

## カエル舌咽神経の Na 塩味覚刺激に対する相動性応答の性質

及川 貴子, 横瀬 隆夫\*, 奥田・赤羽 和久\*\*, 北田 泰之\*\*

岩手医科大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任: 久保田 稔 教授)

岩手医科大学歯学部歯科補綴学第一講座\*

(主任: 鈴木 哲也 教授)

岩手医科大学歯学部口腔生理学講座\*\*

(主任: 北田 泰之 教授)

(受付: 2007年10月29日)

(受理: 2007年12月5日)

**Abstract** : The frog glossopharyngeal nerve responds transiently to relatively high concentrations of Na-salts after rinsing the tongue with 1 mM NaCl. In the present study, the properties of the phasic responses of the frog glossopharyngeal nerve to Na-salts were investigated. Cross-adaptation experiments between NaCl and LiCl indicate that NaCl and LiCl were very similar to each other. This is in agreement with the fact that LiCl also gives rise to a good salty in humans. The order of effectiveness of Na-salts was  $\text{NaCl} \approx \text{Na acetate (NaAc)} > \text{Na gluconate (NaGlu)}$ . We found that gluconate<sup>-</sup> weakly inhibited the phasic response to Na<sup>+</sup>. The modulation by gluconate<sup>-</sup> was specific to the phasic response to Na<sup>+</sup>, because NaAc and NaGlu have a similar effect on phasic responses to quinine-HCl. Amiloride, an epithelial sodium channel broker, did not affect phasic responses to NaCl at 1.5 min after application of amiloride to the tongue, suggesting that amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channels in the apical membrane are not involved in phasic responses to Na-salts in the frog glossopharyngeal nerve. Unitary impulses from single sensory units were recorded using the suction electrode method (Kitada, 1978). The latency between onset of stimulation and appearance of the first impulses elicited by 100 mM NaCl was average 100 msec. Since the time required for antidromic conduction from the impulse initiation site to the recording site was very short, about 2.4 msec (Sato *et al.*, 1987), it was suggested that the latency obtained here was close to the time between the arrival of the chemical stimulus to the apical membrane and the first impulse in taste fibers. The long latency of impulses in responses to NaCl suggests that cation-channels in the apical membrane are not involved in NaCl taste reception responsible for the phasic response.

---

Properties of phasic responses of the frog glossopharyngeal nerve to Na-salts taste stimuli  
Takako OIKAWA, Takao YOKOSE\*, Kazuhisa OKUDA-AKABANE\*\* & Yasuyuki KITADA\*\*  
Department of Operative Dentistry and Endodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University. (Chief : Prof. Minoru KUBOTA)

\*Department of Removable Prosthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University (Chief : Prof. Tetsuya SUZUKI)

\*\*Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Iwate Medical University. (Chief : Prof. Yasuyuki KITADA)

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

**Keyword :** taste reception, phasic responses to Na-salts, glossopharyngeal nerve, frog

## 緒 言

ヒトは食塩 (NaCl) と他の塩化物 (KCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub> および MgCl<sub>2</sub>) の味を明確に区別できる。このことは Na<sup>+</sup> を他の陽イオンと区別する受容機構が味細胞に存在し、塩味を中枢に伝える神経線維が存在することを意味する。実際、ラットの鼓索神経線維には他の塩化物溶液に比べ NaCl 溶液に特に鋭敏に応答する神経線維が存在する<sup>1)</sup>。上皮性 Na<sup>+</sup> チャンネルブロッカーのアミロライド (amiloride) が NaCl 神経応答を抑制することが見出され、塩味の受容に受容膜の上皮性 Na<sup>+</sup> チャンネルを介する pathway が存在することが提唱されてきた<sup>2)</sup>。しかし、amiloride はラット鼓索神経の NaCl 応答の 50% まで抑制するが、抑制されずに残る応答もある<sup>3)</sup>。前者は amiloride 感受性 NaCl 応答、後者は amiloride 非感受性 NaCl 応答と呼ばれている。また、ラット舌咽神経の NaCl 応答は amiloride によって抑制されない amiloride 非感受性 NaCl 応答であった<sup>4)</sup>。このように、amiloride で抑制される上皮性 Na<sup>+</sup> チャンネルが存在するとしても amiloride 非感受性 NaCl 応答はどのような受容機構を介する応答なのかよく分かっていなかった。最近、amiloride 非感受性 NaCl 応答はカプサイシン受容体である vanilloid receptor-1 (VR-1) 活性によって開口するイオンチャンネルを介する応答であることが報告された<sup>5)</sup>。VR-1 を介するイオンチャンネルは現在、transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1) チャンネルと呼ばれている。TRPV1 チャンネルは非選択性陽イオンチャンネルであり、Na<sup>+</sup> 以外の無機陽イオンも透過するので amiloride 非感受性 NaCl 応答、KCl 応答、NH<sub>4</sub>Cl 応答はこの TRPV1 チャンネルの pathway を用いることが提唱された<sup>5)</sup>。このように無機陽イオンは受容

膜のイオンチャンネルを通り、味細胞を興奮させ、味覚神経線維にインパルスが発生させると考えられている。即ち、amiloride 感受性 Na<sup>+</sup> チャンネルでは Na<sup>+</sup> のみが通過し、そして amiloride 非感受性の TRPV1 チャンネルでは Na<sup>+</sup> を含む無機陽イオンが通過し、味細胞を脱分極させ、電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルを開き、外部からの Ca<sup>2+</sup> が味細胞内へ流入し、細胞内 Ca<sup>2+</sup> の上昇により味細胞から神経伝達物質が放出され、味覚神経線維末端にインパルスが発生する<sup>2)</sup>。

塩化物の中で NaCl はヒトに塩味を呈し、KCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub> および MgCl<sub>2</sub> は塩味を呈しないので、塩味は Cl<sup>-</sup> でなく Na<sup>+</sup> によって引き起こされる。Na 塩の中で、NaCl は Na acetate (NaAc) や Na gluconate (NaGlu) よりも塩味が強く、陰イオンの違いで塩味の強さが変わる。陰イオンの異なる Na 塩刺激で鼓索神経の応答の大きさは異なるので、陰イオンは味細胞レベルで塩味の強さを修飾すると考えられている。このような陰イオンの作用は味細胞と味細胞のタイトジャンクションを通過できる小さな Cl<sup>-</sup> と通過できない大きな陰イオン (acetate<sup>-</sup> や gluconate<sup>-</sup>) が Na<sup>+</sup> 応答に対し異なる修飾作用を及ぼすとされ、paracellular pathway 説が提唱された<sup>6-8)</sup>。即ち、大きな陰イオンは味細胞間のタイトジャンクションを通過できず、Na<sup>+</sup> のみが通過するので味細胞の外側 (間質液) は陽電荷が多くなって電位が高くなる。その結果、味細胞内の電位は過分極方向へ移り、味細胞の興奮は減少する。しかし、Cl<sup>-</sup> は味細胞間のタイトジャンクションを通過でき、味細胞内の電位を過分極方向へ動かさない。このように、paracellular pathway 説は Na 塩の陰イオンの違いによる Na 塩応答の大きさを説明する有力な説である。

カエル舌の味細胞は舌咽神経によって支配されている。カエル舌に NaCl 刺激を与えると舌咽神経から一過性の相動性応答,あるいは相動性応答とそれに続く持続性の緊張性応答が記録される。相動性応答は味刺激が持続すると,順応が起こり,応答の大きさが急速に減少する。一方,緊張性応答は順応が遅く,味刺激の間中,応答が持続する。カエル舌咽神経の相動性応答と緊張性応答は異なる神経線維の興奮によって生じる。しかしながら,このような順応がどのようなメカニズムで起こるのか,ほとんど分かっていない。カエル舌咽神経の NaCl 緊張性応答は,ラット鼓索神経と違って amiloride によって抑制されず, amiloride 非感受性応答であった<sup>9)</sup>。また, Ca 塩刺激も舌咽神経に緊張性応答を引き起こすが, Ca<sup>2+</sup> 応答は選択的に舌表面の 0.1% pronase 処理で消失するので, Ca<sup>2+</sup> 応答と Na<sup>+</sup> 応答はそれぞれ異なる Ca<sup>2+</sup> 受容部位と Na<sup>+</sup> 受容部位に作用することが分かった<sup>10-11)</sup>。しかし,これらの受容部位がイオンチャンネルなのか受容体なのか分かっていない。このように異なる Ca<sup>2+</sup> 受容部位と Na<sup>+</sup> 受容部位に対し陰イオンは全く逆の修飾作用を示した<sup>12)</sup>。小さな Cl<sup>-</sup> は Ca<sup>2+</sup> 受容部位に対し抑制的に作用し, CaCl<sub>2</sub> 応答の大きさは大きな陰イオンを持つ CaSO<sub>4</sub> 応答の大きさより小さかった。これは paracellular pathway 説では説明できない。逆に Na 塩の興奮効果の順序は NaCl > Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> であった。このことから,陰イオンの修飾作用は異なる受容部位には異なったように作用することが提唱された<sup>12)</sup>。

上述のように,カエル舌咽神経の Na<sup>+</sup> 緊張性応答の性質はよく調べられてきたが, Na<sup>+</sup> 相動性応答の性質はほとんど調べられてこなかった。これまでカエル舌咽神経の相動性応答を示す単一神経線維は種々の塩化物,苦味物質および酸溶液に反応することが報告<sup>13)</sup>されているので,これらの単一神経線維が味質の情報として中枢へ伝えることはない。カエル舌咽神経の相動性応答は舌下神経に反射性応答を引き起こすので<sup>14-16)</sup>, 忌避のシグナルと考えられる。

横瀬ら<sup>17)</sup>はカエル舌咽神経の NaCl 刺激の相動性応答は他の味物質刺激のそれとは受容部位が異なっており, Na<sup>+</sup> に特異な受容部位を介する応答であることを示した。そこで,本研究では味覚における末梢機構として Na<sup>+</sup> 受容機構を探る目的で,カエル舌咽神経の Na<sup>+</sup> 相動性応答の性質を調べた。ヒトの味覚において, LiCl と NaCl は類似した味を呈するので<sup>18)</sup>, 本研究ではカエル舌咽神経の相動性応答において LiCl 刺激と NaCl 刺激は類似した刺激であるかどうか調べた。次に, Na<sup>+</sup> 相動性応答に対する陰イオンの効果および Na<sup>+</sup> 相動性応答が amiloride 感受性であるかどうかを調べた。また,味細胞の先端受容膜のイオンチャンネルを介する味覚受容では味細胞を流れる電流により脱分極が起こるので,味覚刺激後短い時間でシナプス伝達が起こるものと思われる。一方,受容体を介する味覚受容ではセカンドメッセンジャーが細胞内を拡散する時間が必要になる。そこで, Na<sup>+</sup> 相動性応答の刺激開始からの神経応答開始までの潜時を調べ, Na<sup>+</sup> 相動性応答にセカンドメッセンジャーが関与する可能性について研究を行った。

## 方 法

実験にはウシガエル (*Rana catesbeiana*, 体重 200-400 g) を用いた。動物の両側リンパ嚢に 25% ウレタン (3 g/kg body wt.) を投与し麻酔した。麻酔後,動物を仰臥位にし,口腔から舌を引き出し,チェンバー内のソフトプレート上にピンで固定した。

本研究は岩手医科大学実験動物委員会の承認 (No. 375) を受けて行った。

### 1. 神経応答の記録

#### 1) 神経束からの応答

一側の舌咽神経を周囲組織から露出させ,舌骨上部で切断した。舌咽神経の末梢端を記録用銀電極上に置いた。舌の一部を銀板に接触させ,銀板を不関電極とした。神経の乾燥を防ぐため電極上の神経周囲をワセリンと流動パラフィンの混合物で覆った。神経活動は AC 増幅

器 (VC-10; 日本光電) で増幅し, ペンレコーダー (レクチコーダ RJC-4124; 日本光電) により積分応答 (時定数=0.5 sec) として記録した。

## 2) 吸引電極法による感覚単位の応答

単一神経線維は枝分かれし, 通常数個の茸状乳頭を支配する。カエル茸状乳頭は軟らかいので, 1 個の茸状乳頭を吸引電極内に吸引できる。電極周囲の茸状乳頭に刺激液を流し, 味覚刺激により興奮した神経線維からの逆行性に伝導するインパルス吸引電極法<sup>19)</sup>により記録した。

## 2. 刺激溶液とリンス液

実験は室温 (20-25°C) で行った。舌表面に流すリンス液および味覚刺激液の流速は約 0.5 ml/sec とした。カエル舌咽神経は舌に与えた蒸留水に反応 (水反応) し, 低濃度の NaCl 液は水反応を抑制するので 1 mM NaCl をリンス液として用いた。味覚刺激溶液には 1-200 mM NaCl, 1-100 mM NaAc, 1-100 mM NaGlu, 100 mM LiCl + 1 mM NaCl, 100 mM NaCl + 20-100 mM NaGlu, 0.002-0.5 mM Q-HCl (quinine-HCl, Sigma) + 1 mM NaCl, また 0.002-0.5 mM Q-HCl に加えた 100 mM NaCl, NaAc, NaGlu の混合液を用いた。刺激液は 30 秒間舌表面をかん流した。刺激の前後に 1 mM NaCl で舌表面を洗い流した。amiloride (amiloride hydrochloride, Sigma) の影響を調べるために 0.5 mM amiloride + 1 mM NaCl, 0.5 mM amiloride + 100 mM NaCl および 0.5 mM amiloride + 1 mM NaCl + 0.1 mM Q-HCl の混合液を用いた。

## 3. 交叉順応実験

ある刺激液 (A) に対する応答をコントロールとして記録しておき, 別の刺激液 (B) の反応の順応後, 続いて A の刺激液を流し, A 反応が, 先行した B によってどのように影響されるか調べる実験を交叉順応実験という。もし, B 刺激の順応後でも, A の反応が現われたら A と B は異なる受容部位をもつと結論できるが, 反応が消失したら, A と B は同じ受容部位に作用したか, B の受容過程が A の受容過程を修飾

することが考えられる。本実験において, 100 mM NaCl と 100 mM LiCl 間の交叉順応実験が行われた。

## 4. 陰イオンの効果

gluconate<sup>-</sup> による 100 mM NaCl 相動性反応の修飾作用を調べるために, 100 mM NaCl と 20, 50, 100 mM NaGlu の混合液に対する相動性反応の大きさを測定した。また, Na<sup>+</sup> 相動性反応以外の味刺激による相動性反応に対する陰イオンの効果を調べる目的で, 陰イオンによる Q-HCl 相動性反応の修飾作用を調べた。これは 100 mM NaCl, 100 mM NaAc および 100 mM NaGlu 順応後にこれらの塩の存在下で Q-HCl の用量反応曲線がどのように影響されるか調べたものである。Q-HCl が用いられたのは, Q-HCl 刺激は相動性反応を生起し, 0.5 mM Q-HCl と 100 mM NaCl 間の交叉順応実験で Q-HCl 受容部位と Na<sup>+</sup> 受容部位はそれぞれ異なる受容部位であることが明らかになっているからである<sup>17)</sup>。また, 100 mM の濃度が使われたのはこの濃度で Na 塩の用量反応曲線 (Fig. 2 B) において陰イオン効果が充分現われたことによる。

## 5. データ分析

記録された積分反応において, ベースラインから相動性反応のピークまでの長さを測定し, 反応の大きさとした。それぞれの刺激において, コントロール刺激を定め, 各刺激の反応の大きさはコントロール刺激の反応の大きさに対する相対値で表した。two-way ANOVA, 対応のある *t*-test および対応のない *t*-test を用いて分析した。有意水準を 5% と定めた。

## 結 果

### 1. NaCl 相動性反応と LiCl 相動性反応

Fig. 1 A はリンス液に 1 mM NaCl を用い, 100 mM NaCl で刺激すると一過性の相動性反応が記録されることを示す。しかし, リンス液の NaCl の濃度を 50 mM に高くすると 100 mM NaCl 相動性反応は著しく減少した。同じ味刺激であれば先行刺激の濃度に依存して 2 番目の

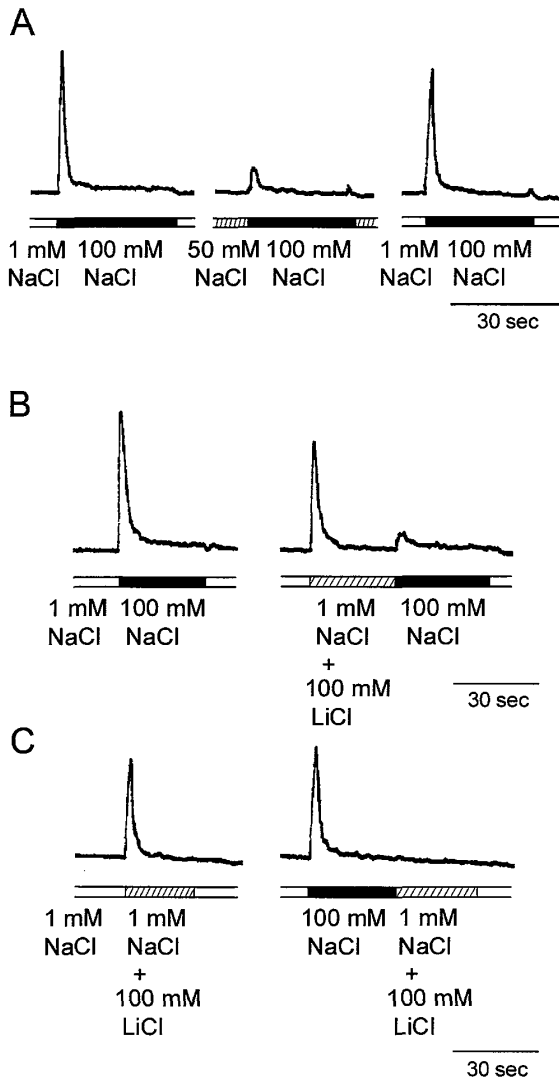


Fig. 1. Phasic responses of the frog glossopharyngeal nerve to NaCl and LiCl. A : A 100 mM NaCl stimulating solution elicits a large phasic response after adaptation of the receptor to 1 mM NaCl (right and left) and adaptation of the receptor to 50 mM NaCl reduced the phasic response to the 100 mM NaCl stimulating solution (middle). B and C : Cross-adaptation experiments between NaCl and LiCl. A phasic response to a 100 mM NaCl stimulating solution applied secondarily after adaptation of LiCl was almost eliminated (B). A phasic response to 100 mM LiCl applied secondarily after adaptation of NaCl was eliminated (C).

刺激で生起する相動性応答の大きさが減少する<sup>17)</sup>。前述のごとく、ヒトにおいてLiClはNaClと類似の塩味を呈するので、LiCl刺激は

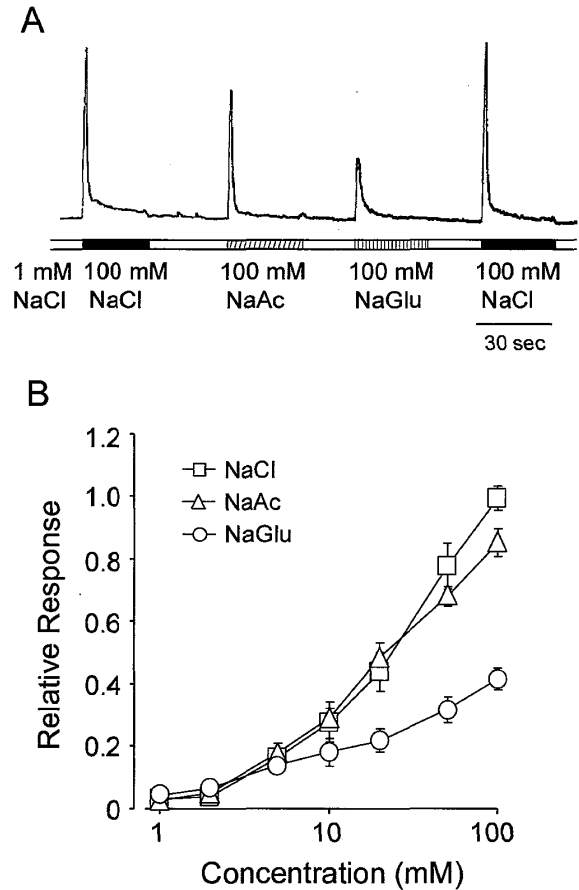


Fig. 2. Phasic responses of the frog glossopharyngeal nerve to NaCl, Na acetate (NaAc) and Na gluconate (NaGlu). A : Phasic responses to 100 mM NaCl, 100 mM NaAc and 100 mM NaGlu. B : Concentration-response curves for NaCl, NaAc and NaGlu. The magnitude of the phasic response to 100 mM NaCl is taken as unity. Points and bars represents mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ).

カエル舌咽神経のNaCl刺激と同じ受容部位に作用することが考えられる。そこで、NaClとLiCl間の交叉順応実験を行った。Fig. 1 BとCで示すようにLiClとNaCl刺激のどちらが先行しても2番目に与えた刺激に対する相動性応答が消失した。カエル舌咽神経の相動性応答においてLiClとNaClは類似した味覚物質であることが示唆された。

## 2. Na<sup>+</sup>相動性応答に対する陰イオンの効果

3つの異なる陰イオン種のNa塩(NaCl, NaAc, NaGlu)刺激に対する相動性応答の大

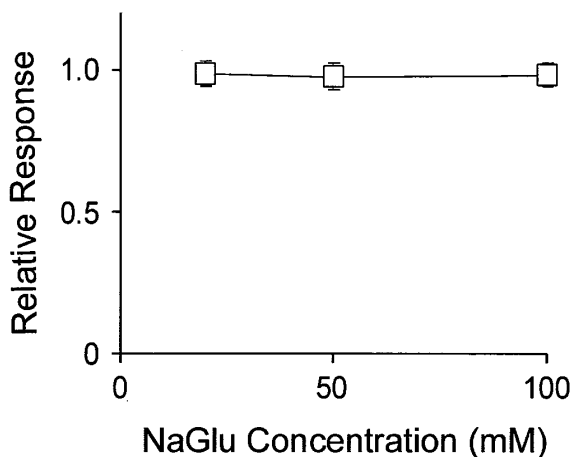


Fig. 3. Effects of gluconate<sup>-</sup> on phasic responses to Na<sup>+</sup>. The relative magnitudes of phasic responses to mixtures of 100 mM NaCl and 20, 50 and 100 mM NaGlu are plotted against NaGlu concentrations added. The magnitude of the phasic response to 100 mM NaCl is taken as unity. Points and bars represents mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ).

きを比較した。100 mM Na 塩刺激の相動性応答の大きさは NaCl  $\approx$  NaAc  $>$  NaGlu の順序であった (Fig. 2 A)。Fig. 2 B は Na 塩の用量応答曲線を示す。NaCl と NaAc は同じような曲線を示し、NaGlu の曲線の傾斜は NaCl や NaAc の曲線の傾斜より緩やかであった。NaCl と NaAc の 1-100 mM の相動性応答の大きさの two-way ANOVA は刺激濃度には有意の差 ( $[F(6, 48) = 197.175, p < 0.0001]$ ) を示したが刺激種の違いに有意の差は見られなかった ( $[F(1, 8) = 0.316, p = 0.5895]$ )。しかし、NaAc と NaGlu の用量応答曲線において two-way ANOVA は刺激濃度 ( $[F(6, 48) = 120.848, p < 0.0001]$ ) も刺激種の違い ( $[F(1, 8) = 40.534, p < 0.001]$ ) にも有意差のあることを示した。Fig. 2 B に示すように、100 mM の濃度で、NaGlu の相動性応答の大きさは NaCl あるいは NaAc のその約40%であった。Na<sup>+</sup> 緊張性応答は gluconate<sup>-</sup> によって強く抑制されることが知られているので<sup>20)</sup>、NaGlu の相動性応答の大きさが小さいのも、gluconate<sup>-</sup> が Na<sup>+</sup> 相動性応答を抑制していることが考えられる。そこで、100 mM NaCl に20, 50, 100 mM NaGlu

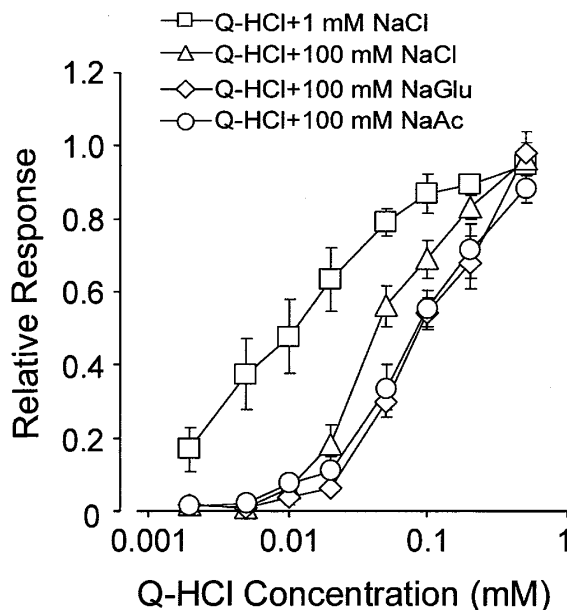


Fig. 4. Concentration-response curves for quinine-HCl (Q-HCl) in the presence of 1 mM NaCl, 100 mM NaCl, 100 mM NaAc and 100 mM NaGlu. The tongue was adapted to a solution of 1 mM NaCl, 100 mM NaCl, 100 mM NaAc or 100 mM NaGlu and then Q-HCl solutions of varying concentrations in the presence of the respective Na-salts were applied secondarily. The relative magnitude of the phasic response to 0.5 mM Q-HCl with 1 mM NaCl is taken as unity. Points and bars represents mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ).

を加えた混合液の相動性応答の大きさを測定し100 mM NaCl 相動性応答の大きさと比較した (Fig. 3)。200 mM NaCl 相動性応答の大きさは  $1.32 \pm 0.08$  (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 5$ ) であり、100 mM NaGlu も興奮効果を示すので、100 mM NaCl と 100 mM NaGlu の混合液は gluconate<sup>-</sup> の Na<sup>+</sup> 相動性応答に対する修飾作用がなければ、100 mM NaCl 相動性応答の大きさを超えるものと思われる。Fig. 3 で示すように、100 mM NaCl と NaGlu の混合液の相動性応答の大きさは NaGlu の濃度が増しても増加せず、100 mM NaCl 相動性応答の大きさと同じ程度であった。このことから、gluconate<sup>-</sup> による Na<sup>+</sup> 相動性応答の抑制が示唆された。しかし、gluconate<sup>-</sup> による Na<sup>+</sup> 相動性応答の抑制は Na<sup>+</sup> 緊張性応答の抑制ほど強くはな

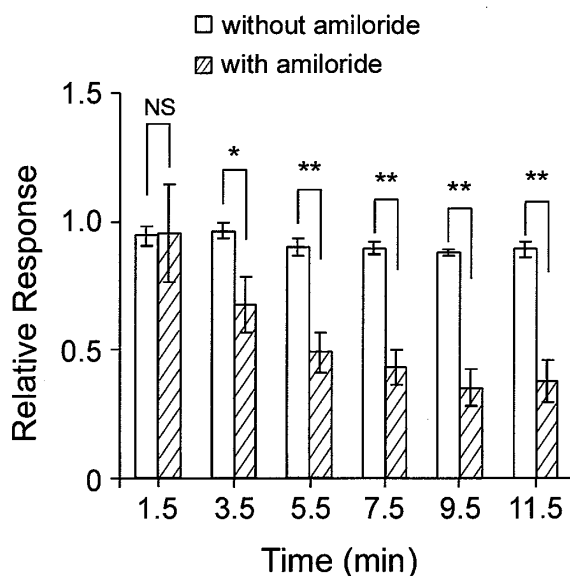


Fig. 5. Effects of amiloride on the phasic response to NaCl. A solution of 100 mM NaCl containing 0.5 mM amiloride was repeatedly applied to the tongue surface after adaptation of the receptor to 0.5 mM amiloride with 1 mM NaCl. The magnitude of phasic responses to 100 mM NaCl after adaptation of the receptor to 1 mM NaCl without amiloride is taken as unity. The relative magnitudes of responses to 100 mM NaCl with 0.5 mM amiloride were plotted against time after treatment with amiloride. A solution of 100 mM NaCl without amiloride was also repeatedly applied every 2 min. The relative magnitudes of the phasic responses to 100 mM NaCl were compared with those values during amiloride. Unpaired *t*-test (NS:  $p > 0.05$ ; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).

かった (考察で後述)。

このような gluconate<sup>-</sup> の修飾作用は Na<sup>+</sup> 相動性応答に特異的であるのかどうか調べるために, Q-HCl 刺激で生起する相動性応答に対する Na 塩 (NaCl, NaAc, NaGlu) の効果を調べた。まず, 100 mM Na 塩を先行刺激とし, 相動性応答の順応直後に各種濃度の Q-HCl に 100 mM Na 塩を加えた混合刺激液を与え, 相動性応答の大きさを測定し, コントロール刺激 (1 mM NaCl リンスで, 0.5 mM Q-HCl と 1 mM NaCl の混合液刺激) の相動性応答の大きさに

対する相対値で表した (Fig. 4)。Fig. 4 で示すように, Q-HCl の用量応答曲線は 100 mM Na 塩の存在で右にほぼ平行移動した。100 mM NaAc あるいは 100 mM NaGlu は 100 mM NaCl より Q-HCl の用量応答曲線を右へ移動させた。そこで, 100 mM NaAc と 100 mM NaGlu 存在下の二つの曲線を比べると, two-way ANOVA で, 二つの塩による有意の差は見られなかった ( $F(1, 8) = 0.069$ ,  $p = 0.7991$ )。このように NaAc と NaGlu は Q-HCl の用量応答曲線への影響はほとんど同じであったが, Fig. 2B で示した Na 塩の用量応答曲線では NaAc と NaGlu の影響は著しく異なっていたので, 本実験結果は Na<sup>+</sup> 相動性応答に対し, 陰イオンは特異的な修飾作用をもつことを示す。

### 3. NaCl 相動性応答に対する amiloride の効果

Fig. 5 は 1 mM NaCl リンス液あるいは 0.5 mM amiloride のかん流後の 100 mM NaCl 刺激の相動性応答の大きさの時間経過を示す。0.5 mM amiloride を与えてから, 1.5, 3.5, 5.5, 7.5, 9.5 および 11.5 分の時点で 0.5 mM amiloride を含む 100 mM NaCl 刺激を行った。0.5 mM amiloride 処理後 1.5 分での 100 mM NaCl 刺激の相動性応答の大きさは amiloride 処理なしの 100 mM NaCl 刺激の相動性応答の大きさと比べ有意の差はなかった (対応のない *t*-test,  $p > 0.05$ )。従って, NaCl 相動性応答に amiloride 感受性 Na<sup>+</sup> チャネルは関与していないことが示唆された。0.5 mM amiloride 処理後の時間とともに, 100 mM NaCl 相動性応答の大きさは有意に減少した (Fig. 5)。100 mM NaCl 刺激の代わりに, amiloride 処理後の Q-HCl 相動性応答を調べた (図に示していない)。0.5 mM amiloride 処理後 10.5-11.5 分での 0.1 mM Q-HCl 相動性応答の相対的大きさは  $0.651 \pm 0.053$  (mean  $\pm$  S.E.M.,  $n = 7$ ) であり, 0.5 mM amiloride 処理前のコントロールに比べ, 有意 (対応あり *t*-test,  $p < 0.001$ ) に減少した。従って, amiloride 処理後の時間とともに応答の大きさの減少が NaCl 相動性応答にも 0.1 mM

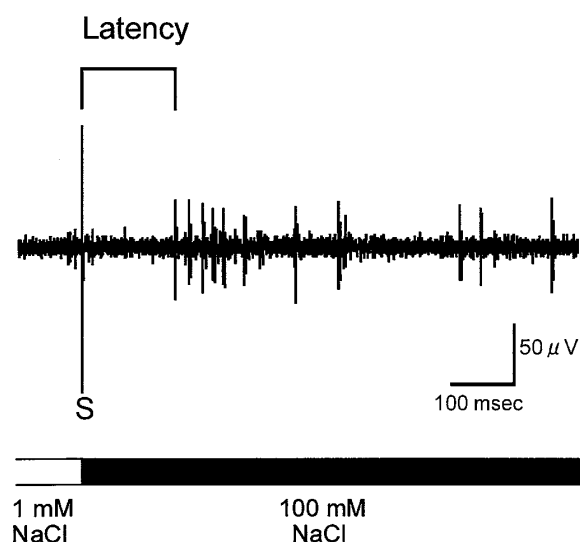


Fig. 6. A typical example of antidromic impulses in sensory units, caused by application of 100 mM NaCl to the adjacent papillae, recorded with a suction electrode (see Text). The time interval between the stimulant touch artifact (S) and the first impulses in a sensory unit showing a phasic response was measured as the latent period.

Q-HCl 相動性応答にも観察されるので、amiloride 処理後遅く現われる amiloride の効果は NaCl 相動性応答に特異的ではなかった。

#### 4. 味刺激開始から神経応答が現われるまでの潜伏時間 (latency)

100 mM NaCl 刺激開始から神経応答が現われるまでの latency を測定した。latency の測定には吸引電極法を用いた。Fig. 6 は吸引電極近傍に 100 mM NaCl 刺激液を与えた時に生じる電気的サージ (刺激時点) から一定の時間後に単一神経線維からのインパルスが現われることを示す。Fig. 6 で示される感覚単位は 146 msec の latency で応答が現われた。100 mM NaCl 刺激の latency は 6 つの感覚単位で  $100.9 \pm 14.4$  msec (mean  $\pm$  S.E.M.) であった。

### 考 察

最近、甘味、苦味、うま味、酸味の味覚受容体が遺伝子解析の研究から明らかになっており、味覚受容機構の研究はこれまでに比べ格段

の進歩があった<sup>21)</sup>。しかし、Na<sup>+</sup> 受容は緒言で述べたように、amiloride で抑制される Na<sup>+</sup> チャンネルと抑制されない TRPV 1 チャンネルの pathway が考えられており<sup>5)</sup>、Na<sup>+</sup> 受容に受容体が関与する証拠はまだ得られていない。本研究ではカエル舌咽神経の Na<sup>+</sup> 相動性応答の性質を明らかにし、Na<sup>+</sup> 受容がイオンチャンネルの pathway を使うかどうか調べた。

相動性応答は短い時間で順応が起こるので、緊張性応答とは違って交叉順応実験が適応でき、種々の味物質が異なる受容部位に作用するかどうか検討できる利点がある。横瀬ら<sup>17)</sup>はカエル舌咽神経の相動性応答において、NaCl, KCl および NH<sub>4</sub>Cl 間の交叉順応実験を行い、それぞれの陽イオン相動性応答を引き起こす受容部位は異なることを示した。従って、カエル舌咽神経は Na<sup>+</sup> を他の陽イオンと区別できる味覚受容機構が存在することになる。しかし、Na<sup>+</sup> と Li<sup>+</sup> は 1 価陽イオンの中でも K<sup>+</sup> と比べ原子半径が小さく、従って表面電解強度は強く、水和が強いという共通性がある。カエル舌咽神経における交叉順応実験結果 (Fig. 1 B および C) は LiCl と NaCl が類似した味覚物質であることを示した。おそらく、カエルの味覚受容においても哺乳動物の味覚受容と同じように Na<sup>+</sup> と Li<sup>+</sup> は同じ受容部位に作用するものと思われる。

塩は水に溶解すると陽イオンと陰イオンに解離するので、陰イオンが陽イオン受容過程に修飾作用を及ぼすことが考えられる。Fig. 2 B において大きな陰イオンを持つ NaAc と小さな陰イオンを持つ NaCl 用量応答曲線はほぼ同じであり、大きな陰イオンを持つ NaGlu のそれは緩やかな勾配であり、他の塩に比べ興奮効果は小さかった。この結果から Na<sup>+</sup> 相動性応答に対する陰イオンの修飾作用は陰イオンの大きさに関係しないことが分かった。従って、カエル舌咽神経の Na<sup>+</sup> 相動性応答における陰イオン効果を paracellular pathway 説<sup>6-8)</sup>で説明することはできない。このような陰イオンの効果が他の味物質に対する相動性応答に共通するの



かどうか100 mM Na 塩の先行刺激の後に100 mM Na 塩存在下の Q-HCl 相動性応答で調べた。100 mM Na 塩存在下で Q-HCl 用量応答曲線は右に平行移動した (Fig. 4)。Q-HCl 用量応答曲線に対する NaAc と NaGlu は同じ効果を示し、陰イオンの違いによる差はなかった。Na<sup>+</sup>相動性応答に対して acetate<sup>-</sup> と gluconate<sup>-</sup> の効果の差は顕著であったので (Fig. 2), Na<sup>+</sup>相動性応答に対する陰イオンの修飾作用は特異的である。今回得られた Q-HCl 用量応答曲線は Na 塩の存在により右へ平行してシフトする結果はこれまでに報告がない。今後、Q-HCl 受容を考える上で興味ある結果と思われる。

カエル舌咽神経の NaCl 緊張性応答は NaCl の中に NaGlu を加えると応答の大きさは著しく減少し、gluconate<sup>-</sup> による Na<sup>+</sup> 受容に対する強い抑制作用が報告されている<sup>20)</sup>。Fig. 3 で示されようように、Na<sup>+</sup>相動性応答に対し gluconate<sup>-</sup> は抑制効果を持った。しかし、gluconate<sup>-</sup> の抑制効果は小さかった。従って、カエル舌咽神経の Na<sup>+</sup>相動性応答と Na<sup>+</sup>緊張性応答に対する、陰イオンの作用機序は異なっていることが考えられる。

カエル舌の遊離味細胞で amiloride によってブロックされる Na<sup>+</sup>チャンネルが見出され<sup>22)</sup>、このチャンネルは Na<sup>+</sup>受容に関与すると考えられてきた。また、ラット舌からの遊離味細胞でも amiloride 感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルが見出された<sup>23)</sup>。しかし、これらの実験は遊離細胞でなされているため、amiloride 感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルが味細胞の先端受容膜に存在するという証拠は得られていない。amiloride 感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルは外側基底膜に存在するかもしれない。その場合、舌表面に与えた amiloride は大きい分子なのでタイトジャンクションを通過できず、Na<sup>+</sup>チャンネルをブロックすることはできない。従って、味細胞レベルで amiloride 感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルが見出されても、amiloride 感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルが表面受容膜に存在しない限り、amiloride 感受性神経応答は現われないことに

なる。

カエル舌咽神経の NaCl 緊張性応答は 0.5 mM amiloride で抑制されない<sup>9)</sup>ので、少なくとも先端受容膜に amiloride 感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルは存在しない<sup>9)</sup>。しかし、今回 amiloride 処理後の時間経過とともに 100 mM NaCl 相動性応答の大きさは次第に減少し、約 40% のレベルで一定になった。0.1 mM Q-HCl 相動性応答でも 0.5 mM amiloride 処理後の時間経過とともに減少するので、amiloride の効果は NaCl 相動性応答に特異的に効いたのではなかった。従って、amiloride の効果は薬理作用として Na<sup>+</sup>チャンネルを抑制したことになる。おそらく、amiloride は時間とともに受容膜に結合し、100mM NaCl 相動性応答や 0.1 mM Q-HCl 相動性応答を非特異的に抑制したものである。また、本研究では、0.5 mM amiloride 処理後 1.5 分で 100 mM NaCl 相動性応答の減少は見られなかった (Fig. 5)。ラット鼓索神経の Na 塩応答では通常 0.1 mM 以下の低濃度の amiloride で充分効果が現われるし<sup>24)</sup>、amiloride 処理後直ちに応答の減少が観察されるので、カエル舌咽神経の Na<sup>+</sup>相動性応答の受容機構には amiloride 感受性 Na<sup>+</sup>チャンネルは関与しないと思われる。

もし Na 塩の味覚刺激に対する応答が味細胞の先端受容膜のイオンチャンネルを介する応答であるならば、先端部の脱分極電位は直ちに味細胞を内側から外側に向かう電流を生じさせ、細胞体に脱分極電位をもたらす、刺激開始から、神経応答が現われるまでの latency は数ミリ秒のオーダーであると思われる。本実験では、吸引電極法により 100 mM NaCl 刺激後に相動性応答の現われる latency は約 100 msec もあった。吸引電極内に吸引された茸状乳頭の近傍の茸状乳頭で生じたインパルスは逆行性に伝導して平均 2.4 msec 経過して吸引電極で記録される<sup>25)</sup>。従って、約 100 msec の時間はほとんど味覚受容細胞内での受容過程で費やされる時間と思われる。従って、カエル舌咽神経の Na 塩相動性応答は先端受容膜での Na<sup>+</sup>チャンネルを

介する応答とは考え難い。最近、甘味、苦味、うま味受容において G 蛋白質共役型受容体を介する pathway が報告されている<sup>21)</sup>。即ち、セカンドメッセンジャー生成、Ca<sup>2+</sup> ストアーからの Ca<sup>2+</sup> 放出、Ca<sup>2+</sup> によって活性化される transient receptor potential melastatin-5 (TRPM 5) の非選択性陽イオンチャネルの開口、脱分極、電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャネル開口、神経伝達物質の放出という細胞内シグナリングカスケードを経て味覚神経線維にインパルス発生が起こり、味覚情報は中枢へ伝えられる。カエル舌において、吸引電極法により 0.5 mM Q-HCl 刺激で得られた latency は 100 mM NaCl 刺激の latency とほぼ同じく、約 100 msec であった<sup>26)</sup>。Q-HCl 刺激は受容体を介するので、100 mM NaCl 刺激と Q-HCl 刺激の latency がほぼ同じことは NaCl 相動性応答は Na<sup>+</sup> チャネルを介するのではなく、Na<sup>+</sup> 受容体を介する pathway によって生起することを示唆する。gluconate<sup>-</sup> の Na<sup>+</sup> 相動性応答の抑制は gluconate<sup>-</sup> が陰イオン結合体と結合し、二次的に Na<sup>+</sup> 受容体に影響を与えるものと思われる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、非常に温かい御指導と御鞭撻を賜りました久保田稔教授に心よりの謝意を表します。また、多くの御示唆、御支援を賜りました本学歯学部歯科保存学第一講座および口腔生理学講座の先生方各位に深く感謝致します。

この研究は一部、文部科学省ハイテクリサーチプロジェクト（平成17年度～平成21年度）の補助を受け実施した。

## 文 献

1) Ninomiya, Y., and Funakoshi, M. : Amiloride inhibition of responses of rat single chorda tympani fibers to chemical and electrical tongue stimulations. *Brain Res.* 451 : 319-325, 1988.  
2) Lindemann, B. : Taste reception. *Physiol. Rev.* 76 : 719-766, 1996.

3) Formaker, B. K., and Hill, D. L. : An analysis of the residual NaCl response taste response following amiloride. *Am. J. Physiol.* 225 : R1002-R1007, 1988.  
4) Kitada, Y., Mitoh, Y., and Hill, D.L. : Salt taste responses of the IXth nerve in Sprague-Dawley rats : lack of sensitivity to amiloride. *Physiol. Behav.* 63 : 945-949, 1998.  
5) Lyall, V., Heck, G.L., Vinnikova, A. K., Ghosh, S., Phan, T. H., Alam, R. I., Russel, O. F., Malik, S. A., Bigbee, J. W., and DeSimone, J. A. : The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J. Physiol.* 558 : 147-159, 2004.  
6) Ye, Q., Heck, G. L., and DeSimone, J. A. : The anion paradox in sodium taste reception : resolution by voltage-clamp studies. *Science* 254 : 724-726, 1991.  
7) Ye, Q., Heck, G. L., and DeSimone, J. A. : Voltage dependence of the rat chorda tympani response to Na<sup>+</sup> salts : implications for the functional organization of taste receptor cells. *J. Neurophysiol.* 70 : 167-178, 1993.  
8) Elliot, E. J., and Simon, S. A. : The anion in salt taste : a possible role for paracellular pathways. *Brain Res.* 535 : 9-17, 1990.  
9) Kitada, Y., Okuda-Akabane, K., and Mitoh, Y. : Effects of amiloride on gustatory neural responses to salts in the frog. *Chem. Senses* 26 : 1203-1210, 2001.  
10) Kitada, Y. : Two different receptor sites for Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> in frog taste responses. *Neurosci. Lett.* 47 : 63-68, 1984.  
11) Kitada, Y. : Different receptor sites for Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> in single water fibers of the frog glossopharyngeal nerve. *Brain Res.* 377 : 211-215, 1986.  
12) Kitada, Y. : Anions modulate cation-induced responses of single units of the frog glossopharyngeal nerve. *Brain Res.* 694 : 253-263, 1995.  
13) Hanamori, T., Hirota, K., and Ishiko, N. : Receptive fields and gustatory responsiveness of frog glossopharyngeal nerve. A single fiber analysis. *J. Gen. Physiol.* 95 : 1159-1182, 1990.  
14) Nomura, H., and Kumai, T. : Reflex discharge evoked by water stimulation on the frog tongue. *Brain. Res.* 221 : 198-201, 1981.  
15) Kumai, T. : Reflex response of the hypoglossal nerve induced by gustatory stimulation of the frog tongue. *Brain. Res.* 208 : 432-435, 1981.  
16) Nomura, H., and Kumai, T. : A specific chemoreceptor to the linguo-hypoglossal chemoreflex of the frog. *Jpn. J. Physiol.* 32 : 683-687, 1982.  
17) 横瀬隆夫, 奥田・赤羽和久, 深見秀之, 松本範雄 : カエル舌咽神経の相動性味覚応答に関与する複数受容部位 : 交叉順応法による研究, 岩医大歯誌 31 : 186-196, 2006.

- 18) Beidler, L. M.: Taste receptor stimulation with salts and acids. In Handbook of Sensory Physiology, Vol. IV/2, Chemical Senses. (L. M. Beidler, ed.) Springer-Verlag, Berlin and New York, pp. 200-220, 1971.
- 19) Kitada, Y.: Inhibitory effects of cations on the  $\text{Ca}^{2+}$  response of water fibers in the frog tongue. *Jpn. J. Physiol.* 28 : 413-422, 1978.
- 20) 岩淵有紀子, 奥田・赤羽和久, 成田欣也: カエル舌咽神経の Na 塩応答:  $\text{Ni}^{2+}$  によって増強された Na 塩応答における陰イオンの役割, 歯基礎誌, 45: 169-179, 2003.
- 21) Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P., and Zuker, C. S.: The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444 : 288-294, 2006.
- 22) Avenet, P., and Lindemann, B.: Amiloride-blockable sodium currents in isolated taste receptor cells. *J. Membr. Biol.* 105 : 245-255, 1988.
- 23) Doolin, R. E., and Gilbertson, T. A.: Distribution and characterization of functional amiloride-sensitive sodium channels in rat tongue. *J. Gen. Physiol.* 107 : 545-554, 1996.
- 24) Hettinger, T. P., and Frank, M. E.: Specificity of amiloride inhibition of hamster taste responses. *Brain Res.* 513 : 24-34, 1990.
- 25) Sato, T., Miyamoto, T., and Okada, Y.: Latency of gustatory impulses initiated in frog tongue. *Brain Res.* 424:333-342, 1987.
- 26) 成田欣也, 北田泰之.: カエル舌咽神経の単一神経線維における相動性味覚応答: 味応答の初期過程. 日本味と匂学会誌. 印刷中.