

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10234

研究課題名（和文）飲食物の「香り」が摂食機能を修飾する神経機構の可視化

研究課題名（英文）Visualization of neural mechanisms by which food aroma modulates feeding behavior

研究代表者

溝口 尚子（Mizoguchi, Naoko）

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：00548919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、摂食機能障害へのリハビリテーションに活かすことを念頭に、飲食物の「風味」を知覚・認識するメカニズムを明らかにすることを目的とした。標準飼料と比べて摂取量の多い食品を選出し嗜好餌とみなした。嗜好餌を経験させたマウスに、嗜好餌と餌以外のニオイを呈示したときの大脳皮質応答をフラビン蛋白蛍光強度の変化として計測し比較した。鼻腔もしくは口腔から呈示を試みた結果、応答領域のピーク到達時間は総じて鼻腔から呈示をした時の方が早く、食品のニオイは呈示方法によって一部領域でピーク到達順序が異なるという知見を得た。ほかに後梨状皮質において、食品のニオイが否かで情報処理が異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「誤嚥性肺炎」は人口動態統計上、日本人の死因のうち第5位の肺炎に次ぐ第6位となっている。そして高齢者の肺炎は、とくに70歳以上では70%以上、90歳以上では約95%といったように誤嚥性肺炎が占める割合が高い。また、誤嚥性肺炎の主なリスク因子には摂食嚥下障害が挙げられる。そのため、すでに超高齢社会である日本では、誤嚥性肺炎および摂食嚥下障害について理解を深めるとともに、根拠に基づいた予防法や医療介護を含めた対応方法の充実が期待される。本研究で得られた成果は、その中でも風味認識に関わる香りの活用に応用できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the mechanism of perception and recognition of "flavor" of food and drink with a view to its application to rehabilitation of eating dysfunction. At first, we selected foods that the mice consumed in excess of the standard diet, a preferred food A, to use in subsequent studies. We observed cortical responses in mice exposed to a preferred food A when presented with the food A and odor components other than the food by in vivo optical imaging with flavoprotein autofluorescence. The results of nasal and oral odor presentation revealed that not only was the peak arrival time in the response area generally faster when the odor was presented from the nasal cavity, but also that the order of peak arrival in some areas differed depending on the method of presentation of the food odorant. Other findings suggested that information processing in the posterior piriform cortex differs depending on whether the odor is of food or not.

研究分野：医歯薬学

キーワード：嗜好 風味 味覚 嗅覚 光学計測

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国はすでに 65 歳以上の高齢者が総人口の 25% を超え、80 歳以上の人口は 1200 万人を超えた。この高齢者人口の割合は主要国のなかでも高く、今後も高い水準で推移すると推計されている。そして高齢化がすすむにつれて肺炎、とくに誤嚥性肺炎で亡くなる人口は依然として増加傾向にある。「誤嚥性肺炎」は 2017 年より人口動態統計上で死因順位に用いる分類項目に追加され、日本人の死因のうち第 5 位の肺炎に次ぐ第 6 位となっている。

高齢者の肺炎は、とくに 70 歳以上では 70% 以上、90 歳以上では約 95% といったように誤嚥性肺炎が占める割合が高い。この誤嚥性肺炎の背景には、主なリスク因子として摂食嚥下障害が存在する。また摂食嚥下障害は、誤嚥性肺炎を筆頭として多疾患のリスク因子としても注目されている。すでに超高齢社会である日本では、誤嚥性肺炎および摂食嚥下障害について理解を深めるとともに、根拠に基づいた予防法や医療介護を含めた対応方法の充実が期待される。

摂食機能障害に対するアプローチの中で「口から食べて満足感を得たい」という患者本人の希望を叶えること、「おいしさ」すなわち「風味」を感じることに理解は重要と考える。なぜなら、意識覚醒のほか口腔機能や消化器系のはたらきへといった人体への影響がまず考えられるためである。他にも、本人の希望を叶えてあげたいという家族のサポートなどの環境因子は、リハビリテーション(広義)に大いに関係するため、その活動の科学的根拠たる知見を増やすことによって発症リスクの軽減などの好循環が見込まれる。

「風味」の認識に関して神経科学的には実証すべき課題が多く残されている。そこで我々は、食に関する「満足感」の源は「おいしさ(風味)を感じる」と位置づけ、「味・ニオイ・食感」の統合である「風味」の中でもとくに味およびニオイに焦点を充てて風味認識に関わる中枢神経機構の解明に取り組んでいる。

2. 研究の目的

摂食嚥下障害は、誤嚥性肺炎を筆頭とした多疾患のリスク因子として注目されており、本障害への理解とともに根拠に基づいた対応方法の充実が期待される。我々は摂食嚥下リハビリテーションに貢献することを念頭において、背景で述べた観点から、風味認識に関わる中枢神経機構の解明に取り組んでいる。

「風味」の形成には「味・ニオイ・食感」などの情報を認識することが欠かせない。けれども、感覚統合に関する中枢神経機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究課題では、脳神経科学的見地から、学習によってなじみのある状態となった飲食物の「風味」を知覚・認識するメカニズムを明らかにすることを目的に定めた。とくに風味学習と脳活動の記録を組み合わせる食に関連する化学感覚の情報処理について解析し、ニオイを効率的に臨床応用するための根拠もしくは新たな知見を得ることを目指した。

一般的に実験動物(マウス)は、離乳後から決まった固形餌を与えられる。一方で本来マウスは雑食であることが知られている。そのため、与えれば実験動物用の通常固形餌よりも多く摂餌する自然食品の存在が予想された。そこでまず、通常固形餌よりも多く摂取する自然食品を選定して、その後の嗜好学習訓練に用いることとした。嗜好学習の成立の判定は摂餌量の測定ならびに行動観察によって試みた。また、嗜好餌摂取の有無でストレス度を測定することにより、リハビリテーションに有効かつストレス度の少ないニオイ利用が可能となるポイントを見極めることを目的に血液を採取し血中コルチコステロン量を測定した。そして、学習成立確認テストの結果をもとに、味覚野および嗅覚野を含む大脳皮質領域に対して光学計測を実施し、風味学習前後の中枢神経におけるニオイ応答特性を調べることにした。

3. 研究の方法

本研究は、明海大学歯学部動物実験倫理委員会において承認され、明海大学歯学部動物実験実施規定に基づいて実施した。

実験には生後半年未満の C57BL/6 マウス(雄性、三協ラボサービス)を用いた。明暗 12 時間サイクルにて飼育し水とエサは、嗜好餌の判定や嗜好学習訓練期間中も自由摂取を基本とした。嗜好学習成立の判定前には、文献を参考に絶飲食(半日以内)を実施した。

[嗜好餌の選定]

実験用マウスはハツカネズミの一種である。ハツカネズミは雑食であるものの、種子・穀物・野菜類を好むことが知られている。本研究で比較対象とする標準飼料(固形, Certified Diet, MF, オリエンタル酵母工業)は水分が少なく硬いので、類似の性質をもつ種子あるいは穀物を嗜好餌候補として与えた。標準飼料 MF と比較して摂餌量の多いものを各個体の嗜好餌として取り扱うこととして研究を進めた。その過程で、個体差が少なく同一に好まれうる食品(嗜好餌 A とする)を選定した。

[風味学習訓練および学習成立の判定]

標準飼料 MF の摂餌量計測

標準飼料 MF および嗜好餌 A を併用して与え摂餌量計測比較

風味以外の条件を完全にそろえることは困難だったため、複数の判定方法を用いた。においては日中 AM10～PM5 を絶食期間あるいはテスト実施期間とし、PM6～AM9 は飼育環境下で与えられた餌の摂餌、また飲水可能期間とした。PM6～AM9 の水分摂取量、摂餌量を計測した。体重は毎朝 AM9 時台に計測した。

[血清コルチコステロン濃度の測定]

通常固形餌 MF のみ経験時点に一度血液採取をした。その後、標準飼料 MF を与え続けたコントロール群と、標準飼料 MF に嗜好餌 A のオイルを添加して風味付けした餌を与えた群と、嗜好餌 A を与えた群に分けて再度血液を採取した。血液はアニマルランセット (MEDIpoint, バイオリサーチセンター) を使用してマウス顎静脈より 0.5ml チューブに採取し遠心分離 (3000 rpm 10 分間) を行った。このうち血清中のコルチコステロン濃度を液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析 (LC-MS/MS, あすか製薬メディカル) にて測定した。血液採取の際に佐藤慶太郎博士の協力を得た。

[ニオイ (気体) を呈示した際の大脳皮質におけるフラビン蛋白の蛍光変化計測]

学習成立の判定後に光学計測を実施した。フラビン蛋白の蛍光変化測定に際し、新潟大学脳研究所の手術および測定術式を基本として実施した。

解剖学的見地および機能を推測する手法によって、味覚と嗅覚の主な神経経路は、末梢から大脳皮質に至るまで異なる経路をたどると考えられている。味覚情報は、口腔内の味蕾から鼓索神経などを介して、視床を經由して大脳皮質一次味覚野 (島皮質味覚野) に至る。一方の嗅覚情報は、嗅上皮に存在する嗅細胞から主嗅球を經由して梨状皮質 (大脳皮質一次嗅覚野) に至る。そして両感覚の統合領域は主に眼窩前頭皮質 (大脳皮質二次感覚野) と考えられてきた。

そして島皮質と梨状皮質は、げっ歯類 (マウスやラット) では上下に近接しており表層からの観察が可能である。そのため、側頭部を観察野とする全脳動物標本を作製し、刺激に対する応答を光学計測法によって観察し解析を行うことで、新たな生理学的知見を得ることが期待できる。

実験で用いた光学計測法は、広い領域を同一視野で観察することができ、時間分解能も高い点で目的に合った手法である。

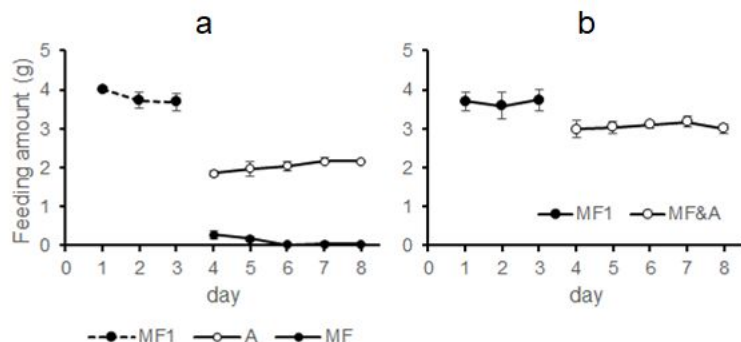
- 1) 標本作成：実験動物にはマウス C57BL/6NCrSlc (雄性, 三協ラボサービス) を用いてフラビン蛋白の蛍光変化測定用全脳動物標本を作製した。標本作成は三種混合麻酔の腹腔内投与による全身麻酔下にて行った。マウスを脳定位固定装置 (ナリシゲ社製) に固定し、左側の頭頂部から側頭部にかけて皮膚を切開した。つづけて、中大脳動脈と嗅裂の交点を中心に島皮質および梨状皮質が観察できるように、頬骨弓およびデータ取得の妨げになる筋組織は除去した。脳表面を覆う骨組織は可及的に残した。
- 2) 残存させた側頭部の骨表層へは保湿目的でシリコンオイルを付与し観察野とした。マウスは頭蓋骨が薄く、保湿により骨の透明性を維持することで骨を介して脳組織や血管を観察することができる。そのため頭蓋骨を残した状態でフラビン蛋白の蛍光強度変化を測定可能である。
- 3) 先行研究でニオイ呈示に対してフラビン蛋白蛍光の応答変化を計測した際、気管挿管の有無で応答強度が異なったため、引き続き気管挿管なしの自発呼吸下にて計測を行うこととした。
- 4) 全脳動物標本を作製後、実体顕微鏡に CCD カメラを搭載した光学計測システム (MICAM 02-HR, ブレインビジョン社製) を用いて同領域の神経活動に伴う蛍光強度の変化を記録した。光源には青色 LED (LEX2, Brainvision) を光源とし、励起フィルタとダイクロイックミラーにて波長 482 nm の励起光を皮質表層に経頭蓋で照射することとした。励起光照射によって発したフラビン蛋白の自家蛍光はロングパスフィルタ (> 536 nm long-pass, Andover, Salem, NH, USA) を通して受光・検出した。
- 5) ニオイ物質 (気体) を鼻孔もしくは口腔内から呈示し、刺激毎に皮質応答を観察した。それぞれの単独刺激に対する応答記録を行った上で、同一個体に同時刺激を実施し応答を観察し、単独もしくは同時に刺激した場合における皮質表層における応答性について解析した。ニオイ物質として標準飼料 MF, 嗜好餌 A オイル, 0.1% Isopentyl Acetate (和光) を用いた。ニオイ呈示は 500 ms とした。
- 6) データ解析には BV_Ana (BrainVision) を用いた。画像 1 フレームあたり 100 ms として 15 秒間の記録にまとめた。実際の記録方法としては、1 回目は記録開始から 2 秒後に刺激出力を行い 15 秒間、2 回目は出力なしで 15 秒間 Acquisition し、これら 2 回の Acquisition の差分を 1 フレームとしたデータを 15 セット加算平均して作成した。記録の間の interval は 10 秒間とした。応答変化率を求める際、記録開始から 2 秒間 (20 frame) をベースラインとした。また高周波をカットするために、Low Pass filter 計算処理を実施した ($\text{prm} = 0.15$)。この操作によって応答変化率波形ピークを暫定的に決定した。LPF を用いると位相差が生じるので、厳密な時間についての解析は今後の課題としたい。

4. 研究成果

[嗜好餌の選定]

個体差が少なく同一に好まれうる食品 (嗜好餌 A とする) を選定した。

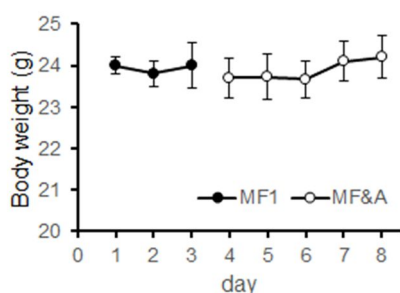
標準飼料 MF は、嗜好餌 A と形状を類似させる目的でバンドソー（K-100，HOZAN）にて四分円柱状に加工して与えた。



摂餌量と飲水量の推移 (図 1)
N = 4 . Values are means \pm SEM .

摂餌量の計測結果(a), 摂餌量計測期間における飲水量(b)

標準飼料 MF のみを与えた 3 日間の摂餌量は 1 日当たり平均 3.8 g。その後、標準飼料 MF と嗜好餌 A を併用して与えた 3 日間においては標準飼料 MF を平均 0.15 g、嗜好餌 A を平均 1.96 g 摂取した (合計 2.11 g)。併用投与を続けたところ、嗜好餌 A を多く摂取する傾向が続いた。飲水量は標準飼料 MF 投与 3 日間で平均 3.67 ml、併用投与では平均 3.05 ml 飲水した。

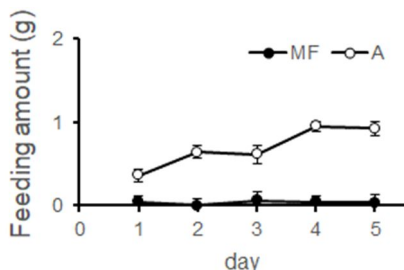


飼育環境下における体重変化 (図 2)

N = 4 . Values are means \pm SEM .

標準飼料 MF のみを与えた 3 日間の平均体重は 23.9 g、併用投与で 3 日間でも平均体重 23.9 g とほぼ変化がなかった。嗜好餌 A は 100 g あたり 625 kcal、標準飼料 MF は 355 kcal である。すなわち嗜好餌 A は、標準飼料 MF の約 1.75 倍のカロリーであり、カロリー換算としての摂餌量に大きな変化はなかった。

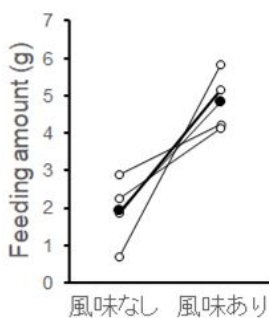
[風味学習訓練および学習成立の判定]



絶飲食解除後 1 時間の摂餌量 (図 3)

N = 4 . Values are means \pm SEM .

嗜好餌 A の二オイを添加した標準飼料 MF と非添加 MF を与え、その摂取量の比較をもとに判断することとした。なお 1 時間後経過後から翌 AM9 時までは標準飼料 MF を与えた。



MF に嗜好餌 A 粉末を添加したか否かによる摂餌量変化 (図 4)

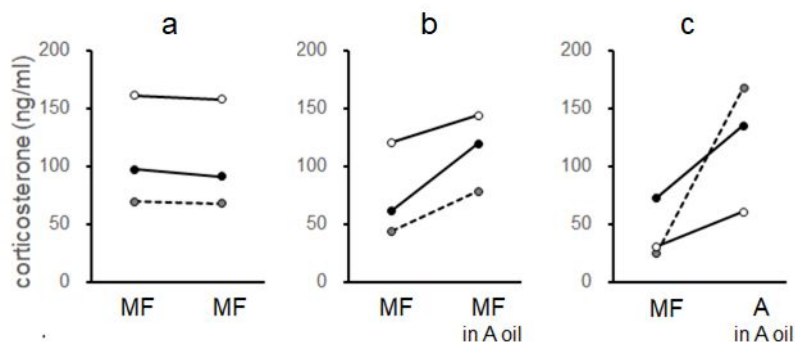
N = 4 .

○ : 平均値の推移, ● : 個体ごとの推移 .

24 時間ごとに餌の左右を入れ換えて与え、摂餌量は 48 時間に摂取した量として算出した。

全ての個体で風味ありの MF を多く摂取した。

[血清コルチコステロン濃度の測定]



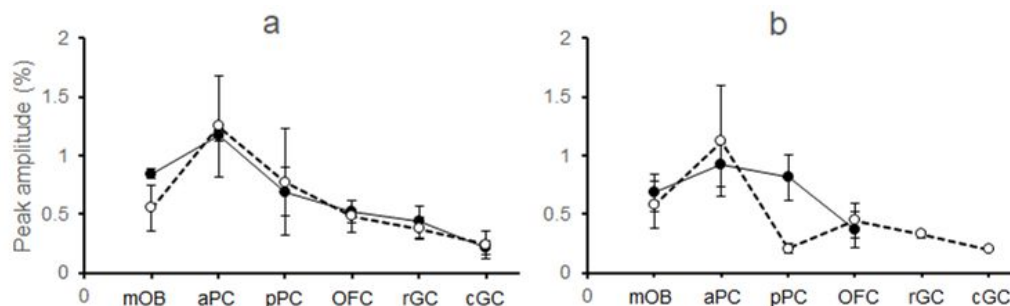
摂取した餌の種類と血清コルチコステロン濃度 (図 5)

N = 9 .

標準飼料 MF のみ摂取 (a), 嗜好餌 A のオイル漬けにした標準飼料 MF を摂餌 (b) ならびに嗜好餌 A をさらに A のオイル漬けにした餌を摂取 (c)

線につながった○は各個体で、特定の餌の摂取経験前後で個々の血清コルチコステロン濃度を測定した結果を示す。(b) および (c) ではすべての個体において、標準飼料 MF のみ与えた場合に比べて、他の餌を与えた後の血清コルチコステロン濃度が増加した。

[ニオイ (気体) を呈示した際の大脳皮質におけるフラビン蛋白の蛍光変化計測]



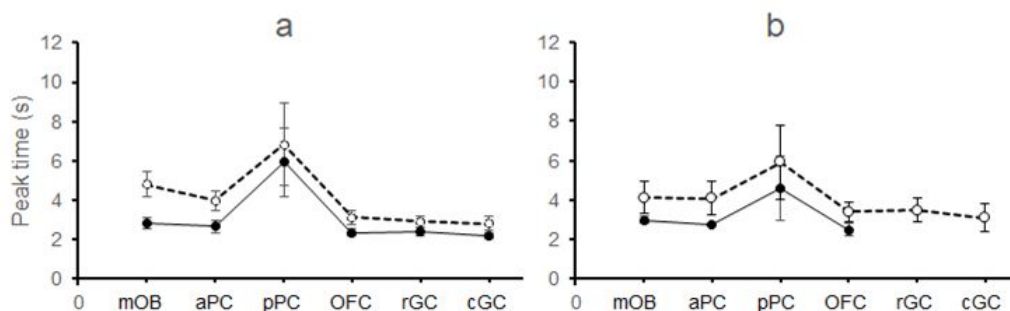
鼻腔および口腔内からニオイ呈示した場合の皮質応答 (図 6)

嗜好餌 A (a) , 0.1% Isopentyl Acetate (b) のニオイを投与したときの脳領域ごとの最大応答変化率 (%) 。 mOB 主嗅球 (側頭部) , aPC 前梨状皮質 , pPC 後梨状皮質 , OFC 眼窩前頭皮質 (側頭部) , rGC 吻側味覚野 , cGC 尾側味覚野 . : 鼻腔からニオイ呈示 , : 口腔からニオイ呈示 . N = 3 . Values are means ± SEM .

(a) 嗜好餌 A のニオイを呈示した場合の値は mOB [0.84 ± 0.04 % , ○ 0.55 ± 0.20 %] , aPC [1.18 ± 0.06 % , ○ 1.25 ± 0.43 %] , pPC [0.69 ± 0.21 % , ○ 0.77 ± 0.45 %] であった。ニオイを鼻腔から呈示したときの方が、口腔内からの呈示に比べて応答変化率が大きく、ばらつきは少なかった。

(b) 餌のニオイとして経験したことのないニオイを呈示した場合の値は , mOB [0.68 ± 0.16 % , ○ 0.58 ± 0.20 %] , aPC [1.12 ± 0.47 % , ○ 0.92 ± 0.18 %] , pPC [0.81 ± 0.19 % , ○ 0.21 ± 0.37 %] であった。なお , (b) における OrGC と OcGC では明瞭なピークをとらえることができなかったため除外した。

図 6 の結果をもとに、領域ごとの最大応答到達時間についてまとめた。



鼻腔および口腔内からニオイ呈示した場合の刺激開始から最大応答到達時間 (図 7)

N = 3 . Values are means ± SEM . 嗜好餌 A (a) , 0.1 % Isopentyl Acetate (b) mOB 主嗅球 (側頭部) , aPC 前梨状皮質 , pPC 後梨状皮質 , OFC 眼窩前頭皮質 (側頭部) , rGC 吻側味覚野 , cGC 尾側味覚野 . : 鼻腔からニオイ呈示 , : 口腔からニオイ呈示 .

(a) 嗜好餌 A のニオイを呈示した場合の値は mOB [2.86 ± 0.29 % , ○ 4.80 ± 0.64 %] , aPC [2.67 ± 0.32 % , ○ 4.00 ± 0.49 %] , pPC [5.93 ± 1.73 % , ○ 6.83 ± 2.07 %] であった。各領域においてニオイを鼻腔から呈示したときの方が、口腔内からの呈示に比べて応答変化率のピーク到達時間が早かった。

(b) 餌のニオイとして経験したことのないニオイを呈示した場合の値は , mOB [3.00 ± 0.17 % , ○ 4.13 ± 0.82 %] , aPC [2.77 ± 0.07 % , ○ 4.10 ± 0.85 %] , pPC [4.60 ± 1.65 % , ○ 5.93 ± 1.89 %] であった。なお , (b) における OrGC と OcGC では明瞭なピークをとらえることができなかったため除外した。

嗅覚情報は、一般に主嗅球、梨状皮質、眼窩前頭皮質 (大脳皮質二次感覚野) の順に伝播すると考えられている。そのためニオイ呈示経路が異なる場合、鼻腔からの呈示の方が早く応答ピークが生じるが、応答ピークが発生する順序に変化は生じないという予想と異なり、口腔内からニオイを呈示した場合 aPC よりも平均 0.80 秒ほど遅れて mOB の応答ピークが生じた点が興味深い。この知見が何に由来するのかについて引き続き解析、ならびに他の手法と併用しての検討を要する。また、図 6 の結果から食品のニオイか否かによって後梨状皮質での情報処理が異なることが示唆された。

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 Fontaine Arjun K., Ramirez David G., Littich Samuel F., Piscopio Robert A., Kravets Vira, Schleicher Wolfgang E., Mizoguchi Naoko, Caldwell John H., Weir Richard F. ff., Benninger Richard K. P.	4. 巻 11
2. 論文標題 Optogenetic stimulation of cholinergic fibers for the modulation of insulin and glycemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83361-3	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 Fontaine Arjun K., Futia Gregory L., Rajendran Pradeep S., Littich Samuel F., Mizoguchi Naoko, Shivkumar Kalyanam, Ardell Jeffrey L., Restrepo Diego, Caldwell John H., Gibson Emily A., Weir Richard F. ff	4. 巻 11
2. 論文標題 Optical vagus nerve modulation of heart and respiration via heart-injected retrograde AAV	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83280-3	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 溝口尚子、村本和世
2. 発表標題 Visualization of odor- and taste-evoked cortical responses by in vivo optical imaging study
3. 学会等名 日本味と匂学会第56回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溝口尚子
2. 発表標題 味やニオイの刺激で変わる！動物の脳活動
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーキング学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 天野 修、池尾 隆、石原 和幸、小川 祐三、川端 重忠、岸野 万伸、城戸 瑞穂、佐藤 元、住友 倫子、田畑 純、堂前 英資、長谷 則子、西村 康、溝口 尚子、山口 雅也、吉田 篤、李 昌一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 312
3. 書名 第4版 イラストでわかる歯科医学の基礎	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------