

## 注意欠陥多動性障害モデルラットにおける発育期 うま味摂取による情動形成の脳内メカニズム解析 —血中オキシトシン関与の検討—

名古屋市立大学院医学研究科・脳神経生理学 三角 吉代  
名古屋市立大学院医学研究科・脳神経生理学 上田 佳朋  
名古屋市立大学院医学研究科・脳神経生理学 横山 善弘  
名古屋市立大学院医学研究科・脳神経生理学 飛田 秀樹

The mechanism of enhanced social behavior that is mediated  
monosodium glutamate (MSG) intake in attention-deficit/hyperactivity  
disorder (ADHD) model rat-Plasma oxytocin fails to explain MSG effect

Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, MISUMI, Sachiyo  
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, UEDA, Yoshitomo  
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, YOKOYAMA, Yoshihiro  
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, HIDA, Hideki

### 要 約

発育期の外部刺激（発育環境や食育）は、不安様行動および社会性行動など情動形成に大きく影響する。我々は、発育期のうま味物質（グルタミン酸ナトリウム;MSG）摂取による社会性亢進の脳内メカニズム解析に取り組んでいる。これまで注意欠陥多動性障害(ADHD)モデル動物(SHR ラット)に離乳直後(生後 25 日)から 0.6%MSG 水溶液を投与すると、新規ラットに対する攻撃が有意に減少(社会性の亢進)することが分かっていた。本報告では、MSG による社会性亢進の形成において情動行動との関与が示唆されているオキシトシンの関与について検討した。生後 25 日の SHR ラットに 0.6%MSG を経口投与した後、60 日目に血液を採取しオキシトシン濃度を測定した。その結果、MSG 投与群と水投与群で血中オキシトシン量に変化は見られなかった。また、扁桃体と内側前頭前野でのオキシトシン受容体遺伝子の発現にも変化は見られなかった。MSG による社会性亢進には血中オキシトシンの直接的な関与はないことが示唆された。

【キー・ワード】グルタミン酸ナトリウム, 社会性行動, 注意欠陥多動性障害, 情動形成, オキシトシン

### Abstract

External stimuli as environment and food during the period of development significantly

affect emotions in anxiety and social behavior. We previously reported that oral intake monosodium L-glutamate (MSG), a taste substance for umami, for 5 weeks from postnatal day 25 (P25) to P60 decreased aggressive behavior in ADHD model rat (SHR). In this study we investigated plasma oxytocin level that is recently reported to improve social communication. At P60, we collected blood plasma and detected the oxytocin level by ELISA. No significant change of plasma oxytocin level was shown between MSG treated and H2O treated groups, and no correlation was also detected between aggressive behavior and the plasma level. We next estimated gene expression of oxytocin receptor (OxyR) in the amygdala and medial prefrontal cortex by real time PCR. There was no significant difference in OxyR gene expression after MSG treatment. Data suggests that plasma oxytocin fails to explain MSG effect on aggressiveness, although MSG intake during the development enhanced social behavior in SHR.

**【Key words】 monosodium L-glutamate, social behavior, ADHD, emotional formation, oxytocin**

## 背景と目的

発育期の外部刺激は、不安・ストレス下での行動や対人関係など社会性行動の形成、すなわち動物の成熟後の情動形成に大きく影響する。たとえば、発育期を豊かな環境（広いケージ、豊富な遊び・運動道具、6-8匹の飼育：個体レベルの外部環境変化）で飼育することにより（Baldini.S, Berardi. N., et al 2013; van Praag.H, Kempermann.G, & Gage, FH,2000）成熟後の不安様行動が減少し、さらに社会性が亢進することが明らかになっている。このような個体レベルでの飼育環境（豊かな環境）に加え、発育期の味覚からの感覚刺激（食育）が情動行動に影響を与えていることが大いに考えられる。

味覚の基本味として、甘味、塩味、苦味、酸味が古くから知られているが、近年“うま味”が第5の基本味として認識されるようになった。うま味物質の一つにグルタミン酸ナトリウム（MSG）が知られるが、MSGの摂取により扁桃体、室傍核、外側視床下部などにおいて血流増加や遺伝子発現上昇が誘導されることが報告されている（Kondoh.T., & Torii.K ,2008; Otsubo. H, Kondoh.T, Shibata.M, Torii.K, & Ueta.Y, 2011; Tsurugizawa.T, Uematsu, A., Uneyama, H.,& Torii, K,2011）。扁桃体は、味覚を含めた外界からのあらゆる感覚刺激の情報を受け取り、情動表出に必要な脳の領域に出力している。特に扁桃体の中心核は情動反応において中心的な働きをしている（Phelps ,EA1.,LeDoux ,JE,2005）。

私たちはこれまでに、注意欠陥多動性障害(ADHD)モデル動物(SHR ラット)に離乳直後(生後 25 日)から成熟するまで(生後 60 日)の 5 週間、0.6%MSG 水溶液を投与すると、新規ラットに対する攻撃行動が有意に減少(社会性の亢進)することを明らかにしている。本研究では、発達期の MSG 経口摂取が成長後の社会性亢進を引き起こすメカニズムについてオキシトシンの関与に注目し検討を行った。オキシトシンは脳内で合成される神経ペプチドホルモンの一種で、近年、ヒトやげっ歯類において対人関係や他者への信頼、恐怖や不安行動といった社会性行動、感情行動(情動行動)に影響していることが報告されてきている（Heinrichs.M and Domes.G,2008; Kirsch. P, Lindenberg.A.M.,et al

2005; Neumann.I.D and Slattery.D.A,2015)。特に、自閉症患者では血中オキシトシン濃度が低いこと、オキシトシンの経鼻投与でコミュニケーション力が上昇する、など社会性への影響が報告されている (Watanabe.T, Yamasue. H., et al 2014; Green.LA, Morris.M; 2001)。このことより、発育期の MSG 経口摂取により、血中オキシトシン濃度の変化、あるいは情動に関与する扁桃体や社会性に関与する内側前頭葉でオキシトシン作用機構に変化が見られ、行動変化につながっている可能性が考えられる。

さらに、発育期の適切な MSG 摂取による味覚刺激の亢進が、扁桃体中心核の個々の神経活動の発火頻度あるいは発火様式に変化を与え、扁桃体中心核からの出力が修飾された結果として情動行動に変化が見られることが考えられる。

本論文では、これまで報告した注意欠陥多動性障害(ADHD)モデル動物 (SHR)を用いた MSG 投与による社会性亢進の実験結果 (中間報告にて発表済み)、および血中オキシトシン濃度の測定、扁桃体と内側前頭前野でのオキシトシン受容体の遺伝子発現変化の検討について報告する。また、扁桃体での神経活動の発火頻度と発火様式の記録について現在までの進捗状況を報告する。

## 方 法

### 1) 動物の飼育条件

生後 25 日齢の SHR を用い生後 60 日齢までの 5 週間、通常のおよび大きさケージ(400×230×180 mm)で餌・水の位置を固定し、1 匹で飼育する孤独な環境で飼育 (IE: isolated environment)した。

### 2) グルタミン酸ナトリウム (MSG) の投与

0.6%MSG 水溶液を経口から摂取させた。離乳直後(生後 25 日)から成熟(60 日)するまでの間、以下の 2 群を比較した。

MSG 投与群

水投与群 (コントロール群)

### 3) オープンフィールドテスト

ラットを直径 60cm 高さ 30cm の円形の新規環境空間の中央部に入れ、空間内を移動する様子を 10 分間ビデオに撮影した。行動解析ソフト smart を用いて全移動距離(cm)および直径 30cm の中央部分への進入回数を解析し、不安様行動の指標とした (図 1 A)。

### 4) 社会性テスト

ラットを縦 60cm 横 20cm 高さ 30cm の長方形空間の両端に、観測対象となるラットとその反対側に新規動物を同時にいれ、5 分間の行動をビデオ撮影した。新規動物の匂いを嗅ぐ行動(スニフイング回数)、相手動物に上乗しする行動(ライディング数)を測定した (図 1 D)。

## 5) 血漿オキシトシン測定

各群において生後 60 日目のラットから血液を採取し、遠心により血漿を分離した。オキシトシン測定は競合的酵素免疫測定法(ELISA)により行った (Oxytocin EIA kit; phoenix pharmaceuticals, Inc.)。

## 6) 脳内オキシトシン受容体の発現測定

生後 60 日目のラットの扁桃体, 前頭前野の組織を採取し, Trizol reagent(thermoFisher scientific)にて全 RNA を分離した。M-MVL 逆転写酵素(thermoFisher scientific)により相補的 DNA を作成した後, SYBR green (Nippon gene) 検出によるリアルタイム PCR 法によりオキシトシンの遺伝子発現(メッセンジャーRNA)量を測定した。

# 結 果

## 1) 情動行動の解析

### ①オープンフィールドテスト

10 分間の測定の結果, MSG 投与群と H<sub>2</sub>O 投与群の総移動距離に有意な差は見られなかった(図 1 B)。また, 不安行動の指標である中心部への進入時間においても両群で差は見られなかった(図 1 C)。

## 2) 社会性テスト

新規ラットへの攻撃行動(ライディング時間)は, 水投与群と比較し MSG 投与群で有意に減少していた(図 1 E)。相手への探索行動であるスニッフィング時間も MSG 群で減少が見られた(図 1 F)。また, 1 分毎のスニッフィング時間を比較すると, 測定開始 1・2 分目でスニッフィング時間が有意に減少していることが分かった。

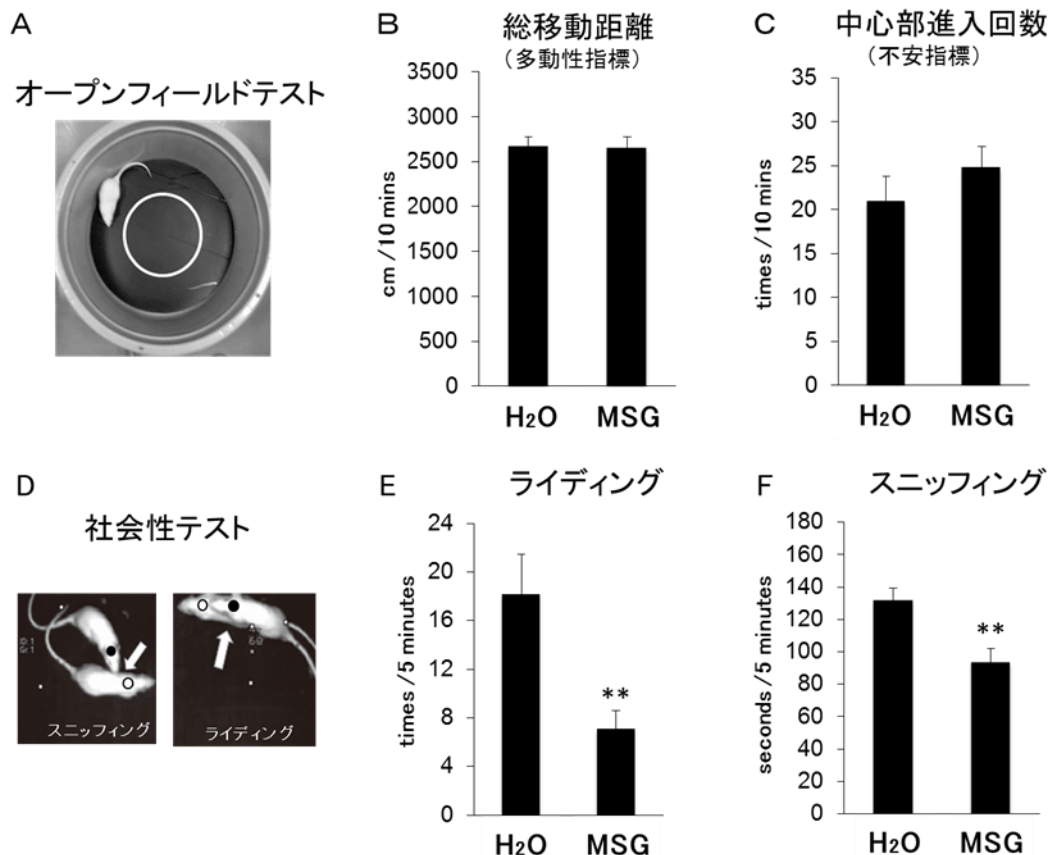


図1 MSG投与による社会性行動の変化

### 3) 血中オキシトシン濃度

ELISA法により血中オキシトシン濃度を測定したところ、MSG投与群と水投与群において有意な差は認められなかった。(MSG投与群;5.6ng±1.7/ml, 水投与群 6.5ng±1.9/ml, n=7)(図2 A)。また、攻撃行動数(ライディング数)、探索行動数(スニッフィング数)と血中オキシトシン濃度のあいだに相関性は見られなかった。

### 4) 扁桃体でのオキシトシン受容体遺伝子の発現解析

情動行動に関連する脳部位として、扁桃体、前頭前野でのオキシトシン受容体の遺伝子発現変化をリアルタイムPCR法を用いて測定した。その結果、扁桃体、前頭前野の両部位において遺伝子発現量に変化は見られなかった(扁桃体;1.23倍, 前頭前野 1.12倍; 対水投与群)(図2 B)。

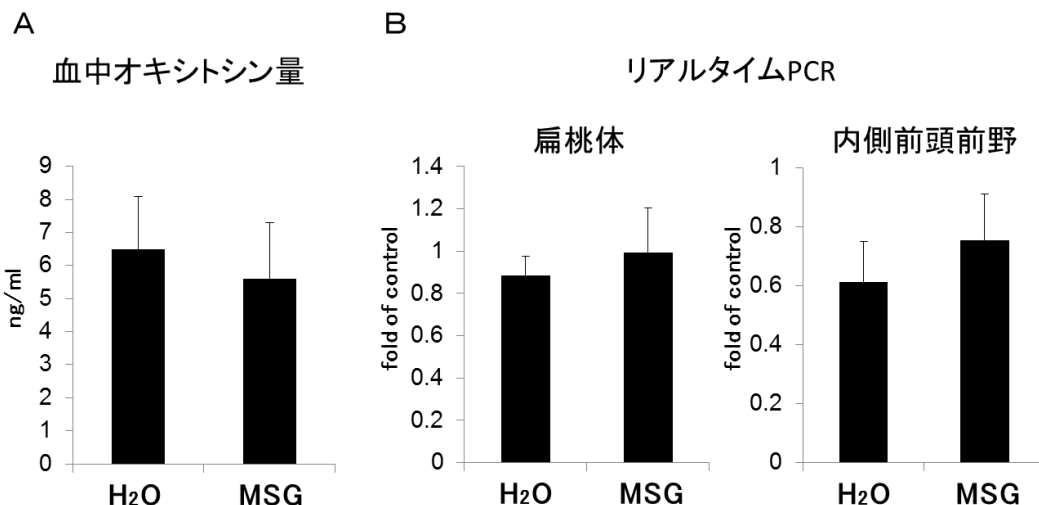


図2 血中オキシトシン濃度とオキシトシン受容体の遺伝子発現

## 考 察

SHR ラットは、発育期に多動性を示すため注意欠陥多動性モデルとして研究に用いられている。これまでの結果より、MSG を投与された SHR ラットではオープンフィールドテストによる総移動距離(多動性)と中心部進入時間(不安様行動)に水投与群との変化は見られなかった。しかしソーシャルインタラクションテストでは、MSG 群において新規ラットへの攻撃行動(ライディング時間)の減少が見られた。また、相手への探索行動を示すスニフing時間も減少が見られた。このテストでは開始直後の1分間あたりの両群間のスニフing時間に差はなく、新規動物に出会った際の好奇心・探究心に変化はないと考えられる。1-2分目に有意な減少が見られたことから、新規動物に対する受け入れが寛容になっていること(警戒行動の低下)が示唆される。以上の結果より、MSG の投与により攻撃性の減少と新規動物への受け入れ寛容という情動行動の変化(社会性の亢進)が起こることが分かった。

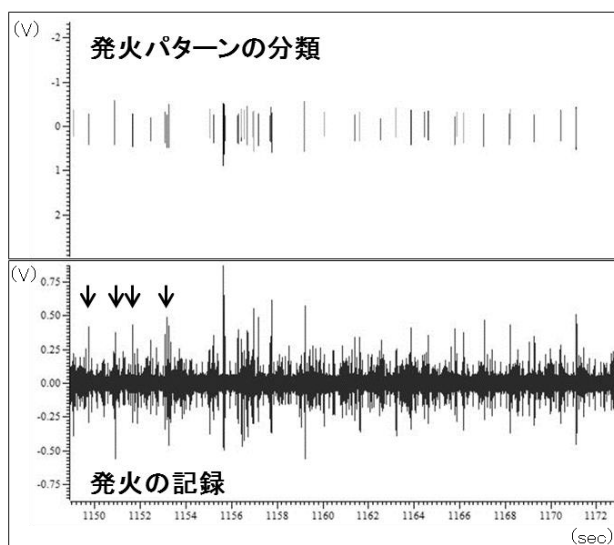
近年、脳内ホルモンの一種であるオキシトシンが不安行動や母性行動など社会性行動に深く関与していることが報告されている。上記の結果で見られたMSGによる社会性の亢進がオキシトシンの関与による可能性を考え、血中オキシトシン濃度の測定を行った。しかし、MSG投与群と水投与群で有意な差は認められなかった。オキシトシンは主に脳の室傍核で合成され、下垂体後葉に運ばれ、様々な刺激(ストレスや分娩など)により血中に分泌される。今回の結果からは、血中に放出されたオキシトシンはMSGによる攻撃行動や警戒行動の減少には直接関与していないことが考えられる。一方、室傍核で合成されたのち脳内に分泌されるオキシトシン(脳内オキシトシン)もあり、これらはオキシトシン受容体を介して周りの神経細胞に作用する。近年の報告では、脳内オキシトシンが扁桃体や縫線核を介してマウスの恐怖行動や、不安行動に関与していることが報告されている(Knobloch.H.S, Grinevich1.V., et al 2012; Guzmán.Y.F, Radulovic.J., et al 2013)。本実験では、扁桃体、内側前頭

野でのオキシトシン受容体遺伝子の発現には変化を認めなかったが、これらの部位でのオキシトシンの分泌量自体が変化している可能性が考えられ、今度は脳内オキシトシン濃度の測定が必要であると考えている。

以上の結果より、発育期のMSGによる味覚刺激が、成熟後の情動行動の変化（社会性の亢進）を引き起こすこと、血中オキシトシンは直接これらの変化に関与しないことが明らかとなった。

また、MSGの摂取により社会性行動に関与する脳内（扁桃体、内側前頭葉など）で活動様式に変化が起きていることが予想される。特に扁桃体は味覚を含めた外界からの刺激を受け取り、それらを情動表出に必要な脳部位に出力している。今後は、MSG経口投与による扁桃体の神経活動変化について、神経発火頻度やその様式等について波形解析することを予定している。これまでに扁桃体での神経活動の記録法を立ち上げた。麻酔下にてラット脳の扁桃体部位に記録電極を植え込み（図3B）、神経活動を記録した。結果、扁桃体での神経発火（図3A. 下段：矢印）が見られ、それらの活動がいくつかの発火パターンに分類できることが分かった（図3A. 上段）。今後はMSG投与の動物で同様の実験を行い、発火頻度と発火パターンにどのような変化が見られるのかについても検討していく。

### A 神経活動記録



### B 記録電極の挿入位置

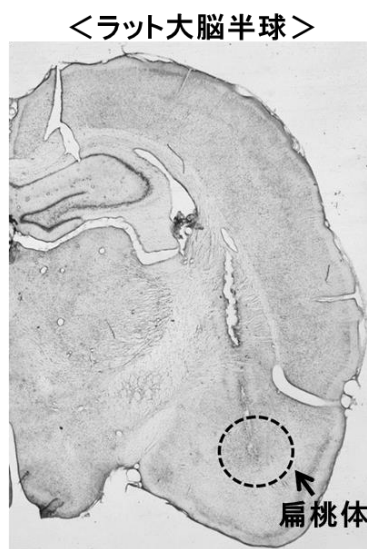


図3 扁桃体での神経発火と発火パターンの記録

## 今後の課題

我々は、注意欠陥多動性障害モデルラット（自然発症型高血圧ラット：SHR）を用いて、生後の発育期でのうまみ物質のグルタミン酸ナトリウム（MSG）の経口摂取により社会性が亢進する情動行

動変化を明らかにした。今後はMSGを投与したときの扁桃体の神経活動の発火と発火パターンの解析を行い、情動行動に関する神経活動に変化が起きているかについて検討していく。また、脳内オキシトシン量の測定、オキシトシン投与による前頭前野、扁桃体の神経活動を測定し社会性亢進への関与についても検討していく必要があると考える。さらには、脳の各部位での活動と同時に、前頭前野刺激による扁桃体の神経活動の変化など各領域間の連絡について検討し、情動行動の変化を引き起こす神経回路について検討していく必要があると考えている。

## 引用文献

- Baldini, S., Restani, L., Baroncelli, L., Coltelli, M., Franco, R., Cenni, MC., Maffei, L., & Berardi, N. (2013). Enriched Early Life Experiences Reduce Adult Anxiety-Like behavior in Rats: A Role for Insulin-Like Growth Factor 1. *The Journal of Neuroscience*.33(28):11715–11723
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, FH.,(2000).Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews. Neuroscience*, 1(3):191-8.
- Kondoh, T., & Torii,K (2008) . Brain activation by umami substances via gustatory and visceral signaling pathways, and physiological significance. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*.31(10):1827-1832
- Otsubo, H., Kondoh, T., Shibata, M., Torii, K.,& Ueta, Y.(2011). Induction of Fos expression in the rat forebrain after intragastric administration of monosodium L-glutamate, glucose and NaCl. *Neuroscience*.196:97-103
- Tsurugizawa, T., Uematsu, A., Uneyama, H.,& Torii, K.(2011). Different BOLD responses to intragastric load of L-glutamate and inosine monophosphate in conscious rats. *Chemical Senses*.36(2):169-76
- Phelps,EA1., LeDoux,JE.,(2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron*.48(2):175-87.
- Sagvolden, T1., Russell, VA., Aase, H., Johansen, EB., & Farshbaf M. (2005) Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*.57(11):1239-47.
- Heinrichs, M and Domes, G., (2008). Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. *Progress in Brain Research, Vol. 170*
- Kirsch,P., Esslinger,C., Chen,Q., Mier,D., Lis,S., Siddhanti,S., Gruppe,H., Mattay,V.S., Gallhofer,B., and Lindenberg,A,M.(2005). Oxytocin Modulates Neural Circuitry for Social Cognition and Fear in Humans. *The Journal of Neuroscience*.25(49):11489–11493
- Neumann,I,D., and Slattery,D,A.(2015). Oxytocin in General Anxiety and Social Fear:A Translational Approach. *Biological Psychiatry*, doi: 10.1016/j.biopsych.2015.06.004.
- Watanabe, T., Abe,O., Kuwabara,H., Yahata,N., Takano,Y., Iwashiro,N., Natsubori,T., Aoki,U., Takao,H., Kawakubo,Y., Kamio,Y., Kato,N.,



- Miyashita, Y., Kasai, K., Yamasue, H. (2014). Mitigation of Sociocommunicational Deficits of Autism Through Oxytocin-Induced Recovery of Medial Prefrontal Activity: A Randomized Trial. *JAMA Psychiatry*. 71(2):166-175
- Green, L.A., Fein, D., Modahl, C., Feinstein, C., Waterhouse, L., and Morris, M. (2001). Oxytocin and Autistic Disorder: Alterations in Peptide Forms. *Biological Psychiatry*. 50:609-613
- Knobloch, H.S., Charlet, A., Hoffmann, L.C., Eliava, M., Khrulev, S., Cetin, A.H., Osten, P.L., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., Stoop, R. and Grinevich, V. (2012). Evoked Axonal Oxytocin Release in the Central Amygdala Attenuates Fear Response. *Neuron*. 73:553-566
- Guzmán, Y.F., Tronson, N.C., Jovasevic, V., Sato, K., Guedea, A.L., Mizukami, H., Nishimori, K., and Radulovic, J. (2013). Fear-enhancing effects of septal oxytocin receptors. *Nature neuroscience*. 16 (9) :1185-1189

