

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10039

研究課題名（和文）悪心・嘔吐の中枢機序解明と新たな制吐療法創出に向けた神経生理学的研究

研究課題名（英文）Neurophysiological study of central mechanisms for nausea and vomiting to create a new antiemetic therapy.

研究代表者

船橋 誠（FUNAHASHI, MAKOTO）

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：80221555

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）：エメチン、シスプラチン、トラネキサム酸はいずれもCTAを惹起した。TRテストによりこれら全ての薬物が味覚に対する嫌悪感を伴う条件付け悪心を誘発することが確定できた。次に最後野切除群と迷走神経求心路切除群およびそれぞれの偽手術群を作成して同様の実験を行い、1)エメチン誘発悪心は最後野切除によってほぼ消失すること、2)シスプラチン誘発悪心は最後野および迷走神経求心路切除の両方を行ったラットにおいても起こること、3)トラネキサム酸誘発悪心は最後野切除または迷走神経求心路切除によって有意に抑制されることが分かった。また、デキサメタゾン投与によりシスプラチン誘発CTAが抑制されるパイロットデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪心・嘔吐は様々な疾病や体調不良および消化器系の不調などによって起こる。また、抗がん剤の副作用として重篤な悪心・嘔吐が起こり、食欲不振を招いてがん化学療法の妨げになる。悪心・嘔吐が続くと体力低下を招くだけでなく、生活の質を著しく低下させる。ところが悪心・嘔吐を誘発する中枢神経機序については未だ不明な点が多く残されており、新たな制吐療法の開発を難しくしている。我々の研究成果はエメチンによる急性の悪心・嘔吐と抗がん剤に誘発される悪心・嘔吐は異なる中枢機序によることを示唆している。特に、シスプラチンに誘発悪心にステロイドホルモンが奏功する機序については今後の研究課題として意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Emetine, cisplatin, and tranexamic acid all induced CTA. The TR test confirmed that the conditioned nausea with an aversion to taste. Next, a similar experiment was performed by creating the area postrema lesion group and the vagal afferent vagotomy group and each pseudosurgical group, and 1) the emetine-induced nausea almost disappeared by the area postrema lesion, 2) the cisplatin-induced nausea occurred in rats with both the area postrema lesion and the vagal afferent vagotomy. 3) Tranexamic acid-induced nausea was found to be significantly suppressed by the area postrema lesion or the vagal afferent vagotomy. In addition, pilot data were obtained that dexamethasone administration suppressed cisplatin-induced CTA.

研究分野：口腔生理学

キーワード：悪心 嘔吐 最後野 孤束核 迷走神経 条件付け味覚嫌悪 味覚反応試験 ラット

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪心・嘔吐の機序に関する研究は1900年のはじめに開始された(Weiss & Hatcher, 1922 文献①)。その後、Borison & Wang, 1953 (文献②) によって、最後野が嘔吐を誘発する化学受容器引き金帯 (Chemoreceptor Trigger Zone: CTZ) であることが証明された。現在、悪心・嘔吐の誘発機序として、嘔吐中枢への末梢からの内臓感覚の入力、CTZを介する入力、大脳皮質や間脳および辺縁系からの入力、前庭器からの入力に関与するという概念が形成されている。内臓感覚を伝える迷走神経活動と最後野の化学感受性については先行研究が多数ある。細胞内機序の解明には我々の研究も大いに貢献している。大脳皮質から嘔吐中枢への入力による悪心・嘔吐の機序に関しては未だに不明な点が多く残されている。

我々はこれまでにCTZである最後野におけるニューロンの膜特性、活動性、化学感受性、受容体とその細胞内メカニズムを解明し、研究成果を査読有の国際的科学雑誌に多数発表してきた。また、近年は応募者が得た単一ニューロンレベルまたは分子レベルでの知見を、行動科学実験により検証し、成果を上記の科学雑誌に発表し、最後野が悪心誘発に関わる神経機序と摂食抑制に関わる神経機序の区別を示し、当該分野における新たな概念を提唱した。

本研究課題の最も大きな問いは、心象である悪心と反射運動である嘔吐におけるそれぞれの中核機序の共通点と相違点についてである。これは、予期性悪心・嘔吐の機序の解明や、経頭蓋直流電気刺激によって悪心と嘔吐を別々に制御できるかという問いの解明にもつながるため極めて重要である。悪心を感じても嘔吐しない場合やその逆もあり、悪心と嘔吐を区別して中枢および末梢の神経機序を解明できれば新たな概念を作ることができる。さらに、悪心と嘔吐の新たな制御方法の創出に道を開くことができる。

### 2. 研究の目的

悪心と嘔吐のそれぞれの中核機序を明らかにし、悪心・嘔吐に関する新たな概念を創出したい。そして、悪心と嘔吐の共通機序と特異的機序を解明できた暁には、抗がん剤の副作用による悪心・嘔吐に対して、悪心と嘔吐を区別して制御する新たな制悪心療法と制吐療法の可能性を提唱したい。そのために、1) 嘔吐中枢へのCTZを介する入力と迷走神経求心路の入力の割合と催吐性薬物の種類による違いの有無、2) 末梢からの入力とCTZを介する入力を遮断した動物において悪心は誘発されるのか、3) 最新の制吐薬にもステロイド剤を併用しなければ制吐効果が十分でないのはなぜか、について明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

SD系またはWister系ラットを用いて、北海道大学動物実験指針を遵守して動物実験を行う。ラットは嘔吐しない動物であるが、他の動物であれば嘔吐するような薬物を投与することにより、直前に摂取したサッカリンの甘味と内臓不快感(悪心)との連合学習が成立し甘味摂取を忌避する行動、すなわち条件付け味覚嫌悪(CTA: conditioned taste aversion)を獲得する。CTAの記憶は薬物誘発悪心の重症度に比例して1日から1週間続く。本研究では、吐根の成分であるエメチン、抗悪性腫瘍薬であるシスプラチン、獣医療で催吐剤として用いられるトラネキサム酸を投与してサッカリンに対する味覚条件付けを行いCTAの計測を行った。また、ラットがCTAを獲得した場合に、甘味の再摂取時に条件付け悪心誘発の有無を調べるために、味覚反応試験(TRテスト: Taste reactivity test)を行い、甘味の再摂取時のゲーピング行動の解析を行った。

#### (1) 味覚嫌悪学習(CTA)の測定

条件刺激として0.1%サッカリン溶液、無条件刺激としてシスプラチン(抗がん剤)、エメチン、トラネキサム酸を用いた。1ボトル法を用いてCTA測定実験を行い(図1)、サッカリン摂取量を比較して、CTAを獲得した場合を悪心誘発の指標とした。また、サッカリン溶液に対する安全学習の経過を解析してCTAの強度を比較した。

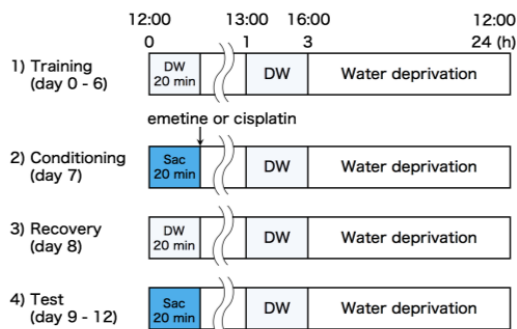


図1. 1ボトル法によるCTA測定のプロトコール

## (2) 横隔膜下両側迷走神経求心路切除術

ラットの手術はミダゾラム(ミダゾラム®、富士フィルム和光純薬株式会社、2 mg/kg)、プロプラノロール(ベトルファール®、明治アニマルヘルス株式会社、2.5 mg/kg)、塩酸メドトミジン(メドトミン®、明治アニマルヘルス株式会社、0.375 mg/kg)の腹腔内注射(i. p.)による三種混合麻酔下で行った。以下に記載した手術においても同様である。開腹し、顕微鏡手術にて食道に伴走する腹側と背側の迷走神経を横隔膜にできる限り近い位置で食道から剥離して綿糸を通して置き、同部を食用油に溶解した5%カプサイシンに20分間浸漬した後、生理食塩水で洗浄した。腹腔を閉鎖し、回復後実験に供した。

## (3) 最後野切除術

三種混合麻酔下にて、後頭骨下縁と環椎の間の後環椎後頭膜を体軸方向に切開し、その後脳硬膜を切開して電気メスの先端を最後野直上に設置し、電気メス先端の位置を垂直方向に1.2ミリ進めたところで、電気メスのスイッチをONにして最後野を凝固モード、intensity 2.5、time 0.5秒で焼灼した。最終的に組織切片を作成してニッスル染色を行い、切除部位を同定した。

## (4) 口腔内チューブ造設手術

三種混合麻酔下にて、ラットの頭部を脳定位固定装置(ナリシゲ、SR-8)に固定し、口腔内チューブ(サイズ3、ヒビキポリエチレンチューブ)を固定する自作した頭部モールドを頭蓋骨埋め込みビスと歯科用レジンで固定した。口腔内における口腔内チューブの一端は右上顎第一大臼歯の頬側に開口するように設置して頬粘膜に縫合し固定した。口腔内チューブの他端は咬筋を貫通させ、皮下へ挿入後、頭頂部の皮膚の切開部位から体外へ出し、上述の固定用モールドに固定した。チューブの内側が唾液で閉じないように、各チューブに綿糸を挿入した。蒸留水またはサッカリンの経口投与(p. o.)を口腔内チューブで行った。

## (5) 味覚反応試験 (Taste reactivity test: TRテスト)

TRテストは、以前の研究(文献③~⑦)に従って実施した。手術を受けたラットは、手術後および実験期間中、自由に水を摂取させた。TRテストのプロトコルを図2に示す。水分遮断期間は、合計20時間40分/日に設定した。条件刺激(CS)としてサッカリンを、無条件刺激としてシスプラチンまたはエメチンを経口投与した(US)。TRテストは口腔内チューブ手術の5日後に実施した。1日目と2日目に、口腔内チューブをポリエチレンチューブでシリンジポンプに取り付けられた20 ml シリンジに接続し、ラットを口腔内チューブから注入した蒸留水を飲むように順応させた(流量0.5 ml/分で8分間)。条件付け当日、ラットに甘味溶液(蒸留水に溶解した0.1%サッカリンナトリウム水和物、流速0.5 ml/分、8分間、p. o.)を摂取させた直後に、シスプラチン(Sigma-Aldrich; 3 mg/kg、1%BW、i. p.)またはエメチン二塩酸塩(Sigma-Aldrich; 5.54 mg/kg、1%BW、i. p. または i. g.)を投与した。エメチン二塩酸塩の用量は、エメチンのIC50を3.345 mg/kgとした以前の研究に基づいて選択した(文献⑧、⑨)。シスプラチンの用量は、ラットにおいてシスプラチン誘発性条件付味覚忌避を実証したRudd et al. 2002による以前の研究に基づいて選択した(文献⑩)。条件付け日の後には回復日が続く、ラットは水分摂取に対して嫌悪行動がなくなるまで蒸留水を与えた。試験当日、0.1%サッカリン溶液の経口投与を行った。デジタルビデオカメラを用いてラットの行動を記録し、オフライン映像解析によりサッカリンに対する嫌悪行動とされるゲーピング反応数をカウントした。

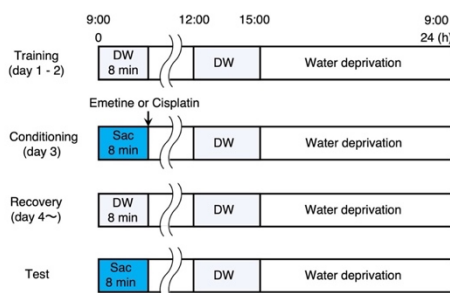


図2. 味覚反応試験 (TRテスト) のプロトコル

## 4. 研究成果

エメチン、シスプラチン、トラネキサム酸はいずれもCTAを惹起し、TRテストでもゲーピング行動の著しい増加を確認できた。これにより、これら全ての薬物は悪心を誘発するとともに味覚に対する嫌悪感を伴う条件付け悪心を示すことが確定できた。エメチンの作用について得られた知見はPhysiology & Behaviorに掲載された。次に最後野切除群と迷走神経求心路切除群およびそれぞれの偽手術群を作成して同様の実験を行い、1) エメチン誘発悪心は最後野切除によってほぼ消失すること、2) シスプラチン誘発悪心は最後野および迷走神経求心路切除の両方を行ったラットにおいても起こること、3) トラネキサム酸誘発悪心は最後野切除または迷走神

経求心路切除によって有意に抑制されることが分かった。また、デキサメタゾン投与により最後野および迷走神経求心路切除の両方を行ったラットにおけるシスプラチン誘発 CTA が抑制されるパイロットデータを得た。エメチンの作用に関する主要な知見を図 3 に示す。TR テストのデータをまとめて国際的科学雑誌へ投稿中であり、CTA のデータについても同様に発表する準備を行っている。

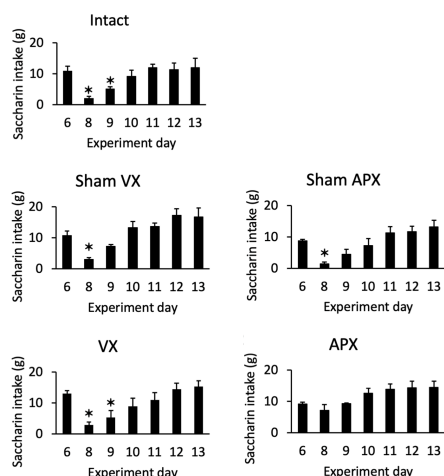


図 3. サッカリン摂取量の経時的变化

手術を受けていないラットにおけるサッカリン摂取 (Intact)、偽迷走神経切開術 (Sham VX) および偽最後野破壊 (Sham APX)、迷走神経切除術 (VX)、および最後野破壊 (APX)。Intact 群のサッカリン摂取量は、条件付け日 (6 日) と比較して CTA テスト日 (8、9 日) に有意に減少した。両方の偽手術群で条件付け日と比較して 1 回目の CTA テストの日 (8 日) に有意に減少した。VX 群のサッカリン摂取量は、1 日目と 2 回目の CTA テストの日 (8、9 日) に有意に減少した。条件付け日当日と比較して APX 群においてサッカリン摂取量の有意な減少がなかった。各群  $n = 5$ 、\*  $p < 0.05$ 。

#### 引用文献

- ① S. Weiss, R.A. Hatcher, The Mechanism of the Vomiting Induced by Antimony and Potassium Tartrate (Tartar Emetic), *J Exp Med* 37 (1923) 97-111.
- ② H.L. Borison, S.C. Wang, Physiology and pharmacology of vomiting, *Pharmacol Rev* 5 (1953) 193-230.
- ③ H.J. Grill, R. Norgren, The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats, *Brain Res* 143 (1978) 263-279.
- ④ L.A. Parker, Taste reactivity responses elicited by reinforcing drugs: a dose-response analysis, *Behav Neurosci* 105 (1991) 955-964.
- ⑤ T. Inui, C. Inui-Yamamoto, Y. Yoshioka, I. Ohzawa, T. Shimura, Activation of efferents from the basolateral amygdala during the retrieval of conditioned taste aversion, *Neurobiol Learn Mem* 106
- ⑥ K. Berridge, H.J. Grill, R. Norgren, Relation of consummatory responses and preabsorptive insulin release to palatability and learned taste aversions, *J Comp Physiol Psychol* 95 (1981) 363-382.
- ⑦ L.A. Parker, L. Brosseau, Apomorphine-induced flavor-drug associations: a dose-response analysis by the taste reactivity test and the conditioned taste avoidance test, *Pharmacol Biochem Behav* 35 (1990) 583-587.
- ⑧ T. Sato, Y. Hirai, S. Su, W. Zimo, N. Yasuura, T. Inui, M. Funahashi, Involvement of the area postrema and the nucleus tractus solitarius in the emetogenic action of emetine in rats, *J Oral Biosci* 62 (2020) 310-314.
- ⑨ S. Su, M. Fujita, Z. Wei, H. Huang, T. Yoshizawa, T. Inui, M. Funahashi, Effects of area postrema lesions and bilateral subdiaphragmatic afferent vagotomy on emetine-induced conditioned taste avoidance in rats, *Physiol Behav* 241 (2021) 113565.
- ⑩ J.A. Rudd, K. Yamamoto, A. Yamatodani, N. Takeda, Differential action of ondansetron and dexamethasone to modify cisplatin-induced acute and delayed kaolin consumption ("pica") in rats, *Eur J Pharmacol* 454 (2002) 47-52.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Su Shaoyi, Fujita Mayu, Wei Zimo, Huang Helai, Yoshizawa Tomohiko, Inui Tadashi, Funahashi Makoto	4. 巻 241
2. 論文標題 Effects of area postrema lesions and bilateral subdiaphragmatic afferent vagotomy on emetine-induced conditioned taste avoidance in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 113565 ~ 113565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.physbeh.2021.113565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Takanori, Hirai Yoshiyuki, Su Shaoyi, Zimo Wei, Yasuura Nanae, Inui Tadashi, Funahashi Makoto	4. 巻 62
2. 論文標題 Involvement of the area postrema and the nucleus tractus solitarius in the emetogenic action of emetine in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 310 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshizawa Tomohiko, Funahashi Makoto	4. 巻 62
2. 論文標題 Effects of methyl methacrylate on the excitability of the area postrema neurons in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 306 ~ 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maezawa Hitoshi, Koganemaru Satoko, Matsubashi Masao, Hirata Masayuki, Funahashi Makoto, Mima Tatsuya	4. 巻 156
2. 論文標題 Entrainment of chewing rhythm by gait speed during treadmill walking in humans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 88 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 藤田麻由, 乾賢, 吉澤知彦, 舩橋誠
2. 発表標題 トラネキサム酸の悪心・嘔吐誘発機序に関する行動学的解析
3. 学会等名 第101回北海道医学大会生理系分科会（日本生理学会北海道地方会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蘇韶懿, 黄鶴来, 吉澤知彦, 乾賢, 舩橋誠
2. 発表標題 化学受容性悪心を誘発する中枢機序の解明
3. 学会等名 第101回北海道医学大会生理系分科会（日本生理学会北海道地方会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蘇韶懿, 魏紫茉, 保浦七愛, 吉澤知彦, 乾賢, 舩橋誠
2. 発表標題 エメチンおよびシスプラチンによる条件付け味覚忌避における最後野の役割
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田麻由, 乾賢, 吉澤知彦, 舩橋誠
2. 発表標題 ラットを用いたトラネキサム酸誘発悪心の行動学的解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蘇韶懿, 魏紫茉, 黄鶴来, 吉澤知彦, 乾賢, 船橋誠
2. 発表標題 The effect of dexamethasone on the cisplatin-induced CTA in rats with area postrema lesions and bilateral subdiaphragmatic afferent vagotomy.
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 実藤潤, 平井喜幸, 久留和成, 藤田麻由, 蘇韶懿, 山崎七愛, 船橋誠
2. 発表標題 Behavioral study on nausea induction by serotonin agonists in rats.
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 乾賢, 船橋誠
2. 発表標題 味覚嫌悪学習における扁桃体基底外側核の役割
3. 学会等名 第100回北海道医学大会生理系分科会 (日本生理学会北海道地方会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保浦七愛, 乾賢, 魏紫茉, 佐藤嘉晃, 十川紀夫, 船橋誠
2. 発表標題 メタロチオネイン欠損マウスにおける条件付け味覚嫌悪行動の行動学的解析
3. 学会等名 第100回北海道医学大会生理系分科会 (日本生理学会北海道地方会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nanae Yamazaki, Makoto Funahashi, Norio Sogawa, Yoshiaki Sato
2. 発表標題 Effects of regulation of zinc metabolism of Metallothionein on taste and conditioned taste aversion in mice.
3. 学会等名 第79回日本矯正歯科学会学術大会 / 第9回国際矯正歯科会議世界大会国際矯正歯科学会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 保浦 七愛, 乾 賢, 十川 紀夫, 船橋 誠
2. 発表標題 メタロチオネイン欠損および低亜鉛餌による条件付け味覚嫌悪行動の変化
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makoto Funahashi, Yoshiyuki Hirai, Kazunari Hisadome, Mayu Fujita, Shaoyi Su, Nanae Yamazaki, Jun Sanefuji
2. 発表標題 Analysis of nausea induced by emetine or cisplatin in rats.
3. 学会等名 北米神経科学学会 (Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mayu Fujita, Yoshiyuki Hirai, Kazunari Hisadome, Makoto Funahashi
2. 発表標題 Effects of vagotomy and lesions of the area postrema on nausea induced by tranexamic acid.
3. 学会等名 北米神経科学学会 (Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 実藤潤, 平井喜幸, 久留和成, 藤田麻由, 蘇韶懿, 山崎七愛, 船橋誠
2. 発表標題 Behavioral study on nausea induction by serotonin agonists in rats.
3. 学会等名 第97回日本生理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 船橋誠 (分担執筆)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 28
3. 書名 基礎歯科生理学第7版 第3章 体液, 第23章 嘔吐	

〔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	久留 和成  (Hisadome Kazunari)  (00592081)	北海道大学・歯学研究院・助教   (10101)	
研究分担者	平井 喜幸  (Hirai Yoshiyuki)  (40344519)	北海道大学・歯学研究院・助教   (10101)	

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
---------	---------