

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11697

研究課題名（和文）おいしく食べるための唾液、その中枢神経機構の解明

研究課題名（英文）Saliva for tasting and eating food: Its central nervous mechanism

研究代表者

美藤 純弘（Mitoh, Yoshihiro）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：20240872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：味物質は唾液に溶解して味細胞に到達することにより味覚受容器を刺激するため、おいしく味わうためには唾液は不可欠である。唾液は食事中に豊富に分泌されるが、その中枢神経機構は不明である。顎下腺・舌下腺の副交感性の中枢である上唾液核（SSN）神経はOX受容体を発現するので、OXを産生する視床下部外側野（LH、摂食中枢）ニューロンの分布を明らかにした。麻酔下ラットでLHの電気刺激を行ったが、唾液分泌は起こらなかった。しかしピロカルピン（副交感神経刺激薬）投与により唾液分泌が生じたことから、唾液分泌は麻酔薬の影響を強く受けることが明らかになった。現在、覚醒下でLHを活性化する方法の開発を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

味物質は唾液に溶解して味細胞に到達することにより味覚受容器を刺激するため、おいしく味わうためには唾液は不可欠であるが、大きく不足しない限りその重要性に気づかない。頭頸部がんの治療で放射線治療が頻繁に行われ、唾液分泌障害が必発するが、多くの患者は「味を感じにくくなった」と訴える。食事中に豊富な唾液分泌が起こることを切り口に、本研究は唾液分泌の中枢神経機構を解明することを試みた。現在、まだ研究は進行中であるが、これまでの研究から唾液分泌は麻酔薬の影響を強く受けることが明らかになった。このことから、中枢に移行する薬物、例えば向精神薬なども唾液分泌に影響することが示唆される。

研究成果の概要（英文）：Taste substances are dissolved in saliva and reach taste cells to stimulate taste receptors. Thus, saliva is essential for eating and tasting foods. Saliva is abundantly secreted during eating, but the central nervous mechanism is unknown. The superior salivary nucleus (SSN) neurons, which is the parasympathetic center of the submandibular and sublingual glands, expresses OX receptors, so we clarified the distribution of OX-producing lateral hypothalamic (LH, feeding center) neurons. Electrical stimulation of LH in anesthetized rats did not cause saliva secretion. However, saliva was secreted when pilocarpine, a parasympathomimetic drug, was administered intraperitoneally, revealing that saliva secretion is strongly influenced by anesthetic drugs. Then, We are currently developing a method to activate LH in awake rats and measure salivation.

研究分野：口腔生理学分野

キーワード：上唾液核 視床下部外側野 顎下腺・舌下腺 味覚 オレキシン

1. 研究開始当初の背景

味物質は唾液に溶解して味細胞に到達することにより味覚受容体を刺激するため、おいしく味わうためには唾液は不可欠である。唾液分泌は自律神経系により調節されるが、中枢神経機構はほとんど理解されていない。しかし、一般的に唾液は咀嚼に伴って発生する口腔感覚により反射的に分泌されると考えられている (図1)。つまり、食事で生じる味覚や歯根膜感覚が刺激されて生じた感覚情報が下位脳幹 (孤束核、三叉神経脊髄路核) を介して唾液分泌中枢

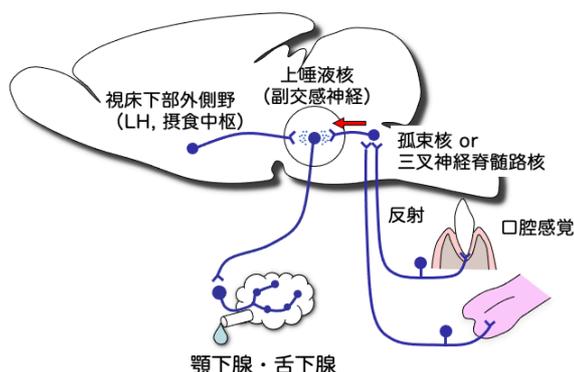


図1 唾液分泌を調節する神経

を活性化することにより、分泌シグナルが唾液腺に送られた結果、唾液分泌が起こると考えられる。「噛めば噛むほど唾液が出る」と言われる所以である。しかし、これまでの我々の研究から、唾液分泌は下位脳幹を介する調節に加えて、前脳が関与することを考えている。そのように考える根拠を挙げる。1) 自由行動下のラットで食事時の唾液は豊富に分泌されるが、歯ぎしりをしているときはほとんど分泌されない。食事中と歯ぎしり中の咬筋活動は同じくらい大きさであったことから、歯根膜は同じくらい刺激されたと考えられるが、歯ぎしり中よりも食事中は豊富な分泌が観察された。2) 視床下部外側野 (LH、摂食中枢) を破壊したラットでは、食事中に観察された多量の唾液は大きく減少した。3) 唾液分泌中枢である顎下腺・舌下腺の副交感神経の中核である上唾液核 (SSN) は、LH から直接的な神経連絡を受けている。4) SSN ニューロンは摂食亢進作用を有する神経ペプチドのオレキシン (OX) に対する受容体を発現する。OX は LH に局在する。このような背景から、我々は、食事時の唾液は下位脳幹よりも前脳が「OX は摂食行動を促進するとともに唾液分泌も促進する」という仮説を立てた。この仮説を検証するにあたり、まず SSN ニューロンに OX 受容体が存在するかどうか免疫組織化学的に調べたところ、OX 受容体のサブタイプである OX1R と OX2R に対する免疫活性が検出された。この結果を受けて、パッチクランプ法により唾液腺支配の SSN ニューロンから記録し、OX を投与すると脱分極することや内向き電流を発生することが観察された。従って、SSN ニューロンは LH のオレキシン作動性ニューロン (OX ニューロン) による興奮性調節を受けることが示唆される。

2. 研究の目的

LH の活性化、または OX ニューロンの活性化は SSN ニューロンの興奮を導き、発生した興奮性シグナルは唾液腺に送られ唾液分泌を誘発する可能性が考えられる。本研究は LH を電気刺激したとき、あるいはチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を LH ニューロンに発現させた LH を光 (470 nm) で刺激したときの唾液分泌を観察したいので、その実験系を確立することを目指した。

3. 研究の方法

SSN ニューロンの蛍光色素による標識

SSN には複数の標的組織 (顎下腺・舌下腺、舌前部の血管および涙腺) に対する副交感神経節前神経の細胞体が存在する。そこで唾液腺ニューロンと他の組織支配のニューロン、つまり舌ニューロンあるいは涙腺ニューロンを同時に異なる蛍光色素を用いて標識した。それぞれの組織

を支配するニューロンは、蛍光色素の逆行性軸索輸送により染色された。Wistar 系成熟ラットを塩酸メドトミジン 0.15 mg/kg+ミダゾラム 2 mg/kg+酒石酸ブトルフェール 2.5 mg/kg を腹腔内投与して麻酔した。唾液腺ニューロンの標識について、顎下を切開した後、左側顎下腺を剖出し、10% Dextran-Texas Red を 3-5 μ l 注入した。舌ニューロンについて、左側舌に 10% Dextran-fluorescein を 3-5 μ l 注入した。涙腺ニューロンについて、左側翼口蓋神経節を剖出し、10% Dextran-fluorescein を 0.5-1 μ l 注入した。色素注入 2 日後、4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定し、厚さ 50 μ m の切片を作製し、蛍光顕微鏡下でニューロンの分布を観察した。

電気生理学的実験

Wistar 系ラット(6-17 日齢) を用いた。SSN ニューロンの標識には、5-10%の Dextran-Texas Red-lysine (MW 3000) を左側唾液腺、または舌に注入した。新鮮脳スライス切片を作製し、標識された SSN 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。電流固定法で OXA をバス投与したときの膜電位変化を観察した。また電圧固定下で膜電位を-70 mV に固定しテロドトキシン存在下にて OXA をバス投与したときの電流変化を観察した。

唾液分泌測定

Wistar 系、雄性、ラットを用いた。以下の 4 種類の麻酔薬を使ったときの唾液分泌量の測定を試みた：①塩酸メドトミジン 0.15 mg/kg+ミダゾラム 2 mg/kg+酒石酸ブトルフェール 2.5 mg/kg)、腹腔内投与、②ケタミン 90mg/kg+キシラジン 10mg/kg)、腹腔内投与、③ウレタン(1mg/kg)、腹腔内投与、④イソフルラン(2-3%)。口角部の皮膚を切開し、顎下腺導管を剖出し、唾液分泌圧の記録のために、剖出した導管を切開し、唾液線側の導管へポリエチレンチューブを挿入した。口腔内に味溶液を注入するために、口腔側の導管には同様のポリエチレンチューブを挿入し固定した。顎下腺に挿入したチューブの一端は、咬筋の表面を横切って、頭頂部に出した。そのチューブを圧力トランスデューサー(TP-400T、NIHON KODEN)に接続し、トランスデューサーからのシグナルを増幅した(AP-601 G、NIHON KODEN)。増幅したシグナルは PowerLab8/30、(ADInstruments、Australia)に取り込み、専用分析ソフト(Chart5、ADInstruments)を用いて解析した。唾液分泌量は、ボトル内の液体圧の増加として測定された。マイクロシリンジを用いて 10 μ l の溶液を付加してキャリブレーションを行った。

4. 研究成果

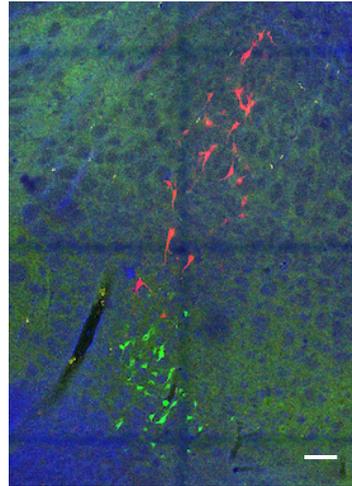
SSN ニューロンに神経連絡する LH ニューロンの分布

LH ニューロンを電気刺激あるいは光刺激したときの SSN ニューロンの応答や唾液分泌を調べるため、LH に電気刺激または光刺激するための光ファイバーを刺入する位置を特定する必要がある。そこで SSN ニューロンに投射する視床下部外側野ニューロンの分布を検討するために、SSN にフルオロゴールドを投与し、逆行性軸索輸送により LH ニューロンを染色した。標識ニューロンは LH において吻尾側方向に広範囲に渡って分布していた(Bregma-1.8 mm から-4.5 mm の間)。これらの結果から刺激プローブの刺入部位は、吻尾側 : Bregma -2.5 mm、外側 : 1.7 mm、深さ 8.5 mm に決定された。

SSNにおける標的組織ごとのニューロン分布

SSNには唾液腺、舌および涙腺を支配するニューロンの細胞体が存在する。SSNにChR2搭載AAVウイルスを投与するにあたり、唾液腺ニューロンをどれくらい特異的に標識できるか知る必要がある。しかし、それぞれの組織を支配するニューロンの分布を同時に調べた研究はない。そこで我々は唾液腺ニューロンと、舌あるいは涙腺ニューロンを同時に異なる蛍光色素を用いて染色したときの分布を観察した。唾液腺および舌ニューロンは混在し、涙腺ニューロンは唾液腺ニューロンの腹側部に分かれて分布することが明らかになった(図2)。通常、ウイルスの注入は頭頂部から注射針を刺入することにより行うが、この方法では唾液腺および舌ニューロンとともにウイルス感染することが考えられる。

A



B

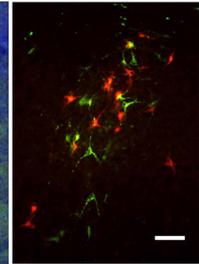


図2 SSNニューロンの標的組織ごとの分布

A、唾液腺ニューロン(赤)と涙腺ニューロン(緑)の分布。B、唾液腺ニューロン(赤)と舌ニューロン(緑)の分布。

舌ニューロンのOXに対する反応性

LHを電気刺激したとき、あるいは光刺激したときOXニューロンが活性化され、放出されたOXは唾液腺および舌ニューロンを刺激する可能性があるため、それぞれのニューロンに対するOXに対する反応性をパッチクランプ法で調べた。静止膜電位で300 nM OXAをバース投与すると多くの唾液腺および舌ニューロンは脱分極、または活動電位を発生した。テトロドトキシン存在下、保持電位-70 mVでOXAに対して、唾液腺および舌ニューロンともに用量依存性の内向き電流を

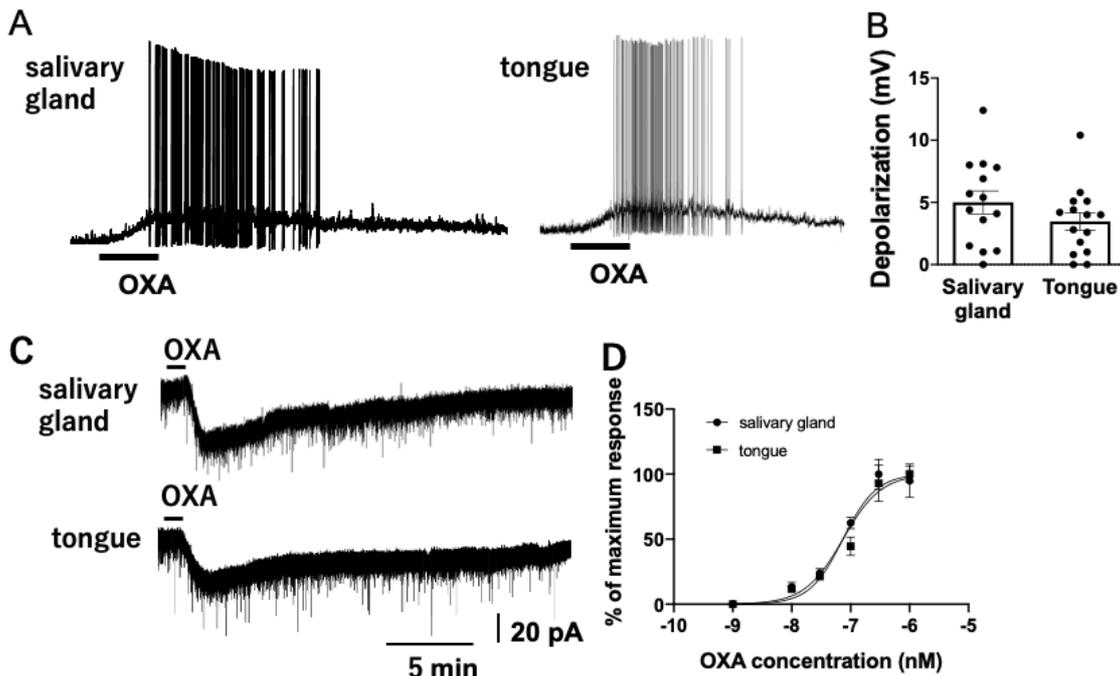


図3 唾液腺および舌ニューロンのOXに対する反応性

OXAのバース投与で唾液腺および舌ニューロンの活動電位(A)、内向き電流(C)を発生した例。B、唾液腺および舌ニューロンのOXAを投与した時の脱分極のピーク値。D、唾液腺および舌ニューロンのOXAのバース投与で発生した内向き電流のピーク値がプロットされた。

発生したが、その反応曲線は似ていた (図 3)。それぞれのニューロンの微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) は、NMDA 型および non-NMDA 型グルタミン酸受容体を介していたが、唾液腺ニューロンに対する mEPSC の平均の発生頻度は 3.81 ± 0.71 Hz ($n=12$) で舌ニューロンのもの 0.85 ± 0.1 Hz ($n=21$) よりも有意に速かった。しかし、それぞれの mEPSC の発生頻度は OXA 存在下で変化しなかった。従って、唾液腺および舌ニューロンの神経活動はともに OXA により促進されるが、その作用は主にシナプス前膜ではなくシナプス後膜の OX 受容体を介すると考えられた。

LH を電気刺激したときの唾液分泌

実験に先立ち、唾液分泌の測定系の確立を確かめるために、麻酔下ラットで舌を味覚刺激したときの唾液分泌を観察した。麻酔は塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルフェールを用いた。3-100 mM クエン酸で舌を刺激したが、唾液分泌は起こらなかった (図 4)。測定系に問題ないか確認するために、ピロカルピンを腹腔内投与したとき唾液分泌が起こるかどうかが検討した。その結果、唾液分泌が観察されたことから、測定系としては問題ないことが確認された。その他の種々麻酔薬、すなわちケタミン+キシラジン、ウレタン、およびイソフルランを試みたが、唾液分泌は観察されなかった。次に、イソフルラン麻酔下で LH に刺激電極を挿入し電気刺激 (100-200 μ A) したときの、唾液分泌が起こるかどうかが検討したが、唾液分泌は生じなかった。しかしピロカルピンの腹腔内投与で、唾液分泌が観察された。よって、唾液分泌は麻酔薬の影響を強力に受けることが考えられた。

まとめ

本研究ではラット LH を電気刺激または ChR2 を発現させて光刺激したときの唾液分泌を観察することを目指し、種々条件検討を行った。まず SSN の標的組織ごとのニューロンの分布を観察した。唾液腺ニューロンは舌ニューロンと混在し、涙腺ニューロンとは別れていた。舌ニューロンの OXA に対する反応性は唾液腺ニューロンのものと似ていた。LH を電気刺激または光刺激したとき、唾液腺ニューロンだけでなく、舌ニューロンも刺激される可能性が考えられるが、LH 刺激のアウトプットとしての唾液分泌を見る場合、舌ニューロンの活性化の影響は考慮する必要性は少ないと考えられる。一方、唾液分泌はいずれの種類の麻酔下でも起こらないことが明らかになった。このため LH 刺激したときの唾液分泌は測定できなかったが、逆に今後研究を進める上で重要な情報になったと考える。現在、非常に困難ではあるが自由行動下で LH を電気刺激したときの唾液分泌測定に挑戦している。

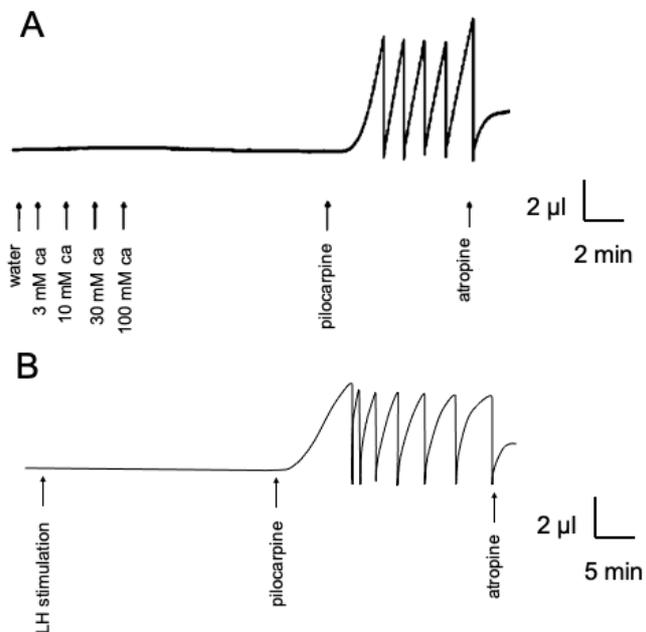


図 4 麻酔下ラットの唾液分泌

A、味覚刺激したとき唾液分泌の波形例。3-100 mM クエン酸を舌に投与したが、唾液分泌は観察されなかった。B、LH を電気刺激したとき唾液分泌の波形例。LH 刺激で唾液分泌は誘発されなかった。A および B ともに、ピロカルピンの腹腔内投与で唾液分泌が観察された。アトロピン投与によりピロカルピンで誘発された唾液分泌は抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Takamori M, Mitoh Y, Horie K, Egusa M, Miyawaki T, Yoshida R.	4. 巻 43
2. 論文標題 Sugar signals from oral glucose transporters elicit cephalic-phase insulin release in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Science	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-023-00875-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshihiro Mitoh, Kengo Horie, Tadasu Sato, Takehiro Yajima, Hiroyuki Ichikawa, Ryusuke Yoshida
2. 発表標題 Distribution of the superior salivatory nucleus neurons innervating the salivary glands, blood vessels of the tongue, and lacrimal glands and the responsivenesses to orexin
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yoshihiro Mitoh, Tadasu Sato, Takehiro Yajima, Kengo Horie, Hiroyuki Ichikawa, Ryusuke Yoshida
2. 発表標題 Effects of dopamine on the superior salivatory nucleus neurons innervating the salivary glands in rats
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 兵藤藍子、三上彩可、堀江謙吾、美藤純弘、吉田竜介
2. 発表標題 唾液緩衝能が味覚に及ぼす影響について
3. 学会等名 日本味と匂学会第57回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高盛充仁、美藤純弘、堀江謙吾、吉田竜介
2. 発表標題 糖刺激による頭相インスリン分泌の誘発
3. 学会等名 日本味と匂学会第57回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山瀬裕子、黄海、堀江謙吾、美藤純弘、江草正彦、吉田竜介
2. 発表標題 甘味・うま味受容体が有機酸の光学異性体の識別に関与している
3. 学会等名 日本味と匂学会第57回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wang Kuanyu、美藤純弘、吉田竜介
2. 発表標題 CCN expression in the murine taste bud does not confer essential roles in taste perception
3. 学会等名 日本味と匂学会第57回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田竜介、堀江謙吾、美藤純弘
2. 発表標題 味蕾内シナプス欠損マウスの機能解析
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔生理学分野ホームページ
<https://www.okayama-u.ac.jp/user/oralphys/OralPhysiology.html>

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	向井 康敬 (Mukai Yasutaka) (30908124)	名古屋大学・環境医学研究所・特任助教 (13901)	

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