

香り誘発性鎮痛の視床下部オレキシン神経による調節

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

柏谷 英樹

To reveal the central neuronal circuit underlying the odorant-X induced analgesia, I examined the contribution of hypothalamic orexin neurons, one of the higher centers for the intrinsic analgesia-system. Formalin test revealed that the odorant-X induced analgesia was not observed in orexin mutant mice, indicating that the orexin neurons are essential for the odorant-X induced analgesia.

1. 緒言

世界には多様な香気が存在するが、その中の一部は鎮痛効果を持つことが予想されており、一部の民間療法では香気療法が取り入れられている。実際、いくつかの香気分子は末梢組織において鎮痛効果を持つことが証明されている。例えばウィンターグリーン(ツツジ科)由来の香気分子であるサリチル酸メチルは独特の香気を持つが、体内に摂取されるとサリチル酸へ代謝され、末梢でCOX-2を阻害しプロスタグランジン生成を阻害することで鎮痛効果を発揮する。しかしながら、香気成分が「香り」として、言い換えれば嗅覚系を介した嗅覚入力として鎮痛効果を持つのか、もし持つならばそれはどのような神経回路メカニズムが介在するのか、については明らかになっていない。

本申請者は、この嗅覚系を介した鎮痛効果を検証しようと考え、種々の匂い暴露下で疼痛行動(ホットプレートテスト及びホルマリンテスト)を観察し、鎮痛効果を持つ匂い分子odorant-X(テルペノイドの一種。未発表データであるため仮称)を見出した。図1は、ホルマリンテストにおけるodorant-Xの鎮痛効果を調べたデータである。ホルマリンテストでは特徴的な2相性の疼痛行動を示すが、odorant-X香気暴露により両相で有意に疼痛行動が減少している($p<0.05$; マンホイットニーU検定)。この鎮痛効果は嗅覚遮断マウス(嗅上皮破壊マウス及び嗅球破壊マウス)では消失することから、嗅覚入力を介して鎮痛効果が現れることが明らかになった。

本研究では、この香気誘発性鎮痛がどのような中枢神経回路により発現するかを明らかにすることを目的としている。申請者は鎮痛を含む多様な自律神経反応に関与するこ

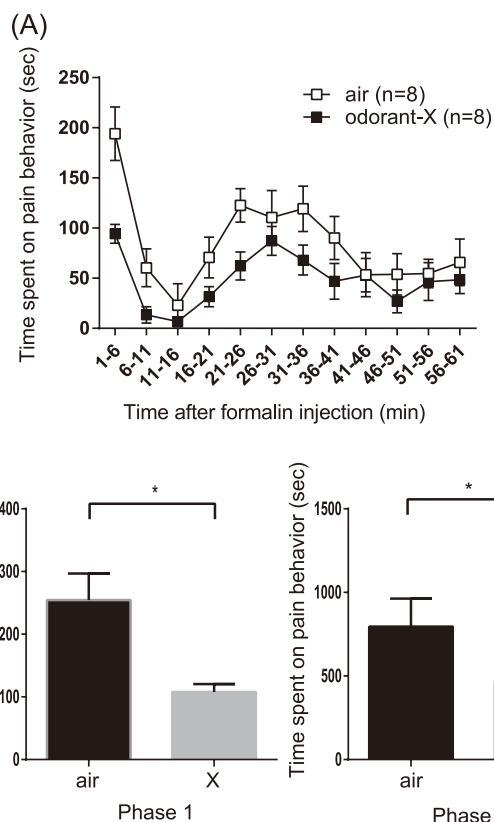


図1 odorant-X香気誘発性鎮痛(ホルマリンテスト)

とが知られているオレキシンペプチドに着目し、オレキシン含有神経が香気誘発性鎮痛に関与するかどうかを検討した。

2. 実験

2.1. 香気暴露及びホルマリンテスト

自作のオルファクトメーターにより定流量・濃度の気化odorant-Xを作成し、0.5Lの観察チャンバー内を換気した。換気は1L/minで行った。室温は $25\pm1^{\circ}\text{C}$ とした。マウスを予め5分間観察チャンバー内でodorant-Xに暴露した後、左後肢足底に20 μL の2%ホルマリン液を皮内注入し、観察チャンバー内に戻した後、ホルマリン誘発性疼痛行動を観察した(ホルマリンテスト)。疼痛行動は注入側後肢のlicking, lifting, flinching, bitingに費やした時間の計測で行



Orexin neurons in hypothalamus contribute to odor-induced analgesia

Hideki Kashiwadani

Graduate School of Medical and Dental sciences, Kagoshima University

い、5分間毎の疼痛行動量としてあらわした¹⁾。匂い暴露群のコントロールとして、無臭空気暴露群の疼痛行動量を測定し、疼痛行動量差を検証した。ホルマリンテストでは、ホルマリンによる侵害受容器刺激性疼痛と中枢シナプス感作及び末梢炎症性疼痛の表出時間の異なる2相性の疼痛行動を示すことが知られている。Odorant-X 香気誘発鎮痛がどちらの疼痛行動に影響与えるかを検証するため、疼痛行動量差は1相、2相に分けて検証した。

2. 2. 動物 (マウス)

香気誘発性鎮痛に対するオレキシン神経の関与を検証するため、オレキシン神経除去マウス²⁾、及びオレキシンペプチド欠損マウス³⁾における匂い誘発性鎮痛を検証した。これらのミュータントマウスは、共同研究者である桜井武教授(金沢大学大学院医薬保健学総合研究科)より提供を受けた。実験は雄マウス(25-32g)を用いて行った。複数回実験による学習効果を除外するため、全ての動物は1度のみ疼痛実験に用い、ホルマリンテスト終了後直ちに麻酔薬の過剰投与により安楽死させた。オレキシン神経活性化をc-Fos発現により検証する際は、ミュータントマウスのbackground strainであるC57BL6マウスを用いた。

2. 3. 匂い分子

Odorant-Xは東京化成工業より入手した。匂い分子の劣化を防ぐため、odorant-Xは4℃で保存し、実験毎に分注して用いた。

2. 4. 免疫抗体染色

オレキシン神経のc-Fos活性化を検証するため、抗オレキシンA抗体と抗c-Fos抗体による免疫抗体蛍光二重染色を行った。1時間の匂い暴露後、ウレタン水溶液(1.5g/kg, i.p.)により深麻酔し、4%PFAにより灌流固定を行った。抜脳後40μm切片を作成し、floating staining methodを用いて染色を行った⁴⁾。c-Fosの可視化にはウサギ抗c-FosA抗血清(1/1000, oncogene)、ビオチン化抗ウサギIgG抗体(1/250, Jackson ImmunoResearch)及びストレプトアビジン結合AlexaFluor488抗体(1/200, Invitrogen)を、オレキシン神経の可視化にはヤギ抗オレキシン抗血清(1/100, Santa Cruz)及びCF568結合抗ヤギIgG抗体(1/200, Biotium)を用いた。c-Fos陽性細胞のカウントは、1匹あたり視床下部を含む3枚の脳切片から行った。

2. 5. innate odor preference test

マウスのodorant-Xに対する生得的な好悪を判定するため、innate odor preference test (IOP test)を行った⁵⁾。動物を実験環境及び手順に慣らすため、プラスチックケージ(20×15×13 cm)に静置し、30分毎に新しいケージへ移

す作業を4回行った。馴化後、マウスを同型のケージに移し、匂い分子20μLを染み込ませた2×2 cmのろ紙を静置した同型のケージにマウスを移し、ろ紙の嗅探索行動時間を計測した。

2. 6. innate odor avoidance test

マウスのodorant-Xに対する生得的な嫌悪を判定するため、innate odor avoidance test (IOA test)を行った⁴⁾。実験は3室の連なった手製のテストチャンバーを用い、両側のチャンバーは無臭空気または香気で換気(1 L/min)でできるよう設定した。実験2日前、無臭空気での換気したテストチャンバー内にマウスを静置し、60分間自由にチャンバー内を探索させ装置に馴化させた。翌日、両側のチャンバーを無臭空気での換気した状態でマウスを中央チャンバーに静置し、両側のチャンバーへの侵入回数及び滞在時間を10分間測定し、両側チャンバーの好悪に関してバイアスがかかっていないことを確認した。実験当日、片方の匂いチャンバーを無臭空気、他方のチャンバーにオルファクトメーターから導入した香気で還流し、それぞれのチャンバーへマウスが探索した回数及び滞在時間を10分間計測した。

2. 7. 血中コルチコステロンのELISAによる定量

Odorant-X暴露によるマウスのホルモン性ストレス応答を計測するため、匂い刺激60分後のコルチコステロン(ストレスホルモンの一種)の血中濃度をELISA法により計測した。オルファクトメーターを用いて60分間匂い暴露した後、素早く(15秒以内)断頭を行い、EDTA管に全血採血した。ELISAにはcorticosterone ELISA kit (ADI-900-097, ENZO, NY, USA)を用い、添付のプロトコルに従い計測を行った。

3. 結果

3. 1. オレキシン神経除去マウスでは匂い誘発性鎮痛が消失する

Odorant-X 香気誘発性鎮痛に対するオレキシン神経の寄与を検証するため、オレキシン神経を選択的に除去したマウス(ORX-AB)を用い、odorant-X暴露下及び無臭空気暴露下でのホルマリン誘発性疼痛行動量を測定した。

図2AはORX-ABにおいてホルマリン性疼痛の1相及び2相の総疼痛行動量をodorant-X暴露群と無臭空気暴露群で比較している。1相、2相両相で疼痛行動量は両群で大差がなく、野生型マウスで観察されたodorant-X暴露による疼痛行動量減少は観察されなかった(p>0.05; マンホイットニーU検定)。この結果から、odorant-X誘発性鎮痛の発現には視床下部オレキシン神経が必要不可欠であることが示唆された。

3. 2. オレキシンペプチド欠損マウスでは匂い誘発性鎮痛が消失する

オレキシン神経は、神経伝達物質としてオレキシンの他にグルタミン酸等を含有することが知られている。そこで、香気誘発性鎮痛にはオレキシンペプチドによる神経伝達が必要であるのか、あるいはオレキシン神経に含まれる他の神経伝達物質による神経伝達が必要であるのかを検証することを目的とし、オレキシンペプチドを選択的に欠損させたマウス (ORX-KO) を用いて、odorant-X 香気誘発性鎮痛を検証した。

図 2B は ORX-KO においてホルマリン性疼痛の 1 相及び 2 相の総疼痛行動量を odorant-X 暴露群と無臭空気暴露群で比較している。1 相、2 相両相で疼痛行動量は両群で大差がなく、野生型マウスで観察された odorant-X 暴露による疼痛行動量減少は観察されなかった ($p>0.05$; マンホイットニー U 検定)。この結果から、odorant-X 誘発性鎮痛の発現にはオレキシンペプチドによる神経伝達が必要であることが示唆される。

3. 3. Odorant-X 刺激によりオレキシン神経は活性化される

Odorant-X 刺激で実際オレキシン神経が活性化される

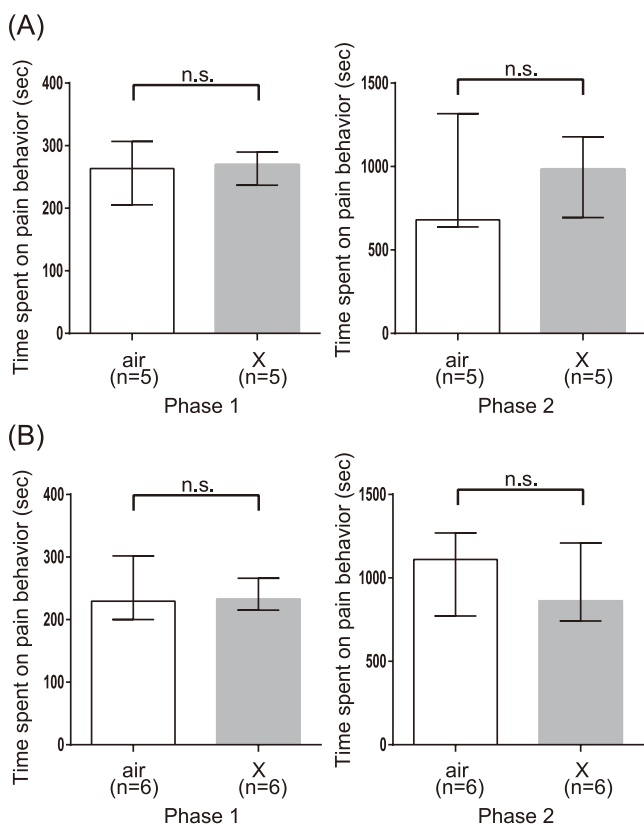


図 2 オレキシン神経除去マウス (A) 及びオレキシンペプチド欠損マウス (B) では odorant-X 香気誘発性鎮痛は消失する

かを検証するため、野生型マウスでホルマリンテスト時同様 1 時間の odorant-X 香気暴露を行い、神経活性マーカーである最初期遺伝子産物 c-Fos を発現するオレキシン神経の割合を定量化した。その結果、コントロール群及び odorant-X 暴露群の両群で視床下部オレキシン神経で c-Fos 発現細胞が観察されるが、odorant-X 暴露群で有意に c-Fos 陽性オレキシン神経の数が増加していた (図 3)。これらの結果は、odorant-X 香気暴露により活性化される視床下部オレキシン神経が増加し、その結果 odorant-X 香気誘発性鎮痛が発現することを示唆している。

3. 4. Odorant-X 刺激はマウスに強いストレス応答を引き起こさない

Odorant-X 香気暴露はマウスに有意な鎮痛効果をもたらすが、これは odorant-X 暴露がマウスに強いストレスを引き起こし、その結果ストレス誘発性鎮痛が惹起された可能性が考えられる。odorant-X がマウスに強いストレスを引き起こすのであれば、マウスは odorant-X に対して忌避行動をとることが予想されるため、innate odor preference test (IOP test) 及び innate odor avoidance test (IOA test) により odorant-X に対する忌避性を検証した。

IOP test で、odorant-X 香気を付着させた紙の探索時間と無臭紙の探索時間を比較した所、有意な差は検出されず、odorant-X 香気付着紙の探索時間が延長する傾向を示した ($p>0.99$; ダン多重比較検定)。一方、マウスに先天的忌避行動を誘発する trimethylthiazolin (TMT) を付着させた紙に対する探索行動は無臭紙と比較し有意に減少した ($p<0.05$; ダン多重比較検定)。

次に IOA test で odorant-X 香気灌流チャンバーと無臭空気灌流チャンバーの滞在時間を比較した所、有意な差は検出されなかった ($p>0.99$; ウィルコクソン検定)。一方、TMT 灌流チャンバーでは有意に滞在時間が減少した ($p<0.05$; ウィルコクソン検定)。

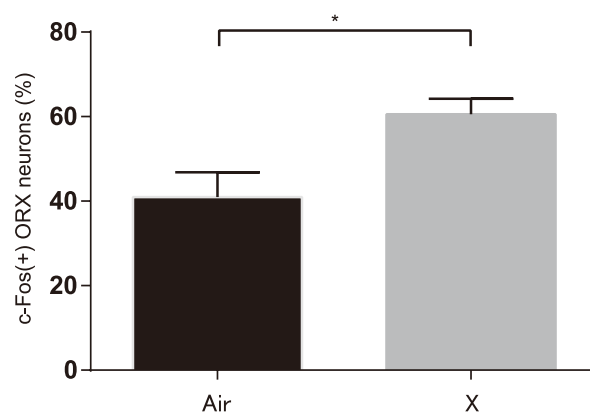


図 3 Odorant-X 香気暴露により、視床下部オレキシン神経において c-Fos 蛋白質陽性細胞数は増加する

これらのodorant-Xに対する好悪行動テストから、マウスはodorant-Xに対して、TMT臭気に対する忌避行動を惹起することではなく、TMTがもたらすような強い忌避性ストレスを引き起こさないことが示唆された。

更に、odorant-Xがマウスへ与えるストレスをより直接的に検証するため、ストレスホルモンの一種であるコルチコステロンの血中濃度変化をELISA法により検証した。げっ歯類に有意なストレス反応を引き起こすTMT暴露ではコルチコステロン量は有意に増加したが($p < 0.0001$; テューキー多重比較検定)、odorant-X香氣暴露時にはコルチコステロン量の有意な増加は見られなかった ($p > 0.20$; テューキー多重比較検定)。これらの結果より、odorant-X暴露はマウスに対して忌避行動を惹起するような強いストレスをもたらすことなく、odorant-X誘発性鎮痛はストレス誘発性鎮痛とは異なる機序で発現していると考えられる。

4. 考 察

本研究により、odorant-X香氣誘発性鎮痛の発現には、オレキシン含有神経が必要であることが明らかになった。オレキシン含有神経は視床下部に局在することが知られており、睡眠覚醒、摂食、体温調節、循環調節、鎮痛といった多様な自律神経調節に深くかかわりを持つ⁶⁾。これまでに、ストレス誘発性鎮痛発現にオレキシン神経が関与することが示唆されてきた⁷⁾。ストレス誘発性鎮痛と香氣誘発性鎮痛はオレキシンを活性化する入力経路に差があるが、共通した出力系により鎮痛効果を発現する可能性が考えられる。

また、オレキシン神経は直接脊髄後角に軸索投射し、上向する疼痛情報を抑制する可能性が指摘されている⁷⁾。実際、脊髄内にオレキシン受容体アゴニストを局所注入することで鎮痛効果が現れることが示されている⁸⁾。また、オレキシン神経は中脳水道鎮痛回路を賦活化し、下行性抑制系を介して鎮痛効果を現すことも、薬理学的方法で示されている⁹⁾。香氣誘発性鎮痛は、多機能性ペプチドであるオレキシンの受容体を直接的に刺激することなく鎮痛を誘発できるため、臨床応用への障害がより少ないと考えている。

本研究で用いた鎮痛香odorant-Xは、これまでアロマセラピーの世界で鎮痛効果を持つと信じられている複数の植物由来香氣成分から、ガスクロマトグラフィ等により分離同定された匂い分子リストを作成し、マウスの行動学的スクリーニングで見出した。本研究によりオレキシン神経が鎮痛効果発現のハブとなっていることが明らかになったため、オレキシン神経をターゲットとした麻酔下マウスを用いた電気生理学的手法により、鎮痛作用を持つ候補香をより効率的にスクリーニングすることが可能となった。ホルマリンテストを用いると1匹あたり1時間程度の時間を要し、また動物の学習効果等を勘案すると1匹あたり1つ

の匂い分子しか検証できない。一方、電気生理学的手法を用いると、1細胞あたり30程度の候補分子の応答を検証することが可能であり、また1匹あたり20程度の細胞の応答を記録することができる。この新しいスクリーニング法を用いることで、より鎮痛効果の高い香氣成分の分離同定が容易になることが予想される。

これまでに明らかになったodorant-X香氣誘発性鎮痛に関するデータをまとめた論文を執筆・投稿したところ、複数の査読者から機械的痛覚刺激に対する香氣誘発性鎮痛の効果を付け加えるべき、というコメントがついた。そこで古典的なvon Frey法により機械的痛覚刺激に対する応答閾値の測定を試みたが、香氣刺激後動物が安静状態に至るまでの経過時間にばらつきが大きく実験手法として不適当であることが判明した。そこで本申請で新たにpincher test装置を購入しコントロール実験を行った。その結果、非常に高安定度及び長時間分解能でマウスの機械的痛覚閾値の測定が可能であることが明らかになった。現在、pincher test装置により機械的痛覚刺激に対する香氣誘発性鎮痛の効果を検証中である。

5. 統 括

本助成による研究で、odorant-X誘発性鎮痛が視床下部オレキシン含有神経を介して発現することが明らかになった。しかしながら、嗅覚情報がどのような神経経路を介してオレキシン神経を活性化するか、あるいはオレキシン神経からの出力がどのような経路を介して実際鎮痛効果をもたらすのか、いまだに不明である。上述のc-Fos発現を指標に本申請者はオレキシン神経の上流、下流の神経回路の解明に取り掛かっており、いくつかの候補経路が見出されている。今後これらの経路の薬理学的、電気生理学的ブロックにより実際香氣誘発性鎮痛が遮断されるか検証する予定である。これら香氣誘発性鎮痛の神経回路を解明することにより、香氣誘発性鎮痛を臨床応用するための基礎データを得ることができる。また本研究によりodorant-Xはマウスに対して明らかな忌避性ストレス反応を引き起こすことがなく、odorant-X誘発性鎮痛はストレス誘発性鎮痛とは異なる機序で発現することが強く示唆された。これらの結果は香氣誘発性鎮痛の臨床応用へ大きな前進となり、機能性香氣研究の重要な手掛かりとなると予想される。

(文献)

- 1) Miyata M, Kashiwadani H, Fukaya M, et al: Role of thalamic phospholipase Cb4 mediated by metabotropic glutamate receptor type 1 in inflammatory pain, *J. Neurosci.*, 23, 8098-108, 2003
- 2) Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al: Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep

- regulation, *Cell* 98, 437-51, 1999
- 3) Hara J, Carsten TB, Nambu T, et al: Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity, *Neuron* 30:345-54, 2001
 - 4) Yonemitsu T, Kuroki C, Takahashi N, et al: TRPA1 detects environmental chemicals and induces avoidance behavior and arousal from sleep, *Sci. Rep.* 3, 3100, 2013
 - 5) Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, et al: Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb, *Nature* 450, 503-8, 2007
 - 6) Sakurai T: The role of orexin in motivated behaviors, *Nat. Rev. Neurosci.*15, 719-31, 2014
 - 7) Kuwaki T: Orexin links emotional stress to autonomic functions, *Auton. Neurosci.* 161, 20-7, 2011
 - 8) Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T: Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test, *Br. J. Pharmacol.* 137, 170-6, 2002
 - 9) Azhdari Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y, et al: Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats, *J. Pain* 12, 280-7, 2011