

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700833

研究課題名(和文) 単一ニューロン記録法・標識法を用いた食行動を呼び起こす味覚神経回路の解析

研究課題名(英文) Analysis of gustatory neural circuits evoked by feeding behavior by using single neuron recording and labeling method

研究代表者

岩井 治樹 (Iwai, Haruki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30452949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：脳内味覚神経回路における単一ニューロンの全体像を明らかにするため、ジャクスタセルラー記録法・標識法をラット脳に適用した。その結果、単一ニューロンが同定され、そしてその細胞体、軸索、および樹状突起が可視化された。さらにバーチャルスライドシステムを用いることで、単一ニューロンの再構築が可能となった。脳内味覚回路研究において、ジャクスタセルラー記録法・標識法が有効な手段になることが分かった。

研究成果の概要(英文)：To provide an overview of single neurons in central gustatory neural circuits, we applied juxtacellular recording-labeling technique in rat brain. As a result, single neurons were identified, and their cell bodies, axons, and dendrites were visualized. Furthermore, using digital slide scanner allowed to reconstruct single neurons. We confirmed that juxtacellular recording-labeling technique was effective tool for gustatory neural circuits research.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：味覚 神経回路 単一ニューロン ジャクスタセルラー記録法・標識法

1. 研究開始当初の背景

食行動は、生きるために必要なものを体の中に取り入れるという側面だけではなく、高齢化社会の中で国民一人一人が人生の最後まで健康で安全に生きるという生活の質 (Quality of Life) を高めるという側面においても極めて重要である。例えば、味覚障害、生活習慣病、あるいは摂食障害といった食行動に関連する疾病は、身体的、そして精神的な面からみても全身の健康を蝕むことに繋がることが容易に想像できる。

この食行動の原動力となる食物に対する応答や欲求は、舌からの味覚刺激をもとに脳内で生じることから、真に食行動を理解するためには、脳内における食行動のメカニズムを解明することが必要不可欠である。このような食行動を実現する脳内味覚回路は、これまでに、ニューロントレーサーを用いた形態学的研究および味刺激に対するニューロンの反応性を用いた機能学的研究により、脳幹から大脳皮質に至る神経路が調べられている。しかし、これらの研究は、おのおの独立しており、形態学的知見と機能学的知見の間で矛盾がみられる。例えば、ニューロントレーサー研究によって同定された味覚路と味刺激に応答するニューロンの存在位置は、全て一致しているわけではない。また、神経回路は、単一ニューロンの集合からなるが、味覚神経回路内における単一味覚ニューロンの全体像は分かっていない。

このような状況下の中、近年、味覚以外の感覚系では、ジャクスタセルラー記録法・標識法という研究手法が注目されている。この手法は、ニューロンの活動電位の記録、そして、ニューロントレーサーの注入による単一ニューロン可視化を同時に行えることから、形態学的知見と機能学的知見の間にある矛盾を解決することができると考えられる。また、この研究手法を脳内味覚回路研究に導入することができれば、より詳細な味覚回路図を手に入れることに繋がり、脳内で味覚がどのように機能しているのかをシミュレートするためのモデルの作成など、食行動研究を新しい段階に引き上げることができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、食行動の原動力となる脳内味覚回路が、単一の味覚ニューロンの集合からなるという視点から、未だ明らかにされていない単一味覚ニューロンの構造と機能を明らかにし、脳内における食行動のメカニズムの解明や味覚障害、生活習慣病、あるいは摂食障害といった食行動に関連する疾病の治療および予防への応用に耐えうる味覚の神経回路学的基盤を確立することが目的である。

本研究期間内では、ジャクスタセルラー記

録法・標識法を用いて、舌からの味覚刺激の最初の入口となる脳幹味覚野の単一味覚ニューロンの全体像を明らかにすることを主目的とし、以下の研究を予定した。

(1) 「単一味覚ニューロンの同定および可視化」: これまでに、脳幹味覚野では、味覚ニューロンが同定されているが、5つの基本味 (塩味、酸味、甘味、苦味、およびうま味) に反応する単一味覚ニューロンそれぞれの形態は分かっていない。そこで本研究では、最初に、単一味覚ニューロンをそれぞれ同定および可視化する。

(2) 「単一味覚ニューロンの再構築像の作成」: 脳幹味覚野では、塩味反応ニューロンあるいは酸味反応ニューロンといったように味質の違いによってニューロンを使い分けしているだけではなく、それぞれ投射領域が異なっている可能性がある。そこで本研究では、単一味覚ニューロンを可視化後、再構築像を作成することによって、それぞれの基本味に反応する単一味覚ニューロンの形態、空間的な位置、および神経終末の分布領域を明らかにする。

(3) 「単一味覚ニューロンの定量的解析」: 単一味覚ニューロンは、味質の違いによって、それぞれの細胞体の大きさ、投射領域における軸索の長さや神経終末の量、あるいは、樹状突起の長さなどが異なっている可能性がある。このような違いは、味刺激に対する鋭敏性の指標になるかもしれない。そこで本研究では、単一味覚ニューロンの細胞体、軸索終末、あるいは樹状突起などの大きさ、長さ、または量などを定量的に解析することによって、それぞれの基本味に反応する単一味覚ニューロン間の機能的な差を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究期間内では、ラット脳幹味覚の単一味覚ニューロンの全体像を明らかにするため、ジャクスタセルラー記録法・標識法の装置を構築し、予備実験を行い、そして脳内味覚回路研究に向け実験系を最適化させた。具体的な内容は、下記の通りである。

(1) 「ジャクスタセルラー記録法・標識法の装置の構築」: ジャクスタセルラー記録法・標識法は、これまでの細胞内あるいは細胞外記録法やパッチクランプ法といった電気生理学的手法では不可能だった個体レベルでの単一味覚ニューロンの長距離投射を可視化できることが特徴である。本研究をはじめにあたり、微小電極増幅器、データ収録装置、およびデータ解析装置等の実験機材のセットアップを行った。

(2)「単一ニューロンの神経活動の記録およびニューロントレーサー注入による可視化」：ジャクスタセラー記録法・標識法の装置を用いて予備実験を行った。ラットを麻酔後、定位脳手術下で、脳内にガラス電極を刺入した。ジャクスタセラー記録法・標識法の装置を用いて、単一ニューロンの神経活動の記録後、ニューロンにピオチン化デキストラミン等のニューロントレーサーを注入した。5-7 日後、ラットを深麻酔し、灌流固定を行った。脳を取り出し、スライスを作成した後、アビジン・ピオチン系、DAB 発色法などにより、ニューロンを可視化させた。

(3)「組織切片を基にした単一ニューロンの再構築像の作製」：可視化した単一ニューロンの組織標本をバーチャルスライドシステムによって画像として取得した。画像編集ソフト上で組織切片の画像をつなぎ合わせた後、描画ソフトを用いて、単一ニューロンをトレースダウンし、再構築像を作成した。

(4)「味覚に特化した実験系の構築」：ラットの味覚ニューロンを特定するためには、味覚神経回路内にガラス電極を留置した後、舌を味物質（スクロース、塩化ナトリウム、グルタミン酸、クエン酸、あるいはキニーネ等）で刺激する必要がある。そこで、ラットの舌に対し、必要に応じて味物質を滴下するとともに、速やかに味物質を除去するための味刺激装置を構築した。

4．研究成果

(1)「単一ニューロンの神経活動の記録およびニューロントレーサー注入による可視化」：ジャクスタセラー記録法・標識法の装置を用いて、単一ニューロンの神経活動の記録を得た。さらにこのニューロンにニューロントレーサーを注入することにより単一ニューロンを可視化できることが確かめられた。可視化後の単一ニューロンの形態は、細胞体および樹状突起が明瞭に観察された。それに対して、軸索突起は、断続的に認められる程度であった。アビジン・ピオチン系、DAB 発色法だけでは、軸索突起の明瞭な検出は難しいのかもしれない。この問題を解決するために、トレーサーの検討、チラミド増感系などの導入、そして反応条件などを見直し、単一ニューロンの全体像をすみずみまで可視化していきたい。

(2)「組織切片を基にした単一ニューロンの再構築像の作製」：可視化した単一ニューロンの組織切片をもとに、バーチャルスライドシステム、画像編集および描画ソフトを用いて再構築像を得ることができた。細胞体および樹状突起の平面的な広がり、明瞭に識別できたが、切片が分厚いため、奥行き情報が

不足しており、断片的な再構築像に留まった。切片をより一層薄切して、奥行き情報を得る必要があるのかもしれない。また、軸索の分配域など必要となる情報に応じて前頭面、水平面、あるいは矢状面といった脳スライスの作成面に検討を加える必要があるのかもしれない。

研究期間内では、脳幹味覚野の単一味覚ニューロンの構造と機能を明らかにすることが目標であったが、ジャクスタセラー記録法・標識法の実験装置の構築に時間がかかり当初目標を完全には達成することができなかった。しかし、上述の実験系を用いることにより、単一味覚ニューロンの構造と機能の追求が可能となったので、引き続き精力的に実験を進めていきたい。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sonomura, T., Furuta, T., Nakatani, I., Yamamoto, Y., Unzai, T., Matsuda, W., Iwai, H., Yamanaka, A., Uemura, M., Kaneko, T., Correlative Analysis of Immunoreactivity in Confocal Laser-Scanning Microscopy and Scanning Electron Microscopy with Focused Ion Beam Milling, *Frontiers in Neural Circuits*, 査読あり, vol.7, 2013, Article 26.

植村正憲, 園村貴弘, 岩井治樹, 山中淳之, 顎顔面の運動神経細胞の脳内分布, および味覚の神経回路, *鹿児島大学歯学部紀要*, 査読なし, vol.33, 2013, pp.3-17.

〔学会発表〕(計 2 件)

岩井治樹, 山中淳之. ラットにおける結合腕傍核-視床-線条体味覚路. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術大会, 2014 年 3 月 27 日~29 日, 自治医科大学 (栃木).

塚原飛央, 増原正明, 園村貴弘, 岩井治樹, 植村正憲, 佐藤友昭. Repeated stress on ovariectomized mice increase risk taking behaviors via GABAergic dysfunction, which are rescued by 17 β -estradiol treatment. 第 87 回 日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日~21 日, 東北大学 (仙台).

6．研究組織

(1)研究代表者

岩井 治樹 (IWAI HARUKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30452949