

9 5 4 5 食塩欲求の発現に関与する脳部位と神経伝達物質の検索

助成研究者：志村 剛 (大阪大学 人間科学部)

目 的

食塩欲求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であり、しかも実験室での誘発が容易なため、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を理解するのに好都合なモデルとして広く利用されている。従来の研究から、下位脳幹の味覚中継核と前脳の相互作用が食塩欲求の発現に重要なことが示唆されているが、それらの神経回路の中でどのような伝達物質や修飾物質がこの行動に関与しているのかについてはほとんど知られていない。我々は最近、嫌悪性味刺激に対してラット大脳皮質味覚野のアセチルコリン放出が促進することを報告したが、食塩欠乏時にはこの部位のアセチルコリンがどのように変動するかを明らかにするため、マイクロダイアリス法により自由行動中のアセチルコリンレベルを計測した。

方 法

実験にはあらかじめガイドカニューレと、味溶液を口腔内に直接注入するための口腔内カニューレをとりつけた雄性ウイスター系ラットを用いた。急性食塩欠乏は、実験の24時間前にフロセミドを2時間間隔で2回皮下注射して(7 mg/rat)誘発した。また、フロセミドの代わりに生理食塩水を投与した動物を対照として用いた。実験時にはプローブ刺入から少なくとも4時間経過してから、0.5 M 食塩水を口腔内カニューレを通じて5 ml、5 分間にわたって注入した。アセチルコリンは高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出により測定した。

結果と考察

食塩水の口腔内注入により、食塩欠乏動物、対照動物ともに皮質味覚野のアセチルコリン放出量は、刺激前のベースラインに比べて有意に増加した。また、食塩欠乏動物では対照動物に比べて増加率が高く、また、増加の持続時間も長かった。しかし、食塩欠乏時に食塩水を与えたときよりも、すでに報告したキニーネなどの嫌悪性味刺激を与えたときのほうがアセチルコリン増加率が高く、持続時間も長かった。これらのアセチルコリンの著明な増加は、それぞれの味刺激に対して動物の示す嫌悪性応答あるいは摂取性応答と関連することが、ビデオによる行動解析から明かになった。したがって、皮質味覚野のアセチルコリン放出は一般的な運動よりも、嫌悪性味覚応答や摂取性味覚応答に含まれる行動要素とより深く関連すると推察される。食塩欲求における皮質味覚野の役割はよくわかっていないが、本実験結果から皮質味覚野のアセチルコリンは正常な食塩欲求行動の調節機構の一部として機能している可能性が示唆された。

9 5 4 5 食塩欲求の発現に関与する脳部位と神経伝達物質の検索

助成研究者：志村 剛（大阪大学 人間科学部）

1. 研究目的

体内に塩分が欠乏した動物は食塩を多量に含んだ飲食物を好んで摂取する。この現象は食塩欲求と名づけられており、生体が内部環境の恒常性を維持するための重要な適応行動のひとつと考えられている (1)。実験に多用されるラットの場合、通常は 0.5 M 程度の高濃度食塩水を呈示しても自発的に摂取することはないが、実験的に食塩欠乏状態におくと、食塩に対する嗜好性が変化し、不足した食塩量を凌駕するほどの高濃度食塩水を積極的に摂取するようになる。この例のように、食塩欲求は実験室で比較的容易に誘発できることから、味覚を手がかりとした飲食物の摂取や拒否行動の中枢神経機序を理解するのに好都合な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行動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しらべたり、末梢神経応答 (2) や味覚中継核のニューロン応答 (3) を記録することによって検討が続けられており、これまでに、下位脳幹の味覚中継核と前脳の相互作用が食塩欲求行動の発現に重要なことが明らかになってきた。しかし、それらの神経回路の中でどの種の神経伝達物質が食塩欲求行動の発現に関係しているかは全く不明である。一般に、味覚の中枢情報処理にどの種の神経伝達物質が関わっているのかについては知見が乏しく、このような行動モデルを利用することにより、味覚情報処理に関与する神経伝達機構の一端を明らかにできる可能性が高い。我々は最近、キニーネ溶液などの嫌悪性味刺激を与えると、ラット大脳皮質味覚野のアセチルコリン放出が著明に促進することを報告したが (4)、本研究では、同部位のアセチルコリンが食塩欲求行動にはどのように関係するのかを明らかにすることを目的として、マイクロダイアリス法を用いて自由行動中の動物においてアセチルコリンの動態をしらべた。

2. 研究方法

2. 1. 実験対象

実験には、手術時の体重が 250-400 g の雄性ウイスター系ラットを用いた。本報告では、そのうち安定してアセチルコリンの回収・測定に成功した 13 匹の成績について述べる。ダイアリス実験の 1 週間前に、ネブタール麻酔下 (50 mg/kg, ip) でプローブ装着用のガイドカ

ニューレを大脳皮質味覚野の直上まで刺入し、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。また、味刺激用に、ポリエチレンチューブ（PE90）で作製したカニューレを動物の口腔内頬部に開口するよう装着し、皮下を貫通させて頭蓋骨上まで導き、ガイドカニューレとともに歯科用セメントで固定した。動物は術後、1週間の回復期間においてマイクロダイアリシス実験に供した。7匹の動物については、実験の24時間前に食塩欠乏処置としてナトリウム利尿剤のプロセミドを7 mg (0.7 ml)、2時間間隔で2回皮下注射した。この際、動物を洗浄済みのケージに移動して、飼育環境内からの食塩摂取を不可能にするるとともに、通常の固形飼料の代わりにコンデンスミルクを与えて、急性的に食塩欠乏を誘発した。また、6匹の動物については、実験の24時間前にプロセミドの代わりに生理食塩水を同量（0.7 ml）、2時間間隔で2回皮下注射し、その他の処置を実験群と同様にして、対照動物とした。

2. 2. マイクロダイアリシスの手続き

味刺激開始の最低4時間前に、ガイドカニューレに沿ってマイクロダイアリシス・プローブ（CMA12, Carnegie Medicin, Sweden: 透析膜部の外径 0.5 mm, 膜長 2 mm）を大脳皮質味覚野に刺入した。透析膜部はガイドカニューレの先端から、さらに2 mm 深い部位まで達するように留置した。プローブには、毎分2 μ l の流速で人工脳脊髄液（NaCl 140 mM, KCl 3 mM, MgCl₂·6H₂O 1 mM, CaCl₂·2H₂O 2.5 mM, NaHPO₄·12H₂O 2 mM, glucose 0.9%; pH 7.4）を灌流した。なお回収したアセチルコリンの分解を抑制するため、灌流液にはアセチルコリンエステラーゼの阻害剤であるフィズスチグミン（100 μ M, Sigma）を添加した。

2. 3. 味刺激

プローブ刺入後最低4時間経過してから、上記の口腔内カニューレを通じて、0.5 M 食塩水を5 ml、5分間にわたり動物の口腔内に注入した。また、このときの動物の口部を中心とした運動パターンをビデオ撮影し、のちに再生して味覚行動の分析を行った。

2. 4. アセチルコリンの測定

試料は20分毎に8℃に保ったマイクロサンプラー（CMA200, Carnegie Medicin, Sweden）内に自動的に回収し（40 μ l）、冷凍保存して実験の翌日に分析した。アセチルコリンは固定化酵素法を用いた高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出（HPLC-ECD）により測定した。移動相（50 mM リン酸ナトリウム緩衝液および0.5 mM EDTA·2Na, pH8.4）は100 μ l/min でガードカラム、分離カラム、酵素カラムに順次送液した。酵素カラム内のアセチルコリンエステラーゼとコリンオキシダーゼの作用により、アセチルコリンは過酸化水素とベタインに変化するので、発生した過酸化水素の酸化電流を電気化学検出器（LC-4C, Bioanalytical Systems, IN）により測定した。

2. 5. データ分析

6 試料ごとに挿入したアセチルコリン標準物質の分析から得られたクロマトグラムの保持時間と応答量を基準として、各試料のアセチルコリンの同定と数量化を行った。動物ごとにアセチルコリンの絶対回収量には大きな分散がみられたため、各動物のアセチルコリン量は、味

刺激を行った1時間前の3試料の平均をベースラインとし、それに対する相対パーセント量として求めた。味刺激前1時間と味刺激開始後2時間の計9試料について、アセチルコリン量の変化を統計学的に分析した。

2. 6. 組織学的検索

各実験終了後、動物をネンブターール深麻酔下 (80 mg/kg) で10%ホルマリンにより灌流固定し、脳を摘出した。その後、凍結マイクロームにより100 μm の前額断連続切片を作製し、クレジールバイオレットで染色後、プローブ刺入部位を組織学的に確認した。

3. 研究結果

3. 1. 予備実験

はじめに、本実験で用いた食塩欠乏処置が食塩欲求の誘発に有効であるかどうかを確認するために実施した、行動学的実験の結果について述べる。Fig.1は10匹のラットにフロセミドを投与して食塩欠乏を誘発した場合と、同じ動物群に生理食塩水を投与して食塩が充足している場合に、動物が示した0.5 M食塩水摂取量の累積記録である。処置前24時間の食塩水摂取量 (pre) は、両条件とも約3 mlであり、条件間に差はなかった。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、本実験で採用したプロトコールにより、少なくともフロセミド投与24時間後には、動物は行動的に食塩欲求を示すことが確認された。なお、これらの正常動物のほかにも、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動物についても、同一のプロトコールで食塩水摂取量をしらべたが、食塩欠乏時には Fig.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いえる。

3. 2. プローブ刺入部位

組織学的検索の結果、マイクロダイアリス・プローブは前交連接合部から吻側に1.3-2.6 mmの島皮質に分布していた。

3. 3. アセチルコリンの絶対放出量

本実験では、上記のように、味刺激前1時間のアセチルコリンレベルをベースラインとみなしたが、13匹について平均すると、 $160 \pm 29 \text{ fmol}/10 \mu\text{l}$ (mean \pm SE) となった。一部の実験において、 Ca^{2+} を含まない灌流液を用いた場合には、アセチルコリンレベルは著明に減少した。一方、アセチルコリンのアンタゴニストであるスコポラミン (2 mg/kg, ip) を投与すると、動物は過剰運動反応を示すとともに、アセチルコリンレベルはベースラインの約7倍に増加した。

3. 4. 高濃度食塩水刺激の効果

Fig.2に食塩欠乏群および対照群における0.5 M食塩水の口腔内刺激に対するアセチル

コリン放出パターンを示した。各点は、20分ごとの試料回収期間を示し、刺激前3試料、刺激後6試料の計9試料、すなわち3時間の経過を表している。刺激時点以前の3試料では両群ともにきわめて変動が少ないことから、各群の平均を100%としてベースラインとした。0.5 M 食塩水を口腔内に注入すると、食塩欠乏処置群、対照群とも皮質味覚野のアセチルコリン放出量はベースラインに比べて有意に増加した（ANOVA, $p < 0.05$ ）。また、刺激時点から2試料すなわち40分間は、食塩欠乏群は対照群よりも高いアセチルコリン放出を示した（LSD検定, $p < 0.01$ ）。

最近、我々はキニーネなど動物が通常嫌悪する味刺激を与えたときに、皮質味覚野のアセチルコリン放出がとくに促進することを報告した。そこで、本実験における食塩欠乏時のアセチルコリンの変動と、すでに報告した嫌悪性味刺激時のアセチルコリンの変動を Fig.3 のように比較した。食塩欠乏時に高濃度食塩水を与えると、刺激直後の試料では、アセチルコリンレベルはキニーネ溶液やあらかじめ味覚嫌悪を条件づけたサッカリン溶液刺激時のパターンと同様に増加した。しかし、それ以後の試料では、嫌悪性味刺激を与えたときのほうが、食塩水刺激を行ったときよりも、アセチルコリンの増加率が高く、持続時間も長かった。

3. 5. 行動的味覚応答

本実験のように自由行動下で味刺激を与えると、動物はその味刺激の種類に応じて口部を中心とした典型的な味覚応答反応を示す。そこで、ビデオ記録した味刺激前後の動物の行動を、Grillら(5)の分類にならって、摂取反応、嫌悪反応、中立反応にわけ、それぞれの出現数を計数して、アセチルコリン放出パターンとの時間的対応関係の有無をしらべた。Fig.4には個体データを示したが、食塩欠乏動物に食塩水を与えると(A)、活発な摂取反応がみられ、アセチルコリン放出も著明に促進した。この個体では、アセチルコリンの増加率は刺激時の試料よりも次の試料において高く、このとき同時に多数の摂取反応や中立反応が出現した。一方、食塩が充足した対照動物の口腔内に0.5 M 食塩水を与えると(B)、嫌悪反応が最も多く出現し、摂取反応の出現数は食塩欠乏動物に比べて明らかに少なかった。また、食塩水刺激によるアセチルコリン放出も、食塩欠乏動物の約半分の量にとどまった。

このように、皮質味覚野のアセチルコリンレベルは味刺激を与えたことによるなんらかの運動反応と関係していることが示唆されたので、刺激開始から60分以内の行動量とアセチルコリンレベルの関係を食塩水刺激とキニーネ刺激についてしらべた(Fig.5)。食塩欠乏動物に食塩水を与えたとき(A)には、アセチルコリンの増加は摂取反応ともっとも相関しており($r=0.85$)、ナイーブな動物にキニーネ溶液を与えたとき(B)には、嫌悪反応および中立反応の出現数とアセチルコリン量の相関が認められた。

4. 考察

アセチルコリンは、味覚中枢路の中でも、とくに大脳皮質味覚野で活性が高く、脳組織の移植実験(6)や、電気生理学的実験(7)から、皮質味覚野の伝達物質のひとつとして作

用していることが示唆されている。本実験において、灌流液から Ca^{2+} を除くと、アセチルコリンレベルが著明に減少したこと、また、スコポラミンの投与によりアセチルコリンレベルが著明に増加したことから、この実験系で測定したアセチルコリンは神経伝達物質として細胞外に放出されたものであると考えられる。この結果は、アセチルコリンが大脳皮質味覚野の伝達物質であるとする仮説を強く支持するものである。

組織学的検索の結果、マイクロダイアリシス・プローブの刺入部位は、吻側尾側の範囲については、従来、味応答ニューロンの存在が報告されている領域 (8) とほぼ一致した。しかし、本実験では膜長が 2 mm のプローブを用いたため、背側腹側方向の測定部位は味覚野の範囲を超えた島皮質にも及んでいた。とくに、味覚野を含め近接領域には口腔内外の体性感覚や運動に関係するニューロンの存在が報告されているので (9)、本実験で測定したアセチルコリンの一部は味覚以外の口腔感覚や運動にも関連するものと思われる。

本実験のもっとも重要な結果は、食塩欠乏ラットが高濃度の食塩水を積極的に摂取するとき、皮質味覚野のアセチルコリンレベルが対照動物に比べて有意に増加したことである。一般に 0.5 M 程度の高濃度食塩水は、本研究で行った予備実験や他の報告から明らかなように、ラットにとっては嫌悪的な刺激である。事実、口部を中心とした運動パターンの解析から、ナイーブな対照群の動物は、高濃度食塩水刺激により、Fig.4 のように、嫌悪性の味覚応答を示し、積極的に食塩水を摂取することはまれであった。これに対し、食塩欠乏動物は高濃度食塩水を積極的に摂取したことから、これらの動物にとっては同じ濃度の食塩水が嗜好的な味刺激になっていたと考えられる。両群の皮質味覚野アセチルコリン放出に顕著な差がみられたことは、この部位のアセチルコリン放出が食塩水の味質の情報処理に主として関わっている可能性を否定するものである。なぜなら、アセチルコリン放出が味質の情報処理に深く関与しているとすれば、動物の状態に関係なく、同程度の応答が期待できるからである。この点は、最近我々が報告した結果 (4) と一致する。すなわち、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、条件づけをしていない動物にそれぞれ 0.01 M のサッカリン溶液を与えたとき、条件づけ群の皮質味覚野アセチルコリンレベルは無条件づけ群に比べて有意に高かった。このように、皮質味覚野のアセチルコリンレベルは味質に関連するというよりも、むしろ、その味刺激が動物にとって嗜好的であるか、嫌悪的であるかという要因によって大きく変化するものと思われる。

我々は、種々の味溶液の中でキニーネなどの嫌悪性味刺激が皮質味覚野のアセチルコリン放出を著明に促進することから、この部位のアセチルコリンは嫌悪性味覚行動の発現と関係すると推測した (4)。Fig.3 に示したように、キニーネや条件づけたサッカリンなどの嫌悪性味刺激時と、今回の食塩欠乏時の食塩水刺激、つまり動物にとっては嗜好的な味刺激時のアセチルコリン放出パターンを比較すると、刺激開始から 20 分間の放出量には、両者で相違は認められなかった。しかし、嫌悪性味刺激時には、それ以後の 40 分間にわたって、食塩欠乏時よりもアセチルコリン放出が高かった。この結果は、皮質味覚野のアセチルコリン

は嫌悪性味刺激後に持続時間の長い強い放出を示すが、嗜好性味刺激時にも著明に活性化されることを示している。したがって、皮質味覚野のアセチルコリンは特異的に嫌悪性味覚情報処理に関係しているわけではないと考えられる。以上の結果をまとめると、皮質味覚野のアセチルコリンは、嫌悪性味刺激時>嗜好性味刺激時>中立性味刺激時の順に多く、長く放出されるといえる。

大脳皮質のアセチルコリン放出は動物の運動量（10）や覚醒水準（11）とも関係することが示唆されている。本実験のように、自由行動下でアセチルコリン放出量を測定する際には、これらの要因を十分に吟味する必要がある。本実験の場合、Fig.4 の個体例をみると、味覚応答以外の中立反応（grooming や locomotion など）の出現数とアセチルコリン放出量には特定の関係はないと推察される。また、Fig.5 に示したように、嗜好性味刺激時には摂取性味覚応答とアセチルコリン量が高い相関を示し、嫌悪性味刺激時にはアセチルコリン放出は嫌悪性味覚応答と相関している。したがって、皮質味覚野では一般的な運動よりも摂取性味覚応答や嫌悪性味覚応答に含まれる行動発現とアセチルコリン放出がとくに関連するといえる。

ところで、食塩が充足した対照動物にとって、0.5 Mの食塩水は嫌悪的な刺激であり、キニーネ等と同じく高いアセチルコリン放出がみられても当然だと考えられる。しかし、アセチルコリン放出はむしろ食塩欠乏動物のほうが高く、皮質味覚野が嫌悪性味覚行動の発現に関係するという仮説と矛盾するように思われる。行動的な味覚応答パターンから判断すると、対照動物では高濃度食塩水に対して、キニーネ刺激時に典型的にみられるような chin rubbing などの強い嫌悪性行動は出現しておらず、刺激時には注入された食塩水を受動的に口からこぼすだけであった。したがって、この濃度の食塩水は動物にとってはキニーネほど嫌悪性が強くないため、アセチルコリン放出も少なかったと推測される。逆に、キニーネ等の強い嫌悪性味刺激はいわゆるあと味として残り、そのため持続時間の長いアセチルコリン放出の促進がみられたものと思われる。

食塩欲求行動の発現には脳幹部、とくに結合腕傍核の神経細胞群が重要な役割を果たしていることを、我々は破壊実験（12）や電気生理学的実験（13）から示唆している。しかし、脳幹部と前脳の連絡を遮断した除脳動物では、食塩欲求の行動発現が不可能なことから（14）、前脳にも食塩欲求の行動表出に重要な役割を果たす調節機構が存在すると推定される。扁桃体、視床下部などへの味覚投射に比べ、視床味覚野や大脳皮質味覚野への投射は食塩欲求にさほど重要であるとは考えられていないが（1）、本実験結果を見る限り、皮質味覚野のアセチルコリンは正常な食塩欲求行動の調節機構の一部として機能していると結論できる。

5. 今後の課題

本研究では、食塩欲求に関連した大脳皮質味覚野のアセチルコリンレベルの変化をはじめ

めて明らかにしたが、この部位が食塩欲求の行動発現にどの程度重要であるかは、今後、行動学的な実験を行うことによって解決すべき問題である。また、高濃度食塩水刺激が、動物の体内環境に応じて、嫌悪的なものから嗜好的なものに変化するダイナミクスを、いわゆる脳内報酬系における神経伝達機構の変化としてとらえることも重要な課題である。さらに、時間分解能に難点のある従来のマイクロダイアリス法に代わって、リアルタイムに脳内局所の伝達物質の変化を測定できるバイオセンサーを、自由行動中の動物においても実用化し、より詳細に行動と伝達物質の対応関係を解析する必要がある。このような研究の発展により、食塩欲求ににとどまらず、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に関与する神経伝達機構の理解に大きく貢献することになる。

6. 引用文献

1. 志村 剛 (1995) 食塩摂取行動の発現機構. 大阪大学人間科学部紀要, 21: 175-197.
2. Contreras, R.J. (1977) Changes in gustatory nerve discharges with sodium deficiency: a single unit analysis. *Brain Res.*, 121: 373-378.
3. Nakamura, K. and Norgren, R. (1995) Sodium-deficient diet reduces gustatory activity in the nucleus of the solitary tract of behaving rats. *Am. J. Physiol.*, 269: R647-R661.
4. Shimura, T., Suzuki, M. and Yamamoto, T. (1995) Aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine release in the insular gustatory cortex of the rat: a microdialysis study. *Brain Res.*, 679: 221-226.
5. Grill, H.J. and Norgren, R. (1978) The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res.*, 143: 263-279.
6. Lopez-Garcia, J.C., Fernandez-Ruiz, J., Bermudez-Rattonim F. and Tapia, R. (1990) Correlation between acetylcholine release and recovery of conditioned taste aversion induced by fetal neocortex grafts. *Brain Res.*, 523: 105-110.
7. Hasegawa, K. and Ogawa, H. (1995) Effects of acetylcholine on cortical taste area neurons in rats. *Jpn. J. Physiol.*, 45, Suppl.1: S167.
8. Yamamoto, T., Yuyama, N., Kato, T. and Kawamura, Y. (1984) Gustatory responses of cortical neurons in rats. I. Response characteristics. *J. Neurophysiol.*, 51: 616-635.
9. Ogawa, H., Ito, S., Murayama, N. and Hasegawa, K. (1990) Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation

- of the entire oral cavity. *Neurosci. Res.*, 9: 196-201.
10. Day, J., Damsma, G. and Fibiger, H.C. (1991) Cholinergic activity in the rat hippocampus, cortex and striatum correlates with locomotor activity: an in vivo microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38: 723-729.
 11. Kametani, H. and Kawamura, H. (1991) Circadian rhythm of cortical acetylcholine release as measured by in vivo microdialysis in freely moving rats. *Neurosci. Lett.*, 132: 263-266.
 12. Scalera, G., Grigson, P.S., Shimura, T., Reilly, S. and Norgren, R. (1992) Excitotoxic parabrachial nucleus lesions disrupt conditioned taste aversion, conditioned odor aversion, and sodium appetite in rats. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 18: 1039.
 13. Shimura, T. and Yamamoto, T. (1996) Parabrachial unit responses to taste stimuli in acutely sodium deficient rats. *Neurosci. Res.*, Suppl. in press.
 14. Grill, H.J., Schulkin, J. and Flynn, F.W. (1986) Sodium homeostasis in chronic decerebrate rats. *Behav. Neurosci.* 100: 536-543.

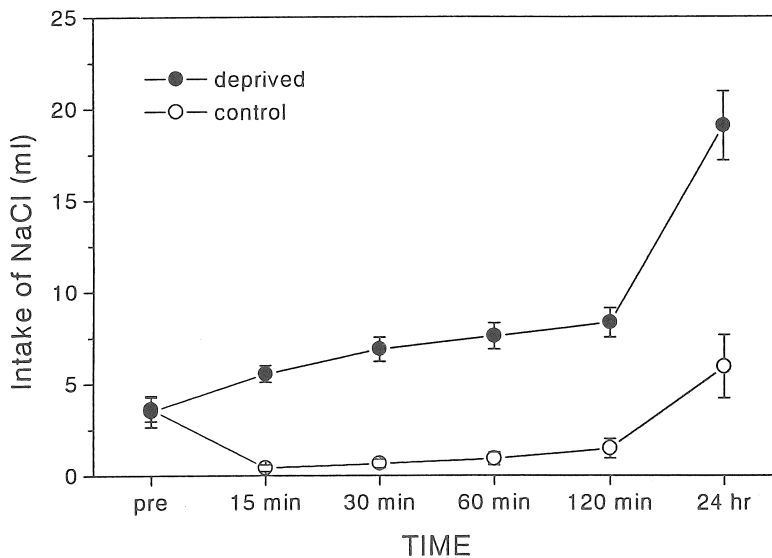


Fig. 1 Cumulative intake of 0.5 M NaCl (ml) across a 24 h period during salt-deprived and salt-replete conditions (n=10). "pre" indicates intake of 0.5 M NaCl in a 24 h period just before each treatment.

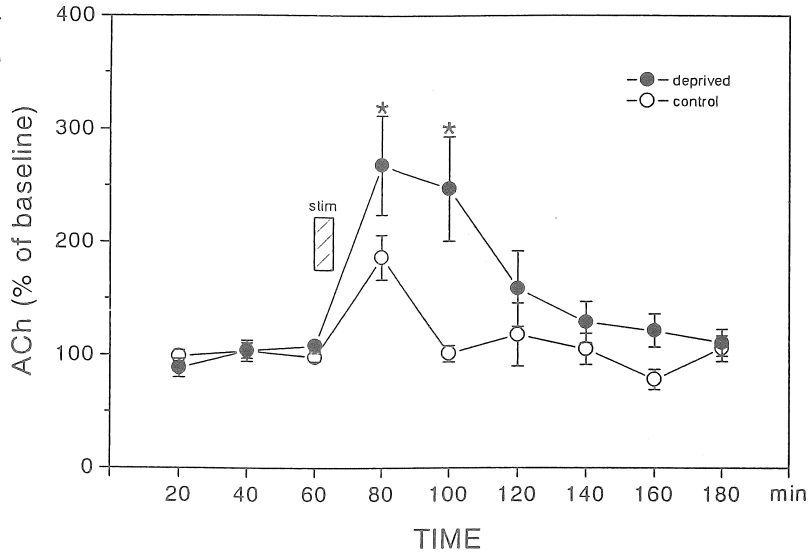


Fig. 2 Extracellular levels of acetylcholine in the cortical gustatory area before and after intraoral infusions of 0.5 M NaCl in salt-deprived and control rats.

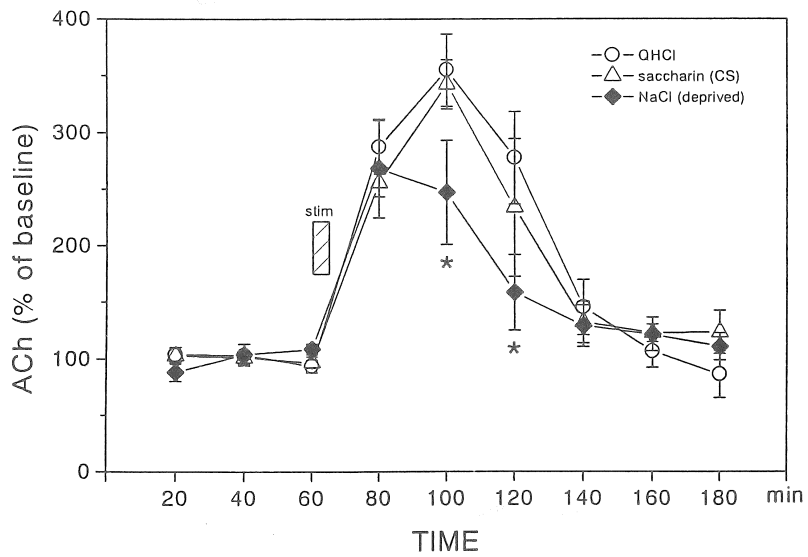


Fig. 3 Extracellular levels of acetylcholine in the cortical gustatory area before and after intraoral infusions of three different solutions: 0.001 M quinine HCl to naive rats, 0.01 M saccharin to conditioned animals, and 0.5 M NaCl to salt-deprived animals.

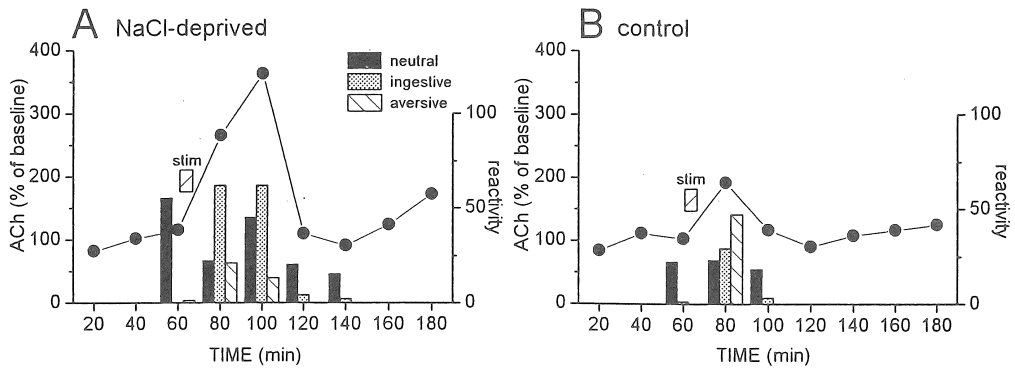


Fig. 4 Extracellular levels of acetylcholine in the cortical gustatory area and numbers of reactivity occurred simultaneously. A: a salt-deprived rat, B: a control rat.

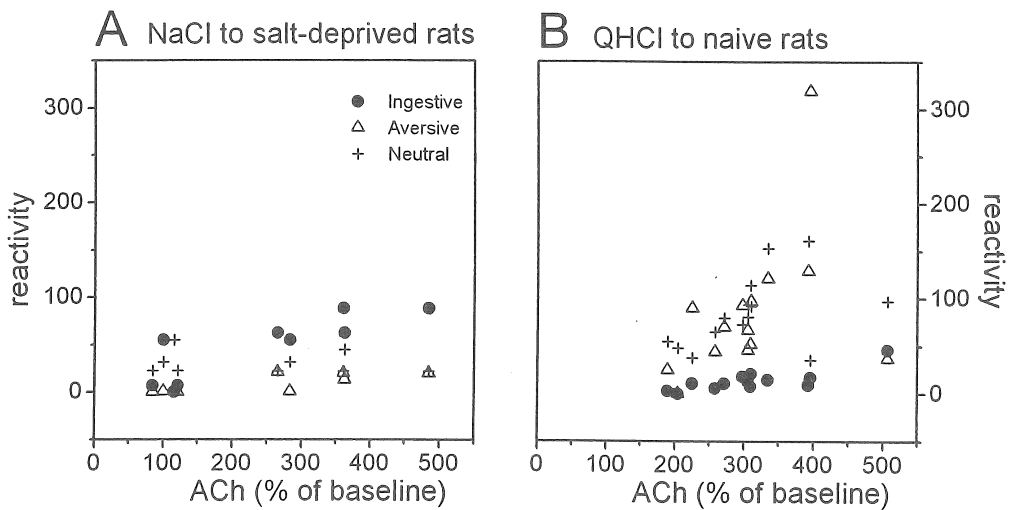


Fig. 5 The relationship between acetylcholine release and frequency of ingestive, aversive and neutral behavioral activity. QHCl: quinine HCl.

A search for neurotransmitters involved in salt appetite: enhancement of acetylcholine release in the gustatory cortex of salt-deprived rats in response to concentrated NaCl.

Tsuyoshi Shimura

Osaka University, Faculty of Human Sciences

Summary

When animals are deficient in body sodium, they consume considerable quantities of concentrated salty solutions that are normally avoided at such high concentrations. Compared with lesion and electrophysiological studies on salt appetite, neurochemical information about this phenomenon is quite limited. Since we recently reported that aversive taste stimuli facilitate extracellular acetylcholine (ACh) release in the gustatory cortex (CGA), in the present experiment we measured ACh levels in the CGA in response to normally aversive concentrated (0.5 M) NaCl in freely moving rats using the microdialysis technique. Salt appetite was evoked by two injections of a natriuretic drug, furosemide (7 mg/rat) 24 h previously. At least 4 h before each experiment, a microdialysis probe (2.0 mm in membrane length and 0.5 mm in diameter) was implanted in the CGA via the guide cannula. The probe was perfused at a flow rate of 2 μ l/min with artificial cerebrospinal fluid. Four hours after the probe implantation, each animal received a 5 ml intraoral infusion of 0.5 M NaCl for 5 min. Samples were collected at 20-min intervals and dialysates were analyzed by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. The mean basal release of ACh before stimulation was 160 ± 29 fmol/10 μ l (mean \pm SE, n=13). ACh levels in response to concentrated NaCl in salt-deprived rats were significantly higher than those in control rats. Behavioral analyses revealed highly positive correlation between ACh levels and overt activity of animals after taste stimulation in salt-deprived rats. Although the magnitude and duration of ACh release were larger in animals that received an aversive taste stimulus in the previous study, it is suggested that ACh in the CGA is involved in the normal behavioral expression of salt appetite.