薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
117 (10-11) 681-689 (1997)

脳内ステロイドホルモンの分析

島田和武

金沢大学薬学部, 〒920 金沢市宝町 13-1

Analysis of Neurosteroids

Kazutake SHIMADA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University,
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920, Japan

(Received June 30, 1997)

The term neurosteroids applies to those steroids that are both synthesized in the nervous system, either *de novo* from cholesterol or from steroid hormone precursors, and that accumulate in the nervous system to levels that are at least in part independent of steroidogenic gland secretion rates. Neurosteroids consist of 17- or 20-oxosteroids and accumulate in the brain as unconjugated form and their sulfates, fatty acid esters and sulfolipids.

The characterization and determination of neurosteroids including conjugates in the brain are summarized in this review. For example, the separation and characterization of 3-fatty acid esters (stearate, palmitate) of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the rat brain are carried out using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (LC/APCI-MS) operating in the positive-ion mode. The fatty acid esters obtained from the rat brain were derivatized with *O*-methylhydroxylamine to give the respective methyloximes, which were identified in comparison with their chromatographic behavior with authentic samples during LC/APCI-MS. The function of the steroids are also briefly described.

Key words—brain; neurosteroid; oxosteroid; conjugate; analysis; LC/MS

1. はじめに

21世紀は脳科学の時代 (century of the brain) だと言われている。すなわち、人類最後のターゲットであるヒト脳への挑戦が日米を中心に宣言され、日本では脳を「知る」、「守る」、「創る」を3本の柱とする国家的プロジェクトが発足するなど脳への関心は高い。このプロジェクトはアルツハイマー病や治療の難しい脳疾患の克服を始め、人工知能の開発などを通して、高齢化社会に対応した社会福祉や、より高度なコンピューター社会の実現を目的としている。^{1,2)}

生物の持つ情報システムのなかで、遺伝情報は1960年代に、免疫情報は1970年代に、その大枠が分子レベルで理解されるに至った。しかし、「我思う、ゆえに我あり」の境地からなる物心二元論に代表される心の世界は未知のままである。「脳は分子でどれだけわかるか」は、近代科学主義の限界に迫るものであり、ヒトの行動のすべてが化学物質との相関で説明されるのか否か、興味ある課題である。

脳の研究はあらゆる面から行われている。アルツハイマー型老年痴呆の研究を例としても、

臨床面や病理学的見地からの研究はもちろん,^{3,4)} 神経伝達物質や、この病気に特異的なアミロイドタンパクの構造研究,⁵⁾ モデル動物に関するもの⁶⁾ など多岐にわたる。しかし、治療法あるいは治療薬を含めて、すべてが「これから」である。以上の知見を踏まえ、本総説は数多くある脳内の化学物質の中からステロイドを取り上げ、特に分析化学の見地から研究の動向を探ってみたい。

2. 脳内の化学物質

脳は脂質含有量が非常に高く、組織の水分（灰白質で約 80%，白質で約 70%）を除いた固形成分の約 50% に達する。ちなみに、他の臓器では 20% 程度である。脳を化学的に分析していくと、最終的には種々の核酸、ペプチド、タンパク、アミノ酸、ステロイドやプロスタグランジンを含む脂質、炭水化物、無機物などに分かれてゆく。これらのなかには構造物質としてではなく、ニューロン間の情報を運ぶ化学物質、すなわち神経伝達物質として重要な役割を果たしているものも多い。またプロスタグランジンのように、睡眠との関係が示唆されているものもある。²⁾ モノアミン系、コリン系、アミノ酸系など多くの神経伝達物質に関して膨大な研究がなされ、脳科学研究の一つの主役をなしているが、この点については他の解説,⁷⁾ 著書⁸⁾ に譲り、D-アミノ酸に着目した研究⁹⁾ を簡単に紹介するにとどめたい。

Imai らは、4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole を用いる高感度化学発光検出 HPLC によるアミノ酸の分析法を確立し、それを基にラット脳松果体内の検索を行ったところ、D-Asp が L-体より高濃度で存在することが明らかとなった。生体内のアミノ酸は L 型と考えられていたが、D 型アミノ酸が発見されたこと、さらに加齢との関係やアルツハイマー病患者脳灰白質の β -アミロイドタンパク中におけるこれらの存在など、注目すべき知見が蓄積されつつあり、今後の発展が期待される。¹⁰⁾ なお、この研究に関しては今井により本特集号に詳述されているので参照して戴きたい。

3. 脳内ステロイドホルモン

3.1. ステロイドとその分析法について コレステロール (cholesterol)、胆汁酸 (bile acid) に代表されるステロイドは複雑な化学構造を有する有機化合物であり、広く生物界に分布している。ステロイドの化学的研究は前世紀から行われているが、本格的に取り上げられたのは今世紀の初めからである。1903 年に始まる Windaus 一門の cholesterol, 1912 年以來の Wieland 一派の bile acid の研究を中心に、多くの化学者の努力によって 1932 年の後半に至ってその化学構造が確定されることとなった。17 位側鎖の種類及び核間メチル基の有無によって基本構造は gonane (C₁₇), estrane (C₁₈), androstane (C₁₉), pregnane (C₂₁), cholane (C₂₄) などに分類される (Fig. 1)。しかし、一般的には女性ホルモン [エストロゲン (estrogen) など], 男性ホルモン (androgen), 副腎皮質ホルモン [鉱質コルチコイド (mineralocorticoids), 糖質コルチコイド (glucocorticoids)], bile acid などの作用別に分類されることが多く、これらの他、強心性ステロイドやビタミン D など強い生理作用を発現するものが多い。^{11, 12)}

Fig. 1. Structures of Steroids

ステロイドの分析法には種々のものが知られているが、大別すると HPLC, GC に代表されるクロマトグラフィーと RIA, EIA に代表される結合タンパクを用いる分析法になる。前者に属し GC/MS, LC/MS に代表される hyphenated technique は、その情報量の豊富さと信頼性に優れた分析法である。GC/MS は既に完成されたものであるのに対し、LC/MS もいよいよ実用化の時代に入り、特に優れたイオン化法の開発は高極性化合物、高分子化合物の分析を可能にした。例えば、従来の脳内ステロイドホルモン、特に高極性あるいは不揮発性な抱合体の同定、定量は加水分解などの脱抱合処理前後における遊離型ステロイド量の差異を GC/MS や RIA により求める間接的手法によるものであったが、LC/MS では抱合体のままでこれらが可能であり、有意義な知見が得られている (3.2, 3.4. 参照)。一方、結合タンパクを用いる分析法は優れた抗体などの結合タンパクが得られるか否かが分析法の良否を決める。抱合体に対する抗体の調製も行われているが、脳内ステロイドホルモンの分析へ適用された例は見られない。

なお、生体内ステロイド分析法の詳細に関しては総説,¹³⁾ 成書¹²⁾ を参照して戴きたい。

3.2. 脳内ステロイドホルモン発見の経緯 脳の機能とステロイドとの関係は 1941, 1942 年になされた Selye の、ある種のステロイドが麻酔作用を有するとの報告に遡る。^{14, 15)} ステロイドは、その脂溶性の故に blood-brain barrier も通過して、神経細胞の機能に影響を与えると考えられ、行動、ストレスへの適応、性的衝動などの重要な調節因子としての可能性が示唆されるに至った。しかし、それがより具体的になったのは、1980 年代初期の Corpéchet ら、^{16, 17)} ついで Robel と Baulieu¹⁸⁾ によるラット脳内におけるステロイドホルモン、すなわち GC/MS 及び RIA を駆使した pregnenolone, dehydroepiandrosterone 及びそれらの硫酸エステル (sulfate) の同定、定量に始まる一連の研究であり、これらは neurosteroids と命名された。なお、脳内においてホルモンとして作用しているか否か、その作用が脳内に限局されるか否かは別として、ここでは伝統に従い脳内ステロイドホルモン、すなわち neurosteroids の呼称を使用する。この研究に引き続き、Jo らはラット脳内には脂肪酸エステル (fatty acid ester) も含まれていることを RIA により明らかにしている。¹⁹⁾ これらの定量値を Table 1 に示したが、いずれも脳内に高濃度 (末梢血中の 10 倍以上) で存在し、しかもステロイドホルモン産生臓器である副腎や性腺とは無関係な局所で、cholesterol から生合成される。さらに Mathur らは、ラットその他、ウサギ、イヌの脳について検索し、上記のステロイド (3β -hydroxy-5-ene 体) に加えて、これらの還元体

Fig. 2. Structures of Neurosteroids

Table 1. Studies on Neurosteroids

Year	Authors	Species	Neurosteroids (ng/g tissue)	Methods
1981	Corpéchet <i>et al.</i> ¹⁶⁾	Rat	D ^{a)} [0.42±0.10 ^{b)} (anterior brain), 0.12±0.03 (posterior brain)] DS [1.58±0.14 (anterior brain), 4.89±1.06 (posterior brain)]	RIA, GC/MS
1983	Corpéchet <i>et al.</i> ¹⁷⁾	Rat	P [38.4±6.9 (anterior brain), 22.1±2.9 (posterior brain)] PS [15.8±3.0 (anterior brain), 5.7±2.1 (posterior brain)]	RIA, GC/MS
1985	Robel, Baulieu ¹⁸⁾	Rat	D [0.4±0.1 (anterior brain), 0.1±0.0 (posterior brain)] DS [1.6±0.2 (anterior brain), 4.9±1.1 (posterior brain)] P [38.4±6.9 (anterior brain), 22.1±2.9 (posterior brain)] PS [15.8±3.1 (anterior brain), 5.7±2.2 (posterior brain)]	RIA, GC/MS
1989	Jo <i>et al.</i> ¹⁹⁾	Rat	P (25±8) PS (19±6), DS (2.1±0.5) PL (46±14), DL (36±17)	RIA

a) D, dehydroepiandrosterone; P, pregnenolone; S, sulfate; L, lipoidal. b) mean±S. D.

Table 2. Levels of Steroids Found in Adult Male Brains²⁰⁾

Species	Nature	P ^{a)}	3β-AP	3α-AP	D	EpiA
Rat	FS ^{b)}	65 ± 15 ^{c)}	2.5±0.5	3 ± 1.5	12 ± 4	2.5±1
	S	21 ± 5	0	ND	4 ± 2	2.7±0.5
	L	3 ± 1	0	ND	7 ± 3	0.5±0.1
	SL	100 ± 20	<0.5	ND	20 ± 3	2.0±0.5
	Total	189 ± 41	2.7±0.5	3 ± 1.5	43 ± 12	7.7±2.1
Rabbit	FS	55 ± 15	10 ± 3	ND	5 ± 1	5 ± 2
	S	25 ± 8	0	ND	14 ± 5	0
	L	16 ± 3	0	ND	10 ± 2	4 ± 2
	SL	100 ± 15	Trace	ND	15 ± 3	1 ± 0.4
	Total	196 ± 41	10 ± 3	ND	44 ± 11	10 ± 4.4
Dog	FS	29 ± 8	1.2±0.3	6.5±1	5.5± 1	4.6±0.5
	S	22 ± 3.5	0	ND	1.6± 0.4	4 ± 0.6
	L	5.5± 1.5	0	ND	0	2.5±0.5
	SL	17 ± 4	0	10.5±2	3.2± 0.4	2.4±0.3
	Total	73.5±17	1.2±0.3	17 ± 3	10.3± 2	13.5±2

a) P, pregnenolone; 3β-AP, 3β-hydroxy-5α-pregnan-20-one; 3α-AP, 3α-hydroxy-5α-pregnan-20-one; D, dehydroepiandrosterone; EpiA, epiandrosterone. b) FS, free steroids; S, sulfate; L, lipoidal; SL, sulfolipid. c) method, GC/MS; ng/g wet weight; mean±S. D.; ND, not determined.

Table 3. Ratio of Mean Steroid Concentrations in Five Cerebral Regions for Each of Ten Subjects (nmol/kg of Tissue)/Mean Plasma Concentration (nmol/l)²¹⁾

Steroid	Subjects no.										Ratio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mean±S. D.
Progesterone	7.3 ^{a)}	2.8	7	10.9	3.3	2.38	9.7	14.28	6.9	8.5	7.3± 3.8
Androst-4-ene-3,17-dione	1.26	1.58	1.47	1.9	2.4	0.3	18.7	11	8.2	2.0	4.9± 5.9
Pregnenolone	76.2	37.6	34.2	269	17	23	—	—	56.9	79	74 ± 82
Dehydroepiandrosterone	4.3	15	4.1	10.7	4.8	1.2	—	—	8.5	4.1	6.5± 4.4
17α-Hydroxyprogesterone	5.7	1.13	2.9	18.6	3.6	—	26.6	11	6.6	6.6	9.2± 8.3

a) method, RIA; —, not determined.

(5 α 体; 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, epiandrosterone) 及び新しく硫脂質 (sulfolipid) との抱合体の存在を GC/MS により明らかとした (Table 2).²⁰⁾ 一方, ヒト脳内における検索も行われ, 5 種のステロイドの存在が RIA により解明された. これらの中には各種動物の neurosteroids とは異なる 4-en-3-one 構造を有するものも見られる (Table 3).²¹⁾ いずれにしても, neurosteroids のゲニン部は androstane, pregnane 系の比較的簡単な構造を有する 17-あるいは 20-オキソステロイドからなるもので, それを一括して Fig. 2 に示した.

以上の研究のなかで抱合体については, sulfate, fatty acid ester 及び sulfolipid とのそれが知られているが, 構造に関しては明らかでない点が多い. これは, 先に記したようにその同定, 定量が脱抱合処理前後の遊離型ステロイドの GC/MS 又は RIA による測定値の差異に基づいているためと考えられる. すなわち, 脱抱合反応 (加水分解など) に伴う抱合形式, 部位に関する情報の喪失や反応率など多くの問題が生じてくる. ヒトにおけるステロイド脂肪酸エステルについての総説を引用しておくが, 分析法との関連からも参照して戴きたい.²²⁾

Neurosteroids の概念が確立する前後に, 脳内における catecholestrogen の存在が示唆され多大の注目を集めたが,²³⁾ その後十分な報告がなくその存在を疑問視する声もある.

3.3. 脳内ステロイドホルモンの生合成, 代謝と生理的意義 Neurosteroids の生合成は, 先に記したように脳内において cholesterol を前駆物質とし, 他のステロイドと同様のプロセスで進行するが, 関与するほとんどの酵素の存在が明らかとされている. *In vitro*²⁴⁾ や抱合に関与する酵素²⁵⁾ を含めて多くの研究がなされているが, これらは総説を参照して戴きたい.²⁶⁻³⁰⁾

Neurosteroids の生理的意義には多大な関心が寄せられ, 多くの研究がなされている. 例えば, 1984 年に Carrette と Poulain はモルモット septo-preoptic area のニューロンにイオン導入法などで dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone 3-sulfate 又は pregnenolone 3-sulfate を投与すると, 活動電位が増し, 興奮性の効果が認められたと報告している.³¹⁾ 1986 年からの一連の研究で Majewska とそのグループは, pregnenolone 3-sulfate が GABA_A 受容体機能と拮抗する作用を有し, barbiturate により麻酔されたラットの睡眠時間を短縮する事実を見出した.³²⁻³⁵⁾ なお, 前者の作用は dehydroepiandrosterone 3-sulfate でも観察されている.³⁶⁾ また, 学習, 記憶に深く関係する *N*-methyl-D-aspartate 受容体と pregnenolone 3-sulfate との関係 (allosteric modulator としての作用など) や,³⁷⁻³⁹⁾ pregnenolone とマウスの記憶増進との関係に関する報告もある.⁴⁰⁾

このように neurosteroids は精神活動と深く関係していると思われるものの, 加齢との関係を含めて未知の分野が多い. このことに関しては上記の総説²⁶⁻²⁹⁾ や特集⁴¹⁾ に詳細に記載されていることを付け加えておく.

3.4. 脳内ステロイドホルモンに関する新たな研究 先に述べたように neurosteroids の同定, 定量は遊離型 neurosteroids を測定対象とした GC/MS や RIA により行われている. これらの測定法は汎用性に欠ける点が見られる上に, 測定対象を遊離型 neurosteroids に限局すると抱合体に関する情報が不正確になる欠点を有している.

我々は neurosteroids のより簡便な分析法の開発を目指し, まず遊離型 neurosteroids の HPLC による汎用性の高い定量法の開発を企てた. Neurosteroids は末梢血中のそれより遙かに高濃度で存在するとされているが, ng/g tissue オーダーの超微量であり, しかもそれ自身顕著な UV 吸収を有していないものがほとんどである. そこで, 蛍光誘導体化法を導入することとした (Fig. 3).^{42, 43)} Neurosteroids はオキソステロイドであると共に, 反応性に富む equatorial 性の 3 β 水酸基を有するものが多い. したがって, この 2 つの官能基に着目し, 誘導体化試薬 4-

Fig. 3. Fluorometric Derivatization of Neurosteroid (Pregnenolone) with DBDH or 1-Anthroyl Cyanide

Table 4. Pregnenolone in Rat Brain⁴⁵⁾

Entry	Concentration (ng/g tissue)					Strain
	1	2	3	4	5	
1 ^{a)}	10.5 ^{c)}	<1	<1	nd	nd	(Wistar strain)
2 ^{b)}	13.1	5.5	<1	<1	<1	(Wistar strain)
3 ^{a)}	22.2	<1	nd	nd	nd	(Sprague-Dawley strain)

a) after 1 h light exposure. b) after 10 h light exposure. c) method, FL/HPLC; nd, not detectable.

(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBDH) と 1-anthroyl cyanide とを各々選択した。まず、遊離型 neurosteroids の存否であるが、ラット脳を用い、蛍光誘導体化後 HPLC で分取を繰り返して検索したところ、pregnenolone, dehydroepiandrosterone が確認された。⁴⁴⁾ 次いで、1-anthroyl cyanide を用いてラット脳内における pregnenolone の蛍光検出 HPLC (FL/HPLC) による定量法を開発した。⁴⁵⁾ 開発した方法は前処理が煩雑であり、改善の余地は大いにあるが、注目すべきは実試料への適用結果である。それによると、文献値と符合するものもある一方で、多くのラット脳のそれはかなり低い値を示し、検出されないものも見られた (Table 4)。ラットの種差や光照射時間の問題についても検討したが、特に影響は見られなかった。脳内にステロイドがあることは確実であるが、末梢血中の 10 倍近く存在するのが neurosteroids であり、大きな疑問が生じてきた。分析手段の違いにより、このように大きく違う結果が得られたことは、以前脳内における catecholesterogen の検索を行った際にも経験した。すなわち、放射性同位元素でラベルした補酵素 (*S*-adenosyl-L-methionine) と catechol *O*-methyltransferase を用いる酵素反応の組み合わせ

Fig. 4. Structures of Neurosteroid 3-Fatty Acid Esters

Fig. 5. APCI-MS Spectrum of Pregnenolone 3-Stearate Methyloxime

せ (radioenzymatic assay) による研究報告を基に,²³⁾ 電気化学検出 HPLC で追試したが, そのような高濃度では検出されなかった. これらの原因については, 今後の研究課題となるが neurosteroid 研究の鍵を握る知見と考えている.

これとは別に, neurosteroids 抱合体の検索を行ったところ, pregnenolone, dehydroepiandrosterone の 3-fatty acid esters (stearate, palmitate) の存在が明らかとなった (Fig. 4). 従来から, neurosteroids の fatty acid ester が存在することは知られていたが, いずれも加水分解を伴う間接的証明のため化合物を特定するまでには至っていなかった. 研究は抱合体標品との直接比較により行い, 当初 FL/HPLC を用いたが,⁴⁶⁾ その後導入した LC/MS での同定が有効であった.⁴⁷⁾ 本物質は各種イオン化法 [atmospheric pressure chemical ionization (APCI), electrospray ionization] を駆使しても, 脱エステル化したピークしか与えなかったが, メチルオキシム化することで APCI (positive-ion mode) において擬分子イオンピークが観察され, 脂肪酸部に関する十分な知見が得られた (Fig. 5). LC/MS が高極性化合物の分析ばかりでなく, このような低極性で不揮発性化合物のそれにも誘導体化などの工夫により威力を発揮することが判明した. 現在, これら fatty acid ester の定量を同位体希釈 LC/MS により検討中であるが, 存在部位と存在量との関係解明が待たれる. 例えば, これ自体は構造物質に過ぎないとしても, 遊離型との相関を考慮すると, 貯蔵型として何かの役割を果たしているとも考えられる.⁴⁸⁾

その他, LC/MS により pregnenolone 3-sulfate のラット脳内における存否にも検索を加えたが, このことに関しては機会を改めて報告したい.

4. おわりに

以上我々の研究を含めて neurosteroids について紹介してきたが, 研究の糸口が見い出された程度のものであり, すべてはこれからである.

現在, 神経伝達機能改善薬, 神経ペプチド系薬, 神経細胞安定化作用薬など抗痴呆薬の開発が積極的に行われているが, ステロイドに関するものは見られない. しかし, アルツハイマー型老年痴呆に女性ホルモンが有効であるとの疫学的調査報告や,⁴⁹⁾ GABA_A 受容体との作用を

志向した neurosteroids アナログの合成も積極的に行われており今後に期待したい。⁵⁰⁾ ところで、すべての科学は「何が」、「どこに」、「どれだけ」が正確に分かって、始めて「なぜ」の解明が可能である。こうして考えると、分析化学の役割は本研究に限らず極めて重要であり、今後の益々の発展を祈念したい。

なお最後に、既に引用した以外の neurosteroids に関する総説を付け加えておく。^{51, 52)}

謝辞 著者らの研究は現星薬科大学学長南原利夫先生により始められた生体内ステロイドの分析化学的研究の流れを汲み、文部省科学研究費 [基盤研究 (B)] の助成に基づいている。ここに謝意を表する。

引用文献

- 1) 学術審議会特定研究領域推進分科会バイオサイエンス部会, 学術月報, **49**, 1212 (1996).
- 2) “睡眠,” ファルマシア, **33**, 1997, pp. 227—272.
- 3) Iqbal K., “Alzheimer’s Disease; Biology, Diagnosis and Therapeutics,” Wiley UK, GBR, 1997.
- 4) “脳の臨床,” 総合臨床, **46**, 永井書店, 東京, 1997, pp. 9—149.
- 5) 瀧尾擴士, ファルマシア, **31**, 482 (1995).
- 6) 瓦林 毅, “アルツハイマー病の動物モデル,” *Geriat. Med.*, **35**, ライフ・サイエンス, 東京, 1997, pp. 69—74.
- 7) “化学者のための脳の読み方,” 化学, **50**, 化学同人, 東京, 1995, pp. 25—37.
- 8) 川合述史, “分子から見た脳,” 講談社, 東京, 1994.
- 9) 今井一洋, ファルマシア, **32**, 1214 (1996).
- 10) Imai K., Fukushima T., Hagiwara K., Santa T., *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 106 (1995).
- 11) Fieser L. F., Fieser M., “Steroids,” Reinhold Publishing Co., New York, 1959.
- 12) Makin H.L.J., Gower D. B., Kirk D. N., “Steroid Analysis,” Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, 1995.
- 13) “合成ステロイドホルモン,” 日本臨牀, **52**, 日本臨牀社, 東京, 1994, pp. 642—678.
- 14) Selye H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **46**, 116 (1941).
- 15) Selye H., *Endocrinology*, **30**, 437 (1942).
- 16) Corpéchet C., Robel P., Axelson M., Sjövall J., Baulieu E.-E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 4704 (1981).
- 17) Corpéchet C., Synguelakis M., Talha S., Axelson M., Sjövall J., Vihko R., Baulieu E.-E., Robel P., *Brain Res.*, **270**, 119 (1983).
- 18) Robel P., Baulieu E.-E., *Neurochem. Int.*, **7**, 953 (1985).
- 19) Jo Do-H., Abdallah M. A., Young J., Baulieu E.-E., Robel P., *Steroids*, **54**, 287 (1989).
- 20) Mathur C., Prasad V.V.K., Raju V. S., Welch M., Lieberman S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 85 (1993). [転載]
- 21) Lacroix C., Fiet J., Benais J.-P., Gueux B., Bonete R., Villette J.-M., Gourmel B., Dreux C., *J. Steroid Biochem.*, **28**, 317 (1987). [転載]
- 22) Hochberg R. B., Pahuja S. L., Zielinski J. E., Lerner J. M., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 577 (1991).

- 23) Ball P., Knuppen R., "Catecholoestrogens," *Acta Endocrinol.* (Copenhagen), Sup. **232**, 1980, pp. 89—90.
- 24) Akwa Y., Morfin R. F., Robel P., Baulieu E.-E., *Biochem. J.*, **288**, 959 (1992).
- 25) Vourc'h C., Eychenne B., Jo Do-H., Raulin J., Lapous D., Baulieu E.-E., Robel P., *Steroids*, **57**, 210 (1992).
- 26) Baulieu E.-E., Robel P., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **37**, 395 (1990).
- 27) Akwa Y., Young J., Kabbadj K., Sancho M. J., Zucman D., Vourc'h C., Jung-Testas I., Hu Z. Y., Goascogne C. Le, Jo Do-H., Corpéchet C., Simon P., Baulieu E.-E., Robel P., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 71 (1991).
- 28) Robel P., Akwa Y., Corpéchet C., Hu Z.-Yi, Jung-Testas I., Kabbadj K., Goascogne C. Le, Morfin R., Vourc'h C., Young J., Baulieu E.-E., "Brain Endocrinology," ed. by Motta M., Raven Press, New York, 1991, pp. 105—132.
- 29) Robel P., Baulieu E.-E., *Trends Endocrinol. Metab.*, **5**, 1 (1994).
- 30) Negri-Cesi P., Poletti A., Celotti F., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **58**, 455 (1996).
- 31) Carette B., Poulain P., *Neurosci. Lett.*, **45**, 205 (1984).
- 32) Majewska M. D., Harrison N. L., Schwartz R. D., Barker J. L., Paul S. M., *Science*, **232**, 1004 (1986).
- 33) Majewska M. D., Mienville J.-M., Vicini S., *Neurosci. Lett.*, **90**, 279 (1988).
- 34) Mienville J.-M., Vicini S., *Brain Res.*, **489**, 190 (1989).
- 35) Majewska M. D., Bluet-Pajot M.-T., Robel P., Baulieu E.-E., *Pharm. Biochem. Behav.*, **33**, 701 (1989).
- 36) Dermirgören S., Majewska M. D., Spivak C. E., London E. D., *Neuroscience*, **45**, 127 (1991).
- 37) Wu F.-S., Gibbs T. T., Farb D. H., *Molec. Pharmacol.*, **40**, 333 (1991).
- 38) Irwin R. P., Maragakis N. J., Rogawski M. A., Purdy R. H., Farb D. H., Paul S. M., *Neurosci. Lett.*, **141**, 30 (1992).
- 39) Rebas E., Lachowicz A., Lachowicz L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 606 (1995).
- 40) Flood J. F., Morley J. E., Roberts E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 1567 (1992).
- 41) "Steroids in the Brain," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **49**, 1994, pp. 373—427.
- 42) Shimada K., Satoh Y., Nishimura S., *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 713 (1995).
- 43) Shimada K., Nishimura S., *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 1691 (1995).
- 44) Shimada K., Nakagi T., Yoshizawa M., Ueda T., *Anal. Sci.*, **11**, 445 (1995).
- 45) Shimada K., Nakagi T., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Techno.*, **19**, 2593 (1996).
- 46) Shimada K., Fukuda N., Nakagi T., *J. Chromatogr. Sci.*, **35**, 71 (1997).
- 47) Shimada K., Mukai Y., Nakajima A., Naka Y., *Anal. Commun.*, **34**, 145 (1997).
- 48) Provost P. R., Lavalley B., Belanger A., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 182 (1997).
- 49) 鍋島俊隆, "抗痴呆薬の今後," 総合臨床, **46**, 永井書店, 東京, 1997, pp. 195—196.
- 50) Upasani R. B., Yang K. C., Acosta-Burrue M., Konkoy C. S., McLellan J. A., Woodward R. M., Lan N. C., Carter R. B., Hawkinson J. E., *J. Med. Chem.*, **40**, 73 (1997).
- 51) 宮地幸隆, "Neurosteroids," 最新医学, **46**, 最新医学社, 大阪, 1991, pp. 2189—2195.
- 52) Rupprecht R., Hauser C.A.E., Trapp T., Holsboer F., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **56**, 163 (1996).