

長期亜鉛欠乏における味覚受容の動態およびそのメカニズム に関する研究

林 由佳子

京都大学大学院農学研究科

概要 舌上にある味を受容する味細胞は、約 2 週間で新陳代謝している。亜鉛欠乏に陥ると、タンパク質の合成や DNA の複製が進まず味覚障害を発症する。亜鉛は骨に蓄積されており、食事性由来の亜鉛が途絶えても血液中の亜鉛量は徐々に低下し約 1 ヶ月後に低値安定する。味覚に関するこれまでの研究で、亜鉛欠乏 1 週間後から塩味物質摂取の亢進と塩味感受性の低下が報告されている。短期の亜鉛欠乏における研究はあるが、実際に即した長期にわたる亜鉛欠乏時の味覚変化の動態に関しては研究がない。そこで申請者は、試験的に血液亜鉛値が一定となる 1 ヶ月に細胞の新陳代謝に必要な期間を加えた 6 週間という長期の亜鉛欠乏をマウスに施し、味覚感受性を味神経記録で調べた結果、塩味に続いて酸味も味覚感受性の低下が生じた。そのことから、本研究では、長期亜鉛欠乏時の味認識、味細胞の動態、および味細胞タイプ別に特異的に存在するマーカー分子を使用した味細胞タイプ別の動態を調べることによって、味覚の末梢組織に対する亜鉛欠乏の影響を明らかにすることを目的とした。

C57BL/6J Slc マウス 雌を 5 週齢から 6 週間低亜鉛食餌を自由摂取させた。亜鉛は餌に含まれる卵白に由来するものだけである。自己の排せつ物からの亜鉛を回収する可能性を排除するため、脚下に金網を設置した。コントロール群として通常食を自由摂取させた。6 週間後、脱毛や指の形成異常といった外見の変化と血清中の亜鉛濃度が有意に低下していることを確認した。

この亜鉛欠乏状態を示しているマウス(以下 亜鉛欠乏マウス)の味に対する嗜好性を 48 時間二瓶選択法で調べた結果、1, 3 mM クエン酸(酸味)に対する忌避が消失した。しかし、ほかの味質に対する嗜好や忌避には差は見られなかった。この変化を酸味感受性低下によるものか、食後効果によるものかを味神経記録によって調べた。

マウスの鼓索神経の応答を記録した結果、高濃度のクエン酸溶液で応答に減少傾向がみられたが、1, 3 mM では差がなかった。他の味質においても味神経応答に有意な差は見られなかった。

つぎに、免疫組織染色法を用いて、有郭乳頭の味細胞観察を行った。味蕾における味細胞数以外に、味細胞のタイプに亜鉛欠乏の影響が出ることを考え II 型細胞数、III 型細胞数を亜鉛欠乏マウス群と正常マウス群で比較した。しかし、両群の間で各細胞型の細胞数および発現割合に差は見られなかった。

そこで、クエン酸の食後効果に関して 10 分間二瓶選択実験を行った結果、亜鉛欠乏マウスと正常マウス間の差はなくなった。これらの結果から、表現型では亜鉛欠乏病態がみられるものの味細胞の更新や味情報処理に関してなんらかの防御的メカニズムがあると示唆された。

1. 目的

現在、QOL を著しく低下させる味覚障害は増加傾向にあり、その要因の 1 つとして亜鉛の欠乏が知られている。亜鉛は、生体内で多くの構成成分として様々な代謝に関

与する重要な必須微量元素の 1 つである。亜鉛が活性化に必要な酵素の例として DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼが挙げられる。従って亜鉛は核酸代謝やタンパク質代謝合成において重要な役割を担っており、亜鉛不足

状態になると脱毛症や皮膚病、味覚障害といった症状が見られる¹⁾。

味分子を最初に検知する味細胞は寿命がラットで約 10 日と短く新陳代謝が活発であり、味細胞から構成される味蕾には亜鉛が豊富に存在する。亜鉛が欠乏すると味細胞の入れ替わりが滞り、味蕾を健全に維持することが困難になると考えられている。実際に味覚障害患者に亜鉛製剤の投与による治療を施すと、症状が改善したという例も報告されている^{2,3)}。

しかし亜鉛欠乏による味覚障害の発症メカニズムについて、本当に味覚受容器の変化によるものなのか、他の異なる要因が関係するのかについてはまだ結論がでていない状況である。

さらに味覚障害には味覚減退や味覚乖離、錯味症など多彩な症状が含まれ、そのうちの症状に亜鉛欠乏が関与するのかわかっておらず様々な研究がなされている⁴⁾。

現在までに、味覚受容器の変化としては亜鉛を欠乏させたラットで味細胞の減少や微絨毛の消失が SEM により観察されたという報告が存在する^{5,6)}。また、亜鉛欠乏症を発症したラットでは味細胞のターンオーバーが 100 時間以上延長するということが報告されている⁷⁾。味受容の変化に関しては亜鉛欠乏ラットで本来忌避する高濃度の NaCl に対する嗜好が亢進するという報告がなされているが⁸⁻¹¹⁾、この嗜好性の変化は味覚受容器ではなく内分泌物質の異常によるものではないかとも考えられている¹¹⁾。また、亜鉛欠乏ラットは苦味物質である塩酸キニーネに対する忌避が弱まるという報告もあり^{10,12)}、この要因として中枢側の結合腕傍核での苦味刺激に対する反応性に変化が生じていることが示されている¹²⁾。しかし、亜鉛欠乏に関する研究の多くはラットを用いたものであり、亜鉛欠乏マウスを用い味受容・伝達の変化を調べた文献は少ない。

本研究では亜鉛欠乏マウスを作製し、五基本味それぞれに対する味覚受容や味細胞の変化について検討することを目的とした。

2. 方法

本実験では、C57BL/6J 系統のマウス(メス, 5 週齢)に対し通常食 (3.13 mg Zn/100 g diet) または低亜鉛食 (0.7 mg Zn/100 g diet) を 6 週間給餌することで正常マウス、亜

鉛欠乏マウスを作製した。低亜鉛食の組成は以下に示した(表 1)。飼育中はケージの下に金網を敷き、自身の糞尿からの亜鉛再摂取を防いだ。また、水として水道水の代わりに milli-Q 水を与えた。全実験は、京都大学動物実験委員会の規定に従って行った。

2.1 血清亜鉛濃度測定

正常マウスと亜鉛欠乏マウスから全血採取し、その血清亜鉛濃度を測定することで亜鉛欠乏症の発症を確認した。

5 mg/mL ネブタールを腹腔内に投与することで深麻酔し開腹した後、少量のヘパリンを注入した注射器で腹部大静脈から採血を行った。得られた血液は 4°C、5,000 rpm で 20 分間遠心分離し上清をサンプルとした。サンプル 0.2 mL に硝酸と過酸化水素を加えて加熱することで灰化し、蒸発乾固させたサンプルを硝酸に溶解後 ICP-AES にて分析した。

表 1. (上)低亜鉛食の組成 (下)低亜鉛食中ミネラル mix の組成

組成 (低亜鉛飼料)	%	実量/g
グラニュー糖	33	4290
コーンスターチ	30	3900
卵白粉末	20	2600
ミネラルmix(Zn抜)	7	910
コーンオイル	5	650
セルロースパウダー	3	390
α化澱粉	1	130
ビタミンmix(精製)	1	130
合計	100	13000

組成 (ミネラルmix (Zn抜))	mg/100g	実量
KH ₂ PO ₄	1730	224.9
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	1500	195
CaCO ₃	1355.4	176.2
コーンスターチ	806	104.79
MgSO ₄ · 7H ₂ O	800	104
NaCl	600	78
FeC ₆ H ₅ O ₇ · 5H ₂ O	190	24.7
MnSO ₄ · 4H ₂ O	15.4	2
Ca(IO ₃) ₂	1.54	0.2
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.26	0.16
CaCl ₂ · 5H ₂ O	0.4	0.05
合計	7000	910

2. 2 48 時間二瓶選択実験

亜鉛欠乏による嗜好性の変化を調べるために 48 時間二瓶選択実験を行った。マウスに対して milli-Q 水と味溶液を同時に呈示し 48 時間自由摂取させた後、各飲水量を測定した。ただし、場所による偏好を防ぐため呈示 24 時間後には二瓶の場所を入れ替えた。味溶液としてスクロース(甘味)、キニーネ(苦味)、L-グルタミン酸ナトリウム(MSG)(うま味)、NaCl(塩味)、クエン酸(酸味)、HCl(酸味)を用い全て低濃度から実験を行った。それぞれの味溶液に対する嗜好率は、

嗜好率 = 味溶液の飲水量 / 総飲水量
という式を用いて算出した。

2. 3 短時間二瓶選択実験

食後効果を排除して嗜好性を調べる実験として短時間二瓶選択実験を行った。暗期開始時から 6 時間絶水させたマウスに対し味溶液と水を同時に呈示し 10 分間飲水させ、各飲水量を測定した。ただし、場所による偏好を防ぐため呈示 1 分後、3 分後、5 分後には二瓶の位置を入れ替えた。味溶液としてクエン酸を用い低濃度から実験を行った。嗜好率は 48 時間二瓶選択実験と同じ式を用いて算出した。

2. 4 味神経応答解析

亜鉛欠乏が味感受性の低下を引き起こすのかを調べるため、味神経応答解析を行った。5 mg/mL ネブタールと 25% ウレタンを腹腔内に投与することで麻酔したマウスから鼓索神経を露出させ白金電極にかけた。このマウスの舌へ味溶液を滴下した時に鼓索神経を伝導するインパルスが白金電極で導出し、増幅器、積分計を通して記録し応答波形を得た。キニーネ、MSG、NaCl、クエン酸を用い、味溶液に対する応答値は 0.1 M NH₄Cl 溶液に対する応答の大きさを 1 とした時の相対値で示し、亜鉛欠乏による応答値の変化を調べた。

2. 5 免疫染色

亜鉛欠乏による味蕾の変化を調べるために免疫組織染色を行った。4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定したマウスの舌を O.T.C コンパウンドにて包埋・凍結させ、クライオスタットより有郭乳頭付近のスライスを作製した。このスライスをブロッキング後、一次抗体、二次抗体の順に反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。一次抗体には、II 型細胞マーカーとして Ga-gustducin 抗体もしくはは

PLCβ2 抗体を、III 型細胞マーカーとして CAR4 抗体を用いて二重染色を行い、各細胞型の発現様式を比較した。

3. 結果

最初に 6 週間の低亜鉛食給餌により亜鉛欠乏状態に陥るかを確認するため、血清亜鉛濃度の測定を行った。その結果、低亜鉛食を 6 週間給餌したマウスは通常食を給餌したマウスと比較して有意に血清亜鉛濃度が低下していた(図 1)。また、低亜鉛食を給餌したマウスでは脱毛や指などの形成異常といった亜鉛欠乏症の症状と同じ症状が見られた(図 2)。従って、本研究ではこのマウスを亜鉛欠乏マウスとして実験を行った。

最初に、作製した亜鉛欠乏マウスの嗜好性変化を調べるため 48 時間二瓶選択実験を行った。味溶液には基本五味を呈するスクロース、キニーネ、MSG、NaCl、クエン酸を用いた。その結果、亜鉛欠乏マウスでクエン酸 1 mM、3 mM に対する忌避が消失するという変化が見られた。一方、他の味質に対する嗜好・忌避に関しては亜鉛欠乏の影響は見られなかった(図 3)。

味溶液に対する嗜好性は、味感受性だけでなく生理状態の変化などによってもたらされる食後効果にも左右される。そこで、亜鉛欠乏マウスで見られたクエン酸 1 mM、3 mM に対する忌避の消失が酸味感受性の低下によるものか、もしくは食後効果によるものか検討を行った。

味情報は味細胞で受容され、味神経を伝播し脳へ伝えられる。亜鉛欠乏により味細胞の消失といった味覚伝達経路の末梢部で障害が生じると、それ以降の味覚伝達に関係する味神経での電気信号に変化が生じると思われ

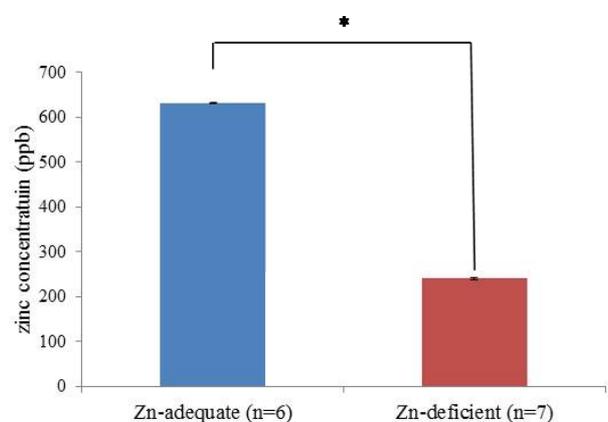


図 1. 低亜鉛食給餌による血清亜鉛濃度の変化(mean ±S.E. t test, *,*p*<0.05)

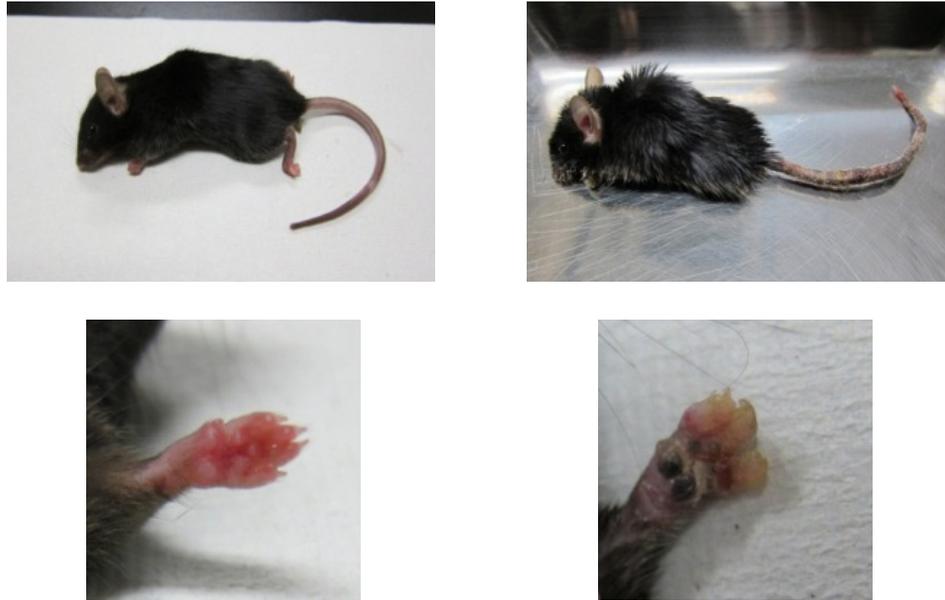


図 2. 低亜鉛食餌による外見の変化(左:正常マウス、右:亜鉛欠乏マウス)

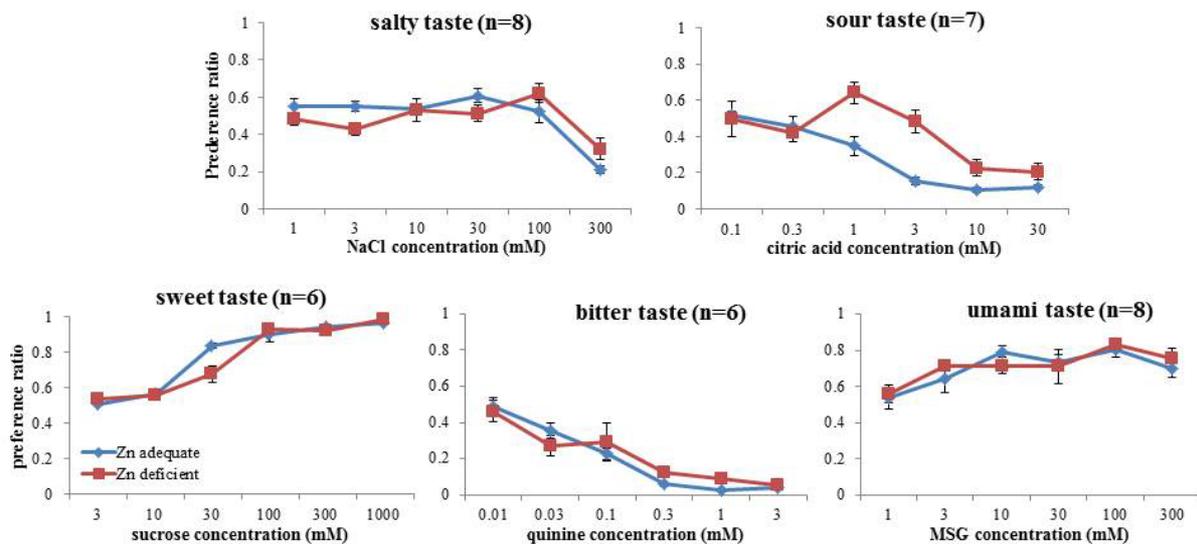


図 3. 亜鉛欠乏によるマウスの嗜好性変化(mean±S.E. Two way ANOVA with post hoc Tukey test, *, $p<0.05$, **, $p<0.01$)

る。そこで、正常マウスと亜鉛欠乏マウスの間で味溶液(キニーネ, MSG, NaCl, クエン酸)に対する応答値を比較した。その結果、クエン酸に対する応答値は減少傾向が見られたものの有意差は認められなかった。キニーネ, MSG, NaCl に対する応答値は、どの濃度においてもほとんど変化が見られなかった(図 4)。

さらに亜鉛欠乏が味覚受容器に影響を及ぼすかを検討するため、免疫組織染色を行い味細胞の発現を比較した。亜鉛欠乏により味細胞が大幅に減少していれば共焦点レーザー顕微鏡による観察でも変化が確認できるはず

である。

これまでに亜鉛欠乏の影響が見られなかった甘味、苦味、うま味はⅡ型細胞で受容され、影響が見られた酸味はⅢ型細胞で受容されるということが知られている。そこで細胞型により亜鉛欠乏が与える影響の程度が異なるのではないかと考え、有郭乳頭に存在する味蕾内のⅡ型細胞とⅢ型細胞をそれぞれのマーカー分子で二重染色後、細胞数を計測した。しかし、正常群と亜鉛欠乏群の間で各細胞型の細胞数および発現割合に差は見られなかった(図 5, 表 2)。

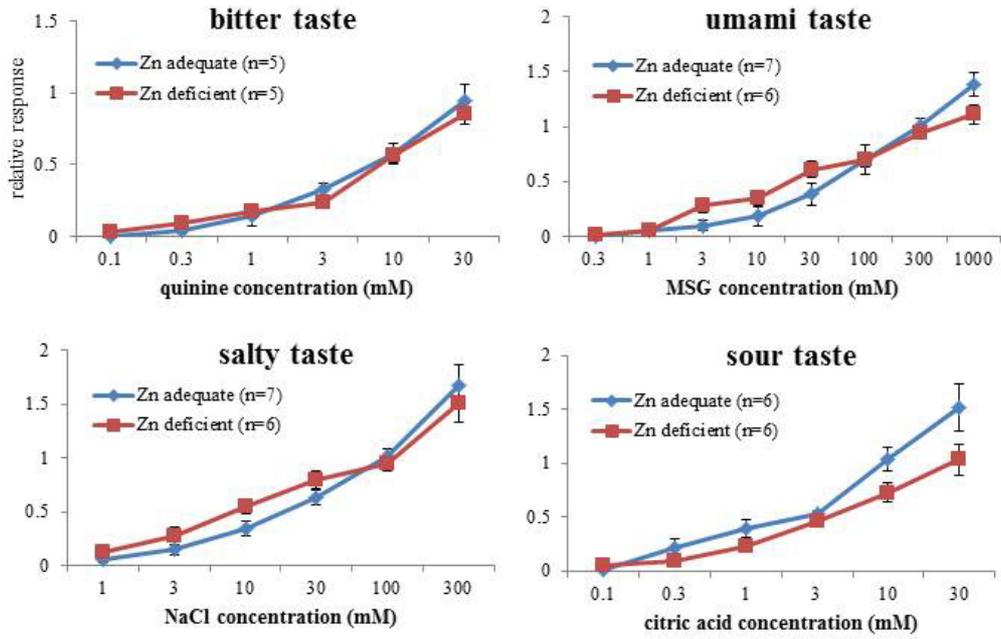


図 4. 亜鉛欠乏が味神経応答値に与える影響 (mean±S.E. Tukey-Kramer test)

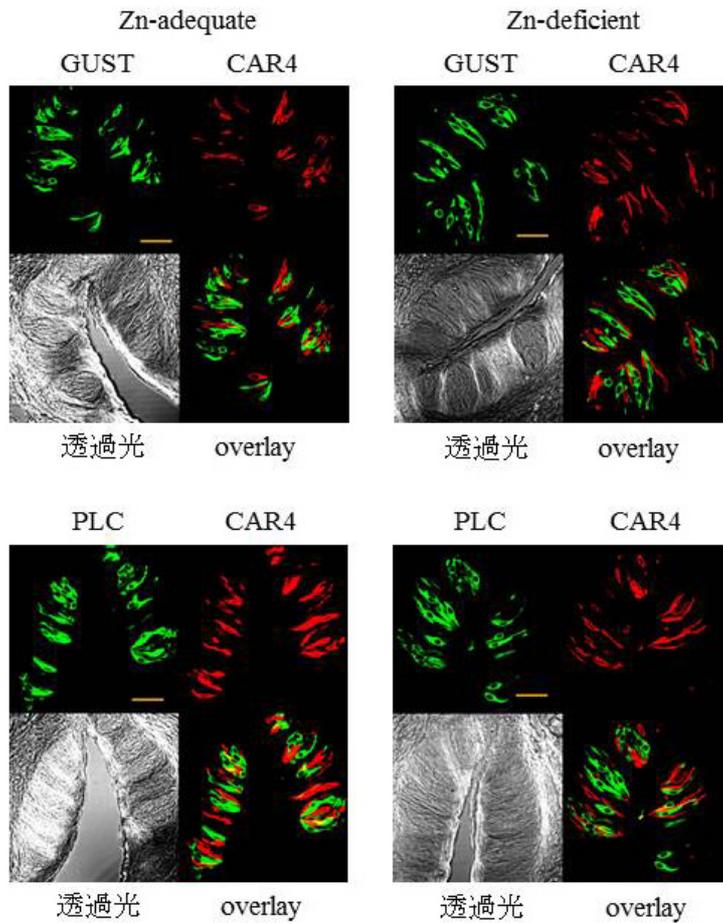


図 5. (上) α -gustducin (II型細胞マーカー)とCAR4(III型細胞マーカー)の二重染色例
(下) PLC β 2 (II型細胞マーカー)とCAR4(III型細胞マーカー)の二重染色例

表 2. 亜鉛欠乏によるⅡ型およびⅢ型細胞数の変化

	Zn adequate	Zn deficient		Zn adequate	Zn deficient
各抗体で染色された細胞数±SEM (割合 = Ⅱ型もしくはⅢ型細胞の個数/染色された全細胞数)					
G _α -gustducin	4.21 ± 0.20 (55.1%)	3.64 ± 0.13 (51.3%)	PLCβ2	5.15 ± 0.19 (60.0%)	4.90 ± 0.12(59.1%)
CAR4	3.35 ± 0.16 (44.9%)	3.42 ± 0.10 (48.7%)	CAR4	3.46 ± 0.15 (40.0%)	3.38 ± 0.08 (40.9%)
total	7.56 ± 0.29	7.06 ± 0.18	total	8.61 ± 0.28	8.28 ± 0.16

ここまで酸味感受性の変化について検討してきたが、亜鉛欠乏の影響はほとんど見受けられなかった。そこで次に、食後効果が嗜好性を左右した可能性について検討した。

本研究で酸味物質として用いたクエン酸は、エネルギーを作り出すクエン酸回路の基質などとして生体で利用されている。また、クエン酸回路内には亜鉛酵素であるアコニターゼやリンゴ酸デヒドロゲナーゼが存在することも知られており亜鉛の欠乏によりなんらかの障害が生じている可能性がある。そのため、クエン酸を摂取することにより生体内で生理機能を果たし、溶液に対する嗜好性を上昇させたということも考えられる。そこで、生体内で生理活性を持たない HCl を酸味物質として用い、クエン酸と同様に 48 時間二瓶選択実験を行った。その結果、クエン酸で見られたような亜鉛欠乏による忌避の消失は見られず、正常マウスと同様に亜鉛欠乏マウスも HCl に対する忌避を示した(図 6)。

さらに、10 分間二瓶選択実験を行った。食後効果は溶液を摂取して約 20 分後から生じると言われているため、この実験系では食後効果を排除することができる。もし食後効果の影響によりクエン酸の忌避が消失していたとすれば、この実験系では通常の忌避が見られるはずである。実験を行ったところ、48 時間二瓶選択実験で見られた 1 mM、3 mM クエン酸に対し正常マウスと同様に忌避を示し亜鉛欠乏による変化は見られなくなった。(図 7)

4. 考察

現在までに亜鉛欠乏による嗜好性の変化は、亜鉛欠乏ラットにおける高濃度 NaCl への嗜好亢進が報告されているが、今回の C57BL/6J マウスの実験系では、酸味に対する忌避が亜鉛欠乏マウスで弱まるという結果になった。酸味嗜好性変化の原因として、亜鉛欠乏による酸味感受性

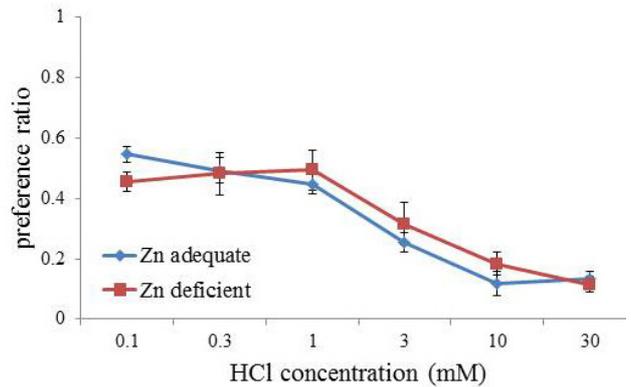


図 6. 亜鉛欠乏による塩酸嗜好性変化 (mean±S.E. Two way ANOVA, n=6)

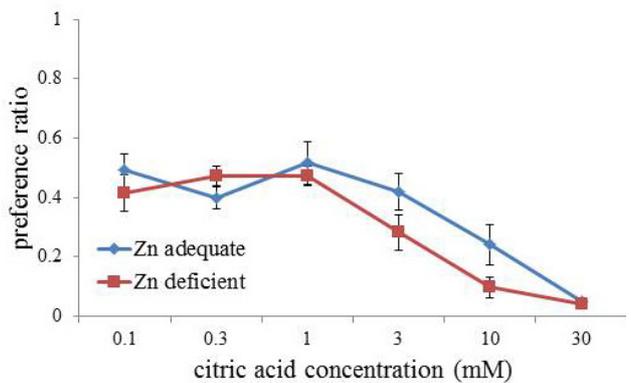


図 7. 亜鉛欠乏によるクエン酸味嗜好性変化 (mean±S.E. Two way ANOVA, n=5)

の低下もしくは生理状態の変化が考えられる。そこで味感受性の変化を調べるため正常群と亜鉛欠乏群の味神経応答値を比較したが、酸味に対する味神経応答値は高濃度において減少傾向が見られたものの有意な差は認められなかった。嗜好性の変化が見られたのは 1 mM と 3 mM であり、味神経応答解析で減少傾向がみられた濃度帯とは一致しない。

また、今回Ⅱ型細胞で受容される甘味、苦味、うま味については差が見られず、Ⅲ型細胞で受容される酸味のみで変化が見られた。そこで味細胞の細胞型に着目し、発現様式の変化についても検討を行ったが、亜鉛欠乏の影響は見られなかった。

また、クエン酸の食後効果を排除できる実験系で嗜好調査を行ったところ、亜鉛欠乏マウスは正常マウスと同様に酸味溶液を忌避した。

従って今回の実験系で見られた酸味嗜好の変化は味感受性の低下によるものとは考えにくく、食後効果の影響をより大きく受けたと考えられる。ただし、具体的に生体内でどのような働きをしたのかについては今回の実験系からははっきりとはわからない。リンゴ酸といったクエン酸回路で中間生成物となっている酸味物質の嗜好の変化を調べるなどさらなる研究が必要である。

また、味感受性についても今回検討できたのは有郭乳頭における味細胞の発現と鼓索神経応答値のみである。免疫染色に関してはマーカー分子の存在を確認できたのみであり、実際に受容体が機能しているのかなどについてはわからない。これまでに、亜鉛欠乏により炭酸脱水素酵素の活性が低下するという報告も存在するため¹³⁾、味細胞の機能について検討することは必要であろう。

また、共焦点レーザー顕微鏡で味細胞の変化が見られなかった場合でも結合腕傍核への情報入力に差が見られたという報告も存在するため¹²⁾、亜鉛欠乏による変化はより中枢に近い部分で生じている可能性もある。

亜鉛と味覚は複雑に関与していると考えられるため、さらに細かく影響を検討する必要がある。

文 献

- 1) 池田稔, 生田明浩: 味覚障害と亜鉛欠乏. *Biomed Res Trace Elements* 18(1), 10-14 (2007)
- 2) Henkin R I and Bradley D F: Hypogeusia corrected by Ni^{++} and Zn^{++} . *Life Sci* 9, 701-709 (1970)
- 3) Hambidge K M, Hambidge C, Jacobs M and Baum J D:

- Low levels of zinc in hair, anorexia, poor growth, and hypogeusia in children. *Pediatr Res* 6, 868-874 (1972)
- 4) 裕哲崇, 麩谷嘉一, 勝川秀夫, 中島清人, 山本宏治, 杉村忠敬: 亜鉛欠乏ラットにおける4基本味間の弁別能. *日本味と匂学会誌* 13 (3), 391-394 (2006)
 - 5) M Naganuma, M Ikeda and H Tomita: Changes in soft palate taste buds of rats due to aging and zinc deficiency -scanning electron microscopic observation. *Auris Nasus Larynx* 15(2), 117-127 (1988)
 - 6) T Kinomoto, M Sawada, Y Ohnishi, T Yamaguchi, S Ogawa, M Washizuka, J Minaguchi, Y Mera and K Takehana: Effects of Palapozinc on morphological change of the tongue in zinc-deficient rats. *J Oral Pathol Med* 39, 617-623 (2010)
 - 7) 大木光義: 亜鉛欠乏による味覚障害ラットの turnover について. *日大医学雑誌* 49, 215-225 (1990)
 - 8) Contalantotto FA and Lacy P: Effect of a zinc deficient diet upon fluid intake in the rat. *J Nutr* 107, 436-442 (1977)
 - 9) William Jakinovich JR and Donald W Osborn: Zinc Nutrition and Salt preference in rats. *Am J Physiol* 241, 233-239 (1981)
 - 10) T Goto, M Komai, H Suzuki and Y Furukawa : Long-Term Zinc Deficiency Decreases Taste Sensitivity in Rats. *J nutr* 49, 131(2) 305-10 (2000)
 - 11) 裕哲崇, 勝川秀夫, 中島清人, 麩谷嘉一: 亜鉛欠乏と食塩嗜好. *日本味と匂学会誌* 13 (1), 17-28 (2006)
 - 12) 河野彰代, 本間志保, 丹波均, 脇坂聡: 亜鉛欠乏ラットにおける苦味刺激の受容・伝達に関する研究. *日本味と匂学会誌* 17 (3) 201-202 (2010)
 - 13) T Goto, M Komai, Bryant BP and Y Furukawa: Reduction in carbonic anhydrase activity in the tongue epithelium and submandibular gland in zinc-deficient rats. *Int Vitam Nutr Res* 70 (3), 110-118 (2000)

Studies on the Characterization and the Mechanism of Taste Perception under the Long Zinc Deficiency

Yukako Hayashi

Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Summary

Zn²⁺, one of essential trace elements for both humans and animals, works as a component of various metalloenzymes including RNA polymerase and DNA polymerase. Therefore it is directly involved in DNA synthesis and plays an important role in cell division and proliferation. Zn deficiency causes many clinical symptoms such as taste disorder. The estimated life span of taste cells is quite short, about 10 days. Thus Zn deficiency makes it difficult to keep continuous cell renewal in taste buds. The morphological changes like a significant decrease in number of taste cells, loss of microvillus and delayed turnover rates of taste buds in Zn deficient rats have been observed using an electron microscope. However, the effects of Zn deficiency on taste perception remain controversial. To investigate the changes of taste perception of Zn deficient mice, we conducted 48 h two bottle preference test and nerve recordings. Mice were fed the low Zn food for 6 weeks and led to hair loss and finger deformity in C57BL/6Jms slc mice. The 48 h-preference test showed that avoidance for 1 and 3 mM citric acid was almost disappeared in zinc deficient mice, whereas the preference ratio for other tastants did not change. Chorda tympani nerve recordings from Zn deficient mice showed relatively reduced responses to citric acid. We also conducted immunostaining to reveal the change of ratio of taste cells with type II cell marker, Gα-gustducin and phospholipase C beta2, and type III cell marker, carbonic anhydrase 4, however there was no differences between Zn adequate mice group and Zn deficient mice group. These results suggest that citric acid avoidance was disappeared not because of specific loss of cells and might be postprandial effect. The 10 min-preference test were carried out to confirm the effect, and the result showed that there was no difference in the preference ratio for citric acid.

These results in this study suggested that the defense mechanism against Zn deficiency exist in the taste system.