

## 摂取塩分濃度閾値の違いを生み出す塩分受容体の個人差と腸内細菌叢の関与

柴田 知行, 田原 智満, 大久保 正明, 河村 知彦, 堀口 徳之, 山田 日向

藤田保健衛生大学医学部消化管内科

**概要** 塩味の閾値が個人で異なるかは未だ不明である。今回の研究では、塩味受容体 ENaC の多型解析, DNA のメチル化解析と腸内細菌叢の解析を行い, 研究参加者それぞれの塩味閾値と食生活内容について調べて関連性を解析した。

特定の疾患を有さない健康成人ボランティア 20 名に対し解析を行い, 電気味覚計を用いて, 味覚障害の有無を診断した。また味覚問診票にて, 味の嗜好を把握した。更に体脂肪計を用い, 研究参加者の年齢, 性別, 身長を聴取した上で, 体重, 基礎代謝, 体脂肪, 内臓脂肪, 皮下脂肪, BMI, 筋組成, 体組成, 骨密度, バランス年齢を測定した。生体内塩味受容体 ENaC の多型解析及びメチル化検査は, 唾液 DNA を採取し, 塩味受容体 ENaC の R563Q 多型の解析を行った。同遺伝子のメチレーションは MSP 法により解析予定である。塩味閾値の判定は, 食塩含浸濾紙を用いたが, 有意な差は認められなかった。腸内細菌叢の解析は, キットで便を採取後, DNA を抽出し, 受託解析中である。以下, 研究結果を示す。

ボランティア全 21 名につき解析を行った。男性がやや多く, 平均年齢は 39 歳であった。味覚障害の有無は, 電機測定器で -2 から 12 dB と個人により, かなりの差が認められた。しかし, 正常範囲は 8 または 14 とされているので, 個人差の範囲内とも考えられる。味の嗜好と食生活のアンケート調査に関しては現在, 集計中である。基礎代謝や BMI は男女が混在しているためか, ばらつきが大きかった。生体内塩味受容体 ENaC の多型解析及びメチル化検査に関して, 既に DNA は抽出し, 全例 DNA のクオリティは問題ない事が判明している。ボランティアのエントリーが予定時期より遅れたため, 現在, 解析準備中である。塩味閾値は前述した様に明らかな差は認めなかった。腸内細菌叢の解析用便も全研究参加者から採取可能であった。現在, DNA を抽出しており, 受託解析発注済みである。

考察として, 当初の予定では, 個々人の摂取塩分閾値の違いがソルセイブにより判明するであろうと予測されたが, 本研究手法では研究参加者間で塩分摂取の有意な閾値の差は認められなかった。味の嗜好性に関する問診を集計しているので, こちらとの関連性については検討中である。

### 1. 研究目的

塩味は甘味, うま味, 苦味, 酸味, 塩味からなる基本 5 味の一つであり, 塩味が低濃度の場合は美味しく感じられるが, 高濃度の場合, 不快な味と認識されることが分かっている。この塩味の濃度差による識別能は複数の受容体経路を介していると考えられ, 最近, その詳細が解明されつつある<sup>(1, 2)</sup>。即ち, 誘因経路(低濃度塩分)と忌避経路(高濃度塩分)が存在し, それぞれの経路が, 上皮性ナトリウムチャンネル(ENaC)経路と苦味, 酸味受容体経路を

介している事が判明してきた。これらの塩味に対する受容体や反応経路が判明しつつあるにもかかわらず, なぜ, 塩味の閾値が個人で異なり, それが過塩状態や低塩状態に繋がり, 様々な人体活動に影響を与えるのかは不明である。今回の研究では, 遺伝因子としての塩味受容体 ENaC の多型解析<sup>(3)</sup>を行うとともに, 後天的要因である DNA のメチル化解析と腸内細菌叢の解析を行い, この個人で異なる塩味閾値と食生活内容について解析した。

## 2. 研究方法

### 2.1 ボランティア

特定の疾患を有さない健康成人ボランティア 20 名に対し、解析を行った。ボランティア募集は藤田保健衛生大学病院院内で募集を行った。募集方法として、募集案内のポスターを藤田保健衛生大学消化管内科医局、外来、内視鏡センターに掲示した。

### 2.2 味覚障害の除外

電気味覚計 (TR-06 リオン社) を用いて、味覚障害の有無を診断し、味覚異常のある者は除外した。

### 2.3 味の嗜好と食生活のアンケート調査

味覚問診票にて、味の嗜好を把握した。1つは本研究代表研究者が開発した味覚問診票である<sup>(4)</sup>。この問診票は、塩味などの刺激性の味覚を中心に、その嗜好性と身体反応の有無を問うもので、本問診票により、GERD と味覚の嗜好性との関連性が示唆された<sup>(4)</sup>。また食生活のアンケートに関しては、食品嗜好度調査用紙<sup>(5)</sup>を用いた。

### 2.4 体脂肪測定

タニタ製の体脂肪計を用い、研究参加者の年齢、性別、身長を聴取した上で、体重、基礎代謝、体脂肪、内臓脂肪、皮下脂肪、BMI、筋組成、体組成、骨密度、バランス年齢を測定した。また血圧計を用いて異常な高血圧が無いかを確認した。

### 2.5 生体内塩味受容体 ENaC の多型解析及びメチル化検査

唾液 DNA を DNAgenotek 社 (Ottawa, Canada) の唾液 DNA 採取キットを用いて採取し、直ちに DNA を型どおり抽出し、解析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。塩味受容体 ENaC の R563Q 多型の解析には Applied biosystems 社 (Foster, USA) の TaqMan probe を用いて TaqMan SNP Assay 法で行った。具体的方法としては、過去に報告した方法と類似の方法にて行った<sup>(6)</sup>。また、同遺伝子のメチレーションの程度も PCR (MSP 法) により解析する。

### 2.6 塩味閾値の測定

塩味閾値判定キット・ソルセイブ<sup>®</sup> (ADVANTEC 社) を用いて、被検者の塩味閾値を判定する。具体的には本キット・ソルセイブ<sup>®</sup>は、食塩含浸濾紙であり、6種類の (食塩の含まれていないものを含めると7種の) 塩分の濃度を含浸させた濾紙であり、塩辛さの比較に用いられている<sup>(7)</sup>。

この試験濾紙を 0 濃度から順に濃い塩分濾紙を口腔内に含ませ、塩辛さを、どの濃度で感じるかを記録した。

### 2.7 腸内細菌叢の解析

対象者の便を採取し、腸内細菌叢解析に用いた。便は常温管理が可能であるスルガラボ (静岡, 日本) の腸内細菌叢解析用キットを用いて採取した。キットで採取後、DNA を抽出し、腸内細菌叢解析目的に株式会社生物技研 (厚木, 日本) に受託解析を依頼した。方法はアンプリコンシーケンスであり、対象領域は 16S rRNA V3/V4 領域とした。

以上の結果を多変量解析し、どの要因が塩味閾値に関連するかを見いだす。多変量解析には JMP10 を用いた。本研究は藤田保健衛生大学倫理審査委員会の承認を得て施行された。

## 3. 研究結果

### 3.1 ボランティア

データのばらつきを考慮し、全 21 名につき解析を行った。全参加者の背景について表に示す (Table 1)。

### 3.2 味覚障害の有無

電気味覚計による測定では、Table 1 に示す様に、-2 から 12 dB と個人により、かなりの差が認められた。

### 3.3 味の嗜好と食生活のアンケート調査

本調査に関しては、現在、集計中である。

### 3.4 体脂肪測定

基礎代謝や BMI は男女が混在しているためか、ばらつきが大きかった。

### 3.5 生体内塩味受容体 ENaC の多型解析及びメチル化検査

既に DNA は抽出し、全例 DNA のクオリティは問題ない事が判明している。ボランティアのエントリーが予定時期より遅れたため、現在、解析準備中である。

### 3.6 塩味閾値の測定

Table 1 に示す様に、塩味閾値はソルセイブ・キットを用いたところ、殆どが最低閾値の 0.6 であり、最高でも次に高い濃度の 1.0 であった。

### 3.7 腸内細菌叢の解析

便も全研究参加者から採取可能であった。現在、DNA を抽出しており、生物技研 (株) に解析発注済みである。

**Table 1.** Subjects' characteristics

M: F	13:08
Age	39 y.o. (22-67)
Ht (cm)	166.3 (146-182)
BW (Kg)	61.9 (38.2-89.2)
basal metabolism	1313 (889-1776)
body fat percentage	23.3 (12.5-33.4)
visceral fat	5.7 (1-12)
subcutaneous fat percentage	21.0 (10.3-30.7)
BMI	22.2 (16-27.5)
Muscle composition	6 (4-9)
Body composition age	41 y.o. (28-58)
Bone density	6 (4-9)
Balance age	30 y.o. (18-53)
Taste value (dB)	4.2 (-2-12)
Salty threshold	0.7 (0.6-1)

#### 4. 考 察

今回、本研究では、塩味の閾値が個人で異なり、それが過塩状態や低塩状態に繋がり、様々な人体活動に影響を与えるメカニズム解明の一助として、遺伝因子としての塩味受容体 ENaC の多型解析を行うとともに、後天的要因である DNA のメチル化解析と腸内細菌叢の解析を行い、それらの結果と個人で異なる塩味閾値と食生活内容についての関連性を調べることを目的とした。当初の予定では、個々人の摂取塩分閾値の違いがソルセイブにより判明するであろうと予測された。しかし、本キットの本来の目的が食品中の塩味を相対的に比較するため開発されたものであったためか、研究参加者間で塩分摂取の有意な閾値の差は認められなかった。これとは別に味の嗜好性に関して問診を集計しているため、塩味の好みとの関連性と他因子との関連性につき検討中である。

#### 5. 今後の課題

当初、研究計画を作成した際は、腸内細菌叢の解析は T-RFLP の様な簡易な腸内細菌解析が主流であり、その様な計画を策定したが、現時点で腸内細菌解析はホール

ゲノム解析へと移行しており、それに伴って受託解析費も高騰している。その為、当初の計画を全て行うには予算不足となり、今後の解析待ちとなっている。

また、ボランティアを主体とする研究であるため、まず研究期間内で実施可能例数として 20 名と設定した。院内で労働する人を中心に健常なボランティアを院内掲示などにより募集したが、当初予定人数に達するまでに時間がかかり、やや人数設定の見通しが甘かった事と、総合的解析を開始する時期が遅れてしまった事が反省点として挙げられる。

#### 文 献

- (1) Nature. 2010, 464:297-301
- (2) Nature. 2013, 494:472-5
- (3) CVJ Africa. 2011, 22: 241-4
- (4) J Dig Dis. 2015, 16: 337-41
- (5) 名古屋文理短期大学紀要. 1991, 16: 81-89
- (6) Biomed Res. 2016, 37: 305-10
- (7) [https://www.advantec.co.jp/service\\_support/download/catalog/16-02-3.pdf](https://www.advantec.co.jp/service_support/download/catalog/16-02-3.pdf)

## Individual Differences in Salt Receptors That Produce Differences in Intake Salt Concentration Threshold and Involvement of Intestinal Microflora

Tomoyuki Shibata, Tomomitsu Tahara, Masaaki Okubo, Tomohiko Kawamura, Horiguchi Noriyuki,  
Hyuga Yamada

Department of Gastroenterology, Fujita Health University School of Medicine

### Summary

In this study, polymorphism analysis of the salty taste receptor ENaC, methylation analysis and intestinal microflora were performed, and these data were examined about the associations of the salty taste threshold and dietary content of participants.

Twenty healthy adult volunteers (average age was 39 years old) who did not have a specific disease were analyzed and the presence or absence of a taste disorder was diagnosed using an electric taste meter. In addition, we got a taste interview questionnaire to grasp the taste. Furthermore, using a body fat scale, the age, sex, height, weight, basal metabolism, body fat, visceral fat, subcutaneous fat, BMI, muscle composition, body composition, bone density and balance age were measured. Polymorphism analysis of salt receptor ENaC R563Q was performed. Methylation of this gene will be analyzed by MSP method. For determination of salty taste threshold value, salt-impregnated filter paper was used, but no significant difference was observed. Analysis of the intestinal microflora is carried out by consulting analysis after extraction of DNA from feces. Test of taste disorder was ranged from -2 to 12 dB in the electrical measuring instrument. Since the normal range is set to 8 or 14, it can be considered to be within the range of individual differences. The questionnaire survey on taste preference and dietary life is currently being calculated. Basal metabolism and BMI were varied due to the presence of both males and females. Regarding the polymorphism analysis and methylation test of the salty taste receptor ENaC, DNA has already been extracted. The volunteer's entry was delayed from the planned time, so it is currently under preparation for analysis. No obvious difference was observed in the salty taste threshold as described above. Feces for analysis of intestinal microflora could also be collected from all participants. Currently, we are extracting DNA, and we have ordered consignment analysis.

### Discussion

At the initial plan, it was predicted that the difference in salt intake thresholds of individuals will be discovered by kit. But in this study method, there was no significant threshold difference in salt intake between research participants.

Since we are collecting inquiries concerning the taste preference, we are studying the relevance to these questions.