

Title	味覚嫌悪学習の想起に関与する中枢神経機序の解明
Author(s)	菊池, 媛美
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第15486号
Issue Date	2023-03-23
DOI	10.14943/doctoral.k15486
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89682
Туре	theses (doctoral)
File Information	Emi_Kikuchi.pdf



## 博士論文

### 味覚嫌悪学習の想起に関与する中枢神経機序の解明

## 令和 5年 3月申請

# 北海道大学 大学院歯学院口腔医学専攻

## 菊池媛美

# 目次

第1章 序論	1
第2章 実験1:分界条床核の神経活動抑制	8
味覚嫌悪学習の想起時における条件刺激摂取行動への影響	
水および味溶液摂取行動への影響	
第3章 実験2:分界条床核の神経活動抑制	27
味覚嫌悪学習の想起時における条件刺激に対する反応への影響	
第4章 実験3:分界条床核の神経活動促進	44
味覚嫌悪学習の想起時における条件刺激に対する反応への影響	
一分界条床核の尾側および吻側での行動表出の違い―	
第5章 総合論議	53
第6章 結論	57
引用·参考文献	58

第1章 序論

1. 現代における食の問題点

食には5つの大きな機能があるといわれている(渋川,2011). 栄養機能, 食欲を満た すための精神的な機能,生活リズムの調整機能,コミュニケーション機能,食文化の継 承である.なかでも、栄養機能はとトや動物にとって生命維持のために重要である.現 代の日本では経済発展により食べられることは当たり前となり、「飽食の時代」とも言わ れている(濵口 et al., 2010). そのため, 食べ過ぎによる肥満の増加, 食の欧米化など による栄養バランスの悪化などといった食に起因する健康問題が深刻化している.一 方で、日本特有の問題として、この飽食の時代にありながらも若年女性のエネルギー 摂取量が非常に低レベルであり、栄養不足が指摘されている(今井、久保、2019).第 二次世界大戦以降の日本では痩せていることが美しいとされる価値観が継承されて おり,近年ではソーシャル・ネットワーキング・サービス(social networking service, SNS)の発達が痩せ願望や食行動異常に影響していることが示唆されている(Wilksch et al., 2020). 小学6年生から大学生までの女子生徒を対象とした調査では,全ての 学校段階の生徒が平均して 2.0~2.5kg 痩せることを望んでおり、メディアにより得られ る情報が影響していると報告されている.また,同調査よって,高校生では自らの体型 に対する他者からの評価に関心が強く、摂食障害傾向に関連していることが明らかと なっている.

2. 摂食障害

摂食障害は摂食行動に異常を呈する疾患の一つであり、神経性食欲不振症 (anorexia nervosa, AN)と神経性過食症(bulimia nervosa, BN)に代表される. AN は ダイエットや食欲不振を契機に発症する. 極端な痩せ願望や肥満への恐怖から極度 な食事制限を自らに課すことで体重が減少する. 痩せているにも関わらず, 太ってい ると感じるなど自分の体型に対する認知が歪むことが特徴である. AN 患者の中には 空腹に耐えかねてむちゃ喰いをはじめ,代償行動として自己誘発性嘔吐や下剤の乱 用などを繰り返す BN へ移行する者もいる. AN の治療方法は数多く存在するが,治 療を受けた患者の 71%は回復せず,15%は自殺や疾患の進行で死亡したという報告 がある(Hotta et al., 2015). また,2010 年 4 月から 2016 年 3 月の間に日本国内の医 療機関で神経性食欲不振症と診断された患者のうち,多くが 50 代以下の女性であっ たことが報告されている(Edakubo and Fushimi, 2020). 摂食障害は近年になって急増 し,日本の若年女性においても深刻な問題である.

#### 3. 神経性食欲不振症と脳内報酬系

神経性食欲不振症に罹患した者は痩せたことに対する社会的賞賛が報酬となり、食 事制限がさらに助長される.このように報酬を期待して対象物を得ようとする意欲の高 まりや行動の発現は脳内報酬系という神経回路の働きによるものであり、神経性食欲 不振症への関与が示唆されている(図1)(O'Hara et al., 2015).Olds & Milner(1954 年)は、ラットの脳内に刺激電極を埋め込み、レバーを押すことで通電するようにする と、電気刺激を得るために頻繁にレバーを押すようになるという現象を発見した(Olds and Milner, 1954).これは脳内自己刺激行動と呼ばれ、視床下部、側坐核(nucleus accumbens, NAc)などの大脳辺縁系、中脳の黒質や腹側被蓋野などの刺激によって 快情動が惹起されるために生じると考えられている.脳内報酬系は腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA)から NAc、腹側淡蒼球(ventral pallidum, VP)を経て視 床下部外側野へ投射する神経回路により構成される.また、脳内報酬系は大脳皮質 前頭野や扁桃体など多くの脳部位との入出力がある(Saper et al., 2002).



#### 図1 神経性食欲不振症の形成機序

食事制限による体重低下・痩身に対して社会的称賛が得られる. その称賛に対して快情動を 感じ, それが報酬となって脳内でドーパミンが増加する. それによって食事制限という行動が 強化される. これを繰り返すことで拒食や過食後の嘔吐といった異常な摂食行動を示すよう になり, 神経性食欲不振症が進行する. (O'Hara et al., 2015 Fig.1 を改変)

4. 味覚嫌悪学習

味覚嫌悪学習(conditioned taste aversion, CTA)は、新奇な味の飲食物を摂取した後 に腹痛や吐き気などの不快感を経験すると、以後その味を呈する飲食物を忌避し、摂 取量が減少する現象である(図 2).嫌悪と恐怖によって摂取が抑制されるという点で AN と共通している(図 3). CTA には神経性食欲不振症と同じく脳内報酬系が深く関 与する(Mark et al., 1991, 1995; Fenu et al., 2001; Inui et al., 2007, 2009)(図 4). CTA は条件刺激(conditioned stimulus. CS)である食べ物の味と無条件刺激 (unconditioned stimulus, US)ある不快感の結びつきによって成立する連合学習の一 っと考えられている. CTA の記憶を想起することで、ヒトや動物は毒物に汚染された飲 食物を避けることが可能になるため、この学習能力は生存に不可欠である.

CTA の想起に関わる神経機構として扁桃体基底外側核(basolateral amygdala, BLA)の関与が明らかにされている. BLA の神経活動を抑制すると, CTA によって嫌 悪性となった味溶液(CS)の摂取量が増加する(Inui et al., 2019). BLA から NAc, 分 界条床核(bed nucleus of the stria terminalis, BNST), 扁桃体中心核(central amygdala, CeA) へ投射する遠心性神経の活動が, CS の呈示によって増強される (Inui et al., 2013). これらの 3 つの脳部位のうち, NAc (Mark et al., 1991, 1995; Fenu et al., 2001; Inui et al., 2011)と CeA (Buresová et al., 1979; Gallo et al., 1992; Yasoshima et al., 1995; Tucci et al., 1998; Navarro et al., 2000)が CTA の想起に関わ ることが先行研究によって示されているが, BNST の関与については不明である.



### 図 2 味覚嫌悪学習(conditioned taste aversion, CTA)の 獲得(a)および想起(b)の模式図

条件づけの際, 条件刺激(CS)として動物に味溶液を呈示する. その後, 無条件刺激(US) として, 倦怠感を誘発する塩化リチウム(LiCl)を腹腔内投与する. この CS-US のペアリングにより CTA 獲得を誘発する. 条件づけの後, CS を呈示すると, CTA の記憶が呼び起こされることにより嫌悪反応や接近恐怖が生じ, CS の摂取が抑制される. この過程を想起という.



#### 図3 神経性食欲不振症と味覚嫌悪学習の比較

本来は美味や幸福感などの快要因が摂食量を増加させる.しかし, AN あるいは CTA の形成後はさま ざまな不快要因によって摂食量が低下する. AN と CTA で不快要因が異なるが, 味に対する嫌悪(不 味)と動機づけの抑制という点では共通している.



#### 図4味覚嫌悪学習の想起過程の中枢神経回路

緑色に着色した脳領域と経路が CTA の想起に関与していることが先行研究により明らかと なっている(1-7). 青色で着色した領域は,味覚の情報伝達経路で, CTA の想起に関与する ことが知られている(8-10). 1-2, Inui et al., (2007, 2009): 3-4, Inui & Shimura (2014, 2017); 5, Inui et al., (2011); 6, Inui et al., (2013); 7, Inui et al., (2019); 8, Chang & Scott(1984); 9, Yamamoto et al., (1993); 10, Yamamoto & Fujimoto (1991) 5. 分界条床核(図 5)

分界条床核 (BNST) のニューロンは, 結合腕傍核 (parabrachial nucleus, PBN) のニュ ーロンから投射を受けている (Norgren, 1976; Alden et al., 1994). PBN は, 味覚情報 を孤束核 (nucleus tractus solitarius, NTS) から受け取っている (Travers and Hu, 2000; Cho et al., 2002; Karimnamazi et al., 2002; Cho and Li, 2008). PBN 内側部の両側性 破壊は, ショ糖溶液の偽飲 (経口摂取させるが胃カニューレで排出)によって誘発され る BNST ニューロンの c-Fos 発現を減少させることから, PBN ニューロンは BNST に 味覚情報を送っていると考えられる (Mungarndee et al., 2008). 一方, BNST のニュー ロンは NTS と PBN に投射し (Whitehead et al., 2000; Dong et al., 2001; Dong and Swanson, 2003, 2004a; Kang and Lundy, 2009), ソマトスタチンとコルチコトロピン放出 因子を発現している (Panguluri et al., 2009; Magableh and Lundy, 2014). 電気生理学 的実験によって, BNST ニューロンは PBN ニューロンの味覚反応を修飾することが示 されている (Smith et al., 2005; Li and Cho, 2006). BNST ニューロンの GABA 作動性 ニューロンは, 軸索を青斑核吻側部に送り, ナトリウム欠乏下の動物では NaCl に対す る反応を変化させる (Lee et al., 2019). これらの知見は, BNST ニューロンが味覚情報 を媒介することを示唆している.

BNST ニューロンは内臓感覚にも関与している可能性がある(St Andre et al., 2007).内臓感覚を受け取る尾側 NTS の神経細胞は, BNST に密に投射している (Ter Horst et al., 1989).内臓不快感を誘発する塩化リチウムを腹腔内投与すると BNST ニューロンで c-Fos 発現が誘導され,不安惹起作用のあるヨヒンビンを投与する と, NTS や PBN から BNST に投射するニューロンで c-Fos が発現する(Myers et al., 2005).また, BNST は PBN のカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide, CGRP)陽性ニューロンの投射を受けている(Shimada et al., 1985).ス クロース溶液摂取後にこの CGRP 陽性 PBN ニューロンを刺激すると, スクロースに対

する CTA が成立する (Chen et al., 2018). このように, BNST は CTA の重要な連合要素である味覚情報と内臓感覚情報の両方を受け取っている.

6. 本研究の目的

先行研究から, BNST が CTA 想起の神経基盤の一部であるという仮説がたてられた. そこで本研究では, BNST の神経活動操作が CS に対する行動へ及ぼす影響を調べ, BNST の役割を明らかにすることを目的とした.



図 5 脳図譜における分界条床核の位置 (a)冠状断および(b)矢状断 第2章 実験1

1. 背景

いくつかの先行研究では, CTA 獲得への BNST の関与について否定的な証拠が示 されている(Yamamoto and Fujimoto, 1991; Roldan and Bures, 1994; Brownson et al., 2002; Roman et al., 2006). また, BNST が CTA の想起に関与していることを示した報 告はない. そこで本実験では, BNST の神経活動抑制が CTA 想起時の CS 摂取に およぼす影響について調べ, BNST が CTA に関与する可能性を検証することを目的 とした.

CTA を獲得した動物は CS に対して嫌悪反応を示すようになるため, CTA は嗜好 性の低下を引き起こすと考えられている(Berridge et al., 1981).また,動物(特に,嘔 吐できない種)に危険を知らせるため, CTA によって CS に対する恐怖条件づけが成 立する(Parker, 2003; Inui et al., 2019).BNST は恐怖や不安に深く関与している (Davis et al., 2010).したがって,BNST の神経活動を制御することで,CS に対する嫌 悪感や恐怖感に影響を与えることが期待される.新奇環境において,未知の刺激に 晒されると,不安や恐怖の反応が誘導される(Misslin and Cigrang, 1986).以上のこと から,動物が慣れ親しんだ環境(ホームケージ環境)とは異なる環境で条件づけ手順 (CS と US の対呈示)を経験した場合,BNST ニューロンが CTA に関与する可能性が あると考えた.そこで本実験では、マウスを被験体としてホームケージとは異なるテスト チャンバーで呈示した味溶液または水の摂取量を測定した.

2. 材料と方法

2.1. 被験体

飼養開始時 8-9 週齢の雄性 C57BL/6 マウス 20 匹(日本クレア株式会社,大阪)を用 いた.標準的な環境条件(23±2℃,12 時間明暗サイクル,7 時点灯)のもと,動物室内 の透明ケージに個別収容した.水と標準飼料(日本クレア株式会社,大阪)を,指定さ

れた制限スケジュールを除いて,自由に摂取させた.すべての実験について,北海道 大学動物実験委員会(#17-0045)および北海道大学遺伝子組換え実験安全委員会 (#2019-008)の承認を受け,実験動物飼養ガイド(National Institutes of Health Guide) の下で実施した.

2.2. 手術

動物にメデトミジン(Meiji Seika ファルマ株式会社,東京;0.75 mg/kg),ミダゾラム(サ ンド株式会社,東京;4 mg/kg)および酒石酸ブトルファノール(Meiji Seika ファルマ株 式会社,東京;5 mg/kg)の混合物を腹腔内投与して麻酔を施した.マウスの頭部を脳 定位固定装置(SR-5M1-HT,ナリシゲ科学器械研究所,東京)に固定した.両側 BNST 上部の頭蓋骨に開けた穴に,アデノ随伴ウイルスを充填したガラスピペット(先 端内径 20-40 μm)をゆっくりと刺入した(図 6). BNST の座標は, bregma から尾側に 0.25 mm,左右外側に 0.8 mm,腹側に 4.1 mm であった.注入したアデノ随伴ウイル スは pAAV8-hSyn-hM4D(Gi)-mCherry(50475-AAV8, Addgene, Watertown, MA, USA)であった.ガラスピペットを,ポリエチレンチューブ(BD INTRAMEDIC<sup>TM</sup> Polyethylene Tubing; PE #10;日本ベクトン・ディッキンソン株式会社,東京)および バイトンチューブ(JB-10, エイコム株式会社,京都)を介してガスタイトシリンジ(10-μl; 1701N, ハミルトン・カンパニー・ジャパン株式会社,東京) へ接続した.シリンジポン





**図 6 ウイルスベクター注入時の写真と冠状断の模式図** ウイルスベクターを分界条床核へ注入. AP = +0.25mm, ML = ±0.8mm, DV = -4.1mm from the bregma

プ(Legato® 130, KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA)により, 片側につき 500 nl のウイルスを 100 nl/min の速度で注入した. 注入終了後, ガラスピペットをその場に 15 分間留置してウイルスを拡散させた後, ゆっくりと引き抜いた. 頭蓋骨の穴にゼラチ ンスポンジ(スポンゲル, LTL ファーマ株式会社, 東京)の小片を充填し, 光硬化型流 動性コンポジット(クリアフィル・マジェスティ ES フロー, クラレノリタケデンタル株式会 社, 東京)で被覆した. 切開した皮膚をナイロン縫合糸(4-0;秋山メディカル株式会 社, 東京)で閉じた. アミノグリコシド系抗生物質(ゲンタマイシン, 日本全薬工業株式 会社, 福島;8mg/kg, 皮下), 鎮痛剤カルプロフェン(リマダイル, ゾエティス・ジャパン 株式会社, 東京; 5 mg/kg, 皮下), 塩酸アチパメゾール(Meiji Seika ファルマ株式会 社, 東京; 0.75 mg/kg, 腹腔内), および滅菌生理食塩水(0.9%, 体重の 1%量, 腹腔 内) を投与した.

#### 2.3.1. CTA 実験

手術から少なくとも2週間の回復期間をおいてから行動実験を開始した. マウスを15 分間テストチャンバーに入れて馴化させた(Day 1). ホームケージと同じ透明プラスチ ックケージとステンレスワイヤー製の蓋で構成されたものをテストチャンバーとして使用 した(図 7). 一個体毎にこのテストチャンバーを用意した. ホームケージには敷材(日





### 図7 実験環境

(a)ホームケージ. プラスチックケージに敷材とエンリッチメントを設置した. (b)テストチャンバー. ホームケージと同じ規格のケージと蓋を使用し, ケージの底に金網を敷いた.

本エスエルシー株式会社,静岡)とエンリッチメント(Enviro-dri®と Shepherd Shack®, EPトレーディング株式会社,東京)を設置したが,テストチャンバーにはマウスケージ 用フロアーメッシュ(トキワ科学器械株式会社,東京)を設置した.マウスをこのテストチ ャンバーに入れ,飼養時と同じ場所に置いた.脱イオン水(deionized water, DW)を入 れたスパウトを15分間呈示した.呈示終了から3時間45分後にマウスをホームケー ジに戻し,2時間給水ビンを呈示して補給を行った.この飲水トレーニングを6日間行 った(表1).条件づけでは,DWの代わりに0.2%サッカリン溶液をCSとして呈示し た.呈示直後にUSとして0.3M塩化リチウム(体重の2%量,腹腔内)を投与した.3 時間45分後にマウスをホームケージに戻し,水と飼料を自由に摂取させた.条件づ けの3日後,飲水トレーニング時と同様にテストチャンバーでマウスにDWを呈示し, 飲水行動に異常がないことを確認した.その後,1日おきに3回のテスト(Test 1-3)で マウスにCSを呈示した.

Day	Trial	Treatment
2-7	トレーニング	水
8	条件づけ	0.2 % サッカリン ─ <u><sup>直後</sup></u> → 0.3 M 塩化リチウム (i.p.)
13	テスト 1	0.2 % サッカリン
15	テスト 2	CNO or 生理食塩水 <u>30 分後</u> 0.2 % サッカリン
17	テスト 3	0.2 % サッカリン

表 1. CTA 試験 実験スケジュール

テスト1(Acq.)は、CTAの成立を調べることを目的として実施した.CSの摂取量が 減少したことから、全てのマウスがCTAを獲得したことが示された(図9a).ここで半数 のマウスを実験群、もう半数を対照群に群分けした.テスト1におけるCS摂取量の群 間差が可能な限り小さくなるようにした.テスト2において、BNSTの神経活動を抑制 するために、実験群に clozapine N-oxide (CNO; Enzo Life Sciences, Inc, NY, USA; 1 mg/kg; 体重の0.5%量)を腹腔内投与した.一方、対照群には溶媒(0.9%滅菌生理 食塩水;体重の 0.5%量)を腹腔内投与した. 投与 30 分後から CS を 15 分間呈示した. テスト 2 における CS 摂取量の変化が CNO 投与によるものであることを確認するために, 2 日後に再び CS を呈示した(テスト 3). トレーニング, 条件づけ, テストにおいてすべての水および味溶液呈示は, 18 時間の給水制限後の正午に開始した.

テスト3から1週間水と飼料を自由に摂取させて十分に休息させた後, CNO 投与 が水摂取量におよぼす影響を調べた.テストを2回行った.半数のマウスには,1回 目に CNO を,2日後の2回目に溶媒を腹腔内投与した.残りのマウスには,1回目に 溶媒を,2回目に CNO を投与し,投与順のカウンターバランスをとった.投与30分後 に DW を呈示した. CTA 試験と同様に18時間給水制限した状態で実験を行った.

2.3.2. naïve なマウスにおける摂取量測定実験

CTA 実験とそれに続く水摂取実験において、CNO 投与は CS と水の摂取量をともに 減少させた.このことから、BNST の神経活動抑制が水分摂取行動を抑制することが 示唆された.しかし、この水摂取量減少は条件づけを経験した個体に特有の現象であ った可能性が考えられた.そこで、naïve な(CTA を経験していない)マウスを用いて、 BNST の神経活動抑制が水分摂取行動に及ぼす影響について検討した.

12 匹の雄マウスに、CTA 実験で使用したものと同じアデノ随伴ウイルスを注入する 外科的手術を行った.この実験では、環境の変化が水分摂取行動に与える影響を除 くため、テストチャンバーを用いずに、ホームケージを用いて実験を行った.飲水トレ ーニングを6日間行った.トレーニング最終日の2日後から2日おきに4回の水の摂 取試験を実施した.CNOと溶媒の投与を交互に行い、順序のカウンターバランスをと った.2種類の用量のCNOを用いて、前半は0.2mg/kg後半は1.0mg/kgとした.投 与30分後からDWを15分間呈示した.

最後の水摂取実験の2日後から味溶液摂取に対する CNO 投与の影響を調べた. 呈示する味溶液として、0.2%サッカリンナトリウム、10 mM スクラロース、75 mM 塩化ナ

トリウム(NaCl), 0.3 M グルタミン酸ナトリウム(monosodium glutamate, MSG), 0.5 mM 塩酸キニーネ(quinine hydrochloride, QHCl), 20 mM クエン酸を用いた. 各味溶液に ついて, 水摂取実験と同様に, CNO 投与と溶媒投与の 2 回のセッションを行い, 投与 順のカウンターバランスをとった. 投与 30 分後から味溶液を 15 分間呈示した. テスト 間隔は 2 日間とした. また, 新奇恐怖を解消するために, 初回セッションの 2 日前に 各味溶液をマウスに経験させた.

#### 2.4. 組織学的検証

行動実験終了後,ペントバルビタールナトリウム(100 mg/kg,腹腔内投与)によって深麻酔を施し,0.02 M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS; pH 7.4) で経心的に灌流した.その後,0.1 M リン酸緩衝液 (phosphate buffer, PB)を溶媒とした4%パラホルムアルデヒドで固定した.脳を頭蓋骨から摘出し,パラホルムアルデヒド溶液で一晩以上後固定した後,0.1 M PBを溶媒とした30%スクロース溶液に浸漬し, 凍結保護した.回転式ミクロトームで厚さ30 µm の切片を作製し,免疫組織化学的染色を行うまで凍結保護液に浸漬し,-20℃で保存した.

凍結保護液から取り出した組織切片を浮遊法で染色した. ブロッキング液(5%正常 ヤギ血清と0.05%Triton-Xを含むPBS)で2時間インキュベート(室温)した後, mCherry に対するウサギ抗赤色蛍光タンパク質ポリクローナル抗体(1:5000;株式会 社医学生物学研究所,東京; PM005)と4℃にて一晩反応させた. この切片に対して, Alexa 594 標識抗ウサギ IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA; 111-585-003)を室温で3時間反応させた. その後, ブロッキング液中で1時間 インキュベート(室温)し,ニューロンのマーカーである NeuN に対するマウスモノクロー ナル抗体(1:5000;シグマアルドリッチジャパン合同会社,東京; MAB377) と4℃で 72時間反応させた. 最後に,切片を Alexa 488 標識抗マウス IgG (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA; 115-545-003) と室温で3時間反応さ せた. 各抗体をブロッキング液で希釈した. 抗体との反応の前後に, 切片を PBS で 10 分間, 少なくとも 3 回洗浄した. 染色された切片をスライドグラス(クレストコート;松波ガ ラス工業株式会社, 大阪)に貼付した. スライドグラスをマウントメディウム(Mounting Medium With DAPI - Aqueous, Fluoroshield;アブカム株式会社, 東京; ab104139)で 封入した.

組織切片を顕微鏡(ECLIPSE Ci;株式会社ニコン,東京)を用いて観察した. hM4Diを発現している神経細胞を含む領域の範囲を推定するために,mCherry 陽性 細胞,神経細胞マーカーNeuN 陽性細胞のデジタル画像とそれらの合成画像を,デ ジタルカメラ(DS-Fi3;ニコン)とフィルターセット,ソフトウェア(NIS-ElementsD;ニコン) で撮影・作成した.

2.5. 統計学的分析

hM4Di の発現が BNST の片側のみ, または両側共にみとめられなかったマウスは, データの解析から除外した. データの解析は, Prism (GraphPad Software, CA, USA) を用いて行った. CS に対する嫌悪の強さを調べるために, 条件づけとテスト1 におけ る CS 摂取量を対応のある t 検定 (paired t-test) で比較した. CNO 投与による影響は, Holm-Šídák 法で補正した対応のない多重 t 検定 (multiple unpaired t-test)を用いて, テスト 2 とテスト 3 における CS 摂取量を群間で比較することで評価した. その他の実 験では, paired t-test (CTA 実験後の水摂取実験) および Holm-Šídák 法で補正した対 応のある多重 t 検定 (multiple paired t-test) (naïve なマウスを用いた水および味溶液 摂取実験)を用いて CNO 投与後と溶媒投与後の摂取量を比較した.

3. 結果

3.1. 組織学的検証

BNST のニューロンに hM4Di が発現していることを, NeuN 陽性細胞に mCherry が発 現していることを観察することで確認した. mCherry 陽性ニューロンは, 実験群 (n = 6) および対照群 (n = 7)において, BNST の背側および腹側の両方に存在した(図 8). 実験に用いたマウスのうち, 実験群 4 匹と対照群 3 匹は, BNST の外側に mCherry 陽性細胞がみられた, あるいは片側の BNST で陽性細胞が観察されなかったため, 行動実験のデータ解析から除外した.



#### 図8 組織学的検証

a. 神経細胞マーカーとしての NeuN の発現(緑). b, hM4Di 受容体マーカー としての mCherry の発現. c, a と b の合成画像. BNST の背側部と腹側部 に NeuN と mCherry の共局在(青矢印)が観察され, BNST ニューロンが hM4Di を発現していることが示された. 黄色の破線は BNST の境界を示し, 実線は前交連の境界を示す.

3.2. CTA 実験

テスト1(Acq.)における CS の摂取量(0.139±0.04 g; Mean±SEM)は条件づけ
(Cond.)時(0.7995±0.062 g)より有意に少なかった(図 9a; paired t-test; t[12] = 8.142,
p < 0.001). これらの結果は、マウスが CTA を獲得したことを示している。条件づけ(対照群, 0.789±0.048 g, 実験群, 0.812±0.1295 g)およびテスト1(対照群, 0.145±0.057 g, 実験群, 0.132±0.062 g)における CS 摂取量に群間差はみられなかった。こ</li>

れらの結果から、両群は同程度の強さの CTA を獲得したと考えられる. テスト2 にお ける CS 摂取量も、対照群(CON)と実験群(EXP)のどちらも条件づけより有意に少な かった(図 9b; paired t-test; 対照群, t[6] = 4.246, p < 0.01; 実験群, t[5] = 5.851, p < 0.01;). これらの結果から、テスト2 においても両群とも CS を嫌悪していたと考えられ る. しかし、実験群の CS 摂取量(0.062 ± 0.032g)は対照群(0.369 ± 0.065g)に比べて 有意に少なかったことから、CTA の強さに群間差があったことが示唆された(multiple unpaired t-test; t[8.74] = 4.237, p < 0.01). したがって、CNO 投与によって CTA によ る CS の摂取抑制が増強されたと考えられる. テスト3 においても、条件づけに比べて CS 摂取量は有意に少なかった(図 9c; paired t-test; 対照群, t[6] = 2.633, p < 0.05; 実験群, t[5] = 2.883, p < 0.05). しかし、群間に有意差はみとめられず、テスト2 で投 与された CNO の効果は一過性であったことが示された.



図9条件づけおよびテストにおけるサッカリン溶液(CS)の摂取量

a, 条件づけ後の摂取量の変化. CTA の成立により CS 摂取量は有意に減少した. b, テスト 1 において CNO は CS 摂取量の抑制を促進した. c, テスト 2(テスト 1 から 2 日後)において CS 摂取量に有意な群間差はなかった. Cond ., 条件づけ; Acq ., テスト 1, CON, 対照群; EXP, 実験群. \*\*\*p < 0.001(群間比較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.01(Cond.との比較)

3.3. CTA 実験の動物を用いた飲水量測定実験

CNO 投与による CS 摂取量の抑制は, BNST 神経活動の抑制が摂取行動そのものを 抑制したためではないかという疑問を新たに抱かせるものであった. そこで, CTA 実 験に供したマウスを用いて, CNO 投与が水摂取量におよぼす影響を調べた. CNO 注 入後の水摂取量は溶媒投与後に比べて有意に少なかった(図 10; CNO, 0.491 ± 0.042 g; 溶媒, 0.621 ± 0.036 g; paired t-test, t[12] = 2.604, p < 0.05). これら結果か ら, BNST の神経活動抑制によって水摂取行動が減少する可能性が考えられたが, こ れらのマウスが CTA 実験で条件づけを経験していたことは無視できない事実であっ た. なぜなら CTA の過程が BNST ニューロンの活動に何らかの可塑的変化を誘発す る可能性があるためである. そこで, 以下の実験では, naïve なマウスを用いて, BNST の神経活動抑制が水摂取行動におよぼす影響について検討した.



図 10. CTA 実験に使用したマウスの薬物投与後の水摂取量 CNO 投与後の水摂取量は生理食塩水投与後と比較して有意に少なかった. 内部が白色の丸は CTA 実験における対照群, 灰色の丸は実験群を示す. SAL, 生理食塩水. \*\*p < 0.01

3.4. naïve なマウスを用いた飲水量測定実験

BNST ニューロンに hM4Di 受容体を発現させたマウスに対し, CNO または溶媒(生 理食塩水)の投与後に DW を 15 分間呈示した.低用量(0.2 mg/kg) CNO 投与後の DW 摂取量(0.946±0.089 g)と溶媒投与後の DW 摂取量(1.032±0.115 g)に有意差 はなかった(図 11).また,高用量(1.0 mg/kg)CNO(0.8111±0.074 g) と溶媒(0.882 ±0.088 g)の比較でも有意差はみとめられなかった.これらの結果から,CNO のいず れの用量においても水摂取量を変化させないことが示された.



図 11. naïve な動物における薬物投与後の水摂取量 低用量(0.2 mg/kg)および高用量(1.0 mg/kg)の CNO はいずれも水摂取量を 変化させなかった. SAL の両方のバーは, 各用量の CNO の対照として溶媒(生 理食塩水)を投与した後の水摂取量を示す.

3.5. naïve なマウスを用いた味溶液摂取量測定実験

水摂実験の後,ホームケージ内で味溶液の摂取に対する CNO 投与の影響を調べた. CNO 投与後のサッカリンおよびスクラロースの摂取量(サッカリン, 0.928±0.103 g; ス クラロース, 0.9733±0.065 g)は,溶媒投与後(サッカリン, 1.21±0.073 g; スクラロース, 1.219±0.079 g)より有意に少なかった(図 12; multiple paired t-test; サッカリン, t[6] = 4.395, p < 0.05; スクラロース, t[6] = 3.982, p < 0.05). 一方, NaCl(CNO, 1.037± 0.085 g; 溶媒, 1.200±0.059 g), MSG(CNO, 0.79±0.098 g; 溶媒, 0.904±0.149 g), QHCl(CNO, 0.414±0.056 g; 溶媒, 0.467±0.068 g) およびクエン酸(CNO, 0.459±0.083 g; 溶媒, 0.511±0.1004 g) に関しては CNO 投与後と溶媒投与後の間で摂取
量に有意差はみとめられなかった.



**図 12. naïve な動物における薬物投与後の味溶液摂取量** CNO(1.0 mg/kg)投与によってサッカリン(saccharin)とスクラロース (sucralose)の摂取量は有意に減少したが、塩化ナトリウム(NaCl)、グルタミン 酸ナトリウム(MSG)、塩酸キニーネ(QHCl)、クエン酸(citric acid)の摂取量は 減少しなかった. \*p < 0.05

3.6. 対照実験:偽手術マウスにおける CS 摂取量に対する CNO 投与の影響 CNO は血液脳関門を通過しにくく、その代謝物である clozapine が人工受容体だけ でなく、内因性の受容体にも結合しうることが報告されている(Gomez et al., 2017).本 研究のここまでの結果も clozapine の内因性受容体への作用によるものであった可能 性がある.そこで、CNO の投与のみで CTA の想起に影響が生じるかどうか調べた. hM4Di を誘導しないアデノ随伴ウィルス (pAAV-hSyn-EGFP、50465 -AAV8; Addgene, Watertown, MA, USA)を BNST へ注入した偽手術マウスを用意した.この マウスを用いて上述の CTA 実験と同様に CNO 投与後の CS 摂取量を測定した.トレ ーニング最終日における偽手術動物の水摂取量(0.558±0.093 g)は、CTA 実験にお ける対照群および実験群の水摂取量(0.924±0.062 g, 1.083±0.208 g)より有意に少 ないことがわかった(F[2,26] = 4.087, p < 0.05). このことから,本実験とCTA 実験の結 果を,摂取量をもとに比較することは適当ではないと考えた.そこで,条件づけとテスト での摂取量をトレーニング最終日の摂取量で割り,摂取比率を算出した.テスト2で はグループの主効果が有意であった(図 13;一元配置分散分析;F[2,16] = 6.747, p < 0.01)が,条件づけやテスト1と3での主効果は有意ではなかった.Tukey's HSD test を用いた下位検定によって,テスト2では実験群と対照群あるいは偽手術群との間に 有意差がみとめられたが(それぞれ p < 0.01, p < 0.05),偽手術群と対照群の間には 有意差はみとめられなかった.これらの結果より,CNOの投与だけでは CS 摂取量 は変化しないことが示された.



#### 図 13. テスト2 における摂取比率

CTA 実験における対照群(CON)と実験群(EXP)の摂取比率を算出するために 図 9 に示すテスト 1 における摂取量をトレーニング最終日における摂取量で除し た. それらのデータを偽手術を受けた群(SHAM)の摂取比率と比較した. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01

4. 考察

実験1ではCTA 想起時のCS 摂取量へのBNSTの関与を明らかにすることを目的と した.CTAの成立後にBNSTの神経活動を化学的遺伝学的に抑制した状態で、CS を呈示すると、CNOを投与されたマウスは溶媒(生理食塩水)を投与されたマウスに比 べて有意に少ない量のCSを摂取したことから、BNSTの神経活動抑制がCS 摂取行 動を抑制することが示された. テスト2から2日後に行われたテスト3で有意な群間差 がみとめられなかったことから, CNO 投与による抑制効果は一時的なものであると考 えられる. また, CTA を経験した動物を用いた水摂取実験では, CNO 投与後に水摂 取量が有意に減少したが, naïve な(CTA を経験していない)マウスでは, BNST の神 経活動抑制は水摂取量を変化させなかった. さらに, この操作は, サッカリンとスクラロ ースの摂取量を減少させるが, NaCl, MSG, QHCl, クエン酸の摂取量は減少させな いことが明らかとなった.

BNST は不安や恐怖状態において極めて重要な役割を担っている(Davis et al., 2010)ことから, hM4Di 受容体を介して BNST 神経活動を抑制する CNO の投与によって CS 摂取量が増加する可能性があると予想していた. しかし実際は, CNO を投与されたマウスの CS 摂取量は減少した. このことは, BNST の神経活動抑制は CTA の成立による CS 摂取量減少を緩和しないことを示唆している. また, CNO の投与によって人工甘味料(サッカリン, スクラロース)の摂取が抑制されたことは予想外の結果であった. なぜなら, BNST が味溶液摂取行動に関与することを示した先行研究がなかったためである. したがって, BNST ニューロンが甘味溶液の摂取に関わる可能性を示した報告は本研究が初めてである.

BNST のニューロンは、脳幹の味覚中継核である孤束核 (nucleus tractus solitarius, NTS)と結合腕傍核 (parabrachial nucleus, PBN) に投射する (Whitehead et al., 2000; Saggu and Lundy, 2008; Kang and Lundy, 2009; Magableh and Lundy, 2014). BNST ニューロンを電気的に刺激すると PBN の味覚応答性ニューロンの多くは抑制される (Li and Cho, 2006). BNST から PBN へ投射するニューロンは抗グルタミン酸デカル ボキシラーゼ (GAD67) 抗体にほとんど反応しない. つまり抑制性神経伝達物質である  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)を放出する (GABA 作動性) のではなく (Saggu and Lundy, 2008), コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) およびソマトスタチン作動性である (Panguluri et al., 2009; Magableh and Lundy, 2014). したがって, BNST から PBN へ

の下行性抑制調節は、GABA ではなく、CRH とソマトスタチンを介する可能性があ る. 本実験で hM4Di 受容体を発現していた BNST ニューロンが CRH やソマトスタチ ンに対して陽性であったかどうかは不明であるが、CNO の投与によって PBN の味覚 応答性ニューロンが脱抑制している可能性は否定できない. PBN ニューロンは、好ま しい味よりも学習によって嫌悪性となった CS に対してより顕著な電気生理学的反応を 示す (Shimura et al., 1997). また、CTA 成立後に CS を呈示すると、PBN では神経活 動のマーカーである Fos タンパク質の発現が増加する (Sakai and Yamamoto, 1997; Navarro et al., 2000; Tokita et al., 2007). これらの知見から、BNST の神経活動抑制 は、PBN ニューロンの脱抑制を介して CTA の想起を増強する可能性があることが示 唆される.

先行研究において、ラットにとって好ましい甘味溶液であるスクロース溶液を呈示し ても、PBNの神経活動は変化しないことが示されている(Shimura et al., 1997).したが って、本実験で CNO を投与することによってマウスの好むサッカリンとスクラロースの 摂取量が減少したのは、PBN ニューロンの活動が修飾されたためではないと思われ る.また、BNST ニューロンは腹側被蓋野 (ventral tegmental area, VTA)にも投射して いる(Dong and Swanson, 2003). VTA のドーパミン(DA) 作動性ニューロンは、嗜好 性の高い味溶液を摂取する行動に深く関与している.スクロース溶液の摂取は VTA の DA ニューロンの主要な投射先である側坐核において細胞外ドーパミンレベルを上 昇させる(Hajnal and Norgren, 2001, 2002). VTA の DA 作動性ニューロンの除去は、 スクロースの摂取量を減少させる(Martínez-Hernández et al., 2006; Shimura et al., 2002; Shibata et al., 2009).また、VTA の GABA 作動性ニューロンを化学遺伝学的 手法によって抑制するとスクロースに対する嗜好性が増加する(Yu et al., 2021)のに 対し、活性化するとスクロースの摂取量が減少する(van Zessen et al., 2012).これらの ことから、Jennings ら(2013)が提唱するように、スクロース摂取に関与する DA 作動性 ニューロンは GABA 作動性介在ニューロンによって抑制的に支配されていると考えら

れる(Kudo et al., 2012). BNST から VTA へ投射するニューロンは主に GABA 作動 性であり、VTA の GABA 作動性介在ニューロンを支配している(Kudo et al., 2012, 2014). これらの知見は, GABA 作動性 BNST-VTA 投射ニューロンの抑制が VTA の GABA 作動性介在ニューロンの脱抑制をもたらし, 結果として VTA の DA 作動性 ニューロンが抑制されることを強く示唆している. この GABA 作動性 BNST-VTA 投 射ニューロンの抑制はエタノールの binge 摂取を減少させることも報告されている (Companion and Thiele, 2018). したがって, 本研究の naïve な動物では, hM4Di 受 容体を介した BNST ニューロンの抑制が VTA の DA 作動性ニューロンの抑制を引 き起こし, 結果として甘味溶液(サッカリンとスクラロース)の摂取量を減少させた可能 性が考えられる.

また, CTA 実験に供したマウスでは CNO の投与によっての水摂取量は減少した (図 10). BNST ニューロンは前述のように VTA の DA 作動性ニューロンを修飾する ため,水摂取量の減少は欲求・完了行動の一時的な抑制によって生じるのではない かと予想された. しかし, naïve なマウスを用いた実験の結果, BNST の神経活動を抑 制しても水摂取量に変化は見られなかったため,この仮説は支持されなかった(図 11). 先行研究では,塩分欠乏状態にあるマウスにおいて,脳弓下器官から BNST 腹 側部への投射ニューロンの活動を抑制しても,水摂取量に変化がないことが示されて いる(Matsuda et al., 2017). BNST が水分摂取に関与していることを示す報告はない ため,給水制限下では, BNST ニューロンは体液バランスや水分摂取行動の調節に 関与していないと考えられる.

本実験では、CTA を経験した動物においてのみ CNO 投与による水摂取量の減少 がみられたことから、BNST の神経活動抑制によって、条件づけを経験したテストチャ ンバーでの不安と恐怖が増強した可能性が考えられた.テストチャンバー内には金網 の床を設置し、味溶液呈示前や呈示中にマウスが尿を舐めたり、糞を食べたりすること がないように配慮した.また、場所選好・嫌悪学習パラダイム(Companion and Thiele、

2018)において、マウスはテストチャンバーの床の特徴を識別できたことから、本実験 において味溶液呈示の文脈が負の経験(内臓不快感)と関連づけられたのかもしれな い.したがって、CNO 投与による水摂取量減少は、BNST ニューロンの活動阻害がテ ストチャンバーに対する不安や恐怖を想起した可能性が考えられる.この考えは、 BNST から PBN への GABA 作動性およびグルタミン酸作動性投射が摂食および不 安関連行動に果たす役割を調べた最近の研究によって支持される (Luskin et al., 2021).彼らは、PBN へ投射する BNST の GABA 作動性ニューロンのカルシウム活 性が脅威の呈示によって低下することを明らかにした.また、このニューロンの活動を 抑制すると摂食量が減少することを見出した.これらの知見から、本実験では CNO 投 与によって PBN への GABA 作動性投射ニューロンの活動が抑制され、潜在的な脅 威環境(テストチャンバー)において水摂取量が低下したのかもしれない.

CNO 投与により、0.5 mM QHClと 20 mM クエン酸の摂取量は有意に減少しなかった. CS(サッカリン)は学習性嫌悪刺激であるのに対し、QHClとクエン酸は生得的に嫌悪される刺激である. どちらも動物には忌避されるが、脳内では異なる処理がなされている可能性がある. 腹側淡蒼球の GABA 作動性伝達は高嗜好性サッカリンと CTA によって低嗜好性となったサッカリンの両方を媒介する一方で、低嗜好性 QHClと CTA によってより低嗜好性となった QHCl には反応しない (Shimura et al., 2006; Inui et al., 2009). また、6-ヒドロキシドーパミン(6-OHDA)の注入によって VTA を破壊すると、スクロースの摂取は抑制されるが、QHClや HClの摂取は抑制されないことから、VTA の DA 作動性ニューロンも高嗜好性味溶液には反応するが、低嗜好性味溶液 には反応しないようである (Shimura et al., 2002). したがって、BNST ニューロンは生得的に好ましいと感じる味だけを媒介する可能性がある.

naïve なマウスにおける味溶液摂取実験では、BNST の神経活動抑制は 0.075 M NaCl の摂取を変化させないことが示された. 高濃度の NaCl は動物にとって嫌悪性で ある(Glendinning et al., 2002)ため、先行研究を参考にマウスが水よりも好む 0.075M

の濃度を選択した(Tordoff and Bachmanov, 2002; Bachmanov et al., 2009). 本実験に おいて,溶媒注入後の0.075 M NaClの摂取量はサッカリンやスクラロースの摂取量 に近かったことから、マウスにとって高嗜好性味溶液であったことがわかる.しかし、 NaClの摂取量には CNO 投与による有意な差はみられなかった. BNST を破壊すると 食塩欠乏によって誘発される高濃度(2%,約0.34M)NaClの摂取が減少することが 明らかとなっている(Zardetto-Smith et al., 1994). 脳弓下器官から BNST 腹側部への 投射ニューロンの抑制は食塩欠乏条件下での 0.3M NaCl の摂取を抑制する.一方, この投射ニューロンを活性化すると 0.15M NaCl を好むようになり, また 0.3M NaCl に 対する嫌悪が抑制される(Matsuda et al., 2017). これらの結果は, BNST がナトリウム 摂取に重要な役割を担っていることを示唆している. 本実験の NaCl 濃度はこれらの 先行研究よりも低かったので, BNST の神経活動抑制による NaCl 摂取量の変化はみ られなかったのかもしれない. MSG もマウスにとって高嗜好性であるため, NaCl につ いての考察を MSG にも適用できる可能性がある. MSG の濃度(0.3M)は, マウスがこ の濃度を好んで摂取することを示した先行研究(Bachmanov et al., 2009)に基づいて 決定した. 本実験では, CNO を投与しても MSG の摂取量に変化がないことを示し た. しかし, 溶媒投与後の MSG の摂取量は水の摂取量とほぼ同等であった. したが って, 本研究で用いたマウスにとって 0.3 M MSG はサッカリンやスクラロースほど好ま しいものではなかった可能性がある.しかし,先行研究(Bachmanov et al., 2009)にお いてマウスは 600 および 1000 mM の MSG を忌避するという結果が示されていたた め、本実験では高濃度の MSG を使用しなかった. 今後の研究で BNST の神経活動 とMSG 摂取の関係が明らかになるかもしれないが, VTA の DA 作動性ニューロンを 除去しても MSG 溶液の摂取量は変化しない (Shibata et al., 2009) ことから, BNST の 神経活動は MSG 摂取行動には関与していないと推測される.

本研究では、ニューロンの性質に関係なく人工受容体の遺伝子を導入するため に、ヒトシナプシン1(hSyn)の遺伝子カセットをプロモーターとして含む AAV ベクター

を用いて、BNST のニューロンを非特異的に操作した. BNST は複数の亜核から構成 され、それぞれ異なる構造と機能を有している(Ju and Swanson, 1989; Ju et al., 1989; Choi et al., 2007). 解剖学的な観点から、BNST は内側部、中間部、外側部、腹側部 に分けられる(De Olmos et al., 1985). さらに、これらの区分は異なる性質の細胞を含 んでおり、前内側部は 6 つの亜核 (anterodorsal, anteroventral, dorsomedial, magnocellular, dorsolateral, ventral), 前外側部は 5 つの亜核 (anterolateral, juxtacapsular, oval, fusiform, rhomboid), 後部は 3 つの亜核 (transverse, interfascicular, principal) に分けられる (Ju and Swanson, 1989; Ju et al., 1989). これら の亜核には、グルタミン酸, GABA, アセチルコリン, CRH, 血管作動性腸管ペプチ ド, ソマトスタチン, カルレチニンという異なる性質を持つ神経伝達物質を発現する細 胞が存在する (Nguyen et al., 2016). 本研究では、CNO 投与によりどのタイプのニュ ーロンが抑制されたのか不明であるため、今後は BNST のニューロンのタイプに応じ た操作が摂取行動におよぼす影響を検討する必要がある.

#### 第3章 実験2

1. 背景

実験1では、BNSTの神経活動を抑制すると、CTA 想起時のCS 摂取量がより少なくなることが分かった。このことから、BNSTのCTAへの関与が示唆されたが、BNSTの機能の詳細は不明である。CNO 投与による摂取量減少の原因を明らかにすることがBNSTの機能解明につながると考えられる。

実験1では1本のスパウトを呈示し、セッション前後でのスパウトの重量の変化から 摂取量を測定する方法(1ビン法)を用いた.1ビン法はスパウトの呈示や重量測定が 容易なため、複数の被験体に対して同時に実験を行える利点がある.一方で、結果と して摂取量という一つの指標(データ)しか得ることができない.摂取量が示すのはセッ ション全体(実験1であれば15分間)における動物の行動の総和であり、セッション中 に動物がどのような行動を示したかということを客観的データとして示すことはできない (実験者の観察による主観的なデータを得ることはできる).つまり、1ビン法ではテスト 中の行動に関するデータはブラックボックスの中にあるといえる.したがって、このブラ ックボックスの中に光を当て、動物の行動の詳細を明らかにすることができれば、実験 1 で明らかになった CNO 投与による摂取量減少の原因を詳らかにすることができ、ひ いては CTA における BNST の機能解明につながると考えられる.

以上の目的のために、本実験では微細行動分析システムを用いて BNST の神経 活動抑制が CS に対する行動におよぼす影響を調べた. 微細行動分析システムにつ いての詳細は後述するが、動物のスパウトへの接近行動や Lick(舐める)行動の経時 的な変化を分析することで、欲求の強さ、味溶液に対する嗜好性の高低、摂取への不 安や恐怖の強さを測定することができる.

実験1では人工リガンドとして CNO を使用した. CNO は化学遺伝学的手法において最も汎く使用されているリガンドであるが,前述のように CNO が血液脳関門難通 過性物質であることや CNO の代謝産物であるクロザピンにより受容体が活性化される

可能性が報告されている(Gomez et al., 2017). これらの問題を克服するために, 2020 年に新たな人工リガンドであるデスクロロクロザピン(deschloroclozapine, DCZ)が開発 された(Nagai et al., 2020). DCZ は CNO などの従来の人工リガンドよりも低用量で人 工受容体に作用することが可能であり,血液脳関門に対して易通過性であるという特 徴を持つ.実験2を開始するにあたって, CNO の替わりに DCZ を人工リガンドとして 用いることとした. しかし, DCZ は新規な人工リガンドであるために使用実績(論文報 告)がほとんどない状況であった. そこで,運動機能に深く関わる VTA に人工受容体 を発現させたマウスに DCZ を投与する予備実験を行った. その結果,運動量が増大 することが分かり, DCZ が実際に使用可能であることが確認された.

2. 方法

2.1. 被験体

飼養開始時 8-9 週齢の雄性 C57BL6 マウス 20 匹を用いた. 飼育環境などは実験 1 と同様であった.

2.2. 手術

手続きは実験1と同様であった. 行動実験の開始までに少なくとも2週間の回復期間 をおいた.

2.3. 行動実験

2.3.1. 微細行動分析システム(図 14)

防音箱内に設置されたチャンバー内でマウスがスパウトから DW や味溶液を摂取でき るように設計した.防音箱はクーラーボックス(コールマン 54QT;ニューウェルブラン ズ・ジャパン合同会社,東京)を改造したものであった.蓋が下開きになるように横倒し にし,下側となる面にボルトを取り付けて高さを調節して内部底面が水平になるように



#### 図 14. 微細行動分析システム

スタートボックス内へマウスを入れ,扉を開けたタイミングをセッションの開始とした.マウスは給水制限下におかれていたため,アリーナへ入り,スパウトへ接近して水または味溶液を摂取した.出窓の横に設置した通過センサーとスパウトに接続した接触センサーにより,出窓への接近とLickを検出した.

した.防音箱の奥面上部に照明のための小型蛍光灯(LED 蛍光灯,10W 形)を取り 付けた.防音箱に向かって右側側面上部に正方形の穴を開け,換気用ファン (DC12V ブラッシュレス冷却ファン,AB5020H12-1;Security-01)を取り付けた.左側側 面にあった排水コックを取り外し,ケーブルを通す穴とした.内部上面中央にWebカメ ラ(BSW200MBK,株式会社バッファロー,愛知)をとりつけ,内部を観察できるようにし た.また内部上面左側にスピーカー(小型フルレンジスピーカーユニット,E15-00198-03)を取り付けた.内部底面にはスライドレールを2本固定し,その上にポリカーボネ ート板を置いた.その上にマウスケージ用フロアーメッシュ(トキワ科学器械株式会社, 東京)を底にしたチャンバーを置き,全体を容易に手前に引き出せるようにした.これ は、実験の前後でマウスを出し入れしやすくするためである.

チャンバーは小さい箱(スタートボックス;幅10 cm x 奥行き6 cm x 高さ10 cm)と 大きな箱(アリーナ;幅17 cm×奥行き15 cm×高さ20 cm)によって構成されており,スタ ートボックスとアリーナは 5×5cm の四角い穴でつながっていた.この穴は通常シャッタ ーによって閉じられていた.シャッターは防音箱の壁を貫通するステンレス製棒を実験 者が上下することで開閉できるようになっていた.このシャッターとは反対側のアリーナ の壁に出窓があった.出窓の外には、シリンジ用の架台を設置した.シリンジはガラス 製の試験管とステンレス製のスパウトからなり、スパウトに付属するクリップを架台のス テンレスワイヤーに噛ませるとシリンジ先端が 45°の角度で下向きの状態で架台に固 定されるように設計した.チャンバー、シャッター、シリンジ架台のいずれもポリカーボ ネート樹脂板を加工して作製することで水洗いを可能にした.

アリーナの壁面外側に, 出窓を左右から挟むように通過センサー(エリアモニタリング ファイバーセンサーヘッド;E32-T16WR, オムロン株式会社, 京都)を取り付けた. この センサは赤外線によって通信する送信部と受信部の2つのヘッドからなり, 赤外線を 遮断することで物体の通過を検知することができる. これを出窓の左右に設置すること で, マウス頭部の出窓への侵入, すなわちマウスのスパウトへの接近を検知することが できるようにした. また, シシリンジ架台のステンレスワイヤーを接触センサー(タッチセ ンサー2, 共立電子株式会社, 大阪)に接続し、マウス舌の接触, すなわち Lick を検 出できるようにした.

通過センサーの赤外線を遮断すると出力電圧が0Vから5Vへ上昇し, Lick によって接触センサーの出力電圧が0Vから1Vへ上昇した. これらの電圧変化のデー タをデータ収集システム(PowerLab, ADInsturments, Dunedin, New Zealand)とそれに 付属する LabChart ソフトウェアを用いてパソコンに取り込んだ. サンプリング周波数は 1 kHz であった.

各セッションの終了前後にシリンジの重量を測定し,摂取量を算出した.

2.3.1. 手続き

手術からの回復期間終了後, マウスを実験環境に馴化させた(Day 1).2 台の微細行 動分析システム(Chamber1,2)を用意し,各個体は実験を通して同一の Chamber 内 で DW あるいはサッカリン溶液を呈示された.給水制限と補給の条件は実験1と同様 であった.飲水トレーニング,条件づけテスト1を実験1と同様のスケジュールで実施 した(表 2).また,テスト1の終了後に CS 摂取量が実験群と対照群で可能な限り同 等となるように群分けを行った(実験群,n=10;対照群,n=9).テスト2において BNST の神経活動を抑制するために,実験群に DCZ(50 µg/kg)を,対照群には溶媒 (1.0% DMSO 含有滅菌生理食塩水)を腹腔内投与した.投与量は体重の0.5%量で あった.DCZ の用量は先行研究(Nagai et al., 2020)をもとに決定した.実験1と同様 にテスト3をテスト2の48時間後に行った.

		衣 2. 夫殿 2 行動夫殿入り シュール
Day	Trial	Treatment
2-6	トレーニング	水
7	条件づけ	0.2 % サッカリン ─ <sup>直後</sup> → 0.3 M 塩化リチウム (i.p.)
12	テスト 1	0.2 % サッカリン
14	テスト 2	DCZ or 溶媒 (i.p.) <u>30 分後</u> → 0.2 % サッカリン
16	テスト 3	0.2 % サッカリン

表 2. 実験 2 行動実験スケジュール

#### 2.4. DCZ の用量依存性検証実験

DCZ は新規の人工リガンドであるため、その作用は不明な点が多い. DCZ が人工受容体に直接に作用し神経活動を変化させるのであれば、用量が低いほど神経活動の変化は小さくなり、その結果観察される行動の変化も小さくなると考えられる. そこで、用量による作用の違いについて検証するため、上述の実験よりも低い用量(5 µg/kg)の DCZ を用いる実験を行った. 雄性 C57BL6 マウス 10 匹に対し、これまでの実験と同様に BNST に hM4Di の配列を持つアデノ随伴ウィルスベクターを注入する外科的

手術を行った. 術後 2 週間から行動実験を開始した. 上述の 5 μg/kg の実験と同じス ケジュールで実施し, テスト 2 において CS 呈示 30 分前に 5 μg/kg の DCZ を腹腔内 投与した.

2.5. 組織学的検証

行動実験終了後、マウスの灌流固定を行い、脳を頭蓋骨から摘出した.厚さ30 µmの 組織切片を作成し、実験1と同様の手順で免疫組織化学的染色を行った.

顕微鏡を用いて組織切片を観察し, hM4Di を発現しているニューロンの分布を観察した.

2.6 行動分析

各トライアルのデータを LabChart でテキスト形式で出力し, フリーソフトウェア R によっ て作成したプログラムを用いて解析した. 接触センサーのデータから Lick 行動を分析 した. Lick 間隔(1つ1つの Lick がどれくらいの時間間隔で生じるか)を基準に分析し た(図 15).3 回以上の Lick が 180 msec 未満の間隔で続いた場合, その一連の Lick を「burst」と定義し, burst の数とサイズ(1 つの burst あたりの Lick 数)を評価した.



図 15. Lick 行動と接近行動 (Entry)の経時的変化 a. 最初の Lick から最後の Lick までの時間 (Meal time), b. 最初の Lick まで の潜時 (Latency for 1st Lick), c. 各 Entry–Lick における最初の Lick までの潜 時, d-e, Entry-Lick と Entry-Stop の持続時間 (duration), f. Lick 間隔 (interlick interval, ILI).

また, 最初の Lick までの潜時 (Latency for 1st lick), 最初の Lick から最後の Lick ま での時間 (Meal time), 15 分間の総 Lick 数 (Total lick number)を評価した. 接近行 動については, マウスが出窓に頭を入れる (スパウトに接近する) 行動を 「Entry」と定義 した. Entry の頻度や持続時間によって動機づけの強さを分析した.

Entry についてはさらに Entry–Lick と Entry–Stop に分類した. Lick 行動を伴う Entry を「Entry–Lick」と定義した(図 16). 一方,「Entry–Stop」はスパウトに接近するも のの,味溶液を摂取しない(Lick せずに後退する)行動で,マウスが摂取を躊躇して いたことを示す指標と定義した. Entry–Lick と Entry–Stop のそれぞれについて頻度と 持続時間を評価した.



#### 図 16. Entry の分類

マウスが出窓に頭を入れる(スパウトに接近する行動)を Entry と定義した. Entry は通過センサーにより検知され, 動機づけの指標とした. a. Entry-Lick. 飲み口に接近し, 味溶液を舐める(Lick する)行動. b. Entry-Stop. 飲み口に 接近するものの, Lick せずに止まる行動. 躊躇の指標とした.

2.7. 統計

実験1と同様に、hM4Diの発現がBNSTの片側のみ、または両側共に認められなかったマウスは、データの解析から除外した.データの解析は、Prismを用いて行った. CTAを獲得することで上述の行動指標がどのように変化するかを明らかにするために、各パラメーターについて条件づけとテスト1の間で対応のあるt検定(paired t-test)を用いて比較した.DCZ 投与による影響は、テスト2とテスト3における各パラメ
ーターの群間差を Holm-Šídák 法で補正した対応のない多重 t 検定 (multiple unpaired t-test)を用いて分析することで評価した.また, DCZ の用量依存性を検証する実験では溶媒投与群, 5 µg/kg DCZ 投与群, 50 µg/kg DCZ 投与群の各パラメーターを一元配置分散分析で比較した.

3. 結果

3.1.50 µg/kg DCZ 投与による Lick 行動および接近行動の変化

BNST の背側および腹側の両方に mCherry 陽性細胞の存在が確認された実験群 8 匹, 対照群 9 匹のデータを分析した. シリンジの重量から算出した摂取量の変化から 全ての個体において CTA が成立したことが分かった(テスト1 での摂取量が条件づけでの摂取量より少なかった).

各パラメーターのデータを図 17 から図 21 に示す. 各グラフにおいて, 条件づけ (conditioning test, Cond.)とテスト1(acquisition test, Acq.)のデータを paired t-test を 用いて比較することで, CTA の成立による各パラメーターの変化について分析した. また, テスト2と3(Test 2, 3)について実験群と対照群を multiple unpaired t-test によっ て比較することで, DCZ 投与による各パラメーターの変化について分析した.

最初の Lick までの潜時(図 17a; Latency for 1st lick)は CTA の成立によって変化 せず, DCZ 投与の影響もみられなかった. 一方, 最初の Lick から最後の Lick までの 時間(図 17b; Meal time), すなわちマウスが CS を摂取していた時間は CTA の成立 によって有意に短くなった(t[16] = 3.519, p < 0.01). また, DCZ 投与によって短くなっ たが, 群間差は有意ではなかった. 15 分間の総 Lick 数(図 17c; Total lick number) は CTA の成立によって有意に減少した(t[16] = 18.11, p < 0.001). このことは摂取量 の減少と相関している. テスト2 において実験群の総 Lick 数は対照群に比べて有意

に少なく(t[15] = 3.615, p < 0.01), DCZ 投与が Lick 行動を減少させたことが分かった. このような群間の有意差はテスト3 ではみとめられなかった.



#### 図 17. 条件刺激に対する Lick 行動の変化

Cond.(条件づけ), Acq.(テスト1)のデータは全個体の平均値を示している. TEST 2(テスト2)とTEST 3(テスト3)のデータは各群(EXP, 実験群;CON, 対照群)の平均値をそれぞれ示している. TEST 2 の色付きのバーは DCZ(橙) あるいは溶媒(VEH, 青)を投与したことを示している. a, 最初の Lick までの 潜時は CTA の成立によって変化せず, DCZ 投与による影響もなかった. b, 最初の Lick から最後の Lick までの時間は CTA の成立により, 有意に短く なった. DCZ 投与により短くなる傾向がみられたが, 群間差は有意ではなかっ た. c, 総 Lick 数は CTA の成立により有意に減少した. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001(群間比較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>†††</sup>p < 0.001(Cond.との比較)

CTA の成立によって burst の数が有意に減少した(図 18a; Number; t[16] = 7.307, p < 0.001). また, テスト2 において群間差が有意であり, DCZ 投与によって burst の 数が減少したことが分かった(t[15] = 3.417, p < 0.01). テスト3 における群間差は有意 ではなかった. burst のサイズは小さいほどその味溶液に対する嫌悪感が強いことを意 味し, 反対にサイズが大きくなると嫌悪感が弱いことを意味する. CTA の成立によって burst のサイズが有意に小さくなった(図 18b; Size; t[16] = 7.422, p < 0.001)ことから,

マウスは CS への嫌悪感を示していたと考えられる. テスト2 において DCZ 投与により burst のサイズは有意に小さくなった(t[15]=2.534,p<0.05). テスト3 では群間差は みられなかった.





## 図 18. 高頻度 Lick(burst)への影響

a, burst の数は CTA の成立により有意に減少した. テスト2において DCZ 投与によって有意に減少した. b, CTA の成立により, burst のサイズは有意に 小さくなった. DCZ 投与により対照群との間に有意差がみとめられた. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001(群間比較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.01, <sup>†††</sup>p < 0.001(Cond.との比較)

接近行動については Entry, Entry–Lick, Entry–Stop について頻度と持続時間を分 析した. CTA の成立によって Entry の頻度が有意に減少した(図 19a; Number; t[16] = 2.690, p < 0.05). テスト2 とテスト3 では群間差はみられなかった. Entry の平均持 続時間もCTAの成立によって有意に短くなった(図 19b; Duration; t[16] = 14.25, p <</p> 0.001). また, テスト2で DCZ 投与によって有意に短くなった(t[15] = 3.272, p < 0.05) が, テスト3 では群間差はみられなかった.

Entry-Lick の頻度は CTA の成立によって有意に減少した(図 20 a;t[16] = 9.195, p < 0.001; Number). また, テスト2 において DCZ を投与された実験群は対照群に比 べて有意に少ない Entry-Lick を示した(t[15]=2.734, p < 0.05). このような群間差は テスト3ではみられなかった.同様に Entry-Lick の平均持続時間も CTA の成立によ って有意に短くなり(図 20b; Duration; t[16] = 11.43, p < 0.001), テスト2において

DCZ 投与は有意な群間差を生じさせた(t[15] = 2.634, p < 0.05). テスト3 では群間差 はみられなかった.



# 図 19. スパウトへの接近行動(Entry)への影響

a, CTA の成立により Entry の頻度は有意に減少した. 一方, テスト2と3 では 群間差はみられなかった. b, 平均持続時間も CTA の成立により, 有意に短くな った. DCZ 投与により対照群との間に有意差がみとめられた. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001(群間比較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.01, <sup>†††</sup>p < 0.001(Cond.との比較)



# 図 20. Lick 行動をともなう Entry (Entry-Lick) への影響

a, Entry-Lick の頻度は CTA の成立によって有意に減少した. テスト 2 において 実験群は対照群に比べて有意に少ない Entry-Lick を示した. b, Entry-Lick の 平均持続時間も CTA の成立によって有意に短くなり, テスト 2 において DCZ 投 与は有意な群間差を生じさせた. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001(群間比較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>†††</sup>p < 0.001(Cond .との比較) Entry-Stop の頻度に CTA の成立は影響をおよぼさなかった (図 21a; Number). テ スト 2 において DCZ 投与は Entry-Stop の頻度を増加させる傾向を示したが, 群間差 は有意ではなかった (t[15] = 1.360, p >0.05). テスト 3 での群間差も有意ではなかっ た. 一方, Entry-Stop の平均持続時間においても CTA の成立による有意な変化はみ られず, DCZ 投与の影響もみられなかった (図 21b; Duration). Entry の頻度に占める Entry-Stop の頻度の割合 (Entry-Stop の発生確率; Probability)を算出すると, CTA の成立によって有意に増大することがわかった (図 21c; t[16] = 4.917, p < 0.001). ま た, テスト 2 において DCZ を投与された実験群は対照群に比べて有意に高い発生確 率を示した (t[15] = 2.899, p < 0.05). このような群間差はテスト 3 ではみられなかっ た.



## 図 21. Lick 行動をともなわない Entry(Entry-Stop)への影響

a, Entry-Stop の頻度は CTA の成立によって変化しなかった. DCZ 投与は Entry-Stop の頻度を増加させる傾向を示したが, 群間差は有意ではなかった. b, 平均持続時間も CTA の成立による有意な変化はみとめられず, DCZ 投与の 影響もみられなかった. c, Entry-Stop の発生確率は CTA の成立によって有意 に増大し, DCZ 投与により有意に増大した. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001(群間比 較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.01(Cond.との比較) 3.2 DCZ の用量依存性検証実験(5 µg/kg DCZ 投与による行動の変化)

実験に用いた 10 匹のうち, 4 匹では BNST の片側あるいは両側で mCherry 陽性細胞が見られなかったため, 行動データの解析から除外した.

5 μg/kg DCZ 投与群(以下, 5 μg 群と表記)を前項の対照群(以下, 0 μg 群と表記), 実験群(以下, 50 μg 群と表記)と比較した.

5 μg 群は 0 μg 群, 50 μg 群と同様に CTA の成立によって各パラメーターを変化さ せた. 群間に違いはみられなかったため, CTA の成立による変化(Cond.と Acq.のグ ラフ)については省略する.

テスト2 において 5 µg 群の最初の Lick までの潜時(図 22a; Latency for 1st lick) は、0 µg 群に比べて長くなる傾向にあったが群間の有意差はみとめられなかった. テ スト3 においても同様であった. 摂取時間(図 22b; Meal time)についてはテスト2 とテ スト3 の両方において群間差はみとめられなかった. 総 Lick 数(図 22c; Total lick number)については 0 µg 群と 50 µg 群間においてのみ有意差がみとめられた. (p < 0.01).

burst の数(図 22d;Number)とサイズ(図 22e;Size)については, テスト2において 0 µg 群より 5 µg 群のほうが小さくなる傾向にあったが, いずれも群間差は有意ではな かった.

Entry の頻度 (図 22f; Number) についてはテスト 2 とテスト 3 の両方において群間 差はみとめられなかった. 一方, Entry の平均持続時間 (図 22g; Duration) については テスト 2 において 0  $\mu$ g 群と 5  $\mu$ g 群との間に有意差がみとめられたが (p < 0.05), 0  $\mu$ g 群と 50  $\mu$ g 群の差のほうが大きかった (p < 0.01).

Entry-Lick の頻度(図 22h; Number)と平均持続時間(図 22i; Duration)について はテスト2とテスト3の両方において0 µg 群と5 µg 群の間に有意差はみとめられな かった.

1. Lick Behavior



# 図 22. DCZ の用量依存性検証実験

低用量(5 µg/kg)の DCZ を投与すると Entry の平均持続時間(g. Duration)が 対照群(0 µg/kg)に比べて有意に短くなった. しかし, 高用量(50 µg/kg)と比べる とその差は小さかった. その他のパラメーターについては対照群との間に有意差 はみとめられなかった. Entry-Stop については, 頻度(図 22j; Number), 平均持続時間(図 22k; Duration), 発生確率(図 22l; probability)のいずれにおいても, テスト2 とテスト3の両方において有意な群間差はみとめられなかった.

4. 考察

テスト2において実験群(50 μg 群)では burst のサイズが小さくなったことから, DCZ 投与による分界条床核の神経活動抑制は, CS に対する嫌悪を増大させたことが分か った. テスト2において実験群は有意に少ない総 Lick 数, すなわち有意に少ない CS 摂取量を示したが, CS に対する嫌悪の増大が摂取量減少の一因であったと考えられ る.

接近行動については, DCZ 投与は Entry の頻度に影響をおよぼさなかった. このこ とは実験群と対照群が同程度の頻度でスパウトに接近したことを意味している. つま り, DCZ 投与によって接近動機づけ (マウスが味溶液を摂取しようとする過程)には変 化が生じなかったことから, 分界条床核の神経活動抑制は欲求行動に影響しないこと が示唆された.

一方で、Entry-Lick の頻度と平均持続時間は DCZ 投与によって有意に減少した. Entry-Lick は Lick 行動をともなう Entry であるため、DCZ 投与による Entry-Lick の 減少は CS 摂取量の減少を反映していると考えられる. 頻度だけでなく平均持続時間 が減少したということは、Entry-Lick の各イベントが DCZ 投与によって持続しなくなっ たことを意味している. つまり、マウスはスパウトに接近し、Lick を開始したとしても比較 的短時間で終了したといえる. 上述したように DCZ によって CS に対する嫌悪が増大 したために、Lick 行動が持続しなかったと考えられる.

Entry-Stop の平均持続時間については群間の違いはみられなかったが, 頻度については DCZ 投与による増加傾向がグラフ(図 23a)からみてとれた. 統計学的に有意 差がみとめられなかったのは個体差が大きいためではないかと考え, 発生確率(図

23a)を算出した. その結果, DCZ 投与によって Entry-Stop が生じやすくなることがわ かった. Entry-Stop はマウスがスパウトに接近にするものの Lick しない, すなわち Lick を躊躇している状態を意味している. したがって, DCZ 投与による Entry-Stop の 増加は, 分界条床核の神経活動抑制によって, マウスが CS の摂取をより強く躊躇す るようになったことが示唆された.

本実験のマウスは給水制限下におかれており、口渇感によって飲水に対する動機 づけが増強していたと考えられる. DCZ 投与はこの動機づけに影響しないことが Entry の分析によって示された. すなわち, 実験群のマウスは対照群と同様に呈示さ れた味溶液を摂取しようしたと考えられる. したがって, DCZ 投与によって CS に対す る嫌悪と躊躇が増大し, 結果的に摂取量が減少したことが示唆された.

DCZの用量依存性を検証する実験では、低用量(5 µg/kg)のDCZを投与すると Entryの平均持続時間が対照群(0 µg/kg)に比べて有意に短くなったが、高用量(50 µg/kg)よりも変化は小さかった.また、その他のパラメーターについては対照群との間 に有意差はみとめられなかった.以上の結果から、低用量のDCZ 投与では行動表出 への影響がないか、あったとしても小さいことが示された.したがって、低用量のDCZ によるBNSTの神経活動抑制作用は高用量に比べて軽微であり、DCZの作用は用 量依存的であることが示唆された.DCZの使用開始にあたって参考にした Nagai 6 (2020)の研究では 100 µg/kg の用量でサルを対象とした行動実験(空間遅延反応課 題)を実施した.彼らはマウスに対してDCZを1 µg/kg の用量で投与して薬物動態を 調べているものの、行動実験は実施しておらず、マウスでの使用実績は乏しい状況で あった.しかし最近.マウスのメラノコルチン4受容体発現細胞の活動を人工受容体 rM3Ds(ラット改変アセチルコリン受容体 M3)を介してDCZ 投与によって操作し、摂 餌量の変化を調べた研究が報告された(Matsumura et al., 2022).彼らは、0.01 mg/kg または 0.1 mg/kg の用量で DCZを投与すると、低用量では摂餌量が抑制されなかっ たのに対し、高用量では摂餌量が抑制されることを示している.この先行研究と本研

究では DCZ の用量が若干異なるものの低用量では影響が小さいという点で一致して おり、本研究において低用量の DCZ が hM4Di を介して BNST の神経活動を抑制す る効果は行動の変化を引き起こすほどのものではなかったと考えられる.したがって、 行動実験においてはある一定の用量以上の DCZ が用いられる必要があるものの、 CNO(1 mg/kg)に比べると低い用量(50 μg/kg)で効果が得られることが示された. 第4章 実験3

1. 背景

実験1と実験2では、BNSTの神経活動抑制がCTAの想起時におけるCS摂取量 や行動におよぼす影響を調べた.その結果、BNSTの神経活動を抑制するとCSに 対する嫌悪や躊躇が増大し、CS摂取量が減少することがわかった.そこで実験3で はBNSTの神経活動促進によってCSに対する反応にどのような変化が生じるかを明 らかにすることを目的とした.

2. 方法

2.1. 被験体

飼養開始時 8-9 週齢の雄性 C57BL6 マウス 18 匹を用いた. 飼養環境などは実験 1 と同様であった.

2.2. 手術

これまでと同様に両側の BNST にアデノ随伴ウィルスベクターを注入する手術を行った. 注入したウィルスはヒト改変アセチルコリン受容体 M3 (興奮性受容体)の配列をもつ pAAV8-hSyn-hM3D(Gq)-mCherry(50474-AAV8, Addgene, Watertown, MA, USA)であった. ウィルスベクター注入後の手続きは実験 1,2と同様であった.

2.3. 行動実験

実験2と同じく微細行動分析システムを使用して, Lick 行動と接近行動の解析を行った. 手続きは実験2と同様であった.

2.4. 組織学的検証

実験1,2と同様の方法でhM3Dqを発現しているニューロンの分布を分析した. hM3Dqの発現がBNSTの片側,または両側ともにみとめられなかったマウスについては,以下の行動分析から除外した.

## 2.5 行動分析

各トライアルにおける Lick 行動と接近行動を実験 2 と同様に LabChart を介してパソ コンに記録し、そのデータを R で作成したプロフラムを用いて解析した.

#### 2.6. 統計

Prismを用いて統計学的分析を行った.実験2と同様に,CTAの成立による行動の 変化を明らかにするために,各パラメーターについて条件づけ(Cond.)とテスト1 (Acq.)の違いを対応のあるt検定(paired t-test)を用いて分析した.DCZ 投与による 影響については,Holm-Šidák 法で補正した対応のない多重t検定(multiple unpaired t-test)を用いて,テスト2とテスト3における群間の違いを分析することで評価した.

## 3. 結果

3.1. 組織学的検証

実験群(n=9)および対照群(n=6)の背側および腹側の両方に mCherry 陽性細胞 が存在していることを確認した.実験群の3 匹については BNST の外側に mCherry 陽性細胞が見られたため,行動データ解析から除外した.残りの実験群のうち,5 匹で は BNST の尾側部に mCherry 陽性細胞が分布していたが,吻側部では分布が観察 されなかった.残りの4 匹については吻側部と尾側部の両方に細胞の分布がみられ た.実験2 で行動データ分析に供した個体はいずれも吻側部と尾側部の両方に hM4Di が発現していた.また,分界条床核の吻側部と尾側部では神経投射が異なる (Dong and Swanson, 2004). これらのことを踏まえて,本実験では,尾側に陽性細胞 が分布していた個体(尾側群;n=5)と吻側にも分布が見られた個体(吻側群;n=4)の2 つの群に分けた. 吻側群の個体数が不十分であったため,尾側群についてのみ統計 学的分析を行なった.

3.2. 行動分析

3.2.1. 尾側群について

実験2と同様にテスト1でいずれの個体もCS摂取量が低下したことから,行動デー タ分析に供した個体ではCTAが成立していたと考えられる.

最初の Lick までの潜時(図 23a; Latency for 1st lick)が CTA の成立によって増大 する個体がみられたが,条件づけ(Cond.)とテスト1(Acq.)の間で有意差はみとめられ



b. Meal time



c. Total lick number



# 図 23. 尾側群における Lick 行動の変化

a, 最初の Lick までの潜時は CTA の成立によって増大する個体がみられたが, 有意差はみとめられなかった. DCZ 投与により有意に長くなった. b, CS 摂取時 間は CTA の成立により有意に短くなった. DCZ 投与により短縮傾向にあったが 有意な群間差はみとめられなかった. c, 総 Lick 数は CTA の成立によって有意 に減少した. DCZ 投与による有意な変化はみられなかった. \*p < 0.05(群間比 較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>†††</sup>p < 0.001(Cond.との比較) なかった. テスト2で DCZ 投与によって有意に長くなった(t[9] = 2.908, p < 0.05). テ スト3においても尾側群のほうが長かったが群間差は有意ではなかった. 最初の Lick から最後の Lick までの時間(図 23b; Meal time)は CTA の成立によって有意に短く なった(t[10] = 3.051, p < 0.05). DCZ 投与によってより短くなる傾向にあったが尾側 群と対照群の間に有意な群間差はみとめられなかった. テスト3 における群間差は有 意ではなかった. 総 Lick 数(Total lick number)は CTA の成立によって有意に減少し た. テスト2 では DCZ を投与された尾側群は対照群に比べて少ない総 Lick 数を示 したが有意な差ではなかった. また, テスト3 における群間差も有意ではなかった.

burst の数とサイズは CTA の成立によって有意に減少した(図 24;数, t[10] = 5.110, p < 0.001; サイズ, t[10] = 5.163, p < 0.001). また, 数とサイズのどちらも尾側群 では DCZ 投与によって減少する傾向がみられたが, 対照群との間に有意差はみとめ られなかった.



#### 図 24. 尾側群における burst の変化

burst の数(a)とサイズ(b)は CTA の成立によって有意に減少した. また, 数と サイズのどちらも尾側群では DCZ 投与によって減少傾向がみられたが, 対照群 との間に有意差はみとめられなかった. \*\*\*p < 0.001(群間比較); <sup>†</sup>p < 0.05, <sup>††</sup>p < 0.01, <sup>†††</sup>p < 0.001(Cond.との比較)

Entry の頻度は CTA の成立によって有意に減少した(図 25a;t[10] = 2.708, p < 0.05). DCZ 投与は尾側群の Entry の頻度を減少させたが, 群間差は有意ではなかった. また, テスト3 での群間差も有意ではなかった. 同様に, Entry の平均持続時間

にも CTA の成立によって有意に短くなった(図 25b;t[10] = 3.372, p < 0.05)が、テスト 2 とテスト 3 における群間差は有意ではなかった(図 25b).



#### 図 25. 尾側群における Entry の変化

a, Entry の頻度は CTA の成立によって有意に減少した. DCZ 投与は尾側群の Entry の頻度を減少させたが, 群間差は有意ではなかった. b, Entry の平均持 続時間にも CTA の成立によって有意に短くなったが, テスト 2 とテスト 3 におけ る群間差は有意ではなかった. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01(群間比較);<sup>++</sup>p < 0.01, <sup>+++</sup>p < 0.001(Cond.との比較)

Entry–Lick の頻度と平均持続時間は Entry と同様の傾向を示した. CTA の成立に よって有意に頻度が減少し(図 26a;t[10] = 6.593, p < 0.001), 平時持続時間が短くな った(図 26b;t[10] = 3.801, p < 0.01). また, 統計学的有意差はみとめられなかったも のの, DCZ 投与によって頻度が減少し, 平均持続時間が短くなる傾向にあった. 頻度 についてはテスト3 においても尾側群のほうが少ない傾向にあったが, 群間差は有意 ではなかった. テスト3 における平均持続時間については群間の差はみとめられなか った.

Entry-Stop の頻度(図 27a)と平均持続時間(図 27b)は CTA の成立によって変化 しなかった.しかし,発生確率は有意に増大した(図 27c;t[10]=4.551,p<0.01).テ スト2で DCZ を投与すると, Entry-Stop の頻度が若干減少し,反対に平均持続時間 が若干長くなる傾向にあったが群間差は有意ではなかった.また,発生確率にも DCZ は影響をおよぼさなかった.



## 図 26. 尾側群における Entry-Lick の変化

Entry-Lick の頻度は CTA の成立によって有意に頻度が減少し(a), 平均持続時間が短くなった(b). また, 有意差はみとめられなかったものの, DCZ 投与によって頻度が減少し, 平均持続時間が短くなる傾向にあった. \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001(群間比較); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001(Cond.との比較)



# 図 27. 尾側群における Entry-Stop の変化

Entry-Stop の頻度(a)と平均持続時間(b)は CTA の成立によって変化しな かった.テスト2で DCZ を投与すると, Entry-Stop の頻度がわずかに減少 し,反対に平均持続時間が若干長くなる傾向にあったが群間差は有意ではな かった.発生確率(c)は CTA の成立によって有意に増大したが, DCZ は影 響をおよぼさなかった. 3.2.2. 吻側群について

BNST の吻側部にも mCherry 陽性細胞が分布していた実験群(吻側群)と対照群の 結果を表 3 に示す.条件づけ(Conditioning), テスト1(Test 1), テスト3(Test 3)のデ ータは尾側群,対照群と同程度であったため記述を省略し, テスト2(Test 2)の結果に ついて吻側群と尾側群あるいは対照群との比較について以下に記述する.

吻側群における最初の Lick までの潜時 (Latency for 1st lick) は対照群より長く, 尾 側群より短かった. 最初の Lick から最後の Lick までの時間 (Meal time) は対照群と 同程度であった. 15 分間の総 Lick 数 (Total lick number) は対照群より少なく, 尾側 群より多かった. burst の数は対照群と同程度であったのに対し, burst のサイズは尾側 群と同程度であった.

Parameter	Conditioning	Test 1	Test 2	Test 3
Latency for 1st Lick	11.5 ± 2.86	7.65 ± 0.28	264.1 ± 212.8	82.6 ± 42.8
Meal Time	666.2 ± 95.83	646.4 ± 107.7	358.4 ± 214.6	600.9 ± 116.4
Total Lick Number	682.5 ± 91.58	110 ± 97.1	105.3 ± 66.0	304.8 ± 191.1
Burst Number	39.3 ± 6.45	7.3 ± 6.29	6.5 ± 3.78	23.3 ± 11.35
Burst Size	17.4 ± 2.6	4.7 ± 3.29	7.5 ± 4.67	8.8 ± 2.38
Entry Number	21.8 ± 4.33	12.5 ± 1.85	13.0 ± 3.54	18.3 ± 3.75
Entry Duration	5.7 ± 1.66	2.1 ± 1.08	1.7 ± 0.49	2.8 ± 1.01
Entry-Lick Number	15.5 ± 2.78	6.3 ± 1.49	3.3 ± 1.60	8.0 ± 3.03
Entry-Lick Duration	7.5 ± 2.22	2.6 ± 1.06	3.1 ± 1.41	5.1 ± 0.74
Entry-Stop Number	4.5 ± 2.10	7.0 ± 2.77	5.5 ± 2.22	10.3 ± 3.79
Entry-Stop Probability	0.4 ± 0.08	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.27	0.6 ± 0.16
Entry-Stop Duration	21.0 ± 10.06	57.3 ± 16.29	45.7 ± 16.82	57.1 ± 13.78

表3 hM3Dq 注入群(吻側)の実験結果

Entry の頻度は対照群に近い値を示した. それに対して, Entry の平均持続時間については尾側群に近い値となった.

Entry–Lick の頻度と平均持続時間については,対照群より少なく,尾側群より多かった. Entry–Stop の頻度は対照群より少なく,尾側群より多かった. 一方, Entry–Stop の平均持続時間は対照群と同程度であった. 発生確率については対照群と尾側群のいずれよりも低かった.

4. 考察

テスト2において15分間の総Lick数(Total lick number)とburstのサイズについて, DCZ 投与によって減少する傾向がみられたものの,有意な群間差はみとめられなかった.これらのことから,BNST 尾側部の神経活動を促進させても,摂取量やCS に対する嫌悪に有意な変化は生じないことが示唆された.

DCZ 投与は尾側群の Lick 行動のうち, 最初の Lick までの潜時 (Latency for 1st lick)を有意に増大させた. また, Entry の頻度については, 群間差は有意ではないものの減少する傾向がみとめられた (p=0.101). これらの結果は, 尾側群のマウスは対照群に比べて, チャンバーのシャッターが開いてから最初に Lick するまでに有意に長い時間を要し, またスパウトに接近する頻度も少なかったことを意味している. つまり, DCZ 投与によって BNST 尾側部の神経活動を促進すると, 接近動機づけが弱められ, 欲求行動が減少することが示唆された.

Entry-Lick の頻度と平均持続時間も DCZ 投与によって減少する傾向にあったが 尾側群と対照群の間に有意差はみとめられなかった. これらの減少傾向は, マウスが CS を Lick しようとする行動が少なくなる傾向にあることを示しており, 結果として CS 摂取量(総 Lick 数)の減少傾向へとつながったと考えられる.

テスト2における Entry-Stop の発生確率は 54.7 ± 14.95%であったことから, Entry-Lick と Entry-Stop がほぼ同程度の頻度で生じたといえる. Entry の頻度そのも

のが減少したことを考慮に入れると、尾側群のマウスではスパウト(CS)がある出窓に接近することへの恐怖が DCZ によって増大した可能性が考えられる. 接近をしないために、摂取量は減少し、burst も減少したのかもしれない.

一方, 吻側にも mCherry 陽性細胞が見られた個体(吻側群)では, 最初の Lick ま での潜時(Latency for 1st lick)と Entry の頻度は DCZ 投与の影響を受けなかった. こ のことから, 吻側群では接近動機づけに変化は生じなかったといえる. この吻側群で は Entry-Stop の頻度や平均持続時間についても変化がなかったことから, DCZ 投与 は CS の摂取に対する躊躇を増大させないことが示唆された. 吻側群は尾側群のよう に接近動機づけが減弱することはなく, BNST 吻側部の神経活動を促進しても CS に 対する恐怖は増強されない可能性が考えられた. ただし, 現時点で BNST の吻側部 において mCherry 陽性細胞(hM3Dq 発現細胞)の分布が確認されたのは 4 個体の みであるため, 統計学的分析に十分な個体数を得るために, 今後さらに実験を重ねる 必要性がある. 第5章 総合論議

実験1ではCTAの想起にBNSTが関与しているかどうかを明らかにするために、 BNST の神経活動抑制が CS 摂取行動におよぼす影響を調べた. BNST の神経活動 を抑制されたマウスの CS 摂取量は、抑制されていない個体に比べて有意に少なくな ることが明らかとなった.この摂取量減少の原因を明らかにするため、実験2におい て,微細行動分析システムを用いて,マウスの行動を定性的・定量的に記録し,「どれ だけ減ったか」という量的な変化だけでなく、「どのようにして減ったか」という質的な変 化も詳らかにすることを目指した. in vitro の実験では設定された特定の条件下におけ る神経活動の変化を観察することが出来る.しかし、実際の生体においてどこまでその 結果が反映されるのかは未知の領域である.一方、本研究のような in vivo の実験で は条件を均一に保つことの難しさや実験動物の個体差という実験者には制御できな い要因があるものの,脳が生体という器の中でどのように機能しているのかを生体現象 を通じて解明しようとする上では非常に重要な手法であるといえる. 実験2と実験3で はマウスの行動を複数のパラメーターから分析し、検討することで、CTA 想起時に CS 摂取を避ける行動, すなわち生体にとって危険とされるものから回避する行動をより詳 細に明らかにすることができた. その結果は非常に興味深いものであり, 様々な側面 から生体行動を分析することは重要であると考える.

実験2で微細行動分析システムを用いることで,BNSTの神経活動抑制は高頻度 Lick (burst)のサイズを小さくし,CSの摂取を躊躇する行動を増大させ,CS摂取量が 減少することを明らかにした.このことは,CS摂取量の減少がCSに対する嫌悪と恐 怖の増強によってもたらされることを示している.一方,実験3においてBNST尾側部 の神経活動を促進させた場合では,CS摂取量が減少する傾向がみとめられた.この とき最初のLickまでの潜時が増大し,Entryの頻度が減少したことから,接近動機づ けが減弱した結果,CS摂取量が減少したと考えられる.雌・雄マウスのPBNから BNSTに投射するニューロンにhM3Dg受容体を発現させ,人工リガンドで活性化さ

せると雌マウスでは摂餌までの潜時が増大することが報告されている(Jaramillo et al., 2020). また, 小胞体 GABA トランスポーター (VGAT)を発現する BNST ニューロンを hM3Dq 受容体を介して活性化させると不安様行動が増加することも明らかとなってい る(Mazzone et al., 2018). 本研究では BNST のニューロンに非特異的に hM3Dg 受 容体を発現させ,神経活動の促進によって接近動機づけが抑制されるという同様の傾 向がみとめられた. 塩化リチウムや 2,4,5-トリメチル-3-チアゾリン(キツネの分泌物に含 まれる物質)の呈示により、マウスの BNST に Fos が発現することから(St Andre et al., 2007; Janitzky et al., 2015), 生体にとってネガティブな刺激が与えられた時に BNST の活動が促進すると考えられる. 本研究のように BNST ニューロンを人為的に興奮さ せた場合に、与えられた刺激を回避する行動が誘発される可能性が示唆された. 一 方, BNST 吻側部の神経活動を促進した場合には接近動機づけの変化や躊躇行動 の増加などは認められなかった. 今回は偶然的に mCherry 陽性細胞が吻側部に分 布していなかった個体が存在したために吻側群と尾側群に分けて解析を行なったが、 結果的に BNST の吻側部と尾側部では CTA の想起に関する役割が異なる可能性が 示唆された.この可能性は下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(pituitary adenylate cyclase-activating peptide, PACAP)をラットの BNST 吻側部と尾側部に注入 した際の体重変化を検討した報告(Kocho-Schellenberg et al., 2014)によっても示唆さ れる.この研究では吻側部に注入した場合では体重の変化がみられず,尾側部に注 入した個体では体重減少が認められた.本研究の実験3で吻側部にmCherry陽性 細胞が分布した個体は4個体のみであったためBNSTの吻側部と尾側部の役割の 違いについて論じることは時期尚早であるが、今後個体数を増やしデータを増やし検 討していくとともに、吻側部のみあるいは尾側部のみにアデノ随伴ウィルスを注入し、 それぞれの神経活動を制御した場合の行動変化を調べる実験を行う価値があると考 えている.

実験3においてBNSTの神経活動を促進させた個体の中にはEntry-Lickの頻度 が0であった個体が存在した.これらの個体はCSを全くLickしなかったため,CSの 味を確認した上で摂取をやめたのではなく,CSへの接近行動自体が減少し,その結 果としてCS摂取量が減少したと考えられる.先行研究において,マウスのBNSTの 神経活動を抑制すると嫌悪刺激に対する回避行動の発現が抑制され,神経活動を促 進させると回避行動が増加することが示されている(Guerra et al., 2022).本研究の実 験2において,BNSTの神経活動抑制は接近動機づけを変化させなかった.このこと は,CSへ接近することに対する恐怖が減弱し,回避反応が起こらなかった可能性を示 唆している.しかし同時に,burstのサイズが小さくなったことから分かるようにCSの味 に対する嫌悪が増強されていたためにCSの摂取は抑えられた.結果として,恐怖の 減弱と嫌悪の増強が拮抗し,Entry-Stopの発生確率が上昇するという結果を招いたと 推察される.

以上の結果をまとめると、BNST の神経活動を促進させた場合には CS へ接近す ることへの恐怖(contextual fear)が増強され、反対に抑制した場合には contextual fear は減弱するものの、CS の味に対する嫌悪(taste aversion)が増強されることが示唆され た.

本研究では人工リガンドとして CNO と DCZ を使用した.実験1では CNO 投与に より CS 摂取量が減少することを明らかにした.また,実験2において実験群の総 Lick 数が減少したことから, DCZ 投与によって CS 摂取が抑えられたことが明らかとな った. CNO は最も広く用いられている人工リガンドであるものの,血液脳関門を通過し にくく,代謝産物であるクロザピンが作用している可能性も示唆されている.一方で DCZ は血液脳関門を通過しやすく低用量で作用することが出来るものの,新規の薬 剤であり,齧歯類の行動実験に用いた例は少ない.本研究において, CNO と DCZ の いずれを投与した場合でも CTA 想起時の CS 摂取量が減少し,同様の実験結果が 得られたことから, DCZ も人工リガンドとして有用であることが示された.

本研究では、摂食障害に注目し、摂取行動の抑制が観察されるという点で共通点が ある味覚嫌悪学習を実験モデルとして用いた. BNST が不安や恐怖に深く関与するこ とから、その神経活動を、化学遺伝学的手法を用いて制御した場合の行動変化を観 察した. BNST の亜核の一つである背外側部は雌の方が大きく、そこに含まれる CRF ニューロンが多いという報告(Uchida et al., 2019)から、BNST の機能に雌雄差がある のかもしれない. 本研究では雄マウスを対象として行なったが、雌マウスを対象とした 場合、CS に対する行動表出の雌雄差が生じる可能性があると予想している. 摂食障 害の患者の多くは女性であることから、雌マウスを用いた実験を行うことで BNST の機 能における性差を明らかにする研究に取り組むことも重要だと考える. 第6章 結論

CTA の想起における BNST ニューロンの役割を明らかにするために,神経活動の制御が行動の表出におよぼす影響について検証した.

BNST の神経活動を抑制すると、CTA 想起時における CS(甘味溶液)の摂取量が 減少することがわかった.また、甘味溶液を好んで摂取する naïve な(CTA を獲得して いない)マウスにおいても摂取量が減少することがわかった.これらの結果から、BNST ニューロンは甘味情報の処理に関わり、好ましいか否かに関わらず、その摂取を調節 していることが示された.

BNST の神経活動抑制によるマウスの行動の変化の詳細を微細行動分析システム によって調べたところ, CS の味に対する嫌悪が増大することで摂取量が減少すること が明らかとなった. さらに, BNST の神経活動を促進すると, CS へ接近することへの恐 怖の増強により, 摂取量が減少することが示された.

以上のことから, BNST ニューロンは甘味溶液摂取行動に関与し, CTA の想起に おける嫌悪や恐怖の表出に重要な役割を担っていることが示唆された.

- Alden M, Besson JM, Bernard JF (1994) Organization of the efferent projec tions from the pontine parabrachial area to the bed nucleus of the str ia terminalis and neighboring regions: a PHA-L study in the rat. J C omp Neurol 341:289–314 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.90 3410302.
- Bachmanov AA, Inoue M, Ji H, Murata Y, Tordoff MG, Beauchamp GK (2 009) Glutamate taste and appetite in laboratory mice: physiologic and genetic analyses. Am J Clin Nutr 90:756S-763S Available at: http://d x.doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462L.
- Berridge K, Grill HJ, Norgren R (1981) Relation of consummatory response s and preabsorptive insulin release to palatability and learned taste av ersions. J Comp Physiol Psychol 95:363–382 Available at: http://dx.do i.org/10.1037/h0077782.
- Brownson EA, Brinton RD, Chambers KC (2002) Vasopressin content in sel ect brain regions during extinction of a conditioned taste aversion. Br ain Res Bull 59:125–134 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0361-9230(02)00861-4.
- Buresová O, Aleksanyan ZA, Bures J (1979) Electrophysiological analysis of retrieval of conditioned taste aversion in rats. Unit activity changes i n critical brain regions. Physiol Bohemoslov 28:525–536 Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/160574.

- Chen JY, Campos CA, Jarvie BC, Palmiter RD (2018) Parabrachial CGRP
  Neurons Establish and Sustain Aversive Taste Memories. Neuron 100:
  891-899.e5 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.032.
- Cho YK, Li C-S (2008) Gustatory neural circuitry in the hamster brain ste m. J Neurophysiol 100:1007–1019 Available at: http://dx.doi.org/10.11 52/jn.01364.2007.
- Cho YK, Li C-S, Smith DV (2002) Gustatory projections from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nuclei in the hamster. Chem Senses 27:81–90 Available at: http://dx.doi.org/10.1093/chemse/27.1.81.
- Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP (2007) Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for t he integration of limbic inputs. J Neurosci 27:2025–2034 Available a t: http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007.
- Companion MA, Thiele TE (2018) Assessment of ventral tegmental area-proj ecting GABAergic neurons from the bed nucleus of the stria terminal is in modulating binge-like ethanol intake. Eur J Neurosci 48:3335–33 43 Available at: http://dx.doi.org/10.1111/ejn.14222.
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C (2010) Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. Neuropsychopharmacology 35:105–135 Available at: http://dx.doi.org/1 0.1038/npp.2009.109.

- De Olmos J, Alheid GF, Beltramino CA (1985) Amygdala. The Rat nervous system: Forebrain and midbrain:223–334.
- Dong HW, Petrovich GD, Watts AG, Swanson LW (2001) Basic organizatio n of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. J Comp Neurol 436:430–455 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.1079.
- Dong H-W, Swanson LW (2003) Projections from the rhomboid nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis: implications for cerebral hemisp here regulation of ingestive behaviors. J Comp Neurol 463:434–472 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.10758.
- Dong H-W, Swanson LW (2004a) Organization of axonal projections from t he anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. J Comp Neurol 468:277–298 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.10949.
- Dong H-W, Swanson LW (2004b) Projections from bed nuclei of the stria t erminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regu lation of defensive and reproductive behaviors. J Comp Neurol 471:3 96–433 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.20002.
- Edakubo S, Fushimi K (2020) Mortality and risk assessment for anorexia ne rvosa in acute-care hospitals: a nationwide administrative database ana lysis. BMC Psychiatry 20:19 Available at: http://dx.doi.org/10.1186/s12 888-020-2433-8.

- Fenu S, Bassareo V, Di Chiara G (2001) A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learnin g. J Neurosci 21:6897–6904 Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov /pubmed/11517277.
- Gallo M, Roldan G, Bures J (1992) Differential involvement of gustatory in sular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditio ned taste aversion in rats. Behav Brain Res 52:91–97 Available at: ht tp://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80328-6.
- Glendinning JI, Gresack J, Spector AC (2002) A high-throughput screening procedure for identifying mice with aberrant taste and oromotor functi on. Chem Senses 27:461–474 Available at: http://dx.doi.org/10.1093/ch emse/27.5.461.
- Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Sysa-Shah P, Rodrigu ez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M (2017) Chemogenetics revealed: DREADD o ccupancy and activation via converted clozapine. Science 357:503–507 Available at: http://dx.doi.org/10.1126/science.aan2475.
- Guerra DP, Wang W, de Souza KA, Moscarello JM (2022) The bed nucleu s of the stria terminalis mediates the expression of proactive defensiv e behavior. bioRxiv:2022.08.16.504160 Available at: https://www.biorxi v.org/content/10.1101/2022.08.16.504160 [Accessed November 22, 202 2].

- Hajnal A, Norgren R (2001) Accumbens dopamine mechanisms in sucrose i ntake. Brain Res 904:76–84 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s00 06-8993(01)02451-9.
- Hajnal A, Norgren R (2002) Repeated access to sucrose augments dopamine turnover in the nucleus accumbens. Neuroreport 13:2213–2216 Availa ble at: http://dx.doi.org/10.1097/00001756-200212030-00010.
- Hotta M, Horikawa R, Mabe H, Yokoyama S, Sugiyama E, Yonekawa T, N akazato M, Okamoto Y, Ohara C, Ogawa Y (2015) Epidemiology of anorexia nervosa in Japanese adolescents. Biopsychosoc Med 9:17 Av ailable at: http://dx.doi.org/10.1186/s13030-015-0044-2.
- Inui T, Inui-Yamamoto C, Yoshioka Y, Ohzawa I, Shimura T (2011) Activa tion of projective neurons from the nucleus accumbens to ventral pall idum by a learned aversive taste stimulus in rats: a manganese-enhan ced magnetic resonance imaging study. Neuroscience 177:66–73 Avail able at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.006.
- Inui T, Inui-Yamamoto C, Yoshioka Y, Ohzawa I, Shimura T (2013) Activa tion of efferents from the basolateral amygdala during the retrieval of conditioned taste aversion. Neurobiol Learn Mem 106:210–220 Avail able at: http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.09.003.
- Inui T, Shimura T, Yamamoto T (2007) The role of the ventral pallidum G ABAergic system in conditioned taste aversion: effects of microinjecti ons of a GABAA receptor antagonist on taste palatability of a condit

ioned stimulus. Brain Res 1164:117–124 Available at: http://dx.doi.org /10.1016/j.brainres.2007.06.031.

- Inui T, Sugishita T, Inui-Yamamoto C, Yasoshima Y, Shimura T (2019) Th e Basolateral Nucleus of the Amygdala Executes the Parallel Processe s of Avoidance and Palatability in the Retrieval of Conditioned Taste Aversion in Male Rats. eNeuro 6 Available at: http://dx.doi.org/10.152 3/ENEURO.0004-19.2019.
- Inui T, Yamamoto T, Shimura T (2009) GABAergic transmission in the rat ventral pallidum mediates a saccharin palatability shift in conditioned taste aversion. Eur J Neurosci 30:110–115 Available at: http://dx.doi.o rg/10.1111/j.1460-9568.2009.06800.x.
- Janitzky K, D'Hanis W, Kröber A, Schwegler H (2015) TMT predator odor activated neural circuit in C57BL/6J mice indicates TMT-stress as a s uitable model for uncontrollable intense stress. Brain Res 1599:1–8 A vailable at: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.030.
- Jaramillo AA, Williford KM, Marshall C, Winder DG, Centanni SW (2020) BNST transient activity associates with approach behavior in a stressf ul environment and is modulated by the parabrachial nucleus. Neurobi ol Stress 13:100247 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ynstr.2020. 100247.
- Ju G, Swanson LW (1989) Studies on the cellular architecture of the bed n uclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. J Comp N

eurol 280:587–602 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.90280040 9.

- Ju G, Swanson LW, Simerly RB (1989) Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: II. Chemoarchitect ure. J Comp Neurol 280:603–621 Available at: http://dx.doi.org/10.100 2/cne.902800410.
- Kang Y, Lundy RF (2009) Terminal field specificity of forebrain efferent ax ons to brainstem gustatory nuclei. Brain Res 1248:76–85 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.10.075.
- Karimnamazi H, Travers SP, Travers JB (2002) Oral and gastric input to th e parabrachial nucleus of the rat. Brain Res 957:193–206 Available a t: http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03438-8.
- Kocho-Schellenberg M, Lezak KR, Harris OM, Roelke E, Gick N, Choi I, Edwards S, Wasserman E, Toufexis DJ, Braas KM, May V, Hammac k SE (2014) PACAP in the BNST produces anorexia and weight loss in male and female rats. Neuropsychopharmacology 39:1614–1623 A vailable at: http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.8.
- Kudo T, Konno K, Uchigashima M, Yanagawa Y, Sora I, Minami M, Wata nabe M (2014) GABAergic neurons in the ventral tegmental area rec eive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed n ucleus of the stria terminalis. Eur J Neurosci 39:1796–1809 Available at: http://dx.doi.org/10.1111/ejn.12503.

- Kudo T, Uchigashima M, Miyazaki T, Konno K, Yamasaki M, Yanagawa Y, Minami M, Watanabe M (2012) Three types of neurochemical pro jection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral teg mental area in adult mice. J Neurosci 32:18035–18046 Available at: http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4057-12.2012.
- Lee S, Augustine V, Zhao Y, Ebisu H, Ho B, Kong D, Oka Y (2019) Che mosensory modulation of neural circuits for sodium appetite. Nature 5 68:93–97 Available at: http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1053-2.
- Li C-S, Cho YK (2006) Efferent projection from the bed nucleus of the stri a terminalis suppresses activity of taste-responsive neurons in the ham ster parabrachial nuclei. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 29 1:R914-26 Available at: http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00750.2005.
- Luskin AT, Bhatti DL, Mulvey B, Pedersen CE, Girven KS, Oden-Brunson H, Kimbell K, Blackburn T, Sawyer A, Gereau RW 4th, Dougherty J D, Bruchas MR (2021) Extended amygdala-parabrachial circuits alter t hreat assessment and regulate feeding. Sci Adv 7 Available at: http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abd3666.
- Magableh A, Lundy R (2014) Somatostatin and corticotrophin releasing hor mone cell types are a major source of descending input from the for ebrain to the parabrachial nucleus in mice. Chem Senses 39:673–682 Available at: http://dx.doi.org/10.1093/chemse/bju038.

- Mark GP, Blander DS, Hoebel BG (1991) A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the developmen t of a learned taste aversion. Brain Res 551:308–310 Available at: htt p://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(91)90946-s.
- Mark GP, Weinberg JB, Rada PV, Hoebel BG (1995) Extracellular acetylch oline is increased in the nucleus accumbens following the presentatio n of an aversively conditioned taste stimulus. Brain Res 688:184–188 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(95)00401-b.
- Martínez-Hernández J, Lanuza E, Martínez-García F (2006) Selective dopami nergic lesions of the ventral tegmental area impair preference for sucr ose but not for male sexual pheromones in female mice. Eur J Neur osci 24:885–893 Available at: http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.200 6.04944.x.
- Matsuda T, Hiyama TY, 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. Nat Neuro sci 20:230–241 Available at: http://dx.doi.org/10.1038/nn.4463.
- Matsumura S, Miyakita M, Miyamori H, Kyo S, Shima D, Yokokawa T, Is
  hikawa F, Sasaki T, Jinno T, Tanaka J, Goto T, Momma K, Ishihara
  K, Berdeaux R, Inoue K (2022) Stimulation of Gs signaling in MC
  4R cells by DREADD increases energy expenditure, suppresses food i
  ntake, and increases locomotor activity in mice. Am J Physiol Endocr

inol Metab 322:E436–E445 Available at: http://dx.doi.org/10.1152/ajpe ndo.00439.2021.

- Mazzone CM, Pati D, Michaelides M, DiBerto J, Fox JH, Tipton G, Anders on C, Duffy K, McKlveen JM, Hardaway JA, Magness ST, Falls W
  A, Hammack SE, McElligott ZA, Hurd YL, Kash TL (2018) Acute e ngagement of Gq-mediated signaling in the bed nucleus of the stria t erminalis induces anxiety-like behavior. Mol Psychiatry 23:143–153 A vailable at: http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.218.
- Misslin R, Cigrang M (1986) Does neophobia necessarily imply fear or anxi ety? Behav Processes 12:45–50 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/ 0376-6357(86)90069-0.
- Mungarndee SS, Lundy RF Jr, Norgren R (2008) Expression of Fos during sham sucrose intake in rats with central gustatory lesions. Am J Phys iol Regul Integr Comp Physiol 295:R751-63 Available at: http://dx.do i.org/10.1152/ajpregu.90344.2008.
- Myers EA, Banihashemi L, Rinaman L (2005) The anxiogenic drug yohimbi ne activates central viscerosensory circuits in rats. J Comp Neurol 49 2:426–441 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.20727.
- Nagai Y et al. (2020) Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenet ic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys. Nat Neurosci 23:1157–1167 Available at: http://dx.doi. org/10.1038/s41593-020-0661-3.

- Navarro M, Spray KJ, Cubero I, Thiele TE, Bernstein IL (2000) cFos induc tion during conditioned taste aversion expression varies with aversion strength. Brain Res 887:450–453 Available at: http://dx.doi.org/10.1016 /s0006-8993(00)03032-8.
- Nguyen AQ, Dela Cruz JAD, Sun Y, Holmes TC, Xu X (2016) Genetic cel l targeting uncovers specific neuronal types and distinct subregions in the bed nucleus of the stria terminalis. J Comp Neurol 524:2379–239
  9 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.23954.
- Norgren R (1976) Taste pathways to hypothalamus and amygdala. J Comp Neurol 166:17–30 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/cne.90166010 3.
- O'Hara CB, Campbell IC, Schmidt U (2015) A reward-centred model of an orexia nervosa: a focussed narrative review of the neurological and p sychophysiological literature. Neurosci Biobehav Rev 52:131–152 Avai lable at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.02.012.
- Panguluri S, Saggu S, Lundy R (2009) Comparison of somatostatin and cort icotrophin-releasing hormone immunoreactivity in forebrain neurons pr ojecting to taste-responsive and non-responsive regions of the parabra chial nucleus in rat. Brain Res 1298:57–69 Available at: http://dx.doi. org/10.1016/j.brainres.2009.08.038.

- Parker LA (2003) Taste avoidance and taste aversion: evidence for two diffe rent processes. Learn Behav 31:165–172 Available at: http://dx.doi.org /10.3758/bf03195979.
- Roldan G, Bures J (1994) Tetrodotoxin blockade of amygdala overlapping w ith poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats.
  Behav Brain Res 65:213–219 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/01 66-4328(94)90107-4.
- Roman C, Nebieridze N, Sastre A, Reilly S (2006) Effects of lesions of the bed nucleus of the stria terminalis, lateral hypothalamus, or insular c ortex on conditioned taste aversion and conditioned odor aversion. Be hav Neurosci 120:1257–1267 Available at: http://dx.doi.org/10.1037/07 35-7044.120.6.1257.
- Saggu S, Lundy RF (2008) Forebrain neurons that project to the gustatory p arabrachial nucleus in rat lack glutamic acid decarboxylase. Am J Ph ysiol Regul Integr Comp Physiol 294:R52-7 Available at: http://dx.do i.org/10.1152/ajpregu.00635.2007.
- Sakai N, Yamamoto T (1997) Conditioned taste aversion and c-fos expressio n in the rat brainstem after administration of various USs. Neurorepor t 8:2215–2220 Available at: http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199707 070-00025.
- Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2002) The need to feed: homeostatic an d hedonic control of eating. Neuron 36:199–211 Available at: http://d x.doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00969-8.
- Shibata R, Kameishi M, Kondoh T, Torii K (2009) Bilateral dopaminergic 1 esions in the ventral tegmental area of rats influence sucrose intake, but not umami and amino acid intake. Physiol Behav 96:667–674 Av ailable at: http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.01.002.
- Shimada S, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, Toh yama M (1985) Calcitonin gene-related peptidergic projection from th e parabrachial area to the forebrain and diencephalon in the rat: an i mmunohistochemical analysis. Neuroscience 16:607–616 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(85)90195-2.
- Shimura T, Imaoka H, Yamamoto T (2006) Neurochemical modulation of in gestive behavior in the ventral pallidum. Eur J Neurosci 23:1596–160
  4 Available at: http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04689.x.
- Shimura T, Kamada Y, Yamamoto T (2002) Ventral tegmental lesions reduc e overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. Behav Br ain Res 134:123–130 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328 (01)00461-2.
- Shimura T, Tanaka H, Yamamoto T (1997) Salient responsiveness of parabr achial neurons to the conditioned stimulus after the acquisition of tast

e aversion learning in rats. Neuroscience 81:239–247 Available at: htt p://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00188-7.

- Smith DV, Ye M-K, Li C-S (2005) Medullary taste responses are modulated by the bed nucleus of the stria terminalis. Chem Senses 30:421–434 Available at: http://dx.doi.org/10.1093/chemse/bji037.
- St Andre J, Albanos K, Reilly S (2007) C-fos expression in the rat brain fo llowing lithium chloride-induced illness. Brain Res 1135:122–128 Ava ilable at: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.010.
- Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD (1989) Ascending pr ojections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phas eolus vulgaris lectin tracing study in the rat. Neuroscience 31:785–79 7 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(89)90441-7.
- Tokita K, Shimura T, Nakamura S, Inoue T, Yamamoto T (2007) Involvem ent of forebrain in parabrachial neuronal activation induced by aversiv ely conditioned taste stimuli in the rat. Brain Res 1141:188–196 Avai lable at: http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.023.
- Tordoff MG, Bachmanov AA (2002) Influence of test duration on the sensit ivity of the two-bottle choice test. Chem Senses 27:759–768 Availabl e at: http://dx.doi.org/10.1093/chemse/27.9.759.
- Travers SP, Hu H (2000) Extranuclear projections of rNST neurons expressi ng gustatory-elicited Fos. J Comp Neurol 427:124–138 Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042595.

- Tucci S, Rada P, Hernandez L (1998) Role of glutamate in the amygdala a nd lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. Brain Res 813: 44–49 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00884-1.
- Uchida K, Otsuka H, Morishita M, Tsukahara S, Sato T, Sakimura K, Itoi K (2019) Female-biased sexual dimorphism of corticotropin-releasing f actor neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. Biol Sex Dif fer 10:6 Available at: http://dx.doi.org/10.1186/s13293-019-0221-2.
- van Zessen R, Phillips JL, Budygin EA, Stuber GD (2012) Activation of V TA GABA neurons disrupts reward consumption. Neuron 73:1184–11
  94 Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.016.
- Whitehead MC, Bergula A, Holliday K (2000) Forebrain projections to the r ostral nucleus of the solitary tract in the hamster. J Comp Neurol 42 2:429–447 Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1086151 8.
- Wilksch SM, O'Shea A, Ho P, Byrne S, Wade TD (2020) The relationship between social media use and disordered eating in young adolescents. Int J Eat Disord 53:96–106 Available at: http://dx.doi.org/10.1002/ea t.23198.
- Yamamoto T, Fujimoto Y (1991) Brain mechanisms of taste aversion learnin g in the rat. Brain Res Bull 27:403–406 Available at: http://dx.doi.org /10.1016/0361-9230(91)90133-5.

- Yasoshima Y, Shimura T, Yamamoto T (1995) Single unit responses of the amygdala after conditioned taste aversion in conscious rats. Neurorepo rt 6:2424–2428 Available at: http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199511 270-00034.
- Yu X, Ba W, Zhao G, Ma Y, Harding EC, Yin L, Wang D, Li H, Zhang P, Shi Y, Yustos R, Vyssotski AL, Dong H, Franks NP, Wisden W (2021) Dysfunction of ventral tegmental area GABA neurons causes mania-like behavior. Mol Psychiatry 26:5213–5228 Available at: http://dx.doi.org/10.1038/s41380-020-0810-9.
- Zardetto-Smith AM, Beltz TG, Johnson AK (1994) Role of the central nucle us of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experi mentally-induced salt appetite. Brain Res 645:123–134 Available at: h ttp://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(94)91645-4.
- 今井祐子, 久保晃 (2019) 若年女性における体組成と栄養状態の関係. 理学 療法科学 34:259-263 Available at: http://dx.doi.org/10.1589/rika.34.25
  9.
- 渋川祥子 (2011) くらしの中での食の位置づけ. 学術の動向 16:11\_56-11\_61 Available at: http://dx.doi.org/10.5363/tits.16.11\_56.
- 濵口郁枝,安達智子,大喜多祥子,福本タミ子,前田昭子,内田勇人,北元
   憲利,奥田豊子 (2010) 大学生の食生活に対する意識と行動の関係に
   ついて.日本家政学会誌 61:13-24 Available at: http://dx.doi.org/10.11
   428/jhej.61.13.

本論文の執筆にあたり、口腔生理学教室 舩橋誠教授にはいつも丁寧な指導と適切 な助言をいただきました.深く感謝いたします.また、日々の実験に関する手技的・理 論的なサポートから論文執筆に至るまで多くの面で丁寧なご指導と助言をいただきま した、口腔生理学教室 乾賢准教授に感謝申し上げます.そして、本研究を進めるに あたりご協力いただきました歯科矯正学教室の佐藤嘉晃教授をはじめ教室員各位に 厚く御礼申し上げます.

> 2023 年 3 月 菊池 媛美