

嗅覚による油の感知メカニズムの解明と 脂質異常症の治療への応用

高橋 弘雄

奈良県立医科大学先端医学研究機構脳神経システム医科学分野 助教

緒 言

食生活の変化に伴い、油の過剰摂取は、肥満や動脈硬化などの生活習慣病の原因として、大きな社会問題の1つとなっている。油を感知するメカニズムの解明は、油への嗜好性を抑え、その摂取量を調節する方法を知るためにも極めて重要である。興味深いことに、マウスは植物油に対して強い嗜好性を示すことが明らかにされており¹⁾、これまでに、味覚により油を感知するメカニズムの存在が、複数のグループから報告されている。Laugereffeらは、味覚の受容器である味蕾で、植物油を構成する脂肪酸のトランスポーターであるCD36が発現することを見出している²⁾。またCD36欠損マウスではリノール酸や大豆油に対する嗜好性が顕著に低下することが明らかとなっている³⁾。さらに、中鎖・長鎖脂肪酸を受容するGタンパク共役受容体GPR40およびGPR120が味蕾で発現し、植物油に含まれるリノール酸やオレイン酸などの脂肪酸を感知して、油に対する嗜好性に関与することも報告されている⁴⁾。一方、嗅覚により油を感知するメカニズムに関しては、これまでほとんど研究されていない。そこで本研究では、マウスの嗅覚による油の感知機構に着目して研究を行った。嗜好性テストを行い、マウスが嗅覚により植物油の匂い誘引されることを明らかとした。

実験方法

1. 匂いの嗜好性実験

行動実験には、ICR系統の1.5~2ヵ月齢の雄マウスを用いた。匂いの嗜好性実験は、以下の論文の方法に若干の変更を加えて行った⁵⁾。マウスを新規環境に慣れさせるために、少量の餌と水を備えた床敷のないケージ(D31×W25×H12.5 cm)にマウスを1匹ずつ入れ、30分ごとに4回新しいケージに交換した(合計2時間)。その後、匂い物質をセットした床敷のない新規のテストケージにマウスを移し、3分間のマウスの行動を観察し

た(図1)。匂いの提示方法として、底から1 cmの高さで切ったエッペンドルフチューブにろ紙(4 cm²)を入れ、匂い物質40 μLをろ紙に含ませて壁に固定した(図1; 拡大写真)。マウスがチューブの断面に鼻先を持っていった時間を探索時間と定義し、3分間の探索時間を計測した。絶飲絶食での匂いの嗜好性実験の場合には、ケージ順応時間に餌と水を除き、マウスを絶飲絶食状態とした。その後、上記と同様の手順で匂いの探索時間の測定を行った。

2. 嗅覚喪失マウスを用いた匂いの嗜好性実験

ZnSO₄処理による嗅覚喪失マウスの作製は、以下の論文を参考に行った⁶⁾。マウスの腹腔内にpentobarbital



図1 匂いの嗜好性実験

嗅覚と味覚の効果を分離するために、マウスが直接匂い物質に触れることができないよう、底を1 cm切ったエッペンドルフチューブに匂い物質を含ませたる紙を入れた。匂い物質を入れたチューブは、マウスが動かせないようにダブルクリップを用いてケージの壁面に固定した。

(50 mg/kg) を注射して麻酔した後、両鼻孔にそれぞれ 5% ZnSO₄/PBS を 50 μL ずつ注入した。ZnSO₄ 処理日から 1 日の回復を待ち、マウスの嗅覚機能が喪失していることを嗅覚判定テスト⁷⁾により確認した (ZnSO₄ 処理後、2 日目)。翌日 (ZnSO₄ 処理後 3 日目) に嗅覚喪失マウスを用いて、絶飲絶食での匂いの嗜好性実験を行った。

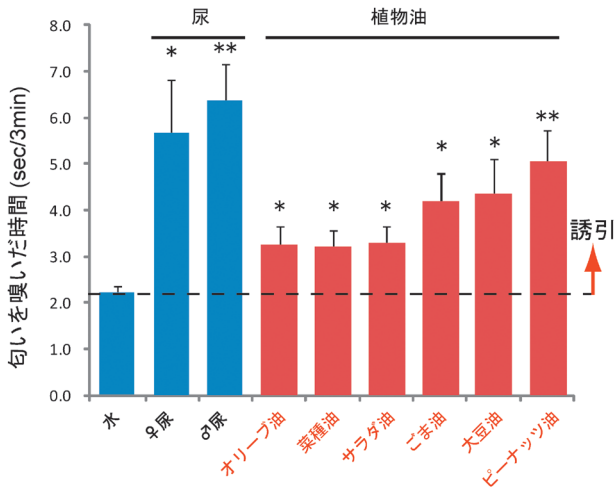


図2 油の匂いに対する嗜好性実験

さまざまな物質に対するマウスの探索時間を測定した。その結果、植物油の匂いにマウスが誘引されることが明らかとなった。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (水と比較)

結 果

1. マウスの油の匂いに対する嗜好性

味覚と嗅覚の影響を区別するため、マウスが直接匂い物質に触れることができないように、匂い物質をエッペンドリフチューブに入れて提示するという実験系を確立した (図1)。水の入ったチューブの匂いを嗅いだ時間 (探索時間) をコントロールとし、それよりも探索時間が長ければ、マウスが嗜好性を示す匂いであると定義した。マウスへの誘引作用が報告されているマウス尿を用いて⁸⁾、匂いの嗜好性実験を行った結果、雄雌どちらの尿に対しても、雄マウスの探索時間は水と比較して有意に増加した (図2)。そこで、さまざまな種類の植物油に対するマウスの反応を検討した。サラダ油や大豆油、ピーナッツ油など、実験に用いた植物油のすべてにおいて、コントロールと比較して 1.5~2.5 倍程度の探索時間の増加が見られた (図2)。また、あまに油などの植物油でも、同様の誘引効果が観察された。これらの結果から、すべての植物油に共通する匂いの成分の中に、マウスを惹き付ける匂い物質が存在することが示唆された。

2. 絶飲絶食条件下での油の匂いに対する嗜好性

マウスが植物油に惹き付けられる理由として、普段食べている餌に植物油が含まれるからであると予想され

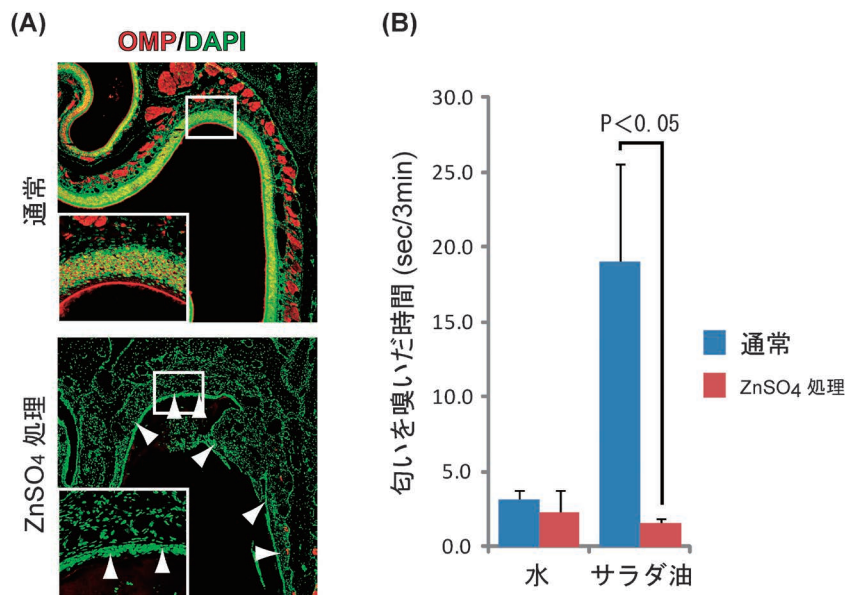


図3 嗅覚喪失マウスを用いた匂いの嗜好性実験

(A) 嗅覚喪失マウスの嗅上皮における OMP (嗅細胞マーカー) による抗体染色。ZnSO₄ 処理により嗅細胞が死滅していることがわかる (白矢頭)。(B) 嗅覚喪失マウスは、通常のマウスと比較して油への探索時間が有意に減少した。マウスが嗅覚により油へ誘引されることが示唆された。

る。マウスの餌は、デキストリンやガゼイン、ショ糖、コーンオイル、ラードなどを原料としており（日本SLC株式会社）、これらには植物油の成分が含まれている。そこで、絶飲絶食状態にしたマウスにおいて、油への嗜好性を検討した。その結果、通常条件に比べて絶飲絶食条件下では、植物油であるサラダ油に対する探索時間が、およそ6倍に増加した（通常条件 3.29 ± 0.37 s、絶飲絶食条件 19.00 ± 6.53 s）。これら結果から、マウスはサラダ油の匂いを餌の匂いとして認識しているものと考えられる。

3. 嗅覚喪失マウスを用いた匂いの嗜好性実験

著者らが行った匂いの嗜好性実験系が、味覚を排除した、嗅覚による嗜好性を調べているのか？ という点について、嗅覚喪失マウスを用いて検討した。鼻孔内に $ZnSO_4$ を注入することにより、嗅細胞を死滅させ、嗅覚喪失マウスを作製した^{6,9)}。通常マウスと嗅覚喪失マウスを用いて、絶飲絶食条件下において匂いの嗜好性実験を行い、両者の行動を比較した。その結果、サラダ油に対する探索時間が、 $ZnSO_4$ 処理群では非処理群に比べて有意に短くなった（図3B；通常条件 3.29 ± 0.37 s、嗅覚喪失マウス 1.79 ± 0.69 s）。一方、コントロールの水に対する探索時間は、通常マウスと嗅覚喪失マウスとの間で有意な差が見られなかった（図3B；通常マウス 2.21 ± 0.14 s、嗅覚喪失マウス 2.30 ± 1.41 s）。匂いの嗜好性実験の後、嗅細胞のマーカーであるOMPに対する抗体染色を行って、 $ZnSO_4$ 処理群ではOMPのシグナルが消失し、DAPIにより染色される嗅上皮の層構造自体も薄くなっていることを確認した（図3A）。以上の結果から、本実験系における植物油による誘引作用が、確かに嗅覚に依存したものであることが明らかとなった。

4. 嗅上皮において植物油の感知に関与するニューロン

匂いは、嗅上皮の嗅細胞で識別される。そこで、マウスが嗜好性を示した植物油の構成成分であるオレイン酸をマウスに嗅がせて、嗅上皮における神経活動のマーカーであるZif268の発現を検討した。その結果、主に嗅上皮の腹側の領域において、OMP陽性の嗅細胞の一部でZif268のシグナルが見られた。以上の結果から、嗅上

皮の主に腹側の領域に、オレイン酸の匂いに反応する嗅細胞が存在することが明らかとなった。

考 察

本研究において、マウスは多くの植物油の匂いに嗜好性を示すことから、植物油に含まれる共通の構成成分に誘引されているものと予想される。興味深いことに、植物油に多く含まれるオレイン酸により、嗅上皮の腹側領域の嗅細胞の活性化が見られた。匂いによる先天性な忌避行動には、嗅上皮の背側領域により感知されることがこれまでに報告されているが⁵⁾、本研究により、嗅上皮の腹側領域にある嗅細胞の活性化が、マウスの誘引行動を惹起する可能性が示唆された。今後、嗅覚により油を感じるメカニズムを解明することにより、油への嗜好性を抑え、脂質代謝異常などの治療に繋がるよう研究を進めていきたい。

要 約

本研究により、マウスは植物油の匂いに嗜好性を示すことが明らかとなった。また、絶飲絶食状態におかれたマウスは、植物油の匂いに強く誘引されることから、嗅覚による油の探知は餌の探索に関与していると考えられる。嗅覚喪失マウスでは、植物油の匂いによる誘引効果は見られなくなることから、嗅覚による油の匂いの感知が、マウスの誘引行動を惹起することがわかった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) M. Takeda, et al.: *Life Sci.*, **67**, 197–204, 2000.
- 2) F. Laugerette, et al.: *J. Clin. Invest.*, **115**, 3177–3184, 2005.
- 3) A. Scalfani, et al.: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, 1823–1832, 2007.
- 4) C. Cartoni, et al.: *J. Neurosci.*, **30**, 8376–8382, 2010.
- 5) K. Kobayakawa, et al.: *Nature*, **450**, 503–508, 2007.
- 6) K. McBride, et al.: *Chem. Senses*, **28**, 659–670, 2003.
- 7) M. Takeda, et al.: *Life Sci.*, **69**, 847–854, 2001.
- 8) J. Weiss, et al.: *Nature*, **472**, 186–190, 2011.
- 9) N. S. Nadi, et al.: *Brain Res.*, **213**, 365–377, 1981.