

## 9254 食塩の味の成り立ちと嗜好性発現の生理機構

助成研究者:山本 隆(大阪大学 人間科学部)

共同研究者:志村 剛(大阪大学)

:裕 哲嵩(大阪大学)

食塩(NaCl)は、基本味の1つである塩から味を呈する代表的な物質としてよく知られている。しかし、塩から味発現に際して、NaイオンとClイオンのいずれの刺激効果が重要なのか、あるいは、両イオンがどのようなバランスで刺激効果を発揮することが重要なのかに関しては今なおよく分っていない。本研究は、食塩を含む数多くのナトリウム塩、カリウム塩の溶液を用いて、その呈味作用における陽イオンと陰イオンの働きを明らかにすることを目的に行なったものである。

また、食塩は、低濃度から高濃度にわたって、その味の質にはほとんど変化がないが、等張濃度以上になると、その味を嫌悪するようになる。この濃度変化によって生じる嗜好性変化のメカニズムを中枢神経での味覚情報投射様式の上から考察したい。

受容器レベルでのNaイオンの作用を調べるため、Naチャンネルのブロッカーであるアミロライドを用いて実験を行った。実験には、体重250-400gのウィスター系雄性ラットを用い、通法に従って、鼓索神経からの積分応答を記録した。蒸留水と $10^{-4}$ Mのアミロライド溶液のそれぞれに溶解した20種類のNa塩、および、蒸留水に溶かした同種のK塩を味刺激として用いた。Na塩アミロライド溶液の刺激に対して、一過性のphasic応答とそれに続くtonic応答が得られた。これらの応答をNa塩蒸留水溶液の応答と比べると、phasic応答の大きさはほぼ同じであったが、tonic応答は、陰イオンの種類により50-100%の減少を示した。Na塩アミロライド溶液のtonic応答は、K塩の応答と非常に良い相関を示した。さらに、条件づけ行動実験と単一線維応答パターンの分析から、アミロライド処理後のNa塩応答は陰イオンによる刺激効果であること、ラットでは、Kイオンの刺激効果はほとんどみとめられず、K塩の味応答は、陰イオンに対する応答である可能性が示唆された。

ラットにNaCl溶液を十分に摂取させたとき活動する中枢部位をFOS蛋白質をマーカーとして味覚の第2次中継核である結合腕傍核レベルで検索すると、大きく3つの場所に分かれることが明かとなった。1つは、中心外側亜核で、この部位では、NaClに限らずラットが好んで摂取する溶液であれば必ず細胞が興奮することから、快情動に関与していることが示唆される。また、外部外側亜核は内臓性感覚刺激で興奮する部位であるから、NaCl摂取による消化管からの情報を受けとっている可能性がある。最後に、内側亜核であるが、この部位のFOS蛋白質のみは、アミロライドにより、Naイオンの作用をなくすると大きく減少することから、この部にNaイオンの情報が入力するものと考えられる。このようにNaCl摂取に際して、機能的に異なった部位の細胞が活動することがわかった。



## 9254 食塩の味の成り立ちと嗜好性発現の生理機構

助成研究者:山本 隆(大阪大学 人間科学部)

共同研究者:志村 剛(大阪大学)

:裕 哲嵩(大阪大学)

## 目 的

食塩(NaCl)は、基本味の1つである塩から味を呈する代表的な物質としてよく知られている。しかし、塩から味発現に際して、NaイオンとClイオンのいずれの刺激効果が重要なのか、あるいは、両イオンがどのようなバランスで刺激効果を発揮することが重要なのかといった基本的な受容器刺激機序についてはよく分っていない。したがって、本研究は、食塩を含む数多くのナトリウム塩、カリウム塩の溶液を用いて、その呈味作用における陽イオンと陰イオンの働きを明らかにすることを目的に行なったものである。

また、食塩は、低濃度から高濃度にわたって、その味の質にはほとんど変化がないが、等張濃度以上になると、その味を嫌悪するようになる。この濃度変化によって生じる嗜好性変化のメカニズムを中枢神経での味覚情報投射様式の上から明らかにする。

## 方 法

## 1. 電気生理学の実験

ウィスター系雄性ラットを使用し、ソムノペンチル(50mg/kg)麻酔下にて実験を行なった。麻酔レベルを深く維持するため必要に応じてウレタン(750mg/kg)を追加した。通法に従って鼓索神経を露出し、周囲組織から分離し、白金線電極を用いて神経の電気活動を記録した。各種味溶液を舌表面に与えたとき、神経束全体からの応答を調べる場合は、積分計を介してペンレコーダーに記録し、基線からの高さを計測した。単一神経線維の応答は、単位時間あたりのインパルス数をカウントすることにより求めた。

味刺激は、NaClを含む23種類のNa塩、K塩溶液で、それぞれ、蒸留水に溶解したもの、各種濃度のアミロライド溶液に溶解したものをを用いた。

## 2. 行動学的実験

ウィスター系雄性ラットを用い、条件づけ味覚嫌悪学習を獲得させた。条件刺激

として各種の塩溶液をラットに十分摂取させたあとで、無条件刺激として0.15M LiClを腹腔内注射した。その後、ラットに各種テスト溶液をあたえ、20秒間のリック数を計測した。

### 3. 免疫組織化学的実験

ウィスター系雄性ラットに蒸留水あるいはアミロライド溶液にて作製した食塩水を十分に摂取させた。摂取開始1-2時間後に、動物をペントバルビタールで麻酔し、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定した。脳を取り出し、同固定液で4~24時間固定した後、30%蔗糖液で一晩洗浄し、50 $\mu$ mの切片を作成した。c-fos様免疫活性は一次抗体として家兎免疫c-fos抗体(0.2 $\mu$ g/ml; Oncogene Sci., Inc. USA)を用い、PAPにて染色した。なお、最終反応は硫酸ニッケルで増強した。反応した切片はニュートラルレッドで対比染色を施した。

## 結 果

### 1. 味覚神経応答

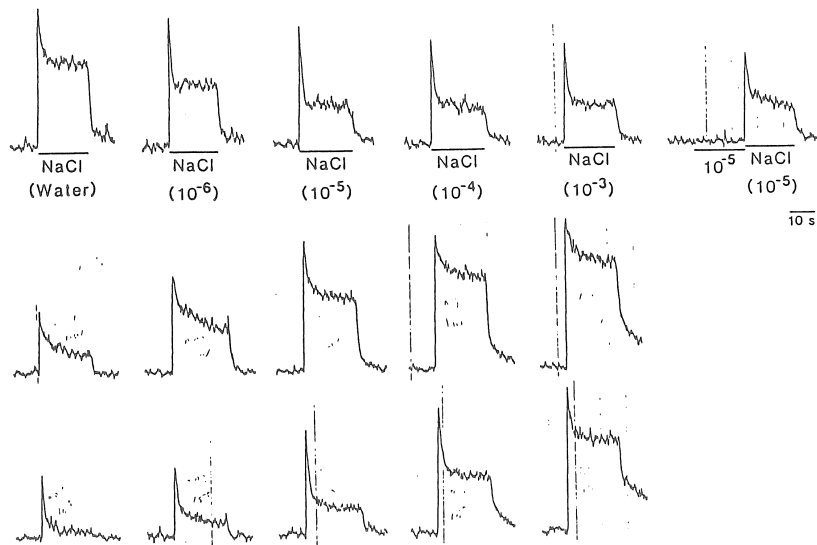


Fig-1 Responses to NaCl

図1は、0.1M NaClに対するラットの鼓索神経の積分応答である。左端は蒸留水に溶解したNaCl、ついで、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、 $10^{-4}$ M、 $10^{-3}$ Mのアミロライド溶液に溶かしたNaClを蒸留水でよく順応させた舌に与えたときの応答である。phasic相の大きさは、アミロライド濃度の増大とともに減少するが、steady相の大きさは $10^{-6}$ Mで約70%に、 $10^{-5}$ Mから $10^{-3}$ Mでは、約50%と一定の大きさに減少した。右端の積分応答は、前もって $10^{-5}$ Mのアミロライド溶液を舌にかけておいて、 $10^{-5}$ Mに溶か

した0.1M NaClを舌に与えたときの応答である。先の場合と異なってphasic応答が減少したが、steady応答に差はなかった。以上の結果から、NaClをアミロライド溶液に溶かしたとき、はじめのPhasic応答は、アミロライドとNaイオンが競合し、一部Naイオンの応答が混っているが、steady応答は、 $10^{-5}$ Mの濃度で十分にNaイオンの作用をブロックしうるものと考えられる。

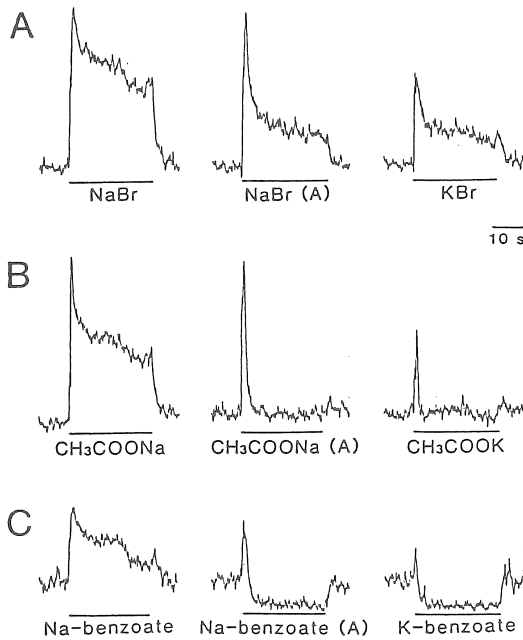


Fig-2 Responses to Salts

を生じることがわかる。なお、アミロライドに溶かしたNa塩が大きなphasic応答を示すのは、前述のように、一過性のNa応答を反映したものと考えられる。

図3は23種類のNa塩の応答が $10^{-5}$ Mのアミロライドの作用でどのような変化を受けるかをまとめたものである。黒丸印で示す蒸留水溶液のphasic応答はアミロライド溶液にすると白丸印で示す応答になり、黒三角で示すsteady応答は、アミロライドの作用で、白三角で示す応答になる。いずれの場合も、phasic応答の大きさはあまり差がないが、steady応答は、アミロライド溶液にすると大きく減少することがわかる。

16種類の塩について、そのK塩の応答も調べると、K塩のsteady応答は、星印で示すように、アミロライド作用によるNa塩の応答とよく一致することがわかる。

このようなアミロライド作用後のsteady応答の大きさは、化学物質のいかなる性質を反映したものであるかを探るため、塩の分子量、および、溶液のpHとの相関を求めてみた。図4に示すようにpH増大、分子量増大とともに、応答量は有意に減少することがわかった。すなわち、分子量が大きい程、陰イオン自身の刺激作用が減少することが示唆された。なお、pHが下がるほど応答が増大するのは、水素イオンに

Na塩は、その陰イオンの種類によって、異なった影響を受ける。図2には、代表的な3種類の応答を示す。図2-Aは、 $10^{-5}$ Mのアミロライドの作用で、steady応答が残る場合で、これはNaBrの応答例を示す。図2-Bは、ほとんどsteady応答が消失する場合で、CH<sub>3</sub>COONaの応答例である。図2-Cは、steady応答が抑制型に変わる場合で、安息香酸ナトリウムの応答例である。

図2の右端に示すのは共通の陰イオンを持つK塩、すなわち、KBr、CH<sub>3</sub>COOK、安息香酸カリウムの水溶液に対する応答である。共通の陰イオンを持つとき、アミロライドに溶かしたNa塩と水に溶かしたK塩とは、ほとんど同じ大きさ、パターンに応答

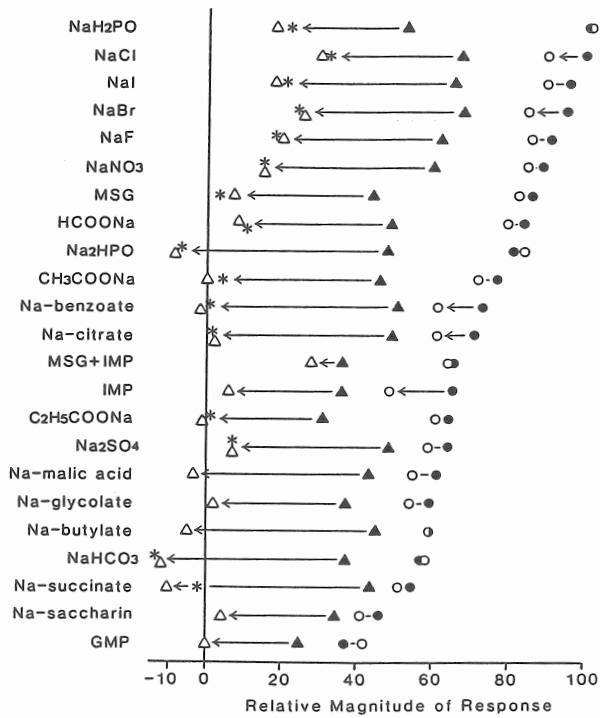


Fig-3 Effects of Amiloride

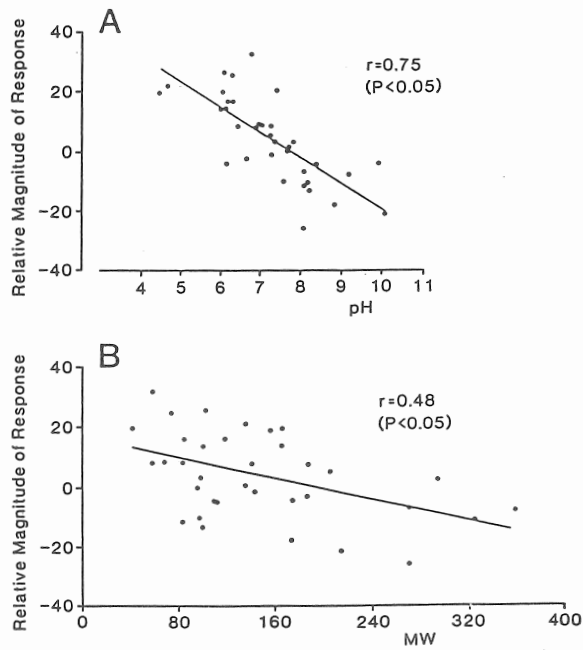


Fig-4 Effects of pH and MW

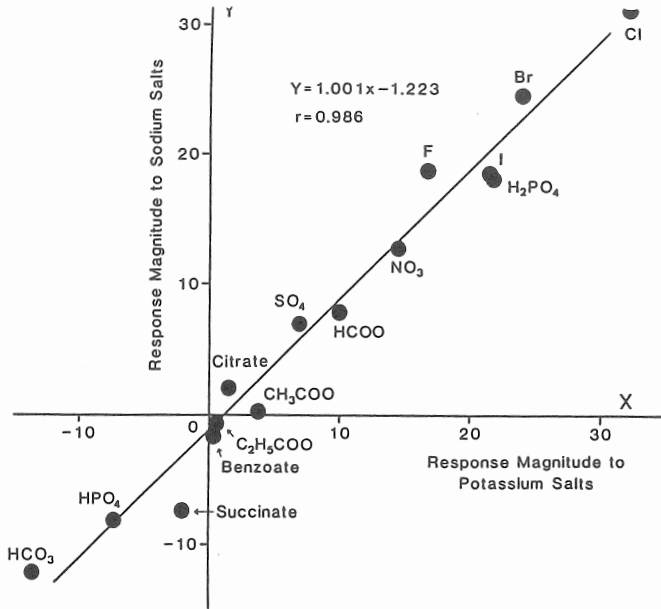


Fig-5 Responses to Na and K Salts

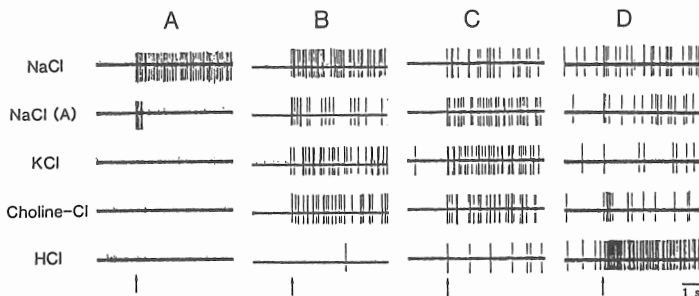


Fig-6 Single Fiber Responses

答が含まれることが明かである。

Bは、NaイオンとClイオンにも応じるもので、Cはむしろ、Naイオンには応じず、Clイオンによく応じるものである。Dは、HCl、すなわち、水素イオンに特異的に応じるタイプである。

図7は14種類の塩溶液を味刺激に用いたとき、41本の神経線維が示すインパルス数をもとに、各味刺激間の相関係数を取り、味質間の類似度をクラスター分析したものである。刺激後最初の1秒間のphasic相の神経情報は、Naイオンを含むものの味、Kイオンを含むものの味、HClの味を区別できるのみであるが、次の、1秒間あるいは、刺激後5～10秒間のsteady相の応答には、Naイオンの味、プロピオン酸イオンの味、臭素イオン、ヨウ素イオンの味、塩素イオンの味、そして塩酸の味というように、細分化された情報分析が行われていることがわかる。

また、Na塩のアミロライド溶液は、最初の1秒間は、Naイオンの作用のため、Na

よる刺激作用が加わったためと考えられる。

先に示したように、アミロライドに溶かしたNa塩のsteady応答は、K塩水溶液のsteady応答とよく似ていることが示唆された。そこで、両者の相関を調べると、図5に示すように、きわめてよい相関を示し、回帰直線の傾きも、1.001と両者の応答量がほぼ等しいことを示している。

次に、鼓索神経単一神経応答を検討した(図6)。分析した41本の線維はA～Dの代表例で示すように大きく4つのタイプに分けることができた。

Aは、NaCl水溶液によく応じ、NaClアミロライド液に一過性に応じ、他のCl塩には応じないもので、Naイオンspecificに応じるタイプである。積分応答記録からの予測どおり、phasic応答の中には、一過性のNaイオン応

イオングループに属するが、steady相では、それぞれの陰イオンのグループに属することがわかる。

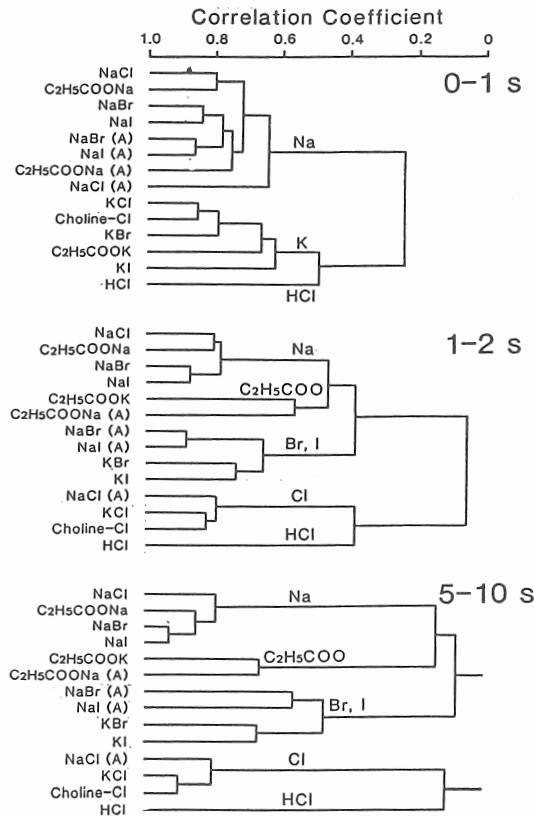


Fig-7 Classification of Salt Responses

## 2. 味覚嫌悪学習

以上の、電気生理学的実験から得られた知見を味覚嫌悪条件づけ法を用いた行動学的実験で確かめた。

図8は、その結果をまとめたもので、各グラフの左に書いてある溶液で条件づけをしたとき、その汎化の程度をもとに、たて軸に類似度をとったもので、1に近い程、条件刺激と試験刺激の味が類似していることを表す。

ラットが、NaClの水溶液と似た味と判断するのは、この白丸で示すように、NaCl、NaBr、NaI、プロピオン酸Naである。

それに対し、NaClのアミロライド溶液の味は、KCl、NaBrのアミロライド液、KBrなどと類似の味と感じ、KClの味も、同じようなパターンを示した。NaBrのアミロライド液やNaIアミロライド液の場合も、それぞれ、Brイオンやヨウ素イオンを含む溶液と類似した味を呈することがわかる。

以上、本実験結果をまとめると、Na塩をアミロライド液に溶解して、Naイオンの



刺激効果のみを選択的にブロックしたあとの応答は、その塩の陰イオンの刺激効果によるものであること、また、K塩の場合は、Kイオンの刺激効果はほとんどなく、その応答は、陰イオンの刺激作用によるものであることが明らかとなった。

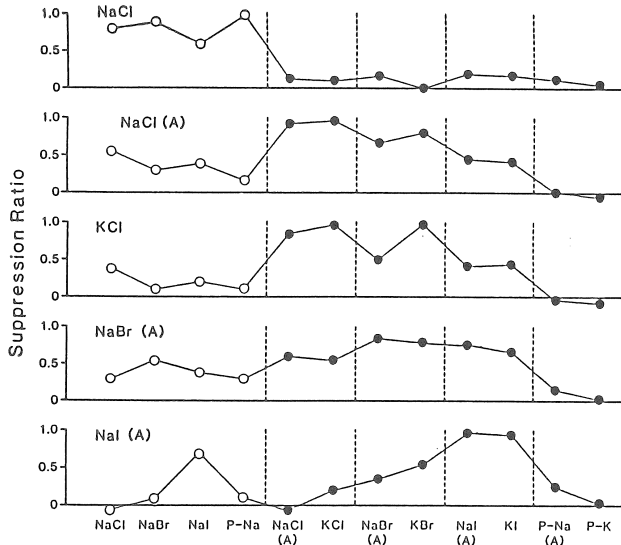


Fig-8 Results of Behavioral Experiment

### 3. 食塩味覚情報の中枢投射

0.2M NaCl水溶液を1時間呈示すると、絶水ラットは平均約16ml摂取した。摂取開始1時間後に産生されるFOS蛋白質を調べると、結合腕傍核では、橋背側部が下丘と結合するレベルよりやや尾側部の中心外側 (central lateral) 亜核と外部外側 (external lateral) 亜核の2ヶ所にFOS蛋白質免疫活性を示す細胞 (*c-fos*ニューロン) が局在化していた (図9-A)。そのまま尾側にたどると、結合腕の腹側、すなわち、内側 (medial) 亜核に *c-fos*ニューロンが集合して存在するようになり (図9-B)、これは、顔面神経根の付近まで続く。

NaClを蒸留水、もしくは、 $5 \times 10^{-5}$ Mのアミロライド溶液で0.2Mとなるように作製し、1時間自由に摂取させたあとの *c-fos*ニューロンの分布を調べた。図10に示すように、アミロライド液の場合は、内側亜核の *c-fos*ニューロンがほとんど認められないが、中心外側亜核と外部外側亜核では、両溶液間で差は認められなかった。アミロライドはNaイオンの味刺激作用をブロックすることが知られているので、以上の結果は、内側亜核にNaイオンの味覚情報が投射することを示唆する。中心外側亜核では、0.1M NaCl、蔗糖、サッカリン、ポリコースなどラットが好んで摂取する味刺激でより多くの *c-fos*ニューロンが出現することから、快情報に関係し、外部外側亜核の *c-fos*ニューロンは、内臓感覚情報の投射部とほぼ一致することから、消化管に溶液が入ったことによる内臓からの求心性情報により興奮したものと考えられる。

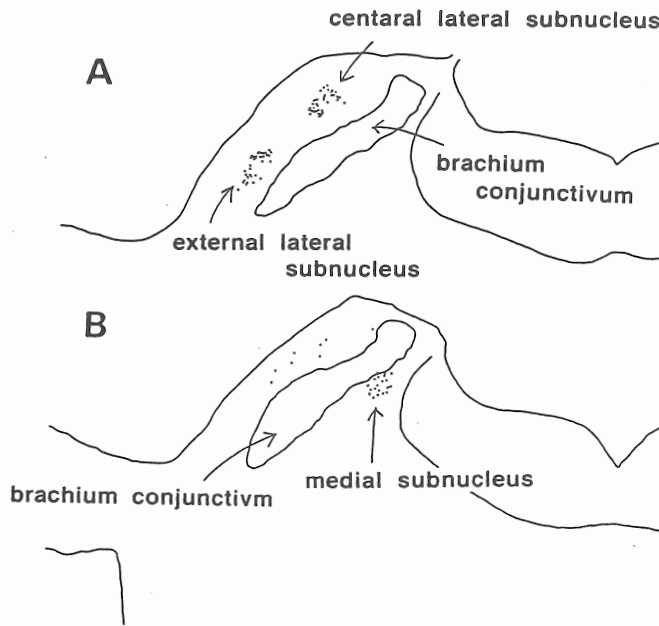


Fig-9 *C-fos* Neurons in the PBN

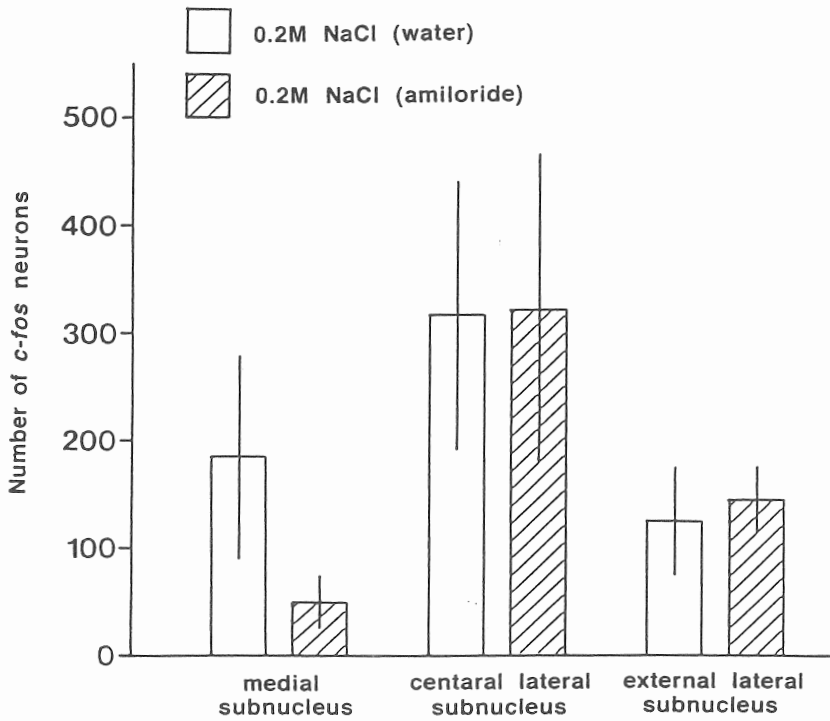


Fig-10 Effects of Amiloride on *C-fos* Neurons

## 考 察

本実験により、アミロライドというNaイオンチャンネルのプロッカーを用いて、Naイオンの刺激作用のみを抑えることにより、陰イオンの刺激作用を分析することができることが明かとなった。NaClは、基本味の1つである塩から味を有する物質としてよく知られているが、本研究により、その味は、NaイオンとClイオンの刺激効果の混合により生じるものであることが示唆された。ヒトの場合でも、前もってアミロライド溶液を口に含んで順応させておいたあとで、NaClを味わうと塩かい味は消失して、むしろ、やや苦いような味に変化することが知られている。一方、プロピオン酸ナトリウムのように、アミロライドの作用で完全に応答が消失することから、陰イオンの刺激作用がなく、Naイオンの刺激作用のみを有すると考えられる物質の味は、せっけんをなめたような味がすることも知られている。すなわち、Naイオンの刺激作用のみでは、決して、純粹の塩からい味は生じないのである。

また、本研究で、Na塩とK塩の味を比べてみると、アミロライドに溶解して、Naイオンの作用を抑えたNa塩の味は電気生理学的にも、行動学的にも、きわめてK塩の味に類似していることが明かとなった。このことは、Kイオンの味覚作用はほとんどなく、K塩の味の質は、陰イオンによって決定されていることを示唆している。

さらに、陰イオンの刺激作用は、Cl、Br、I、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>COOの各イオンで異なっていることが、単一味覚神経の応答様式と味覚嫌悪学習の汎化パターンの分析から明確となった。

NaClの味覚情報の中樞投射をFOS蛋白質をマーカーとして結合腕傍核レベルで検索すると、大きく3つの場所に分かれることが明かとなった。1つは、中心外側亜核で、ここの部位では、NaClに限らずラットが好んで摂取する溶液であれば必ず細胞が興奮することから、快情動に関与していることが示唆される。また、外部外側亜核は内臓性感覚刺激で興奮する部位であるから、NaCl摂取による消化管からの情報を受けとっている可能性がある。最後に、内側亜核であるが、この部位のFOS蛋白質のみは、アミロライドにより、Naイオンの作用をなくすると大きく減少することから、この部にNaイオンの情報が入力するものと考えられる。このように、同じ結合腕傍核であっても、部位により異なった機能を有することがわかった。

## 今後の課題

1. 本研究では、NaClを代表とする各種塩溶液の味は、それを構成する陽イオンと陰イオンの刺激作用の複合味として特徴づけられることが明確となった。このような知見は、アミロライドというNaイオンブロッカーの働きで明かになったのであるが、逆に、陰イオンのブロッカーの作用でやはり、同様の結論に達するのかを調べてみる必要がある。従来、困難であったそのような陰イオンブロッカーがはっきり同定されれば、陰イオンの味覚刺激作用のメカニズムも明確になるものと期待される。
2. 中枢神経系において、NaClの情報がどのような部位に投射するのかをより明らかにする必要がある。つまり、他の基本味質との比較において、味覚中枢が局在配列されているのか、あるいは、混在しているのかを明確にする必要がある。
3. また、本研究で示唆された、快情報に関与する部位が存在するなら、反対に、高濃度NaClを嫌悪するときに働くと思われる不快情動に関与する部位が存在するはずである。FOS蛋白質をマーカーとする方法によりそのような部位がどこに存在するのかを明らかにする必要がある。
4. NaClは、濃度変化によって味の質はほとんど一定しており、その強度が変化するのみである。ただし、嗜好性は、低濃度と高濃度では正反対となり、好みから嫌悪に変化することはよく知られている。この脳内メカニズムを明らかにするため、神経細胞の中に、味の質の識別に関係するものと、嗜好と嫌悪に関係するものが別れて存在するの可否かを電気生理学的に、あるいは、免疫組織化学的に明らかにする必要がある。

**Physiological mechanisms of formation of taste quality and taste hedonics of NaCl behavioral, histochemical and electrophysiological studies.**

**Takashi Yamamoto, Tsuyoshi Shimura and Noritaka Sako**  
**Faculty of Human Sciences, Osaka University**

Summary

NaCl elicits salty taste, which is one of the fundamental tastes. However, it is still to be solved to what extent Na and Cl ions contribute to formation of salty taste. The present study aims to clarify the role of cations and anions of salts including NaCl in eliciting tastes. One other characteristics of NaCl is that its taste is preferred at low concentrations and rejected at high concentrations. The present study also aims to elucidate central representation of taste quality and hedonics of NaCl.

Wistar male rats were used. Under deep Nembutal anesthesia, whole strand or single fibers of the chorda tympani nerve were recorded in response to 20 kinds of sodium salts and potassium salts each dissolved in distilled water or  $10^{-4}$ M amiloride, which is known to be a blocker of sodium channels. The magnitudes of tonic responses to Na salts dissolved in amiloride solution are correlated well with those of K salts dissolved in water. Behavioral experiments using the conditioned taste aversion and electrophysiological single fiber analyses indicated that responses to Na salts after treatment with amiloride reflected responsiveness to anions, and that since K ions had little stimulatory effects, responses to K salts were due to responses to anions.

In the next experiment, we have tried to localize FOS protein, which is produced as a result of a rapid induction of a proto-oncogene *c-fos*, in the parabrachial nucleus after ingestion of NaCl. *C-fos* neurons were found in the 3 subnuclei; the medial subnucleus receives taste information of Na ions, the central lateral subnucleus may be concerned with pleasant hedonic aspect of taste of NaCl as well as other palatable solutions, and the external lateral subnucleus may be related to gastrointestinal information.