

## 食塩欲求の中樞神経機序

### Central neural mechanisms of salt appetite

代表研究者 大阪大学人間科学部講師 志村 剛  
Assist. Prof., Faculty of Human Sciences, Osaka University  
Tsuyoshi SHIMURA

共同研究者 大阪大学人間科学部教授 山本 隆  
Prof., Faculty of Human Sciences, Osaka University  
Takashi YAMAMOTO

甲子園大学栄養学部助教授 堀尾 強  
Assoc. Prof., Faculty of Nutrition, Koshien University  
Tsuyoshi HORIO

When animals are deficient in body sodium, they consume considerable quantities of concentrated salty solutions that are normally avoided at such high concentrations. In order to clarify the possible neural mechanisms of salt appetite, we carried out several experiments using different techniques. 1) Behavioral experiments reconfirmed that salt-deprived rats ingested excessive amounts of salty solution. 2) C-Fos immunohistochemical studies revealed the functional segregation within the parabrachial nucleus (PBN), namely, the salty taste specifically activated the medial subnucleus. 3) Electrophysiological experiments demonstrated that PBN units turned to be more sensitive to sodium-salts after complete acquisition of conditioned taste aversion to NaCl. 4) Neurochemical studies using the microdialysis technique indicated that aversive taste stimuli such as quinine facilitated extracellular release of acetylcholine (ACh) in the insular gustatory cortex. Concentrated salty solution also enhanced extracellular release of ACh in the gustatory cortex of salt-deprived rats. These results suggest that the PBN is one of the most critical region for salt appetite. ACh in the gustatory cortex seems to be involved in the behavioral expression of salt appetite.

#### 研究目的

体内に塩分が欠乏した動物が食塩を多量に含んだ飲食物を好んで摂取する現象は、食塩欲求と名づけられている。この現象は生体が内部環境の恒常性を維持するための適応行動の一つと考えられており、味覚を手がかりとした飲食物の摂取や拒否行動の中樞神経機序の理解に好都合な実験モデルとして広く利用されている。

脳のどの部位が食塩欲求に関係するのかという問題に関しては、味覚伝導路の各段階を局所的に破壊して行動への効果を調べたり、末梢神経応答や味覚中継核のニューロン応答を記録することによって検討が続けられおり、下位脳幹の味覚中継核と前脳の相互作用がこの行動発現に重要なことが示唆されているものの、中心的な役割を果たす脳部位は未だに同定されていない。とくに、高濃度食塩水に対する拒否から摂取への転換が

いかなる動的変化によって生じるのか、この適応行動にどのような神経伝達物質が関与するのかという点についてはまったく明らかにされていない。

そこで、本研究では、味覚動機づけ行動における重要性が示唆されている味覚第二次中継核の結合脳傍核ならびに大脳皮質味覚野をおもな研究対象として選び、それぞれ異なる方法で実験を行い、食塩欲求行動の発現にこれらの部位がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的とした。

#### 研究経過

##### 1) 行動学的実験

食塩欲求の標準的プロトコールの確立と扁桃核破壊の効果を調べるために、行動学的実験を行った。実験動物としてラットを用い、イボテン酸

の微量注入により扁桃体あるいは不確帯を破壊した。手術からの回復後、連続5日間、高濃度食塩水(0.5 M)と蒸留水を2ピン法により呈示し、それぞれの24時間の摂取量を測定して基線レベルを決定した。実験前日に、利尿剤のプロセミドを投与して食塩欠乏を惹起し、24時間後に再び、食塩水と蒸留水を呈示してその摂取量を測定した。

## 2) 免疫組織化学的実験

結合腕傍核を破壊すると、食塩欲求が阻害されることが明らかにされているが、結合腕傍核のなかでどのようなニューロンが食塩の味覚情報処理に関与するのかを明らかにするため、細胞性癌遺伝子のひとつである *c-fos* の誘導する FOS 蛋白質を免疫組織化学的に検出した。この方法は、刺激によってどの細胞が興奮したかを視覚的に検索できる利点をもつ。実験時には、個々のラットに対し1種類の味溶液を20分間与え、1-2時間後に深麻酔下で灌流固定して脳を取り出し、通法にしたがって FOS 蛋白質を可視化した。

## 3) 電気生理学的実験

動物が新奇な味刺激を呈する飲食物を摂取したあと、胃腸障害や吐き気などの体調異常を経験すると、次に同じ味刺激が与えられても、それを拒否して摂取しなくなる。この現象は味覚嫌悪学習と呼ばれるが、味刺激と内臓不快感の連合により、それまで摂取していたものを拒否するようになるので、食塩欲求とは行動的に正反対の事象であるといえる。結合腕傍核は食塩欲求だけではなく、味覚嫌悪学習にも本質的な役割を演じていることが明らかにされているので、本実験では、この学習に結合腕傍核のどのようなニューロン活動の変化が関係しているかを調べた。実験動物には、あらかじめ0.1 M 食塩水を摂取した後、0.15 M 塩化リチウム(体重の2%量)を腹腔内注射して内臓不快感を誘発する条件づけを1日おきに3回行った。動物が食塩水をほぼ完全に摂取しなくなってから、ウレタン麻酔下で種々の味溶液に対する結合腕傍核の単一ニューロン活動を記録した。ナイーブな対照動物についても、同様の記録実験を行い、両群間の味覚応答を比較した。

## 4) 神経化学的実験

味覚行動の中枢神経機構に関する研究の中で、神経細胞間の情報処理の担い手である神経伝達物質や修飾物質についての知見はきわめて少ない。前記の通り、下位脳幹の結合腕傍核などは食塩欲求に重要な役割を演じてはいるが、除脳により前脳と下位脳幹の神経連絡を遮断された動物では、食塩欲求が発現しないことから、前脳にもこの欲求発現に重要な部位が存在すると考えられている。味覚情報は、最終的には大脳皮質味覚野に投射し、この部位に存在するアセチルコリン

が味覚嫌悪学習の獲得に不可欠であることが知られているので、本実験では、最近急速に発展してきたマイクロダイアリシス法を用いて、自由行動中の動物の大脳皮質味覚野において種々の味刺激時のアセチルコリンの変化パターンを調べた。実験には、ナイーブな動物のほかに、前記の方法で食塩欠乏を誘発した動物、およびサッカリン溶液に対して味覚嫌悪学習を獲得した動物を用いた。

## 研究成果

### 1) 行動学的実験

食塩充足時および利尿剤投与による急性食塩欠乏時の0.5 M 食塩水摂取量(10匹の平均)を図1に示した。処置前24時間の食塩水摂取量は、両条件とも約3 ml であり、条件間で差はなかった。しかし、食塩欠乏時(●)に食塩水を呈示すると、動物ははじめの15分間で、処置前24時間の摂取量を上回る5 ml 以上の食塩水を摂取し、以後24時間におわたって食塩充足時よりも高い摂取量を示した。このように、本実験プロトコルを用いて、動物の食塩欲求の程度を客観的にとらえることがわかった。

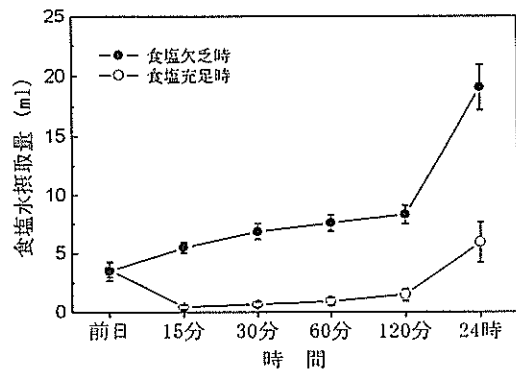


図1 食塩欠乏時および充足時の食塩水摂取量

また、解剖学的に味覚情報の投射が示唆されている扁桃体あるいは不確帯の神経細胞体をイボテン酸微量注入により破壊した場合にも、食塩欠乏時には図1の正常動物と同様の食塩摂取パターンが生じたことから、これらの部位の単独破壊では食塩欲求は阻害されないと考えられる。この点は、結合腕傍核や孤束核破壊の場合に食塩欲求が著しく阻害されることと対照的であった。

### 2) 免疫組織化学的実験

味刺激の種類に応じて結合腕傍核の尾側部では異なる部位のニューロンに *c-fos* 様蛋白質の発現がみられた。すなわち、食塩水摂取時には内側莖核に、サッカリン溶液摂取時には、腹側外側莖

核に *c-fos* ニューロンの局在がみられた。一方、動物が通常は摂取を拒否するキニーネ溶液や塩酸溶液では、外側亜核に *c-fos* ニューロンが局在した。これらの結果は、味質の違いに応じて結合腕傍核の異なった部位のニューロンが興奮することを示しており、食塩欲求時には内側亜核のニューロン群が重要な役割を果たしていることを示唆する。実際、結合腕傍核の内側亜核を中心とした破壊で、食塩欲求がもっとも大きく阻害されることを我々は既に明らかにしている。

### 3) 電気生理学的実験

0.1 M 食塩水に対して条件づけを行った動物から 51 個、条件づけを行わないナীব群動物から 54 個の単一ニューロン活動を記録し、種々の味刺激に対する応答性を調べた。蔗糖、食塩、塩酸、キニーネの各溶液をそれぞれ甘味、塩味、酸味、苦味の標準刺激として用いたが、結合腕傍核のユニットの大多数は、条件づけ群、ナীব群いずれも塩味に対してもっともよく応じる食塩ベストユニットであった。0.01 M から 0.5 M までの 5 段階の濃度の食塩水に対する応答を群間で比較すると、条件づけ群では低濃度の食塩水に対してナীব群よりも大きな応答が得られた。このことは、条件づけ群では、食塩水に対する感受性が高くなったことを示す。

図 2 は、用いた 13 味刺激の類似性に関して、それぞれの刺激に対するニューロン応答をもとにクラスター分析して得たデンドログラムである。この図ではクラスター距離が短いほど、お互いのクラスターが類似していることを表すが、条件づけ群では、ナトリウムイオンを含む溶液間の類似性が高く、これらの刺激で一群のサブクラスターを形成している。これに対し、ナীব群では、条件づけ群でみられたような、塩味とそれ以外というような明確なクラスタリングは認められない。このように、条件づけにより結合腕傍核ユニットの塩味感受性が増強し、他の味質との識別能が高くなるという本実験結果は、条件づけを受けた動物が塩味刺激を与えられたときに、低濃度の溶液でもそれを弁別して摂取するか拒否するかを選択するのに有利に作用していると考えられる。これらの結果は、味覚末梢神経応答や味覚第一次中継核の孤束核ニューロン活動において、食塩欲求時には食塩に対する応答が減少することと好対照である。つまり、食塩欲求時には通常は拒否するような高濃度の食塩に対する応答が減少することにより、動物はそれを拒否せず、むしろ摂取するようになると解釈できる。

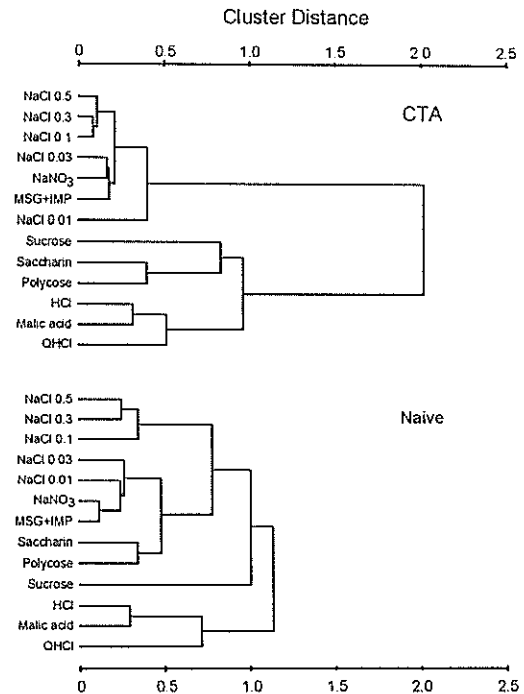


図 2 結合腕傍核ユニット活動による味刺激の分類

### 4) 神経化学的実験

大脳皮質味覚野のアセチルコリンレベルは、苦味を呈するキニーネ溶液を口腔内に与えると、約 1 時間にわたってベースラインレベルの最高約 350% まで増加することがわかった。ほかの味溶液や蒸留水を与えた場合にも、味覚野のアセチルコリンレベルは増加したが、キニーネ溶液による増加に比べて有意に低かった。また、あらかじめサッカリン溶液に対して味覚嫌悪を条件づけた動物とナীব群動物で、サッカリン溶液に対するアセチルコリン放出を比較すると、条件づけ群ではキニーネ刺激に匹敵するアセチルコリンの増加が認められ、ナীব群におけるアセチルコリンレベルよりも有意に高かった。

一方、0.5 M 食塩水刺激に対するアセチルコリンレベルの変化を食塩欠乏動物と食塩充足動物と比較すると、図 3 に示したように、食塩欠乏時(●)には充足時よりも放出量が高くなった。しかし、アセチルコリンの最大放出レベルは上記の嫌悪性味刺激時に比べて低かった。ナীব群動物はこの濃度の食塩水を積極的に摂取せず、むしろ拒否するのに対して、食塩欠乏動物は行動実験で示したように、積極的に摂取する。そこで、動

物の行動パターンを摂取反応、嫌悪反応、中立反応に分類し、それぞれの出現数とアセチルコリン放出量の関係を調べると、食塩欠乏時の食塩水刺激では摂取反応数とアセチルコリンレベルの間に高い正の相関が認められた。

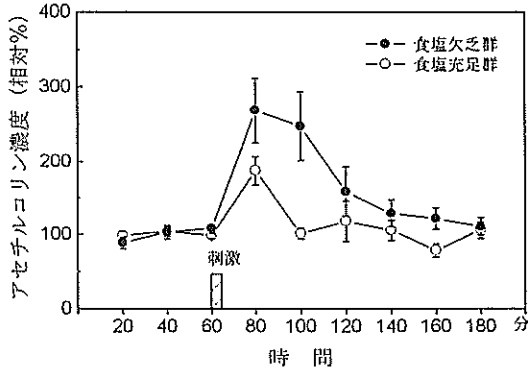


図3 食塩水摂取時の大脳皮質味覚野アセチルコリンレベル

このように、大脳皮質味覚野のアセチルコリンは嫌悪性味刺激時にも、動物が積極的に溶液を摂取する嗜好性味刺激時にも増加し、しかも動物の味覚行動反応と高い相関を示すことから、この部位のアセチルコリンの放出は口腔内外の感覚や運動と関連するものと思われる。現在のところ、食塩欲求に大脳皮質味覚野が積極的に関与するという実験的証拠はほとんどないが、本実験結果から、正常な食塩欲求行動の発現に大脳皮質味覚野のアセチルコリンが関与している可能性が示唆された。

#### 5) まとめ

以上の結果、結合腕傍核においては、食塩の味覚情報がとくに内側亜核で処理されること、また、動物の学習経験によって結合腕傍核ニューロンの食塩に対する感受性が鋭敏化することが明らかになり、食塩欲求時にもこの部位が重要な役割を果たしている可能性がさらに高まった。一方、食塩欲求の行動発現には結合腕傍核などの下位脳幹だけではなく前脳の関与も重要視されているが、本研究では味覚情報の最終投射部位である大脳皮質味覚野のアセチルコリンが嫌悪性ならびに嗜好性味覚行動の発現に関与していることをはじめて明らかにした。

#### 今後の課題と発展

本研究では、食塩欲求の中枢機構に関していくつかの重要な知見を得ることができた。しかし、

これらの知見は、食塩欲求の中枢機構という大きなシステムの中のごく一部を明らかにしたにすぎない。各脳部位の働きにしても、それぞれ異なる実験方法による結果からの推察であり、今後、個々の部位の役割に関して集中的に各種の方法を駆使し、様々な角度からその機能をさらに解明していく必要がある。

現在、味覚嫌悪学習により著明な変化が生じた結合腕傍核ユニット活動については、食塩欠乏時の変化の有無について継続して実験中である。また、神経化学的研究についても、アセチルコリンとグルタミン酸を同一のサンプルから回収・分析して、2つの物質の変化パターンを比較検討する試みに着手しており、味覚情報処理に係る伝達物質間のダイナミクスを明らかにできるものと思われる。

このような研究の発展により、食塩欲求に関与する脳内機構の解明が一層深まるだけでなく、味覚に関する動機づけ、つまり快・不快や好き・嫌いなどの行動発現メカニズムの理解に大きく貢献するものと思われる。

#### 発表論文リスト

- 志村 剛, 山本 隆 脳内微小透析法によるラット島皮質味覚野のアセチルコリンレベルの測定: 嫌悪性味刺激による促進. 日本味と匂学会誌 (1994) 1:286-288
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sakai, N., & Ozaki, N. Representation of hedonics and quality of taste stimuli in the parabrachial nucleus of the rat. *Physiol. Behav.* (1994) 56: 1197-1202
- Shimura, T., Suzuki, M. & Yamamoto, T. Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Res.* (1995) 679 :221-226
- 志村 剛 食塩摂取行動の発現機構. 大阪大学人間科学部紀要 (1995) 21: 175-197
- Shimura, T., Tanaka, H. & Yamamoto, T. Modification of gustatory responses in parabrachial units of rats after taste aversion learning. *Jpn. J. Physiol.* (1995) *in press*
- 志村 剛 食塩欲求時のラット大脳皮質味覚野のアセチルコリンレベル. 動物心理学研究 (1995) *in press*