

# マウス味覚嫌悪学習の条件刺激前後での重力攪乱 の影響の比較

日本女子大学 宮本武典 土田晴美 藤原宏子 北里大学 佐藤亮平

## Comparison of Effects of Gravitational Disturbance before and after Conditioned Stimuli on Conditioned Taste Aversion

**Abstract:** We compared among the effects of gravitational disturbance before and after conditioned stimuli on acquisition and retention of the conditioned taste aversion (CTA) paradigm as a model of emotional learning and memory. When the gravitational disturbance by 3D clinostat was applied between 0.2% sodium saccharin as a conditioned stimulus (CS) and an i.p. injection of 0.15 M LiCl as an unconditioned stimulus (US), both acquisition and retention of CTA memory (CTAM) was suppressed. On the other hand, the gravitational disturbance before CS suppressed water-intake but not CTA. Furthermore, after CTAM acquisition with the gravitational disturbance, expression of an immediately early gene, *c-fos* was expressed in the dorsal tegmental area but not in the vestibular nuclei regardless of presence of gravitational disturbance. These results suggest possibility that the gravitational disturbance by clinostat was not accepted through the vestibular system but directly by the ascending activating system in the brain stem.

### <目的>

我々はこれまでに情動学習の一つである味覚嫌悪学習パラダイムを用いて、上位の脳の関与が不可欠ではないが、扁桃体や視床下部が重要な役割を果たしている情動行動への3D-クリノスタットを用いた重力攪乱の影響を調べた(参考文献1)。また、脳幹や視床などの味覚の伝導路、前庭系や情動の中核である大脳辺縁系、動機付けに関与する上行性網様体賦活系のニューロン活動の変化を、即初期遺伝子の一つである *c-fos* の発現を指標に免疫組織学的に調べた。

### <方法>

#### 行動実験

新奇の味であるサッカリン(条件刺激、CS)を呈示した後でLiCl(無条件刺激、US)を注射して内臓不調を起こさせるとサッカリンは危険なものだと判断して摂取しなくなる。これが味覚嫌悪学習(Conditioned taste aversion, CTA)であり、これによって獲得された味覚嫌悪記憶(CTA memory)は長期記憶として保持される。CS呈示前または呈示後US呈示前にクリノスタットを用いてマウスの

重力情報を攪乱し、CTAへの影響を解析することによって学習の獲得と保持の機構を調べた。

- i training…1日4時間だけの給水を6日間続け、この条件に慣れさせた。給水時間の最初の10分間にDWで飲水量を測定し、この平均を各個体の標準飲水量(SDW)とした(Fig.1参照)。
- ii conditioning…CSにサッカリン、USに塩化リチウムを用いて条件付けを行った2日間(1日目:D0;2日目:D0')。CSとUSの間隔は約30分とし、CS前あるいはCSとUSの間に頭部の位置が変動ないように搭載用チューブに入れ、クリノスタット(最大速度:2rpm;定速持続時間:60s;速度遷移時間:5s)で20分間回転した。
- iii test…2回の条件付け(C1,C2)の後、4日間(T1-T5)のサッカリンの摂取量を測定した。

実験は搭載用チューブにいれ、CS前(Before CS群、n=5)またはCS後(After CS群、n=11)にクリノスタットで回転しLiCl投与したグループ、搭載用チューブに入れるが、回転せずにLiCl投与したグループ(Tube群、n=16)、クリノスタットで回転

せず、搭載用チューブにも入れず LiCl を注射したグループ (Control 群、n=9) について行った。

また、前記と同様な方法で標準飲水量を測定した後、DW呈示前に3hrの間クリノスタットに搭載・回転させることによるの飲水量に対する重力攪乱の影響をしらべた (n=6)。

### 免疫染色

行動実験と同じ方法で条件付けをしたマウスを用い、D1 と D4 に灌流固定を行い、脳を取り出した。脳の凍結切片を作り、Fos 蛋白の免疫染色を行った。切片上での脳部位の同定は参考文献2に従った。

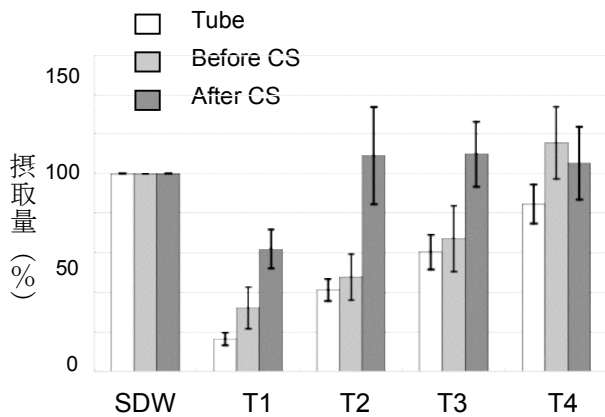


Fig.1 Effect of the gravitational disturbance on saccharin-intake before or after CTA. The mean intake of SDW during training was taken as 100%. Both acquisition (T1) and retention (T2-T4) were significantly impaired after CS but not before CS in compared with Tube control.

### <結果>

#### 行動実験 (味覚嫌悪学習)

(1) CS後重力攪乱の影響: conditioning の翌日(T1)の After CS 群と Tube 群を比較すると After CS 群の飲水量のほうが有意に多く ( $p<0.01$ )、CTA の獲得が弱いということがわかる (Fig.1)。Control 群と Tube 群間では有意差は見られなかった ( $p=0.20$ )。このことからクリノスタットによって重力攪乱を起こすことで CTA 獲得の経路のどこかが抑制されていると考えられる。昨年度報告したようにクリノスタットによる回転を US とした場合ではまったく学習が起きていないので、クリノスタットで回転すること自体は US にならないといえる。また After CS 群と control 群の飲水量は T2, T3, T4 でも差があったので ( $p<0.05$ )、CTA の獲得だけでなく保持にも影響があることが分かる。

After CS 群は Tube 群と比較して CTA の獲得も保持も有意に弱かった。獲得指数 (1-T1/SDW)

( $p<0.0001$ )およびRI (1-(T2+T3+T4)/SDW) ( $p<0.0001$ ) に有意差があった。Fisher の PLSD による検定では After CS 群はそれぞれ Tube 群と比較して CTA の獲得が弱く ( $p<0.0001$ )、保持も悪かった ( $p<0.01$ )。

(2) CS前重力攪乱の影響: conditioning の翌日(T1)の Before CS 群と Tube 群の間では有意差は見られなかった (Fig.1)。このことからクリノスタットによる重力攪乱は CS と US の間で与えられなければ無効であることが分かる。

(3) CS後重力攪乱の飲水量に対する影響: 5日間の標準飲水量を測定すると最初の1~2日よりも飲水量が増加したところで安定する。その後、飲水量測定前に3時間の間クリノスタットによる重力攪乱を与えると、飲水量は最初の2日間で約50%

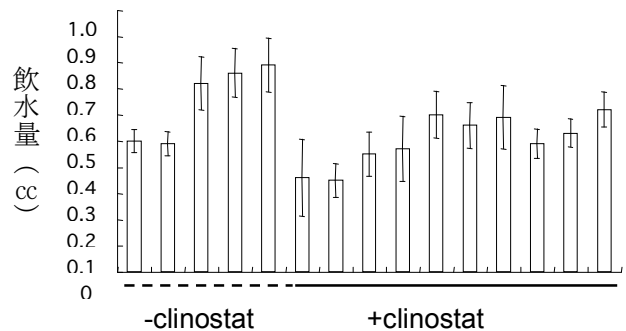


Fig.2 Suppression of water-intake induced by gravitational disturbance during 3hr every day using clinostat (+clinostat) during successive 10 days after measurements of standard water-intake during successive 5 days.

に減少し、その後少しずつ回復した後、標準飲水量の30%程度の所で安定した (Fig.2)。この飲水量の減少は活動量の減少を伴った。

#### 免疫染色 (c-fos 発現パターン)

昨年度報告したように T1 の control 群では結合腕傍核(PBN)の背側外側垂核(dls)と外部外側垂核(els)および視床前核群(MD, PT, PVA)に c-fos の発現が見られた (参考文献1, 3)。After Cs 群では PBN の els と PVA での発現が弱くなっていた。そこで前庭核群の c-fos 発現パターンを比較したところ相違は見られなかった。一方、クリノスタットによる重力攪乱を適用した群のすべてにおいて、上行性網様体賦活系の内の背側経路の起始核である橋背外側被蓋核 (Laterodorsal tegmentum, LDT) (参考文献4)に c-fos 発現が増加する傾向が見られた。しかし、上行性網様体賦活系の内の腹側経路の起始核である青斑核では、クリノスタットでの回転の有無によって明らかな相違も見られなかった。大脳皮質味覚野 (島

皮質)、扁桃体や海馬では明確な相違は見られなかった。

#### <考察>

本実験をまとめると(1) Tube 群は Control 群と同様の CTA 獲得を示したので、この程度のストレスでは CTA は影響されないことが分かった。

(2) CTA は CS 後の重力攪乱によって影響を受けたが、CS 前では影響しなかった。(3) CS 前の重力攪乱は活動性や飲水量の減少を誘発した。(4) クリノスタットによる重力攪乱は PBN や視床前核群で *c-fos* 発現をすると共に、上行性網様体賦活系の背側経路の起始核である橋背外側被蓋核 (LDT) に *c-fos* 発現を増加させた。それに対して、前庭核群や青斑核では顕著な相違は見られなかった。

上行性網様体賦活系の背側経路の起始核である橋背外側被蓋核 (LDT) はコリン作動性神経であり、覚醒や注意、動機付けに関与しているとされている(参考文献5)。この経路は視床前核群を含む視床非特殊核群に広範に投射している。本実験では重力攪乱が生じた時に LDT に *c-fos* 発現が生じる傾向が見られた。昨年度報告したように Control 群では PVA と MD 両方に *c-fos* が発現したが、clinostat 群では PVA における *c-fos* 発現がほぼ消失した。LDT には覚醒状態で発火するタイプと徐波睡眠状態で発火するタイプの2種の神経細胞が存在するとされている(参考文献6)。視床前核群は感覚入力を統合して感覚情報を大脳皮質に出力することで注意や覚醒の保持および調節に関与する(参考文献7)と同時に、Papez の回路を介して同様の情報を辺縁系に送り情動学習を修飾していると考えられている(参考文献8)。しかしながら、本実験では扁桃体や大脳皮質味覚野では著しい変化は見られなかった。また、前庭核群や青斑核では相違が見られなかったことから、クリノスタットによる重力攪乱は、LDT で直接的に受容され、コリン作動性神経を介して視床非特殊核群を介して活動性や飲水量の減退を誘発したと考えられる。また、LDT から PBN への直接投射による *els* での *c-fos* 発現の抑制が生じたとも考えられる。

本実験では、After CS 群のみ CTA の抑制が見られた。このことは、重力攪乱で生じた LDT での神経細胞の活性化が、サッカリンの甘味 (CS) と LiCl 投与による嫌悪感 (US) との連合を妨げると考えられ、更に CTA の獲得だけでなく保持にも影響したことから、条件付けに際して生じた LDT を介する重力攪乱の影響が数日後まで及ぶことが示唆される。昨年度に報告したように、扁桃体や海馬、大脳皮質味覚野には明確な差は見られない。このことから、PVA

から PBN へ直接的に下行する経路が存在することが示唆されたが、今回の実験結果より、LDT から PBN への直接投射による *els* での *c-fos* 発現の抑制が生じ、その結果として、上行性の味覚情報が遮断されることによって CTA の阻害が生じたとも考えられる。PBN の破壊実験では CTA が完全に阻害されることが知られている(参考文献3)

以上を総合すると、クリノスタットで生じた重力攪乱はLDTを介して受容され、上行性網様体賦活系の背側経路を介して味覚の嫌悪情報を抑制すると共に、視床非特殊核群を介して活動性や飲水量を減退させると結論される。

今後、LDT と PBN との結合関係を明確にする必要があるだろう。そのためには、*c-fos* 発現とアセチルコリンやノルアドレナリン受容体の分布との関係を詳細に検討する必要があるだろう。

#### <参考文献>

- 1) 宮本武典、藤原悠美、坪井香苗、藤原宏子、木本万里 マウス味覚嫌悪学習はクリノスタットによる疑似微小重力環境で阻害される. *Space Util. Res.* **21**, 147-150 (200)
- 2) Paxions, G. and Franklin, K.B.J. *The Mouse Brain.* Academic Press (2004)
- 3) 山本隆 脳と味覚. 共立出版 (1996)
- 4) Moruzzi, G and Magoun, H.W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalgr. Clin. Neurophysiol.* **1**, 455-473 (1949)
- 5) 有田秀穂 ノルアドレナリン神経系 (6)覚醒との関係 *Clin. neurosci.* **17**, 248-249 (1999)
- 6) Datta, S. Cellular basis of pontine pontino-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **17**, 341-365 (1997)
- 7) McCormick, D.A. and Szymusiak, R. Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in modulation of thalamocortical activity. *Prog. Neurobiol.* **39**, 337-388 (1992)
- 8) Greenstein, B. and Greenstein, A. (大石 実訳) 神経の解剖と生理 *メディカル・サイエンス・インターナショナル*, (2000)