

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K12054

研究課題名(和文) 食べる意欲に欠かせない風味認識の中樞神経機構の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of flavor recognition related to pleasure of food consumption in the CNS

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：すでに超高齢社会である我が国において摂食機能障害は身近な疾患となっている。「食」は生命維持に直結するだけでなく、「おいしさ」すなわち「風味」を感じることでQOLの維持向上や食べることへの意欲維持につなげることができると考えられるが、風味認識に関する神経機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、風味(味・ニオイ・食感)の中でもとくに味およびニオイ呈示時の大脳皮質における応答性について光学計測を用いて調べた。膜電位変化とフラビン蛋白蛍光変化を計測し検討した結果、味嗅覚の統合の一部は島皮質の前部でも行われており、該当する領域における脳細胞内の活動性も刺激に応じて変化す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

超高齢社会である我が国の人口動態統計では、死亡原因について肺炎と誤嚥性肺炎を分けて集計するようになっている。高齢者の肺炎による死亡の内訳として誤嚥性肺炎が占める割合が高いためであるが、そ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と考えられている。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、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。本研究で得られた風味認識に関する知見は、それらに関わる科学的根拠の一つとして応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Elderly people are at high risk of suffering from dysphagia (having feeding/swallowing difficulty) in Japan which is a markedly 'super-aged society'. The sensation of flavor could be useful as a motivator keeping QOL and an aid in the rehabilitation. Flavor of foods is known a combination of smell, taste, texture, and more. However, little is known whether and how flavor sensory inputs converged in the CNS. To address these issues, we observed rodents cortical responses to either or both of two stimuli, odorants and tastants, by in vivo optical imaging with flavoprotein autofluorescence or voltage sensitive dye. These results suggest that partial of the gustatory and olfactory information was integrated in anterior insular cortex, and intracellular signaling factors were also involved it.

研究分野：医歯薬学

キーワード：風味 脳神経科学 光学計測

1. 研究開始当初の背景

課題開始当初、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1千万人を超える状況にあり、それらは今も増加傾向にある。2010年度の人口動態統計のデータにより肺炎で亡くなる方の約95%が65歳以上の高齢者で占められることが明らかになった。その数年前に Teramoto ら(2008)によって、肺炎入院患者における誤嚥性肺炎の割合が、高齢になるほど上昇することが示された。そして高齢者の肺炎の内訳として誤嚥性肺炎が占める割合が高い背景には、主なりリスク因子として摂食嚥下障害が存在すると考えられている。

高齢に伴い認知症や高次脳機能障害の発症リスクが高まるとともに、摂食機能障害を合併するリスクも増加する。そして一見食欲不振と思われる症状の背景にも、誤嚥もしくは誤嚥性肺炎が潜んでいると推測される。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に期待される。

摂食機能障害に罹患した場合に「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はQOLを維持向上することとも直結する。臨床的に一日一口でも満足感の源となる「おいしさ」すなわち「風味」を感じることで日々の暮らしを豊かにし、意欲を維持向上してきた例は多い。意識覚醒のほか口腔機能や消化器系のはたらきの維持に対しても効果があるとの報告もある。そして本人の希望を叶えてあげたいという家族の要望も強く存在する。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)の効果や予後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好循環を生み出す可能性が見込まれる。このように「食」は個としての生命維持に欠かせない要素であり、食を通じた「おいしさ」すなわち「風味」の認識はQOLを維持向上させるためにも重要であると考えられる。

しかしながら食に関わる「風味」に関する知見は臨床報告や食行動の観点からの報告が多い一方で、神経科学的知見は「味覚」「嗅覚」「体性感覚」など独立したテーマによる報告が多く、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、とくに大脳皮質に着目して取り組むこととした。

2. 研究の目的

「おいしさ」すなわち「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が、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。そこで本研究では、時間-空間的解像度が高い利点をもつ光学計測法を用い、味およびニオイ刺激に対する応答を指標にして、特に大脳皮質に存在する味覚野であり多様な情報を統合するインターフェイスとしての役割を担う領域のひとつとして考えられている島皮質と、嗅覚野である梨状皮質の役割について新たな知見を得ることを目指した。

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、視床を経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経由して梨状皮質(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。

解剖学的にはさらに、島皮質に関しては細胞構築学的に無顆粒性島皮質(agranular insular cortex; AI), 不全顆粒島皮質(dysgranular insular cortex; DI), 顆粒島皮質(granular insular cortex; GI) の三部位に分類されている。また神経線維の投射に関しては、嗅球からAIへ順行性の投射がある(Krushel LA and van der Kooy D, 1988) ことや島皮質と梨状皮質は双方向性に投射があることが示されている。これらの知見は、島皮質では味覚情報だけでなく嗅覚情報の処理も行っていることを示唆するものであるが、実際の感覚に対する応答を捉えた生理学的に機能を推測できる知見は少ない。一方で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、本研究により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。

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行われた。

【味溶液およびニオイ(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】

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の術式を基本として実施した。

1) 標本作成：C57BL/6NCrSlc マウス（雄性、三協ラボサービス）を用い内因性蛍光物質であるフラビン蛋白の蛍光変化測定用全脳動物標本作製した。全身麻酔としてウレタン（1.6 g/kg）を腹腔内投与したあとに頭部皮膚を切開し、露出させた頭頂部の骨を脳定位固定装置（ナリシゲ社製）に固定した。マウスは頭蓋骨が薄いので、保湿により骨の透過性を維持することで頭蓋骨を可及的に残した状態でフラビン蛋白の蛍光強度変化を測定することができる。そのため、頬骨弓およびデータ取得の妨げになる筋組織は除去しつつ、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頭蓋骨を露出した上から保湿目的でシリコンオイルを付与し観察野とした。なお、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で計測を行うこととした。

2) 全脳動物標本作製後、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, プ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（ $\lambda > 536$ nm long-pass, Andover, Salem, NH, USA）を通して受光・検出した。

3) 実際の味質（甘味や苦味などの液体）を口腔内に、ニオイ（気体）を鼻孔から呈示し、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。

【味覚および嗅覚の伝導路を刺激した際の大脳皮質における膜電位の応答変化率測定】

Sprague-Dawley 系ラット（雄性、三協ラボサービス）を用いて作成した膜電位計測用全脳動物標本に対し、～ の刺激を行うことで得られた皮質応答データについて解析を進めた。

味神経のひとつである鼓索神経への電気刺激

嗅覚の一次中枢である主嗅球への電気刺激

鼓索神経および主嗅球への同時電気刺激

鼓索神経または主嗅球への刺激のタイミングを前後 150 ms させる

なお、膜電位計測用全脳動物標本作製しデータを得るにあたって次の点に留意した。

1) 実験動物には Sprague-Dawley 系ラット（雄性、三協ラボサービス）を用いた。全身麻酔としてウレタン（1.5 g/kg）を腹腔内投与したラットに気管挿管を実施したのち、頭部皮膚を切開し露出させた頭頂部の骨を脳定位固定装置（ナリシゲ社製）に固定した。同じく皮膚を切開し側頭部の頭蓋骨を露出後、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骨を開窓した。その際、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。開窓によって露出した大脳皮質表層全体に膜電位感受性色素（RH-1691, 1 mg/ml）を定着させ観察野とした（Mizoguchi et al., 2011, 2020）。

2) 刺激条件：刺激電極として、嗅覚の一次中枢である主嗅球にタングステン電極（UEWMECSE0N1M, FHC, Bowdoin, ME, USA）を刺入し、鼓索神経線維束にはエナメルワイヤー（直径 100 μ m, 多摩川電線, 東京）製双極電極を設置した。STG2008（Multi Channel Systems）を電気刺激装置に用いて電気刺激（50 Hz, 5 trains）を行った。それぞれの単独刺激による皮質における膜電位変化を測定するとともに、同時刺激およびタイミングをずらした刺激に対する皮質応答を観察し解析を行った。

3) 全脳動物標本作製後、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, プ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。なお、ハロゲンランプ（CLS150XD, Leica Microsystems）を光源とし、励起フィルタとダイクロイックミラーによって波長 632 nm の励起光を皮質表層に照射した。励起光照射によって得られた神経活動前後の膜電位感受性色素の蛍光強度変化はロングパスフィルタ（ $\lambda > 650$ nm long-pass, Andover, Salem, NH, USA）を通して受光・検出した。

4. 研究成果

【味溶液およびニオイ（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】

味およびニオイを同時に呈示した場合における皮質応答を得ることは当初の課題の一つであったが、フラビン蛋白の蛍光変化としてその応答を捉えることが可能となった。

味溶液を口腔内に 1 秒間呈示し得られた大脳皮質におけるフラビン蛋白の蛍光強度変化：300 mM のスクロース液と 0.1 mM のキニーネ液をマウス口腔内に 1 秒間呈示した場合に皮質味覚野に反応が認められた。皮質味覚野においては刺激開始直後から反応が開始する傾向があったが、ピークに至るまでの時間は平均 3 秒程度であった。この点はニオイ呈示に対する反応と似た傾向を示した。しかし鼓索神経への電気刺激および味溶液の口腔への呈示に対する大脳皮質における膜電位の反応変化と比較して長い時間がかかっている。この時間的特徴が何に由来するの

かについて、引き続き解析および他の手法と併用するなどして解明を試みることにした。

ニオイ物質を鼻腔から呈示した際に得られる大脳皮質におけるフラビン蛋白の蛍光強度変化：全身麻酔下のマウスに対し鼻孔から1秒間ニオイ物質アミルアセテート(バナナ臭)の呈示を行うと梨状皮質に反応が認められた。この傾向は主嗅球を電気刺激して膜電位の変化を計測して得られた結果と類似していたが、その反応の経時的変化には違いが認められた。梨状皮質前方部に着目した場合、刺激開始から1秒後以降に反応変化が始まり、反応ピークに至る時間は平均して約3秒後であった。潜時や刺激開始からピークに至るまでの時間が、主嗅球に対する電気刺激時に認められる大脳皮質における膜電位の反応変化と比較して差がある。この時間的特徴が何に由来するのかについて、引き続き解析および他の手法と併用するなどして解明を試みることにした。

味溶液およびニオイの同時呈示に対する大脳皮質におけるフラビン蛋白の蛍光強度変化：

がともに可能であった個体に対し、味溶液およびニオイ物質を同時に用いて大脳皮質におけるフラビン蛋白の蛍光変化を計測した。その結果、味またはニオイ単独の呈示時と比較して同時呈示の際は吻側 AI において反応強度が有意に増加した。

【味覚および嗅覚の伝導路を刺激した際の大脳皮質における膜電位の反応変化】

鼓索神経への刺激に対する皮質反応：ラットでは中大脳動脈周囲約1mmのDIが大脳皮質一次味覚野として報告されている。我々のこれまでの研究においても味溶液による口腔内刺激誘発性にDIが活性化することを示している。鼓索神経を電気刺激した場合においても、DIが反応することが示された。さらに解析を進めると鼓索神経刺激による皮質反応はDI内においても一律ではなく、吻側のDIが尾側のDIと比較し膜電位の反応変化率が大きいことが確認された。そして吻側DIにおける初期反応は刺激開始から 15.4 ± 1.8 msで認められたが、5連刺激に対しては1つのピークを示した。反応ピークに達する時間は刺激開始から平均で 105.1 ± 15.2 msであった。なお、鼓索神経単独刺激ではDI以外ではAI、二次体性感覚野口腔領域、梨状皮質でも反応強度の変化はどれも吻側DIにおける変化よりも有意に小さかった。先に述べたように、解剖学的に島皮質と梨状皮質は双方向性に投射があることが示されている。具体的にはAI後方からDIや梨状皮質へは順行性の投射があること(Shi CJ and Cassell MD, 1998)、梨状皮質後方2層に細胞体を持つ錐体細胞は島皮質、嗅周皮質、嗅内皮質、扁桃体、嗅結節に軸索投射する(Johnson DM et al., 2000)といったことである。これらのことから、吻側AI、尾側DI、梨状皮質の前方および後方部のいずれかは、鼓索神経刺激に対し反応強度が有意に増加することが予想されたが、反応の最大変化率に着目した場合はそのような結果は示されなかった。

主嗅球への刺激に対する皮質反応：嗅覚情報は主嗅球から外側嗅索を経て梨状皮質へ伝わる。我々が行った主嗅球への電気刺激に対しても梨状皮質への反応が確認できた。解析を進めた結果、主嗅球への電気刺激による梨状皮質への反応は、刺激開始からの潜時については梨状皮質前方が 7.4 ± 3.0 ms、梨状皮質後方が 9.7 ± 3.9 msであった。反応は5連刺激に即した5つのピークが認められた。その中でも最大ピークに達する時間の平均値は刺激開始から梨状皮質前方では 79.4 ± 9.8 ms、梨状皮質後方では 85.1 ± 10.5 msであった。Krushel LAら(1988)によって示された嗅球からAIへ順行性の投射があるとの解剖学的知見およびから、主嗅球を刺激することでAIへの反応が予想されたが、本手法では鼓索神経刺激時と比較して有意な反応強度の変化は認められなかった。

鼓索神経および主嗅球への同時電気刺激に対する皮質反応：吻尾側のDIや梨状皮質および二次体性感覚野口腔領域には、単独刺激時と比較して有意な反応強度の増加は認められなかった。しかしながら、吻側AIでは有意な反応強度の増加が認められた。

鼓索神経または主嗅球への刺激のタイミングを前後にずらした場合の皮質反応：皮質局所回路における興奮は、GABA_AおよびGABA_B受容体の抑制を伴い、その後の神経活動に影響を与える可能性がある。GABA_B受容体を介する抑制性シナプス後電位は、活性から約150ms後にピークを示す(Kobayashi M et al., 2012)ことから、のほかに鼓索神経および主嗅球刺激を150ms前後にずらしたときの皮質反応を観察した。その結果、同時刺激時の吻側AI、吻側および尾側のDIにおける皮質反応は、主嗅球を鼓索神経より前に刺激した場合と比較して有意に大きくなることが示された。なお、吻側AIでは鼓索神経刺激後に主嗅球を刺激した場合も、逆の場合に比べ反応強度は有意に大きくなることが示された。

【膜電位計測とフラビン蛋白蛍光変化計測による結果の比較】

ラット大脳皮質における膜電位計測の結果，鼓索神経を電気刺激すると吻側 DI に，主嗅球を電気刺激すると梨状皮質に主たる応答が認められた。同時刺激の結果では，吻側 DI および梨状皮質に単独刺激に類似した応答変化が認められたほか，吻側 AI に有意な応答強度の増加が認められた。マウスに対し味溶液およびニオイ（気体）を呈示し，大脳皮質におけるフラビン蛋白の蛍光変化を観察した際にも同様の傾向が認められた。異なる動物種かつ，膜電位とフラビン蛋白蛍光変化という異なる指標によっても味覚および嗅覚刺激に対する応答領域の共通性を見出すことができた。一方，時間的な変化に対しては膜電位変化とフラビン蛋白蛍光変化に差が認められるため，この時間的特徴が何に由来するのかについて，引き続き検討を要する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizoguchi N, Muramoto K, Kobayashi M.	4. 巻 472 (6)
2. 論文標題 Olfactory signals from the main olfactory bulb converge with taste information from the chorda tympani nerve in the agranular insular cortex of rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 721-732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-020-02399-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 溝口 尚子	4. 巻 1 (8)
2. 論文標題 食べる意欲に欠かせない風味認識の中樞神経機構の解明	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 894 - 895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小峰 雄介、溝口 尚子、坂下 英明、村本 和世
2. 発表標題 風味形成によるマウス大脳皮質での味およびニオイ情報処理領域の変化 Flavor formation affects the cortical representation of signal processing for odor and taste in mouse
3. 学会等名 NEURO 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小峰 雄介、溝口 尚子、坂下 英明、村本 和世
2. 発表標題 Changes of neural activity in mouse insular cortex by the associative learning of taste and odor
3. 学会等名 日本味と匂学会第52回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小峰 雄介、溝口 尚子、坂下 英明、村本 和世
2. 発表標題 Visualization of odor- and taste-evoked cortical responses by in vivo optical imaging with flavoprotein autofluorescence
3. 学会等名 第95回 日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 溝口 尚子、箕田 碧、須田 直人、村本 和世
2. 発表標題 An intracortical connection among somatosensory areas makes higher complemental processing for orofacial sensation in rat.
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (北米神経科学会)(国際学会)
4. 発表年 2017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jing学会 学術集会
4. 発表年 2021年

〔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	小林 真之 (Kobayashi Masayuki) (00300830)	日本大学・歯学部・教授 (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
連携研究者	村本 和世 (Muramoto Kazuyo) (10301798)	明海大学・歯学部・教授 (32404)	

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