

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16898

研究課題名（和文）フラビン蛋白イメージングを用いたマウス大脳味覚野の機能解明

研究課題名（英文）Analysis of gustatory cortex in mice using transcranial flavoprotein fluorescence imaging

研究代表者

馬場 洋徳（BABA, HIRONORI）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20770225

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：味覚野を同定するために初回刺激としてアイソレーターを用いて電気刺激によるフラビン蛋白蛍光反応を確認した。マウスの舌表面に電気刺激を与え、過去の報告と一致した中大脳動脈の周囲に蛍光反応を捉えることができ、強度依存性も確認した。次に甘味刺激、苦味刺激、蒸留水による蛍光反応を確認した。刺激方法は各刺激を舌へ手動によって滴下した。蒸留水（無味刺激）では反応は認めず、甘味と苦味で反応の強度の違いを認め味覚野を同定した。しかしながら味覚MAPの同定まで至っていない。現在外部トリガーからシリンジポンプを使用して任意のタイミングで味覚水、蒸留水を滴下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

臨床の場でも味覚障害患者の客観的な検査や治療法が確立しておらず、大脳皮質味覚野の研究は、脳の機能の解明のみならず、臨床にも直結した注目すべき研究分野であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：An isolator was used as the initial stimulus to identify the gustatory cortex. Then, the flavin protein fluorescence reaction by electrical stimulation was confirmed. By applying electrical stimulation to the tongue surface of the mouse, a fluorescence reaction was observed at a position consistent with previous reports. In addition, the strength dependence could be confirmed.

Next, sweetness stimulus, bitterness stimulus, and fluorescence reaction with distilled water were confirmed. The stimulation method was manually dropped onto the tongue. No reaction was observed with distilled water. Differences in reaction intensity were observed between sweetness and bitterness, and the gustatory cortex could be identified. However, the taste map has not been identified yet.

Currently, it is possible to drip from an external trigger using a syringe pump at any time.

研究分野：大脳皮質味覚野

キーワード：フラビン蛋白蛍光法 大脳皮質味覚野

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの脳機能活動の測定法は、脳表に針電極を刺し、その周囲の神経細胞の活動電位を拾う電気生理学的手法を用いるのが一般的であった。しかし、針電極から得られたデータのデータでは、ネットワークとして機能する神経活動をとらえるのには適さない。そこで脳表面で起こる神経活動を2次元的な情報として直接とらえる光学的イメージング法が開発された。その中でも、われわれはミトコンドリアの電子伝達系に内在するフラビン蛋白の性質に注目し研究している。フラビン蛋白は還元型と酸化型が存在し、青色励起光を照射すると酸化型のみ緑色蛍光を発するという性質を持つ。フラビン蛋白蛍光イメージングとは神経活動に伴った細胞内の酸素代謝亢進により、フラビン蛋白が還元型から酸化型へと変化、それに伴う緑色自家蛍光の上昇を記録することにより、神経活動のみを画像化する方法である。同法は他の光学的イメージング法と異なり外来性の色素などを投与する必要がなく、より自然に近い反応がみられること、ヘモグロビンの吸光変化を用いたいわゆる内因性信号に比較し信号強度が強く、神経活動と相関して蛍光が強くなる点で優れている。また、マウスは頭蓋骨が非常に薄く、頭蓋骨越しにイメージングが可能であることから、脳に無侵襲で大脳聴覚野機能を捉える事ができる。味覚の中樞機構は大脳皮質(一次味覚野)で認知され、眼窩前頭皮質(二次味覚野)に投射される。この領域は嗅覚、触覚なども伝わり食に伴う感覚の統合処理を行う重要な部位である。また扁桃体では情動や快・不快の感情について重要な領域でもある。

大脳味覚野の研究は電気生理学的な手法が一般的であり、2000年代に入り、味のニューロイメージングとしてPET、MEG、fMRIなど非侵襲的な研究報告が増えている。しかし大脳味覚野の詳細な情報処理についてはっきりしておらず、2011年一次味覚野でのCa<sup>2+</sup>濃度変化を測定した研究で味質ごとに明確に分離された領域が同定された。しかし特定の味覚に応答するニューロンの分布領域には重なりがあるとされていた過去の積み上げられた研究とは相容れない結果であったため批判的な意見もあり、明確なコンセンサスを得ていない。臨床の場合でも味覚障害患者の客観的な検査や治療法が確立しておらず、大脳皮質味覚野の研究は、脳の機能の解明のみならず、臨床にも直結した注目すべき研究分野であると考えられる。

### 2. 研究の目的

われわれはこれまで行ってきたフラビン蛋白蛍光イメージングを利用し、大脳皮質味覚野の機能解析、味覚情報処理の一端を明らかにし、また味覚と嗅覚、体性感覚そして情動との関連、メカニズムの解明にも迫りたい。

### 3. 研究の方法

経頭蓋的にフラビン蛋白蛍光イメージングを利用し大脳味覚野の反応を測定する。対象動物はマウスとし、C57BL/6を中心とした系統を用いる。ウレタン 1.7g/kg 腹腔内投与によって麻酔、自発呼吸下に管理する。大脳味覚野については、中大脳動脈前後の島皮質内に存在することが知られており、聴覚野と同様にマウスの頭部皮膚を切除、側頭筋を翻転させ、大脳味覚野を明視下に置く。青色励起光(450-490 nm)を頭蓋骨越しに脳表に照射し、神経活動に伴って発せられる緑色自家蛍光(500-550 nm)を冷却 CCD カメラにより撮影する。反応は通常1秒あたり9フレームの頻度で撮影し、30回程度のトライアルを平均加算

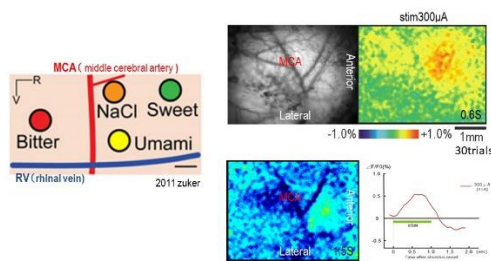
する。刺激音提示直前の複数枚の平均画像を基準とし、刺激音提示後の蛍光変化を経時的に画像化する。

味覚野を同定するために初回刺激としてアイソレイターを用いて電気刺激によるフラビン蛋白蛍光反応を確認し、次に甘味刺激、苦味刺激、蒸留水による蛍光反応を確認した。

#### 4. 研究成果

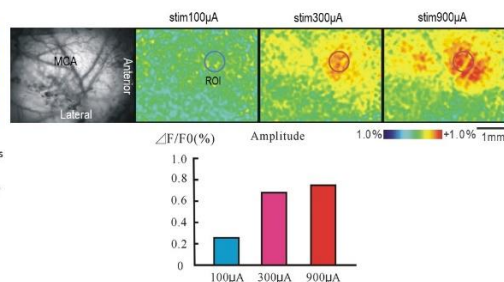
呼吸を安定させるために気管切開を行い、自発呼吸下で急性実験を行った。アイソレイターを用いた電気刺激によるフラビン蛋白蛍光反応は、マウスの舌表面に 100 $\mu$ A、300 $\mu$ A、900 $\mu$ A (10Hz, 10pulses)の電気刺激をそれぞれ与えた。結果、過去の報告と一致した中大脳動脈の周囲に蛍光反応を捉えることができた。また 100 $\mu$ A では反応はなく、300 $\mu$ A、900 $\mu$ A で反応を捉え、強度依存性を認めた。

#### 電気刺激に対するフラビン蛋白蛍光反応



MCAを同定し大脳皮質味覚野と考えられる領域に反応を確認

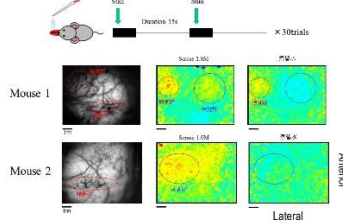
#### 刺激強度別の反応の違い



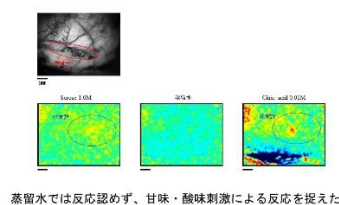
100 $\mu$ Aでは反応なく、300 $\mu$ Aと900 $\mu$ Aで反応と強度依存性あり

次に甘味刺激、苦味刺激、蒸留水による蛍光反応を確認した。刺激方法は各刺激を舌へ手動によって滴下した。蒸留水（無味刺激）では反応は認めず、甘味と苦味で反応の強度の違いを認め味覚野を同定した。しかしながら味覚 MAP の同定まで至っていない。また遺伝子改変マウスである GCaMP マウスを導入した。GCaMP マウスはフラビン蛋白蛍光の数倍の強度でイメージングが可能と報告している。実際 GCaMP マウスに対して刺激を行い、同様の位置に反応の増強が認められた。これまで手動による滴下刺激で対応したが、より正確なデータを捉えるための刺激方法として ON と OFF がはっきりさせ、繰り返し刺激を行う必要がある。現在外部トリガーからシリンジポンプを使用して任意のタイミングで味覚水、蒸留水を滴下することが可能となった。今後これらを用いて大脳皮質味覚野の可塑性変化を捉える研究を進めていく。

#### スクロース、蒸留水刺激による比較

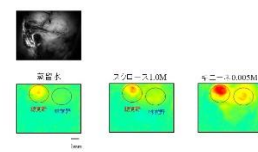


#### スクロース、蒸留水、クエン酸刺激による比較



蒸留水では反応認めず、甘味・酸味刺激による反応を捉えた

#### GCaMPによる味覚野の反応



味覚野反応を捉え、蒸留水では反応認めず、特に苦味刺激では強い反応強度を認めた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬場洋徳
2. 発表標題 フラビン蛋白蛍光法を用いたマウス大脳皮質味覚野の同定
3. 学会等名 第30回日本口腔・咽頭科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

フラビン蛋白イメージングを用いたマウス大脳皮質味覚野の機能解明 <a href="https://nrid.nii.ac.jp/ja/nrid/1000020770225/">https://nrid.nii.ac.jp/ja/nrid/1000020770225/</a>
--

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