

味覚嗜好性における脳神経活動部位と免疫制御機構との関連解析

乾 千 珠 子

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 特任助教

(現 大阪大学大学院歯学研究科 助教)

緒 言

「医者を持つより料理人を持て」という西洋のことわざがある。これは食には医を超える力があることを意味している。食べ物をおいしく食べられることは、摂取した食物の消化や吸収を促進するだけでなく、全身を活性化して免疫力を強化することにもつながると経験的にも知られている。したがって、「おいしさ」を感じることは生体にとって重要な意義があると考えられる。この「おいしさ」を構成する要素の一つである「味覚」は、食物に含まれる化学物質を受容し、味の認知など中枢での情報処理を介し、「おいしい・まずい」「すき・きらい」などの情動変化を生じさせる。このような情動変化は自律神経系や内分泌・免疫系にも影響を及ぼす。したがって、「味覚」は免疫系に関連することが推察される。

味覚系と免疫系の情報が体内で結びつく証拠として、リポポリサッカライド (Lipopolysaccharide, LPS) による味覚学習の成立に関する知見がある¹⁾。LPSはグラム陰性菌の外膜にあり、体内に侵入するとマクロファージを活性化させ、インターロイキン-1などのサイトカインの放出を引き起こす。その結果、発熱反応が生じる。Bullら¹⁾は甘味を呈するサッカリン溶液 (条件刺激) をラットに摂取させた後にLPS (無条件刺激) を腹腔内に投与した。一週間後にそのラットに再びサッカリン溶液を呈示すると、ラットは嫌がって飲まなかった。このように、溶液の味覚情報と無条件刺激の薬物効果によって生じた体調不良が結びつくことで成立する連合学習を味覚嫌悪学習 (conditioned taste aversion, CTA) という。上述のBullらの報告¹⁾は、味覚情報はLPSによる免疫反応とも結びつきやすいということを示唆している。しかしながら、CTAにおける味覚と免疫との関連において、脳内メカニズムについては不明である。そこで、本研究では免疫反応を生じさせるLPSによる味覚嫌悪学習、つまり、免疫学習モデルにおいて、CTA獲得後の味溶液の再呈示による嫌悪性反応に関連する脳部位につい

て、超高磁場MRIによるニューロイメージングによる同定を試みた。

実験方法

LPSがCTA獲得後のサッカリン溶液摂取に及ぼす影響

はじめに、LPSによるCTAを動物に獲得させる方法を確立するため、CTAの獲得において適切なLPSの用量を調べた。実験動物にはC57BL/6N雄性マウス10週齢を用いた。すべての動物は個別ケージで湿度・温度で管理された飼育室にて飼育し、実験開始まで水・餌は自由摂取とした。CTAに用いる条件刺激 (conditioned stimulus; CS) には、サッカリン溶液 (10 mM saccharin-Na) を用いた。無条件刺激 (unconditioned stimulus; US) には、生理食塩水 (Saline)、LPS (E. coli O111, 0.1, 1, 10 mg/kg)、または塩化リチウム溶液 (150 mM LiCl, 体重2%) を用い、実験動物を5群 (Saline群、LPS-low群、LPS-middle群、LPS-high群、LiCl群) に分けた。すべての群のマウスに飲水用ボトルから蒸留水を摂取することに慣れさせた後、19:00から18時間絶水を行い、13:00に飲水用ボトルを10分間呈示し、その摂取量を測定した。15:00~19:00 (4時間) は補給のために飲水用ボトルを呈示した。はじめの3日間は、蒸留水を呈示し、4日目にサッカリン溶液を呈示した。サッカリン溶液を10分間呈示し、15分後にUSとなる薬物が当量となるよう腹腔内投与した。約1週間回復させた後、再び19:00から18時間絶水し、翌日13:00にサッカリン溶液が入った飲水用ボトルを10分間呈示し、その摂取量を測定し、また体重についても、同様の手順で5日間測定した。

薬物投与、およびCTA獲得後のサッカリン溶液または蒸留水呈示時の脳機能イメージング

本実験では、はじめに、薬物による脳活動への影響について、マンガン造影MRI法を用いて検討した。マン

ガン造影MRI法は、ニューロンの活性化によって Ca^{2+} チャンネルを通して細胞内に流入する Mn^{2+} を追跡することで、神経活動および神経投射経路を直接可視化することができる。したがって、マンガン造影剤を投与することで脳活動を積分値としてマッピングすることが可能となる^{2,3)}。実験動物にはC57BL/6N雄性マウス10週齢を用いた。環境に慣れさせた後、コントロールとして生理食塩水 (Saline)、LPS、または塩化リチウム溶液 (150 mM LiCl, 体重2%) を用い、各群の動物にそれぞれの薬物を腹腔内投与した。それぞれの薬物の投与1時間前に、造影剤として塩化マンガン溶液 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/kg) を腹腔内投与した。各群すべての動物は麻酔下 (セボフルラン、2.5~4%) にて、薬物投与1、2、4時間後に脳幹部を中心に、1.5、3時間後に前頭部を中心にMRI撮像を行った。MRI撮像には、超高磁場11.7 T MRI装置 (11.7 T Bruker BioSpec scanner, AVANCE 500WB, Ettlingen, Germany) を用いた。撮像条件は、エコー時間; 11 ms、繰り返し時間; 400 ms、スライス厚; 0.3 mm、撮像領域; 256×256、加算回数; 16回、撮像シーケンスにはMulti Slice Multi Echo法を用いた。

次に、CTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示により誘発される脳活動について検討を行った。前述の実験と同様に、実験動物にはC57BL/6N雄性マウス10週齢を用いた。CSとしてサッカリン溶液、USとして、生理食塩水 (Saline)、LPS、または塩化リチウム溶液 (150 mM LiCl, 体重2%) を用い、実験動物を3群 (CTA-Saline群、CTA-LiCl群、またはCTA-LPS群) に分けた。テスト日の行動実験時には、さらに、再呈示溶液としてサッカリン溶液または蒸留水を呈示する群の2群に分けた。飼育環境に慣れさせた後、動物をペントバルビタール (50 mg/kg) により麻酔し、口腔内カニューレを留置する手術を行った。回復後、口腔内カニューレを介して飲水することに慣れさせるトレーニングを行った。前述の実験と同様に、18時間の絶水後、0.8 mL (0.1 mL/

min) の蒸留水を、口腔内カニューレを介して呈示した。2時間後に補給のために水・餌を4時間自由に摂取させた。この飲水トレーニングを2日間行った。3日目に、口腔内カニューレを介してサッカリン溶液を呈示し、15分後に各群それぞれの薬物を腹腔内投与した。約1週間の回復期間後、18時間絶水を行い、翌日をテスト日とした。サッカリン溶液の再呈示、またサッカリン溶液の代わりに蒸留水の呈示を行った。その際の行動をビデオカメラにて記録した。ビデオ解析では、図1に示す行動パターンを摂取性反応 (Ingestive) あるいは嫌悪性反応 (Aversive) について観察を行った⁴⁾。サッカリン溶液または蒸留水の呈示1時間前に塩化マンガン溶液 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/kg) を腹腔内投与した。MRI撮像は、先述の方法と同様であった。撮像後、得られた画像において、最後野付近 (area postrema, AP)、孤束核付近 (nucleus of the solitary tract, NTS)、扁桃体付近 (amygdala, AMY)、および視床下部背内側核付近 (dorsomedial hypothalamus, DMH) の信号輝度を、画像背景の信号輝度の平均値で除法することによって相対値として算出した。

結 果

LPS濃度がCTA獲得後の溶液摂取および体重に及ぼす影響

条件づけの前、および回復期間後1~5日目のサッカリン溶液の摂取量 (体重10 gあたり) と体重変化を図2に示す。条件づけ後Day1およびDay2で、LPS-middle群、LPS-high群、およびLiCl群のサッカリン摂取量は、Saline群およびLPS-low群より有意に少なく、また条件づけ前の摂取量と比較しても有意に少なかった。Day3でもLPS-middle群の摂取量は少なかった。体重変化においては、LPS-high群の体重は他群と比較して有意に少なかった。統計的な差はないが、Day4およびDay5においてもLPS-high群の体重は他群と比べて少ない傾向にあった。

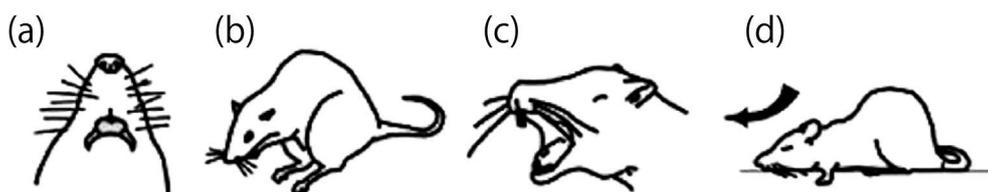


図1 味覚反応テスト (Grill & Norgren, 1978を改変)

摂取反応 (a, b) と嫌悪反応 (c, d) の例。a) 舌を突き出す、b) 前肢をなめる、c) 大きく口をあける、d) 顎をこすりつける。

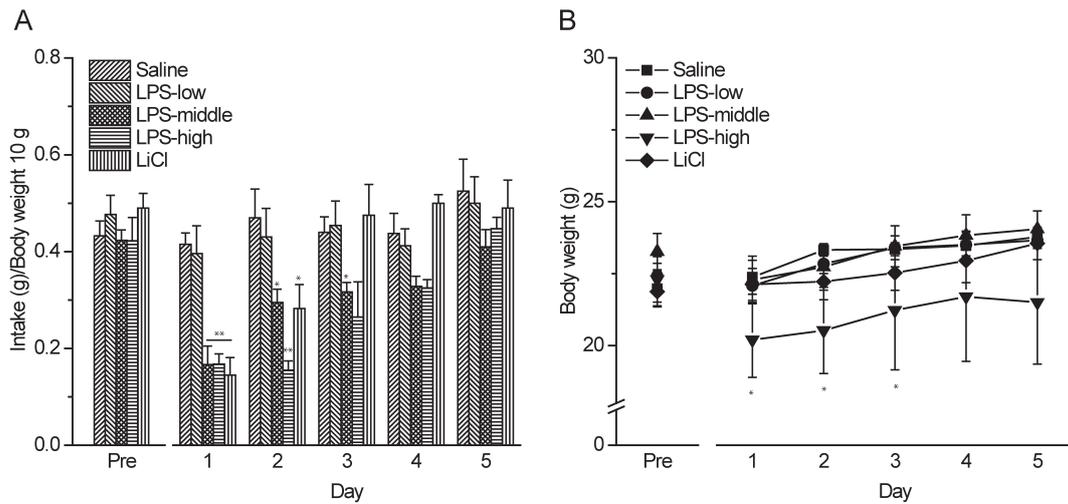


図2 LPS濃度の相違によるCTA獲得への影響

A. 条件づけ前 (Pre) および条件づけ後 (Day1~5) のサッカリン溶液の摂取量の変化 (mL/体重10 g)。平均値±SEM。B. 条件づけ前 (Pre) および条件づけ後 (Day1~5) の体重変化 (g)。平均値±SEM。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

薬物投与による脳活動とCTA獲得後のサッカリン溶液または蒸留水の呈示による脳活動の比較

図3に、Saline、LPS、LiClを腹腔内投与された個体と、CTA獲得後にサッカリン溶液を呈示された個体におけるAPまたはNTS領域の活動を描出した代表的なMR画像を示す。MR画像上で比較すると、Saline群のAPまたはNTS領域の信号輝度はLPS群またはLiCl群よりも低かった(図3A)。一方、CTAの獲得後に、サッカリン溶液を呈示した場合(図3B)においては、APまたはNTSにおける信号輝度の上昇はCTA-LPS群でわずかにみられた。平均値でみると(図4)、Saline、LPSまたはLiClの腹腔内投与による影響においては、LPS群とLiCl群のAPの信号輝度はSaline群のそれよりも有意に高かった。NTSはAPの信号輝度の上昇の1時間後から信号輝度が上昇していた。一方、CTAの獲得後のAPまたはNTSにおける信号輝度の上昇は群または撮像時間に関わらず認められなかった。

図5に、各薬物投与後の各群のAMYまたはDMHにおける信号変化の代表例を示す。LPS群またはLiCl群のAMYおよびDMHの信号輝度は、Saline群のそれよりも高くなる傾向が認められた(図5A)。一方、CTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示によっても、CTA-LPS群、またCTA-LiCl群のAMY付近の信号輝度は高かった(図5B)。またCTA-LPS群の視床下部付近の信号輝度も高かった(図5B)。平均値で比較すると(図6)、LPS群およびLiCl群の1.5、3時間後のAMYの信号輝度は、Saline群より高かった。DMHにおいては、LPS群

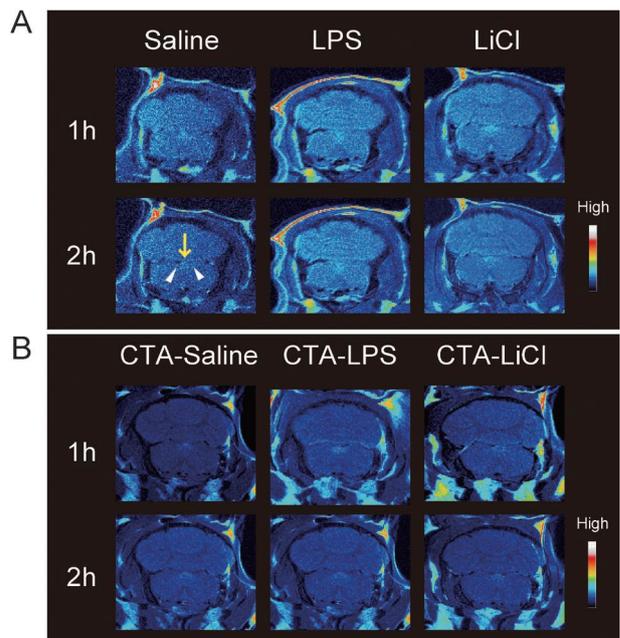


図3 各群のAPまたはNTSにおける脳活動の代表例

A. 薬物投与1、2時間後のAP (黄色矢印) およびNTS (白色矢頭) 付近を含む領域のMR画像 (カラースケールに変換)。B. CTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示1、2時間後のAPおよびNTS付近を含む領域のMR画像。AP, area postrema; NTS, nucleus of the solitary tract.

のみがSaline群より高い信号輝度を示した。CTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示では、CTA-LPS群およびCTA-LiCl群の信号輝度がCTA-Saline群より高くなる傾向がみられた。DMHでは、CTA-LPS群のみの信号輝度が他群よりも高かった。サッカリン溶液の代わりに

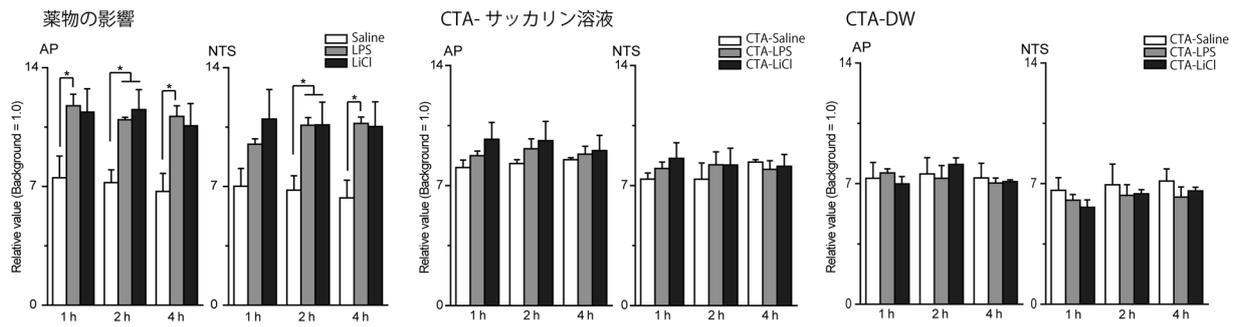


図4 各群のAPまたはNTSにおける信号強度の相対値の平均値

左図、各薬物 (Saline, LPS, またはLiCl) の腹腔内投与1、2、4時間後における信号輝度の相対値の平均値±SEM。中央図、CTA獲得後のサッカリン溶液再呈示1、2、4時間後における信号輝度の相対値の平均値±SEM。右図、CTA獲得後のDW呈示1、2、4時間後における信号輝度の相対値の平均値±SEM。* $p < 0.05$ 。

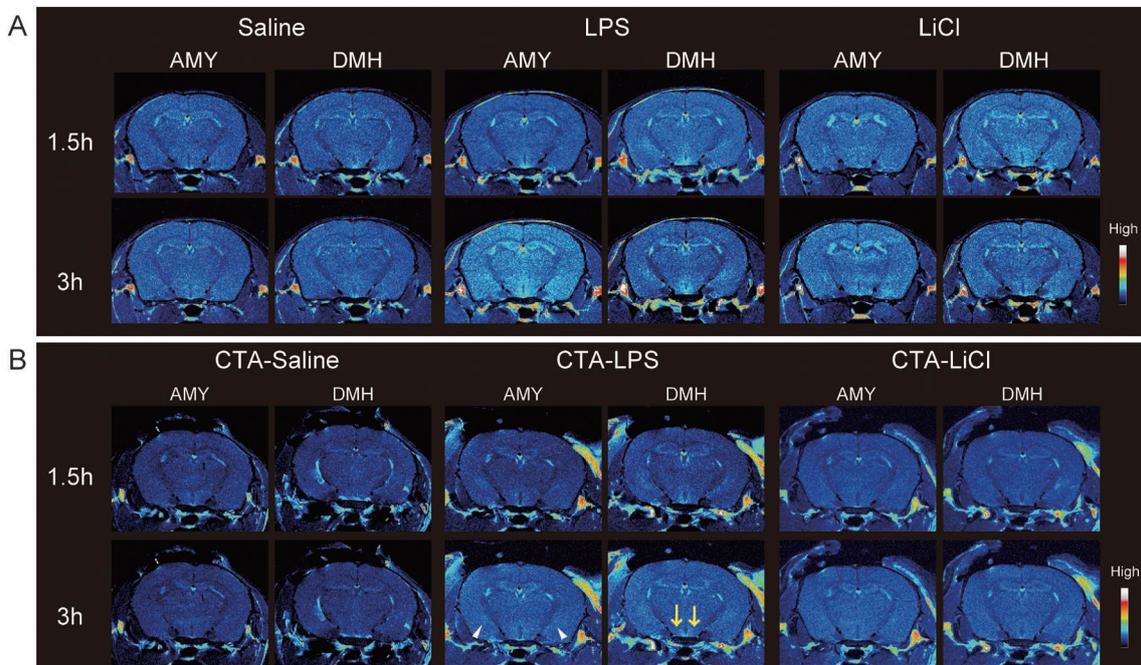


図5 各群のAMYまたはDMHにおける脳活動の代表例

A. 薬物投与1.5、3時間後のMR画像 (カラースケールに変換)。B. CTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示1.5、3時間後のMR画像。DMH付近を黄色矢印、AMY領域を白色矢頭で示す。DMH, dorsomedial hypothalamus; AMY, amygdala。

DWで刺激した場合には、どの群においてもAMYまたはDMHでの信号輝度の上昇は認められなかった。

考 察

本研究から、LPSを用いたCTA獲得後の味覚刺激による嫌悪性反応、つまり、味覚と免疫反応が結びついた免疫学習モデルに関連する脳部位は、マンガン造影MRI法を用いた検討から、扁桃核または視床下部背内側核を含む領域であることが明らかとなった。

LPSが脳活動にどのような影響を及ぼすかを検証した

実験では、LPS投与後の最後野の活動は、投与1時間後から4時間後まで長時間にわたって強い信号変化がみられた。また、孤束核においてもLPS投与2時間後から4時間後にわたって強い活動がみられた。最後野と比べ、1時間遅れてNTSでの活動に変化が見られた。このことは、孤束核が最後野からの神経連絡を受けること、また薬物の腹腔内投与後に腹痛など消化管から迷走神経を介した入力も受け、複雑な入力やタイムラグが影響したのかもしれない。最後野は解剖学的に血液脳関門を持たず、血液および脳脊髄液中の代謝物質、ホルモン、また

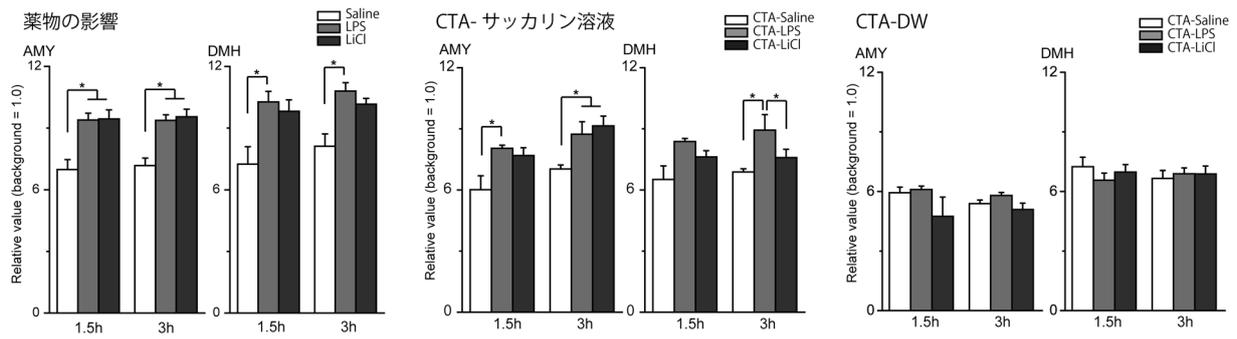


図6 各群のAMYまたはDMHにおける信号強度の相対値の平均値

左図、各薬物 (Saline, LPS, または LiCl) の腹腔内投与1.5、3時間後における信号輝度の相対値の平均値±SEM。中央図、CTA獲得後のサッカリン溶液再呈示1.5、3時間後における信号輝度の相対値の平均値±SEM。右図、CTA獲得後のDW呈示1.5、3時間後における信号輝度の相対値の平均値±SEM。* $p < 0.05$ 。

薬物や細菌など様々な物質を受容する部位⁵⁾であり、脳内への情報伝達の要となっている。一方、CTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示では、最後野および孤束核の活動はみられなかった。これらのことから、薬物投与による最後野や孤束核の活動は薬物の血液を介する受容により活動が活発になるが、CTA獲得後の味溶液の再呈示においては薬物の関与は直接ないため、最後野および孤束核の活動はみられなかったものと考えられる。また、LPSの投与により、最後野また孤束核の他、扁桃体また視床下部背内側核付近においても信号輝度が高くみられた。これらの部位の活動は、対照実験として用いた塩化リチウムの投与の場合よりも強くみられたため、LPSは脳全体の神経活動を強く誘発する効果があるものと考えられる。

LPS投与による脳活動の変化と同様に、LPSによるCTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示によっても、扁桃体また視床下部背内側核を含む部位の働きが認められた。サッカリン溶液の代わりに蒸留水を呈示してもそれらの部位の活動はみとめられなかったことから、サッカリン溶液に特異的に活動を生じていたと考えられる。扁桃体の活動においては、塩化リチウムをUSとしたCTA獲得後のサッカリン溶液の再呈示によっても認められたことから、CTA獲得に共通して関与する脳部位であると考えられる。扁桃体は解剖学的に多くの亜核によって構成されており、それぞれ機能が異なることが知られている。その一部である扁桃体基底外側核は、破壊実験、電気生理学的実験などから味覚嫌悪学習における記憶の保持に関連していると考えられている⁶⁾。しかし、扁桃体基底外側核以外の扁桃体の亜核ではそのような効果はないという。今後さらに扁桃体を亜核にわけた詳細な解

析が必要である。

視床下部背内側核を含む領域の活動については、LPSによるCTA獲得後の味覚刺激による嫌悪性反応時のみ認められ、この免疫学習モデルにおいて特異的に働く部位であることが明らかとなった。視床下部は体温制御に関連することで知られており、本実験の結果との関連の可能性もあると考えられる。本実験では、視床下部背内側核を含む領域の活動と行動変化との関連性は明らかとなっていないが、LiClによる条件づけでは床に顎をこすりつける、また口を大きく開けるなどの嫌悪性行動が多く見られたのに対し、LPSによる条件づけ後のサッカリン溶液の再呈示には、これらの行動とは別に前肢を震わす行動が多くみられた。前肢を震わす行動は嫌悪性行動の一つであるが、今後このような行動の相違についても検討を行い、食行動において重要な機能である味覚嗜好性と免疫系との関わりについてさらに検討を進めたい。

要 約

食べ物のおいしさが免疫力に影響を及ぼすことを科学的に実証することを目指す。おいしさの重要な要因である味覚嗜好性には脳が深く関与している。一方で、脳は免疫機能の制御を行っている。そこで、脳内で味覚情報が処理されることで免疫系が活動すると想定した。動物に味溶液を摂取させた後で免疫反応を引き起こすLPSを投与すると、脳内での味覚情報処理と免疫反応が結びつき、動物はその味を嫌うようになる (conditioned taste aversion, CTA; 味覚嫌悪学習)。本研究では、この現象のメカニズムを行動、脳活動、免疫機能の観点から調べ、味覚嗜好性と免疫系の関係を明らかにすること

を目的とし、LPSによるCTA獲得後に甘味溶液（サッカリン溶液）が再び呈示され、不味いと感じた時に活動する脳部位を、マンガン造影MRI法を用いて同定することを計画した。はじめに、LPSによるCTAを動物に獲得させる方法を確立するため、CTA獲得において適切なLPSの濃度を調べた。高濃度のLPS（10 mg/kg）投与により、投与前と比較し体重が減少した。また、サッカリン溶液を再呈示したところ、摂取量は有意に減少した。中濃度LPS（1 mg/kg）でもサッカリン溶液の摂取量の減少は認められたが、体重減少は認められなかった。さらに低濃度のLPS（0.1 mg/kg）では、体重もサッカリン溶液の摂取にも影響はみられなかった。このことから、LPS投与後に体重減少がなく、再呈示された味溶液に対して摂取量が減少し、嫌悪性行動が観察された濃度のLPS（1 mg/kg）を用いてCTA獲得後の脳神経活動の同定を行った。その結果、LPSによるCTA獲得後の想起過程において、視床下部背内側核を含む部位の働きが認められた。対照実験として用いた生理食塩

水または塩化リチウムではその部位で強い活動は見られなかったことから、LPSによるCTA獲得において特異的に働く部位であることが明らかとなった。

謝 辞

本研究によって、免疫反応に関連した味覚嫌悪学習の獲得後の味の想起によって働く脳活動部位を同定することができました。本研究に対して助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) D. F. Bull, et al.: *Physiol. Behav.*, **49**(6), 1229–1233, 1991.
- 2) C. Inui-Yamamoto, et al.: *Neuroscience*, **167**, 199–204, 2010.
- 3) T. Inui, et al.: *Neurobiol. Learn Mem.*, **106**, 210–220, 2013.
- 4) H. J. Grill, R. Norgren: *Brain Res.*, **143**, 263–279, 1978.
- 5) M. S. Corinne, et al.: *Physiol. Behav.*, **105**, 151–160, 2012.
- 6) T. Yamamoto, et al.: *Neurosci. Res.*, **22**(1), 31–49, 1995.