

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670290

研究課題名(和文)匂い誘発性鎮痛の中樞神経回路メカニズム

研究課題名(英文)Central neuronal circuit underlying odor-induced analgesia

研究代表者

柏谷 英樹(Kashiwadani, Hideki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：70328376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：匂い分子X誘発性鎮痛が「嗅覚入力」により発現するかを検証するため、嗅覚遮断モデルマウスにおける匂い誘発性鎮痛を調べた。その結果、嗅覚遮断マウスでは匂い誘発性鎮痛が消失していた。従って匂い分子X誘発性鎮痛は確かに嗅覚入力により惹起することが明らかになった。さらにこの鎮痛は匂い刺激後少なくとも5分間持続することが明らかになった。また、匂い誘発性鎮痛はオピオイド受容体阻害薬により消失することから、匂い誘発性鎮痛にはオピオイド受容体を介した内在性鎮痛回路が関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To assess whether the olfactory input mediates odorant-X-induced analgesia, we examine the analgesia in olfactory deprived mouse. The formalin test and the hot plate test revealed that the analgesic effects were not observed in olfactory deprived mouse, indicating that the olfactory input evoked by the odorant-X is necessary for the analgesia. Next, we examine the duration of the analgesic effects. The results indicated that the analgesic effects lasted at least 5 minutes after the odorant-X exposure. Furthermore, we examined the contribution of intrinsic opioid system to the analgesic effects, and found that the intrinsic analgesic system including mu-opioid receptors mediates the odorant X-induced analgesia in mice.

研究分野：感覚生理学

キーワード：鎮痛 匂い

1. 研究開始当初の背景

「香気」が強く情動を惹起し、多様な自律神経応答が誘発されることは経験的に知られている。例えばラベンダーの香りは血圧や心拍数を下げ、鎮痛効果を持つと言われている。しかしながら具体的な作用機序は不明であり、芳香療法は依然として民間療法の域を出ていない。

申請者は、香気が本当に鎮痛を誘発できるのか？そしてその鎮痛を誘発する中枢神経回路メカニズムを解明したいと考え、いくつかの予備実験を行った。鎮痛効果を持つ香気を探索するため、香気暴露下でホットプレートテストを行ったところ、テルペン系化合物の1つ(匂い分子 X とする)が有意に疼痛閾値を上昇させることを見出した。さらに匂い分子 X 香気暴露下でホルマリンテストを行うと疼痛行動が有意に減弱し、匂い分子 X 香気の鎮痛効果を確認した。

この鎮痛効果は、疼痛行動発現に重要な視床下部オレキシン神経を遺伝子工学的に除去したマウスでは観察されないことから、オレキシン神経を含む中枢神経回路を介して匂い分子 X 誘発性鎮痛が発現することを見出した。また、この鎮痛効果は嗅覚一次中枢である嗅球を両側性に破壊すると消失するため、嗅覚入力に依存して誘発されることが示唆された。ただし、両側嗅球破壊マウスでは手術に伴い情動障害を併発する可能性が否定できないため、他の嗅覚脱失モデルを用いて再検証する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は以下の3つの目的を有する。

- (1) 香気誘発性鎮痛の「嗅覚入力依存性」を、両側嗅球破壊マウスとは異なるモデルで再検証する。
- (2) 香気誘発性鎮痛の持続時間検証する。
- (3) 香気誘発性鎮痛の中枢神経回路を、c-Fos 発現と局所神経破壊法を基に同定する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験動物には野生型マウス(C57BL/6 マウス、雄、25-35g)を用いた。動物は7時から19時を明期とする12時間サイクルの動物室で飼育し、すべての実験は14時から19時の間(明期)に行った。水、餌は自由摂取させた。すべての実験は日本生理学会の動物実験ガイドラインに従い、鹿児島大学動物実験委員会の承認のもと行った。

(2) 3-メチルインドールによる嗅上皮破壊マウスの作成

当初嗅覚失調モデルマウスとして、CNG2 欠損マウスを導入する予定であったが、補助金充当率が不足し導入が不可能であることが判明した。そこで代替手段として、3-メチルインドールによる嗅上皮破壊マウスを作成し、匂い誘発性鎮痛を検証した。

3-メチルインドール(300 mg/kg in corn oil)を腹腔内に投与し、2週間の回復期間をおいた。この嗅上皮破壊法により2週間後に嗅覚失調をおこしていることは申請者の予備実験(匂い馴化試験)で確認した。

3-メチルインドール投与2週間後において分子 X 暴露下でホルマリンテスト(後述)を行い、コントロールマウス(無臭空気暴露群)との疼痛行動量を比較した。

(3) 香気暴露法

テルペン系匂い分子 X をガラスバイアル(直径27.5mm、容積20mL)に0.5mL分注し、匂いチャンバー(0.32L)中にて室温(25±1)で気化させた。活性炭と純水で無臭化処理した空気を入力栓から匂いチャンバーに導入し、出力栓からの香気で円錐台状の観察チャンバー(上面直径8.0cm、下面直径11.5cm、高さ15cm、容量1L)を一定流量(1L/min)で灌流した。観察チャンバー内の香気濃度を一定に保つため、動物への香気暴露前に5分間観察チャンバー内を還流した。その後動物を観察チャンバー内に導入し、チャンバー内で5分間動物に香気暴露を行った。

(4) 疼痛試験

ホットプレートテスト

熱性疼痛応答潜時を、ホットプレート装置(#7280、Ugo Basile社)を用いて検証した。ホットプレートの温度は54.5に設定した。ホットプレートテスト開始後最初に観察されるマウスの疼痛行動(ジャンプ、後肢挙上、後肢なめ)までの潜時を計測した。予備実験において複数回ホットプレートテストを行うと持ち越し効果(潜時の減少)が観察されたため、テストは各個体1度に限定した。

ホルマリンテスト

化学性疼痛行動時間をホルマリンテストにより検証した。5分間の匂い暴露後、20µLの2%ホルマリン液を左後肢足底に皮内投与した。その後マウスを観察チャンバー内にもどし、マウスの示す疼痛行動(後肢なめ、後肢挙上、後肢噛付き、後肢振り)時間を5分間毎に1時間集計した。今回の実験条件下では、マウスは典型的な2相性の疼痛行動(ホルマリン投与後10分以内に起こる末梢神経の直接刺激による第一相および10-60分でみせる組織炎症や中枢神経系過敏化による第二相)を示したため、第一相、第二相の総疼痛行動時間を集計し、検定した。

(5) 免疫組織化学法による c-Fos 陽性細胞

のマッピング

ホルマリンテスト時の匂い暴露法を踏襲し、65分の匂い暴露後、動物をウレタン水溶液(1.3 g/kg, i.p.)にて深麻酔し、4% PFAにて灌流固定し脳標本を得た。

一晚の後固定後、40 μmの薄切切片をピブラトームにより作成し、浮揚免疫組織化学法によりc-Fos蛋白質発現細胞を同定した。ウサギ抗c-Fos抗体(Oncogene Research Products社製、1/1000希釈、60分、室温)、ビオチン化抗ウサギ(Jackson Immuno Research社製、1/250希釈、90分、室温)で反応させた後、ストレプトアビジン-Alexa 488抗体(Invitrogen社、1/200希釈、90分、室温)で標識した。サンプルは落射型蛍光顕微鏡(BZ-X700、キーエンス社)により観察した。

4. 研究成果

(1) 香気誘発性鎮痛の嗅覚依存性の再検証

当初予定していたNCG2欠損マウスによる嗅覚遮断実験が遂行不可能となったため、代替手段として3-メチルインドール(3-MI)投与による嗅上皮破壊マウスを用いた嗅覚遮断実験を行った。

3-MI投与2週間後、におい分子X暴露下、あるいは無臭空気暴露下でホルマリンテストを行ったところ、両群のマウスともに野生型マウス同様2相性の疼痛行動を示した。しかしながら、その疼痛行動量を定量解析したところ、両群の間で第一相、第二相ともに有意な差は観察されなかった。この結果は、嗅上皮破壊により匂い分子X暴露による鎮痛効果が消失したことを意味している。今回の嗅上皮破壊マウスおよび先行研究による嗅球破壊マウスの両嗅覚破壊マウスで匂い分子X誘発性鎮痛が消失することから、香気誘発性鎮痛は嗅覚入力を通じて発現することが明らかになった。

(2) 香気誘発性鎮痛の持続時間

香気誘発性鎮痛の持続時間を検証する第一歩として、野生型マウスに香気の短時間暴露(5分間)による鎮痛効果を検証した。ホルマリンテスト直前の5分間のみ香気暴露を行い、ホルマリン投与後無臭空気下で疼痛行動を観察したところ、ホルマリン性疼痛行動量は第一相において有意に減少した。一方、第二相では有意な変化は観察されなかった。

この結果から、ホルマリンテスト直前5分間のodorant X香気暴露により第1相に値しては有意な鎮痛効果があること、香気暴露16分以降に出現する第2相には鎮痛効果が見られないこと、に2点が明らかになった。

次に短期間暴露がホルマリンテスト第二相を形成する疼痛には鎮痛効果がないのか、それとも短期間暴露による鎮痛効果が第二相出現時には減弱してしまうのか、を検証す

る為、ホルマリン投与11分後からの5分間(第二相出現直前)に香気暴露を行った。その結果、ホルマリン性疼痛の第2相の疼痛行動時間に有意な差は見られなかったものの、香気暴露により疼痛行動が減弱する傾向が観察された。

(3) 香気誘発性鎮痛に対する内因性オピオイドシステムの関与

匂い分子X暴露による香気誘発性鎮痛に内因性オピオイドシステムが関与するかを検証するため、μオピオイド受容体の選択的阻害剤であるナロキソン塩酸塩投与下で香気誘発性鎮痛を観察した。疼痛試験にはホットプレートテストを用いた。ナロキソン塩酸塩を腹腔内投与(3 mg/kg)した15分後にホットプレートテスト(54.5℃)を行ったところ、匂い分子X暴露による疼痛潜時延長は観察されなかった。また、反応潜時に対するナロキソン塩酸塩投与単独の効果は見られなかった。

これらの結果から、匂い分子X暴露による香気誘発性鎮痛にはμオピオイド受容体を介する内因性鎮痛経路が関与することが明らかになった。

(4) 匂い分子X暴露により活性化される脳領域の同定

香気誘発性鎮痛をひきおこす匂い分子X暴露により脳のどの領域が活性化するかを検証するため、匂い分子X暴露マウスおよび無臭空気暴露マウスから脳標本を作製し、最初期遺伝子c-Fos産物の局在を免疫組織化学法により検証した。

匂い分子X暴露によりc-Fos陽性細胞数が著明に増加した領域として、視床下部室傍核および青斑核が確認された。一方、視床外側中心核、視床下部背内側核、中脳水道灰白質外側部、中脳水道灰白質外腹側部ではc-Fos陽性細胞数が著明の減少していた。いずれも疼痛行動や鎮痛系に深くかかわる領域であり、匂い分子X暴露による嗅覚入力これらの領域の活性をコントロールすることで香気誘発性鎮痛が発現すると考えられる。なお嗅皮質および扁桃体におけるc-Fos産物の定量が現在進行中である。これらの研究により、香気誘発性鎮痛の発現に必要な神経回路の解明が期待できる。

これらの研究成果は国内外の学会で公表し(5. 主な発表論文等〔学会発表〕参照)、内外の研究者との密な意見交換を行った。研究成果(1)及びこれまでの研究成果をまとめ、海外総合科学雑誌に投稿、受理された(Tashiro et al. 2016)。また研究成果(2)~(4)のデータについては現在投稿準備中である。

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)

[学会発表](計 6件)

Hideki Kashiwadani, Shogo Tashiro, Ran, Yamaguchi, Katsuko Kajiya, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki, Odor-induced analgesia in mice, 9th FENS forum of neuroscience, 2014/07/05-09, Milan (Italia)

山口蘭、田代省吾、加治屋勝子、上村裕一、桑木共之、柏谷英樹 視床下部オレキシンニューロンを介した匂い誘発性鎮痛の発現 第37回日本神経学会 2014/09/11-13 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

山口蘭、田代省吾、加治屋勝子、上村裕一、桑木共之、柏谷英樹 Odorant-X 誘発性鎮痛はストレス誘発性鎮痛とは異なる 第92回日本生理学会 2015/03/21-23 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

永田敬一郎、山口蘭、田代省吾、加治屋勝子、上村裕一、桑木共之、柏谷英樹 イモ焼酎含有香気 Odorant X 誘発性鎮痛 第92回日本生理学会 2015/03/21-23 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

Sodemi Ishikawa, Shogo Tashiro, Ran Yamaguchi, Katsuko Kajiya, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki, Hideki Kashiwadani Central neuronal circuit underlying odor-induced analgesia estimated by c-Fos expression in mice, 45th Annual meeting of Society for Neuroscience, 2015/10/17-21, Chicago (USA)

井上恵理、上村裕一、桑木共之、柏谷英樹 匂い誘発性鎮痛は内因性オピオイドシステムを介する 第93回日本生理学会 2016/03/22-24 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

[論文発表](計 1件)

Shogo Tashiro, Ran Yamaguchi, Sodemi Ishikawa, Takeshi Sakurai, Katsuko Kajiya, Yuichi Kanmura, Tomoyuki Kuwaki, Hideki Kashiwadani, Odor-induced analgesia mediated by hypothalamic orexin neurons in mice (2016), (accepted).

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏谷 英樹 (KASHIWADANI HIDEKI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・講師
研究者番号：70328376

(3)連携研究者

桑木 共之 (KUWAKI TOMOYUKI)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：80205260