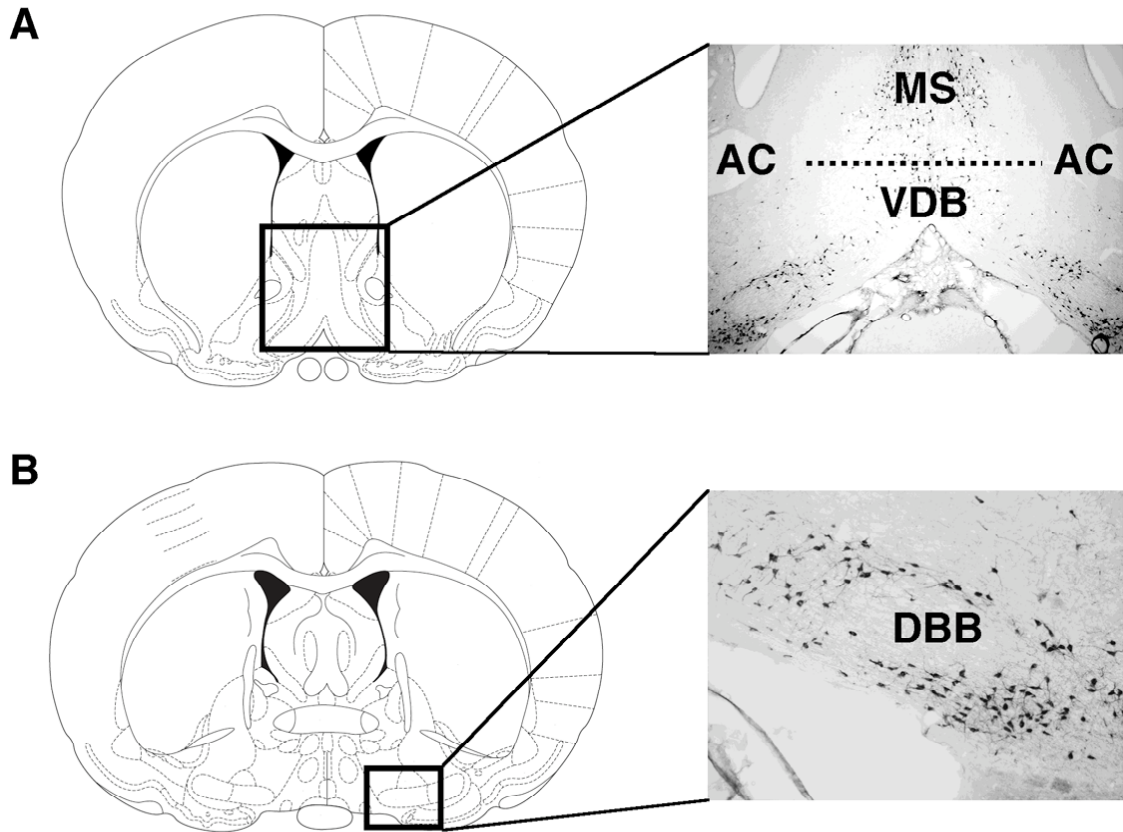


Fig. 7 Schematic coronal views of the normal rat brain. Each square indicates the area where the photomicrographs were taken at a magnification of 40 x. Representative photomicrographs of ChAT immunoreactive cells in the MS (A) and DBB (B). AC, anterior commissure; DBB, diagonal band of Broca; MS, medial septum; VDB, vertical limb of diagonal band of Broca.

各領域に対応する2〜4枚の切片で検出された抗ChAT抗体陽性細胞数の合計を、観察した切片の枚数で割り、その値を各個体の各領域における抗ChAT抗体陽性細胞数とした。中隔核とブローカ対角帯垂直脚は前交連を結んだ仮想の線 (Fig. 7) を引いて分けた (Gibbs, 1996)。

## 6. 統計

性別および餌形状が海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの24時間の変化に及ぼす影響を検討するために、固形餌または粉餌を給餌した雌雄各群のアセチルコリンレベルについて、性別 (雄、雌) × 餌形状 (固形、粉) × 時間経過の三要因分散分析を行った。また、明期 (午前5時から午後7時)、暗期におけるアセチルコリンレベルの性差、さらに餌形状がアセチルコリンレベルに及ぼす影響を検討するために、性別 (雄、雌) × 餌形状 (固形、粉) × 明期対暗期の三要因分散分析を行った。

中隔核およびブローカ対角帯における抗ChAT抗体陽性細胞数の平均値を、性別 (雄、雌) × 餌形状 (固形、粉) の二要因分散分析により解析した。結果は全て平均値±標準誤差で表記し、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

## 結果

Fig. 8A-Dは、固形餌または粉餌を給餌した雌雄ラットの24時間のアセチルコリンレベルの変化を示す。三要因分散分析を行ったところ、時間経過の主効果が認められたが [ $F(71, 1491) = 25.614, p < 0.01$ ]、性別および餌形状の主効果は認められなかった。

Fig. 8E、Fは固形餌または粉餌を給餌した雌雄ラットの明期（午前5時から午後7時）、暗期におけるアセチルコリンレベルを示す。三要因分散分析を行ったところ、明期対暗期 [ $F(1, 21) = 93.772, p < 0.01$ ]の主効果が認められた。また、性別×餌形状 [ $F(1, 21) = 4.862, p < 0.05$ ]の交互作用が認められたので、下位検定により固形または粉の各群におけるアセチルコリンレベルの性差を解析したところ、固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かった [ $F(1, 21) = 5.160, p < 0.05$ ]。しかし、粉餌を給餌したラットでは、雌雄のアセチルコリンレベルに有意な差は認められなかった。さらに、下位検定により各性における餌形状の影響を検討したところ、粉餌を給餌した雄と固形餌を給餌した雄のアセチルコリンレベルに有意な差は認められなかったが、粉餌を給餌した雌のアセチルコリンレベルは固形餌を給餌した雌に比べて有意に高かった [ $F(1, 21) = 9.375, p < 0.01$ ]。

Fig. 9は、固形餌または粉餌を給餌された雌雄ラットの中隔核およびブローカ対角帯における抗ChAT抗体陽性細胞数を示す。中隔核における各群の陽性細胞数を二要因分散分析により解析したところ、性別および餌形状の主効果は認められなかった。また、ブローカ対角帯における各群の陽性細胞数を二要因分散分析により解析したところ、中隔核と同様に、性別および餌形状の主効果は認められなかった。

## 2.2 第2章の考察

実験1では、固形餌で飼育された雌雄ラットの海馬体における細胞外アセチルコリンレベルが午前5時から午後7時の明期で低く暗期に高いこと、雄の方が雌に比べてアセチルコリンレベルが高いことが示された。これは既報と一致する結果であった (Masuda et al., 2005)。また、Gibbs

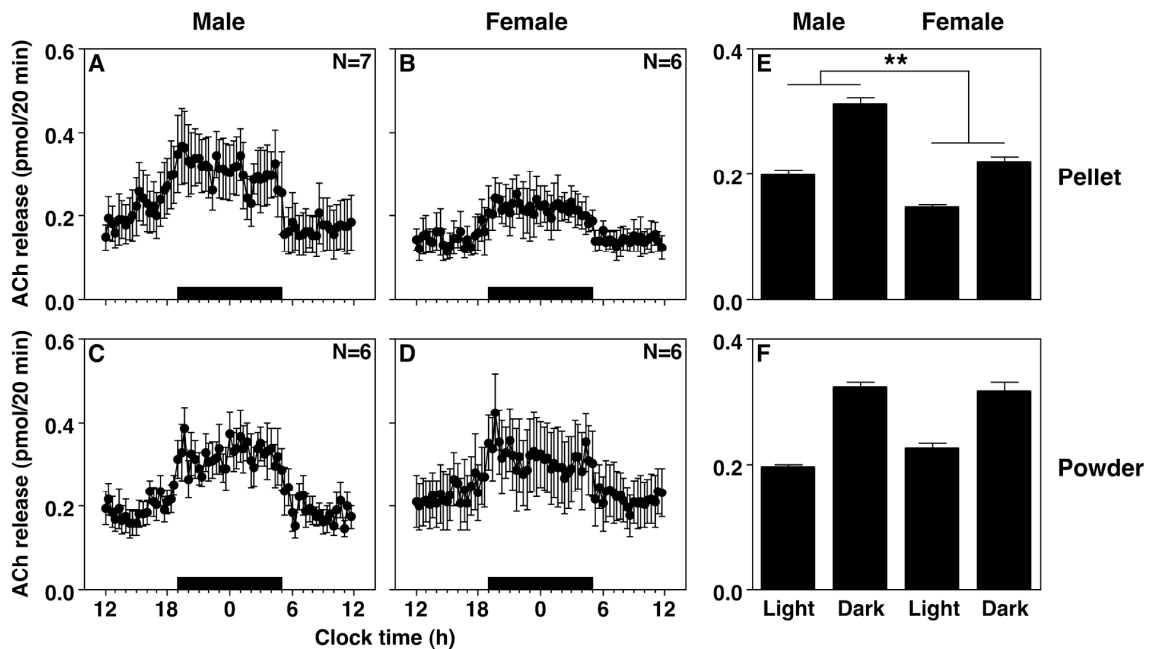


Fig. 8 Sex difference in the 24-h profile of ACh levels in the hippocampus in rats fed pelleted diet or powdered diet. Both sexes of rats showed a distinct 24-h rhythm of ACh levels. In rats fed pelleted diet (A, B, E) and powdered diet (C, D, F), the overall mean ACh levels during the dark phase was significantly greater than those during the light phase in males (A, C) and females (B, D). The number of rats is shown in each panel (N=x in A-D). Horizontal black bars represent the dark period. Sex differences in the overall mean ACh levels (E, F). Males consistently showed a greater overall mean ACh levels than females in rats fed pelleted diet. In rats fed powdered diet, no sex difference was observed. All data are presented as means  $\pm$  SEM.

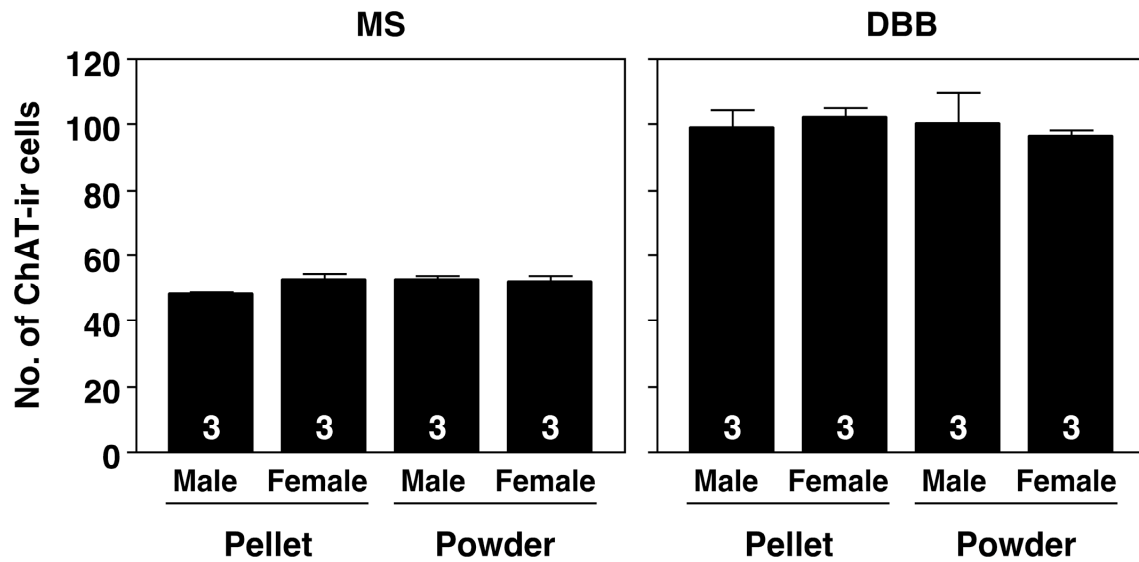


Fig. 9 The number of ChAT immunoreactive cells in the medial septum and diagonal band of Broca in rats fed pelleted or powdered diet. In both regions, no sex differences or feeding effects were observed. MS, medial septum; DBB, diagonal band of Broca. The number of rats is shown at the bottom of bar. All data are presented as means  $\pm$  SEM.

(1996) の報告と一致し、実験2において中隔核およびブローカ対角帯における抗ChAT抗体陽性細胞数に性差が認められなかったことから、アセチルコリンレベルの性差出現は、海馬体へ投射するコリン作動性ニューロンの細胞数の差ではなく、他の要因が関与する可能性が示唆された。

腹側被蓋野から中隔核へ投射するドーパミン作動性ニューロン(A10)は、海馬アセチルコリン系の活動を制御する要因の一つであることが報告されている (Swanson, 1982; Nillson et al., 1992; Yanai et al., 1993)。また、形態学的知見から、ドーパミン作動性ニューロンがD<sub>1</sub>受容体ではなくD<sub>2</sub>受容体によって海馬アセチルコリン系を制御していることが示唆されている (Weiner et al., 1991)。オピオイド作動性ニューロンも海馬アセチルコリン系を制御する要因の一つである (Mizuno and Kimura, 1996)。オピオイド $\mu$ 受容体遮断薬であるナロキソンは海馬体における細胞外アセチルコリンレベルを上昇させるが、受容体刺激薬はアセチルコリンレベルを低下させる (Mizuno and Kimura, 1996)。また、GABAも海馬アセチルコリン系を制御する要因の一つである。GABA<sub>A</sub>受容体刺激薬であるムシモールを中隔核へ投与すると、アセチルコリンレベルは低下するが、受容体遮断薬であるピククリンはレベルを上昇させる (Moor et al., 1998)。以上はすべて雄性ラットで確かめられた知見であり、雌性ラットにおいても同様であるか否かは不明であるが、海馬アセチルコリン系の性差出現に上述の神経機構が関与する可能性は考えられる。

神経系の制御のみならず、性腺ステロイドホルモンによる液性制御も海馬アセチルコリン系の活動を制御する要因の一つであると考えられる。神経解剖学的知見から、雌雄ラットのA10にアンドロジェン受容体

が発現し(Kritzer, 1997)、中隔核のコリン作動性ニューロンの45～60%にエストロゲン受容体 $\alpha$ が発現していることが示されている(Mufson et al., 1999; Miettinen et al., 2002)。雌は雄に比べて血中エストロゲン濃度が高く(Shors et al., 2001; Mitsushima et al., 2003)、雄は雌に比べて血中アンドロゲン濃度が高いため(Falvo et al., 1974; Rush and Blake, 1982)、これらの性腺ステロイドホルモンが海馬アセチルコリン系に影響を及ぼし、性差出現に関与することが考えられる。

さらに実験1では、餌形状が海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差出現に影響を及ぼすことが示された。固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。粉餌による給餌は雌の放射状迷路課題の成績を改善するため(Endo et al., 1994)、粉餌を給餌された雌に認められたアセチルコリンレベルの上昇は、放射状迷路課題の成績改善に関与しているのかもしれない。現在まで、いくつかの研究において、餌形状を含む出生後の外部環境が空間学習の性差出現に影響を与えることが報告されているが(Einon, 1980; Endo et al., 1994)、実験1から、海馬アセチルコリン系の性差もまた、餌形状の影響を受けることが示唆された。

しかし、餌形状は中隔核およびブローカ対角帯における抗ChAT抗体陽性細胞数に影響を与えていない。そのため、海馬アセチルコリン系の活動を制御するA10(Swanson, 1982; Nillson et al., 1992; Yanai et al., 1993)、オピオイド作動性ニューロン(Mizuno and Kimura, 1996)、またはGABA作動性ニューロンなどが餌形状の影響を受け(Moor et al.,



1998) 、その結果、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差が出現または消失する可能性が考えられる。

実験1、2では、離乳後より異なる餌形状で給餌を行ったが、離乳後のいつの時期に餌形状が影響を及ぼしたのかは明らかにされていない。

Krasnoff and Weston (1976) は、空間学習の性差が、思春期前では見られず、思春期後に出現することを報告している。これは、思春期後の何らかの要因が空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に関わっていることを示唆している。次章では、思春期後の餌形状がラットの放射状迷路学習および海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差出現に及ぼす影響を検討する。

### 第3章 思春期後の餌形状がラットの放射状迷路学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響

#### 3.1 思春期後に餌形状を操作したラットの放射状迷路学習の検討【実験3】

ラットの迷路学習の性差は思春期後に出現することが既に報告されている (Krasnoff and Weston, 1976)。これは、思春期後の何からの要因が、性差出現に関与する可能性を示唆している。もし、餌形状が性差出現に関与する一つの要因であるならば、思春期後の餌形状の操作により性差は出現または消失するはずである。実験3では、思春期後の6週齢以降に固形餌または粉餌を給餌した雌雄ラットの放射状迷路学習を調べ、続く実験4では、空間学習に深く関わりと示唆されている海馬アセチルコリン系が思春期後の餌形状の影響で変化するか否かを *in vivo* マイクロダイアリシス法により検討する。

#### 方法

##### 1. 被験体

Wistar系雌性ラットを妊娠させた。妊娠させたラットは午前5時から午後7時までを明期とする人工照明下(230 lux)、室温約23℃の状況で、プラスチックケージ(縦47 cm、横31 cm、高さ20 cm)で飼育し、固形餌および水は自由摂取とした。出産の日、同腹仔を10匹(雄5匹、雌5匹)に調整した。3週齢で離乳させ、雌雄別々にプラスチックケージ(同上サイズ)に2~3匹ずつで飼育し、それぞれに5週齢まで固形餌を給餌

した。餌はケージ内に設置したアルミニウム皿（直径13.5 cm、高さ4 cm）に入れて与え、自由摂取とすべく、アルミニウム皿は常に餌で満たされた。そして6週齢以降、半数の雌雄ラットには固形餌による給餌を引き続き行い、残りの半数の雌雄ラットには粉餌による給餌を実験終了まで行った（Fig. 10）。行動実験には12週齢のラットを用いた。

## 2. 放射状迷路学習

放射状迷路学習の訓練には固形餌を給餌した雄性ラット14匹、固形餌を給餌した雌性ラット15匹、6週齢以降に粉餌を給餌した雄性ラット15匹、そして6週齢以降に粉餌を給餌した雌性ラット14匹、計58匹を使用した。8方向放射状迷路は、Olton and Samuelson（1976）により記述されたものと同じものを用いた。中央のプラットホームとそこから放射状に張り出したアーム（選択肢）（縦60 cm、横12 cm）から成っており、装置の床面が実験室の床から40 cm上の高架式であった。選択肢の数は8本であり、すべての選択肢の先端に餌を入れるくぼみ（餌皿）が備え付けられていた。習得訓練開始5日前の馴化手続き開始時から実験終了時まで、ラットは個飼用のプラスチックケージ（縦31 cm、横24 cm、高さ18 cm）で個別に飼育され、体重が自由摂食時の90%となるように給餌制限をかけられた。餌はケージ内に設置したアルミニウム皿（直径6.5 cm、高さ3 cm）に入れて与え、水は自由摂取とした。

習得訓練の開始5日前から、午後1時から5時の間に、1日1回放射状迷路への馴化手続きを行った。馴化は、放射状迷路内にチーズ片（0.5 cm × 0.5 cm × 0.2 cm）を撒き、5匹1組のラットを雌雄別々に10分間放置して行った。

5日間の馴化手続きの後、習得訓練を開始した。8方向放射状迷路の各

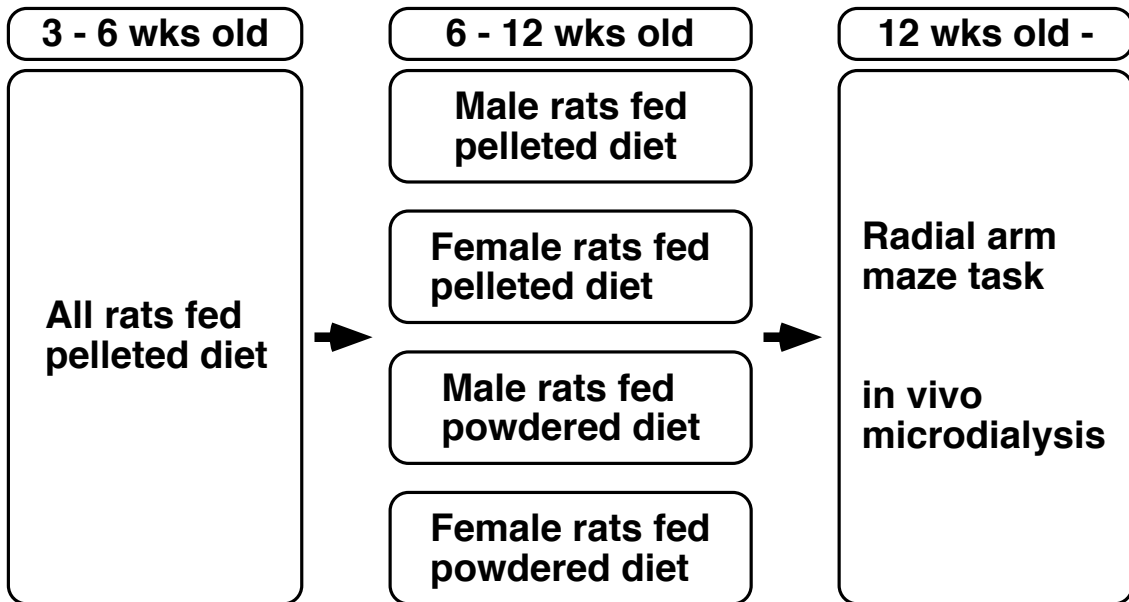


Fig. 10 The schematic illustration of the experimental schedule in Experiment 3 and 4. The pups were weaned at postnatal day 21 and unisex groups of 2-3 rats were housed in plastic cages. All rats had been fed pelleted diet until 6 weeks old, and after that, they were fed either pelleted or powdered diet made by grinding the pelleted diet. Both sexes of rats were used for the experiments at 12 weeks old.

選択肢の餌皿にチーズ片を1つずつ置き、その後、中央のプラットホームにラットを置き、自由に走行させ、選択肢を選択させた。ラットが選択肢の先端まで到達した時点で選択とみなし、記録した。一度選択した選択肢を再び選択した場合を誤選択とし、チーズ片を全て食べ終わった段階で試行を終了した。また、10分経過してもチーズ片を全て食べ終わらない場合は、その段階で試行を終了した。これを1日1試行行った。最初の8選択中7以上が正選択であり、これを5試行連続で維持することを習得基準とした。

### 3. 統計

放射状迷路学習は、習得基準の5試行を含む、学習に要した試行数の各群の平均値を、性別（雄性、雌性）×餌形状（固形、粉）の二要因分散分析により解析した。結果は全て平均値±標準誤差で表記し、 $p < 0.05$ を有意差の判定に用いた。

## 結果

Fig. 11は、固形餌または粉餌を給餌された雌雄ラットが学習に要した試行数を示す。二要因分散分析を行ったところ、性別 $[F(1, 54) = 8.185, p < 0.01]$  および餌形状の主効果が認められた $[F(1, 54) = 16.454, p < 0.01]$ 。性別×餌形状の交互作用が認められたので $[F(1, 54) = 5.934, p < 0.05]$ 、下位検定により、学習に要した試行数の性差を固形、粉の各群で解析したところ、固形餌を給餌したラットでは、学習に要した試行数は、雄が雌に比べて少なかったが $[F(1, 54) = 8.345, p < 0.01]$ 、粉餌を給餌したラットでは雌雄間に有意な差が認められなかった。さら

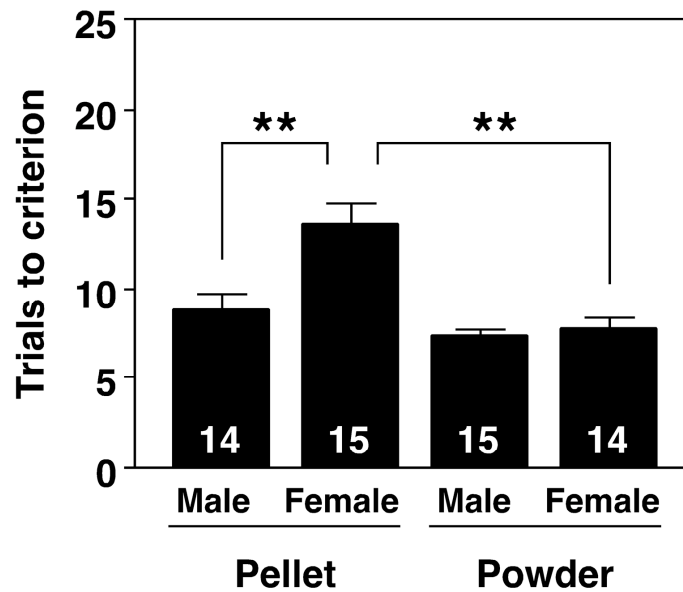


Fig. 11 Sex difference in the number of trials to criterion in rats fed pelleted diet or powdered diet in the radial arm maze task. In rats fed pelleted diet, the number of trials to reach a criterion was lower in male rats than that in female rats. Conversely, in rats fed powdered diet after 6 weeks of age, no sex difference was observed in the number of days to reach a criterion. The number of rats is shown at the bottom of bar. All data are presented as means  $\pm$  SEM.

に、下位検定により、性別ごとに餌形状の影響を検討したところ、固形餌を給餌した雄と粉餌を給餌した雄の学習に要した試行数に有意な差は認められなかったが、固形餌を給餌した雌の学習に要した試行数は粉餌を給餌した雌に比べて有意に多かった[F(1, 54) = 15.447, p < 0.01]。

### 3.2 思春期後に餌形状を操作したラットの海馬アセチルコリン系の検討【実験4】

#### 方法

##### 1. 被験体

実験3の飼育方法に準じ、6週齢以降固形餌または粉餌給餌環境下で飼育した12週齢のWistar系雌雄ラットを対象に行った。実験には、固形餌を給餌した雌雄ラット各8匹、粉餌を給餌した雄性ラット6匹、粉餌を給餌した雌性ラット7匹、計29匹を用いた。

##### 2. *in vivo*マイクロダイアリシス法

実験1の手続きに準じて行った。実験終了後、海馬CA1からCA3領域内におけるマイクロダイアリシスプローブ刺入部位を確認した (Fig. 12)。

##### 3. 細胞外アセチルコリンレベルの定量

実験1の手続きに準じて行った。回収率の平均値は $14.1 \pm 0.7\%$ であった。

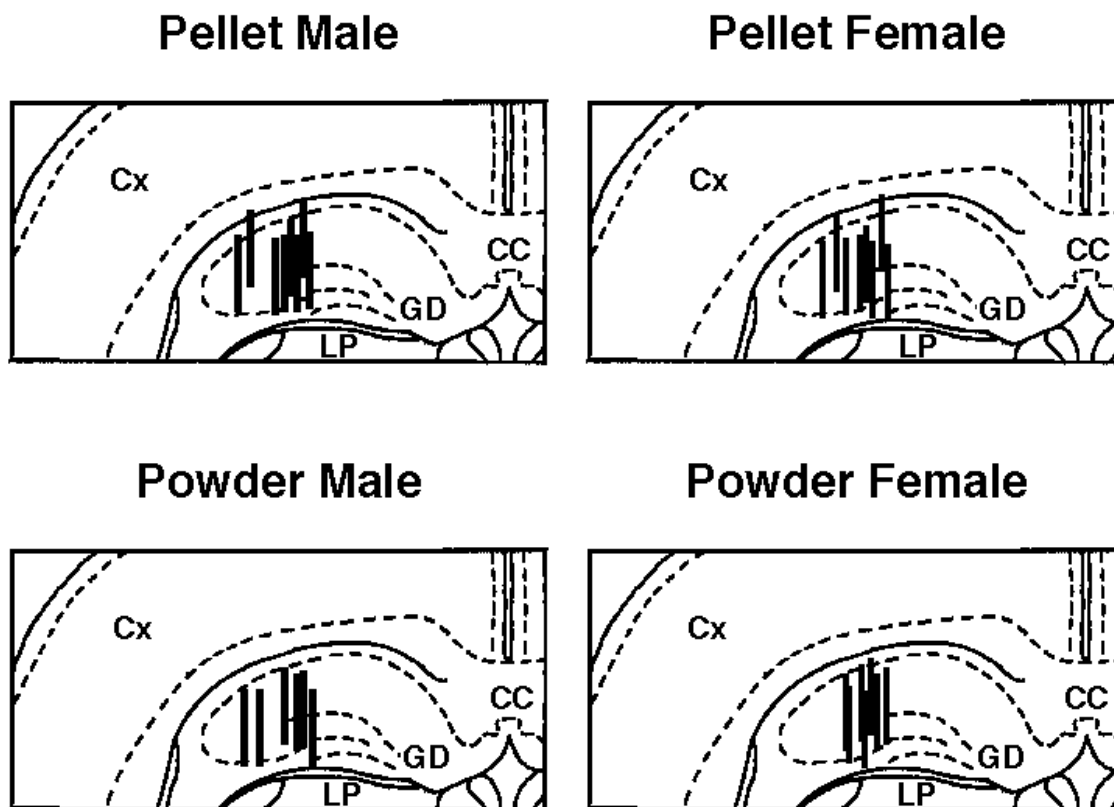


Fig. 12 Schematic illustrations showing locations of the 1.0-mm-long tip of the microdialysis probe in the rat brain. Each probe is represented by a black bar. CC, corpus callosum; Cx, cortex; GD, dentate gyrus; LP, lateral posterior nucleus.



#### 4. 統計

実験1の手続きに準じて行った。

#### 結果

Fig. 13A-Dは、固形餌または6週齢以降粉餌を給餌した雌雄ラットの24時間のアセチルコリンレベルの変化を示す。三要因分散分析を行ったところ、時間経過の主効果が認められたが [ $F(71, 1775) = 18.241, p < 0.01$ ]、性別および餌形状の主効果は認められなかった。

Fig. 13E、Fは固形餌または6週齢以降粉餌を給餌した雌雄ラットの明期(午前5時から午後7時)、暗期におけるアセチルコリンレベルを示す。三要因分散分析を行ったところ、明期対暗期 [ $F(1, 25) = 38.711, p < 0.01$ ] の主効果が認められた。また、性別×餌形状 [ $F(1, 25) = 5.480, p < 0.05$ ] の交互作用が認められたので、下位検定により固形または粉の各群におけるアセチルコリンレベルの性差を解析したところ、固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かった [ $F(1, 25) = 4.994, p < 0.05$ ]。しかし、6週齢以降粉餌を給餌したラットでは、雌雄のアセチルコリンレベルに有意な差は認められなかった。さらに、下位検定により各性における餌形状の影響を検討したところ、雄の6週齢以降粉餌を給餌した群と固形餌を給餌した群間に有意な差は認められなかったが、雌では6週齢以降粉餌を給餌した群の方が固形餌群に比べて有意に高かった [ $F(1, 25) = 7.712, p < 0.05$ ]。

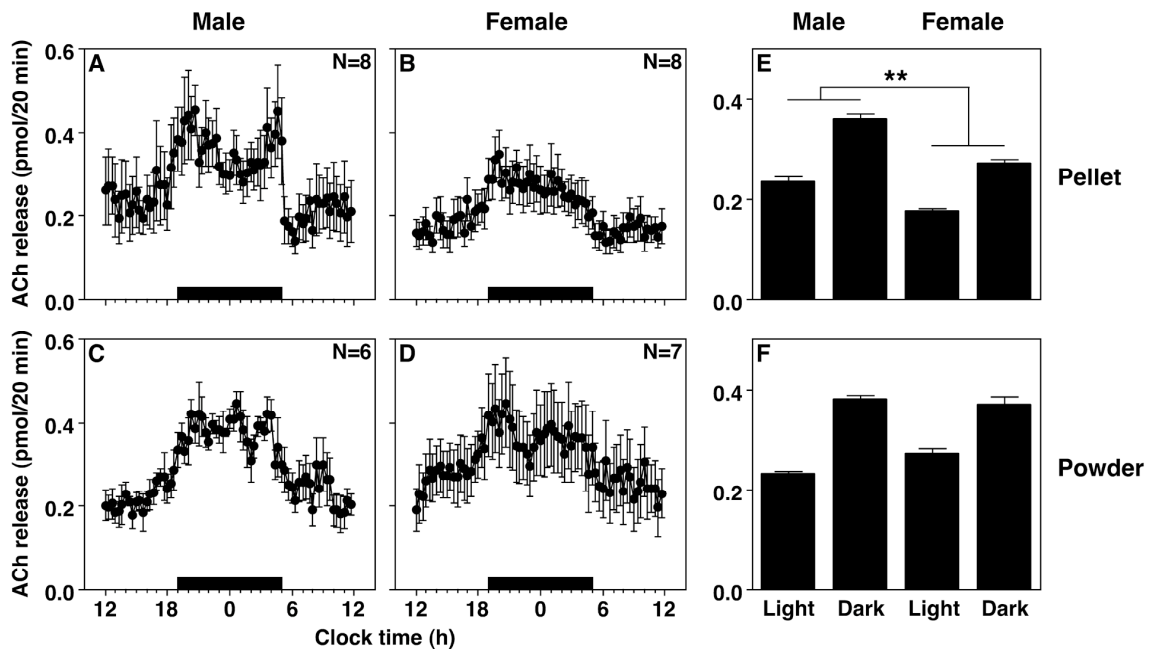


Fig. 13 Sex difference in the 24-h profile of ACh levels in the hippocampus in rats fed pelleted diet or powdered diet. Both sexes of rats showed a distinct 24-h rhythm of ACh levels. In rats fed pelleted diet (A, B, E) and powdered diet after 6 weeks old (C, D, F), the overall mean ACh levels during the dark phase was significantly greater than those during the light phase in males (A, C) and females (B, D). The number of rats is shown in each panel (N=x in A-D). Horizontal black bars represent the dark period. Sex differences in the overall mean ACh levels (E, F). Males consistently showed a greater overall mean ACh levels than females in rats fed pelleted diet. In rats fed powdered diet after 6 weeks old, no sex difference was observed. All data are presented as means  $\pm$  SEM.

### 3.3 通常飼育したラットの海馬アセチルコリン系の発達変化の検討

#### 【実験5】

ラットの迷路学習の性差は思春期後に出現することが既に報告されている (Krasnoff and Weston, 1976)。また、実験1、3、4より、放射状迷路学習の成績と平行して、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルが変化することが示唆された。実験5では、海馬体におけるアセチルコリンレベルの発達変化を調べ、雌雄ラットの海馬体におけるアセチルコリンレベルの性差が思春期後に出現するか否かを検討する。

#### 方法

##### 1. 被験体

固形餌を給餌した思春期前の4週齢のWistar系雌雄ラットおよび思春期後の9～12週齢のWistar系雌雄ラットを実験に用いた。被験体数は、4週齢の雌雄ラット各6匹、9～12週齢の雄性ラット5匹、雌性ラット8匹、計25匹であった。

##### 2. *in vivo* マイクロダイアリシス法

実験1の手続きに準じて行った。ただし、4週齢の雌雄ラットの海馬CA1からCA3領域内にステンレススチール製ガイドカニューラを定位的に植え込むための各座標は、Albe-Fessard et al. (1966) の脳地図に基づき、ブレグマから2.1～2.3 mm前方、正中より2.7～2.8 mm側方、脳表面より2.1 mm下方とした。実験終了後、海馬CA1からCA3領域内におけるマイクロダイアリシスプローブ刺入部位を確認した (Fig. 14)。

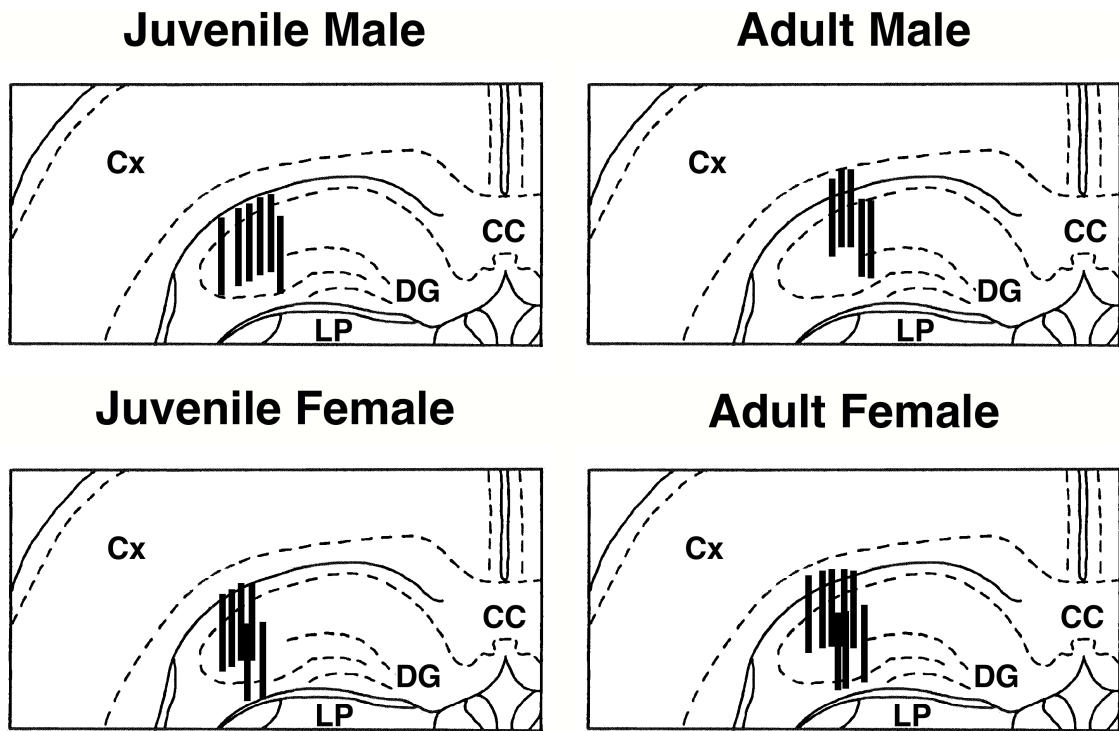


Fig. 14 Schematic illustrations showing locations of the 1.0-mm-long tip of the microdialysis probe in the rat brain. Each probe is represented by a black bar. CC, corpus callosum; Cx, cortex; DG, dentate gyrus; LP, lateral posterior nucleus.

### 3. 細胞外アセチルコリンレベルの定量

実験1の手続きに準じて行った。

### 4. 統計

性別および週齢が海馬体における細胞外アセチルコリンレベルに及ぼす影響を検討するために、4週齢または9～12週齢の雌雄ラット各群の24時間のアセチルコリンレベルについて、性別（雄、雌）×週齢（4週齢、9～12週齢）×時間経過の三要因分散分析を行った。また、明期（午前5時から午後7時）、暗期におけるアセチルコリンレベルの性差および週齢がアセチルコリンレベルに及ぼす影響を検討するために、性別（雄、雌）×週齢（4週齢、9～12週齢）×明期対暗期の三要因分散分析を行った。

## 結果

Fig. 15A-Dは、4週齢または9～12週齢の雌雄ラットの24時間の細胞外アセチルコリンレベルの変化を示した。三要因分散分析を行ったところ、時間経過の主効果が認められたが $[F(71, 1491) = 14.909, p < 0.01]$ 、性別および週齢の主効果は認められなかった。

Fig. 15E、Fは4週齢または9～12週齢の雌雄ラットの明期（午前5時から午後7時）、暗期におけるアセチルコリンレベルを示す。三要因分散分析を行ったところ、明期対暗期 $[F(1, 21) = 69.371, p < 0.01]$ の主効果が認められた。また、性別×週齢 $[F(1, 21) = 5.754, p < 0.05]$ の交互作用が認められた。下位検定により週齢ごとのアセチルコリンレベルの性差を解析したところ、4週齢では、雌雄のアセチルコリンレベ

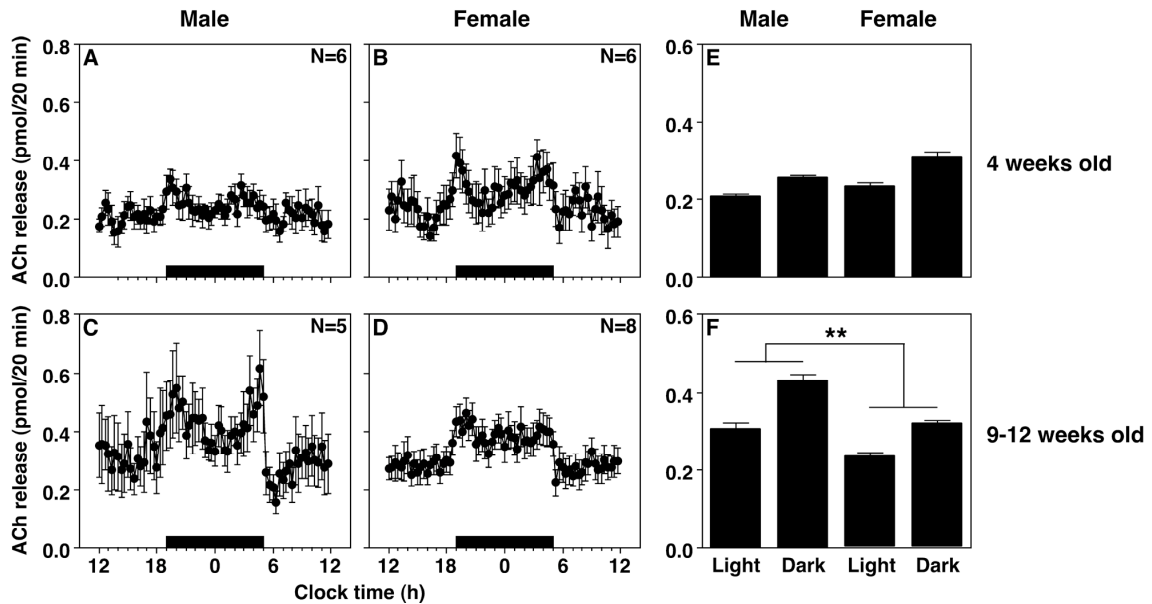


Fig. 15 Sex difference in the 24-h profile of extracellular ACh levels in the hippocampus at 4 or 9-12 weeks old. Both sexes of rats showed a distinct 24-h rhythm of ACh levels. At 4 (A, B, E) and 9-12 weeks old (C, D, F), the overall mean ACh levels during the dark phase was significantly greater than those during the light phase in males (A, C) and females (B, D). The number of rats is shown in each panel (N=x in A-D). Horizontal black bars represent the dark period. Sex differences in the overall mean ACh levels (E, F). No sex difference was observed at 4 weeks old. However, males consistently showed a greater overall mean ACh levels than females at 9-12 weeks old. All data are presented as means  $\pm$  SEM.

ルに有意な差は認められなかったが、9～12週齢では、雄の方が雌に比べて有意に高かった [F (1, 21) = 5.432, p < 0.05]。さらに、下位検定により各性における週齢の差を検討したところ、雄は発達に伴いアセチルコリンレベルが増加したが [雄、F (1, 21) = 6.433, p < 0.05]、雌には有意な増加は認められなかった。

### 3.4 第3章の考察

実験3では、学習に要した試行数は、固形餌群では雄が雌に比べて少なかったが、粉餌群では雌の学習に要した試行数が減少し、雌雄間で有意な差が認められなかった。Endo et al. (1994) は、離乳後の餌形状操作が成体期における放射状迷路学習の性差に影響を及ぼすことを示したが、思春期後の餌形状操作も同様の結果をもたらすことが示された。また実験4より、放射状迷路学習の変化と平行して、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルも思春期後の餌形状の影響で変化した。固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。

自由行動状態のアセチルコリンレベルは活動期(暗期)に顕著に高い。固形餌群の雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて高いため、放射状迷路課題の遂行時も、自由行動状態と同様に、雌に比べて高いことが予測される。

中隔核およびブローカ対角帯から脳弓を介して海馬体に至るコリン作動性ニューロンは空間学習に重要な役割を果たすことが示唆されている。実際、免疫毒性を持つIgG 192サポリンを中隔核に局所的に注入し、コリン作動性ニューロンを選択的に破壊したラットでは、放射状迷

路課題やモリス水迷路課題において、侵襲の程度に依存した顕著な成績の低下が認められた (Walsh et al., 1996; Cassel et al., 2002)。また、思春期後の性腺ステロイドホルモン環境や出生後の外部環境の操作により、海馬体でのアセチルコリンレベルが上昇したラットでは、迷路課題の成績が上昇することが報告されている (Liu et al., 2000; Marriott and Korol, 2003)。さらに、放射状迷路課題遂行中のラットの海馬体においてアセチルコリンレベルの顕著な増加が認められたことから (Fadda et al., 2000)、海馬体におけるアセチルコリンレベルは空間学習に影響を及ぼすことが示唆される。実際、海馬体でのアセチルコリン分泌により発生するシータ波は長期増強を引き起こす (Stewart and Fox, 1990)。また、アセチルコリン受容体遮断薬であるスコポラミンをラットに投与すると、用量依存的に海馬体のシータ波は抑制され、学習課題の成績が低下することが報告されている (Givens and Olton, 1990)。さらに、コリン作動性ニューロンを選択的に破壊したラットにコリン作動性ニューロンを移植すると、シータ波が回復して損傷による学習、記憶機能の低下が軽度になると報告されている (Buzsáki et al., 1987; Nilsson et al., 1987; Shapiro et al., 1989)。これらの知見から、固形餌を給餌したラットで認められた放射状迷路学習の性差や、粉餌を給餌した雌性ラットの成績改善に、海馬体におけるアセチルコリンレベルの関与が示唆される。固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高く、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルの上昇により、雌雄間に差は認められないことは、この可能性を支持する。

では、発達のいつの時期に空間学習の性差は出現するのであろうか。Krasnoff and Weston (1976) は、ラットの迷路学習の性差は思春期後



に出現することを報告した。思春期前では性差は認められないが、思春期後に迷路課題における雄の誤選択が雌に比べて減少し、性差が出現する。実験5より、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差も、思春期前の4週齢では性差は認められないが、思春期後の9～12週齢では雄の方が雌に比べて顕著に高かった。これらの結果は、思春期後の何からの要因が、空間学習や海馬体のアセチルコリンレベルの性差出現に関与する可能性を示唆している。

可能性は二つ考えられる。一つは、6週齢以降に起こる性腺ステロイドホルモン環境の性特異的な変化が雌雄ラットの放射状迷路学習や海馬体のアセチルコリンレベルの性差出現に影響を及ぼす可能性である。精巣はアンドロジェンを主に分泌し、卵巣はエストロジェンを主に分泌する。しかしながら、ラットにおいて、思春期前はこれら性腺ステロイドホルモンの血中濃度に性差は認められず、思春期以降に差が出現することが報告された (Döhler and Wuttke, 1975)。ラットでは、成体期での精巣または卵巣摘除に伴い、放射状迷路課題やT迷路課題における正選択率が低下し (Daniel et al., 2003; Gibbs et al., 2004)、中隔核の抗ChAT抗体陽性細胞数および海馬体でのアセチルコリンレベルが減少することが報告されている (Mufson et al., 1999; Nakamura et al., 2002; Mitsushima et al., 2006)。また、性腺を摘除した雄にアンドロジェンを、雌にエストロジェンを補充することにより、中隔核の抗ChAT抗体陽性細胞数および海馬体でのアセチルコリンレベルは回復することが報告されている (Gibbs and Pfaff, 1992; Nakamura et al., 2002; Mitsushima et al., 2006)。そのため、6週齢以降に起こる性腺ステロイドホルモン環境の性特異的な変化が雌雄の放射状迷路学習や海馬体でのアセチルコリンレベルの性差を出現させるのかもしれない。

二つ目の可能性は、思春期後の餌形状である。実験4では、放射状迷路学習の変化と平行して、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルも思春期後の餌形状の影響で変化した。固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。ラットの場合、出生後の外部環境が空間学習や海馬アセチルコリン系に影響を及ぼすことが報告されている。例えば、外的刺激が多い豊環境で飼育された場合、雄性ラットは雌性ラットに比べて放射状迷路課題で優れた成績を示すが、外的刺激が少ない貧環境で飼育された場合、雌性ラットが雄性ラットに比べて優れた成績を示した (Einon, et al., 1980)。また、狭いケージで4日間飼育された場合、雄性ラットは放射状迷路課題の成績が低下し (Mitsushima et al., 2001)、海馬体のアセチルコリンレベルも低下したが (Mitsushima et al., 1998)、雌性ラットには影響が見られなかった (Masuda et al., 2005)。餌形状もまた、ラットの空間学習の性差に影響を及ぼすことが報告されている。固形餌で飼育された場合、雄は雌に比べて放射状迷路課題で優れた成績を示したが、粉餌で飼育した場合、雌の成績が改善し、雄と同等の成績を示した (Endo et al., 1994)。そして、実験3、4、5より、思春期後の餌形状が空間学習や海馬アセチルコリン系の性差出現に関与することが示唆された。

#### 第4章 総合考察

実験1では、固形餌で飼育された雌雄ラットの海馬体におけるアセチルコリンレベルが午前5時から午後7時の明期で低く暗期に高いこと、雄の方が雌に比べてアセチルコリンレベルが高いことが示された。これは既報と一致する結果であった (Masuda et al., 2005)。さらに、餌形状が海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差出現に影響を及ぼすことも示された。固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。また、Gibbs (1996) の報告と一致し、実験2において中隔核およびブローカ対角帯における抗ChAT抗体陽性細胞数に性差が認められなかった。また、餌形状の影響も認められなかったことから、アセチルコリンレベルの性差出現に、海馬体へ投射するコリン作動性ニューロンの細胞数ではない他の要因の関与が示唆された。実験3では、学習に要した試行数は、固形餌群では雄が雌に比べて少なかったが、粉餌群では雌の学習に要した試行数が減少し、雌雄間で有意な差が認められなかった。Endo et al. (1994) は、離乳後の餌形状が成体期における放射状迷路学習の性差に影響を与えることを示したが、思春期後の餌形状操作も同様の結果をもたらすことが示された。また実験4より、放射状迷路学習の変化と平行して、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルも思春期後の餌形状の影響で変化することが示された。固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。最後に、実験5より、海馬体に

における細胞外アセチルコリンレベルの性差は、思春期前の4週齢では認められないが、思春期後の9-12週齢では、雄の方が雌に比べて顕著に高かった。一連の結果から、思春期後の餌形状は、ラットの放射状迷路学習および海馬体におけるアセチルコリンレベルの性差出現に影響を及ぼすことが示唆された。

では、給餌環境はどのようにして、これらの性差に影響を及ぼすのであろうか。Endo et al. (1994) は、粉餌を給餌した雌性ラットに比べて固形餌を給餌した雌性ラットの副腎重量が重いことを報告した。ストレスに慢性的に曝露された個体では、副腎重量が増加することが報告されているため (Riegler, 1973; Vernikos et al., 1982; Dallman, 1984; Armario et al., 1985)、Endo et al. は、固形餌による給餌が雌性ラットに対してストレスとして作用しているという可能性を述べている。固形餌による給餌が雄性ラットに対してストレスとして作用しない理由について、雄性ラットの精巣から分泌されるアンドロジェンには骨格筋を形成する細胞の成長および発達を促進する作用があり (Michel and Baulieu, 1980; Estrada et al., 2003)、雄性ラットでは咀嚼に必要とされる筋力が雌性ラットに比べて強いことを挙げている (Endo et al., 1994)。また、雌雄ラットに対して固形餌と粉餌に関する嗜好性試験を行ったところ、雌雄ともに固形餌よりも粉餌を好んで食べることが確認された (Sako et al., 2002)。これは、固形餌の給餌は雌性ラットだけでなく雄性ラットにとっても嫌悪的な刺激として知覚されている可能性を示している。しかし、雌性ラットは雄性ラットに比べて固形餌の咀嚼に関わる筋力が弱いため、固形餌による給餌を強いストレスとして知覚しているのかもしれない。

もし、固形餌の給餌をストレスとするならば、ストレスに曝

露された際に副腎皮質から過剰に分泌されるコルチコステロンが、空間学習に重要な役割を果たすコリン作動性ニューロンに細胞死を引き起こす可能性が考えられる。しかし、本研究の実験2より、中隔核およびブローカ対角帯のコリン作動ニューロンの数に餌形状の影響が認められなかったため、この可能性は考え難い。中隔核およびブローカ対角帯へは様々なニューロン群が投射し、その機能を制御している (Wood et al., 1979; Costa et al., 1983; Allen and Crawford, 1984; Lamour et al., 1984; Givens and Olton, 1990; Nilsson et al., 1992; Mizuno and Kimura, 1996)。また、中隔核やブローカ対角帯へ投射する様々なニューロン群の起始核にはコルチコステロンの受容体が発現していることから (Morimoto et al., 1996)、固形餌を給餌した雌性ラットでは、中隔核およびブローカ対角帯を制御するニューロンが細胞死で減少した結果、海馬体でのアセチルコリンレベルが減少した可能性が考えられる。この点については、今後検討されなければならない。

## 第5章 結論および今後の課題と展望

### 5.1 結論

先行研究から、空間学習の性差出現の神経機構に海馬アセチルコリン系が関わっていること、さらに、ラットの空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に飼育環境が影響することが示唆されていた。本研究では、飼育環境のうち餌形状に着目し、放射状迷路学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響を検討した。その結果、固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。

また、先行研究は思春期後の何らかの要因が空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に関わっていることを示唆していたため、思春期後の餌形状操作のみで、放射状迷路学習および海馬アセチルコリン系の性差が影響を受けるか否かを検討した。その結果、放射状迷路学習に要した試行数は、固形餌群では雄が雌に比べて少なかったが、粉餌群では雌の学習に要した試行数が減少し、雌雄間で有意な差が認められなかった。Endo et al. (1994) は、離乳後の餌形状が成体期における放射状迷路学習の性差に影響を与えることを示したが、思春期後の餌形状操作も同様の結果をもたらすことが示された。さらに、放射状迷路学習の変化と平行して、固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差は、思春期前の4週齢では認められないが、思春期後の9-12週齢では、雄の方が雌に比べ

て顕著に高いことも示され、一連の結果から、思春期後の餌形状は、ラットの放射状迷路学習および海馬体におけるアセチルコリンレベルの性差出現に影響を及ぼすことが示唆された。

## 5.2 今後の課題と展望

今後、餌形状がどのようにして、放射状迷路学習や海馬体のアセチルコリンレベルに影響を及ぼすのか、そのメカニズムについて詳細な検討を行っていきたい。また、今回行った一連の研究はラットについてのみ言及し得る知見であるのか、ヒトへの汎用性を備えた知見であるのか、今後検討していきたい。現在、ヒトでも、出生前後に起こる脳の性分化によって空間学習の性差が出現するという説が有力となっている。しかし、いくつかの報告がこの説の矛盾を指摘している。食事環境がヒトの空間学習の性差出現に影響を与えているか否かはわからない。しかし、食事環境ではなくとも、我々が両性別にとって害は無いと判断してしまっている外部環境の中に性差出現要因が潜んでいる可能性は十分に考えられる。この研究を契機として、各性、各発達段階に適した外部環境を模索していくことを、これからの研究の展望としたい。

## 概要

多くの報告が、ヒトを含む哺乳類の空間学習に性差が存在することを示唆している。空間学習の性差出現に関わる神経機構は全て明らかにされているわけではないが、中隔核およびブローカの対角帯核から海馬体へと投射するコリン作動性ニューロン（海馬アセチルコリン系）は空間学習において重要な役割を果たすことが示唆されている。実際、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの上昇は空間学習課題の成績を改善する。アセチルコリンの分泌に伴い海馬体ではシータ波が発生し、シータ波は記憶に深く関わりと示唆されている長期増強や細胞増殖を引き起こすことが報告されている。また、自由行動状態のラットの海馬体において細胞外アセチルコリンレベルを24時間測定した報告は、アセチルコリンレベルは雄が雌に比べて高いことを示している。一連の報告は、空間学習の性差出現に関わる神経機構に海馬アセチルコリン系が深く関わることを示唆している。

ラットの場合、出生後の外部環境が空間学習や海馬アセチルコリン系の性差出現に影響を及ぼすことが報告されている。例えば、外的刺激が多い豊環境で飼育されたラットでは、雄が雌に比べて空間学習課題の一つである放射状迷路課題で優れた成績を示すが、外的刺激が少ない貧環境で飼育された場合、雌が雄に比べて優れた成績を示した。また、狭いケージで4日間飼育されたラットでは、雄は放射状迷路課題の成績が低下し、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルも低下したが、雌には影響が見られなかった。これらの報告は、空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に出生後の外部環境が影響することを示唆している。



外部環境の一つである餌形状もまた、ラットの空間学習の性差出現に影響を及ぼすことが報告されている。固形餌で飼育されたラットでは、雄が雌に比べて放射状迷路課題で優れた成績を示したが、固形餌を砕いて作成した粉餌で飼育した場合、雌の成績が改善し、性差は認められなかった。しかし、餌形状が海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響は未だ明らかにされていない。

そこで本研究ではラットの放射状迷路学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす餌形状の影響について検討した。第1章では、空間学習の性差に関する研究動向、空間学習の性差出現に関わる三つの要因、空間学習に関わる海馬体の役割について詳説し、本研究の目的を述べた。

第2章では、離乳後の餌形状がラットの海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響を検討するため、Endo et al. (1994) の方法に従い、3週齢の離乳以降、固形餌で飼育したラットと、固形餌を砕いて餌形状を変えた粉餌で飼育したラットの海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差を*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて検討した(実験1)。次に、海馬体へと投射するコリン作動性ニューロンの数を、抗コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 抗体を用いたコリン作動性ニューロンの免疫組織化学により検討した(実験2)。実験1では、固形餌で飼育された雌雄ラットの海馬体におけるアセチルコリンレベルが明期で低く暗期に高いこと、雄の方が雌に比べてアセチルコリンレベルが高いことが示された。さらに、餌形状が海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差出現に影響を及ぼすことも示された。すなわち、固形餌を給餌したラットでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレ

ベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。実験2において中隔核およびブローカ対角帯における抗ChAT抗体陽性細胞数に性差が認められなかった。また、餌形状の影響も認められなかった。

第3章では、思春期後の餌形状がラットの放射状迷路学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に及ぼす影響を検討した。Krasnoff and Weston (1976) は、空間学習の性差が、思春期前では認められず、思春期後に出現することを報告している。これは、思春期後の何らかの要因が空間学習および海馬アセチルコリン系の性差出現に関わっていることを示唆している。そこで、性成熟が完成する6週齢以降（思春期後）の餌形状の影響を検討するために、固形餌で飼育したラットと、固形餌を砕いて餌形状を変えた粉餌で飼育したラットの放射状迷路学習の性差を調べ（実験3）、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差を*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて検討した（実験4）。また、Krasnoff and Weston (1976) の報告は、海馬アセチルコリン系の性差が、思春期前では見られず、思春期後に出現することを示唆しているため、4週齢の思春期前のラットと9～12週齢の思春期後のラットの海馬体における細胞外アセチルコリンレベルを*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いて検討した（実験5）。実験3では、学習に要した試行数は、固形餌群では雄が雌に比べて少なかったが、粉餌群では雌の学習に要した試行数が減少し、雌雄間で有意な差が認められなかった。Endo et al. (1994) は、離乳後の餌形状が成体期における放射状迷路学習の性差に影響を与えることを示したが、思春期後の餌形状操作も同様の結果をもたらすことが示された。また実験4より、放射状迷路学習の変化と平行して、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルも思春期後の餌形状の影響で変化することが示された。すなわち、固形餌を給餌したラッ

トでは、雄のアセチルコリンレベルは雌に比べて有意に高かったが、粉餌を給餌したラットでは、雌のアセチルコリンレベルが上昇し、雌雄間に有意な差は認められなかった。最後に、実験5より、海馬体における細胞外アセチルコリンレベルの性差は、思春期前の4週齢では認められないが、思春期後の9～12週齢では、雄の方が雌に比べて顕著に高かった。

一連の結果から、思春期後の餌形状は、ラットの放射状迷路学習および海馬体におけるアセチルコリンレベルの性差出現に影響を及ぼすことが示唆された。

## 引用文献

- Albe-Fessard D, Stutinsky F, Libouban S (1966) Atlas Stéréotaxique du diencéphale de rat blanc. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique.
- Allen CN, Crawford IL (1984) GABAergic agents in the medial septal nucleus affect hippocampal theta rhythm and acetylcholine utilization. *Brain Res*, 322, 261-267.
- Amaral DG, Kurz J (1985) An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol*, 240, 37-59.
- Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK (1971) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand*, 76, 4A-5A.
- Armario A, Restrepo C, Castellanos JM, Balasch J (1985) Dissociation between adrenocorticotropin and corticosterone responses to restraint after previous chronic exposure to stress. *Life Sci*, 36, 2085-2092.
- Baker SW, Ehrhardt AA (1974) Prenatal androgen, intelligence and cognitive sex differences. In Friedman RC, Richart RM, Vande Wiele RL: *Sex Differences in Behavior*, New York, Wiley.
- Beatty WW (1979) Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors in rodents: Organizational and activational influences. *Horm Behav*, 12, 112-163.
- Beatty WW (1984) Hormonal organization of sex differences in play

- fighting and spatial behavior. *Prog Brain Res*, 61, 315-330.
- Bennett MR (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol*, 60, 109-137.
- Bimonte-Nelson HA, Singleton RS, Nelson ME, Eckman CB, Barber J, Scott TY, Granholm AC (2003) Testosterone, but not nonaromatizable dihydrotestosterone, improves working memory and alters nerve growth factor levels in aged male rats. *Exp Neurol*, 181, 301-312.
- Bliss TV, Gardner-Medwin AR (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 357-374.
- Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.
- Boron WF, Boulpaep EL (2002) *Medical Physiology*. Collingwood, Saunders.
- Buhl EH, Szilágyi T, Halasy K, Somogyi P (1996) Physiological properties of anatomically identified basket and bistratified cells in the CA1 area of the rat hippocampus in vitro. *Hippocampus*, 6, 294-305.
- Burwell RD (2000) The parahippocampal region: corticocortical

- connectivity. *Ann N Y Acad Sci*, 911, 25-42.
- Buzsáki G (1989) Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience*, 31, 551-570.
- Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron*, 33, 325-340.
- Buzsáki G, Gage FH, Czopf J, Björklund A (1987) Restoration of rhythmic slow activity (theta) in the subcortically denervated hippocampus by fetal CNS transplants. *Brain Res*, 400, 334-347.
- Cassel JC, Gaurivaud M, Lazarus C, Bertrand F, Galani R, Jeltsch H (2002) Grafts of fetal septal cells after cholinergic immunotoxic denervation of the hippocampus: a functional dissociation between dorsal and ventral implantation sites. *Neuroscience*, 113, 871-872.
- Cimadevilla JM, Gonzalez-Pardo H, Lopez L, Diaz F, Cueto EG, Garcia-Moreno LM, et al. (1999) Sex-related differences in spatial learning during the early postnatal development of the rat. *Behav Processes*, 46, 159-171.
- Costa E, Panula P, Thompson HK, Cheney DL (1983) The transsynaptic regulation of the septal-hippocampal cholinergic neurons. *Life Sci*, 32, 165-179.
- Córdoba Montoya DA, Carrer HF (1997) Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res*, 778, 430-438.
- Dabbs Jr. J, Chang EL, Strong R, Milun R (1998) Spatial ability, navigation strategy and geographic knowledge among men and women. *Evol Hum Behav*, 19, 89-98.

- Dallman MF (1984) Control of adrenocortical growth in vivo. *Endocr Res*, 10, 213-242.
- Daniel JM, Fader AJ, Spencer AL, Dohanich GP (1997) Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav*, 32, 217-225.
- Daniel JM, Hulst JL, Berbling JL (2006) Estradiol replacement enhances working memory in middle-aged rats when initiated immediately after ovariectomy but not after a long-term period of ovarian hormone deprivation. *Endocrinology*, 147, 607-614.
- Dawson JLM, Cheung YM, Law RTS (1975) Developmental effects of neonatal sex hormones on spatial and activity skills in the white rat. *Biol Psychol*, 3, 213-229.
- Deller T, Katona I, Cozzari C, Frotscher M, Freund TF (1999) cholinergic innervation of mossy cells in the rat fascia dentata. *Hippocampus*, 9, 314-320.
- Döhler KD, Wuttke W (1975) Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*, 97, 898-907.
- Eichenbaum H (2000) A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci*, 1, 41-50.
- Eichenbaum H (2001) The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res*, 127, 199-207.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris RGM (1990) Hippocampal representation in spatial learning. *J Neurosci*, 10, 331-339.

- Einon D (1980) Spatial memory and response strategies in rats: age, sex and rearing differences in performance. *Q J Exp Psychol*, 32, 473-489.
- El-Bakri NK, Islam A, Zhu S, Elhassan A, Mohammed A, Winblad B, Adem A (2004) Effects of estrogen and progesterone treatment on rat hippocampal NMDA receptors: relationship to Morris water maze performance. *J Cell Mol Med*, 8, 537-544.
- Endo Y, Mizuno T, Fujita K, Funabashi T, Kimura F (1994) Soft-diet feeding during development enhances later learning abilities in female rats. *Physiol Behav*, 56, 629-633.
- Estrada M, Espinosa A, Muller M, Jaimovich E (2003) Testosterone stimulates intracellular calcium release and mitogen-activated protein kinases via a G protein-coupled receptor in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 144, 3586-3597.
- Fadda F, Cocco S, Stancampiano R (2000) Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *NeuroReport*, 11, 2265-2269.
- Falvo RE, Buhl A, Nalbandov AV (1974) Testosterone concentrations in the peripheral plasma of androgenized female rats and in the estrous cycle of normal female rats. *Endocrinology*, 95, 26-29.
- Galea LAM, Kimura D (1993) Sex differences in route learning. *Pers Individ Differ*, 14, 53-65.
- Gaykema RP, Luiten PG, Nyakas C, Traber J (1990) Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol*, 293, 103-124.



- Gibbs RB (1996) Expression of estrogen receptor-like immunoreactivity by different subgroups of basal forebrain cholinergic neurons in gonadectomized male and female rats. *Brain Res*, 720, 61-68.
- Gibbs RB, Pfaff DW (1992) Effects of estrogen and fimbria/fornix transection on p75NGFR and ChAT expression in the medial septum and diagonal band of Broca. *Exp Neurol*, 116, 23-29.
- Gibbs RB, Gabor R, Cox T, Johnson DA (2004) Effects of raloxifene and estradiol on hippocampal acetylcholine release and spatial learning in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 29, 741-748.
- Givens BS, Olton DS (1990) Cholinergic and GABAergic modulation of medial septal area: effect on working memory. *Behav Neurosci*, 104, 849-855.
- Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE, Southam AM (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res*, 148, 333-346.
- Griffin JE (1980) The testis. In Bondy PK, Rosenberg LE: *Metabolic Control and Disease*. Philadelphia, WB Saunders.
- Haist F, Bowden Gore J, Mao H (2001) Consolidation of human memory over decades revealed by functional magnetic resonance imaging. *Nat Neurosci*, 4, 1139-1145.
- Halasy K, Buhl EH, Lörinczi Z, Tamás G, Somogyi P (1996a) Synaptic target selectivity and input of GABAergic basket and bistratified interneurons in the CA1 area of the rat hippocampus. *Hippocampus*, 6, 306-329.

- Halasy K, Cobb SR, Buhl EH, Nyíri G, Somogyi P (1996b) Sites of synaptic junctions established by a GABAergic basket cell on an interneuron in the CA1 area of the rat hippocampus. *Neurobiology (Bp)*, 4, 269-270.
- Hampson E (1990a) Variations in sex-related cognitive abilities across the menstrual cycle. *Brain Cogn*, 14, 26-43.
- Hampson E (1990b) Estrogen-related variations in human spatial and articulatory-motor skills. *Psychoneuroendocrinology*, 15, 97-111.
- Herman JF, Siegel AW (1978) The development of cognitive mapping of the large-scale environment. *J Exp Child Psychol*, 26, 389-406.
- Hilton GD, Nuñez JL, McCarthy MM (2003) Sex differences in response to kainic acid and estradiol in the hippocampus of newborn rats. *Neuroscience*, 116, 383-391.
- Hines M (1982) Prenatal gonadal hormones and sex differences in human behavior. *Psychol Bull*, 92, 56-80.
- Hines M, Shipley C (1983) Prenatal diethylstilbestrol (DES) exposure and sexually dimorphic cognitive abilities and cerebral lateralization. *Dev Psychol*, 11, 81-94.
- Hoffman KL, McNaughton BL (2002) Sleep on it: cortical reorganization after-the-fact. *Trends Neurosci*, 25, 1-2.
- Huerta PT, Sun LD, Wilson MA, Tonegawa S (2000) Formation of temporal memory requires NMDA receptors within CA1 pyramidal neurons. *Neuron* 25, 473-480.
- Jahoda G (1980) Sex and ethnic differences on a spatial-perceptual task. *Br J Psychol*, 71, 425-431.

- Jakab RL, Leranth C (1995) Septum. In: Paxinos G, editor. The rat nervous system. 2nd ed. London, Academic press, p. 405-442.
- Jarosiewicz B, McNaughton BL, Skaggs WE (2002) Hippocampal population activity during the small-amplitude irregular activity state in the rat. *J Neurosci*, 22, 1373-1384.
- Jefferys JG, Whittington MA (1996) Review of the role of inhibitory neurons in chronic epileptic foci induced by intracerebral tetanus toxin. *Epilepsy Res*, 26, 59-66.
- Jonasson Z (2005) Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 811-825.
- Jones CM, Braithwaite VA, Healy SD (2003) The evolution of sex differences in spatial ability. *Behav Neurosci*, 117, 403-411.
- Joseph R, Hess S, Birecree E (1978) Effect of hormone manipulations and exploration on sex differences in maze learning. *Behav Biol*, 24, 364-377.
- Juraska JM, Fitch JM, Henderson C, Rivers N (1985) Sex differences in the dendritic branching of dentate granule cells following differential experience. *Brain Res*, 333, 73-80.
- Juraska JM, Kopicik JR, Washburne DL (1988) Neonatal castration of male rats affects the dendritic response to differential environments in hippocampal dentate granule neurons. *Psychobiology*, 16, 406-410.
- Keogh BK (1971) Pattern copying under three conditions of an expanded spatial field. *Dev Psychol*, 4, 25-31.

- Kimura D, Hampson E (1994) Cognitive pattern in men and women is influenced by fluctuations in sex hormones. *Curr Directions Psychol Sci*, 3, 57-61.
- Krasnoff A, Weston LM (1976) Pubertal status and sex differences: activity and maze behavior in rats. *Dev Psychobiol*, 9, 261-269.
- Kritzer MF (1997) Selective colocalization of immunoreactivity for intracellular gonadal hormone receptors and tyrosine hydroxylase in the ventral tegmental area, substantia nigra, and retrorubral fields in the rat. *J Comp Neurol*, 379, 247-260.
- Lacreuse A, Herndon JG, Killiany RJ, Rosene DL, Moss MB (1999) Spatial cognition in rhesus monkeys: male superiority declines with age. *Horm Behav*, 36, 70-76.
- Lamour Y, Dutar P, Jobert A (1984) Septo-hippocampal and other medial septum-diagonal band neurons: electrophysiological and pharmacological properties. *Brain Res*, 309, 227-239.
- Leranth C, Petnehazy O, MacLusky NJ (2003) Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J Neurosci*, 23, 1588-1592.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci*, 3, 799-806.
- Lorente de Nó, R (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of ammonic system. *J Psychol Neurol*, 46, 113-177.
- MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD (1994)

- Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Mol Cell Neurosci*, 5, 691-698.
- Maccoby EE, Jacklin CN (1974) *The Psychology of Sex Differences*. Stanford, Stanford University Press.
- Madeira MD, Lieberman AR (1995) Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol*, 45, 275-333.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science*, 275, 209-213.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, 285, 1870-1874.
- Marriott LK, Korol DL (2003) Short-term estrogen treatment in ovariectomized rats augments hippocampal acetylcholine release during place learning. *Neurobiol Learn Mem*, 80, 315-322.
- Martina M, Royer S, Paré D (2001) Propagation of neocortical inputs in the perirhinal cortex. *J Neurosci*, 21, 2878-2888.
- Masica DN, Money J, Ehrhardt AA, Lewis VG (1969) IQ fetal sex hormones and cognitive patterns: Studies of the testicular feminizing syndrome of androgen insensitivity. *Johns Hopk Med J*, 124, 34-43.
- Masuda J, Mitsushima D, Funabashi T, Kimura F (2005) Sex and housing conditions affect the 24-h acetylcholine release profile in the hippocampus in rats. *Neuroscience*, 132, 537-542.
- McCarthy MM, Konkle AT (2005) When is a sex difference not a sex

- difference? *Front Neuroendocrinol*, 26, 85-102.
- McGee MG (1979) Human spatial abilities: Psychometric studies and environmental, genetic, hormonal, and neurological influences. *Psychol Bull*, 86, 889-918.
- McGee MG (1982) Spatial abilities: The influence of genetic factors. In Potegal M: *Spatial abilities: Development and Physiological Foundations*. New York, Academic press.
- McGuire LS, Ryan KO, Omenn GS (1975) Congenital adrenal hyperplasia. II. Cognitive and behavioral studies. *Behav Genet*, 5, 175-188.
- Mehta MR, Quirk MC, Wilson MA (2000) Experience-dependent asymmetric shape of hippocampal receptive fields. *Neuron* 25, 707-715.
- Michel G, Baulieu EE (1980) Androgen receptor in rat skeletal muscle: characterization and physiological variations. *Endocrinology*, 107, 2088-2098.
- Miettinen RA, Kalesnykas G, Koivisto EH (2002) Estimation of the total number of cholinergic neurons containing estrogen receptor-alpha in the rat basal forebrain. *J Histochem Cytochem*, 50, 891-902.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*, 20, 445-468.
- Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand D (1994) Interactions of estrogen with the neurotrophins and their receptors during neural development. *Horm Behav*, 28, 367-375.

- Mitsushima D, Yamanoi C, Kimura F (1998) Restriction of environmental space attenuates locomotor activity and hippocampal acetylcholine release in male rats. *Brain Res*, 805, 207-212.
- Mitsushima D, Funabashi T, Shinohara K, Kimura F (2001) Impairment of maze learning in rats by restricting environmental space. *Neurosci Lett*, 297, 73-76.
- Mitsushima D, Tin-Tin-Win-Shwe, Kimura F (2003) Sexual dimorphism in the GABAergic control of gonadotropin release in intact rats. *Neurosci Res*, 46, 399-405.
- Mitsushima D, Takase K, Kimura F (2006) Corresponding sex hormones maintain the sex-specific 24-h acetylcholine release profile in the hippocampus in behaving rats. *Soc Neurosci Abstr*, 661.22.
- Mizuno T, Kimura F (1996) Medial septal injection of naloxone elevates acetylcholine release in the hippocampus and induces behavioral seizures in rats. *Brain Res*, 713, 1-7.
- Moffat SD, Hampson E (1996) A curvilinear relationship between testosterone and spatial cognition in humans: possible influence of hand preference. *Psychoneuroendocrinology*, 21, 323-337.
- Moffat SD, Hampson E, Hatzipentalis M (1998) Navigation in a virtual maze: sex differences and correlation with psychometric measures of spatial ability in humans. *Evol Hum Behav*, 19, 73-87.
- Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O (2005) Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and

- learning. *Neurobiol Aging*, 26, 939-946.
- Money J (1964) Two cytogenetic syndromes: Psychologic comparisons. 1. Intelligence and specific factor quotients. *J Psychiat Res*, 2, 231.
- Moor E, DeBoer P, Westerink BHC (1998) GABA receptors and benzodiazepine binding sites modulate hippocampal acetylcholine release in vivo. *Eur J Pharmacol*, 359, 119-126.
- Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokoyama K, Kawata M (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26, 235-269.
- Morris JA, Jordan CL, Breedlove SM (2004) Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci*, 7, 1034-1039.
- Mufson EJ, Cai WJ, Jaffar S, Chen E, Stebbins G, Sendera T, Kordower JH (1999) Estrogen receptor immunoreactivity within subregions of the rat forebrain: neuronal distribution and association with perikarya containing choline acetyltransferase. *Brain Res*, 849,253-274.
- Nakamura N, Fujita H, Kawata M (2002) Effects of gonadectomy on immunoreactivity for choline acetyltransferase in the cortex, hippocampus, and basal forebrain of adult male rats. *Neuroscience*, 109, 473-485.
- Nash SC (1979) Sex role as a mediator of intellectual functioning. In Wittig MA, Petersen AC: *Sex-Related Differences in Cognitive Functioning*. New York, Academic Press.



- Nilsson OG, Shapiro ML, Gage FH, Olton DS, Björklund A (1987) Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. *Exp Brain Res*, 67, 195-215.
- Nilsson OG, Leanza G, Björklund A (1992) Acetylcholine release in the hippocampus: regulation by monoaminergic afferents as assessed by in vivo microdialysis. *Brain Res*, 584, 132-140.
- Nuñez JL, Koss WA, Juraska JM (2000) Hippocampal anatomy and water maze performance are affected by neonatal cryoanesthesia in rats of both sexes. *Horm Behav*, 37, 169-178.
- Nuñez JL, Alt JJ, McCarthy MM (2003) A new model for prenatal brain damage. I. GABAA receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. *Exp Neurol*, 181, 258-269.
- Nyakas C, Luiten PG, Spencer DG, Traber J (1987) Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res Bull*, 18, 533-545.
- O'Keefe J (1979) A review of the hippocampal place cells. *Prog Neurobiol*, 13, 419-439.
- O'Keefe JA, Handa RJ (1990) Transient elevation of estrogen receptors in the neonatal rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, 57, 119-127.
- O'Keefe JA, Pedersen EB, Castro AJ, Handa RJ (1993) The ontogeny of estrogen receptors in heterochronic hippocampal and neocortical transplants demonstrates an intrinsic developmental

- program. *Brain Res Dev Brain Res*, 75, 105-112.
- Olton DS (1983) Memory functions and the hippocampus. In Siefert W: *Neurobiology of the hippocampus*. New York, Academic Press.
- Olton DS, Samuelson RJ (1976) Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Exp Psychol: Anim Behav Proc*, 2, 97-116.
- Pavrides C, Greenstein YJ, Grudman M, Winson J (1988) Long-term potentiation in the dentate gyrus is induced preferentially on the positive phase of theta-rhythm. *Brain Res*, 439, 383-387.
- Pfaff DW (1966) Morphological changes in the brains of adult male rats after neonatal castration. *J Endocrinol*, 36, 415-416.
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC (1959) Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology*, 65, 369-382.
- Reinisch JM, Gandelman R, Spiegel FC (1979) Prenatal influences on cognitive abilities: Data from experimental animals and human genetic and endocrine syndromes. In Wittig MA, Petersen AC: *Sex-Related Differences in Cognitive Functioning*. New York, Academic Press.
- Resnick S, Berenbaum SA (1982) Cognitive functioning in individuals with congenital adrenal hyperplasia. *Behav Genet*, 12, 594-595.
- Riegle GD (1973) Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology*, 11, 1-10.

- Roberts J (1971) Intellectual Development of Children by Demographic and Socioeconomic Factors. In DHEW Publ. No. HSM 72-1012, Series 11, No. 110. Washington, DC, U.S. Government Printing Office.
- Rush ME, Blake CA (1982) Serum testosterone concentrations during the 4-day estrous cycle in normal and adrenalectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 169, 216-221.
- Sako N, Okamoto K, Mori T, Yamamoto T (2002) The hardness of food plays an important role in food selection behavior in rats. *Behav Brain Res*, 133, 377-382.
- Sandstrom NJ, Kim JH, Wasserman MA (2006) Testosterone modulates performance on a spatial working memory task in male rats. *Horm Behav*, 50, 18-26.
- Saucier DM, Green SM, Leason J, MacFadden A, Bell S, Elias LJ (2002) Are sex differences in navigation caused by sexually dimorphic strategies or by differences in the ability to use the strategies? *Behav Neurosci*, 116, 403-410.
- Schratz MM (1978) A developmental investigation of sex differences in spatial (visual-analytic) and mathematical skills in three ethnic groups. *Dev Psychol*, 14, 263-267.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20, 11-21.
- Seymour P, Dou H, Juraska JM (1996) Sex differences in radial maze performance: influence of rearing environment and room cues. *Psychobiology*, 24, 33-37.

- Shapiro ML, Simon DK, Olton DS, Gage FH 3rd, Nilsson O, Björklund A (1989) Intrahippocampal grafts of fetal basal forebrain tissue alter place fields in the hippocampus of rats with fimbria-fornix lesions. *Neuroscience*, 32, 1-18.
- Shepherd GM (2003) *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press.
- Sherman J (1978) *Sex-Related Cognitive Differences*. Thomas, Springfield.
- Shors TJ, Chua C, Falduto J (2001) Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *J Neurosci*, 21, 6292-6297.
- Silverman II, Choi J, Mackewn A, Fisher M, Moro J, Olshansky E (2000) Evolved mechanisms underlying wayfinding. Further studies on the hunter-gatherer theory of spatial sex differences. *Evol Hum Behav*, 21, 201-213.
- Simerly RB (2002) Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annu Rev Neurosci*, 25, 507-536.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 240-244.
- Stackman RW, Blasberg ME, Langan CJ, Clark AS (1997) Stability of spatial working memory across the estrous cycle of Long-Evans

- rats. *Neurobiol Learn Mem*, 67, 167-171.
- Stafford RE (1961) Sex differences in spatial visualization as evidence of sex linked inheritance. *Percept Mot Skills*, 13, 428.
- Stewart J, Skvarenina A, Pottier J (1975) Effects of neonatal androgens on open field and maze learning in the prepubescent and adult rat. *Physiol Behav*, 14, 291-295.
- Stewart M, Fox SE (1990) Do septal neurons pace the hippocampal theta rhythm? *Trends Neurosci*, 13, 163-168.
- Sutherland GR, McNaughton B (2000) Memory trace reactivation in hippocampal and neocortical neuronal ensembles. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 180-186.
- Swanson LW (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull*, 9, 321-353.
- Takase K, Funabashi T, Mogi K, Mitsushima D, Kimura F (2005) Feeding with powdered diet after weaning increases visuospatial ability in association with increases in the expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus of female rats. *Neurosci Res*, 53, 169-175.
- Tees RC, Midgley G, Nesbit JC (1981) The effect of early visual experience on spatial maze learning in rats. *Dev Psychobiol*, 14, 425-438.
- Thomas MJ, Watabe AM, Moody TD, Makhinson M, O'Dell TJ (1998) Postsynaptic complex spike bursting enables the induction of LTP by theta frequency synaptic stimulation. *J Neurosci*, 18,

7118-7126.

- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T (2005) GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47, 803-815.
- van Groen T, Wyss JM (1992) Connections of the retrosplenial dysgranular cortex in the rat. *J Comp Neurol*, 315, 200-216.
- Vandenberg SG, Kuse AR (1979) Spatial abilities: A critical review of the sex-linked major gene hypothesis. In Wittig MA, Petersen AC: *Sex-Related Differences in Cognitive Functioning*. New York, Academic Press.
- Vernikos J, Dallman MF, Bonner C, Katzen A, Shinsako J (1982) Pituitary-adrenal function in rats chronically exposed to cold. *Endocrinology*, 110, 413-420.
- Wainer BH, Levey AI, Rye DB, Mesulam MM, Mufson EJ (1985) Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci Lett*, 54, 45-52.
- Walsh TJ, Herzog CD, Gandhi C, Stackman RW, Wiley RG (1996) Injection of IgG 192-saporin into the medial septum produces cholinergic hypofunction and dose-dependent working memory deficits. *Brain Res*, 726, 69-79.
- Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT (1995) LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res*, 703, 26-30.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat

- brain. Proc Natl Acad Sci U S A, 88, 1859-1863.
- Williams CL, Meck WH (1984) The organizational effects of gonadal steroids on sexually dimorphic spatial ability. Psychoneuroendocrinology, 16, 155-176.
- Wilson MA, McNaughton BL (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. Science, 261, 1055-1058.
- Wilson MA, McNaughton BL (1994) Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science, 265, 676-679.
- Winter JS, Hughes IA, Reyes FI, Faiman C (1976) Pituitary-gonadal relations in infancy: 2. Patterns of serum gonadal steroid concentrations in man from birth to two years of age. J Clin Endocrinol Metab, 42, 679-686.
- Wood PL, Cheney DL, Costa E (1979) An investigation of whether septal gamma-aminobutyrate-containing interneurons are involved in the reduction in the turnover rate of acetylcholine elicited by substance P and beta-endorphin in the hippocampus. Neuroscience, 4, 1479-1484.
- Woolley CS, McEwen BS (1992) Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. J Neurosci, 12, 2549-2554.
- Wyss JM, van Groen T (1992) Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. Hippocampus, 2, 1-11.
- Yanai J, Rogel-Fuchs Y, Pick CG, Slotkin T, Seidler FJ, Zahalka EA, Newman ME (1993) Septohippocampal cholinergic changes after

destruction of the A10-septal dopaminergic pathways.  
*Neuropharmacology*, 32, 113-117.

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