

9026 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

鈴木 継美(東京大学)

味覚に影響を与える亜鉛の栄養状態、低温環境および低体温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2つの実験を行なった。使用したマウスは全てICR系雄で、8:00-20:00を明とする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個別に飼育した。

① 低亜鉛食による軽度の亜鉛欠乏状態が食塩嗜好、塩味識別閾値、各臓器中亜鉛レベル、血漿中ALP(Alkaline phosphatase)活性、肝臓および血中ALAD(δ -aminolevulinic acid dehydratase)活性、肝臓中MT(Metallothionein)含量にどのような影響を及ぼすかを調べた。低亜鉛食群の血漿および大腿骨中亜鉛濃度と血漿中ALP活性は飼育42日目と56日目に、また、肝臓中MT含量は飼育56日目に通常食群と比べ有意に低かった。塩味識別閾値は通常食群では0.05%であるのに対し、低亜鉛食群では飼育30-38、44-52日目ともに0.1%であった。食塩水嗜好は0.9%に対しては両群に有意差が無かったが、1.6%に対しては飼育40日目で低亜鉛食群に通常食群より強い嗜好が観察された。

② 寒冷刺激の無い常温下で、マウスに低体温を引き起こすことが知られている亜セレン酸を投与したところ、40 μ M/kg投与(低体温が6時間継続する投与量)により、0.9%食塩水に対する嗜好の増強(40→60%)が観察された。

9026 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

鈴木 継美 (東京大学)

1. 研究目的

昨年度から引続いて行なった一連の研究は、日本の東北地方において食塩摂取量が多い理由を生理学的に解析することを目的としている。昨年度の研究で、次の3つのことがわかった。

- 1) マウスの0.9%食塩水に対する Preference が、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した。
- 2) 低亜鉛飼料(Zn: 2 μ g/g)で6週間飼育したマウスの Salt Taste Threshold が通常亜鉛飼料(Zn: 50 μ g/g)で飼育したマウスに比べて高くなった。
- 3) 食塩水と再留水を自由に選択摂取できるようにしたマウスを1日6時間、4日間にわたって寒冷(5-9°C)に曝露したところ自発的食塩摂取量増加を引き起こし、そのことが寒冷下の体温保持に有効であることが示された。

以上の結果は、東北地方における寒冷環境や、塩蔵食品摂取による必須微量元素(亜鉛)の欠乏状態が食塩嗜好の引き金になっている可能性を示唆している。McConnelら(1974)や、Jakinovichら(1981)は重度の亜鉛欠乏状態がラットの食塩嗜好を変化させることを報告している。我々の行なった実験条件が重度の亜鉛欠乏状態なのか、現実の人に起こっていると考えられる Marginal な亜鉛欠乏状態を再現しているのかを確かめる必要がある。また、味覚と栄養を考えるためにはSalt Taste Threshold だけでなく、Salt preference の変化の有無も調べる必要がある。次に、最近の実験的研究(Kutaら、

1984)では、絶食、拘束といったストレスが実験動物の食塩嗜好を引き起こすことが報告されていることから、寒冷曝露による自発的食塩摂取がストレスによるものか、低体温に伴う生理学的反応によるものであるかを確かめる必要がある。これらのことを検討するため、マウスを使って、以下の2つの実験を行なった。

- ① 低亜鉛食飼育が Marginalな亜鉛欠乏状態を再現しているか否かを確かめ、その時の Salt Taste Threshold および Salt preferenceを調べる。
- ② 寒冷刺激の無い環境下でマウスに低体温を引き起こすことが知られている (Watanabeら, 1990) 亜セレン酸ナトリウムを投与し、自発的食塩摂取量増加が起きるかどうかを調べる。

なお、ここで言う Salt Taste Threshold とはマウスに食塩水と再留水を自由に選択できるような状態で飼育し、食塩水濃度を徐々に濃くしていったときに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、Salt Taste Threshold より濃い食塩水と再留水を自由に選択できるようにしたマウスの食塩水飲水量が総飲水量(食塩水+再留水飲水量)に占める割合(%)のことである。また、Marginalな亜鉛欠乏状態とは、体重、摂食量、飲水量の減少や、脱毛といった症状がなく、かつ、骨以外の臓器中亚鉛レベルが正常値で、血漿中亚鉛レベルが正常時より有意に低下した状態を指す(Waalkes, 1986)。

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 Marginalな亜鉛欠乏状態の検討と Salt preference の変化についての実験

35匹のマウスを使用した。マウスは4週齢で搬入後、通常飼料を与え、給水器を2本とも再留水として1週間飼育した後、7匹を屠殺し、0日目のデータとした。屠殺はエーテル麻酔下で行ない、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。血漿中亜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 (Metallothionein)量を、 ^{203}Hg -binding法で測定した。残りのマウスは、群間の体重差が無いように14匹ずつ2群にわけ、一方は通常飼料、他方は低亜鉛飼料(Zn: $2.0\ \mu\text{g/g}$)で飼育した。給水器は2本とも再留水とした(以下、通常飼料飼育群をZnA群、低亜鉛飼料飼育群をZnD2群)。飼育開始後30-38日目にかけて、各群半数の7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。給水器の位置が飲料水選択に及ぼす影響を取除くため、給水器の位置は1日おきに交換した。さらに、38-40日目に、0.9%食塩水、40-42日目に1.6%食塩水に対する Preference 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、各飲料水の24時間摂取量測定を2日間行なった。給水器の位置交換は毎日行なった。42日目にこれら7匹のマウスを0日目と同様に屠殺し、生体試料の分析を行なった。各群それぞれ残り7匹は飼育開始後44-52日目にSalt taste threshold、52-56日目に Salt preference の測定を行ない、56日目に屠殺した。

2. 2. 2 実験2 自発的食塩摂取量増加が寒冷ストレスによるものか低体温によるものかを検討するための実験

10週齢のマウスを7匹ずつ3群にわけ、常温で通常飼料および再留水と0.9%食塩水を与えた飼育条件のもとで、リン酸緩衝液(PBS)に溶解した亜セレン酸ナトリウムを各群それぞれ、0、30、40 μ

M/kg 頸部に皮下注射し、注射後1、2、4、6、8時間後の結腸温度をサーミスタ温度計で測定した(以下、各群をPBS群、SS30群、SS40群とする)。さらに、注射後24時間の飼料、再留水、食塩水摂取量を測定した。なお、0 μ M/kg 投与とは、リン酸緩衝液のみを注射したことを指す。また、注射液量は等しく 体重40 gあたり0.2 mlとなるようにした。

3. 結果

3.1 実験1

体重、摂食量、飲水量について、ZnD2群とZnA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。各群の臓器および血漿中亜鉛レベルをFigure 1に示した。脳、腎臓、肝臓、RBC中の亜鉛レベルは飼育後60日目まで、ZnA群とZnD2群の間に有意な差はみられなかった。一方、大腿骨と血漿中亜鉛レベルは、飼育42日目でZnD2がZnA群より有意に低い値を示した。血漿中ALP活性および肝臓中MT量をFigure 2に示した。ZnD2群の血漿中ALP活性は42日目から、また、肝臓中MT量は56日目からZnA群より有意に低い値を示した。Salt Taste Threshold はZnA群では飼育 30-38日目、44-52日目ともに0.05%であったが、ZnD2群では 30-38日目以降、1.0%であった。この結果は昨年度の結果と一致していた。Salt Preference を Figure 3 に示した。0.9%食塩水に対する Preference はZnA群、ZnD2群の間に有意な差はなかったが、1.6%食塩水に対する Preference は、飼育38-40日目以降、ZnD2群がZnA群より有意に強かった。

3.2 実験2

注射後の結腸温度変化をFigure 4に示した。SS30群は注射後2時間、SS40群は注射後6時間までの結腸温がPBS群に比べ、有意に低い値を示した。注射後24時間の摂食量を Figure 5に、飲水量をFigure 6に示した。SS30群の摂食量はPBS群と比べ、有意な差がなかったが、SS40群では有意に少なかった。また、SS30群の0.9%食塩水飲水量はPBS群と比べ、有意な差がなかったが、SS40群では有意に多かった。PBS群、SS30群、SS40群の Salt preference はそれぞれ、31.2%、48.2%、78.4%で、SS40群に Salt preference の有意な増強が認められた。

4. 考察

実験1によって、我々の低亜鉛飼料による飼育条件は Marginal な亜鉛欠乏状態を実験的に作り出すことに成功していることが確かめられた。また、肝臓中MT量の結果から、飼育56日目は42日目に比べ、亜鉛欠乏状態がより進行していることがわかった。さらに、Marginal な亜鉛欠乏状態により Salt taste threshold および1.6%食塩水に対する Preference が変化することがわかった。亜鉛の栄養状態が味覚に影響を及ぼし、高濃度の食塩に対する嗜好を強めたと考えられる。実験2では、寒冷刺激のない状態でも6時間の低体温が起これば自発的な食塩摂取量増加がひきおこされることがわかった。しかし寒冷曝露実験では摂食量の増加がみられたが、今回の実験では摂食量は減少していた。このため、昨年度の6時間寒冷曝露実験と本年度の薬物による6時間低体温実験を簡単に比較することは危険であるが、寒冷曝露による自発的な食塩摂取量増加は、寒冷ストレスだけではなく、低体温に伴う生理的メカニズムが関与している可能性が高くなった。寒冷曝露や低体温に伴う自発的な食塩摂取量増加が体温維持のための生理的反応であるとする、産熱に必要なエネルギー摂取量との関係を検討する必要があると考えられる。

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。今回の亜セレン酸投与実験の結果、寒冷による食塩摂取量の増加は、寒冷下の体温低下を防ぐための生理作用である可能性が高くなったが、亜セレン酸投与の場合でも食塩摂取量増加が低体温を防ぐ効果があるかどうかを確かめる必要がある。また、いずれの実験条件においても摂食量との関係を調べなければ

ならない。今後、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。

6. 参考文献

McConnel, S.D. and Henkin, R.I. (1974)

Altered preference for sodium chloride, anorexia, and changes in plasma and urinary zinc in rats fed a zinc-deficient diet. *J.Nutr.* 104, 1108-1114.

Jakinovich, W.Jr., and Osborn, D.W. (1981)

Zinc Nutrition and salt preference in rats. *Am.J.Physiol.* 241, R233-R239.

Kuta, C.C., Bryant, H.U., Zabik, J.E., & Yim, G.K.W. (1984)

Stress, endogenous opioids and salt intake. *Appetite*, 5, 53-60.

Watanabe, C., Suzuki, T., Ohba, T., & Dejima, Y. (1990)

Transient hypothermia and hyperphagia induced by selenium and tellurium compounds in mice. *Toxicol.Let.*, 50, 319-326.

Waalkes, M.P. (1986)

Effect of dietary zinc deficiency on the accumulation of cadmium and metallothionein in selected tissues of the rat. *J.Toxicol.Environ.Health*, 18, 301-313.

厚生省保健医療局健康増進栄養課編

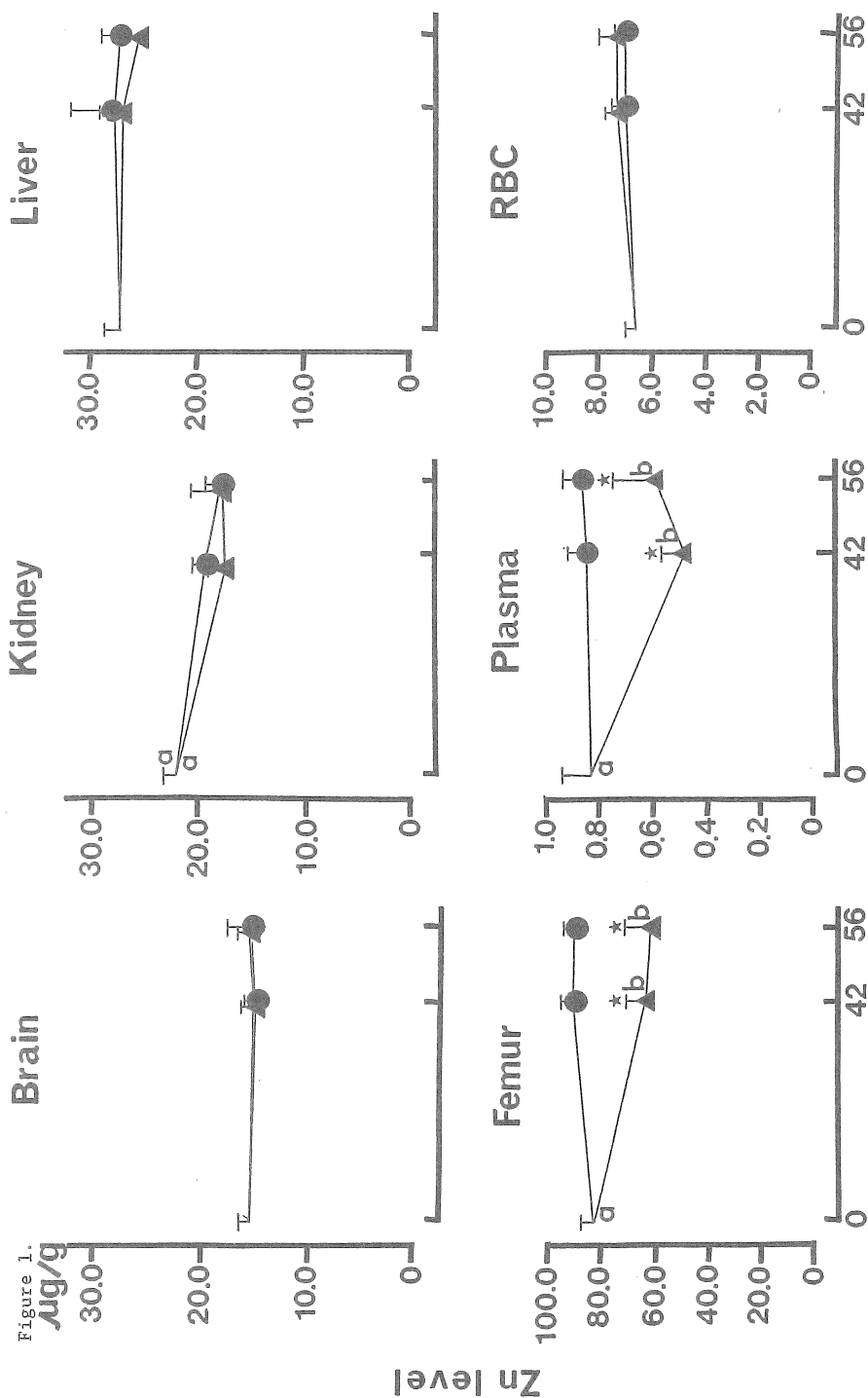
国民栄養の現状 平成元年度版 第一出版

Ishida,H., Takahashi,H., et al. (1985)

J. Nutr. Sci. Vitaminol., 31, 585-598.

Suzuki,T., Ishida,H., et al. (1988)

J. Nutr. Sci. Vitaminol., 34, 209-222.



Experimental day

Zinc levels in tissues and blood on each sacrifice day.

Marks in the figure show mean & S.D. of Zinc levels in the brain, Kidneys, Liver, femur, plasma, and RBC in the ZnA group (●) and in the ZnD2 group (▲). Each group consists of 7 mice. Marks with different superscripts a, b values show statistically different ($p < 0.05$) by Tukey's multiple range test.

Figure 2.

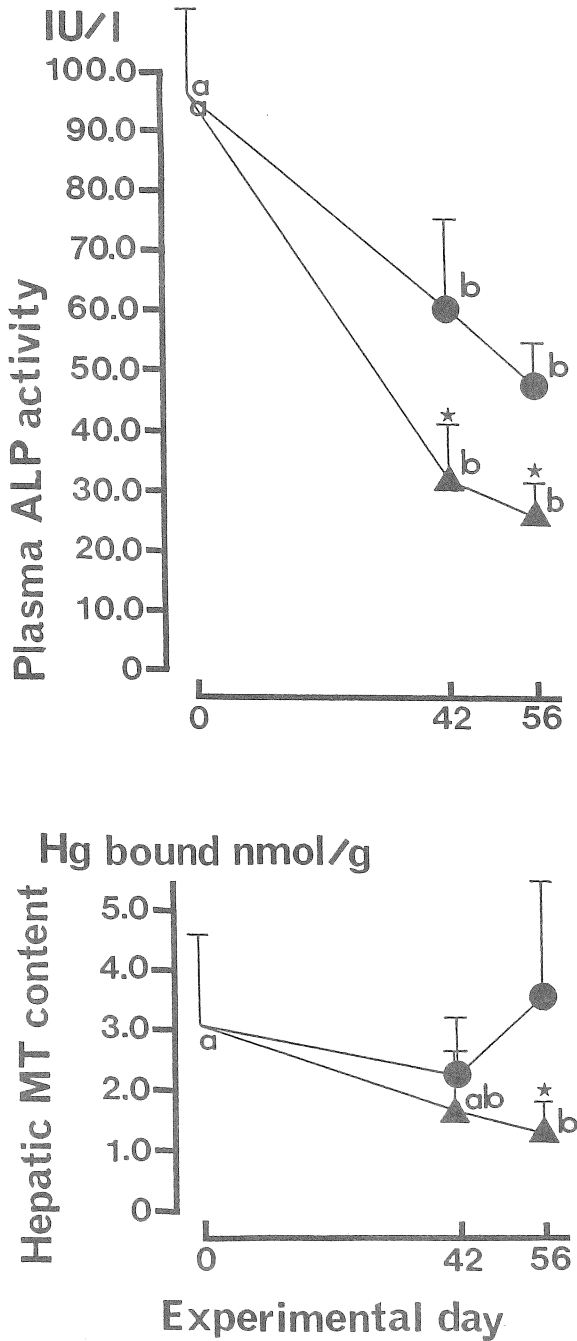
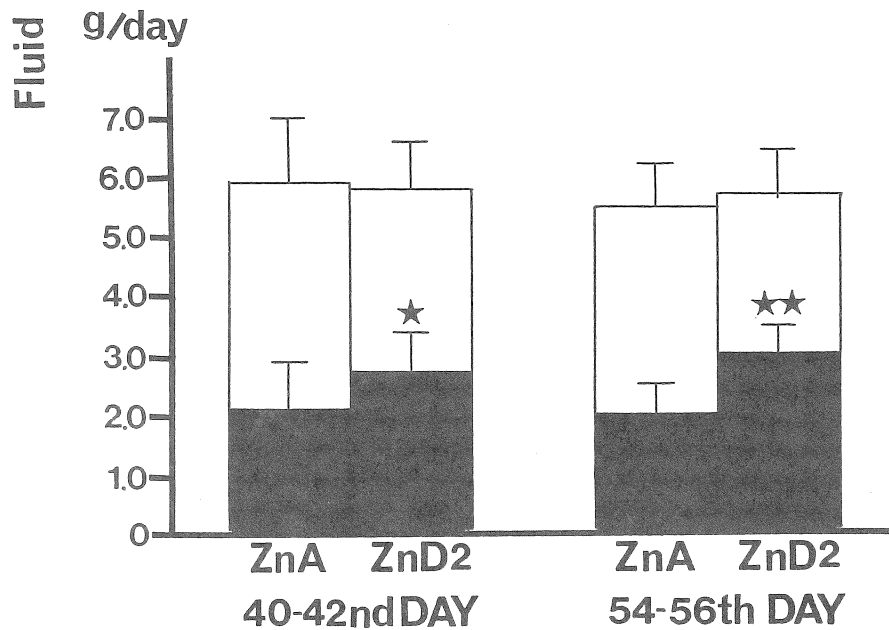
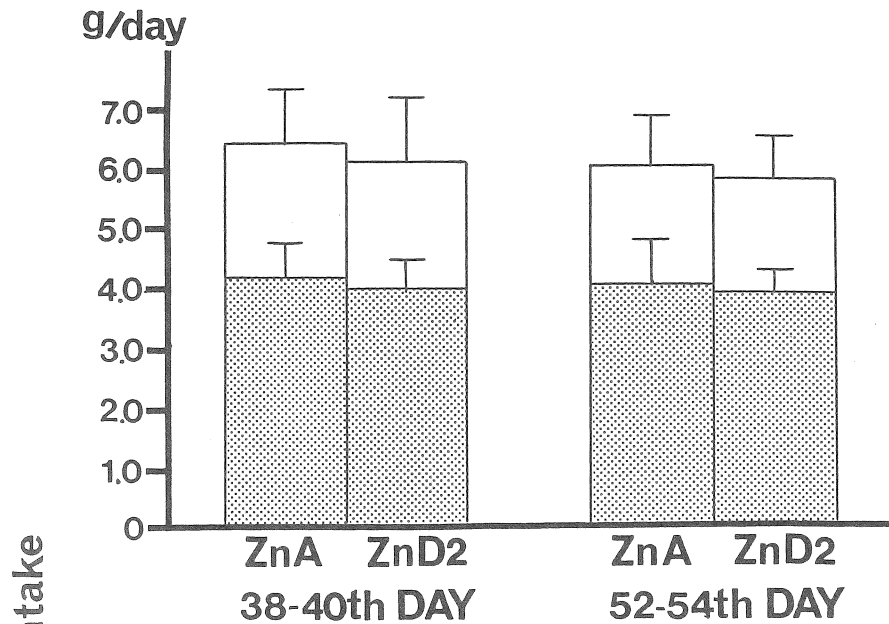


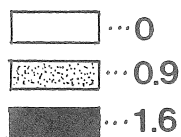
Fig. 2. Alkaline phosphatase(ALP) activity in plasma and hepatic metallothionein (MT) content on each sacrifice day.

Marks in the figure show mean & S.D. of plasma ALP activity and hepatic MT content in the ZnA group(●) and in the ZnD2 group(▲). Marks with different superscripts a,b show significantly different ($p < 0.05$) values by Tukey's multiple range test.

Figure 3.



Fluid intake in the preference test.



Bars in the figure show mean & S.D. of fluid intake in the salt preference test. White bars indicate distilled water intake, dot bars indicate intake of 0.9% NaCl solution, and black bars indicate intake of 1.6% NaCl solution. Black bars with * (p<0.05) and ** (p<0.01) in the ZnD2 group are significantly different from those in the ZnA group.

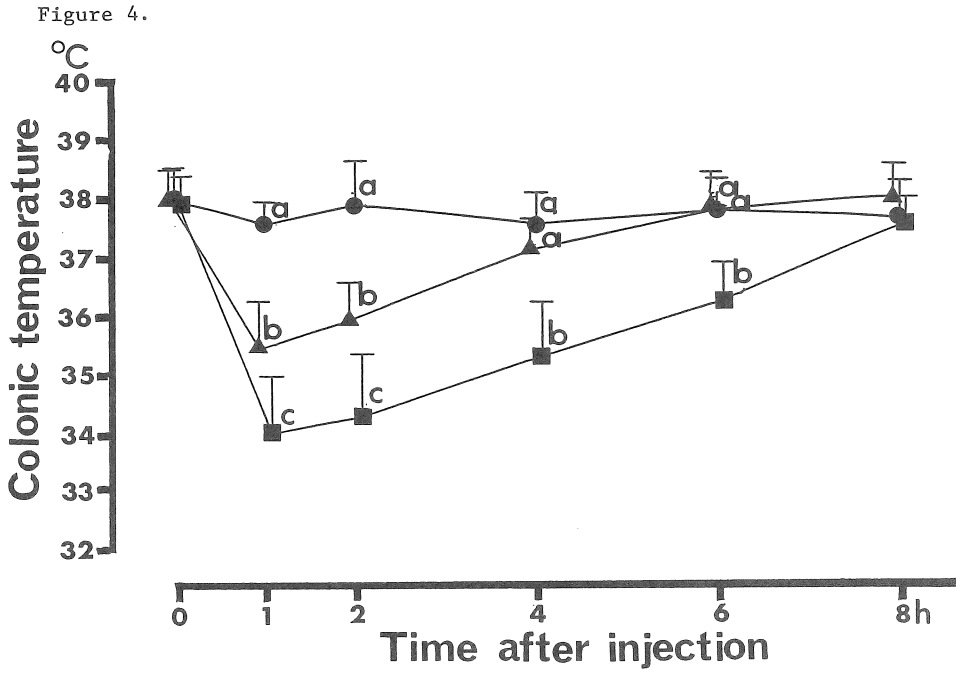


Fig.4. Colonic temperature after injection.

Marks in the figure show the mean & S.D. of colonic temperature in the PBS group (●), in the 30 μM/kg injected group (▲), and in the 40 μM/kg injected group (■). Marks with different superscripts a, b, c are statistically different ($p < 0.05$) by Tukey's multiple range test.

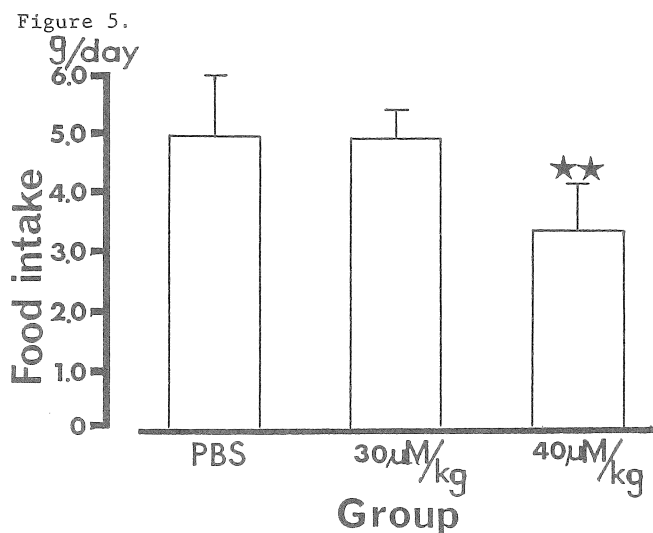


Fig.5. Food intake in each group.

Bars in the figure show mean & S.D. of food intake in 24 hours after injection. Bar with **($p < 0.01$) in the 40 μ M/kg injected group is significantly different from the PBS injected group.

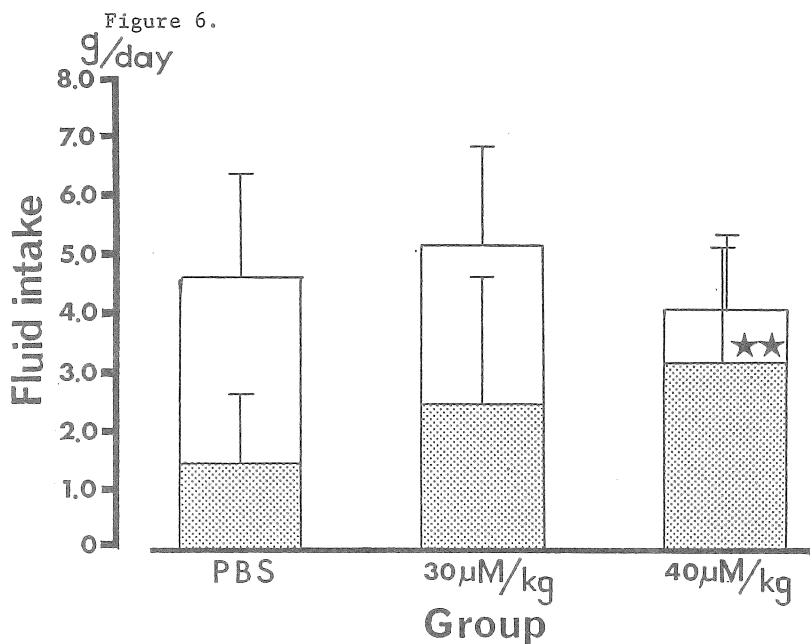


Fig.6. Fluid intake in each group.

Bars in the figure show mean & S.D. of fluid intake in 24 hours after injection. White bars indicate distilled water intake, dot bars indicate intake of 0.9% NaCl solution. Dot bar with **($p < 0.01$) in the 40 μ M/kg injected group is significantly different from the PBS injected group.

No.9026 Behavioral and Physiological aspects of spontaneous salt intake in mice exposed to various environmental conditions.

Tsuguyoshi Suzuki¹, Hiroshi Kashiwazaki¹ & Yasushi Dejima²

1. *Department of Human Ecology, School of Health Sciences, Faculty of Medicine, The University of Tokyo.*
2. *Department of Human Ecology, School of Health Sciences, Faculty of Health Sciences, Kyorin University.*

Summary

Spontaneous salt intake of male mice of ICR strain was investigated in the two different experimental conditions. In both of 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, five-week old mice were given zinc adequate diet (Zn: 50 μ g/g) and distilled water (Group ZnA), or zinc deficient diet (Zn: 2 μ g/g) and distilled water (Group ZnD2) for 8 weeks. Growth, zinc levels in various tissues, and in plasma, hepatic metallothionein (MT) contents, and plasma alkaline phosphatase (ALP) activity were measured at the end of 6 weeks and 8 weeks. Taste threshold for NaCl solution and Preference for 0.9% and 1.6% NaCl solution was investigated at 4-6 weeks and 6-8 weeks. Growth of mice was not significantly different between in Group ZnA and in Group ZnD2 throughout the experiment. ALP activity in plasma, and zinc levels in plasma and femur in the Group ZnD2 was significantly lower than those in Group ZnA both at the end of 6 weeks and 8 weeks. Hepatic MT content was significantly lower in Group ZnD2 than in Group ZnA only at the end of 8 weeks. Zinc levels in brain, kidney, liver and red blood cell were not significantly different between the two groups both at the end of 6 and 8 weeks. Thus, marginal zinc deficiency was successfully produced in Group ZnD2. Salt taste threshold in Group ZnA was 0.05%, although, it was shifted to 1.0% both at the end of 6 and 8 weeks in Group ZnD2. Preference for 0.9% NaCl solution was the same in both of two groups (about 40%). However, preference for 1.6% NaCl solution was significantly higher in Group ZnD2 than in Group ZnA both at the end of 6 and 8 weeks. In Experiment 2, 10-week old mice were subcutaneously injected 0, 30 or 40 μ M/kg of sodium-selenite (SS) dissolved in PBS. Hereafter, we call those group of mice as PBS, SS30, and SS40 respectively. Colonic temperatures at 1, 2, 4, 6, 8 hours after injection were measured. Food intake and preference for 0.9% NaCl solution in 24 hours after injection were measured. Colonic temperature of mice in SS40 was significantly lower than in PBS during 6 hours after injection. Colonic temperature in SS30 was significantly lower than in PBS during 2 hours after injection. Preference for 0.9% NaCl solution was significantly higher in SS40 (78.4%) than in PBS (31.2%), while it was the same between in SS30 (48.2%) and in PBS. Food intake of mice in SS40 was significantly lower than in PBS, while it was the same between in SS30 and in PBS.