

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：82412
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K10236
研究課題名（和文）味覚の臨界期を探るためのGRINレンズによる覚醒マウスの脳内イメージング法の確立

研究課題名（英文）Establishment of brain imaging method of awakened mice using GRIN lenses to explore the critical period of taste

研究代表者
武井 浩樹（Takei, Hiroki）

埼玉県立小児医療センター（臨床研究部）・歯科・医員

研究者番号：50632543
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、脳内のニューロン活動を経過観察できるGRINレンズをマウスに埋入した状態で、種々の味覚物質を摂取させた際のニューロン群の発達に伴う発動パターンを覚醒下にて計測する方法の確立と味覚野の「臨界期」の存在を検証することを目的とした。6mmのGRINレンズ挿入法の確立に取り組んだが、術後の出血および組織の再生によりイメージング視野を維持することが非常に難しかった。そこで、光学プリズムを脳側頭部に挿入し、プリズムを通した味覚野イメージング法の開発を行った。動物に対する襲度合いを大幅に抑えた慢性実験用の手技を開発し、覚醒状態でカルシウム応答を計測することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、光学プリズムによる動物に対する襲度合いを大幅に抑えた慢性実験用の手技を開発し、慢性的に動物の状態を良好に維持しつつ覚醒状態でカルシウム応答を計測することが可能となった。しかしながら、皮質表面における組織再生の問題は完全に解決しておらず、研究期間中に「味覚の臨界期」を決定する当初の実験計画を実行するまでには至らなかった。今後、皮質表面組織再生等の問題を解決することにより「味覚の臨界期」の解明を行うことの一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish a method to measure the firing patterns associated with the development of a group of neurons in mice while awake, when various taste substances are ingested, and to verify the existence of a "critical period" in the gustatory cortex. We tried to establish a method for inserting a 6-mm GRIN lens, but it was very difficult to maintain the imaging field of view due to postoperative hemorrhage and tissue regeneration. Therefore, an optical prism was inserted into the temporal region of the brain, and an imaging method of the gustatory cortex through the prism was developed. We have developed a technique for chronic experiments that is much less invasive to animals, and can measure calcium responses in the awake state.

研究分野：成長および発育系歯学関連

キーワード：味覚 臨界期 プリズム光学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児期に獲得した味覚形成は生涯にわたり多大な影響を及ぼす可能性が指摘されている。そのため幼児期で偏った食習慣がつくと、成長後の高血圧、肥満症や糖尿病などの生活習慣病の発症・進行を助長することにつながる。また、砂糖含有食品・飲料の摂取は小児期のう蝕の原因になり、う蝕は歯内清掃の習慣よりも食習慣に影響されるとの報告が既にされている(Granathら 1976, 1978 田浦ら 1983)。人の口腔内の味蕾分布やその成熟程度を調べたこれまでの研究では、他の感覚器官と比較して、すでに成熟した多数の味蕾が分布しており、哺乳に重要な役割を果たすことが推察されている(田原ら 2004)。一方で味情報を伝える鼓索神経において、3週齢(離乳直後)と12週齢のラットでの塩味や苦味に対する応答の差異が認められている(Ferrellら 1981, Yamada 1980)。また、小児(未就学児)を対象とした味覚閾値に関する研究では、甘味は成人よりも感受性が高く、逆に塩味は成人の方が高いという結果が示されている(三輪ら 1997)。これは、実験動物(ヒツジ)においても塩味に対する感受性が生後、徐々に発達することと一致すると推察されている(Bradleyら 1973)。したがって、末梢の味質を受容する味蕾が既に小児で十分に存在しているにもかかわらず、このような味覚の閾値や感受性の違いが生じる。その理由の1つとして、末梢神経の軸索の肥大化や中枢神経系における神経伝達や回路修飾に起因する可能性が考えられる。

種々の味に関する情報は、舌咽神経などの種々の求心神経を介して脳内に入り最終的に島皮質周辺部に存在する味覚野に到達する。例えば、味情報の中継核の1つである孤束核において、1-2週齢幼若ラットの急性スライス脳標本では、テトロドトキシン灌流下で記録される活動電位非依存的なグルタミン酸放出が成獣ラットよりも多いことが知られる。さらに、数日でグリア細胞の突起がシナプス間隙の間に割って入ることにより、シナプス間の距離と伝達度合いを調節することによって成熟したシナプスが形成される(Tashiro 2007)。皮質のニューロンやそれらによって構成される神経回路でも可塑性に富んでいることが知られる。幼若期に瞼を縫合し、その後に抜糸したネコでは遮蔽した目で弱視になることが知られている(Swindale 1980)。同時に大脳皮質視覚野でも単眼遮蔽によって変質が生じた神経回路は元には戻らないことが分かっており、臨界期後の神経回路では可塑的变化が起こりづらい事を意味する。しかし、他の皮質感覚受容野に関する研究と比較し味覚野の研究は後れを取っており、皮質視覚野で広く知られる視覚の臨界期が、味覚にも存在するか未だ不明である。

小児期の味覚形成は、その時期の食習慣に左右されやすい乳歯齲蝕の原因となり得て、その後の生活習慣病の発症・進行を助長することにつながる可能性がある。成熟した味覚形成はすでに完了している小児期において、味覚情報を脳内に伝える脳神経線維や中継核ではまだ発達途上である。したがって味覚を生み出す大脳皮質味覚野においても同様に、(発達)神経経路形成)が完了していないと考えられる。しかし、過去の研究では成長に伴う味覚の変化が報告されているにもかかわらず、大脳皮質視覚野で認められ、神経回路の発達が完了する「臨界期」が、味覚にも当てはまるか未解明のままである。

2. 研究の目的

島皮質での神経回路の時間軸に沿った変化を明らかにできれば、そのタイミングで起こる可塑的变化のメカニズム、すなわちどのような分子が神経回路を変化させるのかを追究することが可能になる。例えば、離乳1週間後に島皮質のニューロンの興奮性に変

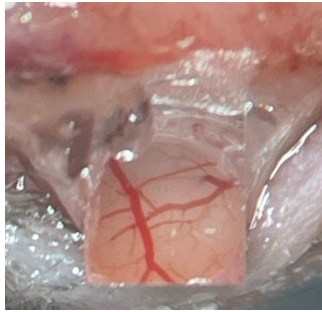
化がみとめられれば、それに先行して臨界期の回路形成に重要な役割を果たす BDNF が結合する TrkB 受容体拮抗薬などの種々の薬物を投与することで、島皮質の可塑的变化を抑制することが可能であると推察される、そこで、我々は一度埋入すると長期間にわたり脳内のニューロン活動の経過観察が可能である GRIN レンズを用いて、種々の味質物質を摂取させた際のニューロン群の発達に伴う発動パターンの変化を数週間にわたり覚醒下の動物にて計測することを試みた。本研究の手法で「味覚の臨界期」を知ることが出来るのと考えられる。「味覚の臨界期」を科学的に示すことにより現在、幼児期の食生活の重要性を科学的に証明することに寄与する。

3. 研究の方法

GCaMP6s マウスをイソフルランで全身麻酔し、電動マニピュレーターに把持させた GRIN レンズを低速で刺入する。刺入する際には出血量を極力抑制するために、心拍数、血中酸素飽和度および直腸温をモニターして血圧を低めに維持する。GRIN レンズの先端が島皮質に到達した後、観察視野に出血がないことを確認し、GRIN レンズを頭蓋骨に固定する。

4. 研究成果

予備実験の際、島皮質味覚野に挿入した3.7mm GRINレンズを通して皮質からのカルシウム応答を計測することが可能であることを確認していたが、急性標本を基に実験手法を確立したためレンズ長が慢性実験に対応できないことが判明した。そのため3.7mmから6mmのGRINレンズに変更し同様の手法を慢性実験に適用しようと試みた。しかしながら、術後の出血および組織の再生によりイメージング視野を維持することが非常に難しく、視野の確保が実現できないため味覚野可塑性の検証も進まない状態が続いた。GRINレンズを使用する理由は味覚野が脳の側頭下部に位置するため、イメージングを真上から行えない点にある、そこで、真上からのイメージングを可能にする光学プリズムを脳側頭部に挿入し、プリズムを通した味覚野イメージング法の開発を6mm GRIN レンズ挿入実験と並行して行った。なお、この手法はGRINレンズのように皮質に直接挿入する必要がないため、皮質を損傷することがなく術後出血問題を回避することができる。プリズム挿入自体は、島皮質における侵害情報処理の研究用に開発した手術手技を応用することで問題なく実行することができたが、この手技も急性実験を行うために開発されたものであったため、動物に対する侵襲度合いが大きく、ここでも計測まで可能な個体を作成することが非常に困難であった。しかしながら、最終的には動物に対する侵襲度合いを大幅に抑えた慢性実験用の手技を開発し、慢性的に動物の状態を良好に維持しつつ覚醒状態でカルシウム応答を計測することが可能となった(図参照)。しかしながら、皮質表面における組織再生の問題は完全に解決しておらず、研究期間中に「味覚の臨界期」を決定する当初の実験計画を実行するまでには至らなかった。一方、6mm GRIN レンズ挿入法の開発であるが、未だ術後の出血および組織の再生問題を解決できず未確立である。



左側頭部に埋め込まれたプリズムを通した島皮質味覚野の脳表面血管パターン

プリズム面左上からにかけて走っている血管が中大脳動脈でこの血管の前後が味覚野に対応している。プリズムを通して見ているため上下が反転して見えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 武井浩樹	4. 巻 59
2. 論文標題 味覚の発達を支える島皮質におけるヒスタミンのシナプス伝達修飾作用の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 45-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11411/jspd.59.1_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura S, Yamamoto K, Nakaya Y, O'hashi K, Kaneko K, Takei H, Tsuda H, Shirakawa T, Kobayashi M.	4. 巻 455
2. 論文標題 Presynaptic NK1 Receptor Activation by Substance P Suppresses EPSCs Via Nitric Oxide Synthesis in the Insular Cortex.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 151-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤田 智史 (Fujita Satoshi) (00386096)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	
研究分担者	山本 清文 (Yamamoto Kiyofumi) (30609764)	日本大学・歯学部・講師 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中谷 有香 (Nakaya Yuka) (60781391)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関