

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791820

研究課題名（和文） 食品の硬さの嗜好を調整する脳内物質の解明

研究課題名（英文） Elucidation of neural substances processing palatability of hardness of food

## 研究代表者

石塚 智子 (ISHIZUKA TOMOKO)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90448043

研究成果の概要（和文）：食物の硬さやその嗜好性が神経活性に及ぼす影響についてラットを用いた検討を行った。硬飼料摂取時には扁桃体中心核の神経活性が上昇し当該部位のヒスタミン遊離が増加したが、軟飼料摂取時では両者とも上昇は認められなかった。一方、軟飼料に対して嫌悪を獲得したラットでは軟飼料摂取時に神経活性が上昇し、ヒスタミン遊離も増加した。さらに、軟飼料に対する嫌悪反応は扁桃体中心核に  $H_1$  受容体遮断薬を投与することで抑制された。従って、扁桃体中心核のヒスタミン神経系は食物の硬さの嗜好性の調節に関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：The effects of hardness and palatability of food on neuronal activation were studied using rats. A number of Fos-immunoreactive cells and the enhancement of histamine release were found in the central nucleus of amygdala in hard pellets-fed rats, but not in soft pellets-fed rats. When rats acquired a conditioned aversion to soft pellets, Fos expression and histamine release were increased during feeding. In addition, the microinjection of  $H_1$ -antagonist to the bilateral central nucleus of amygdala impaired the aversive response to soft pellets. These observations indicate that the amygdalar histaminergic system is involved in the modulation of palatability related to hardness of food.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学，機能性基礎歯科学

キーワード：摂食行動，ヒスタミン神経系，食物の硬さ，嗜好性，食物嫌悪学習，マイクログリアリシス，免疫組織化学染色

## 1. 研究開始当初の背景

動物が摂取する食物の性状には大きく分けて化学的属性と物理的属性の二種類が存在する。化学的属性とは食物の味や匂いなどの化学感覚で検知されるものであり、物理的属性とは食物の硬さや温度などである。この

うち、食物の味や硬さの情報は、口腔内に存在する感覚器で受容されて中枢へと伝達される。

味覚の中枢における情報処理機構については数多くの知見が得られており、シグナル伝達に関わる脳部位についても明らかにな

っている。一方、味覚の研究と比較すると、食物の硬さの情報の伝達機構についてはほとんど解明されていない。しかし、日常生活の中で同じ味を呈する食物であっても硬さが異なると感じるおいしさが変化して食行動に影響を及ぼすことはわれわれもよく経験することである。さらに、動物実験レベルにおいても食品の硬さがラットの食物の選択に重要な役割を果たしていることや食物嫌悪条件学習の条件刺激となり得ることが報告されており、動物が食品の硬さに対する嗜好性を検知していることは明らかである。その際に、味覚の場合と同様に脳内で何らかの情報処理が行われ、嗜好性の形成に寄与していることが推測されるため、食品の硬さによる嗜好性の調節に関与する脳内機構について検討することを思い至った。

## 2. 研究の目的

本研究では食物の硬さの情報が脳内でいかにして処理されているのかを調べるために、まず食物摂取時に硬さの情報が入力する脳部位を Fos 蛋白を神経活性のマーカーとした免疫組織化学染色法にて明らかにし、さらに硬さのシグナル伝達に関与する神経伝達物質について、摂食調節と味覚の情報伝達に関与が認められているヒスタミン神経系に着目した神経化学的実験を行う。また、食物嫌悪学習のパラダイムを用い、生得的に動物が好む硬さの飼料に対して後天的に嫌悪を獲得させた場合、ヒスタミン神経系の活性にどのような影響を及ぼすのかについて、神経化学的・行動薬理的に検討する。以上より、食品の硬さならびにその嗜好性に関与する脳内機構について解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

実験にはすべてウイスター系雄性ラット(日本 SLC, 実験開始時 8 週令)を用いた。ラットは個別にケージに収容し、明暗周期 12 時間の環境下で飼育した。

### (2) 飼料

通常の固形飼料 (MF, オリエンタル酵母社製) と、MF と同程度の硬さであるが含有成分が異なる飼料 (hard), hard と含有成分は同じであるが、コーンスターチの配合率を変化させた硬度の低い飼料 (soft)を用いた。hard, soft はそれぞれオリエンタル酵母社に特注し作成した。成分表を表 1 に示す。

表 1 各飼料の成分表

	MF	hard	soft
$\alpha$ -corn starch	10% w/w	20% w/w	3% w/w
$\beta$ -corn starch	42	34	51
Casein	25	20	20
Sucrose	5	10	10
Corn oil	6	7	7
Cellulose Powder	8	5	5
Mineral	3	3	3
Vitamin	1	1	1

### (3) 実験方法

#### ①食物選択試験

実験日前日までラットには MF および水を自由に摂取させた。実験日前日には MF 飼料をケージより抜去し、24 時間絶食環境下においた。水は絶食期間中も自由に摂取させた。翌日, hard と soft の 2 種類の飼料を図 1 のようにラットに 30 分間呈示し、それぞれの飼料の摂取量を測定した。餌箱 (A および B) の位置による飼料摂取量への影響を回避するために、30 分間の飼料呈示中には 5 分ごとに餌箱の位置を入れ替えた。摂食量より、下記の数式から各飼料の嗜好率を算出した。各群間の嗜好率における統計的な有意差は Student's t 検定を用いて検定した。  
嗜好率 = 各飼料の摂取量 / 総摂取量 \* 100

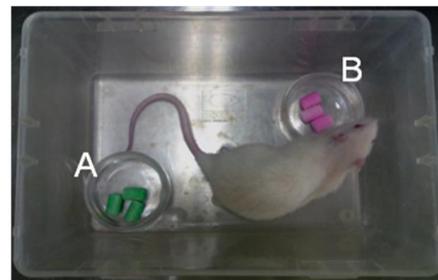


図 1 食物選択試験

#### ②免疫組織化学染色実験

別群のラットに 11 時 30 分から 12 時 30 分までの 1 時間のみ飼料を与えて摂取させる制限食トレーニングを 1 週間程度行った。この期間中はラットには MF を呈示し、水は制限せずに 24 時間自由に摂取させた。経日的な摂食量が安定したのち、実験日前日には新奇性恐怖を回避するために実験日に摂取させる飼料と同種の飼料を摂取させた。食物嫌悪学習獲得群には soft 飼料抜去 20 分後に 0.15 M 塩化リチウム溶液を体重の 2% 量腹腔内投与し、内臓不快感を誘発することで条件付けを行った。実験日にはそれぞれのラットに hard, soft のいずれか 1 種類の飼料を 1 時間

摂取させ、2時間後にペントバルビタール (50mg/kg) を腹腔内投与して麻酔した。その後、左心室より 0.02M リン酸緩衝生理食塩水を灌流して瀉血後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定した。全脳を摘出し、一晩後固定として 4%パラホルムアルデヒド溶液に浸透させた後、凍結時の破壊防止のために 30%ショ糖溶液に浸漬し、4°Cで脳が沈降するまで保存した。クリオスタットにて 40 $\mu$ m の凍結脳切片を作成し、常法に従って Fos 蛋白を免疫組織化学染色した。その後、光学顕微鏡にて各切片を観察し、Fos 陽性細胞が存在する神経核を検索した。

### ③マイクロダイアリシス

ラットをペントバルビタール (50mg/kg) の腹腔内投与にて麻酔し、扁桃体中心核 (AP, -2.3; LM, -4.0; DV, 6.4 mm) にマイクロダイアリシス用のガイドカニューレを留置した。回復期間をおいたのち、②と同様の制限食トレーニングを経日的な摂食量が安定するまで行った。実験日前日には新奇性恐怖を回避するために、実験日に摂取させる飼料と同種の飼料を摂取させた。食物嫌悪学習の条件付けについても②と同様の手順で行った。実験日にはダイアリシスプローブ (MAB6, 膜長 2mm) をガイドカニューレに沿って刺入し、プローブにはリングル液を流速 1  $\mu$ l/min で灌流した。安定したヒスタミンレベルを得るため、プローブ刺入から 1 時間までのサンプルは除外し、その後は 20 分ごとにサンプルを回収した。基礎遊離を測定後、前日に呈示したものと同一種類の飼料をラットに摂取させるとともにサンプルを回収した。エサを除去したあとは 1 時間後までサンプルの回収を行った。また、それぞれの群の実験中の摂食量についても測定した。サンプル内のヒスタミンレベルは HPLC 蛍光法にて定量し、各群の基礎遊離を 100%とした相対値で示した。ヒスタミンレベルについては二元配置 (飼料の種類 $\times$ 時間) の分散分析を用いて検定し、有意差が認められた場合は下位検定として Newman-Keuls 検定を行った。摂食量は一元配置の分散分析を用いて検定した。

### ④行動薬理学的実験

ラットをペントバルビタール (50mg/kg) の腹腔内投与にて麻酔した後、ガイドカニューレを両側の扁桃体中心核 (AP, -2.3 mm, LM, -4.0 mm, DV, 6.4 mm) に装着した。手術から回復後、全てのラットに対して②と同様に制限食トレーニングと条件付けを行った。翌日、soft の再呈示 20 分前に両側の扁桃体中心核に H<sub>1</sub> 受容体拮抗薬であるメピラミン (20 $\mu$ g/0.5 $\mu$ l/side) を投与したのちに soft 飼料を再呈示し、1 時間の摂食量を測定した。control 群には同量の生理食塩水の投与を行

った。摂食量は一元配置の分散分析を用いて検定し、有意差が認められた場合は下位検定として Newman-Keuls 検定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

#### ①食物選択試験

hard に対して、soft の嗜好率は有意に高く (soft:  $t(12) = -7.51, p < 0.01$ )、ラットは soft に対して生得的に嗜好性が高いことが確認できた (図 2)。

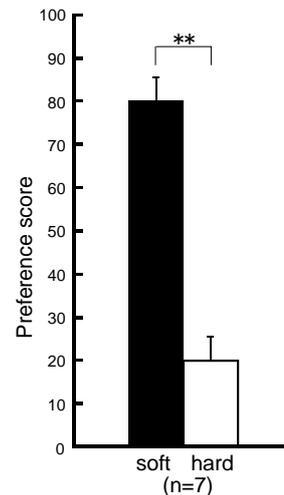


図 2 食物選択試験における各飼料への嗜好率。 \*\*:  $p < 0.01$ .

#### ②免疫組織化学染色実験

扁桃体中心核において、摂取する飼料の違いによって Fos 陽性細胞数が変化していた。hard 群では Fos 発現は顕著に増加していたが、soft 群では Fos 発現が減弱していた。さらに、soft と塩化リチウムを対呈示し、soft に対して嫌悪を獲得した群では soft 飼料摂取時に顕著な Fos 発現の増加が認められた (図 3)。

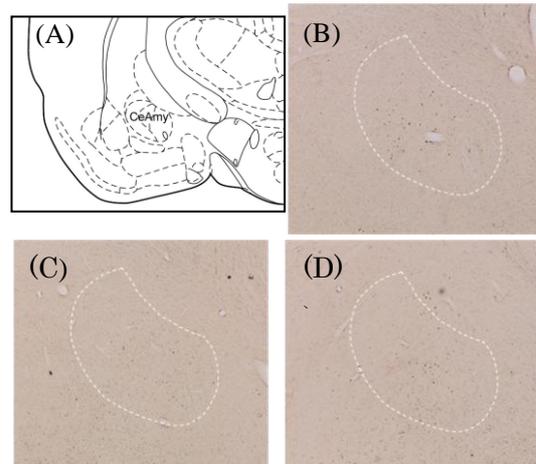


図 3 (A) ラット扁桃体中心核 (CeAmy) の前頭断面図 (Paxinos & Watson, 1998). (B) hard, (C) soft, (D) soft 嫌悪群の扁桃体中心核における Fos 蛋白発現。

③マイクロダイアリシス

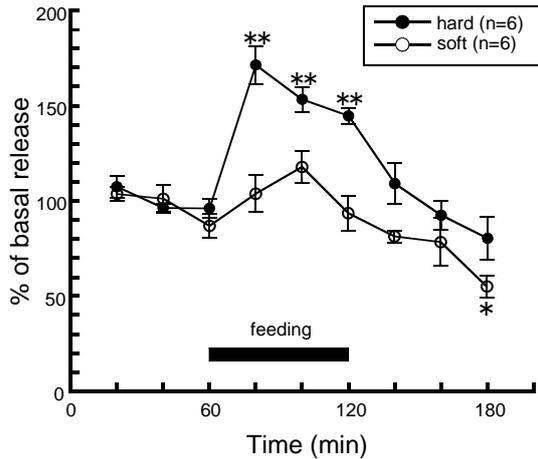


図4 hard及びsoft摂取が扁桃体中心核におけるヒスタミン遊離に及ぼす影響. (\*\* p<0.01, \* p<0.05 vs. 基礎遊離)

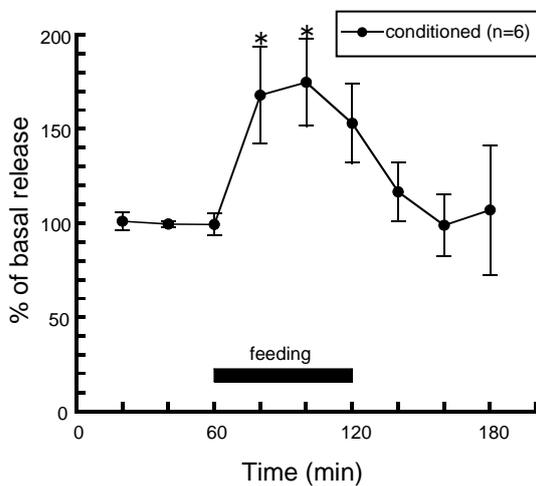


図5 softに対して嫌悪を獲得したラットにおいてsoft摂取が扁桃体ヒスタミン遊離に及ぼす影響. (\* p<0.05 vs. 基礎遊離)

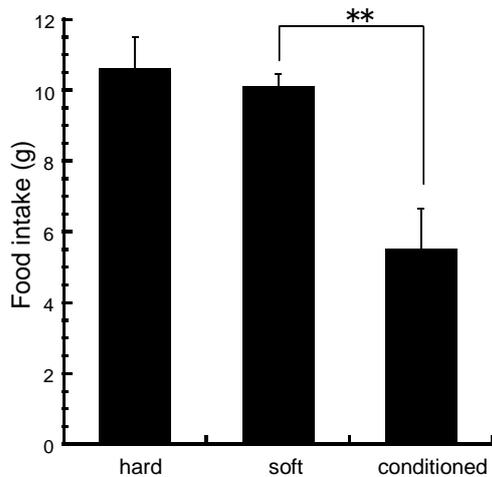


図6 マイクロダイアリシス時の摂食量の比較. (\*\* p<0.01)

分散分析にて、飼料の種類の主効果が認められた ( $F(2,14) = 14.94, p < 0.01$ , 図4). hard 摂取時には扁桃体中心核におけるヒスタミン遊離は基礎遊離と比較して有意に上昇した ( $p < 0.01$ , 図4). 一方, soft 摂取時には摂食中にヒスタミン遊離の上昇は見られず, 観察期間の最後に有意なヒスタミン遊離の低下が認められた ( $p < 0.05$ , 図4). それに対して, soft 嫌悪群 (conditioned) では実験日の soft 飼料摂取中のヒスタミン遊離は有意に上昇した ( $F(8,40) = 4.46, p < 0.01$ , 図5). また, 実験中の摂食量については hard 群と soft 群の間に有意な差は見られなかったが, conditioned 群では, 実験中の摂食量が soft 群と比較して有意に減少していた ( $F(2,15) = 10.68, p < 0.01$ , 図6).

④行動薬理学的実験

図7に行動薬理学的実験の結果を示す. pre が条件付け前の飼料の摂取量, post が条件付け後の条件刺激再呈示時の摂食量である. control 群では pre よりも post の摂食量が有意に減少しており (pre vs post:  $p < 0.05$ ), 食物嫌悪学習の獲得がなされたものと考えられる. しかし, 条件刺激再呈示前に両側の扁桃体中心核にメピラミンを投与すると, 再呈示時の soft 摂取量は control 群と比較して有意に増加した ( $p < 0.05$ ).

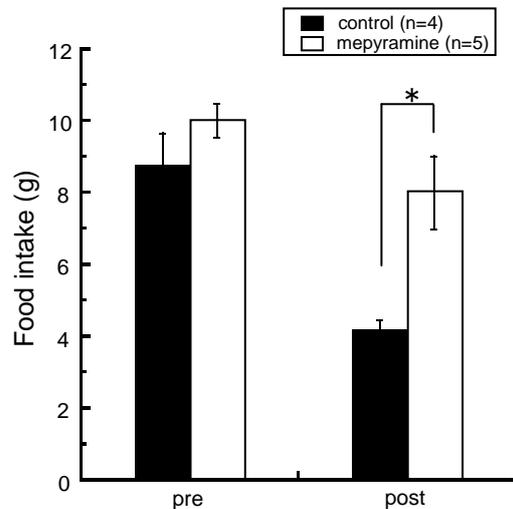


図7 食物嫌悪学習獲得翌日の soft 摂取量に対する  $H_1$  遮断薬投与の影響. (\* p<0.05)

(2)考察

扁桃体中心核において, hard 摂取時には soft 摂取時よりも多くの Fos 陽性細胞数が見られたこと(図3B, C)から, 食物の硬さの情報がこの部位に入力しており, 口腔内への機械的刺激が扁桃体中心核の神経活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された. また, soft に対して食物嫌悪学習を獲得させたのちに soft を再呈示した場合には顕著な Fos 発現の

増加が見られた(図 3D)。図 2 の食物選択試験の結果により、soft はラットにとって生得的に好ましい食物であることが示されており、soft と塩化リチウムの対呈示によって soft への嗜好性が「好き」から「嫌い」へと変化し、Fos 発現が増加したものと推測されるため、扁桃体中心核の神経活性は食物の硬さに対する嗜好性を反映しているものと考えられる。

次に、マイクロダイアリシス実験において、hard 摂取時には扁桃体中心核でのヒスタミン遊離は基礎遊離と比較して有意に増加したが、soft 摂取時にはヒスタミン遊離の上昇は認められなかった(図 4)。実験時の摂食量は hard 群と soft 群で差がなかったこと(図 6)から、摂取した飼料の量がヒスタミン遊離量に影響を及ぼしている可能性や、飼料摂取による食後効果や血糖値変動の関与はないものと推測され、食物の硬さに由来する感覚情報が扁桃体中心核のヒスタミン遊離動態に影響を及ぼしたものと考えられる。さらに、soft 飼料呈示後に塩化リチウムを腹腔内投与して条件付けを行うと、翌日の実験中の soft 摂取量はナイーブな soft 群と比較して有意に減少しており(図 6)、食物の硬さを条件刺激とした食物嫌悪学習が獲得できることが確認された。さらに、条件付け群においては、ヒスタミン遊離が soft 摂取中に有意に上昇していた(図 5)。この結果は、甘味に対する嫌悪条件付けを獲得させたラットに甘味溶液を摂取させると、視床下部でのヒスタミン遊離が上昇したというわれわれの先行研究と部分的に一致しており、味覚のみならず、食物の硬さに対する嗜好性の変化によってもヒスタミン遊離の動態が変化することが示された。さらに、Fos 発現の結果とヒスタミン遊離動態とは良く対応しており、扁桃体中心核で遊離したヒスタミンによって近傍の神経細胞の活性化が引き起こされるものと示唆された。

また、H<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるメピラミンの前投与によって、食物嫌悪学習獲得群での soft の摂食量が有意に増加した(図 7)。このことから、食物の硬さを条件刺激とする食物嫌悪学習の想起に扁桃体中心核のヒスタミンが関与していることが示された。

以上の結果より、扁桃体中心核のヒスタミン神経系は食物の硬さとそれに対する嗜好性の表出に関与することが示された。

#### (3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究の成果は学術論文として発表した(雑誌論文欄の文献 3, Ishizuka et al., 2010)。摂取する食物の硬さによって神経伝達物質の挙動が変化することを報告した論文はこれが初めてである。

#### (4) 今後の展望

今回得られた成果により、扁桃体中心核のヒスタミン神経系は口腔内体性感覚情報によってその活性が変化し、さらにそれに対する嗜好性によっても変化することが示された。口腔内において歯根膜や咀嚼筋の筋紡錘で受け取られた食物の硬さの体性感覚は、脳内の三叉神経中脳路核や外側網様体に存在する運動前ニューロンを介して三叉神経運動核へと伝達される。三叉神経運動核はさらに上位中枢から遠心性のニューロンの投射を受け、活動を制御されることで顎運動の発現や調節に重要な役割を果たしている。扁桃体からは延髄の小細胞性網様体を介した三叉神経運動核への投射が存在することが解剖学的に確認されており、また扁桃体が情動行動に深く関係していることを併せ考えると、口腔内体性感覚情報によって変動する扁桃体のヒスタミンレベルが食物に対する好き・嫌いなどの情動と関連した顎運動変化の調節の一部を担っている可能性が考えられる。今後は、食物の硬さや味覚による扁桃体中心核のヒスタミン遊離動態の差異が実際に顎運動を修飾する働きを持つか否かについて行動レベルでの検討を行っていきたい。

#### 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 3 件)

① Tomoko Ishizuka, Atsushi Yamatodani, Integrative role of the histaminergic system in feeding and taste perception, *Frontiers in Systems Neuroscience*, 査読有, in press, DOI: 10.3389/fnsys.2012.00044

② 石塚智子, 裕哲崇, 大和谷厚, 大浦清, 食物嫌悪学習の想起に対する扁桃体中心核ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の関与, *日本味と匂学会誌*, 査読有, Vol.18, 2011, 303-306

③ Tomoko Ishizuka, Noritaka Sako, Tomotaka Murotani, Aya Morimoto, Atsushi Yamatodani, Kiyoshi Ohura, The effect of hardness of food on amygdalar histamine release in rats, *Brain Research*, 査読有, Vol. 1313, 2010, 97-102, DOI: 10.1016/j.brainres.2009.11.058

[学会発表] (計 7 件)

① 石塚智子, 裕哲崇, 大和谷厚, 大浦清, 口腔内体性感覚によるラット扁桃体中心核ヒスタミン遊離動態への影響, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2011 年 10 月 2 日, 長良川国際会議場(岐阜県)

② Tomoko Ishizuka, Noritaka Sako, Tomotaka

Murotani , Atsushi Yamatodani , Kiyoshi Ohura,  
The Effects of Properties of Food on Amygdalar  
Histamine Release in Rats, The European  
Histamine Research Society 39th Annual  
Meeting, 2010年7月14日, Duhram University  
(England)

③ 石塚智子, 碓哲崇, 室谷知孝, 篠原光子,  
大和谷厚, 大浦清, The effect of hardness of  
food on histamine release in rat amygdala, 第32  
回日本神経科学大会, 2009年9月18日, 名  
古屋国際会議場 (愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石塚 智子 (ISHIZUKA TOMOKO)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：90448043

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし