

氏名	足立 れいみ
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第7030号
学位授与の日付	令和6年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	マウスを用いた味覚唾液反射機構の解明：中枢神経系の c-Fos 発現
論文審査委員	沢 禎彦 教授      宮脇 卓也 教授      稲葉 裕明 准教授

### 学位論文内容の要旨

味刺激により唾液分泌が促進される味覚唾液反射が知られているが、その神経メカニズムについてはよくわかっていない。味覚唾液反射の神経メカニズムを調べるため、まず、麻酔下ラットを用いて味刺激後の唾液分泌量の測定を行った。ラットの顎下腺管にカニューレを挿入し、圧力感知トランスデューサーに接続して、トランスデューサーからのシグナルを増幅した。増幅したシグナルは PowerLab8/30 に取り込み、専用分析ソフトを用いて解析した。味溶液としては 3-100 mM のクエン酸および塩酸を使用した。麻酔は①塩酸メedetミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルフェール、腹腔内投与②ケタミン+キシラジン、腹腔内投与③ウレタン、腹腔内投与④イソフルランを用いた。いずれの場合も、麻酔下では味刺激による唾液分泌は認められなかった。唾液分泌促進薬であるピロカルピンを腹腔内注射したところ唾液分泌を認め、この唾液分泌は唾液線のムスカリン性アセチルコリン受容体の拮抗薬であるアトロピンの投与によって抑制された。したがって、唾液腺や測定系に問題は無いことから、麻酔下では味覚唾液反射は生じないことが示唆された。この結果を受けて自由行動下で測定を試みたが、味刺激による唾液分泌と舌の動きによる唾液分泌と判別することが困難であった。そこで、味刺激により上唾液核ニューロンが活性化されると想定されることから、これを c-Fos 免疫組織化学法により追及した。8-9 週齢の野生型マウス(C57BL/6J, WT), TRPV 全身ノックアウトマウス(TRPV1<sup>-/-</sup>, TRPV1-KO), 味蕾内で SNAP25 と全身で TRPV1 を欠損したマウス(K5<sup>cre</sup>;SNAP25<sup>flox/flox</sup>;TRPV1<sup>-/-</sup>, SNAP25;TRPV1-dKO)を使用した。舌の動きを止めるためにイソフルラン麻酔下で舌下神経を剖出し、両側の舌下神経を切断した。露出した気管にカニューレを挿入して呼吸を確保した。マウスの動きを制限するため、30 mL のプラスチックシリンジの底をくり抜き空洞にしたシリンジの中にマウスを入れて頭部を露出させ、イヤーパーを取り付け脳定位固定装置に固定した。舌は舌下面に接着剤で固定された糸で牽引した。覚醒後、舌に味溶液(10mM クエン酸、100 mM クエン酸、100 mM 塩酸、100 mM L-乳酸、100 mM D-乳酸)を 500 μL 投与し、1 分後に脱イオン水にて洗浄し、4 分間休ませた。この操作を 12 回繰り返す。最後の刺激が完了してから 2 時間後に塩酸メedetミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルフェールを腹腔内に投与し、20%ホルマリン溶液で灌流固定を行い、脳を取り出した。その後、孤束核および上唾液核を含む延髄の冠状面切片 (50μm) を作製した。c-Fos 免疫染色後に共焦点顕微鏡を用いて、片側の上唾液核および孤束核の c-Fos 陽性細胞をカウントした。遺伝子および試験溶液の濃度の影響は、一元配置分散分析 (ANOVA) およびボンフェローニ補正を用いたポストホック t 検定によって分析した。p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。酸の種類によ

て上唾液核の c-Fos 陽性細胞の発現数が変化するかどうか調べた結果、100 mM クエン酸で刺激した際の c-Fos 陽性細胞数は  $36 \pm 14.0$  で最も多く、100 mM D-乳酸で  $4 \pm 3.7$  と最も少なかった。次に濃度の異なるクエン酸により味刺激を行った際の WT マウス、TRPV1-KO マウスおよび SNAP25;TRPV1-dKO マウスの c-Fos 発現を調べた。WT マウスにおいてクエン酸刺激時の c-Fos 陽性細胞数は濃度に依存して増加した。TRPV1KO マウスでも味刺激の濃度が高くなるにつれて c-Fos 陽性細胞数は増加したが、10 mM クエン酸と 100 mM クエン酸刺激時の c-Fos 陽性細胞数は WT マウスと比較して有意に少なく、SNAP25;TRPV1-dKO マウスでは上唾液核および孤束核ともに c-Fos 陽性細胞はほとんど観察されなかった。TRPV1-KO マウスおよび SNAP25;TRPV1-dKO マウスの上唾液核における c-Fos 陽性細胞数は、WT マウスと比較して有意に少なかった。これらの結果から舌を酸味刺激したときの唾液分泌には、味覚神経よりも三叉神経系を介する経路が大きく関与していることが示唆された。また、カルボキシル基が多い、pKa 値が低い、炭素数が多い酸ほど  $H^+$  を放出する効率が高いことがわかっており、これが酸の種類による強度の違いに関連していると思われる。

## 論文審査結果の要旨

【緒言】最近、味蕾3型細胞の酸応答イオンチャンネル（OTOP1）は酸味受容体であること、自由神経終末イオンチャンネル（TRPV1）が酸応答することが示された。本研究は、三叉神経 TRPV1 の酸応答が三叉神経節経由で上唾液核に入力し、OTOP1 のような特殊感覚経路と同様に唾液分泌に関係する、という仮説を立証するものである。

【材料・方法】Wistar 系ラット舌にクエン酸刺激を行って顎下腺導管の唾液分泌圧を解析した。一般体性感覚酸応答 KO として TRPV1KO、味蕾の酸味の特殊感覚 cKO としてシナプス伝達分子 SNAP25 cKO、これに TRPV1KO とのダブル KO（SNAP25-TRPV1-dKO）を用いた。脳定位固定装置で頭を固定し舌に複数回の酸味刺激を行った後、延髄の冠状面切片を 50 $\mu$ m 厚で作製して c-Fos タンパクの免疫染色を行なった。共焦点顕微鏡で上唾液核の c-Fos 陽性細胞数を計測し、酸刺激に関与する唾液分泌経路の活性化神経細胞数として統計学的解析を行い、味覚唾液反射を評価した。

【結果】ラットは麻酔下で酸刺激による唾液分泌を示さなかった。酸刺激した WT の上唾液核の c-Fos 陽性細胞数は酸濃度依存性に増加し、クエン酸が HCL/L-lactic acid/D-lactic acid より多かった。酸刺激マウス上唾液核 c-Fos 陽性細胞数については、TRPV1-KO は WT より少ないが、SNAP25-TRPV1-dKO と比較して有意差が無かった。

【考察】唾液分泌には麻酔薬の抗コリン作用が影響することが考えられた。酸応答依存性 cFos 陽性細胞数は、一般体性感覚 TRPV1 の KO では WT よりも少なかったことから、酸刺激による唾液反射に一般体性感覚が関与することが示された。しかし興味深いことに TRPV1 および味蕾の特殊感覚（酸味応答）のダブル KO と TRPV1 のみの KO との間で差がなく、酸刺激による唾液反射に特殊感覚の酸味応答は貢献しないことが示唆された。また材料の水素イオン濃度は影響しなかったため、酸味は酸の分子構造が寄与すると考えられた。

本研究は、酸味による唾液分泌には一般体性感覚が寄与すること、特殊感覚経路はむしろ関与しないという非常にユニークな新しい考察を示すもので、味覚唾液反射の機構を紐解く上で非常に重要な知見である。よって審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。