

塩の美味しさを高める神経基盤の解明

田中 大介¹, 野中 茂紀²

¹ 東京医科歯科大学認知神経生物学分野, ² 基礎生物学研究所イメージングサイエンス

概要 塩は、体内のナトリウムイオンが欠乏している時ほどより美味しく感じられる。しかしこれまでのところ、体内のナトリウム欠乏が、塩をより美味しく感じさせる神経メカニズムの全容は明らかになっていない。マウスやラットなどの齧歯類が食塩水を美味しいと感じているかどうかは、口腔顔面および前脚の動きを検出する味覚反応テストにおける「快反応」で定量的に見積もることができる。また、絶塩時に活動する神経細胞(絶塩細胞)は、塩を美味しく感じさせる神経回路を理解する上で、その始点となる重要な細胞であると考えられる。

本研究では、塩の摂取を増加させることが知られている脳弓下器官(SFO)から分界条床核腹側部(vBNST)に投射する神経細胞(SFO → vBNST 細胞)の活動により、塩摂取時の快反応が誘導されるかを明らかにすること、および絶塩細胞の分布を全半球に亘って網羅的に調べ、絶塩細胞が分布する新たな脳領域を同定することを目的とした。

SFO → vBNST 細胞を特異的に活性化するためには化学遺伝学的手法を用いた。絶塩細胞を網羅的に同定するためにはTRAP2;Ai14 マウスと脳の透明化技術、および光シート顕微鏡観察法を組み合わせた。結果、SFO → vBNST 細胞の活性化操作をすると、食塩水の摂取量は増加する傾向があった一方で、食塩水に対する快反応は誘導されなかった。また、絶塩細胞の網羅的探索の結果、視床において絶塩細胞が分布する新たな脳領域が見つかった。今後、本研究と同様の実験、もしくは一部条件を改善した実験を繰り返すことで、結果の再現性を確認することがまずは最も重要である。新たな絶塩細胞の存在が示唆された視床の核は、これまで塩の生体反応との関連についての報告がほとんどなく、塩の情報処理に果たしている役割は不明であり、新規性という点で大変興味深い。今後再現性が確かめられた際には、既知の絶塩細胞との関連や差異など、塩の脳内処理を理解する上で新たな視点を提供してくれることが期待される。

1. 研究目的

塩化ナトリウム(塩)を摂取した際に経験する主観的な美味しさは、生活の質を高める上で極めて重要な役割を担っている。塩は、体内のナトリウムイオンが欠乏している時ほどより美味しく感じられることが知られている。しかしこれまでのところ、体内のナトリウム欠乏が、塩をより美味しく感じさせ、塩に対する嗜好を高める神経メカニズムの全容は明らかになっていない。

マウスやラットなどの齧歯類が食塩水を美味しいと感じているかどうかは、口腔顔面および前脚の動きを検出する味覚反応テストを用いることで定量的に見積もることができる¹⁾。味覚反応テストにおいて、舌なめずりや前脚を舐める動き

は、美味しいと感じていることの指標と考えられており、「快反応」と判断される。他方、大口や、頭部や前脚を振る運動などは嫌悪反応と判断される。これまでにラットにおいて、通常嫌悪反応を誘導する高濃度の食塩水が、ナトリウム欠乏時には快反応を誘導するようになることが分かっている^{2,4)}。ただし同様のことがマウスにおいても起こるのかは確認されてない。

マウスにおけるこれまでの知見として、マウスの脳弓下器官(SFO)にはナトリウム欠乏時に活動する神経細胞(絶塩細胞)が存在することが分かっている。絶塩細胞は、塩を美味しく感じさせるシグナルを発している可能性が高く、塩を美味しく感じさせる神経メカニズムを理解する上で重

要な細胞であると考えられる。しかしこれまでのところ、絶塩細胞の分布を脳全域で網羅的に調べられた報告はなく、脳内における絶塩細胞の分布の全貌は明らかになっていない。

また、SFO から分界条床核腹側部 (vBNST) に投射する vGluT2 陽性細胞を強制的に活動させると、塩摂取が誘導されることが知られている⁽⁵⁾。しかしその SFO から vBNST に投射する神経細胞 (SFO→vBNST 細胞) の活動により、塩摂取のみならず、快反応も誘導されるのかは明らかになっていない。

そこで本研究では、(1) マウスにおいて、絶塩により塩に対する快反応が誘導されること、(2) SFO→vBNST 細胞の活動により、塩摂取時の快反応が誘導されるかを明らかにすること、および(3) 脳内における絶塩細胞の分布を網羅的に調べ、絶塩細胞が分布する新たな脳領域を同定することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 マウスにおける快反応の測定と絶塩

野生型マウス (SLC) を用いた。これまでに著者らが報告した方法⁽⁶⁾ とほぼ同じ方法を用いた。マウスは $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、12 時間の明暗サイクル (午前 8 時点灯) で飼育し、餌 (ラボ MR ストック; 日本農産工業, 神奈川県) と水を自由に摂取できるようにした。行動実験では、3-4 週齢のオスを離乳させ、透明プラスチックケージ (12 × 19 × 11 cm) に同世代の兄弟と一緒に、1 ケージあたり 2-4 匹のオスでグループを作って飼育した。行動実験には、取り扱い開始時に 6-14 週齢の雄のみを使用し、ハンドリング開始直前に個別に収容した。行動実験はすべて明期に行った。すべての動物実験は、東京医科歯科大学施設動物管理使用委員会の承認を受け、関連ガイドラインや規則に従って実施した。

マウスは手術の 2 日前から連続して 15-60 分間ハンドリングした。口腔内チューブを埋め込むために、マウスをミダゾラム (4 mg/kg b.w.; Astellas Pharma Inc), ブトルフェノール (5 mg/kg b.w.; Meiji Seika Pharma Co. Ltd.), メドミジン (0.3 mg/kg b.w.; 日本全薬工業株式会社) の混合物⁽⁷⁾ の腹腔内注射 (i.p) により麻酔した。頭皮の正中線上に切開を行った。口腔内ポリエチレンチューブ (SP-10; 株式会社夏目製作所, 東京) に取り付けられた針を切開部位から挿入し、眼球の後方で皮下に進め、右側の口の第一上顎臼歯の外側で出るようにした⁽⁸⁾。チューブの口腔内

端は、口腔粘膜に引き込まれないように、直径約 1 mm になるように熱加工した。マウスはイヤーパーを用いて脳定位固定装置フレーム (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) に装着した。プラスチックバーの一部を歯科用セメントで頭蓋骨に固着した。頭部を切開して取り出したチューブの端は、歯科用セメントでプラスチックバーに固定した。マウスは、感染予防のために抗生物質クロラムフェニコールサクシネート (60 mg/kg b.w.) (第一三共株式会社, 東京) および鎮痛のためにカルプロフェン (5 mg/kg b.w.) (Rimadyl; Zoetis, 東京) を皮下注射した。術後 3 日目に、マウス頭部のプラスチックバーに固定した口腔内チューブの端部に輸液チューブ (SP-10; 株式会社夏目製作所) の一端をコネクタ (KN-394, 2 方向 (0.3 + 0.3); 株式会社夏目製作所) で連結し、他端を 1 mL シリンジに取り付けた針 (30 G x 13 mm; ReactSystem 社, 大阪) に接続し、滅菌 MilliQ 水約 20 μL を動物の口腔内に導入して液体を口腔内に注入できることを確認した。口腔内チューブは、閉塞を防ぐために 2-3 日おきに滅菌 MilliQ 水約 20 μL でフラッシュした。マウスは、行動実験を開始する前に、手術から回復させるため 1-3 週間の時間をおいた。

味覚反応テスト^(1, 9)を用いて、マウスの情動行動反応を測定した。テストチャンバーは、ガラス床とアクリル円筒 (高さ 30cm, 外径 13cm, 厚さ 3mm) で作成した。デジタルビデオカメラ (HDR-PJ800; ソニー, 東京, 日本) をガラス床の下に設置し、マウスの腹側をビデオ撮影した。味覚反応性試験用の溶液の調製には、滅菌 MilliQ 水を使用した。テスト前の約 1 週間に亘り、マウスをテストチャンバーに入れ、口腔内への水を注入して、味覚反応テストの操作手順に適応させた。溶液注入中のマウスの行動を、その後のフレームごとのビデオ解析のためにビデオ録画した。

口腔内溶液注入時の快反応および嫌悪反応の味覚反応パターンは、観察者がフレームごとに手でスコア化した (30 フレーム/秒)^(1, 10)。快反応の値は、観察された、リズムミカルな舌の突出、正中線または側面の単一の舌の突出、および前脚を舐めることの合計数とした。嫌悪反応は、大口 (下唇を引っ込めながら口を大きく開ける)、頭を素早く横に動かすこと、前足で顔を拭くこと、両前肢を素早く振ること、顎を試験室の床に押し付けること、の合計数とした。

マウスにおいて快反応を誘導する可能性のある絶塩状態をつくるために、ラットにおいて快反応を誘導できた方

法^(3,4) , およびマウスにおいて塩摂取を誘導できた方法⁽⁵⁾ を参考にし, furosemide (400 mg/kg b.w.)を皮下に注入し, 飼料と水を除いた状態で 3 時間おいたのち, 減塩飼料および水を与えて 1 日経過後に味覚反応テストを行った。味覚反応テストでは 9%食塩水を口腔内に注入した。

2.2 SFO→vBNST 細胞の特異的な活性化

SFO→vBNST 細胞を特異的に活性化するために, 野生型マウスの脳に, 様々な遺伝子をコードするアデノ随伴ウイルス(AAV)を感染させる方法を用いた。具体的には, まず SFO に神経細胞特異的プロモーターの下流で Cre 遺伝子組換え酵素依存的に人工受容体 hM3Dq 発現する AAV を感染させた。通常, hM3Dq は生体内では何の機能も持たないが, 外部から投与した clozapine N-oxide (CNO) が結合することで, それを発現する神経細胞の活動を誘導することができる。次に vBNST に, 軸索末端に感染し, 軸索を逆行的に移動して細胞体で Cre 活性を発動できる AAV を感染させた。これにより, SFO→vBNST 細胞で特異的に hM3Dq を発現させることができる。この状態で CNO (2 mg/kg b.w.) を腹腔内投与することで, SFO→vBNST 細胞を特異的に活動させることができる。実験では, 絶塩状態ではない, 通常の飼育状態で CNO を投与した時に, 食塩水の摂取および食塩水に対する快反応が誘導されるかを調べた。食塩水の摂取量を調べるためには, two bottle intake test を行った。絶水状態のマウスに水の入ったメジャラーボトルと食塩水の入ったメジャラーボトルの 2 本を提示し, それぞれの摂取量を測定する。快反応の測定は, 先の記述と同様に行った。これらの実験で食塩水の摂取または食塩水に対する快反応が誘導されれば, それら行動を誘導するのに, SFO→vBNST 細胞の活動で十分であることが示唆される。

2.3 絶塩細胞の全半球マッピング

脳内に分布する絶塩細胞を網羅的に同定するために, TRAP2 マウス⁽¹¹⁾を用いた。TRAP2 マウスには, 主に神経活動の直後に特異的に発現する最初期遺伝子 cFos の下流に, 4-hydroxytamoxifen (4-HT) の結合により遺伝子組換え活性を持つようになる iCreERT2 がコードされているため, 4-OHT 存在下で活動した神経細胞で特異的に遺伝子組換えを誘導すること (TRAP) ができる。この TRAP2 マウスと遺伝子組換え依存的に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現する Ai14 マウスを組み合わせた。この

TRAP2;Ai14 ダブルトランスジェニックマウスでは, 4-HT 存在下で活動した神経細胞で特異的に tdTomato が発現する。絶塩状態で飼育したこの TRAP2;Ai14 マウスに 4-HT を投与することで, 絶塩細胞を TRAP し, tdTomato を発現させた。脳を固定し, CUBIC-L/R 法⁽¹²⁾ により全半球を透明化した後, tdTomato 陽性細胞の分布を調べるために, 光シート顕微鏡を用いて全半球を丸ごと撮影した (基礎生物学研究所 野中茂紀先生との共同研究)。得られたデータを元に tdTomato 陽性細胞の分布を三次元的に再構成し, 様々な脳領域における tdTomato 陽性細胞の密度を, 通常状態で TRAP した対照群と比較した。絶塩状態で TRAP したマウスの脳領域で tdTomato 陽性細胞の密度が増加していた場合, それら細胞は絶塩細胞であることが示唆される。

3. 研究結果

3.1 絶塩状態で, 食塩水に対して快反応を示す個体があった

9%食塩水を用いて味覚反応テストを行った結果, 通常状態の個体は全く快反応を示さず (快反応 = 0), 嫌悪反応を示した (嫌悪反応 = 6) (n = 1)。他方, 絶塩状態の個体は, 快反応を示す個体 (快反応 = 20) (n = 1) 示さない個体 (快反応 = 0) (n = 1) がいた。快反応を示した個体は, 嫌悪反応を全く示さなかった (嫌悪反応 = 0)。

絶塩状態においた個体に, 快反応を示す個体と示さない個体があったことを受け, 快反応を示さなかった個体は絶塩状態の程度が弱かったのではないかと考え, 絶塩状態の前後の体重変化を比較した。結果, 快反応を示した個体は 5%減少していたのに対し, 快反応を示した個体は 10%減少していた。したがって快反応を示さなかった個体は絶塩状態の程度が低かったとは言えない。

3.2 SFO→vBNST 細胞の活性化操作をしても, 食塩水に対する快反応は誘導されなかった

SFO→vBNST 細胞で特異的に hM3Dq を発現させる操作をしたのち, CNO を投与して 40 分後に食塩水に対する味覚反応を調べた。対照実験として, 同一個体で CNO の代わりに saline を投与する実験を行った。結果, CNO と saline いずれを投与した場合も, 食塩水に対して快反応はほとんど出なかった (n = 3)。

過去の知見より, SFO→vBNST 細胞を活性化すると食塩水の摂取量が増加することが知られている⁽⁵⁾。本実験で

SFO→vBNST 細胞を機能的に活性化できているのかを確かめるために、CNO を投与することで食塩水の摂取量が増加するのかを調べた。結果、水の摂取量は変わらない一方で、食塩水の摂取量が特異的に増加する個体があった(n = 2 mice among 3 mice)。したがって少なくとも一部の個体(n = 2)では CNO の投与により、食塩水の摂取量および嗜好性が増加するが、食塩水に対する快反応は増加しなかったことになる。

3.3 全半球マッピングにより、絶塩細胞が分布する新たな脳領域が見つかった

TRAP2;Ai14 マウスと全半球解析を組み合わせることで、絶塩状態で活動する細胞が増加する脳領域を探した。結果、視床の特定の核や大脳新皮質の特定の領域において絶塩状態で TRAP したマウスで tdTomato 陽性細胞の密度が増加する傾向があった(絶塩状態, n = 3; 対象群, n = 1) (Fig. 1)。

4. 考察

本研究では、予定していた実験をひと通り行うことができた。しかしいずれの実験でも標本数が十分ではないため、現在までに得られている結果に基づいて強い結論を導くことは難しい。今後、本研究と同様の実験、もしくは一部条件を改善した実験を繰り返すことで、結果の再現性を確認することがまずは最も重要であると考えている。

現時点で強い結論は導き出せないことを踏まえても、いくつか興味深い観察があった。特に新たな絶塩細胞の存在が示唆された視床の核は、これまで塩の生体反応との関連についての報告がほとんどなく、塩の情報処理に果たしている役割は不明であり、新規性という点で大変興味深い。今後再現性が確かめられた際には、既知の絶塩細胞との関連や差異など、塩の脳内処理を理解する上で新たな視点を提供してくれることが期待される。

SFO→vBNST 細胞を活性化する操作をしても快反応が誘導されなかったことについて、まず考慮しなければならないことは、SFO→vBNST 細胞を十分に活性化できていない可能性があることである。今回の操作で、過去の知見の通り、食塩水の摂取量および嗜好性が増加する傾向が見られたため、一定の活性化ができていと考えられるが、全ての SFO→vBNST 細胞のうちどのくらいを活性化できているのかは不明である。より明確な結論を得るために、今後組織学的な解析によりそれぞれの AAV が期待通りの位置に感染していることを確認していくことが必要である。

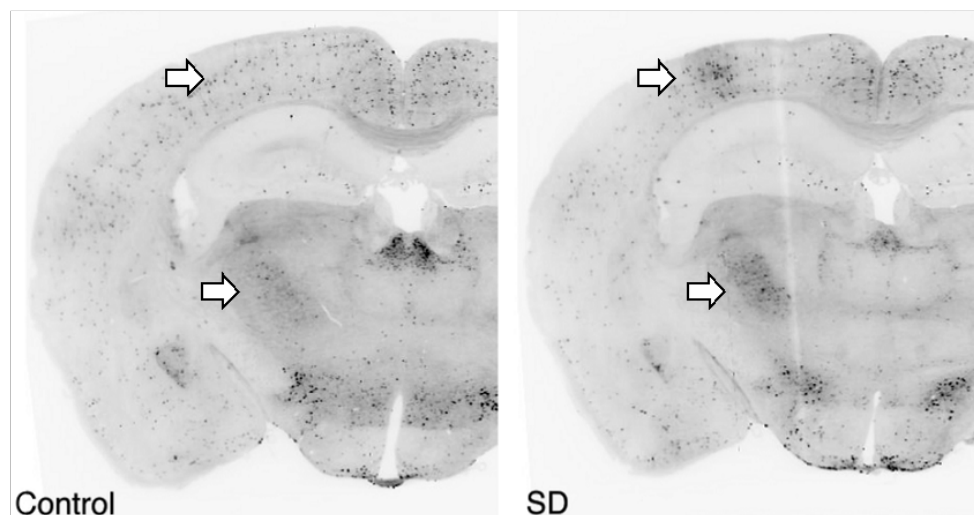


Fig. 1 Several brain regions were activated by the sodium depletion. Distribution of tdTomato-positive cells in the coronal section of TRAP2;Ai14 mice in the normal condition (left) or in the sodium-depleted condition (right). Arrows indicated the region where the density of tdTomato-positive cell was higher in the sodium depletion condition.

5. 今後の課題

本研究では、絶塩状態の、食塩水に対する快反応の誘導効果にばらつきがあったため、マウスにおいて快反応を再現性よく誘導できる絶塩状態をつくるための方法を改善する必要があると考えている。過去の知見として、ラットにおいて再現性よく快反応を誘導できた絶塩状態をつくるために、本研究で用いた furosemide (10 mg/kg b.w.) と減塩飼料を与える方法⁽⁴⁾ と、furosemide (7.5 mg/kg b.w.) を2回投与し、さらに Deoxycorticosterone acetate (5 mg/kg b.w.) を投与して減塩飼料を与える方法⁽³⁾がある。本研究では、マウスで摂塩行動を誘導する方法である furosemide の投与量 (400 mg/kg b.w.) も参考にし、furosemide (400 mg/kg b.w.) と減塩飼料を与える方法を採用した。今後は、まずは furosemide を2回投与し、さらに Deoxycorticosterone acetate を投与して減塩飼料を与える方法を試す必要があると考えている。

6. 文献

1. Berridge, K.C. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 173-198 (2000).
2. Berridge, K.C., Flynn, F.W., Schulkin, J. & Grill, H.J. Sodium depletion enhances salt palatability in rats. *Behav Neurosci* 98, 652-660 (1984).
3. Tindell, A.J., Smith, K.S., Pecina, S., Berridge, K.C. & Aldridge, J.W. Ventral pallidum firing codes hedonic reward: when a bad taste turns good. *J Neurophysiol* 96, 2399-2409 (2006).
4. Clark, J.J. & Bernstein, I.L. Sensitization of salt appetite is associated with increased "wanting" but not "liking" of a salt reward in the sodium-deplete rat. *Behav Neurosci* 120, 206-210 (2006).
5. Matsuda, T. et al. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nat Neurosci* 20, 230-241 (2017).
6. Tanaka, D.H., Li, S., Mukae, S. & Tanabe, T. Genetic Access to Gustatory Disgust-Associated Neurons in the Interstitial Nucleus of the Posterior Limb of the Anterior Commissure in Male Mice. *Neuroscience* 413, 45-63 (2019).
7. Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. & Kurosawa, T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim* 60, 481-487 (2011).
8. Kobayashi, M. et al. Functional neuroimaging of aversive taste-related areas in the alert rat revealed by positron emission tomography. *J Neurosci Res* 91, 1363-1370 (2013).
9. Grill, H.J. & Norgren, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 143, 263-279 (1978).
10. Koizumi, M., Cagniard, B. & Murphy, N.P. Endogenous nociceptin modulates diet preference independent of motivation and reward. *Physiol Behav* 97, 1-13 (2009).
11. Allen, W.E. et al. Thirst-associated preoptic neurons encode an aversive motivational drive. *Science* 357, 1149-1155 (2017).
12. Tainaka, K. et al. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep* 24, 2196-2210 e2199 (2018).

Neural Mechanism of “Liking” for Salt

Daisuke H. Tanaka¹, Shigenori Nonaka²

¹Department of Cognitive Neurobiology, Tokyo Medical and Dental University

²Optics and Imaging Facility, National Institute for Basic Biology

Summary

Salt tastes better when the body is deficient in sodium ions. However, the neural mechanisms by which sodium deficiency in the body makes salt more palatable have not been fully elucidated. Whether rodents such as mice and rats find saltwater tasty can be quantitatively estimated by the "liking" responses in a taste response test that detects oral-facial and forepaw movements. In addition, neurons that are active during salt deprivation (SD cells) are considered to be an important starting point for understanding the neural circuitry that makes salt taste good. In this study, we aimed to clarify whether the “liking” to salt is induced by the activity of neurons projecting from the subformal organ (SFO) to the ventral part of the ventral borderline bed nucleus (vBNST) (SFO-vBNST cells), which is known to increase salt intake, and to examine the distribution of SD cells in the whole hemisphere comprehensively. To specifically activate SFO-vBNST cells, we used a chemogenetic approach. To comprehensively identify SD cells, we combined TRAP2;Ai14 mice with brain transparency techniques and light-sheet microscopy. Results showed that activation manipulation of SFO-vBNST cells tended to increase saline intake, but did not induce “liking” to saline. In addition, a comprehensive search for SD cells revealed a new brain region in the thalamus where SD cells are distributed. In the future, it is most important to confirm the reproducibility of the results by repeating the same experiments as in the present study or by modifying some of the conditions. The nucleus of the thalamus, where the existence of new SD cells was suggested, is very interesting in terms of novelty, since there have been few reports on the relationship between information processing of salt and biological reactions in the region, and the role it plays in salt information processing is unknown. When reproducibility is confirmed in the future, it is expected to provide a new perspective for understanding salt processing in the brain, such as the relationship and differences with known SD cells in other brain regions.