

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06943

研究課題名(和文)新規雌性尿中生理活性物質の分離精製と中枢神経系内活性化部位の同定

研究課題名(英文) Separation and purification of new physiologically active substances in female rats' urine, and identification of the activated neuron due to the active substances in central nervous system

研究代表者

阿久津 仁美 (Akutsu, Hitomi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：フェロモンコミュニケーションは、多くの哺乳類において性行動の動機づけとなり、鋤鼻器はフェロモンの受容器である。本研究では、雌ラット尿中のフェロモン活性物質が雄ラットに与える行動的影響の特定と、その行動発現に関わる神経回路の可視化を試みた。自由行動下にある成熟雄ラットに雌ラット由来の発情前期尿あるいは発情休止期尿を提示すると、雄ラットはsniffingやnibblingなどの探索行動を示した。探索行動の持続時間は、発情前期尿に対してより長い傾向にあった。雌ラット尿中生理活性物質と活性化された神経回路は不明なままであるが、発情休止期尿よりも発情前期尿が雄ラットをより引き付けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェロモン研究は雄マウスを対象として著しい発展を見せているが、雌ラット尿中に雄ラットを引き付ける生理活性物質が存在することを示した本研究は、フェロモンコミュニケーションが動物種ごとに独自のフェロモン分子を用いて営まれていることを示し、種を維持するための繁殖戦略に不可欠な役割を持つことを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Pheromone communication is an important element to provide a motivation for expression a sexual behavior in many mammals, vomeronasal organ is a specific organ to receive pheromones. In present study, we tried to identify the pheromone effect which derived from female rats' urine on the natural behavior of the adult male rats and to visualize the neural circuit involved in the behavioral manifestation. When the free moving adult male rats were exposed to proestrous urine or diestrous urine derived from adult female rats, they represented sniffing and nibbling as the exploration behavior. The duration of the behavior tended to be longer for proestrous urine. The active substances in female rats' urine or the activated neural circuit has remained unknown, it was suggested that proestrous urine might be more attractive for male rats than diestrous urine.

研究分野：神経科学

キーワード：尿中フェロモン 生理活性物質 雌ラット 発情前期尿 行動試験 免疫組織化学 神経回路

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの哺乳類では、フェロモンを用いたケミカルコミュニケーションが性行動の動機づけとなる。フェロモンは鼻中隔基部にて鋤骨に囲まれた鋤鼻器で受容されるが、鋤鼻器を損傷すると性行動が正常に遂行できず、結果としてその個体の繁殖の失敗につながることから、性行動の発現にはフェロモン情報が重要な役割を果たしていることが推測される。フェロモン研究の発展はマウスに寄与するところが大きく、中でも雄マウス由来のフェロモン分子が数多く同定されている。フェロモンは性行動発現に深く関与し、その動物種の維持に貢献しているため、種特異的なフェロモン分子とその受容体が不可欠であると思われる。加えて、マウスと同じ齧歯類であるラットは、体の大きさや解剖学的特徴、生態にもマウスとは異なる点があることから、マウスでのフェロモン研究がラットにそのまま当てはまることはない。

2. 研究の目的

動物種によって異なるフェロモン分子を用いて、その種特有のフェロモンコミュニケーションを営んでいることを明らかにするために、ラットの種特異的な、また雌特異的な、繁殖に関する情報を有したフェロモンの分子を特定し、それを受容した雄ラットにおいて、生理的・行動的なフェロモン応答を発現するに至る鋤鼻系神経回路を特定することを、本研究の目的とした。

3. 研究の方法

行動試験：成熟雄ラットが雌ラット尿（発情前期尿、発情休止期尿）に自由に接することができる環境に置かれたときの、雄ラットが示す行動を観察・記録した。実験用成熟雄ラット（Wistar、11-16 週齢）は、単独でおこなわれる行動試験のために、実験日の 2 日以上前から個別飼育とした。行動試験を実施するにあたって、人の出入りがなく、他のにおいに邪魔されない実験室を準備した。アクリル板で作られた行動試験ボックス（縦 45 cm × 横 60 cm × 高さ 45 cm、フタなし）を実験室の床に置き、紙製のマウス用巣穴（シェファードシャック ドーム型、SSP 社）を半分に割って使用）をマスキングテープにてボックスの四隅に取り付け、あらかじめ清潔なキムワイプを入れてから、紙製の床敷（滅菌済みアルファドライサーティファイド、SSP 社）をボックスの床面に敷いた。実験に使用する雄ラットは、この時点でボックスに導入され、30 分間自由に行動させて環境に馴化させた。雄ラットの馴化後、1 個の巣穴のキムワイプには発情前期尿または発情休止期尿（生理的食塩水にて 2 倍希釈したもの）をしみこませ、残り 3 個には生理的食塩水をしみこませた。尿希釈液と生理的食塩水をキムワイプにしみこませてすぐに、雄ラットの行動をビデオカメラにて真上から撮影し、30 分間の行動を記録した。対照実験として、4 か所の巣穴すべてのキムワイプに生理的食塩水をしみこませた状況で雄ラットの行動を観察した。

巣穴はマウス用の大きさであるため、ラットは穴から頭を入れることはできても、体までは入らない構造となっている。

記録したラットの行動試験映像を用いて、雄ラットが尿を入れた巣穴に近づいた時間の長さを測定した。雄ラットが、巣穴から 5 cm以内に鼻を近づけてにおいを嗅いでいる、巣穴内の尿キムワイブに直に接している（齧る、啜るなど）巣穴から引っ張り出したキムワイブに鼻を近づけてにおいを嗅いでいる、巣穴から引っ張り出したキムワイブに直に接している、という状態を維持しているときに、その時間の長さを測定した。



鋤鼻器および副嗅球の神経活動の可視化（免疫組織化学）: 行動試験に供試した成熟雄ラットは、尿の提示から 60 分後に二酸化炭素による安楽死をさせ、左心室経由にてリンゲル液の灌流に続いて 4%パラフォルムアルデヒド（4% PFA in 0.1M PB）を全身灌流して組織を固定した。ラットの鋤鼻器を含む吻部と嗅球を含む脳を採材し、吻部は 4% PFA にて後固定をした後に、0.5M EDTA・7% sucrose（pH 7.4）に漬けて脱灰をおこなった（3～6 か月）。剃刀で抵抗なく骨が切断できるようになってから、30% sucrose に漬けて耐凍処理をおこない、3 ブロックに分割して OCT コンパウンドにて包埋し、-30 にて保存した。脳は 30% sucrose in PBS に漬けて耐凍処理をおこなってから、3 ブロックに分割して OCT コンパウンドにて包埋し、-30 にて保存した。

クリオスタットを用いて、吻部は 16 μ m、脳は 20 μ m 厚の凍結切片を作製した。それらの切片を用いて、活動神経細胞のマーカである c-Fos タンパク質を検出するために、一次抗体に抗 c-Fos 抗体と抗 Olfactory Marker Protein（OMP）抗体（鋤鼻感覚細胞のマーカ）を用いて、免疫組織化学染色をおこなった。

4．研究成果

行動試験: 成熟雄ラットは、提示された発情前期尿あるいは発情休止期尿に対して著しい関心を示し、尿のある巣穴の入り口や巣穴の中に鼻を近づけ、尿がしみこんだキムワイブのにおいを嗅ぐ行動を頻繁に示し、鼻腔からその成分を取り込んでいる様子が見られた。またキムワイブを巣穴から引っ張り出して、噛む・口と前足を使って引き裂くなどの行動を示し、尿の成分を口腔内にも取り込んでいる様子が見られた。そのような尿に対する探索行動は

個体によって持続時間が異なり、ばらつきが認められた。発情前期尿に対する探索行動持続時間は 283.12 ± 75.33 秒 (Mean \pm SEM)、発情休止期尿に対する探索行動持続時間は 247.76 ± 79.26 秒であり、有意差は認められなかったが、発情前期尿に対する探索行動持続時間が発情休止期尿に対するものよりも長い傾向が見られた ($p=0.753$ 、分散が等しくないと仮定した 2 標本による t-検定、各実験群：n=6)。

鋤鼻器および副嗅球の神経活動の可視化 (免疫組織化学)：一次抗体に抗 c-Fos 抗体と抗 OMP 抗体を用いた免疫組織化学染色では、鋤鼻器の鋤鼻感覚上皮内およびその一次中枢である副嗅球における c-Fos の陽性反応は認められなかった。三日月形の鋤鼻感覚上皮の両端に、わずかな陽性反応が認められた切片もあったが、これは鋤鼻感覚細胞ではなく、鋤鼻器内の腺組織に接する神経線維であると思われた。これまでの免疫組織化学では鋤鼻系に直接関与する細胞の神経活動は検出できなかったが、まだ切片を作製していない脳部位を用いて免疫組織化学をおこなうことにより、鋤鼻系の活性化に関与する脳部位の神経核に神経活動の痕跡を検出できる可能性があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加茂 政晴 (Kamo Masaharu) (40214564)	岩手医科大学・歯学部・研究員 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関