

嫌悪記憶を指標としたショウジョウバエの痛み様感覚の検討

桑原 舞衣 (筑波大学 生物学類)

指導教員：本庄 賢 (筑波大学 生命環境系)

【背景】

昆虫もヒトと同じく「痛み」を感じるのだろうか？本研究の目的は高度な遺伝学的ツールを持つキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いてその答えを得ることである。

現在もっとも広く受け入れられている国際疼痛学会による痛みの定義によれば痛みは "An unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage. (実際にはまたは潜在的に存在する組織の損傷やそうした損傷を示す言葉で表現される不快な感覚, あるいは不快な情動体験)" であるとされている (IASP, 1979)。しかし、この定義は主観に依存しており、言葉による意思疎通の困難な乳児やヒト以外の動物において痛みの存在を検証することは難しい。動物モデルを用いた痛覚研究においては「侵害受容」という、 "The neural process of encoding noxious stimuli. (有害刺激の情報処理に関わる神経プロセス) (IASP, 1979) " と定義される客観的な概念を用いることでこの問題を回避しているが、ヒト以外の動物に痛みが存在するのことは長らく議論が続いている (Sneddon et al, 2014, Rose et al, 2014)。

先行研究により、脳神経構造がヒトに近い哺乳動物においては痛覚刺激によって活性化される脳領域が共通であることなどから痛みを感じていると既に推定されている (Sneddon et al, 2014)。しかし哺乳動物以外の動物、特に脳神経構造のヒトとの共通性があまり見られない無脊椎動物について痛みの議論はこれほど進んでいない。

Elwood らは無脊椎動物であるヤドカリに電気ショックを与えると、その条件を学習して回避するようになることを示した。彼らはこの嫌悪記憶の形成を、無脊椎動物が侵害性の刺激により不快な感覚を体験する、すなわち痛みが存在する証拠であるとした (Elwood, 2011)。確かに、侵害性の刺激により嫌悪記憶が形成されるならば、それは「侵害性の刺激による不快な情動体験」すなわち痛みとして捉えられる。しかしこの実験のみでは無脊椎動物に痛みがあると断定はできない。電気ショックは侵害受容以外の感覚受容も引き起こしうるため嫌悪記憶が本当に侵害性刺激と結びついたものか、この行動レベルの実験からは判断できないからだ。

そこで本研究では遺伝学的ツールによって上記の問題を解決するため、高度な遺伝学的ツールが利用できるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用い、無脊椎動物に「侵害性の刺激による不快な情動体験」というヒトにおける痛みに近い感覚プロセスがあるかどうかの検証を目指す。

一般に動物愛護において無脊椎動物はその対象から除外されている。無脊椎動物に痛みの機構が備わっているか否かを知ることは、動物愛護の観点からも重要な意味をもつだろう。

【方法】

・温度遺伝学による侵害受容ニューロンの人為的刺激

自然な侵害刺激を与えた場合に活性化される感覚系を網羅的に調べることは困難である。そのため本研究では温度遺伝学的手法に

よって特定のニューロンを人為的に興奮させることで侵害受容を発生させることにした。

GAL4/UAS システムは酵母転写因子とその標的配列に由来する組織特異的な遺伝子強制発現システムである (図 1)。これを用いて幼虫の侵害受容器と同定されている class IVニューロンに、30°C前後の熱に応答して開くチャネル dTRPA1 を発現し、30°Cの条件下において人為的に侵害受容ニューロンに刺激が加わるシステムを作成した。

・侵害受容ニューロンの人為的刺激と匂いの連合学習

本実験の目的は「侵害受容による不快な情動体験」が生じるか検証することである。そこで、先行研究 (Honda et al, 2014) に基づいて上記の手法で引き起こした侵害受容と匂いと連合学習を行い、その後匂いに対する走化性がどう変化するかを調べた。

シャーレのフタにろ紙を貼り付け、におい刺激となる Ethyl Acetate (EA) をろ紙に滴下した。dTRPA1 が応答する温度である 30°C に温めたゲル上にショウジョウバエ 3 齢後期幼虫を置き、即座にフタを閉めて 1 分放置した。これにより侵害刺激とにおい刺激が同時に与えられることになり、連合学習が生じると考えられる。

次に試験用紙 (図 2 参照) の上にシャーレを置き、その両端にマイクロチューブのフタを台としてろ紙を置いた。シャーレの中央に学習処理を終えたショウジョウバエ幼虫を置き、ろ紙の片方のみ EA を滴下して 3 分間自由運動をさせた。各領域に含まれる幼虫の数を数え、以下の式に当てはめ、匂いに対する反応を数値化した。

$$Response\ Index(RI) = \frac{N_{odor} - N_{ctrl}}{N_{odor} + N_{ctrl}}$$

N_{odor} : 匂い刺激のある領域にいた幼虫の数

N_{ctrl} : 匂い刺激のない (コントロールの) 領域にいた幼虫の数

RI の数値は、1 に近づくほど匂い刺激に対して正の走化性が、-1 に近づくほど負の走化性があることを示す。

もしも温度遺伝学的な侵害受容の発生と匂いの連合学習によって嫌悪記憶が形成されるならば、連合学習後の幼虫の RI はコントロールに比べて有意に減少すると考えられる。

【結果と考察】

これまでに学習に関して学習時間や温度の条件検討を行っている。詳細は発表会にて示す。

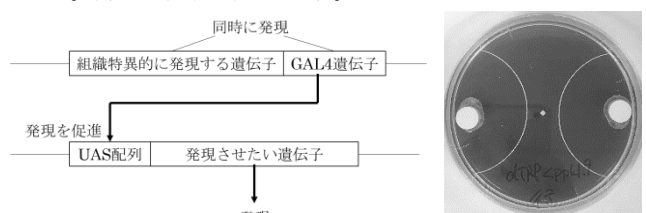


図 1 UAS/GAL4 システム

図 2 行動試験用紙