

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12325

研究課題名(和文) 食べ物のおいしさが免疫機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) The analysis of relationships between the changes in taste preference and immune function

研究代表者

乾 千珠子(山本千珠子)(Inui, Chizuko)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00419459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：食べ物の美味しさと免疫機能との関連を明らかにするため、動物にとって好ましい味覚溶液(甘味)と免疫反応を誘発するLPSを組み合わせた味覚嫌悪学習において、味覚刺激によって生じる行動変化と脳活動との関連についてマンガン造影MRI法を用いて調べた。その結果、行動変化においては学習獲得後の甘味刺激によって嫌悪性行動が認められた。甘味刺激により、扁桃体および視床下部背内側核を含む部位の活動が認められた。扁桃体の活動は他の薬物と組み合わせた場合にも認められたが、視床下部背内側核の活動では認められなかったことから、視床下部背内側核が味覚と免疫反応を結びつける部位として特異的に働いていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Some reports show that rodents can acquire aversion to the taste stimulus paired with LPS, which induces inflammatory reaction. However, the brain mechanisms in the conditioned taste aversion (CTA) with immune reactions remain obscure. Therefore, to elucidate the brain mechanism in the retrieval of CTA with LPS, we tried to detect the brain activities using a manganese-enhanced MRI. C57BL/6 male mice were conditioned by i.p. injection of saline, LiCl, or LPS, after drinking saccharin solution. On the test day, all mice were given saccharin solution and scanned by 11.7 T MRI. Our results showed that the signal intensity of the amygdala in the LPS- and LiCl-groups were higher than that in the Saline-group. The signal intensity of the dorsomedial hypothalamus (DMH) only in the LPS-group was higher. The DMH has a role of the body temperature control. Therefore, there is a possibility that the DMH might have an important role in the relationship between taste preference and immune system.

研究分野：機能形態学、行動免疫学、脳神経科学、食生活学

キーワード：味覚嫌悪学習 免疫機能 味覚嗜好性 リポポリサッカリド マンガン造影MRI法 扁桃体 視床下部 嫌悪性行動

## 1. 研究開始当初の背景

食べ物をおいしく食べられることは、摂取した食物の消化や吸収を促進するだけでなく、全身を活性化して免疫力を強化することにもつながると経験的にも知られている。「おいしさ」を構成する要因の一つである「味覚」は、末梢の味覚受容機構を介し、中枢において甘味、塩味、うま味、酸味、苦味などの味の認知から「おいしい・まずい」「すき・きらい」などの情動変化を生じさせる。このような情動変化は自律神経系や内分泌・免疫系にも影響を及ぼす。したがって、「味覚」は免疫系に関連することが推察される。

味覚系と免疫系の情報が体内で結びつく証拠として、リポポリサッカリド (Lipopolysaccharide, LPS) による味覚学習の成立に関する知見がある。LPS は体内に侵入するとマクロファージを活性化させ、インターロイキン-1 などのサイトカインの放出を引き起こす。その結果、発熱反応が生じる。Bull ら (1991) は、甘味を呈するサッカリン溶液 (条件刺激; conditioned stimulus, CS) をラットに摂取させた後に LPS (無条件刺激; unconditioned stimulus, US) を腹腔内に投与した。一週間後にそのラットに再びサッカリン溶液を呈示すると、ラットは嫌がって飲まなかった。この結果は、味覚情報は LPS による免疫反応とも結びつきやすいということを示唆している。しかしながら、無条件刺激を LPS とした免疫反応と条件刺激とした味覚情報との結びつき、その脳内情報伝達機序についての詳細は明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

溶液の味覚情報と無条件刺激の薬物効果によって生じた体調不良が結びつくことで成立する連合学習を味覚嫌悪学習 (conditioned taste aversion, CTA) という。CTA における無条件刺激には下痢や嘔吐などの内臓不快感を生じる塩化リチウムが多く用いられる。前述の LPS は塩化リチウムの効果とは異なり、免疫反

応を生じることから、免疫学習モデルとし、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究では、CTA の獲得後、味覚情報が脳内で処理されることで免疫系が反応するという仮説を立て、免疫反応を生じさせる LPS による味覚嫌悪学習、つまり、免疫学習モデルにおいて、CTA 獲得後の味溶液の再呈示による嫌悪性反応に関連する脳部位について、超高磁場 MRI によるニューロイメージングによる同定を試みた。

## 3. 研究の方法

実験動物には C57BL/6N 雄性マウス 10 週齢を用いた。すべての動物は個別ケージで温度・湿度の管理された飼育室にて飼育し、実験開始まで水・餌は自由摂取とした。飼育環境に慣れさせた後、麻酔し、口腔内カニューレを留置する手術を行った。回復後、口腔内カニューレを介して飲水することに慣れさせるトレーニングを行った。飲水トレーニングは、18 時間の絶水後、口腔内カニューレを介して蒸留水を呈示した。2 時間後に補給のために水・餌を 4 時間自由に摂取させた。この飲水トレーニングを 2 日間行った。3 日目に、口腔内カニューレを介して CS としてサッカリン溶液 (saccharin-Na, Sac) を呈示し、15 分後に各群それぞれの薬物、生理食塩水 (Saline)、LPS、または塩化リチウム溶液 (LiCl) を腹腔内投与し、それぞれ条件づけを行った。9 日間の回復期間とし、18 時間絶水を行い、翌日をテスト日とした。テスト日に、刺激溶液にサッカリン溶液を呈示する群、また、サッカリン溶液の代わりに蒸留水 (distilled water, DW) を呈示する群に分け、Saline-Sac 群、Saline-DW 群、LiCl-Sac 群、LiCl-DW 群、LPS-Sac 群、または LPS-DW 群の全 6 群とした。サッカリン溶液または蒸留水の刺激呈示時の行動をビデオカメラにて記録し、行動パターンを摂取性反応あるいは嫌悪性反応について観察を行った (Grill HJ and Norgren R, 1978)。

超高磁場 MRI によるニューロイメージングに

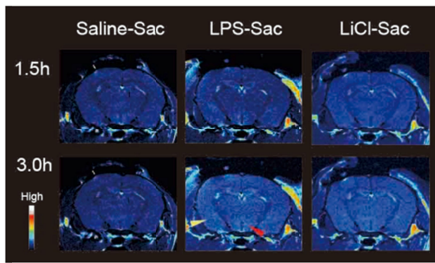


図1 扁桃体または視床下部背内側核付近の神経活動を示すMR画像の代表例（カラースケールに変換）。CTA獲得後のSaline-Sac、LPS-SacまたはLiCl-Sac群のサッカリン溶液の再呈示1.5、3時間後の活動部位を示す。黄色矢頭：扁桃体付近、赤色矢頭：視床下部背内側部付近を示す。

よる脳活動部位の同定には、マンガン造影MRI法を用いた。マンガン造影MRI法はニューロンの活性化によって電位依存性カルシウムチャンネルを通して細胞内に流入するマンガンを追跡することで、神経活動および神経投射経路を直接可視化することができる。したがって、マンガン造影剤を全身性に投与することで脳活動を積分値としてマッピングすることが可能となる(Inui-Yamamoto C, et. al., 2010)。本研究では、この神経活動マーカーである塩化マンガン溶液を、サッカリン溶液または蒸留水の刺激呈示の1時間前に腹腔内投与した。MRI撮像は麻酔下にて刺激呈示後1時間から4時間まで、超高磁場11.7 T MRI装置(11.7 T Bruker BioSpec scanner, Germany)を用いて行った。関心領域を、最後野、孤束核、扁桃体、および視床下部背内側核とし、それらを含む部位の信号輝度を画像ソフトを用いて測定した。その値をそれぞれの画像背景の信号輝度の平均値で除法することによって相対値として算出し、群間の比較を行った。

#### 4. 研究成果

条件づけ後の刺激呈示時の行動観察では、LPS-Sac群およびLiCl-Sac群のマウスはサッカリン溶液の呈示により、床に顎をこすりつける、また口を大きく開けるなどの嫌悪性行動が多くみられた。LPS-Sac群ではこれらの行動に加え、前肢を震わす嫌悪性行動もみられた。LPS-DW群、LiCl-DW群、Saline-Sac群、Saline-DW群では嫌悪性行動はみられな

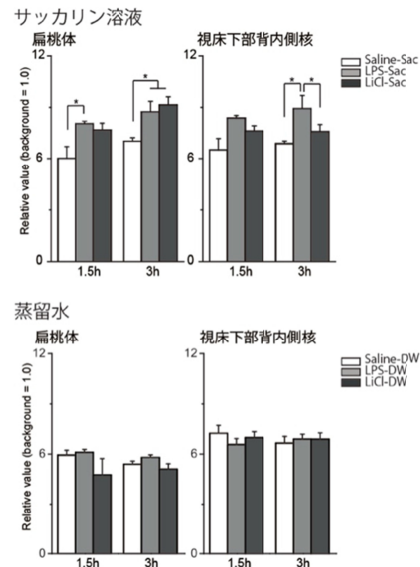


図2 扁桃体または視床下部背内側核付近におけるMR画像の信号強度の平均値±標準誤差。上段：CTA獲得後にサッカリン溶液呈示。\*  $p < 0.05$ 。下段：サッカリン溶液の代わりに蒸留水を呈示。

った。通常、摂取性行動を示す溶液の味に対して嫌悪性行動が認められたことから、LPS-Sac群及びLiCl-Sac群がCTAを獲得していたと考えられる。

CTA獲得後のサッカリン溶液呈示による脳活動部位の代表例を図1に、また、各群の関心領域とした脳部位における信号輝度の平均値を図2に示す。Saline-Sac群の代表例(図1:左列)で示すように、撮像時間に関わらず画像の信号輝度は全体的に低く認められたのに対し、LPS-Sac群(図1:中列)またはLiCl-Sac群(図1:右列)では特異的に信号輝度が高い部位が認められた。詳細にみると、LPS-Sac群またはLiCl-Sac群の画像では、黄色矢頭(図1:中下段)で示す扁桃体付近の信号輝度が高くなっていた。また、LPS-Sac群においては、赤色矢頭で示す視床下部背内側核付近の信号輝度が特に高くなっていることが認められた。統計学的に解析すると、LPS-Sac群およびLiCl-Sac群の扁桃体の信号輝度は、撮像時間に関わらずSaline-Sac群より有意に高い値を示した(図2:上段)。また、LPS-Sac群の視床下部背内側核を含む部位の信号輝度は他群より有意に高い値を示した(図2:上段)。一方、サッカリン溶液の代わりに蒸留水を呈示し

た場合にはそれらの部位で差は認められなかった(図 2: 下段)。図には示していないが、最後野及び孤束核については、サッカリン溶液及び蒸留水による刺激呈示においても全体的に信号輝度は低く、群間で有意な差は認められなかった。最後野は解剖学的に血液脳関門を持たず、血液および脳脊髄液中の代謝物質、ホルモン、また薬物や細菌など様々な物質を受容する部位である。また、孤束核はその最後野からの神経伝達を受ける。このように、これらの部位は血中における薬物の直接の関与がある場合に機能する部位であるが、本実験で行った CTA 獲得後の味溶液の再呈示においては薬物の直接の関与はないため、活動がみられなかったのかもしれない。

扁桃体の活動は、無条件刺激が塩化リチウム溶液でも LPS においても認められ、また条件刺激のサッカリン溶液の刺激の場合に認められたことから、CTA 獲得後のサッカリン溶液の味の想起による嫌悪性行動に関連する脳部位であると考えられる。視床下部背内側核を含む領域の活動については、LPS による CTA 獲得後のサッカリン溶液の刺激による嫌悪性反応時にのみ認められたことから、この免疫学習モデルにおいて特異的に働く部位であると考えられる。この部位は体温制御に関連することで知られており、LPS による CTA 獲得後の味覚刺激によって体温が変化するという報告(Bull DF, et. al., 1991)もある。このような報告からも、視床下部背内側核が味覚情報と免疫機能とを結びつける脳部位として重要な部位であることを示唆しているものと考えられる。

本研究の成果は、学習による食物の味の「好き・嫌い」が免疫機能に影響するという可能性を示す基盤的成果となるものと考えられ、さらに詳細な解明を急ぎたい。また、近年の研究で LPS 投与後、抑うつ状態になるという報告(Wang Z, et. al., 2014)がある。このような LPS による薬理学的な効果が CTA 獲得後の記憶の想起に及ぼす影響についても考慮する

必要があると考えられ、今後さらに詳細な検討を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 4 件)

①Chen T, Mori Y, Inui-Yamamoto C, Komai Y, Tago Y, Yoshida S, Takabatake Y, Isaka Y, Ohno K, Yoshioka Y: Polymer brush-afforded SPIO nanoparticles show unique biodistribution and MRI contrast in mouse organs, Magn Reson Med Sci. In printing. 査読有

②Kawano A, Honma S, Inui-Yamamoto C, Ito A, Niwa H, Wakisaka S: c-Fos expression in the parabrachial nucleus following intraoral bitter stimulation in the rat with dietary-induced zinc deficiency, Brain Res. 1659: 1-7, 2017. 査読有  
DOI: 10.1016

③Ooi Y, Inui-Yamamoto C, Yoshioka Y, Seiyama A, Seki J: 11.7 T MR Imaging Revealed Dilatation of Virchow-Robin Spaces within Hippocampus in Maternally Lipopolysaccharide-exposed Rats, Magn Reson Med Sci. 16: 54-60, 2017. 査読有  
DOI: 10.2463

④森勇樹、乾千珠子、吉岡芳親: 超高磁場 MRI による脳内免疫細胞トレーシング、Clinical Neuroscience 34, 2016. 査読なし

(学会発表)(計 5 件)

①Inui-Yamamoto C, Sugihara F, Chen T, Yoshioka Y, Wakisaka S: Neuronal activities induced by conditioned solution in the retrieval of the conditioned taste aversion paired with lipopolysaccharide, Japanese Chapter of ISMRM 第一回学術集会, 2017 年 2 月 23 日, 脳情報通信融合研究所(大阪府、吹田市).

②Inui T, Inui-Yamamoto C, Nakae A, Nakai K, Yoshioka Y, Shimura T: The effects of optogenetic stimulation of the basolateral amygdala on the retrieval of conditioned taste aversion in mice: a preliminary study, 15<sup>th</sup> international symposium on molecular and neural mechanisms of taste and olfactory perception: in conjunction with YR Umami forum 2016, 2016年12月3-4日、九州大学コラボレーション(福岡県、福岡市).

③Inui-Yamamoto C, Inui T, Honma S, Abe M, Wakisaka S: The effects of feeding of unpalatable chow in the developmental stage on the formation of mandibular condyle, 15<sup>th</sup> international symposium on molecular and neural mechanisms of taste and olfactory perception: in conjunction with YR Umami forum 2016, 2016年12月3-4日、九州大学コラボレーション(福岡県、福岡市).

④Inui-Yamamoto C, Sugihara F, Chen T, Yoshioka Y, Wakisaka S: Brain activities induced by a conditioned taste stimulus paired with lipopolysaccharides, Society for the ingestive behavior (SSIB), 2016年7月15日、ポルト(ポルトガル).

⑤Inui-Yamamoto C, Sugihara F, Chen T, Yoshioka Y, Wakisaka S: Neuronal activities concerning the conditioned taste aversion with immune reactions, 17th International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT2016), 2016年6月10日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

乾 千珠子 (INUI, Chizuko)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 00419459

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

吉岡芳親 (YOSHIOKA, Yoshichika)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特

任教授

研究者番号: 0017489

### (4)研究協力者

杉原文徳 (SUGIHARA, Fuminori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特

任助教

研究者番号: 50381645

森勇樹 (MORI, Yuki)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特

任助教

研究者番号: 10559355

陳 挺 (CHIN, Tei)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・大

大学院生