

塩味の嗜好性を制御する脳神経基盤の解明

吉田悠太

茨城大学農学部食生命科学科

概要 味覚は、食事の喜びを享受し、健康的な食生活を維持する上で重要な化学感覚である。これまでに末梢の味蕾における味刺激の検出メカニズムについては多くの研究が積み重ねられてきたが、中枢において味覚嗜好性が制御されるメカニズムについては依然分かっていないことが多い。塩分の多い食品の摂り過ぎは生活習慣病の要因となるが、食塩の嗜好性は高いため減塩は容易ではない。そこで本研究では、塩味嗜好性を制御する脳神経基盤に着目することにした。特に本研究では、精神的なストレスが塩味嗜好性に及ぼす影響について検討を行った。慢性社会的敗北ストレスモデルは、代表的なうつ病モデル動物として多くの研究に利用されている。本研究では、標準的な慢性社会的敗北ストレスモデル作製時の物理的なストレスを軽減した軽度の亜慢性社会的敗北ストレス(sCSDS)モデルを用いて、精神的なストレスが塩味嗜好性に及ぼす影響について検討を行った。

7週齢オスのC57BL/6J (B6)マウスと5ヶ月齢以上のICRマウスを用いた。1週間の馴致の後、B6マウスをsCSDS群とコントロール群に分けた。B6マウスを、体の大きなICRマウスに毎日短時間暴露し、居住者-侵入者パラダイムによる闘争を引き起こし、身体的なストレスを負荷した。1日目の暴露時間は5分間とし、毎日30秒ずつ減らした。11~15日目は暴露時間を30秒とした。その後、透明な仕切りを介してB6マウスをICRマウスと同居させることで精神的なストレスを負荷した。これらのストレスを15日間負荷した。11日目に社会性行動テストを実施した。12~14日目に300 mM NaClと水のボトルを用いて48時間の二瓶選択試験を実施した。ボトルの位置は24時間後に交換した。14日目に利尿剤であるフロセミドを腹腔内投与し、低Na飼料を21時間給餌した。その後、15~16日目に再び24時間の二瓶選択試験を実施した。ボトルの位置は1時間後と12時間後に交換した。

既報の通り、sCSDSの負荷により、sCSDS群のマウスの体重、摂食量、並びに飲水量が有意に増加した。一方、本研究では社会性行動の減少は観察されなかった。二瓶選択試験の結果、コントロール群のマウスは、300 mM NaClを有意に忌避した。一方、sCSDSを負荷すると、300 mM NaClに対する嗜好性が劇的に増強された($P < 0.001$)。塩分欠乏処理から2時間後に実施した二瓶選択試験では、コントロール群、並びにsCSDS群のマウスは共に300 mM NaClに嗜好性を示した。このことから、sCSDSの負荷は、300 mM NaClに対する嗜好性を増強するが、sCSDSマウスは300 mM NaClに対する味覚感受性を失っていないことが考えられた。

これまでに、うつ病は高血圧、脳血管疾患、並びに心血管疾患などの発症と関連していることが報告されている。ストレスによる塩味嗜好性の変化がこれらの疾患の発症と関連しているかもしれない。またsCSDSモデルは、塩分に高い嗜好性を示す新規モデルとして有用であると考えられた。sCSDSモデルを活用していくことで、塩味嗜好性を制御する脳内メカニズムの解明や、新たな減塩法の開発に貢献できる可能性が期待できる。

1. 研究目的

味覚は、食事の喜びを享受し、健康的な食生活を維持する上で重要な化学感覚である。現在、味覚は「甘味、う

ま味、苦味、酸味、並びに塩味」の基本五味に大別される。味物質は口腔内の味蕾により検出され、その情報が味神経から中枢へと伝達されることで味が知覚される。これま

でに味蕾における味刺激の検出を担う味覚受容体の研究が進展しており、基本五味に対する全ての味覚受容体が同定されている¹⁻⁴⁾。一方、中枢に伝達された味覚情報がどのように処理され、最終的に動物の食行動を制御しているかについては依然分かっていないことが多い。塩分の多い食品の摂り過ぎは生活習慣病の要因となるが、食塩の嗜好性は高いため減塩は容易ではない。そこで本研究では、塩味嗜好性を制御する脳神経基盤に着目することにした。特に本研究では、精神的なストレスが塩味嗜好性に及ぼす影響について検討を行った。

慢性社会的敗北ストレスモデルは、代表的なうつ病モデル動物として多くの研究に利用されてきた⁵⁻⁷⁾ (Fig. 1)。標準的な慢性社会的敗北ストレスモデルでは、ストレスを負荷するマウスを体の大きなマウスに短時間暴露する。このように侵入者-居住者パラダイムによる闘争を引き起こすことで、5分間~10分間の物理的なストレスを負荷する。その後、透明な仕切りを介して体の大きなマウスと長時間同居させることで、視覚、聴覚、並びに嗅覚を介した精神

的なストレスを24時間負荷する。これらの処理を10日間程度継続させる。本研究では、標準的な慢性社会的敗北ストレスモデル作製における物理的なストレスを軽減した亜慢性社会的敗北ストレスモデル^{8,9)}を用いて、精神的なストレスが塩味嗜好性に及ぼす影響について検討を行った。

2. 研究方法

2.1 実験動物

オスのC57BL/6J (B6) マウス (7週齢) およびSlc:ICR (ICR) マウス (リタイア; 5ヶ月齢以上) を用いた。マウスは、ウッドチップを敷いたシングルケージ (ケージサイズ 143×293×148 mm) に個別に収容した。B6 マウスに実験用食餌 (CA-1; 日本クレア株式会社) とイオン交換水を自由に与え、ICR マウスに標準的な実験用食餌 (MF pellet; オリエンタル酵母株式会社) と水道水を自由に与え、12時間の明暗サイクル (午前7時に点灯) の動物施設で飼育した。本研究の実験スケジュールを Fig. 2 に示す。

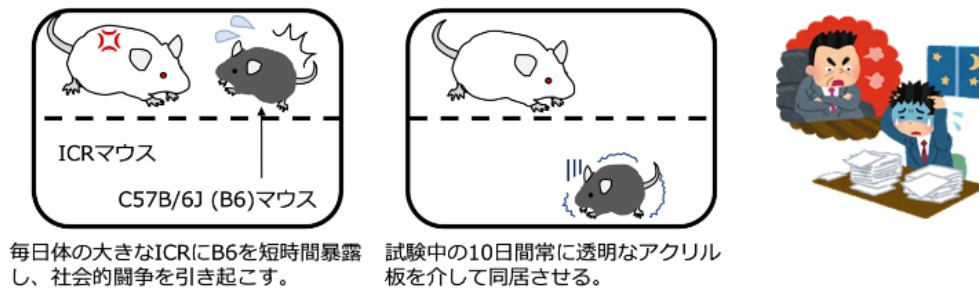


Fig. 1 Illustrations of chronic social defeat stress model

Chronic social defeat stress comprises 1) short-term physical stress and 2) long-term psychological stress. B6 mice are exposed to ICR mice and physical attacks by the resident-intruder paradigm (30 sec to 5 min/day). Then, the B6 mice are moved into the neighboring compartment of the ICR mice for 24 hr and exposed to psychological stress. The B6 mice are repeatedly exposed to physical and psychological stress for ten days or more.

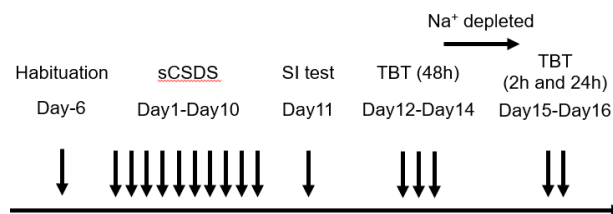


Fig. 2 Schedule of the present study.

Firstly, the B6 mice were habituated for one week (Day -6 to Day 0). sCSDS (subchronic and mild social defeat stress) were performed from Day 1 to Day 16. From Day 11 to Day 15, physical contact with the ICR mice was performed for 30 sec/day, and the B6 mice were moved to the neighboring compartment of the ICR mice for 24 hr. SI test (social interaction test) was performed on Day 11. TBT (two-bottle choice test) was performed for 48 hr from Day 12 to Day 14. On Day 14, the B6 mice were intraperitoneally injected with furosemide and fed low Na diet for 21 hr. Then, the TBT tests were performed for 2 hr and 24 hr.

2. 2 亜慢性社会的敗北ストレスモデルの作製

亜慢性社会的敗北ストレス(subchronic and mild social defeat stress; sCSDS)では、標準的な社会的敗北ストレスモデルの作製と比較して短時間の物理的なストレスを負荷することで作製した^{8,9)}。まず ICR マウスの攻撃行動時間を評価し、30 匹の ICR マウスの中から 15 匹の攻撃的な ICR マウスをスクリーニングした。攻撃的な 15 匹の ICR マウスを、SD (social defeat) ケージ (ケージサイズ 220 × 320 × 135 mm) を透明の仕切りで二つの区画に分けた片方の区画に移した。オスの B6 マウスを 1 週間馴致し、sCSDS 群(n = 15)とコントロール群(n = 8)に分けた。その後 1 日目から 14 日目までは、sCSDS 群のマウス (B6) は、毎日見知らぬ ICR マウスに短時間曝露された。sCSDS 負荷においては、身体接触の時間は、1 日目は 5 分間とし、2 日目から 10 日目までは身体接触の時間を 1 日あたり 0.5 分ずつ短縮した^{8,9)}。10 日目以降も毎日 0.5 分間 ICR マウスに曝露した。身体的接触の後、毎日 24 時間、B6 マウスを ICR マウスと透明な仕切りを介して同居させ、精神的なストレスを負荷した。これらの処理を 16 日目まで繰り返した。コントロールマウス(B6)は、仕切りのある SD ケージの各区画にそれぞれペアで飼育した。

2. 3 社会性行動テスト

11 日目に社会性行動テストを実施した^{8,9)}。オープンフィールドアリーナ(400 mm × 400 mm × 400 mm)に、ワイヤーメッシュの窓を 3 つ備えたプラスチック製のインタラクションボックスを設置し、インタラクションボックスの周囲の 6~7 cm 幅の領域をインタラクションゾーンとした。インタラクション用のボックスは 20 lux の照明下で設置した。暗室に 30 分マウスを置いてから実験を行った。オスの ICR マウスをインタラクションボックスに入れた場合と入れない場合の B6 マウスの行動をそれぞれ観察した。社会的相互作用(social interaction; SI)スコアは、ターゲット存在時のインタラクションゾーン滞在時間/ターゲット不在時のインタラクションゾーン滞在時間 × 100 として算出した。

2. 4 塩味嗜好性試験

塩味嗜好性試験は、Matsuda ら、2017 を参考とした¹⁰⁾。12 日目に、15 mL のガラス製試験管にシリコン製の栓とノズルを取り付けた 2 つのボトル(Drinko-measurer DM-G1; O'Hara & Co. Ltd., 東京, 日本)¹¹⁾を用意した。イオン交換水を入れたボトルと 300 mM NaCl 溶液を入れたボトル

を SD ゲージの B6 側に 2 つ 48 時間提示した。24 時間後、位置の影響を無くすため、2 本のボトルの位置を入れ替えた。48 時間後、B6 マウスにフロセミド溶液を腹腔内投与した。3 時間絶食、絶水を行った後、飲水ボトルと CA-1 低 Na 飼料(日本クレア株式会社)を 21 時間与えた。15 日目にイオン交換水を入れたボトルと 300 mM NaCl 溶液を入れたボトルを SD ゲージの B6 側に 2 つ設置した。1 時間後、二つのボトルの位置を入れ替え、2 時間後ボトルの重さを測定した。12 時間後ボトルの位置を再び入れ替え、24 時間後ボトルの重さを再度測定した。300 mM NaCl 溶液の嗜好率は、300 mM NaCl 溶液飲水量/総飲水量(300 mM NaCl 溶液飲水量 + イオン交換水飲水量) × 100 で計算した。

2. 5 統計解析

体重、摂食量、飲水量の解析については、二元配置反復測定分散分析を用いた。その他のデータの解析については、unpaired t-test を用いた。統計解析は、R statistical package version 3.4.3 (The R Project, Vienna, Austria) と Excel (2011) (Microsoft, Redmond, WA, USA) を用いて実行した。P < 0.05 を有意水準とした。

3. 研究結果

3. 1 体重、摂食量、飲水量

二元配置反復測定分散分析により、sCSDS がマウスの体重、摂食量、並びに飲水量に有意な影響を与えることを確認した。また unpaired t-test により、1 日目から 10 日目までの総体重増加量、総摂食量、総飲水量は、いずれも sCSDS 群で有意に増加していた。

3. 2 社会的相互作用試験

社会的敗北ストレスモデルでは、SI スコアに基づいて、ストレスに強い抵抗性マウス(SI スコア > 100)とストレスに弱い感受性マウス(SI スコア < 100)の 2 つのマウス集団が生成されることが報告されている⁵⁾。本研究では 15 頭の sCSDS マウスのうち、ストレス抵抗性のマウスが 13 頭、ストレス感受性のマウスが 2 頭観察された。また sCSDS 群とコントロール群で SI スコアに有意な差は見られなかった。

3. 3 二瓶選択試験

12 日目から 14 日目の塩分欠乏処理を施さずに実施した二瓶選択試験では、コントロール群は 300 mM NaCl 溶液を忌避したが、sCSDS 群は 300 mM NaCl 溶液を忌避しなかった。sCSDS 群とコントロール群の 300 mM NaCl 溶

液に対する嗜好率には顕著な差が観察された ($P < 0.001$)。一方、16 日目に塩分欠乏処理を施したマウスに二瓶選択試験を行った 2 時間後では、コントロール群、sCSDS 群のどちらも 300 mM NaCl 溶液を嗜好した。24 時間後の二瓶選択試験の結果ではコントロール群は 300 mM NaCl 溶液を忌避し、sCSDS 群は 300 mM NaCl 溶液を忌避しなかった。

4. 考察

sCSDS 群はコントロール群と比較して体重、摂食量、並びに飲水量の増加を示したが、SI スコアに有意な差はなく sCSDS マウス 15 頭のうちストレス感受性個体は 2 頭のみであった。sCSDS マウスの体重、摂食量、飲水量の増加は過去の報告^{8,9)}と一致しており、マウスが社会的敗北ストレスの影響を受けたことを示していると考えられた。一方で、SI スコアが sCSDS 群で減少しなかった点については、今回使用した飼料に関係しているのではないかと考えている。先行研究において、半精製飼料 (AIN-93G) と非精製飼料 (MF) をそれぞれ給餌すると、社会的敗北ストレス曝露後の SI スコアが変化するという報告がある¹²⁾。今回の実験では、CA-1 という非精製飼料を利用したことにより、ストレス抵抗性マウスの割合が増加した可能性が考えられた。

コントロール群は塩辛い 300 mM NaCl 溶液を忌避したが、sCSDS 群は 300 mM NaCl 溶液を忌避しなかった。しかし、塩分欠乏処理を施すと sCSDS 群も 300 mM NaCl 溶液を好んで飲むようになっていたことから、sCSDS マウスは 300 mM NaCl に対する味覚感受性を失ってはいないことが示された。したがって、精神的なストレスは、塩辛い味に対する嗜好性を顕著に増強する可能性が考えられた。これまでに、うつ病と高血圧や心血管疾患との間に関連があることが報告されている¹³⁾。このことから、ストレスにより塩辛い味に対する欲求が高まると、食習慣が変化することにより血圧が上がり、血管系の病気のリスクが高くなるかもしれない。

5. 今後の課題

本研究において、sCSDS モデルマウスは、高い塩味嗜好性を示すモデル動物として、塩味嗜好性の研究に有用である可能性が考えられた。食塩の嗜好性は高いため減塩は容易ではないが、新たに本研究により見出した高い塩味嗜好性を示す sCSDS マウスを減塩の研究に利用することで、過剰な塩味欲求を発生させるメカニズムの解明

や、過剰な塩味欲求を抑える新たな減塩法の開発により、我々の健康や食生活を維持するための一助となるような研究が進むことが期待される。

6. 文献

1. Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115(3), 255-266.
2. Mueller, K. L., Hoon, M. A., Erlenbach, I., Chandrashekar, J., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. (2005). The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature*, 434(7030), 225-229.
3. Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A., Hummler, E., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2010). The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, 464(7286), 297-301.
4. Zhang, J., Jin, H., Zhang, W., Ding, C., O'Keeffe, S., Ye, M., & Zuker, C. S. (2019). Sour sensing from the tongue to the brain. *Cell*, 179(2), 392-402.
5. Krishnan, V., Han, M. H., Graham, D. L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S. J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D. C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T. A., Neve, R. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A. J., Self, D. W., Lee, F. S., Tamminga, C. A., Cooper, D. C., Gershenfeld, H. K., Nestler, E. J. (2007). Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, 131, 391-404.
6. Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1161-1169.
7. Golden, S. A., Covington, H. E., Berton, O., & Russo, S. J. (2011). A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nature protocols*, 6(8), 1183-1191.
8. Goto, T., Kubota, Y., Tanaka, Y., Iio, W., Moriya, N., & Toyoda, A. (2014). Subchronic and mild social defeat stress accelerates food intake and body weight gain with polydipsia-like features in mice. *Behavioural brain research*, 270, 339-348.

9. Goto, T., & Toyoda, A. (2015). A mouse model of subchronic and mild social defeat stress for understanding stress-induced behavioral and physiological deficits. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (105), e52973.
10. Matsuda, T., Hiyama, T. Y., Niimura, F., Matsusaka, T., Fukamizu, A., Kobayashi, K., Kobayashi, K., & Noda, M. (2017). Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nature Neuroscience*, 20(2), 230–241.
11. T. Furuse, D.A. Blizard, K. Moriwaki, Y. Miura, K. Yagasaki, T. Shiroishi, T. Koide, Genetic diversity underlying capsaicin intake in the Mishima battery of mouse strains, *Brain Res. Bull.* 57 (2002) 49e55.
12. Goto, T., Kubota, Y., & Toyoda, A. (2016). Effects of diet quality on vulnerability to mild subchronic social defeat stress in mice. *Nutritional Neuroscience*, 19(7), 284-289.
13. Hare, D. L., Toukhsati, S. R., Johansson, P., & Jaarsma, T. (2014). Depression and cardiovascular disease: A clinical review. *European Heart Journal*, 35(21), 1365–1372.

A Study on the Central Nervous System that Regulates Salt Taste Preference

Yuta Yoshida

Department of Food and Life Sciences, Ibaraki University

Summary

Taste is important for enjoying food and maintaining our quality of life. However, excess consumption of appetitive salty or sweet foods could be the cause of lifestyle-related diseases. Although cumulative studies have elucidated peripheral taste sensing mechanisms mediated by taste receptors, it has not been fully understood how taste preference is regulated in the central nervous systems. Here, we focused on the central nervous system that regulates salt taste preference, and we studied the effects of psychological stress on salt taste preference. Chronic social defeat stress (CSDS) model is one of the most commonly used animal models of depression. CSDS is comprised of 1) short-term physical stress induced by the resident-intruder paradigm and 2) long-term psychological stress. In the present study, we used a subchronic and mild social defeat stress (sCSDS) model, which was generated by milder physical stress compared to the standard CSDS paradigm.

We used the 7-week-old C57BL/6J (B6) mice and the more than 5-month-old ICR mice. The B6 mice were habituated for 1 week and divided into sCSDS group and control group. Then, the B6 mice were exposed to physical attacks by the ICR mice for 30 sec to 5 min/day. The attacking duration was set to 5 min on Day 1, and it was reduced to 30 sec/day. From Day 11 to 15, the B6 mice were exposed to physical attacks for 30 sec. Then, the mice were moved into the neighboring compartment of the ICR mice for 24 hr. The sCSDS was performed from Day 1 to 15. On Day 11, social interaction test was performed. From Day 12 to 14, the two-bottle choice test using 300 mM NaCl and water was performed for 48 hr. On Day 14, the B6 mice were intraperitoneally injected furosemide and fed low sodium diet for 21 hr. Then, from Day 15 to 16, the two-bottle choice test using 300 mM NaCl and water were performed for 2 hr and 24 hr.

We demonstrated that sCSDS significantly increased body weight, food intake, and water intake, as shown previously. However, social interaction behavior was not significantly changed in the sCSDS mice. While the control mice severely avoided 300 mM NaCl, the preference for 300 mM NaCl dramatically upregulated in the sCSDS mice compared to the control mice (p -value < 0.001). After sodium depletion, both sCSDS mice and control mice preferred 300 mM NaCl, suggesting that sCSDS upregulated salt taste preference, but not abolished salt taste sensitivity. The present study showed the possibility that upregulation of salt taste preference could be related to psychological stress-induced cardiovascular diseases. Future investigations of the sCSDS model, which shows a high preference for salt taste, could contribute to understanding the mechanisms of central nervous systems regulating salt taste preference, and the new approach to achieving a reduction of dietary salt intake.