HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イソフルラン暴露による延髄最後野におけるc-Fosの発現誘導に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	長谷, 徹太郎
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12122号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/61870
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。　配架番号：2226
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Tetsutaro_Hase_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文（要約）

イソフルラン暴露による延髄最後野における c-Fos の発現誘導に関する研究

(Studies on c-Fos expression in area postrema of the rat induced by isoflurane)

2016 年 3 月

北　海　道　大　学

長 谷　徹 太 郎

学　位　論　文（要約）

イソフルラン暴露による延髄最後野における c-Fos の発現誘導に関する研究

(Studies on c-Fos expression in area postrema of the rat induced by isoflurane)

2016 年 3 月

北　海　道　大　学

長 谷　徹 太 郎

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・　１頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４頁

実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・　５頁

実験結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・　７頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　８頁

総括及び結論　・・・・・・・・・・・・・・・　１０頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・　１１頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として投稿中である。

1． Tetsutaro Hase, Toshikazu Hashimoto, Hitoshi Saito, Yosuke Uchida, Rui Kato, Kenkichi Tsuruga, Koichi Takita, Yuji Morimoto.
Isoflurane induces c-Fos expression in area postrema of the rat.
Canadian journal of anesthesia

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1． Tetsutarou Hase, M.D., Toshikazu Hashimoto, M.D.,Ph.D., Koichi Takita, M.D.,Ph.D., Hitoshi Saito, M.D., Yosuke Uchida, M.D., Rui Kato, M.D.,Ph.D., Kenkichi Tsuruga, M.D., Yuji Morimoto, M.D.,Ph.D.
Volatile Anesthetic Isoflurane Induces c-Fos Expression in the Rat Area Postrema
American Society of Anesthesiology 2013 Annual Meeting. October 12 - 16, 2013, San Francisco, California, USA

2． 長谷徹太郎、橋本聡一、瀧田恒一、内田洋介、加藤類、森本裕二
イソフルランはラット最後野とNTSにおいてc-Fosの発現を誘導する
日本麻酔科学会第61回学術集会. 5月15 - 17日,2014, 横浜

3． Tetsutarou Hase, M.D., Toshikazu Hashimoto, M.D., Ph.D., Koichi Takita, M.D.,Ph.D., Hitoshi Saito, M.D., Yosuke Uchida, M.D., Rui Kato, M.D.,Ph.D., Kenkichi Tsuruga, M.D., Yuji Morimoto, M.D.,Ph.D.
Ondansetron Inhibits C-Fos Expression Induced by Isoflurane Exposure in the Rat Area Postrema
American Society of Anesthesiology 2014 Annual Meeting. October 11 - 15, 2014, New Orleans, Louisiana, USA

緒言

術後悪心嘔吐は、未だに周術期の大きな問題の一つである。重度の合併症を引き起こすことは少ないが、患者にとっては非常に不快な周術期合併症とされる[1]。術後悪心嘔吐の患者背景としては、若い年齢、女性、非喫煙歴、動揺病の既往などの素因で増加することが知られている[2,3]。臨床研究の結果、術後悪心嘔吐は吸入麻酔薬、術後の麻薬の使用が麻酔方法では最大の原因となっている[4,5]。最近では、遺伝的研究により遺伝子多型、5-HT3 やムスカリン、D2 受容体の影響や、薬剤代謝の影響が知られつつある[4]。また、術後嘔吐の頻度は、吸入麻酔曝露時間が延びるにつれ、増加する[5]。術後悪心嘔吐の発生率を予測する因子はあるが、これまでその機序を示した研究はない。多数の臨床試験で、術後悪心嘔吐をコントロールするのに様々な薬理学的ターゲットの情報が得られ、神経系に対する多角的なアプローチの必要性が判明しつつある。術後嘔気の予防には 5-HT3 受容体拮抗薬であるオンダンセトロンが有用だが、嘔吐の予防には D2 受容体遮断薬のドロペリドールが有効との報告もあり、嘔気と嘔吐ではその発生機序が違う可能性も指摘されている[6]。吸入麻酔薬、静脈麻酔薬による麻酔でのオンダンセトロン、デキサメタゾン、ドロペリドールの予防薬併用の報告では、これらの予防薬を併用しても、術後嘔気嘔吐の発生はゼロにはならないことが示されている[7]。新しい制吐薬の NK-1 受容体拮抗薬は、スンクスでのその有用性の報告があり[8]、ヒトでも嘔吐を強く抑制することが報告されている[9]。こういった臨床的発見にかかわらず、術後悪心嘔吐を来す経路は判明していない。

最後野(Area postrema: AP)は延髄背側に位置し、脳血液関門を欠く脳室周囲器官である[10]。孤束核(Nucleus of the solitary tract: NTS)や背側運動核といった迷走神経背側複合体に密接にシナプス結合している。以前より、AP は悪心嘔吐にかかわる化学受容体引き金帯 (Chemoreceptor Trigger Zone: CTZ) として知られている[13]。イヌ[11]およびネコ[12,14]の実験やヒトでの臨床経験[15]で、AP の焼灼で嘔吐行動が発現しなくなった報告があり、嘔吐の経路として延髄背側の関与は確立されている。

一方、悪性腫瘍に対する抗腫瘍薬による悪心嘔吐に対する研究は進んでおり、これまでに AP や NTS の関連が指摘されている。スンクスでは、シスプラチン投与により AP と NTS での神経細胞活動の活性化が示されている[16]。フェレットでは AP の焼灼により、シスプラチン投与による遅発性のがん化学療法誘発性嘔吐の抑制が示されている[17]。また嘔吐を欠くラットでも、シスプラチン投与により AP・NTS での、神経細胞の活動性の指標とされる、c-Fos タンパクの発現上昇が報告されている[18,19]。げっ歯類では嘔吐反射はないが、代わりにカオリンなど通常の餌ではないものに食欲を示す異食行動 (pica) を行うとされ、pica で摂取するカオリンの摂食量と c-Fos の関連が報

告されている[20-22]。
また、同様に嘔気嘔吐を来すオキシコドンやトラキネム酸でも、AP での神経細胞の活動性の上昇と pica の亢進が示されている[23,24]。
したがって、我々は、術後悪心嘔吐が AP・NTS における麻酔による神経細胞の活動性惹起に起因するとの仮説を立てた。もしこの仮説が正しいとすると、制吐薬により、この神経細胞の興奮が抑制されうると考えた。この仮説を検証するため、現在広く使用されている代表的な吸入麻酔薬であるイソフルランに暴露したラットの AP と NTS での神経細胞の活動性を、免疫組織学的な手法を使用し評価した。制吐薬としては、5-HT3 受容体拮抗薬であるオンダンセトロンと D2 受容体遮断薬であるドロペリドールを用いた。

略語表

本文および図中で使用した略語は以下の通りである。

AP　最後野（Area postrema）

NTS　孤束核（Nucleus of the solitary tract）

PBS　リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline）

PFA　パラホルムアルデヒド（Paraformaldehyde）

DAB　Diaminobenzidine

１．　実験材料および実験方法

【実験動物】

実験には雄性の Wistar 系ラットを用いた。ラットは恒温（22-25℃）環境下、12 時間毎の明暗サイクル（6:00-18:00 の明暗）で飼育し、水及び固形飼料は実験直前まで自由に与えた。
実験はすべて「北海道大学における動物実験に関する指針」に準拠して行った。

【イソフルラン暴露】

１．１．イソフルランによる時間依存性の評価
週齢 10～11 の雄性ラットを、以下の群に分け、イソフルラン暴露を行った。
1.3%イソフルラン（Abbott Laboratories, North Chicago, IL, U.S.A）に 0 分(N=5)、90 分(N=6)、120 分(N=6)、180 分(N=5)、240 分(N=6)で暴露した。キャリアガスとして酸素と窒素の混合ガス（酸素濃度 40%、総流量 6l/分）を用いた［この混合ガスは以下の群でも使用した］。

１．２．イソフルランによる濃度依存性の評価
週齢 10～11 の雄性ラットを、以下の群に分け、イソフルラン暴露を行った。
120 分間、0%(N=5)、1.3%(N=6)、2.6%(N=5)イソフルランに暴露した。

１．３．制吐薬使用後のイソフルラン暴露
週齢 10～11 の雄性ラットを以下の群に分け、イソフルラン暴露を行った。
イソフルラン暴露 30 分前に、オンダンセトロン（コントロール群，1mg/kg 群，2mg/kg 群，4mg/kg 群;各群 n=6)、ドロペリドール(コントロール群，30μg/kg 群，100μg/kg 群， 300μg/kg 群;各群 n=4)を腹腔内投与し、1.3%イソフルランに 120 分間暴露した。

上記暴露後、延髄 AP を含む 30μm 厚の水平断薄切切片を作成した。切片は AP 全体から作成し、切片は 3 切片毎に 1 切片採取した。

【DAB 染色】

AP 切片をマウントしたスライドグラスを 30 分間のクエンチ処理、3%正常ロバ血清で 60 分間室温下のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、神経細胞活動性のマーカーである c-Fos タンパクを標的とした抗 c-Fos 抗体(1:5,000, catalog No.sc-52-G, Goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)と 4℃で一晩反応させた。続けて、ビオチン標識 - ロバ - 抗ヤギ抗体(1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA)と室温で 60 分間反応させた。二次抗体反応後、アビジン - ビオチン複合体システム (Vector Laboratories)を室温で 60 分間反応させた。その後、DAB キット(Vector Laboratories)を 10～15 分間反応させた。反応終了後、100%エタノールで 10 分間の脱水処理、キシレンで 10 分間の透徹処理を行い、乾燥させ、VectaMount Permanent Mounting Medium で封入した。

【光学顕微鏡】

作成したサンプルを光学顕微鏡(Olympus Model BX51TRF; オリンパス; 日本)を使用し、c-Fos 抗体で標識された AP・NTS の細胞核の分布を観察した。各切片を 10 倍対物レンズでデジタルカメラ(model U-LH100HGAPO, オリンパス,日本)を用い、スキャンした。1 個体につき 12 切片からの画像を作成し、AP・NTS における標識された細胞核を計数した。NTS は、AP との同一の高さの標本から計数した。盲検化するために計数は処置の割り付けを知らされていない測定者が行った。計数結果を元に各個体における上位 3 切片分を合計し、統計学的検討を用いた群間比較を行った。

【統計学的手法】

すべての統計学的解析には GraphPadPrism(version 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)を用いた。3 群間の評価は一元配置分散分析を用い、Post hoc には Dennett’s test を用い分析した。
すべてのデータは平均値±標準誤差で表現し、P 値＜5%を有意水準とした。

２．　実験結果

【イソフルラン暴露の影響】

いずれのラットにおいても、ラットの自発運動は消失した。

【免疫染色の結果】

AP、NTS に、c-Fos タンパク陽性細胞が、ニッケル加 DAB 反応により黒く染色された。

【イソフルラン暴露による c-Fos 陽性細胞の時間・濃度依存性】

イソフルラン暴露の最後野での c-Fos 陽性細胞数が時間により増加することが示された($F(4,23)=20.31, P<0.0001$)。孤束核でも同様に時間依存性に増加が認められた($F(4,18)=2.978, P=0.0475$)。また、濃度の上昇に伴い、最後野の c-Fos 陽性細胞数が増加することが示された($F(2,13)=82.46, P<0.0001$)。

【制吐薬使用後のイソフルラン暴露による c-Fos 陽性細胞数の変化】

イソフルラン暴露による c-Fos 陽性細胞が、制吐薬の前投与での変化を評価するため、イソフルラン暴露 30 分前にドロペリドール、オンダンセトロンを投与した。その後 120 分間のイソフルラン暴露を行い、c-Fos 陽性細胞数を評価した。
ドロペリドール群では有意差は見られなかった。オンダンセトロン群では、4 mg/kg 群で c-Fos 陽性細胞数が有意に減少した($F(3,18)=4.491, P=0.0160$)。

３．　考察

本研究によってラットにイソフルランを暴露するとAP・NTSにおけるc-Fosタンパクが誘導されることが示された。イソフルラン暴露によるc-Fosタンパク誘導が、時間依存性、濃度依存性に増加することが示された。また、オンダンセトロンの前投与でイソフルラン暴露により誘導されるc-Fosタンパクが抑制されることが示された。
c-Fosタンパクは、初期調節性遺伝子c-fosから作成される[25]。非特異的なマーカーであるが、神経細胞での活動性のマーカーとして用いられる。今回我々は、c-Fosの発現を指標に最後野・孤束核での細胞の興奮を評価した。
シスプラチンは、抗悪性腫瘍薬であり、その代表的な副作用として、悪心・嘔吐が報告されている[26]。 シスプラチンの悪心･嘔吐に対する基礎研究はよく行われており、これまで、フェレット[17,27]や、スンクス[16,27]、ラット[18,19]などでその評価が行われてきた。シスプラチン投与により、AP・NTSにおけるc-Fosタンパクの誘導が分かっており、このc-Fos誘導が嘔吐行動に比例し、また5-HT3受容体遮断薬などの制吐薬で抑制されることから、AP・NTSでの神経細胞の活動性の上昇が、嘔吐行動につながるものと考えられている。
嘔吐の入力としては、前脳からの刺激、内耳からの刺激、血液からの刺激、消化管からの刺激が挙げられる[28]。それぞれの刺激は、NTSに集積され、対応する神経核に出力されると考えられている。入力部位としてAP、NTSは把握されているが、その詳細な経路はまだわかっていない[4,28]。
フェレットは、嘔吐反射があり、比較的容易に管理できることから、これまで嘔吐研究における標準的な動物として使用されてきた。しかしながら、吸入麻酔による嘔吐行動はみられないと報告されている[27]。実験動物として頻用されるラット・マウスはげっ歯類であり、もともと嘔吐反射を欠く。近年の化学療法誘発性悪心嘔吐の研究に伴い、嘔吐のないラットでも、脳内の構造は類似した構造をしており、その入力部位では同様の反応が見られること、嘔吐行動の代わりに異食行動（栄養のないカオリンの摂取量の上昇）が見られることが報告されている。このため、我々は、術後悪心嘔吐に関しても同様の反応が見られるのではないかと考え、AP・NTSの評価を行った。
今回の実験で、我々はイソフルラン暴露により、AP・NTSでc-Fosタンパクが誘導されることを示した。この反応は、これまで報告のあった、シスプラチン[18,20]、オキシコドン[23]、トラネキサム酸[24]投与時のラットのAPでのc-Fosタンパク発現に準じたものである。前述の研究でラットは嘔吐行動に類縁した異食行動が生じていることから、イソフルラン暴露ラットにおいても、同様の行動が期待できると考えられる。
また、c-Fos陽性細胞数の変化は、イソフルラン暴露に対する時間依存性と濃度依存性があり、イソフルランに特異的な反応と考えることができる。イソフルランのAPに

対するアプローチとして考えられるのは、血液中のイソフルラン自体が直接 AP の神経細胞に働きかけた可能性、腹部からの迷走神経刺激による可能性がある。腹部迷走神経からの入力としては、吸入麻酔薬の呼吸反応抑制が、迷走神経 C 線維を抑制することによって生じるとする報告もあり、吸入麻酔薬が迷走神経に影響する可能性は否定できない[29]。

NTS には、前庭神経からの入力も入るとされる[30]。吸入麻酔での麻酔後、めまいを強く感じるとの報告[31]もあり、NTS にはその影響が入る可能性を考え、今回は途中から評価を中断した。今後、検討の必要がある。

制吐薬に対する反応では、ドロペリドールには有意差を認めず、オンダンセトロンには有意差が認められた。ドロペリドールで有意差が見られなかった原因としては、効果部位が異なる可能性、溶媒として必要だった DMSO の影響が考えられる。効果部位に関しては、AP には D2 受容体が多いため、ドパミン受容体遮断薬の効果を持つドロペリドールの効果部位としては矛盾しないと考えられる[10]。コントロールとしてとった DMSO 溶媒の腹腔内投与群で、c-Fos タンパク陽性細胞数が増加していることから、DMSO の影響はあると考えられる。オンダンセトロンは、4 mg/kg 群において有意差が認められた。5-HT3 受容体は AP、NTS に存在することが確認されている[32]。他の報告でも、5-HT3 受容体作動薬での AP での c-Fos タンパクの発現[33]、5-HT3 受容体拮抗薬による AP での c-Fos タンパクの抑制[16]は報告されている。また完全に抑制されないことも 5-HT3 受容体拮抗薬のみで術後悪心嘔吐が解決しないことと臨床的にも矛盾しない[7]。嘔吐には 5-HT3 のみでなく他の化学受容器がかかわっていることを示唆する結果となった。オンダンセトロン 4 mg/kg 群で c-Fos タンパクの減少が見られたことから、5-HT3 受容体と c-Fos タンパクの発現を調べるため、蛍光免疫 2 重染色も行っているが、結果はまだ出ていない。NK-1 受容体拮抗薬、ステロイドなどの他の作用機の制吐薬、また制吐薬の併用も、検討が必要と考えられる。

この研究の問題点としては、以下の 3 点が挙げられる。1 つは、実際にラットが異食行動を示すかどうかである。これまでの報告から、げっ歯類の AP での c-Fos タンパクの発現は異食行動、すなわちカオリンに対する異常食欲を示すという前提で行っている。今後、行動学的な検討が必要である。2 つ目として、イソフルランが AP に c-Fos タンパクを生じさせる経路の検討である。今回の研究では、直接作用する可能性と、迷走神経経由での可能性に関して十分な検討ができていない。迷走神経切断術などの前処置を行うことでより明確な作用機序が特定出来うるものと考える。最後に嘔吐の神経回路の特定がされていないことがある。入力部位としての、AP・NTS の神経細胞の興奮は示したが、この結果がどういった神経核を通して、嘔吐反射を導くかの更なる実験が必要である。

総括及び結論

『本研究から得られた新知見』

・イソフルラン暴露により、ラット最後野で c-Fos タンパクの誘導が確認された。
・イソフルラン暴露により、ラット NTS で c-Fos タンパクの誘導が確認された。
・オンダンセトロン前投与により、イソフルラン暴露による c-Fos タンパクの発現は抑制された。
・ドロペリドール前投与では、イソフルラン暴露による c-Fos タンパクの発現は抑制されなかった。

『新知見の意義』

術後悪心・嘔吐の基礎研究は、その対象動物が、イヌ・ネコなどの中型の動物、またはトガリネズミなどの入手・管理の難しい動物が必要であった。今回、我々の知見により、比較的管理の容易なラットでの術後悪心・嘔吐の評価が可能になったものと考える。

『今後の研究展開』

まず、前述の c-Fos/5-HT3 受容体の共発現の確認を行う。次に我々の実験では、行動学的な評価ができていない。術後悪心・嘔吐を評価するためには、カオリン摂取量と、最後野での c-Fos 発現量についての関連を調べる必要がある。また、臨床で効果のあるステロイドや NK-1 受容体遮断薬、抗ヒスタミン薬といった制吐薬により、c-Fos の抑制がされるのかの検討が必要になると考える。

『今後の課題』

嘔吐の神経回路は、未だ特定されていない。げっ歯類は、嘔吐がなく、最適ではないかもしれない。しかし、実験動物としての汎用性から、より術後悪心・嘔吐の研究を促すことになる。ラットでの反応を調べることにより、嘔吐の神経回路を検討していくことが可能になると思われる。

引用文献

1. Gan, T. J., et al. A. How much are patients willing to pay to avoid postoperative nausea and vomiting? *Anesth. Analg.* 92, 393-400 (2001).
2. Apfel, C. C., et al. A simplified risk score for predicting postoperative nausea and vomiting - Conclusions from cross-validations between two centers. *Anesthesiology* 91, 693-700 (1999).
3. Gan, T. J. et al. Consensus guidelines for the management of postoperative nausea and vomiting. *Anesth. Analg.* 118, 85-113 (2014).
4. Horn, C. C., Wallisch, W. J., Homanics, G. E. & Williams, J. P. Pathophysiological and neurochemical mechanisms of postoperative nausea and vomiting. *Eur. J. Pharmacol.* 722, 55-66 (2014).
5. Apfel, C. C. et al. Volatile anaesthetics may be the main cause of early but not delayed postoperative vomiting: a randomized controlled trial of factorial design. *Br. J. Anaesth.* 88, 659-668 (2002).
6. Andrews, P. L. R. & Sanger, G. J. Nausea and the quest for the perfect anti-emetic. *Eur. J. Pharmacol.* 722, 108-121 (2014).
7. Apfel, C. C. et al. A factorial trial of six interventions for the prevention of postoperative nausea and vomiting. *N. Engl. J. Med.* 350, 2441-2451 (2004).
8. Gardner, C. & Perren, M. Inhibition of anaesthetic-induced emesis by a NK1 or 5-HT3 receptor antagonist in the house musk shrew, Suncus murinus. *Neuropharmacology* 37, 1643-1644 (1998).
9. Tsutsumi, Y. M. et al. The effects of intravenous fosaprepitant and ondansetron for the prevention of postoperative nausea and vomiting in neurosurgery patients: A Prospective, Randomized, Double-Blinded Study. *Biomed. Res. Int.* (2014).
10. Borison, H. L. Area Postrema - Chemoreceptor circumventricular organ of the medulla-oblongata. *Prog. Neurobiol.* 32, 351-390 (1989).
11. Badola, R. P., Bhargava, K. P., Dixit, K. S. & Ratra, C. K. Role of chemoreceptor trigger zone in cyclopropane induced emesis in dogs. *Br. J. Pharmacol.* 43, 248-9 (1971).
12. Jovanovicmicic, D. et al. Ablation of the area postrema and emesis. *Metab. Brain Dis.* 4, 55-60 (1989).
13. Miller, A. D. & Leslie, R. A. The area postrema and vomiting. *Front. Neuroendocrinol.* 15, 301-320 (1994).

14. Miller, A. D. & Ruggiero, D. A. Emetic reflex are revealed by expression of the immediate-early gene c-Fos in the cat. *J. Neurosci.* 14, 871-888 (1994).
15. Lindstrom, P. A. & Brizzee, K. R. Relief of intractable vomiting from surgical lesions in area postrema. *J. Neurosurg.* 19, 228-236 (1962).
16. De Jonghe, B. C. & Horn, C. C. Chemotherapy agent cisplatin induces 48-h Fos expression in the brain of a vomiting species, the house musk shrew (Suncus murinus). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R902-R911 (2009).
17. du Sert, N. P., Rudd, J. A., Moss, R. & Andrews, P. L. R. The delayed phase of cisplatin-induced emesis is mediated by the area postrema and not the abdominal visceral innervation in the ferret. *Neurosci. Lett.* 465, 16-20 (2009).
18. Horn, C. C. Brain Fos expression induced by the chemotherapy agent cisplatin in the rat is partially dependent on an intact abdominal vagus. *Auton. Neurosci.* 148, 76-82 (2009).
19. Horn, C. C., Ciucci, M. & Chaudhury, A. Brain Fos expression during 48 h after cisplatin treatment: Neural pathways for acute and delayed visceral sickness. *Auton. Neurosci.* 132, 44-51 (2007).
20. Horn, C. C., De Jonghe, B. C., Matyas, K. & Norgren, R. Chemotherapy-induced kaolin intake is increased by lesion of the lateral parabrachial nucleus of the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1375-R1382 (2009).
21. 斎藤亮、高野行夫．ラットを用いた簡便な嘔吐測定法．日薬理誌 127, 461-5 (2006).
22. 山本浩一、大和谷厚．ラット・マウスを用いた悪心・嘔吐の研究法．日薬理誌 132,83-8 (2008).
23. Batra, V. R. & Schrott, L. M. Acute oxycodone Induces the pro-emetic pica response in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339, 738-745 (2011).
24. Kakiuchi, H., Kawarai-Shimamura, A., Kuwagata, M. & Orito, K. Tranexamic acid induces kaolin intake stimulating a pathway involving tachykinin neurokinin 1 receptors in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 723, 1-6 (2014).
25. Hunt, S. P., Pini, A. & Evan, G. Induction of c-Fos-like protein in spinal-cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328, 632-634 (1987).
26. Martin, M. The severity and pattern of emesis following different cytotoxic agents. *Oncology* 53, 26-31 (1996).
27. Horn, C. C. et al. Post-anesthesia vomiting: impact of isoflurane and morphine on ferrets and musk shrews. *Physiol. Behav.* 106, 562-568 (2012).
28. Horn, C. C. Why is the neurobiology of nausea and vomiting so important?

Appetite 50, 430-434 (2008).

29. Mutoh, T., Tsubone, H., Nishimura, R. & Sasaki, N. Effects of volatile anesthetics on vagal c-fiber activities and their reflexes in anesthetized dogs. *Respir. Physiol.* 112, 253-264 (1998).
30. Yates, B. J. et al. Organization of vestibular inputs to nucleus-tractus-solitarius and adjacent structures in cat brainstem. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 267, R974-R983 (1994)
31. Raeder, J., Gupta, A. & Pedersen, F. M. Recovery characteristics of sevoflurane- or propofol-based anaesthesia for day-care surgery. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41, 988-994 (1997).
32. Morales, M., Battenberg, E. & Bloom, F. E. Distribution of neurons expressing immunoreactivity for the 5HT3 receptor subtype in the rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 402, 385-401 (1998).
33. Ray, A. P., Chebolu, S. & Darmani, N. A. Receptor-selective agonists induce emesis and Fos expression in the brain and enteric nervous system of the least shrew (Cryptotis parva). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94, 211-218 (2009).