

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462887

研究課題名(和文) 顎下腺・舌下腺分泌に対する摂食中枢の役割に関する研究

研究課題名(英文) A study for role of the feeding center in submandibular and sublingual salivary secretion

研究代表者

美藤 純弘 (Mitoh, Yoshihiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20240872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自由行動下のラットを用いた実験で、水分含量の異なる飼料に対して唾液分泌は水分の増加に伴って唾液分泌は減少したが、摂食中枢破壊したラットではこの傾向は保たれたまま唾液分泌は大きく減少した。ラット顎下腺・舌下腺の副交感性の一次中枢である上唾液核(SSN)ニューロンにおいて、視床下部外側野(摂食中枢)ニューロンが特異的に産生する摂食促進ペプチドであるオレキシンとメラニン凝集ホルモン(MCH)の影響を調べた。SSNニューロンはMCHに対して応答を示さなかったが、オレキシンに対して興奮反応を示した。摂食時の豊富な唾液分泌にオレキシンが関与しているかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Using free-moving rats, we examined the salivation when rats were provided with diets with various water contents. In sham-operated rats, salivation was decreased with increase of water contents in diets (powder > hard pellet > hard mash > medium mash > soft mash). Lesions of feeding center largely reduced the salivation although the tendency for salivary volume was maintained. In the superior salivatory nucleus (SSN) neurons which is the primary parasympathetic center of the submandibular and sublingual salivary glands in rats, effects of orexins and melanin-concentrating hormone (MCH), which were a feeding stimulator that were specifically produced in the lateral hypothalamic area (feeding center). SSN neurons were excited by orexins via orexin receptor 1 and 2 with decrease of potassium conductance, but not MCH. Excitation of SSN neurons via orexin may be involved in abundant salivation in feeding.

研究分野：口腔生理学

キーワード：上唾液核 摂食中枢 オレキシン メラニン凝集ホルモン

1. 研究開始当初の背景

これまでの多くの研究は、下位脳幹を介した「咀嚼-唾液反射」の概念を中心になされてきた。我々は下記のような背景から本研究の着想に至った。

(1) 行動学的背景

ラットに固形食を与えた時と歯ぎしりをしている時の顎下腺分泌を比較した。歯ぎしり中はほとんど分泌が起こらないのに対して咀嚼中は豊富な分泌が観察された。咬筋活動がどちらも同じくらいであるにもかかわらず摂食中の唾液が多いのは、口腔感覚による反射による分泌に加えて視床下部外側野（摂食中枢、以後便宜的に摂食中枢を使用する）などが分泌を促進していることが考えられた。

(2) 組織化学的背景 ラットで HRP やフルオロゴールドを顎下腺・舌下腺の副交感性の一次中枢である上唾液核に注入することによって、上唾液核と連絡する上位および下位脳の神経を調べた。その結果、視床下部外側野を始め摂食、飲水などに関する多くの神経核が染色された。また HRP やフルオロゴールドがシナプスを飛び越えない性質からして、染色された神経は単シナプス性に上唾液核ニューロンと連絡があることが考えられた(図1)。

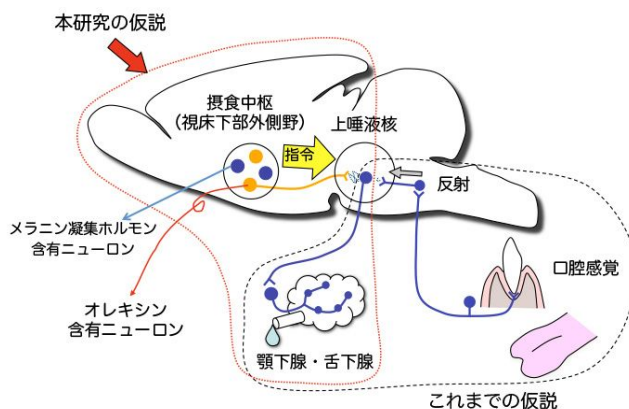


図1 上唾液核ニューロンの摂食中枢による調節

これらの背景から摂食中枢のニューロンは、上唾液核ニューロン活動を直接的に調

節しており、上唾液核ニューロン活動を促進することが考えられる。そこで、我々は摂食中枢に存在するニューロンが放出する摂食促進ペプチドに注目した。

2. 研究の目的

摂食関連ペプチドには摂食を促進するものと抑制するものがあるが、摂食中枢には摂食促進ペプチドであるオレキシンとメラニン凝集ホルモンが存在する。摂食時に豊富な唾液分泌が起こることから、摂食促進ペプチドが上唾液核ニューロンの興奮性を促進し、それにより顎下腺・舌下腺分泌が促進されることが考えられた。顎下腺・舌下腺分泌に対する摂食中枢の役割を調べるために、(1) まず麻酔下ラットで上唾液核にオレキシンとメラニン凝集ホルモンを投与したときの唾液分泌に対する影響を調べる。そして自由行動下の摂食中のラットの唾液分泌に対するオレキシンとメラニン凝集ホルモンの影響を調べる。(2) オレキシンとメラニン凝集ホルモンが上唾液核ニューロンに影響を与える可能性を組織化学的に分析する。つまり上唾液核ニューロンにおけるこれらのペプチドに対する神経線維や受容体の存在を調べた。そして摂食中枢において、上唾液核ニューロンに投射するこれらペプチド産生ニューロンの分布を調べる。(3) 新鮮脳スライス標本の上唾液核ニューロンの興奮性に対して、オレキシンとメラニン凝集ホルモンがどのように影響するか分析する。以上のことについて分析することを目的とした

3. 研究の方法

(1) 麻酔下および自由行動下ラットを用いた in vivo 実験

まずウレタン麻酔下の Wistar 系の成熟ラット (体重 290-300 g) において、味覚や機械刺激をしたとき、ピロカルピン (ムスカリン様受容体作動薬) 刺激したとき、

オレキシンやメラニン凝集ホルモンを投与したときの顎下腺・舌下腺分泌を調べた。唾液分泌は麻酔薬の影響を受けやすいので、その他の麻酔薬存在下でも検討した。

自由行動下のラットにおいて、摂食中枢を破壊した（電気焼灼）場合と偽手術を施した場合で、異なる硬さの飼料を与えたときの唾液分泌を測定し、摂食中枢の唾液分泌に対する影響を調べた。飼料は、固形飼料、粉末飼料および粉末飼料に水分含量を変えて異なる硬さに調整した飼料を与えた。ハードマッシュ、ミディアムマッシュ、ソフトマッシュ状態の飼料は、粉末飼料1に対してそれぞれ水を0.5、1および1.5の割合（重量比）で加えて作製した。

(2) 免疫組織化学的実験

Wistar系雄性ラット（体重290-300g）の鼓索-舌神経にFast Blueを注入することにより上唾液核ニューロンを標識した。4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し厚さ8 μmの連続横断切片を作製し標識された上唾液核ニューロンについて、近傍に存在するオレキシンとメラニン凝集ホルモンの陽性線維を調べ、さらにそれぞれの受容体を免疫組織化学的に検索した。上唾液核にフルオロゴールドを注入することにより、上唾液核ニューロンに投射する摂食中枢のニューロンを逆行性に標識してオレキシンに対する免疫活性を調べた。

(3) 電気生理学的実験

Wistar系ラット（7-13日齢）の鼓索-舌神経にTexasRed-lysine (MW 3000)を注入することにより上唾液核ニューロンを標識した。新鮮脳スライス切片を作製し標識された上唾液核ニューロンからホールセルパッチクランプ法により記録を行った。電圧固定下で膜電位を-70 mVに固定しテトロドトキシン存在下にてペプチドを投与した

時の電流変化を観察した。電圧固定下でペプチドを投与した時の膜電位変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 麻酔下および自由行動下ラットを用いた in vivo 実験

ウレタンあるいはペントバルビタール麻酔下のラットで、まず味覚刺激（0.02 M 塩酸キニーネと0.01 M HCl）あるいは舌のピンチ刺激に対する応答を調べた。これらの刺激に対して、麻酔が覚めかけた状況（ピンセットで後肢をつまんだ時後肢を引っ込める）でも唾液分泌は観察されなかった。しかしムスカリン様受容体作動薬であるピロカルピンを腹腔内投与すると豊富な唾液分泌に観察された。ウレタンやペントバルビタールによる麻酔深度の調節は難しいのでイソフルランを用いて麻酔深度を調節して同様の刺激を試みた。その結果、かなり麻酔深度を浅くしても（1%）唾液分泌はほとんど観察されなかった。オレキシンAに対する効果も検討したが、かなり高い濃度（1 μM）でも唾液分泌はほとんど起こらなかった（< 1 μl/10 min）。通説通り、唾液分泌は全身麻酔下の影響を受けやすいことが確認された。すなわち上唾液核ニューロンは上位中枢によって強力な抑制性入力

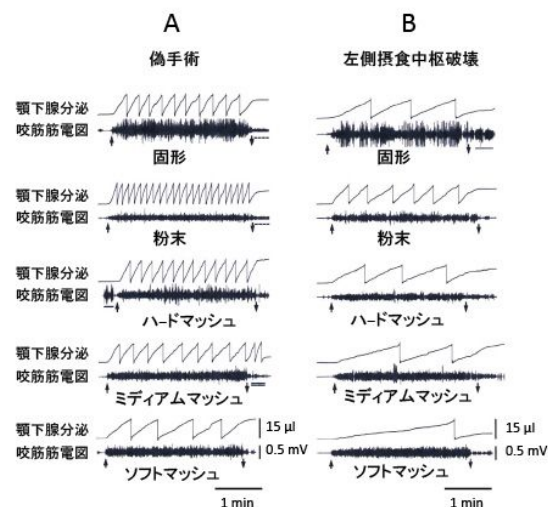


図2 顎下腺分泌と咬筋活動に対する摂食中枢破壊の影響

を受けていることが示唆された。従ってオレキシンやメラニン凝集ホルモンの影響を調べる為には、自由行動下のラットで実験を行う必要がある。

その前段階として顎下腺・舌下腺分泌と咀嚼筋活動を観察する測定系を確立した。この測定系を使って異なる硬さの飼料を与えたときの顎下腺・舌下腺分泌を分析した。偽手術ラットにおいては、粉末飼料でもっとも多く、水分含量が多くなるに従って唾液分泌は減少した(図2)。この傾向は摂食中枢破壊ラットでも維持されたが、唾液分泌量は大きく減少した。摂食中枢破壊によって唾液分泌は、いずれの飼料でも大きく減少したが、顎運動や摂食量(示していない)には影響しなかった。顎下腺・舌下腺分泌に対して摂食中枢は促進的に影響していることが示唆された。

(2) 免疫組織化学的実験

オレキシンにはオレキシンAおよびBのサブタイプが存在するが、両ペプチドに対する陽性線維が上唾液核ニューロン周辺に観察された。上唾液核ニューロンにおけるオレキシン受容体は、検討したニューロンの約50%に存在した。一方、メラニン凝集ホルモンに対する陽性線維は上唾液核ニューロン近傍に観察されたものの、その受容体(メラニン凝集ホルモン受容体1および2)に対する免疫活性は、現在のところ観察されていない(n=2)。摂食中枢のフルオロゴールド標識されたニューロンで(上唾液核ニューロンに投射するニューロン)オレキシンの免疫活性を示したニューロンが観察された。しかし、摂食中枢におけるその局在性は認められなかった。

(3) 電気生理学的実験

これまでの研究から上唾液核ニューロンではオレキシンAの興奮効果(内向き電流

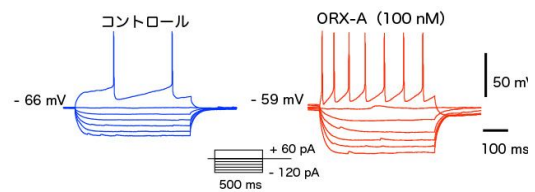


図3 直流通電に対する膜電位応答におけるオレキシンの影響

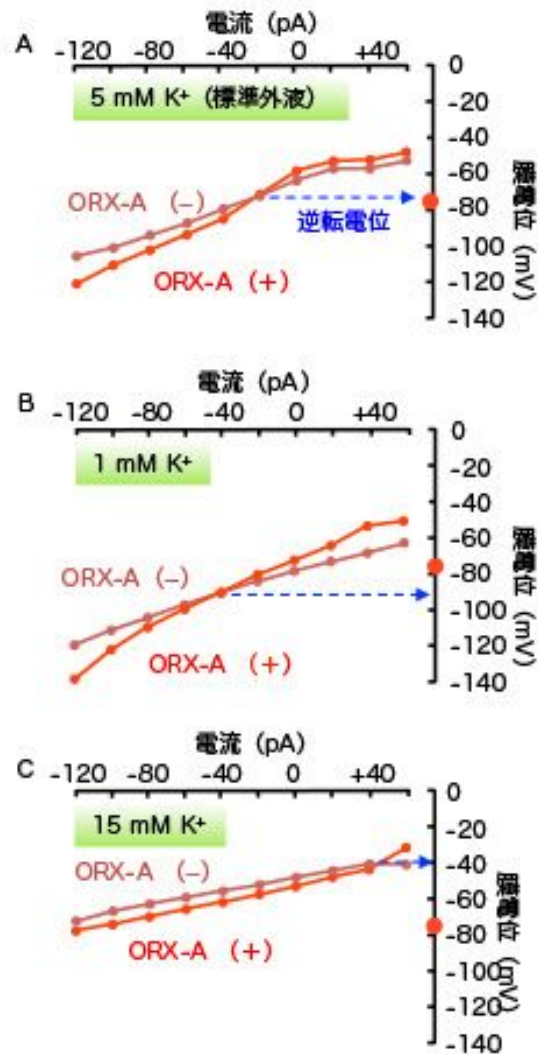


図4 電流-電圧関係に対する細胞外液のK⁺濃度の影響

や脱分極の大きさに対して)が大きいことが分かっているので、本研究ではオレキシンAに対する応答を分析した。電流固定実験で100 nM オレキシンAを投与した時、オレキシンA投与前後において過分極パルスの直流通電を行い電流-電圧曲線を作成した(図3)。オレキシンにより入力抵抗は投与前よりも投与後に増加した。-80 mV付近を基点に傾きが急峻になったことから、

K⁺のコンダクタンスを減少させることによって上唾液核ニューロンの興奮性を高めることが考えられた。オレキシンの投与前後でランプ波(-120~-20 mV)に対する電流変化も同様な結果が得られた。K⁺チャネルの関与を検討するために、細胞外液のK⁺濃度を変化させて電流-電圧関係を検討した。その結果、外液のK⁺濃度が高くなるに従って逆転電位が浅くなった(図4)。オレキシンAによる興奮メカニズムはK⁺のコンダクタンスの減少と、ナトリウム-カルシウム交換輸送体を活性化するものが報告されているが、上唾液核ニューロンの活性化メカニズムは、前者によるものであることが判明した。またオレキシンA投与により、グルタミン酸作働性の微小後シナプス電流の頻度が上昇した。つまりオレキシンAは、グルタミン酸作働性神経に対してシナプス前膜性に働いて興奮性を高めることが示唆された。

まとめ

前脳が唾液分泌に関与していることが示唆されていたが、本研究により視床下部外側野すなわち摂食中枢が、顎下腺・舌下腺分泌に促進的な影響を与えていることが判明した。この役割を分析するにあたり、摂食中枢で特異的に産生される摂食促進ペプチドであるオレキシンとメラニン凝集ホルモンの上唾液核ニューロンに対する影響を調べた。多くのラット上唾液核ニューロンは摂食中枢のオレキシン作働性ニューロンの興奮性調節を受けていることが示された。その興奮性作用は、オレキシン受容体1および2を介していた。さらにその作用のメカニズムはK⁺チャネルを介していると考えられた。一方メラニン凝集ホルモンは、上唾液核ニューロンに対する影響がほとんど無いことから唾液分泌にはあまり影響しないかもしれない。

顎下腺・舌下腺分泌が摂食中枢による調節を受けていることを示した研究は国内外ともに無いので、本研究によって明らかにされた結果に対するインパクトは大きいと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

美藤純弘、藤田雅子、小橋基、松尾龍二。

(2016) 前脳による唾液分泌の調節。日本歯科評論, 6, 145-150. 査読なし。

Kobashi M, Mizutani S, Fujita M, Mitoh Y, Shimatani Y and Matsuo R. (2016)

Central orexin inhibits reflex swallowing elicited by the superior laryngeal nerve via caudal brainstem in the rat. *Physiology & Behavior*,

130, 6-12. 査読あり。

松尾龍二、美藤純弘、松島あゆみ。

(2016) 精神的ストレスと唾液分泌中枢 精神ストレスと上唾液核への下降性ニューロンにおける神経調節機構、日本薬理学雑誌, 141, 306-309. 査読なし。

Matsuo R, Kobashi M, Mitoh Y, Fujita M. (2015) Role of the lateral hypothalamus in submandibular salivary secretion during feeding in rats. *Brain Research*, 1596, 99-107. 査読あり。

Maeda N, Kobashi M, Mitoh Y, Fujita M, Minagi S and Matsuo R. (2014) Differential involvement of two cortical masticatory areas in submandibular salivary secretion in rats. *Brain Research*, 1543, 200-208. 査読あり。

[学会発表](計 7 件)

小橋基、GLP-1 の嚥下反射減弱作用に及ぼすオレキシンAの効果、日本味と匂学会第49回大会、2015年9月26日、岐阜。

松尾龍二、味覚障害と唾液分泌の重要性 -基礎研究からの提言-、第59回日本唾液腺学会総会、2014年12月6日、東京。

美藤純弘、顎下腺・舌下腺を支配する上唾液核ニューロン活動の摂食中枢による調節、第35回岡山歯学会総会・学術集会、2014年10月26日、岡山。

美藤純弘、オレキシンはラット顎下唾液腺を支配する上唾液核ニューロンを興奮させる、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月27日、福岡。

植田 紘貴、内臓感覚と胃酸分泌抑制剤ニガチジンの新たな関係、第91回日本生理学会大会、2014年3月18日、鹿児島。

美藤 純弘、上唾液核における唾液腺支配の副交感神経節前ニューロンに対するオレキシンの影響、第91回日本生理学会大会、2014年3月18日、鹿児島。

Mitoh Y, Developmental Switch of GABA Action in Superior Salivatory Nucleus Neurons, The Third International Symposium of Medical-Dental-Pharmaceutical Education and Research in Okayama, Sep. 23, 2013. Okayama.

〔図書〕(計 1 件)

Matsuo R and Carpenter GH. (2015) 28. The Role of Saliva in Taste Transduction. *In*: Doty RL (Ed): Handbook of Olfaction and Gustation Third Edition, 625-636. New Jersey.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

岡山大学研究者総覧(美藤純弘)

<http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=19c72c5a3e5bb77774506e4da22f6611&k=%E7%BE%8E%E8%97%A4&kc=1&sm=keyword&sl=ja&sp=1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美藤 純弘(MITOH YOSHIHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20240872

(2) 研究分担者

松尾 龍二(MATSUO RYUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30157268

小橋 基(KOBASHI MOTOI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・準教授

研究者番号：80161967

藤田 雅子(FUJITA MASAKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助手

研究者番号：40156881