

塩味嗜好学習に関わる神経回路の同定

乾 賢¹, 高橋 茂²

¹ 北海道大学大学院歯学研究院口腔生理学教室, ² 北海道大学大学院歯学研究院口腔機能解剖学教室

概要

塩味が食べ物の美味しさを高めることは経験的に知られているが、そのメカニズムは十分には明らかにされていない。ラットにナトリウム欠乏を繰り返し経験させると、通常は嫌う高張食塩水を好んで摂取するようになることが分かっている。これはナトリウム欠乏による不快感が高張食塩水によって解消されることで、強い塩味に対する嗜好学習が成立するためと考えられている。塩味刺激に反応するニューロンが扁桃体基底外側核(basolateral amygdala, BLA)に存在することから、塩味嗜好学習に関与するBLAへの入力経路を同定することを目的とした。

神経活動のマーカであるFos蛋白質とともにeGFPを発現する遺伝子改変ラット(Fos-eGFPラット)のBLAに逆行性神経トレーサーFluoro-Gold (FG)を注入した。行動実験において実験群には利尿降圧剤であるフロセミド(FRO)を投与し、24時間後に高張食塩水(3% NaCl 溶液)を30分間呈示した。対照群にはFROの代わりに生理食塩水(SAL)を投与した。この試行を2回行い(テスト1, 2回目), 2回目の3% NaCl 溶液呈示終了から90分後に灌流固定した。採取した脳についてFG標識細胞とGFP発現細胞を探索した。

FROを投与された実験群は対照群より多くの3% NaCl 溶液を摂取した。また、テスト2回目の摂取量は顕著ではないものの1回目より多かった。組織学的実験によって、BLAへのFG注入によって標識されるニューロンが視床室傍核(paraventricular thalamus, PVT)に多く存在することが分かった。そこでPVTでのGFP発現細胞数を調べたところ、実験群の発現数は対照群より有意に多かった。

ナトリウム欠乏を繰り返し経験した実験群では3% NaCl 溶液の摂取量が増加する傾向にあった。このことからナトリウム欠乏と高張食塩水摂取の経験は塩味に対する嗜好を上昇させることが示唆された。また、PVTでFG標識細胞が多く観察され、PVTでのGFP発現細胞数が実験群で有意に多いことが分かった。これらのことから、PVTからBLAへ投射するニューロンが高張食塩水の摂取によって活動することが示された。したがって、PVT→BLA 投射ニューロンが塩味嗜好学習の神経基盤の一部である可能性がある。

1. 研究目的

外食・中食料理には身体機能の維持に必要とされる量より多くの塩分が含まれている。このことは塩味が食べ物の美味しさを高めることを示唆している。ラットは利尿降圧剤によるナトリウム欠乏を繰り返し経験すると、通常は嫌悪する高張食塩水を好んで摂取するようになる¹⁾。これはナトリウム欠乏による不快感が高張食塩水によって解消されることで、強い塩味に対する嗜好学習が成立するためと

考えられている。この塩味嗜好学習の神経回路メカニズムは不明な点が多い。

申請者はこれまでに、味覚嫌悪学習に扁桃体基底外側核(basolateral amygdala, BLA)が重要であることを明らかにした²⁾。BLAニューロンは高嗜好性食塩水刺激によっても興奮する³⁾。そこで、高嗜好性食塩水摂取によって活動するBLAへの入力経路を明らかにし、塩味嗜好学習の神経基盤解明へとつなげる。

2. 研究方法

2.1 被検体

9 匹の c-Fos-eGFP トランスジェニックラット (Fos-eGFP ラット)⁹⁾を用いた。このラットでは c-fos 遺伝子に改変緑色蛍光タンパク遺伝子 (enhanced green fluorescent protein; eGFP) が挿入されている。c-fos 遺伝子は細胞活性化によって発現する最初期遺伝子であるため、その産物である Fos 蛋白質は細胞活性化のマーカーとなる。Fos-eGFP ラットでは Fos 蛋白質とともに eGFP が発現する。したがって、eGFP の発現は細胞活性化の指標となり、組織学的に活性化した細胞を観察することができる。この Fos-eGFP ラットを飼養ケージ (KN-601U, 夏目製作所) で蒸留水と通常飼料 (CE-2, 日本クレア) を与えて個別に飼養した。

2.2 外科的手術

三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン, ミダゾラム, 酒石酸ブトルファンール) を投与した Fos-eGFP ラットを脳定位固定装置 (ナリシゲ) に固定した。頭皮を切開し, BLA の直上の頭蓋骨を穿孔した。脳図譜⁴⁾を参考に逆行性神経レーザー Fluoro-Gold (FG) を充填したガラスマイクロピペットを BLA の座標 (bregma から尾側に 2.8 mm, 正中から側方へ 5.0 mm, 脳表から腹側へ 7.1 mm) へ刺入した。FG 内に浸した Ag/AgCl 電極にアイソレーターの陽極を接続し, ラットの皮膚に留めたクリップに陰極を接続した。アイソレーターに接続した電気刺激装置によって 300 ミリ秒 ON, 200 ミリ秒 OFF の電気パルス を 10 分間流した。電流は 5 μ A とした。通電終了後 FG が拡散するのを待つために 5 分間静置した後, ガラスマイクロピペットをゆっくり引き上げた。切開部を縫合し, 鎮痛剤 (カルプロフェン) と抗生物質 (ゲンタマイシン) を投与した。

2.3 行動実験

2.3.1 トレーニング

外科的手術終了から 2 週間以上経過してから開始した。手続きを図 1 に示す。午後 2 時から 3 時の間に体重の 0.1% 量の生理食塩水 (SAL) を皮下に投与し (投与 1), 直後からテスト用ケージに移した。テスト用ケージは透明ケージ (TR-TPX-200, トキワ科学器械) の底にフロアーメッシュ (T-FM-200, トキワ科学器械) を敷いたものであり, 動物が排泄物に接することができない (排泄物からのナトリウム回収ができない) ようになっていた。テスト用ケージで蒸留水と低ナトリウム飼料 (Na <0.01%, AIN93G 変形, オリ

エンタル酵母工業) を呈示した。最初の投与から 2 時間後に再度生理食塩水を投与した (投与 2)。

投与 1 の 24 時間後に体重測定し, 蒸留水と低ナトリウム飼料をケージから取り除き, それぞれの摂取を測定した。その直後から 3% NaCl 溶液を 30 分間呈示して摂取量を測定した。3% NaCl 呈示終了から 90 分が経過した後, ラットを飼養ケージに戻して蒸留水, 通常飼料, 3% NaCl 溶液を 22 時間 (投与 1 から 48 時間) 与え, 摂取量を測定した (以下, 「補給期」とする)。

2.3.2 テスト 1 回目

トレーニング終了の 3 日後から開始した。ラットを実験群 (n = 5) と対照群 (n = 4) に分けた。実験群に対しては, 利尿降圧剤フロセミド (FRO, 10 mg/kg, 体重の 0.1% 量, 皮下) を 2 時間あけて 2 回投与した。対照群には SAL を投与した。その他の手続きはトレーニングと同様であった。

2.3.3 テスト 2 回目

テスト 1 回目終了の 3 日後から開始した。テスト 1 回目と同様に実験群には FRO を, 対照群には SAL を投与した。投与 1 の 24 時間後から 3% NaCl 溶液の摂取量を測定し, 90 分後に灌流固定を行った。

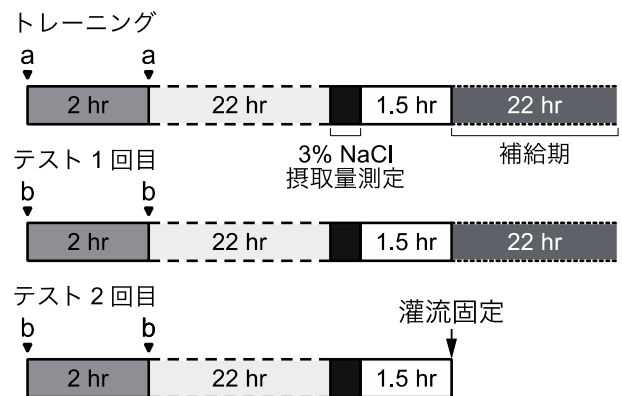


図 1 行動実験の手続き

トレーニングの a の時点で全ての個体に生理食塩水を投与した。テスト 1 回目と 2 回目の b では実験群にフロセミド, 対照群に生理食塩水を投与した。1 回目の投与から 24 時間後まで蒸留水と低ナトリウム飼料を呈示し, その後 3% NaCl 溶液を 30 分間呈示した。呈示終了の 90 分後から通常飼料, 3% NaCl 溶液, 蒸留水を呈示して不足している Na を補給した。

2. 4 灌流固定

ペントバルビタールナトリウムを投与し(100 mg/kg, i.p.), 深麻酔を施した。開腹し, 左心室から冷却したヘパリンナトリウム含有りん酸緩衝生理食塩水を注入し, 右心房を切開して瀉血した。続いて 4%パラホルムアルデヒド含有りん酸緩衝液(4% PFA)を注入して固定した。頭蓋から取り出した脳を 4% PFA 内で一晚以上後固定してから, 凍結保護液(30%ショ糖含有りん酸緩衝液)に浸漬した。

2. 5 免疫組織化学的染色

凍結保護液内で沈降した脳を滑走式リトームとエレクトロフリーズ(REM-710, MC-802C, 大和工機)で薄切し, 50 μm 厚の冠状断凍結切片を作製した。切片を観察したところ eGFP の蛍光強度が微弱であったため, 補強するために以下の免疫組織化学的染色を行った。

切片を PBS 中で洗浄した後, 5%正常ヤギ血清 \cdot 0.5% Triton-X 含有 PBS に 2 時間浸漬してブロッキング処理を行った。その後, 一次抗体(抗 GFP 抗体, 598, 医学生物化学研究所, 5000 倍希釈) \cdot 0.5% Triton-X 含有 PBS に 4°C で三晩浸漬した。その後, PBS での洗浄後に二次抗体(Alexa Fluor® 488 標識抗ウサギ IgG 抗体, 111-545-003, Jackson ImmunoResearch, 400 倍希釈) \cdot 0.5% Triton-X 含有 PBS に 3 時間浸漬した。最後に PBS で洗浄し, スライドグラス(クレストコート, マツナミ)に貼り付けた。褪色防止剤含有封入剤(Anti-Fade Fluorescence Mounting Medium, ab104135, abcam)とカバーガラスで封入し, 蛍光顕微鏡, デジタルカメラ, ソフトウェア(ECLIPSE Ci, DS-Fi3, NIS-ElementsD, ニコンソリューションズ)で観察, 撮像を行った。

2. 5 データ解析

2. 5. 1 行動実験

摂取量や体重のデータについて群(実験群, 対照群)と試行(トレーニング, テスト 1 回目, テスト 2 回目)を要因とした二要因分散分析を行った。交互作用が有意であった場合は Tukey の方法を用いて下位検定を行った。

2. 5. 2 GFP 発現細胞数

顕微鏡画像を画像解析ソフト ImageJ(version 1.51t)で開き, 輝度分布を計測し, 平均値と標準偏差を求めた。次に Threshold コマンドで 2 値画像処理を施した。閾値は輝度分布の平均値か標準偏差の半分の値を減算した値とした。この画像に対して Analyze Particles コマンドを用いて細胞数をカウントした。細胞数のデータについて, グラフ作成・

統計ソフトウェア GraphPad Prism (version 10.2.3)を用いてグラフを作成し, 群間差を対応のない t 検定によって分析した。

3. 研究結果

3. 1 行動実験

3. 1. 1 FRO/SAL 投与後 24 時間の変化

実験群と対照群の両方に SAL を投与したトレーニングでは, 投与後 24 時間の蒸留水摂取量に群間差はみられなかった(図 2A)。しかし, 実験群に FRO を投与したテスト 1 回目と 2 回目では, 実験群の蒸留水摂取量が有意に多かった($p < 0.01$, $p < 0.001$)。

低ナトリウム飼料摂取量(図 2B)についてはテスト 1 回目と 2 回目において実験群の摂取量が有意に少なかった($p < 0.05$, $p < 0.01$)。また, 実験群のテスト 2 回目での摂取量は 1 回目の摂取量より有意に少なかった($p < 0.05$)。24 時間での体重の変化を分析したところ(図 2C), テスト 1 回目と 2 回目において実験群における体重減少は対照群より有意に大きかった(いずれも $p < 0.01$)。また, 実験群のテスト 2 回目での体重減少は 1 回目より有意に大きかった($p < 0.01$)。

3. 1. 2 FRO/SAL 投与 24 時間後の NaCl 摂取量

FRO/SAL の投与から 24 時間後に呈示した 3% NaCl 溶液の摂取量を図 2D に示す。SAL を投与したトレーニングではいずれの群もわずかな量しか NaCl 溶液を摂取しなかったが, テスト 1 回目と 2 回目で FRO を投与された実験群は対照群に比べて有意に多く摂取した(いずれも $p < 0.05$)。

3. 1. 3 補給期における摂取量と体重変化

蒸留水(図 2E)についてはいずれの群もトレーニングよりテスト 1 回目での摂取量が多かった(いずれも $p < 0.01$)。通常飼料(図 2F)や 3% NaCl 溶液(図 2G)の摂取量については群間や試行間で有意差はみとめられなかった。体重の変化(図 2H)についてはテスト 1 回目での実験群の増加量は対照群より有意に多かった($p < 0.01$)。

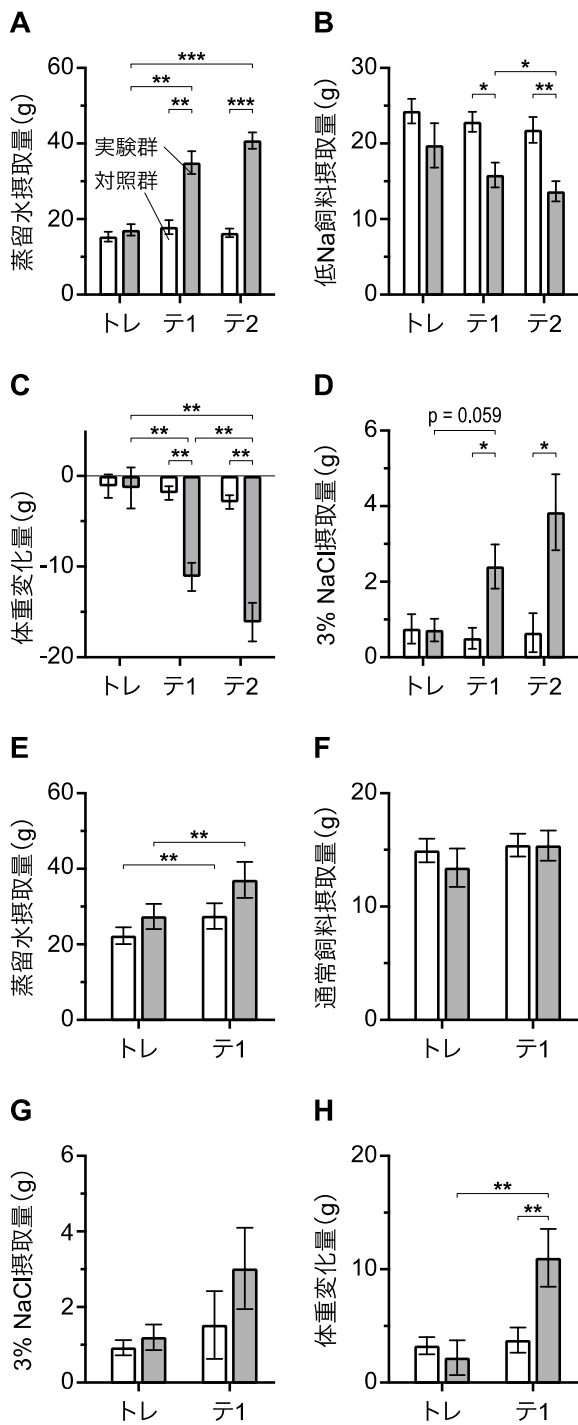


図2 行動実験の結果

1回目のフロセリド/生理食塩水投与から24時間の蒸留水摂取量(A), 低ナトリウム(Na)飼料摂取量(B), 体重の変化量(C)。1回目のフロセリド/生理食塩水投与から24時間後に呈示した3% NaCl溶液の摂取量(D)。補給期における蒸留水摂取量(E), 通常飼料摂取量(F), 3% NaCl溶液の摂取量(G), 体重の変化量(H)。

トレ, トレーニング. テ1, テスト1回目. テ2, テスト2回目。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2 FG 標識細胞の分布

吻側は前頭前野を含むレベルから尾側は腹側被蓋野を含むレベルまで, FG 標識細胞を網羅的に探索した。特に多くの FG 標識細胞がみられたのは視床室傍核 (paraventricular thalamus, PVT)であった(図3)。他に, 内側前頭前野, 腹側淡蒼球, 視床背内側核でFG 標識細胞が観察された。これらの結果から, 次項の GFP 発現細胞の分析はPVTを対象とした。

3.3 GFP(Fos)発現細胞数

PVT における GFP 発現細胞の数をカウントし, 群間で比較した。図4に示す顕微鏡画像の例のように, 実験群では対照群より多くの GFP (Fos) 発現細胞が観察された。PVT の吻側部, 中間部, 尾側部のいずれの亜領域においても, 実験群のほうが対照群より GFP 発現細胞数が多かった。吻側部では有意傾向 ($p = 0.059$)であったが, 中間部と尾側部の群間差は有意であった ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

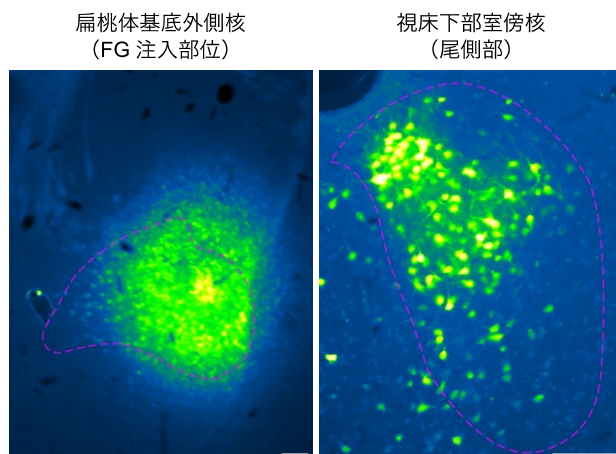
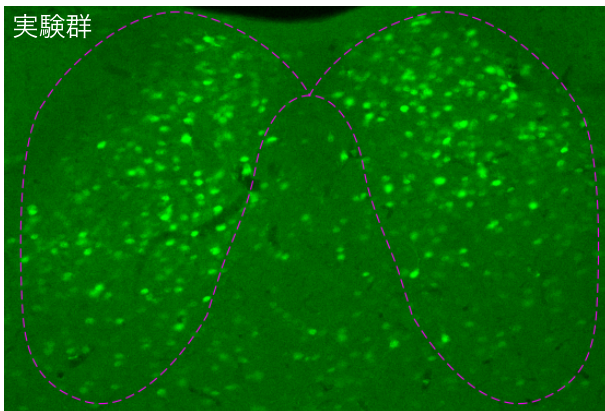
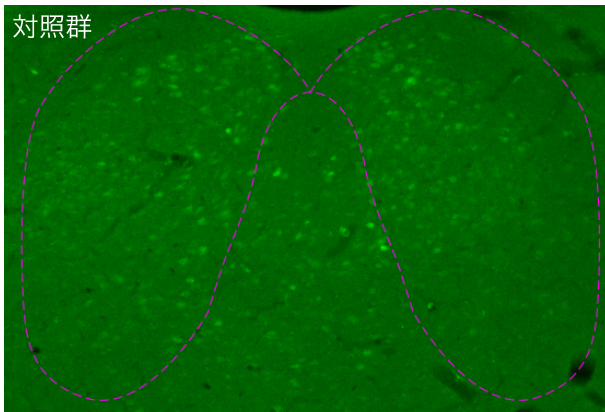


図3 フルオロゴールド(FG)の注入例

左: 扁桃体基底外側核(マゼンタ点線の範囲)にFGが注入されていた(黄緑色が注入範囲を示している)。

右: 視床下部室傍核(マゼンタ点線の範囲)においてFG標識細胞が多数みられた。

スケールバー(白線)は100 μm を表す。



GFP 発現細胞数

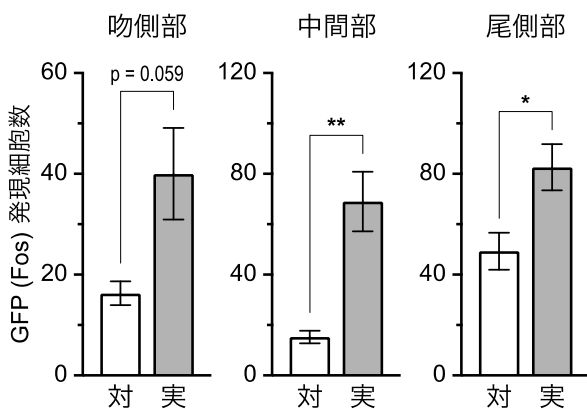


図 4 GFP 発現細胞

上: 対照群と実験群の視床室傍核尾側部(マゼンタ点線)を含む顕微鏡写真の例。

下: 視床室傍核の吻側部, 中間部, 尾側部における GFP (Fos) 発現細胞数。いずれの亜領域でも実験群の発現細胞数が対照群より多く, 中間部と尾側部では群間差は有意であった。

対, 対照群. 実, 実験群. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4. 考察

FRO/SAL の投与から 24 時間後の 3% NaCl 溶液摂取量(図 2D)について, 実験群ではテスト 1 回目とテスト 2 回目の間で統計学的に有意差がみとめられなかったが,

いずれの個体でも摂取量は増加していた。したがって, フロセミド投与による食塩欠乏を繰り返し経験したラットでは高張食塩水に対する嗜好が上昇することが示唆された。テスト間での有意差がみられなかったが, このような傾向は先行研究⁷⁾でも報告されている。上昇幅が小さかったために差が有意であると判定されなかった可能性がある。

PVT における GFP 発現細胞の数が実験群において多かったことから, 3% NaCl 溶液の摂取によって PVT ニューロンが活性化することが示唆された。筆者の知る限り PVT が塩味嗜好学習や食塩欠乏後の高張食塩水摂取に関わるという報告はこれまでにされていない。食塩摂取の中枢神経機構として浸透圧受容センサーが存在する脳弓下器官や終板脈管器官が知られている⁹⁾が, 本研究の成果はそこに視床室傍核を新たに加えるものとなる。

5. 今後の課題

行動実験の課題として, 食塩欠乏の繰り返し経験による高張食塩水摂取量増加が小さかったことが挙げられる。本研究の目的は塩味嗜好学習の神経基盤を明らかにすることであるため, 塩味溶液摂取行動が明瞭に変化することが望ましい。本研究で用いた NaCl の濃度 (3% = 約 0.5 M) は先行研究⁷⁾を参考にしたものであったが, 食塩欠乏に関する先行研究では 0.2~0.3 M 程度の NaCl 溶液を用いているものもある。したがって, 本研究より低く, かつ通常では忌避される濃度の NaCl 溶液を用いてどのような変化がみられるかを調べたい。

行動実験のもう一つの課題は, 食塩欠乏を経験し, 高張食塩水を対照群より多く摂取した実験群のラットが, 塩味を嗜好していたかどうかである。摂取量の増加は不足したナトリウムを補ったことを意味しているだけの可能性がある。したがって, 味覚嗜好性を調べる方法である味覚反応性テスト⁷⁾やリック微細解析法⁸⁾を用いた実験を今後行う必要がある。

GFP 発現に関する課題として, この解析によって PVT ニューロンが活性化したことが分かったが, PVT ニューロンの機能を明らかにすることはできなかった点が挙げられる。すなわち, PVT ニューロンが単に塩味刺激に反応するだけなのか, 塩味嗜好学習が PVT ニューロンに可塑的变化をもたらしたのか, あるいは欠乏したナトリウムを補給するために PVT ニューロンが働くのか, 現時点ではいずれの可能性も否定することはできないため, PVT ニューロンの

役割はまだ明らかではない。したがって、今後は化学遺伝学的手法を用いて PVT ニューロンの活動を人為的に制御し、それによって高張食塩水の摂取がどのように変化するかを調べることで PVT ニューロンの役割を明らかにする。

FG 注入には大きな課題がみられた。本研究では全ての個体に FG を注入したが、BLA への注入が成功し他の脳部位で FG 標識細胞が観察された個体、BLA への注入は成功したものの他の脳部位では FG 標識細胞が観察されなかった個体、BLA への注入が成功しなかった (BLA の外側に FG が注入された) 個体など、結果に大きなばらつきがみられた。当初は FG によって標識され、かつ GFP を発現する細胞を探索することで、BLA へニューロンのうちで高張食塩水の摂取に関わるものを探索する予定であった。しかし、FG 注入の成績が良くなかったため予定を修正した。BLA への注入が成功し他の脳部位で FG 標識細胞が観察された個体において PVT で多くの標識細胞が観察されたことから、PVT において GFP 発現細胞数を分析することとした。間接的な知見となってしまうものの、PVT から BLA へ投射するニューロンが存在することは確実であるため、本研究の結果は PVT→BLA 投射ニューロンの塩味嗜好学習への関与を示唆するものである。

FG 注入による神経回路標識は成功すると明瞭に観察することができるものの、失敗する確率が高いという問題点も明らかとなった。したがって、今後は上述の化学遺伝学的手法に切り替えて、PVT→BLA 投射ニューロンが塩味嗜好学習においてどのような役割を果たしているかを明らかにしていく。

6. 文献

1. Sakai R.R., Fine W.B., Epstein A.N., Frankmann S.P. (1987) Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behav. Neurosci.*, **101**, 724-731. DOI: 10.1037//0735-7044.101.5.724.
2. Inui T., Sugishita T., Inui-Yamamoto C., Yasoshima Y., Shimura T. (2019) The Basolateral Nucleus of the Amygdala Executes the Parallel Processes of Avoidance and Palatability in the Retrieval of Conditioned Taste Aversion in Male Rats. *eNeuro*, **6**, ENEURO.0004-19.2019. DOI: 10.1523/ENEURO.0004-19.2019.
3. Na E.S., Morris M.J., Johnson R.F., Beltz T.G., Johnson A.K. (2007) The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. *Brain Res.*, **1171**, 104-110. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.07.033.
4. Katoh A., Shoguchi K., Matsuoka H., Yoshimura M., Ohkubo J.I., Matsuura T., Maruyama T., Ishikura T., Aritomi T., Fujihara H., Hashimoto H., Suzuki H., Murphy D., Ueta Y. (2014) Fluorescent visualisation of the hypothalamic oxytocin neurones activated by cholecystokinin-8 in rats expressing c-fos-enhanced green fluorescent protein and oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgenes. *J Neuroendocrinol.*, **26**, 341-347. DOI: 10.1111/jne.12150.
5. Paxinos G., Watson C. (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier.
6. Hiyama T.Y. (2024) Brain sodium sensing for regulation of thirst, salt appetite, and blood pressure. *Physiol. Rep.*, **12**, e15970. DOI: 10.14814/phy2.15970.
7. Grill H.J., Norgren R. (1978) The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res.*, **143**, 263-279. DOI: 10.1016/0006-8993(78)90568-1.
8. Davis J.D. (1989) The microstructure of ingestive behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **575**, 106-19; discussion 120-1. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb53236.x.

Study of Neural Mechanisms Underlying Salt Preference Learning

Tadashi Inui¹, Shigeru Takahashi²

¹ Department of Oral Physiology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University,

² Department of Functional Anatomy, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

Summary

It is known empirically that salty taste enhances the taste of food, but the mechanism of this enhancement is not fully understood. It is known that when rats are repeatedly exposed to sodium deficiency, they develop a preference for hypertonic saline solution, which they normally dislike. This is thought to be due to the fact that hypertonic saline relieves the discomfort caused by sodium deprivation, and thus, the rats learn to prefer a strong salty taste. Since neurons in the basolateral amygdala (BLA) respond to salty stimuli, we aimed to identify the input pathway to the BLA that is involved in salt taste preference learning.

The retrograde neural tracer Fluoro-Gold (FG) was injected into the BLA of transgenic rats expressing eGFP as well as Fos protein, a marker of neural activity (Fos-eGFP rats). The experimental group received furosemide (FRO), a diuretic and antihypertensive drug, and 24 hours later, 3% NaCl solution was presented for 30 minutes. The control group received saline (SAL) instead of FRO. This trial was performed twice (Test 1 and 2), and followed by perfusion 90 minutes after the end of the second presentation of 3% NaCl solution.

The experimental group consumed more NaCl solution than the control group. The consumption of the second test was also higher than that of the first, although not significantly so. Histological experiments revealed that many FG-labeled neurons were in the paraventricular thalamus (PVT). The number of GFP-expressing neurons in the PVT was significantly higher in the experimental group than in the control group.

Our study provides evidence that repeated sodium deprivation leads to increased consumption of 3% NaCl solution, indicating the establishment of a salt taste preference. A large number of FG-labeled neurons in the PVT and higher expression of GFP-expressing PVT neurons in the experimental group suggest that neurons projecting from the PVT to the BLA play a role in salt taste preference learning.