

香りのなつかしきの神経メカニズム

福井大学医学部脳形態機能学分野

村田 航志

Olfaction is a unique sensory modality in that it can strongly bring memories back and induce physiological and psychological responses. Odor sensation associated with old memories often accompanies comfortable feelings. However, neural mechanisms of such emotional responses are still unclear. We recently reported that odor-induced attractive behaviors accompanies activation of the olfactory tubercle (OT) in mice. The anteromedial domain of the mouse OT was activated by learned odor cues that induced approach behaviors. In addition, a larger number of dopamine receptor D1 type neurons were activated than D2 type neurons. In this study, we addressed whether the D1 type neurons in the anteromedial OT is involved in attractive behaviors induced by odor cues associated with environment where mice spent infant period. We at first confirmed that mice acquired attractive behaviors to odors associated with bedding where they spent infant periods. Activation of D1 type neurons in the anteromedial OT was observed when mice showed approaching behavior to the odor cue associated with the bedding. We confirmed that optogenetic activation of D1 type neurons in the anteromedial OT induced real-time place preference. These results raise a possibility that the D1 type neurons in the anteromedial OT can be activated by environmental odors which mice experienced in infants and plays a role in attractive behaviors.

1. 緒言

母親が使っていた化粧品の香りには懐かしさや安心を感じるが、脳はいかにしてこの感覚をつくりだすのだろうか。匂いに対する情動的な反応に関わる脳領域として近年注目されているのが嗅結節である^{1,2)}。マウスを用いた我々の研究で、食べ物の在りかと関連づけた匂いに対する誘引行動には、嗅結節の前内側部のドーパミン受容体D1陽性ニューロンの活性化がともなうことがわかった³⁾。また、マウス嗅結節内側部は異性の尿に対する誘引行動に関わることが報告されている⁴⁾。嗅結節前内側部は匂いに対する広義の誘引的な質感形成に関わるのではないかと予想された。

本研究では母親に養育されたときに経験した匂いが成体期に誘引的な行動を引き起こす神経メカニズムへの嗅結節の関与を明らかにするため、以下の実験を行った。

1. 幼少期に経験した匂いに対する誘引的な行動が、ヒトだけではなくマウスでも見られるかを調べた。具体的には養育環境の違い（スギ・ヒノキ製床敷または紙製床敷）によるマウスのヒノキ精油への行動反応の違いを観察した。
2. ヒノキ精油に誘引行動を示すマウスで嗅結節の活性化が生じるかを評価した。
3. 活性化が見られた嗅結節神経回路をオプトジェネティ

クスの手法で操作し、誘引行動が生じるかを検証した。

2. 方法と結果

2.1. マウスにおける幼少期の養育環境臭の違いが成体期の匂い嗜好性に与える影響

実験に使うマウス (C57BL/6J 雄) はスギ・ヒノキ製チップの床敷で養育した群(スギ・ヒノキ群)と、ヒトが嗅いでも匂いのほとんどしない紙製チップの床敷(ペパークリーン、日本SLC)で養育した群(紙群)の2群を用意した。スギ・ヒノキ群は生後4-5週齢まで母親マウスとスギ・ヒノキ製おがくずを入れたケージで飼育し、4-5週齢の時点で紙製チップを入れたケージに母親から離し、同腹の雄同士で集団飼育した。紙群では妊娠期の母親マウスを紙製チップを入れたケージで飼育し出産、仔を養育させ、4-5週齢の時点で紙製チップを入れたケージに母親から離し、同腹の雄同士で集団飼育した。マウスはそれぞれ8-10週齢まで飼育し、行動試験を行った(図1A)。

行動試験は事前の実験環境への慣らし(day 1: habituation)をした後に、テストを行った(day 2: test) (図1B)。匂い嗜好性の測定試験では水とヒノキ精油、および酢酸アミルをマウスに提示した。脱脂綿に各物質を100%濃度で10 μ Lずつを染み込ませ、ステンレス製のメッシュ(18-8ボール茶漉4.5cm、ビクトリー)に脱脂綿を包み、匂い源を用意した。匂い源は透明なケージ(W175×D245×H125cm, TP-106 東洋理工)の右端中央に設置し、マウスをケージに移した後に3分間自由行動させた。3分間の自由行動後は一度マウスの行動をビデオ録画し、マウスが鼻先を匂い源から3cm以内に近づけてスニフリングする時間を実験者が目視で測定した(図1C)。day 1の実験環境の慣らしでは、同じ条件で水を提示し、10分間の自



Neural mechanisms of comfortable feeling induced by odors bringing back of memories

Koshi Murata

Division of Brain Structure and Function, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui

A

	4-5週齢まで母マウスとともに飼育		8-10週齢まで母マウスから離して飼育	
スギ・ヒノキ養育群	スギ・ヒノキ製チップ		紙製チップ	
紙養育群	紙製チップ		紙製チップ	

B

day 1: habituation

テストケージで水提示(10分)	インターバル(5分)	テストケージで水提示(10分)
-----------------	------------	-----------------

day 2: test

水 (慣らし)	インター バル	水 (テスト)	インター バル	ヒノキ オイル	インター バル	酢酸 アミル
------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----------

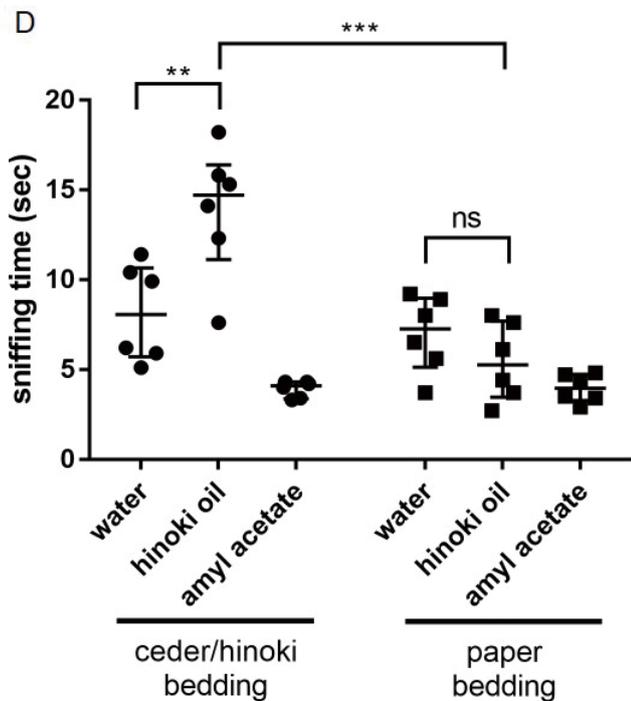


図1 養育環境の匂いに対する誘引行動の獲得
 A. 授乳期の養育環境が異なるマウスを2群用意した。片方はスギ・ヒノキ製床敷で飼育し、もう一方は紙製床敷で飼育した。B. 行動試験のスケジュール。C. マウスが匂い源に接近しスニフリングする様子。D. スニフリング時間の測定結果。

由行動を2回経験させた。

スギ・ヒノキ養育群が水よりも有意に長い時間ヒノキオイルの匂いを嗅いだのに対し、紙養育群ではそのような有意な増加は見られなかった(図1D)。対照実験として提示した酢酸アミルでは、どちらのマウス群も水に比べて時間が短い傾向が見られた。これらの結果は、養育環境の匂いに対して、成体期においてもその環境の匂いに対する誘引行動を示すことを支持する。

2. 2. ヒノキ精油に誘引行動を示すマウスにおける嗅結節の活性化

2. 1. と同様の手順でスギ・ヒノキ養育群のマウスに水またはヒノキ精油を提示し、30分後にペントバルビタールの腹腔内注射で麻酔し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。取り出した脳を凍結し、20mm厚の嗅結節切片を作製後、*in situ* hybridization法により最初期遺伝子 *c-fos* の発現応答およびドーパミン受容体D1の発現を観察

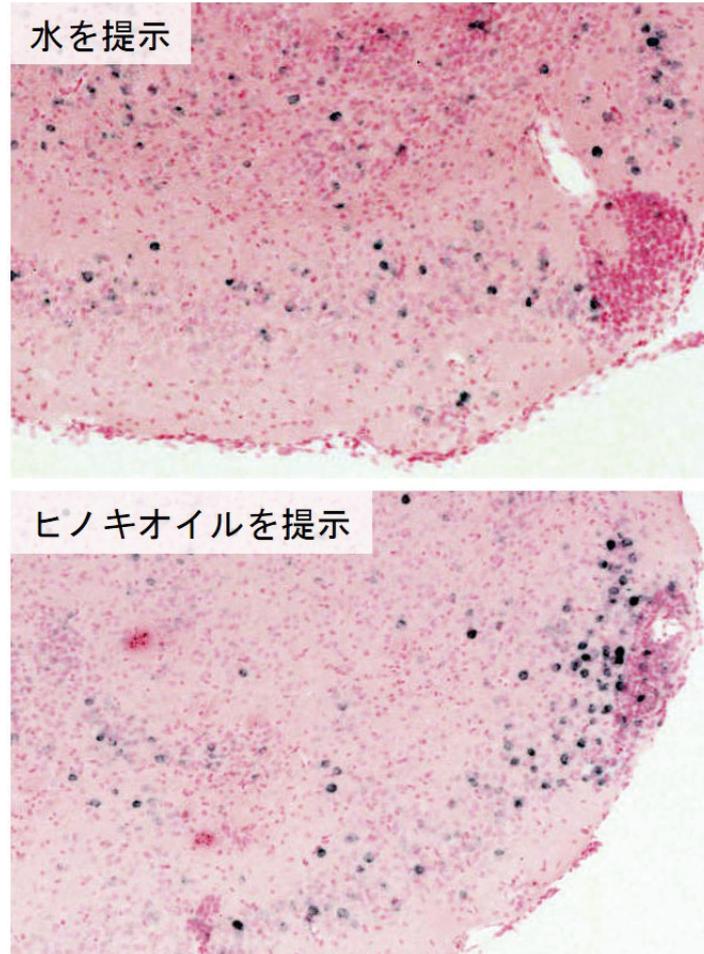


図2 ヒノキオイルに誘引行動を示したマウスの嗅結節前内側部のc-fos発現応答

した(図2)。養育時に嗅いだことのあるヒノキの匂いに対して誘引行動を示したマウスでは、嗅結節の前内側部D1ニューロンの活性化がともなった。

2.3. オプトジェネティクスによる嗅結節神経回路の操作と場所嗜好性試験

2.2. で神経細胞の活性化が見られた嗅結節前内側部のD1ニューロンが誘引的な行動に関わるかどうかを検証するためにオプトジェネティクス(optogenetics, 光遺伝学)を導入し、リアルタイム場所嗜好性試験によって誘引作用の有無を調べた⁵⁾。

オプトジェネティクスでは、神経細胞にチャンネルロドプシンという光感受性のイオンチャンネルを発現誘導し、脳内留置した光ファイバーによって青色光を照射することで特定の神経細胞群を操作することができる。嗅結節の神経細胞群の中でもD1ニューロンだけを操作するために、D1ニューロンがDNA組換え酵素であるCreを発現する遺伝子改変マウス(D1-Creマウス)を用いた。D1-Creマウスの

嗅結節前内側部にアデノ随伴ウイルスベクターを用いてCre依存的にチャンネルロドプシンを発現誘導した。同マウスの嗅結節前内側部に光ファイバーを慢性留置し、青色レーザー光源と接続し、D1ニューロンの操作を行った。

マウスの誘引行動の観察にはリアルタイム場所嗜好性試験を用いた。この試験では暗いチャンバーと明るいチャンバーを自由に行き来できる状況下で、マウスの嗅結節前内側部D1ニューロンを操作した。マウスは夜行性のため、通常は暗いチャンバーに長時間滞在する。明るい部屋に滞在している間、ニューロンを操作することで、通常は避ける明るいチャンバーの滞在時間が変化するかを検証した。ニューロンの操作をしない対照群としては、チャンネルロドプシンを発現させずに光ファイバーを嗅結節前内側部に留置したD1-Creマウスを用いた(図3)。

実験ではマウスを行動試験チャンバーに入れてから20分間自由に探索をさせた。前半の10分間は光照射をせず、後半の10分間は明るいチャンバー滞在時に光照射をした。前半では、チャンネルロドプシンを発現させたマウスと対照

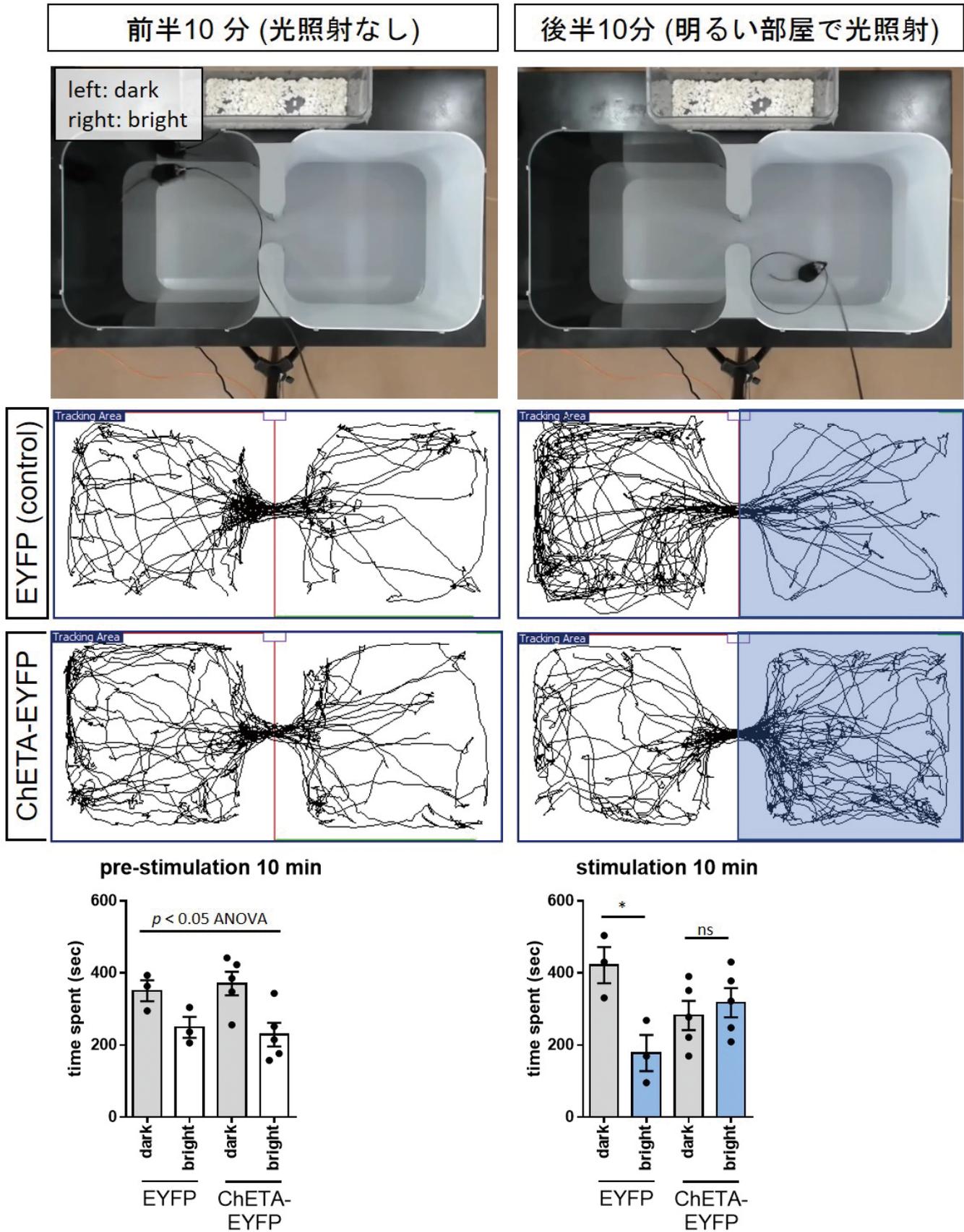


図3 嗅結節前内側部 D1 ニューロンの光操作による場所嗜好性の獲得

群マウスともに暗いチャンバーの滞在時間が明るいチャンバーの滞在時間よりも長かった。後半では、チャンネルロドプシン発現マウスでは明るいチャンバーの滞在時間が延びたのに対し、対照群マウスではそのような明るいチャンバーの滞在時間の延長は見られなかった。この結果から、嗅結節前内側部D1ニューロンの神経活動は、マウスに対して誘引的に作用することがわかった。

3. 考察

スギ・ヒノキチップで養育されたマウスはヒノキオイルに誘引行動を示し、その誘引行動には嗅結節の活性化がともなった。活性化が見られた嗅結節前内側部D1ニューロンをオプトジェネティクスによって操作すると、マウスは誘引行動を獲得した。嗅結節は、えさの匂いに対する誘引行動だけではなく、幼少期に経験した匂いに対する誘引性など、より広義な香りの誘引性に関わる可能性が示唆された。母親から養育を受けた環境は動物にとって安全な環境であり、嗅結節を介してその環境の匂いに対して誘引的な情動を生じさせるのかもしれない。

4. 総括

様々な情動的要素をともなう香りの質感は、どのようにして脳で作りだされるのかはよくわかっていなかった。最近の嗅覚生物学および神経科学的手法の発展により、ようやく手がかりがつかめてきた。今回の研究期間でできなかった実験として、1つは養育環境の匂いを紙製チップに人為的につけ(例：酢酸アミル)、成体期でその匂いに対する誘引行動を評価する実験が挙げられる。もう1つは、嗅結節の機能の阻害実験で、幼少期の養育環境の匂いに対す

る誘引行動への嗅結節の必要性を検証したい。本研究の今後の発展により、嗅覚が誘引的な意欲・情動を直接的に引き起こす神経メカニズムが明らかになり、今後の化粧品香料の開発に役立つデータを提供できると期待される。

(引用文献)

- 1) Yamaguchi M. (2017) Functional Sub-Circuits of the Olfactory System Viewed from the Olfactory Bulb and the Olfactory Tubercle. *Front Neuroanat.* 2017 Apr 11;11:33.
- 2) Wesson DW, Wilson DA. (2011) Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: hedonics, sensory integration, and more? *Neurosci Biobehav Rev.* 2011 Jan;35 (3): 655-68.
- 3) Murata K, Kanno M, Ieki N, Mori K, Yamaguchi M. (2015) Mapping of Learned Odor-Induced Motivated Behaviors in the Mouse Olfactory Tubercle. *J Neurosci.* 2015 Jul 22;35 (29):10581-99.
- 4) DiBenedictis BT, Olugbemi AO, Baum MJ, Cherry JA. (2015) DREADD-Induced Silencing of the Medial Olfactory Tubercle Disrupts the Preference of Female Mice for Opposite-Sex Chemosignals. *eNeuro.* 2015 Sep 22;2 (5). pii: ENEURO.0078-15.2015.
- 5) Zhang Z, Liu Q, Wen P, Zhang J, Rao X, Zhou Z, Zhang H, He X, Li J, Zhou Z, Xu X, Zhang X, Luo R, Lv G, Li H, Cao P, Wang L, Xu F. Activation of the dopaminergic pathway from VTA to the medial olfactory tubercle generates odor-preference and reward. *Elife.* 2017 Dec 18;6. pii: e25423.