

〔総説〕

哺乳動物の嗅覚による個体識別と誘引効果について

長田 和実, 和泉 博之

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野

Mammalian odour communications: attraction and individual recognition

Kazumi OSADA & Hiroshi IZUMI

Division of Physiology, Department of Oral Biology, Health Sciences University of Hokkaido, Hokkaido, Japan

Abstract

Mammalian social organizations rely on signals passed between individuals to convey information about sex, reproductive status, individual identity, competitive ability and age. It is generally believed that each of these characteristics must be relatively stable over a considerable time period in an individual animal in order to influence body odors so that the individual can be recognized in multiple behavioral and social contexts. In addition, there is considerable evidence to suggest that short-term fluctuations in body odor can be caused by diet; however, no previous studies have demonstrated that specific compounds can directly mask or alter mouse urinary odors when ingested, and thus been an agent in altering another animal's behavior. This article aims to review the nature of chemosensory cues and behavioral experiments including our recent progress with such studies, specifically considering, 1) the identification of attractive volatiles in aged male mouse urine, 2) the effect of puberty on female attraction in rats, 3) odour types for major histocompatibility complex as determined by body odour: relationships among mutations of MHC and chemical composition, and behavior, and 4) alterations of mouse urinary chemosignals as a result of ingestion of xenobiotic aromatic compounds.

第1章：緒言

嗅覚を表現する名詞は種類が多い。表1には日本語と英語の「におい」を現す単語を一覧にしたものである。日本語ではにおいに対する我々の感じ方の善し悪しを反映して「かおり」と「におい」に大別されるが、漢字が異なる表現がある。英語の方はさらに言葉が多く、最上の芳香を現すfragranceやperfumeから中庸の匂いを示すscentやodourさらに最悪の臭いを意味するfoetor, stinkまで、より細かく表現が別れているようである。嗅覚は一次中枢が大脳辺縁系にあり、情動や記憶に直接関与する感覚であることが解剖生理学的にも理解され、ヒトのQOLの向上の観点から嗅覚の影響はきわめて大きい。人を含む哺乳動物はその名の通り、母親による手厚い育児管理を行うのが特徴である。その結果、親子の強固な

表1：においを表す単語

日本語	英語
• 香り	• Fragrance
• 薰り	• Perfume
• 匂い	• Aroma
• におい	• Scent
• 臭い	• Odour (odor)
• 悪臭	• Smell
	• Whiff
	• Stench
	• Foetor
	• Stink

絆が形成され、母親は我が子を他の個体と区別して特別な援助を施す。この特有のライフスタイルによって、複雑な社会システムの中で個体を正確に識別、認識する能力が進化し、現在の種族の繁栄の原動力となっている。個体の認識は、個人やグループを認識し、配偶者を守り、巣や食料のある場所を確認し、そして侵入者の認知

受付：平成22年9月30日

とグループからの排除など、いわゆる縄張り行動の基礎となる。それはさらに配偶者の選択にも波及し、配偶者となりうる個体の適性を知る能力は近親交配を低下させ、子孫の適応度を高める（特に競争的な自然環境下で）ことに大いに役立つ（Meagher et al., 2000）。

特定の個体を見出すときには様々な感覚情報を使う。たとえば視覚による顔つきなどの物理的な形態の認識や、クジラの歌声やヒトの会話など聴覚による情報もある。しかしながら、ほとんどの哺乳動物では嗅覚が主要な感覚であり、その行動は同種個体によって分泌される社会的化学信号に大きく影響される（Brennan & Kendrick 2006）。

哺乳動物は、フェロモンのような特異的な化学シグナルや代謝中間体など、様々な化学物質を環境中に放出している。それらの範囲は揮発性の小分子から大分子量のタンパク質におよび、尿、糞、皮膚の分泌物、生殖器や特別な分泌腺など様々なルートで放出される。これらの化学物質は性別、年齢、健康状態や性周期など豊富な情報を伝える。たとえば、ブタの唾液中に分泌される5- α -androst-16-en-3-one, 5- α -androst-16-en-3-ol, は性行動の誘発を引き起こす古典的なフェロモンとして知られる（Brennan & Keverne 2004）。これらのステロイド化合物は揮発性であり、雌豚の主嗅覚系に遠隔性に作用し、ロドーシスなど交配の相手を受け入れる行動をとる（Dorries et al., 1997）。一方、主要組織適合性抗原複合体（MHC）のハプロタイプの違いにより付与されるいわゆるにおい型（odour type）を決める揮発性化合物はきわめて複雑な混合物により形成されている（Singer et al., 1997; Willse et al., 2005; Kwak et al., 2008）。

本稿では、哺乳動物の化学コミュニケーションの近年の進展を紹介することを目的として、1) マウスの老臭と加齢フェロモンの正体とその作用について、2) ラットの思春期に現れるフェロモンの正体と異性に対する誘引性について、3) MHCの突然変異とその揮発性のシグナルの変化について、4) これら動物の化学シグナルに対する食物など外因性の化合物の摂取の影響について、近年の我々の一連の研究成果もふまえて順次解説する。

第2章：老齢動物の匂いと加齢フェロモンの正体について

加齢は多くの生体組織・機能に対し、退行的変化をもたらすが、体臭もその例外ではない。ヒトにおける以前の報告では体表面での抗酸化作用の衰えより脂質の酸化分解が進み、ノネナールが生成し、加齢臭の原因とされ

た（Haze et al., 2001）。ノネナールは高齢者の汗中に多く含まれるバルミトオレイン酸より生成されるという（Nazzaro-Porro et al., 1979）。その後若者の汗中にも見られるとの反論や（Curran et al., 2005）皮膚表面からはノネナールは見いだせないなどの報告もあり（Gallagher et al., 2008）加齢臭の原因についての真偽の程は定かではない。しかしこのような加齢に伴い、抗酸化作用などの生理機能の低下を反映する代謝物が、老齢動物ののにおいに影響を与える可能性は十分に考えられる。

一方、野ネズミなどの野生動物の行動学的研究によれば、雌は高齢の雄をむしろ好んで交配すると報告されている（Manning 1985; Kokko & Lindstrom 1996; Brooks & Kemp 2001）。高齢に達するまで生き延びた野生動物は、長時間生き抜くための知恵と体力があることを体現している。すなわち、高齢動物は優れた遺伝子の表現系そのものであり、異性は自分の遺伝子を効率よく残すために高齢のマウスの方を選択すると考えられている（Trivers 1972; Halliday 1978, 1983; Anderson 1994）。相方の年齢を推定する際にヒトでは、主に視覚認識によるところが大きいですが、ネズミなどの嗅覚の発達した動物では、特に社会的あるいは性的関係の調節要因としては、嗅覚がより重要な意味を持つ。すなわち、動物にはその個体の年齢を反映するにおいがあり、それをかぎ分ける能力を持っていることが予想される。例えばFerkin (1999) は、野生のカヤネズミ（meadow vole）は雌雄共に自分たちと同一種の、年配の相方ののにおいに惹かれると報告している。また動物園のチンパンジーの行動観察によれば、若い雄は同年代の雌よりも年上の雌と交尾したがる傾向がある（Muller et al., 2006）。

加齢に伴う体臭の変化を示す動物行動学的報告に加え、その化学分析に関する報告もある。Robinsonら（1976, 1980）はSwiss Websterマウスの尿中成分の加齢変化について研究しており、2種類の不飽和炭化水素、3-hydroxy-3-methylbutene, trans-3-hepten-2-oneが加齢に伴い増加すると報告しているが、異性に対する誘引性との関連については不明である。同様に、Muller-Schwarze（1971）は、クロオジカの腺盤腺から分泌される揮発性化合物の組成が思春期前と成体では異なっていること、またGoodrich & Mykytowycz（1972）はウサギの肛門腺分泌物のにおいと薄層クロマトグラムのパターンが加齢に伴い変化することを報告している。

我々は以前に、分析化学的手法と併用したY字型迷路（Yamazaki et al., 1979; Yamaguchi et al., 1981）による一連のにおい識別パラダイムにより、実験動物である近交

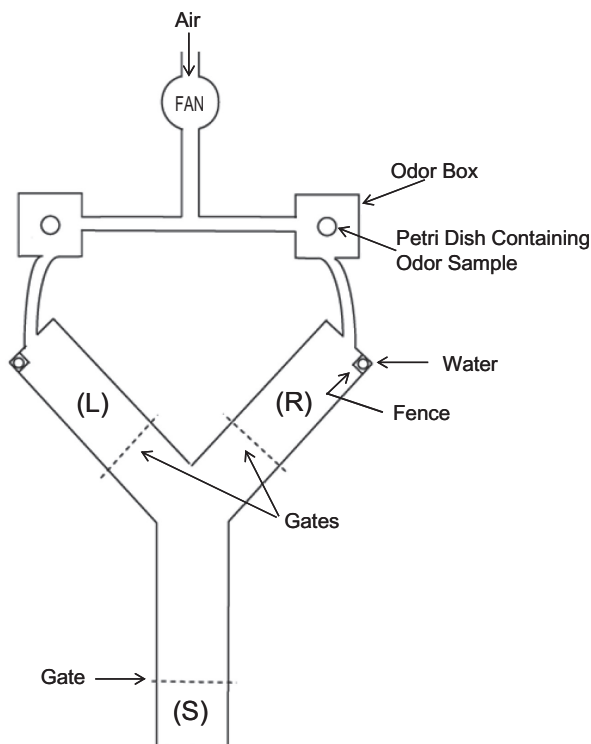


図1：Y字型迷路の模式図

バイオセンサーとなるマウスは23時間絶水の後に図の一番下のシャッターの内側に待機させる。におい箱に老若のマウス尿サンプルを入れ、左右両側腕よりにおいをマウスに伝える。3箇所シャッターを同時に開くとマウスは図の下端部より左右両側腕方向へ進み、分かれ道のところでおいを嗅ぐ。特定のにおいの方へマウスが進めば水を報酬として与え、においの識別実験を実施する。

系のマウスにおいても、その体臭が加齢に伴い変化し、それをマウス自身が識別できることを実験的に証明し、加齢マウスのおいを特徴づける物質を見いだしている。以下にそれらの研究を解説する (Osada et al., 2003)。

実験動物は、Y字型迷路用のバイオセンサーマウス (n=5) として、あるいはにおい提供動物；成体群 (3-10ヶ月齢；n=30)、高齢群 (17-21ヶ月齢n=30) としていずれもC57BL/6J-H-2^kオスを用いた。におい

のサンプルは尿を用いた。尿は特にマウスの場合、性行動などに影響を与える体臭物質を豊富に含んでおり、最も扱いやすい体臭源と考えられる。尿はマウスの下腹部を穏やかに圧迫することにより採取した。Y字型迷路法とは、23時間絶水したマウスを用いて匂いの学習づけを行うことにより嗅覚の識別を証明する方法であり、モネル研究所の山崎等により開発された (Yamazaki et al., 1979; Yamaguchi et al., 1981)。本実験では、Y字型迷路の左右両側腕の先端より、成体群、高齢群の尿あるいは尿分画などのにおいを流入させ、以下に説明するにおいセンサーマウスに、においを同時に提示する (図1)。訓練に使うにおいセンサーマウスは23時間飲水を制限し、成体群あるいは高齢群の尿のにおいのうちどちらか一方のにおいのみを選択し接近する様に訓練付けを行い、報酬として訓練づけしようとしているにおいを選択した場合のみ、一滴の水を与える。両側腕より流入させるにおいを乱数表に基づき何回も左右入れ替え同様の試験を何度も行う。仮にマウスが成体群、高齢群のマウスの尿のにおいを識別できたのであれば、マウスのにおいは加齢変化するという証拠になる。逆にマウスがにおいを正確に識別できない場合、マウスのにおいは加齢変化しないということになる。この実験を識別トレーニング実験 (training trial) とよぶ。

識別トレーニング実験が成立した段階で、訓練に用いたサンプルとは別ロットの新しいサンプルを無報酬で与え、識別の可否を確かめる識別の移行 (generalization) と呼ばれる実験を行う。この試験の目的は、訓練したマウスが年齢とは関係ない偶然の手がかりを使って識別している可能性を排除することであり、正確に識別することが確認できればマウスのにおいは確実に加齢変化すると言える。

本実験では、Y字型迷路は表2に示した一連のパラダ

表2：老若マウスの無処理尿、希釈尿、分画尿に対するにおいかぎマウスの正解率 (%)

実験	識別トレーニング実験		識別移行実験		各実験結果の解釈
	成体群vs高齢群		識別実験とは別ロットの成体群vs高齢群 (実験1~6)		
1	無処理尿	82% (n=96; p<0.001) *	無処理尿	80% (n=19; p<0.01)	マウスの尿臭は加齢変化する。
2	無処理尿	81% (n=112; p<0.001)	老若どちらかを5倍希釈した尿	93% (n=15; p<0.01)	尿臭の質が変化している。
3	エーテル抽出尿	91% (n=73; p<0.001)	エーテル抽出尿	84% (n=25; p<0.001)	エーテル抽出尿中に老臭成分がある。
4	尿分画1	91% (n=173; p<0.001)	尿分画1	82% (n=33; p<0.001)	尿分画1のにおいは加齢変化する。 **
5	尿分画2	46% (n=106; n.s.)	尿分画2	n.t.	尿分画2のにおいは加齢変化しない。
6	尿分画3	74% (n=241; p<0.001)	尿分画3	88% (n=32; p<0.001)	尿分画3のにおいは加齢変化する。 ***
7	尿分画3	78% (n=180; p<0.001)	尿分画3 (成体群vs成体群+Ph&I)	88% (n=24; p<0.001)	PhとIは老臭の原因成分である。
8	尿分画3	80% (n=135; p<0.001)	尿分画3 (成体群vs成体群+B)	50% (n=18; n.s.)	Bは老臭には関係ない。

*有意差検定はFisher's Exact testにより、5匹のマウスのデータの総和に対して行った。 **分析実験の結果、尿分画1には老臭物質が存在しなかった。しかし加齢に伴い減少するmethylbutyric acidsが含まれていた。 ***分析実験の結果、加齢に伴い増加する2種類の化合物 (Ph, およびI) が本分画に含まれていた。 n.t., 実施せず；識別トレーニングが成立しない場合は識別移行実験は行わなかった。 n.s., 帰無仮説 (=50%) に対して有意差なし； Ph, 2-phenylacetamide； I, indole； B, benzoic acid.

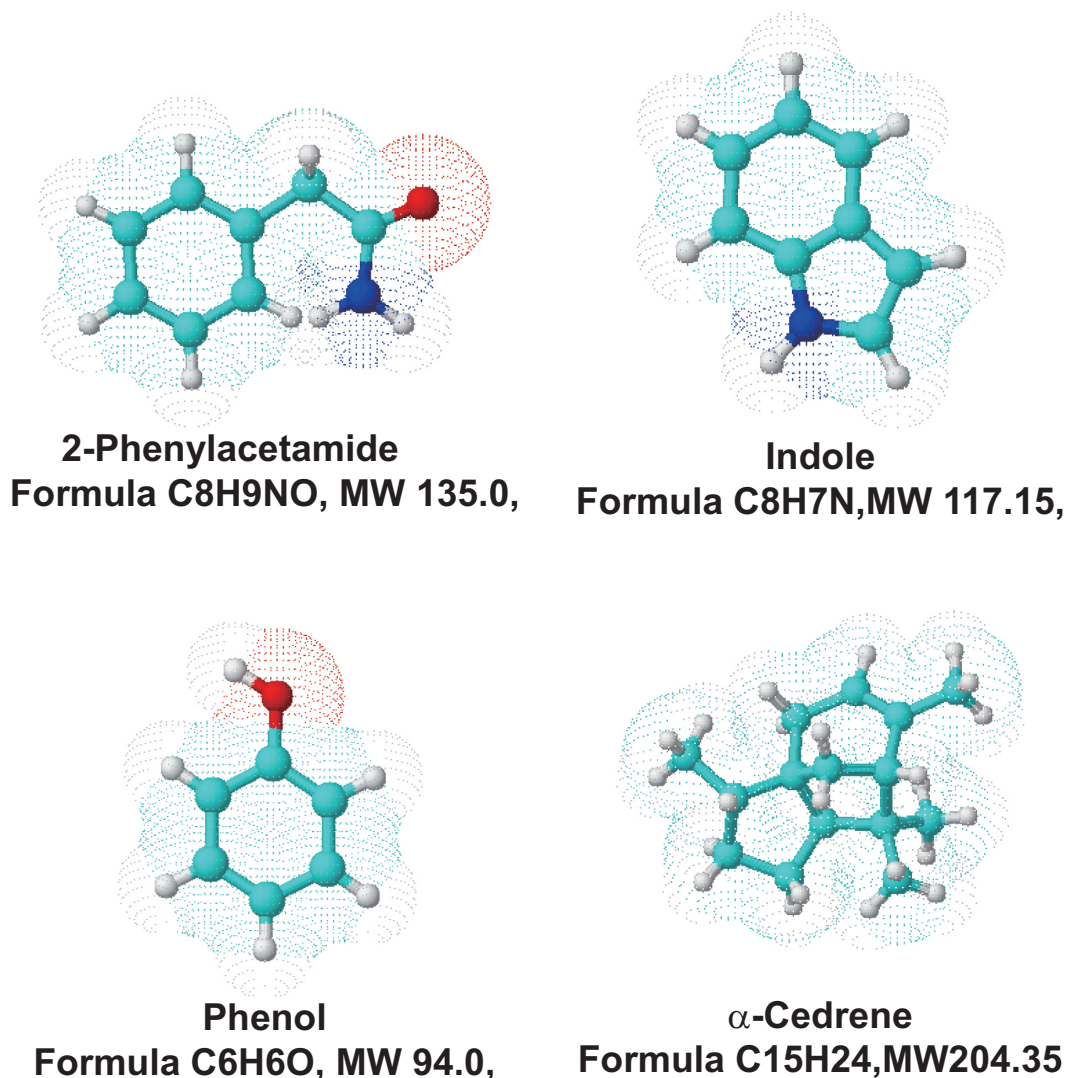


図2：構造決定された老臭候補物質。構造式中の球は、水色＝炭素、白色＝水素、赤色＝酸素、紺色＝窒素、をそれぞれ表している。Phenolとα-CedreneはHPLC分画Ⅰ、Ⅲには含まれず、その影響は限定的なものであると考えられる。

イムについて実施し、以下の結果を得た。すなわち、実験1-2の結果より、マウス自身が加齢に伴う尿臭の質的な変化を識別していることが証明された。そこで一連の分析化学的手法を用いて老若のマウス尿中の老臭物質の同定を試みた。マウス尿は限外濾過後、弱酸性の条件で塩析し、エーテル抽出尿を作成した。このエーテル抽出尿中にはMHCハプロタイプの違いにより変動するにおい物質が含有されていることが知られている (Singer et al., 1997; Willse et al., 2005; Kwak et al., 2008)。そこで、これらの分画中に老臭物質も含まれている可能性を検証するためにY字型迷路実験を行った。すると老若のエーテル抽出尿は識別可能であり、老臭物質がここに含まれていることが示唆された (表2; 実験3)。

そこで、老若の尿成分を水素炎イオン化検出器ーガスクロマトグラフ (FID-GC) で分析するといくつかの揮発性化合物が加齢に伴い変化した。これらの化合物をガスクロマトグラムーマススペクトロメトリー (GC-

MS) を用いて構造解析した結果、特にインドールとフェニルアセトアミド (図2) は加齢に伴い最も顕著に増加し、一方、メチル酪酸は加齢に伴い減少することが明らかになった (表3)。続いて、マウスの尿を高速液体クロマトグラフ (HPLC) で分画し、老臭成分を含む分画をY字型迷路を用いて検索したところ、分画1と分画3のにおいが加齢変化することがわかった (表2; 実験4-6)。分画3にはインドールとフェニルアセトアミドが主に含まれていることがGC-MSの解析から明らかとなり (図3)、インドールとフェニルアセトアミドが老臭物質であるという仮説を支持する結果となった。一方、分画1にはメチル酪酸が含まれており、においセンサーマウスはこの物質の差をかぎ分けていたことが示唆された。インドールとフェニルアセトアミドが老臭物質であることを証明するために、これらの物質を成体マウス尿分画に加えると、においセンサーマウスは老齢群のマウスのおいと同じ行動を示した (表2; 実験

表3：老若マウス尿中から出された38種類の化合物に対するFID-GC分析ピーク高の比較。

Peak Number*	Peak Identity	Adult		Aged		Mann-Whitney P-level ‡ Adult vs Aged
		Median†	Interquartile range	Median	Interquartile range	
1		0.43	0.17-1.38	0.42	0.27-0.69	
2		0.75	0.37-1.37	0.47	0.21-0.77	
3	α-Cedrene	0.23	0.16-0.42	0.48	0.40-0.81	P=0.002
4		0.43	0.10-1.32	0.40	0.11-1.71	<u>P=0.0004</u>
5	Methyl Butyric acids	0.68	0.40-2.61	0.74	0.54-1.47	
6		8.23	3.09-10.8	3.44	1.79-8.38	P=0.006
7		1.21	0.62-2.13	1.52	0.95-2.38	
8	Dimethyl Sulfone	1.36	0.73-2.05	1.16	0.33-1.60	
9		2.31	1.57-3.99	2.33	1.46-4.62	
10		2.74	1.34-5.80	3.32	2.04-7.09	
11		1.00	0.38-2.05	0.71	0.02-1.29	
12	Phenol	0.29	0.02-0.86	0.33	0.02-0.92	
13		0.63	0.54-0.86	0.86	0.64-1.19	<u>P=0.0005</u>
14	p-Cresol	1.00	0.62-1.27	0.98	0.70-1.43	
15		1.78	0.60-2.94	1.93	0.97-5.06	
16		3.29	2.66-4.62	3.14	2.41-4.31	
17	4-Ethylphenol	0.34	0.01-0.66	0.40	0.02-0.76	
18		0.40	0.15-3.38	0.42	0.20-1.10	
19		0.85	0.73-1.71	0.73	0.64-1.29	
20		0.96	0.18-1.81	1.16	0.10-1.93	
21	Benzoic acid	0.99	0.73-1.62	1.18	0.80-2.14	
22		1.60	0.61-14.2	1.16	0.64-17.6	
23		2.86	1.90-3.85	2.68	2.10-4.82	
24	Indole	13.4	6.42-16.4	13.1	7.99-15.4	<u>P=0.0005</u>
25		0.66	0.50-0.86	0.86	0.63-1.50	<u>P=0.0004</u>
26	Phenylacetic acid	1.79	0.99-2.43	2.77	1.55-4.89	
27		2.91	2.01-4.97	2.68	0.92-3.73	
28		0.80	0.43-1.34	0.58	0.32-1.07	
29	2-Phenylacetamide	24.7	15.9-41.5	29.0	17.4-41.0	
30		1.65	0.68-1.91	1.49	0.80-1.96	
31		4.32	1.71-7.89	1.79	0.93-3.73	P=0.00004
32		2.53	1.20-3.12	1.93	1.55-3.10	
33		1.60	0.76-2.12	1.93	1.62-2.50	
34		1.70	0.77-2.29	2.79	1.83-3.40	<u>P=0.00002</u>
35		0.66	0.17-1.00	0.67	0.30-1.18	
36		0.18	0.01-0.33	0.20	0.09-0.29	
37		0.82	0.21-1.25	0.82	0.40-1.28	
38		3.11	1.71-4.35	3.24	1.47-5.37	

†中央値は38種類のピーク高の百分率で表し、老若各15サンプルを分析した。

‡P-levelに下線付きの化合物は加齢に伴い有意に増加し、下線のないものは有意に低下した。

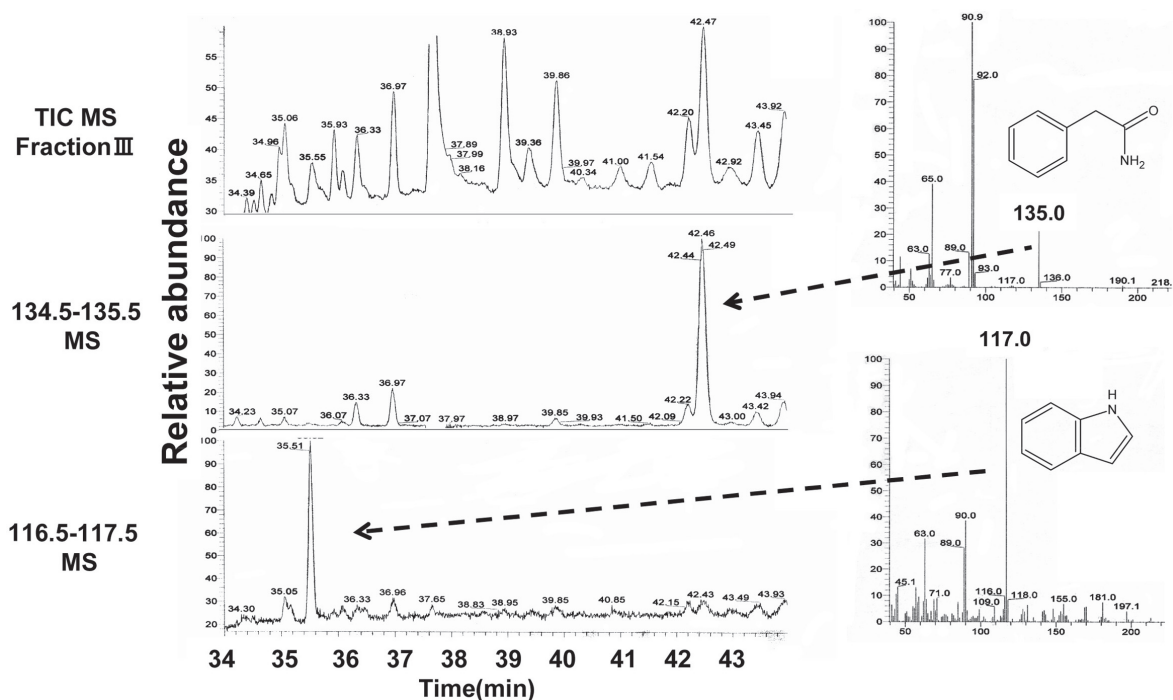


図3：マウス尿HPLC分画IIIのGC-MSクロマトグラム。リテンションタイム35.5minおよび42.5minにそれぞれピークが確認できる（一番上の図）。これらのピークはそれぞれインドール（分子イオンピーク117；3段目）2-フェニルアセトアミド（分子イオンピーク135；2段目）であることがGC-MSより確認された。フラクションI, IIではこれらの物質はほとんど確認できなかった。

7). 一方, 化学分析の結果加齢に伴う変化が見られなかった安息香酸を成体マウス尿に添加したもので汎化実験を行うと, 50%の正解率であった(表2; 実験8). 以上の結果から, インドールとフェニルアセトアミドは加齢に伴い雄のマウスの尿中に増加し, 老臭成分の少なくとも一部としてマウスに認識されていることが証明された.

インドールはマウスの体内では生合成されないが(Kanehisa & Goto 2000), ある種の消化管内微生物ではトリプトファンをインドールに分解することが知られており, これが体内に移動し, 肝臓で代謝しきれなかったものが体液中に出てきたものと推測される(Marklova 1999; Gillam et al., 2000). 一方フェニルアセトアミドは, やはりアミノ酸の一種であるフェニルアラニンが, 顆粒球などにあるペルオキシダーゼによって酸素化と脱炭酸されることにより動物の体内で生成されると考えられている(Olsen & Little 1983; Putter & Becher 1983; Mohacsi et al., 1996; Matsumoto et al., 1998; O'Keefe et al., 1999; Kanehisa & Goto 2000). このことはフェニルアセトアミドの発生が免疫系の加齢変化や生体内の酸化ストレスの状態を反映するいわば生体の老化度を示すにおい物質であることが考えられ, 今後の研究課題のひとつである.

冒頭で, 多くの野生動物でより高齢の動物が異性を引きつけるということが知られており, これは長生きした動物ではより優秀な遺伝子を持つことを意味していると述べた. しかしインドールやフェニルアセトアミドが異性を引きつけるにおいの正体であると考えると矛盾が生じる. すなわち免疫系などの生理機能がより低下した個体が, 異性を引きつけるということになると, それは有害な遺伝子や形質が生態系に残存することを意味し, 種の繁栄にはむしろ有害と考えられるからである. 実際のところ, IやPhを成体マウス尿中に添加しても雌マウスを引きつける作用は確認されていない(未発表データ).

そこで我々は異性を引きつけるいわば「加齢フェロモン」は別に存在すると仮定し, さらに研究を継続した(Osada et al., 2008b). PhやIはエーテル抽出酸性尿中に見いだしたが, 今回は以下の理由で化学分析の手法をヘッドスペース固相マイクロ抽出法(HS-SPME)に変更した(図4)(Osada 2006).

密閉容器中におい源があるとき, その上部空間をヘッドスペース(HS)という. この場合, ヘッドスペースにおい源(体液, 花, 食物などいろいろなものが考えられる)から発生した揮発性物質(ヘッドスペースガ

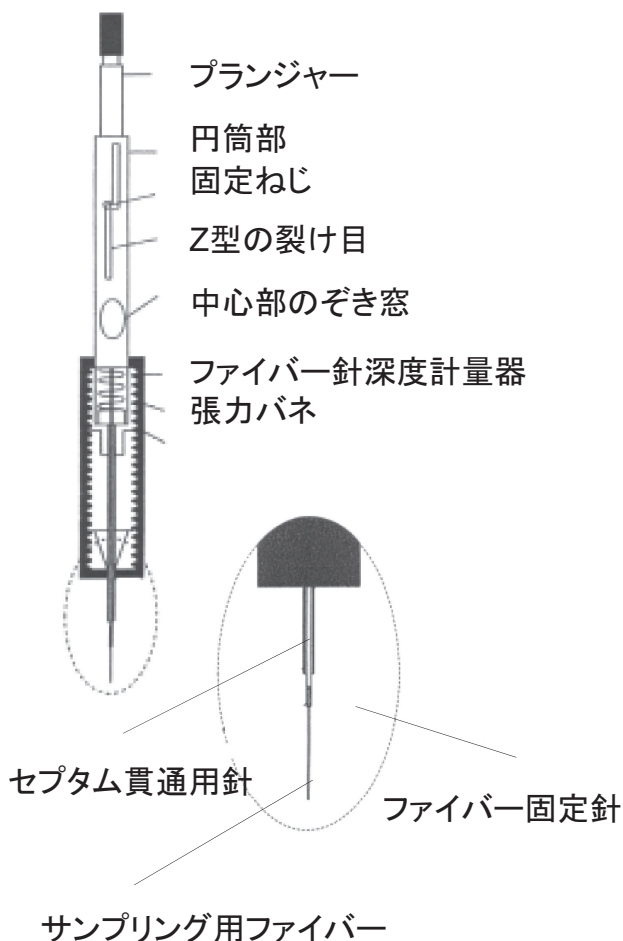


図4: 市販されているSPME装置の図.

ス)が充満した空間であると言える. 一方, 嗅覚は遠隔性化学感覚ともいわれ, におい源から発せられる揮発性成分を嗅神経が捉えることにより検知される感覚である. このように我々はおいを嗅ぐ際におい源のヘッドスペースガスを感じていると言っても過言ではない.

HS-SPME法ではまさにヘッドスペースガスから直接揮発性成分を抽出し, GC-MSなどで分析する方法で, におい成分を簡便に高感度でしかもナチュラルな条件で分析することが出来る. この方法を用いて老若の尿中成分の分析を行った(図5). 抽出にはDVD/PDMS/Carboxenを使用した. 本ファイバーは生体中の微量揮発性成分やフェロモンなどの検出によく用いられている(Osada 2006). 本実験では尿サンプル150 μ Lをスターラーバーで攪拌し, 38 $^{\circ}$ Cで30分間におい物質を抽出した. また揮発性成分を気相中に移動させる目的でNaClを150mg添加した.

化学分析はGC-MS(QP5000, Shimadzu)を用いて分析した. カラムはキャピラリーカラム(Stabilwax: 30m \times 0.32mm \times 0.5mm)を使用した. 主な分析ピークは, NISTライブラリと文献値とのマススペクトルの比較によりその構造を推定し, そのうち入手可能な化合物につ

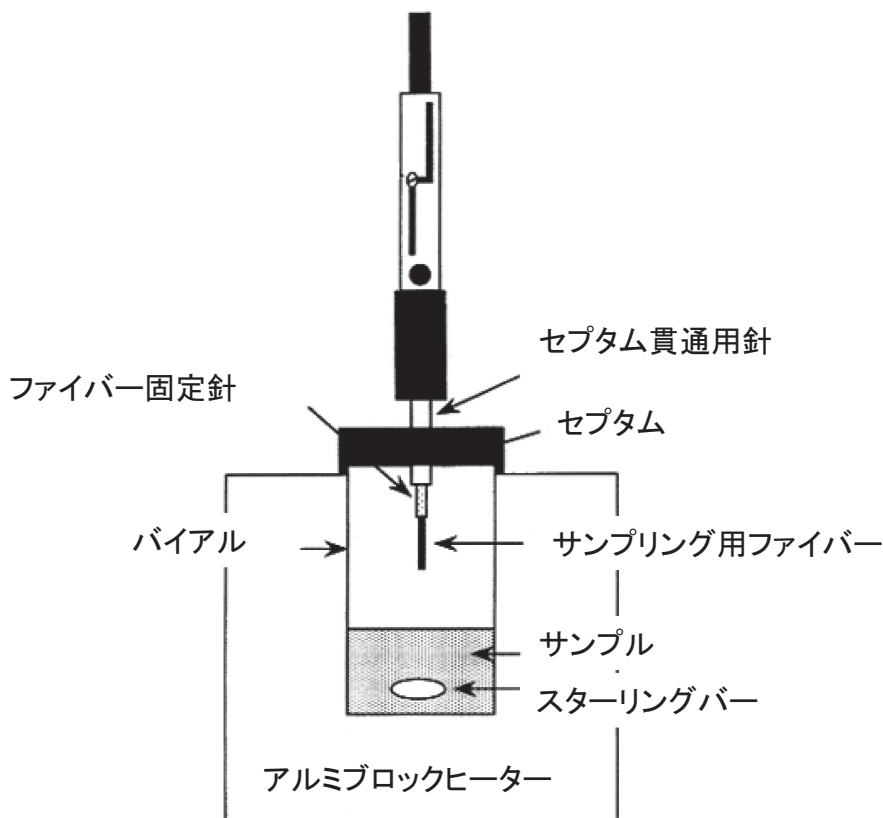


図5：HS-SPMEによるにおい物質の抽出。

表4：百分率法により表された各分析ピークの面積の加齢に伴う変化。

Peak Number	Peak Identity	Adult		Aged		Friedman nonparametric ANOVA Adult vs Aged
		Median	Interquartile range	Median	Interquartile range	
1	trimethylamine ^a	0.83	0.16-4.14	0.48	0.07-1.97	
2	methyl mercaptan ^a	0.07	0.05-0.50	0.10	0.07-0.41	
3	acetone ^a	0.43	0.24-1.76	0.85	0.19-2.70	
4	6H-6M-3H derivative ^a	47.5	39.1-52.2	37.9	32.4-41.8	p<0.001
6	6H-6M-3H derivative ^a	15.4	12.7-16.9	12.0	10.4-13.4	p<0.001
10	2, 4-dimethylcyclopentanone ^b	0.06	0.05-0.19	0.08	0.06-0.35	
12	p-xylene ^a	0.12	0.05-0.72	0.17	0.06-0.52	
13	6H-6M-3H derivative ^a	6.19	5.14-6.83	4.78	4.14-5.37	p<0.001
14	nitromethane ^a	0.19	0.09-0.59	0.10	0.07-0.30	p<0.01
16	2-heptanone ^a	0.16	0.05-0.45	0.09	0.07-0.16	
18	2-penten-1-ol acetate ^b	0.15	0.09-0.35	0.10	0.06-0.20	p<0.05
20	5-hepten-2-one ^b	0.16	0.07-0.34	0.08	0.06-0.11	
21	4-hepten-2-one ^b	0.55	0.26-1.24	0.31	0.23-0.56	p<0.05
23	4-methyl-6-hepten-3-one ^b	0.11	0.05-0.28	0.37	0.10-0.48	<u>p<0.01</u>
24	3-hepten-2-one ^a	0.44	0.08-0.55	0.34	0.12-0.53	
26	6-methyl-5-hepten-3-one ^b	0.42	0.31-0.94	0.34	0.18-0.41	
28	2-isopropyl-4, 5-dihydrothiazole ^a	0.32	0.21-0.47	0.59	0.44-0.67	<u>p<0.001</u>
29	3, 4-dehydro-exo-brevicomine ^a	6.05	3.57-8.94	10.4	7.68-14.0	<u>p<0.001</u>
30	2-sec-butyl-4, 5-dihydrothiazole ^a	11.0	9.20-13.1	20.7	18.4-24.7	<u>p<0.001</u>
32	benzaldehyde ^a	0.27	0.14-1.03	0.30	0.23-0.50	
33	β-farnesene ^a	0.84	0.53-3.37	0.72	0.19-1.15	
36	o-toluidine ^a	1.58	0.93-2.55	1.17	0.78-2.69	
38	dimethyl sulfone ^a	0.21	0.07-0.64	0.22	0.06-0.61	

ピーク番号は図6中での番号と対応している。ピーク番号28-30の3種類の化合物が加齢に伴い有意に上昇している (p<0.001)。サンプル数は老若ともに12例ずつ。a, 標準物質を用いて溶出時間とマススペクトルの一致を確認。b, マススペクトルから構造を推定。

いては同条件で溶出時間が一致することを確認し、構造を決定した。その結果、3, 4-dehydro-exo-brevicomine (DB), 2-sec-butyl-4, 5-dihydrothiazole (BT), 2-isopropyl-4, 5-dihydrothiazole (IT) などが加齢に伴い有意に増加し、一方6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone (HMH) は加齢に伴い低下した (表4, 図6, 7)。

これらの化合物は市販では入手できない。このような場合は化学物質を合成しなければならず、理化学研究所の森謙治、田代卓也両研究員の協力を得て上記揮発性物質を合成した (Tashiro & Mori 1999; Tashiro et al., 2008)。これらの合成揮発性物質とマウス尿を用い、1) 雌マウスは成体雄マウスよりも老齢雄マウス尿

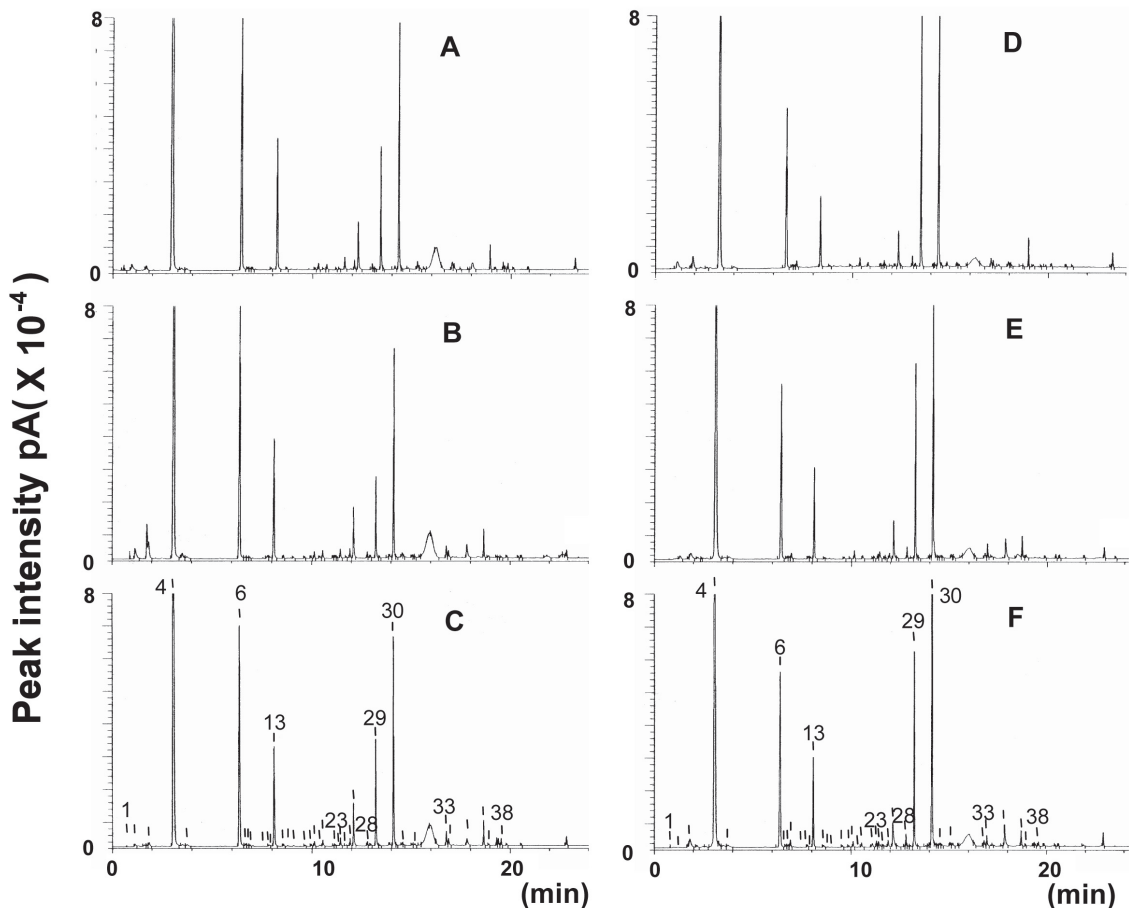
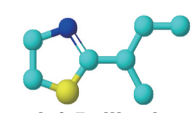
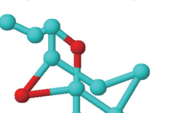
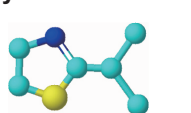
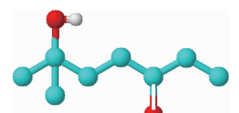


図6：HS-SPMEとFID-GCによる老若マウス尿中揮発性成分の分析。4-8ヶ月齢（A-C）、15-20ヶ月齢（D-F）それぞれ典型的な例を3枚ずつ示す。

構造	雌へのフェロモン作用		加齢変化‡
	内分泌への作用	行動への作用	
 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole (BT)	性周期の同調* 性成熟の促進†	雌の誘引作用**	増加
 3,4-dehydro-exo-brevicommin (DB)	性周期の同調* 性成熟の促進†	雌の誘引作用**	増加
 2-isopropyl-4,5-dihydrothiazole (IT)	?	?	増加
 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone (HMH)	性成熟の促進†	?	減少

● S ● C
 ● N ● O

*Jemiolo B et al. (1986) Proc Natl Acad Sci., vol 83, p4576
 **Jemiolo B et al. (1985) Anim Behav., vol 33, p1114
 †Novotny M et al. (1999) Proc R Soc Lond B., vol 266, p2107
 ‡Osada K, Izumi H et al. (2008) Chem Senses, 33,815-823

図7：加齢に伴い有意に変化した雄マウス尿中の揮発性物質一覧。

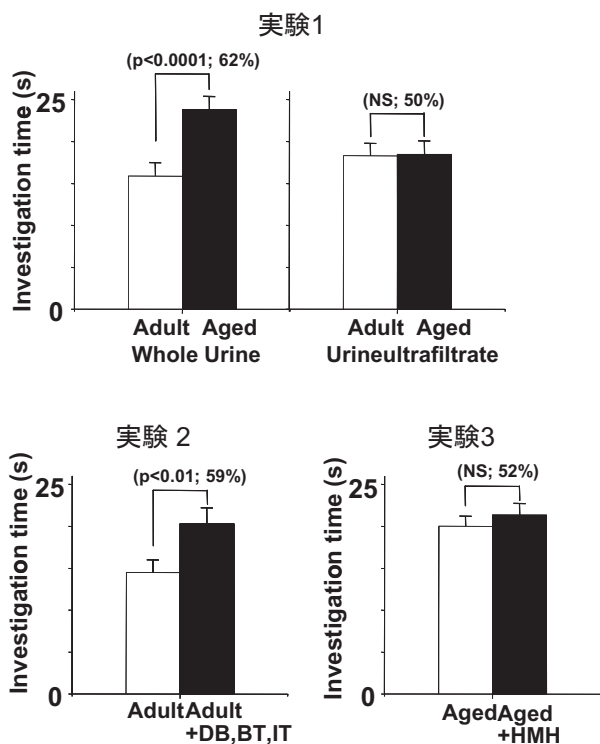
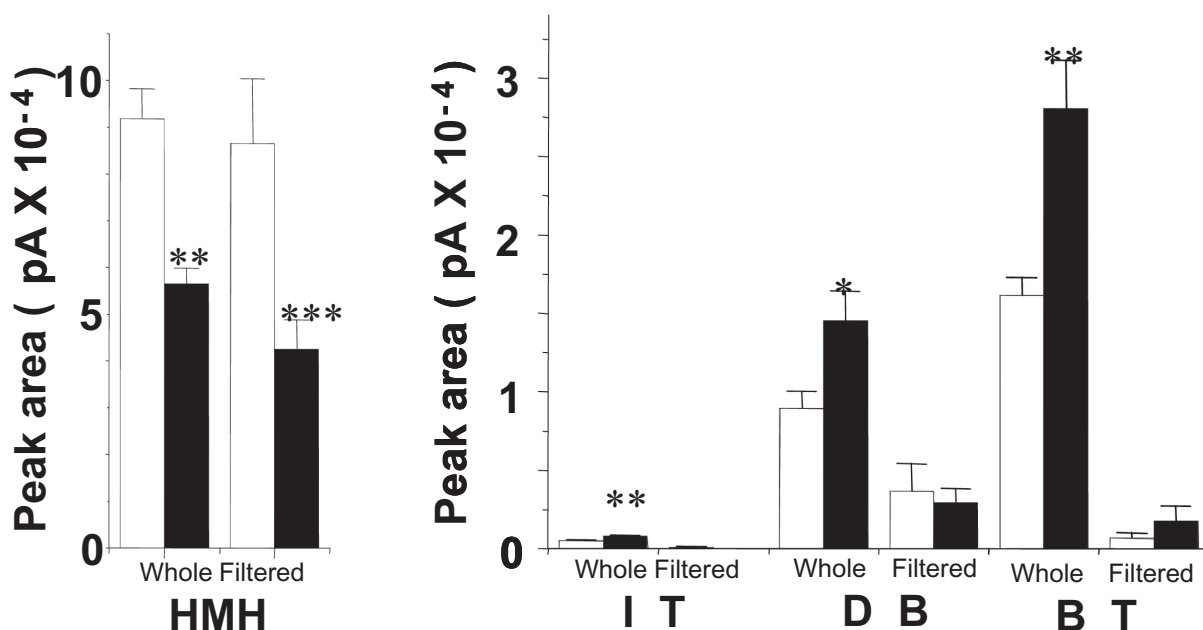


図8：雌マウスの2種類のおい刺激に対する誘引性の比較。平均のおい嗅ぎ時間±SEで表す。1) 老齢雄マウス尿と成体雄マウス尿との嗅ぎ時間の比較 (n=31)。左は通常の尿, 右は限外濾過処理で尿中タンパク質を取り除いた尿。2) 成体マウス尿と加齢フェロモン (DB, BT, IT) を添加した尿 (n=25)。3) 老齢マウス尿と老齢マウス尿+HMHの比較 (n=25)。統計処理はwilcoxon testを用いた。括弧内の%は全かぎ時間に占める黒いバーで表した嗅ぎ時間の割合。

のにおいに対してより強い興味を持つのか、2) その際、DB, BT, ITが雌マウスの行動に影響を与えているかどうか、を明らかにするために以下のにおい嗜好実験を行った。におい嗅ぎ実験のサンプルは老齢群、成体群

の尿である。におい行動実験は、ポリカーボネートケージ (27cm×17cm) を逆さにしてオープンボトムの状態とし、短辺の中央に高さ3 cm, 直径1 cmの穴を開け、におい引き込み口 (ポート) を作成した。ケージの下にはベンチシートを敷き、被験マウス一匹ごとに交換した。マウスを一匹ケージの中央に入れ3分間汎化させた。その間にはにおいサンプルは一切提示しなかったが、マウスはわずかながらポートに鼻を向け、におい嗅ぎ行動をした。続いてにおい源として老若雄マウスの尿を左右のポートから約1 cm離して置き、雌マウスのおい嗅ぎ行動量を3分間測定した。また、限外濾過処理を行った尿についても同様に測定した。実験者は、においサンプルの提示をすべてブラインドで行った。また、尿提示にもかかわらずにおいセンサーマウスの行動量が増加しなかったマウス (におい嗅ぎ時間が11秒に満たないもの) はデータより除外した。

その結果、実験環境下の近交系においても雌マウスはより高齢である雄マウスのおいにおい強い興味を示すことが明らかになった (図8, 実験1)。また、老齢マウス尿と同様に、成体マウス尿にDB, BT, ITを添加した疑似老齢マウス尿においても有意に長いにおい嗅ぎ行動を行ったが、(図8, 実験2) 若齢群の尿中に多く含まれていたHMHを老齢マウス尿に添加しても、誘引性も忌避性も見られなかった (図8, 実験3)。さらにDB, BT, ITはマウス尿中のmajor urinary proteins (MUPs) と結合して存在するため (Hurst et al., 2001 ; Sharrow et al., 2002), 限外濾過処理によりマウス尿中よりMUPsを除



去するとDB, BT, ITも同様に尿中から除去される(図9)。結果として老齢マウス尿臭が持っていた強い誘引性が消失した(図8, 実験1)。これらの結果を総合すると, GC-MSで同定した3種類のフェロモンが加齢に伴い増加し, 雌マウスはそのシグナルにより, 交配相手の年齢をかぎ分けていることを示している。しかも, これらの化合物の加齢に伴う増加については全く知られておらず, 本報告によって初めて加齢に伴い増加する雌マウスの誘引フェロモンの存在が確認された(Osada et al., 2008a)。

DB, BTはアンドロゲン依存性のマウスフェロモンとして以前より知られており, 雌マウスに対して思春期早発作用や性周期の同一作用などが知られている(Jemiolo et al., 1986)。また同種の雄には闘争を誘発するいわば警告フェロモンとしての作用を発揮するが, 雌に対しては誘引フェロモンとして作用する(Jemiolo et al., 1985; Novotny et al., 1985) ことなどが知られている。一方, ITはマウス尿中での存在は知られていたが(Liebich et al., 1977), DB, BTに比較するとその量は少なく, およそ1/10程度である。しかし(Kwak et al., 2005)の報告では, ITはマウス尿中で最も臭気の強い成分の1つであり, 信号化学物質としての機能を持つ可能性は高い。このようにITはDB, BTとともに高齢雄マウスの雌に対する誘引フェロモンとして働いている可能性がある。したがって本報告はITのフェロモンとしての関与を示唆した初めての報告と言える。

一方, HMHはDB, BT同様テストステロン依存性のフェロモンであり, 雌に対する思春期早発作用が報告されている(Novotny et al., 1999a)。本実験ではHMHは他の雄性フェロモンとは異なり, 加齢に伴い有意に低下した。HMHはDB, BTとは異なり, 尿タンパクにはほとんど結合しておらず, 限外濾過してもほとんど濾液中に移動した(図6)。このことは尿タンパクとの親和性の高いフェロモン物質は加齢に伴い増加し, 低いものは低下するとも解釈できる。今後は加齢変化に伴う老臭物質増加のメカニズムについても明らかにしてゆく必要がある。

第3章：思春期に伴い現れるラット雄性フェロモンについて

げっ歯類の尿は非常に豊富な化学情報物質が含まれている。第2章では主にマウスの老臭物質および加齢フェロモンについて述べたが, それ以外にもストレス, 個体識別, ウイルス感染などに伴うおおいの変化に関する行動学的報告がなされている(Yamaguchi et al., 1981 ;

Yamazaki et al., 1994, 2002 ; Gutierrez-Garcia et al., 2007)。それに加え, マウスは性の違い, 思春期の到来に伴う性成熟, 性経験の有無などの違いも尿中の揮発性の化学シグナルによってかぎ分けることが出来る(Jemiolo et al., 1985 ; Novotny et al., 1986 ; Yamazaki et al., 1989 ; Beauchamp et al., 1994)。

すでに解説した「加齢フェロモン」は, 雄マウスの思春期に現れるいわゆる雄性フェロモンの一種である。マウスの雄性フェロモンはDB, BT, HMH以外にも *farne-sene* (Harvey et al., 1989), *Methylthio-methanethiol* (Lin et al., 2005) などが知られており, 雌に対する誘引性を発揮するのみならず(Jemiolo et al., 1985 ; Lin et al., 2005), 幼若雌に対しては黄体形成ホルモンの正のフィードバックを呼び起こし思春期をもたらす(Vandenberg 1967)。これらの現象はDB, BT, HMHなどの既知の雄性フェロモンによって引き起こされると言う報告がある(Novotny et al., 1999b)。一方, 非発情期の雌に対しては脳下垂体ホルモンの分泌低下を招き, 負のフィードバックが解除され, 性周期が回復して発情を誘起したり(Whitten et al., 1968), 受精して間もない雌でそれが起これば着床が妨げられ, 雌マウスの妊娠が阻止される(Bruce 1960 ; Bruce & Parrott 1960)。しかしこれらの現象を引き起こす尿フェロモンの正体は依然として不明である。一方, 雌の尿中にもフェロモン作用が知られており, 性周期の延長や思春期の遅延などを起こす(Van Der Lee & Boot 1955, 1956)。この作用には2, 5 - *dimethylpyrazine*や2 - *heptanone* (Novotny et al., 1986) などのフェロモンが関与している。このようにマウスの尿フェロモンとその生理作用は多岐にわたっているもの, これらマウスの尿フェロモンの多くは, 思春期後, 性成熟とともに発生することが知られている(Brown 1985 ; Schaefer et al., 2010)。

ラットはマウスと同様に世界中の研究室で飼育され, 用いられている有用な実験動物であり, 特に近交系あるいはクローズドコロニーのラットは化学コミュニケーションの根拠を明らかにするために広く使用されてきた(Brown 1985)。ラットにおいても, 雄と雌の識別や性的に魅力のある雄と魅力のない雄の識別に尿のにおいが使われることが知られている。たとえば, 雌のラットは雌の尿臭よりも雄の尿臭に強い興味を持つことが知られており, また精巣を除去した雄の尿臭よりも正常な雄のにおいを好む(Brown 1977 ; Lucas et al., 1982)。

それに加え, ラットはストレスレベルや個体の識別を嗅覚のみで知ることにも明らかになっている(Brown et al., 1989 ; Kiyokawa et al., 2005 ; Kiyokawa et al., 2006 ;

Inagaki et al., 2008). しかしながらマウスの研究に比較すると、尿フェロモンの同定に関する研究はきわめて少ない。およそ30年前に無菌ラットと通常ラットでは揮発性成分が異なっているという報告や (Holland et al., 1983), アロキサン処理による糖尿病の発症に伴い、インドールの濃度が高くなる (Rhodes et al., 1982) などの分析化学的な報告はあるものの、雌を誘引する雄性フェロモンの存在はおろか、ラット尿中の揮発性成分を分析した実験さえほとんど知られていない。唯一近年に報告されたZhangら (2008) は、雄ラットの精巣除去処理により尿中の 2-heptanone や 4-ethylphenol を有意に減少することを報告している。しかし、これらの化合物を去勢雄ラット尿に添加しても、雌を誘引する作用は正常雄ラット尿に比較して低いままである。

そこで、著者らはラット尿中にはまだ未発見の誘因フェロモンが存在し、それらは性成熟とともに発生するのではないかとする仮説の基に性成熟前後 (5 週齢及び 8 週齢) の雄ラット (Donryu ; DN) の尿における揮発性成分の分析を行なった。また雄ラットの尿中には性経験によって誘発されるフェロモンが存在することを示唆す

る報告があることより (Yamaguchi et al., 2000 ; Kashiwayanagi 2005), 同年齢 (11 週齢と 14 週齢) の成体雄ラットの尿中揮発性成分を比較し、これらラット尿中のフェロモンが性経験の影響を受けるかどうかについて検討した (Osada et al., 2009)。

ラット尿中フェロモンの分析は第 1 章と同様に HS-SPME を用いて揮発性成分を抽出した。抽出条件もほぼ同様であるが、マウス尿よりも微量な成分が多く含まれており、抽出時間を 60 分とした。分析は FID-GC によって定量し、GC-MS で構造決定した。分析条件はマウス尿の分析条件と同様に行った。雄ラット尿中成分の FID-GC 分析例と分析結果を表 4 および図 10 に示す。ここに示したとおり、DN ラット雄の性成熟に伴い、4-methylphenol (4-MP), 4-ethylphenol (4-EP) および 2-heptanone (2-HP) が有意に増加するが、他の多くの微量な揮発性成分は性成熟前後でほとんど変化しなかった。一方、これらの化合物は性経験の有無によっては差が認められなかった (図 11)。以上の分析化学的結果より、4-MP, 4-EP, 2-HP はラット尿中に性成熟に伴って現れる雄性フェロモンの可能性が示唆された。

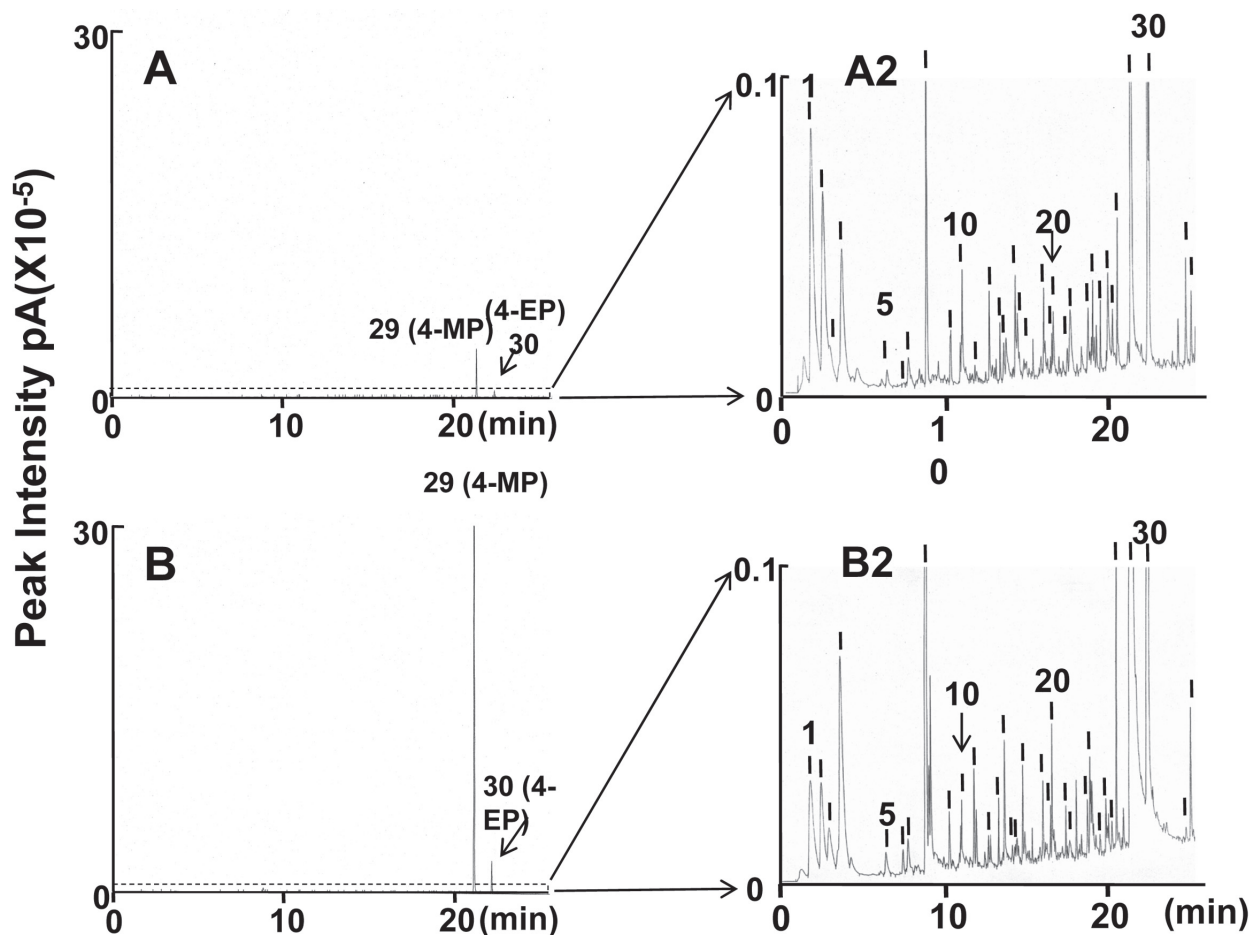


図10: HS-SPME法による (A) 若齢群; 5 週齢及び (B) 成体群; 8 週齢のDonryuラット尿の分析例。図中にマークした32のピークについて両群で比較した。多くの微細なピークを示すために左図の点線の部分の拡大図を右側に示した。ピーク# 8, 29, 30は性成熟に伴い劇的に増加するが、他の微細なピークはほとんど変化しない。

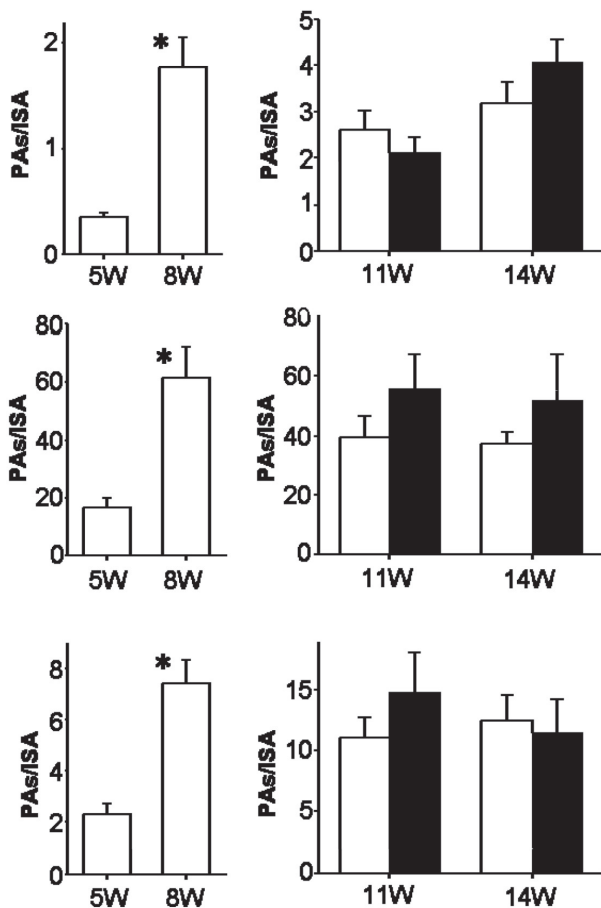


図11: Donryu雄ラット尿中の2-HP (A, D), 4-MP (B, E), 4-EP (C, F) 濃度の性成熟に伴う変化。尿サンプルは5, 8, 11, 14週齢の各時点で採取した (各群ともn=12)。縦軸は各化合物ピーク面積を内部標準物質のピーク面積で除して表した。11週と14週では群を6匹ずつ性経験群 (9週齢時; filled bar) および非経験群 (open bar) で表した。統計処理はwilcoxon test (* $P < 0.01$) あるいはMann-Whitney U -testを用いた。

これまでの研究で、雌ラットは雄ラットのにおいにより強い興味を持つという報告があるものの (Brown 1977), 思春期前後の雄ラットの尿臭の雌ラットに対する誘引性について比較している報告はない。そこで、思春期前後で雄ラット尿臭に誘引性の差があるか、それは性成熟に伴って増加した3種類の物質が誘引の原因であるかを確認するために、以下のようなにおい嗜好実験を行った。

雌DNラット (5-6ヶ月齢, 性経験あり) 48匹を用いた。ラットは2匹ずつ金網ケージで飼育した。におい嗜好実験は45cm×35cmの長方形のポリカーボネートの箱をベンチコートの上で反転させてボトムレスの状態置き、長方形の短辺側の中央に直径5cmの金属製の筒を置き、上面はワイヤーメッシュを張った。ワイヤーメッシュの下には0.5mlのラット尿を入れたペトリ皿を置き、におい源とした (図12)。1匹の雌ラットを入れたポリカーボネートの箱に、におい源を入れない状態で金属の筒を入れ、3分間汎化させたあと、各種におい源を

金属の筒に入れ、それぞれのおい嗅ぎ時間を測定し、におい源の誘引性を測定した。におい行動に対する学習の成立を排除するために、雌ラットは1回のみ使用とし、以下の要領で実験を行った。

実験1: 雄DNラットの尿臭は性成熟に伴い誘引性が高まるか否かを明らかにするために、5週齢と8週齢のDN雄ラットの尿をにおい源として提示した。におい源としてのラット尿はそれぞれ10匹ずつの雄DNラット尿を合わせてにおいサンプルとした。雌DNラットの8週齢ラット尿に対する相対的嗅ぎ時間は、8週齢雄ラット尿嗅ぎ時間より5週齢雄ラット尿嗅ぎ時間を減ずることにより算出した (図12) (n=16)。なお、5週齢雄ラット尿を2つ提示しても嗅ぎ時間がほとんど同一であることも確認した (n=6)。

実験2: 性成熟後の雄ラットで見られる誘引性のメカニズムを明らかにするために、まず5週齢雄ラット尿を2つ提示しても (1つは上記化合物の溶媒であるヘキサンのみ添加) 嗅ぎ時間がほとんど同一であることも確認した (n=6)。次に、5週齢の雄ラット尿に2-HP, 4-EPおよび4-MPのすべてあるいはいずれかを添加し、それぞれの化合物添加尿の相対的嗅ぎ時間を算出し、実験1と同様に比較した (n=10)。各化合物の添加量は8週齢雄ラット尿中の含有量より算出し、2-HP, 4-EPはそれぞれ10ppm, 4-MPは40ppmをヘキサン溶液として添加した。

結果を図13に示す。実験1では、8週齢雄ラット尿の相対的ににおい嗅ぎ時間はおよそ11.2秒で、5週齢ラット尿の相対的嗅ぎ時間 (0.7秒) と比較して有意に高かった (図13a)。この誘引性は雌の性周期の違いによる影響はほとんど見られなかった。一方、実験2では2-HP, 4-EPおよび4-MPすべてを添加した5週齢ラット尿で、8週齢ラット尿とほぼ同様の有意に高い相対的ににおい嗅ぎ時間を示した (図13B: およそ9.8秒, ヘキサンのみ添加群ではおおよそ0.5秒)。2-HP, 4-EP添加群, 4-MP添加群ではいずれも嗅ぎ時間が増加する傾向があるものの、ヘキサンのみ添加群との間に有意差はなかった。

このように本研究は、雄ラット尿臭は性成熟に伴い変化し、雌ラットを引きつける作用があり、その誘引作用の少なくとも一部は揮発性物質によるものであることを証明した (図13a)。また化学分析の結果、性成熟に伴い2-HP, 4-EPおよび4-MPが、DN雄ラット尿中に増加することが確認できた (表5, 図10)。さらに2-HP, 4-EPおよび4-MPを未成熟雄ラット尿に添加すると、成熟ラット尿とほぼ同等の誘引性を発揮することも

表5：雄ラット尿中揮発性物質の生体群と高齢群での比較

Peak Number	Peak Identity	† R.T.	5 W Urine Interquartile		8 W Urine Interquartile		Mann-Whitney p value 5W vs 8W ‡
			Median	Range	Median	Range	
1	Acetone	1.8	878	525 - 1870	354	72 - 748	p<0.001
2	Butanone	2.5	608	286 - 1755	174	97 - 794	p<0.01
3	6H6M3H (lactole)	3.0	23	11 - 180	107	10 - 285	
4	Pentanone	3.7	614	368 - 1976	710	421 - 1911	
5	2-Hexanone	6.4	29	10 - 89	32	27 - 82	
6	4-Heptanone	7.5	12	10 - 21	21	10 - 66	
7	2-Ethyl-2-pentenal*	7.7	55	10 - 93	62	37 - 87	p<0.0001
8	2-Heptanone	8.8	450	303 - 938	1819	1404 - 4946	
9	5-hepten-2-one*	10.3	41	18 - 142	55	24 - 133	
10	Octanal	11.1	81	10 - 146	36	13 - 80	p<0.001
11	3-hepten-2-one	11.8	24	16 - 69	80	49 - 261	
12	Nonanal	12.6	51	21 - 176	30	17 - 127	
13	5-Methyl-2-hexenal*	13.6	34	11 - 57	33	10 - 50	
14	Acetic	13.7	73	26 - 173	116	77 - 264	
15	2-Ethyl-hexanol	14.3	87	46 - 151	23	10 - 165	
16	Decanal	14.4	53	38 - 253	41	23 - 56	
17	Benzaldehyde	14.8	48	20 - 82	74	39 - 144	
18	Butanol	16.1	97	46 - 203	69	20 - 90	
19	Acetophenone	16.5	29	15 - 69	36	18 - 60	
20	Methyl-butyrac	16.6	84	51 - 230	82	72 - 150	
21	Benzyl methyl ketone	17.5	32	10 - 128	33	11 - 85	
22	Hexanol	17.6	197	140 - 380	81	10 - 149	p<0.01
23	Capronic	18.7	74	12 - 297	51	35 - 161	
24	2-Methoxy-phenol	19.0	77	59 - 241	86	53 - 162	
25	Dimethyl sulfone	19.6	37	27 - 72	24	11 - 83	
26	2-Methyl-hexanoic	19.9	82	15 - 263	71	21 - 363	
27	Heptanoic	20.1	31	10 - 66	36	22 - 147	
28	Phenol	20.5	194	83 - 475	327	158 - 1154	
29	4-Methylphenol	21.4	16049	4204 - 38078	96983	48210 - 145260	p<0.0001
30	4-Ethylphenol	22.4	2117	780 - 4108	9732	4730 - 20336	p<0.0001
31	2, 6-di-tert-Butyl-phenol*	24.3	36	19 - 68	17	10 - 27	
32	Indole	25.0	61	29 - 628	122	69 - 277	

† 両群とも10サンプルずつ分析した。

‡ 上向き矢印は加齢に伴い増加，下向きは減少。

多くの化合物はGC-MSによる解列様式と溶出時間を標準物質と比較し，構造決定した。解列様式から構造を推定したのみの化合物には*をつけた。

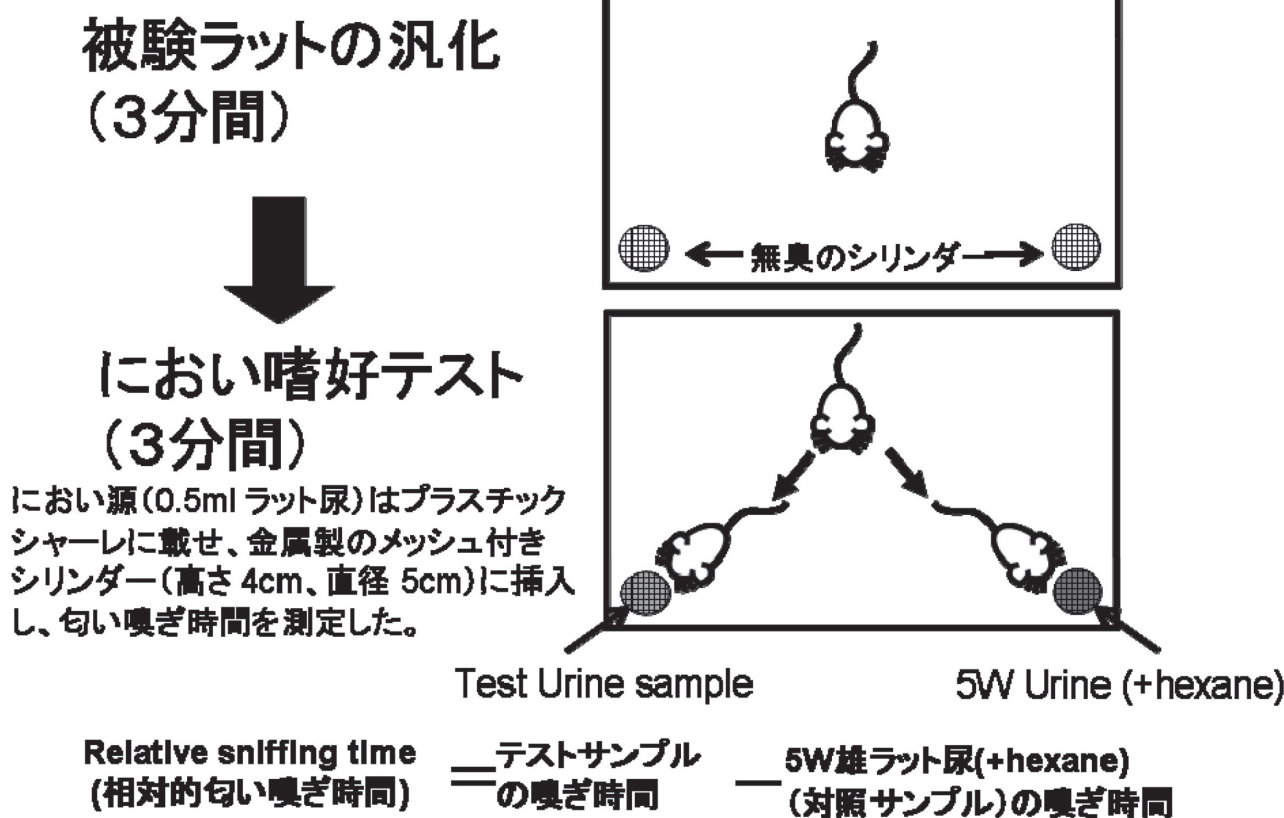


図12：匂い嗜好テストの手順

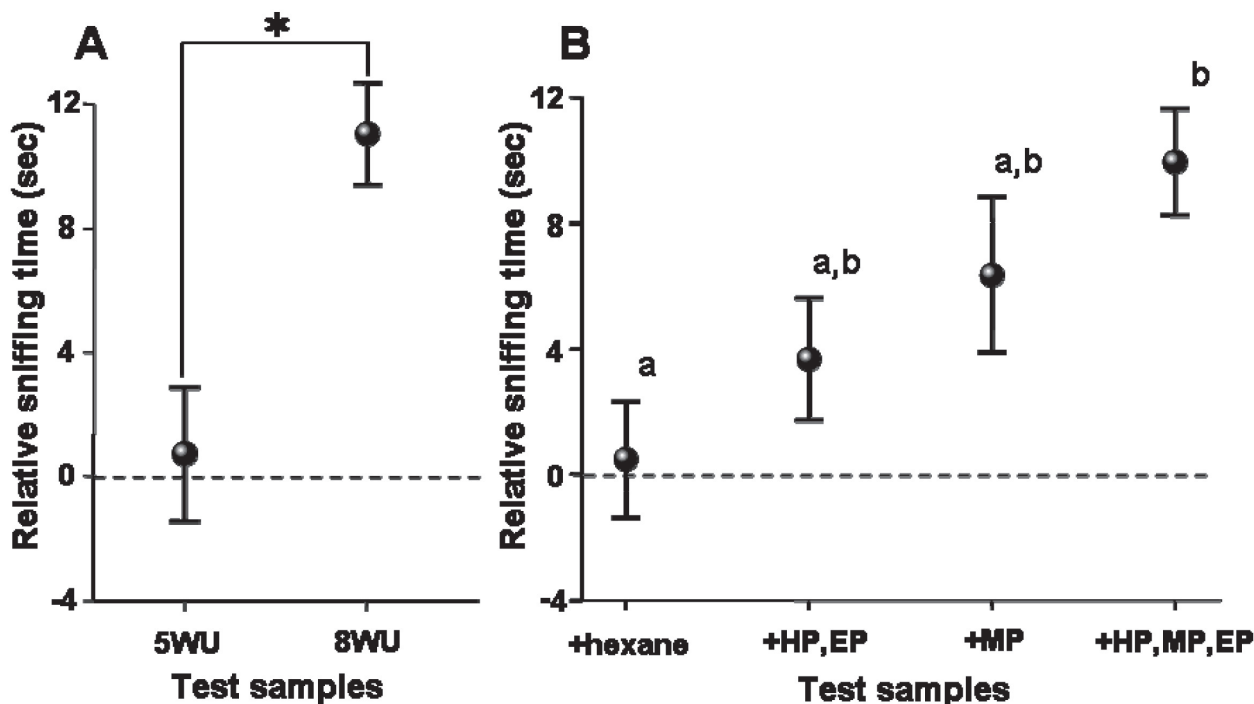


図13：雌ラットにおける匂い嗜好実験の結果. a；Mann-Whitney U-test (* $P < 0.01$) b；Kruskal-Wallis test with a post hoc test (Steel-Dwass) 異なった文字間で有意差あり ($P < 0.05$).

示した (図13b). これらの結果は 2-HP, 4-EP および 4-MP がラットの雄性フェロモンの本体であることを強く示唆しており, 我々の知る限り, これはラットの性成熟に伴い雄性の誘引フェロモンの発生を明らかにし, その主たる成分を同定した初めての報告である (Osada et al., 2009).

以前のいくつかの報告によれば, 4-MP と 4-EP はマウス尿中にも見られる (Singer et al., 1997; Osada et al., 2003). また 2-HP は雌マウスの尿フェロモンとして知られており, 性周期の延長や思春期の遅延などを起こす (Novotny et al., 1986; Jemiolo et al., 1989). しかしながら, これら 3 種類の揮発性化合物が雌の誘引性を発揮するという報告はマウスを含むいかなる哺乳動物においても報告がない. したがってこれら 3 種類の揮発性化合物はラットの雄に特有のフェロモンであると考えられる.

我々の報告に先行し, Zhang ら (2008) は SD ラットにおいて 2-HP, 4-EP, squirene などが精巣除去によって有意に減少することを報告している. 我々の報告は (Osada et al., 2009) これを部分的に支持するものであるが, Zhang ら (2008) のにおい嗜好実験の結果では我々の報告と違い十分なフェロモン作用が観察されていない. 彼らが 4-MP を見落とした理由は定かではないが, SD ラットでは 4-MP の含有量が DN ラットよりも低い (Zhang et al., 2008; Osada et al., 2009) ことが関係しているのかもしれない.

以前の報告では, ラットの尿中には性経験によって現

れる未知の物質があり, 性経験雄ラット尿を雌ラットにスプレーすると雌は一様にとろんと脱力した表情を見せ, 副嗅球に c-fos 陽性細胞が数多く観察されるという (Kashiwayanagi 2005). また限外濾過処理により分子量 500 以上の分子と 500 以下の分子に分けるといずれも単独では c-fos 陽性細胞が増加せず, 高分子物質と低分子物質の両方が必要であることがわかっている (Yamaguchi et al., 2000; Kashiwayanagi 2005). 我々が見出した 3 種類の雄性フェロモン, 即ち 2-HP, 4-MP, 4-EP はいずれも性経験によっては変動しなかった (図11). またこれらの物質を性成熟前の雄ラット尿に加えても副嗅球での c-fos 陽性細胞は増加しなかった (未発表データ). これらの結果より, 2-HP, 4-EP, は副嗅球に作用する証拠はなく, 主に主嗅覚系に作用するフェロモンであると考えられる. ただ, 性経験のある雄ラット尿の高分子成分の正体が依然謎に包まれており, これら性経験によって現れる高分子のフェロモン成分と今回見出された 3 種類の揮発性フェロモンの共存により雌ラットの副嗅球が活性化される可能性は否定できない. 今後, さらなる検討が必要であろう.

第 4 章：MHC の突然変異によるおい型の変化とその揮発性のシグナル物質について

MHC (主要組織適合性抗原複合体) は細胞表面に広く存在し, 免疫学的アイデンティティを規定していると同時に個人特有の体臭を賦与する遺伝子であり, 生殖行

動（ヒトの場合は配偶者選択）に影響を与えている（Yamazaki et al., 1976, 1979, 1983, 1988 ; Wedekind et al., 1995 ; Ober et al., 1997 ; Jacob et al., 2002 ; Chaix et al., 2008）. MHCとくにclass 1の体臭に対する影響力は強く、近交系のコンジェニックマウスではもちろんのこと、近交系のマウスを4種類掛け合わせ、MHC class I以外の遺伝的バックグラウンドをほぼ完全のランダムにしてもMHC class Iに基づくにおい型の違いは容易に識別される（Yamazaki et al., 1994）. またMHC class Iはゲノム全体の0.2%に過ぎないが、におい型の50%を占めている（Beauchamp et al., 1990）.

一方MHCは多型であると同時に突然変異も多い。マウスのMHC class IではH-2 Kb遺伝子が特に変異が多いことが知られている。H-2 Kb m1（以下bm1）は野生型のH-2 Kb（以下b）の突然変異で、C57BL/6 H-2 b（以下B6 H-2 b）マウスとBalb/c H-2 dマウスのF1より発生したものである。このようなF1マウスはB6 H-2 bと戻し交配を連続的に行うことによりB6 H-2 bm1マウスが作成できる（Klein 1978）. このマウスはMHCが変異している以外は通常のB6マウスと遺伝的に同じである。H-2 Kbは356個のアミノ酸より構成されるが、bm1はエピトープを挟み込むgrooveと呼ばれる構造のうち α ヘリックス部分のアミノ酸が3ヶ所変異している（E152→A, R155→Y, L156→Y : E=グルタミン酸, A=アラニン, R=アルギニン, Y=チロシン, L=ロイシンをそれぞれ表す）. bm1以外にもbm3, bm5, bm7, bm8, bm10などがあり、いずれも1-3個のアミノ酸変異が知られている（Yamazaki et al., 1991）.

このようにb遺伝子の変異体にはわずかに数個のアミノ酸のみが異なっているものが多いが、MHCが体臭に対して与える影響を考えると、このような微細な変化でもにおいの変化することが予想される。この仮説を証明するために、山崎らはB6 H-2 bm1とB6 H-2 bのマウスを用いてY字型迷路によるにおい識別実験を行った（Yamazaki et al., 1983）. Y字型迷路法についてはすでに第2章で詳しく述べているのでここでは簡単に触れるだけにとどめる。すなわちY字型迷路の左右両側腕の先端より、B6 H-2 bm1とB6 H-2 bの尿あるいは尿画分などのおいを流入させ、どちらか一方のおいをマウスが選ぶようにマウスに対して識別実験と汎化実験を行なったのである。

最初に、共同研究者のI.K.Egorovが所有していたB6 H-2 bおよびB6 H-2 bm1の尿を用いて識別実験を行った。その結果、識別トレーニングは容易に成立し（ $p < 0.0001$ ）、識別移行実験（ $p < 0.001$ ）も成立した。この

結果はB6 H-2 bのわずかな変異で体臭が変化することを実験的に証明した最初のものである。

さらにより深く検証するために、別の供給先より得たB6 H-2 bとB6 H-2 bm1を用いて汎化実験を行ったところ、識別可能であることがわかった（ $P < 0.001$ ）。たとえ同じ近交系マウスであったとしても別々の環境で飼育された場合、両群に予期しない遺伝的変異がわずかではあるが一定の割合で起きることが予測される（Russell & Russell 1996）。しかしこの結果から2群の別コロニー同士でもにおいの識別にはならぬ影響を与えていないことを証明しており、MHCのにおいを賦与する能力に比較すれば無視できる程度のものであることを示している。

バックグラウンドの遺伝子変異の影響を完全に排除し、純然とbとbm1のみの違いを比較するためにはF2マウスでの比較が有効である。B6 H-2 bとB6 H-2 bm1を交配させ、F2マウスを作成し、近交系のB6 H-2 bとB6 H-2 bm1でトレーニングが成立しているマウスに識別の移行を試みたところ、識別可能であることが証明された（ $p < 0.001$ ）。このようにb遺伝子のわずかな突然変異のみが起因となって体臭が変化することは20年も前に明らかになっている。

その後の研究で、B6 H-2 bにおいてはbm1のみならず、bm8, bm5, bm7など他の変異マウスとの間でも識別できることも明らかになった（Yamazaki et al., 1991）。ところが一方、変異体同士では識別できない、つまりにおいの違いがはっきりしないという一見不思議な現象も見出された（Yamazaki et al., 1990）。突然変異によりにおいの変化したのであれば、変異体同士もそれぞれ違ったにおいを発しそうなものである。しかし現実にはそうではなく、むしろB6 H-2 bが特徴的なにおいを発しており、各変異体はB6 H-2 bとは異なっているものの、お互いは似たり寄ったりのにおいを放っているらしい。

H-2 bはその突然変異によって、体臭だけではなく提示するペプチドの特性も変化する。アルバートアインシュタイン大のvan Bleek & Nathenson（1991）は、bとbm1, bm8がそれぞれ提示するペプチドのアミノ酸配列を解析した。疎水アミノ酸の一種であるチロシンは、MHCのgrooveにおけるアンカー領域と結合しやすいアミノ酸の一種であることが知られているが、bのgrooveに結合していた複数のペプチドは（本研究では10種類）、チロシンがカルボキシル基側から数えて3, 5, 7, 8番目の4ヶ所のいずれかに含まれていた。一方bm1とbm8ではペプチド内にチロシンが挿入されてい

る箇所はともに3ヶ所と、bに比べて一ヶ所減っていた。さらにbm 1, bm 8では8番目にチロシンが挿入されているペプチドがまったく見られず、一方でbでは見られなかった6番目の位置にチロシンが挿入されているペプチドが見られた。このように、bm 1, bm 8などの突然変異体における結合ペプチドの変化には共通性がある。

このようなペプチドの特性の違いはMHCとペプチドの結合力や、抗原提示能そのものにも影響を与えることが考えられる。Rudolphら(2001)はこれらb, bm 1, bm 8の立体構造や免疫学的性質を詳細に解析した。それによると、MHCペプチド複合体の37°Cにおける熱安定性はbに比べると突然変異体では数分の一から十数分の一に劇的に低下する。しかもキラーT細胞のセンダイウイルスや卵白アルブミンに対する抗原認識能は著しく低下し、bm 1ではほとんど認識しなくなる。またbm 8もセンダイウイルスに関しては幾分反応するもののその活性は低く、卵白アルブミンでは認識しない。この結果はb遺伝子の免疫学的機能は突然変異によって一様に機能低下することを意味している。

bm 8はgrooveの底にあたるβシート構造中のアミノ酸が4ヶ所変異してbm 1とは構造的にはずいぶん違うが、Rudolphによればbm 1は152番目のグルタミン酸と155番目のアルギニンが突然変異で失われ、それらが形成していたイオン結合がなくなったために熱安定性の劇的な低下に結びついたという。一方、bm 8については23番目のメチオニンがイソロイシンに変わったため隣接するβ-2ミクログロブリンとの分子間引力に変化が生じた結果、やはり熱安定性が低下したと述べている。

野生型のb遺伝子はマウスの長い進化の過程で自然選択されたものであり、十分な免疫学的機能を持つものと考えられる。一方、bm 1, bm 8などの突然変異を起こした遺伝子は、変異した場所にかかわらず、MHCの機能に何らかの障害が生じる可能性が高い。その結果、bm 1, bm 8ともに喪失を共通点とする類似した機能変化が起きている。それゆえMHCの体臭を賦与する機能も突然変異に伴い同様の变化を受けたとも解釈できる。

しかし、この解釈には異論もある。Carrollら(2002)は一貫してhabituation-dishabituation法(Brown 1988)を用いてMHCにおいの識別を試みている。マウスにあるにおいを提示すると、そのにおいに関心を持ち、においかぎ行動を起こすが、同じにおいのする別サンプルを繰り返し提示すると、動物はにおいに対する興味を徐々に失い、においかぎ行動は急激に少なくなる。その後、違う種類のにおいのするサンプルを与えると、再びサン

ブルに関心を持ち、においかぎ行動が5-10秒ほど増加する(Brown et al., 1987; Schellinck et al., 1992; Penn & Potts 1998)。この増加の有無を見て動物がにおいを識別しているか否かを判断する方法である。

彼らの主な異論は、bとbm 1とのにおいは近交系同士では識別されるもののF2では識別不能であるとしている点である。加えて今までは識別が難しいとされていた突然変異同士(bm 1とbm 3を使用している)は一転して識別できるという。

彼らはhabituation-dishabituation法はY迷路のような学習による識別法と違い、「非学習的」な方法と称し、より自然に近い信憑性の高い方法であると論じている。しかしこの方法は無報酬で、繰り返しにおいを暴露するタイプの訓練を起想させる。実際、Habituation(慣れによる反応性の低下)はもっとも単純で一般的な形での学習そのものである(Beauchamp & Yamazaki 2003)。したがってCarroll等が強調する「非学習的方法」としてのメリットは疑問である。

もう一つの疑問は、彼らの示したデータの内容である。彼らは新たに提示したサンプルに対する嗅ぎ行動の時間と嗅いだ回数で比較しているが、120秒間観察していても1秒以下、すなわちにおい嗅ぎ時間は100ミリ秒単位の差で結論をだしている。嗅いだ回数も1回前後の違いしかなく、いずれにせよこのようなわずかな差ではartifactなどの影響を排除することは難しい。

MHC以外の自然発生的な突然変異がにおいに限らず生理機能に影響を与える可能性は十分にあり、興味深い現象である。しかし近交系、F2のいずれにおいてもbとbm 1のにおいが異なることは20年前にすでに証明済みであり、それを覆すには本データは脆弱な印象をぬぐえない。

これらの疑問をすっきり明らかにするために、以前にわれわれは、H-2遺伝子の変異がマウスの尿臭にもたらす影響について1) Y字型迷路法による行動学的研究に加え、2) FID-GCによる尿中化学成分の分析、および3) 雌マウス嗅球に対するc-fos発現パターンを現したodor mapの解析、により詳細な検討を行った(Schaefer et al., 2002)。

におい源は尿を用い、H-2 K遺伝子だけが異なる4種類のマウスB6 H-2 b, B6 H-2 bm 1, B6 H-2 bm 8, およびH-2 bの突然変異ではなくてハプロタイプ全体が異なるB6 H-2 Kk [H-2 K遺伝子の種類がbではなくk(スモールk)という意味。以下B6 H-2 k], の4種類のマウスの尿について、解析を行った。個々のにおいの違いは1-2種類の特定の化合物の絶対量により決まるの

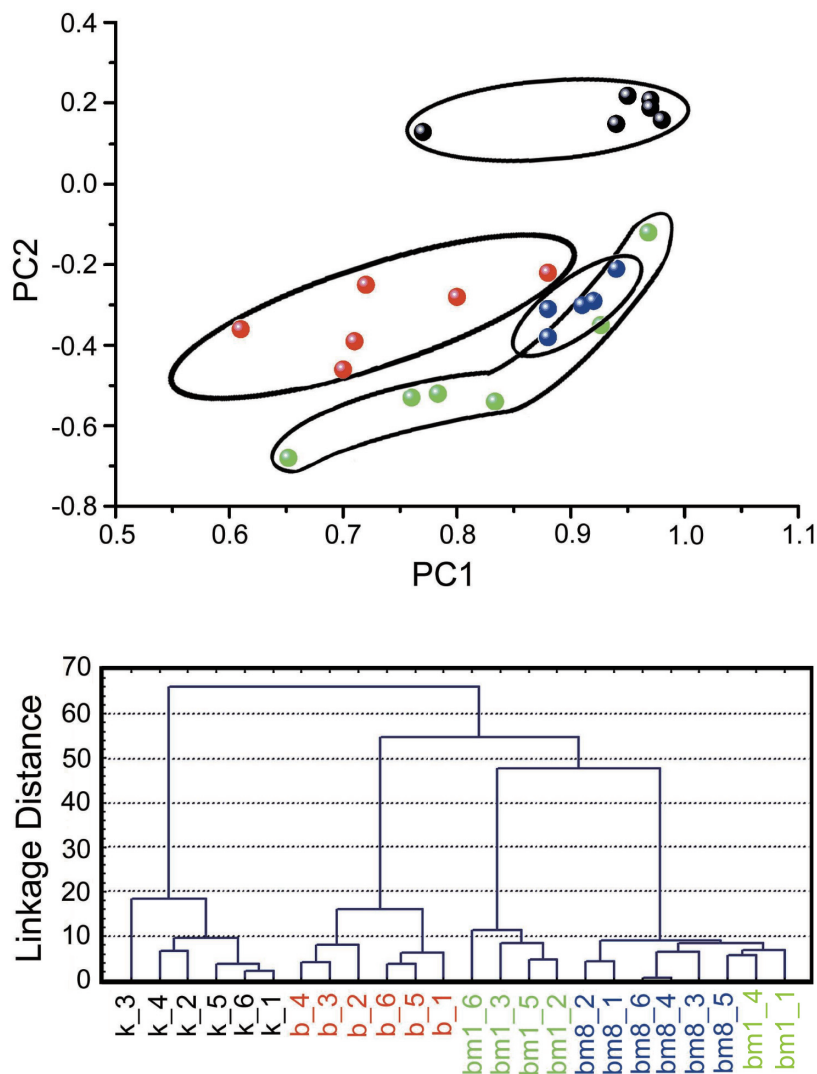


図14：4種類の異なるMHC (H-2b (赤), H-2k (黒), H-2bm1 (緑), H-2bm8 (青))を持つB6マウスの尿中化学物質組成のパターン認識. ガスクロマトグラフィーのピーク (n=41) を元に主成分分析 (上図) およびクラスター分析 (下図) を行った. いずれの場合もH-2bm1, H-2bm8はH-2b H-2kとは独立したクラスターを形成しているがB6 H-2bm1, B6 H-2bm8同士は区別がつかない.

ではなく、むしろ複数の揮発性物質の相対比により決まることが予測される (Singer et al., 1997; Willse et al., 2005; Kwak et al., 2008, 2009, 2010). そこで、MHC遺伝子の違いが尿中の化学組成を変化させるかを確かめるために、それぞれの尿サンプルをFID-GCによって分析した。マウス尿は限外濾過後、弱酸性の条件で塩析し、エーテル抽出尿を作成した。このエーテル抽出尿中にはMHCハプロタイプの違いにより変動するにおい物質が含有されておりことが知られている (Singer et al., 1997)。測定したガスクロマトグラム中の41種類の揮発性物質の相対比がH-2遺伝子の違いを反映するか否かを検討した (図14)。

分析データは二種類のパターン分析、主成分分析およびクラスター解析により、MHCのハプロタイプがそっくり違うH-2bとH-2kが完全に独立したパターンを示

した。それは以前の行動学的研究 (Yamazaki et al., 1976, 1979; Yamaguchi et al., 1981), および嗅球の機能マッピングのデータ (Schaefer et al., 2001) と一致することをまず確認した。それに加え、MHCの単一の遺伝子にわずかな変異があるだけの突然変異マウス、すなわちB6 H-2bm1とB6 H-2bm8は、遺伝的関連性や行動学的データにより予想されるようにB6 H-2kよりもB6 H-2bにより近い位置にあった。一方、B6 H-2bm1とB6 H-2bm8は、B6 H-2k やB6 H-2bとは独立したグループを形成したが、B6 H-2bm1とB6 H-2bm8同士は独立したグループには分離しなかった。これらの結果は、マウスの尿中の揮発性物質の組成は1983年以来、Y字型迷路法を用いて示してきた行動学的データと相関した (表6)。

一方、odor map解析のデータは図15に示す。B6 H-2

表6：Y迷路によるトレーニング成立までに必要とした施行回数，尿中化学物質のクラスター解析によるグループ間距離および，嗅球のc-fos発現パターン非類同性指数の比較

	H-2 ^b vs H-2 ^k	H-2 ^b vs H-2 ^{bm8}	H-2 ^b vs H-2 ^{bm1}	H-2 ^{bm1} vs H-2 ^{bm8}	H-2 ^b vs H-2 ^b
尿臭識別トレーニングの施行回数	150	250	400	**	**
尿成分クラスター解析におけるグループ間距離	63.0	50.0	48.5	N.D. ^a	N.D.
嗅球c-fos発現パターンの非類同性指数 ^b	0.3191	0.2885	0.1725	0.1638	0.1116

** = 施行回数 >> 500回

a: N.D.は独立したグループを形成しなかったことを意味する (図2)。

b: 嗅球横断面上のc-fos発現パターンの相違を現す指数で，全く同一な例では数値は0となり類似性がないときは1となる。この変数が0.17を下回るとにおいの識別は難しくなることを意味している。

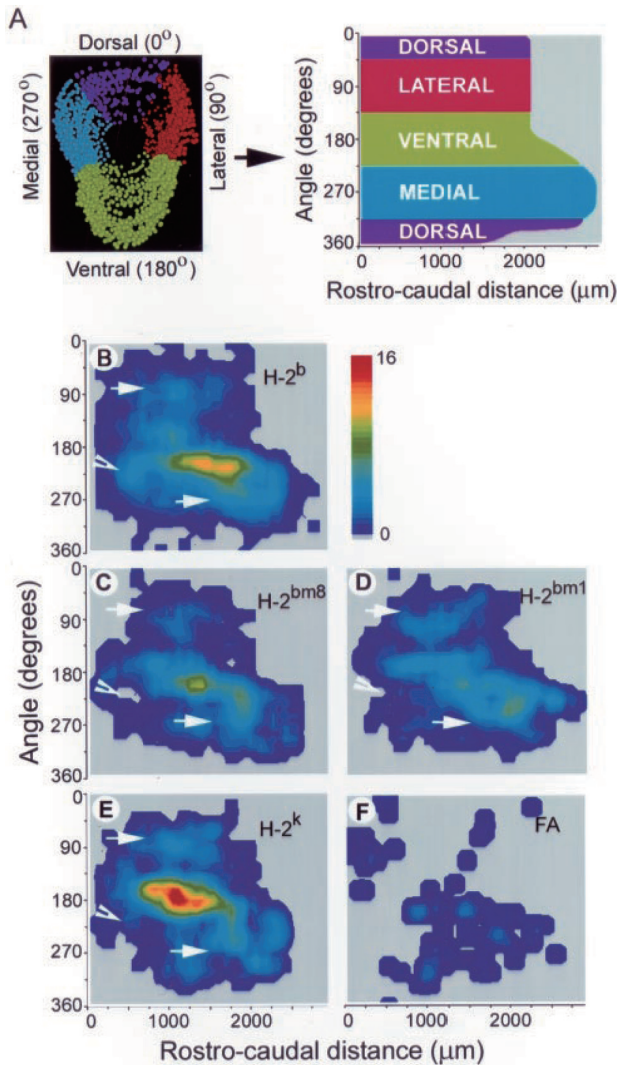


図15：B6H-2b, H-2bm8, H-2bm1, H-2kの雄の尿による雌の主嗅覚器の糸球におけるc-fos発現パターンの比較図。各群6-8匹のマウス嗅球サンプルより比較した。図Bの右側のbarは活性化した糸球の密度を表す。

kとB6H-2bはハプロタイプがまったく違うため，これらのマウスの体臭を嗅がせたときのマウス嗅球横断面のc-fos発現のパターンは，B6H-2bとB6H-2kで大きく異なることが予想される。図14は嗅球表面のc-fos発現強度を図14のAの様に背側部より展開し，2次元パターンとして比較した図である。これによれば，H-2kのにおいに強く反応する部位が嗅球の前方腹側面に，一方H-2bのにおいによって強いc-fosが発現する領域は後部

腹内側面にそれぞれみられることがわかる (図15BおよびE)。一方，B6H-2bm1, B6H-2bm8, の尿臭刺激を受けたマウス嗅球では，嗅球の前方腹側面にはB6H-2kに見られるようなc-fos発現がほとんど見られず，後部腹内側面でのc-fos発現が弱いながらも見られたことより，どちらかと言えばB6H-2bのパターンに似ていることがわかる (図15CおよびD)。しかし，B6H-2bの場合に比べてもc-fosの発現は全般的に弱めであり，また細かいパターンの違いも見られる。これらの結果は嗅球横断面の後部腹内側面に位置する糸球体の興奮は，H-2b特有にみられる特徴であり，MHCのわずかな突然変異が原因となってH-2b独特のにおいの少なくとも一部を失うことを意味している。

表6はY字型迷路での学習成立までに要したトレーニング施行回数，尿中化学物質組成のクラスター分析，それとマウス嗅球横断面のc-fos発現パターンの非類同性指数 (全く同一な例では数値は0となり類似性がないときは1となる) の相関関係を示したものであるが，化学物質組成の差が小さくなれば嗅球のc-fosパターンの非類同性指数も低下し，一方，マウスのトレーニング回数は増加するという関係が明らかとなった。

このようにH-2b遺伝子の突然変異体はH-2kやH-2bとは独立したにおいを発しているが，H-2b遺伝子に特有のにおいの一部を失い，その結果，変異体同士のおいの区別は難しいことが改めて証明された。今後，突然変異に伴い変化した化学物質の構造決定などを進めて行く予定である。

第5章：食物摂取によるマウス尿臭の変化について

動物の尿中には様々な揮発性物質が含まれており，特にげっ歯類などの嗅覚の発達した動物では，尿は重要なにおいの情報源となっている。たとえば，マウス尿臭の個体差は，遺伝子の多様な違い (Yamazaki et al., 1994; Isles et al., 2001)，性差，性周期の違い (Novotny et al., 1985, 1986; Swaney et al., 2007; Ramm et al., 2008)，親子などの近親者の識別 (Yamazaki et al., 2000; Broad et

al., 2006), ウイルス感染 (Yamazaki et al., 2002), さらに年齢の違い (Kokko & Lindstrom 1996; Ferkin 1999; Osada et al., 2003, 2008b; Muller et al., 2006) などにより変化し, 交配行動などに強い影響を与える。これらの体臭の違いは, 動物の行動に多大な影響を与えることが知られており, 化学コミュニケーションの秩序の点から見て少なくとも一定期間は不変であると考えられる。

一方, 食事の変化による体臭の変動についても多くの報告があり, 短期間の変化であるものの, 上記の安定した体臭の変化に匹敵する強さを発揮することがある (Brown et al., 1996)。Beauchamp (1976) は雄のモルモットの尿中に異性を引きつける誘引作用があることを確かめ, この誘引作用は餌の変化の後22時間以内に影響を受けることを見出した。Ferkin (1999) は野生のカヤネズミを用い, 高タンパク食を食べた動物のにおいは通常食の動物のにおいよりも異性を引きつける作用があることを報告している。また, Kwakら (2008) は, 食物の変化によるにおいの違いは, MHCのハプロタイプの違うマウス同士のおいの違いよりも大きい事を行動学的, あるいは分析化学的に証明した。彼らの化学分析の結果では, 食物の違いがもたらすにおいの変化は, 食物中のおい物質の付与によるものではなく, 尿中の揮発性化合物全体の配合比率の有意な変化により, 結果としてにおいに変化すると報告している。一方, 我々はヨモギなどの生薬成分を経口摂取すると, インドールやフェニルアセトアミドの老臭物質が減少することを見出した。しかしヨモギ中の芳香物質が尿中に移行し, 体臭を変化させた証拠は見出せなかった (Osada et al., 2008a)。このように過去の研究結果は, 食物を換えることにより, 体液中の内因性物質の配合比や一部の内因性物質の変化に関する報告はあるものの, 食品中の特定のおい成分がマウスの体液に移行し体臭を変化させるという証拠はほとんど得られていない。

香辛料には, 肉や魚の不快感な分解臭をマスクする効果がある。このことは経験的に立証されており, 数百年以上前から普遍的に使用されているものも多い。そこで筆者らは, 香辛料の一種である山椒に多く含まれるシトロネラルという芳香物質に着目し, シトロネラルをマウスに経口摂取させ, 1) シトロネラルはマウス尿中に移行するか, 2) 移行したシトロネラルはマウス尿臭を変化させるか, 3) それによってマウスの年齢による尿臭の違いをマスクすることが出来るか, などの点について明らかにすることを目的として実験を行った。

実験動物は, Y字型迷路実験用のおいセンサーマウス (♂: n = 5), におい提供動物 (成体群, 4 - 5ヶ月

齢: 老齢群, 17 - 19ヶ月齢; いずれも♂) としてC57BL/6 (B6) を用いた。尿提供マウスは通常は水道水を自由摂取させた。シトロネラルは強い匂いがあるため, 通常の水溶液では忌避反応を示す (Epple et al., 2004)。そこでシトロネラルの投与は, 1.7%ショ糖液にそれぞれ0, 10, 50ppmのシトロネラルを添加し, 飲料水の代わりに自由摂取させた。においサンプルは尿を用いた。尿は代謝ケージを用いて夜間に採尿した。尿は採取後, 直ちに-80℃で保存した。尿のにおい成分の分析にはヘッドスペース固相マイクロ抽出法 (HS-SPME) を用いた。

Y字型迷路法は, 第一章に詳しいが, 実験の目的と提示するにおい物質が若干違うので再度説明したい。Y字型迷路の左右両側腕の先端より, 成体群, 高齢群の尿あるいは尿画分などのおいを流入させ, 以下に説明するにおいセンサーマウスに2種類のおいを同時に提示する。においセンサーマウスの訓練では23時間飲水を制限し, 学習させようとしているにおいを選択した場合のみ報酬として一滴の水を与える。両側腕より流入させるにおいを乱数表に基づき何回も左右入れ替え同様の試験を何度も行う。仮にマウスがシトロネラル摂取群, 非摂取群のマウスやその尿のおいを識別できたのであれば, マウスのにおいはシトロネラルの摂取で変化するという証拠になる。逆にマウスがおいを正確に識別できない場合, マウスのにおいは変化しないということになる。この実験を識別トレーニングとよぶ。識別実験が成立した段階で, 訓練に用いたサンプルとは別の新しいサンプルを無報酬で与え, 識別の可否を確かめるための識別の移行と呼ばれる実験を行う。この試験の目的は, 訓練したマウスがシトロネラルとは関係ない偶然の手がかりを使って識別している可能性を排除することであり, 正確に識別することが確認できればマウスの識別したにおいの違いはより確実に一般的な現象であることを意味する。本実験では以下の3セットのY字型迷路実験を行った。

実験①; マウスのシトロネラルに対する匂い閾値を知るために各濃度 (1000-0.1ppm) のシトロネラル水溶液と水との識別トレーニング (要事調整サンプル) 及び識別の移行 (24時間室温保存のサンプル) を行った。

実験②; 実験①の結果よりマウス尿中には0.1ppm以上のシトロネラルが排泄されなければマウスに識別されない可能性が高いことがわかった。またマウスに対して50ppmシトロネラル溶液を投与した場合, 尿中には0.8ppm以上のシトロネラルが未変化のまま排泄されることがGC-MSによる分析実験で明らかになった (図16,

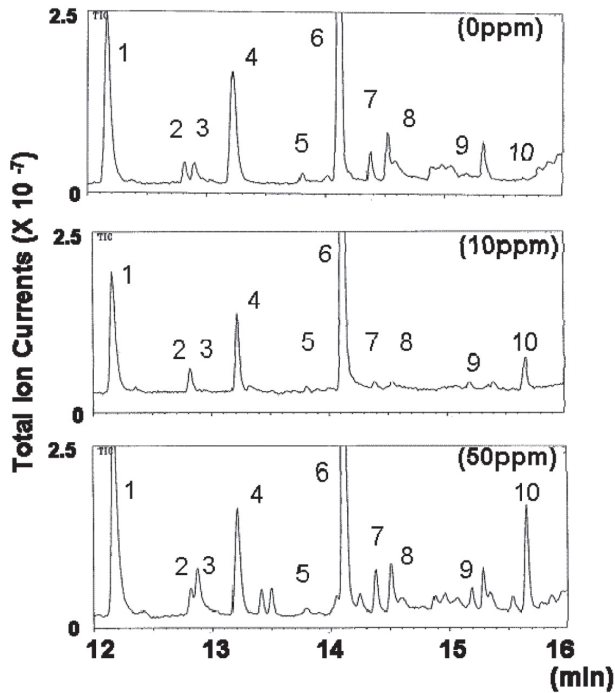


図16：シトロネラル摂取マウス尿中へのシトロネラルの出現。各クロマトグラムはシトロネラル溶液0 ppm (A), 10ppm (B), and 50ppm (C) をそれぞれ6日間投与したマウスの尿中揮発性物質の様子である。1, 6-methyl-5-heptene-3-one⁸; 2, 2-isopropyl-4, 5-dihydrothiazole; 3, 2-nonen-1-ol⁹; 4, 3, 4-dehydro-exo-brevicomine; 5, acetic acid; 6, 2-sec-butyl-4, 5-dihydrothiazole; 7, 2-ethyl-2-hexanol; 8, unknown; 9, benzaldehyde; 10, citronellal. a マスペクトルのパターンから推測 (四重極GC-MS; QP5000, Shimadzu).

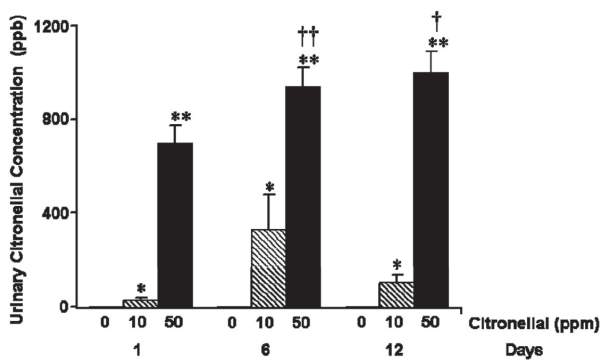


図17：B6♂マウス尿中のcitronellal濃度の経時的変化。尿サンプルは0, 10, 50 ppmのcitronellal水溶液を自由摂取したマウス (各群n=5) より投与後1, 6, 12日目に採取した。統計処理は二元配置分散分析およびHSDにて行った。剣型のシンボルは投与期間, 星印はcitronellal濃度間での有意差を示す (*P<0.05 for 0 ppm, **P<0.001 for 0 ppm and 10 ppm, †P<0.05, ††P<0.01 for day one).

17). そこで本実験では経口摂取によって尿中に現れたシトロネラルが, 尿臭を変化させるかを明らかにするために, 50ppmシトロネラル摂取マウス尿 (12日間) と非摂取マウス尿について実験を行った。

実験③; 尿中に移行したシトロネラルが, 単に尿臭を変化させるだけでなく, マウス尿中に見られる老臭をマスキングする作用があるかどうかを明らかにするために, 0-50ppmのシトロネラル飲料水を成体群および高齢群のマウスに投与し, それらの尿を用いて実験を行った。なお5匹のマウスのデータを一括した上で有意差検定 (fisher's exact test) を行った。

結果を以下に記す。

実験①: 識別トレーニング実験の結果 (表7に記載), においセンサーマウスはいずれも0.1ppmのシトロネラル水溶液と水のおいの違いを識別した (施行回数135回, 正解率70%, P<0.01)。しかし識別移行実験では有意な識別は見られなかった (施行回数14回, 正解率50%, NS)。識別移行実験のサンプルは同じ濃度で調整してあるが, 24時間室温保存したサンプルを使っているため, 分解による目減りが起きている。このことより, マウスのシトロネラル溶液の識別可能な濃度は0.1ppm前後であることが示唆された。

実験②: 本実験ではマウスが充分認識できると考えられる50ppmシトロネラル摂取マウス尿を用いて識別実験を行ったところ, シトロネラル摂取の有無により尿臭は変化することが明らかになった (表8; 識別トレーニング実験)。

また識別移行実験では識別トレーニング実験と同様に12日間シトロネラルを摂取したものに加え6日間しか投与していないもの, あるいは非摂取尿に0.5ppmのシトロネラルを添加したサンプルにおいても識別できた (表8; test 1-3)。しかし, 水にシトロネラルを同量添加したサンプルでは識別できなかった (表8; test 4)。これらの結果は, シトロネラル摂取マウスの尿臭は, 生体内での代謝を受けていないシトロネラル自身のおいによって変化したことを示している。

表7: 様々な濃度のシトロネラル水溶液に対するにおい嗅ぎマウスの正解率

test	citronellal soln.	識別トレーニング実験	識別移行実験
1	1000 ppm	88(136) p<0.001	94 (16) p<0.01
2	100 ppm	84(183) p<0.001	91 (22) p<0.01
3	10 ppm	84(187) p<0.001	88 (24) p<0.01
4	1 ppm	78(133) p<0.001	92 (13) p<0.05
5	0.1 ppm	70(135) p<0.01	50 (14) NS

マウス# 1-3はシトロネラル溶液のおいを選択した場合に, # 4-5は水のおいを選択した場合に一滴の水の報酬を与えた。有意差検定 (fisher's exact test) は5匹のマウスのデータを一括した上で行った。識別トレーニングのサンプルが用事調整であるのに対して, 識別移行実験のサンプルは24時間室温保存したサンプルを使用した。識別トレーニングの総数と正解率は識別移行実験を同時に行ったものを対象に記載した。すべてのマウスは識別トレーニングで50%以上の正解率を示した。識別移行実験においてもtest 5以外は同様であった。

表 8 : シトロネラルの有無によるマウス尿臭に対するにおい嗅ぎマウスの正解率と (施行回数)

test	識別トレーニング実験		識別移行実験	
1	cit-U vs.cont-U (12days)	79 (155) p<0.001	cit-U vs. cont-U (12days)	80 (20) p<0.01
2	cit-U vs.cont-U (12days)	85 (172) p<0.001	cit-U vs. cont-U (6days)	78 (27) p<0.01
3	cit-U vs.cont-U (12days)	87 (190) p<0.001	cont-U+cit vs. cont-U+e	84 (31) p<0.01
4	cit-U vs.cont-U (12days)	83 (180) p<0.001	water+cit vs. water+e	58 (26) NS

識別トレーニングの総数と正解率は識別移行実験を同時に行ったものを対象に記載した。マウス# 1-3はシトロネラル尿にたいし、# 4-5はコントロール尿に対して報酬を与えた。12日間50ppmシトロネラル溶液を摂取したマウスの尿 (cit-U) とその溶媒のみを摂取したマウスの尿 (cont-U) に対する5匹のにおい嗅ぎマウスの識別はいずれも50%以上の正解率を示した。汎化実験ではtest4 (シトロネラル水溶液と水) のみが有意差が見られなかった。有意差検定 (fisher's exact test) は5匹のマウスのデータを一括した上で行った。

表 9 : シトロネラル溶液を摂取した老若マウス尿臭に対する匂い嗅ぎマウスの正解率

Mouse	飲水中シトロネラル濃度											
	5倍希釈尿			0 ppm				10 ppm				50 ppm
	識別トレーニング実験		識別移行実験1		識別移行実験2		識別移行実験3					
C	NC (%)	C	NC (%)	C	NC (%)	C	NC (%)	C	NC (%)	C	NC (%)	
1	180	51 78	9	3 75	7	4 64	4	8 33				
2	97	29 77	4	1 80	6	2 75	2	2 50				
3	101	25 80	7	1 88	9	0 100 *	3	2 60				
4	114	20 85	8	0 100 *		n.t.	7	5 58				
5	150	43 78	5	3 63	8	4 67	3	5 38				
Total	642	168 79 ***	33	8 80 **	30	10 75 *	19	22 46				

マウス1-3は老齢マウス尿で強化し、4-5は若齢群マウス尿で強化した。識別の移行は1, 3, 2の順番で行った。C, 正解の回数, NC, 不正解の回数, マウス4は最後の実験が終了する前に死んだ。***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 (帰無仮説50%) Fisher's Exact Test.

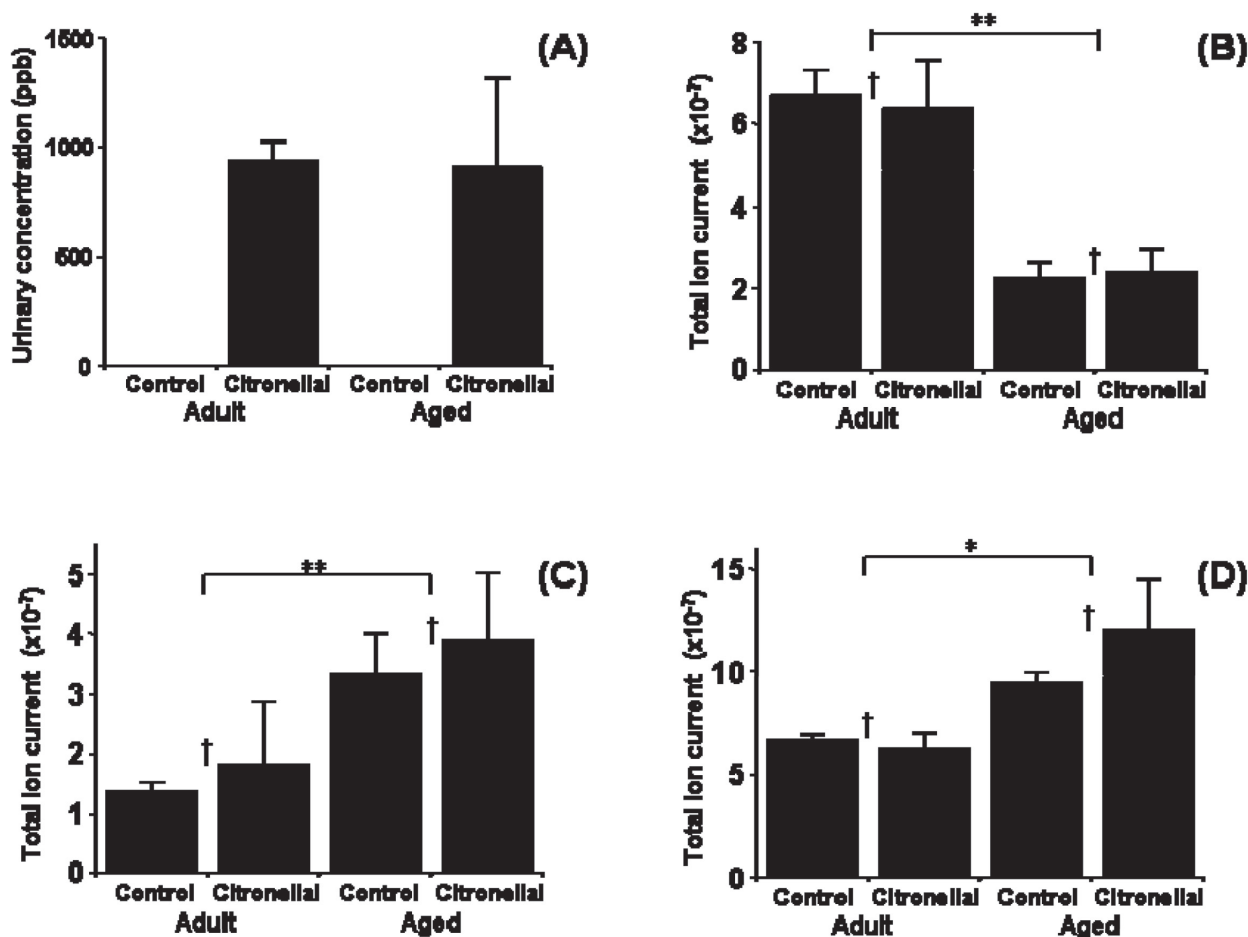


図18 : 50 ppm citronellal 溶液あるいは溶媒のみを摂取したB6マウス老齢群, 成体群の尿中 (A) citronellal, (B) HMH, (C) DB, (D) BT 濃度の変化 (各群; n=5づつ)。統計処理は二元配置分散分析およびHSDにて行った。(星印は老齢群と成体群間の比較 *P<0.05, **P<0.01; 剣型のシンボルはcitronellal投与の有無による比較; いずれも有意差なし。)

実験③：結果を表に示す。においセンサーマウスは成体マウス尿と老齢マウス尿のにおいについて識別可能であった。このことはマウスの尿臭が加齢に伴い変化することを意味し、過去の報告と一致するものである（表9：training, 4）。その後、シトロネラル 0 ppm, 10 ppm, 50 ppm 溶液を6日間摂取したマウス尿で汎化実験を行ったところ、50 ppm摂取群間でのみ老臭の有無が識別できなくなった（表9：test 1-3）。この結果は50ppmのシトロネラル摂取ではマウスが本来発している老臭がマスクングされることを示唆している。

本研究の結果は経口摂取したシトロネラルがマウスの尿中に未変化のまま現れ、マウスの尿臭を変化させ、その結果、年齢による尿臭の違いをマスクングすることを明らかにした。食事による尿臭の変化は以前から報告があるものの、特定の揮発性物質がその匂いを付与することで尿臭を変化させ、結果的にマウスの行動に影響を与えることを実験的に証明した初めての報告と考えられる。同時に行った化学実験では、マウスの加齢フェロモン（Osada et al., 2008b）はシトロネラル投与で変化が見られなかったことより（図18）、シトロネラル投与が老臭物質の濃度を変化させた可能性は低い。シトロネラルがマウスの老臭をマスクングするという本研究結果は、今後マウスの研究分野だけではなく、社会的あるいは性的情報を嗅覚に依存する他の哺乳動物の研究にも波及することが考えられ、ヒトに対する研究にも発展する可能性がある（Osada et al., in press）。

References

- Anderson M. *Sexual selection*. Princeton University Press. 1994.
- Beauchamp GK. Diet influences attractiveness of urine in guinea pigs. *Nature* 263 : 587-588, 1976.
- Beauchamp GK & Yamazaki K. Chemical signalling in mice. *Biochem Soc Trans* 31 : 147-151, 2003.
- Beauchamp GK, Yamazaki K, Curran M, Bard J & Boyse EA. Fetal h-2 odortypes are evident in the urine of pregnant female mice. *Immunogenetics* 39 : 109-113, 1994.
- Beauchamp GK, Yamazaki K, Duncan HJ, Bard J & Boyse EA. Genetic determination of individual mouse odor. vol.5. Oxford University Press. 1990.
- Brennan PA & Kendrick KM. Mammalian social odours : Attraction and individual recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 : 2061-2078, 2006.
- Brennan PA & Keverne EB. Something in the air? New insights into mammalian pheromones. *Curr Biol* 14 : R81-89, 2004.
- Broad KD, Curley JP & Keverne EB. Mother-infant bonding and the evolution of mammalian social relationships. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 : 2199-2214, 2006.
- Brooks R & Kemp DJ. Can older males deliver the good genes? *Trends Ecol Evol* 16 : 308-313, 2001.
- Brown RE. Odour preference and urine-marking scales in male and female rats : Effects of gonadectomy and sexual experience on responses to conspecific odors. *J. comp. physiol. Psychol.* 91 : 1190-1206, 1977.
- Brown RE. The rodents. Ii.Suborder myomorpha. In *Social odours in mammals*. ed. BROWN R, MACDONALD, DW., pp.345-417. Clarendon Press, Oxford. 1985.
- Brown RE. Individual odors of rats are discriminable independently of changes in gonadal hormone levels. *Physiol Behav* 43 : 359-363, 1988.
- Brown RE, Roser B & Singh PB. Class i and class ii regions of the major histocompatibility complex both contribute to individual odors in congenic inbred strains of rats. *Behav Genet* 19 : 659-674, 1989.
- Brown RE, Schellinck HM & West AM. The influence of dietary and genetic cues on the ability of rats to discriminate between the urinary odors of mhc-congenic mice. *Physiol Behav* 60 : 365-372, 1996.
- Brown RE, Singh PB & Roser B. The major histocompatibility complex and the chemosensory recognition of individuality in rats. *Physiol Behav* 40 : 65-73, 1987.
- Bruce HM. A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males. *J Reprod Fertil* 1 : 96-103, 1960.
- Bruce HM & Parrott DM. Role of olfactory sense in pregnancy block by strange males. *Science* 131 : 1526,1960.
- Carroll LS, Penn DJ & Potts WK. Discrimination of mhc-derived odors by untrained mice is consistent with divergence in peptide-binding region residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 2187-2192, 2002.
- Chaix R, Cao C & Donnelly P. Is mate choice in humans mhc-dependent? *PLoS Genet* 4 : e1000184, 2008.
- Curran AM, Rabin SI, Prada PA & Furton KG. Comparison of the volatile organic compounds present in human odor using spme-gc/ms. *J Chem Ecol* 31 : 1607-1619, 2005.
- Dorries KM, Adkins-Regan E & Halpern BP. Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain Behav Evol* 49 : 53-62, 1997.
- Epple G, Bryant BP, Mezine I & Lewis S. Zanthoxylum piperitum (dc), a potential feeding deterrent for mammals : Studies with microtus ochrogaster (wagner). *Pest Manag Sci* 60 : 624-630, 2004.
- Ferkin MH. Attractiveness of opposite-sex odor and responses to it vary with age and sex in meadow voles (*microtus pennsylvanicus*). *J Chem Ecol* 25 : 757-769, 1999.
- Gallagher M, Wysocki CJ, Leyden JJ, Spielman AI, Sun X & Preti G. Analyses of volatile organic compounds from human skin. *Br J Dermatol* 159 : 780-791, 2008.
- Gillam EM, Notley LM, Cai H, De Voss JJ & Guengerich FP. Oxidation of indole by cytochrome p450 enzymes. *Biochemistry* 39 : 13817-13824., 2000.
- Goodrich BS & Mykytowycz R. Individual and sex differences in the chemical composition of pheromone-like substances from the skin glands of the rabbit, *oryctolagus cuniculus*. *J Mammal* 53 : 540-548, 1972.
- Gutierrez-Garcia AG, Contreras CM, Mendoza-Lopez MR, Garcia-Barradas O & Cruz-Sanchez JS. Urine from stressed rats increases immobility in receptor rats forced to swim : Role of 2-heptanone. *Physiol Behav* 91 : 166-172, 2007.

- Halliday TR. Sexual selection and mate choice. Blackwell Scientific, Oxford. 1978.
- Halliday TR. The study of mate choice. Cambridge University Press, Cambridge. 1983.
- Harvey S, Jemiolo B & Novotny M. Pattern of volatile compounds in dominant and subordinate male mouse urine. *J Chem Ecol* 15 : 2061–2072, 1989.
- Haze S, Gozu Y, Nakamura S, Kohno Y, Sawano K, Ohta H & Yamazaki K. 2-nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J Invest Dermatol* 116 : 520–524., 2001.
- Holland M, Rhodes G, DalleAve M, Wiesler D & Novotny M. Urinary profiles of volatile and acid metabolites in germfree and conventional rats. *Life Sci* 32 : 787–794, 1983.
- Hurst JL, Payne CE, Nevison CM, Marie AD, Humphries RE, Robertson DH, Cavaggoni A & Beynon RJ. Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature* 414 : 631–634, 2001.
- Inagaki H, Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y & Mori Y. Enhancement of the acoustic startle reflex by an alarm pheromone in male rats. *Physiol Behav* 93 : 606–611, 2008.
- Isles AR, Baum MJ, Ma D, Keverne EB & Allen ND. Urinary odour preferences in mice. *Nature* 409 : 783–784, 2001.
- Jacob S, McClintock MK, Zelano B & Ober C. Paternally inherited hla alleles are associated with women's choice of male odor. *Nat Genet* 30 : 175–179, 2002.
- Jemiolo B, Alberts J, Sochinski-Wiggins S, Harvey S & Novotny M. Behavioral and endocrine responses of female mice to synthetic analogues of volatile compounds in male urine. *Anim. Behav.* 33 : 1114–1118, 1985.
- Jemiolo B, Andreolini F, Xie TM, Wiesler D & Novotny M. Puberty-affecting synthetic analogs of urinary chemosignals in the house mouse, *mus domesticus*. *Physiol Behav* 46 : 293–298, 1989.
- Jemiolo B, Harvey S & Novotny M. Promotion of the whitten effect in female mice by synthetic analogs of male urinary constituents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 4576–4579, 1986.
- Kanehisa M & Goto S. Kegg : Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28 : 27–30., 2000.
- Kashiwayanagi M. Augmentation of sensitivity to urinary pheromone and excreting of urinary pheromone by sexual experiences. *Chem Senses* 30 Suppl 1 : i138–139, 2005.
- Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y & Mori Y. Alarm pheromone that aggravates stress-induced hyperthermia is soluble in water. *Chem Senses* 30 : 513–519, 2005.
- Kiyokawa Y, Shimozuru M, Kikusui T, Takeuchi Y & Mori Y. Alarm pheromone increases defensive and risk assessment behaviors in male rats. *Physiol Behav* 87 : 383–387, 2006.
- Klein J. H-2 mutations : Their genetics and effect on immune functions. *Adv Immunol* 26 : 55–146, 1978.
- Kokko H & Lindstrom J. Evolution of female preference for old mates. *Proc Biol Sci* 263 : 1533–1538, 1996.
- Kwak J, Jackson M, Preti G, Curran M, Yamazaki K & Beauchamp GK. (2005). Characteristic odor components in mouse urine. In *37th Middle Atlantic Regional Meeting of the American Chemical Society*, American Chemical Society, New Brunswick, NJ, USA.,
- Kwak J, Opiekun MC, Matsumura K, Preti G, Yamazaki K & Beauchamp GK. Major histocompatibility complex - regulated odortypes : Peptide-free urinary volatile signals. *Physiol Behav* 96 : 184–188, 2009.
- Kwak J, Willse A, Matsumura K, Curran Opiekun M, Yi W, Preti G, Yamazaki K & Beauchamp GK. Genetically-based olfactory signatures persist despite dietary variation. *PLoS One* 3 : e3591, 2008.
- Kwak J, Willse A, Preti G, Yamazaki K & Beauchamp GK. In search of the chemical basis for mhc odortypes. *Proc R. Soc. Lond. B Biol Sci* 277 : 2417–2425, 2010.
- Lieblich HM, Zlatkis A, Bertsch W, Van Dahm R & Whitten WK. Identification of dihydrothiazoles in urine of male mice. *Biomed Mass Spectrom* 4 : 69–72, 1977.
- Lin DY, Zhang SZ, Block E & Katz LC. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 434 : 470–477, 2005.
- Lucas PD, Donohoe SM & Thody AJ. The role of estrogen and progesterone in the control of preputial gland sex attractant odors in the female rat. *Physiol Behav* 28 : 601–607, 1982.
- Manning JT. Choosy females and correlates of male age. *J. Theor. Biol.* 116 : 349–354, 1985.
- Marklova E. Where does indolylacrylic acid come from? *Amino Acids* 17 : 401–413, 1999.
- Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y & Umesaki Y. Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse p1/yit strain. *Gut* 43 : 71–78., 1998.
- Meagher S, Penn DJ & Potts WK. Male-male competition magnifies inbreeding depression in wild house mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 3324–3329, 2000.
- Miyashita K & Robinson AB. Identification of compounds in mouse urine vapor by gas chromatography and mass spectrometry. *Mech Ageing Dev* 13 : 177–184, 1980.
- Mohacs A, Kozlovszky B, Kiss I, Seres I & Fulop T, Jr. Neutrophils obtained from obliterative atherosclerotic patients exhibit enhanced resting respiratory burst and increased degranulation in response to various stimuli. *Biochim Biophys Acta* 1316 : 210–216., 1996.
- Muller MN, Thompson ME & Wrangham RW. Male chimpanzees prefer mating with old females. *Curr Biol* 16 : 2234–2238, 2006.
- Muller-Schwarze D. Pheromones in black-tailed deer (*odocoileus hemionus columbianus*). *Anim Behav* 19 : 141–152, 1971.
- Nazzaro-Porro M, Passi S, Boniforti L & Belsito F. Effects of aging on fatty acids in skin surface lipids. *J Invest Dermatol* 73 : 112–117, 1979.
- Novotny M, Harvey S, Jemiolo B & Alberts J. Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 : 2059–2061, 1985.
- Novotny M, Jemiolo B, Harvey S, Wiesler D & Marchlewska-Koj A. Adrenal-mediated endogenous metabolites inhibit puberty in female mice. *Science* 231 : 722–725, 1986.
- Novotny MV, Jemiolo B, Wiesler D, Ma W, Harvey S, Xu F, Xie TM & Carmack M. A unique urinary constituent, 6-hydroxy-6-methyl-3-heptanone, is a pheromone that accelerates puberty in female mice. *Chem Biol* 6 : 377–383, 1999a.
- Novotny MV, Ma W, Wiesler D & Zidek L. Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse : The volatile ligands associating with the major urinary protein. *Proc R Soc B* 266 : 2017–2022, 1999b.
- Ober C, Weitkamp LR, Cox N, Dytch H, Kostyu D & Elias S. Hla and mate choice in humans. *Am J Hum Genet* 61 : 497–504, 1997.
- O'Keefe TL, Williams GT, Batista FD & Neuberger MS. Deficiency in cd22, a b cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J. Exp. Med.*

- 189 : 1307–1313., 1999.
- Olsen RL & Little C. Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood. *Biochem. J.* 209 : 781–787, 1983.
- Osada K. HS–SPME : Powerful analytical technique to the chemical components of body odour. *Jpn J Taste Smell Res* 13 : 59–66, 2006.
- Osada K, Curran M, Kurachi M, Tsunoda K & Yamazaki K. Effect of an orally ingested mugwort and mushroom extract mixture on urine odor from aged mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 72 : 1249–1256, 2008a.
- Osada K, Hanawa M, Tsunoda K & Izumi H. Alteration of mouse urinary odor by ingestion of the xenobiotic monoterpene citronellal. *Chem Senses*, in press.
- Osada K, Kashiwayanagi M & Izumi H. Profiles of volatiles in male rat urine : The effect of puberty on the female attraction. *Chem Senses* 34 : 713–721, 2009.
- Osada K, Tashiro T, Mori K & Izumi H. The identification of attractive volatiles in aged male mouse urine. *Chem Senses* 33 : 815–823, 2008b.
- Osada K, Yamazaki K, Curran M, Bard J, Smith BP & Beauchamp GK. The scent of age. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270 : 929–933, 2003.
- Penn D & Potts WK. Untrained mice discriminate mhc–determined odors. *Physiol Behav* 64 : 235–243, 1998.
- Putter J & Becher R. Peroxidases. *Methods enzym. anal.* 3 : 286–293, 1983.
- Ramm SA, Cheatham SA & Hurst JL. Encoding choosiness : Female attraction requires prior physical contact with individual male scents in mice. *Proc Biol Sci* 275 : 1727–1735, 2008.
- Rhodes G, Holland ML, Wiesler D, Novotny M, Moore SA, Peterson RG & Felten DL. Excretion of urinary volatile metabolites in response to alloxan induced diabetes of short duration in rats. *J Chromatogr* 228 : 33–42, 1982.
- Robinson AB, Dirren H & Sheets A. Quantitative aging pattern in mouse urine vapor as measured by gas–liquid chromatography. *Exp Gerontol* 11 : 11–16, 1976.
- Rudolph MG, Speir JA, Brunmark A, Mattsson N, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L & Wilson IA. The crystal structures of k (bm1) and k (bm8) reveal that subtle changes in the peptide environment impact thermostability and alloreactivity. *Immunity* 14 : 231–242, 2001.
- Russell LB & Russell WL. Spontaneous mutations recovered as mosaics in the mouse specific–locus test. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 13072–13077, 1996.
- Schaefer ML, Wongravee K, Holmboe ME, Heinrich NM, Dixon SJ, Zeskind JE, Kulaga HM, Brereton RG, Reed RR & Trevejo JM. Mouse urinary biomarkers provide signatures of maturation, diet, stress level, and diurnal rhythm. *Chem Senses* 35 : 459–471, 2010.
- Schaefer ML, Yamazaki K, Osada K, Restrepo D & Beauchamp GK. Olfactory fingerprints for major histocompatibility complex–determined body odors ii : Relationship among odor maps, genetics, odor composition, and behavior. *J Neurosci* 22 : 9513–9521, 2002.
- Schaefer ML, Young DA & Restrepo D. Olfactory fingerprints for major histocompatibility complex–determined body odors. *J Neurosci* 21 : 2481–2487, 2001.
- Schellinck HM, West AM & Brown RE. Rats can discriminate between the urine odors of genetically identical mice maintained on different diets. *Physiol Behav* 51 : 1079–1082, 1992.
- Sharrow SD, Vaughn JL, Zidek L, Novotny MV & Stone MJ. Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins. *Protein Sci* 11 : 2247–2256, 2002.
- Singer AG, Beauchamp GK & Yamazaki K. Volatile signals of the major histocompatibility complex in male mouse urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 : 2210–2214, 1997.
- Swaney WT, Curley JP, Champagne FA & Keverne EB. Genomic imprinting mediates sexual experience–dependent olfactory learning in male mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 6084–6089, 2007.
- Tashiro T & Mori K. Pheromone synthesis, ex vivo synthesis of enantiomers of 2–sec–butyl–4, 5–dihydrothiazole and (1r, 5s, 7r)–3, 4–dehydro–exo–brevicomin, pheromone components of the male mouse, *mus musculus*. *Eur J Org Chem* : 2167–2173, 1999.
- Tashiro T, Osada K & Mori K. Syntheses of 2–isopropyl–4, 5–dihydrothiazole and 6–hydroxy–6–methyl–3–heptanone, pheromone components of the male mouse, *mus musculus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72 : 2398–2402, 2008.
- Trivers RL. Paternal investment and sexual selection. Aldine Publishing Company, Chicago. 1972.
- van Bleek GM & Nathanson SG. The structure of the antigen–binding groove of major histocompatibility complex class I molecules determines specific selection of self–peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 : 11032–11036, 1991.
- Van Der Lee S & Boot LM. Spontaneous pseudopregnancy in mice. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 4 : 442–444, 1955.
- Van Der Lee S & Boot LM. Spontaneous pseudopregnancy in mice. ii. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 5 : 213–215, 1956.
- Vandenbergh JG. Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice. *Endocrinology* 81 : 345–349, 1967.
- Wedekind C, Seebeck T, Bettens F & Paepke AJ. Mhc–dependent mate preferences in humans. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 260 : 245–249, 1995.
- Whitten WK, Bronson FH & Greenstein JA. Estrus–inducing pheromone of male mice : Transport by movement of air. *Science* 161 : 584–585, 1968.
- Willse A, Belcher AM, Preti G, Wahl JH, Thresher M, Yang P, Yamazaki K & Beauchamp GK. Identification of major histocompatibility complex–regulated body odorants by statistical analysis of a comparative gas chromatography/mass spectrometry experiment. *Anal Chem* 77 : 2348–2361, 2005.
- Yamaguchi M, Yamazaki K, Beauchamp GK, Bard J, Thomas L & Boyse EA. Distinctive urinary odors governed by the major histocompatibility locus of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 : 5817–5820., 1981.
- Yamaguchi T, Inamura K & Kashiwayanagi M. Increases in fos–immunoreactivity after exposure to a combination of two male urinary components in the accessory olfactory bulb of the female rat. *Brain Res* 876 : 211–214, 2000.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Bard J & Boyse EA. Sex–chromosomal odor types influence the maintenance of early pregnancy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 : 9399–9401, 1989.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Bard J, Boyse EA & Thomas L. Chemisensory identity and immune function in mice. *Chem Senses* 3 : 211–225, 1991.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Curran M, Bard J & Boyse EA. Parent–progeny recognition as a function of mhc odortype identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 10500–10502, 2000.

- Yamazaki K, Beauchamp GK, Kupniewski D, Bard J, Thomas L & Boyse EA. Familial imprinting determines h-2 selective mating preferences. *Science* 240 : 1331-1332, 1988.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Shen FW, Bard J & Boyse EA. Discrimination of odortypes determined by the major histocompatibility complex among outbred mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 3735-3738, 1994.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Thomas L, Bard J & Boyse EA. Determination of distinction odortypes by mutation of class I and class II MHC genes. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1990.
- Yamazaki K, Beauchamp GK, Wysocki CJ, Bard J, Thomas L & Boyse EA. Recognition of h-2types in relation to the blocking of pregnancy in mice. *Science* 221 : 186-188, 1983.
- Yamazaki K, Boyse EA, Bard J, Curran M, Kim D, Ross SR & Beauchamp GK. Presence of mouse mammary tumor virus specifically alters the body odor of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 5612-5615, 2002.
- Yamazaki K, Boyse EA, Mike V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA & Thomas L. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 144 : 1324-1335, 1976.
- Yamazaki K, Yamaguchi M, Baranoski L, Bard J, Boyse EA & Thomas L. Recognition among mice. Evidence from the use of a y-maze differentially scented by congenic mice of different major histocompatibility types. *J Exp Med* 150 : 755-760, 1979.
- Zhang JX, Sun L, Zhang JH & Feng ZY. Sex- and gonad-affecting scent compounds and 3 male pheromones in the rat. *Chem Senses* 33 : 611-621, 2008.