

20. 異なる環境条件下における食塩の摂取行動と生理作用に関する研究 (No.8920)

鈴木 継 美 (東京大学)

ナトリウムの栄養状態、味覚に影響を与える亜鉛の栄養状態および低温環境がマウスの食塩摂取行動と生理作用にどのような影響を及ぼすかを調べるため、以下の3つの実験を行なった。使用したマウスはいずれもICR系の雄で、8:00-20:00の明暗周期のもとで純水と食塩水のどちらでも選択できるような状態で飼育した。① 0.9%食塩水のPreference(食塩水飲水量が総飲水量に占める割合)は通常飼料(Na:2.2mg/g)と純水のみで2週間飼育した後観察すると40%であった。これに対し、高食塩飼料(Na:8.0mg/g)と純水のみで2週間飼育した後観察すると61%と、有意に高くなった。また、通常飼料飼育の場合でも、純水のみではなく、純水と食塩水の選択摂取を食塩水濃度を0.0025%から2日おきに徐々に上げながら行なうと、食塩水濃度が0.9%になったときのPreferenceは75%で、通常飼料純水のみときと比較して有意に高くなった。②低亜鉛飼料による軽度の亜鉛欠乏状態が塩味識別閾値に影響を及ぼすかどうかを調べた。通常飼料(Zn:50ppm)群、低亜鉛飼料(Zn:2ppm)で5~7週間飼育した群について観察した結果、通常飼料群の塩味識別閾値は、0.025~0.05%であったのに対し、低亜鉛飼料群は0.1%であった。なお、臓器および血漿中亜鉛濃度、血漿中ALP(alkaline phosphatase)活性、肝臓中MT(metallothionein)活性については現在分析中である。③低温環境がマウスの食塩摂取行動に及ぼす影響と寒冷下の結腸温の変化を調べた。通常飼料および0.9%食塩水と純水を与え、常温(22℃)で4日間飼育した後、毎日6時間(11:00-17:00)、8℃の低温に繰返し4日間曝露し、再び常温で4日間飼育した。寒冷曝露により摂食量の増加、0.9%食塩水のPreferenceの増強(40→60%)、飼料と食塩水からの総Na摂取量増加(17→25mg/day)がみられた。上記と同様の実験条件で食塩水を与えなかった群について観察したところ結腸温度が寒冷曝露により低下した(36.8→35.6℃)のに対し、食塩水を与えた群では低下しなかった。次に、①と同様の高食塩飼料で2週間飼育したマウスについて同様の実験を行なったところ、総Na摂取量は寒冷曝露開始前に40mg/dayであり、寒冷曝露によっても変化しなかった。また、寒冷による0.9%食塩水のPreference増強はみられなかった。

19. 異なる環境条件下における食塩の摂取行動と生理作用に関する研究 (No.8920)

鈴木 継 美 (東京大学)

1. 研究目的

日本では東北地方において食塩摂取量の多いことが従来から指摘されている。この地方の高血圧発生頻度や脳血管疾患による死亡率が他の地域と比べて高いことから、これらの疾患と食塩摂取との関係が示唆され、食塩摂取を減らす保健活動が進められている。ところが、なぜこの地域で食塩の摂取量が多いかについては必ずしも十分な説明がされているとはいえない。冬期の食物保存のために食塩を多く使用してきたことが理由とされているが、生理学的側面からの検討はほとんど行なわれていない。また、最近の食物保存技術の改善に伴い、塩蔵食品以外に入手可能な食品が多くなっているにもかかわらず、昭和62年国民栄養調査成績、および竹森ら(1987)の報告ではこの地域の食塩摂取量が依然として高いことが示されている。

最近の実験的研究によると、実験動物で食塩嗜好が見られる条件として、低蛋白食、24時間の絶食、拘束などが知られている。ヒトの場合いかなる刺激によって食塩嗜好が形成され、それが持続するかが問題となる。緒方ら(1948,1952)は、食塩の過剰摂取によって産熱が昂進することを報告している。東北地方の冬の室内気候は北海道よりもむしろ寒冷であることが指摘されており、この寒冷な室内気候が食塩嗜好の引き金になっている可能性が考えられる。また、必須微量元素である亜鉛の欠乏が味覚に影響を及ぼすことが知られている。現実には生活しているヒトについて考える場合、重度の亜鉛欠乏ではなく、Marginalな亜鉛欠乏がSalt taste thresholdを変化させ、その結果、食塩摂取量が増える可能性もある。さらに、Bertinoら(1986)は食物中の食塩濃度を増やすと

塩味に対する嗜好が強まることを報告している。これらの点を考慮し、亜鉛の栄養状態および低温環境が食塩摂取行動と生理作用にどのような影響を及ぼすかを調べるため、マウスを使って、以下の3つの実験をおこなった。

- ①食塩濃度の異なる飼料および飲料水を与えたとき、Salt preferenceに変化が生じるかどうかを調べる。
- ②Marginalな亜鉛欠乏状態でSalt taste thresholdが変化するかどうかを調べる。
- ③寒冷に曝露したときにSalt preferenceおよび食塩摂取量が変化するかどうか、また、そのときの体温の変化を調べる。

なお、ここで言うSalt taste thresholdとは、マウスに再留水と食塩水を自由に選択できるように与え、食塩水濃度を徐々に濃くしていったとき、再留水飲水量と食塩水飲水量に明らかな差が生じる最低の食塩水濃度のことである。Salt preferenceとは、マウスに再留水と、Salt taste thresholdより高い濃度の食塩水を自由に選択できるように与えたとき、食塩水飲水量が、総飲水量(再留水+食塩水)に占める割合(%)として示される。また、Marginalな亜鉛欠乏状態とは、体重、飲水量、摂食量の減少や脱毛といった症状が無く、骨以外の臓器中亜鉛レベルが正常値を示しており、かつ、血漿中の亜鉛レベルが正常時より有意に低下する状態をさす。

2. 研究方法

2.1 実験動物および飼育方法

使用した動物は全てICR系雄マウスで、1匹ずつポリカーボネート製のケージで個別に飼育した。各ケージには給水器を2本セットし、どちらの給水器からも自由に飲水できるようにした。実験開始まで給水器は2本とも再留水を入れ、室温20~22°C(以下、常温)で、8:00-20:00を明とする明暗周期のもとで飼育した。餌は船橋農場製のF2調整飼料(以下、通常飼料)を使用した。我々の分析によると、この通常飼料の亜鉛濃度は

50 $\mu\text{g/g}$ 、ナトリウム濃度は2.2 mg/g であった。飲水量、摂食量、体重は毎日10:00-11:00に測定した。

2. 2 実験条件

2. 2. 1 実験1:食塩濃度の異なる飼料および飲料水による、Salt preferenceの変化についての実験

10週齢のマウスを8匹ずつ3群に分け、第1群は、給水器を2本とも再留水とし、通常飼料で2週間飼育した。第2群は、給水器を2本とも再留水とし、高食塩飼料 (Na: 8.0 mg/g)で2週間飼育した。第3群は通常飼料で、給水器の一方を再留水、他方の給水器を食塩水とし、食塩水濃度を2日おきに0.0025%、0.025%、0.05%、0.1%、0.2%、0.4%、0.6%の順に上げていき、2週間飼育した。それぞれの条件で2週間飼育した後、全ての群において給水器2本のうち1本は再留水、他の1本は0.9%食塩水にして0.9%食塩水に対するPreferenceを調べた。

2. 2. 2 実験2:亜鉛の栄養状態によるSalt taste thresholdの変化についての実験

5週齢のマウスを16匹ずつ2群にわけ、第1群は通常飼料群(Zn濃度 50 $\mu\text{g/g}$)、第2群は低亜鉛食群 (Zn濃度 2 $\mu\text{g/g}$)とした。飼育開始後4週間は給水器は2本とも再留水で飼育した。飼育開始後4週間から6週間にかけて、各群半数の8匹についてSalt taste thresholdの測定を行なった。測定は、給水器の一方を再留水、他方を食塩水とし、食塩水濃度を2日おきに0.0175%、0.025%、0.05%、0.1%、0.9%、1.6%と、順に上げていき、再留水と食塩水の飲水量を比較した。この後エーテル麻酔下で屠殺し、腹部大静脈よりヘパリン入りシリンジに採血して血漿を分離した。血漿中亚鉛含量を原子吸光分析により測定し、血漿中ALP (Alkaline phosphatase)活性をBessey-Lowry法で測定した。また、肝臓、腎臓、脳、心臓、大腿骨、大腿筋を採取した。これらの臓器を硝酸で湿式灰化した後、原子吸光分析により亜鉛含量を、さらに肝臓中のMT (Metallothion

ein)量を、 ^{203}Hg -binding法で測定する予定である。各群の残り8匹については飼育開始後6週間は給水器は2本とも再留水で飼育した。飼育開始後6週間から8週間にかけて、Salt taste thresholdの測定を行ない、その後屠殺して同様の分析を行なった。

2. 2. 3 実験3:寒冷に曝露によるSalt preference、食塩摂取量、および、体温の変化についての実験

10週齢のマウスを14匹ずつ2群に分けた。一方の群は常温下で12日間飼育し、他方の群は4日間常温で飼育した後、毎日6時間(11:00-17:00)、8°Cの低温に繰返し4日間曝露し、再び常温で4日間飼育した。両群とも半数は通常飼料と再留水のみで飼育し、残りの半数は通常飼料および再留水と0.9%食塩水を与えた。飲水量と摂食量の測定は毎日11:00におこなった。また、全てのマウスの結腸温度を毎日10:00と16:00に測定した。

3. 結果

3. 1 実験1

各群の0.9%食塩水に対するPreferenceをTable 1に示した。通常飼料と再留水で2週間飼育したマウスの0.9%食塩水に対するPreferenceは40.4%であった。これに対し、高食塩飼料と再留水のみで2週間飼育した後には61.5%と、有意に高くなった。また、通常飼料の場合でも、再留水と食塩水を与え、食塩水濃度を上げながら2週間飼育した群では、Preferenceは75.5%となり、通常飼料-再留水群と比較して有意に高くなった。

3. 2 実験2

体重、摂食量、飲水量について、低亜鉛食群と通常飼料群の間の有意な差は実験期間中を通じてみられなかった。血漿中ALP活性をTable 2に、血漿中亜鉛レベルをTable 3に示した。血漿中ALP活性は、通常飼料群、低亜鉛食群ともに、実験開始時に比べ、6

週間目と8週間目には有意に低い値となった。また、低亜鉛食群のALP活性は、6週間目、8週間目ともに、通常飼料群と比べ、有意に低くなった。血漿中亜鉛レベルは、通常飼料群では実験期間中有意な変化はみられなかったが、低亜鉛食群では、6週間目、8週間目ともに、実験開始時に比べて有意に低下した。また、両群を比較すると、6週間目、8週間目ともに、低亜鉛食群の血漿中亜鉛レベルは通常飼料群と比べて有意に低かった。これらの結果から、低亜鉛飼料群では、6週間目、8週間目ともに、亜鉛欠乏状態にあったと判断されるが、これがMarginal deficiencyといえるかどうかは今後、臓器中の亜鉛含量を測定することによって確認される。実験開始後4～6週間と6～8週間におけるSalt taste thresholdの測定結果をFig. 1に示した。通常飼料群のThresholdは、4～6週間目、6～8週間目のいずれも食塩水濃度0.05%であったが、低亜鉛食群では4～6週間目、6～8週間目ともに0.1%であり、明らかな閾値の上昇が観察された。

3. 3 実験3

12日間常温飼育を続けた群の体重、摂食量、総飲水量は、再留水のみを与えた群、再留水と0.9%食塩水を与えた群ともに実験期間を通じて有意な変動はなく、両群の間にも有意な差はなかった。5日目から8日目にかけて繰り返し寒冷曝露を行なった群では、体重の変動はなかったが、再留水のみを与えた群、再留水と0.9%食塩水を与えた群ともに5日目から8日目(Period 2)の摂食量が1日目から4日目(Period 1)と、9日目から12日目(Period 3)の摂食量と比較して、有意に多くなった(Table 4)。また、0.9%食塩水に対するPreferenceは、寒冷曝露を行なったPeriod 2において、常温のPeriod 1とPeriod 3のときと比較して有意に大きくなった(Table 5)。このときの餌と食塩水からのナトリウム摂取量はTable 6に示すようにPeriod 2で有意に多くなった。Fig 2は結腸温度の変化を示している。常温飼育を続けた群と比べて、再留水のみを与えて寒冷に曝露した群の寒冷曝露直後の結腸温度が有意に低くなっているが、食塩水を与えて寒冷に

曝露した群では有意な低下は認められなかった。

4. 考察

実験1によって、0.9%食塩水に対するPreferenceは、テストに先行して与えられた飼料や飲料水の食塩濃度によって変化することがわかった。これは、過去の食塩摂取歴が、現在のSalt preferenceに影響を及ぼすことを示している。また、実験2では、亜鉛の栄養状態によってSalt taste thresholdが変化することが確かめられた。これらの結果は、亜鉛の欠乏状態(Marginalあるいは軽症の)が、塩味識別閾値を変化させることを示している。

実験3で、寒冷が自発的な食塩摂取量増加をひきおこすこと、そのことが、寒冷下の結腸温維持に関係していることが観察された。この現象のメカニズムはいまのところ不明である。アンジオテンシンIIの脳内投与によってラットの食塩摂取が増加すること、この際、体温調節機構の1つであるNST(非ふるえ熱産生)の主要な調節因子として働くノルアドレナリンが関係していることがわかっている。寒冷刺激によるホルモン調節の変化が食塩摂取量増加に関与している可能性が大きいと考えられる。こうした一連の出来事から、食塩の多量摂取が寒冷下の体温維持に有利に働いており、自発的食塩摂取は低温環境への適応といえなくもない。しかし、我々の実験では、同時に、寒冷による摂食量の増加がおきたにもかかわらず、体重の変化がなかったことが観察されている。このことは、エネルギーバランスの面から考えると寒冷下における自発的な多量食塩摂取は、かえってエネルギー消費を高めることになる。食糧が十分に供給されない状況では、これが適応といえるかどうかについては、慎重な検討を要する問題であると考えられる。

5. 今後の研究課題

これまでの文献を総合すると、寒冷刺激によるホルモン調節の変化が食塩摂取量増加に関与している可能性が大きいと考えられる。また、石田ら(1985)や鈴木ら(1988)は、ヒトの塩味に対する味覚に関係する栄養素として、亜鉛の他に、ビタミンA、カルシウ

ム、マグネシウム、ナトリウム、カリウムを挙げている。これらのことから、寒冷曝露条件や、食塩の摂取条件を変化させたときのマウスの尿中カテコールアミン濃度を測定する予定である。同時に、尿中、各臓器中のカルシウム、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、亜鉛濃度を測定し、摂取量との関係を分析する必要がある。

また、寒冷による食塩摂取量の変化が、寒冷下の体温低下を防ぐための生理作用によるものか否かの検討を行なう。例えば、マウスに亜セレン酸投与を行なって低体温を引き起こし、食塩摂取量の有無を調べる。あるいは、寒冷への適応という側面から、食塩摂取と体温維持の関係を検討するため、低蛋白食や、低カロリー食を与えたときの食塩摂取の変化について、長期的な分析を行なう予定である。

Fig. 1.

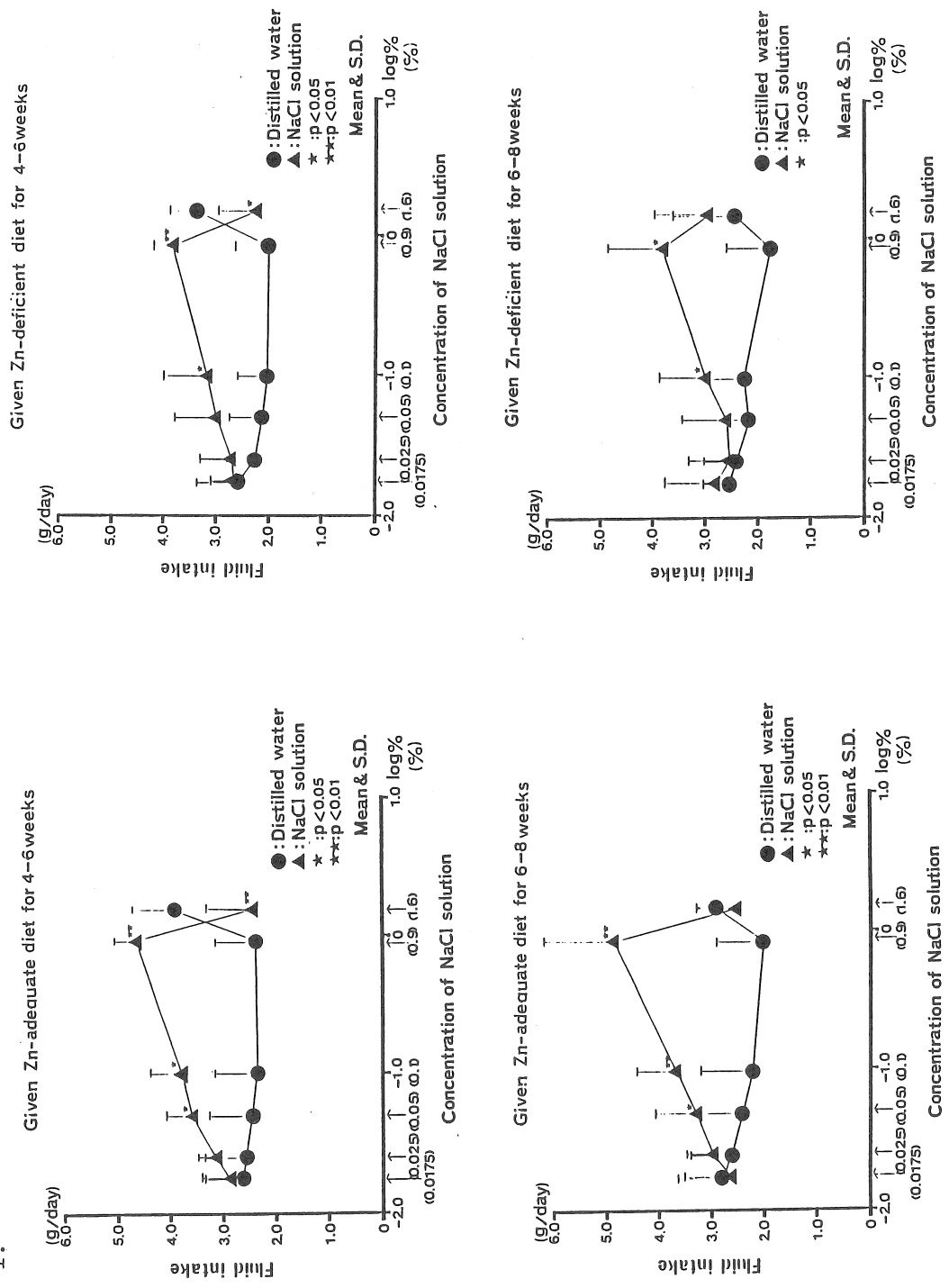
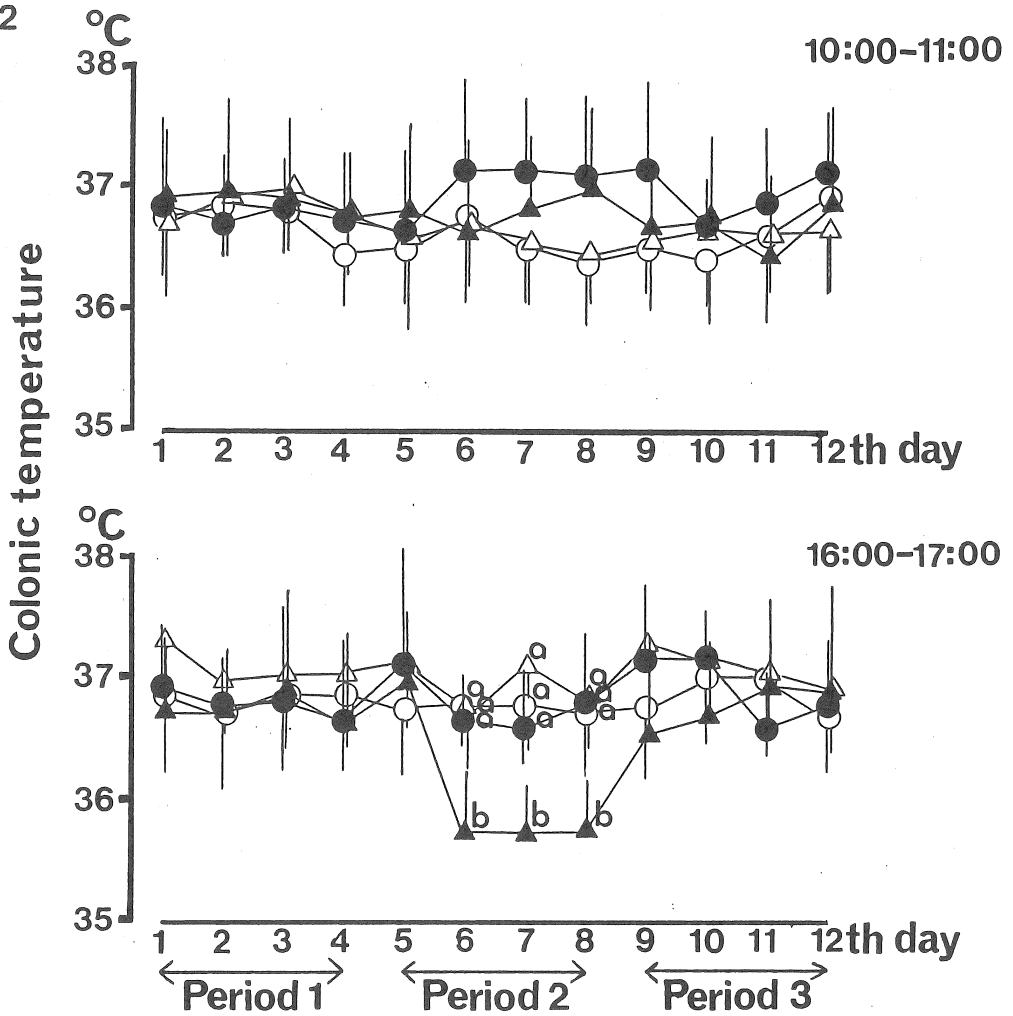


Fig.2



Room temperature	Normal		Normal	Cold (11:00-17:00)	Normal	
(0% & 0%)	△	▲	△	▲	△	▲
(0% & 0.9%)	○	●	○	●	○	●

Mean & S.D.

Marks with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Table 1 : PREFERENCE FOR 0.9% NaCl solution (Exp.1).

Solution Diet	GROUP 1 0% & 0% Normal ²⁾	GROUP 2 0% & 0% High-salt ³⁾	GROUP 3 0% & NaCl solution ¹⁾ Normal	ANOVA
Preference	40.4 ± 9.2 ^a	61.5 ± 13.8 ^b	75.5 ± 11.1 ^b	p < 0.01

- * Values show the mean ± S.D. of preference for 0.9% NaCl solution.
- * Preference was investigated after 2 weeks of breeding with each solution and diet.
- * Statistical tests were made after arc-sine conversion of the data.
- * a,b: Values with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test.
- * 1): Concentration of NaCl solution was raised from 0.0025% to 0.6% every two days.
- * 2): Normal diet contains 2.2 mg/g of sodium.
- * 3): High-salt diet contains 8.0 mg/g of sodium.

Table 2 : PLASMA ALP ACTIVITY (Exp.2).

DIET	DAYS OF SACRIFICE		
	0-day	42th day	56th day
Zn adequate ¹⁾	101.2 ± 20.31 ^a	57.37 ± 22.61 ^{b^x}	46.12 ± 7.48 ^{b^x}
Zn deficient ²⁾	101.2 ± 20.31 ^a	31.96 ± 8.98 ^{b^y}	25.54 ± 7.48 ^{b^y}
ANOVA..... (Day) p < 0.01; (Diet) p < 0.01; (Interaction) p < 0.01			

- * Values show the mean ± S.D. of plasma ALP activity (IU/l).
- * a,b: Values with different superscripts for the DAYS OF SACRIFICE are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.
- * x,y: Values with different superscripts for the DIET are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.
- * 1): Zinc adequate diet contains 50 μg/g of zinc.
- * 2): Zinc deficient diet contains 2 μg/g of zinc.

Table 3 : PLASMA ZINC LEVEL (Exp.2).

DIET	DAYS OF SACRIFICE		
	0-day	42th day	56th day
Zn adequate ¹⁾	0.85 ± 0.12	0.84 ± 0.08 ^x	0.88 ± 0.04 ^x
Zn deficient ²⁾	0.85 ± 0.12 ^a	0.47 ± 0.07 ^{b^y}	0.49 ± 0.08 ^{b^y}
ANOVA..... (Day) p < 0.01; (Diet) p < 0.01; (Interaction) p < 0.01			

- * Values show the mean ± S.D. of plasma Zinc level (μg/g).
- * a,b: Values with different superscripts for the DAYS OF SACRIFICE are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.
- * x,y: Values with different superscripts for the DIET are significantly different (p < 0.05) by Duncan's multiple range test.
- * 1): Zinc adequate diet contains 50 μg/g of zinc.
- * 2): Zinc deficient diet contains 2 μg/g of zinc.

Table 4 : FOOD INTAKE (Exp.3).

GROUP (NaCl solution)	PERIOD 1 (1-4th day)	PERIOD 2 (5-8th day)	PERIOD 3 (9-12th day)
(0% & 0%)	4.81±0.89 ^a	6.04±0.93 ^b	5.02±0.76 ^a
(0% & 0.9%)	4.95±0.81 ^a	6.08±0.78 ^b	5.00±0.92 ^a
ANOVA..... (Period) p<0.01; (Group) NS (Interaction) NS			

* Values in the table show the mean±S.D. of food intake (g/day).

* a,b: Values with different superscripts for the periods are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

* In Period 2, mice was exposed to cold temperature for 6 hours (11:00-17:00) everyday.

Table 5 : PREFERENCE FOR 0.9% NaCl SOLUTION (Exp.3).

PERIOD 1	PERIOD 2	PERIOD 3	ANOVA
33.71± 9.56 ^a	54.60± 5.42 ^b	34.73±15.11 ^a	p<0.01

* Values show the mean±S.D. of preference for 0.9% NaCl solution.

* a,b: Values with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple range test.

* Statistical tests were made after arc-sine conversion of the data.

Table 6 : TOTAL SODIUM INTAKE FROM FOOD AND 0.9% NaCl SOLUTION (Exp.3).

GROUP Diet & (NaCl solution)	PERIOD 1	PERIOD 2	PERIOD 3
Normal ¹⁾ & (0% & 0%)	10.48±1.95 ^{a*}	13.16±2.03 ^{b*}	10.95±1.65 ^{a*}
Normal & (0% & 0.9%)	17.88±2.48 ^{a^y}	24.84±2.45 ^{b^y}	18.04±4.20 ^{a^y}
ANOVA..... (Period) p<0.01; (Group) p<0.01; (Interaction) p<0.01			

* Values in the table show the mean±S.D. of sodium intake from food and NaCl solution (mg/day).

* In Period 2, mice was exposed to cold temperature for 6 hours (11:00-17:00) during consecutive 4 days.

* a,b: Values with different superscripts of for the periods are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

* x,y: Values with different superscripts of for the Groups are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

* 1): Normal diet contains 2.2 mg/g of sodium.

Behavioral and physiological aspects of spontaneous salt intake in mice exposed to various environmental conditions.

Tsuguyoshi Suzuki, Hiroshi Kashiwazaki & Yasushi Dejima
*Department of Human Ecology, School of Health Sciences,
Faculty of Medicine, University of Tokyo*

Summary

Spontaneous salt intake of male mice of ICR strain was investigated in the three different experimental conditions. In all the experiments, animals were housed individually in polycarbonate cage; two water-supply bottles were set on each cage, and animals could choose a bottle to drink freely. In Experiment 1, ten-week old mice were given normal diet (Zn: 50 μ g/g, Na: 2.2 mg/g) and distilled water (Group 1), high-salt diet (Na: 8.0 mg/g) and distilled water (Group 2), or normal diet and distilled water and NaCl solution (Group 3) for 2 weeks. In Group 3, concentration of NaCl solution was raised from 0.0025 % to 0.6 % stepwise every two days. At the end of 2 weeks, preference for 0.9% NaCl solution in Group 2 (61%) and in Group 3 (75%) was significantly higher than that in Group 1 (40%). In Experiment 2, five-week old mice were given zinc deficient diet (Zn: 2 μ g/g) or zinc adequate diet (Zn: 50 μ g/g) for 8 weeks. Growth, zinc levels in various organs and in plasma, hepatic metallothionein (MT) contents, plasma alkaline phosphatase (ALP) were measured at the end of 6 weeks and 8 weeks. Taste threshold for NaCl solution was investigated at 4-6 weeks for a half of mice, and at 6-8 weeks for another half. The threshold was 0.05% in the zinc adequate group, while 0.1% in the zinc deficient group, in the both tests at 4-6 weeks and at 6-8 weeks. Plasma ALP and plasma zinc level in the zinc deficient group were significantly lower than those in the zinc sufficient group both at the end of 6 weeks and 8 weeks. In Experiment 3, the effect of repeated short-term cold exposure on spontaneous salt intake and colonic temperature was investigated. A half of ten-week old mice were exposed to cold (8°C; 6 hours per day; 4 days), and another half of the group both with and without cold exposure were allowed to choose between drinking water with (0.9%) or without (0%) NaCl. In all the groups, normal diet was used. Mice provided with NaCl solution showed increased salt intake with cold exposure. Preference for 0.9% NaCl solution increased from 40% to 60%. Total sodium intake from food and NaCl solution also increased from 17 mg/day to 25 mg/day. In mice exposed to cold and provided with NaCl solution, colonic temperature stayed unchanged, whereas in those without NaCl solution colonic temperature decreased significantly after cold exposure.