
助成研究報告書

食品科学プロジェクト研究

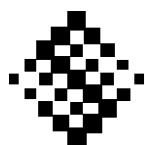
(2016 – 2018年度)

“適塩” 考究に向けた複眼的研究

Multilateral Approaches to Our Appropriate Salt Intakes

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

令和2年3月



公益財団法人
ソルト・サイエンス研究財団

プロジェクト研究報告書 目次

食品科学分野

16D-18D “適塩”考究に向けた複眼的研究

1	まえがき 香西 みどり (お茶の水女子大学)	1
2	GABA 合成酵素を用いた天然物由来の塩味増強物質の探索, 低減食品の開発, 塩味情報伝達機構の解明 (16D1 - 18D1) 植野 洋志 (龍谷大学)	5
3	味噌の木桶仕込による風味生成の解明と減塩効果の可能性を探る (16D2 - 18D2) 若林 素子 (日本大学)	1 5
4	細胞生物学的視点からの味覚改善食品の開発: 老化依存的味受容機構変化の検証 (16D3 - 18D3) 成川 真隆 (東京大学)	3 1
5	食塩嗜好に及ぼす亜鉛欠乏の影響と作用機構の解析 (16D4 - 18D4) 後藤 知子 (宮城学院女子大学)	4 3
6	塩加減と習慣的な食塩摂取量に関する疫学研究 (16D5 - 18D5) 佐藤 ゆき (東北大学)	5 3

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES OF FOOD SCIENSE

16D–18D Multilateral Approaches to Our Appropriate Salt Intakes

1	Foreword	
	Midori Kasai (Ochanomizu University)	3
2	Search for Salt-Enhancement Materials from Natural Resources by Using GABA-Synthesizing Enzyme, Development of Low-Salt Content Foods, and Study of Salt Signal Transduction Mechanism (16D1 - 18D1)	
	Hiroshi Ueno (Ryukoku University)	1 3
3	Flavor and the Effect on Saltiness in the Miso Fermented in Wooden Barrel (16D2 - 18D2)	
	Motoko Wakabayashi (Nihon University)	3 0
4	Evaluation of Age Dependent Change of Taste System (16D3 - 18D3)	
	Masataka Narukawa (The University of Tokyo)	4 2
5	An Analysis of the Mechanism behind the Effect of Zinc Deficiency on Salt Preference (16D4 - 18D4)	
	Tomoko Goto (Miyagi Gakuin Women's University)	5 0
6	Epidemiological Study for Taste of Salt and Habitual Salt Intake (16D5 - 18D5)	
	Yuki Sato (Tohoku University)	6 5

まえがき

香西 みどり

プロジェクトリーダー

お茶の水女子大学基幹研究院教授

塩は身体の機能調節に必須であり、また食物の嗜好においても重要な物質である。一方で、食塩の必要量を超える過剰摂取が問題となることから 2015 年版食事摂取基準では減塩目標量がさらに低下した。実際の食事において減塩が高じると嗜好性の低下や食欲減退にもつながる。適塩は食生活における重要な課題であり、その研究には多様な研究分野が必要とされる。

本プロジェクトでは適塩研究に対する食品の側からと生体の側からの複眼的アプローチにより体系的な解析を行うために5つの課題の研究を実施した。

- (1) γ -アミノ酪酸 (GABA) の受容体がクロライドイオンチャンネルであることから GABA が塩味の情報伝達系に影響を与え、GABA 合成酵素 (GAD) 酵素活性が高い物質が塩味増強物質として作用する可能性がある。植野洋志先生(龍谷大学農学部)は GAD のアイソフォームである GAD67 を用いて塩味増強物質の天然物からの探索を行い、GAD67 活性促進作用をもついくつかの香辛料に塩味増強効果があること、また GAD と複合体を作るタンパク質が塩味信号伝達経路に関与することを示した。
- (2) 味噌の製造に木桶を用いる際に生じる香りや味などの風味の変化が好ましければ味噌の使用量を減らせる減塩効果が期待できる。若林素子先生(日本大学生物資源科学部)は木桶とステンレス桶で調製した味噌を比較し、木桶味噌の減塩効果を探った。実験室調製味噌を実験した結果、11 か月の長期熟成すると味噌の 2 種類の容器間差が顕著になり、官能評価に

より木桶熟成で酸味と塩味の強度が有意に高くなり、木桶による減塩効果が示された。

- (3) 加齢が味感受性を低下させることは示唆されているが、その要因は明らかにされていない。成川真隆先生(東京大学大学院農学生命科学研究科)は若齢と高齢マウス間で末梢の味検出システムを比較し、加齢により苦味と塩味に対する味感受性が鈍化することを確認した。加齢による味関連分子の発現や味蕾の代謝速度の劣化は認められなかったが、味応答を修飾するような血中因子の濃度が高齢マウスで変化したことで、行動レベルの味感受性を変化させることが示唆された。
- (4) 亜鉛欠乏による味覚障害は知られており、亜鉛欠乏ラットでは食塩嗜好が上昇するが、作用機構は明らかにされていない。後藤知子先生(宮城学院女子大学生生活科学部)はこの現象は潜在的カルシウム欠乏を介するのではなく、尿中ナトリウム排泄量が有意に低下しており、尿中ナトリウム排泄増加を引き起こすオキシトシン濃度が低下したことを明らかにした。亜鉛欠乏初期ラットの食塩嗜好上昇にはオキシトシン分泌低下を介する可能性が考えられた。
- (5) 塩加減や食塩摂取量など塩味調味料に関する挙動に及ぼす影響に関する疫学的研究の報告は少ない。佐藤ゆき先生(東北大学東北メディカル・メガバンク機構)は大規模疫学的調査と個別の詳細調査を行い、心理的ストレスが高いグループは低いグループよりも食塩摂取量が多く、塩加減が多くなる傾向があった。大規模疫学データから塩加減と食塩摂取量推定量および実測値の間に強い相関は示されなかったが、塩

加減と心理的ストレスならびに気分状態との関連が示唆された。

以上の5つの課題により、塩味増強物質の探索、味噌の風味増加に伴う減塩効果、加齢依存的な塩味感受性の鈍化や亜鉛欠乏による食塩嗜好上昇のメカニズム、心理的ストレスと食塩摂取の増加、に関する実り多い成果が

得られた。これには今回の食品科学プロジェクト研究が複眼的アプローチによってなされたことが奏功したと考えられる。今後、本研究成果を礎にして国内外において適塩に向けた研究の益々の発展が期待される。

最後に、食品科学プロジェクト研究を実施する機会をいただきました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団はじめ関係者各位に心より御礼を申し上げます。

Foreword

Midori Kasai

Project Leader

Professor, Faculty of Core Research, Ochanomizu University

Summary

Salts are essential substance for the functional order and the palatability for foods. While the targeted amount of salt intake has been reduced in “Dietary Reference Intake for Japanese (2015)” because the excessive salt intake can be the lifestyle-related disease trigger. In practical diet, appropriate salt intake is important issue in our diet because excessive low-salt diet might cause the decline of palatability and the loss of appetite. So, the diverse research fields should be needed.

In our food science project research, the following five cases were studied to analyze systematically the appropriate salt intakes by multilateral approaches from the views of both foods and human.

- (1) Since GABA receptor is known as GABA-gated chloride ion channel, there is a possibility that GABA may play some role in salt signal pathway and high GABA-synthesizing (GAD) enzyme can be salt enhancer. Dr. Hiroshi Ueno, School of Agriculture, Ryukoku University, searched for salt-enhancement materials from natural resources by using GAD67 which is the isoform of GAD. He found that some spice extracts enhanced salt taste with maintaining Umami and there is a rule that those increased GAD67 activities can be salt enhancer. He also found the protein complex formation including GAD might play an important role in salt signal pathway.
- (2) When fermenting miso, it was common to use a wooden barrel. If a favorable change occurs due to the wooden method, the amount of miso added to the food can be reduced leading to low-salt intake. Dr. Motoko Wakabayashi, College of Bioresource Sciences, Nihon University, investigated the flavor and the effect on the reduction of salt intake of miso fermented in wooden barrel in comparison with stainless steel pot. As a result, the difference in aging miso between the two containers became remarkable after long-term aging of 11 months. By the wooden aging, the aftertaste of miso-soup became longer and also the strength of sourness and saltiness increased significantly showing the effect of low-salt intake by sensory evaluation.
- (3) Previous studies have shown that aging causes the decrease in taste sensitivity. However, its factors remain unclear. Dr. Masataka Narukawa, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, compared the peripheral taste detection systems in young and old mice and confirmed that the taste sensitivities to salty and bitter tastes decreased with aging. He did not observe any large decreases in the expressions of taste-related molecules and turnover rates of taste bud cells with aging. Taste

signal-modifying factors such as serum components may have a contributing role in aging related changes in taste sensitivity.

- (4) Zinc deficiency causes taste disorder and the NaCl preference increase in the zinc deficient rat. However, its mechanism has not been clarified. Dr. Tomoko Goto, Faculty of Human Life Science, Miyagi Gakuin Women's University, found that these phenomena is not caused by the deficiency of the calcium. The urinary sodium excretion of zinc deficient rats was reduced and the plasma oxytocin, a hormone known to stimulate sodium excretion, may be involved in the process. She revealed that the plasma oxytocin concentration of zinc deficient rats was significantly reduced to that of pair-fed rats, suggesting that reduced oxytocin secretion may be involved in the early onset of salt preference caused by zinc deficiency.
- (5) Recent report that correlates the seasoning behavior with salt intake was limited. Dr. Yuki Sato, Tohoku University Graduate School of Medicine, Tohoku Medical Megabank Organization, suggested that person with high level of mental distress may behave high frequent of using saltiness seasoning from her results by using large-scaled cohort data. Overall, her study suggested that mental distress and emotional condition would relate to the behavior of using saltiness seasoning.

From these five studies, we have obtained the productive results relating the screening salt enhancer, the reduction effect of salt intake by miso, the mechanisms of the decrease in salty taste sensitivity and the increase of salt intake by zinc deficiency, and the correlation between salt-intake behavior and mental distress. These findings show that our food science project research was very fruitful by multilateral approaches. The scientific evidence provided by the project will serve as a basis for progress of "appropriate salt intakes" studies in the world.

Finally, I would like to express my sincere thanks to "Public Interest Incorporated, The Salt Science Research Foundation" and all the persons in charge of cooperation of this project research in the food science field.

GABA 合成酵素を用いた天然物由来の塩味増強物質の探索、 低減食品の開発、塩味情報伝達機構の解明

植野 洋志¹、久木 久美子²、上田 由喜子³

¹龍谷大学農学部資源生物科学科、²大阪国際大学短期大学部ライフデザイン総合学科、

³大阪市立大学生活科学研究科

概要 III 型味蕾細胞に γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) のアイソフォームである GAD67 の発現を見出した。GABA の受容体である $GABA_A$ はクロライドイオンチャンネルであるため、塩味の情報伝達系が揺らぐことで塩味への変化、また、うま味や甘みとの対比効果に影響するかについて検討することにした。

プロジェクトとしては、塩味増強物質の探索を行うため、安定な GAD67 タンパク質の供給システムの確立、GAD67 を用いた塩味増強物質の天然物よりの探索、官能試験による塩味増強効果を示す物質のライブラリー化、塩味増強物質を用いた減塩食の試作、そして細胞内での塩味情報伝達に関与するタンパク質群の同定を通じての伝達経路の探求を行った。

まず GAD67 活性を促進する香辛料抽出物には塩味増強効果が認められ、そのような香辛料抽出物を探索するために、多くの香辛料をスクリーニングした。そのような香辛料を中心に実際にパン、ドレッシング、そして、汁物を対象に減塩食を試作した。減塩食には味質を変えない程度の香辛料抽出物を添加し、味質を官能試験で検討した。試験管レベルとは異なる結果が得られたが、香辛料が塩味増強に寄与することには変わりなく、食材それぞれがもつ遊離アミノ酸などが試験管とは異なる結果に導いたと考えられる。

塩味の情報伝達では、タンパク質間相互作用を測定することで、タンパク質複合体をとらえ、情報の伝達が物理的に起こることを視覚化することを目指した。GAD と複合体を形成するタンパク質の存在を、脳ホモジェネートを用いることで明らかにできた。そのタンパク質は塩味の受容体の候補と考えられるクロライドイオンチャンネルタンパク質と GAD67 とも複合体形成するものであった。さらにもう一つの複合体形成タンパク質の同定もなされた。これらにより、順次、塩味の信号の伝達様式を明らかにできるものと考えている。

1. 研究目的

申請者らはこれまでグルタミン酸から γ -アミノ酪酸 (GABA) を合成する酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の活性制御機構や高等生物におけるアイソフォームの役割分担と細胞内局在性の研究を行ってきた。その過程で、GAD 活性は香辛料などの天然物成分により大きく活性が制御されることを見出した。さらに、舌の上で発現している III 型味蕾細胞 (塩味と酸味受容体を発現している細胞) に GAD67 (二つ発現しているアイソフォーム (Figure 1) の一つ^[1]) を見出した (Figure 2)^{[2][3]}。味

蕾で GABA の合成がなされており、GABA 受容体である $GABA_A$ の発現も確認した^{[2][4]}。 $GABA_A$ は GABA をリガンドとしたクロライドイオンチャンネルタンパク質であるため、GABA とクロライドイオンの関係が味の世界にあり、さらに、塩味への関与も示すことができた。これらの結果を発展させると、GAD67 活性を「制御する物質」が塩味の情報伝達に影響をあたえること、香辛料などの天然物の抽出物がそのような制御物質となることも考えられる^[5]。このコンセプトは、味の対比効果を使えば、塩分量を減らしても、塩味増強剤を加えることで味質、特に、うま味を損なわな

いで、減塩を達成できることを意味する。

上述の進捗状況をもとに、本申請研究の目的を下記のようにした。

A. GAD67 活性を上昇させる天然物成分をスクリーニングし、ライブラリー化する。

B. A.でライブラリー化した天然物(香辛料を含む)を用いて、減塩食品の開発を行う。

C. 塩味の情報伝達の分子レベル(細胞レベル)での機構解明を進める。

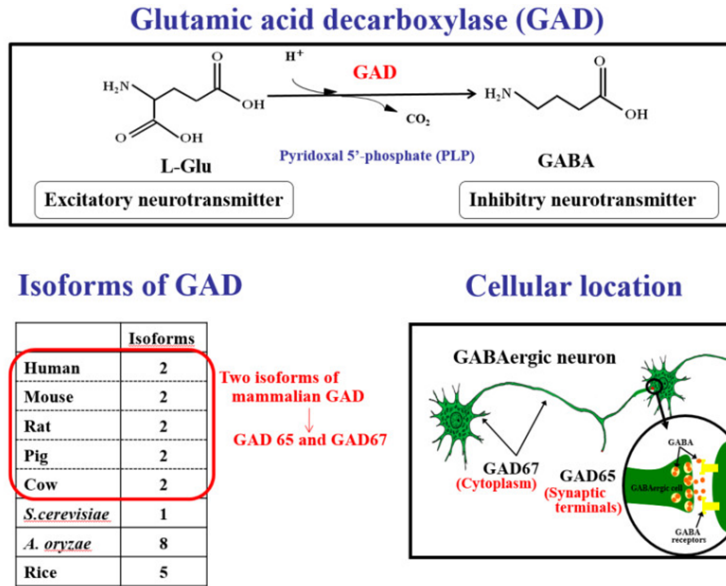


Figure 1. GAD の触媒反応とアイソフォーム

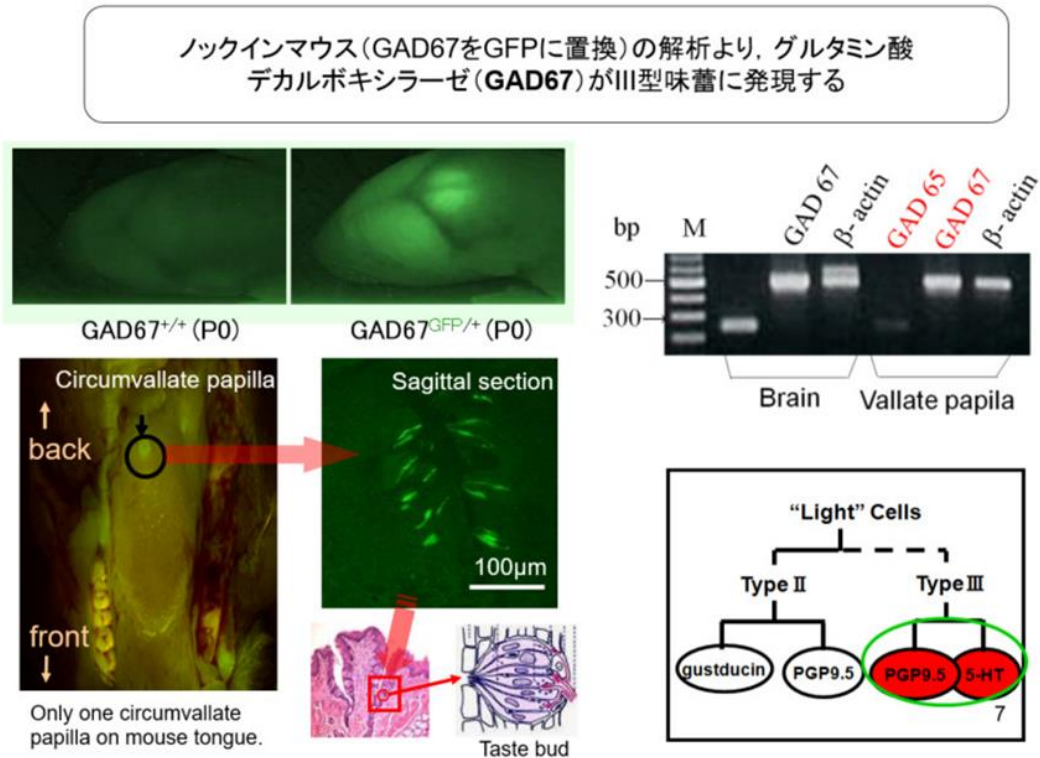


Figure 2. GAD67 の発現部位の検討

ノックインマウスによる GAD67 局在性の可視化と細胞マーカーによる味蕾のタイプ決定

2. 研究方法

研究目的であげた3つの目的について、研究方法を述べる。

A. 天然物より GAD67 活性を上昇させる物質の探索

- a. 抽出物の準備: 食材として用いられる天然物(香辛料を含む)より熱水抽出とアルコール抽出を行う。抽出物は単離精製せず、成分が多種混合している状態で扱う。
- b. GAD67 の準備: 組換え体 GAD67 タンパク質の発現系を用い GST や His タグ精製した組換え体 GAD67 を準備する。
- c. GAD 活性測定: 天然物抽出物の GAD67 活性に与える効果は、L-グルタミン酸を基質として、酵素に抽出物の存在下で GABA の生産量を定量的に測定することで判定する。通常、抽出物を加えたものを比較対象とするため、加えないものを同時にアッセイし、30分のインキュベーションの後、反応を停止させる。反応液から一部を取り出し、アミノ酸誘導化試薬と混ぜて、混合液をアミノ酸分析する。アミノ酸分析では、ピーク面積をアミノ酸含量に変換できることより、アッセイあたりの GABA 量を定量的に評価できる。比較対象の結果と抽出物を加えた結果との差により、GABA 量の増減が判定できる。
- d. GAD67 活性測定で効果を示した抽出物については、官能試験を行う。規定の濃度で準備した標準の五味を区別できるか、それぞれの閾値を認知できるか、等の基準で被験者を選別する。

B. 減塩食品の開発

通常のレシピにて調理する塩分量の半分を目安に、1. でライブラリー化した天然物抽出物もしくはその天然物そのものを加えて、うま味・塩味・その他の味質をヒトによる官能試験にて評価する。天然物抽出物の添加量は、基本的に料理の味質を大きく変えない量に抑えることとする。予備実験では、香辛料の味を感じない程度で十分に効果を発揮している。

【官能試験】

官能試験により減塩食の評価を行った。滋賀県および京都府に位置する大学において、主として女子学生を対象に募集を行った。学生には官能検査参加時に本研究の目的、個人情報保護の方法、安全管理での配慮などについて説明を行い、個人に関わる情報、データ等を提供することに同意を得た。本研究に関しては、大阪市立大学、

京都文教大学、龍谷大学での倫理審査委員会の承認を得ている。官能検査は数回に分けて行った(1回目:味覚感度試験とパン, 2回目:汁物, ドレッシング)。

味覚感度試験:

全口腔法で行った。塩味の濃度が異なる溶液(0.04%, 0.08%, 0.16%, 0.31%, 0.63%)を用い、濃度の薄いほうから濃いほうへ順に口に含み、口腔内全体で味わったのち、最初に塩味を感じた濃度を認知閾値とした。

C. 塩味の情報伝達の解析

- a. 塩味の受容体を擁する III 型味蕾細胞に GAD67 の発現が確認できたことで、GAD67 と相互作用するタンパク質群の同定を行う。サル脳を用いて、そのホモジェネートから GAD67 と相互作用するタンパク質を同定し、さらに、その同定できたタンパク質に対する抗体により生体内での分布を組織免疫化学染色法で検討する。

タンパク質間相互作用は、表面プラズモン共鳴法と免疫沈降法を用いて、GAD67を中心に相互作用する相手方タンパク質を SDS-PAGE と Western blot 法にて探索する。もし、標的タンパク質が見つければ、ゲル上のバンドの切り出し、トリプシン処理、溶媒による抽出、MS 解析(マスコット)する。マスコット解析では、ゲノム解析された生物の全発現タンパク質をトリプシン消化したペプチドがライブラリー化されている。このようにして見出したタンパク質に対する抗体を準備し、その抗体で III 型味蕾細胞を染色することで、探索したタンパク質が III 型味蕾で発現しているか否かを結論づける。

- b. 免疫沈降法は、抗体を標的タンパク質に加えると沈殿する性質を利用するものである。脳の抽出液に抗体を加え、一定の条件で一晩インキュベートし、遠心分離器にかける。沈殿を SDS-PAGE 解析することで、抗体の標的タンパク質と共沈殿するタンパク質が観察される。この共沈殿するタンパク質を解析すれば、未知のタンパク質の探索につながる。
- c. 上述のタンパク質相互作用の解析を GAD67 を中心に、さらに、GAD67 と相互作用することが明らかとなったタンパク質を中心に、という具合に順次相互作用のカスケードを広げていく。このような手法で神経系や味覚系の細胞内の情報伝達機構を研究することはまだ行われておらず、必ず新規な発見につながると確信している。

3. 研究結果

A. 天然物より GAD67 活性を上昇させる物質の探索

香辛料を中心とした天然物からアルコール、水、熱水、温水などによる抽出を行い、その抽出液を GAD67 酵素と基質であるグルタミン酸を混合させて、生じる GABA 量を比較した。酵素活性を促進するものは塩味増強剤の候補として、反対に減少させるものは阻害剤として比較する意味で用いた。酵素は、大腸菌もしくはパン酵母に GST を N 末端に組込んだ GAD67 を発現させる発現系を用いて作製した。GST はプロテアーゼ消化して除去して用いるが、Tag 精製の際には付けたままで行った。あまり強力な発現系ではなかったことより、結晶構造解析などは行えなかったが、活性測定には十分に供せる量であった。

用いた香辛料は、ゆず、ポピーシード、パセリ、クミン、メース、パプリカ、ペパーミント、マイカイカ、レモングラス、ユーカリ、ウーロン、オレガノ、ジンジャー、セロリ、シソ、バジル、アニスなどであった。酵素活性を促進するグループには、ゆず、クミン、メース、シソ、バジル、アニスなどが含まれた(温水抽出)。ただ、抽出条件によっては、異なる香辛料も促進することより、香辛料には多様な働きがあり、定義することの難しさが判明した。表 1 に香辛料抽出物の特性としてまとめたものを示す。

B. 減塩食品の開発

減塩食としてパン、ドレッシング、汁物の開発を行った⁶⁾。パン生地の調製と焼成は市販のパン焼き機を使用し、通常の食パンの塩濃度を強力粉 100g に対して 1.5～2.0%とし、減塩パンでは 0.75%とした。この減塩パンには、アニス、クミン、メース、オレガノ、レモングラスの抽出物を添加した。添加量はパンの風味を損なわない程度とし、強力粉重量の 0.2%を採用した。焼きあがったパンは焼き目の部分を切り落とし、2 cm 程度の角切りにし、A グループ(コントロール(減塩パンのみ)、アニス・メース・レモングラス添加)と B グループ(コントロール、クミン・オレガノ添加)に分けた。試食は A と B の両方を行った。

官能検査では、オレガノが有意に減塩効果を示した。アニスでは有意に塩味が弱くなったと回答した(表 2)。

ドレッシングには、グルタミン酸を多く含むトマト、および、甘味料として上白糖よりアミノ酸を多く含むはちみつを用いた。一般的なドレッシングの塩分濃度は 3.8%程度であるが、トマトドレッシングの場合、塩分濃度は 1.0%とした。理由は予備実験で 2%の塩分濃度ですでに好ましい塩分濃度との回答を得ていたためである。減塩ドレッシングには、ゆず、セロリ、バジル、オレガノの抽出物を添加した。香辛料の添加量はトマト重量の 0.2%とし、このレベルではドレッシングの風味には影響を与えない程度であった。

表 1. 香辛料抽出物の特性

	pH	重量 (g)	水 (ml)	香辛料 抽出物 (ml)	乾燥重量 (mg/抽出物 ml)	GAD67 活性*	塩味 増強度*
ゆず	4.3	0.5	5.0	1.5	9.9	36.0	13.3
アニス	5.8	0.5	2.5	0.9	40.8	28.0	62.5
クミン	5.7	0.5	2.5	1.0	34.1	15.8	26.7
セロリ	5.7	0.5	2.5	1.0	20.0	15.2	66.7
メース	4.4	1.0	5.0	1.0	12.6	3.9	23.3
バジル	6.5	0.5	5.0	1.7	3.8	-2.2	5.8
ジンジャー	5.5	0.5	2.5	1.2	36.3	-30.9	14.1
オレガノ	5.9	0.5	5.0	1.9	22.3	-62.5	-45.5
レモングラス	5.7	1.0	5.0	0.4	42.5	-66.7	-20.0

* GAD 活性および塩味増強度は、久木らの既報²⁰⁾による。

表 2. 香辛料抽出物がパンの塩味・おいしさに及ぼす効果 (n=43)

	塩味			おいしさ		
	弱い	同じ	強い	弱い	同じ	強い
レモングラス	18	16	9	17	14	2
オレガノ	9	8	26*	10	27	6
メース	24	9	10	14	19	10
クミン	11	23	9	17	19	7
アニス	25	16	2**	19	17	2

** p < 0.01, * p < 0.05 : [強い] vs. [弱い] 二点比較法

ドレッシングでは、オレガノ、バジル、セロリで有意に減塩効果が認められた(表3)。減塩ドレッシングにバジルを加えたものは、減塩とおいしさの両方が成り立つ組み合わせであった。オレガノは減塩効果があったものの、おいしさは有意に低下した。回答者の中にはバジル風味やピザ風味を感じたものがいた。

汁物としてこんぶだしとかつおだしを調製した。一般の汁物の塩分濃度は 0.7%であったため、0.4%を減塩とし、香辛料抽出物は 0.02%とした。

汁物では、有意な香辛料の効果は見られず(表4, 5), その減塩効果もこんぶだしとかつおだしでは逆になった(Figure3)。だし汁の中にはグルタミン酸など多くのアミノ酸をはじめ酵素活性や味覚に影響を与える化学物質が存在し、それぞれの影響があるものと考えられる。In vitro の基礎研究の結果をそのまま適応できない複雑系であることより、更なる検討の必要性を実感した。しかし、重要な点は、これまであまり注目されていなかった香辛料の働きである。香辛料は単に味質を提供するだけでなく、さまざまな酵素に働きかけて、個々の反応系に何らかの影響を与えていると考える。その結果、減塩効果などを引き出せるのではないだろうか。基本、in vitro で塩味増強効果を示す香辛料成分の同定は正しい選択であり、その情報を用いて減塩食の開発につなげることは魅力ある課題には違いない。

C. 塩味の情報伝達の解析

III 型味蕾細胞に GAD67 が発現し、酵素活性を持ち GABA の合成がなされている。また、GABA 受容体である

GABA_A 受容体の存在も示され、GABA はなんらかの信号としての役割を担っていることは容易に想像できる。一般に GABA_A 受容体はクロライドイオンチャンネルと言われており、塩味の情報伝達に直接関与することが考えられる。そこで、タンパク質間相互作用を利用して、細胞内での情報伝達の経路を明らかにしようと試みた。

基本、複合体形成には疎水性結合が関与すると考えられていることより、GAD67 の特徴的な部位である N 末 100 残基の領域での疎水性特性を hydrophathy plot 解析した。その結果、二か所で疎水性に富む領域を見出した。比較として、GAD65 の N 末 100 残基領域で同様な解析を行った結果、3 か所の領域を特定した。これら 5 種類の配列に相当するペプチドを合成し、Biacore センサーチップにアミンカップリング法で結合させ、それらを用いて相互作用するタンパク質を同定する作業を進めた。用いた試料は、サル脳である。多くの神経細胞と GABA 合成系を有するため、モデル系として使用した。その結果、GAD67#1 ペプチドと強い相互作用するタンパク質を含む分画を見出し、ポストゲノム解析の一種であるトリプシン消化-LC-MS-Mascot 解析により、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)であることが判明した。GAPDH タンパク質および GAD67 全長型タンパク質を結合させたセンサーチップを準備して検討したところ、複合体形成は特異的であることを確認した。Laschet らは GAPDH が GABA_A 受容体の $\alpha 1$ サブユニットと相互作用し、その kinase 活性でリン酸化に関与することを報告している^[7]。また、GAPDH と GAD67 を複合体形成させ、それぞれの酵

表 3. 香辛料抽出物がドレッシングの塩味・おいしさに及ぼす効果 (n=44)

	塩味			おいしさ		
	弱い	同じ	強い	弱い	同じ	強い
オレガノ	6	6	32**	15	11	18
バジル	4	6	34**	5	9	30**
セロリ	6	13	25**	12	12	20
ゆず	15	8	21	13	14	17

** p < 0.01, * p < 0.05 : [強い] vs. [弱い] 二点比較法

表 4. 香辛料抽出物が汁物(こんぶだし)の塩味に及ぼす効果 (n=43)

	塩味			おいしさ		
	弱い	同じ	強い	弱い	同じ	強い
オレガノ	9	9	24*	31**	7	4
ジンジャー	15	9	18	27	11	4
バジル	12	12	18	30	8	4
セロリ	9	15	18	18	19	5
クミン	17	12	13	15	19	8

** p < 0.01, * p < 0.05 : [強い] vs. [弱い] 二点比較法

表 5. 香辛料抽出物が汁物(かつおだし)の塩味・おいしさに及ぼす効果 (n=41)

	塩味			おいしさ		
	弱い	同じ	強い	弱い	同じ	強い
オレガノ	16	7	18	19	22	0
ジンジャー	13	15	13	24	14	3
バジル	11	8	22	30	11	0
セロリ	10	11	20	24	12	5
クミン	15	10	16	27	12	2

** p < 0.01, * p < 0.05 : [強い] vs. [弱い] 二点比較法

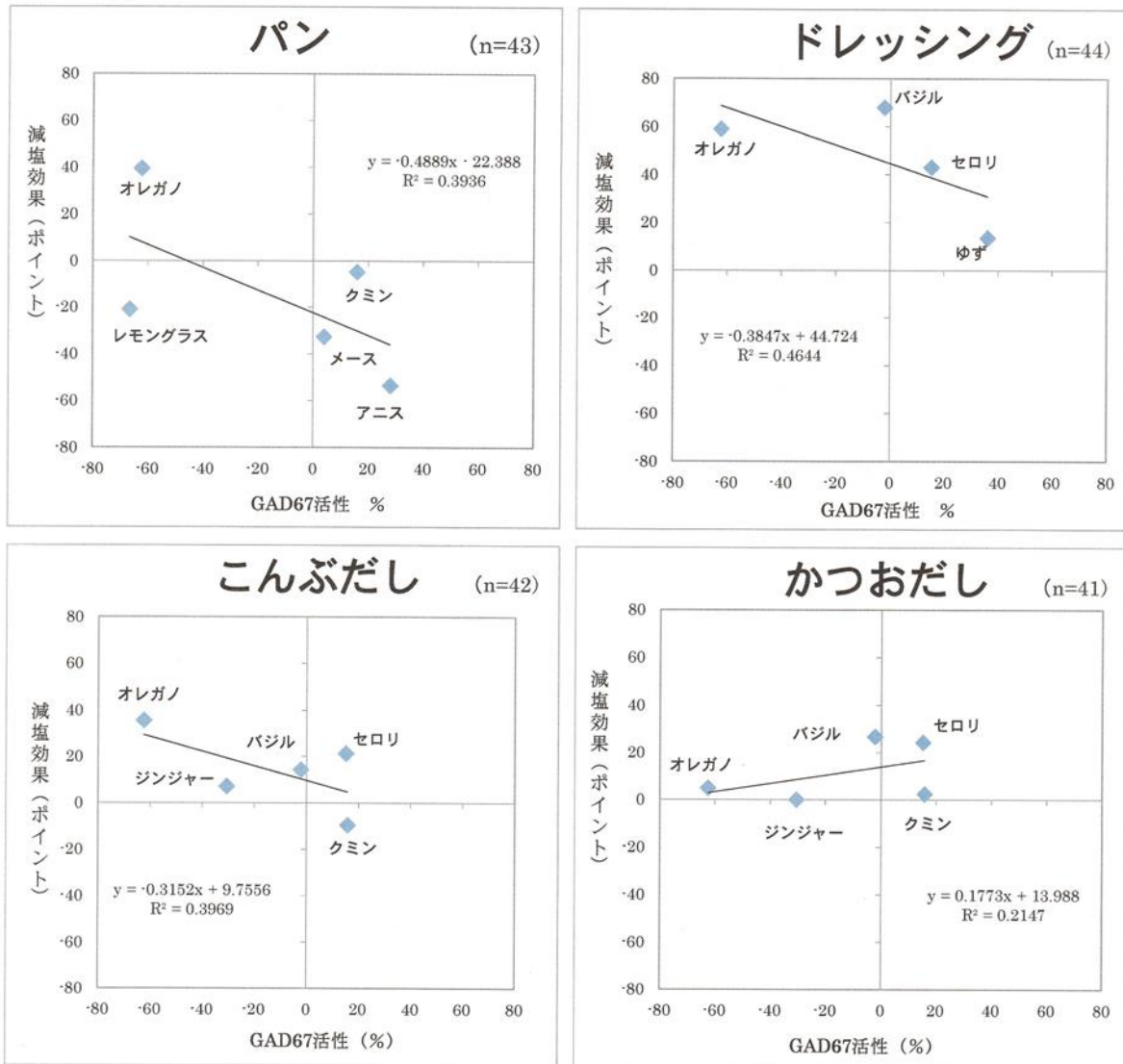


Figure3. 料理に添加した香辛料の減塩効果—GAD67 活性との比較—
減塩効果(ポイント)の評価は久木による^[8]

素活性を測定すると、GAD67はGAPDH活性に影響を与えないが、GAPDHはGAD67活性を上昇させることが分かった。これはすでにWuらが報告しているリン酸化・脱リン酸化によるGAD活性制御機構によるものかもしれない^[9,10]。

さらに複合体形成を検討するため、GAD67全長型タンパク質を組換え体で発現し、それをBiacoreセンサーチップに結合させ、サル脳ホモジェネートより特異的に複合体形成するタンパク質を探索した。上述の手法でMascot解析した結果、lactate dehydrogenase (LDH)を見出した。LDHとGAPDHの間でも複合体形成することを確認でき

たことより、GAD67・LDH・GAPDHの間での複合体が形成されていると考えるに至った。生理的にこの三者がどのような機能を持つかはこれからの課題であるが、クロライオンチャンネルからの情報伝達経路を形成している可能性は否定できない。

4. 考察

減塩食の開発というテーマで本研究を進めてきた。その結果、香辛料がキーとなることを明らかにすることができた。減塩パンなどにおいて、*in vitro*で見出した塩味増強効果をもつ香辛料などはその効果を確認できなかったも

のがあった。また, *in vitro* とは逆に, GAD67 活性抑制作用をもつ香辛料などに塩味増強効果が見られた。実際に調理を行った場合には, 食材には多くの化合物(アミノ酸など)が混在する。それらの相乗的な効果の結果, 純粋な系で見出された塩味増強効果をもつ香辛料の役割が隠されてしまったのであろう。この事実は, 一般的な塩味増強効果をもつ物質にも言えることであり, 調理は独立して考える必要がある。しかし, 重要なことは, これまで塩味増強と香辛料の関係は科学的に考えられてこなかったが, 香辛料のなす役割は大きいし, 様々な効果が得られることが明らかになったことより, ここの料理品目において個別の検討がなされてよいと考える。

塩味の信号伝達機構に関してであるが, GAPDH の多様な moonlighting 効果^[11]の一つに kinase 活性もしくは phosphotransferase 活性があり, これが関与していることが示唆できた。これにより, クロライドイオンチャンネルからの信号は, リン酸化・脱リン酸化経路という一般的なシグナル伝達機構を利用している可能性を示唆するに至った^{[7, 12] [10] [13]}。今後はさらなるタンパク質複合体形成を明らかにし, シグナル伝達の全容を明らかにしたい。

5. 文 献

1. Ueno, H., *Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase*. J. Mol. Catalys. B: Enzym., 2000. **10**: p. 67-79.
2. Nakamura, Y., et al., *GABA is produced in taste bud*. Chemical Senses, 2007. **32**: p. J19.
3. Nakamura, Y., et al., *GABAergic cells in the mouse taste bud*, in *International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes. and Biofactors 2005*. 2005: Awaji, Japan.
4. Nakamura, Y., et al., *Transport of glutamate and GABA on the taste buds that express GAD67, a glutamate decarboxylase isoform*, in *XV International Symposium on Olfaction and Taste*. 2008.
5. 植野 洋志, (新技術)天然物を利用した塩味増強による減塩効果の発揮と食品産業への利用について. 明日の食品産業, 2015. 6月号: p. 15-20.
6. 坂本 千科絵, et al., *味覚情報伝達への影響が期待される香辛料を用いた料理への減塩効果および添加香辛料の探索方法*. 日本食育学会誌, 2018. **12**: p. 147-155.
7. Laschet, J.J., et al., *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition*. J Neurosci, 2004. **24**(35): p. 7614-22.
8. 久木 久美子, *味覚情報伝達を利用した減塩に役立つ食品の探索と同定*, in *奈良女子大学大学院人間文化研究科 共生自然科学専攻 博士後期課程* 2014. p. 116.
9. Bao, J., et al., *Role of Protein Phosphorylation in Regulation of Brain L-Glutamate Decarboxylase Activity*. J Biomed Sci, 1994. **1**(4): p. 237-244.
10. Wei, J., et al., *Protein phosphorylation of human brain glutamic acid decarboxylase (GAD)65 and GAD67 and its physiological implications*. Biochemistry, 2004. **43**(20): p. 6182-9.
11. Harada, N., R. Yamaji, and H. Inui, *Moonlighting タンパク質として見直される GAPDH の機能: アンδροゲン受容体の転写活性におけるコアクチベーターとしての役割*. 化学と生物, 2008. **46**(12): p. 817-819.
12. Wei, J. and J.Y. Wu, *Post-translational regulation of L-glutamic acid decarboxylase in the brain*. Neurochem Res, 2008.
13. Bao, J., W.Y. Cheung, and J.-Y. Wu, *Brain L-glutamate decarboxylase. Inhibition by phosphorylation and activation by dephosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(12): p. 6464-6467.

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご支援賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に深謝申し上げます

Search for Salt-Enhancement Materials from Natural Resources by Using GABA-Synthesizing Enzyme, Development of Low-Salt Content Foods, and Study of Salt Signal Transduction Mechanism

Hiroshi Ueno¹, Kumiko Hisaki² and Yukiko Ueda³

¹Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, School of Agriculture, Ryukoku University,

²Department of Life Design, Osaka International College,

³Faculty of Human Life Science, Osaka City University

Summary

Low salt diet is desired for those people concerning high blood pressure, diabetes, kidney disease, etc. Those having a risk toward high blood pressure and diabetes, called life style related disease, are also targeted for low salt diet. For elderly people especially, low salt diet tends to decrease quality of taste due to the salt effect on Umami. We have been interested on the effect of salt on Umami how salt information interacts with Umami on the taste cells. Recently, we found that GABA producing enzyme, GAD67, is expressed in type III taste cells where expression of GABA_A receptor was also shown. Since GABA_A receptor is known as GABA-gated chloride ion channel, the results suggested a possibility that GABA may play some role in salt signal pathway. We went through extensive human taste tests and found that some spice extracts enhanced salt taste with maintaining Umami. Hence, in this project, following themes were proposed. 1) Screening salt enhancer from natural products by extracting effective components. 2) Preparing low salt recipe that contains salt enhancer from natural products. Low salt bread and other foods are compared with foods prepared with normal recipe by human taste tests. 3) Applying Surface Plasmon Resonance method, salt signal transduction pathway is investigated.

Spice extracts were incubated with GAD67 enzyme and substrate, L-glutamate, where GABA produced was quantitatively measured. At the same time, those spice extracts were mixed with standard salt water where panelists examined taste if saltiness be enhanced or reduced. Both enzyme activity change and saltiness change were converted to numbers, hence, correlation plot was drawn. We observed from these *in vitro* experiments there is a rule that those increased GAD activities can be salt enhancers. Screening was carried out to make a library for spices that enhance salty tastes.

Meanwhile, we prepared low-salt recipe for bread, dressing, and soup. Specific aim was to maintain saltiness and umami taste by adding spice extracts, since lowering the salt contents reduces umami taste. Some of spice extracts indeed showed salt enhancing effect and maintain umami taste, but those spice extracts were not necessarily the same spice extracts activated GAD67. The reasons are not clear at the moment, but it is projected that actual food materials contain multiple materials, including many free amino acids, that affected the taste. We shall continue to investigate this point.

About the signal transduction for salt, protein complex formation was investigated. Peptides having hydrophobic region found in N-terminal region of GAD65 and 67 were synthesized and attached to Biacore sensor chips. Interaction with brain extracts, there was a protein fraction positively interacted with GAD67peptide#1. After tryptic digestion and LC-MS analysis, we found this protein was GAPDH. GAD67 native protein was also found to interact specifically with GAPDH; thus, it is probable that GAD67 and GAPDH forms a protein-protein complex. It has been known that GAPDH interacts with alpha1 subunit of chloride ion channel, probably phosphorylates Ser/Thr residue with its kinase activity. We also found LDH to interact with both GAD67 and GAPDH. Physiological meaning of the complex formation between these three proteins are still not clear. We strongly believe they play important roles in salt signal pathway.

味噌の木桶仕込による風味生成の解明と減塩効果の可能性を探る

若林 素子, 清水 友里

日本大学生物資源科学部食品ビジネス学科

概要 和食に不可欠な食品である味噌を発酵熟成する際には、古来より木桶を用いることが一般的であった。しかし、近年はステンレスやプラスチック容器を使用することが主流である。一方で、伝統的な製造方法として木桶を使い続けたり、改めて木桶製法を見直したりする動きもある。最終製品に木桶ならではの風味が加わると言われているためであるが、その風味や美味しさの向上や木桶が美味しさを生み出すメカニズムなどは明らかにされていない。木桶製法により香りや味に好ましい変化が生ずるのであれば、木桶以外のものに比べて調理や摂食の際に味噌の使用量を減らしても満足感が得られる、つまり減塩に繋がる可能性がある。従って、木桶仕込み味噌の発酵熟成中にいかに風味成分が生成するのか、木桶仕込み味噌には減塩効果があるのかにつき、詳細に検討し明らかにしたいと考えた。

本研究は主に以下の4項目を中心に進めた。(1)醸造メーカーが木桶及び非木桶で仕込んだ市販の味噌を入手し、それらの官能的な違いを調べた。(2)実験室で味噌を調製し、木桶及びステンレス桶にて発酵熟成を行い、各種成分や微生物菌叢の経時変化を分析した。(3)味噌の香気成分の抽出・分析方法を検討し、においかぎ GC-MS 分析によって熟成容器による香気特性の違いを調べた。(4)実験室にて調製した味噌を試料とし、味覚および嗅覚に関する官能評価を行い、熟成容器の違いによる塩味強度の違いや減塩効果を調べた。

市販の木桶・非木桶味噌の官能評価を行った結果、パネルは容器の違いに伴う官能的な違いを認識はしているものの、木桶味噌の嗜好的な優位性はなかった。木桶味噌はより発酵臭が強く複雑な風味を有する可能性が示され、味噌より味噌湯での評価が木桶試料で上がり、加熱調理への適性が高いと思われた。実験室調製味噌の熟成における経時変化の中で、容器による違いが認められたのは色調と遊離アミノ酸量であった。色調の Y 値は熟成 5.5 か月で木桶の方が有意に低くなり、木桶は熟成に伴う褐変の進行を促進した。遊離アミノ酸量では、木桶試料で甘味うま味系アミノ酸の含有量が多く、苦味系アミノ酸の減少量が大きかった。香気分析をポーラスポリマー吸着法と SPME 法で行い、いずれの手法でも木桶味噌に甘い香り成分である Maltol などが多く、Vanillin は木桶試料のみに検出され、木桶熟成により生成香気成分に差があることが示された。実験室調製味噌を官能評価した結果、11 か月という長期熟成すると容器間の差が顕著になり、木桶熟成により味噌湯の後味が長くなり、酸味と塩味の強度は有意に高くなった。以上より、木桶による減塩効果の可能性が示唆された。

1. 研究目的

和食に不可欠な大豆発酵調味料である味噌は、原料の麴として米、麦あるいは大豆のどれを使用するか、その麴の使用割合、塩分濃度などにより表1に示すようにさまざまに分類されている⁽¹⁾。いずれの味噌であっても、味噌として完成するまでには一定時間以上の発酵熟成が必要であり、その際には、原材料を混合した後、古来より木桶

で仕込み、熟成させることが一般的であった。しかし、近年は食品製造における衛生管理の必要性や管理の容易さなどを原因として木桶の代わりにステンレスやプラスチック容器を使用することが主流となっている。一方で、伝統的な製造方法としての木桶を使い続ける企業や、改めて木桶製法を見直す動きもある。理由として、伝統製法のよいイメージがあることや、最終製品に木桶ならではの風味

表1 味噌の種類と特徴

麴原料	味	色	通称	麴歩合		塩分 (%)
				範囲	一般値	
米	甘	白	白味噌, 関西味噌, 府中味噌, 讃岐味噌	15-30	22	5-7
		赤	江戸甘味噌	12-20	15	5-7
	甘口	淡色	相白味噌	10-15	12	8-11
		赤	御膳味噌	10-15	12	11-12
	辛口	淡色	白辛味噌, 信州味噌	5-10	7	12-13
		赤	津軽味噌, 仙台味噌, 越後味噌, 佐渡味噌	5-10	7	12-13
麦	甘口	麦味噌	15-25	20	9-11	
	辛口	麦味噌	8-15	10	12-13	
豆		豆味噌, 三州味噌, 伊勢味噌	100		10-12	

が加わり、味がまるやかにおいしくなる⁽²⁾と言われることなどがあげられている。しかし、その風味や美味しさの向上が客観的事実として証明されたり、木桶が美味しさを生み出すメカニズムなどが明らかにされたりしているわけではない。日本酒においては樽に保存した酒と対照酒を比較し、樽酒が直前に摂取した食品のうま味を強く感じさせる効果があることが報告されている⁽³⁾が、味噌においては筆者の知る限り同様の報告はない。木桶製法により香り成分や味成分に好ましい変化が生ずるのであれば、木桶以外の製法のものに比べて調理の際や摂食の際に味噌の使用量を減らしても満足感が得られる、つまり減塩に繋がる可能性がある。塩分は我々にとって必要不可欠な栄養成分であり、適量の使用が食品のおいしさを決定づける非常に重要なものではあるが、その摂取量に関しては、日本人は依然として過多の状況にある。単純に食事の塩分を減らすと嗜好性が低減し、食事の満足感が得られないだけでなく、全体としての食事摂取量の不足による低栄養にも繋がりがかねない。その点、和食の伝統的発酵調味料である味噌には複雑な呈味成分や香り成分が共に存在するため、さらにそれらが増強されている可能性がある木桶製法味噌には減塩効果があると推定し、詳細に検討し、明らかにしたいと考え、研究を行うこととした。

2. 研究方法

本研究は主に以下に記す4項目を中心に進めた。
 (1) 醸造メーカーが木桶及び非木桶(ステンレスなど)で仕込んだ市販の味噌製品を入手し、それらの官能評価を行い、官能的に違いが認められるか否かを調べた。

(2) 実験室内で、同一原材料を用いて味噌を自ら仕込み、木桶及びステンレス桶に入れて発酵熟成を行い、各種成分や微生物菌叢の経時変化を分析し、比較解析を行った。

(3) 味噌の香气成分の抽出・分析方法を検討し、においかぎ GC-MS 分析によって味噌の発酵熟成容器による香气特性の違いを調べた。

(4) 実験室にて調製した木桶およびステンレス仕込み味噌を試料とし、味覚および嗅覚における違いを調べる官能評価を行い、発酵熟成容器の違いによる塩味強度の違いや減塩効果を調べた。

市販味噌は木桶仕込みを明確にうたっているものと非木桶の試料を福井県および岡山県のメーカーより購入して使用した。各試料は表2に示したとおり辛口2種と甘口または甘と類似の系統ではあるが、市販商品であるため麴歩合や原材料など、木桶かどうか以外にも様々な違いがある。福井県の試料4種間および岡山県の試料2種間の比較を官能的に行った。

市販味噌の官能評価は、本学の20歳代学生男女10~18名をパネルとし、味噌を直接、あるいは塩分濃度0.9%となるよう湯に溶解した味噌湯(64°C)を試料として行った。評価方法は5段階の評点法、評価項目は喫食前後での味噌らしい香りの強さや味噌以外の香りの強さと香りの嗜好性、喫食後の味の嗜好性と総合的な嗜好性である。官能評価の試料には3ケタの乱数を付し、試料位置などもランダム化して実施した。

実験室調製味噌は国産大豆5.8kg、米麴5.8kgおよび塩2.5kgを原料として、麴歩合10部、塩分濃度11.5%の

表 2 実験に用いた市販味噌

試料	麹歩合	味	塩分濃度(%)	有機	製造会社所在地
木桶1	8	辛口	12.4	○	福井
木桶2	15	甘口	11.9		福井
木桶3	13	甘口	10.9		岡山
非木桶1	8	辛口	12.7		福井
非木桶2	22	甘	12.4	○	福井
非木桶3	12	甘口	11.6		岡山

甘口米味噌を調製した。具体的には、大豆は約 22 時間浸漬し、オートクレーブ LBS-245 ((株)トミー精工)で 120°C10 分煮熟し、磨砕した。その後、食塩と米麹で調製した塩切り麹と磨砕大豆を混ぜ合わせ、4等分して木桶 2 個とステンレス桶 2 個に仕込み、5.5 kg の重しをのせて 25°Cにて発酵させた。研究初年度は仕込みから 3 か月まで発酵熟成させ、次年度はより長期の影響をみるために新たな容器を用いて 11 か月間熟成させた。さらに 3 年目は容器を継続使用する影響を調べるために同一容器を用いて再度発酵熟成を行った。

味噌の発酵中における経時変化に関しては、仕込み直後および約 1 か月間隔で、外観の状況を観察記録し、簡易的に香りおよび味の変化を記録すると同時に、水分、水分活性、pH および色調の測定を行った。水分の測定には(株)島津製作所の赤外水分計 MOC63u を、水分活性はアズワン(株)の水分活性測定装置 SP-W を、pH 測定には(株)堀場製作所の LAQUA twin B-711 を、色調測定にはコニカミノルタジャパン(株)の色彩色差計 CR-400 を使用した。また、各容器の発酵過程における遊離アミノ酸の生成を調べた。試料に 5%TCA 超純水溶液を加えて 100 倍希釈した後 10 分間攪拌し、遠心上清を 0.45 μm フィルターろ過し、分析試料とした。アミノ酸分析は、日立高速アミノ酸分析計 L-8900 を使用し、粒径 3 μm の強酸性陽イオン交換樹脂カラムを用いたポストカラム誘導体化法にて行った。さらに、微生物菌叢の測定を行った。一般生菌数の測定には標準寒天培地を、乳酸菌には BCP 加プレートカウント寒天培地を、カビにはサブロー寒天培地を、酵母には PDA 培地を使用し、各培地に 10%食塩を、カビと酵母用の培地にはさらに 0.05%クロラムフェニコールを添加し、混釈培養法により各微生物菌数の測定を行った。

香り分析は、2 種の方法を試みた。すなわち、菅原ら⁴⁾

の報告を参考としたポラパック Q を用いたポーラスポリマー吸着法と、DVB/CAR/PDMS ファイバーを用いた SPME 法である。いずれの手法においても、香り濃縮物を Agilent Technologies 社の 7890B GC System・5977B MSD を用いて GC-MS 分析すると同時にカラム出口を分岐してにおいかぎ分析を行った。GC-MS の分析条件は以下のとおりである。カラム:Agilent Technologies 社 HP-5MS 30 m x 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm, キャリアガス:He, 流量 1.9 mL/min, オープン温度:50→150 °C (2°C/min), 150→200°C (5°C/min), インジェクター温度:250 °C, イオン源温度:230°C。SPME 法の条件は以下のとおりである。吸着条件は味噌 3 g, 40°C, 40 分間, 味噌湯は味噌 3 g に NaCl を 11.8 g と水 5 mL 添加し, 70°C, 30 分間。脱着条件はいずれも 250°C, 2 分間である。分析結果は、GC-MS Chem Station (Agilent Technologies) 及び Aroma Office (西川計測株式会社)により解析し、化合物の同定は保持指標 (RI) とマススペクトルのデータベースとの一致、さらには香り官能特性の文献との一致により行った。

実験室調製味噌の官能評価は、各研究年度次のように行った。初年度は発酵 3 か月の木桶およびステンレス桶の試料を用い、味噌および味噌湯の色の濃さや嗜好性、味や香りの強さなどに関する評価を 5 段階の評点法にて比較した。研究 2 年目は発酵 4 か月後の試料を用い、上記同様に比較検討した。研究 3 年目は 2 年目に調製して 11 か月各容器内で熟成させた試料および容器継続使用による発酵 3 か月の味噌を試料とし、より詳細な評価結果を得るため 7 段階の評点法を用いた。さらに、必要に応じて鼻栓を使用し、鼻栓の有無による結果を比較することで、評価に与える香りの影響を明らかにすることを試みた。味覚の違いを調べるため、甘味、酸味、塩味、うま味および後味の強弱の項目も加えた。また、味噌湯を飲んだ後

の後味の長さを、摂食および嚥下のタイミングを合わせ、モニターに表示したタイマーによりパネリストが後味を感じなくなった秒数を記録させることで測定した。味噌湯の塩味強度を数値化するため、塩分濃度 0.8%の味噌湯を試料とし、さらに詳細な検討を行った。まず 0.8%食塩水を対照試料として提示し、味噌湯試料の塩味強度を、対照を 0 とした時の±4 の評点で評価した。さらに同味噌湯試料を、食塩水 (0.7, 0.8, 0.9%) と比較させ、線尺度法による評価を行い、官能的な塩味強度の数値化を試みた。提供した試料は味噌の場合は常温で 2 g、味噌湯の場合は塩分濃度が 0.9% または 0.8% になるよう味噌を熱湯に溶いて調製し、40 mL を提供して 64°C で評価させた。評価用紙には記述欄も設け、評点以外の官能的情報も収集した。

分析および官能評価により得られた結果は、エクセル統計 2015 を用いて統計解析を行った。2 群の比較の際には *t* 検定を、3 群以上の比較の際には一元配置分散分析を行った後、tukey の多重比較検定を行った。さらに、スピアマンの順位相関係数による相関の解析を行った。

3. 研究結果

3.1 市販味噌の官能評価

市販の福井県産木桶味噌 2 種および非木桶味噌 2 種 (表 2) を試料とし、大学生男女 18 名をパネルとした評点法による官能評価を行った。味噌をそのまま味わった際の結果を図 1 に示した。香りの評価は摂食前後で実施しており、図中の (前) は摂食前の評価、(後) は摂食後の評価結果である。いずれの評価項目においても、木桶 2 種の結果は類似している傾向が認められた。木桶 2 の摂食前の香りの味噌らしさが強い傾向があったが、有意な差ではなかった。非木桶 1 試料についても、木桶試料との有意な差は認められなかった。

一方、非木桶 2 には異なる傾向があり、特に摂食前後共に味噌以外の香りが他の試料と比較して 1% の危険率で有意に強く、味の好ましき ($p < 0.05$) や総合的な好ましき ($p < 0.01$) においても非木桶 1 と比較して有意に好まれないことが示された。

4 種の味噌を試料とした味噌の官能評価の結果の相関をスピアマンの順位相関係数により調べ、表 3 に示した。

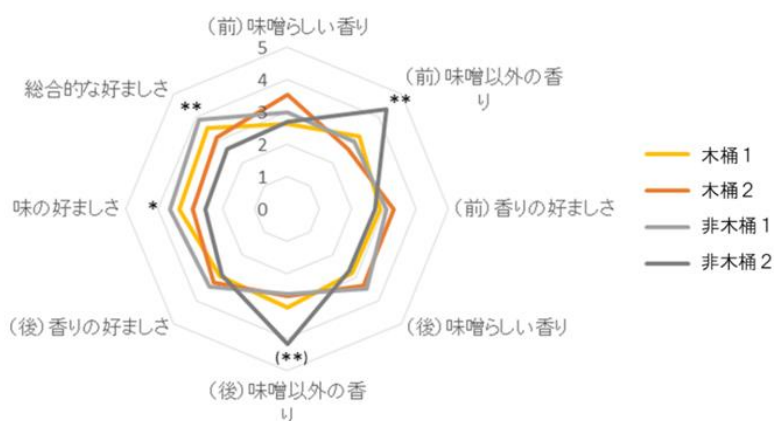


図 1 市販味噌 (福井県産) の官能評価結果

表 3 市販味噌 (福井県産) 官能評価結果の相関

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
①(前)みそらしい香り								
②(前)みそ以外の香り	0.0433							
③(前)香りの好ましき	0.4175	0.1358						
④(後)みそらしい香り	0.4405	0.1412	0.1889					
⑤(後)みそ以外の香り	-0.1202	0.1016	-0.2834	-0.2826				
⑥(後)香りの好ましき	0.0644	0.1883	0.3864	0.4601	-0.2366			
⑦味の好ましき	0.0408	0.3311	0.3816	0.4582	-0.4158	0.5797		
⑧総合的な好ましき	-0.0113	0.3775	0.3487	0.4290	-0.2895	0.5937	0.7893	

最も高い正の相関が認められたのは味の好ましさと総合的な好ましさであることは当然であろうが、次いで摂食後の香りの好ましさが味と総合的な好ましさに正の相関が認められた。ヒトが食品の香りを感じる際は、鼻からにおいを嗅ぐ「鼻先香」と、食品を口に入れて咀嚼することで喉から鼻に抜ける「口中香」の2種があり、それぞれで感じる香りは異なると言われている⁽⁵⁾。今回の味噌試料の評価においても、鼻先香よりも口中香が嗜好性に強く影響する可能性が示唆された。

次に、市販味噌4種を塩分濃度0.9%となるよう湯に溶かした味噌湯を試料として同様に官能評価を行った。結果は図2に示したが、木桶2種は味噌そのもので評価した場合と同様に非常に近似の結果を示した。さらに、味噌湯の場合は鼻先香の香りの好ましさは木桶2種ともに、口中香の味噌らしい香りについては木桶2が非木桶2と比較して1%の危険率で有意に好ましくあるいは強く評価された。非木桶2の評価は、味噌そのものの評価以上に他の

味噌と比較して有意に好まれない、あるいは異なる結果が示された。

味噌湯における官能評価結果の相関を表4に示した。傾向としては味噌の評価結果との類似がみられるものが多いが、味と総合的嗜好性や口中香と嗜好性のさらに強い正の相関が認められた。味噌湯において鼻先香の味噌以外の香りがその他の評価との間に負の相関が認められる傾向がある点は味噌湯においてのみ認められた。

次に、岡山県産の市販木桶味噌および繊維強化プラスチック製(以下FRPとする)桶味噌を試料とし、大学生男女12~14名をパネルとした評点法による官能評価を行った。味噌をそのまま試料とした際の結果を図3に示した。香りの評価は摂食前後で実施しており、図中の鼻:は摂食前の評価、口:は摂食後の評価結果である。木桶の香りは摂取前後ともに味噌以外の香りの強さがFRPと比較して1%の危険率で有意に高いと評価され、木桶味噌に何らかの違いをパネルが感じていることが示された。一方、

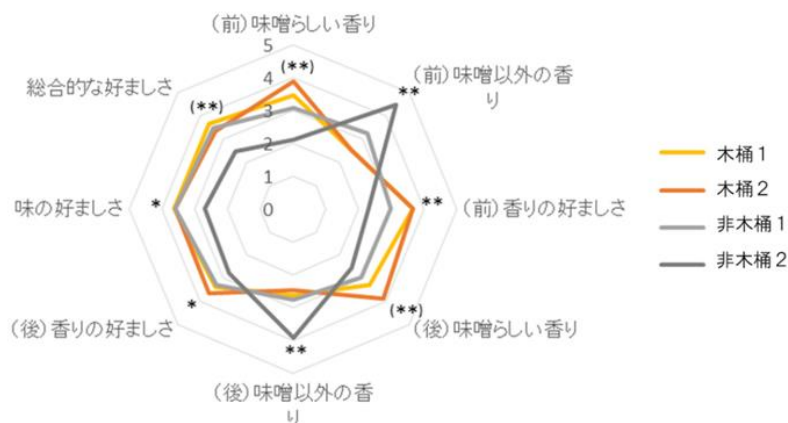


図2 市販味噌(福井県産)の味噌湯における官能評価結果

表4 市販味噌(福井県産)の味噌湯における官能評価結果の相関

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
①(前)みそらしい香り								
②(前)みそ以外の香り	-0.4580							
③(前)香りの好ましさ	0.6573	-0.3943						
④(後)みそらしい香り	0.6061	-0.4281	0.5519					
⑤(後)みそ以外の香り	-0.0163	0.4151	0.0116	-0.0015				
⑥(後)香りの好ましさ	0.4624	-0.2948	0.5629	0.4922	0.0234			
⑦味の好ましさ	0.4001	-0.3547	0.5676	0.4080	-0.0795	0.8080		
⑧総合的な好ましさ	0.3961	-0.3958	0.6055	0.4814	-0.0557	0.7837	0.8533	

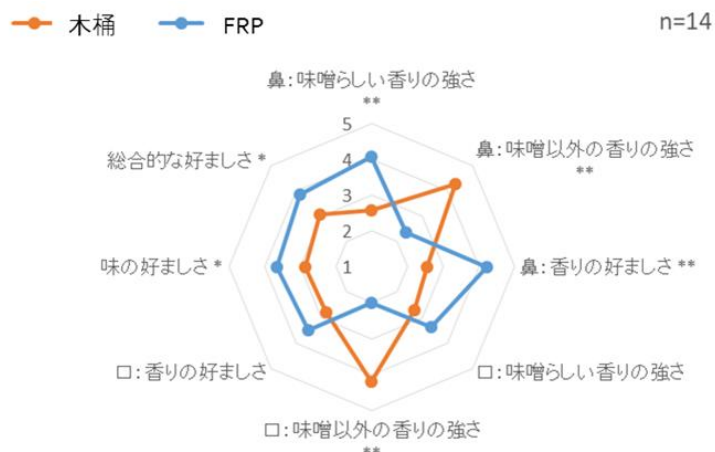


図3 市販味噌(岡山県産)の官能評価結果

FRP において味噌らしい香りの強さが摂取前後共に FRP より 1%の危険率で有意に高く、味の好ましさ、総合的な好ましさにおいても FRP 桶味噌が 5%の危険率で有意に高く評価された。

市販味噌 2 種を湯に溶かした味噌湯を試料として同様に官能評価を行った。なお、両者の塩分濃度が異なるため、味噌湯の調製の際には同量の味噌と湯を用い、木桶試料には不足分の塩化ナトリウムを添加し、塩分濃度を 0.9%に揃えた。結果は図 4 に示したが、摂取前後における味噌以外の香りの強さは木桶において有意に強いと評価され、摂取前の香りの好ましさは FRP が有意であった。しかしながら、味噌そのものの評価では有意差が認められた摂取前の味噌らしい香りの強さと味の好ましさおよび総合的な好ましさにおいて、両試料に差は認められなかった。

今回の官能評価では、パネルに評点をつけさせると同時に自由記述によるコメントも求めた。その結果、木桶味噌の香りは「漬物様」「アルコール」など、発酵臭と思われる記述が複数あり、味としても酸味がより強いとの記述もあった。一方、FRP 桶味噌は特徴がない、だから食べやすいといった記述があった。

3.2 実験室調製味噌の経時変化

次に、実験室にて甘口米味噌を調製し、木桶とステンレス桶に各 2 個ずつに入れて熟成発酵させて経時的な変化を測定し、比較検討した。同一木桶を継続使用した研究 2 年目の結果と研究 3 年目の結果を中心に説明する。水分の測定結果を図 5 に示した。研究 2 年目試料を各試

料の 1 として実線で、研究 3 年目を同様に 2 として破線で示した。実験室における味噌の仕込みは、大豆の使用量や麴歩合および塩分含量を合わせることを第一義に行っているため、試料 1 と 2 は結果的に仕込み時の水分含量が異なっており、1 は 45.5%、2 は 47.2%であった。両年度とも、仕込み容器の違いに関わらず発酵 1 か月までは水分が若干上昇し、その後ステンレス容器では顕著な変動はないが、木桶では低下と上昇の変動が認められた。しかし、いずれにおいても測定試料内での変動があるため容器間での有意差が認められたのは試料 2 の 3 か月目のみであり、当該試料でも 4 か月目には有意な差ではなくなったことから、水分に関しては発酵熟成容器による差は無いものと考えた。

水分活性の測定結果を図 6 に示した。試料 1 は初期値の測定ができておらず不明であるが、発酵 2 か月目から 3 か月目にかけて明らかな減少が認められ、その後再度上昇したが発酵 5 か月目にはステンレス桶は 0.80、木桶は 0.78 に低下した。試料 2 は初期値 0.87 から若干の低下と上昇を経た後に発酵 4 か月後に 0.85 となった。試料 1 では発酵 5 か月後に、試料 2 では発酵 1 か月から 3 か月にかけて木桶のほうが低い傾向が認められたが有意な差ではなく、試料 1 と 2 でも同一の傾向ではなかった。

味噌の pH の測定結果のうち、試料 2 について図 7 に示した。調製直後の 6.1 から経時的に低下し、発酵 5.5 か月後には木桶は 5.3、ステンレス桶は 5.4 となった。木桶のほうが低い値ではあったが、その差は有意ではなかった。

色調の変化については、色調測定において広く用いら

木桶 FRP



図4 市販味噌(岡山県産)の味噌湯における官能評価結果

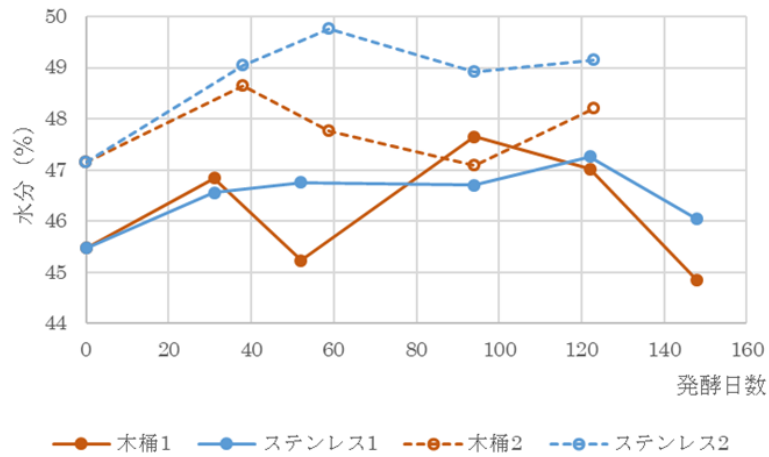


図5 実験室調製味噌の水分量の経時変化

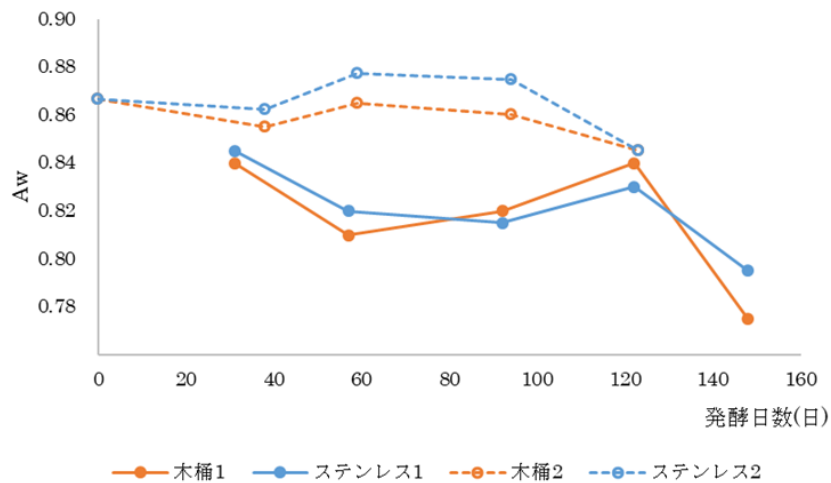


図6 実験室調製味噌の水分活性の経時変化

試料1は一回の測定結果, 試料2はn=4の平均値で示した

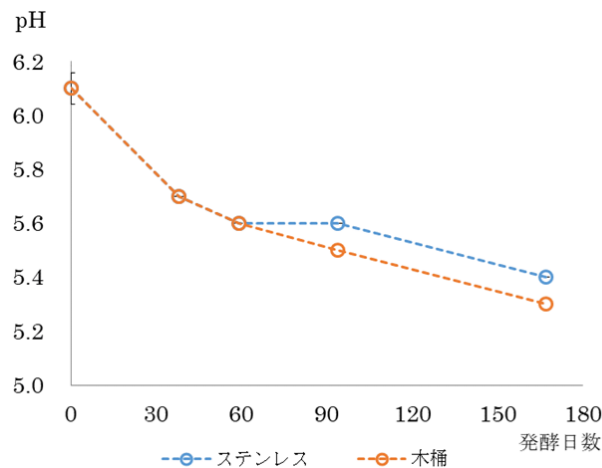


図7 実験室調製味噌のpHの経時変化
試料2のn=4の平均値で示した

れている L*a*b*表色系と味噌の色調評価に一般に用いられることが多い Yxy 表色系の両方で経時変化を測定した。それらのうち試料2のY値の変化について図8に示した。いずれの容器においてもY値は発酵の経過に伴い2か月まではほぼ同様の低下を示したが、5.5か月においては木桶試料が有意に低い値を示し、発酵が長期になると木桶の方がより色が濃くなることが示された。

各発酵段階における味噌の遊離アミノ酸量をアミノ酸分析計にて測定したところ、タンパク質構成アミノ酸とそれ以外のアミノ酸及びアミノ化合物計36種類が検出された。試料1の経時変化について取り上げて説明する。仕込直後および発酵2,4,7.5および11か月後の味噌に含まれるタンパク質を構成するアミノ酸の総計は発酵0から2ヶ月でいずれの容器においても約4倍に増え、その後減少する傾向が認められ、7.5か月目までは木桶の方が遊離アミノ酸総量は多い傾向であったが、11か月後の値はほぼ同等となった。全ての遊離アミノ酸のうち、甘味とうま味を呈するアミノ酸である Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly および Ala 量を合計した値を味噌100gに含まれるmg数として図9に示した。いずれの容器においても、全遊離アミノ酸とは異なり発酵4か月まで合計量が増加する傾向が見られ、特に木桶はステンレス桶と比較して2か月後で1.2倍多い値を示した。4か月以降は合計値が低下する傾向にあったが、5.5か月後でも木桶の方が1.1倍多かった。発酵11か月では両者の差は認められなくなった。一方、苦味を

呈する芳香族アミノ酸 (Phe, Tyr) と塩基性アミノ酸 (Lys, Arg, His) の含量の増減は木桶で特に顕著であり、2か月後の増加量はステンレス桶より明らかに多かったが、その後の減少幅も大きく、発酵11か月後には逆に木桶の方が少なくなる傾向が認められた。

さらに、発酵熟成における微生物菌叢の経時変化を一般生菌、カビ、酵母および乳酸菌について測定した。酵母は発酵3か月から急増する傾向が認められた。しかし、各実験における複数結果のばらつきが大きい問題などがあり、熟成容器が微生物菌叢に与える影響は明確に示すことができなかった。

3.3 手作り味噌の香気成分分析

実験室調製味噌(初年度)の香気成分をまずカラム濃縮法にて抽出し、においかぎGC-MSにて分析を行った。分析の結果122ピークが検出され、うち官能的に香気を感じられたものは41であった。甘い香気特性を有する Phenylethyl alcohol や Maltol は両容器味噌試料で検出されたが、木桶試料の含有量がステンレス桶試料の2~4倍認められた。また、ヴァニラの特有香である Vanillin は木桶試料のみに認められた。カラム濃縮法は食品香気抽出にも広く用いられ、低沸点から高沸点成分まで幅広く分析可能であるが、抽出液を濃縮する際に低沸点成分は若干揮散する傾向にあり、本実験のクロマトグラムにおいても中から高沸点成分のほうがより効果的に検出されている傾向が認められた。

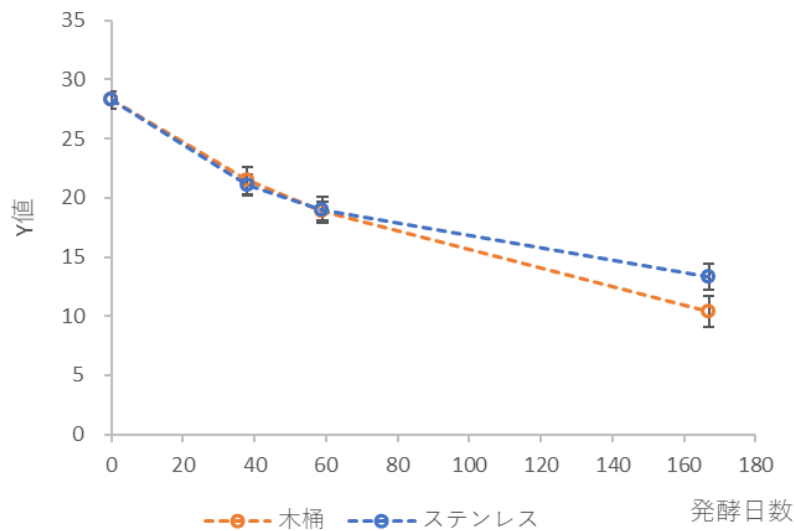


図8 実験室調製味噌の色調(Y 値)の経時変化
試料2のn=4の平均値で示した

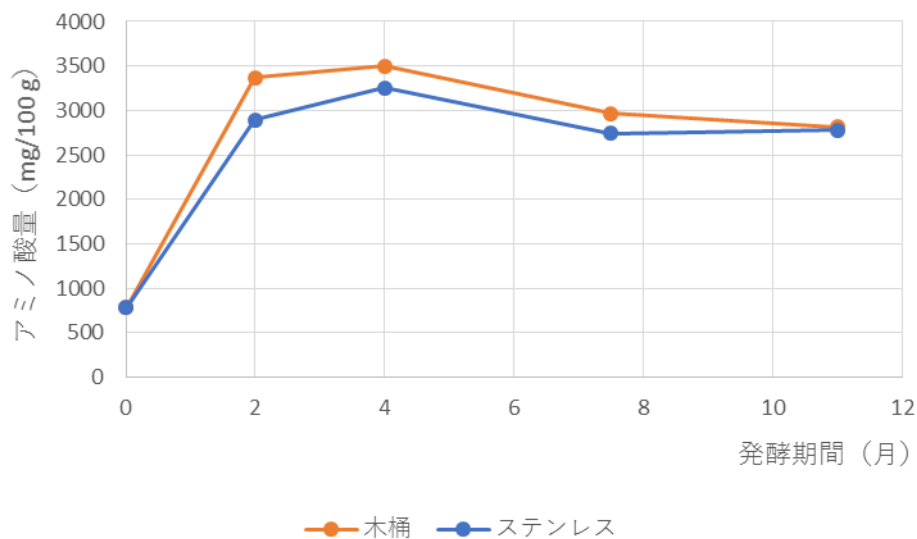


図9 実験室調製味噌の甘味, うま味系遊離アミノ酸量の経時変化
試料1のAsp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Alaの合計量をn=2の平均値で示した。

さらに実験室調製味噌(2年目)2種の味噌そのものおよび味噌湯のヘッドスペース香气成分をSPME法にて捕集し, においかぎGC-MSにて分析を行った。木桶およびステンレス桶間で, 味噌, 味噌湯ともに合計ピーク面積にはほぼ差がなかったが, ピーク数と官能的に香气を感じたピーク数は味噌においても味噌湯においても木桶の方が明らかに多い結果となった。特徴的な成分としては, マ

ツタケ特有香として知られる1-Octen-3-olが木桶はステンレス桶の1.5倍, 柑橘類の特有香であるLimoneneは同様に2.0倍, 甘い香りのMaltolは同様に1.8倍存在していた。味噌香气における重要化合物である, 2-Methoxy-4-vinylphenolも木桶のほうが約2倍の含有量であった。SPME法はカラム濃縮法と比較すると予想された通り低沸点成分が効果的に捕集分析可能であったが, 抽出される

香氣成分が少ないため微量成分の検出が困難である問題があり、さらに本実験においても高沸点成分の検出には限界があった。

3.4 実験室調製味噌の官能評価

実験室調製味噌を試料とした、味噌そのもの、および味噌湯に関する官能評価を行った。

初年度の発酵熟成3か月味噌における結果を図10に示した。図中の鼻:は喫食前の評価、口:は喫食後の評価である。ステンレス桶試料は色が有意に濃く、好ましく、口中香が好ましく、総合的にも有意に好まれる結果となった。一方、木桶味噌は、口中香で「味噌以外の香り」が有意に強く感じられ、口中香が有意に好ましくないと評価された。鼻先香や塩味やうま味などの味覚強度的には木桶とステンレス桶の間に有意な差は認められなかった。以上より、本実験のパネルは味噌の色および口中香を中心として木桶味噌とステンレス桶味噌を識別しており、色が濃いステンレス味噌を好むことが示された。こういった傾向は、詳細は省略するが、味噌湯を試料とした場合もほぼ同様であった。

研究2年目は新たに調製した発酵熟成4か月の試料を用いて官能評価を行った。この際はパネルに香りに重点を置いて評価してもらうことを期待し、色や味覚強度の項目は設けなかった。味噌における結果を図11に示した。ステンレス桶試料は喫食後の「味噌らしい香り」の強さが有意に強い($p < 0.05$)と評価された。鼻先香や口中香における「味噌以外の香り」の強さと総合的な嗜好性におい

て木桶のほうが高く評価される傾向にあったが、有意ではなかった。香りの好ましさや味の好ましさにおいてはほとんど差が認められなかった。評価の際には評点のみならず自由記述を求めたが、その内容を見ると、木桶試料は

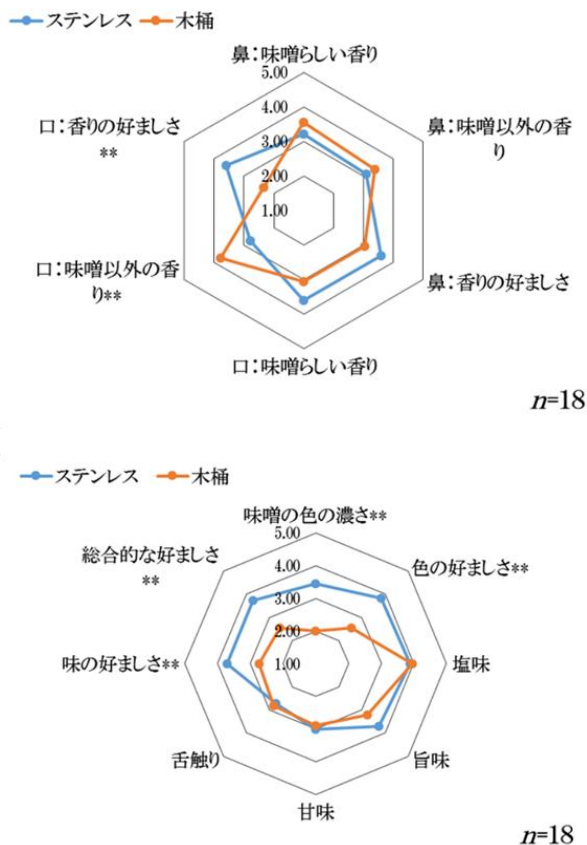


図10 実験室調製味噌初年度の官能評価



図11 実験室調製味噌(2年目)の官能評価

塩味が強い、発酵臭が強い、といったものがあった。同様に味噌湯の官能評価の結果を図 12 に示した。鼻先香および口中香における「味噌らしい香り」はステンレス桶のほうが強い傾向、口中香での「味噌以外の香り」は木桶が強い傾向ではあったが、それらを含めて全ての質問項目において容器間における有意差はみられなかった。

研究3年目は前年度の木桶を継続して使用して新たに仕込んだ味噌を発酵熟成させた。木桶を連続的に長期使用することで木桶に生残する微生物菌叢の効果を期待したが、当該年度の夏季高温多湿の影響で空調管理に不具合が生じ、桶にカビが繁殖してしまったため、発酵を3か月で終了し、それらを試料として比較検討した。さらに、前年度の味噌試料は木桶およびステンレス桶で11か月まで発酵熟成させており、こちらも同様に官能評価を行った。官能評価では鼻栓の有無で行い、評価に与える香気の影響を確認した。評点を7段階にすることでより詳細な差を調べた。以下、3年目の3か月熟成試料を3-3、2年目の11か月熟成試料を2-11と表記する。

試料3-3の味噌および味噌湯を試料とした官能評価の結果、味噌で鼻栓無しの場合のみ鼻先香および口中香での「味噌以外の香り」と「塩味」「うま味」および「後味」の強度において木桶試料のほうが強い傾向があったが、パネル間の偏差が大きく有意差は認められなかった。それ以外の評価項目については、発酵容器による差はほとんど見られなかった。評価用紙の自由記述欄には木桶試料に対して「木のような香り」や「ヒノキの香り」との表記もあ

ったことから、鋭敏なパネリストは木桶試料の違いを認識しているものと考えられた。

試料2-11の味噌そのものの評価においては、鼻栓の有無に関わらず「塩味」強度が木桶のほうが強い傾向があり、「うま味」と「後味」は鼻栓無しの場合のみ木桶が強い傾向であった。味噌湯を試料とした場合はより明確な容器間の差が認められた。鼻栓有りの結果を図13に、鼻栓無しでの結果を図14に示した。鼻栓の有無に関わらず木桶試料はステンレス桶試料より「後味」が強い($p < 0.05$)と判断され、後味に香りは影響しないと考えられた。「酸味」と「塩味」強度においては、鼻栓無しの場合のみ1%の危険率で木桶のほうが有意に強いと評価された。また、有意差は見られなかったが「うま味」強度の評点平均値は木桶で 4.21 ± 1.42 でありステンレス桶の 4.00 ± 1.30 より大きかった。「甘味」においてはステンレス桶の方が有意に強いと評価された($p < 0.05$)。「味噌以外の香り」はこれまでの結果と同様に木桶試料が有意に高く評価された($p < 0.05$)。

試料2-11を使用した味噌湯の官能評価において木桶試料に後味の強さが認められたため、その差をより明確にするために一定量の味噌湯を摂食し、後味が消える時間を測定した。その結果、木桶試料は24.8秒、ステンレス桶試料は21.8秒であった。パネル間の偏差が大きかったため有意差は見られなかったが、平均値として木桶が3秒間、約1.2倍後味を長く感じさせることが明らかとなった。



図 12 実験室調製味噌(2年目)の味噌湯の官能評価

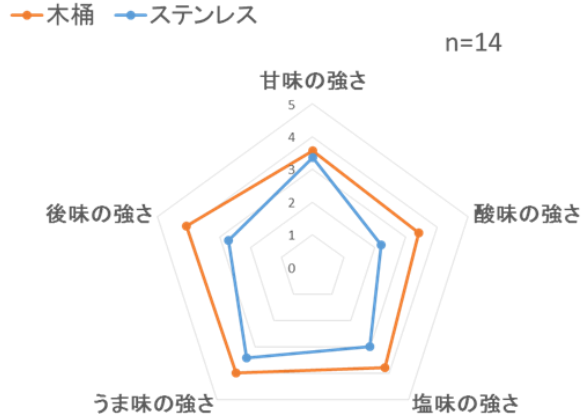


図 13 実験室調製熟成 11 か月味噌湯の鼻栓有りでの官能評価

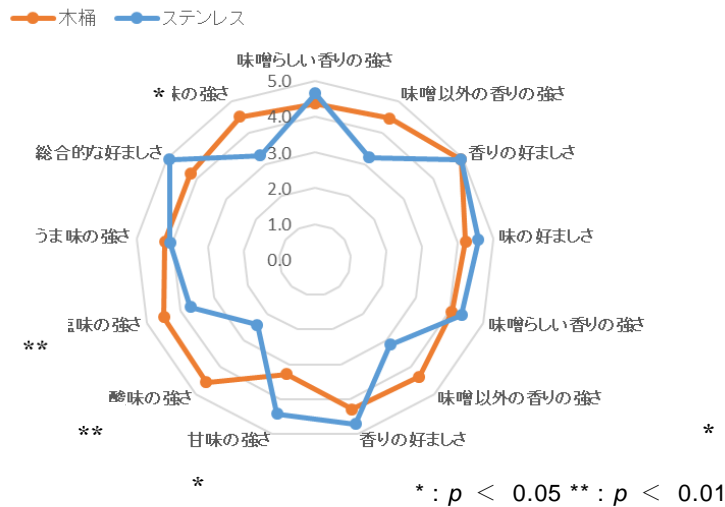


図 14 実験室調製熟成 11 か月味噌湯の鼻栓無しでの官能評価

木桶熟成味噌の味噌湯で評価した場合に塩味強度がステンレス桶より明らかに高かったことから、その強度をより明確にするため、塩分 0.8%の味噌湯を調製し、塩分 0.8%の食塩水を対照として±4 の評点で塩味強度を評価させた。その結果、図 15 に示す通り、試料 3-3 の鼻栓無しでは木桶は対照と比較して明らかにプラスの値を示しステンレス桶と比較してもより塩味強度が高い傾向であったが、偏差が大きく有意ではなかった。一方試料 2-11 では鼻栓の有無に関わらず木桶試料が顕著に高い評点を示し、ステンレス桶と比較した場合もその差は有意であった ($p < 0.01$)。

さらに、塩分 0.8%の味噌湯と 0.7, 0.8, 0.9%の食塩水をパネルに同時に提示し、食塩水と比較しながら試料の塩味強度を線尺度上で評価することで官能的塩味強度を

数値化した。結果は図 16 に示したが、試料 3-3 では鼻栓無しの場合のみ木桶試料が 0.811 と高い塩味強度となり、それ以外の試料は実際の塩分濃度より低く評価された。これに対し試料 2-11 では、ステンレス桶試料は鼻栓の有無に関わらず 0.788 と 0.755%と塩味が低く評価されたが、木桶では鼻栓有りで 0.863、鼻栓無しで 0.858%といずれも明らかに塩味を強く感じていることが示された。これらの木桶の値はいずれもステンレス桶と比較して 1%の危険率で有意であった。

4. 考察

まず市販の福島県産木桶味噌 2 種、非木桶 2 種と岡山県産木桶味噌 1 種、非木桶味噌 1 種を試料として味噌および味噌湯の官能評価を行った。福島県産試料では、木

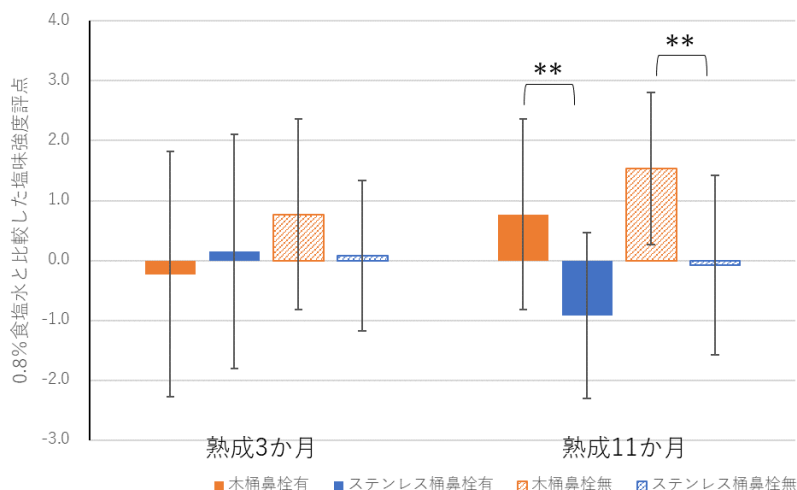


図 15 味噌湯を食塩水と比較した場合の塩味強度評点

0.8%塩分濃度の味噌湯と0.8%食塩水(対照)を比較し、対照を0とした評点法結果は13名の平均値、標準偏差をエラーバーで示した。

** : $p < 0.01$

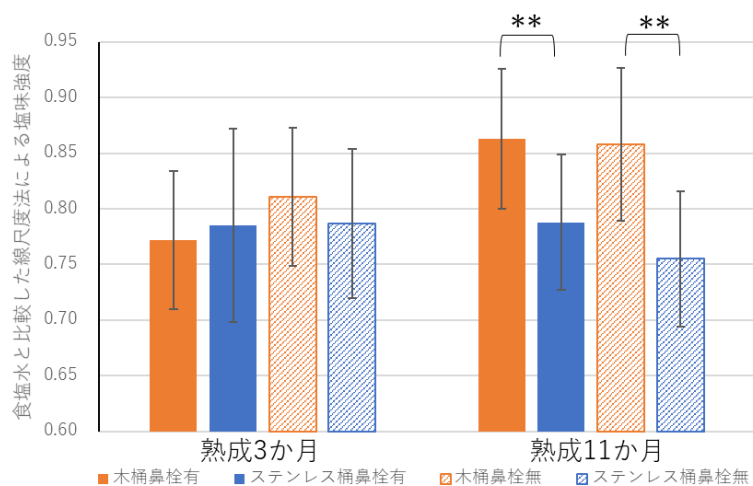


図 16 味噌湯を食塩水と比較した場合の線尺度法による塩味強度

0.8%塩分濃度の味噌湯と0.7~0.9%食塩水を比較し、味噌湯の塩味強度をパネルが線尺度法により評価した。結果は14名の平均値、標準偏差をエラーバーで示した。

** : $p < 0.01$

桶2種は非常に類似した評価結果であったが、非木桶試料の一つが明らかに異なる傾向を示し、「味噌以外の香り」が強く、総合的な嗜好性が有意に低かった。この試料は、原材料として特殊な成分が使用されており、本研究の大学生パネルは、明らかにその特異な添加物を識別していたことが推定された。さらに、味噌そのもので評価した時と比較して、味噌湯では木桶味噌の結果の一部に有意な差が認められたことから、木桶味噌の嗜好性は加熱調理

により高くなる可能性が示唆された。岡山県産試料の比較においては、味噌の評価で木桶と非木桶が明確に判別され、非木桶の嗜好性が有意に高かったが、味噌湯ではその差が認められず、またそれ以外の項目での有意差も減少した。従って、木桶味噌は加熱調理することで香りや味の複雑さをより生かすことができる可能性があるのではないかと思われる、この傾向は福島県産試料の実験結果と一致していた。以上より、パネルは市販木桶味噌と非木

味噌の官能的な何らかの違いを認識はしているものの、木桶味噌の嗜好的な優位性は示されなかった。自由記述の結果などから、木桶味噌がより発酵度が高く、複雑な風味を有している可能性があり、パネル学生が普段そういった味噌を食べなれていないことが評価の結果に影響している可能性があると考えた。さらに、市販味噌の場合は熟成容器以外の条件の差を排除することが非常に難しいことが改めて明らかとなった。

熟成容器以外の条件を統一する必要性からも、実験室にて味噌を調製し、木桶とステンレス桶で発酵熟成し、各種成分と微生物菌叢の経時変化を測定した。水分の変化においては、木桶の方が熟成途中での変動が大きい傾向はあったが、熟成完了時を含めてほとんど有意差は認められず、容器は水分含量に影響しないものと思われた。水分活性に関しても研究2年目と3年目に経時変化を測定したが、容器による影響は認められなかった。ただ、一般的に味噌の水分活性は発酵熟成に伴い0.8以下に低下する⁶⁾が、本研究の特に3年目試料は熟成4か月後でも0.845と値が高く、これは仕込み時の水分含量が高すぎたためではないかと考えられ、味噌の調製条件として最適ではなかった恐れがある。pHは発酵完了時に木桶の方が若干低い値ではあったが、有意な差ではなかった。色調はYxy表色系での結果を説明したが、これにおいてY(%)は色の明るさを、x値は値が大きいと赤系、値が小さいと青系、y値は値が大きいと緑、小さいと青紫系であることを示す。一般に味噌においては発酵熟成期間中に、Y値は途中一次停滞期を含みながら経時的に減少し、x値は熟成途中から増大し、y値は変化しないかわずかに低下する、とされている¹⁾。本実験では発酵熟成期間が長期になると木桶のY値が有意に低くなり、味噌の褐変の進行に木桶が影響することが示された。味噌の発酵熟成における遊離アミノ酸含量の経時変化を測定した結果、全アミノ酸量は仕込み直後から熟成2か月でいずれの容器でも約4倍に増加し、発酵初期にタンパク質の加水分解が起こることが示され、容器による差は認められなかった。アミノ酸のうち甘味とうま味を有するアミノ酸の合計量で比較したところ、発酵4か月まで増加が認められ、熟成7.5か月までは木桶の方が、含有量が多く、木桶味噌の方がタンパク質の分解が促進され、甘味やうま味がより強くなる可能性が示された。一方塩基性アミノ酸は木桶試料

で顕著に減少した。塩基性アミノ酸は反応性の高いアミノ基が多く、メイラード反応に消費されることが知られているため、木桶の褐変が促進されたことが色調のY値の低下にも繋がったと考えられる。つまり、木桶試料では甘味うま味系アミノ酸の含有量が多く、苦味アミノ酸である塩基性及び芳香族アミノ酸の減少量が大きいため、熟成期間の長期化に伴うまろやかな味への変化に影響している可能性を考えた。味噌の発酵熟成における微生物菌叢の経時変化については、熟成容器による影響を明確に明らかにすることはできなかった。

香気分析に関しては、ポーラスポリマーを用いたカラム濃縮法とSPMEを用いたヘッドスペース分析による分析手法が確認できた。それぞれの手法で、木桶試料とステンレス桶試料の香気特性が異なることが明らかとなり、木桶試料の方が特有の甘い香気を有する成分をより多く含んでいたり、木桶試料にのみ含まれる香気成分があることが示された。このような香気の特徴が木桶に認められることが、木桶味噌の複雑な風味や官能評価の際の「発酵臭」あるいは香りの違和感に繋がる可能性があるものと考えた。本研究で用いたカラム濃縮法は低沸点成分の捕集に限界があり官能的な香気を完全には再現できていない可能性がある一方、SPME法では微量成分は検出できない。さらに、味噌の重要香気成分であると報告されているHEMF(4-Hydroxy-2(or5)-ethyl-5(or2)-methyl-3(2H)-furanone)は、今回はいずれの手法でも検出できなかった。HEMFは味噌の発酵において酵母が関与して生成する⁷⁾とされている。工業的な味噌の製造においては仕込み段階で酵母を添加することが一般的であるが、本研究では伝統的な手法にのっとり酵母は添加していない。HEMFが検出されなかったのは酵母を添加していない製法である影響が大きいとは思われるが、抽出分析手法に問題があった可能性も否定はできない。従って味噌の熟成容器による香気への影響についてさらに詳細に明らかにするためには両手法および他の手法を組み合わせる必要があると思われる。

実験室で調製し木桶とステンレス桶にて熟成させた味噌を試料として味噌そのものおよび味噌湯の官能評価を行った。研究初年度において、3か月熟成させた両者はパネルに明確に識別され、味噌以外の香りが強い傾向の

ある木桶味噌は、味噌・味噌湯ともに好まれなかった。本実験においては、ステンレス桶試料の色が明らかに濃く、これが嗜好性に大きく寄与した可能性が考えられた。研究2年目は新たに調製した熟成4か月の味噌を試料として同様に評価を行い、パネルは木桶試料に「味噌以外の香り」を感じている傾向があったが、容器間の差は明確ではなかった。また、評価の際に求めた自由記述においては木桶試料に対してより強い発酵臭を感じている傾向が示され、その結果塩味強度に関与する可能性があるのではないかと考えた。本実験の結果より、熟成期間4か月は容器による影響を明確にするには短い、あるいは木桶を複数年度継続的に使用する必要性があるのではないかと考え、熟成を11か月まで延長して継続し、さらに同一容器に新たな味噌を仕込み、3か月間発酵熟成させた。研究3年目の3か月熟成味噌に関しては容器による影響を明確に示すことはできなかったが、熟成11か月味噌では明確な差が認められた。すなわち木桶試料は有意に後味が長く、酸味と塩味が強いと評価され、酸味と塩味に関しては鼻栓無しでのみ有意であったことから、熟成容器の違いに伴う生成香気の差が酸味と塩味強度に影響したと考えた。うま味に関しては有意ではなかったが木桶の方が強い傾向にあった。木桶試料の後味の長さを秒数で分析するとステンレス桶試料の約1.2倍であり、線尺度法により求めた塩味強度は同様に1.1倍であった。以上の結果より、11か月というような長期間木桶で発酵熟成させた味噌においては、酸味が強くなりうま味も同様な傾向があり、味が複雑になることで後味が長くなり、塩味強度が増した。このように、木桶により長期間発酵熟成させた味噌における減塩効果が示された。

5. 今後の課題

木桶を継続的に使用して製造している市販味噌において、本研究の結果に再現性があるか否か、幅広く試料を

収集して実験を重ねる必要がある。市販味噌の香気成分分析を、今回明らかにした手法などで分析し、重要寄与成分を調べる必要がある。実験室調製味噌に関しては、実験室レベルでの空調管理を含めた味噌の熟成管理が困難であることが明らかとなったことから、製造メーカーに協力を得て実験的な製造を依頼したいと考えている。それが可能となれば、いわゆる「蔵付微生物」の効果も含めた現実的なデータ採取が可能となる。さらに、塩味増強効果が認められた木桶仕込み味噌を実際に減量使用した味噌汁などの調理食品において、パネルの満足度や嗜好性を評価する官能評価を行いたい。

6. 引用文献

- (1) 東和夫(2015)『発酵と醸造 味噌と醤油 製造管理と分析』, 朝倉書店, 第3刷
- (2) 上芝雄史(2003), 仕込桶の歴史と展開—醤油, 味噌そして食酢の桶—, 日本醸造協会誌, 98, 491-496
- (3) 高尾佳史, 高橋俊成, 藤田晃子, 松丸克己, 溝口晴彦(2015), 樽酒中の成分が食品の旨味に及ぼす影響, 日本醸造協会誌, 110, 48-55
- (4) 菅原悦子, 伊東哲雄, 小田切敏, 久保田紀久枝, 小林彰夫, (1990), 異なる調製法によるみそ香気成分の比較, 日本農芸化学会誌, 64, 171-176
- (5) 若林素子(2016)『人を幸せにする食品ビジネス学入門』, オーム社, pp 71-80
- (6) 新国佐幸(1997), 味噌の発酵・熟成と塩辛さ, 日本醸造協会誌, 92, 176-181
- (7) 小浜恵子, 米倉裕一, 菊地智恵子, 大畑素子, 菅原悦子(2006), 味噌酵母の HEMF 生産性と育種, 岩手県工業技術センター研究報告, 13, 62-64

7. 学会発表

2020年度日本農芸化学会等において発表予定。

Flavor and the effect on saltiness in the miso fermented in wooden barrel

Motoko WAKABAYASHI, Yuri SHIMIZU

Nihon University, College of Bioresource Sciences

Summary

When fermenting miso, it was common to use a wooden barrel since ancient times. However, in recent years it is mainstream to use stainless steel and plastic containers. On the other hand, there are movements to continue using wooden barrel as a traditional manufacturing method, or review the wooden method again. As one of the reasons, it is said that the finished product will add a unique flavor of wooden, but the mechanism of improving its flavor and taste are not clarified. If a favorable change occurs due to the wooden method, satisfaction can be obtained even if using reduced amount of miso in cooking compared to non-wooden miso, that is, it leads to the reduction of salt intake. Therefore, we wanted to clarify how flavor are generated during fermentation of wooden barrel miso, and whether or not there is a salt reduction effect in wooden miso.

This research mainly focused on the following four research. (1) Miso products by brewing maker fermented in wooden barrel and non-wooden were obtained, and sensory evaluation was conducted. (2) In the laboratory, miso were prepared using a wooden barrel and a stainless steel pot, and the changes during the fermentation were analyzed. (3) Flavor compounds were extracted by two method, and GC-MS-O analysis were performed. (4) Using the lab. miso, sensory evaluation on taste and smell was conducted to examine the difference in saltiness intensity and the salt reduction effect.

By the sensory evaluation using commercial miso, although the panel recognized the sensory difference of the aging container, there was no preference in wooden miso. The wooden miso was suggested to have a stronger fermentation odor and a complex flavor, therefore, the wooden miso is seems to be suitable for cooking. The Y value of color tone was significantly lower in the wooden miso of 5.5 months aging, so the wooden barrel promoted the progress of browning. In the free amino acid content, the wooden sample contained a large amount of sweet and umami amino acids and a smaller amount of bitter amino acids. Flavor of lab. miso were analyzed by GC-MS-O. The sweet smell components such as Maltol are rich in wooden miso and Vanillin is detected only in the wooden miso. As a result of sensory evaluation of lab. miso, the difference between the aging containers became remarkable after long-term aging of 11 months. By the wooden aging, the aftertaste of miso-soup became longer and also the strength of sourness and saltiness increased significantly.

細胞生物学視点からの味覚改善食品の開発: 老化依存的味受容機構変化の検証

成川 真隆, 三坂 巧

東京大学大学院農学生命科学研究科

概要 おいしい食べ物を食べることは人生の楽しみの一つである。味覚は食行動に強い影響を及ぼすことから、味覚機能の維持は健康な食生活を送るために重要であると言える。これまでの研究において、加齢が味感受性を変化させることが示唆されている。しかし、加齢によって味感受性がなぜ変化してしまうのか、その要因はよくわかっていない。本研究では加齢依存的な味感受性変化の要因を明らかにするため、若齢と高齢マウス間で末梢の味検出システムを比較した。まず、実際に加齢により味感受性が変化するかどうか行動試験で確認した。その結果、加齢により苦味と塩味に対する味感受性が鈍化することを確認した。このとき、味シグナルを伝達する味覚神経の応答を記録したところ、塩に対する応答の有意な上昇は確認されたが、苦味に対する応答に変化は見られなかった。一方、高齢マウスで甘味に対する神経応答が顕著に上昇していることも確認され、行動試験と味覚神経応答の結果は必ずしも一致しなかった。味蕾における味覚関連分子の発現を評価したところ、味受容体の発現に顕著な差は認められなかった。高齢マウスでシグナル分子の有意な発現量低下が観察されたが、その発現量低下はわずかであった。さらに、味蕾細胞の代謝速度を評価したが、代謝速度の有意な低下は認められなかった。このように加齢による味関連分子の発現や味蕾の代謝速度の顕著な劣化は認められなかった。これらの結果から、加齢による味感受性の変化は末梢の味組織の変化により導かれるのではないと考えられた。一方で、味応答を修飾するような血中因子の濃度が高齢マウスで変化していることが認められた。したがって、血中因子のような味修飾因子が二次的に作用し、行動レベルの味感受性を変化させる可能性が考えられた。

1. 研究の背景と目的

我が国は超高齢社会に突入した。日本の高齢化率は27.7%に達し、今後も上昇する見通しである。日本の高齢化の特徴として、寝たきりの期間が長いことが上げられる。この期間は男性で9年、女性では12年にも及ぶ。少子高齢化の中、活力ある社会を維持するためには、寝たきり期間を短縮させる、すなわち高齢者の健康寿命を延伸させることが重要な課題となる。

健康寿命を延伸させるための要因として、栄養バランスのとれた食事があげられる。一般に、加齢に伴い、量や構成といった食事の質が低下してしまう。食事の質の低下は体力の低下を招き、体力の低下は食欲の減退を招くという悪循環に陥る。したがって、食事の質を保つことは健康を維持する上で鍵になり得る。では、なぜ加齢に伴い食事の質が低下してしまうのか？その原因のひとつとして、

味感受性の低下が挙げられる。

高齢者と若齢者の味覚閾値の比較において、高齢者で閾値が上昇することが報告されている⁽¹⁻³⁾。閾値の上昇は味の検知により強い味刺激を必要とすることを意味する。そのため、高齢者は食事の味を感じにくくなり、食事摂取量の低下や摂取品目の偏りをきたす。その結果、高齢者が低栄養に陥る可能性が示唆されている。したがって、味覚機能の低下は、単においしさという主観的な嗜好要素の低下だけではなく、健康上の問題にも直結する。しかしながら、なぜ加齢と共に味感受性が変化してしまうのか、その要因は明らかではない。加齢による味感受性変化のメカニズムを明らかにすることは、高齢者の味覚を改善する食品の開発や食生活を提案する上で有用な情報になると期待される。

本研究では加齢による味感受性の変化とその発生要因の検討を目的とした。まず、若齢と高齢マウスを用いて、実際に加齢により味感受性が変化するかどうか評価した。続いて、味感受性の変化の原因を同定するために、口腔内の味検出システムと血中の味修飾因子に着目して解析を行った。

2. 研究方法

2.1 実験動物

実験動物はC57BL/6J系統雄マウスを用い、若齢群(8–24週齢)と高齢群(120–139週齢)を設けた。市販固形食を飼料として与え、飼料と水は*Ad lib*で与えた。動物実験は東京大学農学部実験動物委員会の許可を得て行った。

2.2 味物質

食べ物の味は5つの基本味、甘・酸・苦・塩・旨味から成る。本研究では、sucrose, citric acid, denatonium benzoate (denatonium), NaCl, グルタミン酸 Na (MSG) + イノシン酸 Na (IMP) 混合溶液をそれぞれの味質を代表する物質として使用した。

2.3 行動学試験

味感受性を観察するために、リッキングテストを行った。リック数は特注したリックメーターを用いて測定した。水のリック数に対する味溶液のリック数の割合を、マウスの味物質溶液に対するリッキング比(Lick ratio)と定義した。飲水条件として忌避味溶液は23時間絶水を行い、嗜好味溶液は通常飼育時の平均飲水量を与えることで飲水制限を行なった。絶水による健康への影響を可能な限り排除するため、飲水制限開始時の体重の80%以上を維持できたマウスのデータのみを使用した。味溶液として以下の溶液を使用した(in mM): 0.3–100 citric acid, 0.1–10 denatonium, 10–1000 NaCl, 1–300 sucrose, 1–300 MSG + 0.5 IMP。

2.4 味覚神経応答記録

麻酔下のマウスから鼓索神経を露出させた。露出した神経束を白金電極にのせ、味溶液刺激に対する神経活動を記録した。応答値は100 mM NH₄Clに対する応答を1.0としたときの相対値として示した。味溶液として以下の溶液を使用した(in mM): 10, 30 citric acid, 10, 30 denatonium, 100, 300 NaCl, 100, 300 sucrose, 30, 100

MSG + 0.5 IMP。

2.5 血清および臓器サンプルの採取

麻酔下のマウスから血液を採取後、頸椎脱臼した。絶命したマウスから舌を採取した。血液は4°Cで一晩静置した後、遠心分離し、血清を得た。有郭乳頭サンプルは舌上皮から酵素処理により取得した。組織サンプルはRNA Laterに浸漬し、4°Cで一晩静置した。余分な溶液を取り除いた後、測定まで-80°Cで保管した。

2.6 Quantitative RT-PCR(qPCR)

有郭乳頭を含む上皮組織をホモジナイズし、キットを用いてTotal RNAを抽出した。逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、これをテンプレートにqPCRを行った。味関連分子として、苦味受容体 *Tas2r105*, 旨味受容体サブユニット *Tas1r1*, 甘味受容体サブユニット *Tas1r2*, 甘・旨味受容体サブユニット *Tas1r3*, 酸味受容体候補分子 *Pkd21l*, Gタンパク質 *Gustducin*, およびエフェクター酵素 *Plcb2*, ホルモン受容体として、アンジオテンシンII受容体 *At1*, コレシストキニン受容体 *Cckar* および *Cckbr*, カンナビノイド受容体 *Cbl1*, レプチン受容体 *Lepr*, 血管作動性腸管ペプチド受容体 *Vpac1* および *Vpac2* mRNAの発現量を測定した。mRNA発現量は味蕾マーカー分子である *Kcnq1* の発現に対する相対値として算出した。

2.7 免疫組織染色

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を用いて、細胞の代謝速度を観察した。BrdUはチミジンアナログで、DNA複製や細胞分裂の際に新生DNAに取り込まれる⁽⁴⁾。したがって、BrdU標識された細胞の数を計測することで、細胞の代謝速度を知ることができる。BrdUは1日1回、3日間に渡り、腹腔内に投与された。投与開始から1週間後に解剖し、舌を摘出した。有郭乳頭を含む舌組織を切り出し、包埋後、凍結した。ここから薄切切片を作製し、抗体染色に供した。まず、4% PFAで固定しPBSで洗浄後、ブロッキングを行った。その後、抗KCNQ1抗体で4°C1晩反応させた。これを洗浄し、二次抗体を室温で1時間反応させ、再び洗浄した。再度4% PFAで固定後、HClで37°C、15分処理し、洗浄した。その後、ブロッキングを行い、抗BrdU抗体を室温で1時間反応させた。洗浄後、二次抗体を室温で1時間反応させた。再び洗浄し、包埋後、画像を取得した。

ENaCの発現は茸状乳頭で観察した。切片を抗ENaC

抗体と抗 KCNQ1 抗体で処理した後、二次抗体と反応させ、包埋した。

2. 8 各種血中因子の測定

アンジオテンシン II 濃度は Angiotensin II EIA Kit を用いて測定した。カルシウム、鉄、マグネシウムおよび亜鉛濃度は Metalloassay Calcium, Iron, Magnesium および Zinc Kit (MG Metallogenics) で、ナトリウム濃度は Sodium Enzymatic Assay Kit で測定した。

2. 9 統計検定

行動学試験では二元配置分散分析を行い、その他の測定に関しては Welch's *t* 検定を行った。

3. 研究結果

3. 1 加齢による味感受性の変化の有無

まず、実際に加齢により味感受性が変化するかどうかをリックテストで確認した (Fig. 1)。両年齢グループで、酸味や苦味のような忌避味に対する Lick ratio は濃度依存的に減少した。一方で、甘味や旨味のような嗜好味に対する Lick ratio は濃度依存的に上昇した。マウスは高濃度の塩を忌避する。それゆえ、塩味に対する Lick ratio は高濃度で低下した。若齢と高齢マウス間の Lick ratio を比較した際、高齢マウスの苦味と塩味に対する Lick ratio が若齢マウスに比べて上昇していた (Fig. 1B, C)。しかしながら、甘味、酸味と旨味に対する Lick ratio には顕著な差は見られなかった (Fig. 1A, D, E)。従って、高齢マウスでは苦味に対する忌避性が低下する一方で、塩味に対する嗜好性が上昇することがわかった。このように、高齢マウスで苦味、塩味に対する味感受性が変化することを確認した。

続いて、基本味に対する味覚神経応答を測定した (Fig. 2)。両年齢群とも味刺激に対する味覚神経応答は濃度依存的に増加した。酸味、苦味、旨味に対する神経応答に若齢と高齢マウス間で差は見られなかったが (Fig. 2A, B, E)、高齢マウスで塩味と甘味に対する応答は若齢に比較して増加していた (Fig. 2C, D)。

塩味応答はアミロライド感受性とは非感受性応答の 2 種類からなる⁶⁾。アミロライド感受性成分は嗜好性の塩味応答を誘発するのにかかわらず、アミロライド非感受性成分は忌避味を誘導する。NaCl 応答増加に寄与する成分を類推するために、NaCl+amiloride で味覚神経応答を測定した (Fig. 3)。その応答は両年齢群でほとんど同じ大きさ

であった。これはアミロライド感受性成分が NaCl 応答増加の原因である可能性を示唆する。

3. 2 味蕾における味関連分子の発現

高齢マウスで味感受性が若齢マウスに比べて変化していた。この味感受性変化の要因を明らかにするために、味蕾における代表的な味関連分子の発現を測定した。まず、qPCR 法により、味受容体分子の mRNA 発現量を調査した。代表的な味覚受容体である苦味受容体 *Tas2r105*、旨味受容体サブユニット *Tas1r1*、甘味受容体サブユニット *Tas1r2*、旨・甘味受容体サブユニット *Tas1r3*、酸味受容体候補分子 *Pkd2l1* の mRNA 量に両者に差は認められなかった (Fig. 4A)。次いで、塩味受容体 ENaC の発現を免疫染色法で調査した。ENaC 抗体に対する免疫反応は両年齢間で観察され、巨視的に染色像の明確な差は認められなかった (Fig. 4B)。このように、味覚受容体の発現に加齢の影響は観察されなかった。そこで続いて、2 つのシグナル成分 *Gustducin* (苦味受容体に共役する G タンパク質) と *Plcb2* (苦味、旨味、甘味受容体のエフェクター酵素) の mRNA 量を測定した。その結果、高齢マウス群で若齢マウスよりその発現が有意に低下することを見出した (Fig. 4A)。しかしながら、その発現量低下はわずかであった。

3. 3 味蕾細胞で細胞代謝速度の比較

一般に加齢は代謝速度に影響する。加齢による細胞代謝速度の変化を調べるために、味蕾における BrdU 陽性細胞数を観察した。味蕾中の BrdU 陽性細胞の数をカウントしたところ、若齢と高齢マウスの BrdU 陽性細胞数は 0.05 ± 0.02 と 0.01 ± 0.00 であった (Fig. 5)。高齢マウスにおける BrdU 陽性細胞の数が若齢マウスに比べて低下する傾向が認められた。しかし、その低下割合は有意ではなかった。

このように、味関連分子の発現および代謝速度の観点から加齢の影響を検討したが、両者に顕著な差は認められなかったことから、加齢による味感受性の変化は末梢味覚器の機能低下によって導かれたものではないと考えられた。

3. 4 味応答修飾因子の比較

続いて、加齢による味修飾因子の変化を検討した。近年、味細胞で検出された味情報が中枢に至る過程で修飾されることが報告されている。一例として、アンジオテンシン II が挙げられる⁶⁾。血中のアンジオテンシン II は味細

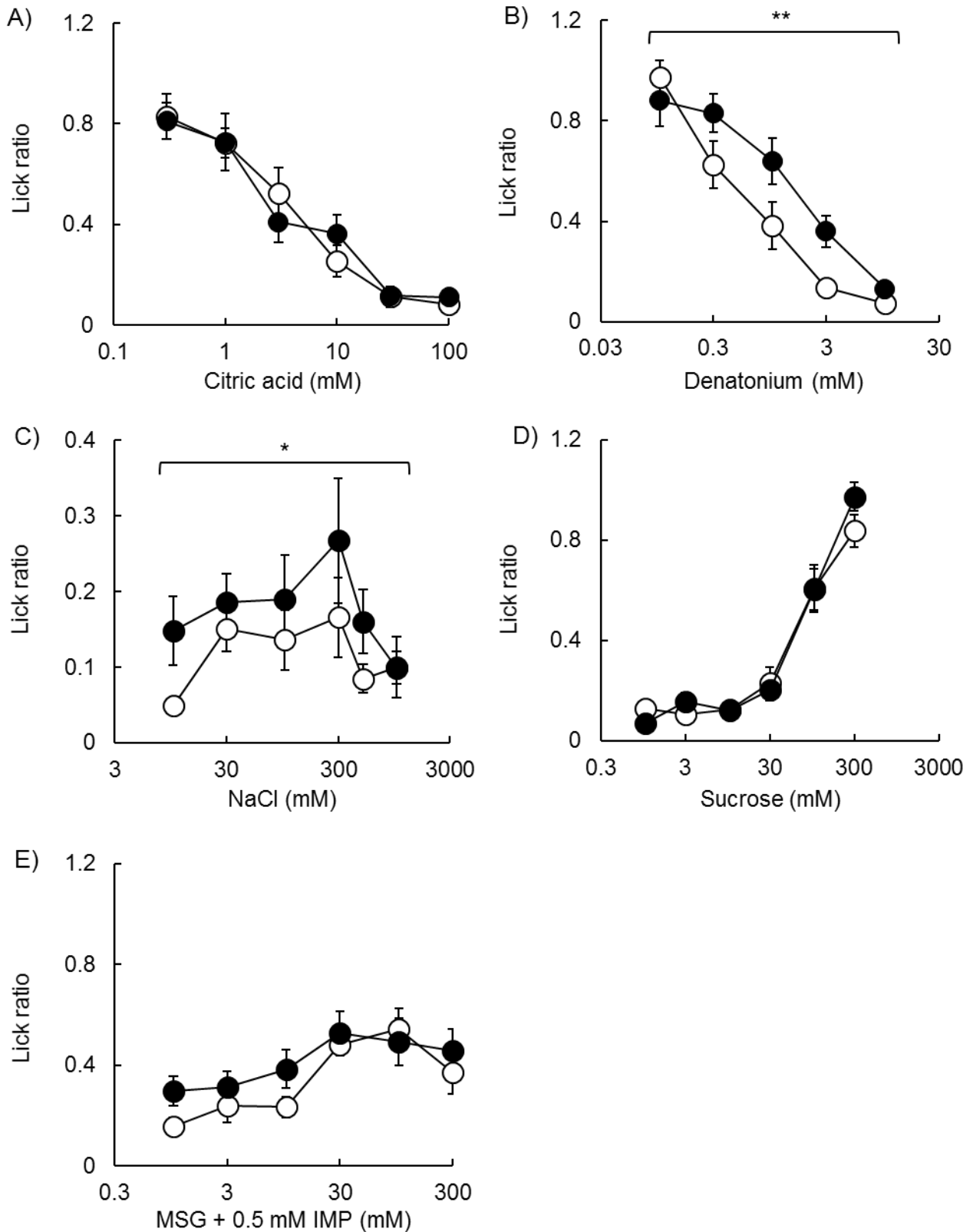


Fig. 1. 若齢マウス(○)と高齢マウス(●)の基本味に対する Lick ratio の比較

(A) Citric acid (酸味), (B) Denatonium (苦味), (C) NaCl (塩味), (D) Sucrose (甘味)と(E) MSG + 0.5 mM IMP (旨味) に対するリック比 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 10$)。

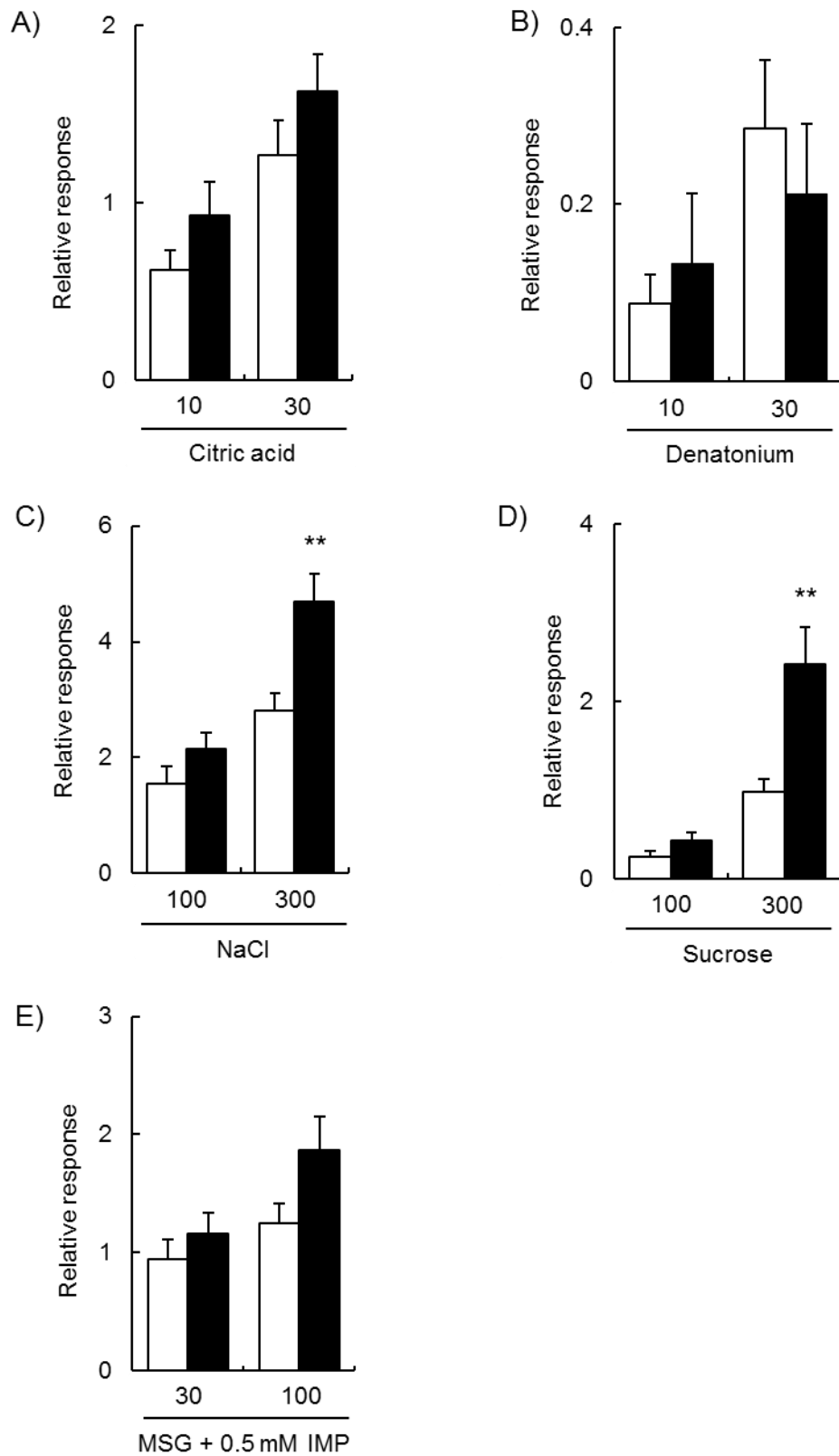


Fig. 2. 若齢マウス(□)と高齢マウス(■)の基本味に対する味覚神経応答の比較 (A) Citric acid (酸味), (B) Denatonium (苦味), (C) NaCl (塩味), (D) Sucrose (甘味)と(E) MSG + 0.5 mM IMP (旨味) に対する鼓索神経応答 (** $p < 0.01$; $n = 4-6$)。

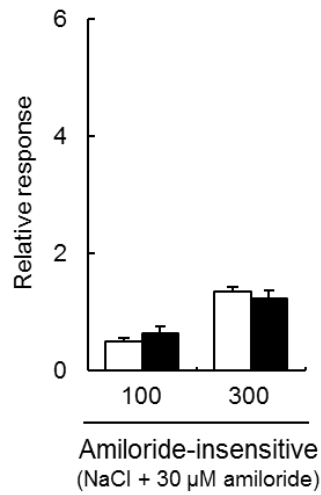


Fig. 3. 若齢マウス(□)と高齢マウス(■)のアミロライド非感受性塩味応答の比較 (n = 4-6)

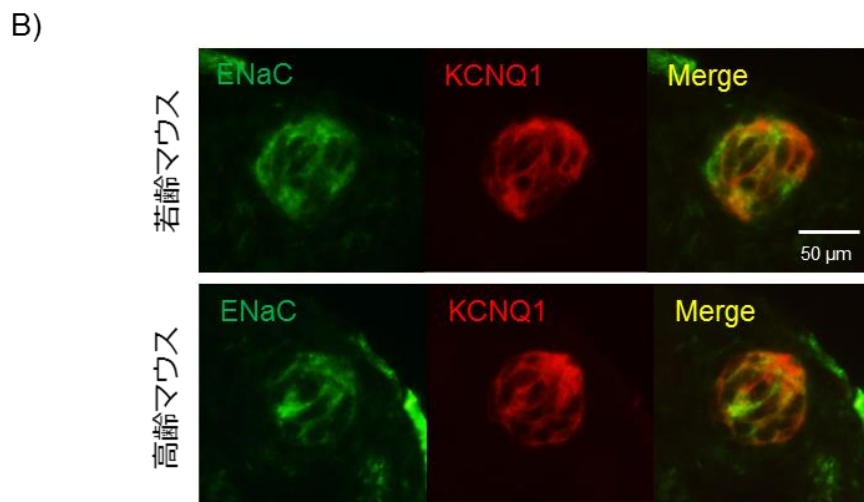
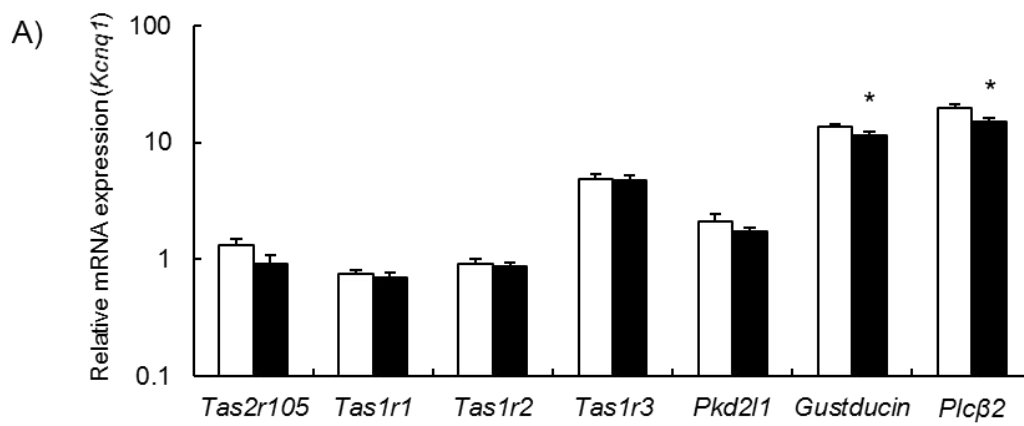


Fig. 4. 味蕾細胞における味関連分子の発現

(A) 若齢マウス(□)と高齢マウス(■)の有郭乳頭における *Tas2r105*, *Tas1r1*, *Tas1r2*, *Tas1r3*, *Pkd2l1*, *Gustducin* と *Plcβ2* mRNA の発現 (* $p < 0.05$; n = 6)。 (B) 茸状乳頭における ENaC (赤) の発現。緑は味蕾マーカー-KCNQ1 を示す。

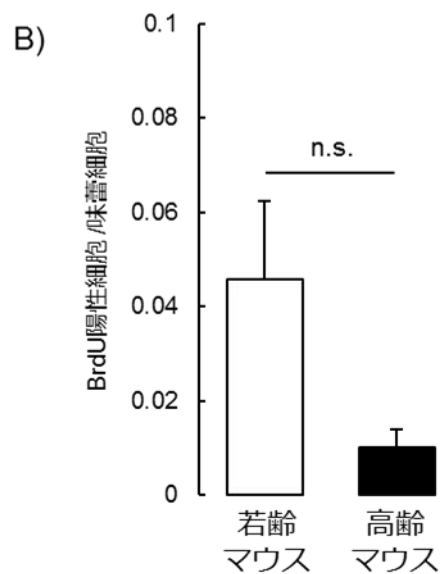
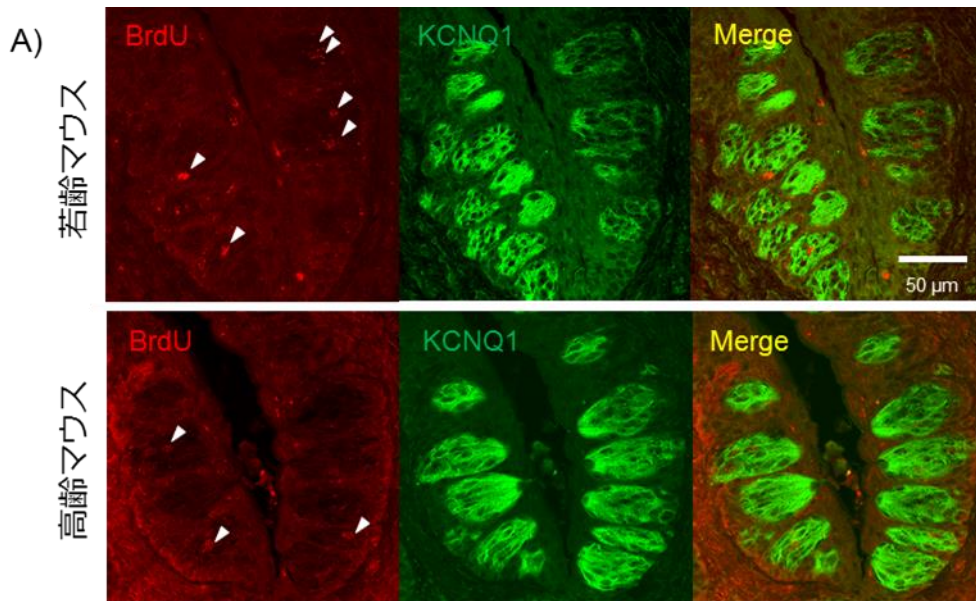


Fig. 5. 有郭乳頭における BrdU 陽性細胞数の比較

(A) 代表的な BrdU (赤) と KCNQ1 (緑) に対する免疫染色像。矢頭は BrdU シグナルを示す。(B) 味蕾細胞における BrdU 陽性細胞の割合 (n = 5)。

胞に存在する AT1 受容体を介して、塩味応答を低下させる。高齢マウスでは塩味感受性が上昇していたことから、アンジオテンシン II の血中濃度の測定を行った。その結果、高齢群でアンジオテンシン II の濃度が有意に低下していた (Fig. 6)。したがって、加齢によるアンジオテンシン

II 濃度の変化が塩味感受性に影響している可能性が考えられた。

アンジオテンシン II 以外にもレプチンやコレシストキニンなど様々なホルモンが味応答を修飾することが報告されている⁽⁷⁻¹⁰⁾。そこで、味応答を修飾するホルモンの受容

体を対象とし、味蕾における mRNA 発現量の比較を行った。*At1*, *Cckar*, *Cckbr*, *Cbl1r*, *Lepr*, *Vpac1* および *Vpac2* の mRNA 発現量を測定したが、若齢マウスと高齢マウスで明確な差は認められなかった(データ示さず)。したがって、ホルモン受容体の発現には加齢による影響がないと考えられた。

一方、各種ミネラルの欠乏状態も味感受性、特に塩味感受性に影響することが知られている⁽¹¹⁻¹⁵⁾。そこで、代表的なミネラルであるカルシウム、鉄、マグネシウム、ナトリウムと亜鉛の血中濃度を測定した。ナトリウムと亜鉛濃度は若齢群と高齢群で変わらなかった一方、カルシウム、鉄、マグネシウムの血中濃度は高齢群で有意に高い値を示した(Fig. 7)。この結果から、高齢群で認められた塩味感受性は各種ミネラルの欠乏状態が原因ではないと考えられた。

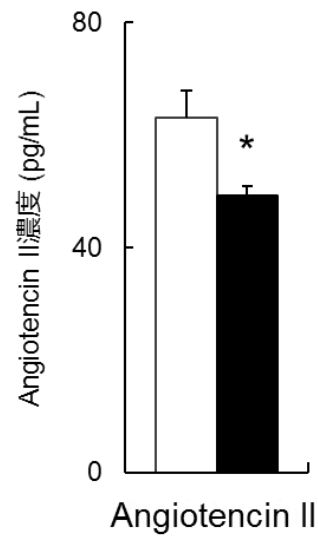


Fig. 6. 若齢マウス(□)と高齢マウス(■)における血中アンジオテンシン II 濃度(* $p < 0.05$; $n = 4-6$)

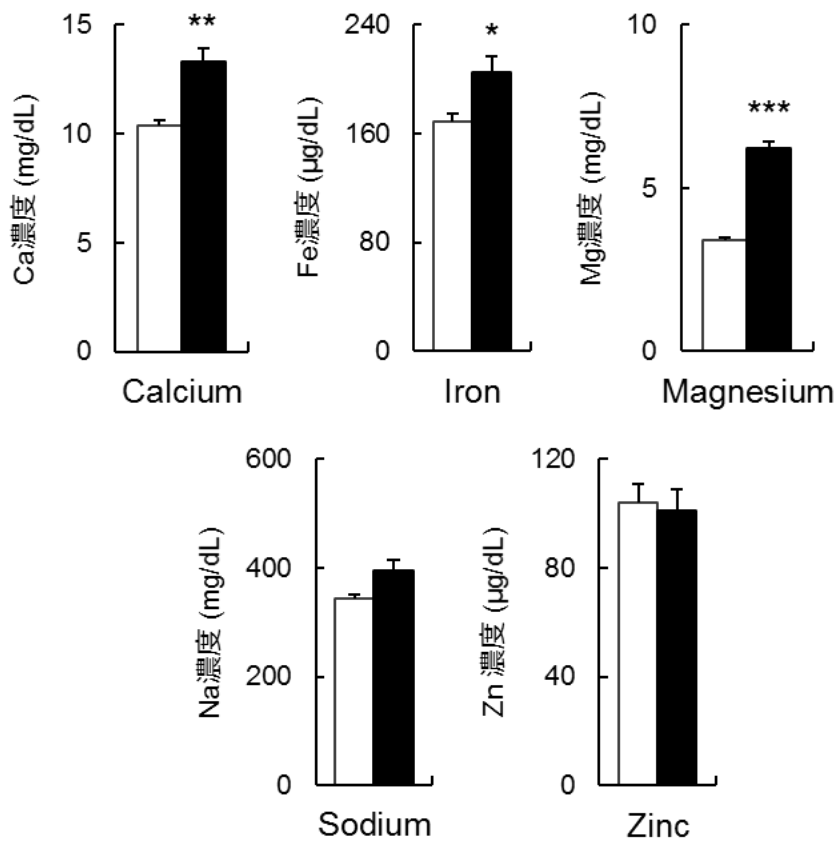


Fig. 7. 若齢マウス(□)と高齢マウス(■)における血中ミネラル濃度の比較
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 4-6$)

4. 考 察

本研究では加齢による味感受性変化の発生要因を明らかにするために、若齢マウスと高齢マウスの味感受性を比較し、味感受性変化における末梢の味システムの関与を検討した。

まず、我々は加齢が味嗜好性を変化させる原因であるかどうか行動学アッセイにより検証した。その結果、苦味と塩味に対する感受性が劇的に変化していた。一方で、酸味と甘味、旨味に対する感受性は加齢により有意な変化を見せなかった。つまり、加齢は一部の味質に対する味感受性を変化させるが、すべての味質に均一の影響を与えるわけではないことがわかった。

続いて、神経レベルでの味応答に加齢の影響があるかどうか調べるために、味刺激に対する味覚神経応答を測定した。その結果、塩味と甘味に対する神経活動が大幅に増加していた一方で、苦味、酸味と旨味物質に対する味覚神経応答で若齢と高齢マウス間に差は見られなかった。神経レベルでも加齢による影響が観察されたが、必ずしも行動アッセイの結果と一致はしなかった。

加齢により味感受性の変化が観察されたことから、この変化の要因を明らかにするために、味蕾における味関連分子の発現と味細胞の代謝速度の変化を分析した。その結果、代表的な味覚受容体の mRNA 発現量に若齢と高齢マウスで差は観察されなかった。ついで、塩味受容体 ENaC タンパク質の発現を調べた。しかしながら、ENaC の発現で発現パターンに差は見られなかった。このように、味覚受容体の発現で加齢による影響は認められなかった。一方で、味覚受容体下流で働くシグナル分子の発現量がわずかではあるが、有意に低下していた。

味蕾は生涯を通じて代謝する。味細胞の平均代謝速度は 8-12 日だと報告されている⁽¹⁶⁾。一般に加齢は代謝速度に影響する。高齢マウスで味細胞の代謝速度の低下傾向が認められたが、有意な低下ではなかった。このように、加齢による影響は認められたが、顕著な末梢味器官の変化は認められなかった。したがって、苦味や塩味の感受性の低下は、末梢味覚器の機能低下により導かれたものではないと考えられた。

加齢により一部の味感受性は変化したが、すべての味に均一な効果ではなかった。また、行動レベルでの応答と神経レベルでの応答結果は必ずしも一致はしなかった。

さらに、味覚受容体の発現量に明確な差は見られなかった。Gustducin や Plcβ2 といったシグナル因子の発現量の低下が観察された。Gustducin は苦味受容体下流で機能する G タンパク質であることから、Gustducin の発現量低下が苦味に対する忌避性の低下に関連があるかもしれない。しかし、その発現量の低下はわずかであった。また、Plcβ2 は苦味だけではなく甘味や旨味応答にも関与する。もし Plcβ2 の発現レベルが加齢によって減少するのならば、甘味や旨味応答も苦味応答と同様に減少すると考えられる。しかし、甘味や旨味に対する感受性に変化は見られなかった。これらのことから、味細胞で検出された味シグナルが中枢へ伝達される過程で、味質特異的に味シグナルを修飾する何らかの因子が存在する可能性が考えられた。近年、一部の味細胞で摂食関連ホルモンの受容体の発現が報告され、摂食関連ホルモンの局所的な分泌や血中からの刺激により味応答に影響を受けることが示唆されている。高齢マウスで特に塩に対する感受性が著しく変化していたことから、ここでは塩応答を修飾する因子に着目して検討を行った。

アンジオテンシン II は血圧上昇作用を示すペプチドホルモンである。アンジオテンシン II を腹腔に投与すると、塩味応答が低下する⁽⁶⁾。若齢と高齢マウスでその濃度を比較した結果、高齢群ではアンジオテンシン II 濃度が有意に低値を示した。したがって、アンジオテンシン II 濃度の低下が加齢による塩味感受性の上昇を導く一因となる可能性が考えられた。一方、味応答修飾作用を持つホルモンの受容体の発現には加齢の影響は認められなかった。したがって、受容体ではなくホルモン量の変化が味感受性に影響をもたらすと考えられた。

一方、各種ミネラルの欠乏状態も塩味感受性の亢進を導くことが知られている⁽¹¹⁻¹⁵⁾。加齢によるミネラル栄養状態の低下を考え、代表的なミネラルの血中濃度を比較した。しかし、いずれのミネラル濃度も加齢による低下は認められなかったことから、加齢による塩味感受性の亢進はミネラル濃度の低下が直接的な原因ではない可能性が考えられた。一方で、カルシウム、鉄、マグネシウムでは高齢群で高値を示した。したがって、ホルモンやミネラルなど、生理状態の変化を反映した味修飾因子の濃度変化が蓄積することで、結果として味感受性に影響した可能性が考えられた。

おいしい食べ物を食べることは人生の楽しみの一つである。味覚は食行動に強い影響を及ぼすことから、味覚機能の維持は健康な生活を送るために重要であると言える。一方で、加齢とともに身体の生理機能は低下してしまう。味覚機能が低下すると、食事に対する満足感が減少する。高齢者が調味料で食事の満足感を補う場合、特に食塩の摂り過ぎは問題となる。食塩の過剰摂取は高血圧や脳血管疾患のリスク上昇を招くためである。したがって、味覚機能は主観的な嗜好要素だけではなく、健康上の問題にも直結する。本研究では、加齢によってなぜ味覚機能が低下するのかという視点から、適塩を含めた適切な食生活を送るための知見の取得を試みた。その結果、加齢によって生じる味感受性変化のメカニズムの一端を明らかにすることが出来た。この知見は味覚改善食品の開発する上での有用な分子基盤になると期待される。今後も検討を進め、高齢者の健全な食生活を維持する上で有用な情報を提供したい。

5. 今後の課題

我々は老化促進モデルマウス SAMP1 マウスを用いた検討も進めた⁽¹⁷⁾。詳細は省くが、SAMP1 マウスの検討でも加齢による味感受性の変化が末梢味覚器の機能低下以外の要因により導かれる可能性が示された。

加齢による味感受性変化の要因の一つとして、味修飾因子の関与が考えられた。しかしながら、味修飾因子の変化だけですべての変化を説明できるかどうかは不明である。末梢の味情報は中枢に伝達されるが、末梢では味の識別が行われる一方、中枢では末梢からの情報の統合が行われる。したがって、味感受性には中枢の味覚関連部位が重要な役割を果たすといえる。近年、中枢の摂食関連神経の活動が味感受性を変化させる可能性が示唆されている。今後は中枢の味覚関連領域が加齢によりどのように変化が生じているのかを検討する必要があるだろう。

6. 引用文献

1. Bartoshuk, L. M., Rifkin, B., Marks, L. E., and Bars, P. (1986) Taste and aging. *J Gerontol* **41**, 51-57
2. Hyde, R. J., and Feller, R. P. (1981) Age and sex effects on taste of sucrose, NaCl, citric acid and caffeine.

Neurobiol Aging **2**, 315-318

3. Weiffenbach, J. M., Baum, B. J., and Burghauer, R. (1982) Taste thresholds: quality specific variation with human aging. *J Gerontol* **37**, 372-377
4. Gratzner, H. G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**, 474-475
5. Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N. J. P., and Zuker, C. S. (2013) High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* **494**, 472-475
6. Shigemura, N., Iwata, S., Yasumatsu, K., Ohkuri, T., Horio, N., Sanematsu, K., Yoshida, R., Margolskee, R. F., and Ninomiya, Y. (2013) Angiotensin II Modulates Salty and Sweet Taste Sensitivities. *J Neurosci* **33**, 6267-6277
7. Kawai, K., Sugimoto, K., Nakashima, K., Miura, H., and Ninomiya, Y. (2000) Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11044-11049
8. Martin, B., Shin, Y. K., White, C. M., Ji, S., Kim, W., Carlson, O. D., Napora, J. K., Chadwick, W., Chapter, M., Waschek, J. A., Mattson, M. P., Maudsley, S., and Egan, J. M. (2010) Vasoactive Intestinal Peptide-Null Mice Demonstrate Enhanced Sweet Taste Preference, Dysglycemia, and Reduced Taste Bud Leptin Receptor Expression. *Diabetes* **59**, 1143-1152
9. Yoshida, R., Ohkuri, T., Jyotaki, M., Yasuo, T., Horio, N., Yasumatsu, K., Sanematsu, K., Shigemura, N., Yamamoto, T., Margolskee, R. F., and Ninomiya, Y. (2010) Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 935-939
10. Yoshida, R., Shin, M., Yasumatsu, K., Takai, S., Inoue, M., Shigemura, N., Takiguchi, S., Nakamura, S., and Ninomiya, Y. (2017) The Role of Cholecystokinin in Peripheral Taste Signaling in Mice. *Front Physiol* **8**, 866
11. Liu, X. W., Dejima, Y., Suzuki, T., Himeno, S., and Okazaki, Y. (1991) Marginal zinc deficiency and changes in behavioral salt taste threshold and salt preference in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **37**, 185-199
12. Tordoff, M. G. (1992) Salt intake of rats fed diets deficient in calcium, iron, magnesium, phosphorus,

- potassium, or all minerals. *Appetite* **18**, 29-41
13. Curtis, K. S., Krause, E. G., and Contreras, R. J. (2001) Altered NaCl taste responses precede increased NaCl ingestion during Na⁺ deprivation. *Physiol Behav* **72**, 743-749
 14. Goto, T., Komai, M., Suzuki, H., and Furukawa, Y. (2001) Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J Nutr* **131**, 305-310
 15. Okada, S., Abuyama, M., Yamamoto, R., Kondo, T., Narukawa, M., and Misaka, T. (2012) Dietary zinc status reversibly alters both the feeding behaviors of the rats and gene expression patterns in diencephalon. *Biofactors* **38**, 203-218
 16. Farbman, A. I. (1980) Renewal of taste bud cells in rat circumvallate papillae. *Cell and Tissue Kinetics* **13**, 349-357
 17. Narukawa, M., Kamiyoshihara, A., Kawae, M., Kohta, R., and Misaka, T. (2018) Analysis of aging-dependent changes in taste sensitivities of the senescence accelerated mouse SAMP1. *Exp Gerontol* **113**, 64-73

7. 論文業績および学会発表 (投稿論文)

1. Narukawa, M., Kurokawa, A., Kohta, R., and Misaka, T*. Participation of the peripheral taste system in the change in aging-dependent taste sensitivity. *Neuroscience* **358**, 249-260 (2017).

2. Narukawa, M., Kamiyoshihara, A., Kawae, M., Kohta, R., and Misaka, T*. Analysis of aging-dependent changes in taste sensitivities of the senescence-accelerated mouse SAMP1. *Exp Gerontol* **113**, 64-73 (2018).

(シンポジウム)

1. 成川真隆, 三坂巧. 老化依存的な味受容機構の変化. 日本味と匂学会第 52 回大会(ソニックシティ, 2018 年)

(学会発表)

1. 成川真隆, 黒川あずさ, 幸田理恵, 河江真宏, 三坂巧. 老化による食嗜好性変化における口腔内味受容機構の関与. 第 2 回食欲・食嗜好の分子・神経基盤研究会(生理学研究所, 2017)
2. 上吉原絢, 成川真隆, 河江真宏, 幸田理恵, 三坂巧. 老化促進モデルマウスを用いた老化依存的な味嗜好性変化とその発生要因の検討. 日本農芸化学会 2018 年度大会(名城大学, 2018 年)
3. 上吉原絢, 成川真隆, 三坂巧. 老化依存的な味感受性変化における味修飾因子の関与の検討. 日本農芸化学会 2019 年度大会(東京農業大学, 2019 年)

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団ならびに関係の皆様
に厚く御礼申し上げます。

Evaluation of Age Dependent Change of Taste System

Masataka Narukawa, Takumi Misaka

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Previous studies have shown that aging modifies taste sensitivity. However, the factors affecting the changes in taste sensitivity remain unclear. To investigate the cause of the age-related changes in taste sensitivity, we compared the peripheral taste detection systems in young and old mice. First, we examined whether taste sensitivity varied according to age using the behavioral assay. We confirmed that the taste sensitivities to salty and bitter tastes decreased with aging. On the other hand, the gustatory nerve responses to salty and sweet tastes increased significantly with aging, while those to bitter taste did not change. Thus, the profile of the gustatory nerve responses was inconsistent with the profile of the behavioral responses. Next, we evaluated the expressions of taste-related molecules in the taste buds. Apparent differences in the expressions of representative taste receptors were not observed between the two age groups. No significant differences in the turnover rates of taste bud cells were observed between the two age groups. Thus, we did not observe any large decreases in the expressions of taste-related molecules and turnover rates of taste bud cells with aging. Based on these findings, we conclude that changes in taste sensitivity with aging were not caused by aging-related degradation of peripheral taste organs. Meanwhile, the concentrations of several serum components that modify taste responses changed with age. Thus, taste signal-modifying factors such as serum components may have a contributing role in aging-related changes in taste sensitivity.

食塩嗜好に及ぼす亜鉛欠乏の影響と作用機構の解析

後藤 知子¹, 白川 仁², 駒井 三千夫²

¹宮城学院女子大学生生活科学部, ²東北大学大学院農学研究科

概要 我が国では近年、偏った食生活や亜鉛キレート作用のある薬剤服用などにより、潜在的な亜鉛欠乏が増えてきているといわれている。亜鉛は必須微量元素のひとつであり、欠乏すると、食欲不振、成長遅延、皮膚炎、味覚障害などが起こることが知られている。亜鉛欠乏ラットでは、食塩嗜好が上昇することも報告されてきたが、その作用機構の詳細は未だ明らかではない。我々はこれまで、亜鉛欠乏ラットの食塩嗜好率を経日的に観察し、亜鉛欠乏食飼育 4 日目(亜鉛欠乏初期)から食塩嗜好率が上昇すること、亜鉛欠乏初期ラットの食塩嗜好上昇は末梢での塩味受容能低下によるものではないことを明らかにした。亜鉛欠乏初期の血圧、ヘマトクリット値、血漿ナトリウム濃度・カリウム濃度に変化は認められなかった。

そこで本研究では、食塩嗜好に及ぼす亜鉛欠乏の影響と、その作用機構を解析することを目的とした。カルシウム欠乏ラットも食塩嗜好が上昇すること、骨に体内亜鉛の約 30%が含まれること、亜鉛欠乏は骨の成長阻害を引き起こすことが報告されてきたことに注目し、亜鉛欠乏初期より潜在的カルシウム欠乏となり食塩嗜好が上昇する可能性を検討した。その結果、亜鉛欠乏初期では一時的に血漿イオン化カルシウム濃度が低下したが再び回復した。長期亜鉛欠乏では血漿イオン化カルシウム濃度が低下し、副甲状腺ホルモン(PTH)分泌が上昇した。したがって、亜鉛欠乏初期から認められる食塩嗜好上昇は、潜在的カルシウム欠乏を介する現象ではないことが示された。

次に 腎臓の遠位尿細管に作用し、ナトリウムイオンの再吸収を促進し、カリウムイオンの排泄を促進するアルドステロンに注目して検討した。しかし、亜鉛欠乏初期ラットの血漿アルドステロン濃度、尿中カリウム排泄量は、ペアフェドラットと同程度であった。一方、亜鉛欠乏初期ラットの尿中ナトリウム排泄量は、ペアフェドラットに比べて有意に低下していた。そこで、血漿ナトリウムイオン濃度上昇を非常に鋭敏に感知し分泌され、食塩摂取量の低下、尿中ナトリウム排泄量の増加を引き起こし、血漿浸透圧を調節することが報告されている下垂体後葉ホルモン、オキシトシンに注目して検討した。その結果、亜鉛欠乏初期ラットの血漿オキシトシン濃度は、ペアフェドラットに比べて有意な低値を示した。一方、血漿パソプレッシン濃度は、飼育 7 日目までは群間で変化が認められなかった。したがって、亜鉛欠乏初期から認められる食塩嗜好上昇は、オキシトシン分泌低下を介する可能性が考えられた。

1. 研究目的

我が国では近年、朝食の欠食など食習慣の乱れや食生活の偏り、亜鉛キレート作用のある薬剤の服用などにより、飽食の時代であるにもかかわらず潜在的な亜鉛欠乏が増えてきているといわれている。亜鉛は必須微量元素のひとつであり、欠乏すると、食欲不振、成長遅延、皮膚炎、生殖機能低下、免疫能低下、味覚障害などが起こることが知られている⁽¹⁾。亜鉛欠乏ラットでは食塩嗜好が上昇す

ることも知られているが、その作用機構は未だ明らかではない。我々のラットを用いた検討では、亜鉛欠乏食飼育 4 日目(亜鉛欠乏初期)から食塩嗜好が上昇すること、亜鉛欠乏初期ラットの食塩嗜好上昇は末梢での塩味受容能低下によるものではないことを明らかにした⁽²⁾。さらに、亜鉛欠乏初期ラットにおいて食塩摂取や血漿浸透圧の調節因子を追跡した結果、亜鉛欠乏食飼育 4 日目の血圧、ヘマトクリット値、血漿ナトリウム濃度・カリウム濃度に変化

は認められなかった。そこで本研究は、食塩嗜好に及ぼす亜鉛欠乏の影響と作用機構を明らかにすることを目的とし、程度の異なる亜鉛欠乏ラットを作出して検討した。食塩嗜好上昇が報告されてきた実験動物(ラット)は、亜鉛欠乏ラットの他にも、副腎摘出ラット・甲状腺除去ラット・ナトリウム欠乏ラット・低タンパク質食給餌ラット・リジン欠乏ラット・カルシウム欠乏ラットなどがある。骨には体内亜鉛の約30%が含まれること⁽³⁾、亜鉛欠乏は骨の成長や発達の障害を引き起こすこと⁽⁴⁾、発育過程において亜鉛が骨代謝に影響を及ぼすこと⁽⁵⁾なども、これまでに示されてきた。さらに、亜鉛欠乏食を長期間(28日間)給餌させたラット(重篤な亜鉛欠乏)では、血清カルシウム濃度低下と血清副甲状腺ホルモン(PTH; Parathyroid Hormone)濃度上昇が認められた⁽⁶⁾。そこで本研究では実験1として、亜鉛欠乏初期より血漿イオン化カルシウム濃度が低下し、潜在的カルシウム欠乏となり食塩嗜好が上昇するの否かを明らかにするため、血漿カルシウム濃度、血漿PTH濃度、血漿イオン化カルシウム濃度の経日変化を追跡した。血液カルシウムは、タンパク質に結合したもの、リン酸やクエン酸などと結合したもの、イオン化したものに区別され、生理学的活性を有するのはイオン化カルシウムであることから、血漿イオン化カルシウム濃度も測定した。次に、亜鉛欠乏ラットと同様、摂食量低下と食塩嗜好上昇が認められるリジン欠乏ラット⁽⁷⁾に注目した。リジン欠乏ラットでは、視床下部腹内側核におけるノルエピネフリン(ノルアドレナリン)放出が低下することが報告された⁽⁸⁾。ノルエピネフリンは摂食促進作用を有することから、リジン欠乏ラットの摂食量低下は、ノルエピネフリン放出低下に起因する可能性が考えられた。しかし、亜鉛欠乏ラットにおける脳内ノルエピネフリン放出の詳細は明らかではない。さらに、脳弓下器官におけるセロトニン神経系がナトリウム欲求に重要な役割を果たすこと⁽⁹⁾などの報告に注目した。なお、亜鉛欠乏食給餌により血漿亜鉛濃度は速やかに低下するが、脳内亜鉛濃度の低下は認められないことが多い。しかし、亜鉛欠乏食給餌による脳細胞外液(Cerebrospinal fluid; CSF)亜鉛濃度の変化は明らかではない。脳細胞外液亜鉛濃度は、脳脊髄液亜鉛濃度とほぼ同程度であると考えられている。亜鉛欠乏による食塩嗜好上昇は、亜鉛摂取により速やかに改善する。そこで実験2では、亜鉛欠乏ラットにおける脳脊髄液亜鉛濃度を経日的に測定した。

次いで実験3では、亜鉛欠乏が脳内モノアミン(ノルエピネフリン・セロトニン)放出に及ぼす影響を検討した。自由行動下ラットの脳標的部位におけるモノアミン放出量を、非侵襲的に実時間(リアルタイム)解析する方法の一つとしてマイクロダイアリシス(微小透析法)がある。マイクロダイアリシス法では、生体に微小透析プローブを挿入し、対象動物が生きた状態(非侵襲的)で標的部位特異的に透析液を回収し、解析に供することができる。実験4では、腎臓の遠位尿細管に作用し、ナトリウムイオンの再吸収を促進し、カリウムイオンの排泄を促進するアルドステロンに注目して検討した。また、血漿中ナトリウムイオン濃度上昇を非常に鋭敏に感知し分泌され、食塩摂取量の低下、尿中ナトリウム排泄量の増加を引き起こし、血漿浸透圧を調節することが報告されている下垂体後葉ホルモン オキシトシン、およびバソプレシンに注目して検討した。オキシトシン(oxytocin; OT)は、9個のアミノ酸から成る下垂体後葉ホルモンで、抗利尿作用をもつバソプレシン(vasopressin; VP)と類似の構造をもつペプチドホルモンである。1位と6位のシステインがS-S結合をつくり環状構造をとる。視床下部室傍核および視索上核の大細胞性ニューロンで産生され、軸索内を下垂体後葉まで輸送され、神経末端から下垂体門脈中に分泌される。オキシトシンは求心性刺激(乳頭刺激、血液浸透圧の変化など)により内分泌され、子宮収縮作用や射乳作用などを引き起こすことが知られているが、他にも、非常に鋭敏に血漿中ナトリウム濃度上昇を感知して分泌され、食塩摂取量の低下、尿中ナトリウム排泄量の増加を引き起こして血漿浸透圧を調節する⁽¹⁰⁾ことが報告されている。オキシトシン欠損マウスでは、通常忌避される高濃度食塩水の摂取量が上昇することも報告された⁽¹¹⁾。オキシトシンと同様に9個のアミノ酸で構成され、9つのうち2つのみがオキシトシンと異なるバソプレシンは、腎臓の遠位尿細管での水の再吸収の促進、血管収縮、血圧上昇などを引き起こす。ナトリウム欠乏ラットでは、血漿中オキシトシン、血漿中バソプレシン濃度が低下することが報告されている⁽¹²⁾。そこで本研究では、亜鉛欠乏初期(潜在的亜鉛欠乏)の食塩嗜好上昇に、下垂体後葉ホルモン(オキシトシン、バソプレシン)分泌が関与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

亜鉛欠乏による食塩嗜好上昇は、亜鉛摂取により改善する。亜鉛が食塩嗜好に及ぼす影響を探ることにより、適

塩と生理状態との関係解明につながると期待している。

2. 研究方法

2.1 実験動物

動物実験は「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき承認を受けて行った。Sprague-Dawley (SD) 系, 雄ラット, 4 週齢 (Slc: SD/SPF; 日本エスエルシー株式会社) を購入した。異なる亜鉛含量となるよう調製した実験食と精製水を自由摂取させた。室温 23 ± 3 °C, 湿度 50 ± 10 %, 午前 8:00~午後 20:00 を明期とする 12 時間明暗サイクルに設定された動物実験飼育室で個別飼育した。摂食量は毎日, 体重は毎週測定した。

2.2 実験食

タンパク質源は, 亜鉛含量の少ない乾燥卵白を用いた。卵白には, ビオチンと強く結合し吸収阻害をもたらすアビジンが多く含まれるため, ビオチンを添加した。実験食は, 異なる亜鉛含量のミネラル混合 (mineral mixture) を独自調製後, 亜鉛欠乏食 (亜鉛含量 2.1 mg/kg diet), 低亜鉛食 (同 4.1 mg/kg diet), 亜鉛添加食 (同 33.7 mg/kg diet) を調整した⁽²⁾。

2.3 測定項目

2.3.1 亜鉛欠乏ラットの血漿イオン化カルシウム濃度 (実験1)

実験群は, 亜鉛欠乏食を自由摂取させた亜鉛欠乏食群 (Zn-Def), 低亜鉛食を自由摂取させた低亜鉛食群 (Low-Zn), 亜鉛欠乏食群が前日に食下した量と同量の亜鉛添加食を給餌したペアフェド群 (Pair-fed) とした。実験食飼育 0, 4, 7, 14, 21, 28 日目に採血した。血漿カルシウム濃度を原子吸光度計, 血漿イオン化カルシウム濃度・イオン化マグネシウム濃度をイオン選択性電極全自動電解質装置, 血漿副甲状腺ホルモン (PTH) 濃度を ELISA 法にて測定した。

2.3.2 亜鉛欠乏ラットの脳脊髄液亜鉛濃度 (実験2)

実験群は, 亜鉛欠乏食を自由摂取させた亜鉛欠乏食群 (Zn-Def), 亜鉛添加食を自由摂取させた亜鉛添加食群 (Zn-Suf) とした。実験食飼育 0, 1, 2, 3, 4 日目にソムノペ

ンチル麻酔下にて大槽より脳脊髄液を採取し, 脳脊髄液 (CSF) 亜鉛濃度をメタロアッセイ亜鉛 LS (メタロジェニクス: 旧 AKJ グローバルテクノロジー) にて測定した。

2.3.3 亜鉛欠乏ラットにおける視床下部外側野のモノアミン放出量 (実験3)

実験群は, 亜鉛欠乏食を自由摂取させた亜鉛欠乏食群 (Zn-Def), 亜鉛添加食を自由摂取させた亜鉛添加食群 (Zn-Suf) とした。SD 系, 雄ラット, 4 週齢を購入後, 市販固型飼料で馴化し, マイクロダイアリス用プローブの挿入手術を行った。手術終了後, 回復期間を設けたのち, 実験食給餌を開始した。実験食飼育 0, 1, 2, 3, 4, 6 日目に, マイクロダイアリス法にて視床下部外側野 (Lateral Hypothalamus; LH) におけるモノアミン (ノルエピネフリン, セロトニン, エピネフリン) 放出量を追跡した。自由行動下ラットの LH へ高カリウム刺激 (神経終末に脱分極を起こす) を与え, 細胞外モノアミン量を経時的に測定することで, 刺激に応答したモノアミン放出を実時間解析した。

2.3.4 血漿アルドステロン濃度の測定 (実験4)

実験群は, 亜鉛欠乏食を自由摂取させた亜鉛欠乏食群 (Zn-Def), 低亜鉛食を自由摂取させた低亜鉛食群 (Low-Zn), 亜鉛欠乏食群が前日に食下した量と同量の亜鉛添加食を給餌したペアフェド群 (Pair-fed) とした。Zn-Def 群, Low-Zn 群, Pair-fed 群 (各群 n=5~6) において, 実験食飼育 4 日目の血漿アルドステロン濃度を ELISA 法にて測定した。

2.3.5 尿中ナトリウム・カリウム排泄量の測定 (実験4)

亜鉛欠乏初期の食塩嗜好上昇が, 尿中ナトリウム排泄量の増加 (ナトリウム利尿の増加) によるものか否かを明らかにするため, 実験食飼育 4 日目の尿中ナトリウム・カリウム排泄量を測定した。実験群は, 亜鉛欠乏食 (Zn-Def) 群, 低亜鉛食 (Low-Zn) 群, ペアフェド対照 (Pair-fed) 群 (Zn-Def 群が前日に食下した量と同量の亜鉛添加食を与えた) の 3 群 (各群 n=5) とした。ラットは代謝実験用飼育ケージにて個別飼育し, 実験食飼育 4 日目の 24 時間尿を採取した。尿はポリ容器に採取し, 濾紙 (東洋濾紙 No.2) で濾過し超純水で希釈後, 原子吸光度計 (AA-6800,

島津製作所)にて尿中ナトリウム・カリウム濃度を測定した。その後、24 時間尿量より尿中ナトリウム・カリウム排泄量を算出した。

2. 3. 6 血漿オキシトシン・バソプレシン濃度の測定(実験5)

Zn-Def 群, Low-Zn 群, Pair-fed 群(各群 n=4~6)において、実験食飼育 0, 1, 2, 3, 4, 7 日目の血漿オキシトシン濃度を ELISA 法(ELAH-8152 EIA for oxytocin: Peninsula Laboratories, Inc)にて測定した。血漿バソプレシン濃度も同様に、ELISA 法(ELAH-8103 EIA for Arg⁸-Vasopressin: Peninsula Laboratories, Inc)にて測定した。絶水状態にすると血漿オキシトシン濃度が著しく増大すること⁽¹³⁾、血漿オキシトシン濃度の日内変動⁽¹⁴⁾を考慮し、20:00 から 8:00 まで絶水後、10:00 に採血した。実験に供したラットは、それぞれ別の個体を用いた。

2. 3. 7 データ解析

データは平均値±標準誤差で示した。平均値の差の検定は一元配置分散分析(one-way ANOVA)または二元配置分散分析で行い、多重比較は Scheffé's test により行った。

3. 研究結果

3. 1 亜鉛欠乏ラットの血漿イオン化カルシウム濃度⁽¹⁵⁾ (実験1)

亜鉛欠乏初期より血漿イオン化カルシウム濃度が低下し、潜在的カルシウム欠乏となり食塩嗜好が上昇するの可否を明らかにするため、亜鉛欠乏ラットの血漿カルシウム濃度・イオン化カルシウム濃度・イオン化マグネシウム濃度を経日的に測定した。その結果、血漿カルシウム濃度はペアフェド群に比べ、亜鉛欠乏食群の飼育 4, 14, 21, 28 日目、低亜鉛食群の4 日目で有意な低値を示した(**Fig. 1**)。血漿イオン化カルシウム濃度はペアフェド群に比べ、亜鉛欠乏食群の 4, 14, 21, 28 日目、低亜鉛食群の飼育 28 日目で有意な低値を示した(**Fig. 2**)。血漿イオン化マグネシウム濃度は群間で有意な差は認められなかった(**Fig. 3**)。副甲状腺ホルモン(PTH)は、血中イオン化カルシウム濃度低下に応じて副甲状腺から分泌され、血中イオン化カルシウム濃度上昇に導く。亜鉛欠乏食飼育 14 日目以降の血漿イオン化カルシウム濃度低下が、PTH 分泌低下によるものか否かを測定した結果、血漿 PTH 濃度は、ペアフェド群に比べ亜鉛欠乏食群、低亜鉛食群の飼育 21 日目から上昇し、28 日目に有意な高値を示した(**Fig. 4**)。

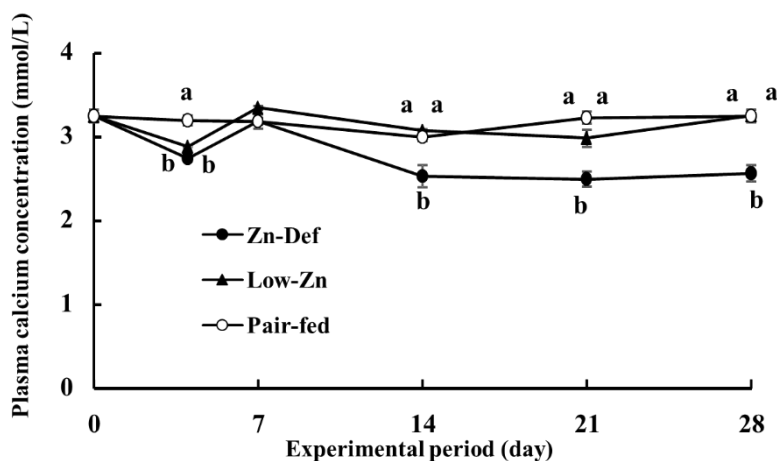


Fig. 1. Plasma calcium concentrations during the experimental period. Means \pm SEM, n = 3-5; those at a time with different superscripts are significantly different, P < 0.05.

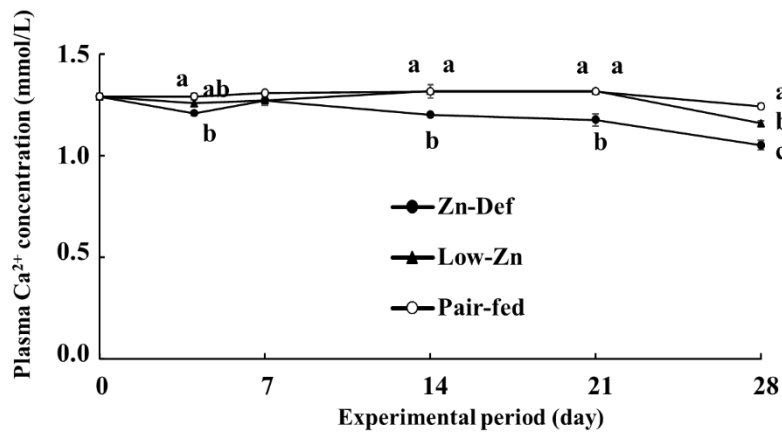


Fig. 2. Plasma Ca²⁺ concentrations during the experimental period. Means \pm SEM, n =3-5; those at a time with different superscripts are significantly different, P<0.05.

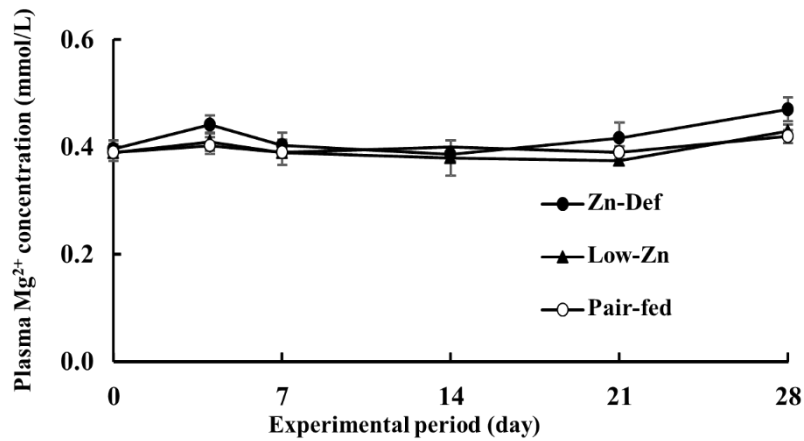


Fig. 3. Plasma Mg²⁺ concentrations during the experimental period. Means \pm SEM, n = 3-5.

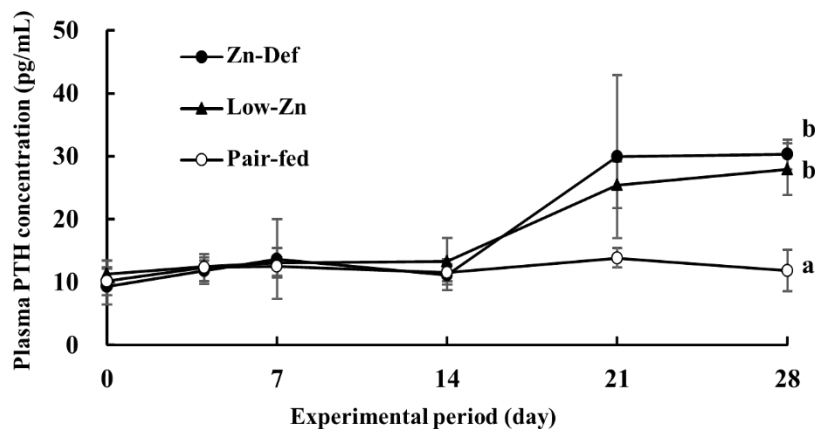


Fig. 4. Plasma intact parathyroid hormone (PTH) concentrations during the experimental period. Means \pm SEM, n =3-5; those at a time with different superscripts are significantly different, P<0.05.

3.2 亜鉛欠乏ラットの脳脊髄液亜鉛濃度(実験2)

亜鉛欠乏ラットの脳脊髄液亜鉛濃度は、亜鉛添加食群に比べ亜鉛欠乏食群で、3日目より低下傾向を示したが、個体差が大きく更なる検討が必要であると考えられた。

3.3 亜鉛欠乏ラットにおける視床下部外側野のモノアミン放出量(実験3)

亜鉛欠乏食群、亜鉛添加食群で、無刺激時の LH におけるノルエピネフリン、ドーパミン、セロトニン放出量を測定した結果、4日目の LH におけるモノアミン放出量は、両群で同程度であった。高カリウム液で 120 分間刺激中の、LH におけるノルエピネフリン、セロトニン放出量は、亜鉛欠乏食飼育 4 日目で低下傾向を示した。

3.4 血漿アルドステロン濃度(実験4)

実験食飼育 4 日目の血漿アルドステロン濃度は、ペアフェド群に比べて、低亜鉛食群で有意な高値を示したが、亜鉛欠乏食群では同程度であった。

3.5 尿中ナトリウム・カリウム排泄量の測定(実験4)

実験食飼育 4 日目の尿中ナトリウム排泄量は、ペアフェドラットに比べて有意な低値を示した。一方、実験食飼育 4 日目の尿中カリウム排泄量は、群間で差が認められなかった。

3.6 血漿オキシトシン・バソプレシン濃度の経日変化(実験5)

Zn-Def群の血漿オキシトシン濃度は、Pair-fed群に比べて3日目より低下し、実験食飼育 4, 7 日目において有意な低値を示した。Low-Zn 群でも同様の变化を示し、飼育 4, 7 日目において、Pair-fed 群に比べて有意な低値を示した。一方、血漿バソプレシン濃度は、飼育 7 日目までは群間で変化が認められなかった。

4. 考察および今後の課題

亜鉛欠乏食群ではペアフェド群に比べて、飼育 4 日目、および 14 日目以降(14, 21, 28 日目)に血漿カルシウム濃度、イオン化カルシウム濃度が有意に低下し、飼育 28 日目に血漿 PTH 濃度が有意に上昇した⁽¹⁵⁾。すなわち、亜鉛欠乏初期で一時的に血漿イオン化カルシウム濃度が低下

するが回復し、長期亜鉛欠乏で血漿イオン化カルシウム濃度が低下し、それに応じて PTH 分泌が上昇したと考えられた。低亜鉛食群ではペアフェド群に比べて、飼育 4 日目の血漿カルシウム濃度は低下したが、飼育 28 日目は低下しなかった。一方、低亜鉛食群の血漿イオン化カルシウム濃度は飼育 28 日目で有意に低下し、血漿 PTH 濃度は有意に上昇した。したがって、亜鉛欠乏初期より認められる食塩嗜好上昇は、潜在的カルシウム欠乏を介するわけではないと考えられた。また、長期亜鉛欠乏ラットでは、血漿イオン化カルシウム濃度が低下して PTH 分泌が上昇したことから、PTH 分泌は亜鉛欠乏により低下しないことが考えられた。血漿イオン化カルシウム濃度は、血漿カルシウム濃度に反映されない生体内変化を顕していると考えられた。なお PTH は、血漿イオン化カルシウム濃度低下に応じて敏感に分泌されるため、今後は、血漿イオン化カルシウム濃度、血漿 PTH 濃度の詳細な経時変化を追跡することが必要であると考えられる。

亜鉛欠乏ラットの脳脊髄液亜鉛濃度は、飼育 3 日目より低下傾向を示した。亜鉛欠乏食給餌により血漿亜鉛濃度は速やかに低下するが、脳内亜鉛濃度の低下は認められないことが多いことから、脳脊髄液亜鉛濃度は鋭敏に低下する可能性が考えられた。しかしながら、個体差が大きく更なる検討が必要である。

亜鉛欠乏ラットの LH におけるノルエピネフリン・セロトニン放出量(高カリウム刺激)は 4 日目で低下傾向を示した。このことから、亜鉛欠乏食飼育 4 日目から、細胞内ノルエピネフリン、セロトニンが低下し、高カリウム刺激を続けることで細胞内ノルエピネフリン、セロトニンが枯渇し、放出量が低下した可能性が考えられた。しかし個体数が少なく、有意な差は得られていないため、今後、更なる検討が必要であると考えられた。

次に、潜在的亜鉛欠乏(亜鉛欠乏初期)ラットの食塩嗜好上昇に、オキシトシン分泌が関与しているか否かを明らかにするため、血漿アルドステロン濃度、血漿オキシトシン・バソプレシン濃度、尿中ナトリウム・カリウム排泄量を測定した。その結果、実験食飼育 4 日目の血漿アルドステロン濃度は、ペアフェド群に比べて、低亜鉛食群で有意な高値を示したが、亜鉛欠乏食群では同程度であった。したがって、亜鉛欠乏はアルドステロン分泌に何らかの影響を及ぼしている可能性もあるものの、亜鉛欠乏により直

接的にアルドステロン分泌が亢進したわけではない可能性も考えられた。実験食飼育 4 日目の尿中ナトリウム排泄量は、ペアフェド群に比べて有意に低下していた。一方、実験食飼育 4 日目の尿中カリウム排泄量は、群間で差が認められなかった。アルドステロンは腎臓の遠位尿細管に作用しナトリウムの再吸収を促進し、カリウムの排泄を促進する。したがって、亜鉛欠乏によりアルドステロン分泌が上昇し、尿中ナトリウム排泄量が低下したわけではないものと考えられた。そこで、血漿ナトリウム濃度上昇を鋭敏に感知し分泌され、食塩摂取量の低下、尿中ナトリウム排泄量の増加を引き起こし、血漿中浸透圧を調節することが報告されているオキシトシンに注目した。ノルエピネフリンはオキシトシン分泌を促すこと⁽¹⁶⁾、オキシトシンはノルエピネフリン分泌を促すこと⁽¹⁷⁾も報告されている。血漿オキシトシン濃度の経日変化を追跡した結果、亜鉛欠乏食飼育 3 日目の血漿オキシトシン濃度は、ペアフェド群に比べて低下しはじめ、4 日目より有意な低値を示した。血漿オキシトシン濃度が 3 日目より低下しはじめた現象は、亜鉛欠乏初期の食塩嗜好上昇に先立って生じている可能性が考えられた。一方、血漿パソプレッシン濃度は、飼育 7 日目までは群間で変化が認められなかった。以上のことから、潜在的亜鉛欠乏(亜鉛欠乏初期)ラットの食塩嗜好上昇には、オキシトシン分泌の低下に伴って生じている可能性が考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に厚く御礼申し上げます。

5. 引用文献

1. Mills CF, Quarterman J, Chesters JK, Williams RB, Dalgarno AC (1969) Metabolic role of zinc. *Am J Clin Nutr* 22, 1240-1249.
2. Goto T, Komai M, Suzuki H, Furukawa Y (2001) Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J Nutr* 131, 305-310.
3. Grynpas MD, Pritzker KP, Hancock RG (1987) Neutron activation analysis of bulk and selected trace elements in bone using a low flux SLOWPOKE reactor. *Biol Trace Elem Res* 13, 333-344.
4. Calhoun NR, Smith JC Jr, Becker KL (1975) The effects of zinc on ectopic bone formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 39, 698-706.
5. 山口正義 (1990) 亜鉛の骨形成促進因子としての役割, 衛生化学 36, 85-99.
6. Suzuki T, Kajita Y, Katsumata S, Matsuzaki H, Suzuki K (2015) Zinc Deficiency Increases Serum Concentrations of Parathyroid Hormone through a Decrease in Serum Calcium and Induces Bone Fragility in Rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 61, 382-390.
7. Torii K (1998) Central mechanisms of umami taste perception and effect of dietary protein on the preference for amino acids and sodium chloride in rats. *Food. Rev. Int.* 2, 273-308.
8. Smriga M, Murakami H, Mori M, Torii K (2000) Effects of L-lysine deficient diet on the hypothalamic interstitial norepinephrine and diet-induced thermogenesis in rats in vivo. *BioFactors* 12, 137-142.
9. Takahashi M, Tanaka J (2016) Serotonin release in the subfornical organ area induced by sodium and water intake in the rat. *Physiology & Behavior* 164, 123-128.
10. Stricker EM, Verbalis JG (1996) Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regul Peptides* 66, 83-85.
11. Puryear R, Rigatto KV, Amico JA, Morris M (2001) Enhanced salt intake in oxytocin deficient mice. *Experimental Neurology* 171, 323-328.
12. Stricker EM, Schreihof AM, Verbalis JG (1994) Sodium deprivation blunts hypovolemia-induced pituitary secretion of vasopressin and oxytocin in rats. *Am J Physiol* 267, R1336-1341.
13. Windle RJ, Forsling ML, Smith CP, Balment RJ (1993) Patterns of neurohypophysial hormone released during dehydration in the rat. *J Endocrinol* 137, 311-319.
14. Windle RJ, Forsling ML, Guzek JW (1992) Daily rhythms in the hormone content of the neurohypophysial system and release of oxytocin and vasopressin in the male rat: effect of constant light. *J Endocrinol* 133, 283-290.
15. Goto T, Shirakawa H, Komai M (2016) Zinc deficiency

causes to decrease plasma calcium and ionized calcium concentrations prior to an increase in the plasma parathyroid hormone concentration in rats. *Nano Biomedicine* 8, 67-73.

16. Espallergues J, Solovieva O, Técher V, Bauer K, Alonso G, Vincent A, Hussy N (2007) Synergistic activation of astrocytes by ATP and norepinephrine in the rat

supraoptic nucleus. *Neuroscience* 148, 712-723.

17. Jovanovic P, Spasojevic N, Stefanovic B, Bozovic N, Jasic N, Djordjevic J, Dronjak S (2014) Peripheral oxytocin treatment affects the rat adreno-medullary catecholamine content modulating expression of vesicular monoamine transporter 2. *Peptides* 51, 110-114.

An Analysis of the Mechanism behind the Effect of Zinc Deficiency on Salt Preference

Tomoko Goto¹, Hitoshi Shirakawa², Michio Komai²

¹Faculty of Human Life Science, Miyagi Gakuin Women's University,

²Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

Summary

Because of habitual problems of an unbalanced diet, or the zinc-chelating effect of certain kinds of drugs, the number of individuals suspected to be suffering marginal zinc deficiency is suggested to be increasing. Zinc deficiency causes to anorexia, growth retardation, epilation, and hypogeusia. It has also been suggested that zinc deficiency rapidly triggers salt preference, however, the mechanism has not been well elucidated. We reported previously that the NaCl preference suddenly increased on day 4 in the zinc deficient and low-zinc rats, and peripheral nerve responses to NaCl solutions are normal at such early stages of zinc deficiency, suggesting that decreased taste sensitivity to salt is not the cause for the early onset of salt preferences. We also found that blood pressures, hematocrit, plasma Na⁺ and K⁺ concentrations are not significantly changed at the early stage of zinc deficiency. In the first-year report of this study, we demonstrated that zinc deficiency causes to decrease plasma calcium concentrations prior to an increase of the plasma parathyroid hormone. However, the timing of the change of plasma calcium concentrations was not well corresponding to the early onset of salt preferences, suggesting that marginal calcium deficiency caused by zinc deficiency is not associated with the triggering mechanism of salt preferences. We next tried to focus on the effect of aldosterone, however, plasma concentrations of aldosterone and urinary potassium excretion of zinc deficient rats were not significantly different to those of pair-fed rats. On the contrary, the urinary sodium excretion of zinc deficient rats was significantly reduced to that of pair-fed rats. We suspected that oxytocin, a hormone known to stimulate sodium excretion, may be involved in the process, and found that the plasma oxytocin concentration of zinc deficient rats was significantly reduced to that of pair-fed rats, suggesting that reduced oxytocin secretion may be involved in the early onset of salt preferences caused by zinc deficiency.

塩加減と習慣的な食塩摂取量に関する疫学研究

佐藤 ゆき¹, 山中 千鶴¹, 鈴木 礼子²

¹東北大学東北メディカル・メガバンク機構, ²日本女子大学家政学部

概要 減塩食品の市場が拡大する近年において塩加減の自己評価と実際の食塩摂取量との相関や寄与要因について大規模疫学研究からの報告は限られており, また妊娠中の女性や青年期, 壮年期における塩加減や食塩摂取量の実態は不明である。本研究では妊娠中の女性を含む約 2 万人の大規模疫学調査と個別の詳細調査から塩加減の自己評価と習慣的な食塩摂取量の関連および背景要因について明らかにすることを目的とした。大規模疫学調査による検証では東北メディカル・メガバンク事業コホート調査参加者の 20 歳以上男女約 20,000 人の食生活習慣等に関する調査データを用いた。妊婦とその他の集団と分けて塩加減の評価(味噌汁の味付け, 塩・醤油を料理に直にかけける習慣)と食物摂取頻度回答から算出した習慣的な塩分摂取量との相関性および心理的ストレス度との関連を検証した。心理的ストレス評価には K6(Kessler 6 Scale)を用いた。詳細調査は東北地方在住の 20 歳以上の男女 58 名を対象に日常食の塩分濃度および室内気温測定とアンケート調査を 1 年間 4 季節実施した。詳細調査のアンケートは大規模疫学調査と同項目のほか 7 つの気分状態を評価する POMS2 を取り入れた。データ管理および解析には統計ソフト SAS9.4 と IBM SPSS を用いた。大規模疫学調査において妊婦 11,419 人のデータを解析した結果, 醤油や塩を料理に使う習慣がない人といつも使う人との食塩摂取量の差の範囲は 0.1~0.4 g/日であった。心理的ストレスが低いグループ(K6<5 点)より高いグループ(K6>=5 点)で食塩摂取量が 0.03 g/日多かった。塩加減については心理的ストレスが高い人で醤油を料理にいつもかける傾向が 1.3 倍, 塩を料理にふる傾向が 1.2 倍, みそ汁の味付けが濃いめとなる傾向が 1.5 倍高いことが示された。妊婦以外の成人 5,957 人のデータから, 醤油や塩を料理に使う習慣がない人といつも使う人との食塩摂取量の差の範囲は 0.3~2.2g/日であった。心理的ストレスが高いグループ(k6>=5 点)で食塩摂取量が 0.1 g/日多かった。塩加減については心理的ストレスが高い人で醤油を料理にいつもかける傾向が 1.5 倍, 塩を料理にふる傾向が 1.8 倍, みそ汁の味付けが濃いめとなる傾向が 1.4 倍高いことが示された。詳細調査から塩加減の評価 3 項目と食塩摂取量との相関は示されなかったがそれぞれ特有の気分状態が関与していることが明らかになった。また塩加減にかかわるその他の要因として味噌汁の味の濃さ, 塩を料理にふる習慣には室内温度と湿度が寄与していた。本研究の大規模疫学データならびに詳細調査から塩加減と食塩摂取推定量および実測値との間には強い相関は示されなかったが, 塩加減と心理的ストレスならびに気分状態との関連が示唆された。

1. 研究目的

減塩食品の市場が拡大する近年において塩加減の自己評価と実際の食塩摂取量とがどのような関連を示すか大規模疫学研究からまだ十分に報告がなされていない。また, 妊娠中の女性では通常より塩分が必要である場合においても減塩嗜好により適切な塩分摂取ができていない可能性もあるが実態は不明である。

本研究では塩加減の自己評価と習慣的な食塩摂取量について妊娠中の女性を含む大規模疫学調査から検証を行い, さらに自己評価の塩加減の精度に関する調査を実施する。大規模疫学調査による検証では塩加減の自己評価と食塩摂取量との相関に加えて, 季節, 性別, 年齢, 栄養状態, 生活習慣等の背景要因がどのように塩分加減の評価と食塩摂取量に関連するかを明らかにする。

精度に関する調査では日常の食事(主に汁物)の塩分濃度測定を行い、自己評価した塩加減と塩分測定値の差を検証し、また背景要因との関わりについても明らかにする。

本研究の特徴として①疫学調査に参加している妊娠中の女性は約 15,000 人と大規模であり、妊娠期の女性の適塩について考究するための食塩摂取量、塩加減等の基礎データを示すことができ、学術的関心度が高い成果が得られること、②東日本大震災後の社会的ストレスが今なお続いている東北地方での調査であり、塩加減の自己評価と心身の状態等の関連など総合的に検証することができ、被災地の長期的な健康施策に役立つこと、③精度に関する調査では調査参加者自身が適塩を考える機会になることから学術成果のみならず個人の健康維持と向上に役立つ取り組みとなることである。得られる研究成果を学会や学術雑誌で公表し適塩についての科学的論拠を示すことを本研究の学術的最終目標とする。

2. 研究方法

本研究では以下の二つの検証方法で行う。

2.1 疫学的検証

大規模疫学調査による検証を行う。対象と方法の概要は以下。

＜対象＞東北メディカル・メガバンク事業コホート調査参加者の 20 歳以上男女のうち平成 26 年 7 月から平成 28 年 3 月 31 日までに調査に参加しかつ質問票への回答が得られた約 20,000 人。

＜方法＞調査票は既往歴、職業等のパーソナル項目、体格、運動、睡眠、食事等の生活習慣、心の状態等で構成しておりこれらの回答をもとに解析を行う。塩加減の評価として味噌汁の味付け(5 段階回答;かなり薄め～かなり濃いめ)、塩・醤油を料理に直にかけける習慣について(5段階回答;ない～いつも)と食物摂取頻度から算出した習慣的な塩分摂取量との相関解析を行う。データ管理および解析には統計ソフト SAS9.4 と IBM SPSS Statistics を用いる。

2.2 精度検証

塩分測定計による日常食の塩分濃度測定と調査票による調査を行う。調査データから塩加減の自己評価と実際の濃度との相関解析を行う。個人の心身の状態、測定時

期、生活環境その他の背景要因による影響については[疫学的検証]の結果を参考に要因別解析を試みる。調査の内容を以下に示す。

＜対象＞宮城県在住の 20 歳以上の男女

・参加適格基準

- ① 食事を 1 日 2 回以上摂る習慣のある者
- ② 調査参加同意時に 20 歳以上である者
- ③ 調査参加同意時に宮城県在住である者

・参加不可基準

- ① 医師から塩分摂取制限を受けている者
- ② 調査票への回答と測定作業が困難な者

＜リクルート方法＞

ボランティアベースによる調査参加者を募る。雑誌広報欄、研究室ホームページ、東北大学メーリングによる呼びかけ、栄養士勉強会等の呼びかけで募る。参加希望者に調査担当者が対面または電話にて調査内容を説明し参加表明があった場合、参加同意書の取り交わしを行う。

＜対象人数の設定＞

最小 50 名。本研究は塩分濃度測定を伴うフィージビリティ研究でもあることから研究体制および研究財源から人数を設定。

＜調査内容＞

調査は自記式質問票による調査(アンケート調査)と汁類の濃度等測定(測定調査)とする。同一者で年 4 回、3 か月毎に同調査を実施する。

① アンケート調査

疫学的検証と同様の項目(家族人数、生活習慣、心理状態、食行動、食物摂取頻度等)で構成する。

② 測定調査

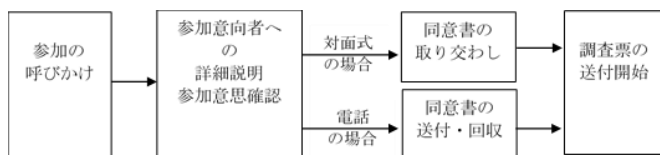
ふだん食事等で摂る汁もの類(みそ汁、スープなど液体)について塩分測定器で濃度測定を行う。喫食時の部屋の湿度と温度も同時に記録を行う。一部の参加者で汁もの類の温度測定を実施(同意時に希望の有無を確認)。

＜アンケート等の配布と回収＞

アンケートならびに測定表の送付と回収は調査担当者 と参加者間との直接郵送で行う。参加者の送付先情報については「個人情報の取り扱い」に示す通り。

＜調査開始までの流れ＞

調査開始までの流れは以下のとおり。



<調査スケジュール>

調査票は調査開始の前週までに参加者に送付する。測定調査期間は2週間とし参加者はその中で都合の良い7日分の記録を行う。調査票の提出は測定調査期間最終日の4日後とする。参加者が都合により他の期間での実施を申し出た場合は相談の上、実施期間を変更する。

内容	時期・期間の目安
調査協力者募集	倫理委員会承認後～2017年3月中旬
1回目調査	2017年3月実施
2回目調査	2017年6月実施
3回目調査	2017年9月実施
4回目調査	2017年12月実施

2.3 研究全体スケジュール

<疫学的検証>

平成28年4～8月:解析データ作成

平成28年9月:データ解析開始, 粗解析, 本解析, 再検証

<精度検証>

平成28年4～12月:調査準備(調査手順書確定, 倫理審査, 参加協力者募集)

平成29年2～平成30年2月:調査実施(四季節)

平成30年3～7月:解析データ作成

平成30年8月:解析開始

平成30年12月を目標に粗解析, 本解析, 再検証

3. 研究結果

3.1 疫学的検証

平成25年7月から平成27年12月31日までに東北大学東北メディカル・メガバンク事業三世代コホート調査に参加同意した妊婦16,028名と非妊婦(以下「一般成人」)10,334名のうちデータ使用が可能な12,843名および8,527名の生活習慣等に関するアンケート回答データをもとに食塩摂取量及び塩加減と心理的ストレス度との関連について解析を行った。食塩摂取量は食物摂取頻度(約140項目FFQs)の回答をもとに1日あたりの摂取量を算出し、エネルギー補正後の摂取量を解析に使用した。塩加減に関する項目には①食卓で醤油を料理に直にかけるとの習慣(回答選択肢:ない, まれに, ときどき, たいてい, いつも), ②食卓で塩を料理に直にふる習慣(回答選択肢:ない, まれに, ときどき, たいてい, いつも), ③ふだんの味噌汁の味付け(回答選択肢:かなり薄め, やや薄め, ふつう, やや濃いめ, かなり濃いめ)を用いた。心理的ストレス度については過去1か月間の精神的不調を評価するK6(Kessler 6 Scale)得点を用いた。

本研究対象のうち塩分摂取量算出不可者(妊婦 n=908, 一般成人 n=524), 検証の主項目への回答不備等(妊婦 n=516, 一般成人 n=2,046)を除外した妊婦11,419名, 一般成人5,957名分のデータを用いて解析を行った。

3.1.1 解析対象者の集団特徴

基本特性を **Table 1**, 塩分摂取状況を **Table 2**, 塩加減と食塩摂取量の量反応関係を **Table 3** にそれぞれ示す。

Table 1. Socio-demographic characteristics of subjects in large-scaled cohort analysis

	Pregnant women (n=11,419)	Other participants (n=5,957)
Age, ave ± s.d	31±5歳	46±15歳
BMI, ave ± s.d *	21±3	24±4
BMI ≥25.0 *	12 %	29 %
Current alcohol drinker	20 %	65 %
Current tobacco smoker	3 %	27 %
No habitual physical exercise	22 %	75 %
Poor sleep	38 %	20 %

*estimated BMI before pregnancy in pregnant women

Table 2. Salt intake and seasoning behavior of saltness

		Pregnant women (n=11,419)	Other participants (n=5,957)
Salt intake g/day, ave±s.d		9.6±0.5	10.8±2.2
Seasoning behavior of saltness, %			
Pouring table soy source on meal	Not use	26.6	19.9
	Sometime or Rarely	66.6	64.0
	Usually or Always	6.8	16.1
Add table salt on meal	Not use	61.7	55.6
	Sometime or Rarely	35.4	41.4
	Usually or Always	3.0	3.0
Taste of miso soup	Very light or Light	23.3	28.1
	Standard	68.4	64.2
	Very strong or Strong	8.3	7.7

Table 3. Salt intake by seasoning behavior

Salt intake, g/day, ave±s.d.		
	Pregnant women (n=11,419)	Other participants (n=5,957)
Pouring table soy source on meal		
Not use	9.6 ± 0.4	10.2 ± 1.7
Sometime • Rarely	9.7 ± 0.5	10.8 ± 2.0
Usually • Always	10.0 ± 0.7	12.0 ± 3.2
	***	***
Add table salt on meal		
Not use	9.7 ± 0.4	10.5 ± 1.9
Sometime • Rarely	9.8 ± 0.6	11.2 ± 2.4
Usually • Always	10.1 ± 0.8	12.7 ± 4.3
	***	***
Taste of miso soup		
Very light • light	9.7 ± 0.5	10.6 ± 1.8
Moderate	9.7 ± 0.5	10.2 ± 1.7
Very strong/strong	9.8 ± 0.5	10.2 ± 1.7
	***	***

*** $P < 0.0001$ in variance analysis,

3. 1. 2 心理的ストレスと食塩摂取量との関連解析結果

心理的ストレスと食塩摂取量の単純相関(Spearman の順位相関係数)は妊婦では $\rho=0.040$, 一般成人では 0.026 であり相関は示されなかった。

心理的ストレスレベル別の食塩摂取量比較心理的ストレスの低い群と高い群の食塩摂取量の差を *t* 検定により検証した (Table 4)。妊婦では心理的ストレス度の高い群で一日当たりの食塩摂取量が 0.03g 多く, 統計的有意差が示された ($P=0.0025$)。一般成人では群間で統計的有意差は示されなかった。

心理的ストレスが高い場合の食塩摂取量増加リスクについては, 心理的ストレスが高い群で食塩摂取量が集団の平均以上となる粗オッズ比ならびに補正オッズ比を算出した (Table 5)。妊婦において心理的ストレスが高い群では食塩摂取量が平均以上となる粗オッズ 1.13 ($P=0.002$), 補正オッズ 1.21 ($P<0.001$), 一般成人では粗オッズ比が 1.12 ($P=0.0428$), 補正オッズ 0.82 ($P=0.3316$) であった。

解析結果から心理的ストレスが高い群で食塩摂取量が集団の平均以上となる確率は妊婦においてのみ統計的有意に 1.2 倍高まることが示された。

Table 4. Salt intake by score of mental distress

Mental distress	Salt intake, g/day mean \pm s.d	<i>P</i> -value
Pregnant women (n=11,419)		
Group of low score (k6<5 点)	9.71 \pm 0.49	0.0025
Group of high score (k6 \geq 5 点)	9.74 \pm 0.51	
Other participants (n=5,957)		
Group of low score (k6<5 点)	10.8 \pm 2.2	0.189
Group of high score (k6 \geq 5 点)	10.9 \pm 2.3	

Table 5. Odds ratio (OR) and 95% CI(95% CI) for mental distress according to above average of salt intake

Mental distress	Crude OR (95%CI)	<i>P</i> -value	Adjusted OR (95%CI)*	<i>P</i> -value
Pregnant women (n=11,419)				
Group of low score (k6<5)	1.00 (reference)	0.002	1.00 (reference)	<.0001
Group of high score(K6 \geq 5)	1.13 (1.05-1.22)		1.21 (1.12-1.32)	
Other participants (n=5,957)				
Group of low score (k6<5)	1.00 (reference)	0.0428	1.00 (reference)	0.3316
Group of high score (K6 \geq 5)	1.12(1.00-1.24)		0.82 (0.55-1.22)	

*Adjusted variables: age, number of family, BMI, alcohol drinking habit, smoking habit, walking habit, occupation, education, sleeping condition. Variable of BMI for pregnant women was used estimated BMI before pregnancy, and annual house income was also added to analysis model in pregnant women because of the data availability.

3. 1. 3 心理的ストレスと塩加減との関連解析

塩加減 3 項目について心理的ストレスとの関連を検証するため粗オッズ比ならびに補正オッズ比を算出した (Table 6a, Table 6b)。妊婦において心理的ストレスが高めである人はしょうゆを料理にいつもかける傾向についての粗オッズ 1.60 (P<0.0001), 補正オッズ 1.31 (P= 0.0031), 塩を料理にいつもふる傾向についての粗オッズ 1.53 (P= 0.0002), 補正オッズ 1.28 (P=0.0505), みそ汁の味付けは濃いめとなる傾向についての粗オッズ 1.62 (P<0.001), 補正オッズ 1.52 (P <0.001)となった (Table 6a)。

同様に、一般成人において心理的ストレスが高めである人はしょうゆを料理にいつもかける傾向についての粗オッズ 1.51 (P<0.0001), 補正オッズ 1.51 (P= 0.1902), 塩を料理にいつもふる傾向についての粗オッズ 1.89 (P<0.0001), 補正オッズ 3.97 (P=0.0194), みそ汁の味付けは濃いめとなる傾向についての粗オッズ 1.45 (P= 0.0002), 補正オッズ 1.62 (P =0.1860)となった (Table 6b)。

以上の結果から、妊婦において心理的ストレスが高めである人はしょうゆを料理にいつもかける傾向が 1.3~1.6 倍高い, 塩を料理にふる傾向が 1.2~1.5 倍高い, みそ汁の味付けは濃いめとなる傾向が 1.5~1.6 倍高いことが統計的有意に示された。一般成人において心理的ストレスが高めである人はしょうゆを料理にいつもかける傾向が 1.5 倍高い, 塩を料理にふる傾向が 1.8~3.9 倍, みそ汁の味付けは濃いめとなる傾向が 1.4~1.6 倍高いことが示されたが, 塩を料理にふる習慣についてのみ統計的有意差が示され, 他 2 項目は, 統計的有意差は示されなかった。

3. 2 精度検証

平成 29 年 1 月に倫理審査の承認を得て平成 29 年 3 月 6 日より第 1 回目調査を開始した。大学掲示板による呼びかけを開始して 10 日間で参加希望者が 65 名に達したため呼びかけを中止し, 65 名に調査の詳細な説明を行い, 参加条件を満たした 60 名にあらためて調査協力を依頼した。再依頼後, 期日までに回答のあった 58 名を確定者とした。調査終了日である平成 29 年 3 月 23 日までに調査票を提出したのは 58 名 (回収率 100%) であった。

3. 2. 1 協力者の特徴

協力者の基本特性を Table 7 に示す。睡眠, ストレス状

態については評価指標をもとにグループ分けした結果を Table 8, Table 9 に示す。特徴として就業者しており, 高校卒業以上の学歴を有し, 定期的な強度な運動習慣はなく, 習慣的に飲酒をするが喫煙はしない者が多い傾向にあった。また震災後の生活変化があったと答えたのは全体の 25%存在した (Table 7)。不眠症疑いを含めると 52%は睡眠が不十分な状態であった (Table 8)。ストレス状態としてはほぼ全員が最近 1 年間にストレスを多く感じており, 不安障害には至らないが心理的ストレス度が高め (K6 スコアが 5 以上) が 42%, うち 8%は超過ストレスをかかえている状態であった (Table 9)。

また, ストレスによる喫食行動にはほぼ全員がストレスを感じたときに何か食べたくなり, 甘いものを食べる人が 50%, 次に塩味が濃いものを食べる人が 13%であった (Table 10)。

塩分チェックシートによる塩分摂取の傾向を評価した結果, 食塩摂取が多めとかなり多めの人は全体の 45%を占めていた (Fig. 1)。

POMS2 による 7 項目の気分状態では気分になんらかの強い問題をもつ者が 18%, ネガティブな感情としては疲労感が最も高く, ポジティブな感情としては友好感 (他者へのポジティブな感情) が高い傾向がみられた (Fig. 2)。

3. 2. 2 塩気の自己評価と実測値, 気分の変動

塩分測定対象を食べたときに「ちょうどいい塩梅」と自己評価した場合の実際の塩分測定値の集団平均とその季節変動について Fig. 3 に示した。2 回目測定期間である夏期の調査では「ちょうどいい塩味」の実濃度値がやや薄く, 4 回目冬期の調査では「ちょうどいい塩味」の実濃度がやや濃いことが示された。

1 年の調査期間を通した気分状態に何らかの強い問題をもつ人の割合を Fig. 4 に示した。期間通して, 気分状態が高めに出ている人が 20%程度見られ, 中でも疲労状態が継続して高い傾向であった。また, 4 回目冬期では怒りや抑うつが高くなる傾向であった。

3. 2. 3 食塩摂取量と気分の相関

食塩摂取量と POMS2 による 7 項目の気分状態の相関解析を行ったところ, 各相関係数は食塩-怒り 0.042, 食塩-混乱 0.051, 食塩-抑うつ 0.097, 食塩-疲労 0.029, 食塩-緊張 0.141, 食塩-活気 0.020, 食塩-友好 0.142 であり統計的有意な相関は示されなかった。各調査とも同様の結果

Table 6a. Odds ratio (OR) and 95% CI (95% CI) for mental distress according to habitual using of saltiness seasoning among pregnant women (n=11,419)

	Crude OR(95%CI)	<i>P-value</i>	Adjusted OR(95%CI)*	<i>P-value</i>
Pouring table soy sause on meal				
Not use	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
Sometime	1.20 (1.09 - 1.31)	<.0001	1.10 (0.99 - 1.21)	0.0645
Usually	1.60 (1.36 - 1.88)	<.0001	1.31 (1.10 - 1.56)	0.0031
Add table salt on meal				
Not use	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
Sometime	1.34 (1.24 - 1.45)	<.0001	1.21 (1.11 - 1.32)	<.0001
Usually	1.53 (1.22 - 1.91)	0.0002	1.28 (1.00 - 1.63)	0.0505
Taste of miso soup				
Light	1.03 (0.94 - 1.13)	0.5437	1.06 (0.96 - 1.17)	0.2623
Moderate	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
Strong	1.62 (1.42 - 1.86)	<.0001	1.51 (1.30 - 1.76)	<.0001

*Adjusted variables: age, number of family, BMI before pregnancy, alcohol drinking habit, smoking habit, walking habit, occupation, sleeping condition, and annual house income

Table 6b. Odds ratio (OR) and 95% CI (95% CI) for mental distress according to habitual using of saltiness seasoning among other participants (n=5,957)

	Crude OR(95%CI)	<i>P-value</i>	Adjusted OR(95%CI)*	<i>P-value</i>
Pouring table soy sause on meal				
Not use	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
Sometime	1.27 (1.11 - 1.45)	0.0007	1.23 (0.79 - 1.99)	0.3968
Usually	1.51 (1.26 - 1.79)	<.0001	1.51 (0.82 - 2.77)	0.1902
Add table salt on meal				
Not use	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
Sometime	1.33 (1.20 - 1.50)	<.0001	1.45 (1.11 - 1.32)	0.0511
Usually	1.89 (1.40 - 2.55)	<.0001	3.97 (1.25 - 12.64)	0.0194
Taste of miso soup				
Light	0.89 (0.79 - 1.00)	0.0648	1.19 (0.78 - 1.81)	0.4192
Moderate	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
Strong	1.45 (1.19 - 1.76)	0.0002	1.62 (0.79 - 3.30)	0.1860

*Adjusted variables: age, number of family, BMI, alcohol drinking habit, smoking habit, walking habit, occupation, education, sleeping condition.

Table 7. Socio-demographic characteristics of participant in detailed survey (n=58)

Variables		%
Employment	Full time employee	33
	Part time employee	40
	House wife	4
	Student	4
	Others	19
Final Education	High school	19
	Technical school/ junior college	38
	University	33
	Graduate School	10
Change of lifestyle and living condition after big disaster in 2011		
	No have changed	63
	Have changed	25
	Unknown	13
Habitual psychical exercise		
	yes	40
	No	60
Habitual alcohol drink	Current drinker	65
	Past drinker	2
	Never	33
Habitual tobacco smoke	Current smoker	2
	Past smoker	15
	Never	83
Sex	Female	78

Table 8. Sleep condition

Athens insomnia scale *		
	No doubt of insomnia (0~3点)	48%
	Doubt of insomnia (4~5点)	24%
	Suspected insomnia (6点以上)	28%

*Athens insomnia scale; Soldatos et al, Journal of Psychosomatic Research 2000, 48, 555-560

Table 9. Level of psychological distress

K6 Score*		
	No psychological distress (0~4 点)	58%
	Moderate level (5~12 点)	33%
	Severe level (13 点以上)	8%

*Kessler Psychological Distress Score

Table10. Stress and preference

Do you feel like eating something when you feel stressed?		
	Yes	100%
What do you eat most when you feel stress?		
	Sweets	50%
	Saltiness	13%
	Spicy&Hot	8%
	Sour	3%
	Bitter	0%
	Greasy	2%
	Othres	3%

Multiple answer was 39%

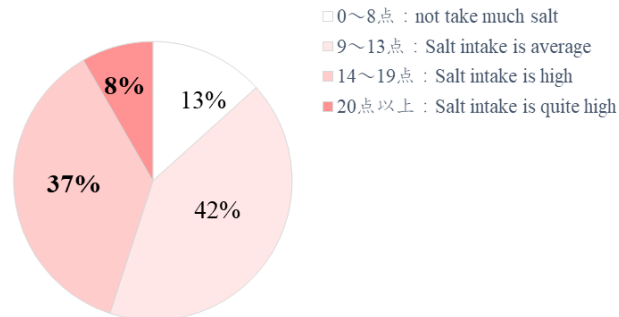


Fig. 1. Trend of salt intake by Check Sheet

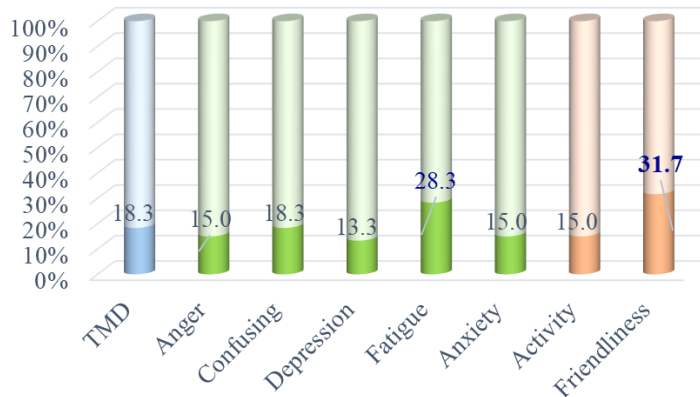


Fig. 2. Result of mood state evaluation by Profile of Mood States 2nd

TMD= Total Mood Disturbance

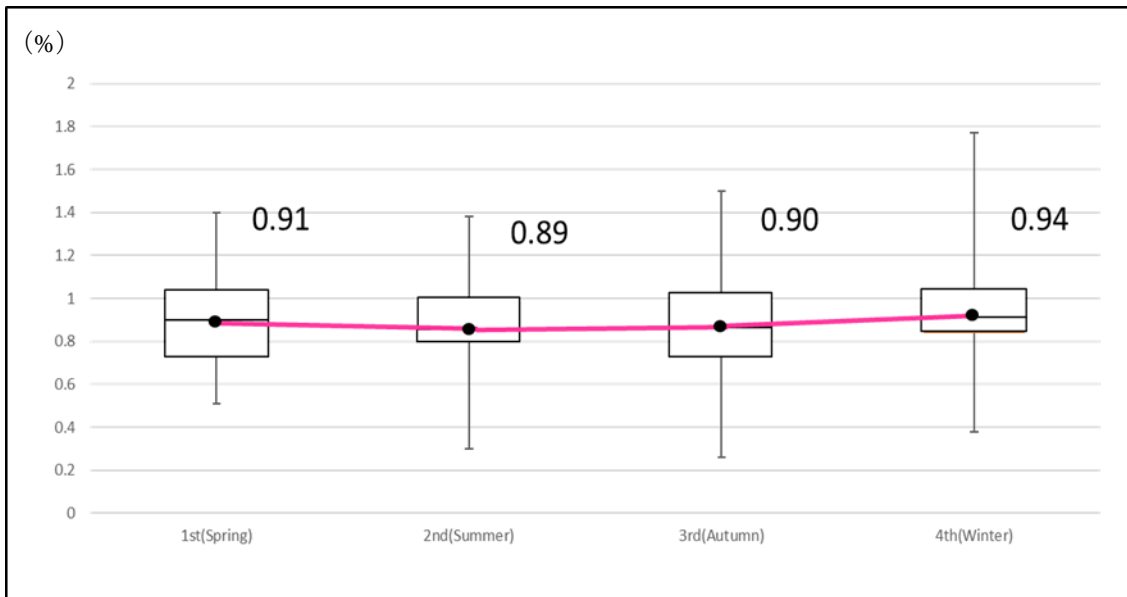


Fig. 3. Salinity measurement of soup and liquids when participants have eaten and self-evaluated as "good" saltiness

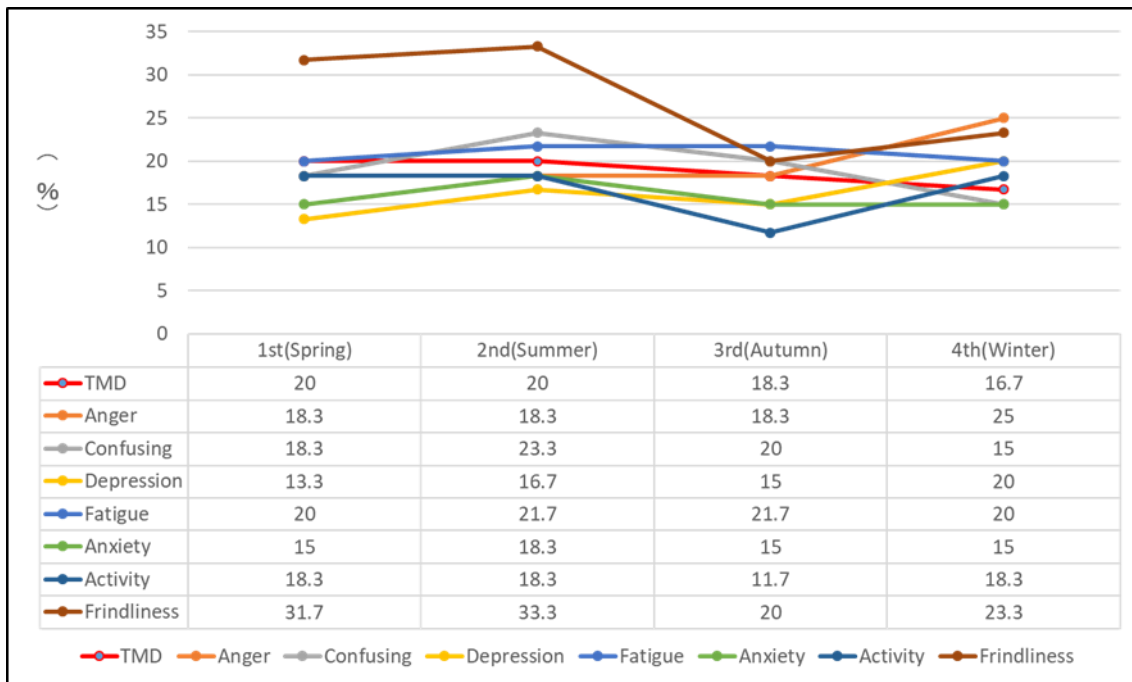


Fig. 4. Percentage of participants with high mood status

であり量反応関係は示されなかった。

3. 2. 4 塩加減にかかわる要因の検証

塩加減 3 項目(味噌汁の味付け, 塩を料理に直にかける習慣, 醤油を料理に直にかける習慣)にかかわる背景要因について変数減少法ステップワイズ(尤度比)を用いて検証した。各測定値平均, 季節ほか調査項目を解析モデルに投入した。

味噌汁の味付けについては性別, BMI, 睡眠, 室温,

湿度, 就労が背景要因として強く寄与していた。POMS2 による 7 つの気分状態の関連順位としては関連が強い順に抑うつ, 疲労, 友好, 混乱, 怒り, 緊張, 活気であった。

塩を料理に直にかける習慣については年齢, 性別, 室温, 湿度, 就労が背景要因として強く関与していた。気分状態別には関連順位としては関連が強い順に友好, 活気, 疲労, 抑うつ, 混乱, 緊張, 怒りであった。

醤油を料理に直にかけける習慣については年齢、性別、就労が背景要因として強く関与していた。気分状態別には関連順位としては関連が強い順に混乱、活気、友好、疲労、緊張、抑うつ、怒りであった。以上の結果から、塩加減にはそれぞれ特有の気分状態がかかわっていることが示唆された。

4. 考 察

国内の先行研究について医学論文のデータベースの医中誌WEB検索機能で検索したところ、塩加減、塩分摂取、心理、気分、感情をキーワードに先行研究を検索した結果、1983年以降の報告が30件、うち論文が15件抽出された。しかし高血圧患者を対象としたケースシリーズの報告を除くと論文は1件、また抄録開示されている学会発表も1件のみであった。該当論文の対象は男性1,014名、平均年齢65歳、心理学的評価は過去1か月の心理的苦痛度を評価するK6を用い、塩分評価は尿中からのNaから塩分摂取量を推定しており、塩分摂取が少ないことと抑うつ傾向が関連しているとの結果であった⁽¹⁾。該当学会発表では男女22名、平均年齢62歳を対象としPOMSと呼ばれる心理的状況評価と味噌汁摂取から塩分濃度を推計した調査において、怒り、活気との関連はなく抑うつ、不安、疲労と塩分摂取に正の関連があったとの報告であった。

本研究の大規模疫学データから、心理的ストレス度が高いと塩分を摂る傾向が高まり、連動して塩分摂取量も多くなる傾向が示された。先行論文では塩分評価を尿中Naからの推計、本研究ではFFQからの算出と行動学的な評価を用いているため単純に結果を比較できないが先行研究と同様の傾向を示していない理由として本解析対象集団の特性の違い、解析方法の違いがあげられる。

本研究の詳細調査から、ふだんの食事での塩加減と気分状態との関連を検証したところ、抑うつ状態が高めの人で味噌汁の味付けが濃いめ、友好的な状態が高めの人で塩を料理に直にかけける習慣であること、混乱状態が高めの人では醤油を料理に直にかけける習慣であることが示された。塩加減には異なる気分状態がかかわっていることが示された。先行報告で味噌汁による塩分評価と抑うつとの正の相関が報告された点について本研究の結果は類似の傾向を示した。また、塩加減の背景要因として性

別、年齢のほかに就労が共通して抽出された。一般地域住民を対象とした大規模疫学データや先行研究では現役就労者の割合が低い集団を対象とした研究では重要視されていないことが多いが、本調査では就労者にも協力を得ることができたため重要なファクターとして明らかにすることができた。外的要因としては味噌汁の味付けと塩を料理に直にかけける習慣に対しては室内の温度と湿度が大きく寄与していた。醤油の使用にはこれらの環境的要因は大きな寄与はなかった。醤油をかける料理は限られておりふだんの身近な塩分摂取源が味噌汁もしくは食卓塩であることの結果とも考えられる。

本研究で食塩摂取量と気分状態との間に統計的有意な相関は示されなかったが、この結果は一時的な気分は全体的な食塩摂取量には影響しないと解釈できる。特定の高い気分状態や高ストレス状態が長期化している場合の食塩摂取量との関連については今回の対象では高い気分状態やストレスを長期にかかえている人が少なく検証に至らなかった。しかし気分状態のタイムラインと塩分摂取について今後継続した研究を実施する場合は本研究で得られた変数相関性などを参考にさらに緻密な研究を実施することが可能であり、その基礎資料として本研究の結果は学術的に有用であると考えられる。

結語として、本研究の大規模疫学データならびに詳細調査から、塩加減には心理的ストレスならびに気分状態と関連があるという見解については一致しているが、塩加減と食塩摂取推定量および実測値との間に強い相関は示されなかった。

5. 今後の課題

今回は比較的塩分摂取量の高めの地域に住む人を対象とした研究であり結果は集団特性に過ぎない可能性もあり、今後は他の集団で同様の検証をし、塩加減に関する結果を蓄積することでより強固なエビデンスを出していきたいと考えている。

6. 文 献

- (1) Shimizu Y, et al. Salt intake and mental distress among rural community-dwelling Japanese men. *Journal of physiological anthropology* 2015, 34: 26.

7. 学会発表

(1) Sato Y, Ishikuro M, Mizuno S, Yamanaka C, Miyashita M, Obara T, Metoki H, Kikuya M, Kuriyama S and the Group of the TMM BirThree Cohort Study. The association between

psychological distress and habitual using of saltiness seasoning on meal among Japanese pregnant women in Miyagi Prefecture. International Conference of Epidemiology. August 2017, Omiya, Japan.

Epidemiological Study for Taste of Salt and Habitual Salt Intake

Yuki Sato¹, Chizuru Yamanaka¹, Reiko Suzuki²

¹Tohoku University Graduate School of Medicine, Tohoku Medical Megabank Organization,

²Japan Women's University, Faculty of Human Sciences and Design

Summary

Recent report that the correlation between seasoning behavior of salt and real salt intake was limited and the status among pregnant women and middle age was still scant.

The aim of the study in this first year was to exam the association between behavior of using saltiness seasoning, taste of miso soup and mental distress in pregnancy. In the second year, we have examed the same association in men and non-pregnant women. We used the data of almost ten thousand pregnant women and almost eight thousand other parsons participated in Tohoku Medical Megabank Project Birth and Three-Generation Cohort Study. Three items of question about seasoning behavior of salt; adding table salt on meal, pouring table soy sauce on meal, taste of miso soup. The category of response for using of saltiness seasoning was five; not use, rarely, sometimes, usually, always. The category of response for taste of miso soup was five; very strong, strong, standard, light, very light. Mental distress was estimated by a Kessler 6 scale score. Data analyses was used by SAS software.

In pregnant women, the average of salt intake was 9.6g/day, and the gape of daily salt intake between subjects who usually use table soy source and/or table salt on meal and who not use the seasoning was 0.1g/day in minimum and 0.4g/day in maximum. The subjects who had high mental distress (diagnosed cut-off score was 5 or higher in K6) more consumed salt than subjects who had normal mental condition, the multivariate odds ratio was 1.2. The tendency of behavior of seasoning of salt was high in subjects who had high mental distress, always pouring soy sauce on meal was 1.3 times, for the always add table salt on meal was 1.2 times, strong taste of miso soup was 1.5 times.

In men and non-pregnant women, the average of salt intake was 10.8 g/day, and the gape of daily salt intake between subjects who usually use table soy source and/or table salt on meal and who not use the seasoning was 0.3 g/day in minimum and 2.2 g/day in maximum. The subjects who had high mental distress (diagnosed cut-off score was 5 or higher in K6) more consumed salt than subjects who had normal mental condition, the multivariate odds ratio was 1.1. The tendency of behavior of seasoning of salt was high in subjects who had high mental distress, always pouring soy sauce on meal was 1.35 times, for the always add table salt on meal was 1.8 times, strong taste of miso soup was 1.4 times. Our result by using large-scaled cohort data suggested person with high level of mental distress may behave high frequent of using saltiness seasoning.

We have also examined salt intake, environmental factors and the seven type of emotion (anger, confusing, depression, fatigue, anxiety, friendliness) in detailed survey. Fifty-eight men and women participated the detailed survey and we followed them during one year. The survey contented a questionnaire which used same items of

large-scale cohort study which included assessment of salt intake and three items of question about seasoning behavior of salt, and added some new items to assess personal emotion, and contented to measure of liquid every day, to measure of temperature and humidity in room. In this detailed survey, the correlation between salt intake and seven type of emotion was low in each and no statically association. We also tried Stepwise analyses to estimate strong factor and the rank it that related to seasoning behavior of salt.

For taste of miso soup was determined by sex, age, BMI, sleep condition, room temperature, room humidity and working type and related most emotional factors was depression.

For using frequency of table salt on meal was determined by sex, age, room temperature, room humidity and working type and related most emotional factors was friendliness. For frequent of use table soy source on meal was determined sex, age, working type and related most emotional factors was confusing. The result has suggested that seasoning behavior of salt was different by emotional type.

Overall, our study suggested that mental distress and emotional condition would relate to behave frequent of using saltiness seasoning.

プロジェクト助成研究報告書（食品科学）
Project Research Report（Food Science）

令和2年3月
March, 2020

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712
URL <https://www.saltscience.or.jp>

ISBN 978-4-902192-52-0

助成研究報告書

食品科学プロジェクト研究（2016－2018）

「適塩」考究に向けた複眼的研究

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団