

## 学位論文題名

## The role of area postrema neurons expressing H-channels for the induction mechanism of nausea and vomiting

(Hチャネル活性を示す最後野ニューロンの化学受容性悪心・嘔吐誘発メカニズムにおける役割)

## 学位論文内容の要旨

## 【目的】

最後野は血液脳関門を欠く脳室周囲器官の一つであり、化学受容性嘔吐誘発域としてよく知られている。これまでに、電気生理学的手法を用いて単一ニューロンの興奮性の違いが調べられ、最後野ニューロンが3種類に大別されることが明らかにされていたが、これら3種類のいずれのニューロン群が悪心・嘔吐誘発に関与するのかについては未だ不明であった。そこで、本研究では最後野において最多数(約60%)を占める過分極作動性カチオンチャネル(Hチャネル)の活性を認めるニューロン群の悪心・嘔吐誘発メカニズムにおける役割を明らかにするために、催吐剤であるアポモルヒネによる条件付け味覚嫌悪(CTA:conditioned taste aversion)の獲得を指標にした行動学的解析とc-Fos発現を指標にした神経活動の解析を行った。

## 【材料と方法】

CTAを指標とした行動学的解析にはWistar系雄性成体ラット(250-350g)を用いた。23.5時間の絶水後、30分間の飲水トレーニングを7日間行った。サッカリンによる甘味を条件刺激とし塩酸アポモルヒネによる悪心誘発を無条件刺激とした。実験動物を以下の3つの群に分けた。第1群:0.1%サッカリン水溶液を30分間摂取させた直後に生理食塩水を腹腔内投与し、10分後に生理食塩水を皮下投与した群。第2群:サッカリン水溶液を30分間摂取させた直後に生理食塩水を腹腔内投与し、10分後に塩酸アポモルヒネ(5mg/kg)を皮下投与した群。第3群:サッカリン水溶液を30分間摂取させた直後にZD7288(Hチャネル阻害薬)を腹腔内投与し、10分後塩酸アポモルヒネを皮下投与した群。翌日は回復日とし、2日後全群において、蒸留水と0.1%サッカリン水溶液を別々に2本の給水瓶に入れて提示し、30分間の摂取量を測定し(2ボトル飲水テスト)、これを5日間行った。行動学的解析の後、最後野におけるc-Fosの発現を指標として、同部のニューロン活動を解析した。行動学的解析において用いた各群の条件付けプロトコールと同じ薬剤投与を行った実験動物に対して、薬剤投与の2時間後に4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて還流固定を行った。直後に脳幹を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液にてさらに1日浸漬固定を行い、続いて30%スクロースリン酸緩衝生理食塩液水(PBS)中に2日間保持し、凍結マイクロトームを用いて最後野を含む脳幹部の前額断切片(厚さ50 $\mu$ m)を作成した。作成した切片は、1%ヤギ正常血清を用いて非特異的抗原-抗体

反応が生じるのを阻害した後、35℃で一晩、抗 c-Fos 抗体 (SantaCruz Biotechnology Inc. rabbit polyclonal antibody, 1:5000) を反応させた。0.02 M PBS で洗浄後、Erite ABC kit (VectorLaboratories) を用いて、ビオチン化二次抗体反応に続いて ABC 試薬を反応させ、最後に 3,3'-diaminobenzidine (10 mg/50 ml, 0.0045% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) にて発色させた。切片を光学顕微鏡に接続した CCD カメラで撮影し、デジタル化した。Photoshop 5.5 (Adobe) を用いて、デジタル化した画像から最後野だけをトリミングした。次に、ImageJ (NIH) を用いて、トリミングした最後野内のコントラストの閾値を 75 にて調整し、c-Fos 陽性細胞を黒色として背景 (白色) との二値化を行い、黒色部分の数を c-Fos 陽性細胞数として算定し、ImageJ により計測した最後野全体の面積で除して、最後野の単位面積あたりの c-Fos 陽性細胞数を算出した。最後野の切片は一匹のラット脳から 12-15 枚作成できるが、最も多くの c-Fos 陽性細胞が検出された切片は最後野の尾側部 (Bregma -13.90 ~ -14.00 mm) に位置していた。このため、単位面積あたりの c-Fos 陽性細胞数が最多であった切片の値を個体の代表値とした。2 群間の比較には、Student's *t* test を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。3 群間の比較には、ANOVA を併用した多重比較 (tukey 法) 検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

#### 【結果と考察】

第 2 群では CTA 測定初日においてサッカリン溶液の摂取量が著しく減少し、第 1 群と比較して第 2 群のサッカリン選択率は有意に低い値となった ( $p < 0.05$ )。これは、アポモルヒネにより惹起された内臓不快感 (悪心) と、この直前に経験した新規呈味溶液である 0.1% サッカリンの甘味との連合学習が成立し、ラットがサッカリンに対する CTA を獲得した結果、サッカリン選択率が著しく低下したと考えられた。

第 3 群では、ZD7288 ( $10^{-3} \sim 10^{-6}$  mg/kg) は用量依存的に塩酸アポモルヒネによるサッカリン選択率の低下を抑制し、半数効果量 ( $ED_{50}$ ) は  $1.837 \times 10^{-5}$  mg/kg 体重と推定された。

このため以後の実験では ZD7288 ( $10^{-3}$  mg/kg) を用いた。第 3 群では、第 2 群と比較して CTA 測定初日のサッカリン選択率が有意に高く ( $p < 0.05$ )、第 1 群との間に有意差を認めなかった。これは、ZD7288 前投与により悪心誘発が抑制され、ラットが CTA を獲得しなかったためと考えられた。第 2 群の平均 c-Fos 陽性細胞数 ( $300.5 \pm 107.7$  個/mm<sup>2</sup>) は、第 1 群の平均 c-Fos 陽性細胞数 ( $8.3 \pm 6.7$  個/mm<sup>2</sup>) と比較して極めて高い値であり、多数のニューロンがアポモルヒネに応答して膜電位の脱分極が誘発されたことを示していた。そして、第 3 群亜群の平均 c-Fos 陽性細胞数は ( $151.2 \pm 100.3$  個/mm<sup>2</sup>) であり、第 2 群と比較して c-Fos 陽性細胞の発現は有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。ZD7288 がアポモルヒネ誘発の c-Fos 陽性細胞の発現を抑制した機序として、ZD7288 が、膜電位の脱分極を誘発するペースメーカーチャネルの機能を有する H チャネル活性を阻害することにより、最後野ニューロンの興奮性が低下したためであると考えられた。

#### 【結論】

本研究は H チャネル拮抗薬により悪心誘発が有意に抑制されることを行動学的実験によりはじめて示したものであり、最後野の H チャネル活性を示すニューロン群が悪心誘発に直接関与していることが明らかとなり、同ニューロン群の神経活動の有無により悪心・嘔吐誘発が制御されていることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 特任教授 戸 塚 靖 則  
副 査 教 授 船 橋 誠  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

## 学位論文題名

### The role of area postrema neurons expressing H-channels for the induction mechanism of nausea and vomiting

(Hチャネル活性を示す最後野ニューロンの化学受容性悪心・嘔吐誘発メカニズムにおける役割)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

本研究は過分極作動性カチオンチャンネル（Hチャンネル）活性を認めるニューロン群の悪心・嘔吐誘発メカニズムにおける役割を明らかにすることを目的に、催吐剤であるアポモルヒネによる条件付け味覚嫌悪(CTA)の獲得を指標にした行動学的解析ならびに c-Fos 発現を指標にした神経活動の解析を行ったものである。

Wistar 系雄性成体ラットを用い、サッカリンによる甘味を条件刺激、塩酸アポモルヒネによる悪心誘発を無条件刺激として、CTA を指標とした行動学的解析を行った。実験動物は、0.1%サッカリン水溶液を 30 分間摂取させた直後に生理食塩水を腹腔内投与し、10 分後に生理食塩水を皮下投与した第 1 群、同様に腹腔内に生理食塩水、皮下に塩酸アポモルヒネ (5mg/kg) を投与した第 2 群、腹腔内に ZD7288 (H チャンネル阻害薬)、皮下に塩酸アポモルヒネ投与した第 3 群の 3 群に分けた。処置 2 日後から 5 日間、全群において、別々に 2 本の給水瓶に入れた蒸留水と 0.1%サッカリン水溶液を 30 分間提示し、摂取量を測定した。

その結果、第 2 群で CTA 測定初日にサッカリン溶液の摂取量が著しく減少し、第 1 群と比較してサッカリン選択率は有意に低い値となることを示し、これはアポモルヒネにより惹起された内臓不快感とこの直前に経験したサッカリンの甘味との連合学習が成立し、ラットがサッカリンに対する CTA を獲得したことによるものと結論した。一方、第 3 群では、ZD7288 が用量依存的にサッカリン選択率の低下を抑制し、CTA 測定初日のサッカリン選択率は第 2 群に比べて有意に高く、第 1 群との間に有意差はないことを示し、これは ZD7288 前投与により悪心誘発が抑制され、ラットが CTA を獲得しなかったことによるものと結論した。

次に、最後野における c-Fos の発現を指標として、同部のニューロン活動を解析した。行動学的解析において用いた各群の条件付けプロトコールと同じ薬剤投与を行った実験動物に対して、薬剤投与の 2 時間後に還流固定し、通法に従って最後野を含む脳幹部の前額断切片 (厚さ 50  $\mu\text{m}$ ) を作成した後、免疫染色を行い、最後野の単位面積あたりの c-Fos 陽性細胞数を算出した。第 2 群の平均 c-Fos 陽性細胞数は第 1 群と比較して極めて高値であることを示し、多数のニューロンがアポモルヒネに応答して膜電位の脱分極が誘発されたことを明らかにした。一方、第 3 群では第 2 群と比較して c-Fos 陽性細胞の発現は有意に少ないことを示し、これは ZD7288 が H チャネル活性を阻害し、最後野ニューロンの興奮性を低下させたことによるものと結論した。

これらの結果は、最後野の H チャネル活性を示すニューロン群は悪心誘発に直接関与していること、ならびに H チャネル拮抗薬により悪心誘発が有意に抑制されることを示している。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、以下の通りである。

- 1) アポモルヒネによる条件付け味覚嫌悪の獲得はどのくらいの確率で起こるのか、
- 2) 最後野における c-Fos 陽性細胞の増加は何を意味しているのか、
- 3) 条件付け味覚嫌悪が回復するメカニズムについて、
- 4) 第 2 群と第 3 群における c-Fos 陽性細胞数の差は、行動学的解析の結果ほど明瞭ではない。このことからどのようなことが考えられるか、
- 5) ZD7288 は H チャネル特異的なのか、またその作用機序について、
- 6) シスプラチンによる嘔吐発現のメカニズムについて、
- 7) 血液脳関門において物質交換が制限されるメカニズムについて、

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的な回答が得られた。本研究は、H チャネル拮抗薬により悪心誘発が有意に抑制されることを行動学的実験で示し、さらに最後野の H チャネル活性を示すニューロン群が悪心誘発に直接関与し、同ニューロン群の神経活動の有無により悪心・嘔吐誘発が制御されていることを示した点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認められた。