

9350 食塩摂取時の味覚情報処理と嗜好性発現に關与する中枢神経機序

助成研究者:山本 隆(大阪大学 人間科学部)

共同研究者:志村 剛(大阪大学)

裕 哲崇(大阪大学)

食塩(NaCl)は基本味の1つである塩味を呈する代表的な物質である。また、食塩は、低濃度から高濃度にわたってその味の質にはほとんど変化がないが、等張濃度以上になると、その味を嫌悪するようになる。塩味は中枢神経系において他の基本味とはどのようなメカニズムで識別されるのであろうか、また、濃度変化による嗜好性変化はどのようなしくみで生じるのであろうか? このような疑問に答えるため、本研究では、ラットが食塩を含む種々の溶液を摂取したとき、第二次味覚中継核である結合腕傍核(parabrachial nucleus: PBN)において、味覚応答性ニューロンの機能的局在分布が認められるか否かを調べることにした。細胞活動の機能的マッピング法には、発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する方法を用いた。c-fosは細胞性癌遺伝子のひとつで、ニューロンが興奮し、脱分極性のカルシウム流入が生じると、このc-fosが急速に誘導され、核内にFOS蛋白質が産生されることが知られている。

0.2M NaCl水溶液を1時間呈示すると、絶水ラットは平均約16ml摂取した。摂取開始1時間後に産生されるFOS蛋白質をPBNにおいて調べると、橋背側部が下丘と結合するレベルよりやや尾側部の背側外側亜核と外部外側亜核の2ヶ所にFOS蛋白質免疫活性を示す細胞(c-fosニューロン)が局在化していた。そのまま尾側にたどると、結合腕の腹側、すなわち、内側亜核にc-fosニューロンが集合して存在するようになり、これは、顔面神経根の付近まで続いていた。NaClを蒸留水、もしくは、0.05mMのアミロライド溶液で0.2Mとなるように作製し、1時間自由に摂取させたあとのc-fosニューロンの分布を調べた。その結果、アミロライド液の場合は、内側亜核のc-fosニューロンがほとんど認められないが、背側外側亜核と外部外側亜核では、両溶液間で差は認められなかった。アミロライドはNaイオンの味覚刺激作用をブロックすることが知られているので、以上の結果は、内側亜核にNaイオンの味覚情報が投射することを示唆する。背側外側亜核では、0.2M NaCl、蔗糖、サッカリンなどラットが好んで摂取する味刺激でより多くのc-fosニューロンが出現することから、快情報にも関係し、外部外側亜核のc-fosニューロンは、内臓感覚情報の投射部とほぼ一致することから、消化管に溶液が入ったことによる内臓からの求心性情報により興奮したものと考えられる。キニーネ刺激に対しては、外部外側亜核に、酸の刺激では、外部外側亜核と外部内側亜核に、c-fosニューロンが認められた。これらの領域には、0.5M以上の高濃度の食塩水刺激に対してもc-fosニューロンが認められた。以上まとめると、PBNにおいては、蔗糖、食塩、キニーネ、塩酸などの刺激により、異なった部位のニューロンが興奮することが明らかとなった。また、絶水ラットに食塩水を摂取させ、結合腕傍核におけるFOS蛋白質産生細胞の局在分布を詳細に調べた結果、内側亜核はNaイオンの味の情報を、外部外側亜核は消化管からの情報や高濃度溶液に対する不快情動に關係するのに対し、背側外側亜核は低濃度溶液摂取時の快情動に關係することが示唆された。

9350 食塩摂取時の味覚情報処理と嗜好性発現に關与する中枢神経機序

助成研究者:山本 隆(大阪大学 人間科学部)

共同研究者:志村 剛(大阪大学)

裕 哲崇(大阪大学)

目 的

味覚神経を介して送り込まれる食塩の味覚情報は中枢神経系でどのように処理されるのであろうか。この問題の解明のためには、糖、酸、苦味物質など食塩以外の刺激に対する味覚情報の処理に関しても明らかにする必要がある。味覚情報処理様式は、味刺激に対する生体の合目的な行動に応じて異なる可能性がある。下位脳幹部では、味刺激により、唾液、消化液、ホルモンなどの分泌、顔面表情変化といったすみやかな味質特異性の反射活動が引き起こされるが、このためには、ある特定の味質に選択的に応じるニューロンが局在化していて、つまり、解剖学的に一定の部位に集合していて、効果器支配ニューロンと直結していれば都合が良いと考えられる。一方、高次脳で味の質や強さの微妙な判断を行なうときや、過去の記憶と照合させるような、時間をかけて詳細に味覚情報を分析する場合は、多数のニューロン全体の応答をもとにしたコーディング機構が関与すると想像される。さらに、味覚のもうひとつの側面である情動性(快・不快、嗜好性・嫌悪性)の処理に関しても、味覚識別性ニューロンとは別に、情動性ニューロンといわれるものが脳内に局在化しているのであろうか。

本研究は、以上のような疑問に答えるため、味質応答性ニューロンは、その生理機能に応じて局在分布(chemotopy)しているのか否かを調べることを目的としたものである。細胞活動の機能的マッピング法には、発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する方法を用いた。c-fosは細胞性癌遺伝子のひとつで、ニューロンが興奮し、脱分極性のカルシウム流入が生じると、このc-fosが急速に誘導され、核内にFOS蛋白質の産生をみる(1)。また、c-fosは、中枢神経系において、刺激に対する短期の細胞性応答を長期の細胞応答に転換する際に働く、つまり、学習や記憶に関する遺伝子としても関心を集めている。本研究では、脳内におけるc-fos様蛋白質を免疫組織化学的に局在化することにより、味刺激により活動した細胞の指標とした。実験にはラットを

用い、研究対象とした脳部位は、過去の我々の実験結果(2)をもとに、FOS蛋白質産生が顕著に認められる結合腕傍核(第二次味覚中継核)とした。

方 法

ウィスター系雄性ラット(200~250g)を用いた。動物には、0.5M蔗糖、0.01~1.0M食塩水、0.01M塩酸、0.1~10mMの塩酸キニーネ、0.1Mグルタミン酸ナトリウム(MSG)と0.01Mイノシン酸ナトリウム(IMP)の混合物のいずれかを自由に摂取させるか、あらかじめ取りつけておいたカニューレを介して口腔内に溶液を注入した。固型飼料を自由に食べさせた動物、水を摂取させた動物、無処置動物などは、味溶液摂取動物に対する比較対照動物とした。また、食塩は蒸留水あるいはアミロライド溶液にて作製した。一部の動物には、0.2M食塩水を条件刺激、0.15M LiClの腹腔内注射を無条件刺激として、条件刺激にたいして味覚嫌悪学習を獲得させた。

摂取開始1~2時間後に、動物をペントバルビタールで麻酔し、4%パラフォルムアルデヒドにて灌流固定した。脳を取り出し、同固定液で4~24時間固定した後、30%蔗糖液で一晩洗浄し、50 μ mの切片を作成した。c-fos様免疫活性は一次抗体として家兎免疫c-fos抗体(0.2 μ g/ml; Oncogene Sci., Inc. USA)を用い、PAPにて染色した。なお、最終反応は硫酸ニッケルで増強した。反応した切片はニュートラルレッドで対比染色を施した。

結 果

味刺激によりFOS蛋白質が免疫組織化学的に検出できた部位は、最後野、結合腕傍核、無名質、大脳皮質味覚野などであり、これらの部位には無処置正常動物ではほとんどFOS蛋白質は認められなかった。水を摂取させた動物、固型飼料を食べさせた動物においても、無処置動物とほぼ同様の所見であったが、最後野には弱いc-fos様免疫活性が認められた。以上のことから、水や固型飼料の味は、本実験で用いた他の味溶液に比べ、味刺激効果が不十分であること、消化管内が溶液や固型物により充満すると最後野の細胞が興奮することがわかる。また、味覚性入力を受けることが知られている延髄孤束核、視床後腹内側核小細胞部、扁桃核、視床下部外側野などには明確なc-fos様免疫活性が認められなかった。このことは、理由はよく分らないが、味刺激に応じた全てのニューロンがc-fos様免疫活性を示すのではないことを示している。

本研究では、PBNに焦点をしばって、味刺激の種類によるc-fosニューロン(FOS蛋白質免疫活性を示す細胞を以後このように称することとする)の分布の相異を検索した。PBNの細胞構築学的区分は、FulwilerとSaper(3)によった。味刺激後どのような時間経過でc-fosニューロンが出現するのかを明らかにするため、0.2M食塩水を摂取させた後で種々の時間

経過後に灌流固定してc-fosニューロンの数を調べた。図1に示すように刺激後1-2時間で最大のc-fos発現をみることから、本実験では、味刺激後1-2時間後のc-fosニューロン数を計測することとした。

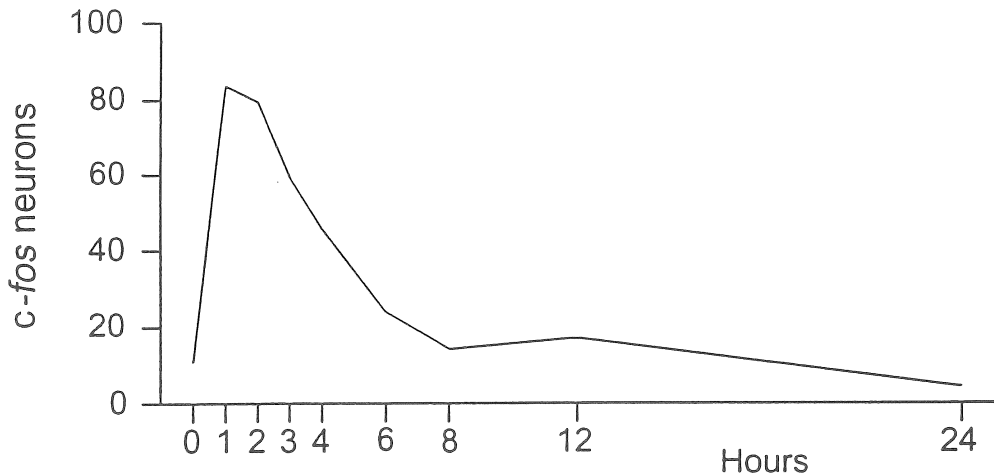


図 1

0.5M蔗糖の刺激により、背側外側亜核と中心外側亜核に多数のc-fosニューロンが認められ、0.2M食塩の刺激では、中心内側亜核に、また、0.1M MSGと0.01M IMPの混合液の刺激では、背側外側亜核、中心外側亜核と中心内側亜核の両方にc-fosニューロンが認められた。このような味刺激によるc-fosニューロンの二重分布は、ラットにおけるうま味物質の刺激効果が、Naイオンと甘味刺激の複合効果であるとする行動学的、電気生理学的結果(4)と相関するものであり、興味深い。キニーネ刺激に対しては、外部外側亜核にc-fosニューロンが認められた。また、塩酸の刺激では、外部外側亜核に加えて、外部内側亜核にも、c-fosニューロンが認められた。

食塩摂取時のc-fosニューロン出現部位をPBNにおいて吻尾的に調べ、まとめたものが図2である。0.2M NaCl水溶液を1時間呈示すると、絶水ラットは平均約16ml摂取した。摂取開始1時間後に産生されるFOS蛋白質を調べると、吻側部では、橋背側部が下丘と結合するレベルよりやや尾側部の外部外側(rostral external lateral)亜核(図2-A)、そ

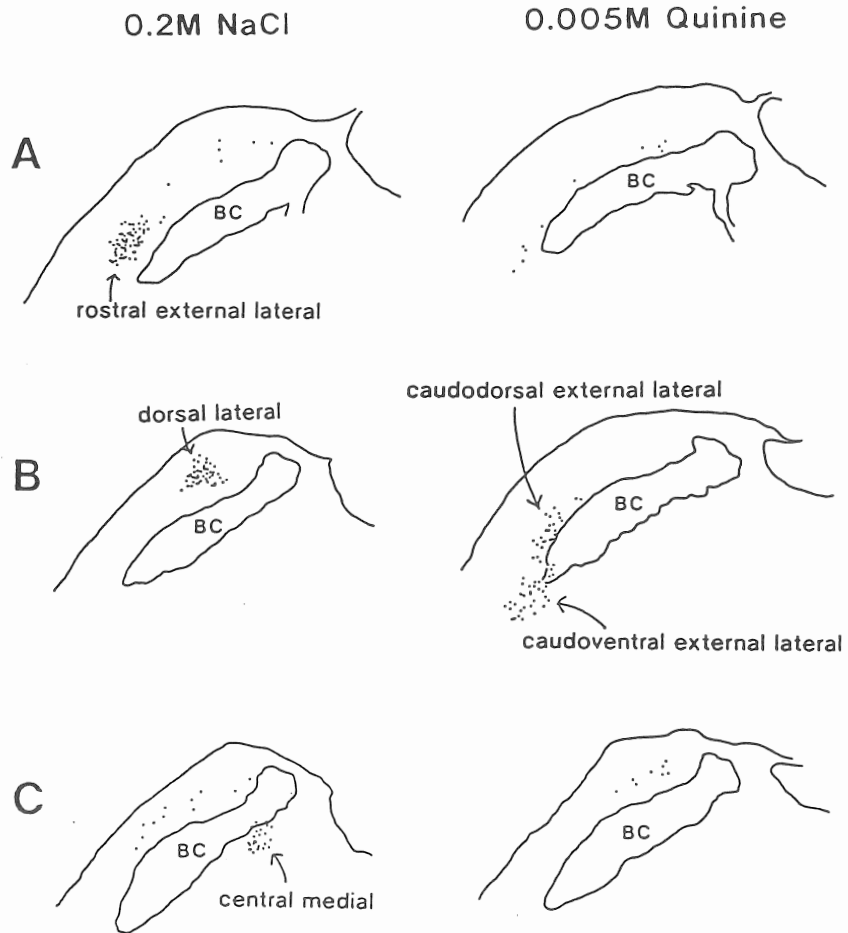


図 2

の尾側部の背側外側(dorsal lateral)亜核(図2-B)、そのまま尾側にたどって結合腕の腹側、すなわち、中心内側(central medial)亜核(図2-C)の3ヵ所にc-fosニューロンが集中して認められた。図2の右の列には、口腔内カニューレを用いて、0.005Mキニーネをラットの口腔内に注入したときのc-fosニューロンの出現部位を食塩の場合と比較のために同一レベルで示した。吻側部Aではc-fosニューロンは認められず、中間部Bでは背側外部外側(caudodorsal external lateral)亜核と腹側外部外側(caudoventral external lateral)亜核にc-fosニューロンは認められたが、尾側部ではほとんど認められなかった。

NaClを蒸留水、もしくは、 $5 \times 10^{-5} M$ のアミロライド溶液で0.2Mとなるように作製し、1時間自由に摂取させたあとのc-fosニューロンの分布を調べた。その結果、アミロライド液の場合は、中心内側亜核のc-fosニューロンがほとんど認められないが、背側外側亜核と外部外側亜核では、両溶液間で差は認められなかった。アミロライドはNaイオンの味覚刺激作用をブロックすることが知られているので、以上の結果は、中心内側亜核にNaイオンの味覚情報が投射することを示唆する。背側外側亜核では、0.2M NaCl、蔗糖、サッカリンなどラットが好んで摂取する味刺激でより多くのc-fosニューロンが出現することから、快情報にも関係し、外部外側亜核のc-fosニューロンは、内臓感覚情報の投射部(2)とほぼ一致し、摂取を拒否するキニーネ溶液に対しては出現しないことから、消化管に溶液が入ったことによる内臓からの求心性情報により興奮したものと考えられる。これより尾側部(B)の外部外側亜核には、キニーネの味の情報の他に、嫌悪性の不快情動にも関係している可能性がある。

各亜核の機能をさらに明確にするため、種々の条件で味刺激を与えたときのc-fosニューロンの産生を検討した(図3)。0.2M食塩水を絶水ラットに与えると、よく飲み、このときc-fosニューロンは、吻側外部外側亜核、背側外側亜核、中心内側亜核によく出現した。つぎに、絶水条件下で、カニューレ法により0.2M食塩水を投与すると、最初はよく飲むが、満腹後は拒否行動を示す。このときc-fosニューロンは、前記3ヵ所のほかに、尾側背側

Procedure	0.2 M NaCl				Quinine	Function
	Voluntary (Thirsty)	Intra-oral Infusion		Infusion (Thirsty)		
Subnuclei	(Thirsty)	(Thirsty)	(Satiated)	(after CTA)	(Thirsty)	
External lateral (rostral)	moderate	moderate				Visceral
External lateral (caudoventral)					dominant	Quinine Taste
External lateral (caudodorsal)		slight	slight		dominant	Aversive
Dorsal lateral	dominant	dominant				Ingestive
Central medial	dominant	dominant	slight	moderate		Na ion Taste
Behavior	Drink much	Drink much ↓ Drip	Drink little ↓ Drip	Reject ↓ Drip	Reject ↓ Drip	

dominant
 moderate
 slight
 negligible

図 3

部の外部外側垂核にもわずか認められた。絶水せずに同様の処置をした場合は、始めやや摂取したが、摂取を拒否し、このとき尾側背側部の外部外側垂核と中心内側垂核にわずかのc-fosニューロンを認めた。0.2M食塩水に嫌悪条件づけしたあとでカニューレ法により0.2M食塩水を投与すると、最初から強い嫌悪性の摂取拒否行動を示し、尾側背側部の外部外側垂核に多数のc-fosニューロンが、また、中心内側垂核に中等度のc-fosニューロンの出現をみた。キニーネをカニューレにより口腔内に注入すると、強い嫌悪性の摂取拒否行動を示し、尾側背側部と尾側腹側部の外部外側垂核に多数のc-fosニューロンの出現をみた。

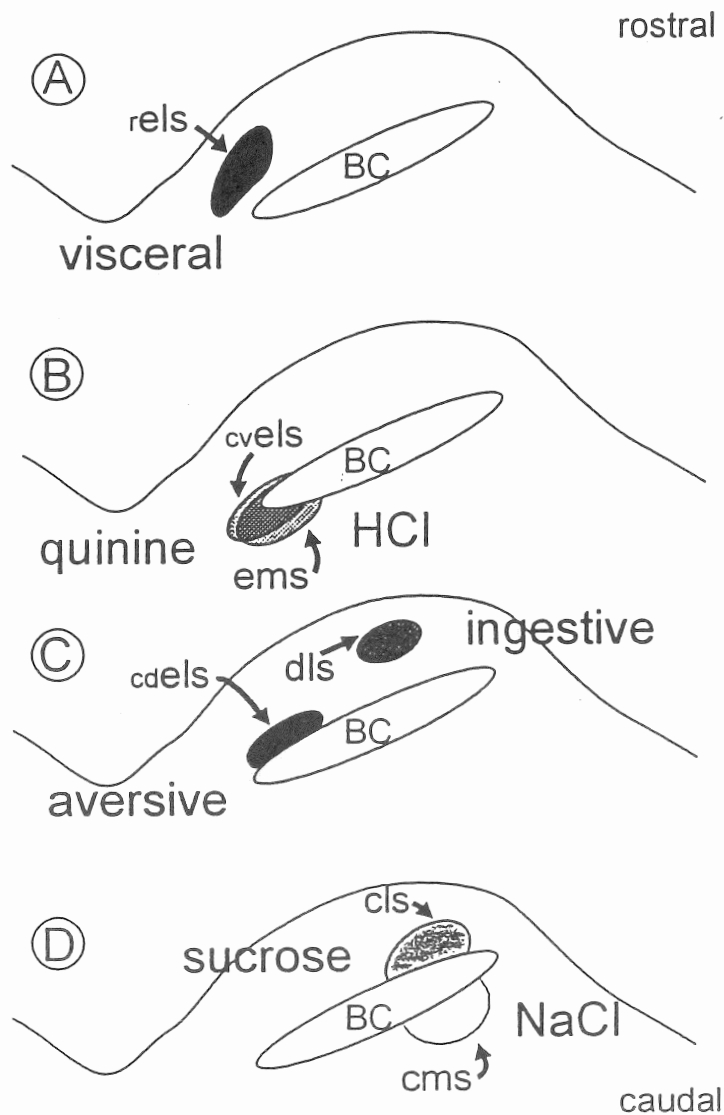


図 4

考 察

本実験で明らかになったように、種々の条件下における各種味刺激に対するc-fosニューロンの出現パターンから、ラットのPBNには図4に示すような機能分化が存在することが示唆される。最も吻側では(図4-A)、動物が溶液を十分に摂取したときに数多くのc-fosニューロンが出現する吻側外部外側亜核(rels)は内臓(消化器系)からの感覚情報を受けると考えられる。事実、腹腔内にLiClを注射して内臓を刺激するとこの部にc-fosニューロンが出現することが知られている(2)。尾側部の結合腕の外側部(図4-B)、すなわち、尾側部腹側外部外側亜核(cvels)と外部内側亜核(ems)には、キニーネと塩酸の味覚情報が入力する。この部において苦味と酸味の情報処理が行なわれると考えられる。さらに尾側にいくと(図4-C)、背側外側亜核(dls)では、味の質にかかわらず動物が好んで摂取したときに多数のc-fosニューロンが認められることから、この部は飲食物摂取にともなう快情動に関与すると考えられる。また、その外側部に位置する尾側部背側外部外側亜核(cdels)では、動物がそもそもその摂取を忌避する味物質(キニーネや塩酸など)や、嫌悪条件づけによりその摂取を拒否するようになった物質の摂取時にc-fosニューロンが出現することから、この部は飲食物の嫌悪感、忌避行動、不快情動に関与すると考えられる。結合腕傍核の最も尾側部では(図4-D)、本文で示唆したように、中心内側亜核(cms)において食塩の塩味の情報処理が行なわれると考えられる。また、中心外側亜核(cis)では、蔗糖やサッカリンなど甘味物質の甘味の情報処理が行なわれるものと思われる。

このように、味覚や内臓感覚が投射する結合腕傍核では、その生理機能に応じて局在分布が認められることがわかった。本研究の目的である食塩の味覚情報に関しては、その味の質は中心内側亜核にて処理され、低濃度での嗜好性は、背側外側亜核にて、高濃度での嫌悪性は、尾側部背側外側亜核にて処理されることが本実験により示唆された。

結 論

c-fos様免疫活性を指標として、各種味刺激に対する応答ニューロンの機能的マッピングを行い、ラットの結合腕傍核においては、蔗糖、食塩、キニーネ、塩酸などの刺激により、異なった部位のニューロンが興奮することが明らかとなった。また、絶水ラットに食塩水を摂取させ、結合腕傍核におけるFOS蛋白質産生細胞の局在分布を詳細に調べた結果、内側亜核はNaイオンの味の情報処理に関係し、中心外側亜核は快情動に関係し、吻側部の外部外側亜核は消化管からの情報を受け、尾側部の外部外側亜核は不快情動に関与することが示唆された。

今後の課題

1. さらに数多くの味物質を用いて本実験結果を確認する必要がある。
2. c-fos様免疫活性を指標として得られた本実験結果を電気生理学的方法によって確認する必要がある。
3. 結合腕傍核のみならず、より上位にありより味覚の認知活動に関係する大脳皮質や扁桃体においても同様の生理機能に対応した機能局在が存在するか否かを明らかにする必要がある。

引用文献

- 1) Morgan, J. I. and Curran, T. (1986) *Nature*, 322, 552-555.
- 2) Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Azuma, S., Bai, W.-Zh. and Wakisaka, S. (1992) *NeuroReport*, 3, 1049-1052.
- 3) Fulwiler, C.E. and Saper, C.B. (1984) *Brain Res. Review*, 7, 229-259.
- 4) Yamamoto, T., Matsuo, R., Fujimoto, Y., Fukunaga, I., Miyasaka, A. and Imoto, T. (1991) 49, 919-925.

参考文献

- Yamamoto, T., Shimura, T., Sako, N., Sakai, N., Tanimizu, T. and Wakisaka, S. (1993) C-fos expression in the parabrachial nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. *NeuroReport*, 4, 1223-1226.
- Yamamoto, T., Shimura, T., Sakai, N. and Ozaki, N. (1994) Representation of hedonics and quality of taste stimuli in the parabrachial nucleus of the rat. *Physiol. Behav.*, in press.

Central nervous mechanisms of formation of taste quality and taste hedonics
during ingestion of NaCl

Takashi Yamamoto, Tsuyoshi Shimura and Noritaka Sako
Faculty of Human Sciences, Osaka University

Summary

NaCl elicits salty taste, which is one of the fundamental taste qualities. It also induces hedonic aspects of taste such as preferable at lower concentrations and aversive at higher concentrations. It is not well understood how these qualitative and hedonic evaluation of NaCl are processed in the central nervous system. The present study aims to elucidate central representation of taste quality and hedonics of NaCl by localizing c-fos protein (FOS protein) as an anatomical marker in the parabrachial nucleus (second-order taste relay station). Wistar male rats were used. We have tried to localize FOS protein, which is produced as a result of a rapid induction of a proto-oncogene c-fos after ingestion of various taste solutions including NaCl. C-fos neurons were found in the 3 sub-nuclei; the medial subnucleus receives taste information of Na ions, the dorsal lateral subnucleus may be concerned with pleasant hedonic aspect of taste of low concentrations of NaCl as well as other palatable solutions, and the caudodorsal part of the external lateral subnucleus may be related to unpleasant hedonic aspect of taste of high concentrations of NaCl. Generally speaking, the medial part of the parabrachial nucleus seems to be concerned with palatable tastes and positive hedonics, while the lateral part is related to aversive tastes with hedonically negative value, and gastrointestinal distress.