

9023 食塩摂取亢進時におけるサルの食塩弁別能と大脳皮質味覚野ニューロン活動

小川 尚(熊本大学)

(目的) アンジオテンシンII (AII) など薬物の脳室内注入で、副腎皮質摘除あるいは食塩摂取制限を行ったと同様に、動物に一過性にはあるが食塩摂取亢進を起こすことができる。しかし、ヒトに近いサルで、食塩摂取亢進がおこる神経機構について味覚生理の側から調べた研究はない。我々は、前年度、ニホンザルに食塩と水の弁別タスクを学習させ、正答率や反応時間が食塩の濃度に依存すること、脳室内にA-IIを注入すると、A-IIの濃度に依存して閾値付近の食塩に対する正答率や反応時間が一過性に变化し、対照として食塩水を注入して場合と全く逆の反応を呈することを見出した。90年度は、右側の大脳皮質味覚野を覆うようにエバーツ型シリンダーを取りつけ、大脳皮質味覚野とその周辺からニューロン活動を記録し、食塩・水弁別GO/NOGO タスクに関連したニューロンに対するAII脳室内投与の影響を調べた。また、1台の16ビットのマイクロコンピュータでタスクのコントロールとデータの収集・解析を行う「モンキー味覚刺激解析装置」を開発した。

(方法) 前年度水と食塩水の弁別GO-NOGO タスクを学習させた2頭のニホンザル(*macaca fuscata*)を用いた。手掛かり刺激として約0.5cc の0.3M食塩水または水を与え、食塩(GO刺激)に対してサルがレバーを押せば報酬として約0.5cc の0.3M蔗糖を与え、水(NOGO刺激)に対してはレバーを押さずにいると報酬を与えた。学習の成立した2頭のサルをネンブタールとケタラールで麻酔し、右側の前頭弁蓋部皮質を覆うようにエバーツ型シリンダーを取りつけた。微小タングステン電極を右側前頭弁蓋部に刺入し、神経インパルスを5Vのパルスに変換し、モンキー味覚刺激解析装置に入力し、データの収集と解析を行った。5 μ g のAII (PEPTIDE INST., HUMAN) を脳室内に注入して、食塩水と水の弁別に対する影響を調べた。

(結果) 手掛かり刺激である水か食塩に特異的に応答したニューロン、レバー押し時に特異的に応答するニューロンや試行間のみ神経インパルス頻度が増大するニューロンなどタスク関連ニューロンを記録することが出来た。タスク関連ニューロンを見出した時点で5 μ g のアンジオテンシンIIをサルの脳室内に注入し、当該ニューロン活動に対する影響を調べた。手掛かり刺激に応答するニューロンのうち、AII投与により一過性に同刺激に対して応答が増加するものがみられた。AII の脳室内投与で活動の変化を来すニューロンが前頭弁蓋部に見出されたことは、視床下部に存在するアンジオテンシンII受容ニューロンから前頭弁蓋部へ投射があることを示唆している。

9023 食塩摂取亢進時におけるサルの食塩弁別能と大脳皮質味覚野ニューロン活動

小川 尚 (熊本大学)

1. 研究目的

副腎皮質不全症患者や副腎皮質摘除あるいは食塩摂取制限を受けた動物は、食塩水を好んで摂取する。また、アンギオテンシンII (AII) など薬物の脳室内注入で一過性に食塩摂取亢進を起こすことができる。食塩摂取欲(sodium appetite) 亢進のラットでは、味覚神経の1つである鼓索神経中の食塩感受性線維の食塩に対する応答が減少し (Contreras and Frank 1979)、更に脳内の第1次味覚中継核である弧束核では糖感受性ニューロンの食塩に対する応答性の増大 (Jacobsら1988) が生じていて、食塩を甘いと感じて摂取している可能性が示唆されている。一方、ヒトに近いサルでは食塩摂取欲亢進時の食塩感受性ニューロンなどの応答性の変化はまだ調べられていず、食塩の味が変化するの否が判っていない。

我々は、89年度の研究で、ニホンザルに食塩と水の弁別タスクを学習させ、正答率や反応時間が食塩の濃度に依存すること、脳室内にアンギオテンシンII (A-II) を注入すると、A-IIの濃度に依存して閾値付近の食塩に対する正答率や反応時間が一過性に变化し、対照として食塩水を注入した場合と全く逆の反応を呈することを見出した。

90年度は、右側の大脳皮質味覚野を覆うようにエバーツ型シリンダーを取りつけ、このシリンダーを介して、大脳皮質味覚野とその周辺からニューロン活動を記録し、食塩・水弁別GO/NOGOタスクに関連したニューロンに対して生理的食塩水およびアンギオテンシンIIの脳室内投与の影響を調べた。従来、タスクのコントロールは8ビットのマイクロ・コンピュータで行い、データ収集は一旦データレコーダに記録した後、ミニコンピュータで解析していたが、しかし、解析を迅速にするために、1台の16ビットのマイクロ・コンピュータでタスクのコントロールとデータの収集・解析を行えるように「モンキー味覚刺激解析装置」を開発した。

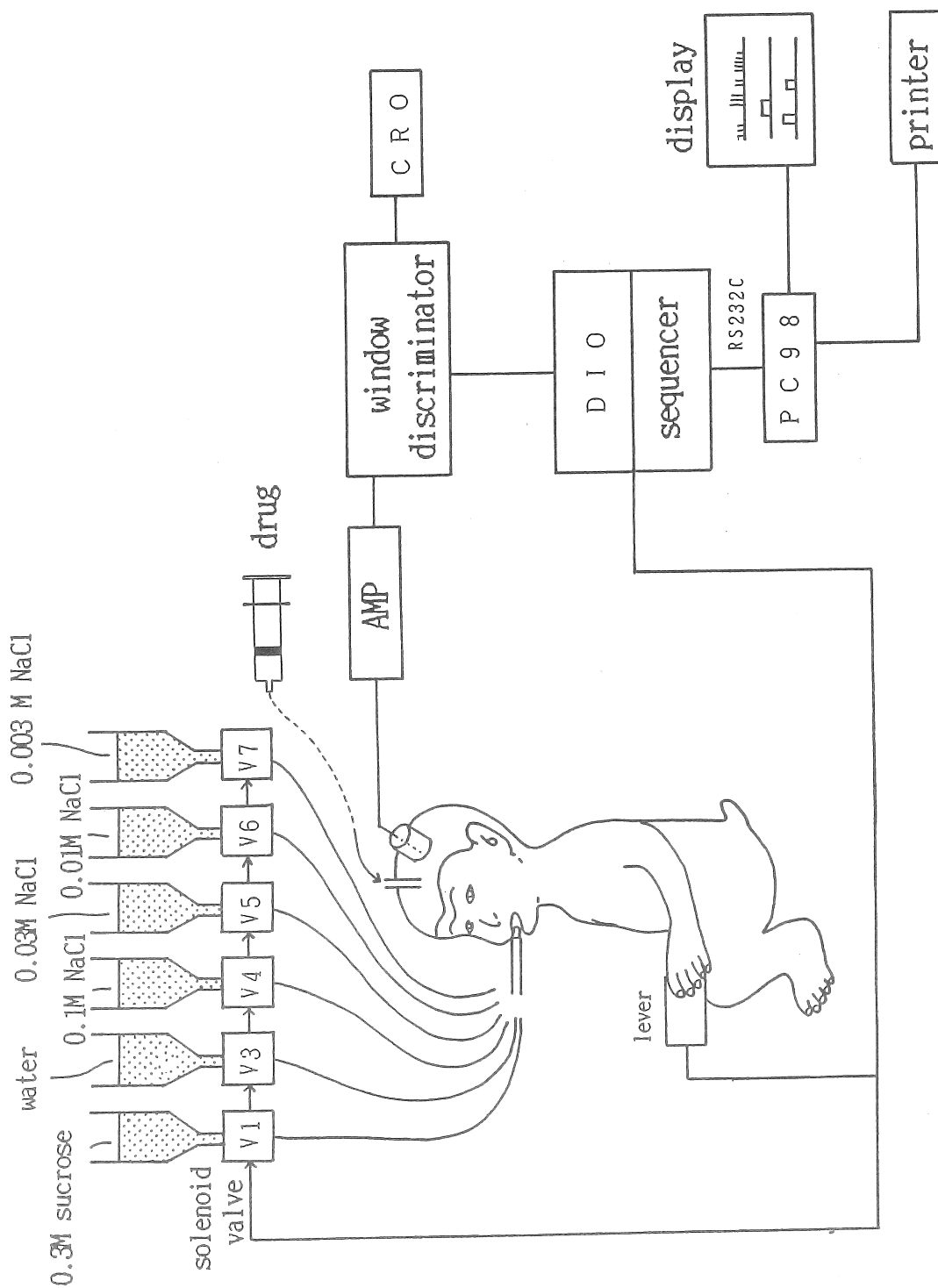
2. 研究方法

2.1 動物

前年度水と食塩水の弁別GO-NOGOタスクを学習させた2頭のニホンザル(*macaca fus-cata*) を用いた。

水と食塩水の弁別GO-NOGO (オペラント条件付け) タスクについては、詳しくは前年度

Fig. 1



の報告書を参照されたい。以下に、同タスクの概要を説明する。手掛かり刺激として約0.5ccの0.3M食塩水または水を与え、食塩(GO刺激)に対してサルがレバーを押せば報酬として約0.5ccの0.3M蔗糖を与え、水(NOGO刺激)に対してはレバーを押さずにいると報酬を与えた。水や溶液はソレノイドバルブを介して与え、ソレノイドバルブの開閉とそれからレバー押しまでの反応時間は、16ビット・パーソナルコンピュータ内蔵のモンキー味覚刺激解析装置(図1)で制御・計測を行った。同弁別行動中のサルの表情はビデオカメラで撮影し観察した。

サルは行動実験セッション中に約200-400ccの水を摂取し、ホームケージに戻って約1時間で最大500ccの水を飲ませた。それ以後は、翌日の実験まで水を与えなかった。

2.2 外科的手術

学習の成立した2頭のサルをネンブタールとケタラールで麻酔し、無菌的に頭蓋骨の1部を除去し、右側の前頭弁蓋部皮質を覆うようにエバーツ型シリンダーを取りつけた。手術より回復した後、上述の食塩と水のGO/NOGOタスクを再学習させた。

2.3 大脳皮質ニューロン活動の記録

エバーツ型シリンダーにX-Yステージを取りつけた。先端を除いて絶縁塗料を塗った微小タングステン電極(先端約0.1Mミクロン、抵抗5Mオーム)をマイクロマニピュレータに取り付け、右側前頭弁蓋部に刺入した。電極は高入力抵抗前置増幅器と結合し、その出力はオシロスコープへ入力し、波形を観察すると共に、ウインドウ・ディスクリミネータにより希望の波高の神経インパルスを5Vのパルスに変換し、モンキー味覚刺激解析装置に入力した(図1)。

2.4 薬物等の脳室内投与

生理食塩水(薬物の溶媒)および5 μ gのアンギオテンシンII(PEPTIDE INSTITUTE, HUMAN)を20-40 μ l/5分の速度で脳室内に注入して、食塩水と水の弁別に対する影響を調べた。

2.5 データの収集と解析

モンキー味覚刺激解析装置によりタスクの制御と同時に、レバー押しの時間並びに大脳皮質単一ニューロン活動(神経インパルス)の収集を行った。タスクの各試行のスタートパルスを基点として、水や食塩水の手掛かり刺激の時間、レバー押し時間、神経パルス発生時間を1ミリ秒の分解能で計測し、ディスクットに保存した。実験中、オンラインでディスプレイ上に神経インパルス発射頻度(ビン幅100ミリ秒)、レバー押しの時間、手掛かり刺激時間、報酬投与時間を表示した。手掛かり刺激からレバー押しまでの時間(すな

Fig. 2

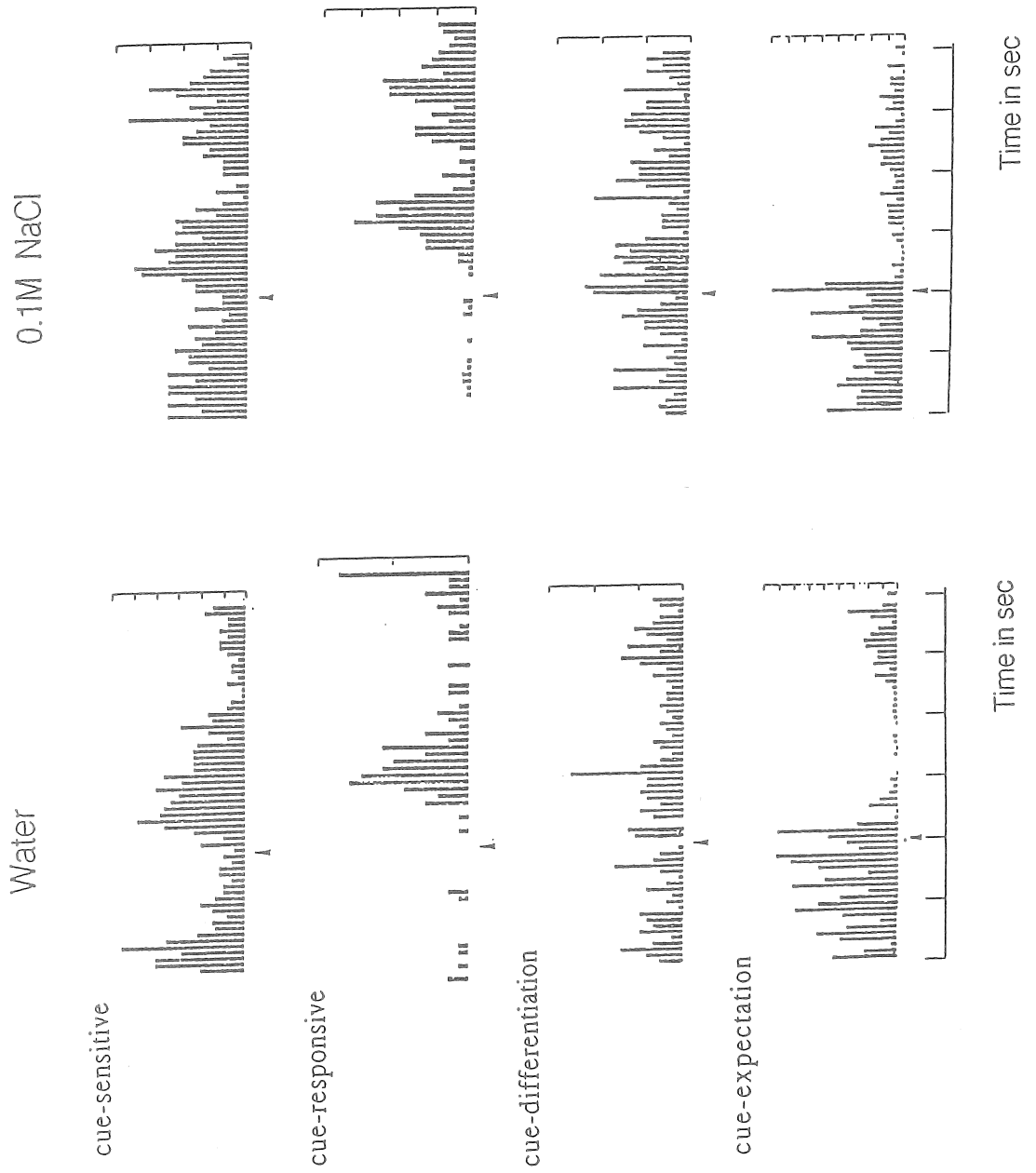
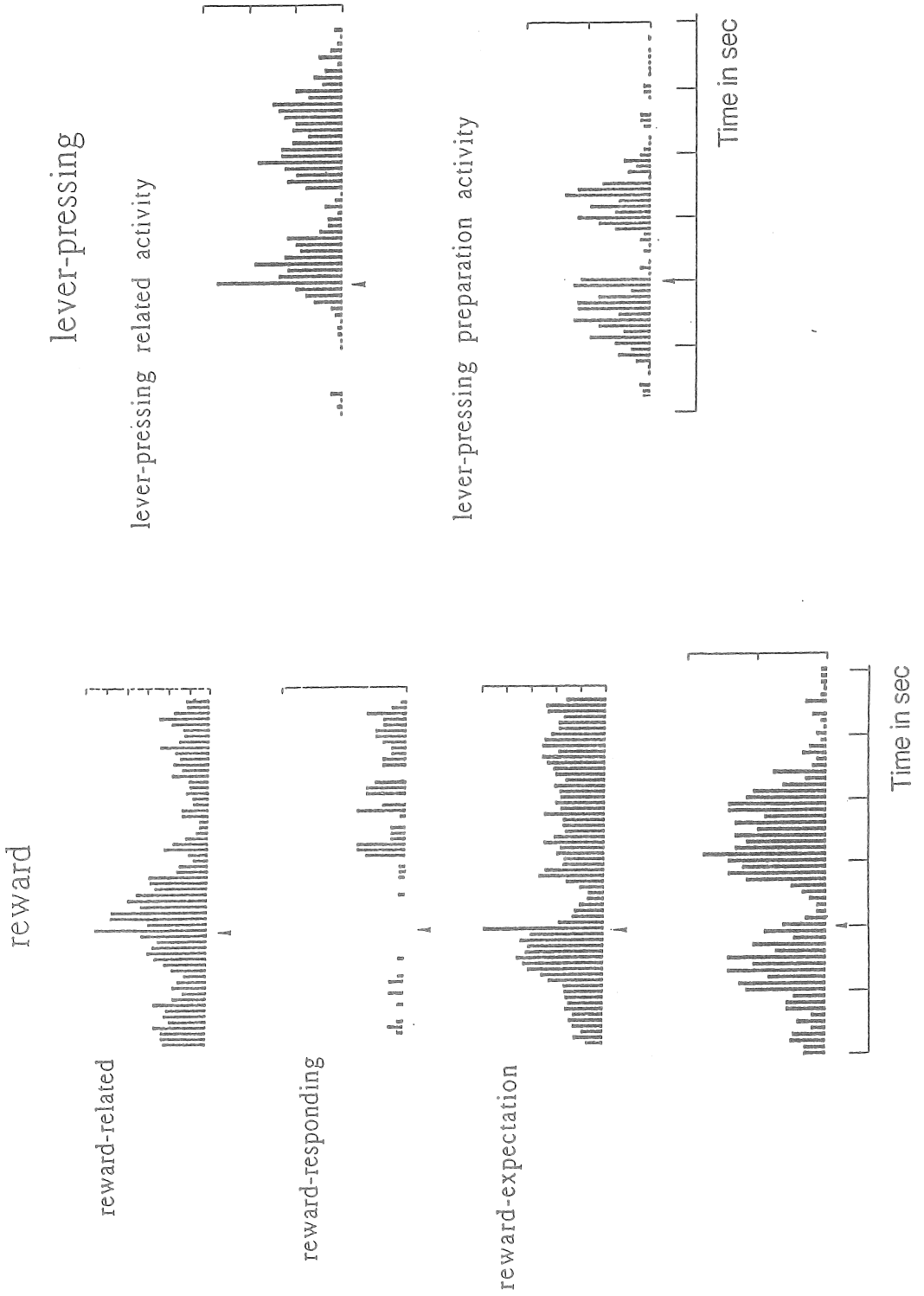


Fig. 3



はち、反応時間)は1試行ごとにプリンターに打ち出した。

実験終了後、タスクに関連のあるニューロンのデータをディスクから読みだし、手掛かり刺激、レバー押し、あるいは報酬との関係をパーソナルコンピュータで調べた。

3. 研究結果

3.1 タスク関連ニューロン

サル大脳皮質前頭弁蓋部より、食塩と水のGO/NOGO 弁別タスクに関連したニューロン (タスク関連ニューロン) を135個記録した。

手掛かり刺激に対する応答5型を区別した(図2)。すなはち、(1) 同応答が onsetと同時に且つ手掛かり刺激の種類に依らずに同じ大きさで生じるもの(cue-sensitive:37.8%)、(2) 応答潜時が200 ミリ秒以上あって(1)と同様の性質を示すもの(cue-responsive:23%)、(3) 水と食塩水に対して応答の大きさや時間経過が異なるもの(cue-differentiation:32.6%)、(4) 高い自発放電があって手掛かり刺激で持続性の抑制を受けるもの(cue-expectation:2.2%)、および手掛かり刺激に全く応答しないもの(4.4%)である。

一方、味覚と関連のある報酬に対する応答として、基本型4種、その組み合わせ2種を区別した(図3、左)。すなはち、(1) 報酬時に高い応答を示すもの(reward-related:40%)、(2) 200ミリ秒以上の潜時があって応答のあるもの(reward-responsive:20%)、(3) 報酬前の放電レベルが高く報酬が与えられるとその放電レベルが低下するもの(reward-expectation:11.9%)、(4) (1)と(2)の組み合わせ(reward-sensitive and -responsive:15.6%)、(5) (3)と(2)の組み合わせ(reward-expectation and -responsive:5.9%)、および(6) 報酬に反応しないもの(5.7%)である。

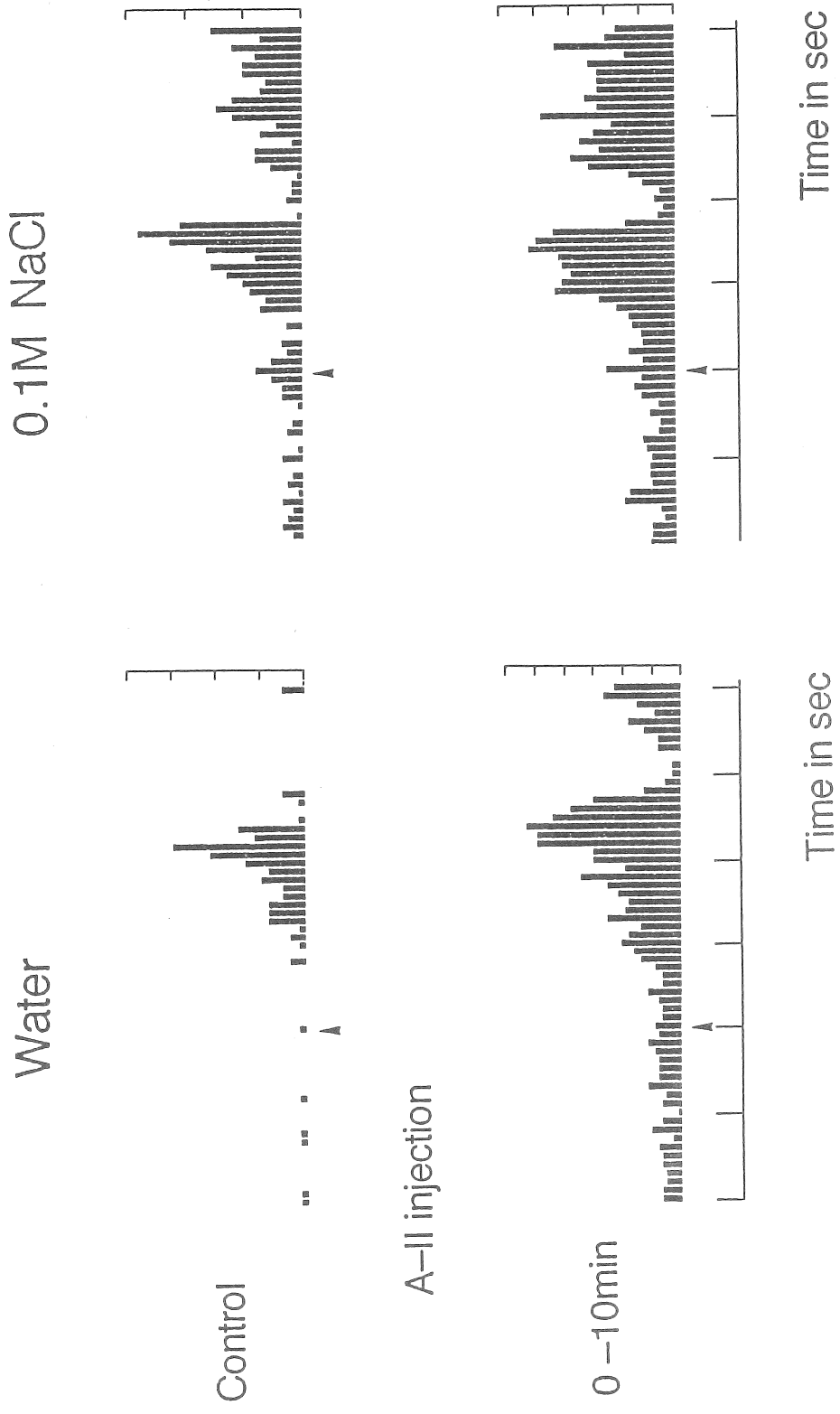
また、レバー押しに関連する活動として3型を区別した(図3、右)。すなはち、レバー押し時に高い放電は活動を示すもの(lever-pressing related:52.6%)、レバー押し前に高い放電レベルが継続していてレバーを押すと放電レベルが低下するもの(lever-pressing preparation activity:26.7%)、および何の反応も無いもの(20.7%)であった。

3.2 アンギオテンシンIIの脳室内注入の影響

前回我々は、アンギオテンシンIIを20 μ lの生理食塩水に5 μ g溶解し、5分間で脳室内に注入してサルの食塩と水のGO/NOGO 弁別タスクに対する影響をみると、アンギオテンシンIIはサルの食塩に対する反応時間と正答率を濃度依存性に変化させ、5 μ gで最大の変化を生じることが判った。本研究では、従って、タスク関連ニューロン22個について、5 μ gのアンギオテンシンIIをサルの脳室内に注入し、手掛かり刺激に対する活動への影響を調べた。7例については30分薬物の影響を観察できた。

手掛かり刺激に応答するニューロン(21個)のうち、アンギオテンシンII投与により応答の時間パターンの変化するもの4例、応答の大きさが変化するもの10例(図4)、潜時が

Fig. 4



短くなるもの1例が見出された。また、自発放電が7例で増加した（図4）。2個のcue-expectation neuronは何れも自発放電が増加し、抑制も強くなり、expectationの増大が示唆された。cue-sensitive neurons 6例中5例は何らかの変化を示し、応答のphasic化、応答の増大、減少等を来した。cue-responsive neurons 7例中6例も応答の変化を生じ、応答のphasic化、応答の増大または減少、潜時の短縮などを来した。また、cue-differentiation neurons 6例中4例が応答の変化を生じ、応答のtonic化、応答の減少を生じた。応答の変化は片方の手掛かり刺激にのみ生じたものが5例あった。この中、応答の増加した2例は水応答に対してのみ、また応答の減少した3例中2例は食塩に対してのみ生じた。これらの応答の変化は30分後に元に戻ったもの1例、10分後に元に戻ったもの1例を除き、多くの例では実験中回復が認められなかった。

4. 考察

4.1 モンキー味覚刺激解析装置の作成

タスクの制御とデータの収集解析を同一の装置で行う為、表記装置を作成した。助成金申請時に想定していた、装置の基本となるパーソナルコンピュータに本研究の精度をカバー出来ないことが作成開始時に判明し、急速パーソナルコンピュータの種類等を変更した。このため、作成に予想以上の時間と費用を費やした。昨年度末に、サルの頭蓋骨左側にエバーツ型シリンダーを装着して、ニューロン記録に備えていた。しかし、実際の記録までに時間が長く経過したため、脳硬膜が肥厚し、電極の刺入が困難となり、頭蓋骨の右側にシリンダーを付け、右側の皮質からのみ記録を行うはめになった。

タスクの制御とデータの収集は、本装置で充分行えることが実験に使用してみて判明した。

4.2 タスク関連ニューロンとアンギオテンシンIIの影響

サルの大脳皮質前頭弁蓋部で、手掛かり刺激、報酬やレバー押しなどタスクに関連したニューロンを記録した。このようなニューロンが記録できることは、以前我々（伊藤と小川1988）が報告している。

本研究ではアンギオテンシンIIを脳室内に投与して手掛かり刺激に対する応答性の変化を調べ、21例中71.4%に応答の変化を見出すことができた。時間経過のは主としてphasic化し、応答は減少する傾向にあった。しかも水応答は増大し、食塩応答は減少する傾向にあった。前回の報告で、アンギオテンシンII投与後10分前後で低濃度の食塩に対する正答率が減少したが、本所見はこれに見合うものかもしれない。今回は、低濃度食塩に対するニューロン活動の変化をまだ解析していないので結論は出せない。トライアル間での自発放電の増加が見られたが、特にcue-expectation neuronで顕著であった。このことは、アンギオテンシンIIで手掛かり刺激に対するattentionが高まることを示している。

ニューロン記録部位の組織学的検索はまだ行ってないので、タスクニューロンの種類とその記録部位との関係や、アンギオテンシンII投与で影響を受けるニューロンの記録部位を明らかにすることは出来ない。ただし、本研究は視床下部のアンギオテンシンII受容ニューロンから前頭弁蓋部へ投射があることを示唆している。Rollsら(1990)は血中グルコース濃度に影響をうける味覚ニューロンは前頭弁蓋部にはなく、彼らの2次味覚野である眼窩野外側部にしかないと報告している。従って、今後記録ニューロンの数を増やすと共に記録部位の確定を行っていききたい。

5. 今後の課題

大脳皮質味覚野、前頭眼窩野などから少数のニューロン活動を記録し、アンギオテンシンIIの脳室内投与に伴う、食塩に対する応答、食塩と水の弁別GO-NOGO タスク中の活動の変化を調べた。アンギオテンシンII投与に伴う食塩閾値、食塩と水の弁別能の変化を説明できるだけのデータを集める必要がある。

本研究で用いたタスクを改良して、正常人および血中アンギオテンシン値の上昇を伴う高血圧患者とで食塩閾値や反応時間に差異があるか否かを調べてみたい。

Effects of increased sodium appetite on neural activities in the gustatory cortex of monkeys during the salt-water discrimination GO-NOGO task.

-Possible modification of activities of cortical taste neurons in monkeys by intraventricular administration of angiotensin II-

Hisashi Ogawa, Shin-ichi Ito, Miki Ohgushi and *Hirotohi Ifuku
Department of Physiology, Kumamoto University Medical School, and
*Department of Health and Physical Education, Faculty of General
Education, Kumamoto University.

Summary

Two Japanese macaques (*Macaca fuscata*), who had been trained to perform a salt-water discrimination GO-NOGO task the last year, were used. In this task, 0.1 M NaCl (0.5cc) given to the mouth was a cue for lever pressing (GO task), and water (0.5cc) a cue for a NOGO task. For the correct response the monkey received 0.3 M sucrose (0.5cc) as a reward. Evarts-type cylinders were aseptically implanted on the skull under anesthesia with nembutal and ketamine. A 16 bit microcomputer-based device was developed to control the task and collect neural data from cortical neurons and reaction times from cues to lever pressing.

Several types of task-related neurons were obtained from the frontal operculum of the monkeys. Some differentially responded to different kinds of cues, i.e., NaCl or water. Effects of intraventricular administration of angiotensin II (AII; Peptide Institute, human, 5 μ g in 20 μ l/5 m) were studied on the activities of the cortical neurons. Some of the task-related neurons changed the response magnitude to cue stimuli for a short period after the AII administration. A tendency was noted that water responses were increased, while NaCl responses decreased. This may conform to the finding obtained the last fiscal year that monkeys could not differentiate low concentrations of NaCl from water after the treatment. Spontaneous discharges during the trial intervals were also increased which suggests increased attention of monkeys to cue-stimuli.

It is desired to record much more neurons from the frontal operculum of the monkeys during the GO/NOGO task, and to histologically locate the task-related neurons modified by intraventricular administration of AII. This can lead to clarification of the neural mechanism by which intraventricular AII causes behavioral changes in NaCl-water discrimination task disclosed the last fiscal year.