

9028 食塩嗜好の中枢機序におけるナトリウムや浸透圧に感受性を有するニューロンの役割

大坂 寿雅(産業医科大学)

生体における塩や水分の調節は脳が統御している。とりわけ前脳の基底部にある視床下部の中には体液の浸透圧を感知するニューロンが存在し、このニューロンの働きを中心として塩や水分に関する摂取や排泄の反応の中枢性調節が行なわれるものと想定されている。本研究は食塩嗜好の中枢機構における浸透圧感受性ニューロンの役割を明らかにすることを目的として、動物が食塩水を飲んでいときのニューロン活動を電気生理学的に調べた。浸透圧感受性ニューロンは視床下部の中の外側視束前野に比較的多いことがこれまでの研究から分かっているので、この部位のニューロンについて調べた。また、浸透圧に対する感受性がないニューロンについても食塩水を飲むときの反応について調べ、外側視束前野のニューロンの総合的な食塩嗜好における役割を調べた。また比較的目的で蒸留水や砂糖水を飲んだときの反応についても調べた。

実験には頭部固定装置用アダプターを頭蓋骨に慢性的に装着したラットを用い、脳定位固定装置に半拘束にした状態で溶液(食塩水、蒸留水、砂糖水)を飲むように訓練した。単一ニューロンの活動電位を記録し、その活動頻度と溶液の摂取行動との対応を解析した。合計204個の外側視束前野のニューロンの活動を調べた結果、食塩水を飲んだ時に何らかの反応を示したニューロンは30%あり、蒸留水を飲んだ時には41%あり、砂糖水を飲んだ時には23%のニューロンが反応した。このうち、特定の溶液を飲んだ時にのみ反応したニューロンは、食塩水に対しては3例、蒸留水に対しては11例、砂糖水に対しては1例見つかった。したがって、調べた外側視束前野のニューロンのなかでは蒸留水を飲むときに特異的に反応するニューロンが最も多かった。ニューロンの浸透圧感受性については、記録したもののうち66個について調べることができた。このうち4個は高浸透圧の溶液によって興奮する高張型のニューロンであり、11個は低浸透圧の溶液によって興奮する低張型のニューロン、残りの51個は浸透圧変化によって影響を受けないニューロンであった。このうち高張型のニューロンの一つは食塩水を飲んだ時に抑制されるが蒸留水や砂糖水を飲んだ時には反応しない食塩特異的ニューロンであった。しかしながら、浸透圧感受性ニューロンの中にも蒸留水を飲んだ時に特異的に興奮するニューロンの方が多く、外側視束前野のニューロンは食塩嗜好ではなくて飲水の調節に関与しているということが示唆された。

9028 食塩嗜好の中枢機序におけるナトリウムや浸透圧に感受性を有するニューロンの役割

大坂 寿雅 (産業医科大学)

1. 研究目的

前脳の基底部にある視床下部の中には体液の浸透圧を感知するニューロンが存在する。浸透圧感受性ニューロンは溶質の種類にかかわらず溶液の浸透圧に反応するが、なかでもナトリウムによく反応する。これは体液の浸透圧が変化する場合の多くは生体内においては事実上ナトリウム濃度が変化することを反映しているものと思われる。浸透圧感受性ニューロンは塩や水分に関する摂取や排泄の中枢性調節に重要な働きをしているものと想定されている。しかしながら、水や塩の摂取時に浸透圧や塩に感受性のあるニューロンの活動を記録した研究はこれまでになされておらず、食塩嗜好の中枢神経機構には不明な点が多い。浸透圧感受性ニューロンは視床下部の前域に散在しているが、この中でも外側視束前野には浸透圧感受性ニューロンが比較的多く存在する。そこで、食塩水を飲んでいる動物のこの部位のニューロン活動を調べることで食塩嗜好の中枢性機序においてナトリウムや浸透圧に感受性のあるニューロンの役割を明らかにすることを試みた。また、浸透圧感受性がない外側視束前野のニューロンについても食塩水を飲んでいる時の反応を調べ、この部位のニューロンが総合的に食塩嗜好にどのように関わっているかを明らかにすることを試みた。また比較の目的で蒸留水や砂糖水を飲んだときの反応についても調べた。

2. 研究方法

ウィスター系雄ラット (体重 280-370 g) を用いた。動物は個別に飼育し、神経活動記録の前日をのぞいて、餌と水は自由に摂取できるようにした。手術時はネブタール (60 mg/kg) 麻酔下に脳定位固定装置に頭部を固定し、頭皮切開して頭蓋骨を露出した。十字縫合を中心に直径約 4mm の範囲の頭蓋骨をドリルで削り取り、神経活動記録用の電極の刺入ができるよう開口部を設けた。覚醒時に頭部を固定するためのアダプターを歯

科用の樹脂で作り頭部に装着した。手術終了後、頭蓋骨の開口部は抗生物質の入った軟膏を塗布し、脳を保護するために歯科用シリコン樹脂で覆った。

手術から約1週間たち手術侵襲の影響が収まった後に、半拘束の状況下で動物が溶液を飲むように訓練を開始した。動物は慢性実験用の頭部固定装置に取り付け半拘束にした。この状況下でラットが小型の柄杓 (liquid dipper 容量 20 μ l) から 9% 砂糖水を飲むように訓練した。Fig. 1 に動物および実験の模式図を示す。溶液を汲み上げる

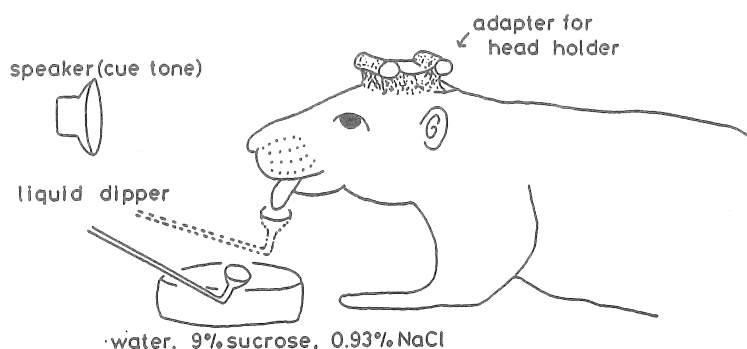


Fig. 1. Diagram of experiment. Rats were prepared for chronic recording by implanting an adapter for a head holder. The rat was trained to lick when the liquid dipper was automatically placed close to its mouth. Single unit activity of neurons in the lateral preoptic area was recorded by a multibarrel micropipette inserted through the hole in the adapter.

間留まり砂糖水を飲むことができるようにし、その後は動物から遠ざかるように設定した。溶液の提示は繰り返し行ったが、提示間隔を動物が学習して予期的に反応することを防ぐ目的で、間隔は 10-20 秒の間で手動で変化させるか、ランダムパルス発生器 (EX-601J、日本光電) を用いて、10 秒を基数とするランダムな間隔 (平均 17 秒) で行った。多くの動物は訓練の最初の日の 1 時間以内に、この状況下で砂糖水を飲むことを学習した。

その後、上述と同じ状況下で食塩水 (0.93%) または蒸留水も与えた。これらの3種類の溶液のうち、同一の溶液を約 20 回連続して与えて1セットとした。3種類の溶液を動物にランダムに提示したが、訓練の初期にはラットが最も好む砂糖水を頻繁に与えて、

前には、4
00 Hz の手
がかり音が
1.5 秒間
鳴り、その
後に柄杓が
動物に接近
して 0.5
秒間後に動
物が飲む
位置に到達
するように
した。この
合計 2 秒
間を手がかり期とした。
柄杓は動物
が飲む位
置に 2 秒

提示された溶液に対して摂取反応がより頻繁に起こるように強化した。ラットは溶液を舌でなめて摂取する。そこで動物の舌の動きを観察するために、舌が柄杓に触れる度におきる静電容量の変化を検出しパルス信号が発生する装置を用いて舌の動きを記録した。

ニューロン活動の記録を行う前日には動物に1晩水を与えないでおいた。記録直前に頭蓋骨の開口部を覆っていたシリコン樹脂を取り除き、この切開部から多連ガラス管微小電極を刺入してニューロンの活動電位を細胞外記録した。記録電極には等張の人工脳脊髄液に2% Pontamine sky blue 色素を加えた溶液を充填し、同じ液を充填した多連微小ピペットの中心管との間の電位差を差動増幅した。記録しているニューロンの浸透圧感受性を調べるために、記録電極に接着した多連ガラス管ピペットから高張および低張の人工脳脊髄液をニューロンの近傍に圧吐出法で投与した。

投与した溶液は以下の6種類を用いた。それは等張(296 mOsm/kg)の人工脳脊髄液、等張液のナトリウム濃度を30 mOsm/kg 減らした低張液、等張液にナトリウムかマンニトールか尿素を30 mOsm/kg 加えた高張液、等張液にグルタミン酸ナトリウムを1 mmol/kg 加えた溶液であった。尿素溶液は細胞膜を自由に通過するためにニューロンにとって有効浸透圧物質にならない物質であり、対照液として用いた。尿素溶液や等張の人工脳脊髄液に反応した場合も解析に含めなかった。

溶液は圧縮窒素ガスを用いてピペットから圧吐出した。圧力範囲は100 から 820 kPa であった。圧力は3方向電磁弁で制御し、ピペットから溶液を圧吐出しないときにはピペット内は大気に連絡させ、圧力がピペット内に残らないようにして、圧吐出が速やかに終了するようにした。

ニューロンの活動と溶液を飲んだときの行動反応はミニコンピュータ(ATAC-450 日本光電)を用い peri-event time histogram によって解析した。溶液を実際に飲んだ時について加算しヒストグラムを作成した。ヒストグラムは3つの期間に分けて、それぞれの期間での活動電位の発生数について解析を行った。3つの期間とは、手がかり刺激の前の2秒間の対照期と手がかり期の2秒間、さらに溶液の摂取期である2秒間についてであり、分散分析によりこれらの期間の活動電位発生数の差を調べた。期間の間の差は Newman-Keuls の方法で解析した。対照期と比較して、活動電位の発生数が有意に増加した期間は興奮反応とし、活動電位数が減少した期間を抑制反応とした。溶液を提示したが実際には飲まなかった試行、および、手がかりのみを提示し溶液は与えないようにした場合の試行についてもそれぞれ同様に解析を行った。

組織学的検索は実験終了後にラットをネブタール麻酔をして、記録時と同じ頭部固定装置に動物を固定し、ガラス管微小ピペットから色素(2% Pontamine sky blue)を電気泳動(5 μ A, 5 min)によって投与してマークした。その後、ホルマリンで固定し、凍結切片(厚さ 40 μ m)を作成し、中性赤で染色して記録部位の組織学的同定を行った。

3. 研究結果

全部で 204 個の外側視束前野のニューロンの活動をラットが溶液を飲んでいる時に記録した。このうち 66 個のニューロンについては浸透圧感受性を調べることができた。

4 個のニューロンは高張液を多連ピペットからニューロンへ投与すると活動電位の発生

頻度が増加するか、低張液の投与によって活動電位の発生頻度が低下する高張型のニューロンであった。11

個のニューロンは高張液の投与で活動電位頻度が減少するか、低張液の投与によって増加反応をする低張型のニューロンであった。残りの 51 個は浸透圧変化に反応しないニューロンであった。ラットは与えた 3 種類の溶液のうち砂糖水を最も好んで飲み、与えた 82% の場合は飲んだ。食塩水の場合には 65% であり、蒸留水の場合には 68% の場合に飲んだ (Fig. 2)。

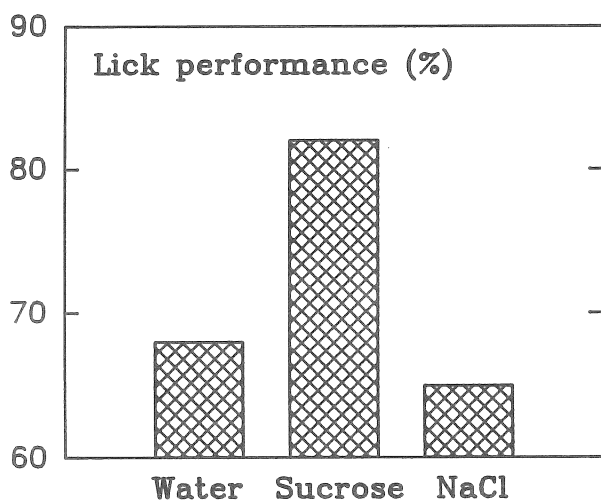


Fig. 2. Lick performance to water, 9% sucrose and 0.93% NaCl solution. Calculation was made by dividing the number of drinking responses by the number of trials.

3. 1. 食塩水摂取時の反応

ラットが食塩水を飲んでいるときに特異的に反応した高張型の浸透圧感受性ニューロンを Fig. 3 に示す。このニューロンに高張のマニトールを投与すると興奮し、低張液を投与すると再現性よく抑制された (Fig. 3A)。砂糖水を飲んだとき (Fig. 3B) や、蒸留水を飲んだとき (Fig. 3C) にはこのニューロンは反応しなかったが、食塩水を飲んだときには抑制された (Fig. 3D)。すなわち、このニューロンは脳内の浸透圧が高くなると興奮し、口腔内に食塩水が入ったときに抑制されるものであった。

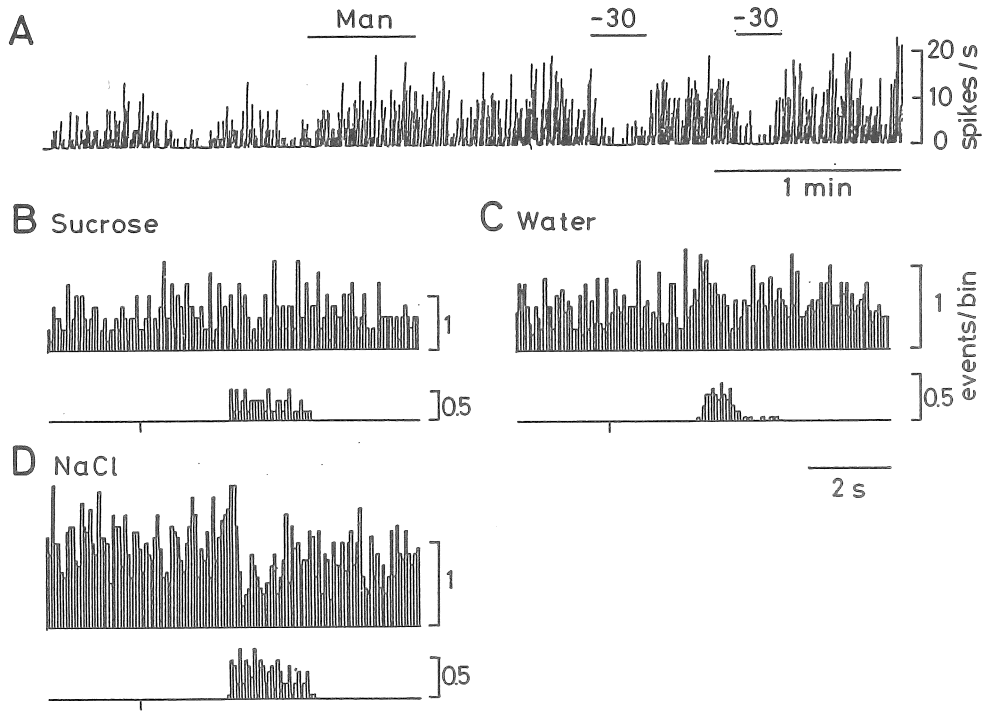


Fig. 3. (A) A ratemeter record of an LPO neuron, showing hypertonic-type responses. Abbreviations: Man, hypertonic solution by adding mannitol; -30, hypotonic solution by reducing NaCl. (B to D) Peri-event time histograms showing a specific response to the intake of NaCl solution. Time resolution was 70 ms/bin.

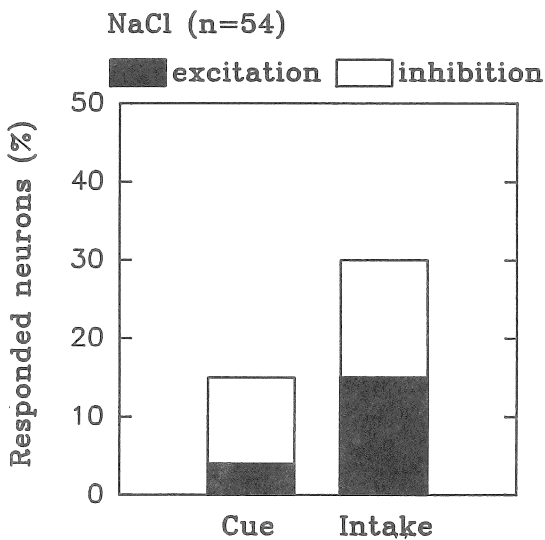


Fig. 4. Percentage of responded neurons to the intake of NaCl solution and the preceding cue tone.

全部で 54 個のニューロンの活動をラットが食塩水を飲んでいる時に記録した (Fig. 4)。このうち 16 個 (30%) はラットが食塩水を飲んだ時に興奮または抑制の反応をした。興奮したニューロンと抑制されたニューロンはともに 8 例づつの同数であった。手がかりの音刺激に反応したニューロンは 8 例 (15%) あり、6 例は抑制で 2 例は興奮だった。このうち 5 例ではその後に食塩水を飲んだ時にも反応した。しかしながら手がかり刺激に対する反応と飲んでいるときのニューロンの反応の方向に関しては相関は無かった。手がかり刺激に反応しないで食塩水を飲んだ時にのみ反応が起きた 12 例において反応の始まりはラットの舌が食塩水に触れるとほぼ同時であった。反応の持続時間は 2 秒間の飲める期間の始めの 1 秒で終わるものから、飲める期間が終わってからさらに 2 秒以上経たないと元の活動レベルに戻らないニューロンの例もみられて一定ではなかった。

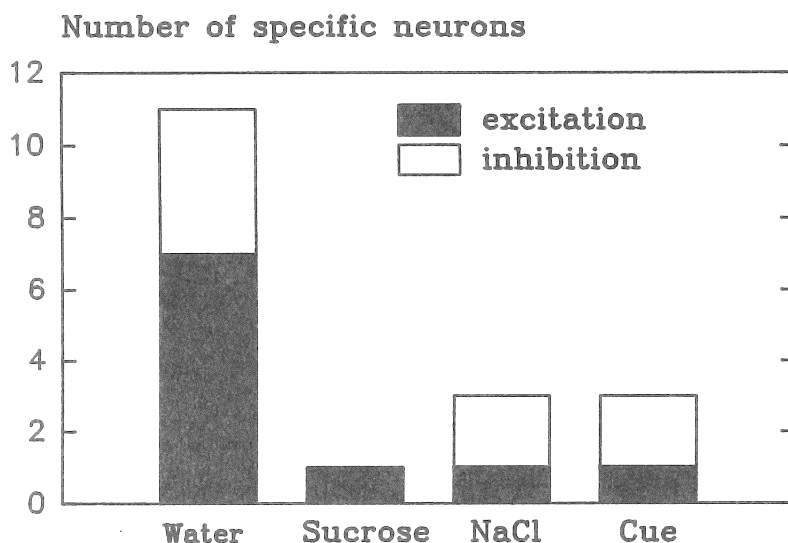


Fig. 5. Number of specific neurons to water, sucrose solution and NaCl solution, and cue tone.

食塩水を飲んだ時に反応したニューロンのうちで、31 個については蒸留水か砂糖水を飲んだときの反応も調べることが出来た。このうち 3 個のニューロンは蒸留水および砂糖水を飲んだ時には反応がなく、食塩水を飲んでいる時にのみ反応した食塩特異的ニューロンであった

(Fig. 5)。したがってこれらのニューロンは、液体の摂取に対する口腔内の機械的刺激や行動反応に伴う覚醒状態によって反応が起きたとは考えにくく、食塩水を飲んだことに対して特異的に反応したものであることが示唆される。さらにこの中の 1 つは高張型の浸透圧感受性ニューロンであった。

3. 2. 蒸留水摂取時のニューロンの反応

ラットが蒸留水を飲んだときには合計 85 個のニューロンの活動を記録した (Fig. 6)。蒸留水を飲んだ時に反応したニューロンは全体の 41% あり、食塩水や砂糖水を飲んだときよりも高率でニューロンは反応した。興奮反応と抑制反応はほぼ同数であった。手がかり刺激に反応したニューロンは 16% あり、抑制されたニューロン (12%) の方が興奮したもの (5%) より多かった。飲水時にのみ反応し、手がかり刺激には反応しないニューロンは 24 例 (28%) あり、逆に手がかり刺激にのみ反応するニューロンは 3 例 (4%) であった。手がかり刺激にも水飲み時にも共に反応しないニューロンが一番多く (55%) 見られ、また手がかり時に抑制されるニューロンは水飲み時にも抑制される傾向がみられた。

合計 73 個のニューロンについては蒸留水を飲んだときの他に、食塩水か砂糖水を飲んだときの反応も調べた。このうち 11 例については蒸留水を飲んだときのみ反応した水特異的ニューロンであった。

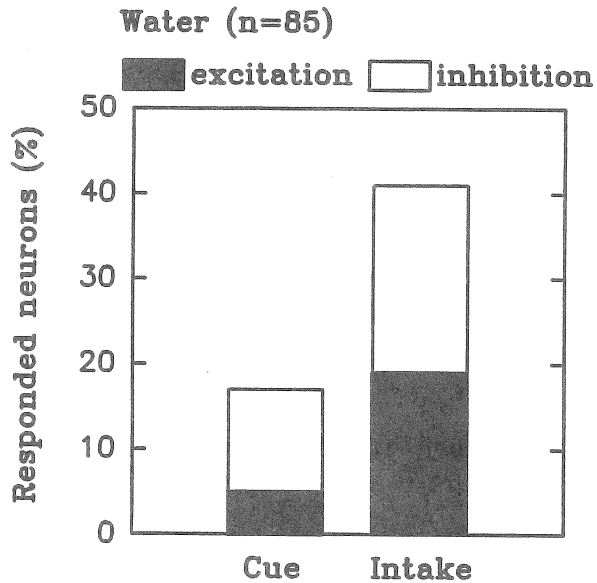


Fig. 6. Percentage of responded neurons to the intake of water and the preceding cue tone.

3. 3. 砂糖水摂取時の反応

砂糖水を飲んだときには 177 個のニューロンの活動を記録した (Fig. 7)。飲んだときにも手がかり刺激にも反応しないニューロンが一番多く 75% あった。砂糖水を飲んだ時に反応したニューロンは全体の 23% にすぎなかった。したがって、食塩水や蒸留水を飲んだ時に比べて砂糖水を飲んだ時に反応したものが一番少なかった。手がかり刺激に反応しないで、砂糖水を飲んだ時に反応するニューロンが 13%、逆のタイプのニューロンは 2% であった。

3. 4. 食塩水の摂取時の反応と蒸留水の摂取時の反応の相関

食塩水と蒸留水の両方も飲んだ時に単一ニューロンの活動が記録できた場合が 32 例あった。これらのニューロンの 75% は両方の溶液を飲んだ時に同じように反応した。すなわち、食塩水を飲んだ時に興奮したニューロンは蒸留水を飲んだ時にも興奮し、食塩水で抑制されるものは蒸留水でも抑制されるという相関が 7 例のニューロンでみられた。逆方向の反応をした場合はなかった。しかしながら、食塩水を飲んだ時には反応せず、蒸留水を飲んだ時にも興奮したニューロンも 5 例あった。

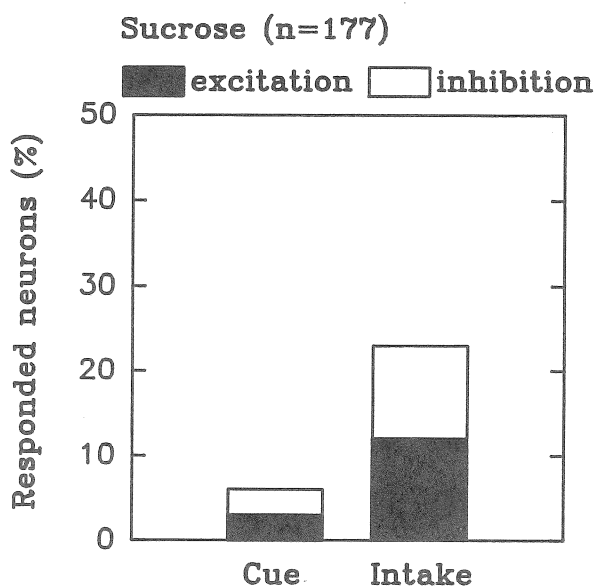


Fig. 7. Percentage of responded neurons to the intake of sucrose solution and the preceding cue tone.

3. 5. 食塩水の摂取時の反応と砂糖水の摂取時の反応の相関

食塩水と砂糖水の両方の摂取時に活動を記録したニューロンは 43 個あった。どちらの溶液を摂取するときも同方向の活動変化をしたニューロンは 10 個 (30%) であった。この場合も逆方向の反応をした場合はなく、反応の相関が認められた。

4. 考察

外側視束前野のニューロンの活動を記録し行動との対応を調べたうちで、食塩水を飲んだ時に何らかの反応を示したニューロンは 30% あり、蒸留水を飲んだ時には 41%、砂糖水を飲んだ時には 23% のニューロンが反応した。このうち、特定の溶液を飲んだ時にもみ反応したニューロンは、食塩水に対しては 2 例、水に対しては 5 例、砂糖水に対

しては1例見つけた。したがって、外側視束前野のニューロンでは水を飲んだときのみ特異的に反応するニューロンが最も多く、この部位が飲水行動の中枢機構に重要であるという仮説が支持される。

食塩嗜好の中枢機構において、食塩水を飲むときに特異的に反応するニューロンは重要な役割を果たしていることが考えられる。ことに浸透圧に感受性を有するニューロンがこのような特異的な反応をした場合には、このニューロンは食塩嗜好において何らかの役割を担っていると考えられる。しかしながら、今回の研究においてはそのような食塩水特異的な浸透圧感受性ニューロンは調べた外側視束前野には1例しか見いだすことができなかった。したがって外側視束前野のニューロンが食塩摂取に重要であることは考えにくい。しかしながら、外側視束前野以外の部位に存在する浸透圧感受性ニューロンが食塩嗜好に重要である可能性は依然として残されており、今後は食塩嗜好に関与することが推定されている不確帯や第三脳室前壁部のニューロンを調べる必要がある。

異なった種類の溶液を摂取したとき、および手がかり刺激時に多くのニューロンは同じように反応した。したがって、外側視束前野ニューロンの一部には溶液に特異的に反応するニューロンはあるものの、多くのニューロンの反応は溶液に対する口腔内の機械的受容器を介する非特異的なものである可能性や動物の覚醒状態による反応の可能性は否定できない。しかしながら、行動反応として溶液を飲んだ確率が最も低かった蒸留水の場合に神経反応は最も高率で起きたことから、外側視束前野のニューロンの少なくとも一部には水の摂取行動に密に関連したものがあることが考えられる。

Activity of osmosensitive neurons in the lateral preoptic
area during the intake of salt solution

Toshimasa Osaka and Hiroshi Yamashita

Dept. of Physiol., Univ. of Occup. and Environ. Health

Summary

Osmosensitive neurons in the hypothalamus are considered to have a cardinal role in the central control of body water and salt homeostasis. In the present study, we recorded activities of osmosensitive neurons in the lateral preoptic area (LPO) of the hypothalamus during drinking water, 0.93% NaCl, and 9% sucrose solution. Non-osmosensitive LPO neurons were also recorded for comparison.

Adult male rats of Wistar strain were trained to drink under partial restraint with a head holder. During drinking behavior, activities of 204 LPO neurons were extracellularly recorded with a multibarrel pipette. Of these, neurons responded (excited or inhibited) to water were most frequent (41%). On the other hand, neurons responded to sucrose and NaCl solutions were 23% and 30%, respectively. Eleven neurons specifically responded to water. In contrast, 1 neuron was sucrose specific and 3 neurons were NaCl specific. Artificial cerebrospinal fluids with various physiological osmolality were ejected from the multibarrel micropipette to immediate vicinity of recorded neurons. Of 66 neurons tested, 4 were excited by hypertonic solutions or inhibited by hypotonic solutions. They were designated as hypertonic cells. Eleven neurons were excited by hypotonic solutions and inhibited by hypertonic solutions, and designated as hypotonic cells. Other 51 neurons were non-osmosensitive cells. One hypotonic cell specifically inhibited during intake of NaCl solution. However, water specific neurons were more frequent (n=3) than the NaCl specific neurons among osmosensitive neurons. These data suggest that the LPO is involved in the central mechanisms of thirst, but not those of sodium appetite.