



Title	味覚嫌悪学習の想起に關与する中枢神經機序の解明
Author(s)	菊池, 媛美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15486号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15486
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89682
Type	doctoral thesis
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	
—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(渋谷, 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, 栄養機能はヒ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(濱口 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) の発達で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, 同調査によって, 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)。

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.

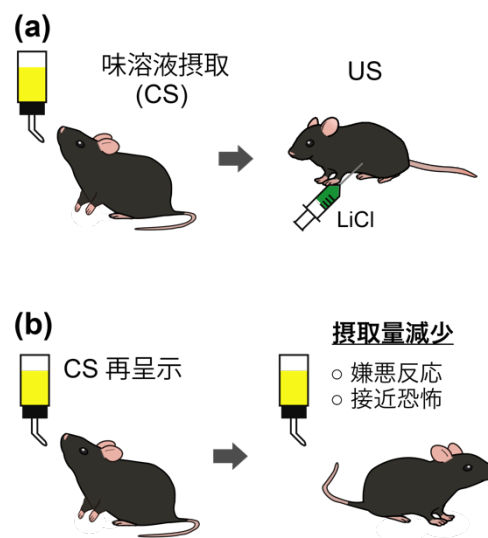


図 2 味覚嫌悪学習 (conditioned taste aversion, CTA) の獲得(a)および想起(b)の模式図

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.

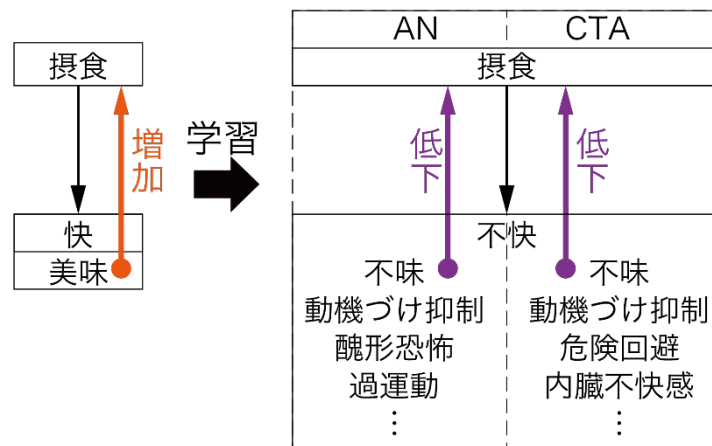


図 3 神経性食欲不振症と味覚嫌悪学習の比較

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。

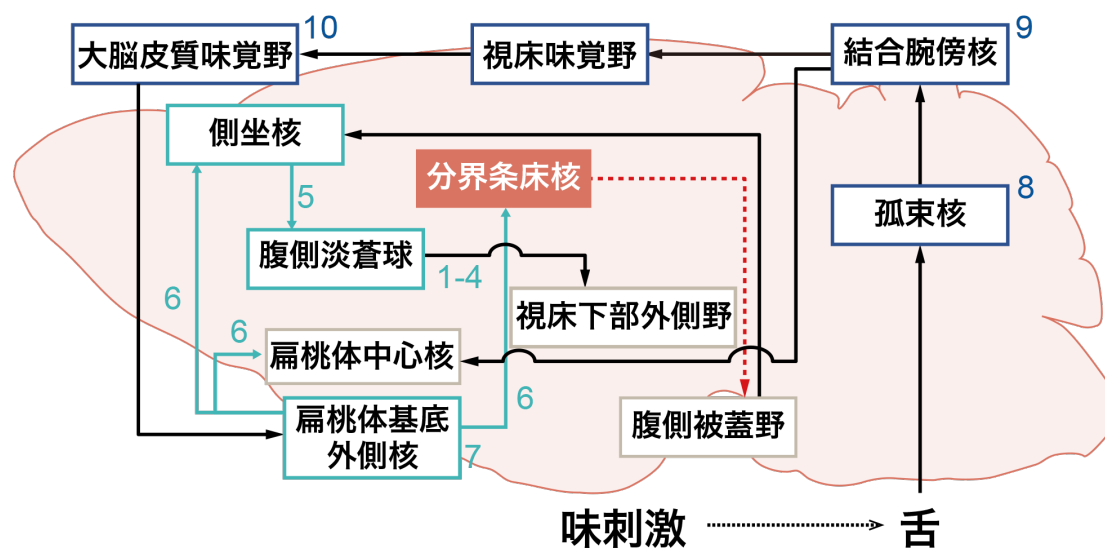


図 4 味覚嫌悪学習の想起過程の中枢神経回路

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). 電気生理学の実験によって, 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.

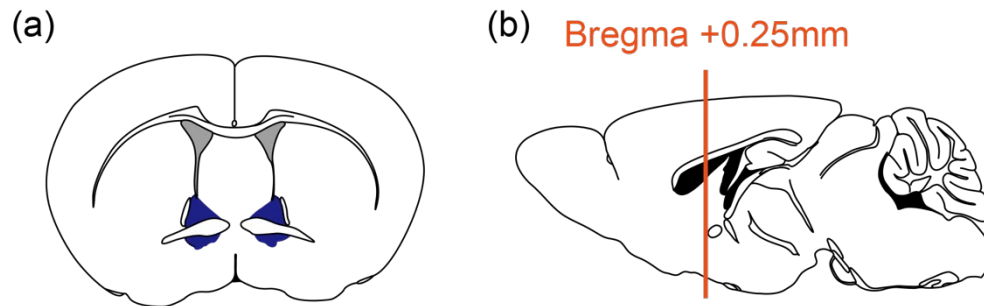


図 5 脳図譜における分界条床核の位置

(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 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 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

動物にメドミジン (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™ 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

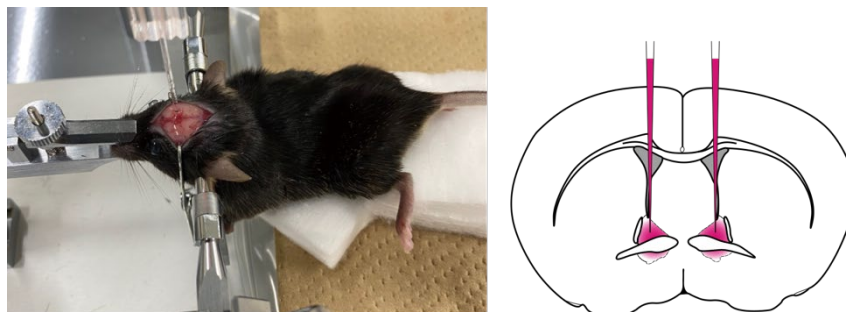


図 6 ウイルスベクター注入時の写真と冠状断の模式図

ウイルスベクターを分界条床核へ注入。

AP = +0.25mm, ML = $\pm 0.8\text{mm}$, DV = -4.1mm from the bregma

ブ (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

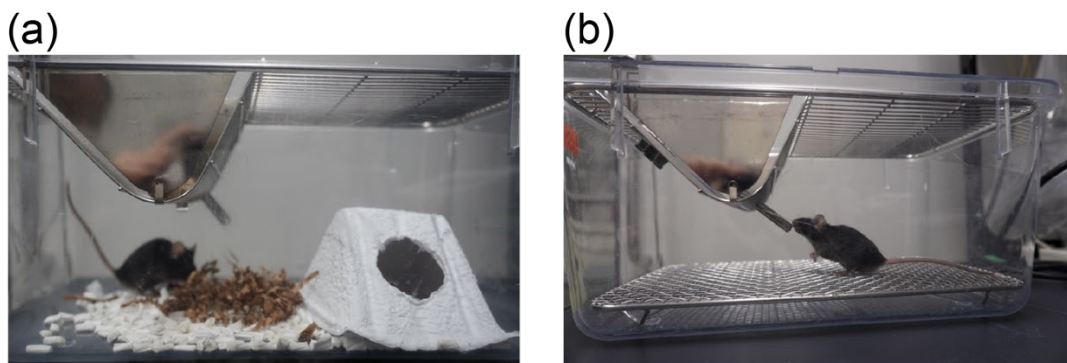


図 7 実験環境

(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ーアーマッシュ(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 0.3 M 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.

表 1. CTA 試験 実験スケジュール

Day	Trial	Treatment
2-7	トレーニング	水
8	条件づけ	0.2 % サッカリン $\xrightarrow{\text{直後}}$ 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 $\xrightarrow{30 \text{ 分後}}$ 0.2 % サッカリン
17	テスト 3	0.2 % サッカリン

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一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. 回転式マイクロームで厚さ 30 μ m 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°C 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°C 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°C 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ガラス(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. スライドガ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-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 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-Šidák 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.

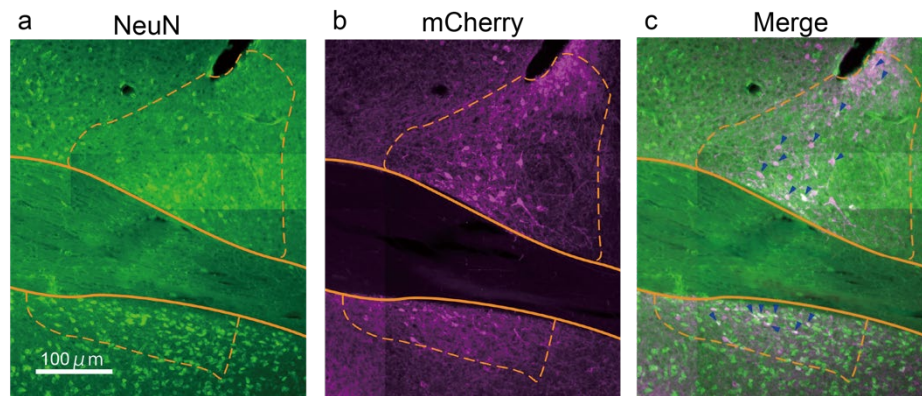


図 8 組織学的検証

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 $\pm$ 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

これらの結果から、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 ($0.062 \pm 0.032\text{g}$) は対照群 ($0.369 \pm 0.065\text{g}$) 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。

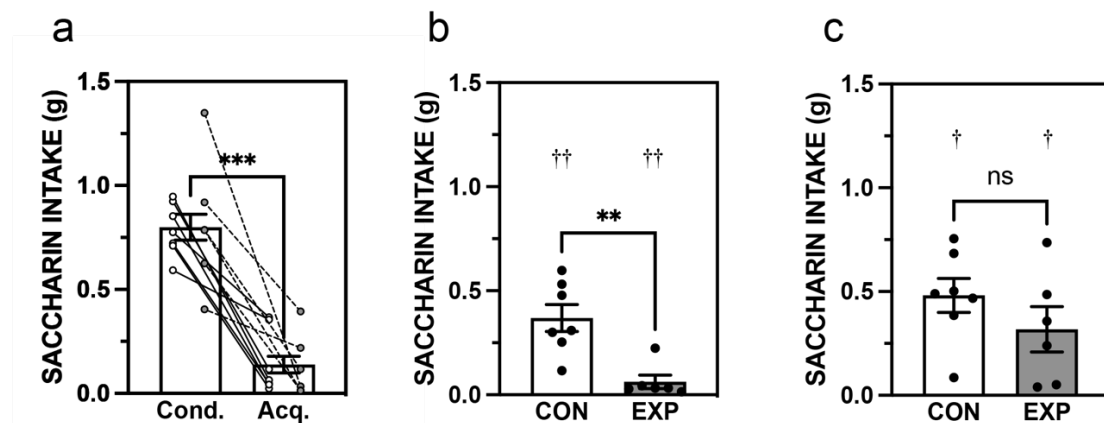


図 9 条件づけおよびテストにおけるサッカリン溶液(CS)の摂取量

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); † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ (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.

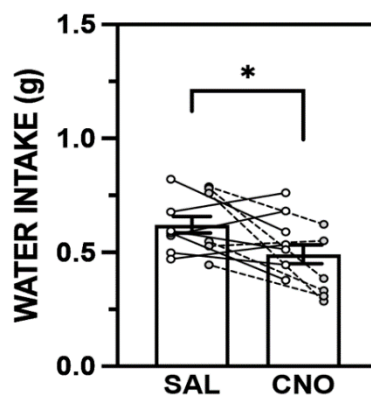


図 10. CTA 実験に使用したマウスの薬物投与後の水摂取量

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.

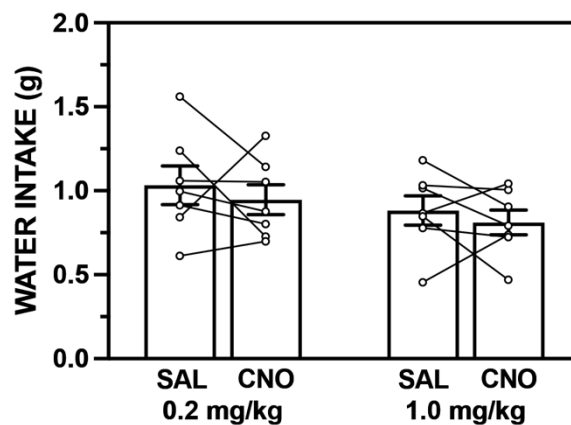


図 11. naïve な動物における薬物投与後の水摂取量

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).

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。

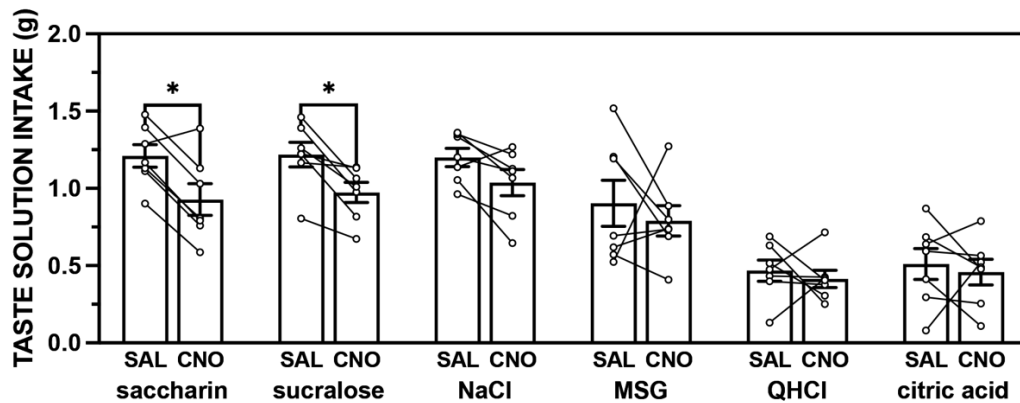


図 12. naïve な動物における薬物投与後の味溶液摂取量

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イルス (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。

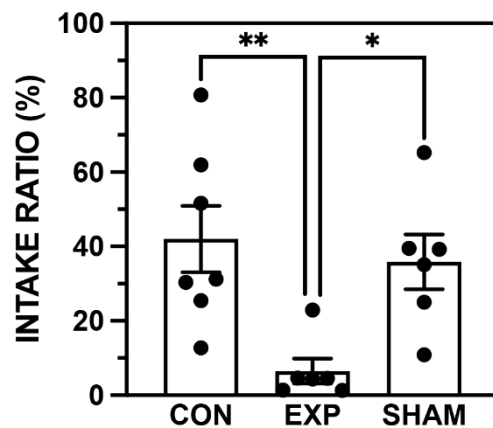


図 13. テスト 2 における摂取比率

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かと予想していた。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; Saggi and Lundy, 2008; Kang and Lundy, 2009; Magableh and Lundy, 2014)。BNST ニューロンを電氣的に刺激すると 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 γ -アミノ酪酸 (GABA) を放出する (GABA 作動性) のではなく (Saggi 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す, 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 の投与によつ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つ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つて, 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食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 の代わりに 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

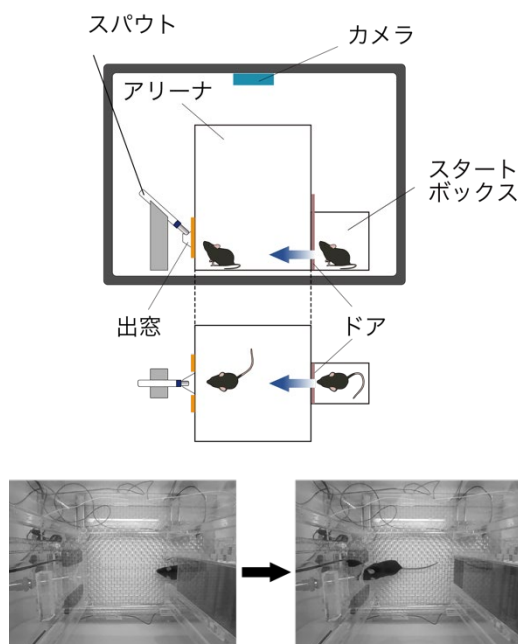


図 14. 微細行動分析システム

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ーアーマッシュ (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 17cm x 奥行き 15cm x 高さ 20cm) 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（エアロ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 0 V から 5 V へ上昇し、Lick によって接触センサーの出力電圧が 0 V から 1 V 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, ADInstruments, 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 ($50 \mu\text{g/kg}$) 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.

表 2. 実験 2 行動実験スケジュール

Day	Trial	Treatment
2-6	トレーニング	水
7	条件づけ	0.2 % サッカリン $\xrightarrow{\text{直後}}$ 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.) $\xrightarrow{\text{30 分後}}$ 0.2 % サッカリン
16	テスト 3	0.2 % サッカリン

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 ($5 \mu\text{g/kg}$) 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 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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 行動を解析した。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) を基準に解析した (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。

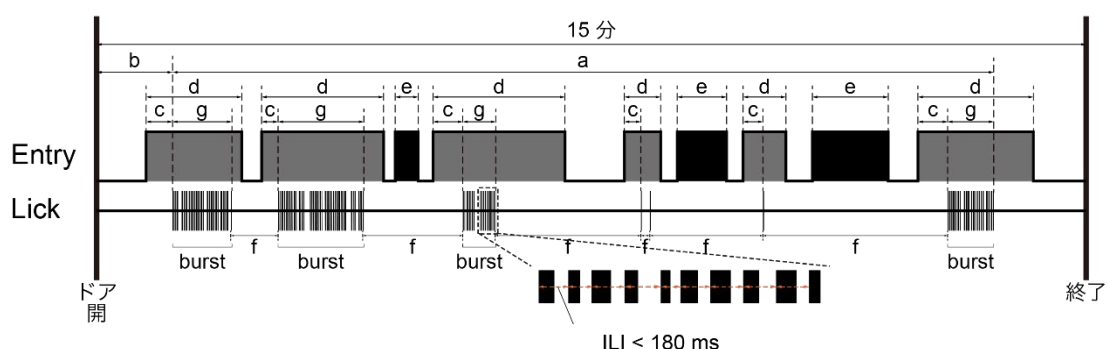


図 15. Lick 行動と接近行動 (Entry) の経時的変化

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 (inter-lick 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.

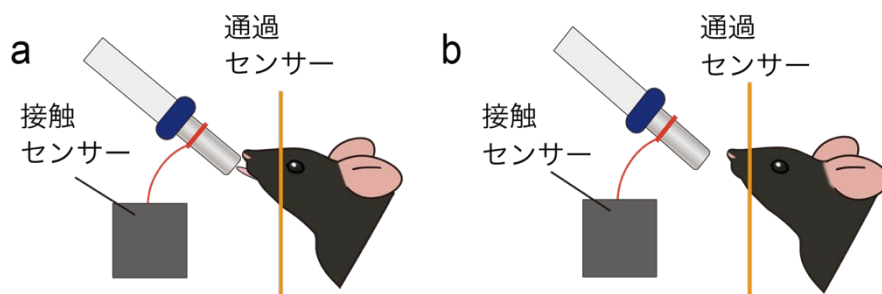


図 16. Entry の分類

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 の間に対応のある 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-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 $\mu\text{g/kg}$ DCZ 投与群, 50 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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.

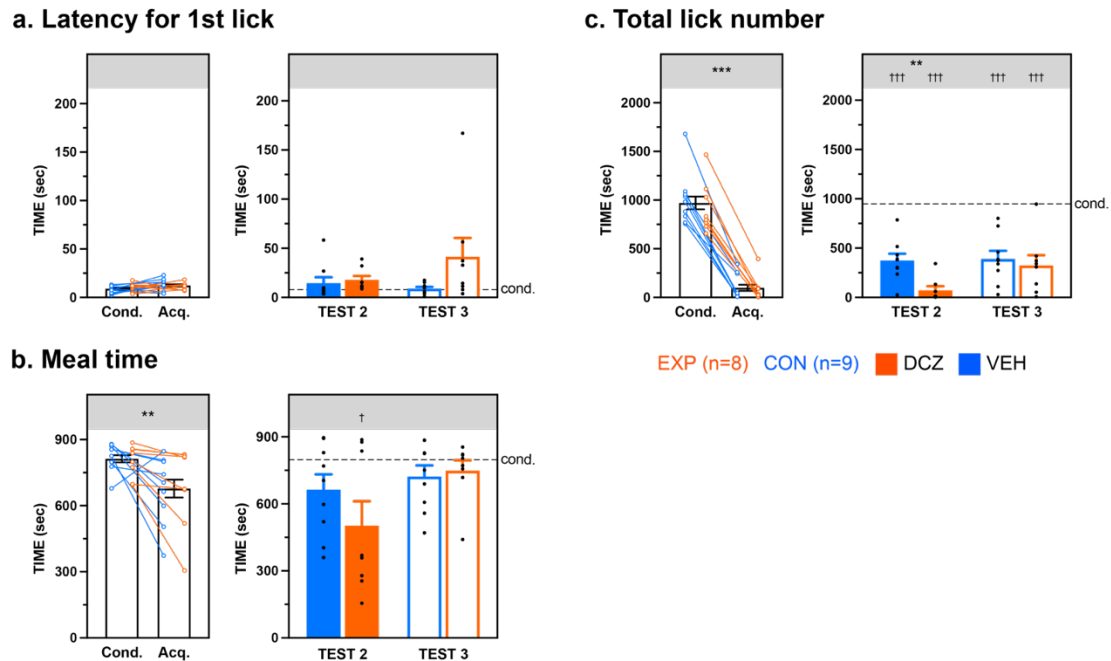


図 17. 条件刺激に対する Lick 行動の変化

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); † $p < 0.05$, ††† $p < 0.001$ (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。

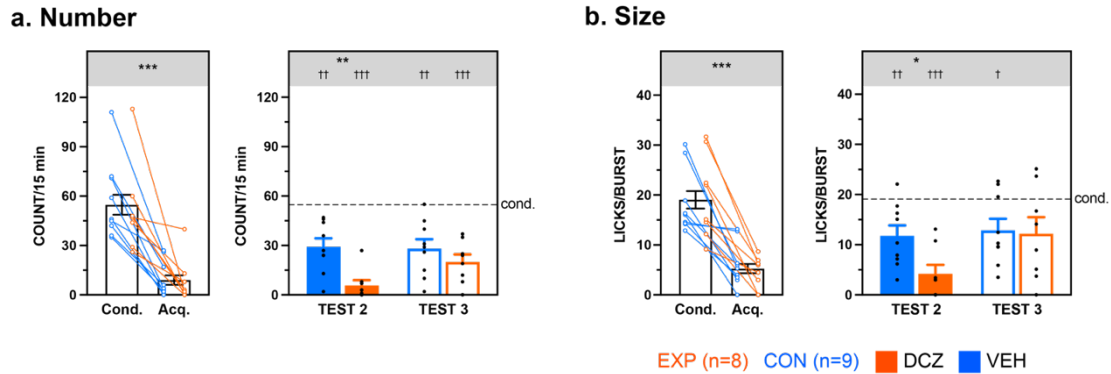


図 18. 高頻度 Lick(burst)への影響

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); † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ (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; $t[16] = 14.25, p < 0.001$)。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。

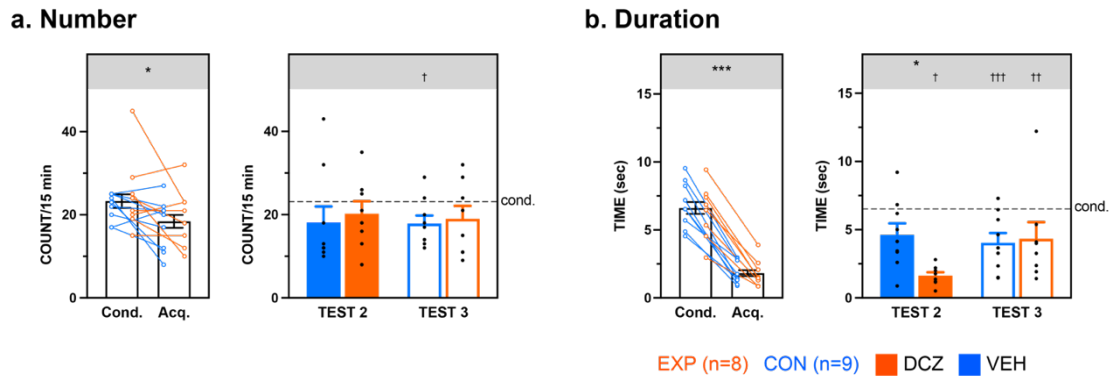


図 19. スパウトへの接近行動(Entry)への影響

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); † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ (Cond.との比較)

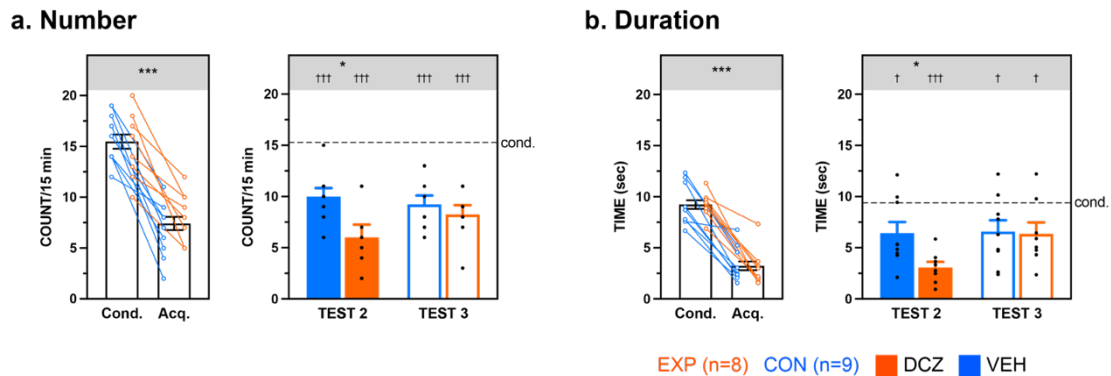


図 20. Lick 行動をともなう Entry(Entry-Lick)への影響

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); † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ (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.

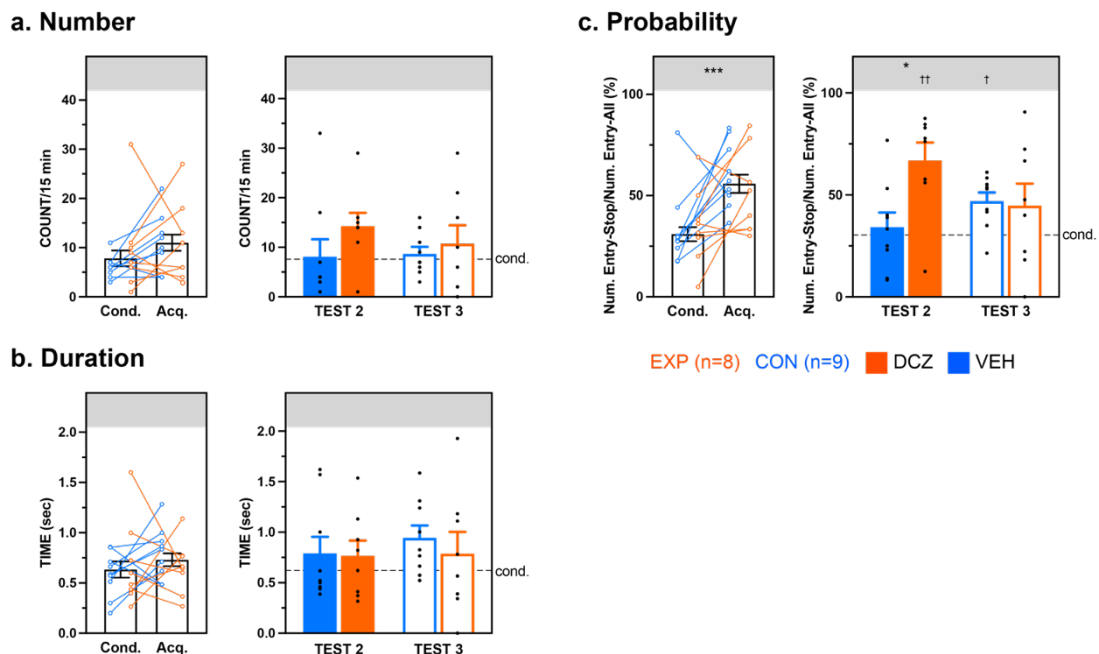


図 21. Lick 行動をともしない Entry (Entry-Stop) への影響

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); † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ (Cond.との比較)

3.2 DCZ の用量依存性検証実験 (5 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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.

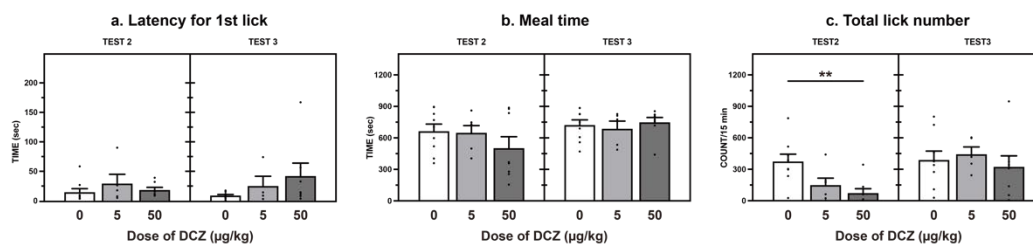
テスト 2 において 5 μg 群の最初の Lick までの潜時 (図 22a; Latency for 1st lick) は, 0 μg 群に比べて長くなる傾向にあったが群間の有意差はみとめられなかった. テスト 3 においても同様であった. 摂取時間 (図 22b; Meal time) についてはテスト 2 とテスト 3 の両方において群間差はみとめられなかった. 総 Lick 数 (図 22c; Total lick number) については 0 μg 群と 50 μg 群間においてのみ有意差がみとめられた. ($p < 0.01$).

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.

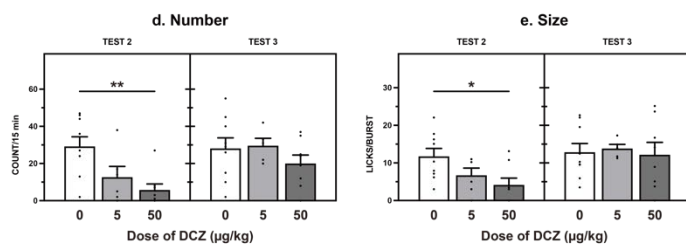
Entry の頻度 (図 22f; Number) についてはテスト 2 とテスト 3 の両方において群間差はみとめられなかった. 一方, Entry の平均持続時間 (図 22g; Duration) についてはテスト 2 において 0 μg 群と 5 μg 群との間に有意差がみとめられたが ($p < 0.05$), 0 μg 群と 50 μg 群の差のほうが大きかった ($p < 0.01$).

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.

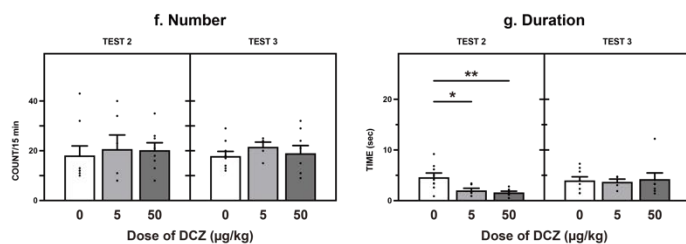
1. Lick Behavior



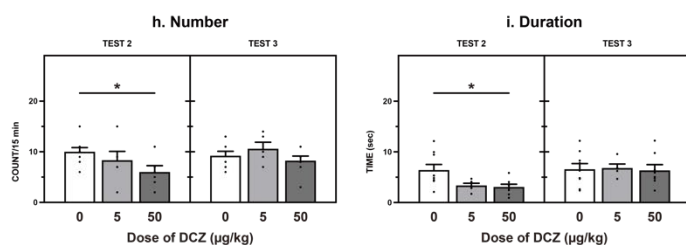
2. Burst



3. Entry



4. Entry-Lick



5. Entry-Stop

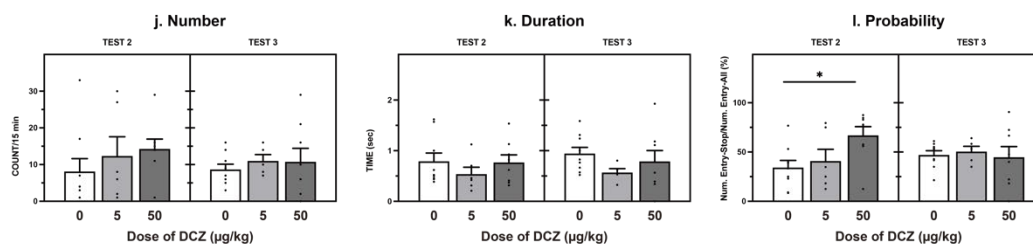


図 22. DCZ の用量依存性検証実験

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 μ g 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增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 $\mu\text{g/kg}$)の DCZ を投与すると Entry の平均持続時間が対照群(0 $\mu\text{g/kg}$)に比べて有意に短くなったが, 高用量(50 $\mu\text{g/kg}$)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事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 ら(2020)の研究では 100 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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 μ g/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 で作成したプロプログ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

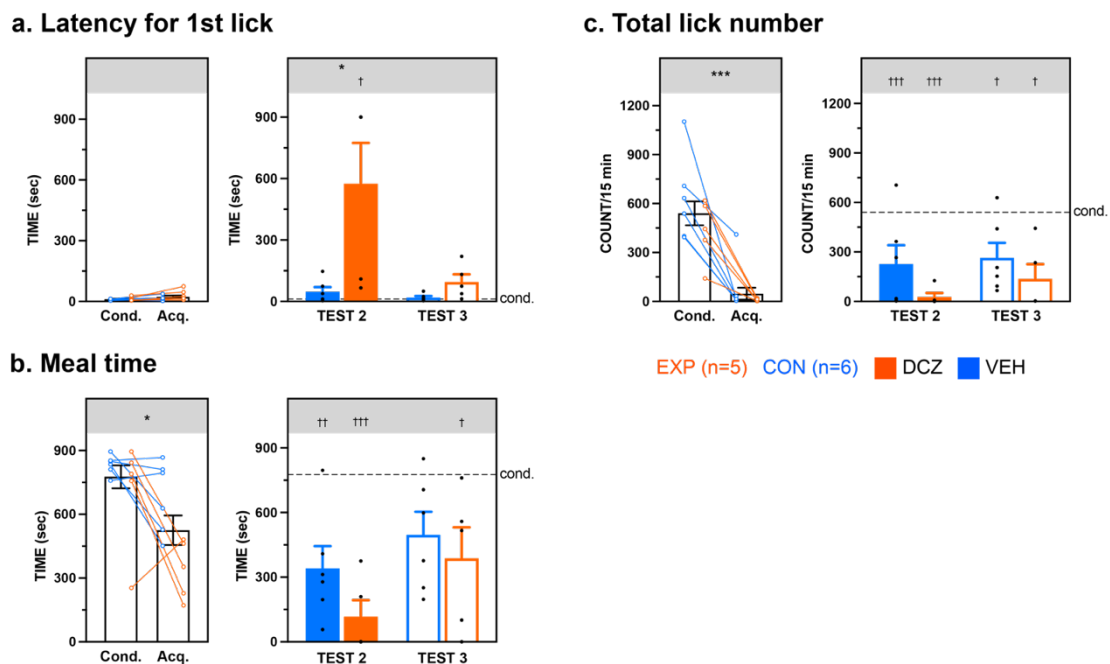


図 23. 尾側群における Lick 行動の変化

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); † $p < 0.05$, †† $p < 0.001$ (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。

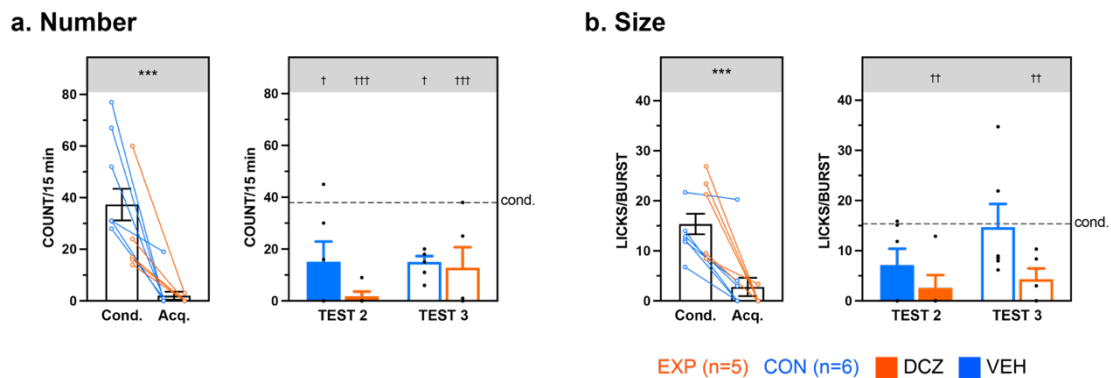


図 24. 尾側群における burst の変化

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); † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ (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).

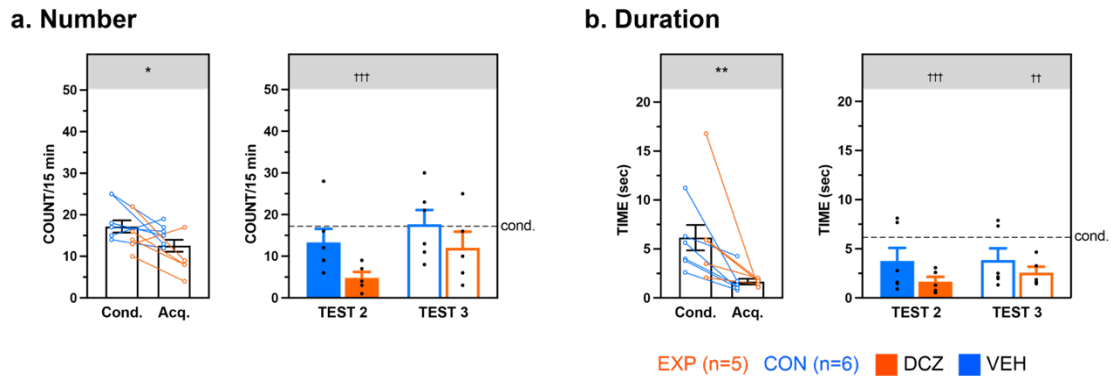


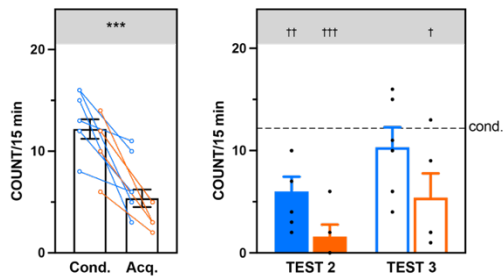
図 25. 尾側群における Entry の変化

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); † $p < 0.01$, †† $p < 0.001$ (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; $t[10] = 6.593, p < 0.001$), 平均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.

a. Number



b. Duration

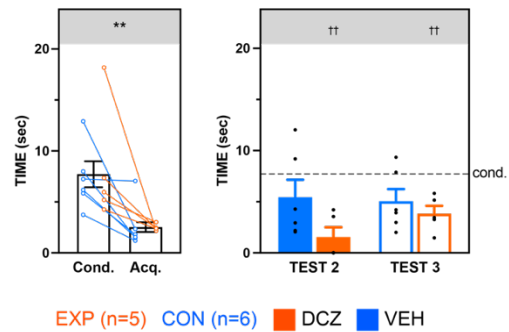
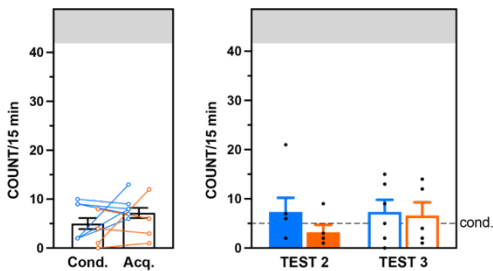


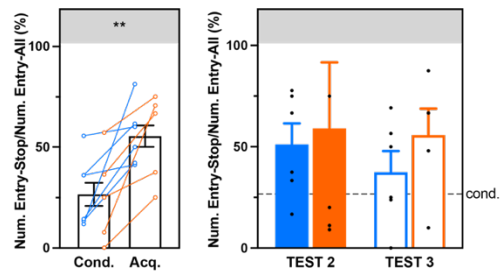
図 26. 尾側群における Entry-Lick の変化

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)

a. Number



c. Probability



b. Duration

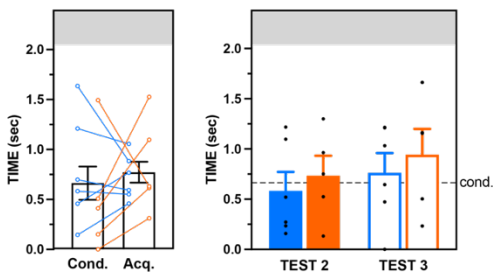


図 27. 尾側群における Entry-Stop の変化

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.

表 3 hM3Dq 注入群 (吻側) の実験結果

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

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 $54.7 \pm 14.95\%$ 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ではなく、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现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 hM3Dq 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 hM3Dq 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、回避反応が起これ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。

引用·参考文献

- Alden M, Besson JM, Bernard JF (1994) Organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the bed nucleus of the stria terminalis and neighboring regions: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 341:289–314 Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.903410302>.
- Bachmanov AA, Inoue M, Ji H, Murata Y, Tordoff MG, Beauchamp GK (2009) Glutamate taste and appetite in laboratory mice: physiologic and genetic analyses. *Am J Clin Nutr* 90:756S–763S Available at: <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462L>.
- Berridge K, Grill HJ, Norgren R (1981) Relation of consummatory responses and preabsorptive insulin release to palatability and learned taste aversions. *J Comp Physiol Psychol* 95:363–382 Available at: <http://dx.doi.org/10.1037/h0077782>.
- Brownson EA, Brinton RD, Chambers KC (2002) Vasopressin content in select brain regions during extinction of a conditioned taste aversion. *Brain Res Bull* 59:125–134 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0361-9230\(02\)00861-4](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 in 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 stem. *J Neurophysiol* 100:1007–1019 Available at: <http://dx.doi.org/10.1152/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 the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 27:2025–2034 Available at: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4301-06.2007>.
- Companion MA, Thiele TE (2018) Assessment of ventral tegmental area-projecting GABAergic neurons from the bed nucleus of the stria terminalis is in modulating binge-like ethanol intake. *Eur J Neurosci* 48:3335–3343 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/10.1038/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 organization 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 hemisphere 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 the 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 terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *J Comp Neurol* 471:396–433
Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20002>.

Edakubo S, Fushimi K (2020) Mortality and risk assessment for anorexia nervosa in acute-care hospitals: a nationwide administrative database analysis. *BMC Psychiatry* 20:19
Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s12888-020-2433-8>.

Fenu S, Bassareo V, Di Chiara G (2001) A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *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 insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* 52:91–97 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328\(05\)80328-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328(05)80328-6).

Glendinning JJ, Gresack J, Spector AC (2002) A high-throughput screening procedure for identifying mice with aberrant taste and oromotor function. *Chem Senses* 27:461–474 Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/27.5.461>.

Gomez JL, Bonaventura J, Lesniak W, Mathews WB, Syta-Shah P, Rodriguez LA, Ellis RJ, Richie CT, Harvey BK, Dannals RF, Pomper MG, Bonci A, Michaelides M (2017) Chemogenetics revealed: DREADD occupancy 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 nucleus of the stria terminalis mediates the expression of proactive defensive behavior. *bioRxiv*:2022.08.16.504160 Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.16.504160> [Accessed November 22, 2022].

- Hajnal A, Norgren R (2001) Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res* 904:76–84 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02451-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02451-9).
- Hajnal A, Norgren R (2002) Repeated access to sucrose augments dopamine turnover in the nucleus accumbens. *Neuroreport* 13:2213–2216 Available at: <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-200212030-00010>.
- Hotta M, Horikawa R, Mabe H, Yokoyama S, Sugiyama E, Yonekawa T, Nakazato M, Okamoto Y, Ohara C, Ogawa Y (2015) Epidemiology of anorexia nervosa in Japanese adolescents. *Biopsychosoc Med* 9:17 Available at: <http://dx.doi.org/10.1186/s13030-015-0044-2>.
- Inui T, Inui-Yamamoto C, Yoshioka Y, Ohzawa I, Shimura T (2011) Activation of projective neurons from the nucleus accumbens to ventral pallidum by a learned aversive taste stimulus in rats: a manganese-enhanced magnetic resonance imaging study. *Neuroscience* 177:66–73 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.006>.
- Inui T, Inui-Yamamoto C, Yoshioka Y, Ohzawa I, Shimura T (2013) Activation of efferents from the basolateral amygdala during the retrieval of conditioned taste aversion. *Neurobiol Learn Mem* 106:210–220 Available 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 GABAergic system in conditioned taste aversion: effects of microinjections 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) The Basolateral Nucleus of the Amygdala Executes the Parallel Processes of Avoidance and Palatability in the Retrieval of Conditioned Taste Aversion in Male Rats. *eNeuro* 6 Available at: <http://dx.doi.org/10.1523/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.org/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 suitable model for uncontrollable intense stress. *Brain Res* 1599:1–8 Available 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 stressful environment and is modulated by the parabrachial nucleus. *Neurobiol 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 nuclei of the stria terminalis in the rat: I. Cytoarchitecture. *J Comp Neurol*

eurol 280:587–602 Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902800409>.

Ju G, Swanson LW, Simerly RB (1989) Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: II. Chemoarchitecture. *J Comp Neurol* 280:603–621 Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.902800410>.

Kang Y, Lundy RF (2009) Terminal field specificity of forebrain efferent axons 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 the parabrachial nucleus of the rat. *Brain Res* 957:193–206 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03438-8](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, Hammack SE (2014) PACAP in the BNST produces anorexia and weight loss in male and female rats. *Neuropsychopharmacology* 39:1614–1623 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.8>.

Kudo T, Konno K, Uchigashima M, Yanagawa Y, Sora I, Minami M, Watanabe M (2014) GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus 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 projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental 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) Chemosensory modulation of neural circuits for sodium appetite. *Nature* 568:93–97 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 stria terminalis suppresses activity of taste-responsive neurons in the hamster parabrachial nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: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 JD, Bruchas MR (2021) Extended amygdala-parabrachial circuits alter threat 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 hormone cell types are a major source of descending input from the forebrain 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 development of a learned taste aversion. *Brain Res* 551:308–310 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90946-s](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(91)90946-s).

Mark GP, Weinberg JB, Rada PV, Hoebel BG (1995) Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus. *Brain Res* 688:184–188 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00401-b](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(95)00401-b).

Martínez-Hernández J, Lanuza E, Martínez-García F (2006) Selective dopaminergic lesions of the ventral tegmental area impair preference for sucrose but not for male sexual pheromones in female mice. *Eur J Neurosci* 24:885–893 Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04944.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 Neurosci* 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, Ishikawa F, Sasaki T, Jinno T, Tanaka J, Goto T, Momma K, Ishihara K, Berdeaux R, Inoue K (2022) Stimulation of Gs signaling in MC4R cells by DREADD increases energy expenditure, suppresses food intake, and increases locomotor activity in mice. *Am J Physiol Endocrinol*

inol Metab 322:E436–E445 Available at: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00439.2021>.

Mazzone CM, Pati D, Michaelides M, DiBerto J, Fox JH, Tipton G, Anderson C, Duffy K, McKlveen JM, Hardaway JA, Magness ST, Falls WA, Hammack SE, McElligott ZA, Hurd YL, Kash TL (2018) Acute engagement of Gq-mediated signaling in the bed nucleus of the stria terminalis induces anxiety-like behavior. *Mol Psychiatry* 23:143–153 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2016.218>.

Misslin R, Cigrang M (1986) Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? *Behav Processes* 12:45–50 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0376-6357\(86\)90069-0](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 Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R751-63 Available at: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.90344.2008>.

Myers EA, Banihashemi L, Rinaman L (2005) The anxiogenic drug yohimbine activates central viscerosensory circuits in rats. *J Comp Neurol* 492:426–441 Available at: <http://dx.doi.org/10.1002/cne.20727>.

Nagai Y et al. (2020) Deschloroclozapine, a potent and selective chemogenetic 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 induction 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](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03032-8).
- Nguyen AQ, Dela Cruz JAD, Sun Y, Holmes TC, Xu X (2016) Genetic cell targeting uncovers specific neuronal types and distinct subregions in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 524:2379–2399 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.901660103>.
- O'Hara CB, Campbell IC, Schmidt U (2015) A reward-centred model of anorexia nervosa: a focussed narrative review of the neurological and psychophysiological literature. *Neurosci Biobehav Rev* 52:131–152 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.02.012>.
- Panguluri S, Saggu S, Lundy R (2009) Comparison of somatostatin and corticotrophin-releasing hormone immunoreactivity in forebrain neurons projecting to taste-responsive and non-responsive regions of the parabrachial 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 different 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 with poisoning impairs acquisition of conditioned taste aversion in rats. *Behav Brain Res* 65:213–219 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90107-4](http://dx.doi.org/10.1016/0166-4328(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 cortex on conditioned taste aversion and conditioned odor aversion. *Behav Neurosci* 120:1257–1267 Available at: <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.120.6.1257>.
- Saggu S, Lundy RF (2008) Forebrain neurons that project to the gustatory parabrachial nucleus in rat lack glutamic acid decarboxylase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R52-7 Available at: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00635.2007>.
- Sakai N, Yamamoto T (1997) Conditioned taste aversion and c-fos expression in the rat brainstem after administration of various USs. *Neuroreport* 8:2215–2220 Available at: <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199707070-00025>.

Saper CB, Chou TC, Elmquist JK (2002) The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* 36:199–211 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00969-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00969-8).

Shibata R, Kameishi M, Kondoh T, Torii K (2009) Bilateral dopaminergic lesions in the ventral tegmental area of rats influence sucrose intake, but not umami and amino acid intake. *Physiol Behav* 96:667–674 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.01.002>.

Shimada S, Shiosaka S, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, Tohyama M (1985) Calcitonin gene-related peptidergic projection from the parabrachial area to the forebrain and diencephalon in the rat: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 16:607–616 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90195-2](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(85)90195-2).

Shimura T, Imaoka H, Yamamoto T (2006) Neurochemical modulation of ingestive behavior in the ventral pallidum. *Eur J Neurosci* 23:1596–1604 Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04689.x>.

Shimura T, Kamada Y, Yamamoto T (2002) Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav Brain Res* 134:123–130 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00461-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00461-2).

Shimura T, Tanaka H, Yamamoto T (1997) Salient responsiveness of parabrachial neurons to the conditioned stimulus after the acquisition of taste

- e aversion learning in rats. *Neuroscience* 81:239–247 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00188-7](http://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 following lithium chloride-induced illness. *Brain Res* 1135:122–128 Available 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 projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31:785–797 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90441-7](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(89)90441-7).
- Tokita K, Shimura T, Nakamura S, Inoue T, Yamamoto T (2007) Involvement of forebrain in parabrachial neuronal activation induced by aversively conditioned taste stimuli in the rat. *Brain Res* 1141:188–196 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.023>.
- Tordoff MG, Bachmanov AA (2002) Influence of test duration on the sensitivity of the two-bottle choice test. *Chem Senses* 27:759–768 Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/27.9.759>.
- Travers SP, Hu H (2000) Extranuclear projections of rNST neurons expressing 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 and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Res* 813: 44–49 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00884-1](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 factor neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Biol Sex Differ* 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 VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron* 73:1184–1194 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.016>.
- Whitehead MC, Bergula A, Holliday K (2000) Forebrain projections to the rostral nucleus of the solitary tract in the hamster. *J Comp Neurol* 422:429–447 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10861518>.
- 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/eat.23198>.
- Yamamoto T, Fujimoto Y (1991) Brain mechanisms of taste aversion learning in the rat. *Brain Res Bull* 27:403–406 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90133-5](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. *Neuroreport* 6:2424–2428 Available at: <http://dx.doi.org/10.1097/00001756-199511270-00034>.

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 nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. *Brain Res* 645:123–134 Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91645-4](http://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.34.259>.

渋谷祥子 (2011) 暮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.

濱口郁枝, 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/10.11428/jhej.61.13>.

謝辞

本論文の執筆にあたり、口腔生理学教室 船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