

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450141

研究課題名(和文) オオカミ尿に含まれるピラジン化合物の恐怖誘起作用に関する研究

研究課題名(英文) The novel wolf kairomone, alkylpyrazine mixtures, induce the fear-related responses to preys

研究代表者

長田 和実 (Osada, Kazumi)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：00382490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請者らは、野生動物の制御と、共存のための有効な手段としてオオカミ尿中のピラジン化合物(P-mix)に着目し、マウス、ラット、エゾシカなど動物種を超えて恐怖を誘起するカイロモン(天敵由来の恐怖誘起物質)であることを見出した。またピラジン化合物の構造活性相関の解明に取り組み、強い恐怖反応を誘起するピラジンの官能基の特徴を明らかにした。さらに恐怖行動を誘起する神経機構の解明に取り組み、P-mixは、通常のおい成分とは異なり、主嗅覚系、鋤鼻系の両方を刺激し、恐怖誘発の情報を受容し、扁桃体内側部、同中心核、視床下部などを活性化し、先天的な恐怖行動や皮膚温低下などを引き起こす事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The applicants indicate that P-mix (a set of alkylpyrazine analogues which identified from wolf urine) are novel kairomones inducing fear-responses to wide range of prey animals (mouse, rat, deer). In addition, structure-activity revealed that active alkylpyrazines inducing fear-responses had methyl or ethyl group(s), and alkyl side chains consisting of four carbon atoms in total were present in the most potent analogs. Moreover, the neural projection of the P-mix stimulation to the rat brain were explored. We clarified that the P-mix but not a control fruity odor mixture increased Fos immunoreactivity of AOB, medial and central amygdala, and hypothalamus of rats. The results suggest that P-mix odor induces unlearned fear-related behaviors in rats.

研究分野：生物有機化学

キーワード：恐怖誘起物質 アルキルピラジン 恐怖関連中枢 カイロモン

### 1. 研究開始当初の背景

日本では、シカ(エゾシカを含む)、クマ、サルやイノシシなどの害獣被害が深刻化している。北海道におけるエゾシカによる農林被害は深刻で、被害額は1995年から年間30億円から50億円の間を推移し続けている。自然環境を破壊することなく、野生動物の制御と、共存のための有効な手段が求められている。ライオンやオオカミなどの猛獣の糞尿を害獣忌避剤として利用することが注目されているが、大量供給が難しいことに加え、クルードなために製品ごとに安定的な効果は得られない。本申請者等はオオカミの尿中に存在する揮発性の恐怖誘起物質を同定し、これを応用することを考えた。

マウスは天敵の匂い(kairomones)を嗅ぐと本能的に忌避反応を示し、恐怖のあまり不動状態となる。本申請者等は、採取時期(11月、1月、3月)の異なったオオカミ尿サンプルを用意し、近交系マウスに対する恐怖誘起作用について検討したところ、発情期直後の3月に採取した尿に有意に強い恐怖誘起作用があることが分かった。そこで3種類の尿をGC-MSで化学分析し、揮発性物質の構造決定および含有量を比較した結果、この尿中には3種類のアルキルピラジン類(2,6-DMP,2,3,5-TMP,3EDMP)の含有量が有意に高かった。

アルキルピラジン類は単独でも恐怖誘起効果を発揮するが、0.3%ずつの等量混合物はTrimethylthiazoline(キツネの糞中の恐怖誘起物質)の10倍以上と、強力な恐怖誘起効果を示した(図2)。これらの結果は、オオカミ尿中に見出されたアルキルピラジン類は強力な新規kairomonesであることを示している(Osada et al. Plos one 2013)。

### 2. 研究の目的

本研究は以下の目的を達成するために実施された。

1) オオカミ尿中のkairomones即ちDMP,TMP,EDMP(以下P-mix)を用い、マウス以外の哺乳動物に対する忌避作用あるいは恐怖誘起作用の確認を行う。

2) アルキルピラジン化合物が引き起こす恐怖誘起作用の構造活性相関を検討する。マウスを用い、Y字型オルファクトメーターによる忌避率測定、freezing-behaviorの増加や総行動量の変化などを測定する。同様に副嗅球に対するc-fos陽性細胞の密度の変化を免疫組織学的手法により測定することにより、副嗅球に対する刺激強度と行動の関係を明らかにする。

3) オオカミKairomonesに暴露されたマウスにおいて嗅球、副嗅球、梨状野、扁桃体、

視床下部、などの高次の中枢に対する作用を確認するためにc-fos陽性細胞の密度を測定し、アルキルピラジンにより中枢で引き起こされる恐怖誘発作用の生理学的機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

申請者等は、オオカミ尿中のkairomonesに着目し、他の哺乳動物に継続的な効果をもたらす恐怖誘起物質を見出し、その中枢機構を解明することを目的とする。研究目的の達成のために

1) フィールドでの研究を実施し、エゾシカに対するP-mixの作用を検索した。フィールド実験は西興部村のシカ牧場(北緯44度12分、東経142度48分)で行った。30頭を超す雌雄のエゾシカが9haの敷地内で自由に行動し、自生する牧草やクマザサを摂食しているが、圧片トウモロコシが適宜与えられている。牧場内に1.8m四方のビニールシート4枚を3m間隔で直線上に並べ、それぞれのシートの中央に圧片トウモロコシを置いた。4カ所中2カ所のシートには8mlのP-mixを置き、エゾシカの動きや行動は10m離れた場所から2台のビデオカメラで15分間記録し、2度に亘る実験でのべ47頭のシカの動きをトレースして餌場へのアプローチの違いや警戒行動の有無を調べた。

2) マウスの系を用いた行動実験によりアルキルピラジン類の構造-活性相関を明らかにし、より効果の高いアナログを見出した。本実験には17種類のアルキルピラジンを用意し、1-10microLのアルキルピラジンをろ紙につけてC57/BL6j♀マウスに提示し、4種類の恐怖行動(すくみ時間の増加、におい探索行動の低下、行動量の低下、Y字型迷路による忌避率の増加)をそれぞれ測定し、クラスター解析にてアルキルピラジン類を恐怖行動の強さより分類し、構造活性相関を明らかにした。

3) アルキルピラジン類の副嗅球および上位中枢への生理機構について免疫組織学的手法を用いて解明した。

実験動物にはラットを用い、マウス同様にP-mixに対する恐怖行動が引き起こされることを確認した後、モノテルペンなどの混合物(O-mix)を対照サンプルとして用い、ラットの床敷き上にP-mixとO-mixをそれぞれ散布し(200micorL)、90分後に麻酔処理を施し脳を4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(pH7.4)で固定した。脳サンプルはピプラトームで矢状断し組織切片を作成後、免疫組織学的手法により、各脳組織のc-fos陽性細胞の発現密度を測定し、中枢投射部位を検索した。

### 4. 研究成果

1) エゾシカに対する P-mix の警戒行動誘起

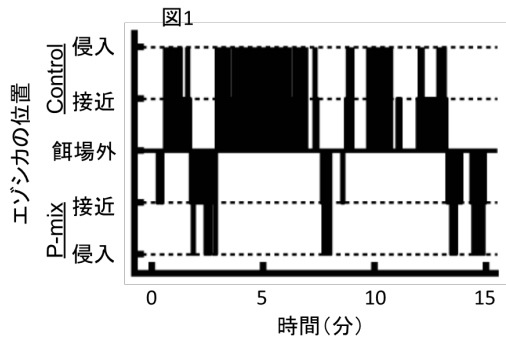
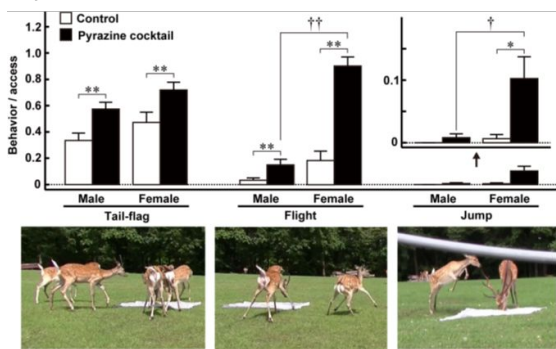


図1 1個体(雄)の餌場への接近、侵入行動のトレースの例。P-mix側へ接近する頻度はきわめて低い。

作用について

フィールド実験に於いて P-mix を置いたシートに集まるシカの数は対照群にくらべて少なく、接近、侵入する回数が有意に低いこと

図2



が分かった ( $P < 0.01$  wilcoxon test)。図1は雄シカの15分間の行動のトレースの平均的な例である。

さらに、3種類の警戒行動量を経時的に定量すると、P-mix 暴露により尾立て行動(Tail-flag)と逃避行動(Flight)は雌雄共に、飛び跳ね行動(Jump)は雌のみに有意に高い頻度で見られた(図2) ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$  Wilcoxon test)。

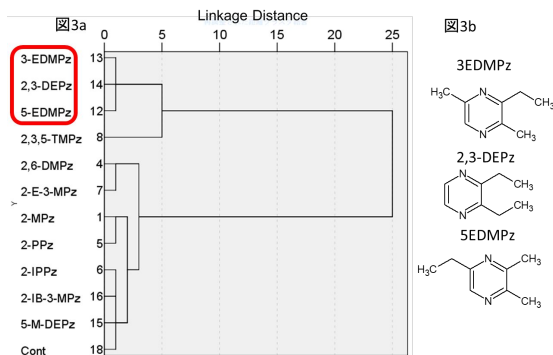
このことから、オオカミ尿中から見いだされた P-mix にはマウスのみならず半野生状態の偶蹄類に対しても本能的な恐怖行動を引き起こすことを明らかにした。この結果は P-mix が複数種類の動物の行動制御に効果を発揮する可能性を示した。

2) マウスの系を用いた行動実験により 17種類のアルキルピラジン類の構造 - 活性相関を検索した。

その結果(図3a)、以下の1群の化合物すなわち 2,3-DEPz, 3EDMPz, 5EDMPz および 2,3,5-TMPz が、対照群と同一のクラスターを形成する活性の弱い化合物群とは異なった強い活性の化合物としてクラスターを形成し、特に前出3化合物は最も活性が高い化合物であると考えられた。これら3種類の化合物の構造より、強い活性を持つアルキルピラジンの構造は以下の特徴がある(図3b)。

ピラジン環に結合するアルキル基の炭素総数は4個である。

官能基はメチル化エチルでそれよりも大きな官能基を持つものはいずれも活性が弱かった。

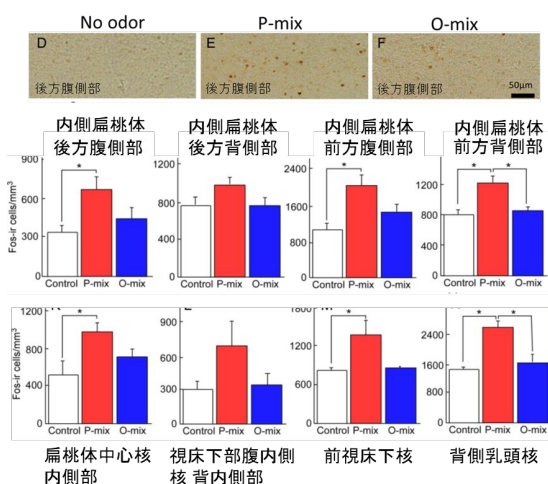


この中でも 2,3-DEPz はオオカミ尿中には見出されていない新規の化合物で、最強の恐怖反応を引き起こすことが示唆された。

さらに、2, 3-DEPz の3位のエチル基をアセチル基、メトキシ基、エトキシ基、およびスルファニルメチル基に置換すると、いずれの置換体も恐怖反応は低下したがエトキシ基の置換体ではある程度の恐怖反応が見られた。

本研究により強力な恐怖反応を引き起こす

図4 P-mix刺激によるラットc-fos陽性細胞の発現



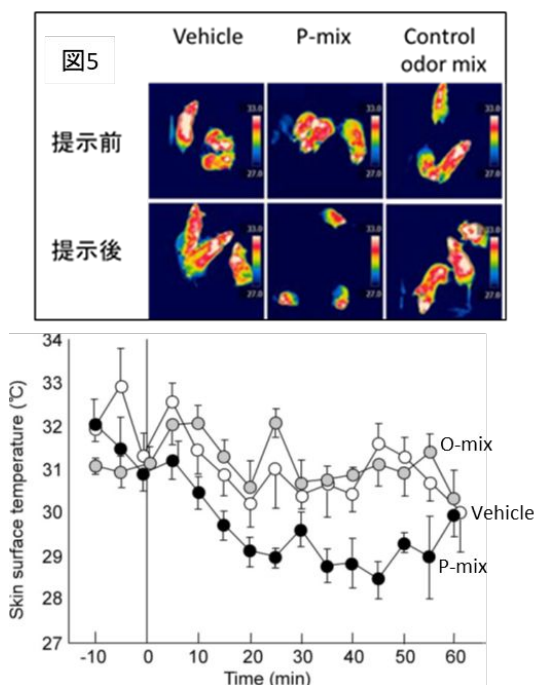
アルキルピラジンの構造が明らかになり、今後野生動物の行動制御に応用してゆきたい。

3) P-mix, O-mix のラットに対する嗅覚行動と中枢における投射部位を検索した。ラットは両方の刺激に対して忌避反応を示したが、すくみ行動を引き起こしたのは P-mix だけであった。このことは P-mix のみに恐怖反応を引き起こしたことを意味し、マウスのみなら

ずラットにも恐怖誘起作用が確認された。また P-mix 処理により副嗅球、内側扁桃体の各部位、扁桃体中心核、視床下部の各部位に P-mix 特異的な反応が見られ(図 4)、これらの中枢を刺激することにより本能的な恐怖反応を誘起していることが示唆された。

#### 4) その他の成果

P-mix は恐怖行動の誘起以外にもコルチコステロンの分泌促進や交感神経反応の亢進などを引き起こす。その結果、マウスの皮



膚表面温度の有意な低下が認められ、この変化は抗不安薬のエチゾラム投与によって抑制されることを見出した。この結果は恐怖誘起物質である P-mix の作用により引き起こされる皮膚温が低下する反応は抗不安薬のスクリーニング系になり得ることを示唆している(図 5)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Osada K., Miyazono S. and Kashiwayanagi M. (2017) Structure-Activity relationships of alkyipyrazine analogues and fear-associated behaviors in mice. *J Chem Ecol.* 43:263-272 DOI 10.1007/s10886-017-0822-3 (査読あり)

Kwak J., Jackson M., Faranda A., Osada K., Tashiro T., Mori K., Quan Y., Voznessenskays V V. and Preti G. (2016) On the persistence of mouse urine odour to human observers. *Flavour and Fragrance J.* 31 (4), 267-282 DOI 10.1002/ffj.3316 (査読あり)

柏柳 誠, 長田和実, 宮園貞治 (2016) オオカミ尿由来の恐怖のにおい P-mix が引き起こすエゾシカの忌避・恐怖行動 におい・かおり環境学会誌 47(2) P112-118 (査読なし)

Osada K., Miyazono S. and Kashiwayanagi M. (2015) The scent of wolves: Pyrazine analogs induce avoidance and vigilance behaviors in prey. *Front in Neurosci.* 9, 363,1-11 (査読あり)

Mori, K., Osada, K., Amaike, M. (2015) Mammalian blood odorant and chirality: synthesis and sensory evaluation by humans and mice of the racemate and enantiomers of trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal. *Tetrahedron: Asymmetry.* 26,861-67. (査読あり)

柏柳 誠, 長田和実, 宮園貞治 (2015) 恐怖の匂い: オオカミ尿由来の恐怖を誘起するピラジン誘導体カクテル P-mix. *日本味と匂学会誌* 22(1), 45-52 (査読あり)

Utsugi, C., Miyazono, S., Osada, K., Matsuda, M. and Kashiwayanagi, M. (2014) Impaired mastication reduced newly generated neurons at the accessory olfactory bulb and pheromonal responses in mice. *Arch Oral Biol.* 59, 1272-78. (査読あり)

Osada, K., Miyazono, S. and Kashiwayanagi, M. (2014) Pyrazine analogues are active components of wolf urine that induce avoidance and fear-related behaviors in deer. *Front in Behav Neurosci.* 8,276,1-7 doi:10.3389/fnbeh.2014.00276 (査読あり)

Utsugi, C., Miyazono, S., Osada, K., Sasajima, H., Noguchi, T., Matsuda, M. and Kashiwayanagi, M. (2014) Soft-diet feeding impaired neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions. *PLOS ONE.* 9, e97309, 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0097309 (査読あり)

長田和実, 柏柳 誠 (2014) 総説特集□: 山崎邦郎先生メモリアルシンポジウム 「化学シグナルと嗅覚行動および脳機能」 -1 巻頭言. *日本味と匂学会誌* 21(1), 5-8 (査読あり)

長田和実 (2014) 老いのにおいと嗅覚マスキング. *日本味と匂学会誌* 21(1), 9-20 (査読あり)

〔学会発表〕(計 17 件)

アルキルピラジン化合物の恐怖行動誘起作用の構造活性相関について 2017.03.18 日本農芸化学会 2017 年度(平成 29 年)大会、(京都)長田和実、宮園貞治、柏柳誠

鼻腔内投与した薬物の脳血管閉門を介さない脳機能への作用 2016.9.10 第 96 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(札幌) 柏柳誠、宮園貞治、野口智広、笹島仁、長田和実

テルペン化合物のバイオフィルム浸透性における構造活性相関の検討 2016.8.26 第 58 回 日本歯科基礎医学会(札幌) 藤田真理、長田和実、宮川博史、中澤 太

嗅覚訓練マウスによる芳香成分の口臭マスキング作用の評価 2016.8.24 第 58 回歯科基礎医学会(札幌) サテライトシンポジウム「歯科医学における化学感覚研究の新展開」長田和実

P-mix pyrazine analogues contained in wolf urine, induced innate fear in immature and mature rats 2016. 06. 06 : International symposium on Olfaction and Taste, JASTS 50th annual meeting: Yokohama, Japan, Kashiwayanagi, M. Miyazono, S. and Osada, K.

The vigilance behaviors provoked by various kinds of alkylpyrazine analogues to mice 2016. 06. 06: International symposium on Olfaction and Taste, JASTS 50th annual meeting: Yokohama, Japan, Osada, K. Miyazono, S. & Kashiwayanagi, M.

The main olfactory and vomeronasal systems modulate fear of predator wolf odor, pyrazine analogues 2016. 06. 06 : International symposium on Olfaction and Taste, JASTS 50th annual meeting: Yokohama, Japan, , Miyazono, S. Osada, K. Sasajima, H, Noguchi, T and Kashiwayanagi, M.

食品臭気物質の嗅覚マスキング強度の評価に関する研究 2016.05.14 第 70 回日本栄養食糧学会大会(神戸) 長田和実

ピラジン化合物のマウスに対する警戒行動誘起作用について 2016.03.28 日本農芸化学会 2016 年度(平成 28 年)大会、(札幌)長田和実、宮園貞治、柏柳誠

マウスにおける主嗅覚系および鋤鼻系を介した天敵臭ピラジン類に対する恐怖反応の制御 2015.09.25 日本味と匂い学会第 49 回大会(岐阜) 宮園貞治、笹島仁、野口智広、長田和実、柏柳誠

ピラジン化合物のマウスに対する警戒行動誘起作用について 2015.09.25 日本味と匂い学会第 49 回大会(岐阜) 長田和実、宮園貞治、柏柳誠

Evaluation of odor masking of dimethyl sulfide by fragrance chemicals in foods 2015.5.15 : 12th Asian Congress of Nutrition: Yokohama, Japan, K. Osada.

オオカミ尿中のピラジン化合物はエゾシカの警戒行動誘発因子である 2015.03.27 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年)大会、(岡山) 長田和実、宮園貞治、柏柳誠

Y 字型迷路を用いた食品中芳香成分の dimethylsulfide に対するマスキング作用の研究 2014.10.2-4 日本味と匂い学会第 48 回大会(静岡) 長田和実

成熟および未成熟ラットのオオカミ尿由来の P-mix に対する応答 2014.10.2-4 日本味と匂い学会第 48 回大会(静岡) 柏柳誠、宮園貞治、長田和実

オオカミ尿中ピラジン化合物により引き起こされるエゾシカの忌避および警戒行動 2014.10.2-4 日本味と匂い学会第 48 回大会(静岡) 宮園貞治、長田和実、柏柳誠

嗅覚訓練マウスを用いた食品由来芳香成分の口臭マスキング作用に関する研究 2014.09.25-27 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会(福岡) 長田和実

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: 1) 哺乳動物忌避剤  
発明者: 長田和実、柏柳 誠  
権利者: 北海道医療大学、札幌医科大学  
種類: 特許  
番号: WO2014/133156 A1  
出願年月日: 2014 年 2 月 28 日  
国内外の別: 国内(審査請求中)

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

長田 和実 (Osada Kazumi)  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号：00382490

##### (2)研究分担者

柏柳 誠 (Kashiwayanagi Makoto)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20169436

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )