

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00924

研究課題名(和文)食物起因複合刺激を条件刺激とした嫌悪学習の行動学的・神経科学的基盤

研究課題名(英文) Basic studies of the conditioned aversion learning elicited by mixed stimuli of foods as CS

研究代表者

碓 哲崇 (Sako, Noritaka)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：90243154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラットは、混合味溶液の含有成分を十分認知する能力があるものの、混合の相手方の濃度依存的に、含有物の認知が困難になることが味覚嫌悪学習を応用した行動学的手法により明らかとなった。この含有の相手方による応答抑制は味覚神経レベル以下で起こっていることが電気生理学的実験により推測された。味覚神経のうち、舌咽神経を切断されたラットの混合味溶液含有物の認知能力は、正常なものと同程度であった。一方、鼓索神経を切断されたラットでは、味覚嫌悪学習の獲得自体に時間を要したが、獲得後は、正常動物と同程度の含有物認知能力を認めた。この混合味溶液含有物の認知は、1分以内の呈示で十分可能であることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒトは通常、単一化学物質ではなく複数の化学物質の混在した複合混合物を摂取している。従来の味覚研究は、あくまでも単一味物質を対象としたものがほとんどであり、この観点で研究を続ける限り、ヒトの食行動の本質を解明するには程遠いと考えられる。本研究では、行動学および神経科学的実験法を駆使し、本来ヒトが摂取している食物の、混合化学物質の味がどのように認知され、混合物間でどのような相互作用をもち、また、その神経基盤がどうなっているかを調べた基礎的研究であり、今後の“本来あるべき”ヒトの食行動の解明に大きな一歩を踏み出したものであることを自負するものである。

研究成果の概要(英文)：Our behavioral study by using of the conditioned taste aversion (CTA) learning method found that rats could recognize the component of mixed taste solutions, but that partner component obstructed the recognition of the other one in concentration - dependent. Our electrophysiological study found that this obstruction occurred in lower level than taste nerve. The rats denervated glossopharyngeal (GL) as well as chorda tympani (CT) nerves could recognize the component of mixed taste solutions. But the rats denervated CT nerve took longer time to acquire the CTA than GL denervated group. The time presented mixed taste solution as conditioned stimulus (CS) was lower than 1 min to recognize the component of CS for rats.

研究分野：口腔生理学

キーワード：食物嫌悪学習 味覚 口腔感覚 味覚神経 混合味

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを始めとする雑食性動物が通常摂取している食物は、単一の化学物質ではなく、複数の化学物質が混在しており、かつ、さらにそれらの化学物質は、硬さ、テクスチャー、温度などの物理的性質も兼ね備えた複合化学物質である。しかしながら、これら食物の性質が生体に及ぼす影響に関するこれまでの研究は、味覚研究においては、単一味刺激物質のみを対象とし、また、硬さ刺激の受容に関する研究では、食物の他の要因をほぼ無視してその硬さ受容メカニズムの解明のみを目的とするなど、単純化された研究がほとんどであった。報告者らは、このような従来の研究手法は、本来、複雑刺激であるはずの食物に対する生体反応を調べることに程遠いのではないかと常々危惧を抱いてきたところである。そもそも、単純に複数の味物質が混合された刺激を、動物がどう認識するかについても、混合味溶液は含有味溶液の性質を残して認識されるとするもの (McBurney and Gent 1979) と元の含有味溶液とは独立したユニークな味質として認識されるとするもの (Erickson and Covey 1980, Erickson 1982) など様々であり、研究者間でも一致した見解をみないのが実情であった。近年、報告者らの研究グループは、条件づけ味覚嫌悪学習を応用した動物実験により、ラットが混合味溶液の含有物をかなり正確に認識している可能性を示し (Katagawa *et al.* 2016)、少なくとも2種類の味質の混合では、それが嗜好性味刺激であっても嫌悪性味刺激であっても、その含有内容を十分認識できている可能性を明らかにした。しかしながら、実際に、これらの混合味溶液中の含有物が相互になんらかの作用を起こすことはないのか、また、末梢味覚神経レベルで混合味溶液はどのように捉えられているか、混合味溶液含有物判断の末梢および中枢神経機序、さらには、どの程度の時間で動物は、混合味溶液の含有物を判断できるのか否かについては、不明のままであった。

### 2. 研究の目的

本助成研究では、1に記載した報告者らの研究 (Katagawa *et al.* 2016) を発展させるため、以下の項目を明らかにすることを目的とした行動学的実験および神経科学的実験 (電気生理学の実験を含む) を行った。

(1) 複数の味物質を混合させた場合、その含有物を認識できることはすでに示したが、その認識能力は、それぞれの単一味刺激を認識するときとまったく差異がないのか否か。すなわち、含有溶液どうしでなんらかの相互作用があるのか否かを行動学的実験により明らかにする。

(2) (1)で行動学的な差異が認められた場合、その原因が末梢レベルにあるのか中枢レベルで生じているのかを味覚神経応答記録により電気生理学の実験により明らかにする。

(3) 味覚を伝える神経は複数あることが知られているが、含有成分の認識にどの神経も均等に同程度関わっているのか否かを神経切断動物を用いた行動実験により明らかにする。

(4) 味覚刺激 (化学刺激) に温度 (物理的刺激) 情報が加わったときに、動物は、どう認識するかを行動学的実験により明らかにする。

(5) そもそも、混合味溶液含有物を認識するために、動物は、どの程度の時間を必要とするのかを行動学的手法により明らかにする。

(6) 混合味溶液が味覚伝導路中の諸核でどう認知されているのかを脳局所破壊法や免疫組織化学的方法など神経学的手法で検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 通報に従い 30  $\mu$ M 塩酸キニーネ (Q) あるいは、30mM ショ糖 (Suc) を条件刺激 (CS) として味覚嫌悪を条件づけたラットを作成し、それぞれのラットに各種濃度の Suc と Q の混合味溶液を呈示し、その 10 秒間リック数をコントロールラット (味覚嫌悪を条件づけていないラット) との間で比較した。同様の実験を 10mM 塩酸 (H) と 30mM Suc との間でも行った。

(2) (1)でみられた混合味溶液含有成分による相互の抑制効果は、末梢神経レベルによるものか中枢神経レベルによるものかを検討するため、味覚神経のひとつである鼓索神経応答を電気生理学的手法により記録解析した。刺激溶液には、(1)と同様に Suc、Q および H を使用し、Suc 単体に各種濃度の Q、あるいは、各種濃度の H を混合した時の混合溶液に対する応答 (実測値) と各含有成分単体に対する応答の和 (理論値) を比較検討した。

(3) 味覚神経のうち鼓索神経あるいは舌咽神経が両側切断された動物でも、含有味刺激を認識できるか否かを(1)と同様の行動実験により検討した。

(4) 味覚以外に体性感覚刺激 (ここでは温度刺激) が加わった複合刺激への動物の行動応答を調べるために、25 100mM Suc を CS として味覚嫌悪を条件づけられたラットに 5 、 25 、

40 の各種濃度の Suc 溶液を呈示し、その 10 秒間リック数を調べた。

(5) 混合味溶液の内容物を認識するためには、どの程度の時間が必要なかを調べるため、CS として 100mM Suc と 30  $\mu$ M Q の混合溶液を呈示するものの、その呈示時間を 1 分、30 秒、10 秒とした 3 群を作成した。これら各群のラットに 100mM Suc や 30  $\mu$ M Q を含んだ単体の 4 基本味溶液を呈示し、それら単体溶液に対する 10 秒間リック数を調べることによって、このような非常に短時間でも混合味溶液の含有物を認識できるかどうかを検討するとともに、CS 呈示時間で忘却に違いがあるかどうかも検討した。

(6) 混合味溶液の認識の中枢機序の一端を探るため、味覚嫌悪条件づけに重要な役割を果たしていることが示唆されている両側扁桃体のイボテン酸破壊を試みたラットを作成し、これらの動物の混合味溶液の含有物認識がどのようになるかを行動学的実験により検討するとともに、混合味溶液をオーラルカニューレにて強制摂取させた動物の結合腕傍核での *c-fos* 活性が認められるかどうかを、免疫組織化学的に検討できるかを合わせて検討した。

すべての実験は、朝日大学歯学部実験動物倫理委員会の承認（承認番号：16-014、16-021、16-030、16-037、16-040、17-003、17-005、17-034、17-035、17-036、17-037、17-050、18-018、18-026、18-027、18-028、18-044）のもとに行った。

#### 4. 研究成果

(1) 30  $\mu$ M Q、30mM Suc、10mM H のいずれに条件づけられたラットもその CS の含有する混合味溶液のリック数をコントロール動物より低下させ、混合味溶液の中に CS の成分が混入していることを認識していることが明らかとなった。しかしながら、混合の相手方の濃度が上がると、条件づけ群ラットのリック数は濃度依存的に上昇していった。これらの事実から、混合味溶液を認識する際、その混合の相手方の濃度依存的に、含有味刺激の認識を阻害していることを明らかとした。また、この阻害は、含有味刺激相互に発生することもわかった。代表例として、30mM Suc に条件づけられたラットの各種濃度の Q を混入した混合溶液に対する 10 秒間リック数を図 1 に示した。

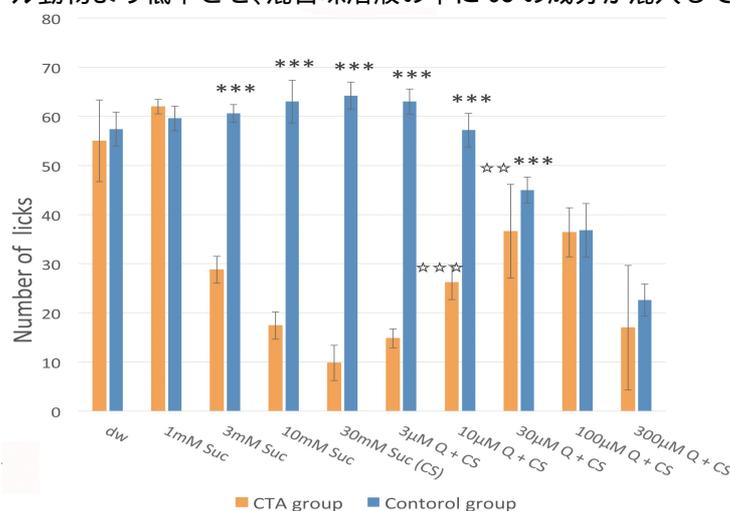


図1 30mM Sucに条件づけられたラットの各種濃度Q溶液混合溶液に対する10秒間リック数。混合するQの濃度が上昇すると嫌悪性のQが混入しているにも関わらず(Qの濃度が低濃度の範囲では)混合溶液に対するリック数がむしろ上昇することがわかる。

(2) Suc 単体に各種濃度の Q、あるいは、各種濃度の H を混合した時の混合溶液に対する鼓索神経応答（実測値）と各含有成分単体に対する鼓索神経応答の和（理論値）を比較検討した。その結果、Suc に Q を混合した場合も、Suc に H を混合した場合も、実測値と理論値の間に主効果がみられ、実測値は理論値よりも有意に小さくなった。このことから、1 でみられた含有味刺激間の抑制効果は、味覚神経以下のレベルで発生していることが明らかとなった。図 2 に代表例として、30mM Suc に各種濃度の Q を混合した時の鼓索神経応答の実測値、理論値および単体 Q に対する応答値を示した。

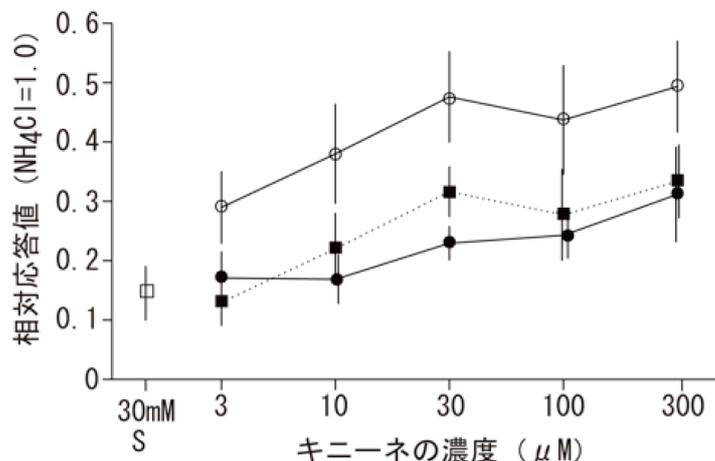


図2 30mM S 単体（白抜き四角）、3-300  $\mu$ M Q 単体（黒塗り四角）、30mM S に 3-300  $\mu$ M Q を加えた混合溶液の理論値（白丸）と実測値（黒丸）。理論値より実測値が小さいことがわかる。

がみられ、実測値は理論値よりも有意に小さくなった。このことから、1 でみられた含有味刺激間の抑制効果は、味覚神経以下のレベルで発生していることが明らかとなった。図 2 に代表例として、30mM Suc に各種濃度の Q を混合した時の鼓索神経応答の実測値、理論値および単体 Q に対する応答値を示した。

(3) 鼓索神経、舌咽神経いずれかが両側性に切断されたラットでも、味覚嫌悪条件づけの獲得さえできれば、その含有味刺激を正常動物と同程度に認識できることを明らかにした。ただし、本実験の過程で、舌咽神

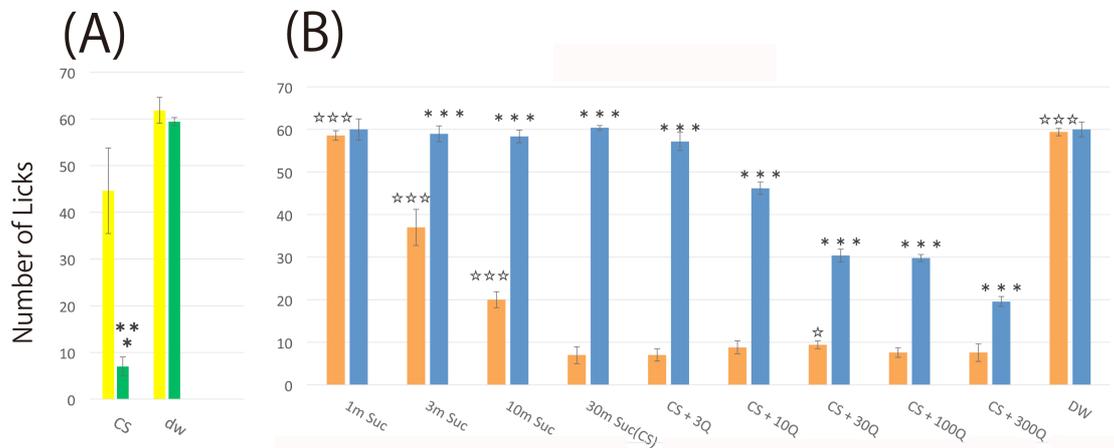


図3 (A) 両側鼓索神経が切断されたラットの条件づけ1回目(黄)と2回目(緑)のCS (30mM Suc) と蒸留水(dw) に対する10秒間リック数。条件づけ1回目では、味覚嫌悪を十分獲得できていないことがわかる。

図3 (B) 条件づけ追呈示を2回行いCS に対する十分な味覚嫌悪を獲得させたラットの各種味溶液に対する10秒間リック数。条件づけ群(オレンジ)とコントロール群(青)。条件づけを獲得さえすれば混合味溶液中の含有物を十分認識していることがわかる。

経切断動物に味覚嫌悪を獲得させるのは正常動物と同程度に容易であるものの、鼓索神経切断動物では味覚嫌悪を獲得させること自体にCS と無条件刺激(US)の追呈示を2回行う必要があるなど、困難であることを発見した。例として図3に鼓索神経切断動物の10秒間リック数をグラフに示した。

(4) 100mM Suc に味覚嫌悪を条件づけられたラットの各種濃度 Suc に対する10秒間リック数は、予想通り低濃度になるほど多くなる(認識しにくくなる)ことを明らかにしたが、同じ濃度であっても、特に低濃度領域では、高温の溶液に対するリック数が、低温のものより低く、高温の Suc の方が低温のものより認識しやすい傾向を見つけた。本事象は、まだ十分な例数が得られなかったことから、引き続き検討を行うこととした。

(5) CS として100mM Suc と30 $\mu$ M Q の混合味溶液を呈示されたラットは、CS の呈示時間が1分以内でも、すなわち、本実験で行った10秒、30秒、1分のいずれの呈示時間でも含有刺激 Suc の存在を認識した。ただし、10秒呈示のものへの忘却は、30秒以上呈示のものより早い(2日で約50%)の傾向がみられた。同じ動物の単体の30 $\mu$ M Q に対するリック数では、10秒呈示の群のリック数が30秒や1分呈示のものよりリック数の大きい傾向があり、Q の存在の認識がやや困難である状況が伺えた。これらの事実を総合すると、混合味溶液の含有物の認識には、さほど長い時間は必要とせず、1分程度の呈示で十分に認識可能な状態となっていることが明らかとなった。

(6) ラット脳マップをもとに、両側扁桃体の破壊を目指したが、残念ながら、助成研究期間内で、確実に両側扁桃体を破壊できた動物の作成には至らなかった。しかしながら、少なくとも扁桃体周辺の諸核をイボテン酸破壊されたラットはいずれも、混合味溶液中の含有性刺激の認識を正常ラットと同程度行うことが可能であった。このことは、少なくとも扁桃体周辺には、混合味溶液の含有物判断に必須の核が存在しない可能性を示唆している。ただし、本実験については、その手法も含めて、より効率的な実験手段や解析手段を今後検討すべきであると考えている。同様に c-fos 抗体をもとにした結合腕傍核の混合味溶液に対する反応性の検証を試みたが、当初予定していた c-fos 抗体をメーカーが製造を中止したことから、研究助成期間内では、本実験に有効な抗体を見つけ出す予備実験のみに留まることとなってしまった。以上のように、これら混合味溶液認識に中枢神経機序については、従来の研究手法を超えた新規の手法を開拓する必要があると考え、今後さらに検討を加える予定である。

#### < 引用文献 >

- (1) McBurney DH and Gent JF. On the nature of taste qualities. *Psychol Bull.* 86(1): 151-167, 1979.
- (2) Erickson RP and Covey E. On the singularity of taste sensations: what is a taste primary? *Physiol Behav.* 25(4): 527-533, 1980.
- (3) Erickson RP. Studies on the perception of taste: do primaries exist? *Physiol Behav.* 28(1): 57-62, 1982.
- (4) Katagawa Y, Yasuo Y, Suwabe T, Yamamura T, Gen K and Sako N. Recognition by Rats of Binary taste solutions and their components. *Chem. Senses* 41(9): 795-801, 2016.

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

(1) 山村知暉、安尾敏明、諏訪部武、裕哲崇、2種類の味物質の混合により生じたラット鼓索神経応答の抑制、日本味と匂学会第51回大会 Proceeding 集、S55-S58、2018。(査読あり)

(2) 山村知暉、安尾敏明、諏訪部武、裕哲崇、混合味溶液含有成分に味覚嫌悪を条件づけられたラットの甘味+苦味または甘味+酸味2種混合溶液への般化、日本味と匂学会第51回大会 Proceeding 集、S25-S28、2017。(査読あり)

### 〔学会発表〕(計10件)

(1) Tomoki Yamamura, Yoshihisa Katagawa, Toshiaki Yasuo, Takeshi Suwabe and Noritaka Sako, Behavioral and neural characteristics of recognition of the binary taste mixture, The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (9th FAOPS), 2019.

(2) 山村知暉、安尾敏明、諏訪部武、裕哲崇、2種混合味溶液を呈示されたラットの鼓索神経応答の特徴、日本味と匂学会第52回大会、2018.

(3) 山村知暉、安尾敏明、諏訪部武、裕哲崇、ショ糖に塩酸キニーネ、または塩酸を混合した混合味溶液刺激時のラット鼓索神経応答、第60回歯科基礎医学会学術大会、2018.

(4) 山村知暉、安尾敏明、諏訪部武、裕哲崇、嗜好性の異なる混合味溶液の識別とそれに関わる神経の検索、第3回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会(食欲・食嗜好研究会)、2018.

(5) Tomoki Yamamura, Toshiaki Yasuo, Takeshi Suwabe and Noritaka Sako, Recognition of the component of the binary taste mixtures in the rats denervated taste nerves, The 95th Annual Meetings of the Physiological Society of Japan, 2018.

(6) Tomoki Yamamura, Yoshihisa Katagawa, Shigeki Yamada, Toshiaki Yasuo, Takeshi Suwabe, Keika Gen and Noritaka Sako, How do the rats recognize individual components of mixed taste solutions? -Review of our recent behavioral studies-, The 16th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfaction Perception, 2017.

(7) 山村知暉、安尾敏明、諏訪部武、裕哲崇、混合味溶液含有成分に味覚嫌悪を条件づけられたラットの甘味+苦味または甘味+酸味2種混合溶液への般化、日本味と匂学会第52回大会、2017.

(8) 山村知暉、安尾敏明、諏訪部武、裕哲崇、ラットにおける混合味溶液中の含有味溶液認識に及ぼす溶液濃度の影響、第59回歯科基礎医学会学術大会、2017.

(9) 片川吉尚、山村知暉、山田茂貴、安尾敏明、諏訪部武、玄景華、裕哲崇、嗜好性の異なる味溶液を混合した場合にその識別性と嗜好性はどのように変化するか?、第2回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会(食欲・食嗜好研究会)、2017.

(10) Tomoki Yamamura, Toshiaki Yasuo, Takeshi Suwabe and Noritaka Sako, Suppression of the taste intensity of paired component in the binary taste mixture of sweet and bitter may occur reciprocally, The 94th Annual Meetings of the Physiological Society of Japan, 2017.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：諏訪部 武

ローマ字氏名：Suwabe Takeshi

所属研究機関名：朝日大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 00610312

研究分担者氏名：安尾 敏明  
ローマ字氏名：Yasuo Toshiaki  
所属研究機関名：朝日大学  
部局名：歯学部  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：30608469