

高温環境下におけるペパーミントの香りがラットのストレス応答に与える影響

北條 梢 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 久野 節二 (筑波大学 医学医療系)

背景・目的

特定の嗅覚刺激(レモン、ラベンダー、お茶などの香り)の受容が拘束ストレスを負荷されたラットのストレス応答を抑制することが報告されている。また、高温環境下の拘束ストレス負荷では、局所性の低温刺激提示によりストレス応答が減弱することが示されている。これらの事実をもとに、本研究では、ペパーミント香を心地よい香り(嗅覚)および冷感刺激(体性感覚)として捉え、その受容が高温環境下でのストレスを和らげるのではないかと考え、実験を行った。

ストレス応答を表出する中枢機構は、視床下部-下垂体-副腎皮質軸(HPA)である。生体はストレスを受けると、視床下部の室傍核ニューロンが正中隆起から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンを放出し、下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモンの分泌を促進させ、最終的に、副腎皮質から糖質コルチコイド(ラットではコルチコステロン)が放出される。室傍核は、神経構築的には大細胞性垂核(pm)と小細胞性垂核に大別され、後者は正中隆起に投射し、HPAの制御に関わる内側小細胞性垂核背側部(mpd)と脳幹および脊髄に投射して自律神経活動を制御する内側小細胞性垂核腹側部(mpv)と背側小細胞性垂核(dp)に細区分される。また、拘束ストレス負荷により室傍核ニューロンが興奮し、ストレス誘導性神経活性マーカータンパク質のc-Fosを発現することがよく知られている。本研究では、ストレス応答に対するペパーミント香の提示効果について、室傍核全域と各垂核におけるc-Fos発現ニューロン数を計測し、定量形態学的に解析した。

方法

Sprague-Dawley系成熟雄ラット(7週齢、日本クレア)を購入し、約1週間、通常の飼育環境(室温約23°C、12/12時間明暗周期(08:00点灯、20:00消灯)、自由摂食・飲水)に順化させたあと、本実験に用いた。実験時の体重は270-310gであった。

○拘束ストレス下での香り提示実験

ラットを2群に分け、各個体に室温33.0±1.0°Cの環境で30分間拘束ストレスを負荷すると同時に、空気ポンベから気流(流速4L/min)を提示した。嗅覚刺激提示群(n=5)にはペパーミント(50µl水溶液)の香りを含む空気を、対照群(n=5)には空気のみを提示し、実験終了後、飼育ゲージに戻した。実験は、08:00-10:00の間に行った。拘束ストレス負荷は、Sanadaら(2013)の方法を参考に、簡詰め方式で行った。

○組織の固定と切片作成

拘束ストレス開始120分後にザンボニ変法液による経心性灌流固定を行い、脳を採取した。視床下部を切り出し、脱水・透徹後、パラフィン包埋し、室傍核を含む5µm厚の前頭断連続切片を作成した。

○免疫組織化学染色

ウサギポリクロナール抗体(Biologend San Diego, CA)を用いて、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合法によりc-Fosの免疫染色を行った。室傍核組織の顕微鏡画像を撮影し、Photoshopを用いてバックグラウンドを標準化したあと、Image J(National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いてc-Fos陽性細胞数を自動計測した。1個体当たり隣接切片2枚を計測し、平均値を評価に用いた。

結果

対照群(Fig.1左)と嗅覚刺激提示群(Fig.1右)の両者で、室傍核小細胞性垂核のdp、mpdおよびmpvにおいてc-Fos陽性細胞が認められたが、細胞数は前者の方が少ない印象があった。形態計測により、室傍核全体およびmpdの陽性細胞が対照群より嗅覚刺激提示群で有意に多いことが示された(Fig.2)。

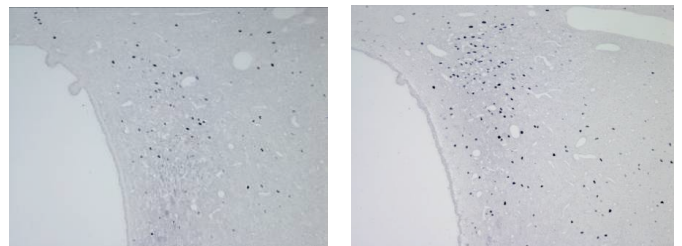


Figure 1: 室傍核におけるc-Fosの免疫染色 (左:対照群、右:嗅覚刺激提示群)

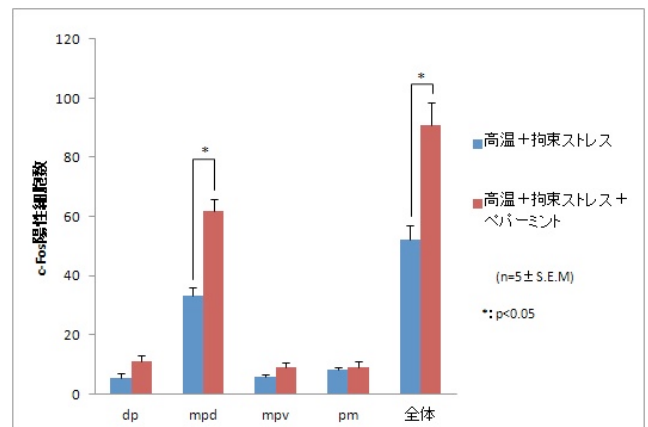


Figure 2: 室傍核におけるc-Fos陽性細胞数

考察

ペパーミント香の提示による陽性細胞数の増加は、この香りがラットでストレス応答を増強させる効果を持つことを示唆している。また、室傍核には拘束ストレスとは異なる種類のストレス要因に応答するニューロンが存在することを示している。今回の実験では、香りが強すぎたことで、ラットが「清涼感」を感じることなく、嗅覚刺激が逆にストレス要因として作用した可能性も考えられる。今後は、提示する匂い物質の濃度に関して、より詳細な検討を行い、同様の実験を行う必要がある。