

塩味嗜好学習の表出に関わる神経回路の機能解明

乾 賢

北海道大学大学院歯学研究院口腔生理学教室

概要

本研究は、ナトリウム欠乏経験が強い塩味に対する嗜好をどのように学習させるか、またその神経基盤として視床室傍核 (paraventricular thalamus, PVT) が関与しているかを明らかにすることを目的とした。先行研究において、ラットに対して利尿降圧剤フロセミドを投与し、低ナトリウム飼料を与えた後に高張食塩水を摂取させると摂取量が漸増することが示された。これは、ナトリウム欠乏による体調不良が高張食塩水の摂取によって解消され、強い食塩に対する嗜好が上昇したためと推察された。しかし、条件付け後のラットが強い食塩を好むのかは確認できていなかった。そこで本研究では、行動実験において、利尿降圧剤 (フロセミド) の投与と低ナトリウム飼料の呈示によってラットをナトリウム欠乏状態においた後に、異なる濃度の食塩水を呈示する条件付けを行い、嗜好学習が成立するかを調べた。0.9%および2%食塩水では嗜好の上昇は認められなかったが、3%食塩水では2回目の条件付けにおいて摂取量の有意な増加がみられた。

これらの結果から、ナトリウム欠乏により強い塩味に対する摂取量が増加することが示されたが、それが嗜好の変化によるものであるかは明確にすることはできなかった。また、PVTの関与を調べるためにPVTニューロンに抑制性人工受容体 (hM4Di) を発現させたラットにおいて化学遺伝学的操作 (DCZ 投与) を行っても食塩水摂取行動には有意な変化はみられなかった。したがって、PVTの直接的関与は本研究では示されなかった。今後は塩味嗜好学習の行動モデルの検討と、PVTを含む神経回路のさらなる解析が必要である。

1. 研究目的

日本人は日々の食生活において食事摂取基準よりも多い食塩を摂取している¹⁾。この塩分摂取過多は長年指摘されており、その健康への影響も広く知られているが十分に改善されているとは言えない。その原因は明らかではないが、塩分欠乏の経験が影響している可能性が動物実験によって指摘されている。ラットに利尿降圧剤を投与してナトリウム欠乏を惹起させ、その後に高張食塩水を与えるという処置を繰り返し行くと、通常は嫌悪する高張食塩水の摂取量が増加することが報告されている²⁾。これはナトリウム欠乏による不快感が高張食塩水によって解消されることで、強い塩味に対する嗜好学習が成立するという可能性が考えられている。

これまでに、ナトリウム欠乏と高張食塩水の反復経験による高張食塩水摂取量増加の神経基盤を明らかにする研究に取り組んだ。行動実験において、利尿降圧剤の投与によるナトリウム欠乏状態と高濃度食塩水 (3%) の呈示をラットに繰り返し経験させると、高濃度食塩水の摂取量が増加することがわかった。この摂取量増加が塩味に対する嗜好の上昇であるかは不明であったため、本研究では呈示する食塩水の濃度によってナトリウム欠乏の経験が嗜好に及ぼす影響を調べた。

先行研究ではナトリウム欠乏を繰り返し経験したラット (実験群) と経験していないラット (対照群) で脳の活動に生じる違いを調べる実験も行った。それぞれの群のラットに高濃度食塩水を呈示した後に脳を採取し、細胞興奮によって産生される Fos 蛋白質を発現しているニュー

ーロンの分布を免疫組織化学的方法によって調べた。その結果、視床室傍核 (paraventricular thalamus, PVT) において、実験群の Fos 蛋白質陽性細胞の数は対照群に比べて有意に多かった。そこで本研究では、化学遺伝学的手法を用いた PVT ニューロンの活動操作が食塩水摂取行動に及ぼす影響を調べた。

2. 研究方法

2.1 被験体

雌性の c-Fos-eGFP トランスジェニックラット (Fos-eGFP ラット)³⁾を用いた。このラットでは Fos 蛋白質とともに eGFP が発現する。したがって、eGFP の発現は細胞活性化の指標となり、組織学的に活性化した細胞を観察することができる。この Fos-eGFP ラットを飼養ケージ (KN-601U, 夏目製作所) で蒸留水と通常飼料 (CE-2, 日本クレア) を与えて個別に飼養した。

2.2 実験 1: 等張食塩水による条件付け

2.2.1 プレテスト

6 時間給水制限下においたラットに対して蒸留水と等張 (0.9%) 食塩水の二ビン選好試験を行った。蒸留水と食塩水を入れたシリンジをホームケージにおいて同時に呈示し、2 時間後に摂取量を測定した。呈示開始 1 時間後に溶液の位置を変えた。

2.2.2 条件付け

体重を測定した後、利尿降圧剤フロセミド (10 mg/kg) の皮下投与を 2 回行った。投与間隔は 2 時間とした。1 回目の投与後に床が金網となっている新しいケージにラットを移した。これは排泄物等からのナトリウム摂取を防ぐためである。新しい給水瓶を用いて蒸留水を与え、低ナトリウム飼料を与えて飼料からのナトリウム摂取も極力減らした。1 回目のフロセミド投与から 24 時間後に体重測定、飲水量、低ナトリウム飼料摂取量を測定した。その後、食塩水を 2 時間呈示し、摂取量を測定した。測定終了後にラットを元のケージに戻し、通常飼料、蒸留水、食塩水を与え、24 時間後に体重測定と摂取量の測定を行った。この条件付けを 4 日間隔で行った。1 回目と 2 回目の条件付けでは 0.9% 食塩水を呈示し、3 回目は 3% 食塩水を呈示した。これは、2 回目の条件付けで 0.9% 食塩水の摂取量増加がみとめられず、塩味嗜好性を上昇させるために塩分濃度が不十分であると考えたためである。

2.2.3 テスト

プレテストと同様の手続きで、6 時間の給水制限後に蒸留水と 0.9% 食塩水に対する二ビン選好試験を行った。このテストを 2 日連続で行った。

2.3. 実験 2: 高張食塩水による条件付け

2.3.1 ウィルスベクターの注入手術

6 匹のラットを用いた。5% イソフルランで麻酔を導入したラットの頭部を脳定位固定装置 (ナリシゲ) に固定した。麻酔深度にあわせてイソフルランの濃度を段階的に 2% まで下げた。頭皮を切開し、ラムダとブレグマの高さを一致させた。グルタミン酸作動性ニューロンに抑制性の人工受容体 hM4Di を発現させるウィルスベクター (AAV8-CaMKII α -mCherry) を PVT へ注入した。PVT の直上に脳室と矢状静脈洞があるため、注入用のガラスマイクロピペットを内外側方向に 15 度傾けて、左側から刺入した。ウィルスベクターの注入量は 0.4 μ l で、0.1 μ l/min の速度で注入した。注入後ウィルスベクターが拡散するのを待つために 15 分間静置した後、ガラスマイクロピペットをゆっくり引き上げた。切開部を縫合し、鎮痛剤 (カルプロフェン) と抗生物質 (ゲンタマイシン) を投与した。

2.3.2 プレテスト

実験 1 と同様の手続きで、6 時間の給水制限後に蒸留水と 0.9% 食塩水の二ビン選好試験を 2 日連続で行った。

2.3.3 条件付け

実験 1 と同様にフロセミド投与と摂食量および飲水量の測定を行った。投与 24 時間後に呈示した食塩水の濃度は 3% であった。この条件付けを 4 日間隔で 3 回行った。

2.3.4 テスト

半分のラットにデスクロクロザピン (deschloroclozapine, DCZ; 100 μ g/kg, i.p.) を投与し、残りの半分は DCZ の溶媒である 2% DMSO 含有生理食塩水 (vehicle, VEH) を投与した。投与の 30 分後から蒸留水と 0.9% 食塩水に対する二ビン選好試験を行った。2 日後に投与する薬物を変えて再び二ビン選好試験を行った。給水制限は 6 時間であった。

2.4 実験 3

2.4.1 ウィルスベクターの注入手術

実験 2 と同様に PVT にウィルスベクターを注入する手術を行った。

2. 4. 2 プレテスト

18時間の給水制限後に蒸留水と3%食塩水の二ビン選好試験を3日間隔で2回行った。

2. 4. 3 条件付け

これまでと同様にフロセミド投与と摂食量および飲水量の測定を行った。投与24時間後に蒸留水と3%食塩水を同時に呈示する二ビン選好試験を行った。呈示時間は2時間であった。この条件付けを7日間隔で3回行った。

2. 4. 4 テスト

DCZあるいはVEHを投与し、30分後に蒸留水と0.9%食塩水に対する二ビン選好試験を行った。4日後に投与する薬物を変えて再び二ビン選好試験を行った。給水制限は18時間であった。

2. 5 実験4

2. 5. 1 プレテスト

実験3で用いた個体を被験体とした。18時間の給水制限後に蒸留水と2%食塩水の二ビン選好試験を行った。

2. 5. 2 条件付け

フロセミド投与の24時間後に蒸留水と2%食塩水を同時に呈示する二ビン選好試験を行った。呈示時間は2時間であった。

2. 5. 3 テスト

DCZあるいはVEHを投与し、30分後に蒸留水と2%食塩水に対する二ビン選好試験を行った。3日後に投与する薬物を変えて再び二ビン選好試験を行った。給水制限は18時間であった。

2. 6 実験5

2. 6. 1 ウィルスベクターの注入手術

実験2と同様にPVTにウィルスベクターを注入する手術を行った。

2. 6. 2 プレテスト

16時間の給水制限後に蒸留水と2%食塩水の二ビン選好試験を2日間隔で2回行った。

2. 6. 3 条件付け

フロセミド投与の24時間後に蒸留水と2%食塩水を同時に呈示する二ビン選好試験を行った。呈示時間は2時間であった。この条件付けを7日間隔で2回行った。

2. 6. 4 テスト

DCZあるいはVEHを投与し、30分後に蒸留水と2%食塩水に対する二ビン選好試験を行った。3日後に投与

する薬物を変えて再び二ビン選好試験を行った。給水制限は16時間であった。

3. 研究結果

食塩水と蒸留水の摂取量については、『摂取量×(1000g/体重)』という算式によって体重1kgあたりの摂取量を算出した。

また、『食塩水摂取量/(蒸留水摂取量+食塩水摂取量)×100』という算式によって嗜好率を算出した。

3. 1 実験1

3. 1. 1 プレテスト

0.9%食塩水と蒸留水の摂取量を比較したところ、食塩水の摂取量が多かった(図1A)。溶液間の差を対応のあるt検定によって比較したところ、有意基準($p<0.05$)には達しなかったものの、有意確率は基準に近かった($p=0.073$)。したがって、ラットは0.9%食塩水を好んで摂取する傾向にあったと考えられる。

3. 1. 2 条件付け

1回目の条件付けに比べて、2回目の摂取量が増加した個体($n=2$)がいる一方で、残りの3匹では摂取量が減少した(図1B)。3%食塩水を呈示した3回目は摂取量が大きく減少した。一元配置分散分析を行ったところ、試行の主効果が有意であった($F(2, 8)=14.15, p<0.01$)。Tukey's testを用いた下位検定を行ったところ、3回目の摂取量は1回目と2回目より有意に少なかった(それぞれ $p<0.01$)。

3. 1. 3 テスト

2回のテストにおける0.9%食塩水の摂取量は蒸留水よりも多かった(図1C)。しかし、試行と溶液についての二要因分散分析を行ったところ、いずれの主効果も有意ではなく、交互作用も有意ではなかった。嗜好率について、プレテストとテストの平均値を比較したところ、テストのほうが低かった(図1D)が、対応のあるt検定の結果は有意ではなかった。

3. 2 実験2

3. 2. 1 プレテスト

0.9%食塩水と蒸留水の摂取量について2回のプレテストの平均値を算出した。食塩水の摂取量は蒸留水より多かった(図2A)。溶液間の差を対応のあるt検定によって比較したところ、有意差がみとめられた($p<0.05$)。

3. 2. 2 条件付け

3%食塩水の摂取量は3回の条件付けを通して変化しなかった(図2B)。試行を要因とした一元配置分散分析の結果、主効果は有意ではなかった。

3. 2. 3 テスト

DCZ投与時とVEH投与時で違いはみられず、いずれの場合も0.9%食塩水の摂取量は蒸留水より多かった(図2C)。薬剤と溶液を要因とした二元配置分散分析の結果、薬剤の主効果と交互作用は有意ではなかったが、溶液の主効果が有意であった($F(1, 10) = 10.28, p < 0.01$)。

DCZ投与時とVEH投与時の嗜好率を、プレテストにおける嗜好率の平均値と一標本t検定を用いて比較したところ、DCZ投与時の嗜好率はプレテストより有意に高かった(図2D; $t = 6.89, df = 5, p < 0.01$)。

3. 3 実験3

3. 3. 1 プレテスト

3%食塩水の摂取量は蒸留水に比べて顕著に少なかった(図3A)。溶液間の差を対応のあるt検定によって比較したところ、有意差がみとめられた($t = 21.37, df = 5, p < 0.05$)。

3. 3. 2 条件付け

3%食塩水の摂取量は2回目の条件付けにおいて増加した(図3B)。試行を要因とした一元配置分散分析の結果、主効果が有意であった($F(2, 10) = 6.53, p < 0.05$)。Tukey's testを用いた下位検定を行ったところ、1回目と2回目の差が有意であった($p < 0.05$)。

3. 3. 3 テスト

DCZ投与時とVEH投与時で違いはみられず、いずれの場合も3%食塩水の摂取量は蒸留水より少なかった(図3C)。薬剤と溶液を要因とした二元配置分散分析の結果、薬剤の主効果と交互作用は有意ではなかったが、溶液の主効果が有意であった($F(1, 10) = 86.26, p < 0.01$)。DCZ投与時とVEH投与時の嗜好率を、プレテストにおける嗜好率の平均値と一標本t検定を用いて比較したところ、DCZ投与時の嗜好率との差に有意傾向が認められた($t = 2.32, df = 5, p = 0.068$)。

3. 4 実験4

3. 4. 1 プレテスト

2%食塩水の摂取量は蒸留水に比べて少なかった(図4A)。溶液間の差を対応のあるt検定によって比較したところ、有意差がみとめられた($t = 7.78, df = 5, p < 0.001$)。

3. 4. 2 条件付け

3%食塩水の摂取量はプレテストに比べて増加した(図4B)。試行間の差を対応のあるt検定によって比較したところ、有意差がみとめられた($t = 7.96, df = 5, p < 0.001$)。

3. 4. 3 テスト

DCZ投与時とVEH投与時で違いはみられず、いずれの場合も2%食塩水の摂取量は蒸留水より少なかった(図4C)。薬剤と溶液を要因とした二元配置分散分析の結果、薬剤の主効果と交互作用は有意ではなかったが、溶液の主効果が有意であった($F(1, 10) = 61.39, p < 0.01$)。DCZ投与時とVEH投与時の嗜好率を、プレテストにおける嗜好率の平均値と一標本t検定を用いて比較したところ、いずれも有意差は認められなかった。

3. 5 実験5

3. 5. 1 プレテスト

2%食塩水の摂取量は蒸留水に比べて少なかった(図5A)。溶液間の差を対応のあるt検定によって比較したところ、有意差が認められた($t = 27.90, df = 5, p < 0.001$)。

3. 5. 2 条件付け

3%食塩水の摂取量は1回目と2回目では変化しなかった(図5B)。試行間の差を対応のあるt検定によって比較したところ、有意差が認められなかった。

3. 5. 3 テスト

DCZ投与時とVEH投与時で違いはみられず、いずれの場合も2%食塩水の摂取量は蒸留水より少なかった(図5C)。薬剤と溶液を要因とした二元配置分散分析の結果、薬剤の主効果と交互作用は有意ではなかったが、溶液の主効果が有意であった($F(1, 10) = 137.1, p < 0.01$)。DCZ投与時とVEH投与時の嗜好率を、プレテストにおける嗜好率の平均値と一標本t検定を用いて比較したところ、いずれもプレテストより低かったが、差は有意ではなかった。

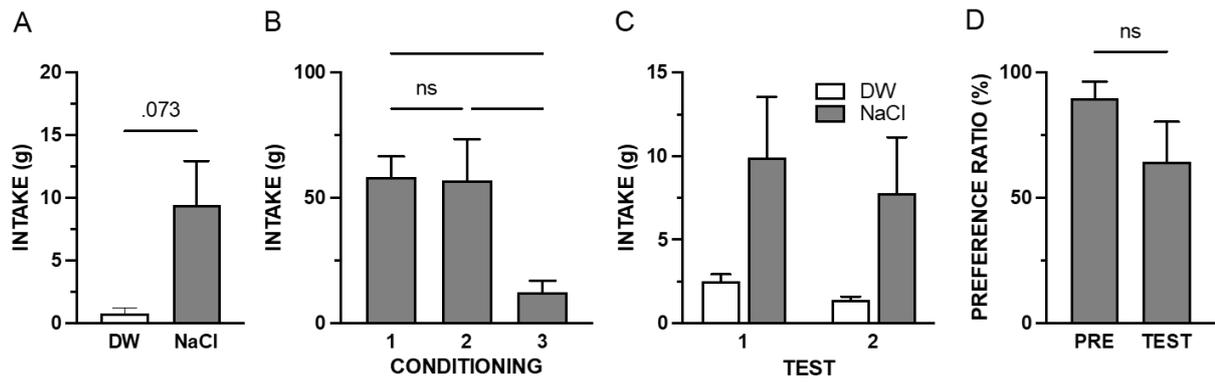


図 1. 実験 1 の結果

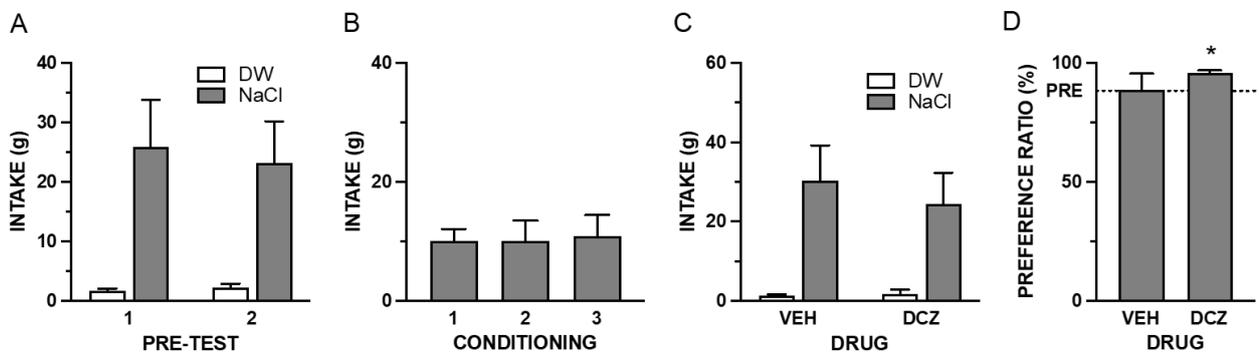


図 2. 実験 2 の結果

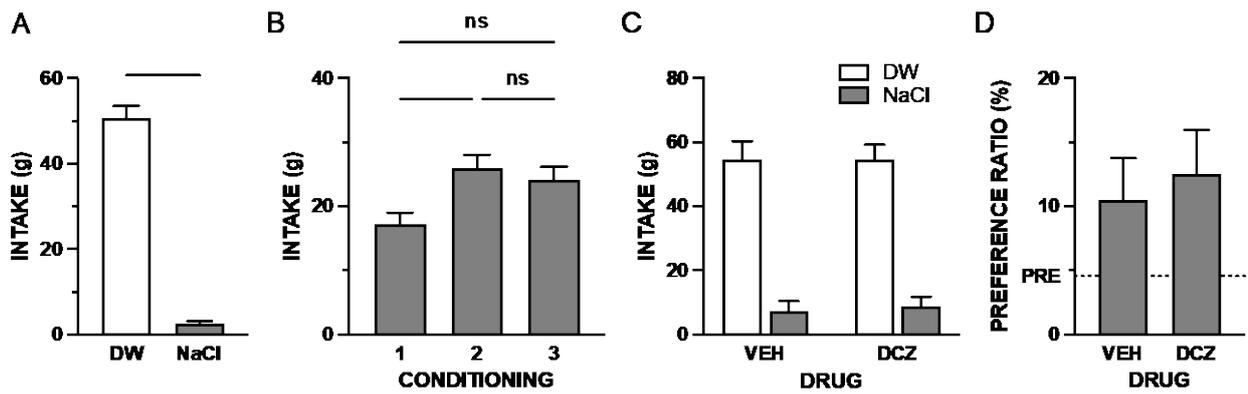


図 3. 実験 3 の結果

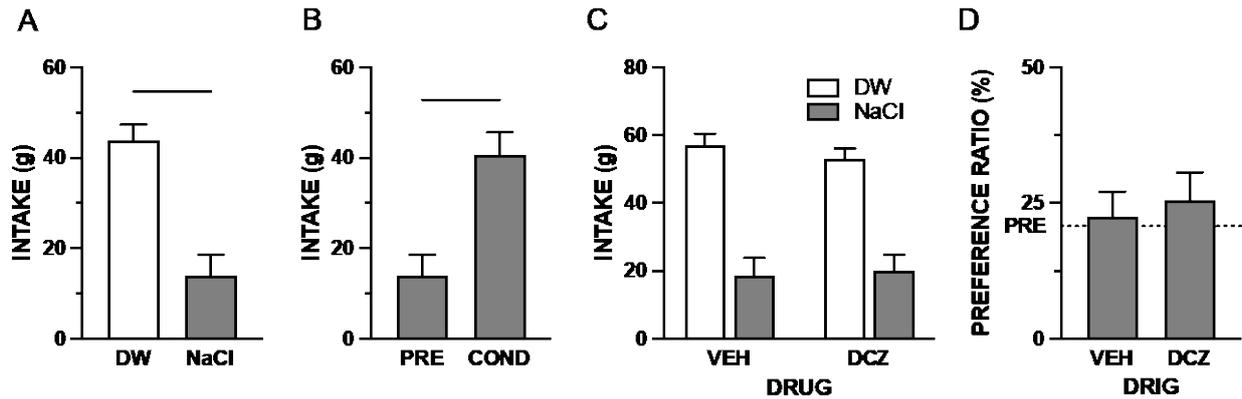


図 4. 実験 4 の結果

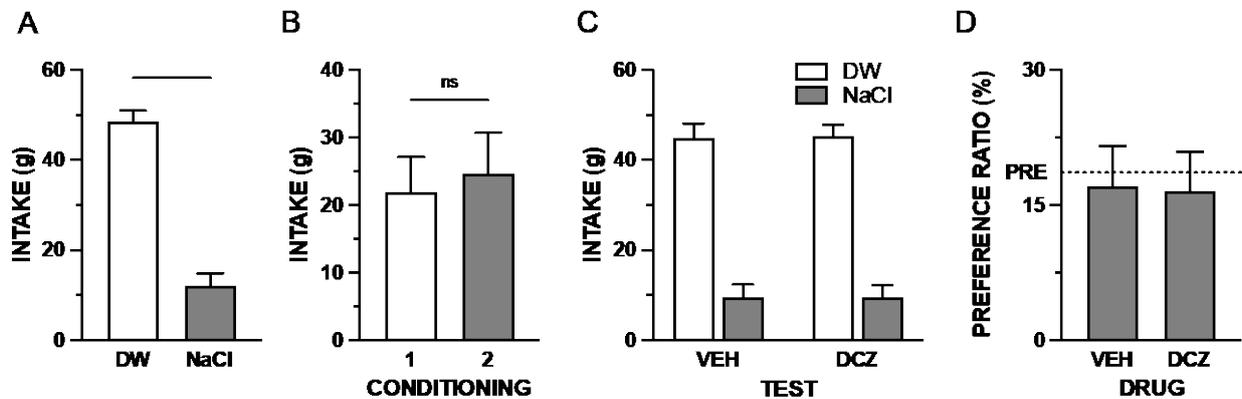


図 5. 実験 5 の結果

4. 考察

本研究では、利尿降圧剤投与によるナトリウム欠乏状態で 0.9%、2%、あるいは 3%食塩水を呈示する条件付けを施すことで塩味に対する嗜好が上昇するかを調べた。

条件付け時に 0.9%あるいは 2%食塩水では条件付けを繰り返しても摂取量は増加しなかった。一方、3%食塩水の摂取量は 2 回目に有意に増加した(図 3B)。このことから、より高張の食塩水の方がナトリウム欠乏による体調不良を解消する効果が高い可能性が示唆される。

塩味に対する嗜好については、0.9%食塩水の場合はプレテストの時点で嗜好率が高く、テストにおいて下がる傾向がみられた。2%と 3%ではプレテストとテストの間では差はみられなかった。プレテストとテストではナトリウムが充足された状態にあったため塩味に対する嗜好が十分

に表出されなかったと考えられる。先行研究においてもナトリウム欠乏の反復経験による高張食塩水の摂取量漸増を示されているが、それによって食塩水に対する嗜好が高まることは示されていない²⁾。したがって、食塩嗜好学習の実験パラダイムについては今後さらに検討する必要がある。

テストにおいて、いずれの実験においても DCZ 投与と VEH 投与では明確な差は認められなかった。したがって、本研究において PVT が食塩水摂取行動に関与していることを示す証拠を得ることはできなかった。しかし、PVT のニューロンは新奇性刺激、報酬価のある刺激、予期性刺激など様々な刺激に反応する⁴⁾。PVT にはグルコースに応答するニューロンがあり、糖分探索行動に関与している⁵⁾。PVT は中枢の第二次味覚中継核である結合腕

傍核から投射を受ける⁶⁾。また、PVTのニューロンは味覚嫌悪学習における条件刺激に対して反応する⁷⁾。以上のことから、PVTが食塩水摂取行動や塩味嗜好学習に関与している可能性は否定できない。したがって、今後さらに研究を続けPVTの関与について検討する必要がある。

5. 今後の課題

本研究で雌性ラットを用いたのは雄性ラットに比べて高張食塩水の摂取量が多いことが先行研究で分かったためである。実際に先行研究では雄性ラットは3%食塩水をほとんど摂取しなかったが、本研究の雌性ラットは3%食塩水のある程度摂取した。しかし一方で、性ホルモンの分泌が塩味感受性に影響を及ぼす可能性が示唆されている⁸⁾。このことから、本研究で嗜好学習の成立を明確に見えず、PVTニューロンの活動制御による変化を見ることができなかつたのは性周期が影響を及ぼしていた可能性がある。そこで、次年度の研究では性周期と塩味嗜好性の関連を明らかにし、性ホルモンが食塩水摂取行動に関連するかを明らかにする。

6. 文献

1. 佐々木敏. (2025). 日本人の食事摂取基準 (2025年版): 食事・栄養に関する基本的・包括的ガイドライン. 総合健診, 52(2), 342-352.
2. Sakai, R. R., Fine, W. B., Epstein, A. N., & Frankmann, S. P. (1987). Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behavioral neuroscience*, 101(5), 724–731.
<https://doi.org/10.1037//0735-7044.101.5.724>
3. Katoh, A., Shoguchi, K., Matsuoka, H., Yoshimura, M., Ohkubo, J. I., Matsuura, T., Maruyama, T., Ishikura, T., Aritomi, T., Fujihara, H., Hashimoto, H., Suzuki, H., Murphy, D., & Ueta, Y. (2014). Fluorescent visualisation of the hypothalamic oxytocin neurones activated by cholecystokinin-8 in rats expressing c-fos-enhanced green fluorescent protein and oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 fusion transgenes. *Journal of neuroendocrinology*, 26(5), 341–347.
<https://doi.org/10.1111/jne.12150>
4. Zhu, Y., Nachtrab, G., Keyes, P. C., Allen, W. E., Luo, L., & Chen, X. (2018). Dynamic salience processing in paraventricular thalamus gates associative learning. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6413), 423–429.
<https://doi.org/10.1126/science.aat0481>
5. Labouèbe, G., Boutrel, B., Tarussio, D., & Thorens, B. (2016). Glucose-responsive neurons of the paraventricular thalamus control sucrose-seeking behavior. *Nature neuroscience*, 19(8), 999–1002.
<https://doi.org/10.1038/nn.4331>
6. Kirouac, G. J., Li, S., & Li, S. (2022). Convergence of monosynaptic inputs from neurons in the brainstem and forebrain on parabrachial neurons that project to the paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain structure & function*, 227(7), 2409–2437.
<https://doi.org/10.1007/s00429-022-02534-6>
7. Yasoshima, Y., Scott, T. R., & Yamamoto, T. (2007). Differential activation of anterior and midline thalamic nuclei following retrieval of aversively motivated learning tasks. *Neuroscience*, 146(3), 922–930.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.044>
8. Curtis, K. S., & Contreras, R. J. (2006). Sex differences in electrophysiological and behavioral responses to NaCl taste. *Behavioral neuroscience*, 120(4), 917–924.
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.4.917>

Elucidation of the Function of Neural Circuits Involved in the Expression of Salt Taste Preference Learning

Tadashi Inui

Department of Oral Physiology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

Summary

This study aimed to clarify how sodium deficiency induces a preference for intense saltiness and whether the paraventricular thalamus (PVT) is involved in the neural basis of this preference. In a previous study, we demonstrated that the intake of hypertonic saline increased gradually in rats fed a low-sodium diet and administered furosemide, a diuretic and antihypertensive medication. This increase was presumably due to a heightened preference for high-sodium saline because the intake of hypertonic saline alleviated the adverse effects of sodium deficiency. However, we could not confirm whether the rats preferred high salt content after conditioning. In the present study, we investigated whether rats would learn to prefer salt by conditioning them with different concentrations of a salt solution after being deprived of sodium through the administration of a diuretic antihypertensive drug (furosemide) and exposure to a low-sodium diet, as observed in a behavioral experiment. No increase in preference was observed for the 0.9% or 2% saline solutions, but a significant increase in intake was observed for the 3% saline solution after the second conditioning session. These results indicate that sodium deficiency increases intake in response to intense saltiness; however, it is unclear whether this is due to a change in preference. To investigate PVT involvement, we administered DCZ to rats expressing inhibitory designer receptors (hM4Di) in PVT neurons, but this did not result in significant changes in the intake of sodium chloride solution. Therefore, the direct involvement of the PVT was not indicated in this study. Further investigation of the behavioral model of salt taste preference learning, as well as a more detailed analysis of the neural circuits, including the PVT, is needed.