

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463192

研究課題名(和文) 超高齢社会に貢献する風味形成機構解明への基礎的アプローチ

研究課題名(英文) Basic approach to elucidation of flavor formation mechanism which contribute to super aged society

研究代表者

溝口 尚子 (Mizoguchi, Naoko)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：00548919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：超高齢社会のわが国において、高次脳機能障害の合併症等で摂食機能障害患者が増加している。「食」は生命維持だけでなく、QOLやリハビリテーションの意欲維持にも大切である。本研究課題の「風味」の中核は味覚と嗅覚であるが、その統合機構については不明な点が多い。そこで、味神経である鼓索神経と嗅覚経路である主嗅球を電気刺激したときの、大脳皮質一次感覚野および周辺皮質の応答性について調べた。単独刺激した場合には興奮が伝播する領域は、ほぼ各一次感覚野に留まったが、同時に刺激すると無顆粒島皮質(AI)で応答変化率に増加が認められたため、味覚と嗅覚の統合の一部はAIで行われていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Patients having feeding/swallowing difficulty (dysphagia) have been increased with the advancement of an aging society. "Enjoy eating" is important not only for maintaining life but also for preserving quality of life and motivation for rehabilitation of dysphagia. The core of flavor is gustatory information and olfaction. However, it has been unclear how and where two kind of senses are integrated. To address this issue, we examined the spatiotemporal dynamics of excitatory propagation in cerebral cortex induced by simultaneous electrical stimulation of the chorda tympani nerve (CT) and main olfactory bulb (mOB). We performed in vivo optical imaging with a voltage sensitive dye. The primary sensory areas responded to each single stimulus. The simultaneous stimulation to mOB and CT increased the excitation in the AI, addition to response of each primary sensory cortices. This result suggest that partial of the gustatory and olfactory information was integrated in the AI.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脳神経科学 光学計測 島皮質 味覚 嗅覚

1. 研究開始当初の背景

全世代を通じて「食」は生命維持に欠かせない要素であり、QOL を高める上でも重要である。とくに日本は現在、65 歳以上の高齢者人口が総人口の 21% を超える超高齢社会である。高齢者の増加に伴い、認知症や高次脳機能障害などの合併症として食べる機能に障害を持つ摂食機能障害患者がますます増加していくことは否めない。対応できる医療や介護などの環境を改善することはもとより、予防や理解の助けとなる知識の蓄積が益々必要と考えられる。

「食」が QOL の維持向上に重要である理由は、食後の満腹感に限らず「おいしさ」すなわち「風味」を味わうことによる満足感にある。実際わが国では“年をとっても口から食べて満足感を得たい”という要望から美味しい介護食の開発が盛んである。「風味」の形成には“味・匂い・舌触り”とくに味とニオイの情報処理が重要と考えられている。

先に述べた摂食機能障害への対応にはリハビリテーションが持続的に行われることが多いためモチベーションの持続も欠かせない。これには食べ物を口から摂取して「おいしい」と感じる事が大切である。経口摂取が困難になっても、食べて美味しかった記憶があると、もう一度口から食べたいという意欲につながる。そして、たった一口でも風味を感じることが、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。一日一口でも口腔機能、消化器系のはたらきの維持には効果がある。一口食べられたことが自信につながるケースもある。「おいしさ(風味)」に関わる知見は、このような症例報告もしくは心理学などの分野で食行動の観点からのものが多い。

一方、中枢神経系において「おいしさ」の味覚と嗅覚の統合機構については未だ不明な点が多い。基礎医学の見地からは、Gordon M. Shepherd らが「Neurogastronomy」なる概念を提唱しており、食に関わる感覚を含めた神経機構の解明は今後の発展が期待される。しかし、現時点では、食に関わる五感「味覚」「嗅覚」など独立したテーマとして研究されることが多いため、実際の食事時における感覚統合の脳内神経機構には未知の部分が多く、実証すべき課題が多く残されている。

味覚と嗅覚の主な神経経路は、異なる経路をたどって末梢から大脳皮質に至ると考えられている。味覚伝導路は、口腔内の味蕾から鼓索神経などの味神経を通じて視床を介し、大脳皮質一次味覚野(島皮質味覚野)に入力している。一方の嗅覚伝導路は、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)などの大脳皮質に至る。両感覚の統合領域はこれまで眼窩前頭皮質(大脳皮質二次感覚野)と考えられてきた。

さらに、解剖学的には大脳皮質一次味覚野

である島皮質と梨状皮質は双方向性に投射があることが明らかになっている。無顆粒島皮質後方から不全顆粒島皮質や梨状皮質に順行性の投射がある(Shi CJ and Cassell MD, 1998)。また、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 et al., 2000)。

これらの結果は、島皮質では味覚情報だけでなく嗅覚情報も処理していることを示唆するものであるが、生体における島皮質と梨状皮質に代表される一次感覚野間の相互作用については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、風味を形成するために欠かせない味覚と嗅覚の脳内統合機構を明らかにする目的で行った。とくに注目した領域は大脳皮質に存在する味覚野であり嗅覚情報を含めた多様な情報を統合する領域の1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である。この二つの領域は近接して存在するが、一度に観察するには方法が限られる。そこで、げっ歯類(マウスやラット)の *in vivo* 標本を用いて刺激に対する応答を時間・空間的解像度が高い利点を有する光学計測法によって観察し解析を行った。

味覚および嗅覚経路への刺激を行ったときの皮質応答を観察したが、具体的な実験課題については以下に記す。

(1) 全脳動物標本を作製し、味覚の末梢神経のひとつである鼓索神経とニオイに関する情報を梨状皮質に伝達する外側嗅索および主嗅球に刺激電極を留置し、それぞれの応答を測定するために適正な刺激条件を確立するとともに、入力タイミングによって変化する島皮質と梨状皮質および周辺皮質における応答性を観察し解析を行う。

(2) 実際の味(甘味や苦味などの液体)刺激を口腔内に呈示し皮質応答を観察する。ニオイ刺激は鼻腔から呈示し同様に観察する。それぞれの単独刺激呈示に対する応答記録を確立した際は同一個体に同時呈示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の応答性の相違を観察する。

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き行われた。

本研究においては先行研究を鑑み、第一選択としてラットを使用した膜電位計測を行った。しかしニオイ呈示に対する応答記録法を確立するにあたり、ラットを用いた膜電位計測とマウスを用いたフラビン蛋白蛍光変

化計測を同時進行で実施した。主な工夫については、本研究における成果と考えられるため、方法または結果の欄に適宜記載した。

(1) 全脳動物標本の作製

膜電位計測用：

Sprague-Dawley 系ラット（雄性，三協ラボサービス）5-6 週齢を用いた。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後，脳定位固定装置（ナリシゲ社製）に，頭頂部から固定した。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開窓した。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 90 分間負荷し，色素を定着させ観察野とした（Mizoguchi et al., 2011）。

フラビン計測用：

C57BL/6NCrSlc マウス（雄性，三協ラボサービス）8-9 週齢を用いた。全身麻酔としてウレタン(1.6 g/kg)を腹腔内投与した後脳定位固定装置（ナリシゲ社製）に，頭頂部から固定した。本研究においては，ニオイ呈示に対してフラビン計測を行った際，気管挿管の有無で応答強度が異なったため，気管挿管を行わずに計測を行うこととした。そして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。マウスは頭蓋骨が薄いため，頭蓋骨を除去せずとも脳を透過して見ることができた。フラビン計測は新潟大学研究所の術式を基本として実施した。味呈示に関しても引き続き検討中である。

全脳動物標本作成後，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，ブ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。

(2) 刺激条件の確立

電気刺激：主嗅球および外側嗅索にタングステン電極（UEWMECSE0N1M, FHC, Bowdoin, ME, USA），鼓索神経線維束にはエナメルワイヤー（直径：100 μm ，多摩川電線，東京）製双極電極を設置し刺激電極とした。刺激には電気刺激装置（STG2008, Multi Channel Systems）使用し電圧刺激（50 Hz, 5 trains）を行った。

味およびニオイ呈示：全脳標本個体を測定装置に設置後，ニオイサンプルと空気の流入用チューブ付き鼻マスクをかぶせ，Amyl acetate（バナナのニオイ）などを刺激として呈示した。濃度および呈示時間，インターバルについて数パターン検討した。マウスを使用したフラビン蛋白の応答計測に成功したので，詳細は結果の欄に記述した。

(3) 刺激に対する応答部位の観察

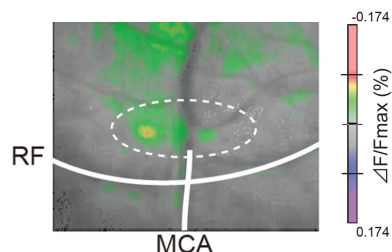
それぞれ単独刺激に対する応答部位を確認し，適正な刺激条件を確立した。その後，入力タイミングによって，島皮質や梨状皮質および周辺の皮質領域における応答性が変化するか否か観察した。

4. 研究成果

(1) 主嗅球，外側嗅索および鼓索神経に電気刺激を行った場合に得られる皮質応答については，ラットで作製した全脳動物標本に膜電位計測を行うことで観察することが出来た（～）。

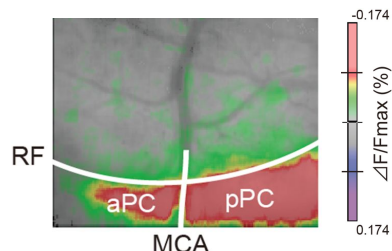
刺激条件については，主嗅球および外側嗅索には同心円電極に比べて細いタングステン電極（UEWMECSE0N1M, FHC, Bowdoin, ME, USA）を使用した。組織を圧迫・損傷を軽減することができたため一定の応答が得られた。鼓索神経線維については刺激部位を鼓室付近とし，線維の損傷を軽減するためエナメルワイヤー製双極電極に接触した部分と組織を樹脂で分離および固定した。

鼓索神経を単独で電気刺激した場合には，顆粒皮質と不全顆粒皮質を中心とした島皮質（皮質味覚野）に反応が得られ，梨状皮質には反応は認められなかった（図 1）。



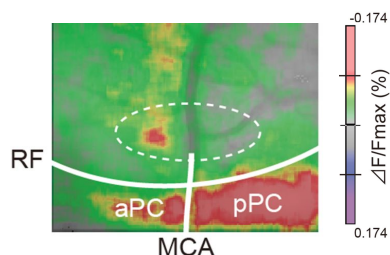
(図 1) 鼓索神経を電気刺激することで誘発される大脳皮質表層での興奮伝播。皮質味覚野（GC, 点線内部）を中心に興奮が伝播している。嗅裂（RF），中大脳動脈（MCA）。反応は疑似カラー表示で示した。

嗅覚情報は主嗅球から主に外側嗅索を経て梨状皮質へ伝わると考えられているため，外側嗅索および主嗅球への電気刺激を実施した。主嗅球を電気刺激した場合には，主に梨状皮質に反応が得られた（図 2）。島皮質では皮質味覚野とは異なると考えられている無顆粒皮質に弱い反応が認められた他はほとんど反応を認めなかった。外側嗅索に電気刺激した場合もほぼ同様の結果を得た。



(図2)主嗅球(mOB)を電気刺激することで生じる大脳皮質表層での興奮伝播。梨状皮質(PC)を中心に興奮が伝播している。

鼓索神経および主嗅球に対して同時に電気刺激を行った場合の結果を示す(図3)。一次感覚野である皮質味覚野および梨状皮質には有意な応答強度の増加は認められなかった。しかし、島皮質の無顆粒皮質においては単独刺激時と比較して応答強度が増加する傾向が認められた。

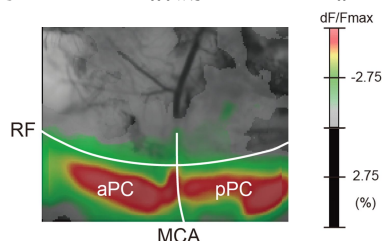


(図3)鼓索神経とmOBを同時に電気刺激した場合に生じる大脳皮質表層での興奮伝播。一次感覚野(GCおよびPC)における応答強度は単独刺激時とほぼ同様であったが、AIでは応答強度が増加した。

以上(~)のように、各部位を単独刺激した場合に興奮が伝播する領域は、ほぼ各一次感覚野(皮質味覚野または梨状皮質)に留まり、興奮が伝播した領域に重なりはほとんど認められなかった。しかし、同時に刺激した場合には無顆粒島皮質で応答変化率に増加が認められたため、味覚と嗅覚の統合の一部は無顆粒島皮質で行われていることが示唆された。

(2)電気刺激による実験の次の段階として、実際の味(甘味や苦味などの液体)およびニオイ(Amyl acetate; バナナのニオイなどを使用)を刺激として用いる実験に着手した。これまでのところ、膜電位と同様に神経活動を反映すると考えられている内因性蛍光タンパクであるフラビンの応答変化をマウス全脳動物標本で計測することによって、ニオイ呈示に対する応答で以下の結果を得た。

鼻腔からのニオイ呈示に対し、嗅覚伝導路を電気刺激した場合と同様、梨状皮質が主に応答を示した(図4)。Sugaiら(2005)が報告しているように、ニオイ濃度依存的に前方から後方へと応答領域が拡大していく傾向がフラビン計測によっても認められた。



(図4)鼻腔から1% Amyl acetateを呈示した時の応答部位。マウス *in vivo* 標本によるフラビン計測でPCに反応が生じることが認められた。

現在得られている味呈示に対する応答は、ニオイ呈示時と比較して弱い。適刺激条件等に関することから引き続き検討を行っている。

これらの結果と他の実験条件を加味し、味刺激とニオイ刺激を同一個体に適用し化学感覚の情報統合機構を明らかにすることが今後の課題である。

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4件)

Oikawa S, Kai Y, Tsuda M, Ohata H, Mano A, Mizoguchi N, Sugama S, Nemoto T, Suzuki K, Kurabayashi A, Muramoto K, Kaneda M, Kakinuma Y. Non-neuronal cardiac cholinergic system influences CNS via the vagus nerve to acquire a stress-refractory propensity. **Clin Sci (Lond)**. 査読有, 130(21), 2016, 1913 - 1928. DOI: 10.1042/CS20160277

Mizoguchi N, Kobayashi M, Muramoto K. Integration of olfactory and gustatory chemosignals in the insular cortex. **J Oral Biosci**. 査読有, 58(3), 2016, 81 - 84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2016.03.002>

Fujita S, Mizoguchi N, Aoki R, Cui Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Cytoarchitecture-Dependent Decrease in Propagation Velocity of Cortical Spreading Depression in the Rat Insular Cortex Revealed by Optical Imaging. **Cereb Cortex**. 査読有, 26(4), 2016, 1580 - 1589. DOI: 10.1093/cercor/bhu336

溝口 尚子, 久保 英範, 村本 和世. 鼓索神経・嗅球への電気刺激に対する一次味覚野および周辺領域における応答変化. 日本味と匂学会誌, 査読有, 22 巻 3号, 2015, pp. 279 - 282.

[学会発表](計4件)

Mizoguchi N, Kobayashi M, Muramoto K. Modification of the gustatory responses in rat insular cortex by the olfactory stimulation. Society for Neuroscience 46th annual meeting, 2016年11月12 - 16日, カリフォルニア州サンディエゴ(米国)

溝口 尚子, 小林 真之, 村本 和世.
味覚と嗅覚の皮質内情報統合機構, The
intracortical integration mechanism for
information of odor and taste, 第 58 回歯科
基礎医学会学術大会・総会, 2016 年 8 月
24 - 26 日, 札幌コンベンションセンター
(北海道・札幌市)

Mizoguchi N, Kobayashi M, Muramoto K.
The gustatory response is accelerated by the
olfactory information in rat insular cortex.
第 17 回嗅覚・味覚国際シンポジウム
(International Symposium on Olfaction and
Taste, ISOT2016), 2016 年 6 月 5 - 9 日,
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

溝口 尚子, 久保 英範, 村本 和世. 鼓
索神経・嗅球への電気刺激に対する一次
味覚野および周辺領域における応答変化.
日本味と匂学会第 49 回大会, 2015 年 9
月 24 - 26 日, じゅうろくプラザ(岐阜
県・岐阜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 尚子 (MIZOGUCHI, Naoko)
明海大学・歯学部・助教
研究者番号: 00548919

(2) 研究分担者

小林 真之 (KOBAYASHI, Masayuki)
日本大学・歯学部・教授

研究者番号: 00300830

(3) 連携研究者

村本 和世 (MURAMOTO, Kazuyo)
明海大学・歯学部・教授
研究者番号: 10301798

(4) 研究協力者

なし