

発表番号 59

食塩欠乏ラットが示す食塩選択行動の解析

—行動科学的、電気生理学的研究—

助成研究者：山本 隆 (大阪大学大学院人間科学研究科)

共同研究者：志村 剛 (大阪大学大学院人間科学研究科)

乾 賢 (大阪大学大学院人間科学研究科)

体内が食塩の欠乏状態になると、食塩を選択的に摂取し、しかも正常状態なら避けるほどの高濃度食塩水を好んで摂取することが知られている。このような合目的な行動をとらせる体のしくみを解明することが本研究の目的である。ウィスター系ラットを用いて以下の実験を行った。1) 味覚と嗅覚の連合学習を応用した行動学的実験(実験1)、2) ラット用飲水量測定装置を用いた2ビン選択嗜好実験(実験2)、3) 結合腕傍核からの味応答記録実験(実験3)。

実験1の結果から、一過性の急性食塩欠乏状態にし、食塩を渴望させると、食塩を連合していた匂いを選択するようになることがわかった。利尿剤投与の結果、ラットは自分が食塩欠乏状態であることを察知し、食塩と連合していた匂いを食塩の検索手掛りとして活用しようとしたものと思われる。

実験2の結果から、ラット用飲水量測定装置を用いることで摂取行動の量的な変化だけでなく、時間的な変化についても解析を行うことが可能であることが示された。その結果、以下のような知見が得られた。1) ラットの飲水行動は暗期に集中し、摂取行動のピークは暗期開始直後と明け方の2回現れる。2) 水と0.1M NaClの嗜好性は同程度であり、水と0.2M NaClでは水の嗜好性が高い。3) フロセミド投与によって0.2M NaClの摂取量が水と同程度かそれ以上になった。0.1M NaClを用いた場合も同様に、フロセミド投与によってNaCl摂取量が増大した。また、フロセミド投与による嗜好性の変化は、濃度依存的に、摂取量だけでなく摂取時間も増大することが示唆された。

実験3から、食塩の味は食塩ベストニューロンのうちでも、アミロライドに感受性のあるニューロンにより伝えられることがわかった。それに対して、アミロライド非感受性のニューロンは塩化カリウム(KCl)と類似の応答パターンを示すことがわかった。すなわち、NaClとKClは少なくともラットでは全く異なる味として受け取られていることが示唆された。

13

助成番号 0244

食塩欠乏ラットが示す食塩選択行動の解析

—行動科学的、電気生理学的研究—

助成研究者：山本 隆（大阪大学大学院人間科学研究科）

共同研究者：志村 剛（大阪大学大学院人間科学研究科）

乾 賢（大阪大学大学院人間科学研究科）

1. 研究目的

体内が食塩の欠乏状態になると、食塩を選択的に摂取し、しかも正常状態なら避けるほどの高濃度食塩水を好んで摂取することが知られている。このような合目的な行動をとらせる体のしくみを解明することが本研究の目的である。実験目標は以下の通りである。

1) 食塩を探り出す手掛りは何か？直接味わったときの味覚を手掛りにすることは知られているが、もし、欠乏状態になる前にある匂いをつけた食塩水を経験させておいたとき欠乏状態にすればこの匂いが手掛りになるだろうか？もし、この匂いを選択するようになれば、動物は現在自分が食塩を欠乏していることを知っていることになる。

2) 食塩と他の塩類と区別して選択するなら、食塩の味覚情報は他の塩類とどのように異なるのか？食塩の味覚情報はどのような点で他の塩類と異なっているのかを味覚神経と中枢ニューロンレベルで明らかにする。

2. 研究方法

1) 実験1（味覚と嗅覚の連合学習を応用した行動学的実験）

Wistar 系雄性ラット（購入時の体重 215-240g）を個別ケージで飼育した。餌は自由に与えたが、朝8時から夕方8時にかけて絶水し、夕方8時から朝8時までの12時間の飲水量を2瓶選択テストで調べた。2瓶の左右の配置を毎日入れ替えた。

2つの瓶からの飲水量がほぼ一定になってから、0.1%サッカリンおよび0.2M NaCl にそれぞれ異なる匂い物質を溶解し、2瓶選択テストで飲ませるトレーニングを6日間行った。

匂い物質およびその用量については、味溶液 100ml あたり、ストロベリーエッセンス (strawberry essence) を 10 μ l、グレープエッセンス (grape essence) を 10 μ l、酢酸

イソアミル (isoamyl acetate) を $3\mu\text{l}$ 、あるいはアーモンドエッセンス (almond essence) を $50\mu\text{l}$ 加えた。ラットにサッカリンと NaCl を両方を飲ませるために、2種類の味溶液を 50ml ずつ与えた。

トレーニングが終わった翌日、トレーニングにおいてサッカリンにつけていた匂い、および NaCl につけていた匂いを蒸留水に溶解し、異なる匂いがする水の摂取量を2瓶選択テストで測定した。味嗜好性と匂い嗜好性の関連によって味覚と嗅覚の連合学習の成立を判断した。

嗜好性は以下の式で求められる嗜好率で表わされる。

$$\text{嗜好率 (\%)} = \frac{\text{A(あるいはB)溶液の摂取量(g)}}{\text{A溶液の摂取量(g)} + \text{B溶液の摂取量(g)}} \times 100$$

利尿剤であるラシックス (lasix, 10mg furosemide/1 ml, Avenis Pharma Ltd., Japan) を各ラットに2時間おきに2回(午前11時と午後1時)、毎回0.7ml 頸部の皮下に注射し、ラットを食塩欠乏状態においた。あらかじめ NaCl に連合させておいた匂いに対する食塩欠乏ラットの嗜好性を検討した。

トレーニング後のラットに0.1%サッカリンを20分間飲ませた後、0.15M LiCl を体重100gあたり2mlの割合で腹腔内に投与し、味覚嫌悪学習条件づけの操作を行った。その後、条件刺激としたサッカリン溶液につけていた匂いに対する嗜好性の変化を調べた。

得られたデータを分散分析によって解析した。さらにニューマン・クールズ検定によって多重比較を行った。

2) 実験2 (ラット用飲水量測定装置を用いた行動解析実験)

Wistar 系雄性ラット4匹(220-280g)を用いた。飼育は装置内で行われ、12時間/12時間の明暗周期環境下におかれた(7時点灯、19時消灯)。実験実施時以外は水あるいは溶液が常に呈示された。エサは体重を一定に保つために制限して与えられた。

ラット用飲水量測定装置はケージ(28cm×25cm×23cm)とモーター部からなる。モーター部は上下2つの筐体からなり、上部から出ている棒の先端にはホルダーがあり、スパウトを2本取り付けることができる。上部の筐体は後方にスライドし、一旦停止し、棒を180度回転させ(スパウトの左右の位置が変わる)、前進する。これらの動きはタイマーによって自由に制御できるが、本研究では5分とした。スパウトは2本のシリンジとつながっており、継続的に溶液を呈示できる。シリンジの下部では溶液が滴下する構造になっており、その滴下を赤外線センサーで検知する。滴下数のデータは1分間ごとにサンプリングされ、コンピュータに記録される。

測定は20日間行った。14日目は水のみを呈示し、飲水行動の解析を行った。58日目は水と0.2M NaClを呈示し、嗜好性について分析した。912日目は水と0.2M NaClを

呈示したが、10日目と12日目にフロセミド（利尿降圧剤）を投与する処置を行った。投与日の11時と13時に1個体につき0.7mlのフロセミドを腹腔内に投与した。11時の投与の直前にスパウトをはずし、暗期に入る直前に戻した。また、10日目はスパウトの除去とともにエサも取り除き、11日目の11時に戻した。12日目はエサを取り除かなかった。13日目は水と0.1M NaClを呈示し、嗜好性を解析した。17日目は水と0.1M NaClを呈示し、18日目と20日目にフロセミドを投与した。手続きは10、12日目と同様とした。

滴下数のデータは自動的にコンピュータに取り込まれた。ただし、滴下数のデータはセンサーの状態によって誤差が生じやすいので、次式によって摂取量のデータに換算した：1分間の摂取量＝1分間の滴下数÷4日間の滴下数×4日間の摂取量

3) 実験3（電気生理学的実験）

Wistar系雄性ラット40匹（200～380g）を用いた。対照群が19匹、実験群が21匹であった。

条件づけ処置は、実験群には条件刺激を0.1M食塩溶液とし、無条件刺激を0.15M塩化リチウムの腹腔内投与として、1日おきに計3回行った。対照群には0.1M食塩溶液の摂取後、生理食塩水を腹腔内投与し、その他は実験群と同様に処置した。

深麻酔（ウレタン 1.3g/kg, i. p.）を施したラットの左側のPBNに記録電極を刺入した。刺激電極は記録部位と同側のGCとCeAに刺入した。

記録電極には、先端を電解研磨したタングステン線をガラスコーティングしたものを使用した。刺激電極には直径80 μ mのポリウレタン被覆ステンレス線を2本より合わせた双極電極を用いた。GCまたはCeAの電気刺激は強度0.5mA、持続時間0.2msecの矩形波を10Hzの頻度で10秒間、計100発与えた。

味刺激として0.5M蔗糖、0.1M食塩、0.01M塩酸、0.02M塩酸キニーネ、0.1M塩化カリウム、0.1M食塩と 10^{-4} Mアミロライドの混合溶液を用いた。試験溶液および蒸留水は動物の口腔内に挿入したポリエチレンチューブを通して10秒間与えた。

3. 研究結果

1) 実験1

異なった匂いをもつ0.1%サッカリンおよび0.2M NaClを2瓶提示により6日間飲ませるトレーニングを行ったあと、味物質を抜いて匂いがする水を飲ませた。ラットは、匂い物質に関わらず、トレーニングにおいてNaClにつけていた匂いのする水に比べて、サッカリンにつけていた匂いのする水を有意に多く摂取した（図1）。

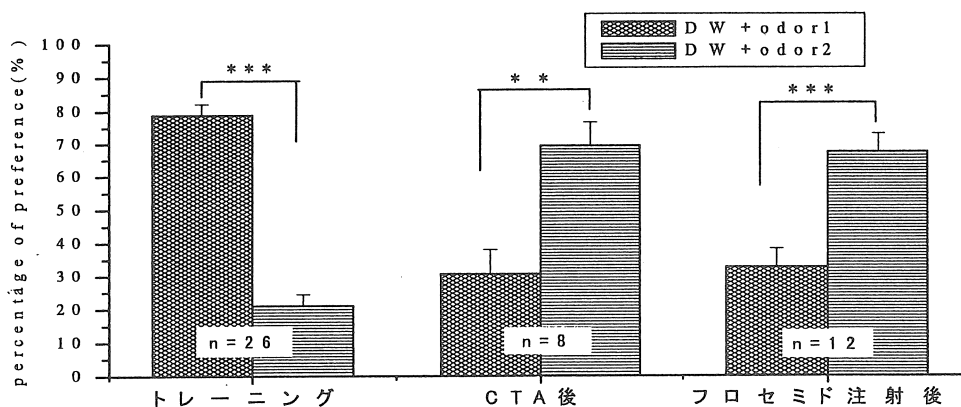


図1 味覚と嗅覚の連合学習と匂い嗜好性

DW:蒸留水

;odor1:トレーニング中サッカリンにつけた匂い;odor2:トレーニング中 NaCl につけた匂い。

: $P < 0.01$; *: $P < 0.001$

サッカリンを条件刺激とする味覚嫌悪条件づけ (Conditioned Taste Aversion: CTA) を獲得したラットでは、サッカリンの摂取が減少するとともに、トレーニングにおいてサッカリンにつけていた匂いのする水の摂取量も有意に減少した (図1)。

フロセミド投与による食塩欠乏のラットでは、トレーニングにおいて NaCl につけていた匂いに対する嗜好率がサッカリンにつけていた匂いの嗜好率より有意に大きくなった (図1)。

2) 実験2

図2(A)と(B)に5~8日目(水と0.2M NaCl)と13~16日目(水と0.1M NaCl)の平均摂取量のグラフを示す。0.2M NaClの場合、1日目はNaClの摂取量が多かったが、2日目以降は水の摂取量の方が多かった。従って、0.2M NaClより水を好むと考えられる。一方、0.1M NaClでは4日間とも摂取量に差がなく、水と0.1M NaClの嗜好性に差がないことが示唆された。

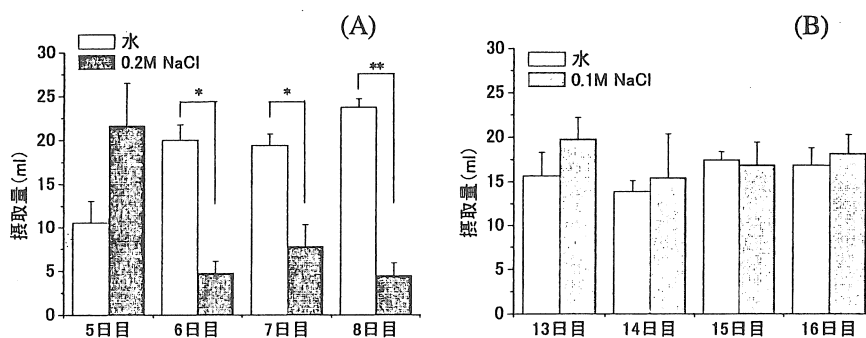


図2 (A) 水と0.2M NaClの平均摂取量、 (B) 水と0.1M NaClの平均摂取量

図3と4に10、12日目と18、20日目の平均摂取量のグラフを示す。0.2M NaClを用いた場合、フロセミド投与によってNaClの摂取量が水と同程度かそれ以上になった。0.1M NaClを用いた場合も同様に、フロセミド投与によってNaCl摂取量が増大した。また10日目と18日目、12日目と20日目を比べると、0.1M NaClの摂取量のほうが多かった。これは濃度が低かったために大量に摂取する必要があったと推測される。また12日目と20日目の全体的な摂取量が増大しているが、これはエサを与えたためと考えられる。

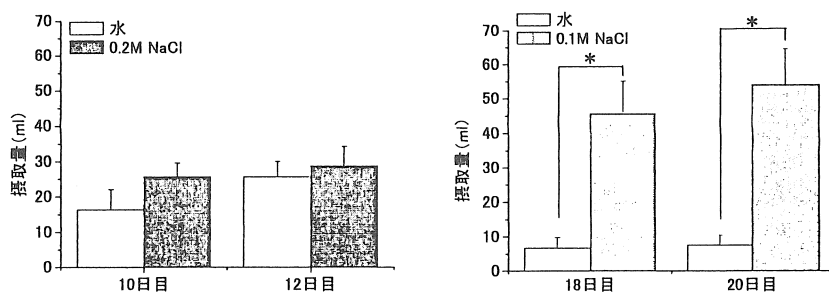


図3 (左) 10日目と12日目の平均摂取量 (暗期のみ)

図4 (右) 18日目と20日目の平均摂取量 (暗期のみ) * $p < .01$

次に、フロセミドを投与した10日目と18日目の19時台における摂取量の変化を図5(A)と(B)に示す(一個体の例)。どちらの場合においても暗期開始直後に最も多くのNaClを摂取している。ただし、0.2M NaClの場合には約20分でNaClの摂取をやめたが、0.1M NaClの場合には約40分間摂取し続けた。以上の結果から、フロセミド投与によって引き起こされるNaCl摂取行動では、濃度に依存して摂取量が増加するだけではなく、摂取時間も増大することが分かった。

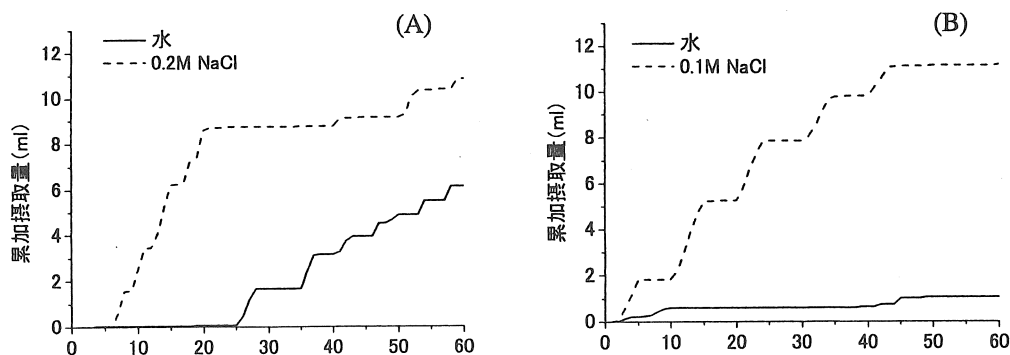


図5 (A) 10日目19時台の摂取量の代表例。(B) 18日目19時台の摂取量の代表例。

3) 実験3

味応答の特徴

対照群では29個(蔗糖ベスト6, 食塩ベスト18, 塩酸ベスト5)、実験群では31個(蔗糖ベスト5, 食塩ベスト18, 塩酸ベスト8)の単一ユニット活動を記録した。

アミロライドによる食塩応答の抑制

対照群と実験群で記録した計36個の食塩ベストユニットのうち、アミロライドによる食塩応答抑制効果が、20%以下のユニットをアミロライド非感受性ユニット(N=10)、40%以上のユニットをアミロライド感受性ユニット(N=26)として分類した。

ユニットタイプ別に見た味応答数

ユニットタイプ別の味応答性を図6に示す。多重比較をおこなったところ、食塩ベストユニットでは実験群の食塩応答が対照群よりも有意に大きかった(図6上段、 $p < 0.05$)。また、食塩ベストユニットをアミロライドに対する感受性によって分類すると、非感受性ユニットでは応答に差がなかったのに対して、感受性ユニットでは実験群の食塩応答が対照群よりも有意に大きかった(図6下段、 $p < 0.05$)。

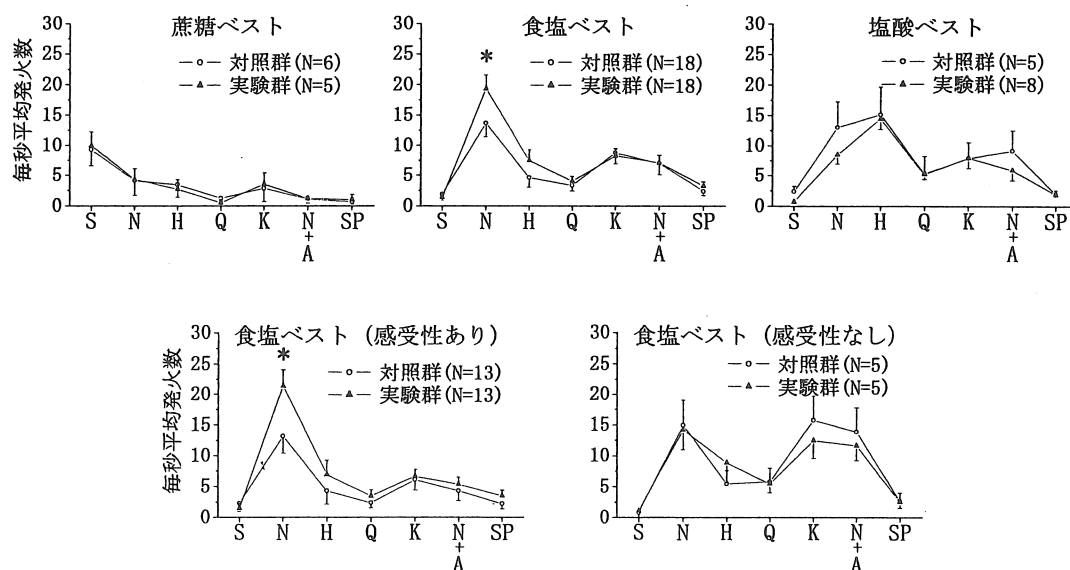


図6 ユニットタイプ別に見た各種味溶液に対する毎秒平均発火数(*: $p < 0.05$)。

S: 蔗糖、N: 食塩、H: 塩酸、Q: 塩酸キニーネ、K: 塩化カリウム、
N+A: 食塩とアミロライドの混合溶液、SP: 自発発火。

4. 考察

実験1の結果から、一過性の急性食塩欠乏状態にし、食塩を渴望させると、食塩を連合していた匂いを選択するようになることがわかった。利尿剤投与の結果、ラットは自分が食塩欠乏状態であることを察知し、食塩と連合していた匂いを食塩の検索手掛りとして活用しようとしたものと思われる。

実験2の結果から、ラット用飲水量測定装置を用いることで摂取行動の量的な変化だけでなく、時間的な変化についても解析を行うことが可能であることが示された。その結果、以下のような知見が得られた。1) ラットの飲水行動は暗期に集中し、摂取行動のピークは暗期開始直後と明け方の2回現れる。2) 水と0.1M NaClの嗜好性は同程度であり、水と0.2M NaClでは水の嗜好性が高い。3) フロセミド投与による嗜好性の変化は、濃度依存的に、摂取量だけでなく摂取時間も増大する。

実験3から、食塩の味は食塩ベストニューロンのうちでも、アミロライドに感受性のあるニューロンにより伝えられることがわかった。それに対して、アミロライド非感受性のニューロンは塩化カリウム (KCl) と類似の応答パターンを示すことがわかる。すなわち、NaClとKClは少なくともラットでは全く異なる味として受け取られていることがわかる。

5. 今後の課題

本研究により、ラットは食塩と塩化カリウムを異なった神経応答を示すことにより区別していること、食塩の情報はアミロライド感受性の神経応答を示すニューロンにより伝えられることが明らかになった。食塩欠乏状態になると、これらの神経の働きで、食塩を積極的に濃度に応じて必要量を摂取させる行動をとらせる。今後、このような食塩摂食行動のアクセルとブレーキの働きを神経機構としてより詳細に明らかにしたい。本研究でもっとも興味深かったのは、においをつけた食塩水を摂取させておくと、ラットはその味とにおいを結びつけて記憶すること、そして食塩欠乏にしたときはそのにおいを手掛りにして選択行動をとること、さらに興味深いのはフロセミド投与により食塩欠乏にしたとき、ラットは自分が食塩欠乏状態であることを認知していることを示すものである。今後、体内食塩レベルを認知するメカニズムを明らかにしたい。

6. 文献

- 1) 白 文忠、山本 隆 日本味と匂学会誌 8(3): 547-550, 2001.
- 2) 乾 賢、渡部美紀、山本 隆 日本味と匂学会誌 8(3):515-518, 2001.
- 3) 時田賢一、志村 剛、山本 隆 日本味と匂学会誌 9(3): 695-698, 2002.

Analyses of salt appetite with behavioral and electrophysiological methods.

Takashi Yamamoto , Tsuyoshi Shimura and Tadashi Inui
Graduate School of Human Sciences, Osaka University

S u m m a r y

Associative learning between taste and odor was studied in Wistar male rats. They were trained to drink 0.5 mM Na-saccharin and 0.2M NaCl which contained low concentrations of odor stimuli such as strawberry essence, grape essence, almond essence or iso-amylacetate. After the 6 day-training session, they were tested for odor preference by exposing two kinds of waters, each of which contained one of the odors with the conventional two-bottle preference test. When the rats were put into sodium deficiency by injections of a diuretic, furosemide, they preferred water with the odor previously associated with NaCl. This finding suggests that odors can work as an effective cue to search foods needed on the basis of odor-taste association learning acquired after mere exposure to these flavored foods.

Rats drank water almost exclusively by in the dark cycle with the two peaks of intake at 19:00-20:00 and at 4:00-5:00. When water and NaCl were presented, rats preferred water to 0.2M NaCl, whereas no significant difference was detected between water and 0.1M NaCl. The rats administrated with furosemide preferred 0.2M NaCl to water soon after presentation of these fluids, but the total intake was greater for water than for 0.2M NaCl during the 12-h dark period. On the other hand, the preference of 0.1M NaCl to water was observed throughout the dark period. These results indicate that both the internal level of Na ions and the hedonics of NaCl taste regulate salt preference.

We recorded taste responses of single neurons in the parabrachial nucleus in rats to different kinds of taste stimuli. Only the amiloride-sensitive NaCl-best neurons showed enhanced responses to NaCl in rats conditioned to avoid NaCl than in control rats. This result shows that salt taste is conveyed exclusively by amiloride-sensitive neurons, but not by neurons responsive to other salts such as KCl.