骨格筋におけるアンドロゲンレセプターの 測定法についての研究

1) 東邦大学医学部第一内科 (指導: 宮地幸隆教授)

2) (財) 明治生命厚生事業団体力医学研究所

高橋正人¹⁾, 荒尾孝²⁾

Studies on the In Vitro Binding Assay of
Androgen Receptor in Rat Skeletal Muscle

Masato TAKAHASHI¹⁾, Takashi ARAO²⁾

¹⁾1st Department of Internal Medicine, Toho University
(Director: Yukitaka Miyachi)

²⁾Meiji Physical Fitness Research Institute

It is known that some athletes use androgenic anabolic steroids to promote skeletal muscular strength and muscle hypertrophy in response to muscle strength training. However, it is not defined whether anabolic steroids are effective for muscle hypertrophy. In order to make this question clear, we examined the conditions of a binding assay of cytosolic androgen receptor on rat skeletal muscle as the first step. We used ³H-mibolerone as the ligand for specific binding to the androgen receptor. The following conditions of the assay were examined in this study: the incubation temperature and time, concentration of ³H-mibolerone, the effects of monothioglycerol and triamcinolone acetonide, and the effect of repeated freezing and thawing of the samples on binding. It was a suitable condition for an androgen receptor assay that samples prepared from unfrozen fresh muscle were incubated with 16nM ³H-mibolerone at 4°C for 20hrs, with monothioglycerol (20mM) and triamcinolone acetonide (25 μM) added. Using these assay conditions, we measured the binding capacity of androgen receptor in rat skeletal muscles. The values of K_d and B_{max} in M.gastrocnemius were 3.61 ± 0.60 × 10⁻⁹M and 3.18 ± 2.23fmol/mg protein respectively.

Key words: Skeletal muscle, Androgen receptor, Assay conditions

---

I. 緒 言

近年運動選手の間で、筋肥大を目的とした蛋白同化ステロイドホルモンのドーピングが行われており、罰則規定の強化にもかかわらず、違反者があとをたたないのは周知のことである¹⁾²⁾。骨格筋の肥大や萎縮に対する同ホルモンの関与については、最近いくつかの報告がなされているが、いまだ明らかではない。すなわち、Hickson らはラット骨格筋では代償性肥大を認め³⁾⁴⁾、その肥大した

筋においてはアンドロゲンレセプター (以下 AR) の親和性には変化がないものの、レセプター数が増加したと報告している。一方、山田らは代償性肥大のモデルを使い、テストステロンの関与よりも、筋繊維の肥大に関してはアルブミンが関与し、筋繊維の増殖に関してはヘパリン結合性成長因子が関与していると報告している⁵⁾。Thompson らは培養実験にて、筋肥大に関してはアンドロゲンは二次的な因子であり、むしろ FGF が主要な因子であることを報告している⁶⁾。これらの研究はいずれも代償性肥大、あるいは培養実験を通しての検討であり、スポーツ現場における運動トレーニングに対する適応現象としての筋肥大の機構とは異なる機構が存在している可能性もある。そこで我々は非生理的方法による骨格筋の代償性肥大についてではなく、より生理的な方法である運動トレーニングにより肥大させた骨格筋について、その AR の結合能を測定することにより、骨格筋の肥大に対するアンドロゲンの関与の可能性について検討することを予定している。

これまでの AR の結合能についての報告は、そのほとんどが前立腺についてのものであり、骨格筋についての報告は極めて少ない。骨格筋の AR の測定法については、いまだ必ずしも十分な検討が成されていないのが現状である。したがって、本研究においてはその第一段階として骨格筋における AR の測定条件を確立することを目的とした。従来、AR のレセプターアッセイには R 1881 が用いられてきたが、その後、リガンドとして mibolerone が開発された。R 1881 よりも mibolerone のほうが代謝的にも、化学的にも安定していると言われている⁷⁾。Akimoto ら⁸⁾、三木ら⁹⁾はそれぞれ mibolerone の AR リガンドの有用性について報告しているが、いずれも前立腺における検討である。今回、我々は AR のリガンドとして mibolerone を用い、骨格筋のラジオレセプターアッセイに対する有用性を検討した。また今回、リガンドとして mibolerone を用いたことから、反応時間、反応温度条件についても検討した。さらに前立腺の測定においてレセプター安定化作用を示す monothioglycerol の有効性についてもあわせて検討した。前立腺細胞にはプロゲステロンレセプター (PR) が存在しており、リガンドの AR に対する特異的結合量を測定するためには、PR へのリガンドの結合を阻害する triamcinolone acetonide (TA) の過剰量添加の必要性が指摘されている。筋における PR の存在については明らかではないが、喉頭筋において PR の存在が報告されている¹⁰⁾。そこで本研究においては骨格筋の AR アッセイにおける TA 添加の必要性についても検討した。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物および試料調整

成熟齢 (20~40週齢) の雌 Wistar 系ラットの骨格筋を用いた。本研究では AR アッセイの確立が目的であり、試料として多量の筋組織を必要とすることから、下肢筋に限定せず、屠殺の際にあらゆる骨格筋を採取し、一括してアッセイに用いた。

2. 試薬

1) 標識ステロイド

³H-mibolerone : 7 α , 17 α -dimethyl [17 α -methyl-³H] 19-nortestosterone, 比活性 87 Ci/mmol (NEN, USA)

原液を最初エタノールで100倍希釈し、さらに各濃度に TEMo buffer で連続希釈して調整した。

2) 非標識ステロイド

mibolerone (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) : 1) と同様な方法で希釈した。

3) 緩衝液: TEMo buffer (50mM Tris, 1.5mM EDTA, 10mM sodium molybdate, pH 7.4)

4) monothioglycerol (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)

5) TA: triamcinolone acetone (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA): メタノールで11.5 μ mol/ml に濃度調整し, 4℃にて保存。これを TEMo buffer でさらに100nmol/ml に濃度調整し, 各濃度の³H-mibolerone に添加した。

6) DCC

(デキストラン・チャコール液)

1% charcoal (和光純薬, 大阪) 0.05% Dextran T-70 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden)

3. Cytosol 分画の調整 (Table 1)

ラットをエーテル麻酔下, 氷冷生食で灌流しながら除血を行った後, 速やかに骨格筋を摘出した。組織重量の3倍量の氷冷 TEMo buffer を組織に加え, 解剖用挟にて組織を細切し, その後直ちに氷冷下でポリトロンにてホモジナイズ (スピード8, 30秒, 2回, 60秒の休止期をおく) した。これを4℃下にて, 105,000g×60分遠心した。最上層の脂肪層を除外した後, 上清を cytosol 分画とした。この方法にて採取した試料の蛋白濃度は18~22mg/ml であった。Hickson らの R 1881 をリガンドとして用いた先行研究³⁾ではアッセイに供した蛋白濃度は14~20mg/ml であり, 本研究では先行研究との比較の意味でもこの蛋白濃度でアッセイを行った。以下この cytosol 分画を AR 測定の試料として用いた。

4. 測定方法

RIA 用ポリエチレン試験管に各濃度の非標識リガンド, 標識リガンドをそれぞれ20 μ l ずつ分注し, 25mM monothioglycerol を添加した試料500 μ l を加え, 20時間インキュベーションした。反応終了後に, デキストラン・チャコール法によりリガンドのB/F分離を行い, 上清500 μ l をバイアル瓶に移し, その各々に ACS II 4ml を加え, その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお, 非特異的結合 (NSB) は³H-mibolerone 各濃度の100倍量の非標識 mibolerone で各々インキュベーションした。

5. 反応条件の検討

以下の反応条件について検討した。

①反応温度

インキュベーションの温度を4℃, および25℃ (室温) とし, それぞれの条件下での結合量を比較検討した。

②反応時間および標識リガンド濃度

反応温度4℃での反応時間を2時間より42時間までとし, 各反応時間での結合量を比較検討した。また, 反応温度4℃にて, ³H-mibolerone 1~40nM にて, 結合量を経時的に比較検討した。

③monothioglycerol のレセプター安定化作用

試料中に25mM の monothioglycerol を添加した場合と添加しない場合の³H-mibolerone の各濃度における特異的結合量の比較をした。

④試料凍結の影響

試料凍結によるリガンドのレセプター結合量に対する影響を以下の4条件について比較検討した。

a) 筋を採取した後, 直ちにイソペンタノードライアイス中で凍結した場合

b) 筋採取後, 直ちに cytosol 分画を得た後に凍結した場合

c) a) と b) のいずれの段階においても凍結した場合

d) いずれの段階でも凍結しない場合

⑤TA 添加による特異的結合量への影響

骨格筋においては PR の存在は極めて少ないと言われている。目的で述べたごとく, 骨格筋において TA 添加による ^3H -mibolerone 結合量の変動を検討した。すなわち, TA (終濃度 $25\ \mu\text{M}$) 添加による各濃度の ^3H -mibolerone の特異的結合量に対する影響を検討した。

6. ラット骨格筋における AR 結合能

以上の測定条件に関する検討結果に基づき, 15週齢の Wistar 系雌ラットの M.Gastrocnemius, および M.Plantariss を用い, competitive binding assay を行った。なお, 筋肉量が少ないため前者は2匹の筋で $n=1$ とし, 後者は6匹の筋で $n=1$ とした。Scatchard plot⁽¹²⁾により, 親和定数 (K_d) および最大結合量 ($B_{\max}$) を求めた。

Fig. 1 Effect of incubation temperature on the specific bindings of ^3H -mibolerone.

Samples of cytosol were incubated with ^3H -mibolerone (16nM) for various time at 4°C or 25°C.

III. 結 果

1. 反応温度 (Fig.1)

反応温度25°Cにおけるリガンドのレセプターへの結合量は, 4°C条件下のときの結合量に比べてすべての反応時間において著明に低く, 特に8時間以上においては時間経過とともに結合量の減少が認められた。

2. 反応時間, およびリガンド濃度 (Fig.2)

いずれの反応時間においても ^3H -mibolerone 濃度依存性の結合量の増加が認められた。しかし, 反応時間の経過に伴う結合量は各リガンド濃度により, 特徴ある変化が認められた。すなわち, ^3H -mibolerone 濃度1~2nM においては時間経過とともに結合量が増加し, 飽和状態は認められなかつ

た。一方、4nMの濃度では36時間で最大結合を示し、以後定常状態を呈した。また8~40nMにおいては8~20時間で最大結合に達し、その後40時間までほぼ定常状態であった。ただし、40nMにおいては20時間以降は時間経過とともに著明な結合量の低下を認めた。

Fig. 2 Effect of the concentration of ^3H -mibolerone and incubation time on the specific binding of ^3H -mibolerone

Samples of cytosol were incubated with ^3H -mibolerone for various time at 4°C

Fig. 3 Effect of monothioglycerol on the specific binding of ^3H -mibolerone to the receptors.

Samples of cytosol were incubated with ^3H -mibolerone (16nM) for 20hrs at 4°C absence of monothioglycerol.

3. monothioglycerol のレセプター安定化作用 (Fig.3)

反応温度4℃, 反応時間20時間の条件下において検討した。リガンド濃度20nM までは monothioglycerol による結合量の変化は認めなかった。しかし, 40nM においては monothioglycerol の添加により, 非添加時に比べて20%の結合量の増加が認められた。

4. 試料凍結の影響 (Fig.4)

反応温度4℃, 反応時間20時間の条件において検討した。その結果, 組織採取直後, あるいは Cytosol 分画調整時点で凍結したもの, および, 両時点で凍結したものはいずれも著明な結合量の低下を認めた。

5. ^3H -mibolerone の AR への特異的結合能に対する TA の影響 (Fig.5)

反応温度4℃, 反応時間20時間の条件下にて検討した。その結果, いずれのリガンド濃度においても TA 添加により結合量が減少し, 平均で25%の減少であった。

6. ラット骨格筋における AR 結合能

反応温度4℃, 反応時間20時間, ^3H -mibolerone 16nM を用い, monothioglycerol, および TA を添加し, M.Gastrocnemius, および, M.Plantaris より調整した試料について AR の competitive binding assay を行い, K_d と $B_{\max}$ を求めた。M.Gastrocnemius では $n=3$ で K_d は $3.61 \pm 0.60\text{nM}$ (mean $\pm$ SD), $B_{\max}$ は $3.18 \pm 2.23\text{fmol/mg}$ (mean $\pm$ SD) protein であり, M.Plantaris では $n=1$ で K_d は 3.17nM , $B_{\max}$ は 5.26fmol/mg protein であった (Table 2)。Fig.6に M.Gastrocnemius の Scatchard plot を示した。

Fig. 4 Effect of freezing of the samples on the specific binding

Samples of cytosol were incubated with ^3H -mibolerone (16nM) for 20hrs at 4℃ absence of monothioglycerol.

Fig. 5 Effect of triamcinolone acetonide (TA) on the specific binding of ^3H -mibolerone to androgen receptor in cytosol.

Samples of cytosol were incubated for various at 4°C for 20hrs in the presence or absence of TA.

Fig. 6 Scatchard plot of data

Samples of cytosol were incubated with ^3H -mibolerone (16nM) for 20hrs at 4°C in the presence of monothioglycerol and TA.

Table 1 preparation of cytosol (all procedures were performed at 4°C)

Skeletal muscles were removed
Muscle was minced in 3vol of buffer
Homogenation (Polytron®, speed 8) for 30sec. × 2times
Centrifugation 105,000g × 60min
Supernatant

Table 2 Characteristics of specific binding on androgen receptors of skeletal muscles.

material : wistar female rat (15weeks of age)

	n	K _d	B _{max}
		(nM)	(fmol/mg protein)
M.Gastrocnemius	3	3.61 ± 0.60	3.18 ± 2.23
M.Plantaris	1	3.17	5.26

IV. 考 察

各種細胞におけるステロイドホルモンのレセプターの研究が進められている。その多くがホルモン療法の観点から前立腺など主要標的器官を対象とした研究である。特に前立腺では上記の目的で盛んに AR の結合能に関する研究が行われ、同時に測定法自体の改良についての研究が行われてきた。しかし、AR 測定法に関しては依然として問題点が指摘されており、改良が望まれている。すなわち、アンドロゲンは血清中、組織中に存在する性ホルモン結合蛋白 (SHBG, あるいは TeBG) と大部分が結合し、フリーのアンドロゲンは極めて少量である。このことが AR の測定を困難なものにしてきた。この問題に対し、最近では SHBG に結合しないリガンドとして R 1881 が開発されている。また、Akimoto⁸⁾らや三木ら⁹⁾は、最近開発された mibolerone が SHBG と結合しないこと、mibolerone が前立腺における AR の測定用リガンドとして使用できることを報告している。従来、骨格筋の AR に関する研究においては、前立腺の場合と同様に、そのほとんどが R-1881 をリガンドとして使用してきた。今回、我々は骨格筋の AR 測定用リガンドとして R 1881 よりも代謝的、化学的安定性に優れており⁷⁾、また、R 1881 と比較して PR やグルココルチコイドレセプター (GR) に対し相互作用が弱く、より AR 選択性が強いと言われている⁷⁾mibolerone を

使用した。そしてそれを使用した AR 測定法を確立することを目的とし、各種測定条件について検討した。その上で同測定法を用いてラット骨格筋における AR 結合特性を測定した。

測定条件として、反応温度は前立腺の AR 測定に R 1881 や mibolerone を使用したとき⁸⁾⁹⁾¹²⁾、および、骨格筋で R 1881 を使用したとき³⁾⁴⁾と同様に、骨格筋について mibolerone を使用した時においても、25℃のときと比較して4℃での結合量が多い点で4℃でアッセイをすることが望ましいことが確認された。従来よりアンドロゲンレセプターは高温により変性しやすいことが指摘されている¹⁴⁾。本研究でも25℃のときに著しく結合量が減少した。その原因としては、従来報告されているレセプター自体の変性のほか、dissociation の亢進が生じることも推察される。したがって、骨格筋の AR の測定においては、前立腺の場合と同様に反応時の厳密な温度管理が必要と思われる。

結合量はリガンド濃度に依存して増加するが、³H-mibolerone 40nM では20時間以降急激な結合量の減少が生じることから、この濃度は測定条件として不適と考えられた。このように高濃度を用いた場合には、時間経過とともに dissociation が亢進することが考えられる。8~20nM の³H-mibolerone 濃度においては20時間で最大結合量に達した後、各濃度とも定常状態を維持しており、測定条件としては妥当なリガンド濃度と考えられる。したがって、結合量、およびその安定性から、その測定条件としてはリガンド濃度16nM、反応時間20時間が適当と思われる。

以上より、反応条件としては反応温度4℃、反応時間20時間、³H-Mibolerone 濃度16nM でインキュベーションすることが望ましい。この結果は Hickson らが骨格筋の AR 測定にリガンドとして R 1881 を用いた場合³⁾⁴⁾とはほぼ同様な測定条件であった。

Hickson ら³⁾⁴⁾はリガンドに³H-R 1881を用いて骨格筋の AR アッセイを行った際に monothioglycerol を添加している。本研究では monothioglycerol の AR 安定化作用は明らかではなかった。しかし、前立腺 AR アッセイにおける AR 不安定化の原因としては蛋白分解酵素などの作用が報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。本研究のように、リガンドに³H-mibolerone を用いた骨格筋の AR アッセイにおいて、反応時間の延長や反応温度の変更をするような場合は monothioglycerol の添加が必要と思われる。

R 1881 は AR のみならず、PR と結合することが報告¹²⁾¹⁵⁾されており、mibolerone についても同様な結果が報告⁸⁾⁹⁾されている。したがって、PR が存在する前立腺組織中の AR 測定においては、mibolerone と PR の結合を阻害して、mibolerone の AR への特異的な結合を高める目的で TA の添加を行っている。骨格筋における PR の存在については必ずしも明らかではないが、喉頭筋において PR の存在を組織化学的方法で証明した報告¹⁰⁾がある。本研究においては、TA 添加にて25%程度の結合量の低下が認められた。このことは骨格筋組織中に PR が存在する可能性を示唆するものであり、骨格筋の AR 測定に関しては TA を添加することが必要ものと思われる。

一方、Danhaive らは R 1881 が GR と結合すると報告している¹⁶⁾が、Liao らは mibolerone は GR との相互作用が R 1881 と比べて相互作用が極めて弱いと述べている⁷⁾。GR が存在すると言われている骨格筋における AR アッセイには、リガンドとして R 1881 と比較して mibolerone がレセプター特異性ですぐれているものと思われる。

また、本研究において、試料の凍結・融解により結合量の著しい減少がみられることが明らかとなった。組織のステロイドレセプターに対する凍結・融解の影響について MacLusky らは脳と下垂体組織を用いて検討しており¹⁷⁾、両組織とも凍結・融解による K_dに対する有意な影響は認められないが、B_{max}に対しては低下が認められたとしている。したがって、骨格筋と脳・下垂体組織と

の違いはあるものの、このような凍結・融解による $B_{\max}$ に対する影響の原因としては、凍結・融解によりレセプター自体に崩壊が生じ、その結果としてレセプター数が減少することが推察される。

以上をまとめると、miboleron を用いたラット骨格筋における AR 測定の反応条件としては、反応温度 4°C 、反応時間 20 時間、 ^3H -miboleron 濃度 16nM とし、さらに miboleron の PR への結合を阻害するために TA を添加することとした。また、レセプター安定化の目的で monothioglycerol の添加を必要に応じて行うこととした。

本研究で開発した前記内容の AR 測定法により求めたラット M.Gastrocnemius における AR の結合特性をしめす K_d は $3.61 \times 10^{-9}\text{M}$ であり、今までに報告¹⁰⁾¹¹⁾された前立腺における値に比べて高値であった。したがって、M.Gastrocnemius など骨格筋における AR のアンドロゲンに対する親和性は前立腺におけるそれよりも低いことが示唆される。また本研究における M.Gastrocnemius の結合特性を示す $B_{\max}$ は $3.18\text{fmol/mg protein}$ であり、この値は先行研究で報告された前立腺の値に比べて低値であった。したがって、M.Gastrocnemius など骨格筋は前立腺に比較してレセプター数が少ないことが示唆された。

V. 結 語

リガンドとして miboleron を用いたラット骨格筋のアンドロゲンレセプターの測定法に関する検討を行った。

- 1) 反応条件として反応温度 4°C 、反応時間 20 時間が望ましい。
- 2) リガンドとして用いる ^3H -miboleron 濃度は 16nM が適当である。
- 3) 骨格筋 AR に対する monothioglycerol の明らかな AR 安定化作用は認められなかった。
- 4) TA 添加により結合量が減少し、骨格筋の AR 測定に対する PR の影響が認められた。したがって、骨格筋の AR 測定においては TA を添加することが望ましい。
- 5) 以上の測定条件により求めた骨格筋の AR の結合能を示す K_d および $B_{\max}$ はそれぞれ 3.61nM 、 $3.18\text{fmol/mg protein}$ であった。

謝辞：本研究についてご指導いただきました東邦大学医学部附属佐倉病院内科教授入江実先生、同医学部第一内科教授の宮地幸隆先生に深謝いたします。また、ご指導、ご協力いただきました(財)明治生命厚生事業団(矢幡隆理理事長)、および同体力医学研究所(江橋博所長)の研究員、職員の皆様に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 黒田善雄：国際オリンピック委員会のドーピング行為に対する反応と方策. 臨床スポーツ医学 1990; 7: 645-653
- 2) 服部光男, 伊東静夫：JOC スポーツ科学委員会の指導・対策. 臨床スポーツ医学 1990; 7: 655-660
- 3) Hickson RC, Galassi TM, Kurowski TT, Daniels DG and Chatterton RT: Skeletal muscle cytosol [^3H]Methyltrienolone receptor binding and serum androgens: effects of hypertrophy and hormonal state. J steroid Biochem 1983; 19: 1705-1712
- 4) Hickson RC, Kurowski TT, Galassi TM and Daniels DG: Androgen cytosol binding

- during compensatory overloaded-induced skeletal muscle hypertrophy. *Can J Biochem Cell Biol* 1985; 63: 348-354
- 5) Yamada S, Buffinger N, Dimario J and Storohman RC: Fibroblast growth factor is stored in fiber extracellular matrix and plays a role in regulating muscle hypertrophy. *Med Sci Sports Exerc.* 1989; 21: 173-180
  - 6) Thompson SH, Boxhorn LK, Kong W and Allen RE: Trenbolone Alters the Responsiveness of Skeletal Muscle Satellite Cells to Fibroblast Growth Factor and Insulin-like Growth Factor I. *Endocrinology* 1989; 124: 2110-2117
  - 7) Schilling K and Liao S: The Use of Radioactive 7α , 17α -Dimethyl-19-Nortestosterone (Mibolerone) in the Assay of Androgen Receptors. *Prostate* 1984; 5: 581-588
  - 8) Akimoto S, Fuse H, Sato R, Zama S and Shimazaki J: Binding of mibolerone to androgen receptor of benign hypertrophic human prostate. Comparison with R1881. *Endocrinol Japon* 1985; 32: 141-152
  - 9) 三木仁司, 大下和司, 井上洋行, 須見高尚, 山下恭司, 森本忠興, 門田康正: ヒト前立腺組織を用いた androgen receptor 測定用リガンド, mibolerone と R1881 の比較検討. *日内会誌* 1988; 64: 655-665
  - 10) Paul JS, Walter ES and Sar M: The distribution of progesterone receptor in the 20-day-old fetal muscle: An autoradiographic study with [^{125} I]progesterin*. *Endocrinol* 1988; 123: 2382-2389
  - 11) Scatchard G: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann N.Y. Acad Sci* 1949; 51: 660-672
  - 12) 児玉孝臣, 島崎 淳: ヒト前立腺のアンドロジェン結合蛋白. *ホと臨* 1985; 33: 1017-1021
  - 13) 中原 満, 宮地幸隆: アンドロジェン・レセプターの精製と精製アンドロジェン・レセプターの性状. *ホと臨* 1985; 33: 1003-1009
  - 14) 島崎 淳, 小玉孝臣, 赤倉功一郎: 生殖内分泌学の進歩, アンドロジェン受容体. *日本臨床* 1987; 45: 2630-2637
  - 15) 日影高志: 前立腺疾患のアンドロゲンレセプター. *千葉医学* 1982; 58: 297-308
  - 16) Danhaive PA and Rousseau GG: Binding of glucocorticoid antagonists to androgen and glucocorticoid hormone receptors in rat skeletal muscle. *J steroid Biochem* 1986; 24: 481-487
  - 17) MacLusky NJ, Roy EJ, Shanabrough M and Eisennfeld AJ: Preservation of steroid receptors in frozen brain and pituitary tissue: use of the cryoprotective agent, dimethylsulfoxide. *J Neurosci* 1986; 16: 131-140
- (受付日: '92. 8. 3)
(採択日: '92.11.30)