

警報フェロモンによる性行動抑制メカニズムに関する研究

平成 20 年度入学

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医学専攻 博士課程

小林辰也

基礎となる学術論文

1. Kobayashi T, Kiyokawa Y, Takeuchi Y, Mori Y. (2011)
Pretreatment with CP-154526 blocks the modifying effects of alarm pheromone on components of sexual behaviour in male, but not in female, rats. *Chemical Senses*, 36, 623-32
2. Kobayashi T, Kiyokawa Y, Arata S, Takeuchi Y, Mori Y. (2013)
c-Fos expression during the modulation of sexual behavior by an alarm pheromone. *Behavioural Brain Research*, 30, 513-9
3. Kobayashi T, Kiyokawa Y, Arata S, Takeuchi Y, Mori Y.
Naloxone blocks the deterioration of male sexual behavior induced by alarm pheromone in rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, (In press)

目次

第1章 総合緒言.....	6
1-1 緒言.....	7
1-2 性行動.....	7
1-2-1 ラットの性行動.....	7
1-2-2 オスラットの性行動観察における指標.....	8
1-2-3 性行動発現機構.....	9
1-2-4 性行動制御機構.....	10
1-3 フェロモンの定義.....	11
1-4 警報フェロモン.....	11
1-5 本研究の目的.....	12
第2章 警報フェロモンが性行動に与える影響とCRHの役割.....	21
2-1 緒言.....	22
2-2 材料と方法.....	23
2-2-1 実験動物.....	23
2-2-2 提示溶液の作製.....	23
2-2-3 実験1; 警報フェロモンを性行動試験期間中に提示した際の性行動試験.....	23
2-2-4 実験2; 警報フェロモンを性行動試験前のオスラットもしくはメスラットに提示した際の性行動試験.....	24
2-2-5 実験3; 警報フェロモンによる性行動抑制に対するCRH受容体拮抗阻害薬の影響.....	24
2-2-6 性行動指標解析.....	25
2-2-7 統計解析.....	25
2-3 結果.....	25
2-3-1 実験1; 警報フェロモンを性行動試験期間中に提示した際の性行動試験.....	25
2-3-2 実験2; 警報フェロモンを性行動試験前のオスラットもしくはメスラットに提示した際の性行動試験.....	25
2-3-3 実験3; 警報フェロモンによる性行動抑制に対するCRH受容体拮抗阻害薬の影響.....	26
2-4 考察.....	26
2-5 小括.....	28
第3章 警報フェロモンの性行動抑制に関与する神経核の探索.....	39
3-1 緒言.....	40
3-2 材料と方法.....	40
3-2-1 実験動物.....	40
3-2-2 提示溶液の作製.....	41
3-2-3 性行動観察.....	41

3-2-4	免疫組織化学	42
3-2-5	CRH および c-Fos 蛋白質の発現解析	42
3-2-6	性行動指標の解析	43
3-2-7	統計解析	43
3-3	結果	43
3-3-1	警報フェロモン提示の性行動への影響	43
3-3-2	警報フェロモン提示の PVN への影響	43
3-3-3	警報フェロモン提示の他の神経核への影響	44
3-4	考察	44
3-5	小括	47
第4章	警報フェロモンの性行動抑制におけるオピオイドの役割の検討	57
4-1	緒言	58
4-2	材料と方法	58
4-2-1	実験動物	58
4-2-2	提示溶液の作製	59
4-2-3	実験 1; 警報フェロモンによる性行動抑制に対するオピオイド受容体拮抗阻害薬の効果	59
4-2-4	実験 2; c-Fos 蛋白質発現を指標とした警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割の検討	60
4-2-5	免疫組織化学	60
4-2-6	統計解析	61
4-3	結果	61
4-3-1	実験 1; 警報フェロモンによる性行動抑制に対するオピオイド受容体拮抗阻害薬の効果	61
4-3-2	実験 2; c-Fos 蛋白質発現を指標とした警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割の検討における行動解析	61
4-3-3	実験 2; c-Fos 蛋白質発現を指標とした警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割の検討における免疫組織化学	61
4-4	考察	62
4-5	小括	64
第5章	総合考察	76
5-1	結果の要約	77
5-2	警報フェロモンによる性行動抑制経路	78
5-3	ストレスによる性行動抑制の共通経路	79
5-4	警報のフェロモンの社会行動における役割	80
5-5	今後の研究	81

総括.....	84
参考文献	88
謝辞.....	101

第1章 総合緒言

1-1 緒言

生物を定義することは難しい。生物を無生物と区別するための特徴としては、自己増殖能力、エネルギー変換能力、恒常性の維持能力、自己と外界との明確な隔離をもつことであると考えられる。個体は、かならず老化などに伴う恒常性維持能力の破綻や捕食者による被食といった形でその終焉を迎える以上、自己増殖は最も優先されるべきことである。ここでいう自己とは、厳密な意味で全く同じ個体というものはないので、自己の遺伝子のことである。このように、生物にとって自己の遺伝子の保存がもっとも優先されるべきことであるため、性行動は生物にとって数ある社会行動の中で最も重要な行動の一つと考えられる。しかし性行動は、様々な外的刺激により抑制されることが知られている。

飢餓状態に陥った時や(Sachs, 1965)、捕食者が存在する状況(Blanchard, 1989)、または捕食者臭などの捕食者の存在を示唆する状況下においては(Bian, 2005)、おそらく個体の生存を優先する方が自己の遺伝子の保存に有利なために、性行動を発現する個体の割合が減少することが知られている。こういった外的刺激は生物の内的環境を変化させるストレス反応を引き起こすストレスであると考えられる事ができ、同様の例は畜産やペットといった動物を扱う身近な状況下においても存在する。例えば競走馬や純血種犬の種付けを行う際、メス個体の飼育場所にオス個体を連れていくと、新奇環境ストレスによって多くのオス個体が性行動を完遂できないことが、経験的に知られている。このように、様々なストレスによって性行動が抑制されることは実験動物においても観察されており、その局所的な中枢メカニズムも調べられているが、知覚されたストレスが最終的に性行動抑制を引き起こすまでの脳内情報伝達経路の全容に関しては未解明であった。その理由として、多くのストレスはその知覚様式が不明であることが挙げられる。例えば新奇環境ストレスの場合、それを知覚する感覚は視覚、聴覚、触覚を含めた複数に渡ることが予測されるため、それぞれの感覚に応じた様々な中枢神経核が興奮してしまい、その結果として性行動自体の抑制に関わっている神経核を特定するのが困難であった。

1-2 性行動

1-2-1 ラットの性行動

通常、雌雄のラットは互いの顔面および肛門性器付近を探索することから性行動を始める。発情期のメスラットは、オスラットと出会うと **darts and hops** (突然の移動や跳躍) や、**ear wiggling** (耳を震わせる行動)、**solicitation** (急激な逃避行動を伴うオスラットへの接触行動) といった受容行動を示す。これらの受容行動はオスラットのマウント(メスラットの後部より腰を突き動かす行動のうち、陰茎の挿入を伴わない行動) や挿入(メスラットの後部より腰をより深く突き動かす

行動で、陰茎の挿入を伴う行動)といった行動の引き金となる。そしてオスラットがマウントした際、メスラットはロードシス反射(背中を反り、尾を振動させ、頸部を緊張させる反射行動)を示す。マウントしては離れての繰り返しによって挿入が十分な回数に達すると、射精に至る。射精後約 6-10 分間の不応期が継続し、その間オスラットはメスラットに興味を示さずに 22kHz の超音波発声を伴いながら、毛づくろい行動や休憩行動をする。そして不応期が終了すると、再びオスラットは挿入を試み始める。このような一連の性行動は copulation period と定義され、一晚で 6~7 回繰り返されることが知られている(Hull, 2002)(図 1-1)。

1-2-2 オスラットの性行動観察における指標

本研究においては、実験手法として主にオスラットの性行動観察試験を用いた。性行動を観察することで、オスラットの性行動に関わる 4 つの構成要素、すなわち性的動機づけ、勃起の程度、交尾率(copulation rate)、射精の活性、の状態を知ることができる。また、それぞれの構成要素により関わるホルモンや神経伝達物質、神経核が変わってくるため、性行動の脳内の制御機構を知るうえで大きな助けとなる。

オスラットの性行動を測定する際に最も一般的に用いられる指標として次のようなものがある。

- ①マウント潜時 (メスラットと出会ってから最初のマウントまでの時間)
- ②挿入潜時 (メスラットと出会ってから最初の挿入までの時間)
- ③射精に必要なマウント数 (ある copulation period において1回の射精に必要なマウントの回数)
- ④射精に必要な挿入数 (ある copulation period において1回の射精に必要な挿入の回数)
- ⑤射精潜時 (ある copulation period において最初の挿入から射精までの時間)
- ⑥平均挿入間隔(挿入が起こってから次の挿入が起こるまでの平均時間)
- ⑦射精後の不応期 (射精が起こってから次の挿入がおこるまでの時間)
- ⑧射精後の超音波持続時間(射精が起こってから超音波発声が終わるまでの時間)
- ⑨射精回数(一定時間内に起こった射精の回数)
- ⑩Hit rate (射精に必要な挿入数をマウント数+挿入数で割ったもの)

上記の 10 の指標は 4 つの性行動の構成要素を表す。一つ目として、①と②に関しては、性的動機づけの強さを示す値である。マウントや挿入の潜時の間は、主にオスラットがメスラットのおいをかいたり、後ろから追いかけたりする時間を数値化しており、行動学的に欲求行動に分類される。この数値が短いほど性的動機づけが高いと考えられる(Hull, 2002)。

③と⑩に関しては勃起の程度を示す指標である。③について、オスラットのメスラットへのマウ

ントは毎回挿入を目的としているため、マウントは挿入の失敗であると考えることができる。十分な勃起は膣に挿入するための硬さと触覚刺激を得るために必要であるため、マウントは勃起が抑制されている際に増加すると考えられている(Hull, 2002)。⑩はオスラットが後ろからメスラットに乗った際にどれくらいの割合で挿入が可能であったのかを示す指標であり、勃起の抑制によって低下する。

⑤⑥⑦⑧⑨に関しては交尾率を示す指標である。交尾行動のペースが早ければ、⑤⑥⑦⑧は短縮され、⑨は多くなる。

④は射精の活性を示す指標である。この値は、数値が高い方が性的活性が高いように思われるが、実際はその逆である。性行動は射精を目的としているため、性的に活発なオスラットほど少ない回数の挿入で射精する。

ある刺激により性行動が促進されたのか、抑制されたのかを見極める際には、これらの指標を総合的に勘案して判断することになる。

1-2-3 性行動発現機構

性行動を引き起こす神経メカニズムを理解するための初期の実験は、脳内の大きな領域を破壊し、その後行動変化を観察することであった。時代が進むにつれ、その破壊領域はニッスル染色によって同定された神経核や神経核群、神経線維の通過経路に限ったものに変化し、さらには電気生理的な刺激や観察、ホルモンや薬物の直接投与や神経伝達物質のマイクロダイアリシス、神経細胞活動の観察などといった手法が取り入れられてきた(Hull, 2002)。

げっ歯類の性行動の発現において、においやフェロモンといった嗅覚刺激は最も重要な役割を果たすことが知られており、嗅覚系を外科的、遺伝的に除去することで、性行動に様々な欠陥を引き起こすことが知られている。嗅上皮を介したメスラットのにおい刺激や、鋤鼻器(VNO; Vomeronasal organ)を介したフェロモン刺激は、それぞれ嗅球と副嗅球(AOB; Accessory olfactory bulb)を介して扁桃体内側核(MeA; Medial amigdala)へ伝達され(Kondo, 1995; von Campenhausen, 2000)、その後、直接、または分界条床核(BNST; Bed nucleus of stria terminalis)を介して間接的に内側視索前野(MPOA; Medial Preoptic Area)に伝達される(Hull, 2002)。MPOAは性行動に中心的な役割を果たしており、性行動によりc-Fos蛋白質の発現が増加することや(Baum, 1992)、電気刺激により性行動が引き起こされること(Rodriguez-Manzo, 2000)、破壊により性行動が阻害されること(Kondo, 1995)が知られている。このMPOAには嗅覚刺激以外にも陰茎から脊髄や中脳中心被蓋野、subparafascicular核(SPF)を介した体性感覚刺激の入力を受けている。このMPOAからは、視床下部や中脳、脳幹に対して投射が認められ(Coolen, 1998; Rizvi, 1996)、自律神経や運動神経を制御することで性行動を発現していると考えられる(図 1-2)。例えば、腹側被蓋野から側坐核(NAc; Nucleus accumbens)に投射している中脳辺縁系ドーパミン経路は、性的動機づけに関与して

いるとされており MPOA から入力を受けていることが知られている(Hull, 2007)。同様に、勃起に関しても、破壊実験などにより室傍核(PVN; Paraventricular nucleus of hypothalamus)や巨細胞性傍核(nPGi; Nucleus paragigantocellularis)などをはじめとする神経核の関与は明らかになっている(Argiolas, 2005; Giuliano, 2000)。また、射精により、内側扁桃体背側部尾側や、分界条床核内側部尾側、内側視索前核背側部尾側、SPF といった神経核で c-Fos 蛋白質の発現増加が認められることが知られており、これらの神経核は MPOA と相互に投射を持つことが知られている。(Coolen, 1998; Coolen, 1997; Heeb, 1996)。しかしながら、上記のような嗅覚系から MPOA までの情報伝達経路は比較的明らかになっているものの、勃起や射精がどのような神経情報伝達経路を経て引き起こされるのかははっきりと明らかになっていない(Hull, 2002)。

1-2-4 性行動制御機構

これまで、性行動の発現に関わる中枢神経の仕組みと同様に、性行動の抑制や促進を司る中枢制御機構に関しても研究が進められてきた。神経伝達物質やホルモンの全身投与や、脳内神経核の破壊実験、神経伝達物質の微量局所投与などの手法を用いて、関連する神経核や神経伝達物質に関する研究結果が蓄積されてきた(Hull, 2002)。例えば、ドーパミンを全身投与することで、性的動機づけ、および交尾率、射精の活性、勃起の程度の促進が認められる。また、NAc を除去した際には、性的動機づけには変化が認められなかったものの、勃起の程度を抑制し、交尾率を低下させた。こういった研究の報告に関しては表 1-1 および表 1-2 にまとめた。

一方で、様々なストレスを用いた実験による報告から、ストレスによるオスラットの性行動の抑制は大きく2つのパターンに分けられると考えられる。1つ目は、オスの性行動が引き起こされなくなるパターンである。捕食者臭の提示(Blanchard, 1989; Koskela, 1995)や新奇環境ストレス(Pfaus, 1995)は、性行動を引き起こすオスラットの割合を減少させることが知られている。これは欲求行動を著しく減少することから、性的動機づけの極端な低下が原因であると考えられる。2つ目のパターンは、性行動は引き起こされるものの、それぞれの性行動の構成要素が低下するパターンである。Retana-Marquez, S.らの研究では、拘束、フットショック、部分水浸をそれぞれ用いてオスラットの性行動の変化を観察している(Retana-Marquez, 1996)。急性的にストレスを提示した場合に着目すると、フットショックは勃起の指標のみを低下させたのに対し、拘束は勃起に加えて性的動機づけの指標を低下させた。さらに部分水浸は勃起と性的動機づけに加えて交尾率の指標を低下させた。また、慢性的にストレスを与え続けた場合に着目すると、フットショックは、ストレス提示1日目から勃起の指標を低下させ、続いて4日目からは性的動機づけおよび交尾率の指標を低下させたものの、射精の活性に関しては20日間にわたりストレスを与え続けても変化することはなかった。以上より、ストレスにより性行動

が抑制される際には、まず勃起が抑制され、続いて性的動機づけおよび交尾率が抑制されると考えられる。また、射精の活性に関しては、別の実験で性的経験のあるオスラットと性的経験のないオスラットの性行動を比較した際に、性的経験のないオスラットにおいて有意に低下したことから(Retana-Marquez, 2009)、勃起、性的動機づけ、交尾率とは共通する部分の少ない神経経路を介して制御していると考えられる。このように、ストレスの種類や期間によって変化を受ける性行動の指標が異なることから、性行動抑制に関わる神経伝達が複数存在し、受けたストレスの程度や期間により活性化される経路が変化することが予想される。

このように、脳内の局所における性行動制御機構やストレスによる性行動抑制の行動変化の様式が少しずつ明らかになってはきたものの、ストレスによる性行動変化における神経伝達機構の全容は未だ明らかではない。

1-3 フェロモンの定義

多くの動物種においては、嗅覚を用いた情報伝達機構を発達させており、同種個体間でのコミュニケーションにおいて、フェロモンを用いた情報交換をしばしば観察することができる。そもそもフェロモンとは、同種個体間で分泌、伝達される物質で、それを受容した個体の行動もしくは生理環境に何らかの影響を及ぼす化学物質と1959年にKarlsonとLuscherが定義した(Karlson, 1959)。フェロモンを利用したコミュニケーションには、視覚や聴覚を利用したコミュニケーションと違い、その効果が遠距離まで達し、信号を発した動物が不在でも情報伝達が行えるという利点があり、この特徴がフェロモン特有の効果を引き起こすのに大きな役割を担っていると考えられる。フェロモンはその作用の仕方から大きく二つの種類に分類される(Wilson, 1963)。一つ目はリリーサーフェロモンと言われ、フェロモンを受容した個体はすぐに反応し、誘因、忌避などの行動が引き起こされる。このリリーサーフェロモンは昆虫で多く調べられており(Tillman, 1999)、カイコガの性フェロモンであるボンビコールなどが有名である(Sakurai, 2004)。また、哺乳類においてもオス豚の唾液に含まれる物質が性フェロモンとして作用することが知られている(G.P. Pearce, 1987)。これに対し、受容した個体に特定の内分泌的な変化を引き起こすことで、結果的にある特定の行動を引き起こすフェロモンをプライマーフェロモンという。このプライマーフェロモンの効果として、マウスの幼若メス個体にオスの成熟個体のおいをかがせることで、発情開始時期を早めるVandenbergh効果や(Vandenbergh, 1976)、ヤギの成熟オス個体の臭いを非繁殖期のメス個体にかがせることで排卵を惹起するオス効果などがよく知られている(Iwata, 2000)。

1-4 警報フェロモン

警報フェロモンは、同種他個体に危険の存在を知らせるためのフェロモンであり、昆虫などの無脊椎動物で多く確認されている。脊椎動物においても、マウス(Rottman, 1972)、ウシ(Boissy, 1998)、ブタ(Vieuillethomas, 1992)などでその存在は確認されている。当研究室では、ラット警報フェロモンに関する一連の研究を進めてきた。まず初めに、小さなアクリルボックスの中にドナーラットを導入してフットショックを与えることで警報フェロモンの分泌を促すことができ、アクリルボックスの中に別のレシピエントラットを導入することで、レシピエントラットにストレス誘因性体温上昇反応の増悪を引き起こせることを発見した(Kikusui, 2001)。次にこのストレス誘因性体温上昇反応を生物検定系として利用することで、警報フェロモンがテストステロン非依存的に(Kiyokawa, 2004)肛門周囲腺から分泌されること(Kiyokawa, 2004)、ストレス反応に関連する神経核における c-Fos 蛋白質発現を増加させること(Kiyokawa, 2005)が明らかになった。また、小さなアクリルボックスの天井に水滴を吹き付けておき、その中で麻酔下のドナーラットの肛門周囲部を局所電気刺激することで警報フェロモンを分泌させた後に、天井の水滴を回収し提示することで、レシピエントラットに警報フェロモンを直接提示したのと同様の反応を引き起こすことができたことから、警報フェロモンは水溶性であることも明らかとなっている(Kiyokawa, 2005)。このフェロモン水を用いることで、ホームケージにおけるストレス誘因性体温上昇反応の増悪や(Kiyokawa, 2005; Kiyokawa, 2007)、変形オープンフィールド試験における防御行動やリスクアセスメント行動の増加(Kiyokawa, 2006)、聴覚性驚愕反射の亢進(Inagaki, 2008)といった別の実験系における警報フェロモンの影響を観察することが可能となった。また、VNO の外科的切除が、フェロモン水を提示されたレシピエントのストレス誘因性体温上昇反応の増悪を阻害したことから、警報フェロモンが VNO で受容されていることも確認された(Kiyokawa, 2007)。しかしながら、これまで警報フェロモンの個体への影響は観察されてきたものの、社会行動への影響は観察されてこなかった。

1-5 本研究の目的

本研究の目的は、ラット警報フェロモンを研究モデルとすることで、ストレス反応が性行動を抑制する脳内情報伝達経路を明らかにすることである。先行研究より、ラット警報フェロモンは、他個体に VNO で受容されることで、受容個体にストレス反応を引き起こすことのできる物質であることが明らかとなっている。また、げっ歯類を用いた多くの先行研究により、フェロモンは VNO で受容されたのちは、AOB への情報伝達を経て、MeA や BNST に伝達されることが明らかとなっている(von Campenhausen, 2000) (図 1-2)。このように、警報フェロモンの受容の際には鋤鼻嗅覚系の神経核が興奮することが明らかなたため、性行動の抑制に関わっている神経核の特定が可能であると考えられる。

この実験系を用いて、第 2 章では、警報フェロモンを様々なタイミングや方法で提示することで、警報フェロモンが性行動に与える影響を観察した。また、CRH 受容体拮抗阻害薬である

CP-154526 を用いることで、警報フェロモンが性行動を抑制する際の CRH の関与について検討した。第 3 章では、免疫組織化学的手法を用いることで、警報フェロモンによる性行動抑制に関与する神経核および、CRH の分泌源の検討を行った。第 4 章では、オピオイド受容体拮抗阻害薬と免疫組織化学的手法を組みわせることで、警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割を検討した。

略語表

- Arc . . . Arcuate nucleus, 弓状核
- BLA . . . Basolateral amygdala, 扁桃体外側基底核
- BNST . . . Bed nucleus stria terminalis, 分界条床核
- BNSTa . . . Bed nucleus stria terminalis anterior division, 分界条床核吻側
- BNSTam . . . Bed nucleus stria terminalis anterior division medial group, 分界条床核
内側部吻側
- BNSTal . . . Bed nucleus stria terminalis anterior division lateral group, 分界条床核外
側部吻側
- BNSTp . . . Bed nucleus stria terminalis posterior division, 分界条床核尾側
- CeA . . . Central amygdala, 扁桃体中心核
- CRH . . . Corticosteron releasing hormone, コルチコステロン放出ホルモン
- dIPAG . . . Dorsolateral periaqueductal gray, 中脳中心灰白質背外側部
- HPA 軸 . . . Hypothalamus-Pituitary-Adrenal grand axis, 視床下部—下垂体—副腎軸
- Magnocellular part of PVN . . . Magnocellular part of Paraventricular nucleus of
hypothalamus, 室傍核大細胞性領域
- MeA . . . Medial amygdala, 扁桃体内側核
- MPOA . . . Medial preoptic area, 内側視索前野
- NAc . . . Nucleus accumbens, 側坐核
- NAc core . . . Nucleus accumbens core, 側坐核 core
- NAc shell . . . Nucleus shell, 側坐核 shell
- nPGi . . . Nucleus paragiganto cellularis, 巨細胞性傍核
- PAG . . . Periaqueductal gray, 中脳中心灰白質
- Parvocellular part of PVN . . . Parvocellular part of paraventricular nucleus of
hypothalamus, 室傍核小細胞性領域
- PVN . . . Paraventricular nucleus of hypothalamus, 室傍核
- vlPAG . . . Ventrolateral periaqueductal gray, 中脳中心灰白質腹外側部

オス

メス

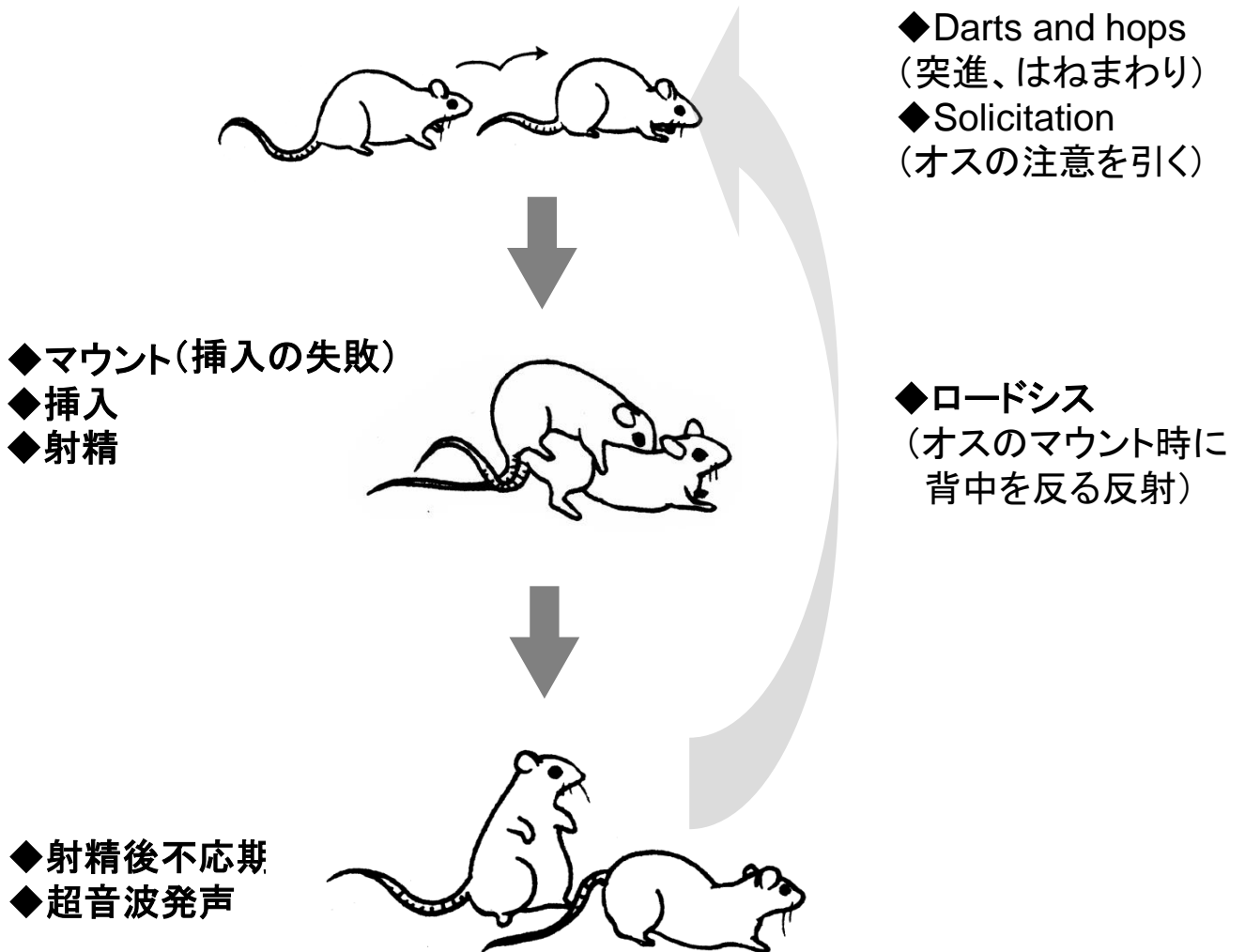
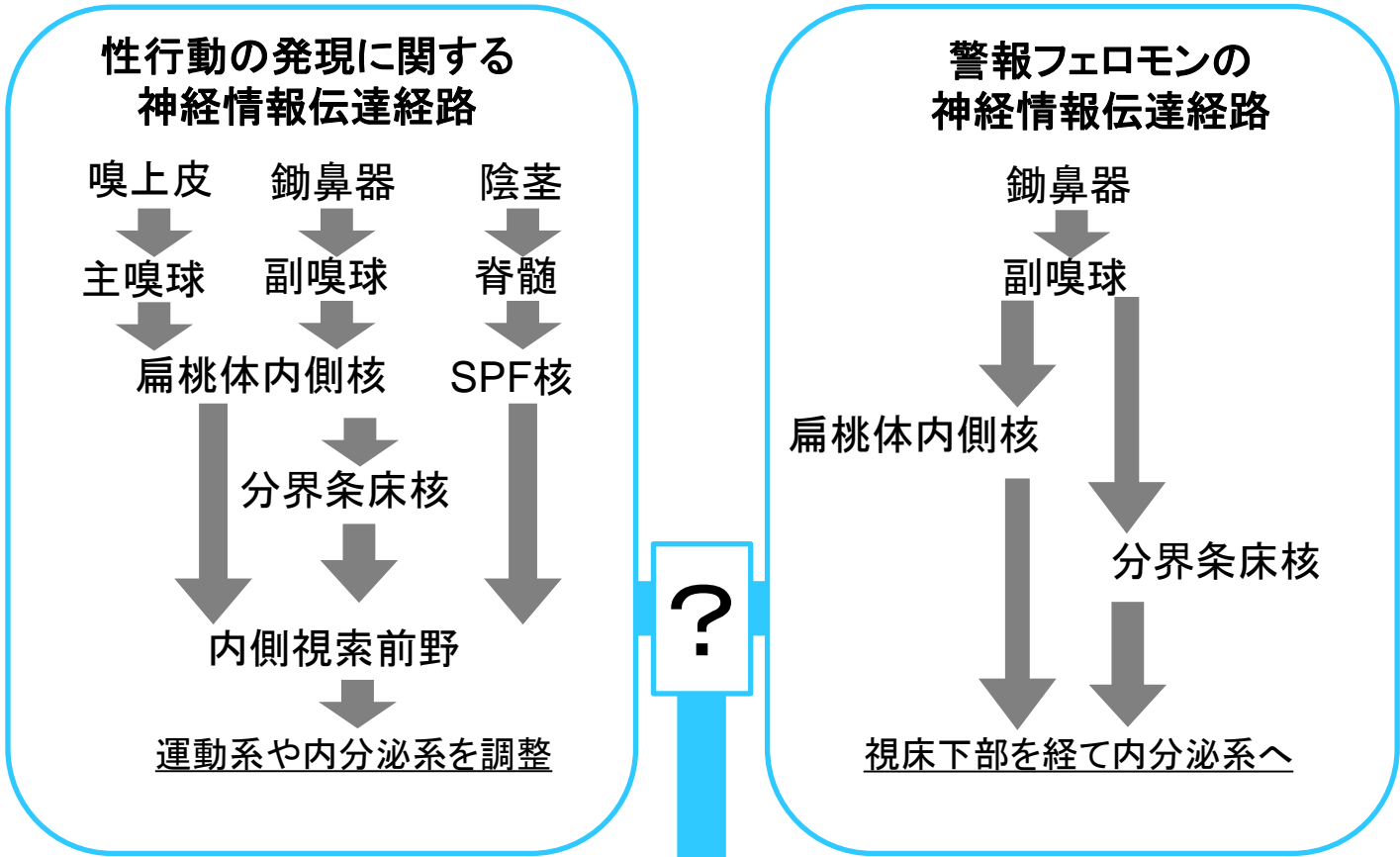


図1-1、ラットの性行動様式



本研究の目的
 警報フェロモンをはじめとするストレスはどのように性行動の回路に作用することで性行動を制御しているのか明らかにする。

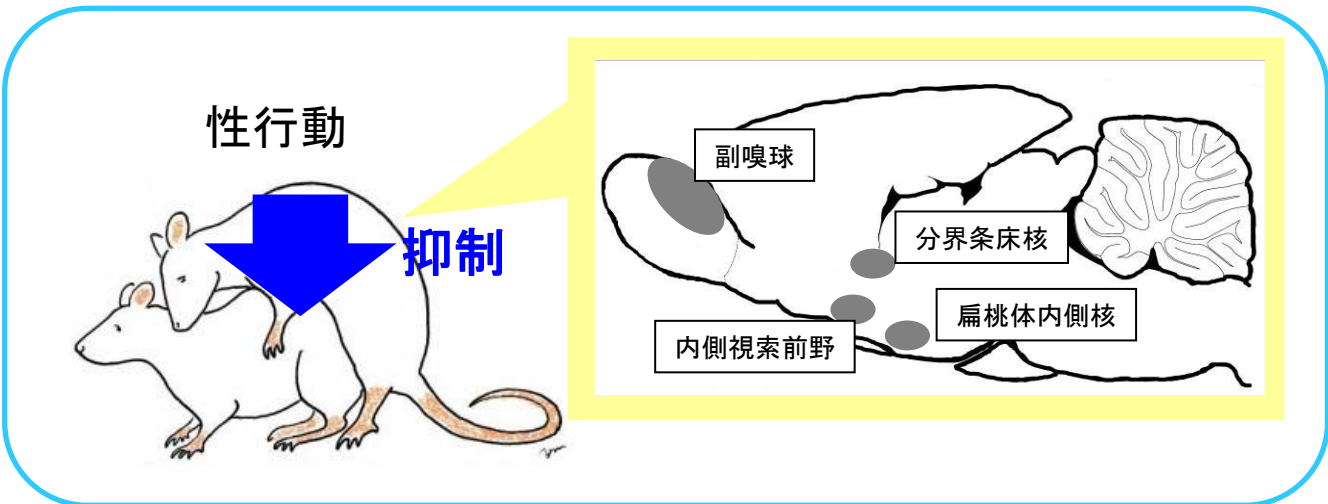


図1-2、ラットの性行動発現および警報フェロモンの情報伝達に関与していると考えられる神経伝達経路と、本研究の目的

表 1-1 薬物全身投与によるオス動物への性行動の影響

神経伝達物質	薬物	性的動機づけ	交尾率	射精	勃起
ドーパミン	Mixed ag.	↑	↑	↑	↑
	Mixed antag.	↓	↓	↓	↓
	D ₁ ag.		↑		
	D ₁ antag.			↓	
	D ₂ ag.		低↑、高↓	↑	↓
ノルアドレナリン	D ₂ antag.		↑	↓	
	前駆体 または 副交感神経刺激		↓	↓	
	α ₂ ag.		↓		↓
	α ₂ antag.		↑	↑	↓
	α ₁ ag.				↑ ↓
	α ₁ antag.		↓		
セロトニン	B ag. or antag.		↑ ↓		
	セロトニン または SSRI	↓	↓	↓	
	5-HT _{1A} ag.		↓	↑	↓
	5-HT _{1B} ag.			↓	
	5-HT _{2C} ag.	↓	↓		
	5-HT ₂ (nonselective) ag.	↓			
	5-HT ₂ antag.	↑			
アセチルコリン	Nonspecific ag.	↓	↑		
	Nonspecific antag.	↓			
	Musc. ag.	↑	↑		
	Musc. Antag.	↓	↓		
GABA	General	↓			
	GABA _A ag.	↓			
	GABA _A antag.		⇔		
	GABA _B ag.	↓			
	GABA _B antag.		⇔		

つづき

オピオイド	Mixed antag.	↓	↑ ↓	↑	
	μ ag.		↓		↓
	κ ag.		↓		
	δ ag.		↓	↑	
オキシトシン	OT		低 ↑、高 ↓	↑	
	OT antag.		↓		
GnRH	GnRH	↑	↑ ↓ ⇔	↑	
CRH	CRH		↓	↓	
ニューロペプチドY			↓		
アンギオテンシンII		↓	↓		

薬物を全身投与した際のそれぞれの性行動の構成要素への影響を示した。↑は活性化、↓は抑制、⇔は変化がなかったことを示す。高；高濃度投与時、低；低濃度投与時、ag.;agonist, antag.; antagonist

参考文献番号；

3,6,11,13,21,22,28,33,38-40,55,65,82,84,89,96-98,101,103,111,113,115,119,130,144

表 1-2 性行動関連神経核の除去および薬物投与によるオス動物への性行動の影響

神経伝達物質 または除去	薬物	性的動機づけ	交尾率	射精	勃起
側坐核					
除去		⇔	↓		↓
セロトニン	5-HT		↓	↓	↓
	5-HT1A ag.			↑	
ドーパミン	Mixed ag.	↑			
分界条床核					
ニューロキニンK	NK-1 ag.	↓			
内側視索前野					
除去			↓		
ドーパミン	Mixed ag.		↑		↑
	Mixed antag.	↓	↓		↓
	D1 ag.		↑		↑
	D1 antag.	↓	↓	↑	↓
	D2 ag.	高↓	高↓	↑	低↑高↓
ノルアドレナリン	前駆体 または 副交感神経刺激		↑		
	Nonspecific α antag.		↓		
	Nonspecific β antag.		↓		
	α ₂ ag.		↓		
	α ₂ antag.		↑		
セロトニン	セロトニン または 前駆体		↓		
	5-HT1A ag.		↑	↑	
	5-HT1B ag.		↓		
GABA	GABAA ag.		↓		
	GABAA antag.		↑	↑	
オピオイド	Nonspecific antag.	↓			
	μ ag.		高↓	低↑	低↓
	κ ag.			低↑	
アセチルコリン	Nonspecific ag.			↑	
	Musc. ag.			↑	
	Musc. Antag.		↓	↓	

つづき

		外側視床下部			
除去					↓
セロトニン	SSRI	↓			↓
		視床下部腹内側核			
除去		↑			↓
		室傍核			
除去					↓
ドーパミン	Mixed ag.				↑
	D ₂ ag.				↑
オピオイド	μ ag.				↓
		腹側被蓋野			
オピオイド	Mixed antag.	↓			
		背側縫線核			
セロトニン	5-HT	↓	↑	↑	↑
		巨細胞性傍核			
除去					↑
		脊髄			
ドーパミン	Mixed ag.		↓	↑	↓
セロトニン	5-HT		↓		
	5-HT _{1A} ag.			↑	↓
オピオイド	μ ag.			↓	
	Mixed antag.			↑	
GABA	GABAB ag.				↓

特定の神経核の除去や薬物を局所投与した際のそれぞれの性行動の構成要素への影響を示した。↑は活性化、↓は抑制、⇔は変化がなかったことを示す。高；高濃度投与時、低；低濃度投与時、ag.;agonist, antag.; antagonist

参考文献番号；

2,5-7,11,13,17,19,22-25,28,30-32,40,43,45,47,48,50,53,55,69,84-88,91,92,94-97,99,102,106,107,112,119,124,135,143,144,153

第2章 警報フェロモンが性行動に与える影響と CRHの役割

2-1 緒言

生物にとって、自己の遺伝子の保存がもっとも優先されるべきことである。そのため、数ある社会行動の中で、性行動は生物にとって最も重要な行動の一つである。しかし低栄養状態になった時や、危険を知らせるシグナルを受容した時など、個体の生存が脅かされる時にはおそらく個体の生存が優先されるため、性行動は抑制されることが知られている。例えば、捕食者のおい存在下では、げっ歯類のオス個体の性行動を発現する割合が低下し(Bian, 2005)、生殖器の重量が低下し、またテストステロン値が低下するといった報告が存在する(Ronkainen, 1994; Ylonen, 1994)。また、メス個体において捕食者臭の提示により性周期が停止するといった報告もある(Apfelbach, 2001; Koskela, 1996)。このような性行動の抑制は捕食者臭のように生物学的に危険なおいに限らず、恐怖条件づけ学習により嫌悪学習したおいによっても引き起こされることが知られている(Lawrence, 1987)。そのため、同じく危険を知らせるシグナルである警報フェロモンは性行動を抑制することが予測される。

Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)は41のアミノ酸からなるペプチド鎖で、PVNの細胞から分泌される。PVN由来のCRH分泌がHPA (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal gland)軸の活性化の引き金となることから、このCRHはストレス反応において重要な働きを持つ。例えばフットショック(Imaki, 1993)や拘束(Imaki, 1995)、強制水泳(Harbus, 1989)といったストレスラーによって、PVNにおけるCRHのmRNA発現量が増加することが知られている。またこのようにして分泌されたCRHは他のいくつかの行動反応にも影響を与える。CRHの脳室内投与は高架式十字迷路におけるオープンアーム滞在時間の減少や(Jones, 1998)、聴覚性驚愕反射の亢進(Swerdlow, 1986)、オープンフィールド試験における探索時間の減少(Takahashi, 1989)といった行動変化を引き起こす。これらに加えて、CRHは性行動を含む社会行動において大きな役割を担う。例えば、CRHの脳室内投与はオス個体の性行動を用量依存的に抑制したという報告が存在する(Sirinathsinghji, 1987)。警報フェロモンがPVNにおけるc-Fos蛋白質の発現を増加させたことや(Kiyokawa, 2005)、警報フェロモンによる聴覚性驚愕反射の亢進がCRHの受容体拮抗阻害薬の事前投与により緩和したこと(Inagaki, 2010)を考え合わせて、もし警報フェロモンが性行動を抑制するのであれば、その抑制メカニズムにCRHが関与することが考えられる。

これらの仮説を検証するため、まず実験1において警報フェロモンが性行動に与える影響を検討した。警報フェロモンをオスラットのホームケージ内に提示し、その5分後にメスラットを導入することで、警報フェロモン存在下における性行動を雌雄それぞれ観察した。実験2では、警報フェロモンがオス、メスどちらの被験動物に作用するのかを検討するため、警報フェロモンをオスラットもしくはメスラットどちらかの被験動物に5分間提示し、それを回収した後に性行動試験を行った。実験3では警報フェロモン作用におけるCRHの役割を検討するため、CRH受容体拮抗阻害薬であるCP-154526をあらかじめ投与したオスラットに警報フェロモンが与える影響を観察した。

2-2 材料と方法

2-2-1 実験動物

実験には Wistar Imamichi 系ラット(オス個体 94 頭、メス個体 94 頭)を供試した。オスラットは 7.5 週齢、メスラットは 8.5 週齢の時点で動物繁殖研究所(茨城県; 日本)より購入した。動物の搬入後はそれぞれ 2 頭ずつアクリル製の飼育ケージ(440W×280D×180H mm)にて飼育した。すべての動物は温度(24±1℃)、相対湿度(45±5%)、と明暗周期(明期:8:00~20:00、暗期:20:00~8:00)が管理された飼育室内において維持した。餌と水は自由摂取とした。メスラットの膣スミアを 1 週間にわたって観察し、メスラットが発情前期の日に実験に供試した。

2-2-2 提示溶液の作製

警報フェロモン溶液は私たちの研究室で確立された方法で作製した (Kiyokawa, 2005)。オスの Wistar Imamichi ラット(12~18 週齢)を警報フェロモンのドナーとして用いた。ドナーラットにペントバルビタールを (Somnopentyl; MERCK Animal Health, Boxmeer, Netherlands) 50ml/kg の用量で腹腔内投与することで麻酔し、電気刺激用の電極として注射針 (27G) を肛門周囲に取り付けた。その後、あらかじめ天井に純水 (5ml) を噴霧したアクリルボックス (200×200×100mm) に麻酔下のドナーを 5 分間導入し、注射針を通じて 15 回の電気刺激 (10V 1 秒間) を 20 秒間隔で肛門周囲に与えることで、警報フェロモンを分泌させた。刺激後ドナーをアクリルボックスから取り出し、天井の水滴をポリプロピレン製のコニカルチューブに回収し、4℃にて当日行う性行動試験まで保存した。同様にして、ドナーの頸部を刺激した後に回収した溶液は、同じようにラットのにおいを含むと考えられるものの、被験動物にストレス反応を引き起こさないことが知られているため、対照水として用いた。提示溶液作製に用いたアクリルボックスは、毎回使用前にお湯と洗剤を用いて洗浄し、ペーパータオルにて水滴を完全に拭き取った。

2-2-3 実験 1; 警報フェロモンを性行動試験期間中に提示した際の性行動試験

すべての個体は実験前 2 日間にわたり、5 分間ずつハンドリングを行った。また、実験前日にオスラットを新たな飼育ケージに移して個飼いにし、その後実験室および、実験器具への馴化を 30 分間おこなった。メスラットも同様にして実験室への馴化を 30 分間行った。

性行動試験は、オスラットの飼育ケージ内にて赤色灯下で行われた。実験当日の 18:00 に被

験動物を実験室にケージごと移動し、暗期となる20:00に赤色灯を点灯するとともに、ケージの天井を事前にアクリル板に空気穴をあけることで作製した天井に取り替えた。約30分の馴化期間をおいた後、提示溶液(水、警報フェロモン溶液)を750 μ l含ませた濾紙を2枚ケージの壁に貼り付けて提示し、その5分後にメスラットを導入することで、60分間の性行動試験を行った。試験期間中の性行動はケージ上方よりビデオカメラを用いて撮影し、後日解析を行った。

被験動物を、提示されるサンプルにより無作為にコントロール群(n=9)およびフェロモン群(n=10)の2グループに分けた。

2-2-4 実験2;警報フェロモンを性行動試験前のオスラットもしくはメスラットに提示した際の性行動試験

すべての個体に対し、実験前2日間にわたり、5分間ずつハンドリングを行った。また、実験前日にすべての個体を新たな飼育ケージに移して個飼いにし、その後、実験室および、実験器具へ30分間の馴化をおこなった。

実験2は以下の点を除いて実験1と同様の方法で行われた。提示溶液は性行動試験前のオスラット、またはメスラットのみ提示した。この実験では、提示溶液を濾紙に含ませ、2枚のアクリル板(120 \times 60mm、厚さ3mm)に挟んで提示を行った。このアクリル板の片方には直径9mmの穴が18か所あけられており、供試個体がこの穴を通して濾紙に接することが可能となっている。このアクリル板を被験個体のホームケージに導入し、5分間のサンプル提示を行った。サンプルを提示後、アクリル板を取り除き、メス個体をオス個体のホームケージに導入した。その後60分間ビデオ撮影を実施し、後に行動を解析した。

供試動物群を、提示対象と提示するサンプルにより無作為に4グループに分けた。すなわち、オス-コントロール群(n=9)、オス-フェロモン群(n=9)、メス-コントロール群(n=9)、およびメス-フェロモン群(n=9)である。

2-2-5 実験3;警報フェロモンによる性行動抑制に対するCRH受容体拮抗阻害薬の影響

すべての個体に対して、実験1と同様にハンドリング、個飼いへの移行、実験器具への馴化を行った。

実験当日、実験の60分前にオスラットに対して、溶媒(0.5%のtragacanth gumの粉末を含んだ食塩水;Wako Pure Chemical; Osaka, Japan)または、CP-154526(Pfizer; New York, NY)を10mg/kg または 30mg/kg の割合で腹腔内投与した。提示溶液の提示および、性行動観察に関しては実験2と同様の方法で行われた。

供試動物群を、提示されるサンプルとCP-154526の濃度により無作為に4群に分けた。すな

わち、コントロール-CP 0mg/kg 群 (n=9)、フェロモン-CP 0mg/kg 群 (n=9)、フェロモン-CP 10mg/kg 群 (n=9)、およびフェロモン-CP 30mg/kg 群 (n=9)である。

2-2-6 性行動指標解析

本研究では、性行動試験期間中に観察された最初の 2 回の copulation period における性行動を解析した。オスラットの性行動として、マウント潜時、挿入潜時(メスラットがオスラットのホームケージに導入されてからマウントおよび挿入が起こるまでの時間)、射精潜時(オスラットが最初に挿入してから射精するまでの時間)、マウント数、挿入数(1 回の射精に必要なマウントおよび挿入の回数)を記録した。メスラットの性行動は、ロードシス数を記録した。また、darts and hops 数と sollicitaion 数については最初の 15 分間のみ記録した。これらに加えて、Hit rate (挿入数をマウント数+挿入数で割った値)、射精後不応期の持続時間、ロードシス商(ロードシス数をマウント数+挿入数で割った値)を計算した。

2-2-7 統計解析

全ての統計解析は有意水準を 5%とした。実験1と実験 2 の結果は one-way analysis of variance (ANOVA)により、また実験3の結果は、ANOVA による解析の後に、Dunnett's post hoc test による解析を行った。

2-3 結果

2-3-1 実験 1; 警報フェロモンを性行動試験期間中に提示した際の性行動試験

第 1 copulation period において、警報フェロモンはマウント数を増加させ[F(1,17) = 7.38, $p < 0.05$]、Hit rate を低下させ[F(1,17) = 5.68, $p < 0.05$]、射精潜時を延長させた[F(1,17) = 6.85, $p < 0.05$](図 2-1、および表 2-1)。警報フェロモンが変化を与えなかった指標に関しては、表 2-1、および表 2-2 にまとめた。第 2 copulation period において、警報フェロモンは全ての性行動指標に変化を与えなかった(図 2-1、および表 2-1)。

2-3-2 実験 2; 警報フェロモンを性行動試験前のオスラットもしくはメスラットに提示した際の性行動試験

オスラットのみに警報フェロモンを提示した際には、第 1 copulation period においてオスラットのマウント数が増加し[F(1,16) = 16.52, $p < 0.001$]、Hit rate が有意に低下した[F(1,16) = 15.05, $p < 0.01$](図 2-2、および表 2-3)。警報フェロモンが変化を与えなかった指標に関しては、図 2-2、および表 2-3、表 2-4 にまとめた。第 2 copulation period において、警報フェロモンは全ての性行動指標に変化を与えなかった(図 2-2、および表 2-3)。

メスラットのみに警報フェロモンを提示した際には、第 1 copulation period においても第 2 copulation period においても、オス、メス両方の性行動指標は変化しなかった(図 2-2、および表 2-4、表 2-5)。

2-3-3 実験 3; 警報フェロモンによる性行動抑制に対する CRH 受容体拮抗阻害薬の影響

第 1 copulation period において、警報フェロモンおよび CP-154526 は、オスラットのマウント数[F(3,35) = 2.95, $p < 0.05$]、Hit rate[F(3,35) = 3.26, $p < 0.01$]、射精潜時[F(3,35) = 3.26, $p < 0.05$]および射精後の不応期 F(3,35) = 4.20, $p < 0.05$]に変化を与えた(図 2-3、および表 2-6)。警報フェロモンおよび CP-154526 が変化を与えなかった指標に関しては表 2-6、および表 2-7 にまとめた。Post hoc test より、警報フェロモンはオスラットのマウント数を増加させ($p < 0.05$)、Hit rate を低下させること($p < 0.01$)が示唆された(図 2-3)。CP-154526 の事前投与はこれらの警報フェロモン効果を緩和した。同時に、高用量の CP-154526(30 mg/kg)は、射精後の不応期を延長させた($p < 0.05$)(表 2-6)。第 2 copulation period において、警報フェロモンおよび CP-154526 は、オスラットのマウント数[F(3,35) = 3.36, $p < 0.05$]、Hit rate[F(3,35) = 2.97, $p < 0.05$]、および射精後の不応期[F(3,35) = 3.28, $p < 0.05$]に変化を与えた(図 2-3、および表 2-6)。警報フェロモンおよび CP-154526 が変化を与えなかった指標に関しては図 2-3、および表 2-6 にまとめた。Post hoc test より、第 2 copulation period においても警報フェロモンはオスラットのマウント数を増加させ($p < 0.05$)、Hit rate を低下させること($p < 0.05$)が示唆された(表 2-6)。CP-154526 の事前投与はこれらの警報フェロモン効果を緩和した。また、第 2 copulation period において、低用量(10 mg/kg) ($p < 0.05$)、および高用量(30 mg/kg)の CP-154526($p < 0.05$)は、射精後の不応期を延長した(表 2-6)。

2-4 考察

警報フェロモンを性行動試験全般にわたり、オスラット、メスラット両方に提示することで、オスラットのマウント数の増加、Hit rate の低下、射精潜時の延長といった変化を引き起こした(実験 1)。これらの結果は、警報フェロモンがオスラットの性行動に変化を与えることを示唆している。警報フェロモンを性行動前のオスラットのみに提示した際にも同様の変化が引き起こされたこ

とから(実験 2)、警報フェロモンはオスラットに作用することでオスラットの性行動を変化させることが示唆された。これらに加えて、CRH の受容体拮抗薬である CP-154526 の事前投与が警報フェロモンによる性行動変化を緩和することが明らかとなった(実験3)。この結果は、CRH が警報フェロモンによる性行動変化において重要な役割を果たしていることを示唆している。以上の結果より、警報フェロモンが CRH の分泌を促し、この CRH がオスラットの性行動指標を変化させることが示唆された。

性行動の主目的は射精であり、この射精は挿入を繰り返すことで達成されるため、ある性行動の変化を促進か抑制か見極める際には、これらの性行動指標がもっとも大切な判断基準となる。しかしながら、本実験では射精潜時や挿入回数といった指標が実験 1 から 3 までを通して変化していないため、現時点ではマウント数と Hit rate の行動変化を通して、警報フェロモンによる性行動指標の変化が促進方向への変化なのか抑制方向への変化なのかを判断しなければならない。マウント数と Hit rate は性行動のうちで、勃起の程度について計測する指標であり、マウント数の増加と Hit rate の低下は、勃起の抑制を示している。これに加えて、警報フェロモンによる性行動指標の変化が CRH 依存的であるという本研究の結果から、警報フェロモンにより引き起こされた性行動の変化は、抑制的な変化であると推察される。一般的にオスラットにおいて、CRH の活性化は性行動の抑制をもたらすと考えられている。たとえば、CRH を脳室内に投与した際には、マウント数の増加とともに挿入数の増加が報告されており(Sirinathsinghji, 1987)、CRH が性行動に対して抑制的な神経伝達物質であることが示唆される。これに加えて、部分水浸やフットショック、拘束といったストレスは、血漿中のコルチコステロン値の上昇から判断されるように CRH の分泌を促すとともに、射精潜時の延長を伴いながらマウント数の増加と Hit rate の低下を引き起こすことが知られており(Retana-Marquez, 2009; Retana-Marquez, 2003)、CRH の分泌が性行動を抑制的に変化させるという考えを支持するものである。以上より、警報フェロモンがオスラットの性行動を抑制したと考えることができる。実験 1 において射精潜時の延長が観察されたことも、この仮説を支持する結果である。

本実験のもう一点の重要な発見は、警報フェロモンがメスラットの性行動に影響を与えなかったことである。考えられる可能性は、血中の高濃度のエストロゲンとプロゲステロンの作用がフェロモン効果を上回ったという可能性である。本研究では、全てのメスラットは発情前期であり、この周期のメスラットは他の周期のメスラットに比べて血中のエストロゲンおよびプロゲステロン濃度が高くなっている。このエストロゲンとプロゲステロンは、CRH の分泌に対して抑制的な作用を持つ。例えば、卵巣除去メスラットへのエストロゲンの投与は、PVN における CRH の mRNA の発現を減少させ(Paulmyer-Lacroix, 1996)、フットショックにより引き起こされた PVN における c-Fos 蛋白質発現の増加を緩和する(Gerrits, 2005)。行動指標を観察する実験においても、その作用は確認されており、エストロゲンとプロゲステロンの皮下投与は CRH の脳室内投与により引き起こされた聴覚性驚愕反射の亢進を緩和する(Toufexis, 2004)。また、拘束ストレスは CRH の mRNA 発現を増加させるとともに PVN における c-Fos 蛋白質発現を増加させる作用を持つことが知られており、エストロゲンとプロゲステロンの皮下投与は、この拘束スト

スにより引き起こされたメスラットの性行動抑制を緩和するといった報告も存在する(Imaki, 1995; White, 2004)。以上より、高濃度のエストロゲンおよびプロゲステロンが警報フェロモンによるCRHの分泌を阻害したために、発情前期のメスラットが警報フェロモンに反応しなかったと考えられる。

本章の実験に関して以下の可能性については除外することができない。第一点目としては、メスラットがオスラットにより産生された警報フェロモンに対する感受性を持っていないという可能性である。しかしながら私たちの研究室で予備実験をおこなったところ、警報フェロモンを提示された卵巣除去メスラットが変形オープンフィールド試験において、防御行動やリスクアセスメント行動の増加を示したことから、この可能性は低いと考えられる。二点目としては、警報フェロモンによるメスラットの性行動変化を私たちが見逃した可能性である。しかしながら、一般的に用いられるメスラットの性行動指標のほとんどが警報フェロモンによって変化させられなかったことから、警報フェロモンがメスラットの性行動に対する修飾作用を持たないことが示唆される。

実験3では、CP-154526の投与が予想外にも射精後の不応期を延長させたが、この原因は不明である。CRHの脳室内投与により、射精後の不応期は影響をうけなかったという報告がある一方で(Sirinathsingji, 1987)、反対に血漿中のコルチコステロン値を上昇させるいくつかのストレスが射精後の不応期を延長したという報告も存在することから(Retana-Marquez, 2009; Retana-Marquez, 2003)、射精後の不応期はCRH系とは無関係であると予想される。これに加えて、私たちの知る限りCP-154526のオスラットの性行動への影響を観察したのはこの実験が初めてであるため、射精後の不応期の延長がCP-154526により常に引き起こされる作用であるのか、それとも今回の実験特有のものであるのかは不明である。そのため、本研究でCP-154526の投与がなぜ射精後の不応期を延長させたのかを明らかにするために、さらなる実験が必要となる。

2-5 小括

本章では、警報フェロモンがラットの性行動に与える影響について検討した。性行動試験期間中全般にわたる警報フェロモンの提示が、オスラットのみの性行動を抑制したことから、警報フェロモンにはオスラットの性行動を抑制する作用があることが示唆された。次に、この性行動抑制作用が、警報フェロモンをオスラットに提示した場合にのみ再現され、メスラットに提示した時には再現されなかったことから、警報フェロモンはオスラットに作用していることが示唆された。また、この警報フェロモンの性行動抑制作用がCRH受容体拮抗阻害薬により阻害されたことから、警報フェロモンはCRHの分泌を介して性行動を抑制していることが示唆された。

オス、メス両方に提示

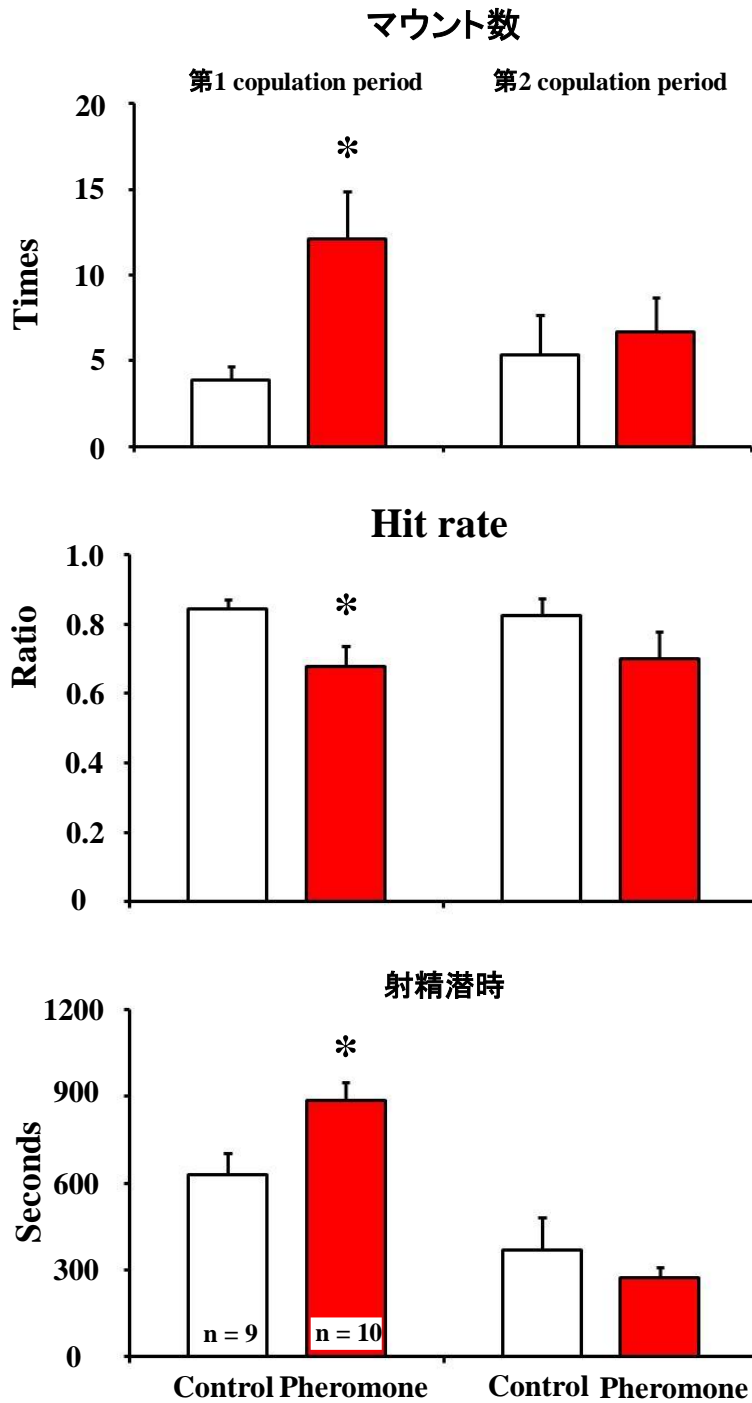


図2-1、警報フェロモンをラットのペアに性行動の間中提示した際の第1、第2 copulation period におけるオスラットのマウント数、Hit rate,および射精潜時

(MEAN±SEM * : p<0.05)

表 2-1

警報フェロモン(Pheromone)、または対照臭(Control)をラットのペアに性行動試験の間提示した際のオスラットの性行動指標およびメスラットのロードシス商 (実験1)。

	<u>1st. copulation period</u>				<u>2nd. copulation period</u>			
	Control (n=9)		Pheromone (n=10)		Control (n=9)		Pheromone (n=10)	
マウント数	3.9 ± 0.8	12.1 ± 2.8*	5.3 ± 2.4	6.7 ± 2.0				
挿入数	19.6 ± 1.9	23.7 ± 2.0	18.3 ± 3.9	12 ± 1.1				
射精後の不応期	431 ± 18	401 ± 8	506 ± 25	478 ± 12				
マウント潜時	75 ± 27	61 ± 18	—a.	—a.				
挿入潜時	75 ± 27	64 ± 18	—a.	—a.				
射精潜時	628 ± 77	887 ± 64*	369 ± 113	274 ± 36				
Hit rate	0.84 ± 0.03	0.68 ± 0.06*	0.82 ± 0.05	0.70 ± 0.08				
ロードシス商	0.950 ± 0.028	0.943 ± 0.020	0.956 ± 0.020	0.963 ± 0.024				

結果は平均値±標準誤差で示した。

*: p<0.05

a.; 分析不能。

表 2-2

警報フェロモン(Pheromone)、または対照臭(Control)をラットのペアに性行動試験の間提示した際のメスラットの性行動開始後 15 分間における性行動指標 (実験1)。

		<u>Pair of rats was exposed to the pheromone</u>	
		Control (n=9)	Pheromone (n=10)
Darts and Hops 数	100.2 ± 8.0	97.9 ± 6.5	
Solicitations 数	12.8 ± 2.1	14.0 ± 2.3	

結果は平均値±標準誤差で示した。

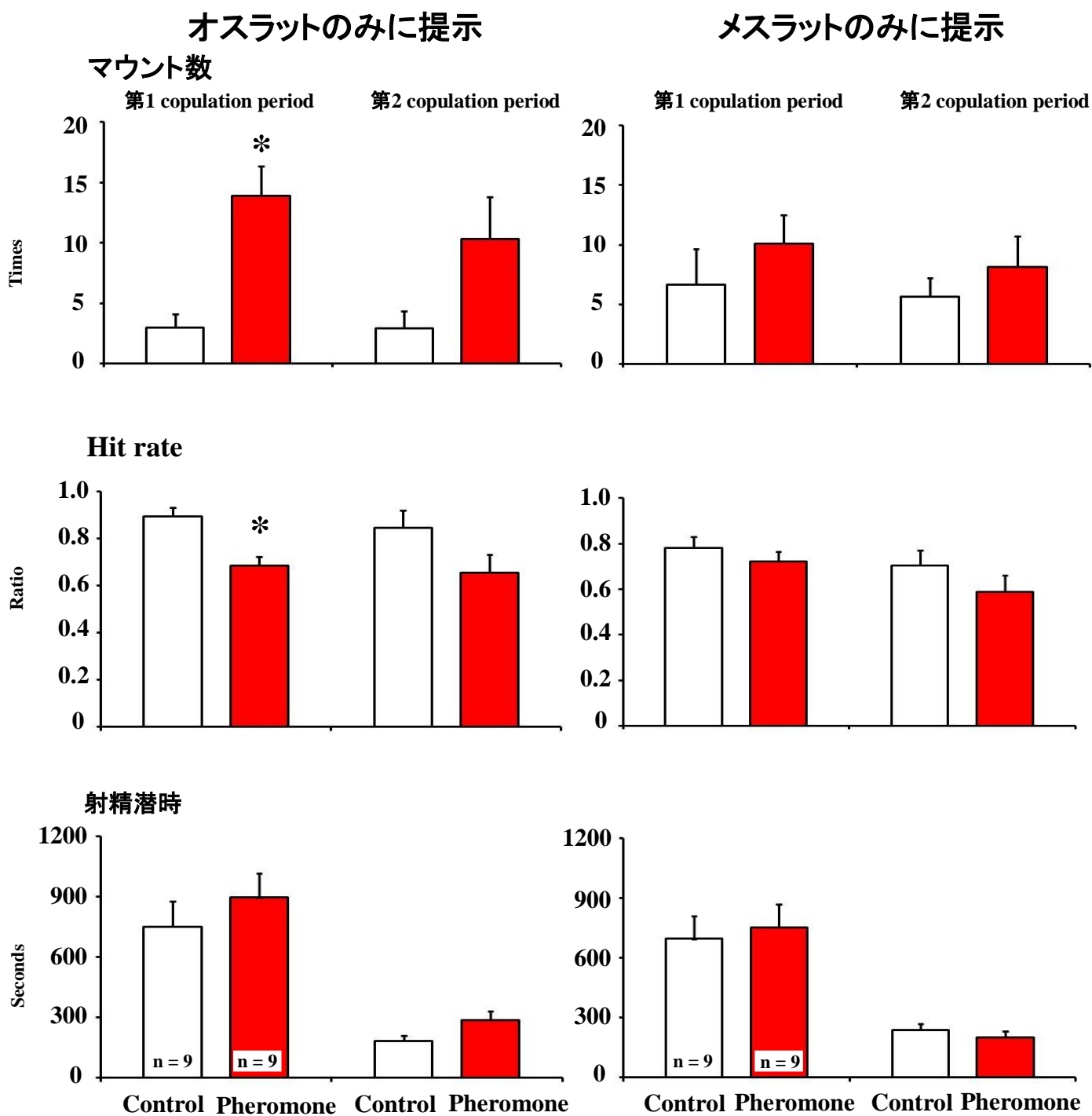


図2-2、警報フェロモンを性行動前のオスラット、メスラットのみに提示した際の第1、第2 copulation period におけるオスラットのマウント数、Hit rate、および射精潜時

(MEAN±SEM * : p<0.05)

表 2-3

警報フェロモン(Pheromone)、または対照臭(Control)を性行動の前のオスラットのみに提示した際のオスラットの性行動指標およびメスラットのロードシス商 (実験 2)。

	<u>1st. copulation period</u>		<u>2nd. copulation period</u>	
	Control (n=9)	Pheromone (n=9)	Control (n=9)	Pheromone (n=9)
マウント数	3.0 ± 1.1	13.9 ± 2.4*	2.9 ± 1.4	10.3 ± 3.5
挿入数	21.4 ± 2.4	27.6 ± 2.0	10.1 ± 1.1	14.3 ± 3.1
射精後の不応期	395 ± 3	383 ± 18	467 ± 17	475 ± 21
マウント潜時	109 ± 42	50 ± 15	—a.	—a.
挿入潜時	117 ± 43	67 ± 17	—a.	—a.
射精潜時	752 ± 126	897 ± 120	182 ± 26	289 ± 43
Hit rate	0.90 ± 0.04	0.69 ± 0.04	0.85 ± 0.07	0.66 ± 0.08
ロードシス商	0.946 ± 0.019	0.951 ± 0.012*	0.981 ± 0.010	0.947 ± 0.029

結果は平均値±標準誤差で示した。

*: p<0.05

a.; 分析不能。

表 2-4

警報フェロモン(Pheromone)、または対照臭(Control)を性行動前のオスラット、またはメスラットのみに提示した際のメスラットの性行動開始後 15 分間における性行動指標 (実験 2)。

	<u>Male was exposed to the pheromone</u>		<u>Female was exposed to the pheromone</u>	
	Control (n=9)	Pheromone (n=9)	Control (n=9)	Pheromone (n=9)
Darts and Hops 数	99.7 ± 9.4	93.2 ± 9.0	77.9 ± 6.4	96.6 ± 8.9
Solicitations 数	10.9 ± 2.0	11.1 ± 1.4	9.0 ± 1.7	7.3 ± 1.4

結果は平均値±標準誤差で示した。

表 2-5

警報フェロモン(Pheromone)、または対照臭(Control)を性行動前のメスラットのみに提示した際のオスラットの性行動指標およびメスラットのロードシス商(実験 2)。

	<u>1st. copulation period</u>		<u>2nd. copulation period</u>	
	Control (n=9)	Pheromone (n=9)	Control (n=9)	Pheromone (n=9)
マウント数	6.7 ± 3.0	10.1 ± 2.4	5.7 ± 1.5	8.1 ± 2.6
挿入数	17.3 ± 2.3	23.3 ± 2.3	11.2 ± 2.2	8.8 ± 1.2
射精後の不応期	405 ± 9	428 ± 16	501 ± 12	515 ± 15
マウント潜時	33 ± 9	47 ± 11	—a.	—a.
挿入潜時	117 ± 56	60 ± 14	—a.	—a.
射精潜時	695 ± 114	754 ± 115	239 ± 29	203 ± 28
Hit rate	0.78 ± 0.05	0.72 ± 0.04	0.70 ± 0.07	0.59 ± 0.07
ロードシス商	0.989 ± 0.007	0.986 ± 0.008	0.983 ± 0.008	0.952 ± 0.027

結果は平均値±標準誤差で示した。

a.; 分析不能。

性行動前にCP154,526投与

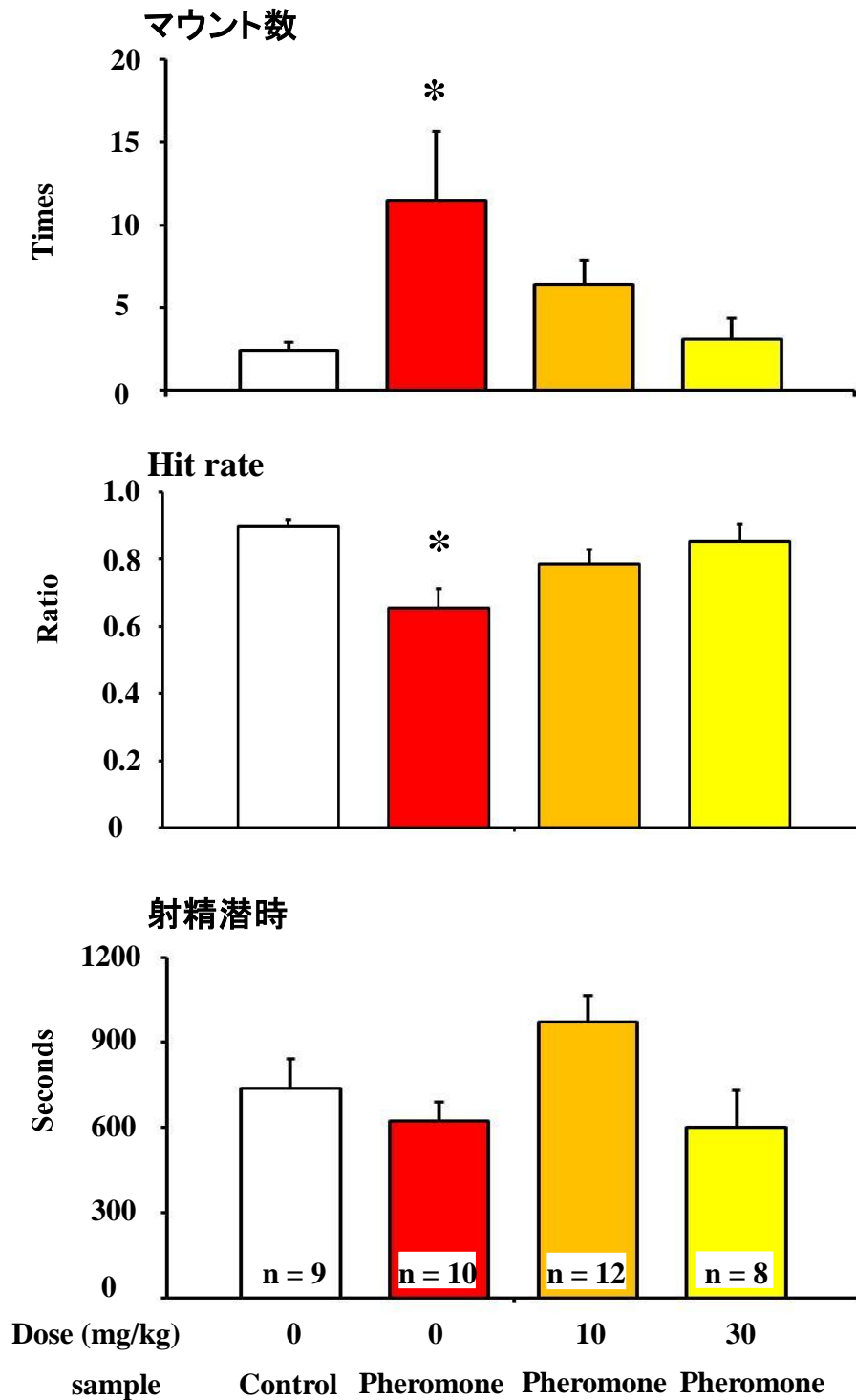


図2-3、CP154526を事前に投与し、警報フェロモンを性行動前のオスラットに提示した際の第1copulation periodにおけるオスラットのマウント数、Hit rate、および射精潜時

(MEAN±SEM * : p<0.05)

表 2-6

CP154-526 を事前投与し、警報フェロモン(Pheromone)、または対照臭(Control)を性行動前のオスラットのみに提示した際のオスラットの性行動指標およびメスラットのロードシス商(実験 3)。

CP154-526 投与量		<u>0 mg/kg</u> Control (n=9)	<u>0 mg/kg</u> Pheromone (n=10)	<u>10 mg/kg</u> Pheromone (n=12)	<u>30 mg/kg</u> Pheromone (n=8)
マウント数	1st	2.4 ± 0.4	11.5 ± 4.1*	6.4 ± 1.5	3.1 ± 1.3
	2nd	1.7 ± 0.5	6.9 ± 1.9*	11.2 ± 0.6	11.1 ± 1.6
挿入数	1st	20.3 ± 2.4	15.9 ± 1.4	20.8 ± 1.8	15.3 ± 2.4
	2nd	10.2 ± 0.8	8.7 ± 1.2	11.2 ± 1.1	11.1 ± 1.1
射精後の不応期	1st	417 ± 13	408 ± 12	445 ± 14	480 ± 21 *
	2nd	481 ± 8	507 ± 16	528 ± 11*	537 ± 15 *
マウント潜時	1st	142 ± 64	32 ± 5	202 ± 70	47 ± 10
	2nd	—a.	—a.	—a.	—a.
挿入潜時	1st	164 ± 83	39 ± 9	214 ± 72	52 ± 9
	2nd	—a.	—a.	—a.	—a.
射精潜時	1st	739 ± 104	624 ± 65	971 ± 95	601 ± 131
	2nd	167 ± 19	196 ± 25	232 ± 23	266 ± 30
Hit rate	1st	0.90 ± 0.02	0.65 ± 0.06*	0.79 ± 0.04	0.85 ± 0.05
	2nd	0.86 ± 0.04	0.64 ± 0.08*	0.77 ± 0.02	0.70 ± 0.07
ロードシス商	1st	0.980 ± 0.012	0.964 ± 0.020	0.985 ± 0.007	0.988 ± 0.012
	2nd	0.991 ± 0.009	0.944 ± 0.028	0.941 ± 0.023	0.956 ± 0.024

結果は平均値±標準誤差で示した。

* $p < 0.05$ (Control 群と比較)

a.; 分析不能。

表 2-7

実験 3 におけるメスラットの性行動開始後 15 分間における性行動指標。

CP154-526 投与量	<u>0 mg/kg</u> Control (n=9)	<u>0 mg/kg</u> Pheromone (n=10)	<u>10 mg/kg</u> Pheromone (n=12)	<u>30 mg/kg</u> Pheromone (n=8)
Darts and Hops 数	90.3 ± 9.7	84.2 ± 8.9	82.4 ± 3.9	104.6 ± 10.7
Solicitations 数	12.9 ± 1.4	10.4 ± 1.1	13.3 ± 1.4	15.0 ± 1.6

結果は平均値±標準誤差で示した。

第3章 警報フェロモンの性行動抑制に関与する神経核の探索

3-1 緒言

これまでに性行動の発現に関する様々な研究が進められてきたのと並行して、性行動の抑制に関する研究も進められてきた。多くの研究においては、げっ歯類に様々なタイプのストレスを負荷するモデルが用いられている。例えば、2 時間の拘束ストレスは、オスラットの挿入潜時を延長し、射精に要するマウント数を増加させ、Hit rate を低下させた(Retana-Marquez, 1996)。これに対して、部分水浸はマウント潜時、挿入潜時、射精潜時、射精後不応期を延長させ、マウント数を増加させるとともに、Hit rate を低下させた(Retana-Marquez, 1996)。また、2 時間の他個体との供飼育や 3 時間の傾いたケージでの飼育、18 時間の水および給餌停止を含む、いくつかの断続的なストレスからなる慢性軽度ストレス負荷処置(chronic mild stress procedure) は、挿入潜時、射精潜時を延長させ、射精数を減少させた(Gronli, 2005)。こういった性行動の変化はストレスの種類によってその表現型が異なるため、脳内にはいくつかの性行動調整システムが存在し、ストレスのタイプにより活性化されるシステムが採択されていることが推察される(Bancroft, 1999; Hull, 2002; van Furth, 1995)。

先行研究で、警報フェロモンは、提示されたオスラットの PVN に c-Fos 蛋白質の発現を増加させたことから、ストレスの一種であることが示唆されている(Kiyokawa, 2005)。しかしながら、PVN においてどういった種類の神経細胞が活性化しているのかは明らかでない。また、第 2 章において CP-154526 の事前投与が警報フェロモンによる性行動抑制を阻害したことから、このフェロモン効果は中枢の CRH 受容体を介していることが明らかとなった。しかしながら、この性行動抑制を司る神経メカニズムについては未だ明らかとなっていない。

第 3 章では、警報フェロモンを提示されたオスラットの 22 か所の神経核について(図 3-1)、特に nPGi に焦点をあて、c-Fos 蛋白質の発現を観察した。先行研究により、この神経核が勃起や射精といった性的反射を強力に抑制する神経核であることや(Coolen, 2004; Hull, 2007; Johnson, 2006)、nPGi の除去が、オスラットのマウント数を減少させ、Hit rate を上昇させるという、警報フェロモンとは逆の作用を示したという結果が示されている(Yells, 1992)。以上の知見を踏まえて、警報フェロモンによる性行動抑制には nPGi とそれに関連する神経核が重要な役割を果たしているという仮説を立てた。これに加えて、PVN を c-Fos 蛋白質および CRH で二重染色することで、警報フェロモンにより活性化される神経細胞の種類を明らかにすることとした。

3-2 材料と方法

3-2-1 実験動物

実験には Wistar Imamichi 系ラット(オス 19 頭、メス 19 頭)を供試した。オス個体は 7.5 週齢、メス個体は 8.5 週齢の時点で動物繁殖研究所より購入した。動物の搬入後はそれぞれ 2 頭ずつ

つアクリル製の飼育ケージ(440W×280D×180H mm)にて飼育した。すべての動物は温度(24±1℃)、相対湿度(45±5%)、と明暗周期(明期:8:00~20:00、暗期:20:00~8:00)が管理された飼育室内において維持した。餌と水は自由摂取とした。メスラットの膻スメアを1週間にわたって観察し、メスラットが発情前期の日に実験に供試した。

3-2-2 提示溶液の作製

警報フェロモン溶液は第2章の実験と同様の方法で作製した。オスの Wistar Imamichi ラット(12~18 週齢)を警報フェロモンのドナーとして用いた。ドナーラットにペントバルビタールを(Somnopentyl; MERCK Animal Health, Boxmeer, Netherlands) 50ml/kg の用量で腹腔内投与することで麻酔し、電気刺激用の電極として注射針(27G)を肛門周囲に取り付けた。その後、あらかじめ天井に純水(5ml)を噴霧したアクリルボックス(200×200×100mm)に麻酔下のドナーを5分間導入し、注射針を通じて15回の電気刺激(10V 1秒間)を20秒間隔で肛門周囲に与えることで、警報フェロモンを分泌させた。刺激後ドナーをアクリルボックスから取り出し、天井の水滴をポリプロピレン製のコンカルチューブに回収し、4℃にて当日行う性行動試験まで保存した。同様にして、ドナーの頸部を刺激した後に回収した溶液は、同じようににおいを含むと考えられるものの、被験動物にストレス反応を引き起こさないことが知られているため、対照水として用いた。提示溶液作製に用いたアクリルボックスは、毎回使用前にお湯と洗剤を用いて洗浄し、ペーパータオルにて水滴を完全に拭き取った。

3-2-3 性行動観察

すべての個体に対し、実験前2日間にわたり、5分間ずつハンドリングを行った。また、実験前日にオスラットを新たな飼育ケージに移して個飼いにし、その後実験室および、実験器具への馴化を30分間おこなった。メスラットも同様にして実験室への馴化を30分間行った。

性行動試験は、オスラットの飼育ケージ内にて赤色灯下で行われた。実験当日の18:00に被験動物を実験室にケージごと移動し、暗期となる20:00に赤色灯を点灯するとともに、ケージの天井を事前にアクリル板に空気穴をあけることで作製した天井に取り替えた。約30分の馴化期間をおいた後、提示溶液(水、警報フェロモン溶液)を750μl含ませた濾紙2枚を2枚のアクリル板(120×60mm、厚さ3mm)に挟んで提示を行った。このアクリル板の片方には直径9mmの穴が18か所あけられており、供試個体がこの穴を通して濾紙に接することが可能となっている。このアクリル板をオスラットのホームケージに導入し、5分間のサンプル提示を行った。サンプルを提示後、提示溶液をアクリル板ごと取り除き、メスラットをオスラットのホームケージに導入することで、60分間の性行動試験を行った。試験期間中の性行動はケージ上方よりビデオ

カメラを用いて撮影し、後日解析を行った。

供試動物群を提示するサンプルにより無作為にコントロール群(n=9)およびフェロモン群(n=10)の2グループに分けた。

3-2-4 免疫組織化学

最初の射精から 60 分後に、オスラットをペントバルビタール(Somnopentyl; MERCK Animal Health, Boxmeer, Netherlands)による深麻酔下にて生理食塩水に続く 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて全身灌流固定を行った。採材した脳を前述の固定液に一晩浸漬固定した後、30%スクロース・リン酸溶液に浸漬した。その後、脳を凍結させ、クライオスタットを用いて厚さ 25 μ m の切片を各 6 枚ずつ作製した。2,5 枚目の切片を神経核の位置を確認するために Cresyl Violet で染色した。また、残りの切片を 0.3%過酸化水素・リン酸緩衝生理食塩水と 30 分間反応させることで、内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、30 分間ブロッキングを行い、c-Fos 蛋白質に対する一次抗体(PC38; Darmstad, Germany; 7500 倍希釈)と 65 時間反応させた。その後、二次抗体であるビオチン化抗ウサギ IgG 抗体(VECTASTAIN Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA)およびアビジン-ビオジン化複合体とそれぞれ 2 時間反応させた後、3,3'-ジアミベンジジン(DAB)およびニッケルを用いて強く発色させた。染色した切片のうち、PVN を含まないものをスライドグラスに張り付けた後、脱水封入した。

その後、PVN を含む切片はさらに CRH に対する一次抗体(AB-02; Advanced Targeting Systems, San Diego, CA; 300 倍希釈)と 18 時間反応させた。さらに、二次抗体であるビオチン化抗ウサギ IgG 抗体(VECTASTAIN Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA)およびアビジン-ビオジン化複合体とそれぞれ 2 時間反応させた後、今度はニッケルを含ませない 3,3'-ジアミベンジジン(DAB)により弱く発色させた。染色した切片をスライドグラスに張り付けた後、脱水封入した。

3-2-5 CRH および c-Fos 蛋白質の発現解析

22 か所の神経核(図 3-1)において、それぞれ 4 枚の切片をデジタルカメラ(DP30W; Olympus, Tokyo, Japan)を備え付けた顕微鏡を用いて撮影した。それぞれの領域において 0.5mm 四方内の c-Fos 蛋白質の発現数を脳切片の両側で計測した。中脳中心灰白質(PAG; Periaqueductal gray)背外側部(dIPAG; Dorsolateral periaqueductal gray)および淡蒼縫線核に関しては、これらの神経核が正中上に存在するために両側で計測することはできなかったため、正中上で計測した。また、同様に PVN についてはデジタルカメラ(MP5Mc; Olympus, Tokyo, Japan)を備え付けた顕微鏡により 4 枚の切片を撮影し、0.5mm 四方内の CRH 発現細胞数およ

び、CRH と c-Fos 蛋白質両方を発現した細胞数を計測した。

3-2-6 性行動指標の解析

本研究では、性行動試験期間中に観察された最初の copulation period における性行動を解析した。雄性被験動物の性行動として、マウント潜時、挿入潜時(メス個体がオス個体のホームケージに導入されてからマウントおよび挿入が起こるまでの時間)、射精潜時(オス個体が最初に挿入してから射精するまでの時間)、マウント数、挿入数(1回の射精に必要なマウントおよび挿入の回数)を記録した。これらに加えて、Hit rate(挿入数をマウント数+挿入数で割った値)、および射精後不応期の持続時間を計算した。

3-2-7 統計解析

全ての統計解析は有意水準を 5%とした。行動実験と免疫染色に関する全ての数値は one-way analysis of variance (ANOVA)により解析した。

3-3 結果

3-3-1 警報フェロモン提示の性行動への影響

警報フェロモンにより、マウント数の増加[F(1,17) = 6.41, $p < 0.05$]、および Hit rate の低下[F(1,17) = 11.3, $p < 0.01$]が観察された(図 3-2)。警報フェロモンが影響を与えなかった性行動指標に関しては表 3-1 にまとめた。

3-3-2 警報フェロモン提示の PVN への影響

警報フェロモンにより、抗 c-Fos 蛋白質抗体および抗 CRH 抗体両方に標識される細胞数が有意に増加していることが明らかとなった[F(1,17) = 15.7, $p < 0.05$](図 3-3、図 3-4、および表 3-3)。これに対し、CRH 抗体に標識される細胞数には変化を認めなかった。

3-3-3 警報フェロモン提示の他の神経核への影響

各神経核において、c-Fos 蛋白質の発現の様子を、表 3-2 にまとめた。前脳および視床下部においては、警報フェロモンは、分界条床核場内側部吻側(BNSTam; Bed nucleus of stria terminalis, anterior division medial group)[F(1,17) = 7.92, $p < 0.05$]、分界条床核外側部吻側(BNSTal; Bed nucleus of stria terminalis, anterior division lateral group)[F(1,17) = 6.81, $p < 0.05$]、分界条床核尾側(BNSTp; Bed nucleus of stria terminalis, posterior division)[F(1,17) = 5.48, $p < 0.05$]の c-Fos 蛋白質の発現を増加させた(図 3-5)。扁桃体においては、警報フェロモンにより、MeA[F(1,17) = 14.65, $p < 0.05$]および扁桃体外側基底核(BLA; Basolateral amygdala)[F(1,17) = 8.13, $p < 0.05$]における c-Fos 蛋白質の発現が増加することが明らかとなった(図 3-6)。脳幹においては、警報フェロモンにより、nPGi の c-Fos 蛋白質発現が増加することが明らかとなった[F(1,17) = 7.08, $p < 0.05$] (図 3-7)。

3-4 考察

性行動試験前にオスラットに警報フェロモンを提示した際には、第 2 章で観察された結果と同様に、マウント数が増加し、Hit rate が低下した。同時に、警報フェロモンを提示した個体では、PVN における抗 c-Fos 蛋白質抗体と抗 CRH 抗体とで二重染色された細胞の数が増加していた。これに加えて、BNSTam、BNSTal、BNSTp、MeA、BLA、nPGi の c-Fos 蛋白質の発現が増加していることが明らかとなった。CRH の受容体拮抗薬が警報フェロモンの性行動への影響を阻害した第 2 章の実験結果を考え合わせると、警報フェロモンによる性行動抑制には以下のような神経メカニズムが関わっていることが予測される。オスラットが警報フェロモンに曝露されると、PVN の CRH 含有細胞が刺激されて HPA 軸が活性化される。それと同時に、ラットは脳内に CRH を分泌し、間接的に nPGi を活性化させる。その結果、性行動の際にはマウント数が増加し、Hit rate が低下する。

私たちの研究室の先行研究では、警報フェロモンを提示し、新奇環境下でストレス誘因性体温上昇反応の増悪を引き起こしたオスラットのストレス関連神経核における c-Fos 蛋白質の発現を観察した(Kiyokawa, 2005)。BNSTam および、BNSTal、MeA、BLA において、今回の実験と先行研究との両方で c-Fos 蛋白質の発現の増加が認められた。これらの結果は、警報フェロモンが BNSTam および、BNSTal、MeA、BLA を活性化させることでストレス反応を引き起こすことを示唆している。これらの神経核がストレス反応の一部として性行動の抑制に関っている可能性については後程詳細を検討する。また、MPOA、外側視床下部、視床下部腹内側核、CeA、dIPAG においては、本研究においても先行研究においても c-Fos 蛋白質発現の増加は認められなかったことから、これらの神経核が警報フェロモンによる性行動抑制を含むストレス反応に関わっていないことが示唆される。

本実験では、警報フェロモンが PVN の CRH 含有細胞を活性化することが明らかとなった。PVN は HPA 軸の引き金であることが知られており(Lennard, 1993)、本実験の結果は警報フェロモンがストレスラーとして作用し、HPA 軸を活性化したことを示唆している。第2章で明らかになったように警報フェロモンは CRH を介して性行動を抑制することから、PVN 由来の CRH 分泌が脳内の性行動抑制システムを活性化していると考えられる。しかしながら、PVN に加えて BNST や扁桃体中心核(CeA; Central amygdala)なども CRH を含有していることが知られているため(Swanson, 1983)、警報フェロモンが PVN 以外の神経核から分泌された CRH を介して性行動を抑制している可能性も否定できない。

本実験では、警報フェロモンによる性行動抑制を示した個体において、nPGi 内の c-Fos 蛋白質発現の増加が認められた。先行研究において、nPGi を除去したオスラットではマウント数が減少し、Hit rate が上昇したことを考え合わせると(Yells, 1992)、この nPGi における c-Fos 蛋白質発現の増加は、nPGi が警報フェロモンによる性行動抑制において重要な働きを担っていることを示唆している。しかしながら、nPGi には CRH 受容体の mRNA の発現が少ないことから(Van Pett, 2000)、警報フェロモンによって分泌された CRH が直接 nPGi に作用している可能性は低いと考えられる。さらに、nPGi は鋤鼻系に含まれていないことから(von Campenhausen, 2000)、c-Fos 蛋白質発現の増加が警報フェロモンの受容そのものに起因する可能性も低いと考えられる。以上より、CRH は間接的に nPGi を活性化している可能性が高いと推察される。

本実験では、BNSTam、BNSTal、BNSTp における c-Fos 蛋白質発現の増加が認められた。分界条床核吻側(BNSTa; Bed nucleus of stria terminalis, anterior division)はストレス反応に重要な役割を果たしていることや(Kovacs, 1998)、BNSTp が鋤鼻系に組み込まれていることはよく研究されている(von Campenhausen, 2000)。これに加えて、BNSTa(Van Pett, 2000)と BNSTp(Van Pett, 2000)は共に CRH 受容体の mRNA を発現しており、BNSTp から nPGi への密な投射が存在しているため(Normandin, 2008)、BNST が CRH の刺激を受け、nPGi を活性化させる神経核となっている可能性も否定できない。このように様々な可能性が考えられるため、BNSTa および BNSTp については、警報フェロモン効果における役割を明らかにするために、さらなる研究が必要であると考えられる。また、CRH の刺激を受け、かつ nPGi を活性化させるメカニズムに関しても、複数の神経核が関与している可能性も否定できない。これら点については、第4章にて改めて検討する。

本実験で c-Fos 蛋白質発現の増加が認められた MeA は一般的なストレス反応にも(Kovacs, 1998)鋤鼻系にも関与している(von Campenhausen, 2000)ことが知られている。先行研究より、オス-メス間の交尾行動の際に引き起こされる c-Fos 蛋白質の発現パターンと、オス-オス間の攻撃行動の際に引き起こされる MeA の c-Fos 蛋白質発現パターンとが一致していることが知られており(Kollack-Walker, 1995)、さらに、オス-メス間の交尾行動の際にも(Clancy, 1984; Meredith, 1986)、オス-オス間の攻撃行動の際にも鋤鼻系が重要な役割を担っていることを考え合わせると(Clancy, 1984; Stowers, 2002)、すべてのフェロモンは MeA 内の同じ神経細胞を活性化していることが示唆される。そのため本実験では、警報フェロモンに曝露されなかつ

た対照群の MeA 内のフェロモン感受性細胞も、性行動の際に受容される性フェロモンに反応したものと推定される。結果的に、MeA は鋤鼻系の情報伝達とストレス反応の両方に関わっているものの、本実験における MeA の c-Fos 蛋白質発現の増加は警報フェロモンの受容によるものではなく、ストレス反応に起因するものであると推察される。また、MeA も BNST と同様に、CRH 受容体 mRNA を多く発現し(Van Pett, 2000)、nPGi への投射をもつ神経核であるため(Normandin, 2008)、MeA が CRH を受容し、nPGi を活性化している可能性が存在する。しかしながら、CRH の MeA への微量投与は性行動に影響を与えなかったという先行研究の結果から(McGregor, 1992)、CRH が MeA を活性化させることで性行動を抑制したとは考えにくいと推察される。

今回の実験で、警報フェロモンは BLA における c-Fos 蛋白質の発現を増加させた。しかしながら、BLA を活性化した際の性行動変化が、警報フェロモンを提示した際の性行動変化と異なることから、BLA が警報フェロモンによる性行動抑制に関与している可能性は低いと考えられる。詳細は以下の通りである。c-Fos 蛋白質の発現を指標にした先行研究から、聴覚性の条件刺激が BLA を活性化することが知られている(Funk, 2000)。また、嫌悪刺激と条件づけされた聴覚性の条件刺激は、性行動を発現するオスラットの割合を低下させるとともに、性行動を発現した個体においては、挿入数を減少させ、マウント潜時や挿入潜時、射精潜時を延長させたという報告がある(Lawrence, 1987)。こういった先行研究の結果を考え合わせると、BLA の活性化と警報フェロモンとは違った神経伝達経路を介して性行動を抑制する可能性が高い。したがって、BLA はストレス反応の一部として活性化されたものの、性行動の抑制には関与していない可能性が高いことが推察される。

中脳中心灰白質腹外側部(vIPAG; ventrolateral periaqueductal gray)は、私たちの研究室の先行研究では c-Fos 蛋白質の発現が増加したのに対し(Kiyokawa, 2005)、本実験においては増加が認められなかった。この違いが生じた原因は、オスオスメスの社会行動が高レベルの c-Fos 蛋白質発現を引き起こしたことであると考えられる。オスオスメスの社会行動は、私たちの知る限りでは vIPAG への影響は調べられていないものの、中脳中心灰白質腹側部や中脳中心灰白質背側部で c-Fos 蛋白質発現を増加させることが知られている(Greco, 1996)。さらに、オスオス間の社会行動は、vIPAG の c-Fos 蛋白質発現を増加させる(Salchner, 2004)。そのため、オスオスメスの社会行動が vIPAG における高レベルの c-Fos 蛋白質発現を引き起こし、それが本実験で警報フェロモンにより引き起こされた c-Fos 蛋白質発現の増加を見えにくくしてしまった可能性は十分に考えられる。本研究における vIPAG の c-Fos 蛋白質発現細胞数が先行研究のそれよりも非常に高いことも、この可能性を支持するものである。

社会行動に加えて、射精も様々な神経核において c-Fos 蛋白質発現が上昇することが知られている。においかぎ行動や、マウント、挿入といった他の性行動に比べて、射精が性行動に関連した神経核の c-Fos 蛋白質の発現細胞数をより多く上昇させたことが複数の先行研究で報告されている(Coolen, 1998; Heeb, 1996)。本実験では、灌流固定の直前までメスラットと同居させていたために、オスラットが長時間にわたり性行動を続けた可能性が考えられる。その

ため、長時間の社会行動、および複数回の射精が、ベースとなる c-Fos 蛋白質の発現量を上昇させてしまった可能性が高く、それが原因で警報フェロモンによる性行動の抑制に関する神経核の興奮がみえにくくなってしまった可能性があるかと推察される。第 4 章の実験ではこの点を考慮し、オスラットが射精に至る前にメスラットと引き離すことで、ベースラインとなる c-Fos 蛋白質の発現量を抑える工夫をして、さらなる解析を進めることとした。

第 2 章の実験により警報フェロモンが勃起を抑制していることが示唆されたが、本章の実験結果はそれを支持するものである。本実験で活性化された nPGi は、勃起や射精反射を下降性に強く抑制する神経核であることが知られていることから(Coolen, 2004; Hull, 2007; Johnson, 2006)、警報フェロモンは nPGi の活性化を介して勃起を抑制したことが推察される。さらには、警報フェロモンが PVN における CRH 含有細胞を活性化させることが明らかとなったが、この結果は警報フェロモンがストレスであることを示唆するとともに、この仮説を支持する結果であると考えられる。ストレスを経験した多くの種のオス個体が勃起の抑制を経験することが知られているからである(Sakamoto, 2010)。以上より、警報フェロモンはストレスとして作用し、nPGi の活性化を介して勃起を抑制したと考えられる。

3-5 小括

本章では、警報フェロモンの性行動抑制に関わっている神経核を探るために、免疫組織化学的手法を用いることで、性行動に関係していることが知られる神経核を解析した。また、同時に警報フェロモンによる性行動抑制における PVN の CRH 含有細胞の役割も検討した。その結果、PVN では、警報フェロモンの提示により抗 c-Fos 蛋白質抗体と抗 CRH 抗体とで二重染色された細胞数が増加した。これに加えて、BNSTam、BNSTal、BNSTa、MeA、BLA、nPGi において、警報フェロモンは c-Fos 蛋白質の発現を増加させることが明らかとなった。以上の結果から、警報フェロモンは PVN からの CRH 分泌を促すとともに、nPGi を含む視床下部や脳幹の神経核を活性化させることで、性行動を抑制することが推測された。

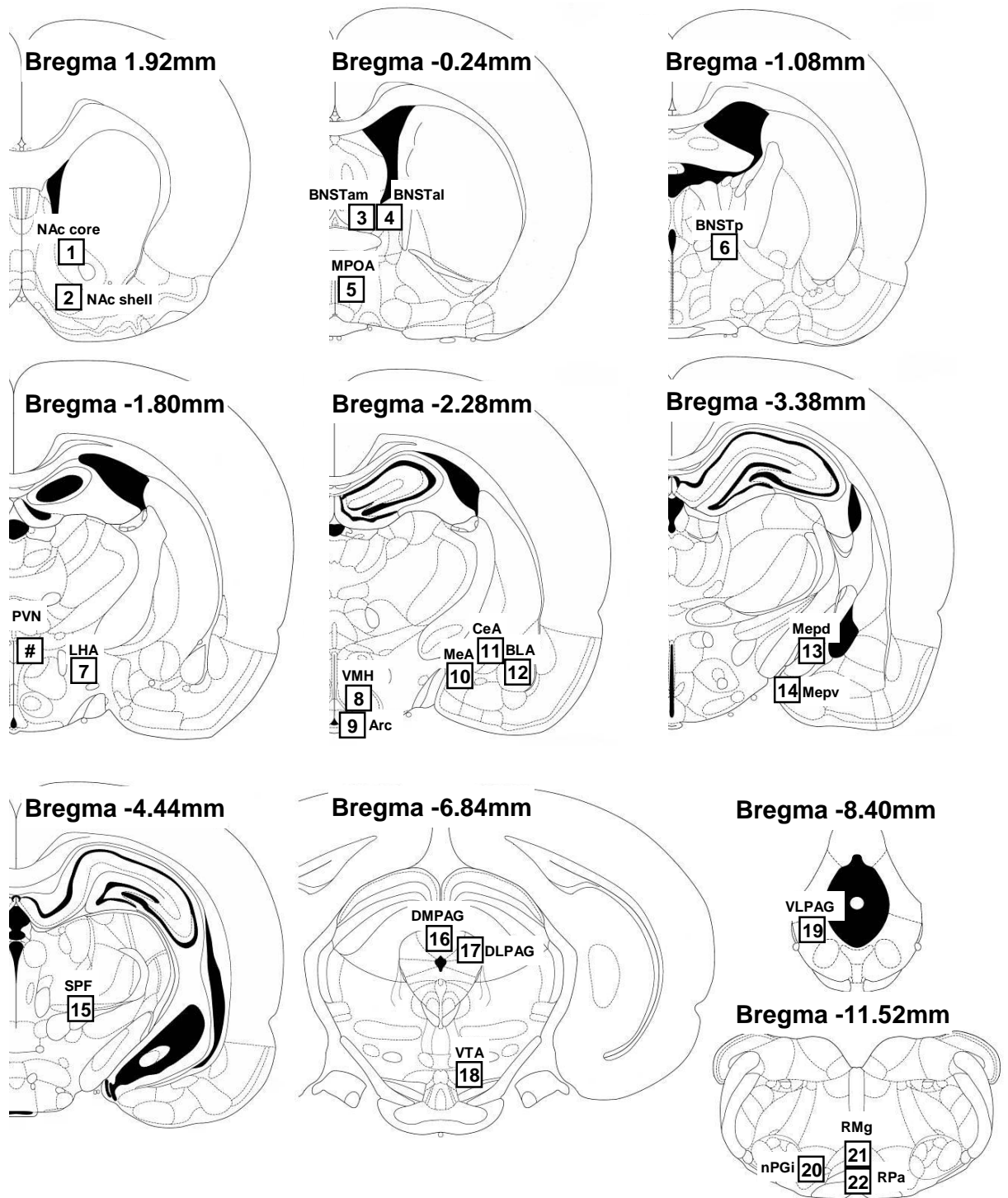


図3-1、c-Fos蛋白質発現を解析した神経核の概念図 (Paxinos & Watson, 2007を改変)。領域番号は表3-2の該当番号に示した。

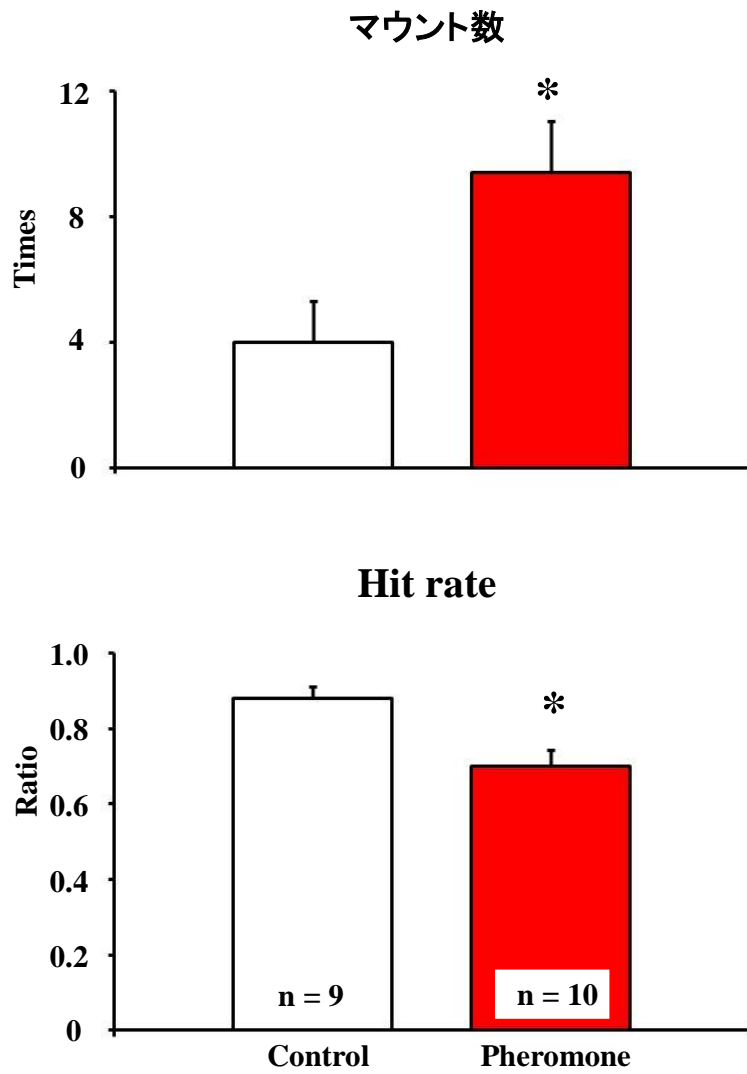


図3-2、警報フェロモンを性行動前のオスのみに提示した際のオスラットのマウント数およびHit rate

(MEAN±SEM * : p<0.05)

表 3-1

警報フェロモンを事前に 5 分間提示した後のオスラットの性行動指標

	Control (n=9)	Pheromone (n=10)
マウント数	4.0 ± 1.3	9.4 ± 1.6*
挿入数	25.9 ± 2.7	20.9 ± 2.9
射精後不応期	430 ± 10	405 ± 14
マウント潜時	189 ± 115	121 ± 79
挿入潜時	192 ± 117	161 ± 80
射精潜時	819 ± 85	858 ± 90
Hit rate	0.88 ± 0.03	0.70 ± 0.04*

結果は平均値±標準誤差で示した。

*: p<0.05

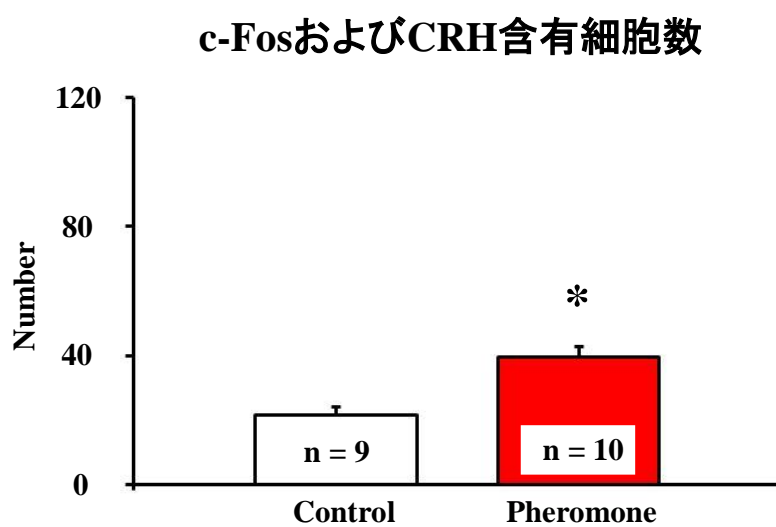
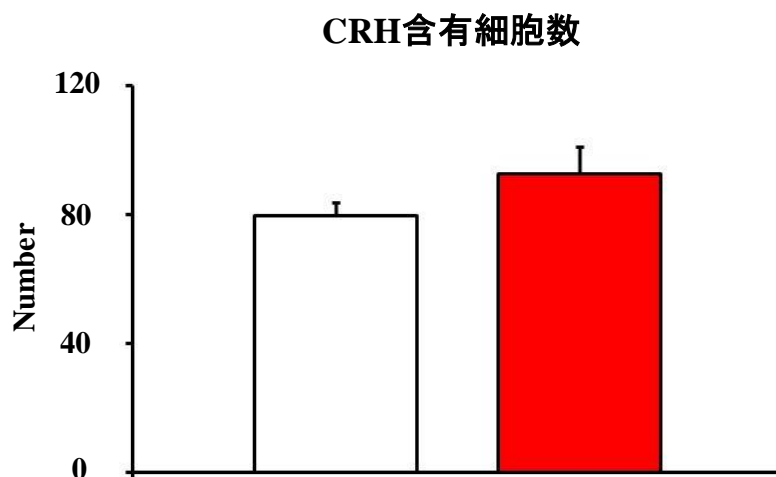


図3-3、警報フェロモンを性行動前のオスラットのみ提示した際のオスラットのCRH含有細胞数、c-Fos およびCRH含有細胞数

(MEAN±SEM * : p<0.05)

表 3-2

警報フェロモンおよび対照臭に暴露されたオスラットの性行動関連神経核における c-Fos 蛋白質発現細胞数/ 0.25 mm²

	Control (n=9)	Pheromone (n=10)
Forebrain and hypothalamus		
1. Nucleus accumbens core	25.8 ± 4.7	33.4 ± 4.9
2. Nucleus accumbens shell	37.9 ± 5.2	35.2 ± 3.6
3. Bed nucleus of the stria terminalis, anterior division medial group	33.1 ± 4.9	50.6 ± 3.9*
4. Bed nucleus of the stria terminalis, anterior division lateral group	21.2 ± 2.4	43.3 ± 7.7*
5. Medial preoptic area	158.4 ± 16.9	181.2 ± 15.9
6. Bed nucleus of the stria terminalis, posterior division	15.2 ± 2.7	24.0 ± 2.6*
7. Lateral hypothalamic area	15.0 ± 1.7	14.9 ± 1.5
8. Ventromedial nucleus of hypothalamus	6.8 ± 0.9	8.7 ± 1.0
9. Arcuate nucleus	43.3 ± 3.2	51.0 ± 5.7
Amygdalae		
10. Medial amygdala (anterior)	32.1 ± 2.8	45.6 ± 2.2*
11. Central amygdala	7.9 ± 1.6	11.0 ± 1.9
12. Basolateral amygdala	21.0 ± 1.8	32.7 ± 3.5*
13. Medial amygdala (postero dorsal)	62.9 ± 9.2	58.2 ± 8.1
14. Medial amygdala (postero ventral)	48.1 ± 11.0	48.2 ± 7.0
Thalamic nucleus		
15. Subparafascicular nucleus	29.1 ± 6.9	29.2 ± 5.7
Brain stem		
16. Dorsomedial periaqueductal gray	12.0 ± 2.2	13.1 ± 1.6
17. Dorsolateral periaqueductal gray	18.0 ± 2.6	22.0 ± 3.5
18. Ventral tegmental area	4.2 ± 1.0	4.6 ± 1.1
19. Ventrolateral periaqueductal gray	24.7 ± 3.1	28.3 ± 3.1
20. Nucleus paragiganto cellularis	3.2 ± 0.6	6.9 ± 1.2*
21. Raphe magnus	7.6 ± 0.9	9.8 ± 0.9
22. Raphe pallidas	3.8 ± 0.4	3.1 ± 0.7

結果は平均値±標準誤差で示した。* p < 0.05 (ANOVA)

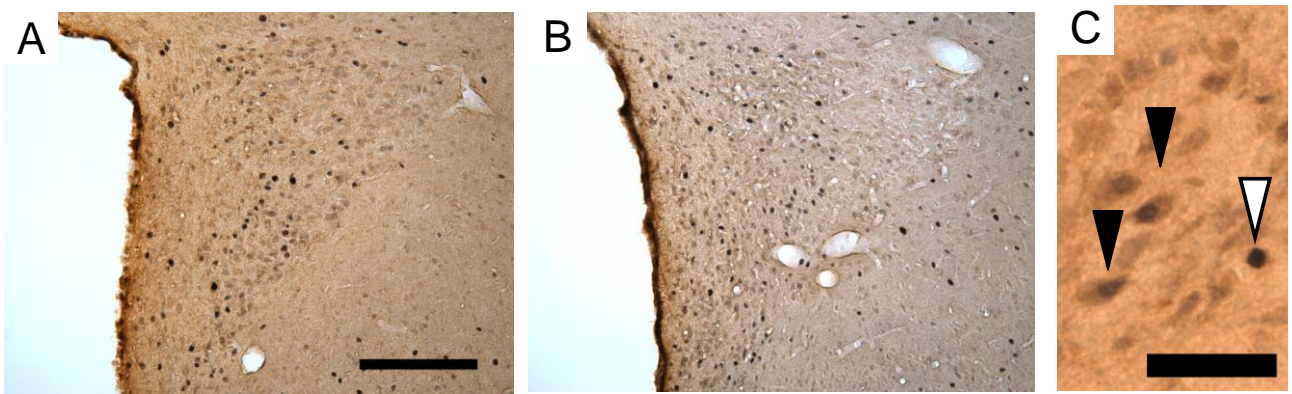


図3-4、頸部刺激臭(A)もしくは警報フェロモン(B)を提示した際のオスラットの室傍核におけるc-Fos蛋白およびCRH陽性細胞の発現 (Bar=200 μ m)
(B)の拡大を(C)に示した。黒矢頭はc-Fos蛋白とCRHを両方含有する細胞を示し、白抜き矢頭はc-Fos蛋白のみ陽性の細胞を示す。(Bar=50 μ m)

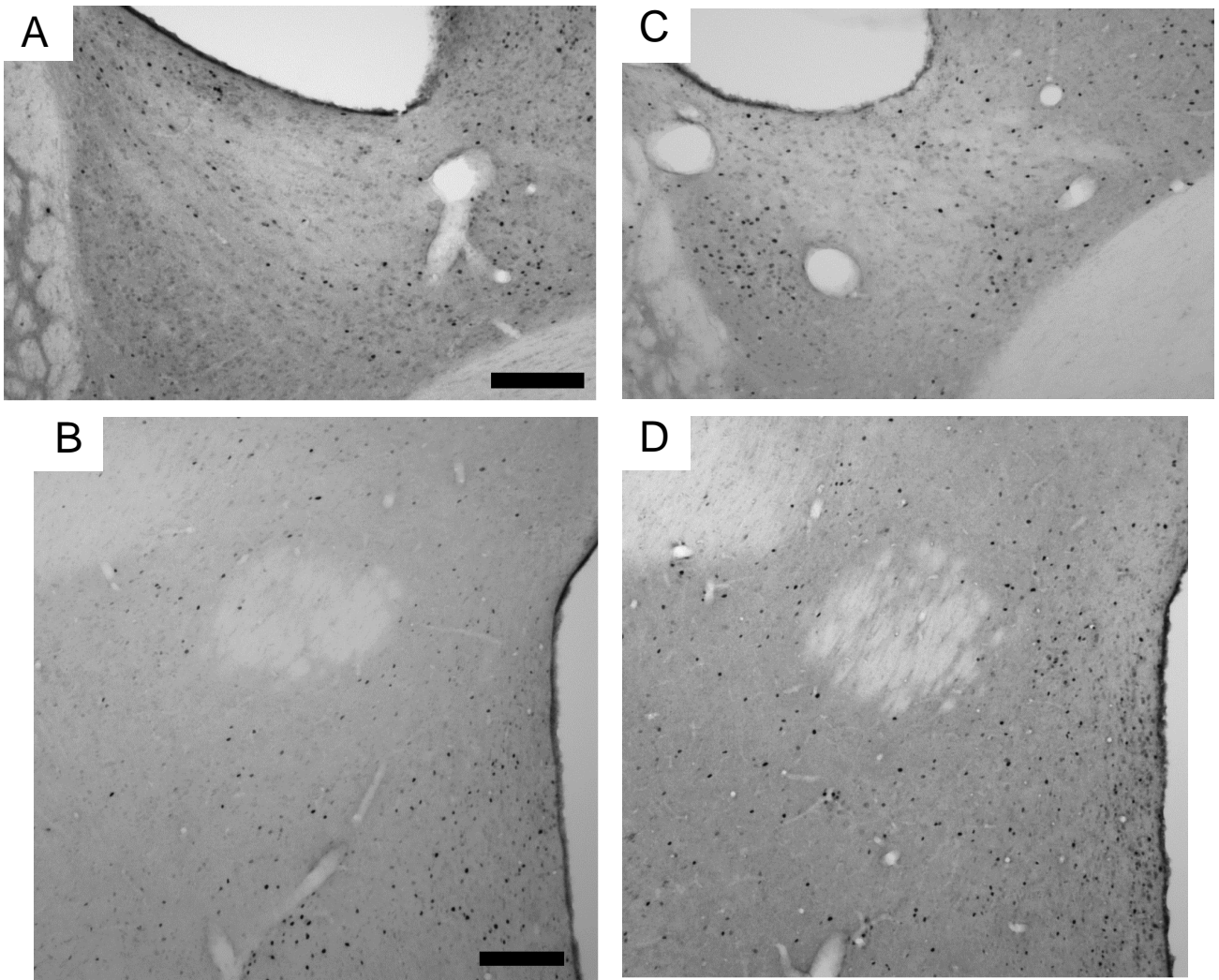


図3-5、頸部刺激臭(AおよびB)もしくは警報フェロモン(CおよびD)を提示した際のオスラットの分界条床核吻側部(AおよびC)、および分界条床核尾側部(BおよびD)におけるc-Fos蛋白陽性細胞の発現 (Bar=200 μ m)

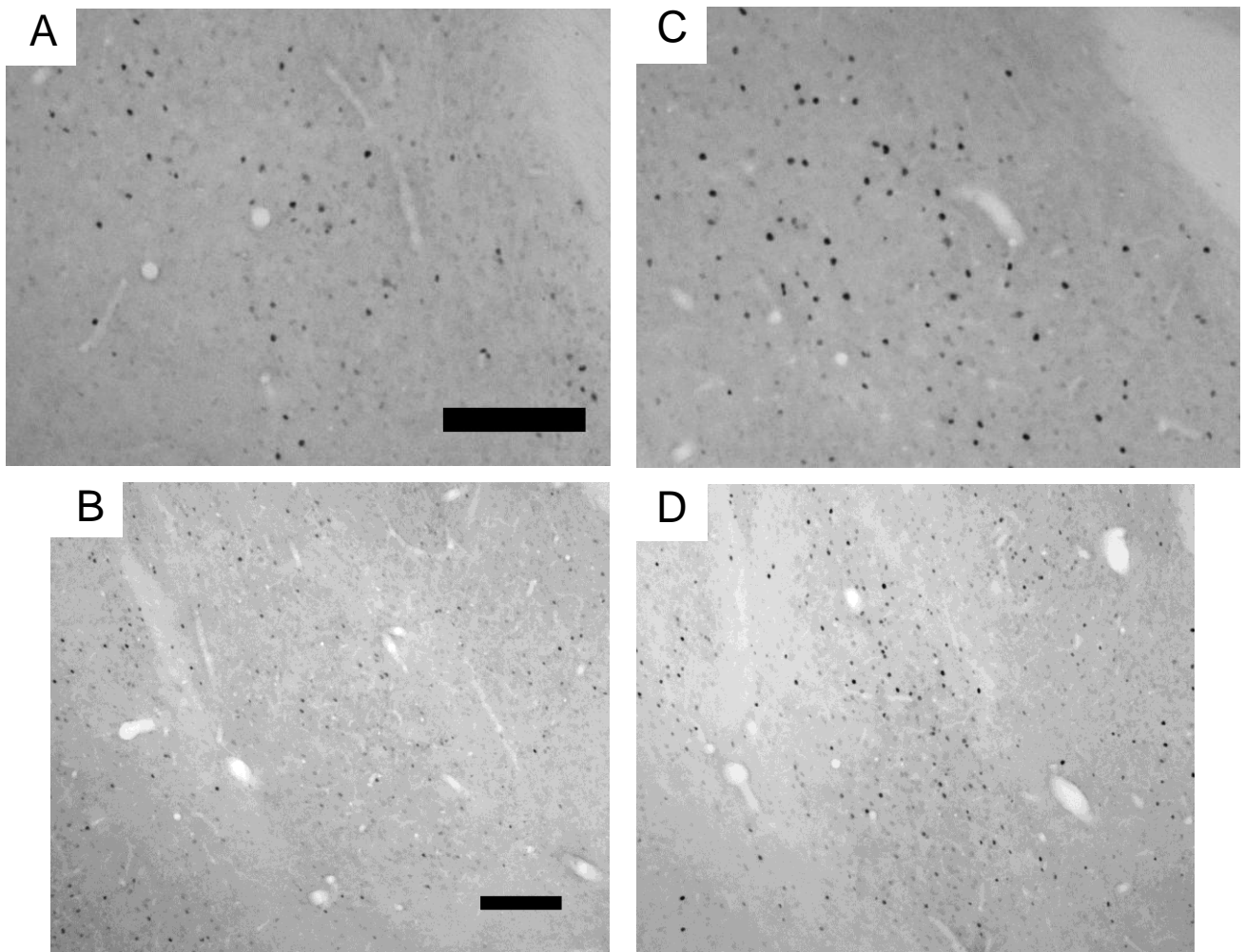


図3-6、頸部刺激臭(AおよびB)もしくは警報フェロモン(CおよびD)を提示した際のオスラットの扁桃体内側核(AおよびC)、および扁桃体外側基底核(BおよびD)におけるc-Fos蛋白陽性細胞の発現 (Bar=200 μ m)

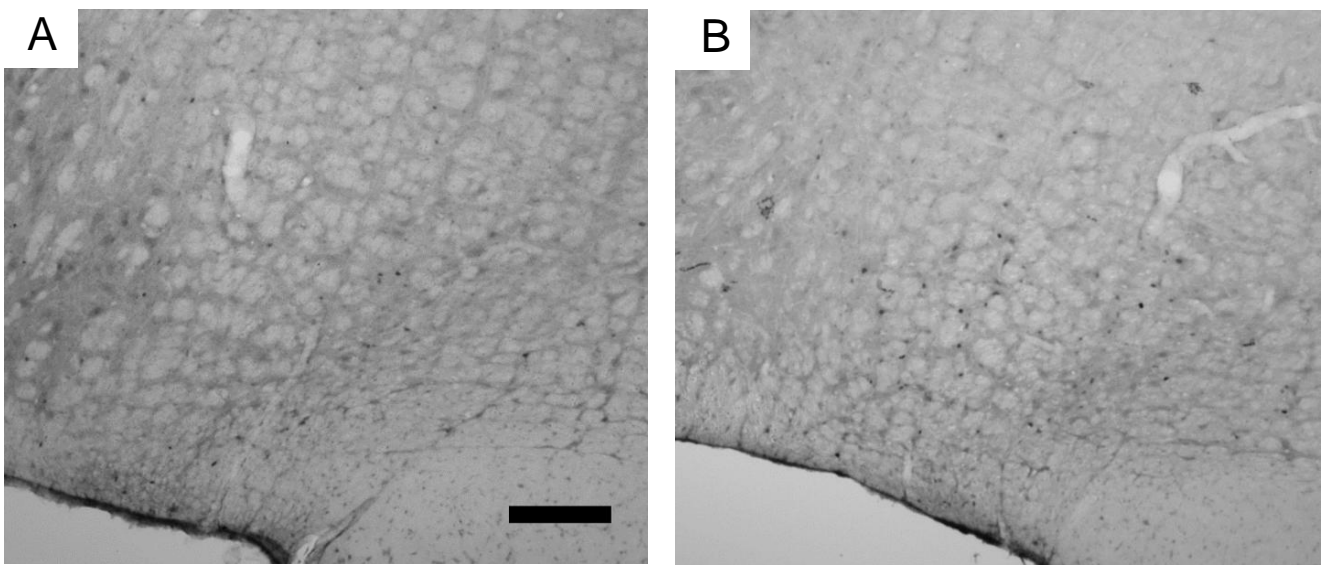


図3-7、頸部刺激臭(A)もしくは警報フェロモン(B)を提示した際のオスラットの巨細胞性傍核におけるc-Fos蛋白陽性細胞の発現 (Bar=200 μ m)

第4章 警報フェロモンの性行動抑制における
オピオイドの役割の検討

4-1 緒言

モルヒネやメタドン(methadone)といったオピオイド系の薬物や、エンケファリンやエンドロフィン、ダイノルフィンのような内因性オピオイドは、自発運動量や摂水摂餌量、免疫反応、認知機能を含む様々な生理学的、行動学的機能に影響を及ぼすことが知られている(Vuong, 2010)。オピオイドは性行動の調節にも関わっていることが知られており、特に低用量のオピオイド投与は警報フェロモンと同様の表現型でオスラットの性行動を抑制することが先行研究で明らかになっている(van Furth, 1995)。例えば、*endomorphin-1* の脳室内投与は、ラットのマウント数を増加させ、射精潜時を延長し、単位時間あたりの射精数を減少させる(Parra-Gamez, 2009)。これに加えて、メタドンの腹腔内投与はマウント数を増加させ、Hit rate を低下させる(Murphy, 1981)。先行研究においてCRHの脳室内投与で引き起こされた性行動抑制が、オピオイド受容体拮抗阻害薬であるナロキソンの投与により緩和されたことから、オピオイド系もまたCRH系の下流でこの性行動抑制に関わっていることが示唆されている(Sirinathsingji, 1987)。実際に、オピオイド受容体拮抗阻害薬であるナルトレキソンは、血中のコルチコステロンレベルの上昇からCRHの分泌の増加が予想される部分水浸によって引き起こされた性行動抑制を緩和したという報告もある(Retana-Marquez, 2009)。以上より、警報フェロモンがCRHの分泌を促す作用を持つことを考慮して、警報フェロモンによる性行動抑制には、CRHの下流で作用するオピオイドが関与するという仮説を立てた。

この仮説を検討するために、ナロキソンを投与したオスラットに警報フェロモンを提示し、その後の性行動を観察した。また、同時にオピオイドがどのように脳内で作用することで警報フェロモンによる性行動抑制を引き起こしているのかを明らかにするために、これらのオスラットの脳を採取し、31か所の性行動関連神経核におけるc-Fos蛋白質の発現を観察することとした(図4-1)。特定の神経核において警報フェロモンの提示がc-Fos蛋白質の発現量に変化を与え、ナロキソンの投与がその変化を阻害した場合に、その神経核は性行動抑制神経経路におけるオピオイドの作用点より下流にある神経核であることが示唆される一方で、警報フェロモンの提示により変化したc-Fos蛋白質の発現量がナロキソン投与による影響を受けないのであれば、その神経核はオピオイドの作用点より上流にある神経核であるか、またはオピオイドとは無関係に活性化された神経核であることが推測できる。

4-2 材料と方法

4-2-1 実験動物

実験にはWistar Imamichi系ラット(オス94頭、メス94頭)を供試した。オスラットは7.5週齢、メスラットは8.5週齢の時点で動物繁殖研究所より購入した。動物の搬入後はそれぞれ2頭ず

つアクリル製の飼育ケージ(440W×280D×180H mm)にて飼育した。すべての動物は温度(24±1℃)、相対湿度(45±5%)、と明暗周期(明期:8:00~20:00、暗期:20:00~8:00)が管理された飼育室内において維持した。餌と水は自由摂取とした。メスラットの膾スミアを1週間にわたって観察し、メスラットが発情前期の日に実験に供試した。

4-2-2 提示溶液の作製

警報フェロモン溶液は私たちの研究室で確立されてきた方法で作製した (Kiyokawa, 2005; Kiyokawa, 2006)。オスの Wistar Imamichi ラット(12~18 週齢)を警報フェロモンのドナーとして用いた。まず、アクリルボックス(200×200×100mm、厚さ 2mm)の天井に純水(5ml)を吹きつけた。ドナーラットにペントバルビタールによる麻酔 (Somnopentyl; MERCK Animal Health, Boxmeer, Netherlands)を体重 1kg あたり 50ml の用量で腹腔内投与し、電気刺激用の電極として注射針(27G)を、肛門周囲に取り付けた。ラットを前述したアクリルボックスの中に 5 分間導入し、15 回の電気刺激(10V 1秒間)を 20 秒間隔で肛門周囲に与えた。この電気刺激によって、ドナーラットより警報フェロモンが分泌されることが報告されている (Kiyokawa, 2005)。その後ドナーラットをアクリルボックスの中から取り出し、天井にふきつけた水滴をガラス棒を用いて回収し、ポリプロピレン製のコニカルチューブにて 4℃で冷蔵保存して警報フェロモン溶液とした。同様にして、ドナーの頸部を刺激した後に回収した溶液は、同じようにオスラットのにおいを含むと考えられるものの、レシピエントとなる被験動物にストレス反応を引き起こさないことが知られているため、対照水として用いた。フェロモン回収用のアクリルボックスは、使用前にお湯と洗剤で洗浄し、ペーパータオルで完全に水滴を拭き取って使用した。

4-2-3 実験 1; 警報フェロモンによる性行動抑制に対するオピオイド受容体拮抗阻害薬の効果

すべてのオスラットに対し、実験前 2 日間ずつ、5 分間ずつハンドリングを行った。また、実験前日にオスラットのケージの交換を行って単飼いにし、その後 30 分間、実験室および、実験器具への馴化をおこなった。メスラットも同様に 30 分間、実験室への馴化を行った。

性行動観察は、実験前日から単飼にされているオスラットの飼育ケージ内にて赤色灯下で上方からビデオ撮影する方法で行われた。実験当日の 18:00 に供試動物を行動観察室にケージごと移動した。19:30 にオスラットに対して、食塩水または、ナロキソン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を 15mg/kg または 40mg/kg の割合で腹腔内投与した。20:00 の暗期が開始する時点で赤色灯を点灯し、単飼されているオスラットのケージの天井をアクリル板で作製した天井に取り替えた。20:30 頃、サンプル(対照水、警報フェロモン溶液)を 750 μ l 含ませた濾紙を 2 枚ずつオスケージの壁に貼り付ける方法で提示を行い、5 分後にメスラットを導入し、そ

の後 60 分間ビデオ撮影を実施し、後に行動を解析した。

供試動物群を、提示するサンプルとナロキソンの濃度により無作為に4群に分けた。すなわち、コントロール-NAL 0mg/kg 群 (n=9)、フェロモン-NAL 0mg/kg 群 (n=10)、フェロモン-NAL 15mg/kg 群 (n=11)、およびフェロモン-NAL 40mg/kg 群 (n=8)である。

4-2-4 実験 2;c-Fos 蛋白質発現を指標とした警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割の検討

すべてのオスラットに対して、実験1と同様にハンドリング、単飼いへの移行、実験器具への馴化を行った。

実験当日、19:30 にオスラットに対して、食塩水または、ナロキソン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を 40mg/kg の割合で腹腔内投与した。サンプル水の提示は実験 1 と同様の方法で行った。性行動実験開始と同時に、隣室のモニターで性行動の観察を行い、オスラットが 10 回の挿入を完遂した時点でメスラットをオスラットのホームケージから取り出した。オスラットはその後、免疫組織化学の実験に供試した。

供試動物群を、提示するサンプルとナロキソンの濃度により無作為に 3 群に分けた。すなわち、コントロール-NAL 0mg/kg 群 (n=9)、フェロモン-NAL 0mg/kg 群 (n=10)、およびフェロモン-NAL 40mg/kg 群 (n=10)である。

4-2-5 免疫組織化学

実験 2 において、オスラットの 10 回目の挿入が完遂した時点から 60 分後に、オスラットをペントバルビタール(Somnopentyl;MERCK Animal Health, Boxmeer, Netherlands)による深麻酔下にて生理食塩水に続く 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて全身灌流固定を行った。採材した脳を上述の固定液に一晩浸漬固定した後、30%スクロース・リン酸溶液に浸漬した。その後、脳を凍結させ、クライオスタットを用いて厚さ 25 μ m の切片を各 6 枚ずつ作製した。2,5 枚目の切片を神経核の位置を確認するために Cresyl Violet で染色した。また、残りの切片を 0.3%過酸化水素・リン酸緩衝生理食塩水と 30 分間反応させることで、内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、30 分間ブロッキングを行い、c-Fos 蛋白質に対する一次抗体(PC38; Darmstad, Germany; 7500 倍希釈)と 65 時間反応させた。その後、二次抗体であるビオチン化抗ウサギ IgG 抗体(VECTASTAIN Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA)およびアビジン-ビオジン化複合体とそれぞれ 2 時間反応させた後、3,3'-ジアミベンジジン(DAB)およびニッケルを用いて強く発色させた。染色した切片をスライドグラスに張り付けた後、脱水封入した。

4-2-6 統計解析

全ての統計解析は有意水準を 5%とした。実験 1 の行動実験と免疫染色に関する結果は ANOVA により解析した後に、Tukey-Kramer post hoc test による解析を行った。実験 2 に関する結果は、ANOVA により解析した後に、検出力の高い Fisher's PLSD test による解析をした。

4-3 結果

4-3-1 実験 1; 警報フェロモンによる性行動抑制に対するオピオイド受容体拮抗阻害薬の効果

警報フェロモンの提示およびナロキソンの事前投与は、オスラットのマウント数[F(3,34) = 5.49, $p < 0.005$]および Hit rate[F(3,34) = 5.37, $p < 0.005$]に変化を与えた(図 4-2、および表 4-1)。警報フェロモンおよびナロキソンが変化を与えなかった指標に関しては表 4-1 にまとめた。Post hoc test より、警報フェロモンの提示はオスラットのマウント数を増加させ($p < 0.05$)、Hit rate を低下させること($p < 0.01$)が示唆された。これらの警報フェロモン効果は、用量依存的にナロキソンの事前投与により緩和された。

4-3-2 実験 2;c-Fos 蛋白質発現を指標とした警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割の検討における行動解析

警報フェロモンの提示およびナロキソンの事前投与は、オスラットのマウント数[F(2,22) = 5.47, $p < 0.05$]および Hit rate[F(2,22) = 5.40, $p < 0.05$]に変化を与えた(図 4-3、および表 4-2)。警報フェロモンの提示およびナロキソンの事前投与が変化を与えなかった指標に関しては表 4-2 にまとめた。Post hoc test より、警報フェロモンの提示はオスラットのマウント数を増加させ($p < 0.05$)、Hit rate を低下させること($p < 0.05$)が示唆された。ナロキソンの事前投与は、このマウント数の増加および Hit rate の低下を阻害した(図 4-3、および表 4-2)。

4-3-3 実験 2;c-Fos 蛋白質発現を指標とした警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割の検討における免疫組織化学

各神経核における、c-Fos 蛋白質の発現の様子を、表 4-3 にまとめた。前脳および視床下部において、警報フェロモンの提示およびナロキソンの事前投与は、側坐核 core (NAc core; Nucleus accumbens core)[F(2,22) = 8.21, $p < 0.005$]、側坐核 shell (NAc shell; Nucleus accumbens shell) [F(2,22) = 6.07, $p < 0.01$]、BNSTam[F(2,22) = 4.81, $p < 0.05$]、

BNSTal[F(2,22) = 12.87, $p < 0.0005$], BNSTp[F(2,22) = 6.66, $p < 0.01$], 室傍核大細胞性領域 (magnocellular part of PVN; Magnocellular part of paraventricular nucleus of hypothalamus) [F(2,22) = 8.09, $p < 0.005$], 室傍核小細胞性領域(parvocellular part of PVN; Parvocellular part of paraventricular nucleus of hypothalamus)[F(2,22) = 8.28, $p < 0.005$], 視床下部腹内側核[F(2,22) = 5.55, $p < 0.05$], および弓状核(Arc; Arcuate nucleus)[F(2,22) = 12.32, $p < 0.0005$]の c-Fos 蛋白質の発現を変化させた(図 4-4, および図 4-5, 図 4-6)。扁桃体においては、警報フェロモン提示およびナロキソンの事前投与により、CeA[F(2,22) = 16.03, $p < 0.0001$]における c-Fos 蛋白質の発現が変化することが明らかとなった。脳幹においては、dlPAG[F(2,22) = 5.53, $p < 0.05$], vlPAG[F(2,22) = 27.96, $p < 0.0001$], 背側縫線核[F(2,22) = 6.11, $p < 0.01$], nPGi[F(2,22) = 21.89, $p < 0.0001$]の c-Fos 蛋白質発現が変化した(図 4-7)。Post hoc test より、警報フェロモンの提示は、BNSTam($p < 0.01$), BNSTal($p < 0.05$), BNSTa($p < 0.005$), parvocellular part of PVN ($p < 0.005$), Arc($p < 0.0005$), dlPAG($p < 0.01$), vlPAG($p < 0.0001$), および nPGi($p < 0.0001$)の c-Fos 蛋白質発現を増加させ、magnocellular part of PVN($p < 0.005$)の c-Fos 蛋白質の発現を減少させた(図 4-5 および図 4-6, 図 4-7)。ナロキソンの事前投与は、vlPAG, および nPGi の c-Fos 蛋白質発現の増加を阻害し(図 4-7), NAc core($p < 0.005$), NAc shell($p < 0.05$), 視床下部腹内側核($p < 0.01$), CeA($p < 0.001$), および背側縫線核($p < 0.01$)の c-Fos 蛋白質発現を増加させた(図 4-4)。

4-4 考察

警報フェロモンを性行動試験前にオスラットに提示することで、オスラットのマウント数の増加、および Hit rate の低下が観察された。この性行動抑制はナロキソンの事前投与により緩和されたことから、警報フェロモンによる性行動抑制にはオピオイド系が関与していることが示唆された。警報フェロモンは、性行動抑制と同時に、BNSTam、BNSTal、BNSTp、Arc、dlPAG、vlPAG、および nPGi の c-Fos 蛋白質発現を上昇させ、magnocellular part of PVN の c-Fos 蛋白質発現を低下させた。これらの神経核のうち、ナロキソンは vlPAG、nPGi、および magnocellular part of PVN の c-Fos 蛋白質発現の変化を阻害したことから、これらの神経核はオピオイドの作用点よりも下流で活性化されていることが示唆された。これに加えて、警報フェロモンは parvocellular part of PVN の c-Fos 蛋白質発現を上昇させたものの、ナロキソンはこの c-Fos 蛋白質発現の変化に影響を与えなかった。以上の結果から、警報フェロモンは CRH の下流においてオピオイドの分泌を促すことで性行動を抑制していることが示唆された。

警報フェロモンによる性行動抑制効果がナロキソンの事前投与により阻害されたことから、この性行動抑制にはオピオイドが関与していることが示唆された。先行研究において、マウント数と Hit rate はオピオイド系により制御されることが示唆されており、本研究の結果と一致する。例えば、部分水浸やフットショック、新奇環境を含む様々なストレスは、共通してマウント数の上

昇と Hit rate の低下を引き起こすが、これらの変化はオピオイドの受容体拮抗阻害薬により用量依存的に緩和される(Pfaus, 19958; Retana-Marquez, 2009)。さらに、オピオイドの受容体作動薬の投与はマウント数と Hit rate を変化させることが知られている(Murphy, 1981)。

本実験では、警報フェロモンが parvocellular part of PVN の c-Fos 蛋白質発現を増加させ、ナロキソンはこの変化を阻害しなかった。PVN の CRH 性神経がこの領域に存在することや (Swanson, 1983)、第 3 章の実験で警報フェロモンは PVN の CRH 性神経を活性化させたことを考慮すると、警報フェロモンは CRH の分泌をオピオイドの作用点よりも上流で引き起こしていることが示唆された。これは、CRH の脳室内投与により引き起こされた性行動の抑制がナロキソンにより阻害されたという先行研究の結果と一致するものである(Sirinathsingji, 1987)。以上より、警報フェロモンは parvocellular part of PVN から CRH 分泌を促し、この CRH がオピオイドの分泌を促すことで性行動を抑制していることが示唆された。

警報フェロモンによる性行動の抑制には、オピオイド受容体の中でも μ 受容体が関与していることが考えられる。オピオイド受容体作動薬や内因性のオピオイドは細胞膜上の κ 受容体、 δ 受容体、および μ 受容体ファミリーを介して受容される(Waldhoer, 2004)。これらの受容体の性行動に対する作用は様々なオピオイド受容体のリガンドにより研究が行われている(Pfaus, 1987; van Furth, 1995)。本研究でラットに投与したナロキソンは他の受容体よりも μ 受容体への親和性が高いことから、警報フェロモンは μ 受容体を介して性行動を抑制したという仮説が立てられる。先行研究において警報フェロモンの性行動抑制効果と同様の性行動抑制を引き起こすことが明らかになっている endomorphin-1 やメタドンが μ 受容体に対し高い親和性を持つこともこの仮説を支持する(Murphy, 1981; Parra-Gamez, 2009; Raynor, 1994; Zadina, 1997)。これに対して、他の受容体の作動薬は、性行動に対して警報フェロモンの効果とは違った作用を示すことが示されていることから(Hughes, 1987; Leyton, 1992)、 κ 受容体および δ 受容体の関与の可能性は低いと考えられる。以上より、警報フェロモンは μ 受容体を介して性行動を抑制していることが推察される。

本実験で、警報フェロモンによる vIPAG および nPGi における c-Fos 蛋白質の発現増加がナロキソンにより阻害されたことから、これらの神経核がオピオイドの作用点よりも下流で活性化されたことが示唆された。先行研究で vIPAG から nPGi へは密な投射が存在し、性行動中にこの経路が活性化されていることを示唆する実験結果が存在することから(Normandin, 2008)、警報フェロモンは PAG を活性化することで nPGi を活性化しているという仮説が立てられる。PAG の除去によって、nPGi の除去と同様の性行動の変化が引き起こされる別の先行研究の結果もこれを支持するものである(Clark, 1975; Yells, 1992)。以上より、警報フェロモンはオピオイド系を活性化させ、それに続く PAG-nPGi という神経経路を活性化することで性行動を抑制することが示唆された。

警報フェロモンは magnocellular part of PVN の c-Fos 蛋白質発現を減少させ、ナロキソンがこの減少を阻害したことから、この領域がオピオイドの作用点よりも下流で抑制されていることが示唆された。magnocellular part of PVN が脊髄に直接投射を持ち(Hosoya, 1991)、勃起に

対して促進的な領域であることを考慮すると(Liu, 1997)、警報フェロモンはこの領域を抑制することで勃起を抑制していると推察される。この推察は、警報フェロモンが勃起を抑制するという、本研究の一連の行動実験の結果とも一致するものである。nPGi が腰椎に直接投射していることを考慮すると(Marson, 1992)、magnocellular part of PVN の抑制は nPGi の活性化とは別経路で勃起を抑制していると考えられる。オピオイドが抑制性の神経伝達物質であることと、先行研究による PVN へのオピオイド投与が性行動を抑制するという結果とを考え合わせると(Melis, 1999)、警報フェロモンはオピオイド系を活性化させることで magnocellular part of PVN を抑制し、PAG-nPGi の神経経路とは別経路で性行動を抑制していることが示唆された。

Arc は警報フェロモンにより c-Fos 蛋白質の発現が上昇し、ナロキソンによりその変化を阻害されなかった神経核の一つである。Arc が μ 受容体と親和性の高い β エンドルフィンを豊富に含む神経を持つことから(Bloom, 1978)、Arc がオピオイドの分泌源である可能性が推察される。先行研究における Tail pinch や捕食者臭を含むストレスの提示が Arc における β エンドルフィンの分泌を促すという結果もこの推測を支持するものである(Sullivan, 1998; Tanapat, 2001)。

本実験では、警報フェロモンが BNSTp における c-Fos 蛋白質の発現を上昇させ、ナロキソンはその変化を阻害しなかったことから、この領域はオピオイドの作用点よりも上流で活性化されたことが示唆される。BNSTp は鋤鼻嗅覚系に含まれており(Halpern, 2003)、PVN へ密な投射をもつことを考慮すると(Dong, 2001)、警報フェロモンは VNO で受容されたのちに、その情報は BNST を経て PVN へ伝達されることが推測される。

4-5 小括

本章では、オピオイド受容体拮抗阻害薬であるナロキシンの全身投与と免疫組織化学的手法を用いることで、警報フェロモンの性行動抑制におけるオピオイドの役割を検討した。警報フェロモンの提示は BNSTam、BNSTal、BNSTp、parvocellular part of PVN、Arc、dlPAG、vlPAG、および nPGi における c-Fos 蛋白質の発現量を増加させ、magnocellular part of PVN の発現量を減少させることが明らかとなった。ナロキソン投与は、これらの神経核のうち vlPAG、nPGi、および magnocellular part of PVN における c-Fos 蛋白質の発現量変化を阻害した。また、parvocellular part of PVN における c-Fos 蛋白質の発現量増加はナロキソン投与により阻害されなかった。以上の結果から、警報フェロモンは、CRH 系に続いてオピオイド系を活性化させ、その後、PAG や nPGi といった脳幹の神経核や magnocellular part of PVN といった視床下部の領域を制御することが示唆された。

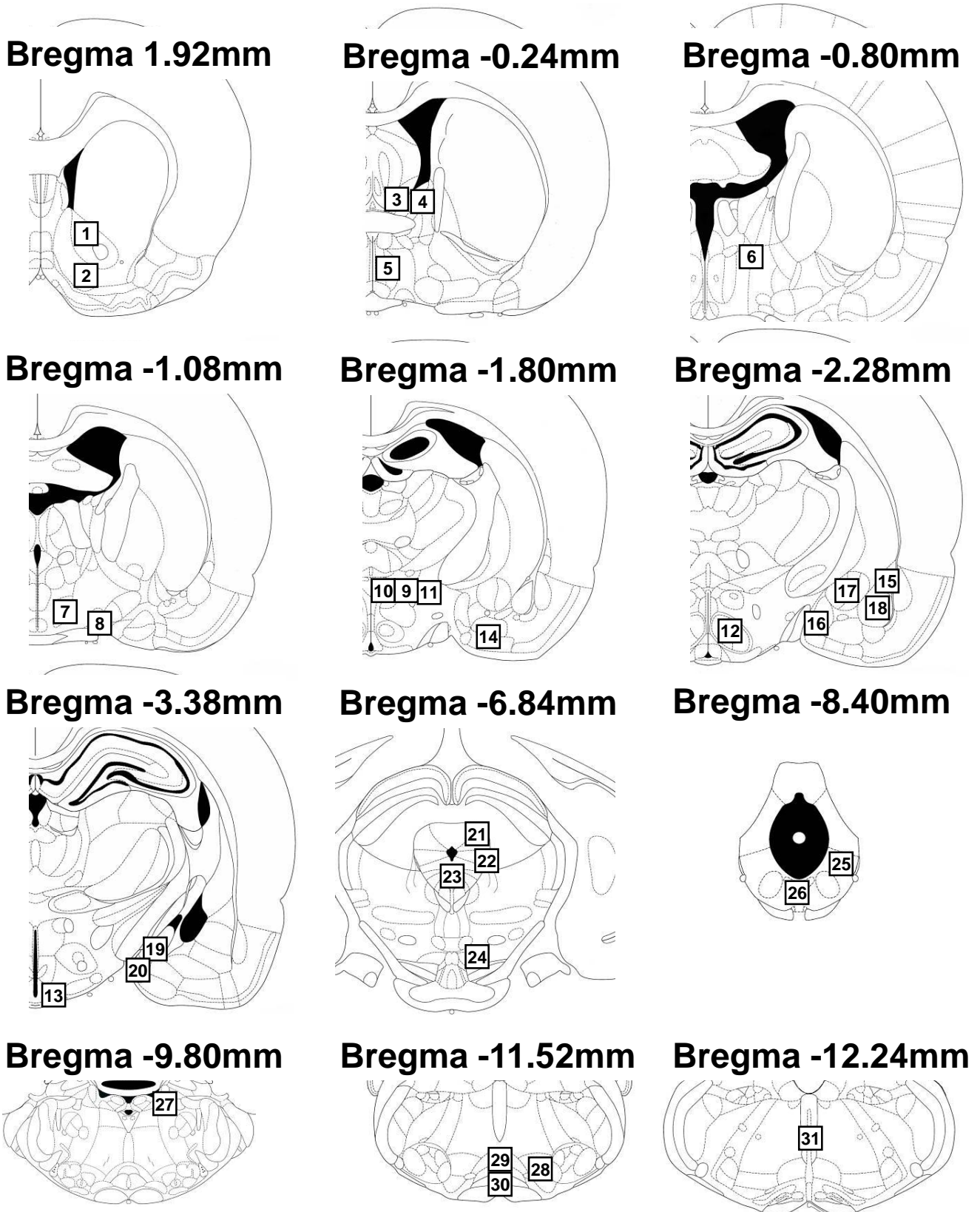


図4-1、c-Fos蛋白質発現を解析した神経核の概念図 (Paxinos & Watson, 2007を改変)。領域番号は表4-2の該当番号に示した。

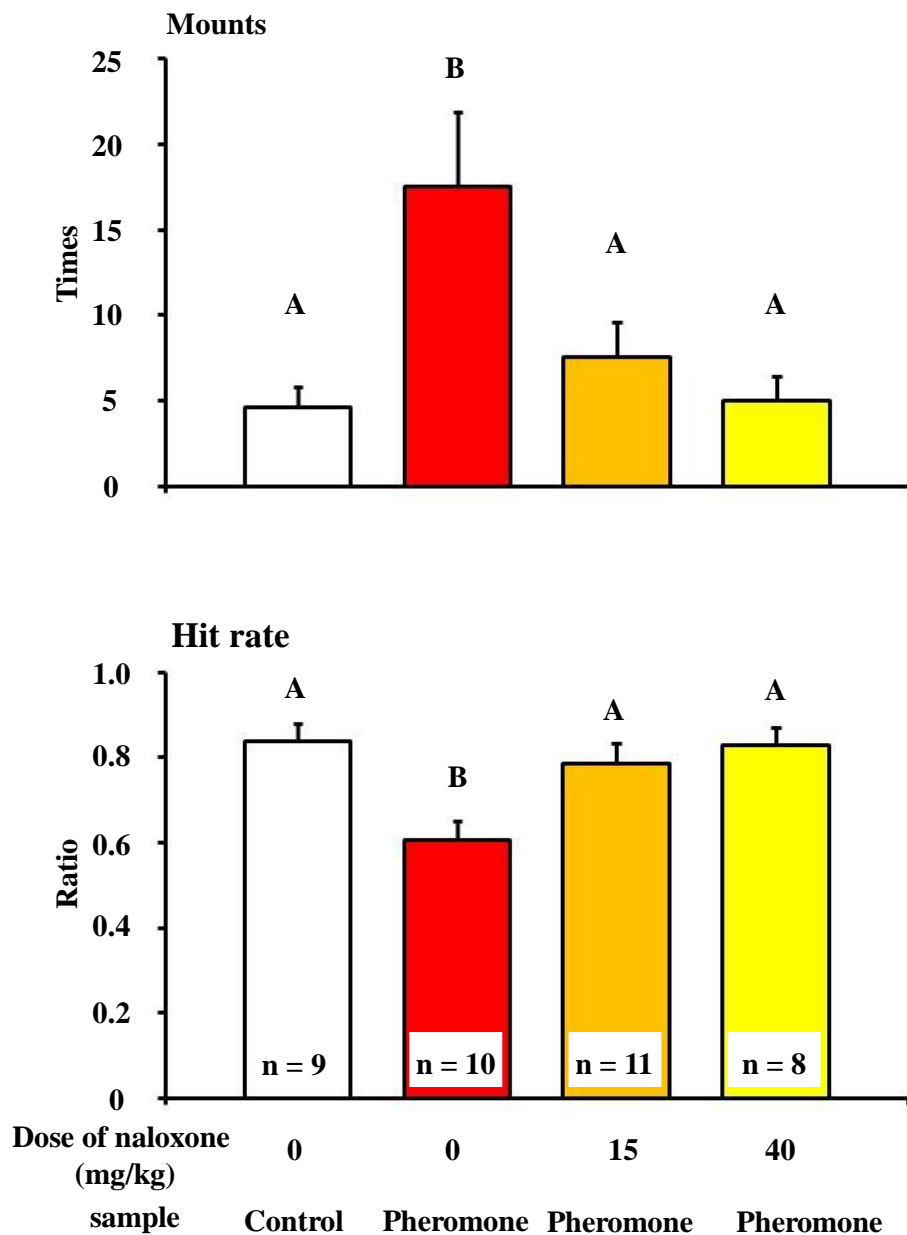


図4-2、ナロキソンを事前に投与し、警報フェロモンを性行動前のオスラットに提示した際のオスラットのマウント数、およびHit rate

(異なるアルファベット間において有意な差を示す)

表 4-1

ナロキソンを事前投与し、警報フェロモン(Pheromone)、および対照臭(Control)を性行動前のオスラットのみに提示した際のオスラットの性行動指標。

ナロキソン濃度 提示サンプル	<u>0 mg/kg</u> Control (n=9)	<u>0 mg/kg</u> Pheromone (n=10)	<u>15 mg/kg</u> Pheromone (n=11)	<u>40 mg/kg</u> Pheromone (n=8)
マウント数	4.6 ± 1.2	17.6 ± 4.3*	7.5 ± 2.0	5.0 ± 1.4
挿入数	24.1 ± 3.4	23.2 ± 2.6	23.2 ± 3.1	23.0 ± 2.5
射精後の不応期	454 ± 16	437 ± 14	460 ± 22	500 ± 47
マウント潜時	137 ± 39	67 ± 15	129 ± 43	203 ± 71
挿入潜時	171 ± 61	135 ± 37	153 ± 42	224 ± 68
射精潜時	946 ± 183	916 ± 132	719 ± 90	946 ± 166
Hit rate	0.84 ± 0.04	0.61 ± 0.05*	0.79 ± 0.05	0.83 ± 0.04

結果は平均値±標準誤差で示した。

*: $p < 0.05$ (Control 群との比較)

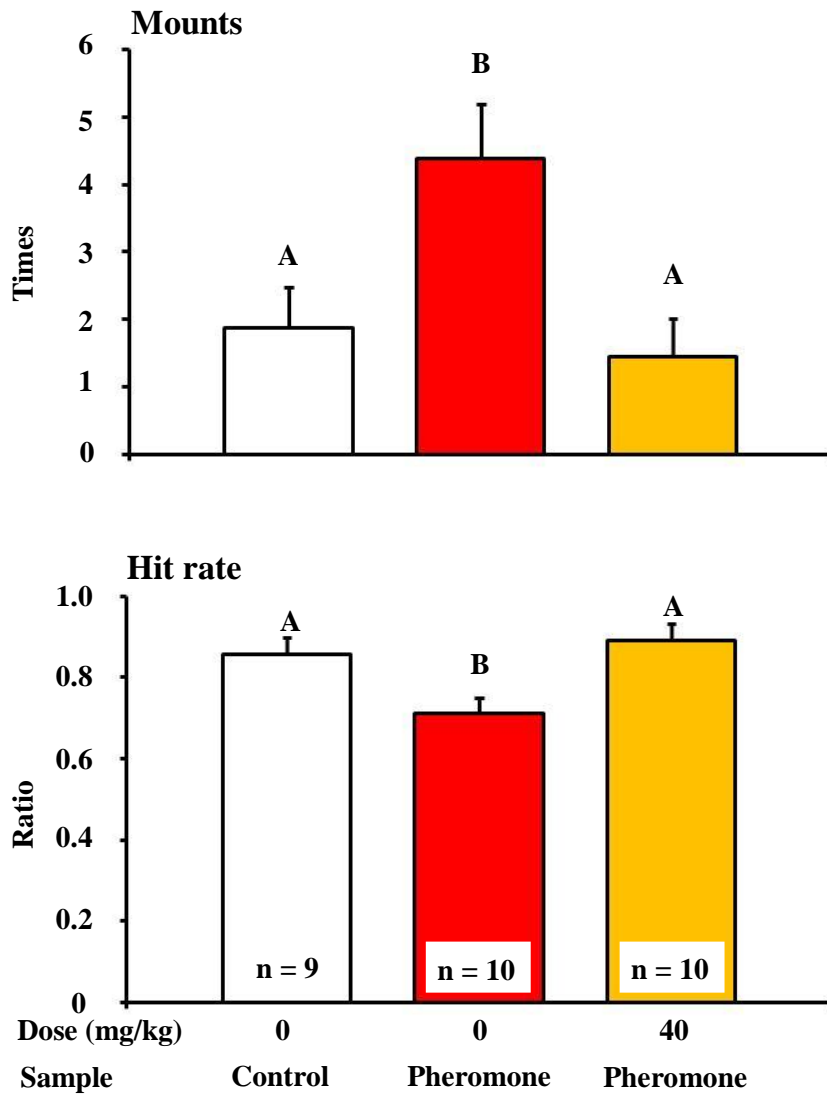


図4-3、ナロキソンを事前に投与し、警報フェロモンを性行動前のオスラットに提示した際のオスラットのマウント数、およびHit rate

(異なるアルファベット間において有意な差を示す)

表 4-2

ナロキソンを事前投与し、警報フェロモン(Pheromone)、および対照臭(Control)を性行動前のオスラットのみに提示した際のオスラットの性行動指標。

ナロキソン濃度 提示サンプル	<u>0 mg/kg</u> Control (n=8)	<u>0 mg/kg</u> Pheromone (n=8)	<u>40 mg/kg</u> Pheromone (n=9)
マウント数	1.9 ± 0.6	4.4 ± 0.8*	1.4 ± 0.6
マウント潜時	135 ± 71	179 ± 73	172 ± 64
挿入潜時	151 ± 69	181 ± 73	311 ± 142
10回の挿入に要した 時間	425 ± 70	440 ± 80	506 ± 87
Hit rate	0.86 ± 0.04	0.71 ± 0.04*	0.89 ± 0.04

結果は平均値±標準誤差で示した。

*: p<0.05 (Control 群との比較)

表 4-3

ナロキソン事前投与後に警報フェロモン(Pheromone)、および対照臭(Control)に暴露されたオスラットの性行動関連神経核における c-Fos 蛋白質発現細胞数/ 0.25 mm²

ナロキソン濃度 提示サンプル	0 mg/kg Control (n=8)	0 mg/kg Pheromone (n=8)	40 mg/kg Naloxone(n=9)
Forebrain and hypothalamus			
1. Nucleus accumbens core	31.5 ± 6.7	39.0 ± 7.6	69.2 ± 6.9 *
2. Nucleus accumbens shell	7.4 ± 2.4	5.0 ± 1.4	15.0 ± 2.4 *
3. Bed nucleus of the stria terminalis, anterior division medial group	18.0 ± 1.4	33.2 ± 4.3 *	30.9 ± 4.3 *
4. Bed nucleus of the stria terminalis, anterior division lateral group	16.5 ± 4.5	34.0 ± 4.0 *	48.1 ± 4.7 *
5. Medial preoptic area	81.9 ± 7.7	90.6 ± 6.2	88.8 ± 3.9
6. Bed nucleus of the stria terminalis, posterior division 0.8	19.9 ± 2.3	37.7 ± 5.9 *	36.3 ± 2.3 *
7. Lateral hypothalamic area	13.9 ± 2.9	17.8 ± 2.5	19.6 ± 2.8
8. Supraoptic nucleus	13.8 ± 3.2	13.5 ± 2.6	8.9 ± 0.9
9. Paraventricular nucleus of hypothalamus Magnocellular part	17.4 ± 2.0	9.8 ± 1.0 *	17.9 ± 1.6
10. Paraventricular nucleus of hypothalamus Parvocellular part	34.6 ± 3.0	51.6 ± 4.8 *	64.7 ± 6.7 *
11. Peduncular part of lateral hypothalamus	16.1 ± 3.1	20.2 ± 2.4	25.6 ± 2.9
12. Ventromedial nucleus of hypothalamus	8.0 ± 1.0	9.2 ± 1.4	14.4 ± 1.8 *
13. Arcuate nucleus	9.4 ± 1.9	30.3 ± 4.7 *	34.6 ± 4.1 *
Amygdalae			
14. Anterior cortical amygdaloid nucleus	36.5 ± 4.1	34.6 ± 5.2	34.2 ± 4.0
15. Lateral amygdaloid nucleus	6.5 ± 1.0	6.8 ± 1.1	7.7 ± 0.5
16. Medial amygdala (anterior)	24.0 ± 3.1	32.4 ± 3.3	31.9 ± 2.8
17. Central amygdaloid nucleus	8.7 ± 1.3	7.6 ± 2.2	74.9 ± 15.5 *
18. Basolateral amygdale	13.6 ± 2.0	12.3 ± 2.6	14.0 ± 2.3
19. Medial amygdala (postero dorsal)	28.5 ± 5.8	45.6 ± 5.4	44.0 ± 5.9
20. Medial amygdala (postero ventral)	39.0 ± 3.8	42.7 ± 2.1	40.1 ± 3.0

つづき

Brain stem

21. Dorsolateral periaqueductal gray	16.2 ± 1.6	23.6 ± 1.8 *	22.9 ± 1.7 *
22. Lateral periaqueductal gray	16.8 ± 2.0	21.9 ± 1.6	25.8 ± 3.5
23. Dorsal raphe	6.0 ± 0.8	6.3 ± 1.1	10.0 ± 0.8 *
24. Ventral tegmental area	4.2 ± 0.8	4.1 ± 0.9	4.4 ± 0.7
25. Ventrolateral periaqueductal gray	33.2 ± 2.8	71.9 ± 6.7 *	32.9 ± 2.1
26. Dorsal raphe nucleus dorsal part	11.7 ± 1.8	11.2 ± 2.0	13.3 ± 1.6
27. Locus coeruleus	13.3 ± 2.5	20.0 ± 3.1	15.8 ± 2.6
28. Nucleus paragiganto cellularis	7.3 ± 0.8	21.5 ± 2.6 *	5.7 ± 0.7
29. Raphe magnus	6.0 ± 0.8	7.0 ± 1.6	6.4 ± 1.2
30. Raphe pallidas	4.9 ± 0.5	5.0 ± 0.4	5.5 ± 1.0
31. Raphe obscurus	11.9 ± 2.7	12.2 ± 2.8	18.1 ± 2.1

結果は平均値±標準誤差で示した。

*: $p < 0.05$ (Control 群との比較)

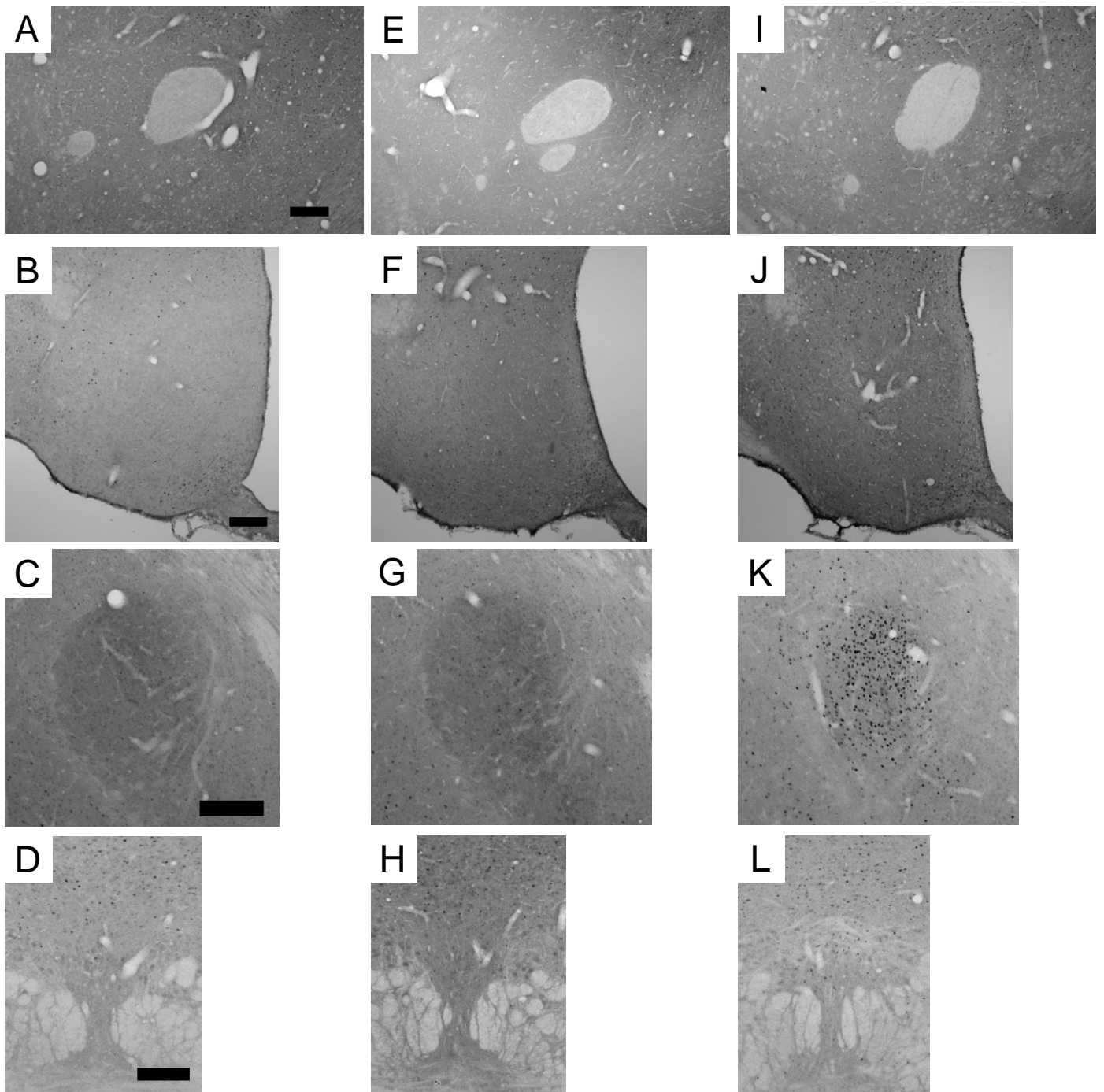


図4-4、生理食塩水を事前投与し、頸部刺激臭(A-D)もしくは警報フェロモン(E-H)を提示した際のオスラット、もしくはナロキソンを事前投与して警報フェロモンを提示した際(I-L)のオスラットの側坐核(A,E, およびI)、視床下部腹内側核(B,F, およびJ)、扁桃体中心角(C,G, およびK)、および背側縫線核(D,H, およびL)におけるc-Fos蛋白陽性細胞の発現 (Bar=200 μ m)

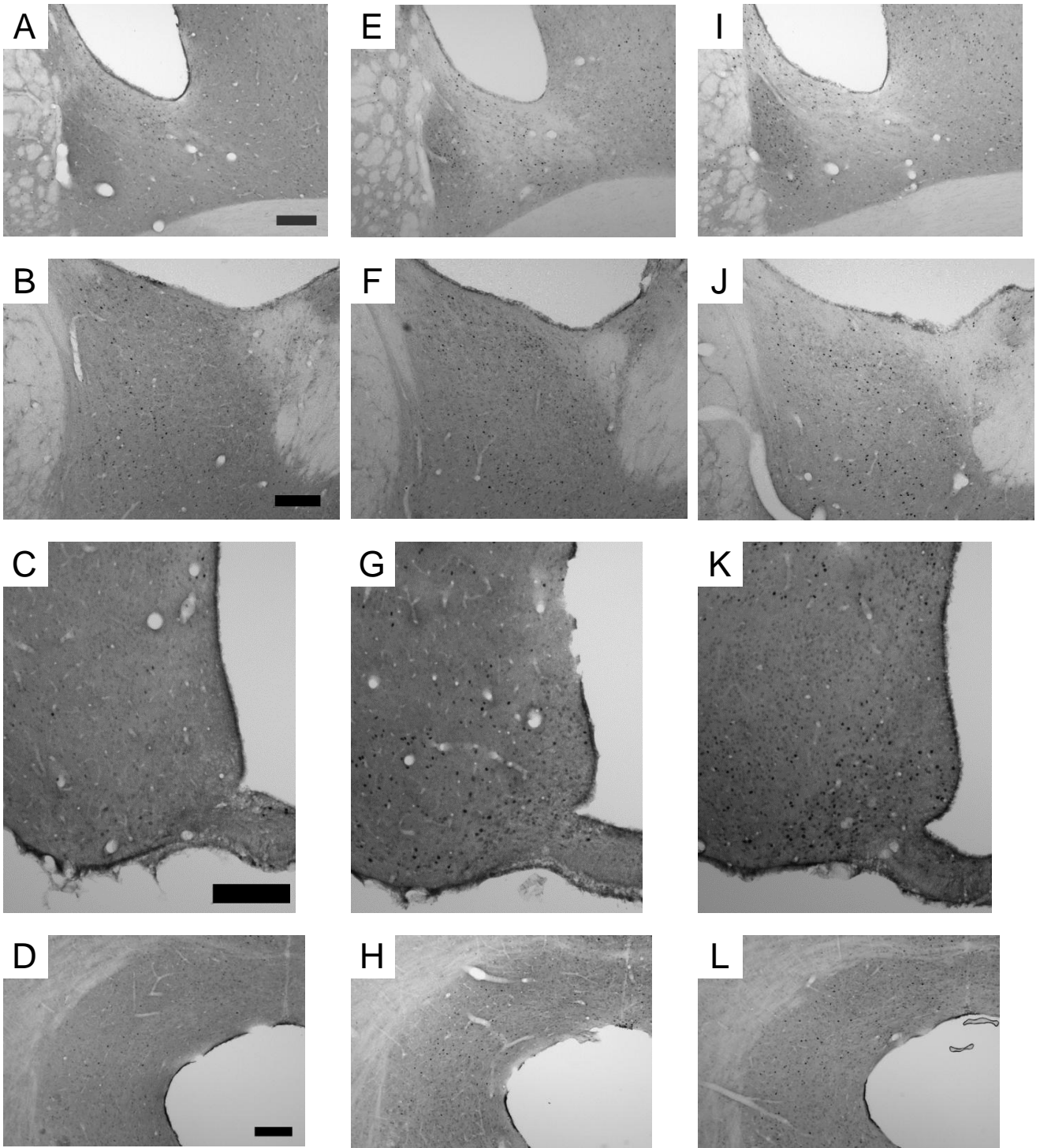


図4-5、生理食塩水を事前投与し、頸部刺激臭(A-D)もしくは警報フェロモン(E-H)を提示した際のオスラット、もしくはナロキソンを事前投与して警報フェロモンを提示した際(I-L)のオスラットの分界条床核吻側部A,E, およびI)、分界条床核尾側部(B,F, およびJ)、弓状核(C,G, およびK)、および中脳中心灰白質背外側部(D,H,およびL)におけるc-Fos蛋白陽性細胞の発現 (Bar=200 μ m)

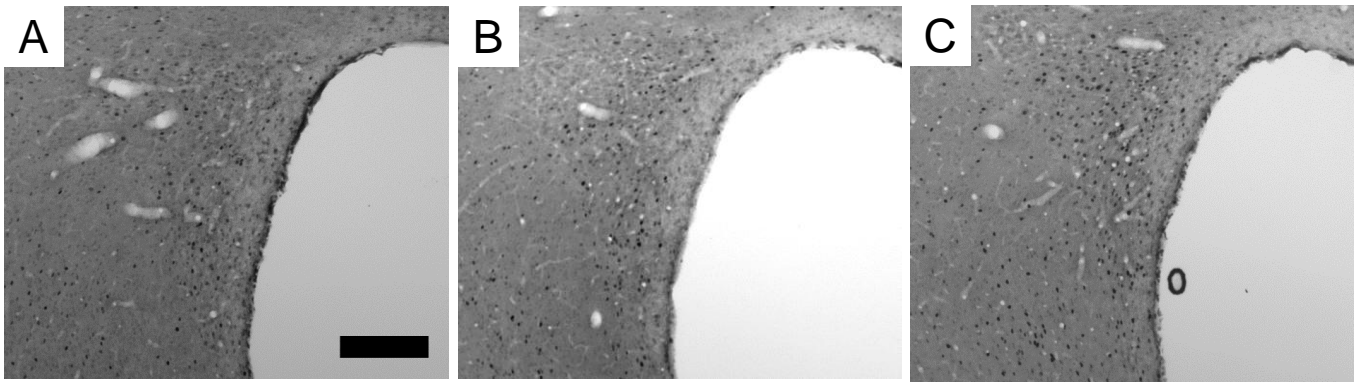


図4-6、生理食塩水を事前投与し、頸部刺激臭(A)もしくは警報フェロモン(B)を提示した際のオスラット、もしくはナロキソンを事前投与して警報フェロモンを提示(C)した際のオスラットの室傍核におけるc-Fos蛋白陽性細胞の発現 (Bar=200μ m)

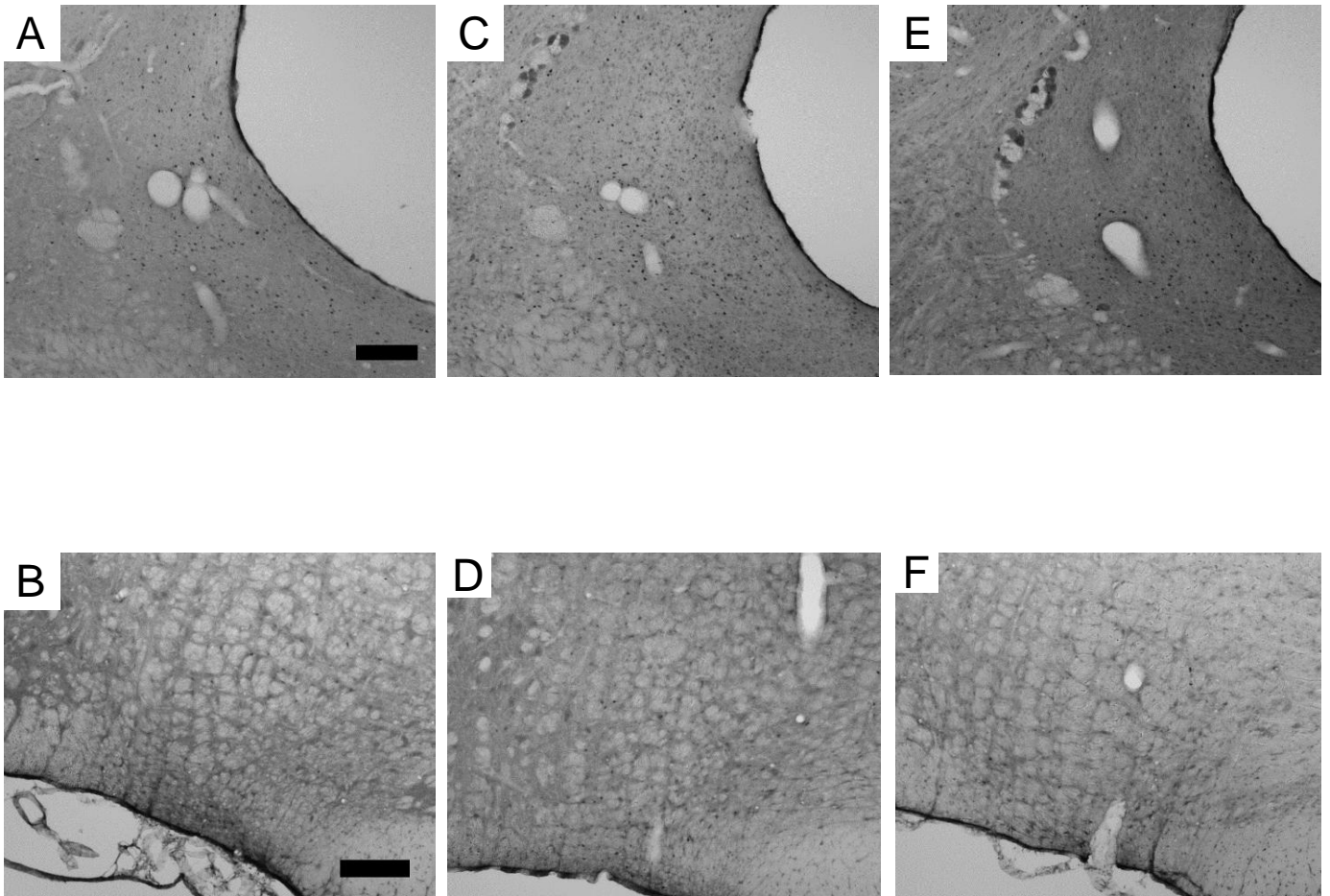


図4-7、生理食塩水を事前投与し、頸部刺激臭(A,B)もしくは警報フェロモン(C,D)を提示した際のオスラット、もしくはナロキソンを事前投与して警報フェロモンを提示した際(E,F)のオスラットの中脳中心灰白質腹外側部(A,C, およびE)、および巨細胞性傍核(B,D, およびF)におけるc-Fos蛋白陽性細胞の発現 (Bar=200 μ m)

第5章 総合考察

5-1 結果の要約

本研究では、ラット警報フェロモンを研究モデルとすることで、ストレス反応が性行動を抑制する脳内情報伝達経路を明らかにすることを目的として、警報フェロモンが性行動に及ぼす影響について検討し、これを生物検定系とすることで関連する神経伝達物質を探索するとともに、関連する中枢神経核の役割を探る目的で c-Fos 蛋白質の発現を観察した。本研究の成果は図 5-1 に示されるとともに以下のように要約される。

1) 警報フェロモンがラットの性行動に与える影響について検討した。性行動試験期間中全般にわたる警報フェロモンの提示が、オスラットのみの性行動を抑制したことから、警報フェロモンにはオスラットの性行動を抑制する作用があることが示唆された。次に、この性行動抑制作用が、警報フェロモンをオスラットに提示した場合にのみ再現され、メスラットに提示した時には再現されなかったことから、警報フェロモンはオスラットに作用していることが示唆された。また、この警報フェロモンの性行動抑制作用が CRH 受容体拮抗阻害薬により阻害されたことから、警報フェロモンは CRH の分泌を介して性行動を抑制していることが示唆された。

2) 警報フェロモンの性行動抑制に関わっている神経核を探るために、免疫組織化学的手法を用いることで、性行動に関係していることが知られる神経核を解析した。また、同時に警報フェロモンによる性行動抑制における PVN の CRH 含有細胞の役割も検討した。その結果、PVN では、警報フェロモンの提示により抗 c-Fos 蛋白質抗体と抗 CRH 抗体とで二重染色された細胞数が増加した。これに加えて、BNSTam、BNSTal、BNSTa、MeA、BLA、nPGi において、警報フェロモンは c-Fos 蛋白質の発現を増加させることが明らかとなった。以上の結果から、警報フェロモンは PVN からの CRH 分泌を促すとともに、nPGi を含む視床下部や脳幹の神経核を活性化させることで、性行動を抑制することが推測された。

3) オピオイド受容体拮抗阻害薬であるナロキソンの全身投与と免疫組織化学的手法を用いることで、警報フェロモンの性行動抑制におけるオピオイドの役割を検討した。ナロキソンは警報フェロモンによる性行動抑制効果を用量依存的に緩和した。警報フェロモンの提示は BNSTam、BNSTal、BNSTa、parvocellular part of PVN、Arc、dlPAG、vlPAG、および nPGi における c-Fos 蛋白質の発現量を増加させ、magnocellular part of PVN の発現量を減少させることが明らかとなった。ナロキソン投与は、これらの神経核のうち vlPAG、nPGi、および magnocellular part of PVN における c-Fos 蛋白質の発現量変化を阻害した。また、parvocellular part of PVN における c-Fos 蛋白質の発現量増加はナロキソン投与により阻害されなかった。以上の結果から、警報フェロモンは、CRH 系に続いてオピオイド系を活性化させ、その後、PAG や nPGi といった脳幹の神経核や magnocellular part of PVN といった視床下部

の領域を制御することが示唆された。

5-2 警報フェロモンによる性行動抑制経路

本研究結果と先行研究の結果をもとにすると、警報フェロモンによる性行動抑制神経経路として以下の仮説が立てられる。すなわち、警報フェロモンは VNO で受容された後、その情報は AOB、BNST を経て parvocellular part of PVN に伝達され、CRH の分泌を促す。分泌された CRH は Arc に作用してオピオイドの放出を促し、その後 PAG—nPGi の神経経路を活性化させるとともに、magnocellular part of PVN を抑制することで性行動を抑制する、という経路である。

先行研究により、警報フェロモンは鋤鼻系を介して受容されること(Kiyokawa, 2007)、AOB を活性化させることが明らかになっていること(Kiyokawa, 2005)、本研究において警報フェロモンが鋤鼻系に含まれる BNST をオピオイドも作用点よりも上流で活性化したことを考慮に入れると、警報フェロモンは VNO で受容された後に、その情報は AOB とそれに続く BNST に伝達されると考えられる。BNST から parvocellular part of PVN へ密な投射が存在するため(Dong, 2001)、警報フェロモンの情報は上記の鋤鼻系神経伝達経路を介して PVN に伝達され、CRH の分泌を促すと推察される。

次に、PVN から Arc への CRH 性の投射が存在すること(Swanson, 1983)、Arc は μ 受容体に高い親和性を持つ β エンドルフィンを豊富に含む神経が存在すること(Bloom, 1978)、in vitro の実験系において CRH 曝露が Arc を含む視床下部のスライスでの β エンドルフィンの分泌を促すこと(Nikolarakis, 1986)などが先行研究により示されていることから、PVN からの Arc への CRH の入力には Arc からのオピオイド分泌を促すと推察される。Tail pinch や捕食者臭などのストレスに暴露されたラットの Arc において β エンドルフィンの濃度が上昇するという先行研究の結果もこの推察を支持するものである(Marinelli, 2004)。

Arc からの入力経路の候補として、MPOA が挙げられる。MPOA へのオピオイド投与は性行動を抑制することが知られており(Hughes, 1987; Matsuzaki, 1989)、Arc から MPOA へは β エンドルフィン性の投射が存在する(Horvath, 1992)。この MPOA への電気刺激が PAG 内の nPGi へ投射する神経を活性化したことが先行研究において示されている(Rizvi, 1996)。また、MPOA 内には、GABA 性の介在神経が存在することを考慮すると、オピオイドがこの介在神経を抑制することで、PAG へ投射している神経の抑制を解除して、PAG—nPGi の神経伝達経路を活性化しているという仮説が立てられる。この仮説は、警報フェロモンが MPOA における c-Fos 蛋白質の発現を上昇させなかった本研究の結果とも一致するものである。

また、Arc からのオピオイド入力経路のもう一つの候補として magnocellular part of PVN が挙げられる。この領域が性行動中に勃起を促進することや(Liu, 1997)、PVN へのメタドンの微量投与は勃起を抑制すること(Melis, 1999)が先行研究から示唆されている。また、Arc からこの

領域への投射が存在し(Sawchenko, 1983)、オピオイドが抑制性の神経伝達物質であることを考え合わせると、Arcからのオピオイド分泌が *magnocellular part of PVN* を抑制することで性行動を抑制したことが考えられる。この領域からは直接オキシトシン性の投射が存在し(Sawchenko, 1982)、このオキシトシン入力が勃起を促進していることがいくつかの研究により示唆されていることから(Argiolas, 2005)、この領域が性行動の抑制に前述の *PAG-nPGi* の経路とは別経路で関与していることが推察される。

5-3 ストレスによる性行動抑制の共通経路

5-2 で考察したように、本研究の結果から、オスラットが警報フェロモンを受容してから性行動の抑制を引き起こすまでの神経情報伝達経路の概要が明らかとなった。この経路のうち、警報フェロモンの受容から、*PVN* 由来の *CRH* 分泌までの経路は警報フェロモン特有の神経伝達経路であると考えられる。これに対し、*PVN* から *CRH* が分泌される反応が多くのストレスサーを用いた際にも認められる共通のストレス反応であることを考慮すると、*PVN* から *CRH* が分泌されてから勃起の抑制を引き起こされるまでの神経情報伝達経路は、ストレスによる性行動抑制における共通の神経情報伝達経路であると推察される。

本研究の結果と、他のストレスサーを用いて性行動を抑制した際の実験結果を比較すると、拘束ストレス(Retana-Marquez, 1996; Sun, 1979)やフットショック(Retana-Marquez, 1996; Swenson, 1983)、部分水浸(Abel, 1993; Retana-Marquez, 2003)などの、オスラットに提示することでコルチコステロン値の上昇をもたらすことが明らかとなっているストレスサーは、マウント数の増加や *Hit rate* の低下といった、勃起が抑制されたことを示唆する性行動指標の変化を引き起こすことが明らかとなっている。これに対し、長期間の単独飼育のように、オスラットにコルチコステロン値の上昇を引き起こさないストレスサーは、オスラットの勃起に関係する性行動指標に変化を引き起こさないことが明らかとなっている(Barrot, 2005)。コルチコステロン値の上昇は、*PVN* から *CRH* が分泌された間接的な証拠になることから、これらの研究の結果は、ストレスによる性行動抑制において *PVN* 由来の *CRH* が起点となり勃起の抑制を引き起こす共通経路である、という本研究の結果を支持するものである。

また、本研究の結果と、*CRH* の脳室内投与により得られた実験結果を比較すると、警報フェロモンは勃起に関する指標だけを抑制したのに対し、*CRH* の脳室内投与は勃起に関する指標に加えて、性的動機づけに関する指標や交尾率、射精に関する指標も変化させた(Sirinathsinghji, 1987)。c-Fos 蛋白質の発現を指標にした先行研究によると、ラットにフットショックや拘束といったストレスサーを暴露した場合と *CRH* を脳室内に投与した場合とでは活性化する神経核に違いがあることが明らかとなっている(Imaki, 1993)。こういった研究結果を考慮すると、脳室内投与のような薬理学的研究により得られた知見は、動物が生体内で引き起こしている反応をかならずしも再現できているとは限らないことが示唆される。これに対し、本研究で

用いられた警報フェロモンは、ラットが自然界で個体間の情報伝達に利用している物質であると考えられるため、警報フェロモンの曝露はラットに自然な状態のストレス反応を再現していると考えられる。そのため本研究から得られた知見は、ストレスによる性行動抑制の中枢制御機構を研究する上で妥当性の高い知見であると言える。しかしながら、性行動の抑制における CRH の用量依存性が先行研究においても、本研究においても示唆されており、警報フェロモンの曝露では、十分な量の CRH 分泌を促すことができなかつたために、勃起に関する指標にのみ影響が出た可能性も否定できない。

5-4 警報のフェロモンの社会行動における役割

当研究室のこれまでの研究により、警報フェロモンの個体に与える行動変化や生理学的変化について知見が積み重ねられてきた。しかしながら、警報フェロモンの社会行動における役割を観察した研究は本研究が初めてである。同種個体間コミュニケーションツールであるフェロモンは、本来その社会行動の中で用いられるものであると考えられるため、本研究の結果は、警報フェロモンの自然界における役割を解明するための大きな手がかりになるものであると推察される。

ラットと同じげっ歯類において、警報フェロモンと同様に危険を伝達するためのシグナルである捕食者臭を提示した場合と比較してみると、捕食者臭を提示した際には性行動を発現するオス個体の割合の減少や(Bian, 2005)、性行動の頻度の低下など(Koskela, 1995)が認められる。これに対し本研究で用いた警報フェロモンでは、オスラットの勃起を抑制するという、捕食者臭と比較すると弱い反応しか観察されなかつた。この反応の差は、捕食者臭が捕食者の存在という直接的な危険の存在を伝えるシグナルであるのに対し、警報フェロモンが、同種他個体が危険に瀕したことを伝える間接的なシグナルであることが関係している可能性が考えられる。警報フェロモンが、自然界のコミュニケーションにおいてどの程度の強さの“警報”としての役割を担っているのか解明していくことは、今後の研究の大きなテーマの一つとなる。

本研究でテーマに据えた性行動は、かならず雌雄の個体のペアによって成り立つ社会行動であるため、雌雄両方の個体の観察をできるという大きな特徴がある。本研究を通して、警報フェロモンはオスラットの性行動を抑制することが観察できたものの、メスラットの性行動変化に関しては観察することができなかつた。先行研究により、視床下部や中脳中心灰白質への CRH 投与はメスラットのロードシス商を低下させることが明らかになっていることを考慮すると(Sirinathsinghji, 1983)、警報フェロモンにより分泌された CRH が他の神経伝達物質との相互関係の中で性行動の変化を引き起こすに至らなかつたことが考えられる。この点に関しては、第2章で考察した通り、発情前期特有の高濃度の血中プロゲステロンおよびエストロゲンの存在が CRH の分泌を緩和したことが原因であると推察される。これに対し、拘束ストレスやフットショックがメスラットのロードシス商を低下させたという先行研究の結果を考え合わせると

(Cecconello, 2009; Hulse, 1983)、メスラットの性行動抑制には CRH 以外の神経伝達物質も関わっていることが推察される。アンギオテンシン II の受容体拮抗阻害薬の投与が拘束ストレスによるロードシス商の低下を阻害した先行研究の結果は、この推察を支持するものである (Cecconello, 2009)。こういった雌雄の行動反応に差が存在する背景には、脳の性差が存在していることが知られている。そもそも性行動は雌雄がそれぞれ別の役割を担う社会行動であるため、警報フェロモンによる性行動制御における神経科学的性差を解明していくことは、警報フェロモンの社会行動に与える影響の意義を考える上でも重要であると考えられる。

これに対して、警報フェロモンの社会行動における役割を観察する上で、性行動を研究対象にしたことで生じる問題点も考えられる。例えば、発情期のメスラットのにおいを事前にオスラットに提示することで、オスラットの捕食者臭への暴露による血中コルチコステロン値の上昇が緩和されたという報告が存在する (Kavaliers, 2001)。そのため、本研究においても、メスラットの存在がオスラットの CRH の分泌を緩和したために、警報フェロモンの作用を観察しにくくなってしまった可能性は否定できない。そのため、オス-メス間の社会行動よりもオス-オス間、またはメス-メス間の社会行動を実験モデルとすることで、警報フェロモンの生理学的意義がより明瞭になることも考えられる。

5-5 今後の研究

本研究の結果より、警報フェロモンの性行動抑制について、その受容から性行動抑制の発現までの神経情報伝達経路の概要が解明された。しかしながら、その詳細についてはさらなる研究が必要であると考えられる。

最大の課題は、直接的に警報フェロモンによる性行動抑制に関わる神経伝達経路を明らかにしていくことである。本研究で用いた手法は、性行動の詳細な観察、受容体拮抗阻害薬の全身投与、および免疫組織化学的手法であるため、ある神経伝達物質が特定の神経核に作用することで性行動の抑制を引き起こしたことを直接示しているわけではない。そのため、今後は、本研究で予測された神経伝達経路に含まれる神経核において、微量投与方法や電気生理学的手法を用いてその詳細を吟味していくことが不可欠とされる。

また、警報フェロモン分子が同定されていないことから、警報フェロモンを提示する際にその量を調節できなかった点も大きな問題点である。警報フェロモン分子を同定することで、その提示量の調整が可能になり、ストレス反応の起点である PVN 由来の CRH 分泌量を調節することも可能になると考えられる。

本研究では、警報フェロモンが勃起を抑制することで性行動を抑制していることが明らかとなった。しかしながら、本研究の行動実験の結果は、性行動観察実験におけるデータしか示すことができていない。勃起を計測する行動実験として、本研究で用いられた性行動観察実験の他に、より直接的に勃起機能を調べるいくつかの試験が開発されている。無麻酔のラットの

上半身を円筒に入れ、下半身を仰向けにして固定し、ペニスを包皮から露出した状態でマスキングテープにあけた穴に通して固定することで得られる勃起を測定する反射勃起テスト (touch based erection 試験)や(Leipheimer, 1988)、オスラットを金網を隔てて発情メスラットの近傍に置くことで得られる勃起を観察する非接触性勃起試験 (noncontact erection 試験) (Sachs, 1994)などが存在する。こういった試験も並行して行うことで、警報フェロモンが勃起を抑制することを直接的に証明していく必要があると考えられる。

性行動の発現に関与している神経メカニズムは哺乳類を通して保存されていることや、本研究の結果から性行動の抑制に関わっていることが示唆されている中枢神経核が多くの哺乳類を通じて解剖学的に保存されていることを考慮すると、性行動を抑制するメカニズムも同様に哺乳類を通して保存されていると考えられる。そのため、本研究で得られた知見は他の動物種においても敷衍し得るものと思われ、冒頭で述べた家畜の繁殖効率の向上のほかに、人間におけるストレス性の勃起障害メカニズムの解明や治療薬の開発といった臨床分野への応用も期待される。

警報フェロモンによる性行動抑制メカニズムの解明

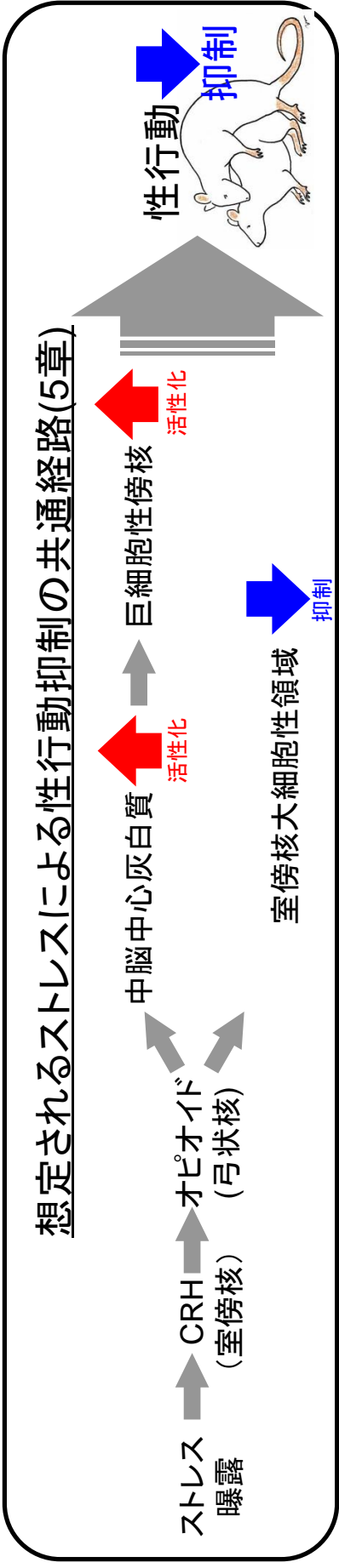
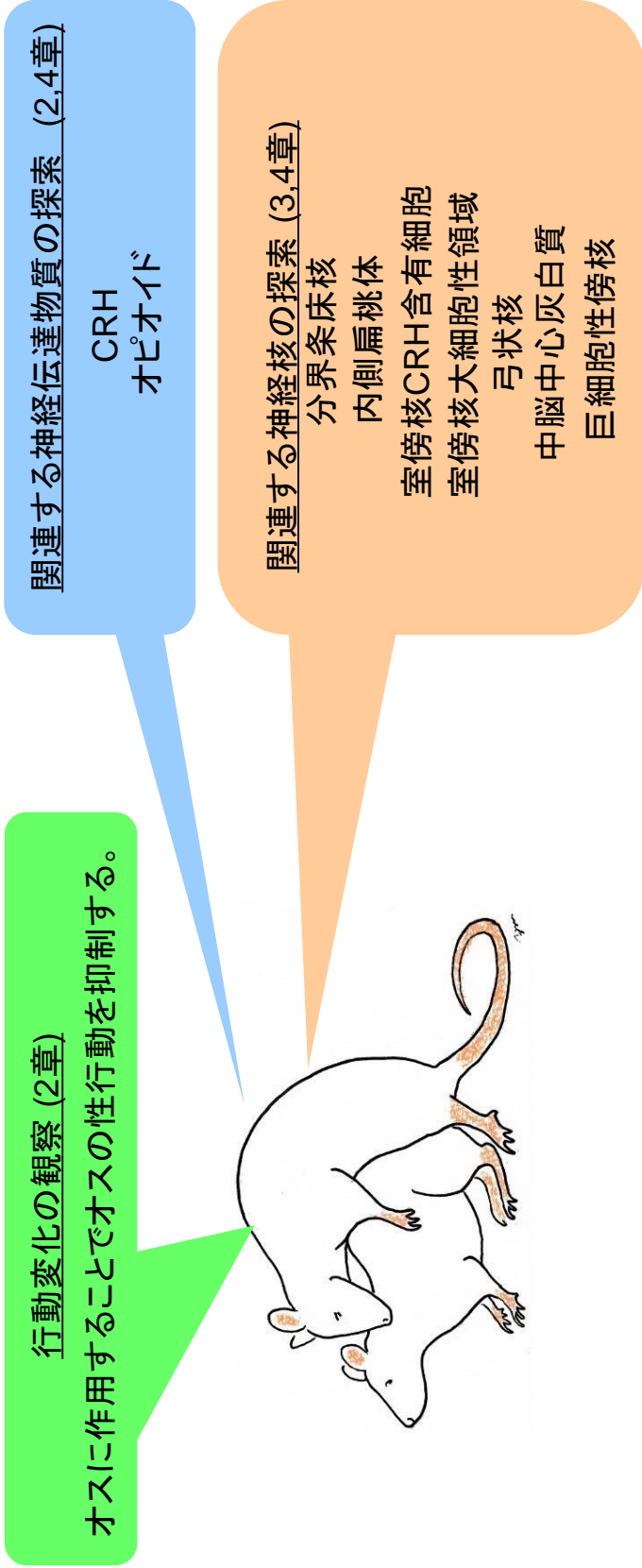


図5-1、本研究のまとめ

総括

総括

生物にとって自己の遺伝子の保存がもっとも優先されるべきことであるため、性行動は生物にとって数ある社会行動の中で最も重要な行動の一つと考えられる。しかし性行動は、様々な外的刺激により抑制されることが知られている。例えば競走馬や純血種犬の種付けを行う際、メス個体の飼育場所にオス個体を連れていくと、新奇環境ストレスによって多くのオス個体が性行動を完遂できないことが、経験的に知られている。このように、様々なストレスによって性行動が抑制されることは実験動物においても観察されており、その局所的な中枢メカニズムも調べられているが、知覚されたストレスが最終的に性行動抑制を引き起こすまでの脳内情報伝達経路の全容に関しては未解明であった。その理由として、多くのストレスはその知覚様式が不明であることが挙げられる。例えば新奇環境ストレスの場合、それを知覚する感覚は視覚、聴覚、触覚を含めた複数に渡ることが予測されるため、それぞれの感覚に応じた様々な中枢神経核が興奮してしまい、その結果として性行動自体の抑制に関わっている神経核を特定するのが困難であった。本研究で用いた警報フェロモンは、ラットが他個体に危険の存在を伝えるための物質であり、先行研究から鋤鼻器により受容され、ストレス反応を引き起こすフェロモンであることが明らかとなっている。このように、警報フェロモンの受容の際には鋤鼻嗅覚系の神経核が興奮することが明らかなため、性行動の抑制に関わっている神経核の特定が可能であると考えられる。そこで本研究は、ラット警報フェロモンを研究モデルとすることで、ストレス反応が性行動を抑制する脳内情報伝達経路を明らかにすることを目的とした。まず警報フェロモンの性行動抑制効果を検討した後、その抑制に関わる神経伝達物質および神経核の探索を行ったものである。本論文は以下のように5章で構成されている。

第1章は総合緒言であり、警報フェロモンの先行研究を概観するとともに、性行動やその中枢制御機構について解説し、本研究の目的を述べた。

第2章では、警報フェロモンがラットの性行動に与える影響を検討した。警報フェロモンを性行動試験期間全般に渡って提示し続け、オスおよびメスラットの性行動を観察した。警報フェロモンの存在により、オスラットでは射精に必要なマウント数の増加およびHit rate(挿入数をマウント数+挿入数で除した値)の低下が認められた一方で、メスラットではいずれの性行動にも影響が観察されなかったことから、警報フェロモンはオスラットのみの性行動を抑制することが示唆された。次に、警報フェロモンがオスラットに作用することで性行動を抑制したのか、メスラットに作用して間接的にオスラットの性行動を抑制したのかを検討した。性行動試験直前に警報フェロモンをオスラットまたはメスラットに提示し、フェロモンを回収した後に性行動試験を行った。その結果、警報フェロモンをオスラットに提示した場合にのみ前述と同等の結果が得ら

れたことから、警報フェロモンはオスラットにのみ作用することが示された。最後に、警報フェロモンによる性行動抑制における Corticotropin releasing hormone (CRH) の役割を検討した。CRH の受容体拮抗阻害薬である CP-154526 をあらかじめ投与したオスラットに警報フェロモンを提示し、その後の性行動を観察した。その結果、CP-154526 の事前投与により性行動抑制が用量依存的に緩和されたことから、警報フェロモンによる性行動抑制には CRH が関与していることが示唆された。以上の結果より、警報フェロモンはオスラットに作用することでオスラットの性行動を抑制し、その際には CRH が関与していることが明らかとなった。

第 3 章では、警報フェロモンによる性行動抑制に関与する中枢神経核を検討するため、性行動抑制を示したオスラットの脳における c-Fos 蛋白質の発現を観察した。先行研究において、巨細胞性傍核の除去はオスラットのマウント数を減少させ Hit rate を上昇させるという、警報フェロモンによる性行動抑制と逆の作用を持つことが示されていることから、本実験ではこの巨細胞性傍核に着目することとした。また室傍核に対して抗 c-Fos 蛋白質抗体および抗 CRH 抗体を用いて二重染色を行うことで、室傍核における CRH 含有細胞の役割を検討した。オスラットに警報フェロモンを提示すると、第 2 章と同様にマウント数の増加と、Hit rate の低下が観察された。また室傍核では、警報フェロモンの提示は抗 c-Fos 蛋白質抗体と抗 CRH 抗体とで二重染色された細胞数が増加した。これらの結果より、警報フェロモンは室傍核からの CRH 分泌を促し、オスラットの性行動を抑制することが示唆された。またさらに、分界条床核内側部吻側、分界条床核外側部吻側、分界条床核尾側、扁桃体内側核、扁桃体外側基底核、巨細胞性傍核において、警報フェロモンは c-Fos 蛋白質の発現を増加させることが明らかとなった。以上の結果から、警報フェロモンは室傍核からの CRH 分泌を促すとともに、巨細胞性傍核を含む視床下部や脳幹の神経核を活性化させることで、性行動を抑制することが推測された。

第 4 章では、警報フェロモンによる性行動抑制におけるオピオイドの役割を検討した。オピオイドの受容体拮抗阻害薬であるナロキソンをあらかじめ投与したオスラットに警報フェロモンを提示し、その後の性行動を観察した結果、ナロキシンの事前投与は用量依存的に性行動抑制を緩和したことから、警報フェロモンによる性行動抑制にはオピオイドが関与していることが示唆された。また同時にオピオイドの作用メカニズムを検討するため、これらのオスラットにおいて c-Fos 蛋白質の発現を観察した。特定の神経核において警報フェロモンの提示が c-Fos 蛋白質の発現量に変化を与え、ナロキシンの投与がその変化を阻害した場合に、その神経核は性行動抑制神経経路におけるオピオイドの作用点より下流にある神経核であることが示唆される一方で、警報フェロモンの提示により変化した c-Fos 蛋白質の発現量がナロキソン投与による影響を受けないのであれば、その神経核はオピオイドの作用点より上流にある神経核であるか、またはオピオイドとは無関係に活性化された神経核であることが推測できる。本実験結果として、警報フェロモンの提示は分界条床核内側部吻側、分界条床核外側部吻側、分界条床核尾側、室傍核小細胞性領域、弓状核、中脳中心灰白質背外側部、中脳中心灰白質腹外

側部、および巨細胞性傍核における c-Fos 蛋白質の発現量を増加させ、室傍核大細胞性領域の発現量を減少させることが明らかとなった。ナロキソン投与は、これらの神経核のうち中脳中心灰白質腹外側部、巨細胞性傍核、および室傍核大細胞性領域における c-Fos 蛋白質の発現量変化を阻害したことから、これらの神経核はオピオイド作用点の下流にあることが示唆された。また一方で、室傍核小細胞性領域における c-Fos 蛋白質の発現量増加はナロキソン投与により阻害されなかったことから、CRH の作用点はオピオイドの作用点より上流であることが推測された。以上の結果より、警報フェロモンはCRHの下流においてオピオイド分泌を促すことで性行動を抑制していることが示唆された。

第 5 章では総合考察を行った。本研究の結果より、警報フェロモンはオスラットに作用することでオスラットの性行動を抑制すること、その抑制には室傍核由来の CRH とオピオイド、および視床下部や脳幹の様々な中枢神経核が関与していることが示された。本研究結果と先行研究の結果をもとにすると、警報フェロモンによる性行動抑制神経経路として以下の仮説を立てられよう。すなわち、警報フェロモンは鋤鼻器で受容された後、その情報は副嗅球、分界条床核を経て室傍核小細胞性領域に伝達され、CRH の分泌を促す。分泌された CRH は弓状核に作用してオピオイドの放出を促し、その後中脳中心灰白質—巨細胞性傍核の神経経路を活性化させるとともに、室傍核大細胞性領域を抑制することで性行動を抑制する、という経路である。

室傍核における CRH 分泌は様々なストレスを用いたストレスにおいて観察される共通の反応である。本研究結果より予測した性行動抑制経路においても CRH は重要な役割を果たしていることから、この経路は様々な場面におけるストレスに共通した性行動抑制経路の一つであることが示唆される。性行動の発現に関与している神経メカニズムは哺乳類を通して保存されていることや先行研究から性行動の抑制に関わっていることが示唆されている中枢神経核が解剖学的に保存されていることを考慮すると、性行動を抑制するメカニズムも同様に哺乳類を通して保存されていると考えられる。そのため、本研究で得られた知見は他の動物種においても外挿し得るものと思われ、家畜の繁殖効率の向上のほか人間におけるストレス性の勃起障害の解明や治療薬の開発といった臨床分野への応用も期待される。本研究で中枢機能の解析に用いられた手法は、薬物の全身投与とそれに伴う行動観察および免疫組織化学的手法であるため、ある一つの神経伝達物質が特定の神経核において作用していることを直接的に示しているものではないことから、今後は、本研究で関連が予想された神経核への微量投与方法などを用いることで、神経経路を確定していくことが大切であると考えられる。

参考文献

- [1] Abel, E.L. and Berman, R.F., Effects of water immersion stress on convulsions induced by pentylenetetrazol, *Pharmacol Biochem Behav*, 45 (1993) 823-5.
- [2] Ackerman, A.E., Lange, G.M. and Clemens, L.G., Effects of paraventricular lesions on sex behavior and seminal emission in male rats, *Physiol Behav*, 63 (1997) 49-53.
- [3] Agmo, A. and Fernandez, H., Benzodiazepine receptor ligands and sexual behavior in the male rat: the role of GABAergic mechanisms, *Pharmacol Biochem Behav*, 38 (1991) 781-8.
- [4] Apfelbach, R., Wiest, H. and Vasilieva, N.Y., Ferret (*Mustela putorius f. furo*) odor affects the estrous cycle in Campbell's hamster females (*Phodopus campbelli*). *Wiss. Mitt Niederoesterr. Landesmuseum*, 14 (2001) 147-152.
- [5] Argiolas, A., Oxytocin stimulation of penile erection. Pharmacology, site, and mechanism of action, *Ann N Y Acad Sci*, 652 (1992) 194-203.
- [6] Argiolas, A., Neuropeptides and sexual behaviour, *Neurosci Biobehav Rev*, 23 (1999) 1127-42.
- [7] Argiolas, A. and Melis, M.R., Central control of penile erection: role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *Prog Neurobiol*, 76 (2005) 1-21.
- [8] Bancroft, J., Central inhibition of sexual response in the male: a theoretical perspective, *Neurosci Biobehav Rev*, 23 (1999) 763-84.
- [9] Barrot, M., Wallace, D.L., Bolanos, C.A., Graham, D.L., Perrotti, L.I., Neve, R.L., Chambliss, H., Yin, J.C. and Nestler, E.J., Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 8357-62.
- [10] Baum, M.J. and Everitt, B.J., Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field, *Neuroscience*, 50 (1992) 627-46.
- [11] Bertolini, A., Genedani, S. and Castelli, M., Behavioural effects of naloxone in rats, *Experientia*, 34 (1978) 771-2.
- [12] Bian, J.H., Wu, Y. and Liu, J.K., Breeding behavior under temporal risk of predation in male root voles (*Microtus oeconomus*), *Journal of Mammalogy*, 86 (2005) 953-960.
- [13] Bitran, D. and Hull, E.M., Pharmacological analysis of male rat sexual behavior, *Neurosci Biobehav Rev*, 11 (1987) 365-89.
- [14] Blanchard, R.J. and Blanchard, D.C., Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system, *J Comp Psychol*, 103 (1989) 70-82.
- [15] Bloom, F., Battenberg, E., Rossier, J., Ling, N. and Guillemin, R., Neurons containing beta-endorphin in rat brain exist separately from those containing enkephalin: immunocytochemical studies, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 (1978) 1591-5.

- [16] Boissy, A., Terlouw, C. and Le Neindre, P., Presence of cues from stressed conspecifics increases reactivity to aversive events in cattle: evidence for the existence of alarm substances in urine, *Physiol Behav*, 63 (1998) 489-95.
- [17] Brackett, N.L., Iuvone, P.M. and Edwards, D.A., Midbrain lesions, dopamine and male sexual behavior, *Behav Brain Res*, 20 (1986) 231-40.
- [18] Ceconello, A.L., Raineki, C., Sebben, V., Lucion, A.B. and Sanvitto, G.L., Effect of acute stress on sexual behavior in female rats: participation of the central angiotensinergic system, *Behav Brain Res*, 207 (2009) 429-33.
- [19] Christensen, L.W., Nance, D.M. and Gorski, R.A., Effects of hypothalamic and preoptic lesions on reproductive behavior in male rats, *Brain Res Bull*, 2 (1977) 137-41.
- [20] Clancy, A.N., Coquelin, A., Macrides, F., Gorski, R.A. and Noble, E.P., Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system, *J Neurosci*, 4 (1984) 2222-9.
- [21] Clark, J.T., A possible role for angiotensin II in the regulation of male sexual behavior in rats, *Physiol Behav*, 45 (1989) 221-4.
- [22] Clark, J.T., Suppression of copulatory behavior in male rats following central administration of clonidine, *Neuropharmacology*, 30 (1991) 373-82.
- [23] Clark, T.K., Sexual inhibition is reduced by rostral midbrain lesions in the male rat, *Science*, 190 (1975) 169-71.
- [24] Clement, P., Bernabe, J., Gengo, P., Denys, P., Laurin, M., Alexandre, L. and Giuliano, F., Supraspinal site of action for the inhibition of ejaculatory reflex by dapoxetine, *Eur Urol*, 51 (2007) 825-32.
- [25] Coolen, L.M., Allard, J., Truitt, W.A. and McKenna, K.E., Central regulation of ejaculation, *Physiol Behav*, 83 (2004) 203-15.
- [26] Coolen, L.M., Peters, H.J. and Veening, J.G., Distribution of Fos immunoreactivity following mating versus anogenital investigation in the male rat brain, *Neuroscience*, 77 (1997) 1151-61.
- [27] Coolen, L.M., Peters, H.J. and Veening, J.G., Anatomical interrelationships of the medial preoptic area and other brain regions activated following male sexual behavior: a combined fos and tract-tracing study, *J Comp Neurol*, 397 (1998) 421-35.
- [28] de Jong, T.R., Veening, J.G., Waldinger, M.D., Cools, A.R. and Olivier, B., Serotonin and the neurobiology of the ejaculatory threshold, *Neurosci Biobehav Rev*, 30 (2006) 893-907.
- [29] Dong, H.W., Petrovich, G.D., Watts, A.G. and Swanson, L.W., Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain, *J Comp Neurol*, 436 (2001) 430-55.

- [30] Dornan, W.A., Vink, K.L., Malen, P., Short, K., Struthers, W. and Barrett, C., Site-specific effects of intracerebral injections of three neurokinins (neurokinin A, neurokinin K, and neurokinin gamma) on the expression of male rat sexual behavior, *Physiol Behav*, 54 (1993) 249-58.
- [31] Eaton, R.C., Markowski, V.P., Lumley, L.A., Thompson, J.T., Moses, J. and Hull, E.M., D2 receptors in the paraventricular nucleus regulate genital responses and copulation in male rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 39 (1991) 177-81.
- [32] Emery, D.E. and Sachs, B.D., Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis, *Physiol Behav*, 17 (1976) 803-6.
- [33] Fernandezguasti, A., Roldanroldan, G. and Saldivar, A., Pharmacological Manipulation of Anxiety and Male-Rat Sexual-Behavior, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 35 (1990) 263-267.
- [34] Funk, D. and Amir, S., Enhanced fos expression within the primary olfactory and limbic pathways induced by an aversive conditioned odor stimulus, *Neuroscience*, 98 (2000) 403-6.
- [35] G. Paxinos and Watson, C., The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th ed. Academic Press, Tokyo., (2007).
- [36] G.P. Pearce, a.P.E.H., An investigation of the roles of boar-component stimuli in the expression of proceptivity in the female pig, *Applied Animal Behaviour Science*, 18 (1987) 287-299.
- [37] Gerrits, M., Grootkarijn, A., Bekkering, B.F., Bruinsma, M., Den Boer, J.A. and Ter Horst, G.J., Cyclic estradiol replacement attenuates stress-induced c-Fos expression in the PVN of ovariectomized rats, *Brain Res Bull*, 67 (2005) 147-55.
- [38] Gessa, G.L., Paglietti, E. and Quarantotti, B.P., Induction of copulatory behavior in sexually inactive rats by naloxine, *Science*, 204 (1979) 203-5.
- [39] Gitlin, M., Sexual dysfunction with psychotropic drugs, *Expert Opin Pharmacother*, 4 (2003) 2259-69.
- [40] Giuliano, F. and Rampin, O., Central neural regulation of penile erection, *Neurosci Biobehav Rev*, 24 (2000) 517-33.
- [41] Greco, B., Edwards, D.A., Michael, R.P. and Clancy, A.N., Androgen receptor immunoreactivity and mating-induced Fos expression in forebrain and midbrain structures in the male rat, *Neuroscience*, 75 (1996) 161-71.
- [42] Gronli, J., Murison, R., Fiske, E., Bjorvatn, B., Sorensen, E., Portas, C.M. and Ursin, R., Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions, *Physiol Behav*, 84 (2005) 571-7.
- [43] Gulia, K.K., Kumar, V.M. and Mallick, H.N., Role of the lateral septal noradrenergic

- system in the elaboration of male sexual behavior in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 72 (2002) 817-23.
- [44] Halpern, M. and Martinez-Marcos, A., Structure and function of the vomeronasal system: an update, *Prog Neurobiol*, 70 (2003) 245-318.
- [45] Hansen, S., Kohler, C. and Ross, S.B., On the role of the dorsal mesencephalic tegmentum in the control of masculine sexual behavior in the rat: effects of electrolytic lesions, ibotenic acid and DSP 4, *Brain Res*, 240 (1982) 311-20.
- [46] Harbuz, M.S. and Lightman, S.L., Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat, *J Endocrinol*, 122 (1989) 705-11.
- [47] Harding, S.M. and McGinnis, M.Y., Microlesions of the ventromedial nucleus of the hypothalamus: effects on sociosexual behaviors in male rats, *Behav Neurosci*, 119 (2005) 1227-34.
- [48] Harris, V.S. and Sachs, B.D., Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions, *Brain Res*, 86 (1975) 514-8.
- [49] Heeb, M.M. and Yahr, P., c-Fos immunoreactivity in the sexually dimorphic area of the hypothalamus and related brain regions of male gerbils after exposure to sex-related stimuli or performance of specific sexual behaviors, *Neuroscience*, 72 (1996) 1049-71.
- [50] Hillegaart, V., Ahlenius, S. and Larsson, K., Effects of local application of 5-HT into the median and dorsal raphe nuclei on male rat sexual and motor behavior, *Behav Brain Res*, 33 (1989) 279-86.
- [51] Horvath, T.L., Naftolin, F. and Leranth, C., GABAergic and catecholaminergic innervation of mediobasal hypothalamic beta-endorphin cells projecting to the medial preoptic area, *Neuroscience*, 51 (1992) 391-9.
- [52] Hosoya, Y., Sugiura, Y., Okado, N., Loewy, A.D. and Kohno, K., Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat, *Exp Brain Res*, 85 (1991) 10-20.
- [53] Hughes, A.M., Everitt, B.J. and Herbert, J., Selective effects of beta-endorphin infused into the hypothalamus, preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis on the sexual and ingestive behaviour of male rats, *Neuroscience*, 23 (1987) 1063-73.
- [54] Hull, E.M. and Dominguez, J.M., Sexual behavior in male rodents, *Horm Behav*, 52 (2007) 45-55.
- [55] Hull, E.M., Meisel, R.L. and Sachs, B.D., Male sexual behavior., *In: D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A.M. Etgen, S.E. Fahrbach and R.T. Rubin, (Eds.), Hormones, Brain and Behavior, Academic Press, London, pp. 3-137. (2002).*
- [56] Hulse, G.K. and Coleman, G.J., The role of endogenous opioids in the blockade of reproductive function in the rat following exposure to acute stress, *Pharmacol Biochem*

- Behav*, 19 (1983) 795-9.
- [57] Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M. and Demura, H., Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress, *Brain Res*, 616 (1993) 114-25.
- [58] Imaki, T. and Vale, W., Chlordiazepoxide attenuates stress-induced accumulation of corticotropin-releasing factor mRNA in the paraventricular nucleus, *Brain Res*, 623 (1993) 223-8.
- [59] Imaki, T., Xiaoquan, W., Shibasaki, T., Harada, S., Chikada, N., Takahashi, C., Naruse, M. and Demura, H., Chlordiazepoxide Attenuates Stress-Induced Activation of Neurons, Corticotropin-Releasing Factor (Crf) Gene-Transcription and Crf Biosynthesis in the Paraventricular Nucleus (Pvn), *Molecular Brain Research*, 32 (1995) 261-270.
- [60] Inagaki, H., Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Enhancement of the acoustic startle reflex by an alarm pheromone in male rats, *Physiol Behav*, 93 (2008) 606-11.
- [61] Inagaki, H., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y. and Mori, Y., The alarm pheromone in male rats as a unique anxiety model: Psychopharmacological evidence using anxiolytics, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 94 (2010) 575-579.
- [62] Iwata, E., Wakabayashi, Y., Kakuma, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Testosterone-dependent primer pheromone production in the sebaceous gland of male goat, *Biol Reprod*, 62 (2000) 806-10.
- [63] Johnson, R.D., Descending pathways modulating the spinal circuitry for ejaculation: effects of chronic spinal cord injury, *Prog Brain Res*, 152 (2006) 415-26.
- [64] Jones, D.N., Kortekaas, R., Slade, P.D., Middlemiss, D.N. and Hagan, J.J., The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats, *Psychopharmacology (Berl)*, 138 (1998) 124-32.
- [65] Kalra, S.P., Dube, M.G. and Kalra, P.S., Neuropeptide K (NPK) suppresses copulatory behavior in male rats, *Physiol Behav*, 49 (1991) 1297-300.
- [66] Karlson, P. and Luscher, M., Pheromones': a new term for a class of biologically active substances, *Nature*, 183 (1959) 55-6.
- [67] Kavaliers, M., Choleris, E. and Colwell, D.D., Brief exposure to female odors "emboldens" male mice by reducing predator-induced behavioral and hormonal responses, *Horm Behav*, 40 (2001) 497-509.
- [68] Kikusui, T., Takigami, S., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats, *Physiol Behav*, 72 (2001) 45-50.
- [69] Kippin, T.E., Sotiropoulos, V., Badih, J. and Pfau, J.G., Opposing roles of the nucleus

- accumbens and anterior lateral hypothalamic area in the control of sexual behaviour in the male rat, *Eur J Neurosci*, 19 (2004) 698-704.
- [70] Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Alarm pheromones with different functions are released from different regions of the body surface of male rats, *Chem Senses*, 29 (2004) 35-40.
- [71] Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Modulatory role of testosterone in alarm pheromone release by male rats, *Horm Behav*, 45 (2004) 122-7.
- [72] Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Alarm pheromone that aggravates stress-induced hyperthermia is soluble in water, *Chem Senses*, 30 (2005) 513-9.
- [73] Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Mapping the neural circuit activated by alarm pheromone perception by c-Fos immunohistochemistry, *Brain Res*, 1043 (2005) 145-54.
- [74] Kiyokawa, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Removal of the vomeronasal organ blocks the stress-induced hyperthermia response to alarm pheromone in male rats, *Chem Senses*, 32 (2007) 57-64.
- [75] Kiyokawa, Y., Shimozuru, M., Kikusui, T., Takeuchi, Y. and Mori, Y., Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behaviors in male rats, *Physiol Behav*, 87 (2006) 383-7.
- [76] Kollack-Walker, S. and Newman, S.W., Mating and agonistic behavior produce different patterns of Fos immunolabeling in the male Syrian hamster brain, *Neuroscience*, 66 (1995) 721-36.
- [77] Kondo, Y. and Arai, Y., Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat, *Physiol Behav*, 57 (1995) 69-73.
- [78] Koskela, E., Horne, T.J., Mappes, T. and Ylonen, H., Does risk of small mustelid predation affect the oestrous cycle in the bank vole, *Clethrionomys glareolus*?, *Animal Behaviour*, 51 (1996) 1159-1163.
- [79] Koskela, E. and Ylonen, H., Suppressed Breeding in the Field Vole (*Microtus-Agrestis*) - an Adaptation to Cyclically Fluctuating Predation Risk, *Behavioral Ecology*, 6 (1995) 311-315.
- [80] Kovacs, K.J., c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map, *Neurochem Int*, 33 (1998) 287-97.
- [81] Lawrence, G.J. and Kiefer, S.W., Cessation of male rat copulatory behavior using illness as punishment: facilitation with a novel odor, *Behav Neurosci*, 101 (1987) 289-91.
- [82] Leipheimer, R.E. and Sachs, B.D., GABAergic regulation of penile reflexes and

- copulation in rats, *Physiol Behav*, 42 (1988) 351-7.
- [83] Lennard, D.E., Eckert, W.A. and Merchenthaler, I., Corticotropin-releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus project to the external zone of the median eminence: a study combining retrograde labeling with immunocytochemistry, *J Neuroendocrinol*, 5 (1993) 175-81.
- [84] Leyton, M. and Stewart, J., The stimulation of central kappa opioid receptors decreases male sexual behavior and locomotor activity, *Brain Res*, 594 (1992) 56-74.
- [85] Liu, Y.C., Sachs, B.D. and Salamone, J.D., Sexual behavior in male rats after radiofrequency or dopamine-depleting lesions in nucleus accumbens, *Pharmacol Biochem Behav*, 60 (1998) 585-92.
- [86] Liu, Y.C., Salamone, J.D. and Sachs, B.D., Impaired sexual response after lesions of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in male rats, *Behav Neurosci*, 111 (1997) 1361-7.
- [87] Liu, Y.C., Salamone, J.D. and Sachs, B.D., Lesions in medial preoptic area and bed nucleus of stria terminalis: differential effects on copulatory behavior and noncontact erection in male rats, *J Neurosci*, 17 (1997) 5245-53.
- [88] Lorrain, D.S., Matuszewich, L., Friedman, R.D. and Hull, E.M., Extracellular serotonin in the lateral hypothalamic area is increased during the postejaculatory interval and impairs copulation in male rats, *J Neurosci*, 17 (1997) 9361-6.
- [89] Lumley, L.A. and Hull, E.M., Effects of a D1 antagonist and of sexual experience on copulation-induced Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic nucleus, *Brain Res*, 829 (1999) 55-68.
- [90] Marinelli, P.W., Quirion, R. and Gianoulakis, C., An in vivo profile of beta-endorphin release in the arcuate nucleus and nucleus accumbens following exposure to stress or alcohol, *Neuroscience*, 127 (2004) 777-84.
- [91] Marson, L. and McKenna, K.E., The identification of a brainstem site controlling spinal sexual reflexes in male rats, *Brain Res*, 515 (1990) 303-8.
- [92] Marson, L. and McKenna, K.E., A role for 5-hydroxytryptamine in descending inhibition of spinal sexual reflexes, *Exp Brain Res*, 88 (1992) 313-20.
- [93] Matsuzaki, I., Takamatsu, Y. and Moroji, T., The effects of intracerebroventricularly injected corticotropin-releasing factor (CRF) on the central nervous system: behavioural and biochemical studies, *Neuropeptides*, 13 (1989) 147-55.
- [94] Matuszewich, L. and Dornan, W.A., Bilateral injections of a selective mu-receptor agonist (morphiceptin) into the medial preoptic nucleus produces a marked delay in the initiation of sexual behavior in the male rat, *Psychopharmacology (Berl)*, 106 (1992) 391-6.

- [95] McGregor, A. and Herbert, J., Specific effects of beta-endorphin infused into the amygdala on sexual behaviour in the male rat, *Neuroscience*, 46 (1992) 165-72.
- [96] McIntosh, T.K. and Barfield, R.J., Brain Monoaminergic Control of Male Reproductive-Behavior .2. Dopamine and the Post-Ejaculatory Refractory Period, *Behavioural Brain Research*, 12 (1984) 267-273.
- [97] McIntosh, T.K. and Barfield, R.J., Brain Monoaminergic Control of Male Reproductive-Behavior .3. Norepinephrine and the Post-Ejaculatory Refractory Period, *Behavioural Brain Research*, 12 (1984) 275-281.
- [98] McIntosh, T.K., Vallano, M.L. and Barfield, R.J., Effects of morphine, beta-endorphin and naloxone on catecholamine levels and sexual behavior in the male rat, *Pharmacol Biochem Behav*, 13 (1980) 435-41.
- [99] Melis, M.R., Succu, S., Spano, M.S. and Argiolas, A., Morphine injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus prevents noncontact penile erections and impairs copulation: involvement of nitric oxide, *Eur J Neurosci*, 11 (1999) 1857-64.
- [100] Meredith, M., Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior, *Physiol Behav*, 36 (1986) 737-43.
- [101] Meyerson, B.J. and Terenius, L., Beta-endorphin and male sexual behavior, *Eur J Pharmacol*, 42 (1977) 191-2.
- [102] Mitchell, J.B. and Stewart, J., Facilitation of sexual behaviors in the male rat associated with intra-VTA injections of opiates, *Pharmacol Biochem Behav*, 35 (1990) 643-50.
- [103] Murphy, M.R., Methadone Reduces Sexual Performance and Sexual Motivation in the Male Syrian Golden-Hamster, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 14 (1981) 561-567.
- [104] Nikolarakis, K.E., Almeida, O.F. and Herz, A., Stimulation of hypothalamic beta-endorphin and dynorphin release by corticotropin-releasing factor (in vitro), *Brain Res*, 399 (1986) 152-5.
- [105] Normandin, J.J. and Murphy, A.Z., Nucleus paragigantocellularis afferents in male and female rats: organization, gonadal steroid receptor expression, and activation during sexual behavior, *J Comp Neurol*, 508 (2008) 771-94.
- [106] Normandin, J.J. and Murphy, A.Z., Excitotoxic lesions of the nucleus paragigantocellularis facilitate male sexual behavior but attenuate female sexual behavior in rats, *Neuroscience*, 175 (2011) 212-23.
- [107] Normandin, J.J. and Murphy, A.Z., Serotonergic lesions of the periaqueductal gray, a primary source of serotonin to the nucleus paragigantocellularis, facilitate sexual behavior in male rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 98 (2011) 369-75.
- [108] Parra-Gamez, L., Garcia-Hidalgo, A.A., Salazar-Juarez, A., Anton, B. and Paredes, R.G.,

- Endomorphin-1, effects on male sexual behavior, *Physiol Behav*, 97 (2009) 98-101.
- [109] Paulmyer-Lacroix, O., Hery, M., Pugeat, M. and Grino, M., The modulatory role of estrogens on corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of ovariectomized rats: role of the adrenal gland, *J Neuroendocrinol*, 8 (1996) 515-9.
- [110] Pfaus, J.G. and Gorzalka, B.B., Opioids and sexual behavior, *Neurosci Biobehav Rev*, 11 (1987) 1-34.
- [111] Pfaus, J.G. and Wilkins, M.F., A novel environment disrupts copulation in sexually naive but not experienced male rats: reversal with naloxone, *Physiol Behav*, 57 (1995) 1045-9.
- [112] Prop-Van den Berg, C.M., Schuurman, T. and Wiepkema, P.R., Nembutal treatment of the VMH (rat): effects on feeding and sexual behaviour, *Brain Res*, 126 (1977) 519-29.
- [113] Quarantotti, B.P., Corda, M.G., Paglietti, E., Biggio, G. and Gessa, G.L., Inhibition of copulatory behavior in male rats by D-Ala²-Met-enkephalinamide, *Life Sci*, 23 (1978) 673-8.
- [114] Raynor, K., Kong, H., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G.I. and Reisine, T., Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors, *Mol Pharmacol*, 45 (1994) 330-4.
- [115] Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vazquez-Palacios, G. and Martinez-Garcia, R., Naltrexone effects on male sexual behavior, corticosterone, and testosterone in stressed male rats, *Physiol Behav*, 96 (2009) 333-42.
- [116] Retana-Marquez, S., Bonilla-Jaime, H., Vazquez-Palacios, G., Martinez-Garcia, R. and Velazquez-Moctezuma, J., Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats, *Horm Behav*, 44 (2003) 327-37.
- [117] Retana-Marquez, S., Salazar, E.D. and Velazquez-Moctezuma, J., Effect of acute and chronic stress on masculine sexual behavior in the rat, *Psychoneuroendocrinology*, 21 (1996) 39-50.
- [118] Rizvi, T.A., Murphy, A.Z., Ennis, M., Behbehani, M.M. and Shipley, M.T., Medial preoptic area afferents to periaqueductal gray medullo-output neurons: a combined Fos and tract tracing study, *J Neurosci*, 16 (1996) 333-44.
- [119] Rodriguez-Manzo, G., Pellicer, F., Larsson, K. and Fernandez-Guasti, A., Stimulation of the medial preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation, *Behav Neurosci*, 114 (2000) 553-60.
- [120] Ronkainen, H. and Ylonen, H., Behavior of Cyclic Bank Voles under Risk of Mustelid Predation - Do Females Avoid Copulations, *Oecologia*, 97 (1994) 377-381.

- [121] Rottman, S.J. and Snowdon, C.T., Demonstration and analysis of an alarm pheromone in mice, *J Comp Physiol Psychol*, 81 (1972) 483-90.
- [122] Sachs, B.D., Sexual Behavior of Male Rats after One to Nine Days without Food, *J Comp Physiol Psychol*, 60 (1965) 144-6.
- [123] Sachs, B.D., Akasofu, K., Citron, J.H., Daniels, S.B. and Natoli, J.H., Noncontact stimulation from estrous females evokes penile erection in rats, *Physiol Behav*, 55 (1994) 1073-9.
- [124] Sakamoto, H., The neurobiology of psychogenic erectile dysfunction in the spinal cord, *J Androl*, 31 (2010) 519-26.
- [125] Sakurai, T., Nakagawa, T., Mitsuno, H., Mori, H., Endo, Y., Tanoue, S., Yasukochi, Y., Touhara, K. and Nishioka, T., Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 16653-8.
- [126] Salchner, P., Lubec, G. and Singewald, N., Decreased social interaction in aged rats may not reflect changes in anxiety-related behaviour, *Behav Brain Res*, 151 (2004) 1-8.
- [127] Sawchenko, P.E. and Swanson, L.W., Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat, *J Comp Neurol*, 205 (1982) 260-72.
- [128] Sawchenko, P.E. and Swanson, L.W., The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat, *J Comp Neurol*, 218 (1983) 121-44.
- [129] Shibata, H. and Nagasaka, T., Role of sympathetic nervous system in immobilization- and cold-induced brown adipose tissue thermogenesis in rats, *Jpn J Physiol*, 34 (1984) 103-11.
- [130] Sirinathsinghji, D.J., Inhibitory influence of corticotropin releasing factor on components of sexual behaviour in the male rat, *Brain Res*, 407 (1987) 185-90.
- [131] Sirinathsinghji, D.J., Rees, L.H., Rivier, J. and Vale, W., Corticotropin-releasing factor is a potent inhibitor of sexual receptivity in the female rat, *Nature*, 305 (1983) 232-5.
- [132] Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C. and Koentges, G., Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2, *Science*, 295 (2002) 1493-500.
- [133] Sullivan, R.M. and Gratton, A., Relationships between stress-induced increases in medial prefrontal cortical dopamine and plasma corticosterone levels in rats: role of cerebral laterality, *Neuroscience*, 83 (1998) 81-91.
- [134] Sun, C.L., Thoa, N.B. and Kopin, I.J., Comparison of the effects of 2-deoxyglucose and immobilization on plasma levels of catecholamines and corticosterone in awake rats, *Endocrinology*, 105 (1979) 306-11.

- [135] Svensson, L. and Hansen, S., Spinal monoaminergic modulation of masculine copulatory behavior in the rat, *Brain Res*, 302 (1984) 315-21.
- [136] Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J. and Vale, W.W., Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study, *Neuroendocrinology*, 36 (1983) 165-86.
- [137] Swenson, R.M. and Vogel, W.H., Plasma Catecholamine and corticosterone as well as brain catecholamine changes during coping in rats exposed to stressful footshock, *Pharmacol Biochem Behav*, 18 (1983) 689-93.
- [138] Swerdlow, N.R., Geyer, M.A., Vale, W.W. and Koob, G.F., Corticotropin-Releasing Factor Potentiates Acoustic Startle in Rats - Blockade by Chlordiazepoxide, *Psychopharmacology*, 88 (1986) 147-152.
- [139] Takahashi, L.K., Kalin, N.H., Vandenburgt, J.A. and Sherman, J.E., Corticotropin-Releasing Factor Modulates Defensive-Withdrawal and Exploratory-Behavior in Rats, *Behavioral Neuroscience*, 103 (1989) 648-654.
- [140] Tanapat, P., Hastings, N.B., Rydel, T.A., Galea, L.A. and Gould, E., Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism, *J Comp Neurol*, 437 (2001) 496-504.
- [141] Tillman, J.A., Seybold, S.J., Jurenka, R.A. and Blomquist, G.J., Insect pheromones--an overview of biosynthesis and endocrine regulation, *Insect Biochem Mol Biol*, 29 (1999) 481-514.
- [142] Toufexis, D.J., Davis, C., Hammond, A. and Davis, M., Progesterone attenuates corticotropin-releasing factor-enhanced but not fear-potentiated startle via the activity of its neuroactive metabolite, allopregnanolone, *J Neurosci*, 24 (2004) 10280-7.
- [143] Valcourt, R.J. and Sachs, B.D., Penile reflexes and copulatory behavior in male rats following lesions in the bed nucleus of the stria terminalis, *Brain Res Bull*, 4 (1979) 131-3.
- [144] van Furth, W.R., Wolterink, G. and van Ree, J.M., Regulation of masculine sexual behavior: involvement of brain opioids and dopamine, *Brain Res Brain Res Rev*, 21 (1995) 162-84.
- [145] Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J.C., Chan, R.K., Li, H.Y., Arias, C., Prins, G.S., Perrin, M., Vale, W. and Sawchenko, P.E., Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse, *J Comp Neurol*, 428 (2000) 191-212.
- [146] Vandenberg, J.G., Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation, *J Reprod Fertil*, 46 (1976) 451-3.
- [147] Vieuillethomas, C. and Signoret, J.P., Pheromonal Transmission of an Aversive Experience in Domestic Pig, *Journal of Chemical Ecology*, 18 (1992) 1551-1557.

- [148] von Campenhausen, H. and Mori, K., Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse, *Eur J Neurosci*, 12 (2000) 33-46.
- [149] Vuong, C., Van Uum, S.H., O'Dell, L.E., Lutfy, K. and Friedman, T.C., The effects of opioids and opioid analogs on animal and human endocrine systems, *Endocr Rev*, 31 (2010) 98-132.
- [150] Waldhoer, M., Bartlett, S.E. and Whistler, J.L., Opioid receptors, *Annu Rev Biochem*, 73 (2004) 953-90.
- [151] White, S. and Uphouse, L., Estrogen and progesterone dose-dependently reduce disruptive effects of restraint on lordosis behavior, *Horm Behav*, 45 (2004) 201-8.
- [152] Wilson, E.O. and Bossert, W.H., Chemical Communication among Animals, *Recent Prog Horm Res*, 19 (1963) 673-716.
- [153] Yells, D.P., Hendricks, S.E. and Prendergast, M.A., Lesions of the nucleus paragigantocellularis: effects on mating behavior in male rats, *Brain Res*, 596 (1992) 73-9.
- [154] Ylonen, H. and Ronkainen, H., Breeding Suppression in the Bank Vole as Antipredatory Adaptation in a Predictable Environment, *Evolutionary Ecology*, 8 (1994) 658-666.
- [155] Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J. and Kastin, A.J., A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor, *Nature*, 386 (1997) 499-502.

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、多くの方々にご指導、ご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

本学獣医動物行動学研究室の森裕司教授には、本研究の遂行、学術論文および本論文の執筆にあたり、終始ご指導をいただきました。様々な助言を頂くとともに、私の自主性を重んじていただいたことを深く感謝します。

同研究室の武内ゆかり准教授には、本研究の遂行、学術論文の執筆にあたり多くの助言を頂きました。特に、研究がうまくいかない時などに頂いた励ましのお言葉には勇気づけられました。厚く御礼申し上げます。

同研究室の清川泰志助教には、本研究の遂行、学術論文の執筆にあたり多くの助言を頂きました。私を一人前の研究者に成長させるための数々のお言葉や手助けは、本当に私の糧となりました。本当にお世話になりました。

獣医動物行動学研究室の先輩方には、あたたかい助言や励ましのお言葉、そして楽しい時間を頂きました。研究の合間にいつも楽しい時間をご一緒させていただいた、稲垣氏、荒田先生、後藤氏、児玉氏、中村氏には感謝しております。ありがとうございました。

同研究室の同期には、刺激を頂きました。村田くん、夏子さん、坂本くんがいたおかげで、私もここまで頑張れたと思っています。どうもありがとうございました。

同研究室の後輩には、いつも励ましていただきました。久保田くん、野呂田さん、高橋くん、森くん、吉武さん、御神村くん、石井さん、寛容な心で私を受け入れていただき感謝しております。

私の研究の遂行にあたり、犠牲となった多くの動物たちに感謝いたします。

最後に、いつも私の研生活を支えてくださった、家族に感謝いたします。とりわけ祖母のマサさん、本当にありがとうございました。