
助成研究報告書

食品科学プロジェクト研究

(2020 – 2022年度)

風味に着目した塩味受容メカニズムの解明と
食品加工における塩の有効利用に関する研究

Studies on the Elucidation of the Mechanisms Involved in Salty Taste
Perception Including Odor-Taste Interactions, and on Beneficial
Utilization of Sodium Chloride in Food Processing for Our Healthy Life.

The Salt Science Research Foundation
Project Research Report

2024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

20D-22D

風味に着目した塩味受容メカニズムの解明と 食品加工における塩の有効利用に関する研究

1	まえがき 駒井 三千夫 (東北大学)	1
2	塩味受容・応答における塩化物イオンの役割と分子論的解明 (20D1 - 22D1) 朝倉 富子 (東京大学)	5
3	食品中匂い成分による食塩摂取量の調節に関する研究 (20D2 - 22D2) 長田 和実 (日本大学)	21
4	ヒトにおける風味による塩味増強効果に関わる認知神経科学的研究とその知見の減塩 一食の呈味性増強への応用一 (20D3 - 22D3) 坂井 信之 (東北大学)	35
5	塩分制御による発酵米糠・小麦ふすまの風味・健康機能性の向上 (20D4 - 22D4) 白川 仁 (東北大学)	51
6	食塩とアミノ酸との相互作用による風味向上の可能性について (20D5 - 22D5) 石川 匡子 (秋田県立大学)	71

CONTENTS

PROJECT RESEARCHES OF FOOD SCIENSE

20D–22D

Studies on the Elucidation of the Mechanisms Involved in Salty Taste Perception Including Odor-Taste Interactions, and on Beneficial Utilization of Sodium Chloride in Food Processing for Our Healthy Life.

1	Foreword	
	Michio Komai (Tohoku University)	3
2	Role of Chloride Ion in Salty Taste Response and Its Molecular Elucidation (20D1 - 22D1)	
	Tomiko Asakura (The University of Tokyo)	20
3	Effect of Scent Component of the Foods on Sodium Chloride Preference in Mice (20D2 - 22D2)	
	Kazumi Osada (Nihon University)	33
4	The Cognitive Mechanisms and Application of the Salt Taste Enhancement Effect Applied to the Low Sodium Foods (20D3 - 22D3)	
	Nobuyuki Sakai (Tohoku University)	49
5	Improvement of Flavor and Hhealth Functionality of Fermented Rice Bran and Wheat Bran by the Regulation of Salt Concentration (20D4 - 22D4)	
	Hitoshi Shirakawa (Tohoku University)	69
6	Study on the Flavor Improvement of Foods by Utilizing Sodium Chloride and Amino Acids Interaction Effect (20D5 - 22D5)	
	Kyoko Ishikawa (Akita Prefectural University)	86

まえがき

駒井 三千夫

プロジェクトリーダー

東北大学名誉教授

風味(フレーバー)は、味と同一視される傾向があり、ほとんどの食品の独特の風味は、味が強調されがちだが、近年におい成分の寄与が大きいことが認識されつつある。すなわち、食品の風味は、味覚成分のみならず嗅覚成分や一般体性感覚因子によっても構成されており、味覚そのものの受容・応答機構の研究だけでは不十分である。実際に、2019年には米国で舌の味細胞に嗅覚受容体が発現していることが証明され、味覚シグナル以外の因子の風味受容全体に及ぼす因子の研究の必要性が指摘されてきた。このような背景から、以下のサブテーマが設定された。

サブテーマ 1: おい・香り成分が塩味受容に及ぼす影響に関する研究

サブテーマ 2: 発酵等の食品加工時の風味改善のための食塩の利用研究

サブテーマ 3: 食品の香味性・機能性向上のための食塩または海水の利用研究

サブテーマの一つ目は、塩味受容に及ぼすにおいや香りの成分の影響に関する研究である。最近の研究の進展により、温度によって甘味感が異なることの説明がなされ、その一例として種々の香辛料成分を受容する陽イオンチャンネルである TRP ファミリーのうちの TRPM5 が、温度が高い時の甘味増強に関与していることが証明された。この TRP ファミリーは、一般体性感覚(温度・触・圧・痛・炭酸刺激味)受容システムの主体であることから、食塩の受容機構にも寄与していることが考えられる。実際に、食塩

応答のうちの Na⁺チャンネル以外の成分については別の TRP チャンネルの介在を主張する研究者もいたが、現状ではなお不明なため食塩応答に関与する可能性のある TRP チャンネルおよび関連するイオンチャンネルの解析が必要であるとの観点も含めて 3 課題が採択された。

1. 『塩味受容・応答における塩化物イオンの役割と分子論的解明』朝倉 富子(東京大学): 食塩(NaCl)の受容機構のうち Cl⁻の受容実体が未解明だったことから、マウス舌有郭乳頭上皮の受容体関連遺伝子の発現量を解析したところ、TMC4 (Transmembrane channel 4)が高濃度の食塩応答性の分子であることを見出した。すなわち、TMC4 は新規の電位依存性の Cl⁻チャンネルとして塩味受容に関与していることを発見した。また、食品中の新しい塩味増強剤の候補物質を具体的に提案することができた。

2. 『食品中匂い成分による食塩摂取量の調節に関する研究』長田 和実(日本大学): 食品中のおい成分がマウスの食塩嗜好性に及ぼす影響について、香辛料のオレガノ・醤油・燻煙臭などを用いて解析した。供与した気相中のおい成分が一定の濃度でマウスに暴露されている実験系で、オレガノの 24 時間暴露が食塩嗜好を抑制することを明らかにし、その活性成分が TRPV3 のアゴニストでもある carvacrol であることを証明した。この効果は、Na 調節作用に関与する脳の分界条床核腹側部や扁桃体中心核の神経活動を高め発揮されることを推察できた。

3. 『ヒトにおける風味による塩味増強効果に関わる認知神経科学的研究とその知見の減塩食の呈味性増強への応用』坂井 信之(東北大学):「意識せずに自動的に減塩食を選ぶような工夫」を提案すべく5種類の研究を行った。その結果、以下のことが明らかになった。①消費者の態度決定については、日本人は減塩に対して知識は十分持っているが、減塩に対する態度は消極的で、行動もできていないことが分かった。②色イメージの調査から、「塩味」青・白色系、「減塩食」緑・赤色系となり、イメージに相違があることが分かった。③脳応答の測定から、パッケージの種類に関係なく、減塩食は普通食よりも塩味が薄くおいしさも低く評価されることが分かった。④減塩スープの塩味を増強させる香料として、イワシ・ベーコン・チーズの香りを選定できた。⑤パッケージの「減塩」の表示が上部に青色の丸印で描いてあるときに最も効果的であることを示した。

二つ目は、発酵食品等の食品加工時の風味改善のための食塩の利用研究である。これまでの研究では、味噌・醤油熟成中に生ずる優良風味成分が、グルコースや食塩添加によって増強されること、フグ卵巣糠漬けの塩漬けによるテトロドトキシン毒の無毒化、乾燥または湿潤塩漬肉製品に生ずるフレーバー成分の改善、等の食塩利用の成果がある。申請課題のうち、小麦フスマや米ヌカの発酵による風味・呈味性改善を含めた食品の高機能化における食塩の利用研究が採択された。

4. 『塩分制御による発酵米糠・小麦ふすまの風味・健康機能性の向上』白川 仁(東北大学): 白川らは、米糠を麴カビと乳酸菌の二段階発酵させることによって、米糠臭を改善させるとともに機能性成分の産出にも

成果をあげてきた。今回さらに、食塩を添加したカビの発酵によって機能性が付与できるか否かについて解析した。その結果、クモノスカビでは、食塩の添加によってアデノシン・エルゴチオネイン・ベタインが増加した。麴カビ米糠発酵物では、エルゴチオネイン・コリン・デカン酸などが増加し、食塩を添加した発酵食品が健康機能性素材として有効に使える可能性を明らかにした。

三つめは、食品に添加できる天然に存在する有用素材を用いた食品加工による食品の香味性・機能性向上のための食塩または海水の利用研究である。風味に問題なく、食品素材としての安全性も担保されているものを対象とした食品の研究が採択された。

5. 『食塩とアミノ酸との相互作用による風味向上の可能性について』石川 匡子(秋田県立大学): 酸味と塩味の対比効果が味の増強に有効であることや、魚醤の呈味性においては Glu, Ala, Gly などのアミノ酸が多いものが酸味を低減させる事などを証明してきた実績から、塩味についてもアミノ酸が味の強度を修飾するのではないかと考えて研究を行った。①塩とアミノ酸の相互作用による味強度変化については、旨味アミノ酸と甘味アミノ酸の相互作用により塩味が増強されることが確認された。②相互作用による呈味改善が、液体だけでなく固形食品においても有効であることを確認した。③鰹節から抽出した香り成分を含んだ寒天が塩味を増強することが分かり、減塩に役立つ可能性を示した。

Foreword

Michio Komai

Project Leader

Honorary Professor, Tohoku University

Summary

Based on the difference in responsiveness to amiloride, salty taste reception is divided into two components; i.e., amiloride-sensitive (AS) and amiloride-insensitive (AI) reception. AS is thought to be involved in the salty response at low concentrations and AI at high concentrations. Since amiloride is an inhibitor of the epithelial sodium channel (ENaC), the AS pathway is thought to be mediated by ENaC. For many years, however, the AI-related molecule has been unknown, so the present project includes this type of research.

Moreover, recent papers revealed that both olfactory and gustatory receptors have been shown to be expressed in a wide variety of tissues. The G-protein-coupled sweet, bitter, and umami gustatory receptors and other gustatory signaling transduction proteins, i.e., ion-channels, are expressed in the tongue basically, and also expressed in such tissues as the digestive system, respiratory system, brain, testicles, and so on. Similarly, olfactory receptors are not only expressed in olfactory epithelium, but also in such tissues as the nervous system, gut, kidney, leucocytes, tongue, and so on. Therefore, the present project also includes odor-taste interactions, and beneficial usage of salt in food processing for our healthy life management from the viewpoint of functional food component utilization.

Subtopic 1: Effect of smell and taste sensation components on sodium chloride perception.

(1) Role of chloride ion in salty taste response and its molecular elucidation” (Dr. Tomiko Asakura): Epithelial sodium channel (ENaC) is a major salty taste detection receptor, and Dr. Asakura, et al. discovered that the transmembrane channel-like 4 (TMC4) is also involved in total NaCl taste detection mechanism as a chloride channel. Furthermore, they clarified salt taste enhancement by 3-guanidinyol propanol via TMC4-mediated mechanism for the first time.

(2) Effect of scent component of the foods on sodium chloride preference in mice. (Dr. Kazumi Osada): Oregano is the staple herb of Italian cuisine, most frequently used with roasted, fried, or grilled vegetables, meat, and fish. Majorly contributing flavor of oregano leaves is carvacrol, and Dr. Osada revealed the fact that scent component of oregano or carvacrol enhanced the salt taste intensity, which reduced the salt preference rate in mice. Moreover, they elucidated the transduction mechanism of this volatile on the brain area which control the salt appetite.

(3) The cognitive mechanisms and application of the salt taste enhancement effect applied to the low sodium foods. (Dr. Nobuyuki Sakai): Drs. Sakai and Onuma’s study aimed to promote the acceptance of low-salt foods in Japanese people, and found that the Japanese consumers have enough knowledge for salt reduction, but they do not behave to reduce salt intake. Their another study aimed to find the best flavor that enhances salt taste using healthy

subjects who tasted and evaluated several low-salt soups with a flavor, and found that sardine, bacon, cheese showed salt enhancement, but without significance. From this study, they are finally recommending that we should use sensory-nudge in health promotion in Japan.

Subtopic 2: Flavor improvement by food processing using sodium chloride during fermentation.

(4) Improvement of flavor and health functionality of fermented rice bran and wheat bran by the regulation of salt concentration. (Dr. Hitoshi Shirakawa): Rice bran (RB) and wheat bran (WB) contain several functional ingredients for health promotion, and Dr. Shirakawa et al. previously developed dual fermented RB (FRB) using fungi and lactic acid bacteria which process improved smell of RB and increased functional ingredients. FRB has been shown to be able to improve symptoms in animal disease models. Furthermore, they observed higher functional property of RB fermented by *Rhizopus oligosporus* (i.e., as for the secondary metabolites, adenosine, ergothioneine, and betaine) or *Aspergillus kawachii* (ergothioneine, choline, decanoic acid) were increased by an addition of NaCl before the processing.

Subtopic 3: NaCl or sea water utilization on the function and flavor enhancement of foods.

(5) Study on the flavor improvement of foods by utilizing sodium chloride and amino acids interaction effect. (Dr. Kyoko Ishikawa): Salt, an important seasoning, adds saltiness to food and enhances or suppresses other flavors. Because excessive salt intake is known as one cause of lifestyle-related diseases, salt reduction is recommended. Firstly, Dr. Ishikawa confirmed that the interaction between umami- and sweet-amino acids enhances the taste of foods including salty taste. Secondly, they confirmed that taste enhancement using salt and amino acids interaction is effective not only for liquids phase but also for solid foods. Thirdly, in addition to amino acids they added aroma components which were extracted from bonito flakes, and found out that the fragrance ingredients increased salt taste intensity with long-lasting aftertaste.

塩味受容・応答における塩化物イオンの役割と分子論的解明

朝倉 富子

東京大学大学院農学生命科学研究科

概要 生体における塩味の認知は Na^+ と Cl^- が同時に存在することが必須である。しかし、末梢における NaCl の受容に関する研究は、 Na^+ のみが注目され、研究されてきた。塩味が Na^+ と Cl^- が同時に存在することによって引き起こされる感覚であることから、 Cl^- を受容する分子実体が存在すると予測し、有郭乳頭上皮 (CvP) 及び周辺上皮 (Epi) から total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて網羅的な発現解析を行った。線虫の TMC1 が食塩に反応するという報告から TMC family に着目した。各遺伝子の味蕾特異的な発現量を検討するために CvP /Epi の値を算出した。味蕾特異的に発現する分子の発現量を見ると、RPKM (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) が 10 以上であることが多く、TMC4 がその条件を満たしていた。TMC4 の発現を *in situ* hybridization で解析した結果、高濃度の塩味に反応する舌咽神経が投射する有郭乳頭と葉状乳頭で強い発現が見られたが、鼓索神経が投射する茸状乳頭では、発現はほとんど見られなかった。

機能未知である膜タンパク質 TMC4 の特性を解明するために、HEK293T 細胞を用いた Whole-cell patch-clamp 法を用いた。細胞内液の陽イオンを K^+ から N-methyl D-glucamine (NMDG) に置換しても TMC4 の媒介電流は変化せず、逆転電位も変化しなかった。このことから TMC4 は K^+ による影響を受けないことが示唆された。細胞外液の陽イオンの影響を調べたところ、TMC4 の媒介する陽性電位の外向き電流は、上皮性 Na チャネルの阻害剤であるアミロライドの影響を受けなかったが、クロライドチャンネル阻害剤として報告されている 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) を含む溶液に置換すると TMC4 の媒介する外向き電流が完全に消失した。これらの結果より、TMC4 は、陽イオンチャンネルでもアミロライドに感受性でもなく、 Cl^- の流入に関与することが示唆された。さらに、種々のクロライドチャンネル阻害剤やアニオンチャンネル阻害剤による TMC4 媒介電流の影響について解析したところ、TMC4 の媒介電流は NPPB 以外にも細胞内 Ca^{2+} 感受性クロライドチャンネルの阻害剤である CaCC(inh)-A01 によって強く阻害された。

以上の結果から、TMC4 が新規の電位依存性アニオンチャンネルであり、塩味受容に関与している可能性が示された。

1. 研究目的

塩味は5基本味の1つであるが、他の基本味と大きく異なる点がある。ヒトにとっての代表的な塩味物質である NaCl が栄養的にも必須であることである。食品加工上では、他の味と比べて、食品の呈味性において最も基本的な味であり塩味がうすいと嗜好的に著しく劣る。哺乳類では低濃度の塩味は嗜好されるが、高濃度の塩味は忌避される。この現象は、栄養学的にも必須である Na を摂取する必要性は高いが、過剰な摂取は生体へ好ましくない影響

を与えるために、高濃度の塩に対しては忌避行動を取るのかもしれない。味覚は、生体が必要とするものを検知し、害になる物質を排除するために生来備えた感覚であることを考えると、塩味に対する生体応答の二面性は、理解しやすい。

生体における塩味の認知は Na^+ と Cl^- が同時に存在することが必須である。しかし、末梢における NaCl の受容に関する研究は、 Na^+ のみが注目され、研究されてきた。¹⁾

これは、げっ歯類において味神経の応答が、上皮性ナトリウムチャンネル (ENaC) の阻害剤であるアミロライドによって抑制されることが古くから示されてきたことと関係が深い。ENaC が舌上に発現し、低濃度の塩味を受容していることが報告され¹⁾、ENaC が塩味受容体であることが証明された。しかし、高濃度 (300 mM 以上) の塩味に応答する分子は特定されておらず、未知の受容体の存在が示唆されている。伝統的にシェフは食塩を粉末でふりかける。この場合、摂取する生体の味蕾近傍の NaCl 濃度は、一時的に 300 mM 以上に達している可能性が有ることから、この未知の塩味受容体の存在意義は甚大である。

Na⁺を中心とした研究が進められてきたために、塩味受容体は Na⁺受容分子であるという考えが広く浸透していった。たとえば、TRPM4, Scn2a1, Scn3a, Scn9a などの舌に発現するカチオンチャンネルがその候補として挙げられてきた。しかし、塩味は上述したように Na⁺と Cl⁻が共存することが必須であるにも拘わらず、Cl⁻の受容機構に関する研究はほとんどない。

アニオンに関する研究は、Na⁺の対イオンとして Na⁺の受容にどのように影響を与えるか、という視点でのみ研究が進められてきた。いわゆる“アニオン効果”である²⁾。アニオン効果は、アニオンの種類によって塩味の強度が変化することを示す理論で、塩味の強さは、Cl⁻ > Br⁻さらに NaCl > NaAc > NaGlu など、イオンサイズが塩味の強度と関わっているとされている。その作用機序として、Na⁺が受容体に受容される際に、味細胞周辺のタイトジャンクションに作用して、受容に影響を与える可能性を示している³⁾。この場合においても、アニオンを受容する特定の分子は示されておらず、塩味のセンシングに関しては、未解明の点が残されている。我々は、塩味が Na⁺と Cl⁻が同時に存在することによって引き起こされる感覚であることから、Cl⁻を受容する分子実体が存在すると予測し、塩化物イオンの役割と分子論的解明を目指してきた。

結果、これまでに有郭乳頭上皮 (CvP) から抽出した total RNA と次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行い機能未知の分子である TMC4 を選抜した。また電気生理学的手法などから TMC4 は、新規電位依存性クロライドチャンネルであり、塩味受容に関与する分子として初めてのクロライドチャンネルであることも報告した⁴⁾。

塩味受容は、ENaC の阻害剤であるアミロライドへの応答性への違いから、アミロライド感受性成分とアミロライド非感受性成分に大別される。特にヒトの塩味受容においては、アミロライド非感受性成分が優勢とされる。塩味受容研究におけるこれまでの知見より、舌上皮の有郭乳頭組織は、アミロライド非感受性の塩味受容に関与する味覚受容体を発現すると考えられている。Tmc4 は CvP に高発現しその機能はアミロライドに影響を受けない。そこでヒトの TMC4 であるヒト TMC4 (hTMC4) の機能が、官能実験などで報告されているヒトの塩味受容を模倣するかどうかについて検証を行った。

2. 研究方法

2.1 マウス有郭乳頭 total RNA の抽出

日本クレア社より購入した C57BL/6J 野生型マウス約 20 匹より有郭乳頭上皮およびその周辺上皮を、当研究室で自家繁殖した SKO マウス約 20 匹より有郭乳頭上皮を摘出し、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。得られた RNA の濃度・純度を吸光定量・Agilent 2100 Bioanalyzer・アガロースゲル電気泳動により評価した。

2.2 NA-Seq 法を用いた遺伝子発現解析

2.1 で抽出した野生型マウス有郭乳頭上皮および周辺上皮由来の total RNA をもとに、Takara 社に RNA-Seq 法による遺伝子発現解析を委託した。供与した total RNA をもとに、TruSeq RNA Sample Preparation Kit (イルミナ) を用いて以下の手順で DNA ライブラリーを作製した。total RNA 1.7 μg より PolyA⁺ RNA を単離し、150 bp 程度に断片化した後、この RNA を鋳型として二本鎖 cDNA を合成した。cDNA の両末端を平滑化・リン酸化処理した後、3'-dA 突出処理を行い、アダプターを連結した。この cDNA を鋳型として PCR (15 サイクル) を行った産物を精製したものを DNA ライブラリーとした。得られた DNA ライブラリーを Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (アジレント・テクノロジー) により評価した。DNA ライブラリーを鋳型として、Cluster Station および Cluster Generation Kit (イルミナ) を用いてクラスター形成を行い、Genome Analyzer IIx および Sequencing Kit (イルミナ) を用いてクラスターを形成する鋳型 DNA の塩基配列を決定した。

シーケンズ解析によって得られたリード配列から、データ解析ソフト「ERANGE 3.2」を用いて、以下のように各

遺伝子の発現量と新規遺伝子発現領域を求めた⁵⁾。まずシーケンス解析によって得られた配列に対して、Bowtie (version. 0.12.7)を用いて各リファレンス配列(UCSC)の染色体配列のうち random を含まないものに、UCSC の遺伝子モデル情報に基づいて抽出した splices 配列(隣り合った exon のそれぞれから 73 bp ずつ抽出し、結合した 146 bp の配列)を加えて作成し、アラインメントを行った。この際 mismatches を 3 塩基まで許容し、ベストマッチしたポジションが 30 ヶ所以上であったリードはマッピング不可能として対象より一旦外した。マッピング不可能なリードに対し、3' 末端より 1 塩基除去して再マッピングを、除去する長さを 1 塩基ずつ増やしながらリードが 50 塩基以下になるまで繰り返し行った。マッピング結果から各リード配列を、unique (一ヶ所のみマッピングされたリード)・multi (複数ヶ所にマッピングされたリード)・splices (splices 配列にマッピングされたリード)の 3 つに分類した。次にこれらの位置情報に基づき、各遺伝子のリード数を First-RPKM・Expanded-RPKM・Final-RPKM の 3 段階で正規化した RPKM (reads per kilobase of exon model per million mapped reads) 値を求めた。RPKM 値は以下の式で算出される。

$$RPKM = \frac{C}{NL} \times 10^9 \quad (1)$$

C はその遺伝子のリード数、 N はマッピングできた全リード数、 L はその遺伝子のエキソン長を示す。まずは既知の各遺伝子モデルに該当するuniqueリードの数をRefSeqごとに集計し、この数をもとに式(1)にてFirst-RPKMを算出した。次に「条件①First-RPKM算出の際に既知の遺伝子モデルに該当しなかったuniqueリードが少なくとも20個以上含まれ、②それら20個以上のリード間の距離が40 bp以内であり、③ゲノム上のリピート領域やlow complex領域を含まず、④既知の遺伝子モデルから20 kbp以上離れている」という4つの条件を満たすゲノム領域を新規遺伝子発現領域(RNAFAR)とし、「(1) 既知の各遺伝子モデルに該当するuniqueリード数」、「(2) 既知の各遺伝子モデルに該当するsplicesリード数」、「(3) RNAFARに該当するuniqueリード数」、

「(4) 既知遺伝子モデルの20 kbp以内であった新規領域に該当するuniqueリード数」の4つのリード数をもとに式(1)にてExpanded-RPKMを算出した。最後にmultiリードを「Expanded-RPKM + 1」の比率に基づいて各遺伝子に分配し、Expanded-RPKM算出時に用いた4つに「(5) 既知各遺伝子モデルおよびRNAFARに該当するmultiリード数」を含めた5つのリード数をもとに式(1)にてFinal-RPKMを算出した。各遺伝子のFinal-RPKMの値を、有郭乳頭上皮および周辺上皮における各遺伝子の発現量とした。

2. 3 cDNA clones

マウス TMC4 (mTMC4) の cDNA 配列は、Reference sequence (Refseq) No. NM_181820.2 を元に C57BL/6J マウスの CvP の cDNA を鋳型にクローニングをした(プライマーはそれぞれ Forward primer: 5'-GAATTCATGGAAGCCTGGGGCCAGTC-3', Reverse primer: 5'-GCGGCCGCTCAGGAAGTTCCATTCCTTGA G-3' を用いた)。マウス ANO1 とヒト TMC4 (hTMC4) の cDNA (mANO1: Refseq No. BC062959, hTMC4: Refseq No. BC025323) は Dharmacon 社 (Lafayette, CO, USA) より購入した。これらの cDNA のコーディング領域は、ISH 実験用にはプラスミドベクターである pBluescript SK (Stratagene 社, USA) の EcoRI and NotI サイト間にサブクローニングし、Whole-Cell patch-clamp 実験用にはプラスミドベクター pIRES2-AcGFP1 (Takara Bio 社, USA) の EcoRI and NotI サイト間にサブクローニングをした。

Whole-Cell patch-clamp 実験用に pIRES2-AcGFP1 の internal ribosome entry site と GFP 領域は切除した。サブクローニング後のこれら全ての配列は、Eurofins Genomics, Japan のゲノムシーケンサーによって確認した。

2. 4 Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR に用いる cDNA 断片は、C57BL/6J マウス (12-30 週齢 雄) の味蕾を含む CvP の上皮組織から抽出し得られた total RNA から得た。TMC1 から TMC8、及び味細胞に関する遺伝子マーカーとして用いた TRPM5 のプライマー情報、 T_m 値、アニーリング温度を Table. 1 に記載した。

Table. 1 Primers used for RT-PCR

Receptor	Accession No.		Length (bp)	Position	Primer sequence	Tm °C	Annealing °C
Tmc1	AF417579.1	F	497	90-112	5' CTTGAGACCAAAGAGGAAACGGA 3'	59.4	63
		R		586-566	GAACCATGTTGACGCCGTACA	59.9	
Tmc2	AF417581.1	F	395	1400-1419	CTCTGTTTGAACCATCGCT	55	58
		R		1794-1775	CCAGCAGTGATTCATGAACC	55.5	
Tmc3	AY236491.1	F	349	1411-1433	GTAGAAGAGACAAGCTTTCTGAC	55.6	68
		R		1759-1740	CATTGAATGCTGGCAGACAC	56.4	
Tmc4	NM_181820.2	F	453	386-405	GGACGCTGAAGAAAATTGGG	56.0	66
		R		838-819	CTGAGAACACTCGGTGACTG	56.5	
Tmc5	NM_001105252.1	F	393	369-388	CCAGCCAAGGACCATGCAAG	60.5	60
		R		761-741	ACCGTGTCCCAAATAACCC	59.6	
Tmc6	NM_145439.2	F	469	1427-1449	TGGTGGTCAGTGCCTTAACCTG	61.1	60
		R		1895-1873	ATCAGGCTGGCCTTCTTGATGTG	62.1	
Tmc7	NM_172476.4	F	312	115-135	CAAGAGCTGCCAAGCTATCGG	60.1	60
		R		426-405	CAGTTCAGGTGGGTTGTCATC	60.0	
Tmc8	AAP69879.1_1	F	313	963-983	CTTCTGGGCCACCAAGTACTC	59.3	60
		R		1275-1255	GTTCTCCAGCACTGGTAGTC	58.9	
Trpm5	NM_020277.2	F	455	2917-2936	CTGATCGCCATGTTTCAGCTA	59.3	63
		R		3352-3371	ATGACGGATACACTGGCTCC	61.0	

2. 5 *In situ* hybridization

In situ hybridization は、黒川らの方法⁶⁾に従って行った。野生型 C57BL/6J(B6)マウス(7 週齢以上のオスを日本クレアから購入)の舌組織を、クリオモルド 1 号(サクラファインテックジャパン株式会社)の中に O.C.T.コンパウンド(サクラファインテックジャパン株式会社)を用いて包埋し、液体窒素をより凍結した。凍結ブロックは、7 µm に薄切りし、MAS コートスライドグラス(松浪硝子工業株式会社)に貼り付け凍結切片を得た。

ジゴキシゲニン標識アンチセンス RNA を、DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostics 社)を用いて T3 RNA Polymerase (Stratagene 社)で *in vitro* 転写反応を行い合成した。その後、Alkaline Sizing Buffer (42 mM NaHCO₃, 63 mM Na₂CO₃)で 65°C, 55 分間処理し、加水分解反応によりアンチセンス RNA を 150 塩基程度に断片化し RNA プローブとした。

作製した有郭、茸状、葉状乳頭凍結切片に冷風を 15 分当てて切片を乾燥させた後、4% PFA / PBS 溶液中で 15 分間固定し、0.1% DEPC / PBS 溶液で 2 回洗浄した。プローブを浸透しやすくするために、Proteinase K (1 µg/ml, Invitrogen™)を含む TBS 溶液で 5 分間処理し、さらに 0.1% DEPC / PBS 溶液で洗浄した。その後、1.17% トリエタノールアミンと 0.25% 無水酢酸を含む DEPC 水に切片を浸し、アセチル化を行った。DEPC 水で洗浄後、切片の周りが乾く程度に乾燥させ、プレハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド, 5×SSC, Fish Sperm DNA (40 µg/ml)) に浸し、58°C, 湿箱中で 2 時間プレハイブリダイゼーション

を行った。その後、ハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド, 5×SSC, 5×Denhardt's 液, Yeast RNA (0.25 mg/ml), 1 mM DTT, Fish Sperm DNA (0.5 mg/ml)) に 85°C で 3 分間処理した。これを切片上に滴下し、パラフィルムを被せて 58°C で 1 晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、58°C の 5×SSC で 5 分間×2 回、0.2×SSC で 30 分間×2 回、洗浄した。TBS 溶液で 5 分間洗浄し、ブロッキング溶液 (0.1% Blocking Reagent (Roche Diagnostic 社) / TBS) に室温で 1 時間程度浸してブロッキングを行った後、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (0.1 µl/ml, Roche Diagnostic 社) を加えたブロッキング溶液中で室温 1 時間、抗原抗体反応を行った。TBS 溶液で 15 分間×3 回洗浄し、アルカリホスファターゼバッファー (100 mM Tris-HCl (pH9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) に 5 分間浸した。

その後、発色基質として NBT (Nitro-blue Tetrazolium) / BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase p-toluidine salt) 溶液 (Roche Diagnostics 社) を滴下して、室温で 1 晩発色反応を行った。アルカリホスファターゼバッファーで 5 分間洗浄して発色を止めた後、超純水に 5 分間浸した。これを乾燥させ、Fluoromount (Sigma 社) を用いてカバーガラスを掛け封入し、プレパラートを作製した。顕微鏡 BX51 (Olympus 社) で観察、冷却 CCD カメラ DP73 (Olympus 社) で画像を取得した。

2. 6 Whole-cell patch clamp 法

2. 6. 1 プラスミド及び発現タンパク質

mTMC4 を HEK293T 細胞に発現させるために、CMV プロモーターを持つプラスミドベクター pIRES2 -AcGFP1 (Clontech 社)を用いた。pIRES2-AcGFP1 の制限酵素 *Eco*R1 サイトと *Not*I の間に mTMC4 (accession NM_181820.2 の配列をマウスの有郭乳頭上皮由来の cDNA からクローニング)を挿入した発現コンストラクトを、1 µg/35 mm dish の割合で遺伝子導入を行った。遺伝子導入試薬には Lipofectamine® LTX Reagent with PLUS™ (Thermo Fisher 社)を用いた。また蛍光指示を目的として pEGFP-N1 (Clontech 社) 0.1 µg/35 mm を同時に導入した。

遺伝子導入した細胞を 18 mm 丸ガラス(松浪硝子工業株式会社)に播種し、再度インキュベーター内(37°C, CO₂ 濃度 5%)で培養した。全ての実験は、HEK293T 細胞に遺伝子導入後 24-36 時間の間に行った。

2. 6. 2 パッチクランプ法(Patch-clamp recording)

HEK293T 細胞を用いた whole cell patch-clamp recording において、増幅器として Axopatch 200B (Molecular Devices 社)を用いて、Digidata 1550 (Axon Instruments 社, Union City, CA, USA)からデジタルデータを取得した。取得したデータは、ソフトウェア pCLAMP 10.2 (Axon Instruments 社)を使用し解析を行った。

GD-1.5 芯入りガラス管(NARISHIGE 社)をマイクロピペットプラーP-97/IVF (SUTTER 社)を使って加工し、ガラス電極を作成した。電極抵抗は 3-5 MΩ になるように調整した。

測定は mTMC4 および hTMC4 発現細胞の膜電位を、-60 mV に固定し、細胞外液を順に灌流しながら行った。各細胞外液に対して 10 mV 間隔で -100 mV から +100 mV の step-pulse (400 ms) を与えて I-V 曲線を作成し、異なる細胞外液による mTMC4 および hTMC4 の電圧電流特性

を測定した。また細胞外液を瞬間的に置換する場合は、-60 mV に電圧固定した細胞に 5 秒毎に ± 100 mV のランブ波を 300 ms 与えながらマイクロフィル CMF28GxxL (WPI 社)を用いたパフュージョンによる液の置換を行った。全ての測定は、25°Cで行った。

パッチクランプ法において用いた細胞内液 (Pipette solution) の組成を Table. 2, 及び細胞外液 (Bath solutions) の組成を Table. 3 にそれぞれ示した。なお, Table. 3 には, Fig. 4 で用いた細胞外液の組成も記載した。

細胞内液 (Pipette solution) は、NMDG (N-Methyl-D-glucamine)を用いて pH7.4 に調整し、細胞内液は、浸透圧は約 270 mosmol / kg に調整した。

細胞外液 (Bath solutions) は、NMDG-OH を用いて pH7.4 に調整し、細胞外液のすべてについて、浸透圧を約 290 mosmol / kg に調整した。

Table. 2 Compositions of pipette solutions

Solution Electrolyte (mM)	NMDG-Cl	KCl
NMDG-Cl	134	-
KCl	-	134
BAPTA	5	5
HEPES	10	10

N-Methyl-D-glucamine (NMDG), O, O'-Bis (2-aminophenyl) ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetraacetic acid, tetrapotassium salt, hydrate (BAPTA), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES).

The pH of all pipette solution was adjusted to pH 7.2 with NMDG-OH. The osmotic pressure of all pipette solution was adjusted to approximately 270 mOsmol/kg.

Table. 3 Compositions of bath solutions

	NaCl (Control)	NMDG-Cl	67 mM NaCl, 67 mM Na- gluconate	34 mM NaCl, 34 mM Na- gluconate	Na-gluconate	NPPB	Na-glutamate	Asp-Na	Ionomycin
NaCl	134	-	67	34	-	134	-	-	134
Na-gluconate	-	-	67	100	134	-	-	-	-
KCl	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
HEPES	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D-Glucose	15	15	15	15	15	15	15	15	15
MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
CaCl ₂	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
NMDG-Cl	-	134	-	-	-	-	-	-	-
Na-glutamate	-	-	-	-	-	-	134	-	-
Asp-Na	-	-	-	-	-	-	-	134	-
NPPB	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-
Ionomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	0.005

N-Methyl-D-glucamine (NMDG), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB).

The pH of all bath solution was adjusted to pH 7.4 with NMDG-OH. The osmotic pressure of all bath solution was adjusted to approximately 295 mOsmol/kg

2. 7 Whole-cell patch clamp 法

Table. 3 に記載した細胞外液を加熱または冷却された標準浴溶液し、チャンバーに内に灌流した。チャンバー内の温度は、サーミスタプローブ (TA-29, Warner Instruments) とヒーターコントローラー (TC-346B, Warner Instruments) でモニタリングした。温度変化のシグナルについても Digidata 1550 (Axon Instruments) によってデジタル化し、ソフトウェア pCLAMP 10.2 (Axon Instruments) を用いてデータ処理を行った。

2. 8 データ解析

得られたデータの結果は、Mean ± SEM として表した。統計解析は、JMP または GraphPad Prism 6 を用いて解析した。多重検定は、Tukey-Kramer 検定を用いて行い $p < 0.05$ を有意とした。また、対数スケールで絶対温度 (T) の逆数として示した温度変化に対する TMC4 の +60 mV における電流値をプロットし、アレニウスプロットを作成した。

温度係数 (Q_{10}) は、オンラインプログラム (<http://www.physiologyweb.com>) を用いて任意の温度 ΔT に対して

$$Q_{\Delta T} = (Q_{10})^{\Delta T/10}$$

の式を用いて算出した。NPPB や ibuprofen など、各ブロッカーの阻害効果は、-60 mV (ENaC の場合) または

+60 mV (TMC4 の場合) における阻害剤投与前後の電流値を比率 $I_{\text{blocker}}/I_{\text{NaCl}}$ として算出した。各阻害剤の半阻害濃度 (IC_{50}) は、ソフトウェア GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いて算出した。

3. 研究結果

3. 1 味蕾特異的に発現する分子

野生型マウス有郭乳頭上皮および周辺上皮由来の total RNA をもとに RNA-Seq 法を用いた遺伝子発現解析を行い、各遺伝子の発現量データ (Final - RPKM) を得た。ダイナミックレンジは各サンプルにおいて全て 5 桁であった。以後各遺伝子の有郭乳頭上皮における発現量を CV、周辺上皮における発現量を Epi とする。

味蕾特異的に発現している遺伝子は以下の 2 つの条件を満たす。

1. 味蕾を多く含む有郭乳頭上皮 (CV) における発現量が高い。
2. 味蕾を含まない周辺上皮 (Epi) における発現量が低い。

よって既知の味蕾特異的発現遺伝子が満たす CV, Epi の条件を調べることで、同じ条件を満たす遺伝子を味蕾特異的発現遺伝子候補として絞り込むことが可能である。

RNA-Seq で得られた RPKM の値から Epi と CV で発現量の異なる分子を味蕾特異的発現分子として抽出した。まず、得られたデータから既知の味蕾特異的発現分子の発現量を抽出し、CV および Epi における発現量の比較を算出し、次世代シーケンス(NGS)のデータが周辺上皮と味蕾の発現分子を正しく抽出できるか否かを検証した (Table. 4)。

味覚受容体として報告のある *Tas2r107*, *Tas2r118*, *Pkd211*, *Tas2r107*, *Tas2r108*, *Tas2r120*, *Tas2r115*, *Tas2r138*, *Tas2r106*, *Tas2r102*, *Tas2r137*, *Tas2r105*, *Tas2r121*, *Tas2r134*, *Tas2r119*, *Tas2r117*, *Tas2r110*, *Tas2r104*, *Tas1r2*, *Tas2r126*, *Car4*, *Tas2r135*, *Pks113*, *Tas1r3*, *Tas1r1*, *Scnn1g*, 味覚シグナル伝達の下流分子 *Gng13*, *Calhm1*, *Gnat3*, *Trpm5*, *Gnb3*, *Gpr113*, *Plcb2*, *Gna14*, *Kcnk16*, タイプ別味細胞 (I, II, III型) マーカー遺伝子 *Kcnq1*, *Snap25*, *Entpd2*, その他味細胞に特異的に発現し、活動電位や分化に関わる分子 *Trcg1*, *Krt20*, *Kcnj1*, *Aadc*, *Foxa2*, *Krt8*, *Krt18*, *Krt19*, *Lrmp*, *Cxcl14*, *Skn-1*, *Ano1* 等今までに報告のある 51 分子の Epi 及び CV の RPKM 値および CV/Epi を Table. 4 に示した。

すべての遺伝子で CV における発現が Epi の発現量を上回っていた。

これらの 51 遺伝子の発現について横軸に Epi, 縦軸に CV の発現量を取りプロットしたのが Fig. 1 である。51 遺伝子はすべて $CV > 3$, $CV/Epi > 3$ の条件を満たすことから、味蕾特異的に発現する分子の必要条件として $C > 3$ かつ $CV/Epi > 3$ を設定し、この条件を満たす遺伝子 1120 個を候補分子とした。

次に 1120 の中から以下の 3 つの条件を満たす遺伝子抽出した。目的とする分子は、①味細胞の細胞膜上に発現すると予測されるため少なくとも 1 回以上の膜貫通領域を有すること、②今までに味蕾での発現が報告されていないこと、③CV における発現が 10 より大きいことを次の抽出の条件とした。味蕾における発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって確認するためには CV における発現量がある程度以上あることが必要である。膜貫通回数は、膜貫通領域予測ソフト「TMpred」を用いて求めた。その結果、以上の条件を満たす分子として 72 個が抽出された。

Table. 4 Expression value of genes (RPKM) expressed in taste buds specifically Circumvallate papillae (CV) and epithelium (Epi)

	CV	Epi	CV / Epi		CV	Epi	CV / Epi		CV	Epi	CV / Epi
<i>Gng13</i>	77.4	0	∞	<i>Tas2r105</i>	4.25	0	∞	<i>Krt19</i>	198	0.91	217
<i>Trcg1</i>	65.0	0	∞	<i>Tas2r121</i>	4.19	0	∞	<i>Tas2r126</i>	8.44	0.04	211
<i>Krt20</i>	26.8	0	∞	<i>Tas2r134</i>	4.12	0	∞	<i>Car4</i>	6.24	0.03	208
<i>Tas2r118</i>	23.5	0	∞	<i>Tas2r119</i>	3.92	0	∞	<i>Lrmp</i>	93.3	0.68	137
<i>Pkd211</i>	16.8	0	∞	<i>Tas2r117</i>	3.87	0	∞	<i>Tas2r135</i>	5.14	0.04	128
<i>Kcnq1</i>	14.3	0	∞	<i>Tas2r110</i>	3.69	0	∞	<i>Pkd113</i>	47.6	0.4	118
<i>Kcnj1</i>	13.5	0	∞	<i>Tas2r104</i>	3.56	0	∞	<i>Kcnh2</i>	5.15	0.07	73.6
<i>Snap25</i>	11.1	0	∞	<i>Calhm1</i>	3.03	0	∞	<i>Cxcl14</i>	113	1.57	72.2
<i>Tas2r107</i>	8.90	0	∞	<i>Gnat3</i>	127	0.03	4236	<i>Gna14</i>	17.1	0.26	65.8
<i>Aadc</i>	7.59	0	∞	<i>Trpm5</i>	37.8	0.01	3780	<i>Kcnk16</i>	4.61	0.12	38.4
<i>Tas2r108</i>	5.60	0	∞	<i>Tas1r2</i>	20.3	0.01	2029	<i>Tas1r3</i>	25.3	0.7	36.2
<i>Tas2r120</i>	5.16	0	∞	<i>Gnb3</i>	104	0.07	1487	<i>Krt7</i>	129	3.78	34.1
<i>Tas2r115</i>	5.06	0	∞	<i>Gpr113</i>	8.28	0.01	828	<i>Tas1r1</i>	3.69	0.16	23.1
<i>Tas2r138</i>	4.67	0	∞	<i>Plcb2</i>	70.0	0.12	583	<i>Entpd2</i>	54.8	4.53	12.1
<i>Tas2r106</i>	4.49	0	∞	<i>Foxa2</i>	18.8	0.06	314	<i>Skn-1</i>	19.5	3.49	5.59
<i>Tas2r102</i>	4.45	0	∞	<i>Krt8</i>	113	0.36	312	<i>Ano1</i>	13.3	3.27	4.06
<i>Tas2r137</i>	4.44	0	∞	<i>Krt18</i>	161	0.62	259	<i>Scnn1g</i>	6.14	1.74	3.53

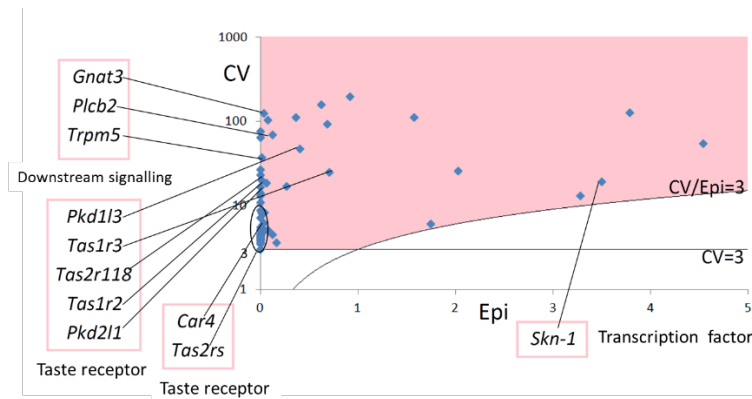


Fig. 1 Distribution of taste bud specific expressed genes

Fifty one taste bud specific expressing genes were plotted in the figure according to the expression value. Longitudinal axis shows the expression value at circumvallate papillae and horizontal axis is that of epithelium, respectively. Red area fulfills both $CV > 3$ and $CV/Epi > 3$. All 51 taste bud specific genes were plotted in this area. 1120 genes which fulfill $CV > 3$ or $CV/Epi > 3$ were selected as taste bud specific genes from 18033 genes whose expression at CV or Epi is at least more than zero.

3. 2 TMC family 分子の有郭乳頭及び周辺上皮における発現

有郭乳頭及び周辺上皮から total RNA を抽出し、NGS を用いて発現解析を行った。それぞれの発現量を示す RPKM について遊郭乳頭と周辺上皮での発現量を比較するために CvP/Epi の値を算出した。Fig. 2B に結果を示す。CvP/Epi の値が最も高いのは TMC5 であったが、周辺上皮の発現が、ほぼ0に近いために CvP/Epi の比率が極めて高い値を示した。既知の味細胞特的に発現することが報告されている3つのマーカー分子 Entpd2 (I型細胞), Plcb2 (II型細胞), Pkd113 (III型細胞)の RPKM は、

いずれも 50 近く或いはそれ以上であることから、味蕾特異的に発現し、機能する分子は、RPKM が 10 以上であることが必要と考えられる。これらの条件を満たす分子として TMC4 が候補として挙げられた。そこで、有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭を含む切片を用いて TMC4 の *in situ* hybridization を行った。各乳頭の舌における存在部位は Fig. 2A に示す。

その結果、舌の奥に存在する有郭乳頭と葉状乳頭で強い発現が見られたが、茸状乳頭では、ほとんど発現は見られなかった (Fig. 2C)。有郭乳頭上皮を用いた RT-PCR でも、TMC4 の明瞭なバンドが検出された (Fig. 3)。

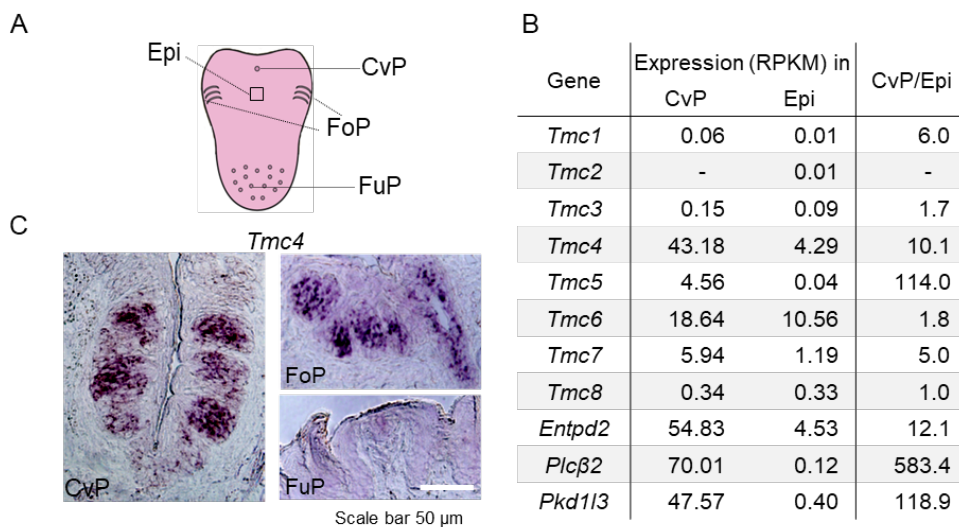


Fig. 2 The Tmc4 gene is predominantly expressed in the taste buds

A; The circumvallate papillae (CvP), the foliate papillae (FoP), the fungi for papillae (FuP), the epithelium (Epi). B; The next sequence data. C; *in situ* hybridization of Tmc4 mRNA.

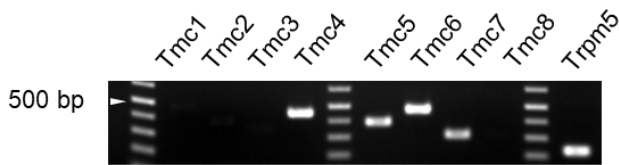


Fig. 3 RT-PCR of Tmc family members and Trpm5

3. 3 TMC4 を発現している HEK293T 細胞を用いた ホールセルパッチクランプ

機能未知である膜タンパク質TMC4の特性を解明するために、培養細胞を用いた Whole-cell patch-clamp 法を用いた。mTMC4 をトランスフェクトしたヒト胎児腎臓由来の HEK293T 細胞をステップパルスで刺激したところ、mTMC4 を発現していない mock 細胞と比較して陽性電位下で大きな外向き電流が観察された。細胞内液の陽イオンを K⁺から同濃度の正電荷を有する高分子 N-methyl D-glucamine (NMDG)に置換しても陽性電位、陰性電位で観察される TMC4 媒介電流は変化せず、逆転電位 (Er)も有意に変化しなかった (mean ± SEM (n = 4), KCl: -27.6 ± 0.9 mV, NMDG-Cl: -25.6 ± 4.0 mV)。このことから mTMC4 は K⁺による影響を受けないことが示唆された (Fig. 4A)。

次に、細胞外液の陽イオン組成の影響を調べたところ mTMC4 の媒介する陽性電位の外向き電流は、同濃度の NMDG-Cl, NaCl, 上皮性 Na チャネルの阻害剤であるアミロライドの影響を受けず、TMC4 媒介電流の逆転電位も変化しなかった (Fig. 4B)。一方で、強力なクロライドチャンネル阻害剤として報告されている 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB)を含む細胞外溶液に置換すると TMC4 の媒介する外向き電流が完全に消失した (Fig. 4B)。これらの結果より、mTMC4 は、陽イオンチャンネルでもアミロライドに感受性でもなく Cl⁻の流入に関与することを示唆された (Fig. 4B)。陰イオンによる外向き電流は、陽性電位下で細胞外から細胞内への陰イオンの流入を示唆している。

さらに、種々のクロライドチャンネル阻害剤やアニオンチャンネル阻害剤による mTMC4 媒介電流の影響について調査したところ mTMC4 の媒介電流は NPPB 以外にも細胞内 Ca²⁺感受性クロライドチャンネルの阻害剤である CaCC(inh)-A01⁷⁾によって強く阻害された (Fig. 4C)。フルオキシセチン塩酸塩とタンニン酸も mTMC4 媒介電流を抑制することが示唆された。一方で、フルオキシセチン塩酸塩や 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic (DIDS)は、mTMC4 媒介電流に対して強い抑制効果を示さなかった (Fig. 4C)。

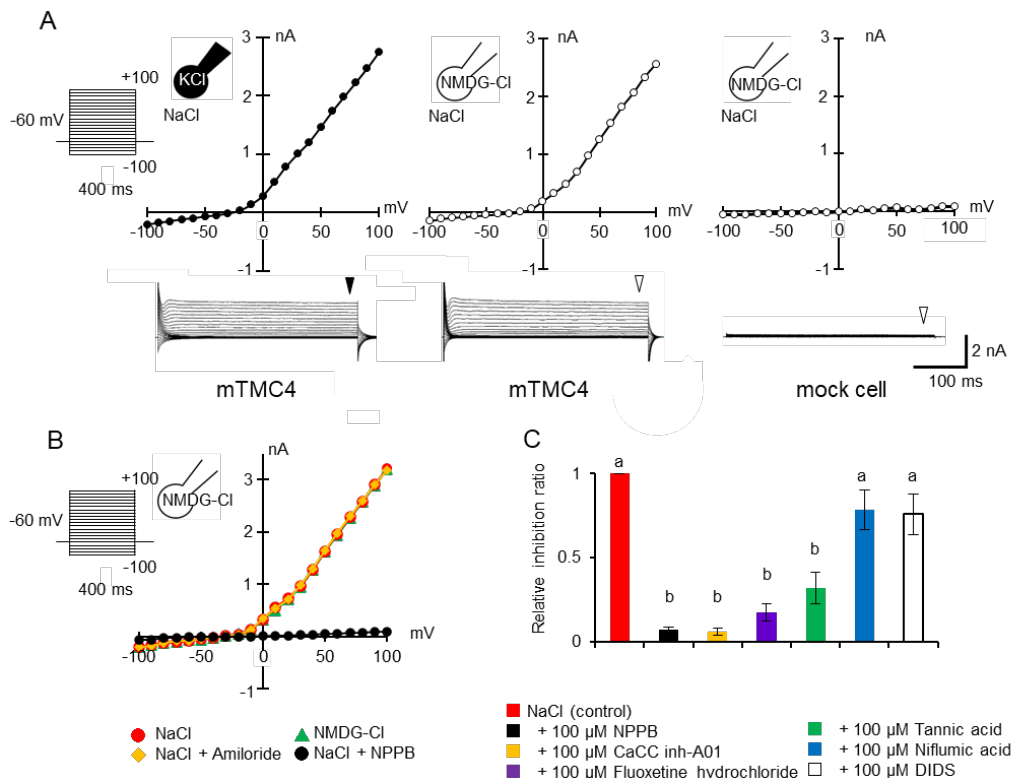


Fig. 4 Tmc4 functions as a novel anion channel

A; current-voltage (I-V) relationship with KCl (left), N-Methyl-D-glucamine (NMDG)-Cl (center), mock cells as negative control. B; I-V curves under different bath solutions in cation. C; Effect of several anion channel inhibitors.

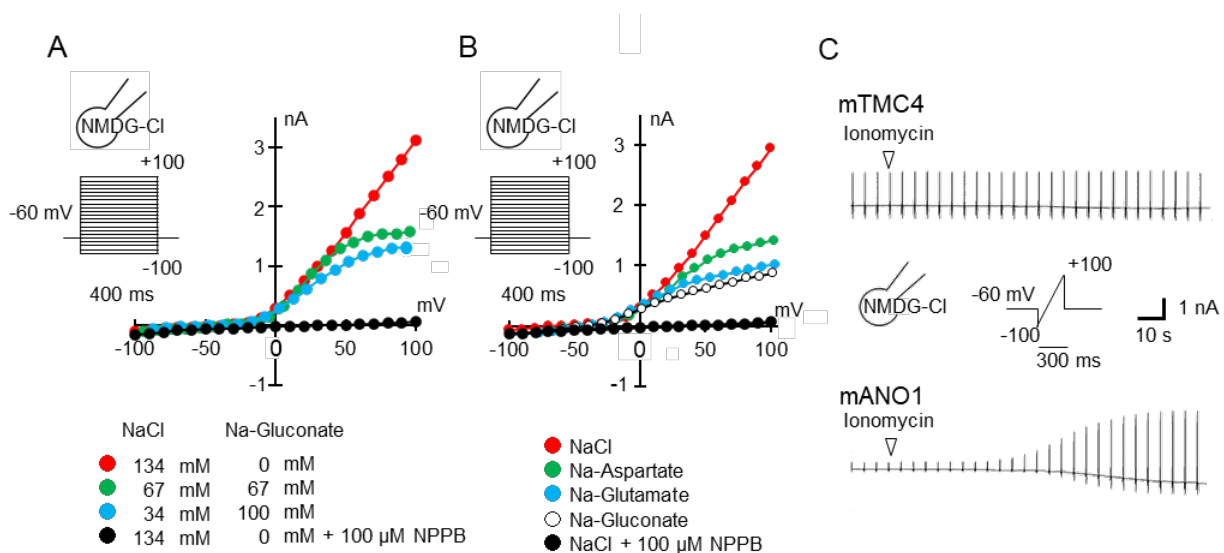


Fig. 5 Characterization of Tmc4

A, B; Tmc4 responds to some anions. C; Tmc4 activates without increase of intracellular calcium ion.

イオンチャネルは、濃度依存的に細胞膜内外のイオンを能動的に透過させる役割を持つ膜タンパク質である。このため mTMC4 が濃度依存的な陰イオン透過性を示すかどうかを確認するために、細胞外溶液に含まれる Cl⁻をイオンサイズの大きく透過が困難な gluconate イオンに段階的に置き換える検討を行った (Fig. 5A)。細胞外液の Cl⁻を gluconate イオンに置換した際の I-V 曲線から mTMC4 の媒介電流は、陰性電位でのわずかな内向き電流のために正確な反転電位を決定することは困難であったが、反転電位が大きく変化しなかった。一方で驚くべき事に陽性電位の外向き電流は、細胞外溶液に含まれる Cl⁻濃度の低下に従って低下が観察された (Fig. 5A)。続いて細胞外溶液に含まれる Cl⁻イオンを種々の同濃度の有機アニオンに置換した。細胞外溶液に含まれる Cl⁻を全て aspartate イオン, glutamate イオン, gluconate イオンに置換した場合でも mTMC4 の媒介する外向き電流は完全に消失しなかった (Fig. 5B)。このことから mTMC4 は細胞外の有機アニオンが透過可能であるほどの大きな孔を持つアニオンチャネルであることが示唆された。

続いて TMC4 の細胞内 Ca²⁺濃度依存性について調査した (Fig. 5C)。TMC ファミリーは、細胞内 Ca²⁺濃度上昇に応じて活性化を示すクロライドチャネルとして知られる ANO1 (TMEM16A) に代表されるアノクタミンファミリーとも遺伝配列的に関係があると報告されている⁸⁾。Ca²⁺を含まない細胞内液を用いて Whole-cell patch-clamp 法を用い

て mTMC4 と mANO1 発現細胞をランプパルスで刺激した電流を比較すると mANO1 発現細胞では、5 μM イオノマイシンの投与による細胞外液に含まれる Ca²⁺の流入によって mANO1 媒介電流が大きく増加する一方で、mTMC4 発現細胞では 5 μM イオノマイシンの投与前後の媒介電流は変化しなかった (Fig. 5C)。このことから mTMC4 には、細胞内 Ca²⁺濃度依存性がない事が示唆された。

3. 4 TMC4 媒介電流の温度に対する応答

まず、hTMC4 の温度の影響について実験を行った。whole-cell patch-clamp を用いて、hTMC4 によって媒介される外向き Cl⁻電流を測定した。これは、hTMC4 を発現する HEK293T 細胞に流入する Cl⁻を示す。各温度での外向き Cl⁻電流を比較した。25°Cでの外向きの Cl⁻電流と比較して 17°Cでの外向きの Cl⁻電流は、わずかに減少した。また、温度上昇に従って、この電流は増加し約 40°Cで最も高くなった。さらに高温条件で外向きの Cl⁻電流は大きくなると想定したが、温度が 47°Cに達する前に、外向きの Cl⁻電流は、大きく減少した (Fig. 6A)。

hTMC4 によって媒介される +60 mV の外向き Cl⁻電流の温度に対する影響を Tukey-Kramer 検定とアレニウスプロットを用いて解析した。Tukey-Kramer による多重検定の結果、外向き Cl⁻電流は、17°C, 25°C, 47°Cと比較して 40°Cで有意に増加した (Fig. 6B)。またアレニウスプロットは、hTMC4 が媒介する外向き Cl⁻電流が 42.6 ± 0.52°Cで

不活化されたことを示した。アレニウスプロットから計算された hTMC4 の Q_{10} は $Q_{10} = 1.48$ であり, hTMC4 に顕著な温度感受性がないことが示唆された (Fig. 6C)。温度に

対する非特異的応答は mock 細胞では観察されなかった (Fig. 6D, Fig. 6E)

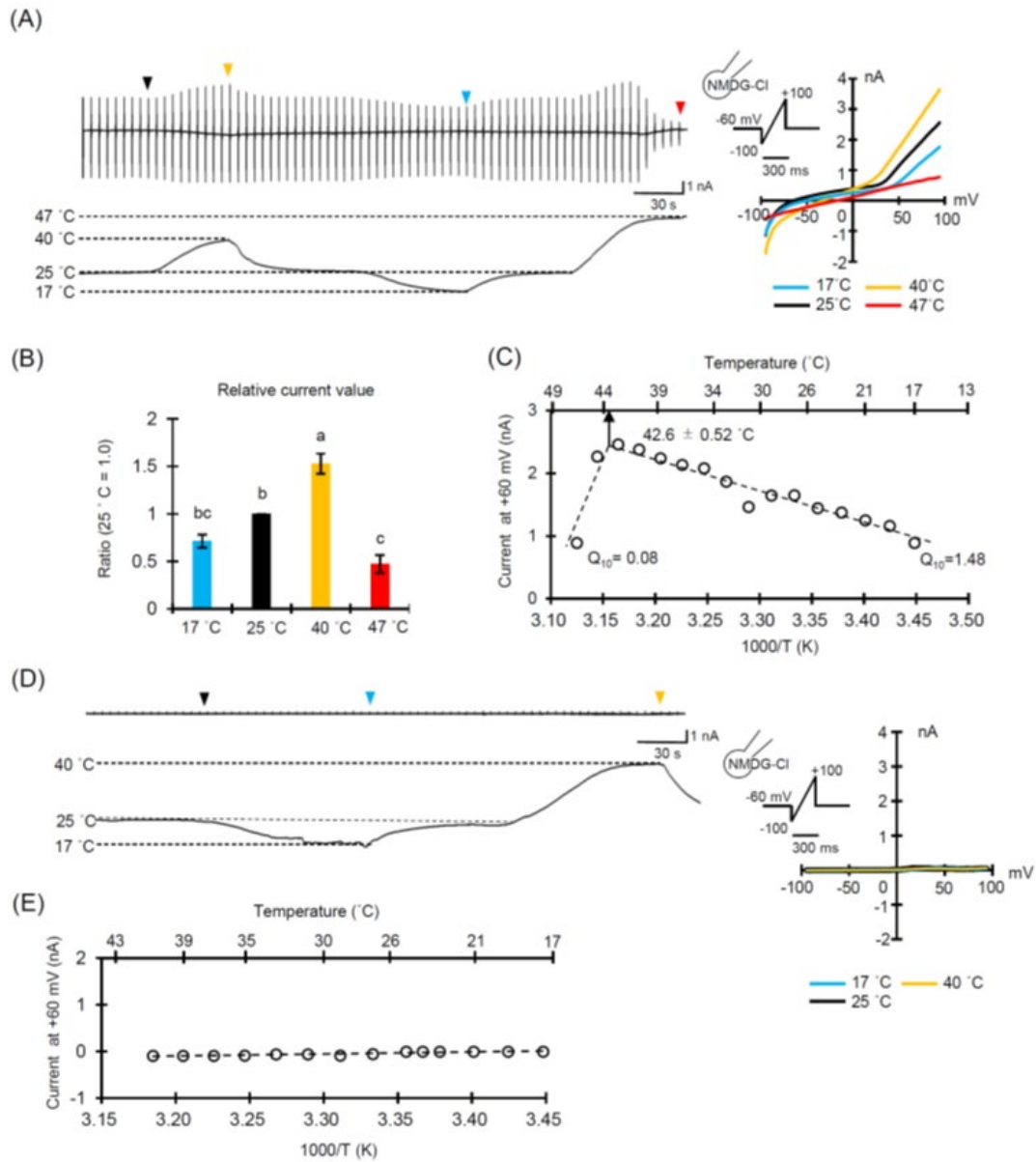


Fig. 6 hTMC4 is modulated by temperature.

(A) left; Time course of current recording of human TMC4 (hTMC4) and temperature recording. Currents evoked by ramp-pulses (300 ms duration, every 5 s from -60 to ±100 mV).

(A) right; The current-voltage (I-V) relations were selected from each arrow heads shown in the left trace.

(B); Temperature effects to hTMC4 were shown by $I_{X^{\circ}C} / I_{25^{\circ}C}$ at +60 mV. All values shown are mean ± SEM (n = 7).

Different letters show statistically significant differences in Tukey-Kramer test $p < 0.05$ (n = 7).

(C); An Arrhenius plot for heat-modulated current shows a clear flex point on temperature dependency (data in (A) were converted). The crossing point of the two linear-fitted lines (a flex point) was defined as a temperature threshold for activation. The Q_{10} value was calculated for each line.

(D); (left) Time course of current recording of mock cell and temperature recording. Currents evoked by ramp-pulses (300 ms duration, every 5 s from -60 to ±100 mV).

(right) The current-voltage (I-V) relations were selected from each arrow heads shown in the left trace.

(E); E. An Arrhenius plot for heat-modulated current could not show a clear flex point on temperature dependency (data in (D) were converted).

4. 考察

塩味受容・応答にかかわる塩化物イオンに応答する分子を探索するためにマウスの味蕾を含む有郭乳頭上皮および味蕾を含まない周辺上皮に発現する mRNA の NGS による網羅的解析を行った。既知の味覚関連遺伝子 (51 分子) について発現量 (RPKM) を調べたところ、すべての分子で味蕾を含む部位の mRNA 発現量は、周辺上皮の発現量より大きく、構築したライブラリーが適正であることが示された。以下、Cl⁻の受容に関わる分子の抽出に本ライブラリーを利用することが可能であり、これらの結果から、目的とする分子が有する条件を設定し、次のステージ (*in situ* hybridization) の解析候補分子を得ることが出来た。

4.1 TMC4 は電位依存性クロライドチャンネルである

TMC4 は、transmembrane channel-like (TMC) ファミリーの一員である。TMC ファミリーは、8-10 個の膜貫通領域を持つと予想されること、C 末端近くの 3 つの膜貫通配列を含む TMC ドメインと呼ばれる比較的保存された配列を持つことが報告されている⁹⁾。哺乳類における TMC ファミリーは、TMC1 から TMC8 の 8 つの分子があり⁹⁾、これらの 8 つのメンバーのうち、TMC1 と TMC2 についての研究が進んでいる。TMC1 が発現する内耳細胞の変異は難聴の原因の 1 つであり¹⁰⁾、TMC2 は、Ca²⁺を介した振動刺激による聴覚受容に関与することが報告されている¹¹⁾。マウス TMC1 および TMC2 は、これらのホモログ遺伝子であるアオウミガメ (*CmTMC1*) およびセキセイインコ (*MuTMC2*) の分子機能解析から、機械感受性カチオンチャンネルとしてすでに定義されている¹²⁾。他の TMC 分子に関しては、TMC6 (EVER1) および TMC8 (EVER2) の変異が疣冗長表皮異形成症に関係している事や¹³⁾、TMC5 発現上昇が膵臓癌の促進に関与する事¹⁴⁾、膵臓癌の発症時に TMC7 の発現上昇が確認されることが報告されている¹⁵⁾など TMC ファミリーに属する多くの遺伝子は生理学的に重要な役割を持つと考えられる。しかしながら、TMC ファミリーの多くは、遺伝子発現変化に関する報告であり、これまで TMC メンバーの分子特性は TMC1 と TMC2 を除いては不明であった。

本研究では、TMC4 が塩味受容に関与する電位依存性アニオンチャンネルであることを明らかにした。TMC4 は TMC ファミリーに属する分子の中で初めてのアニオンチャンネルである。機械感受性カチオンチャンネルである TMC1、

TMC2 の構造解析からカチオンチャンネルとして重要な 3 つのアミノ酸 G520, M521, D672 は、TMC4 では全て保存されていなかった¹²⁾。また TMC ファミリーは、TMEM16A としても知られる ANO1 が属するアノクタミンファミリーと遺伝子配列が類似しているため、アノクタミンスーパーファミリーとしても分類されている¹⁶⁾。ANO1 から ANO10 の 10 種報告されている哺乳類のアノクタミンファミリーのうち、ANO1 および ANO2 は細胞内 Ca²⁺感受性 Cl⁻チャンネルであることが報告されている¹⁷⁾。一方で、最近 ANO4, ANO6, および ANO9 がアニオンチャンネルではなく、カチオンチャンネルであることが報告されている¹⁸⁾。これらアノクタミンファミリーの場合を考慮すると、陰イオンチャンネルと陽イオンチャンネルが同一ファミリーに属することは、TMC ファミリーに限られたことではないと考えられる。

さらに、mTMC4 の介する Cl⁻電流は、NPPB だけでなく ANO1 および ANO2 の特定の阻害剤である CaCC inh-A01 によって阻害された⁷⁾。このことから TMC4 は活性化部位の ANO1 と共通の構造を持っていることが考えられる。一方で、細胞内の Ca²⁺濃度上昇によって活性化するクロライドチャンネルと知られる mANO1 とは対照的に、mTMC4 は細胞内 Ca²⁺の増加なしに活性化された (Fig. 4C)。mANO1 の Ca²⁺結合部位は、mANO1 の N646, E650, E698, E701, E730, E734 であると報告されている¹⁹⁾。しかしながら mTMC4 の配列と mANO1 の配列と比較すると、mANO1 の E698 に対応する部位として mTMC4 の E513 の 1 残基のみが保存されているものの、他の 5 つの残基は保存されていなかった。このことは、mTMC4 が細胞内 Ca²⁺に感受性がないことと関連すると考えられる。

さらに、mTMC4 の明確な特徴は、グルコン酸イオンなどの大きなイオンサイズの陰イオンも mTMC4 への透過性を持つことである (Fig. 4A,B)。この幅広い陰イオン透過性について、Polyethylene glycol (PEG) などを用いて今後、ポアサイズの確認を行うことが必要である。以上のことから、TMC4 は新しい電位依存性アニオンチャンネルであることが示された。

4.2 塩味の受容における TMC4 の生理学的役割

本研究では、TMC4 が新規電位依存性アニオンチャンネルであり、TMC4 が塩味受容に関与している可能性を報告した。これまでナトリウムチャンネルである ENaC $\alpha\beta\gamma$ が Na⁺の受容を通して低濃度の塩味を受容する事が報告されていたが、高濃度の塩味を受容する分子は、Na⁺, Cl⁻

の受容に関わらず報告されていなかった。グルコン酸 Na, 酢酸 Na 等のように異なる陰イオンをもつ Na 塩は、げっ歯類の味覚神経応答だけでなく、ヒトの官能評価においても高濃度の塩味受容に影響を与えることが報告されており、この影響は“アニオン効果”と呼ばれている。アニオン効果の特徴として、Na 塩を構成する陰イオンのサイズの違いによって塩味の強さが異なり、イオンサイズの大きいものは塩味が弱く感じられるという事が挙げられる²⁰⁾。近年、Roebber らは、味細胞の頂端に陰イオンを受容する分子が存在し、この分子がアニオン効果を解明するための鍵であると報告した²¹⁾。しかしながら、その具体的な分子については不明であった。興味深いことに、細胞外から細胞内への陰イオンの流入を示す陽性電位での TMC4 媒介電流は、陰イオンの分子サイズによって変化する (Fig. 4B)。これは、TMC4 が陰イオンの分子サイズが大きくなるにつれて塩分強度が減少する“アニオン効果”を説明しうる可能性が考えられる。

塩味受容は、アミロライド感受性の違いに応じて、LS (低濃度の塩味受容)と HS (高濃度の塩味受容)の2つに大別される¹⁾。これまでにマウスを用いた塩味受容研究から LS ではアミロライド感受性の上皮性ナトリウムチャンネルである ENaCaβγ が報告されている。HS では、アミロライド非感受性に関連する非選択性陽イオンである TRPV1 の味覚変異体 (TRPV1t) が受容担うと報告されている²²⁾。アミロライドはヒトの塩味受容に、強い影響を与えない。また一般に、塩味を呈する多くの食品 (スープ、加工肉、ソースなど) には、約 1.0~5.0% (w/v) の NaCl が含まれている。したがって、アミロライド非感受性の HS 成分は、ヒトの塩味受容にとって重要である可能性が高い。

4. 3 hTMC4 媒介電流の温度に対する応答

温度に対する影響に関しては、TMC4 を介した Cl⁻電流は約 40°C で増加し、アレニウスプロットから算出した TMC4 の温度係数は $Q_{10} = 1.48$ であった。一般に温度係数 Q_{10} は、温度が 10°C 上昇した時の反応速度が何倍になるかを示す係数であり、4 未満の場合は特に温度感受性があるとは考えられず、 Q_{10} が 7 を超える場合に温度感受性があると考えられる。このことから TMC4 の媒介電流は、温度によって確かに変化した、変化量が小さく明確な温度感受性を持たないことが示された (Fig. 6)。

これまでヒトの塩味感受性が最も高まるのは、体温に近い温度またはそれ以下の温度である 22-37°C または 27-32°C であると報告されている^{23, 24)}。その理由として、塩味受容に関わると考えられている ENaCaβγ ($Q_{10} = 1.64$) は低温である約 6°C 活性化し、TRPV1 ($Q_{10} = 18.3$) が高温 43°C 以上で活性化するため、その中間にあたる体温で塩味受容が高まるのではないかと仮説がある²⁵⁾。TMC4 は、約 40°C で最も活性化することから、3 つの分子の中では、最も体温に近い温度であるため温度変化が塩味受容に影響するメカニズムに関する更なる理解に役立つ。

5. 今後の課題

今回、クロライドチャンネルを受容する分子 TMC4 が塩味の受容に関わっている可能性が示された。クロライドイオンを受容する分子は初めての発見で有り、今後さらに、TMC4 の分子的性質や、*in vivo* での働きを解析し、におい・香り成分と塩味の関係性について、TMC4 を用いた系による香辛料の応答性を解析する予定である。

TMC4 が、主要な社会問題である塩分の過剰摂取を解決する新しいツールとなるかどうかの検証を進める必要がある。

6. 文献

1. Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*. 464(7286), 297-301.
2. Rehnberg BG, MacKinnon BI, Hettinger TP, Frank ME. (1993) Anion modulation of taste responses in sodium-sensitive neurons of the hamster chorda tympani nerve. *J Gen. Physiol.* 101, 453-65.
3. Elliott EJ, Simon SA. (1990) The anion in salt taste: a possible role for paracellular pathways. *Brain Res.* 535, 9-17.
4. Kasahara Y, Narukawa M, Ishimaru Y, Kanda S, Umatani C, Takayama Y, Tominaga M, Oka Y, Kondo K, Kondo T, Takeuchi A, Misaka T, Abe K, Asakura T. "TMC4 is a novel chloride channel involved in high-concentration salt taste sensation" *J. Physiol. Sci.* 71.1 (2021): 1-14.
5. Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods.* 5, 621-8.

6. Kurokawa A, Narukawa M, Ohmoto M, Yoshimoto J, Abe K, Misaka T. (2015) Expression of the synaptic exocytosis-regulating molecule complexin 2 in taste buds and its participation in peripheral taste transduction. *J Neurochem.* 133, 806-14.
7. Namkung W, Phuan PW, Verkman AS. (2011) TMEM16A inhibitors reveal TMEM16A as a minor component of calcium-activated chloride channel conductance in airway and intestinal epithelial cells. *J Biol. Chem.* 286, 2365-74.
8. Hahn Y, Kim DS, Pastan IH, Lee B. (2009) Anoctamin and transmembrane channel-like proteins are evolutionarily related. *Int. J Mol. Med.* 24, 51-5.
9. Yue X, Sheng Y, Kang L, Xiao R. (2019) Distinct functions of TMC channels: a comparative overview. *Cell Mol. Life Sci.* 76, 4221-32.
10. Liu S, Wang S, Zou L, Li J, Song C, Chen J, Hu Q, Liu L, Huang P, Xiong W. (2019) TMC1 is an essential component of a leak channel that modulates tonotopy and excitability of auditory hair cells in mice. *Elife* 8, e47441
11. Pan B, Geleoc GS, Asai Y, Horwitz GC, Kurima K, Ishikawa K, Kawashima Y, Griffith AJ, Holt JR. (2013) TMC1 and TMC2 are components of the mechanotransduction channel in hair cells of the mammalian inner ear. *Neuron* 79, 504-15.
12. Jia Y, Zhao Y, Kusakizako T, Wang Y, Pan C, Zhang Y, Nureki O, Hattori M, Yan Z. (2020) TMC1 and TMC2 Proteins Are Pore-Forming Subunits of Mechanosensitive Ion Channels. *Neuron* 105, 310-321.
13. Keresztes G, Mutai H, Heller S. (2003) TMC and EVER genes belong to a larger novel family, the TMC gene family encoding transmembrane proteins. *BMC Genomics* 4 (1), 1-11.
14. Zhang W, Wang S, Zhang X, Liu K, Song J, Leng X, Luo R, Ran L. (2019) Transmembrane Channel-Like 5 (TMC5) promotes prostate cancer cell proliferation through cell cycle regulation. *Biochimie* 165, 115-22.
15. Cheng Y, Wang K, Geng L, Sun J, Xu W, Liu D, Gong S, Zhu Y. (2019) Identification of candidate diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic carcinoma. *E Bio Medicine* 40, 382-93.
16. Medrano-Soto A, Moreno-Hagelsieb G, McLaughlin D, Ye ZS, Hendaro KJ, Saier MH, Jr. (2018) Bioinformatic characterization of the Anoctamin Superfamily of Ca²⁺-activated ion channels and lipid scramblases. *PLoS One* 13, e0192851.
17. Stöhr H, Heisig JB, Benz PM, Schoberl S, Milenkovic VM, Strauss O, Aartsen WM, Wijnholds J, Weber BH, Schulz HL. (2009) TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals. *J Neurosci.* 29, 6809-18.
18. Reichhart N, Schoberl S, Keckeis S, Alfaar AS, Roubeix C, Cordes M, Crespo-Garcia S, Haeckel A, Kociok N, Fockler R, Fels G, Mataruga A, Rauh R, Milenkovic VM, Zuhlke K, Klussmann E, Schellenberger E, Strauss O. (2019) Anoctamin-4 is a bona fide Ca²⁺-dependent non-selective cation channel. *Sci. Rep* 9 (1), 1-11.
19. Kamaledin MA. (2018) Molecular, biophysical, and pharmacological properties of calcium-activated chloride channels. *J Cell Physiol.* 233, 787-798.
20. Sinopoli DA, Lawless HT. (2012) Taste properties of potassium chloride alone and in mixtures with sodium chloride using a check-all-that-apply method. *J Food Sci.* 77, S319-22.
21. Roebber JK, Roper SD, Chaudhari N (2019) The Role of the Anion in Salt (NaCl) Detection by Mouse Taste Buds. *J Neurosci.* 39, 6224-6232.
22. Lyall V, Heck GL, Vinnikova AK, Ghosh S, Phan THT, Alam RI, et al. The mammalian amiloride-insensitive non-specific salt taste receptor is a vanilloid receptor-1 variant. *J. Physiol.* 2004 Jul 1; 558 (Pt 1):147-59.
23. Pangborn RM, Chrisp RB, Bertolero LL. Gustatory, salivary, and oral thermal responses to solutions of sodium chloride at four temperatures. *Percept Psychophys.* 1970 Mar 1; 8(2): 69-75.
24. Talavera K, Ninomiya Y, Winkel C, Voets T, Nilius B. Influence of temperature on taste perception. *Cell Mol. Life Sci.* 2006 Dec 18; 64(4): 377.
- 25.

26. Keast RSJ, Breslin PAS. An overview of binary taste–taste interactions. *Food Qual. Prefer.* 2003 Mar 1; 14(2): 111–24.

Role of Chloride Ion Salty Taste Response and Molecular Elucidation

Tomiko Asakura

Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo

Summary

Both sodium ion and chloride ion are required for the occurrence of salty taste, but the molecule that receive chloride ion has not been clarified. In recent years, an excessive sodium intake may have an adverse effect on health. It is necessary to elucidate the mechanism of salty taste perception in order to solve this problem. Saltiness is preferred at low concentrations, whereas it is repelled at high concentration. In rodents, ENaCa $\beta\gamma$ has been reported as a molecule that responds to low concentrations of NaCl, but the molecule that responds to high concentration of NaCl has not been clarified. Therefore, in this study, we tried to screen new molecules that respond to salty taste, especially those involved in Cl⁻ reception. Total RNA was extracted from taste buds containing the circumvallate papilla and the surrounding epithelium. The mRNA expressed in each sample was comprehensively analyzed using a next-generation sequencer. Based on the expression levels of known taste-related molecules, 72 molecules were extracted as new taste receptor candidates.

From these results, we found the strong expression of transmembrane channel-like 4 (TMC4) in the circumvallate and foliate papillae projected to the glossopharyngeal nerve, mediating a high-concentration of NaCl. Electrophysiological analysis using HEK293T cells revealed that TMC4 was a voltage-dependent Cl⁻ channel and the consequent currents were completely inhibited by NPPB, an anion channel blocker. TMC4 allowed permeation of organic anions including gluconate, but their current amplitudes at positive potentials were less than that of Cl⁻.

食品中匂い成分による食塩摂取量の調節に関する研究

長田 和実¹, 細野 朗¹, 大崎 雄介²

¹ 日本大学生物資源科学部, ² 東北大学大学院農学研究科

概要 本研究は、食品中の匂い成分を分離同定し、マウスに匂いをかがせて適塩効来を発抑するか否かを検討し、そのメカニズムを解明することを目的とする。嗅覚情報は辺縁系などに直接入力し、情動の発現、視床下部ホルモン分泌、自律神経調節などに強力に作用するため、生得的、効果的な塩味調節作用を発揮する可能性がある。食品の匂いが塩味調節作用を持つことを示唆する研究は多いが、活性物質の同定に至った研究は少なく、減塩を促進する匂い物質の解明が求められている。本研究は食品中の匂い成分を用いた食塩摂取調節に新たな可能性を追求するものである。

まず、気相中の匂い成分を簡便正確に定量する方法を開発し (Osada, et.al. 2021: Biosci Biotechnol Biochem. 2021;85(12):2343-51.), その技術を基に食品中の揮発性成分を一定の濃度で継続的にマウスに暴露の評価系を確立し、マウスの二瓶選択実験を行った。自作の匂い発生器と二瓶選択法を用いて C57BL/6J マウスに対して水と 0.15 M NaCl 水溶液の 24 時間の摂取率を計測し食品中におい成分の適塩作用を確認した。その結果、オレガノ (Oregano) 及びその活性成分であるカルバクロール (Carvacrol), 再仕込み醤油, ベーコン燻煙臭, などに活性があり, 中でもオレガノの活性は高かった。

以下, Oregano (Carvacrol) の顕著な適塩作用に着目し, 適塩効果の濃度依存性, 雌雄差, について研究した。Oregano の匂いによりマウスの食塩水嗜好率の低下は雌雄共に誘起された。一方 Carvacrol 単独の場合, 雌では適塩作用を誘起したが, 雄では弱かった。また 24 時間の食塩水摂取量の抑制は濃度依存的に起こったが, 適塩活性を発揮する閾値は雌の方が低かった。したがって Oregano の効果は雌雄同様に見えるが Carvacrol 単独では雄ではやや活性が低いことから, Oregano 中の他の揮発性成分との混合臭が効果を発揮している可能性が示唆された。

これらの行動学的研究の結果から, Carvacrol を含む揮発性活性物質が嗅覚系を刺激し, 食塩消費量の減少を誘導しているとの仮説を立て, 検証するために, ZnSO₄ を鼻腔に注入した嗅覚障害モデルマウスを作製し, 上記行動実験に供した。嗅覚障害マウスは Oregano の揮発性成分に依然として反応し, 食塩摂取量を有意に減少させたことから, 嗅覚系だけではなく別のメカニズムも適塩の情報伝達に関与している可能性が示唆された。今後は, どのような受容体が Carvacrol を感知するのかを明らかにし, Oregano の揮発成分が脳に伝達されるメカニズムを解明していく必要がある。

最後に, 免疫組織化学的手法を用いて, Oregano 揮発成分が塩分の食欲を司る脳領域に及ぼす影響を探った。その結果, Oregano 揮発成分が塩分摂取の中枢である分界条床核腹側部 (VST) を男女ともに有意に刺激することが確認された。これらの結果は, Oregano の揮発成分が未知の受容体を刺激し, VST への塩分の食欲低下を誘導していることを示唆している。

1. 序論

食塩は血液中に最も多く含まれる電解質であり, 電解質浸透圧の形成, 細胞内外の電位差の形成と活動電位の発生, 栄養成分の共輸送などの生理機能に直接関与

する栄養素である。食塩はカルシウムのような明確な体内プールを持たず, 外界からの摂取に依存しており, 近代社会においては摂取過剰が問題となることが多い。複数のメタ解析の報告では食塩の過剰摂取は脳卒中, 心血管疾

患、高血圧、腎疾患、あるいは消化器官のガンなどの慢性疾患の原因となる(Cutler et al. 1997, Strazzullo et al. 2009)。そのため、イギリスの「医療面から見た食品栄養指針委員会(COMA)」では成人 1 日の食塩摂取量を 6 g、世界健康機関(WHO)の勧告では同じく 5 g とされているにもかかわらず、多くのアジア・ヨーロッパの国々では 12 g/day 以上の食塩を摂取しており(Strazzullo et al. 2009)食塩の摂取過剰が現在でも グローバルかつ深刻な栄養学的課題である。

欧米では食塩摂取の 75%程度は加工食品あるいはレストランの食品に由来すると言われている(He et al. 2010, Mattes and Donnelly 1991)。食品業界では減塩を試みるが、多くの場合加工食品の需要も低下させる(Breslin and Beauchamp 1997)。食の魅力を維持したまま減塩を行うために KCl による代替塩の使用(Sinopoli and Lawless 2012)、グルタミン酸ナトリウムの使用(Rotola-Pukkila et al. 2015)、食塩の顆粒の大きさや濃度分布の工夫、カプサイシンなどのスパイスによる塩味抑制(Osada et al. 1997)、スピランツール及びアルギニン塩酸塩(Xu et al. 2019)等いくつかの対策が提唱されている。

匂い成分は嗅覚受容体(ヒトではおよそ 400 種類、マウスでは 1000 種類以上)に結合し、受容器電位を発生させ、その情報が二次ニューロンである僧帽細胞等に伝えられる。匂い情報は他の感覚とは異なり、古い皮質である嗅上皮、扁桃体、視床下部、海馬などに入力した後に大脳嗅覚野に終止する。嗅覚は情動、本能に加え視床下部ホルモンや自律神経機能に基づくホメオスタシスなどに直接作用するため、生得的な減塩効果が期待できる。しかしながら、減塩の原因となる匂い物質はほとんど同定されていない。

匂い成分による食塩の摂取調節は複数報告されている。例えば、イワシの香りやブイヨンの香り(Batenburg and Velden 2011)などがヒトの塩味強度を高め、摂取量を 25%程度低下させるという報告がある。一方、チーズの風味のモデルを用いた実験では風味成分の味覚調節作用は限定的であり、匂いの質によって結果は異なり、特定の活性成分の同定など解決すべき問題が残されている。最近、Onuma らは塩水の味に対する MSG あるいは醤油の匂いの影響を官能評価と近赤外スペクトル分光イメージ分析を行い、醤油の匂いは塩水の旨味と好ましさを有意に高め、

前頭弁蓋部などの血流量の上昇を報告し、醤油の匂いによる減塩調節の可能性を中枢レベルの評価系で示した(Onuma et al. 2018)。一方、Malik らは、人とマウスの味細胞に嗅覚受容体とその細胞内情報伝達系が存在することを突き止めており、中枢のみならず口腔内での味と匂いの情報交換の可能性を示している(Malik et al. 2019)。

本研究ではまず、塩味が印象的な食品の匂い成分に着目し、オレガノ、再仕込み醤油、ベーコン燻煙臭などの匂いについて自作のプラスチックシャーレを利用した匂い発生器及び二瓶選択法を用いて C57BL/6J マウスに対する水と 0.15 M NaCl 水溶液の 24 時間の摂取率を計測し複数の食品中において成分のナトリウム摂取調節作用を確認した。中でもオレガノの匂い成分には最も有意水準の高いナトリウム摂取抑制作用を見出したので、オレガノに特に着目して動物行動に及ぼす詳細な特徴と有効成分の同定について検討しその適塩作用を評価した。さらにオレガノの匂いの塩味抑制作用の作用メカニズムについて中枢及び末梢レベルで検討し、その本質に迫る結果を得ることが出来た。以下にその内容を報告する。

2. 実験方法

2.1 オレガノ中揮発性成分のプロフィール解析

乾燥オレガノの匂いを構成する揮発性成分をヘッドスペース固相マイクロ抽出法【HS-SPME (DVB/CAR/PDMS, Stableflex, 57348-U, Supelco PA, USA)】及び GC-MS (Parvum2 system, Shimadzu, Japan)で分析した。

ガスクロマトグラフには Restek Stabilwax Column (30 m × 0.32 μm × 0.5 μm; Restek, PA, USA)を装着した。

粉碎したオレガノ(1.0 mg)を milliQ 水 10 ml 懸濁液とし、10 μL を 4 ml amber vial に注入し、38°C で 30 分間 HS-SPME (ヘッドスペース固相マイクロ抽出法)を用いて揮発性成分のプロフィール解析を行った(表 1)。

2.2 塩摂取行動実験

自作の匂い発生器を用いて C57BL/6J マウスに対する水と 0.15 M NaCl 水溶液の 24 時間の摂取率を二瓶選択法により計測し、食品中匂い成分がナトリウム摂取調節作用に与える影響を検討した。匂い発生器は直径 35 mm のプラスチックシャーレの底面に直径 4 mm の穴を開けたものを作成した(図 1)。

表 1: オレガノ揮発性成分の分析結果

Peak#	化合物名	溶出時間	ピーク面積	%ピーク面積	SEM
1	Silanol, trimethyl-	6.2	1467216	6.41	4.06
2	1-Butanol	9.1	58015	0.25	0.06
3	Ethanol, 2-ethoxy-	10.6	60799	0.27	0.10
4	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	11.4	547061	2.39	0.41
5	Propanoic acid, 3-hydroxy-, hydrazide	12.2	9968	0.04	0.03
6	Acetic acid, hydrazide	12.5	15643	0.07	0.06
7	1,3-Dioxolane, 2-heptyl-	12.8	8922	0.04	0.03
8	Acetic acid	14.3	213658	0.93	0.45
9	Linalool	15.4	465894	2.04	0.40
10	Ethanol, 2-(2-methoxyethoxy)-	16.0	143978	0.63	0.95
11	Ethanol, 2-(2-ethoxyethoxy)-	16.4	347786	1.52	0.46
12	Butanoic acid	16.5	44522	0.19	0.05
13	Butyrolactone	16.8	55930	0.24	0.10
14	2,4,4-trimethylhexane	17.3	61701	0.27	0.07
15	α -terpineol	17.4	35793	0.16	0.14
16	Borneol	17.5	211991	0.93	0.65
17	Pentanoic acid	17.8	53466	0.23	0.13
18	Carvone	17.9	48777	0.21	0.03
19	Formamide, N,N-dibutyl-	18.3	69020	0.30	0.17
20	Ethanol, 2-(2-butoxyethoxy)-	18.5	86730	0.38	0.40
21	Hexanoic acid	19.0	373305	1.63	1.74
22	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	19.3	1389516	6.07	4.65
23	2-Butanol, 3,3'-oxybis-	19.5	57353	0.25	0.15
24	2-tetrahydroxyfuran	19.6	490992	2.14	0.94
25	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-oxopropyl)phenol	19.8	69057	0.30	0.04
26	Ethanol, 2,2'-oxybis-	20.4	516841	2.26	0.68
27	Octanoic Acid	21.1	46091	0.20	0.17
28	Nonanoic acid	21.8	221548	0.97	0.75
29	Thymor	21.9	238736	1.04	0.20
30	Carvacrol	22.1	15158793	66.22	6.49
31	Benzoic acid	23.5	323344	1.41	1.46

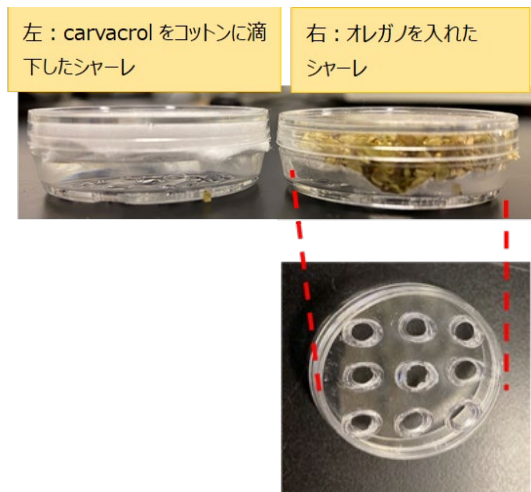


図 1: 匂い発生器の概要

匂い発生器はポリカーボネートケージの上の金網部分の給水瓶の近くに設置した(図 2)。一定濃度のオレガノ臭を継続的に給水瓶付近に曝露し続ける条件を見出すためにオレガノの量や匂い発生器の穴の数などの条件検討を行った。オレガノの量はそれぞれ 1.0 g ずつ匂い発生器に封入し、ペーパーフィルターで穴からの落下を防いだ。

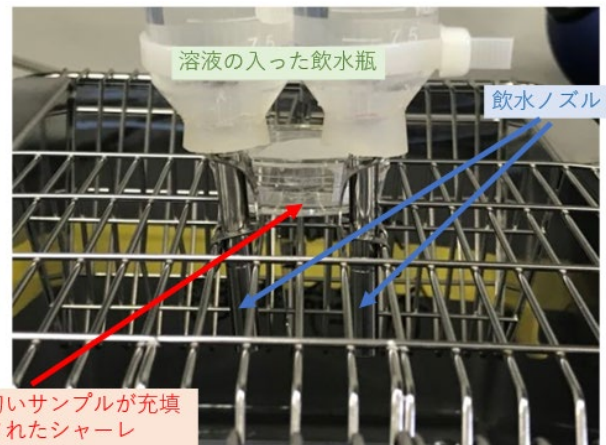


図 2: 二瓶選択装置と匂いの提示方法

HS-SPME を用いて気相中の匂い物質濃度を測定し、ケージ内の 24 時間の匂い成分の濃度の測定を実施した。

オレガノのケージ内の匂い成分はオレガノ臭の主要揮発性成分の一種である Carvacrol を基準として匂い発生器装着 3 分後から 24 時間まで測定した。飲水部付近では Carvacrol 換算で 3~4 pmol/mL (air) の匂い成分が 24 時

間測定される条件を作成し、食塩水摂取量の変化を測定した。

すべての動物実験はSPF環境下で行った。実験動物はC57BL/6Jマウス(雄)3匹1グループ(12グループ)、C57BL/6Jマウス(雌)3匹1グループ(10グループ)、合計66匹を用いた(CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan)。ポリカーボネートケージ(24 cm × 16.5 cm × 12 cm)にbeddingを敷き、オートクレーブ処理したものを使用した。エサはマウス固形飼料CL-2(CLEA Japan, 30 kGy照射済)を使用した。

本実験開始前に予備飼育期間を1週間程度設けオレガノの匂いと二瓶選択実験の環境下に汎化させた。その後、二瓶選択実験(精製水vs 0.15 M NaCl水溶液;いずれも滅菌済み)を匂い提示環境(Odorant)と匂い非提示の環境(Control)でそれぞれ24時間実施した。さらに有効成分と考えられるCarvacrolを用いて0.3~1.0 μLの範囲で匂い発生器への添付量を変化させ塩水摂取抑制作用の濃度依存性を測定した。それぞれの実験は2週間以上のインターバルを設けて行った。

2.3 嗅覚障害マウスの作成

Carvacrolをはじめとするオレガノ中の揮発性成分には多数のモノテルペンが含まれており、これらの成分は嗅神経を強く刺激するが概ね好ましい匂い成分である。実際Carvacrol(表1#30)、以外にも borneol (#16)、phenol-2-methyl-5-(1-methylethyl); Thymol (#29)など類似物質を含む。そこでオレガノの揮発性成分の嗅覚器に対する関与を明確にするために硫酸亜鉛処理による嗅覚障害モデルマウスを作成し(Yamamoto et al. 2013)、オレガノの適塩作用を確認することを考えた。イソフルラン(ファイザー)で吸入麻酔(導入5%)したマウスの鼻に、ゲルローディングチップ-10 μl (Molecular BioProducts inc.)を用いて5% ZnSO₄ + 0.1%カルボキシメチルセルロース混合溶液を左右両鼻腔内に5 μl 滴下した。滴下後10秒程度マウス

を仰臥位のまま固定し、嗅覚障害モデルマウスを作成した。翌日、5% ZnSO₄処理マウスに対して、嗅上皮の機能が想定通り失われているかを確認するため、通常の飼料とピーナッツバターで作った探索実験用エサで探索実験を行い、嗅覚機能を評価した。

2.4 オレガノの匂い成分によるマウス分界条床核における Fos 陽性細胞密度の測定

C57BL/6J系のマウスを日本クレア株式会社より購入した。水は通常の給水瓶で与え、オレガノ1.0 gをマウスに24時間提示した。オレガノの匂いを24時間提示後のマウスをオレガノ群、匂い発生器のみを提示した群を対照群とし、1時間後にイソフルランで吸入麻酔した(導入5%、維持3%)。その後、4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液で脳を灌流し、マウスの脳を採取した。採取した脳は、4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液を5 ml 入れたスチロール棒瓶に20時間浸水した。浸水後、4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液を吸い取り、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、30%スクロース/リン酸緩衝液5 mlで冷蔵保管後、マウスの大脳の冠状断切片(100 μm)をビブラトームで作成し、分界条床核周辺領域について Fos 陽性細胞の発生密度を測定した。

3. 結果

3.1 オレガノのにおい成分による適塩効果の確認

オレガノ1.0 gを24時間提示して二瓶選択実験(精製水 vs 0.15 M NaCl 水溶液)を雌マウスに対して実施したところ、食塩水の摂取量及び摂取率が有意に低下した(P<0.02; Wilcoxon test) (図3a)。一方、水の摂取量は有意に増加し、総節水量は変化しなかった(図3b)。

この結果は、オレガノの匂い成分の中には食塩水摂取を抑制し、代償的に水の摂取量を上昇させ、体液量を保持する成分が含有されている可能性が示唆された。

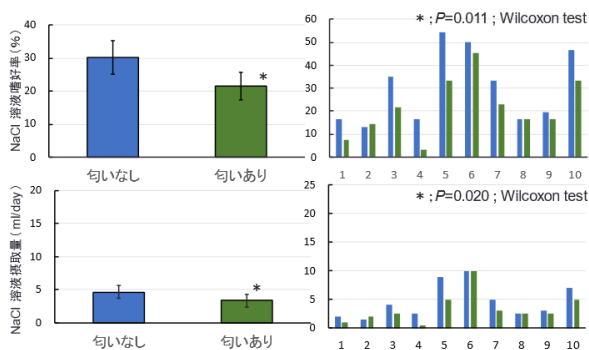


図 3a: マウスの食塩水嗜好に及ぼすオレガノの影響

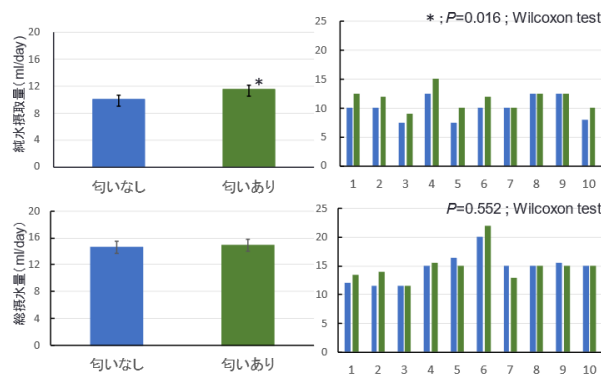


図 3b: マウスの節水量に及ぼすオレガノの影響

3. 2 オレガノの揮発性成分の分析と生理活性成分の同定

オレガノ揮発性成分の化学分析は異なったロットのオレガノを4種類購入し、それぞれ1検体として4例の分析データをもとに解析した。その結果、180種類以上の揮発性化合物が分離された。そのうち、GC-MSのライブラリーで構造の推定が可能であり、分析したすべてのサンプルに共通して見られた31種類の化合物について定量した。そのうち Carvacrol は全体の約66%を占める主要成分であることが分かった(表1)。また Carvacrol 単体の香りはオレガノの特徴香の一つと考えられる。これらのことより、Carvacrol がオレガノの生理活性成分の一つであるとの仮説を以下のように検証した。まず、適塩効果が確認された1.0 gのオレガノを提示した条件での気相中 Carvacrol 濃度を、SPMEを用いて、匂い発生器提示3分後から24時間にわたり測定した。

その結果、オレガノ1.0 gのケージ内の匂い成分は飲水部付近では Carvacrol 換算で3~4 pmol/mL (air)であった。この濃度は、ヒトにおける Carvacrol の嗅覚閾値の数十倍であり、マウスの嗅覚にも十分作用することが推定された。この気相中 Carvacrol 濃度条件を達成できる提示量を検討した結果、1.0 μLの Carvacrol が測定される条件でほぼ達成できることが明らかになった(ANOVA with Bonferroni post hoc test) (図4)。

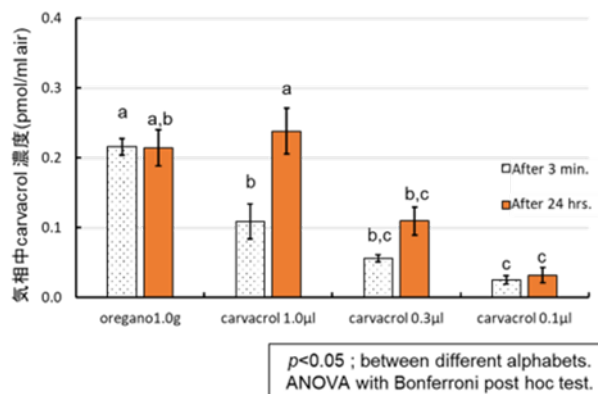


図 4: Carvacrol の気相中濃度の比較 (n = 3-5)

以下、この条件で Carvacrol の適塩効果を測定した。

雌マウスに対する1.0 μLの Carvacrol 単独暴露で1.0 gオレガノと同様な選択実験を行ったところ、オレガノと同等の効果が確認され(P = 0.012; Wilcoxon test, 以下同じ)、Carvacrol がオレガノ臭の主要な活性成分の一つであることが明らかになった(図5上段左端)。その一方、純水の摂取量は相補的に増加し、総摂取量は差がなかった(P = 0.547) (図5上段右端)。この傾向はオレガノと同様であった。Carvacrol の濃度依存性を検討した結果、雌マウスにおいて Carvacrol の添付量を0.3 μLに低下させても効果は見られたが(P = 0.018), 0.1 μLではマウスの塩水嗜好抑制作用は低下し、効果は見られなくなった(P = 0.263) (図7上段右)。

3. 3 雌雄マウスに対するオレガノ及び Carvacrol の適塩作用について

オレガノ1.0 gを24時間提示して二瓶選択実験(精製水 vs 0.15 M NaCl水溶液)を実施した結果を図6に示す。図6は上が雌のデータ、下が雄のデータを示している。上

下とも左から塩水嗜好率(%), 食塩水摂取量 (mL/day), 純水摂取量 (mL/day) 合計摂取量 (%) を表す。マウスの食塩水の摂取量及び摂取率は雌雄ともに有意に低下した (雌それぞれ $P = 0.011$, $P = 0.020$, 雄それぞれ $P = 0.006$, $P = 0.011$; Wilcoxon test 以下同様) (図 6)。一方純水の摂取量は有意に増加し (雌 $P = 0.016$, 雄 $P = 0.042$), 総節水量は変化しなかった (図 6)。この結果は, オレガノの匂い成分の中には食塩水摂取量を抑制し, 代償的に水の摂取量を上昇させ, 体液量を保持する機構を作動させる匂い成分が含まれていることを示しており, それは性に関係なく効果を発揮することを示唆している。一方, オレガノの匂い含まれる適塩活性成分である Carvacrol は雌マウス

に対しては同様の適塩活性を示したが (図 5 上段), 雄マウスに対する生理活性は嗜好率こそ有意差があるものの, 摂取量では有意差がなく ($P = 0.055$), Carvacrol 単体に対する感受性は低い傾向があることが示唆された (図 5 下段)。次に Carvacrol の適塩効果の濃度依存性を確認するために匂い発生器内の添付量を $1.0 \sim 0.1 \mu\text{L}$ の間で変化させ, マウスに提示したところ, 前項でも説明したように, 雌では $0.3 \mu\text{L}$ でも活性を維持し, $0.1 \mu\text{L}$ で適塩効果が消失した (図 7 上段)。一方雄では, $0.3 \mu\text{L}$ ではすでに効果が見られなかった (図 7 下段)。この結果は Carvacrol が濃度依存的に効果を発揮していることを示唆するとともに生理活性の雌雄差の存在を示すものである。

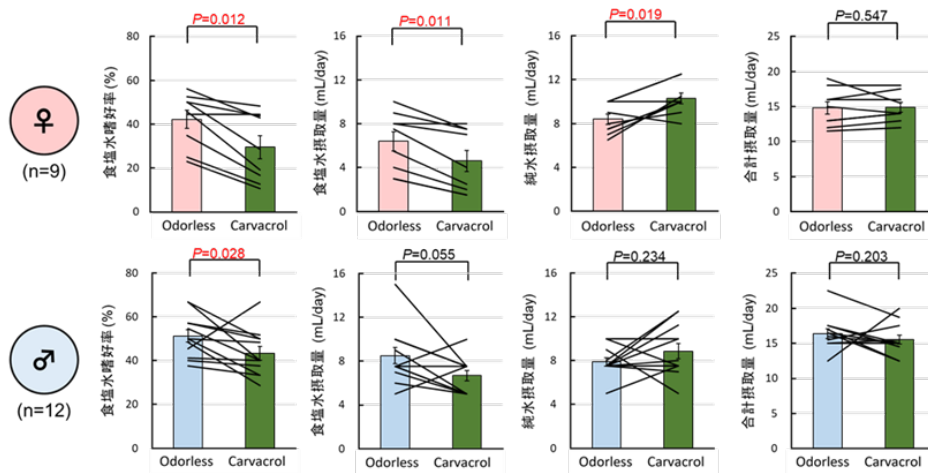


図 5: マウスの Na^+ 嗜好性に対する Carvacrol $1 \mu\text{L}$ の影響

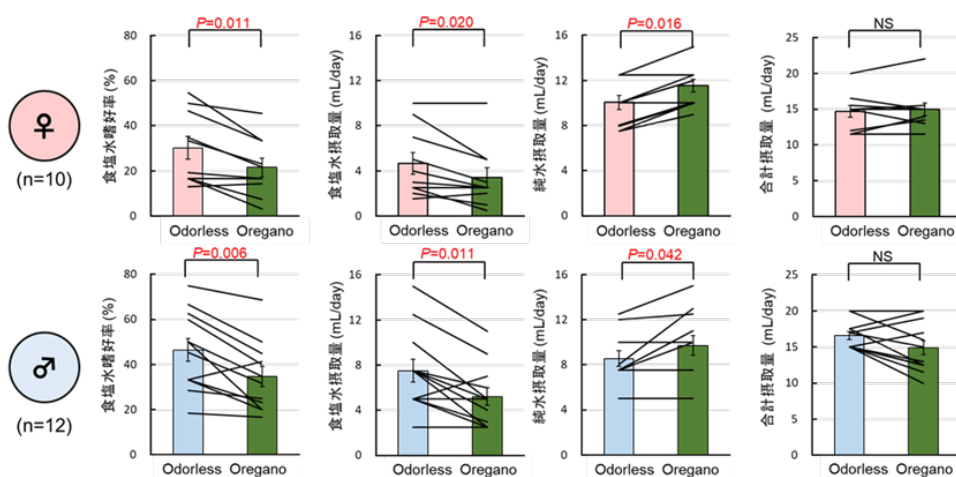


図 6: マウスの Na^+ 嗜好性に対するオレガノ 1g の影響

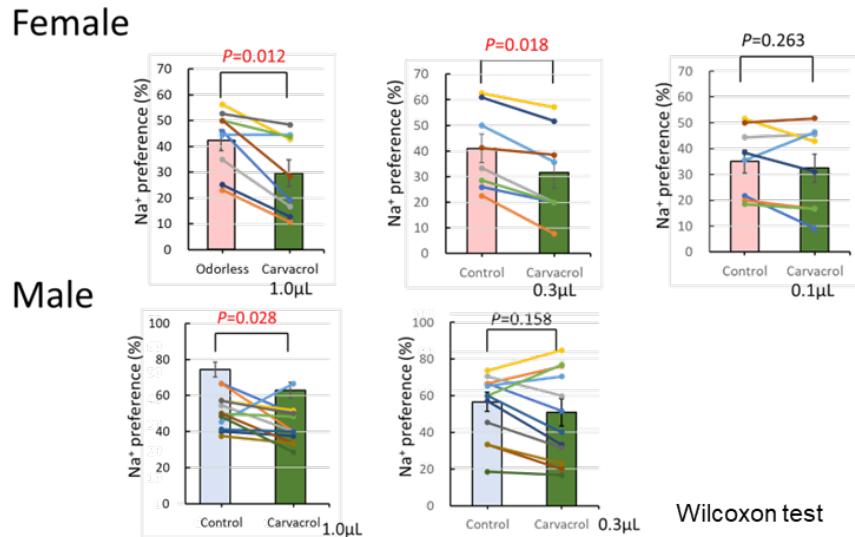


図 7: NaCl 嗜好率に及ぼす Carvacrol の濃度依存的影響

3. 4 嗅覚障害マウスに対する Carvacrol の効果について

5% ZnSO₄水溶液で嗅上皮処理におけるエサ探索実験の結果を図 8 に示す。鼻腔内に 5 μl ずつ 5% ZnSO₄水溶液で処理を行うことで、餌を探し当てるのに要する時間は有意に増加した。嗅覚障害マウスに対するオレガノの効果を図 9 に示す。嗅覚障害モデルマウスの食塩水摂取量及び食塩水嗜好率は依然として有意な低下を示した (P = 0.002; Wilcoxon test)。すなわち、嗅上皮に一過性の嗅覚障害処理を施しても、無処理群と同様の傾向が見られ、適塩効果は誘起されることが確認された。

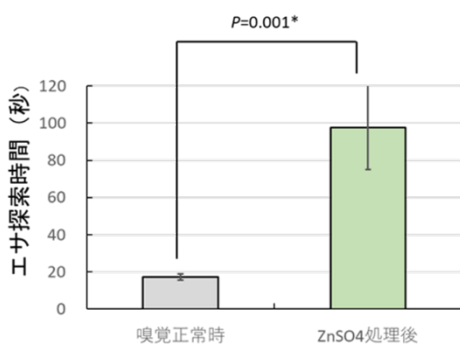


図 8: 嗅覚障害マウスのエサ探索時間の遅延

3. 5 オレガノの匂いが分界条床核の Fos 陽性細胞密度に与える影響について

オレガノ臭曝露の終了後、1 時間経過したマウスの脳組織切片を作成し、分界条床核外側後方部 (STLP)、分界条床核外側背側部 (STLD)、分界条床核腹側外側部 (STLV)、分界条床核腹側内側部 (STMV)、傍分界条床核 (PS)、分界条床核 (STMA)、視床下部中郭核 (Shy) を免疫組織化学的手法で染色し、Fos 陽性細胞密度を測定した。その典型的な組織像 (雄マウス) と雌雄マウスの各脳部位の Fos 陽性細胞密度の結果を図 10 及び図 11 に示す。雄マウスにオレガノ 1.0 g を 24 時間提示した結果、STLV 及び STMV のみに Fos 陽性細胞密度の増加が見られ、オレガノの匂いが Na 調節中枢に特異的に作用することが明らかになった。雌マウスにおいても、STLV 及び STMV が最も強く興奮しているが、それらの他に STLP と STMA で Fos 陽性細胞密度の増加が見られ、雄マウスよりも分界条床核の他の細胞核に対する反応性が高いことが示唆された (図 11)。

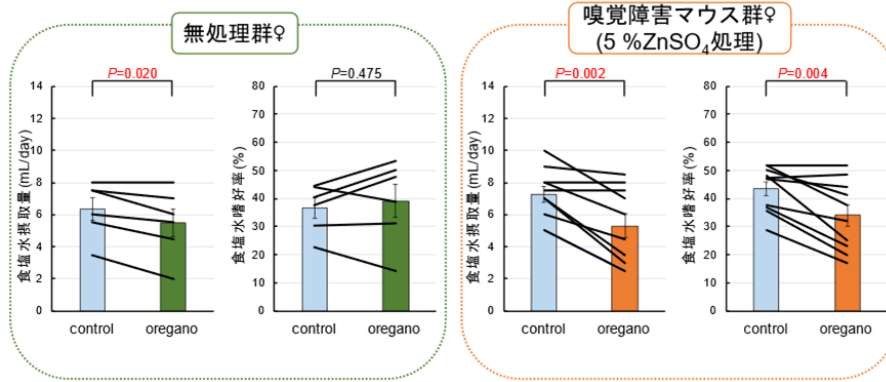


図 9: 嗅覚障害マウスの Na⁺嗜好性に対するオレガノ 1 g の影響

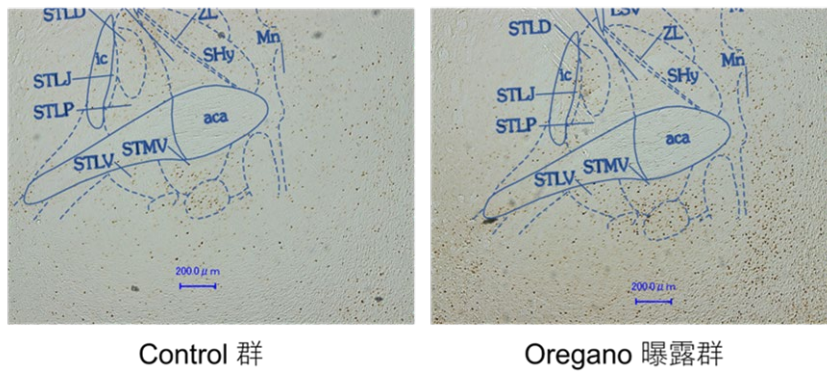


図 10: オレガノ臭曝露 24 時間後の雄マウス分界条床核付近の Fos 陽性細胞の出現

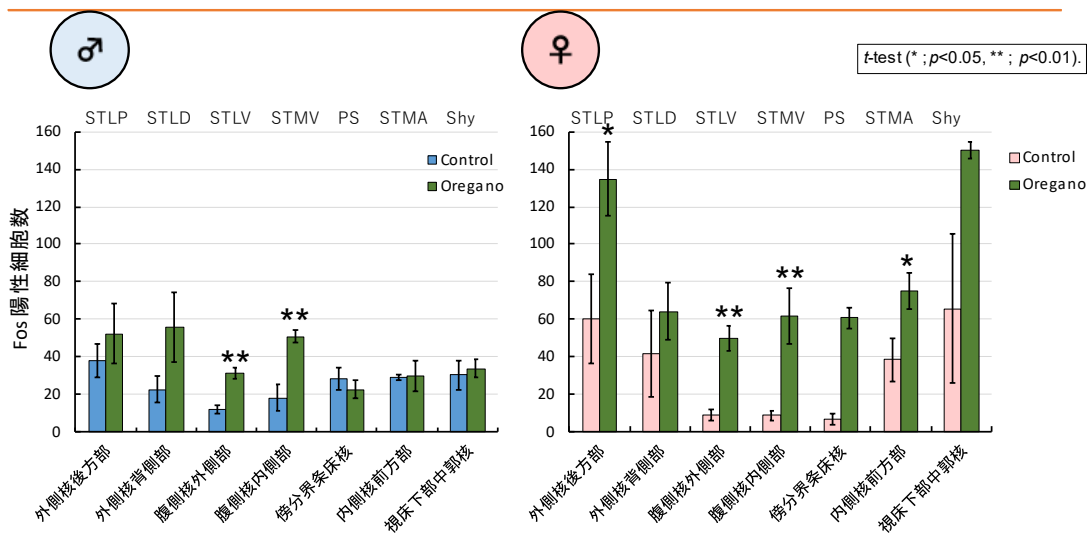


図 11: 免疫組織的手法によるマウス脳内の Fos 陽性細胞密度の測定

4. 考察及び今後の課題

4.1 オレガノの匂い成分が持つ適塩作用の発見と 活性成分の同定

本研究の結果、オレガノの匂い成分はマウスの塩水摂取行動を有意にかつ継続的に低下させることが明らかになった。オレガノ 1.0 g 提示した実験では塩水の摂取量の有意な低下が見られた。この実験では、オレガノ臭の新奇忌避の影響を排除するために、被験マウスは事前にオレガノの匂いと接触している。しかしながら塩水摂取の前処理とは別々に行っているためオレガノの匂いと塩味摂取の間には何らかの学習が成立している可能性はない。にもかかわらず、オレガノの匂いはマウスの食塩水の摂取を有意に減少させた。このことはオレガノ臭の食塩水摂取抑制作用は生得的・本能的な性質が含まれることを示唆している(図 3)。

食塩水の摂取量の低下に伴い、純水の摂取量は有意に増加し、水分総摂取量には差がなかった。このことはオレガノの匂い成分は、体液量の恒常性を保ちつつ、食塩水の摂取量を特異的に低下させることを意味している。本実験で用いた 0.15 M NaCl 溶液は生理的食塩水濃度に近く、みそ汁の塩分濃度が 1%前後であることを考えると、人の食事においても摂取範囲内の濃度である(<https://www.marukome.co.jp/customer/faq/detail/062/>)。

したがって本研究結果はオレガノの匂いを付与することにより、人の食生活においてもその減塩効果が発揮される可能性を示唆するものである。

オレガノの揮発性成分解析の結果、主要成分は Carvacrol であり、揮発性成分の 60%を占めた(表 1)。このことより Carvacrol が主要な活性成分であるとの仮説の検証のため、以下の実験を行った。適塩効果が確認されたオレガノ 1.0 g 提示時の飲水部の Carvacrol 濃度と同等の気相濃度を発する Carvacrol 単体の匂い発生器内への添付量は 1.0 μL であったため、その条件でマウスに Carvacrol を嗅がせて食塩水の嗜好性を調べたところ、予想通りオレガノと同様の効果が見られた(図 7 左)。この結果はオレガノ中の有効成分が Carvacrol であることを証明している。単体 1.0 μL での気相中 Carvacrol 濃度は、最初はやや少ないものの、その後上昇し、オレガノ 1.0 g を提示した時とほぼ同様な気相中濃度[3 pmol/ml (air)]に達する(図 5)。一方 Carvacrol の添付量が低下すると、気

相中濃度も低下し、生理活性も濃度依存的に低下した。今回の計測では Carvacrol 0.1 μL 群では 3 分後、24 時間後ともに 1 pmol/ml (air) に達しおらず、この濃度では抑制効果が見られないことが分かった。オレガノの匂いが発揮する適塩作用の主たる活性成分の一つは、Carvacrol であり、その作用は濃度依存的に誘起されることが明らかになった。

Carvacrol は経口摂取によりラットの前頭前野や海馬におけるのセロトニン及びドーパミン濃度の増減に関与することが知られており(Zotti et al. 2013)、覚醒作用や幸福感に関与することが報告されている。一方、モノアミンを神経伝達物質とする投射ニューロンの活性化は食塩摂取抑制作用があることが知られている(Reis et al. 1994)。このことは経口摂取した Carvacrol がモノアミン系の投射ニューロンを介して食塩摂取量を調節していることを示唆している。近年、脳室内への Carvacrol 投与に食塩摂取抑制作用があることが報告された(Polli et al. 2019)。しかしながら、Carvacrol を経口摂取や脳室内投与など直接体内に摂取することなく、微量の Carvacrol の嗅覚刺激のみで有意な食塩摂取抑制作用を発揮することは本研究が初めての報告である。

今回の実験では、同じマウスグループを用いて[1.0 μL Carvacrol \Rightarrow 0.1 μL Carvacrol \Rightarrow 0.3 μL Carvacrol]の順で類似した匂い成分を 3 回提示した。その結果、3 回目に行った 0.1 μL 添付実験では効果がほとんど見られなかった。このことは Carvacrol の濃度依存性を示した結果と解されるが、匂いに対する順応が起きた可能性も無視できない。しかしながら、その後行われた 0.3 μL Carvacrol の実験では、食塩水抑制作用が改善したこと、各実験間隔を 2 週間以上開けたことより順応による活性低下とは考えにくい。

しかし Carvacrol の効果の継続性の確認は今後の課題である。さらに雄マウスに対する Carvacrol の末梢における受容機構についても検討する予定である。

4.2 その他の食品中匂い成分がマウス食塩嗜好に 与える影響について

匂い成分は加工食品としてベーコン、再仕込み醤油、白醤油を、香辛料として山椒を用い、上記と同様の手法を用いて、HS-SPME 法による匂い成分の抽出を実施し、GC-MS 分析実験と動物行動実験の組み合わせにより活性物質を探索した。

上述のごとく、匂い成分の生理活性を正確に測定するため、オレガノの実験で用いた動物ケージ内に一定の気相濃度を長時間継続して提示できる匂い発生器と匂い測定システムを利用し同様に行動実験を行った。動物行動実験は C57BL/6J マウスを用い、NaCl 水溶液 (0.15 M) と水を同時に与え、二瓶選択実験を行なった (24 時間)。

醤油は再仕込み醤油と白醤油を使用し、匂い発生器内に脱脂綿を挿入し、各 1 mL ずつ脱脂綿にしみこませた。

ベーコンの燻煙臭は、日本大学食品加工センターでベーコン作成時に発生する燻煙臭を 1 辺 25 cm の木綿布に約 4 時間吸着させ、そのまま使用した。その結果、オレガノ以外でも再仕込み醤油の匂いは食塩水摂取抑制活性があることが証明され、一方山椒や白醤油には活性が見られないことが明らかになった (図 12)。再仕込み醤油の効果は雌マウスに対しては高いが、雄に対する作用が不明確であり、匂い刺激に対する性差が示唆され、雌雄いずれにも効果のあるオレガノとは異なった結果となった (データ未発表)。

ベーコンの燻煙臭を提示した場合、食塩水の摂取量は有意に低下したが、一方オレガノで見られたような水の摂取量の上昇は見られず、総節水量は食塩水の摂取量の低下に伴い低下した (図 13)。この結果は、食塩水の摂取調節機構がオレガノや再仕込み醤油と異なっている可能性を示唆している。

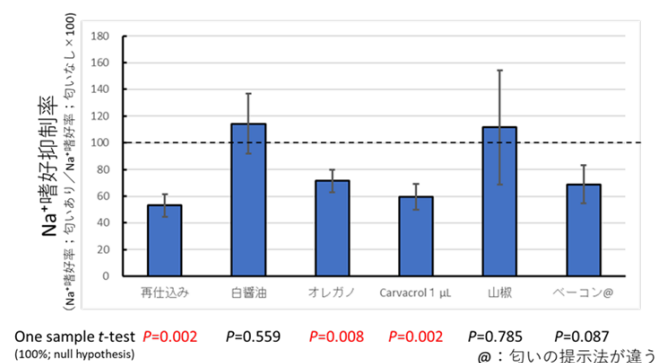


図 12: 各匂い成分による食塩水嗜好抑制率の比較 (雌)

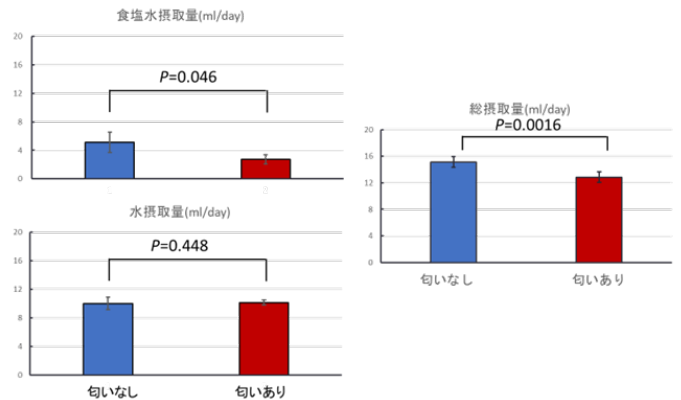


図 13: ベーコンの匂いは食塩水の摂取量は減少させるが水の摂取量は上昇させない

4.3 オレガノ及び Carvacrol の飲水行動に及ぼす影響と雌雄マウスに対する作用

本研究の結果、オレガノの匂いはマウスの雌雄に関わらず、塩水摂取行動を有意に低下させることが明らかになった。オレガノ 1.0 g 提示した実験では塩水の摂取量の有意な低下と純水の摂取量の有意な上昇が見られ、体液量を維持する機構が関与していることが雄においても新たに確認され、その適塩メカニズムは雌雄で共通性があることを示唆している。この実験では、オレガノ臭の新奇忌避の影響を排除するために被験マウスは事前にオレガノの匂いと接触している。しかしながら、塩水摂取の前処理とは別々に行っているため、オレガノの匂いと塩味摂取の間には何らかの学習が成立している可能性はない。にもかかわらず、オレガノの匂いはマウスの食塩水の摂取を有意に減少させた。このことはオレガノ臭の食塩水摂取抑制作用は性差に関係なく生得的・本能的であることを示唆している (図 6)。

一方、オレガノの主成分と考えられる Carvacrol の効果には性差が見られた。雌に対してはオレガノ 同様の作用が見られたが、雄に対する作用は食塩水摂取量や純水摂取量に有意差が見られず、適塩効果は弱かった (図 7)。この結果及びオレガノ 臭が雄にも作用する結果を考え合わせると、Carvacrol 単独では雄に対する十分な適塩効果が発揮できず、オレガノ に含まれる Carvacrol 以外の揮発性物質の混合臭によって適塩効果が発揮されていると解釈できる。実際、オレガノのヘッドスペースには Carvacrol 以外にも多数香気成分が含まれ、その中には生

理活性成分と予測される化合物も含まれており(表 1)、これらの混合臭を作成して雄への十分な効果を確認したい。

Carvacrol の適塩作用には用量依存性があることが示された(図 8)。この結果は、Carvacrol が嗅神経の特定の受容体への結合が嗅覚経路で適塩効果を発揮していることと矛盾しないが、他の感覚系の関与や、体内に直接入り込んだ成分の影響は否定できず、検討の必要がある。また、より低い濃度で雌に作用が発揮されたことより、Carvacrol の性差がここでも示唆された。

本実験で用いた 0.15 M NaCl 溶液は生理的食塩水濃度に近く、みそ汁の塩分濃度が 1%前後であることを考えると、人の食事においても摂取範囲内の濃度である(<https://www.marukome.co.jp/customer/faq/detail/062/>)。したがって、本研究結果はオレガノの匂いを付与することにより、人の食生活においてもその減塩効果が発揮される可能性を示唆するものである。

二瓶選択実験において、なぜオレガノ及び Carvacrol の匂いが食塩水の摂取量のみ低下させ、総飲水量を維持するというメカニズムについては依然残された課題である。水分とナトリウムなどの電解質の摂取行動はレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系が関与している。体液が減少するとアンジオテンシン II が脳室周囲器官の 2 群の異なる神経グループを刺激し、一方は分界条床核腹側部に軸索を伸ばし、電解質の嗜好を誘起する。もう一方は終板血管器官に軸索を伸ばして、口渴すなわち水分の欲求を引き起こす(Matsuda et al. 2017)。Carvacrol の嗅覚経路の神経入力が、分界条床核のナトリウム調節作用を修飾し、一方終盤血管器官に対しては水分摂取を促進する可能性が考えられる。このメカニズム研究には免疫組織学的手法を駆使してこれら電解質調節に関連する細胞核の興奮を Fos の発現密度によって検討することが重要であろう。

4. 4 末梢感覚器官におけるオレガノの感覚受容

メカニズムについて

5% ZnSO₄水溶液処理による嗅覚障害モデルマウスでは、餌の探索実験において 5 倍以上の時間がかかり、嗅覚探索行動の障害が証明された。一方 5% ZnSO₄処理マウスの致死率は 0%であり、嗅覚以外の機能に影響を与えた形跡は見られなかった。

嗅覚障害モデルマウス群の食塩摂取量は、無処理群と同様に有意に低下したことから、オレガノの匂い成分の適塩効果には嗅覚以外の作用関与している可能性が示唆された。嗅覚以外の作用経路は、現時点では 2 つの可能性があげられる。嗅神経以外の顔面領域の末梢神経、例えば三叉神経の一般知覚性神経によるもの、鋤鼻器官による経路、あるいは揮発性物質の鼻粘膜などの呼吸器からの吸収に伴う中枢への直接作用も考えられる。しかし、主嗅覚系の関与も全く否定されたわけではない。オレガノの匂い成分中には、モノテルペン以外にも有機酸などもかなり含まれており、匂い成分によっては適塩効果を阻害するものも含まれている可能性がある。その仮説を明らかにするためには、嗅覚障害マウスに対する Carvacrol の作用を見ることが重要であり、近々の課題である。それに加えて主嗅覚系以外の末梢感覚器官に対するオレガノ、あるいは Carvacrol の関与については受容体欠損マウスや阻害剤などを用いたより詳細な検討が今後の課題となる。

4. 5 中枢レベルでのオレガノの適塩効果メカニズムの解析

今回、Fos 陽性細胞密度を測定した脳部位は分界条床核周辺の領域である。分界条床核外側後方部(STLP)、分界条床核外側背側部(STLD)、分界条床核腹側外側部(STLV)、分界条床核腹側内側部(STMV)、傍分界条床核(PS)、分界条床核(STMA)、視床下部中郭核(Shy)である。オレガノ 1.0 g を 24 時間提示することで、雌雄ともに STLV 及び STMV の Fos 陽性細胞密度は増加し、神経活性が高まることが確認された。このこれらの領域は Na の嗜好調節に直接関与する中枢であることが報告されており(Matsuda et al. 2017)、オレガノの揮発性成分はマウス脳内の Na 嗜好調節する領域に作用することが示唆された。また、STLV と STMV の近傍の領域に存在する STLP と STLD は匂いに対する忌避反応、STMA は先天的な恐怖反応に関与すると報告されている(Kobayakawa et al. 2007)。本実験では、雄マウスにおいて、これらの領域の Fos 陽性細胞密度の増加は見られず、オレガノの匂い成分はナトリウム調節に関連する領域に特異的に作用したことが示された。雌においてもナトリウム調節中枢である STLV、STMV で最も顕著に反応が出たことから、雄同様に食塩調節に関与していると解釈できる。一方、雌では STLP と STMA の Fos 陽性細胞密度が増加した。したが

って、オレガノの匂いは雌マウスにとってある程度の警戒行動を引き起こす可能性もあるが、今回の行動観察からは警戒行動は見られていない。分界条床核には性差が知られており、STLD では雌の方が大きく、ストレスホルモンの生成に関与する CRH 陽性神経細胞も多く存在する (Uchida et al. 2019)。この違いが雌雄の行動的性差を引き起こしている可能性があるが、STLD の Fos 密度には雌雄とも差がなかったため、雌が特段ストレス状態に陥ってはいないと解釈できる。しかしながら、STLV や STMV などにも CRH 陽性細胞が存在するため、Carvacrol の作用の雌雄差などと関連している可能性も考えられる。

今後は、分界条床核腹側部以外の水、ナトリウム摂取に関係する中枢、例えば脳弓下器官、終板血管器官、視床下部室傍核、視索上核、正中視索前核などについても検討を進めたい。

5. 文献

- Batenburg M, Velden R. 2011. Saltiness enhancement by savory aroma compounds. *J Food Sci* 76: S280-288.
- Breslin PA, Beauchamp GK. 1997. Salt enhances flavour by suppressing bitterness. *Nature* 387: 563.
- Cutler JA, Follmann D, Allender PS. 1997. Randomized trials of sodium reduction: an overview. *Am J Clin Nutr* 65: 643S-651S.
- He FJ, Jenner KH, Macgregor GA. 2010. WASH-world action on salt and health. *Kidney Int* 78: 745-753.
- Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H. 2007. Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature* 450: 503-508.
- Malik B, Elkaddi N, Turkistani J, Spielman AI, Ozdener MH. 2019. Mammalian Taste Cells Express Functional Olfactory Receptors. *Chem Senses* 44: 289-301.
- Matsuda T, Hiyama TY, Niimura F, Matsusaka T, Fukamizu A, Kobayashi K, Kobayashi K, Noda M. 2017. Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nat Neurosci* 20: 230-241.
- Mattes RD, Donnelly D. 1991. Relative contributions of dietary sodium sources. *J Am Coll Nutr* 10: 383-393.
- Onuma T, Maruyama H, Sakai N. 2018. Enhancement of Saltiness Perception by Monosodium Glutamate Taste and Soy Sauce Odor: A Near-Infrared Spectroscopy Study. *Chem Senses* 43: 151-167.
- Osada K, Komai M, Bryant BP, Suzuki H, Goto A, Tsunoda K, Kimura S, Furukawa Y. 1997. Capsaicin modifies responses of rat chorda tympani nerve fibers to NaCl. *Chem Senses* 22: 249-255.
- Polli FS, Gomes JN, Ferreira HS, Santana RC, Fregoneze JB. 2019. Inhibition of salt appetite in sodium-depleted rats by carvacrol: Involvement of noradrenergic and serotonergic pathways. *Eur J Pharmacol* 854: 119-127.
- Reis LC, Ramalho MJ, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. 1994. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12022-12026.
- Rotola-Pukkila MK, Pihlajaviita ST, Kaimainen MT, Hopia AI. 2015. Concentration of Umami Compounds in Pork Meat and Cooking Juice with Different Cooking Times and Temperatures. *J Food Sci* 80: C2711-2716.
- Sinopoli DA, Lawless HT. 2012. Taste properties of potassium chloride alone and in mixtures with sodium chloride using a check-all-that-apply method. *J Food Sci* 77: S319-322.
- Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. 2009. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 339: b4567.
- Uchida K, Otsuka H, Morishita M, Tsukahara S, Sato T, Sakimura K, Itoi K. 2019. Female-biased sexual dimorphism of corticotropin-releasing factor neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Biol Sex Differ* 10: 6.
- Xu J, Lewandowski BC, Miyazawa T, Shoji Y, Yee K, Bryant BP. 2019. Spilanthol Enhances Sensitivity to Sodium in Mouse Taste Bud Cells. *Chem Senses* 44: 91-103.
- Yamamoto T, Inui T, Tsuji T. 2013. The odor of *Osmanthus fragrans* attenuates food intake. *Sci Rep* 3: 1518.
- Zotti M, Colaianna M, Morgese MG, Tucci P, Schiavone S, Avato P, Trabace L. 2013. Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. *Molecules* 18: 6161-6172.

The Scent of Food Controlling the Consumption of Sodium Chloride.

Kazumi Osada¹, Hosono Akira¹, Ohsaki Yusuke²

¹ College of Bioresource Sciences, Nihon University

² Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University

Summary

Sodium chloride (Salt) is the most abundant mineral salt in the extracellular fluid. Salt is a very important nutrient to form electrolyte osmotic pressure, a voltage between the cell membrane and action potential, and help the cotransport of nutrients. High dietary NaCl intake is a significant risk factor for hypertension and thus a global public health challenge.

As salt reduction has been an important issue, several approaches to salt reduction in food were described. One of the most intriguing approaches of salt reduction is by odor stimuli emitting from salty food and /or spice employing with salty food. But within the scent of food what is the active volatile(s) which is predisposed to reduce the salt appetite by means of controlling central nerve system? What is the detail mechanism of them to control the salt appetite? It is the ultimate purpose of the experiments described here to address these queries.

We developed an easy and accurate method to quantify the gaseous concentration of volatiles with the HS-PSME system (Osada, et, al. 2021, Biosci Biotechnol Biochem, 85,12, 2343-2351). We developed an evaluation system of two-bottle choice controlling gaseous concentration by the novel SPME system, then conducted the preference test described below. In short, in conjunction with the custom-made odor generator, two-bottle choice apparatus, and volatile chemicals detecting system, we conducted the preference test between the 0.15 M NaCl solution and the pure water to C57BL/6J (three mice per one cage) presence and absence of around 3 p mol /ml in an air of gaseous carvacrol for 24 hours. As a result, we indicated that in addition to the oregano and carvacrol, the soy-source and bacon smoking odor decreased the preference for saline.

Next, we focus on the significant activity of the oregano (carvacrol), then concentrate on the dose dependence effect of these odors on the control effect to adequate salt intake and variation of effect of the odors between male and female were explored. As a result, 1) the preference for the saline was diminished by the oregano odor in both the male and female mice. On the other hand, when carvacrol alone confronted the male mice, the preference for the saline was significantly decreased but weaker than in the female. Although similar in appearance the effect of the oregano odor on both the male and female mice, but not carvacrol, suggesting that this present result suggested that male mice need other odor components contained in the oregano odor. 2) From the results of the behavioral study, we hypothesized that the volatile active chemical (including carvacrol) stimulates the olfactory system, then induces the reduction of salt consumption. We prepared anosmia model mice with ZnSO₄ injection into the nasal cavity to ensure the hypothesis. Surprisingly, anosmia mice were still sensitive to the oregano odor and significantly reduced their salt consumption, suggesting that there may be another mechanism from the olfactory system to transfer the information reducing salt appetite. Future work will seek to identify what kind of receptor

detect carvacrol and to clarify the transduction mechanism of oregano volatiles to the brain. 3) Finally, using the immunohistochemical method, we explore the effects of the oregano volatiles on the brain area, bed nucleus stria terminalis, which control the salt appetite. As a result, both the male and female were significantly stimulated with ventral parts of the stria terminalis (VST), which is the center of salt consumption, by oregano volatiles.

These results indicate that oregano volatile stimulated unidentified receptors inducing decreased salt appetite-stimulating to the VST.

ヒトにおける風味による塩味増強効果に関わる認知神経科学的研究と

その知見の減塩食の呈味性増強への応用

坂井 信之^{1,2}, 大沼 卓也³

¹ 東北大学大学院文学研究科, ² 東北大学ヨッタインフォマティクス研究センター, ³ 近畿大学産業理工学部

概要 本研究課題では3年間で、次に示す5つの研究を実施した。

1. 減塩食に対する消費者の態度測定

本調査では、大学生の減塩食に対する知識と態度、及び実生活での減塩食の摂取行動を問う質問紙調査を日本及び中国にて実施した。本調査の結果を先行研究（オーストラリアでの調査）と比較したところ、日本人に比べて、中国やオーストラリアの方が減塩に積極的な態度であり、減塩の実践頻度も高かった。さらに、日本の課題として、減塩に積極的な態度が形成されていないこともわかった。これらの結果から、知識の普及よりも無意識の行動変容（ナッジ）が、日本人の減塩に効果的であることが示唆された。

2. 減塩食に対するイメージ調査

本調査では、「塩味」や「減塩食」などのキーワードから連想される色イメージを色パッチより選択させることにより、参加者のイメージを調査した。その結果、「塩味」からは steel blue (22.5%), ivory (18.8%), cadet blue (9.9%), medium turquoise (7.3%), deep skyblue (7.3%) など青色系および白色の色イメージが連想されるのに対して、「減塩食」からは medium seagreen (16.7%), medium aquamarine (11.5%), green yellow (10.3%), peach puff (10.3%), seagreen (7.7%), silver (7.7%), medium turquoise (5.1%), moccasin (5.1%) など緑色系および赤色系の色が連想されることがわかった。この色イメージの相違が、前項で述べた知識と行動のギャップに影響を与えている可能性が示唆された。

3. 市販の減塩食に対する脳応答の測定

この実験では、市販の減塩食と通常食を摂取している時の主観評定及び脳活動を比較することにより、減塩食の受容と通常食の受容の比較を行った。その結果、パッケージの種類に関係なく、減塩食は普通食よりも塩味が薄く、おいしさが低く評価されることがわかった。この時中心前回の脳活動が、主観評定と関連を見ることが明らかとなった。つまり、減塩食をデフォルトとするようなナッジではなく、減塩パッケージをきちんと認識して、それを選ばせるようにすることが可能であることがわかった。一方で、より塩味が目立ち、よりおいしい減塩食を開発する必要があることも明らかになった。

4. 減塩食の塩味を増強する香料の選定

この実験は9種類の香料から、減塩スープの塩味を増強させることのできる香料を選定することを目的とした。その結果、イワシ、ベーコン、チーズの香りを減塩スープに添加すると、通常スープの塩味やおいしさと有意差のない塩味の強さやおいしさの評価が得られた。しかしながら、同時にこれらの香料を加えても減塩スープの塩味やおいしさとも有意な差を見せなかった。引き続き効果的な香料を検索している。

5. 減塩食パッケージに対する視線計測

この実験ではパッケージに記載されている「減塩」の表示がどの位置にあるときに最も見つけやすく、目につきやすいかということ調べた。その結果、減塩ラベルがパッケージ上部に青色の丸印で描いてあるときが最も良いことがわかった。

以上の研究から、より塩味を感じ、よりおいしい減塩商品であることが明確なパッケージを持つ食品提供することが日本人の減塩行動につながることを示唆された。

1. これまでの概要

本研究課題ではこれまで次に示す3つの研究を実施してきた。

1.1 減塩食に対する消費者の態度測定

本調査では、日本人大学生の減塩食に対する知識と態度、及び実生活での減塩食の摂取行動を問う質問紙調査を実施した。今回の調査回答者は塩分に対する知識は持っており、塩分については肯定的な態度を持っているが、塩分を控える行動はあまり取っていないことが明らかとなった。

1.2 減塩食に対するイメージ調査

本調査では、「塩味」や「減塩食」などのキーワードから連想される色イメージを色パッチより選択させることにより、参加者のイメージを調査した。その結果、「塩味」からは steel blue (22.5%), ivory (18.8%), cadet blue (9.9%), medium turquoise (7.3%), deep skyblue (7.3%) など青色系および白色の色イメージが連想されるのに対して、「減塩食」からは medium seagreen (16.7%), medium aquamarine (11.5%), green yellow (10.3%), peach puff (10.3%), seagreen (7.7%), silver (7.7%), medium turquoise (5.1%), moccasin (5.1%) など緑色系および赤色系の色が連想されることがわかった。この色イメージの相違が、前項で述べた知識と行動のギャップに影響を与えている可能性が示唆された。

1.3 市販の減塩食に対する脳応答の測定

この実験では、無塩のトマトスープに様々な濃度の醤油を添加したときの塩味の強さやおいしさを評定させた。その結果、0.60%食塩相当の醤油を加えたスープのおいしさや塩味の強さは、0.90%の食塩を加えたトマトスープと同等であると評定された。約33%の減塩効果が見られた。なお、このとき、トマトスープに醤油の香りやうま味などを感じる参加者はいなかった。

1.4 展望

これまでの研究を踏まえて、最終年度ではNIRSデータの解析を進め、醤油による塩味増強効果の生理学的基盤について研究を進めていく。また、減塩商品に対する好嫌反応が減塩に対する知識や態度、行動などによって規定されているか否かを実験により明らかにする。さらに、減塩食の塩味をより強く感じさせる香料の選定を行い、減塩食でもおいしく味わうことができる商品の提案を行う。

2. 最終年度の研究

最終年度は次に示す4つの研究を実施した。

1. 減塩食に対する消費者の態度測定
2. 市販の減塩食に対する脳応答の測定
3. 減塩食の塩味を増強する香料の選定
4. 減塩食パッケージに対する視線計測

3. 減塩食に対する消費者の態度測定

3.1 はじめに

減塩食を選ぶか選ばないかという行動は、その人の減塩食に対する態度により決定される。このような態度は日々の経験によって、暴露される減塩食に関する情報によって形成されると考えられるが、個人差が大きい。そこで、本研究では最初に減塩食に対する心理的態度を測定した。

一般的に人は『健康に良い食物はおいしくない』という信念を持っているとされている¹⁾。我々は減塩食においても同じような信念を持っていると考え、まずこの信念の強さを UTI scale により測定した。次に、減塩食に対する知識と態度及び摂取行動を KAB 調査²⁾により測定した。同時に我々自身で作成した食事に対する健康イメージを測定した。これらの結果を総合的に解釈することにより、減塩食に対する心理的態度を明らかにすることができると考えた。

3.2 方法

3.2.1 調査参加者

本調査には231名の東北大学生(男性150名,女性81名,平均年齢 19.80 ± 1.75)及び中国人184名(男性65名,女性119名,平均年齢 28.17 ± 8.62)が参加した。いずれも授業中及び大学構内での掲示による募集に応じたものであった。

3.2.2 質問項目の構成

最初に調査内容と参加に伴う権利などに関する説明の文書に対して,自発的に参加することに対する問を設けた。上記231名はこの設問に対して自発的に参加すると回答した。一方,その設問に対して「回答しない」ことを選択した参加者はそこで調査終了とした。

次に参加者の性別,年齢,出身地,学歴,既往歴,身長・体重,食料品の主な購買者等に関する基礎的な質問を行った。それから具体的な食品名を挙げ,それぞれに対して,好き嫌い及び健康的か否かについて評価を求めた。回答は両設問とも9段階法(嫌いー好き,非常に不健康ー非常に健康的)により行うように求めた。この時使用した食品リストは表1および表2に示した。

W2それからUTI scaleに関する3設問に対する回答を求めた。この設問では以下の3つの質問(UTIスケール)について,参加者は9件法(1=“全く当てはまらない”から9=“非常によく当てはまる”)で回答した。

- ・より健康な食事を摂るためには,味やおいしさは犠牲にするほかない。
- ・自分の体に良い食品が,おいしいことはめったにない。
- ・食について健康とおいしさの間にトレード・オフがよくあると思う。

最後にKAB調査を行った。この調査はオーストラリアで実施された調査の日本語版であった。内容は,日本人の塩分摂取率の現状及び望ましい摂取量に対する知識,塩分に対する態度,日常の塩分摂取行動のそれぞれを測定するものであった。また,それぞれの項目に対するオーストラリア人大学生の回答を先行研究²⁾より抜き出し,本研究結果と比較することにした。

表1: 日本人を対象とする研究で使用した食品の一覧。
和食と洋食それぞれから代表的と思われる食品を7カテゴリーにわたって取り上げた。

カテゴリー	和食	洋食
主食	ごはん(白米)	食パン
	おにぎり	ピザ
	寿司	ハンバーガー
	おこわ	チキンライス
主菜	焼き鮭	鮭のムニエル
	唐揚げ	フライドチキン
	生姜焼き	ステーキ
副菜	おひたし	グリーンサラダ
	肉じゃが	マッシュポテト
飲み物	緑茶	紅茶
	日本酒	ワイン
汁物	味噌汁	コンソメスープ
麺類	うどん	スパゲッティ
デザート	たい焼き	アップルパイ

表 2: 中国人を対象とする研究で使用した食品の一覧
和食と洋食それぞれから代表的と思われる食品を7カテゴリーにわたって取り上げた。

カテゴリー	和食	洋食	中華
主食	ごはん (白米)	食パン	ごはん (白米)
主食	おにぎり	ピザ	シャオピン
主食	寿司	ハンバーガー	饅頭
主食	おこわ	チキンライス	チャーハン
主菜	焼き鮭	鮭のムニエル	焼き魚 (中華風)
主菜	唐揚げ	フライドチキン	ラーズジー
主菜	生姜焼き	ステーキ	中華風豚の角煮
副菜	漬け物	きゅうりのピクルス	たたききゅうり
副菜	おひたし	グリーンサラダ	野菜炒め
副菜	肉じゃが	マッシュポテト	じゃがいも千切り炒め
飲み物	緑茶	紅茶	緑茶 (中華風)
飲み物	日本酒	ワイン	白酒
汁物	味噌汁	コンソメスープ	鳥のスープ
麺類	うどん	スパゲッティ	素麺
デザート	たい焼き	アップルパイ	月餅

3. 3 結果と考察

3. 3. 1 UTI scale

UTI scale に対する回答の平均値は日本人男性 4.23 ± 2.36 , 日本人女性 4.01 ± 2.22 , 中国人男性 4.84 ± 2.43 , 中国人女性 4.80 ± 2.25 となり, 男性と女性の間, 日本人と中国人の間には有意な差が認められなかった。しかし日本人は9段階の真ん中である5よりも有意に低い数値であり, 中国人ではそのような傾向は見られなかったため, 今回の調査の日本人回答者はUTIに賛成しない傾向があったことがわかった。重回帰分析の結果, UTI傾向が高い日本人ほどBMIが高い傾向にあり($\beta = 0.163$, $SE = 0.105$, $t = 2.49$, $p < 0.05$), UTI傾向が健康問題に関わっていることが示唆された。一方, 中国人ではそのような傾向は見られなかった。

3. 3. 2 間接的な UTI

食物リストに対する嗜好と健康観に関連する調査結果において, それぞれの数値の間に負の相関が見られる(嫌いなものほど健康的であるとみなす傾向にある)とUTI傾向にあると考えられる。そこで, 日本人参加者において全食事に対する評定値の相関を求めたところ比較的弱いながらも有意な正の相関($r = 0.12$, $p < 0.05$)が見られた。そこで, 男性・女性, 和食・洋食の分類ごとに相関を求め

たところ, 男性・女性ともに洋食に対しては有意な相関($r = -0.80$, -0.59)は見られず, 和食に対しては有意な正の相関が得られた($r = 0.23$, $p < 0.05$)。中国人参加者においては, 全般的なおいしさと健康の間に有意な正の相関($r = 0.32$, $p < 0.05$)が見られ, この傾向はいずれの食事でも同じであった。これらの結果から, 今回の参加者はおいしさと健康についてトレードオフの関係にあるという態度を持っていることがわかった。

3. 3. 3 KAB 調査

今回の調査回答者は全体として塩分に対する知識を正しく持っていることがわかった(表 3)。特に塩分の過剰摂取が高血圧や腎臓病, 心臓病, 脳疾患などを引き起こす危険性があることへの知識は, 先行研究のオーストラリア人と同様に90%以上の人を持っていることがわかった。しかしながら, 塩分の主な摂取源に対する知識は日本人(正解は調味料)が57.1%だったのに対して, 中国人(調味料)は86.7%, オーストラリア人(加工食品)は95.5%とかなりの差が見られた。これらの間の差は有意(5%水準)であった。日本人の塩分の摂取源に関する知識は少ないことが明らかとなった。一方で, 塩分摂取傾向については日本人(89.2%)も中国人(90.3%)も同程度に基準よりも多いと考えていることも明らかとなった。しかしながら, 自分自

身の摂取量はどうかという質問に対しては、日本人は半数以上(62.8%)が多く摂取していると回答したが、中国人(37.2%)、オーストラリア人(28.2%)と半数以下であった。

また、塩分摂取に対する態度(表4)については、「塩分は食品をよりおいしくするために加える必要があると思う」という記述に対して日本人参加者の約3/4(76.5%)、中国人参加者の約2/3(66.4%)が賛同した。

一方、先行研究のオーストラリア人の回答は38.2%でしかなかった。一方で、日本人は「加工食品について塩分添加量を制限するような法律ができるべきだ」には賛同す

るものが少なかった(15.3%)。この設問には中国人の49.6%、オーストラリア人の50.6%が賛同していた。このような傾向は、塩分摂取過多の責任の所在にも現れており、日本人は塩分摂取過多の責任を摂取している本人のみ(自分自身:92.2%)に帰することが多かったのに対して、中国人やオーストラリア人はその責任を製造業者や食品販売業者、政府など外部要因に帰することが多かった(図1)。

これらのことから、今回の調査の日本人回答者は塩分摂取について比較的許容的な態度を持ち、その責任は摂取する本人の問題であると認識していることがわかった。

表3: 塩分の摂取に関する知識。

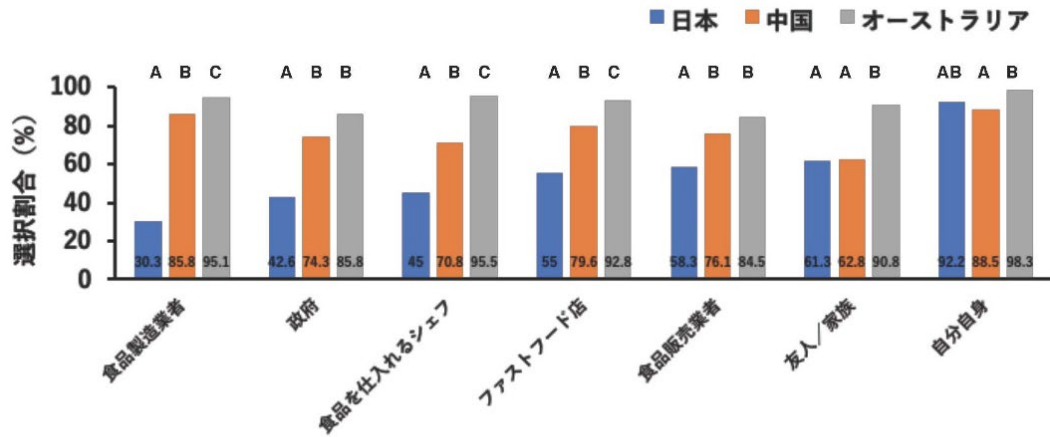
日本人は、塩分摂取過多に関する知識は持っているが、その摂取源に関する知識を正確に持っている割合は少ない。

設問 (正解)	日本 (n=231)	中国 (n=113)	オーストラリアの 若年層(n=252)	p値(カイニ乗検定) A, B, Cは異なる文字間 で有意差あり (p<.05)
一般的な日本人(中国人)の塩分摂取量 (多い, やや多い)	89.2% A	90.3% A	81.3% B	<0.05
塩分の主要な摂取源(調味料)	57.1% A	86.7% B	95.5%(加工食品) C	<0.001
基準値と比べた, 自身の摂取量(多い)	62.8% A	37.2% B	28.2% B	<0.001
塩分の過剰摂取は健康に悪い(はい)	91.7%	90.3%	91.3%	0.137

表4: 塩分摂取に対する態度。

日本人大学生は、塩分はおいしさに必要であると考えているが、塩分摂取を抑制しようとは思っていない。

	日本 (n=231)	中国 (n=113)	オーストラリア の若年層 (n=252)	p値(カイニ乗検定) A, B, Cは異なる文字間 で有意差あり (p<.05)
塩分は食品をよりおいしくするために加える必要がある	76.5% A	66.4% A	38.2% B	<0.001
塩分摂取量を減らせば, 健康が改善される	57.6%	60.2%	51.8%	0.151
外食をする際に, 塩分控えめのメニュー食が 中々利用できない, もしくは食べられるメニュー が制限されると思うことがある	34.6% A	69.0% B	54.2% B	<0.001
加工食品について塩分添加量を制限するような 法律ができるべき	15.2% A	49.6% B	50.6% B	<0.001



カイニ乗検定：A, B, Cは異なる文字間で有意差あり (p<.05)

図1：塩分の摂りすぎの責任の所在に対する態度。

日本人は食品製造業者や政府などが責任を持つという回答は少なかった。

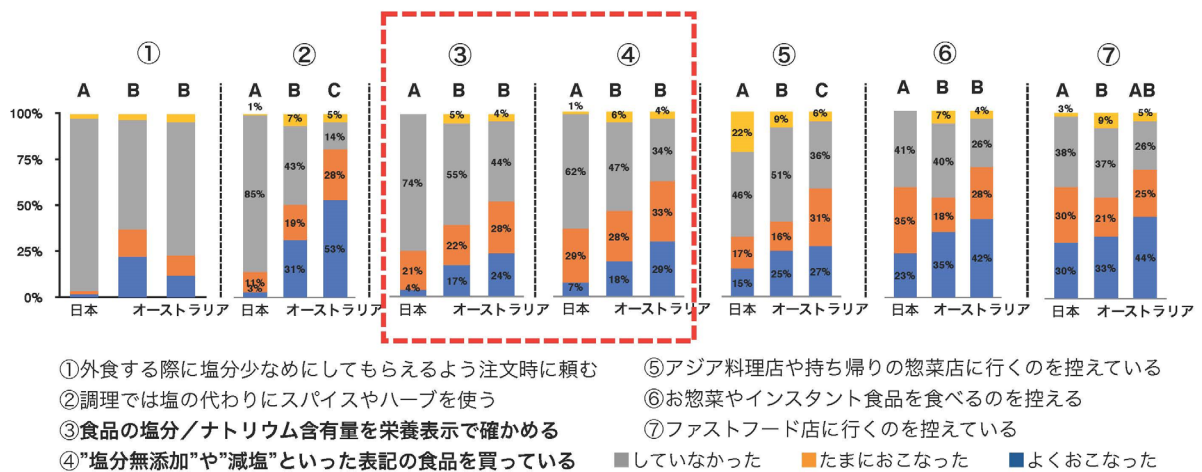


図2：塩分の摂りすぎを控えるための行動。

日本人は栄養表示や「減塩」表示に対する興味が低いことが見て取れる。

食塩関連行動では、今回の日本人参加者はあまり積極的に食塩摂取を抑制する傾向にはないことがわかった(図2)。例えば「食品の塩分やナトリウム含有量を栄養表示で確かめる」(「よく行なった」+「たまに行なった」=25.0%)、「調理では塩の代わりにスパイスやハーブを使う」(14.0%)、「「塩分無添加」や「減塩」といった表記の食品を買っている」(36.0%)などはいずれもオーストラリア人や中国人の行動に比べると顕著に低かった。その他の項目も押し並べて減塩行動を行っている日本人の割合は低く、ほぼ全て

の項目で中国人およびオーストラリア人よりも有意に低い割合となった。

これらの結果から、今回の日本人調査回答者は塩分に対する知識は持っているが、塩分については肯定的な態度を持っており、塩分を控える行動はあまり取っていないことが明らかとなった。これらの傾向が知識しかない若年層特有の傾向か、それとも実施に塩分摂取過多による健康問題を抱えている中高年層にも共通する特性かについては更なる調査が必要となる。しかしながら、実際の塩分摂取量がそれほど低下しない現状を鑑みると、日本人の

行動を減塩の方向へ誘導する必要があることは否めない。その誘導は知識を増やす方向に進めても効果がないことが本研究により明らかとなった。そこで、現在注目されているナッジ(nudge)を適用することで効果的な減塩行動に導くことができるか否かを検討してみたい。

4. 市販の減塩食に対する脳応答

4.1 背景と目的

減塩行動のナッジについては既に逸話的報告がなされている。例えば福島県では社員食堂やスーパーのお惣菜売り場などで、摂取者がわからないように1週間ごとに0.1%ずつの塩分量の削減を目指したと報告されている(令和3年)。しかしながら、この試みが成功したかどうか、削減が現在でも続いているかなどについては資料がない。また、青森県では従来品よりも12~59%減塩の惣菜を5品目開発し、そのPOSデータを調べたことが報告されている。この実験では「減塩」というラベルをつけずに、売場の商品をそのまま減塩食に置き換えて、売り上げが増減するかを調べたものである。その結果、売り上げが伸びたものもあれば減少したものもあること、その売り上げの増減は嗜好調査結果とは相関が見られなかったことなどが報告されている³⁾。これらの試みはいずれも「無意識の減塩」を目指した試みであるが、いまだに成功例には至っていないのが現状である。

一方、私たちは普段食事をする際、食品そのものではなく、そのパッケージやブランド、ラベル、イメージなどの情報も味わっている。ある報告⁴⁾では食品のパッケージなどの外部情報は食品についての期待を生み、食品の選択や知覚、好みに影響を与えることがわかった。コココーラとペプシコーラというブランドの異なるコーラを用いた実験⁵⁾では、ブランドを知らない状態でコーラを味わった際にはどちらのコーラも同様に好まれていたが、ブランドを知っている状態でコーラを味わった際にはコココーラの方が好まれるという結果が得られている。この他にもフェアトレードなどといった食品そのものに関係のないものでも影響を及ぼすことが示唆されている。このように私たちは食品本来の味から美味しさや好ましさを評価しているのではなく、食品の外部情報からその食品への期待を形成し、美味しさや好ましさの評価に影響を与えていることが多くの研究から示唆されている。

食品に付けられたラベルの効果を調べた研究⁶⁾では、オレンジジュースの甘味が、「非常に甘い」とラベル付けされることで、感じられる甘味の強さが増強したという結果を報告している。また、減塩ラベルの効果を調べた研究⁷⁾では、減塩ラベルのついたチキンスープは、ラベルのついていないチキンスープに比べて塩味の強さへの期待が低く評価された。これらのことから、食品の外部情報により与えられた情報は食品の味に対する予期に影響を与え、さらにそのものの味わいにも影響を与えると考えられる。

そこで本研究では、減塩スープ及び通常スープに対する味覚評定及びおいしさ評定が、提示されるパッケージの影響に左右されるか否かについて検証することを目的とした。もし、パッケージの影響が、スープの持つ味自体の影響よりも大きければ、上述のような「無意識」的な方法での減塩行動変化は生じにくいと考えられる。さらに、パッケージの影響よりもスープの持つ味の影響の方が大きければ、消費者は味の違いに気づき、減塩ラベルが貼っていない場合でも、その商品が減塩されていることに気づく可能性が高くなると予想される。

4.2 方法

4.2.1 参加者

日本国籍のある大学生および大学院生34名(うち女性16名、平均年齢20.6歳)が本実験に参加した。

4.2.2 刺激

通常のクノール®ふんわり玉子スープ(食塩相当量1.2g)と塩分30%カットのもの(食塩相当量0.7g)と通常のクノール®カップスープコーンクリーム(食塩相当量1.0g)と塩分40%カットのもの(食塩相当量0.48g)の計4種類のスープとそのパッケージを用いた。すべてのスープは沸騰するお湯を使って作成したのち、保温ボトルに入れ、恒温槽内で60°Cに保った。また、朝に作成したスープは午前中、正午及び午後3時に作成したスープは午後の実験に用い、残ったスープは作成後3時間以内に廃棄した。

4.2.3 評価

7件法リカートスケールを用いた。参加者は左端を1「まったく塩味を感じない」「まったくおいしくない」、右端を7「非常に強く塩味を感じる」「非常においしい」とする7段階評価の最も当てはまる数字を手元のテンキーで刺激の「塩味の強さについて」「おいしさについて」評価を行った。なお、参加者が入力した数字を評定値(1~7)として用いた。

4. 2. 4 計測

脳機能計測には島津製作所製の FOIRE-3000 を使用し、両側頭部に計測点として左右それぞれ 17 チャンネル (Ch) を設定した(図 3 上)。

4. 2. 5 手続き

スープを飲む練習を行ってから本実験に進んだ。練習中・本実験中において PC 画面上に表示する指示に従い課題を行った。本実験は、30 秒のレスト期間と 91 秒のタスク期間からなるブロックにより構成されていた。レスト期間において、参加者は指示があるまで安静に待機した。タスク期間において、はじめに画面上に表示されたパッケージを見(1 秒)、コップを口元へと持ち上げた(5 秒間)。それから画面の指示に従って、サンプルを口に含み(3 秒間)、飲み込んだ(2 秒間)。その後 60 秒の休息が設けられた。休息期間終了後に参加者は手元のテンキーを用いて評価を行なった(図 3 下)。これらの手続きを 12 刺激に対して一度ずつ行った。

4. 2. 6 分析手続き

主観評定データについて、パッケージの効果を検証するため、パッケージ(減塩・通常・無)、塩分含有量(減塩・通常)、スープの種類(玉子・コーン)の 3 要因分散分析を行った。さらに、味の濃さとおいしさとの関係を見るために、塩味の強さの評価とおいしさの評価で相関係数を求めた。また、fNIRS のデータに関しては、oxyHb の濃度変化について、t 検定を行い有意に(有意水準 0.05 で設定)活動があったチャンネルを調べた。

4. 3 結果と考察

主観評定の結果から、塩辛さとおいしさの間には有意な正の相関($r = 0.51, p < 0.001, N = 180$)が見られた。つまり、参加者は塩味をより強く感じるサンプルに対して、より高いおいしさを感じたということである。この結果から、先の節で述べた「塩分は食品を美味しくするために加える必要がある」態度を再確認することができた。

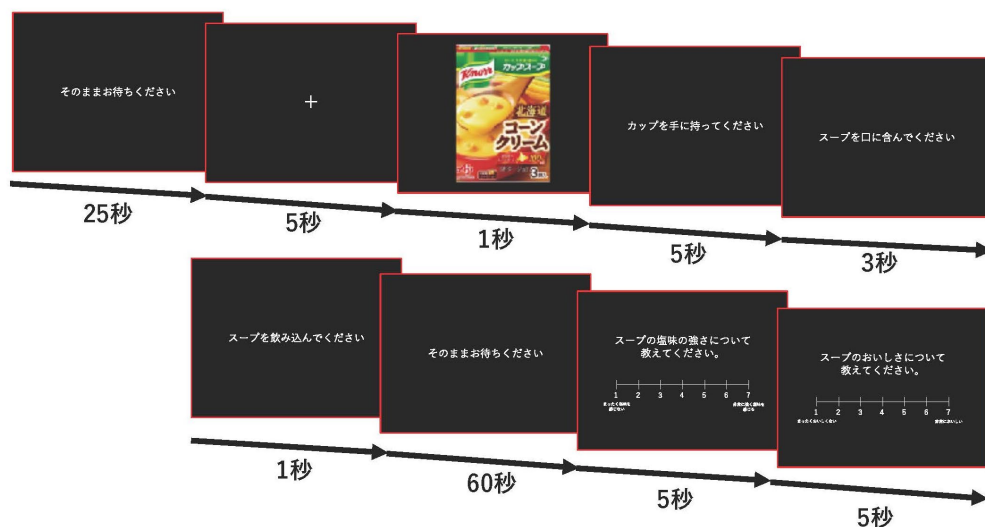
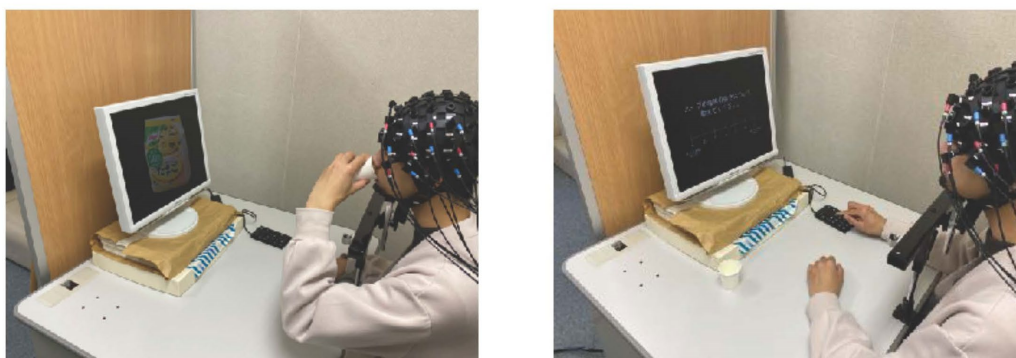


図 3: 減塩食に対する脳応答計測実験の手続き概要。

分散分析の結果から、おいしさ評定値において、スープの種類と塩分含有量の有意な交互作用が見られた ($F(1.176) = 5.178, p < 0.024$)。単純主効果検定の結果、卵スープでもコーンスープでも減塩スープは通常スープよりも有意においしくないと評価された ($p < 0.05$) (表 5, 図 4)。また、塩辛さ評定とおいしさ評定の両方で、スープの種類および塩分含有量の有意な主効果が見られた(表 6, 図 5)。これらの結果から、参加者は卵スープをコーンスープより、通常スープを減塩スープよりおいしく感じ、玉子スープをコーンスープより塩辛く、通常スープを減塩スープより塩辛く感じたことが明らかとなった。

また、パッケージの有無でおいしさ評定値にどのような変化が生じるかについて検討した結果、パッケージの有意な主効果及びパッケージと他の要因の有意な交互作用は見られなかった(表 5, 図 4)。つまり、パッケージを見えない状態で提示(ブラインド)しても、パッケージを開示しても、パッケージを入れ替えて提示しても、パッケージの有意な主効果は得られなかったことになる。一方で、スープが減塩か否かというスープの有意な主効果は一貫して得られた。つまり、大学生は舌のみで減塩商品か否かを判別し、かつ減塩商品をよりおいしくないと感じているが、パッケージの情報に左右されることは少ないことが明らかとなった。

これらのサンプルを味わっている時の脳活動を調べた結果、減塩スープを味わっているときに外側前頭前野に有意な血流の変化が見られることがわかった(図 6)。またこの脳部位は通常の(減塩食ではない)スープを飲んだときには活性化がみられなかった。我々の以前の研究 5)では、外側前頭前野は食塩水に醤油の香りを添加したものを飲んだときにも活性化をみせていたため、ヒトの外側前頭前野は食品を摂取したときに感じられる塩味の強さに関連することが示唆された。

パッケージの主効果及びパッケージと他の要因との交互作用に有意性 ($p < 0.05$) が見られなかったことから、パッケージはスープの味に対して影響を与えなかったと考えられる。この結果は先行研究 6, 7)とは異なる結果となった。今回の実験では、4 種類のスープとパッケージが繰り返し提示されたため、情報量が多すぎて参加者が処理できなかった可能性、及びスープと独立した形でモニター上に映し出されたパッケージの情報がその後提示されたスー

プの味と参加者が結びつけられなかった、つまりパッケージとスープの対応が希薄であった可能性などが考えられる。研究手法のブラッシュアップについては今後の検討課題である。

いずれにしても、本研究の結果から示唆されるのは、先行研究 3)が実施したように、減塩ラベルをつけずに、減塩した商品を通常商品と入れ替えることについては、おいしさの低下及びそれによる忌避という大きな問題を引き起こす可能性があるだろうということである。そのためには消費者が減塩であることに気づかないように感じられる「塩味」の増強を行うことあるいは「減塩」ラベルをつけたまま、消費者にナッジを促すという工夫が必要となる。

表 5: 減塩スープと通常スープに対するおいしさ評定の統計検定結果。

減塩スープは通常スープよりも一貫しておいしくないと評価された。また、通常スープではコーンスープの方が玉子スープよりもおいしいと評価されたが、減塩スープではそのような差は見られなかった。また、パッケージの記載(減塩か通常か)については有意な主効果や交互作用が見られなかったため、おいしさ評価には影響を与えなかったことがわかる。

	おいしさ	
	F	p
スープx減塩 交互作用	5.178	0.024
スープxパッケージ 交互作用	0.204	0.815
減塩xパッケージ 交互作用	0.613	0.543
スープの種類 主効果	0.104	0.747
減塩か否か 主効果	51.368	<0.001
パッケージ 主効果	0.204	0.815

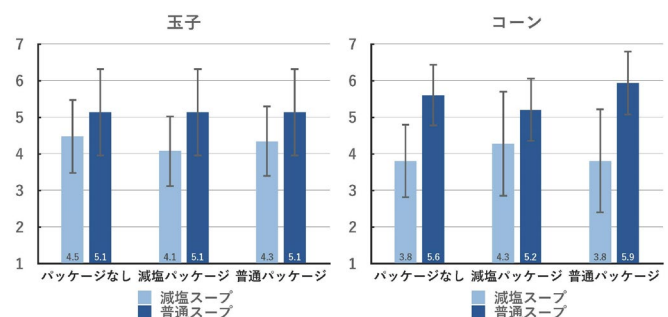


図 5: 塩味評定におけるパッケージの効果。

パッケージの主効果及び交互作用は有意ではなく、パッケージ表示による感じられる塩味の強さに変化はないことがわかる。

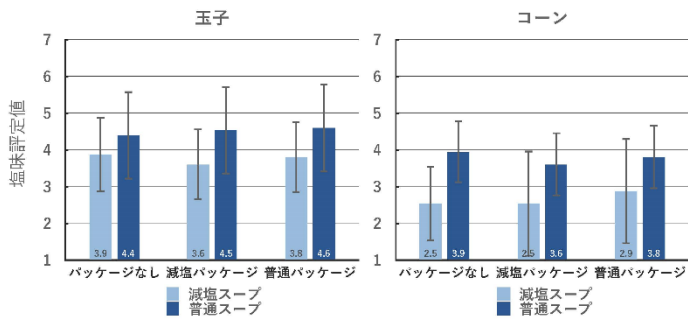


図 6: 減塩スープと通常スープを飲んでいる時の脳活動の比較。

減塩スープを飲んでいるときには通常スープに比べて前頭外側部及び前頭弁蓋部近傍の血流量が多いことがわかる。

5. 減塩食の塩味を増強する香料の選定

5.1 背景と目的

我々の研究から、バニラの香りや醤油の香りを添加することにより甘さや塩辛さがそれぞれ増強されることがわかっている^{8,9)}。また、この嗅覚と味覚の連合性は学習性の共感覚と呼ばれる現象で、日常生活の食経験により形成されることも知られている¹⁰⁾。

我々は、この嗅覚による味覚増強効果を通じて、減塩食の塩味を香りによって増強しようということを目指している。先に述べたように、一般大学生でも減塩食の塩味を弱く感じ、またおいしくないと感じるため、嗅覚による塩味増強効果を応用することで、減塩食のおいしさと味わいを改善できると考えた。そこで、本研究では、様々なスパイスなどを減塩食に添加し、その塩味とおいしさ及び違和感について官能評価を実施し、塩味増強効果を持つ香料を選定することを目的とした。

5.2 方法

5.2.1 参加者

日本国籍のある大学生および大学院生 9 名が本実験に参加した。

5.2.2 刺激

2 種類の濃度(普通のもの塩分 30%カットのもの)のクノール®ふんわりたまごスープおよび 2 種類の濃度(普通のもの塩分 40%カットのもの)のクノール®カップスープコーンクリーム計 4 種類のスープ、並びにそれらのパッケージを用いた。すべてのスープは沸騰するお湯を使って作成したのち、保温ボトルに入れ、恒温槽内で 60°C に保った。また、朝に作成したスープは午前中、正午及

び午後 3 時に作成したスープは午後の実験に使い、残ったスープは作成後 3 時間以内に廃棄した。香り刺激として、醤油、イワシ、ベーコン、オレガノ、パプリカ、セロリ、パセリ、レモングラス、チーズを用いた。それぞれの食材をすり下ろしたものをカップの蓋の裏側に設置し、その香りのみがスープカップに漂うように設置した。参加者は香りを嗅ぎながらスープを飲むように指示された。

5.2.3 評価

7 件法リカートスケールを用いた。参加者は左端を 1「まったく塩味を感じない」「まったくおいしくない」、右端を 7「非常に強く塩味を感じる」「非常においしい」とする 7 段階評価の最も当てはまる数字を手元のテンキーで刺激の「塩味の強さについて」「おいしさについて」評価を行った。なお、参加者が入力した数字を評定値(1~7)として用いた。

5.2.4 手続き

スープを飲む練習を行ってから本実験に進んだ。本実験では実験者の指示のもと、サンプルを口に含み、飲み込んだ後 60 秒の休息が設けられた。休息期間終了後に参加者はその塩味、おいしさ、香りと味の一致度に関する評価を行なった。

5.3 結果と考察

玉子スープに種々の香りを添加した時の評定値を図 7 に示した。また、コーンスープに対する評定値は図 8 に示した。これらの結果に 2 要因分散分析(スープの種類 x 香りの種類)を行なったところ、全ての評定値において有意な交互作用は得られなかった。そこで以下では、それぞれのスープごとに報告する。

玉子スープにおいて、塩味評価における有意な香りの主効果は見られなかった($F(9,80) = 1.50, p > 0.10$)。またおいしさ評定及び一致度評定においては有意な香りの主効果が見られた($F(9,80) = 7.81, p < 0.001$; $F(9,80) = 7.21, p < 0.001$)。そこで事後検定をしたところ、オレガノ、セロリ、レモングラスの香りを添加すると違和感を有意に強く感じ、おいしくなくなることが明らかとなった。なお、玉子スープの場合には減塩商品は、通常商品より、塩味が弱く、おいしくないと感じられる傾向にあったが、いずれもその差は有意ではなかった。

コーンスープの場合には、塩味 ($F(9,70)=3.01$, $p<0.01$), おいしさ ($F(9,70)=5.58$, $p<0.001$), 一致度 ($F(9,70)=9.73$, $p<0.001$) のいずれも有意な香りの主効果が見られた。事後検定の結果, 減塩商品は通常商品よりも有意に塩味が弱く, おいしくないと感じられていることがわかった。また, 香りの添加により有意に塩味が強く感じられるようになったサンプルはなかったが, ベーコンやチーズ, パセリなどの香りを添加されたサンプルは, 通常商品の塩味やおいしさと有意な差が見られず, 違和感もそれほど感じられなくなった。

これらの結果から, コーンスープについては, ベーコンやチーズ, パセリなどの香りを添加することで, 通常商品に遜色のない減塩商品を提供することが可能となる可能性が示唆された。一方で, 玉子スープではそのような効果を持つ香りが見つからなかった。今後, さらに香りの種類を広げて検証する必要がある。

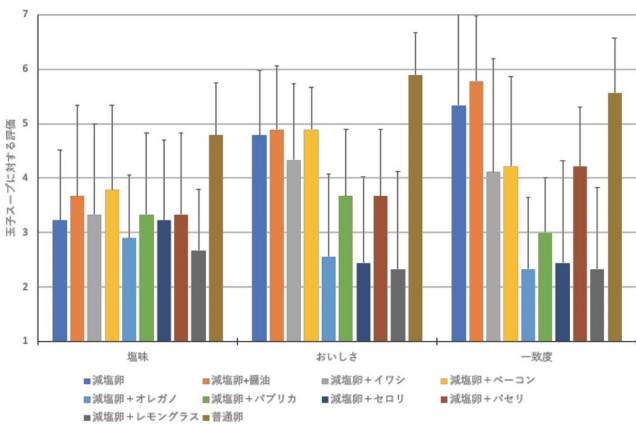


図 7: 玉子スープに種々のスパイスを混入した時の味の変化。

醤油香やベーコン香の添加により, 塩味が強く, おいしいと感じられる傾向にあるが, これらは統計学的には有意な変化ではなかった。

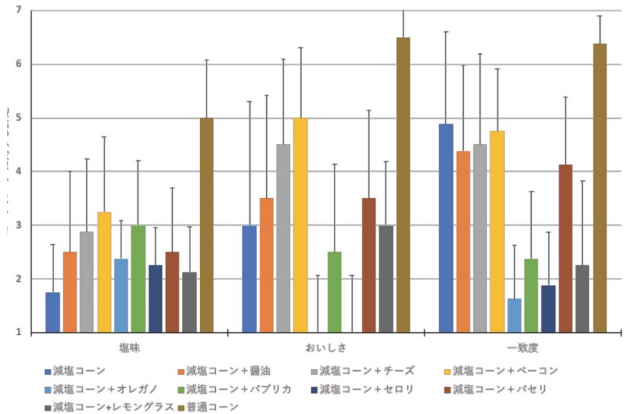


図 8: コーンスープに種々のスパイスを混入した時の味の変化。

チーズ香やベーコン香の添加により, 塩味が強く, おいしいと感じられる傾向にあるが, これらは統計学的には有意な変化ではなかった。

6. 減塩食パッケージに対する視線計測

6.1 背景と目的

健康に良い食生活を行うにあたって, どのように消費者をナッジするかということについては, 既にいくつか報告がある。例えば医療施設内のコンビニのカップ麺コーナーにおいて食塩含有量の少ない商品割合を増やし, 含有量の少ない順に手に取りやすい位置から陳列した上で 教育的に実際の食塩を用いて含有量を表示した研究では, 塩分のより少ないカップ麺の売り上げが上昇したことが報告されている¹⁾。一方で, スーパーの惣菜コーナーにおいて, 塩分含有量の少ない惣菜への商品転換を試みた研究では, 4 品目で売り上げを伸ばした商品が 4 品 (切干大根の煮物, うの花), 売り上げを下げた商品が 4 品 (ひじき煮, きんぴらごぼう) となった。加えてこの研究では, 嗜好調査も実施しているが, 必ずしも嗜好の低いものが売り上げを低下させたわけではないことが示されている³⁾。

これらの研究結果から, ナッジは単に既存の食品を減塩食品に入れ替えるというだけでは明確な効果はなく, 合わせて食塩の含有量を明示したり, 減塩食品を手に取りやすく配列することも必要であることが明らかとなった。そこで, 本研究では, 消費者の視線計測を行うことにより, 目につきやすい「減塩」ラベルの位置について研究を進めることとした。

6.2 方法

6.2.1 参加者

本実験には27人の大学生が参加した。すべての参加者は実験に関する説明を受けたのち、自発的に実験に参加する旨の同意書を作成した。

6.2.2 刺激と装置

視覚刺激として、市販の減塩商品のパッケージ及びそれぞれの商品の通常商品のパッケージ合計48種類を用いた。これらの減塩商品には「減塩」ラベルが青色または緑色で描かれていた。「減塩」ラベルは丸あるいは四角で囲まれており、その配置場所もパッケージ上の様々な位置に置かれていた(ただし右下と左下にラベルが位置した商品はなかった)。また、参加者の視線計測はアイトラッカー(Tobii X-120, 120Hz)を用いておこなった。アイトラッカーでは、最初にそのラベル付近に視線を動かすまでの潜時と、そのラベル付近に何度視線が送られるかの回数とラベル付近に視線が滞在する注視時間を計測した。

6.2.3 実験手続き

参加者は、PC画面上に提示されるパッケージを見て、そのパッケージに「減塩」ラベルがある場合にはJキーを、ラベルがない場合にはFキーをできるだけ早く押すように指示された。行動指標としてラベルの有無の正答率及び回答に要する反応時間を記録した。

6.2.4 分析

実験条件として、ラベルの色(青-緑)、ラベルの形(丸-四角)、ラベルのサイズ(大、小)、ラベルの位置(右上、上、左上、右、中、左、下)の2x2x7の条件が設定された。そのため、視線データ、行動指標のいずれも4要因の分散分析により統計検定の実施が前提となるが、市販のパッケージを使用したため、すべての条件を満たすことができなかった。そこで、本研究ではそれぞれの要因の主効果及び可能な範囲での交互作用に関する検定のみを実施した。

6.3 結果と考察

行動指標における正答率について、分散分析の結果、色と形の有意な主効果が認められた。色については青が98%、緑が96%の正答率となり、また形については丸が95%、四角が97%であった。これらの間にはそれぞれ有意な差($p < 0.05$)があった。なお、色と形の間には有意な交互作用はなかった。この結果については図9に示した。

反応時間については、色、形、サイズ、位置の各主効果いずれも有意であった。それぞれの結果については図10に示した。

また、視線データについて、ターゲット(減塩ラベル)をどのくらい注視していたかという注視時間について、結果をまとめたところ、色、形、サイズ、位置の各主効果いずれも有意であった。それぞれの結果については図11に示した。さらに、そのラベルに何度視線が注がれたかに関する注視回数についても色、形、サイズ、位置の各主効果いずれも有意であった。それぞれの結果については図12に示した。

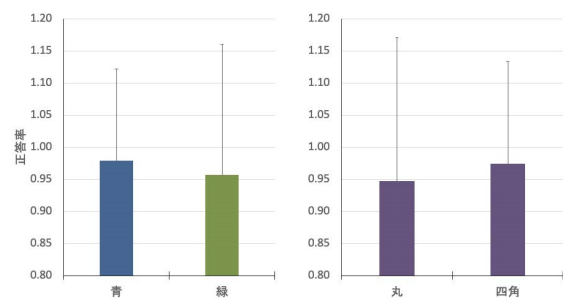


図9: 「減塩」ラベルの検知に関する実験結果。青ラベルは緑ラベルよりも、四角形ラベルは丸形ラベルよりも、それぞれ有意に検出率が高かったことがわかる。

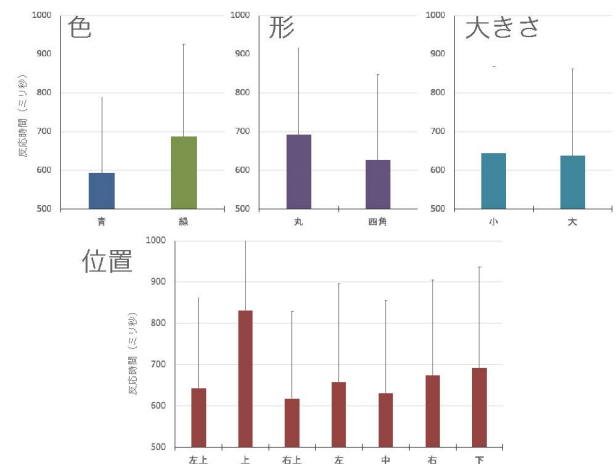


図10: 「減塩」ラベルの検知に関する実験結果。検出までの時間が短いほど早く目についたことを意味している。

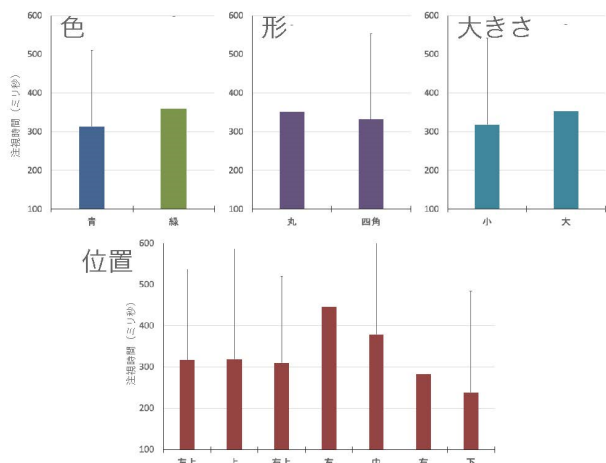


図 11: 「減塩」ラベルの検知に関する実験結果。注視時間が長いほどラベルに目が向いていたことを意味している。

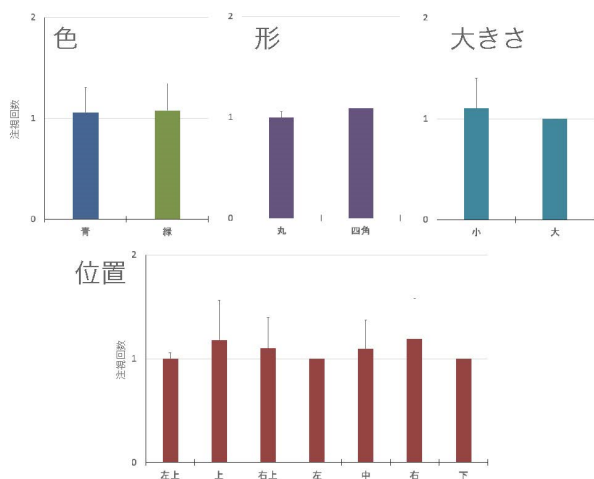


図 12: 「減塩」ラベルの検知に関する実験結果。注視回数が多いほどラベルに目が向いていたことを意味している。

これらの結果から、「減塩」ラベルはパッケージの中心上部に記載してあった時が最も早く目が届き停留時間も長いこと、四角形の青地ラベルであれば最も認知されやすく、目も留まりやすいことなどが示唆された。このような工夫を用いることにより、この商品が「減塩」であることが消費者に伝わりやすくなることが期待される。また、我々の研究¹²⁾で、「減塩」商品に対する一般人のイメージは、居住国に関係なく、健康食品全般に共通して想起される緑や淡いピンク色であることがわかっている。また同じ研究で、「塩味」の色イメージは異文化間で共通して白色や青色で

あることもわかっている。これらの色イメージを取り入れたパッケージイメージの形成も必要かもしれない。

一方、本研究では、実験刺激として市販のパッケージのみを用いたため、条件設定が十分でなく、また複数の要素が同時に異なる刺激を用いた実験となった。今後、試作パッケージなど、実験条件を十分に検討できる実験が必要とされる。

7. まとめ

本研究では、日本人の減塩に対する知識・態度・行動に関する調査¹³⁾、減塩食の味知覚と脳応答計測実験¹⁴⁾、塩味を増強させる香料の選定、減塩食パッケージに対する視線計測実験¹⁵⁾などを行った。これらの研究から、日本人は減塩に対する知識は十分にあるが、行動に移せていないこと、減塩食の味は通常食とは全く異なるように認知されていることなどがわかった。そこで、より塩味を感じ、よりおいしい減塩商品であることが明確なパッケージを持つ食品を提供することが日本人の減塩行動につながることを示唆された。

8. 文献

1. R. Raghunathan et al.: J. Market., 70, 170-84 (2006)
2. C. A. Grimes et al.: BMC Public Health, 17, 532 (2017)
3. 吉池信男: ナッジ x ヘルスリテラシー (村山洋史ら編), pp.80-81, 大修館書店 (2022)
4. R. Deliza & H.J.H. MacFie: J. Sens. Stud., 11, 103-128 (1996)
5. S.M. McClure et al.: Neuron, 44, 379-387 (2004)
6. A.T. Woods et al.: NeuroReport, 22, 365-369 (2011)
7. D.G. Liem et al.: Food Qual. Pref., 25, 192-197 (2012)
8. T. Onuma et al.: Chem. Senses, 43, 151-167 (2018)
9. N. Sakai et al.: Percept. Motor Skills, 92, 1002-1008 (2001)
10. 坂井信之: 味と匂誌, 16, 171-178 (2009)
11. 川畑輝子ら: フードシステム研究, 27, 226-231 (2021)
12. A. Raevskiy et al.: HCII 2022, LNCS 13311 (P.-L. P. Rau Ed.), pp. 378-395 (2022)
13. 齋田涼裕他: 日本健康心理学会第 34 回大会ポスター発表 (2021)

14. 張政嘉ら: 日本味と匂学会第 56 回大会ポスター発表
(2022)

15. Husile et al.: Poster presented at The Joint International
Symposium on “Health and Well-Being”. (2022)

The Cognitive Mechanisms and Application of the Salt-Enhancement Effect Applied to the Low Sodium Foods

Nobuyuki Sakai^{1,2}, Takuya Onuma³

¹Department of Psychology, Tohoku University

²Advanced Institute for Yotta Informatics, Tohoku University

³Faculty of Humanity-Oriented Science and Engineering, Kindai University

Summary

This study aimed to promote acceptance of low-salt foods in Japanese people. For this aim, two surveys and three experiments are introduced here.

1. A survey about knowledge of, attitude to, and behavior for low-salt foods in Japanese participants. The results showed that Japanese participants have enough knowledge about low-salt foods, and a positive attitude to them. However, the participants did not show a tendency to choose them in their daily lives. Those results were compared with those of Chinese university students and with Australian young people, and showed unique attitude to salt-reducing in Japanese university students.

2. A survey about color images of low-salt foods. The Japanese participants showed association between blue colors (steel blue, cadet blue, medium turquoise and so on) with salt taste, but green colors (medium seagreen, medium aquamarine, green yellow and so on) with low sodium foods. The contradiction of knowledge and attitude for low-salt foods with behavior for purchasing them can be explained by the results.

3. An experiment about comparing of brain responses evoked by low-salt foods with those by normal foods. In this experiment, participants asked to ingest low-salt soup or normal soup, and to evaluate their salt intensity. The results showed that the participants can discriminate low-salt foods from normal foods even in blinded condition. The analysis of the brain data has been continuing.

4. An experiment aimed to find the best flavor that enhances salt taste was executed. In this experiment, the participants tasted and evaluated several low-salt soups, each of those was added a flavor. The result showed that some flavors, such as sardine, bacon, cheese, showed salt enhancement, but the enhancement was not statistically significant. We are still finding some flavors that enhance salt taste and palatability of low-salt soup.

5. An experiment with eye-tracker was done to reveal the saliency of the “low-salt” label. The results revealed that the “low-salt” label can be found easily by the consumers when the label is placed on the upper-center of the package in blue color.

We found that the Japanese consumers have enough knowledge for salt reduction, but they do not behave to reduce salt-intakes. It is suggested that for reducing salt-intake in Japanese people, we should develop palatable salt-reduced foods, and provide them with salient “low-salt” label. Thus, we should use sensory-nudge in health promotion in Japan.

塩分制御による発酵米糠・小麦ふすまの風味・健康機能性の向上

白川 仁¹, 小関 卓也²

¹ 東北大学大学院農学研究科, ² 山形大学農学部

概要 米糠や小麦ふすまは、ビタミンをはじめとして、多くの有効成分を含み、健康機能性が高いことが認識されている。我々は、米糠を麹カビと乳酸菌による発酵によって、米糠のもつ独特なフレーバーを改善することに加えて、フェノール化合物、機能性遊離アミノ酸や食物繊維の含量を増加させることに成功し、病態モデル動物での症状改善効果を示してきた。麹カビは醤油や味噌の発酵に利用されており、食塩が含まれている状態での発酵である。本研究では、食塩の添加による環境の変化がカビの物質生産、特に生理活性成分産生に及ぼす影響を調査し、発酵物の機能性を評価した。食塩存在下で米糠をカビで発酵させ、発酵物中の糖質分解酵素の酵素活性を測定したところ、クモノスカビの場合、食塩の添加により α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性が大きく減少した。麹カビの場合も同様に、食塩濃度の増加によって両酵素活性が大きく減少したが、キシラナーゼ活性は食塩添加によって上昇傾向であった。また、小麦ふすまを麹カビで発酵させた場合、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、キシラナーゼ活性は食塩添加で上昇する場合もあったが、米糠のように活性が低下することはなかった。一方、クモノスカビ発酵物においては、高濃度の食塩添加で、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性の急激な減少がみられた。一方、キシラナーゼ活性は、食塩添加によって上昇がみられた。食塩添加によるキシラナーゼ活性の上昇は、塩分添加によって分子間エステル結合が解離して繊維の膨潤が促進し、これにより細胞壁の微細構造へのカビ菌糸の浸透が増加したため、キシラナーゼ産生が促進したと考えられた。カビが産生する二次代謝物についてみると、クモノスカビではアデニン、エルゴチオネイン、ベタインが食塩の添加濃度依存的に増加した。麹カビ米糠発酵物ではエルゴチオネイン、コリン、デカン酸などが増加し、フェルラ酸、 γ -アミノ酪酸は低下した。以上のことから、カビに食塩を添加した条件で小麦ふすまや米糠を発酵させた場合、健康機能性の高い物質の産生を高めることが可能であると考えられた。

食塩存在下で米糠をカビで発酵させ、発酵物中の糖質分解酵素の酵素活性を測定したところ、クモノスカビの場合、食塩の添加により α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性が大きく減少した。麹カビの場合も同様に、食塩濃度の増加によって両酵素活性が大きく減少したが、キシラナーゼ活性は食塩添加によって上昇傾向であった。また、小麦ふすまを麹カビで発酵させた場合、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、キシラナーゼ活性は食塩添加で上昇する場合もあったが、米糠のように活性が低下することはなかった。一方、クモノスカビ発酵物においては、高濃度の食塩添加で、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性の急激な減少がみられた。一方、キシラナーゼ活性は、食塩添加によって上昇がみられた。食塩添加によるキシラナーゼ活性の上昇は、塩分添加によって分子間エステル結合が解離して繊維の膨潤が促進し、これにより細胞壁の微細構造へのカビ菌糸の浸透が増加したため、キシラナーゼ産生が促進したと考えられた。カビが産生する二次代謝物についてみると、クモノスカビではアデニン、エルゴチオネイン、ベタインが食塩の添加濃度依存的に増加した。麹カビ米糠発酵物ではエルゴチオネイン、コリン、デカン酸などが増加し、フェルラ酸、 γ -アミノ酪酸は低下した。以上のことから、カビに食塩を添加した条件で小麦ふすまや米糠を発酵させた場合、健康機能性の高い物質の産生を高めることが可能であると考えられた。

1. 研究目的

我が国における米の生産量は、約727万トン(2022年、玄米ベース)であり、その10%が米糠である。米を主食としている東アジア、東南アジア、中央アジアの諸外国と比べて、我が国では米糠の利用が高度に進んでおり、米糠油の抽出・製造、家畜の飼料、キノコ類の菌床栽培に使われているほか、米糠に豊富に含まれる健康機能性の高い γ -オリザノール、フェルラ酸、トコリエノール、植物ステロール、イノシトールなどの製造原料としても用いられている^{1,2)}。我々の研究グループにおいても、脱脂した米糠を、セルラーゼなどを含む糖質分解酵素 *Driselase* で消化した処理物が、インスリン抵抗性、高血圧症を示すモデル動物の病態改善作用を有することを示してきた^{3,4)}。さらに、処理物中に含まれる健康機能性を有する活性成分の分離・同定を試み、アデノシンやトリプトファンが疾患モデル動物の血圧や血糖値を改善することを示した⁵⁻⁸⁾。アデノシンやトリプトファンは、未処理の脱脂米糠にも含まれているが、酵素処理により顕著に増加した。しかし、米糠は劣化しやすいことや米糠特有の臭いにより、その利用方法が限定されている。

米糠のさらなる高度利用を目的として、我々は米糠フレーバーの改善に取り組み、米糠を醤油、みそ、清酒などの醸造用麹カビと乳酸菌で発酵させることで、米糠臭を改善するとともに、微生物による有用二次代謝物を含む新規の発酵米糠(FRB)を開発し⁹⁾、健康機能性についてモデル動物を用いて検証してきた。

まず、脳卒中易発性高血圧ラット(SHRSP)に与えたところ、本動物が示す加齢に伴う血圧上昇が抑制され、インスリン抵抗性の改善(血中グルコース、インスリン濃度の低下)がみられた⁹⁾。FRBによる血圧上昇抑制の作用機構について解析したところ、FRBは血圧の上昇に関わるアジオテンシン変換酵素に対する阻害活性を上昇させて降圧効果を示すと考えられた。脂肪細胞由来のアディポネクチンは、その受容体を介して様々な作用を示すが、FRBの給餌によって、血中のアディポネクチン濃度が上昇して、肝臓AMP依存性キナーゼが活性化することによってインスリン抵抗性が改善して、血中のグルコース、インスリン値を低下させたと考えられた⁹⁾。

潰瘍性大腸炎やクローン病は代表的な炎症性腸疾患であり、食生活を含む近年のライフスタイルの変化によ

てその患者数は増加している¹⁰⁾。腸内マイクロバイームを含む腸内環境が疾病の発症や増悪に大きく関与していることから、腸内環境を整えるプロバイオティクスやシンバイオティクスによる病状の改善が報告されている¹¹⁾。FRBをデキストラン硫酸ナトリウム誘発の大腸炎モデルに投与した場合、下痢や血便などの大腸炎症状の予防効果がみられた¹²⁾。また、大腸炎誘導後にFRBを与えた場合、症状の早期回復効果や炎症による大腸の線維化の抑制も観察された¹³⁾。さらに、炎症性腸疾患の患者は、腸炎の発症と寛解を繰り返す場合が多いことが知られ、消化管外の組織においても炎症症状を示して、肝臓、筋肉、脳などで炎症に起因する病状(肝障害、サルコペニア、神経炎症)がみられる。これらの腸管外での炎症性合併症のモデルを作成し、FRBの効果を検証したところ、消化管以外の炎症症状を効果的に抑制することが明らかとなった¹⁴⁾。発酵によって増加するトリプトファンに着目して解析を進めたところ、トリプトファン食餌餌により大腸炎が抑制すること、このトリプトファンの作用がアリアル炭化水素受容体(AHR)を介して発揮されることを示した¹⁵⁾。加えて、FRBに豊富に含まれるトリプトファンの微生物代謝物であるトリプタミンもAHRを介して、抗炎症作用を示すことも明らかにした¹⁶⁾。さらに、糖尿病性のサルコペニアモデルにおいて、FRBの給餌は筋特異的ユビキチンリガーゼ(*Atrogin-1*, *MuRF1*)の発現量を減少させて、糖尿病に伴う筋萎縮を抑制することを示した¹⁷⁾。

以上の結果より、FRBは種々の疾病モデル動物を使用した前臨床試験において、高い健康機能性を有することが示されている。麹カビは醤油や味噌の発酵に利用されており、食塩が含まれている状態での発酵である¹⁸⁾。食塩存在下での発酵により麹菌由来のプロテアーゼ活性や揮発性成分が変化することが示されている¹⁹⁻²¹⁾。小麦は米に次ぐ生産量を誇る穀物で、世界で7.6億トン(2020年)生産されており、精麦により全粒の15%が小麦ふすまとなる。小麦ふすまは、食物繊維の含量が高く(約40%)、リン、カリウム、マグネシウムなどのミネラルを豊富に含んでいる²²⁾。

本研究では、米糠と小麦ふすまを麹カビまたはクモノスカビで発酵させ、食塩の添加による生理的環境の変化による物質生産、特に生理活性成分の産生に及ぼす影響を調査し、発酵物の健康機能性について評価を行なった。

2. 研究方法

2.1 食塩存在下での米糠、小麦ふすまの発酵

発酵米糠、および小麦ふすま(15 g)に精製水 15 mL を加えて、オートクレーブ処理した。サンプルが常温に戻ったのち、インドネシア産のテンペから分離したクモノスカビ (*Rhizopus* sp.)、または麴カビ (*Aspergillus oryzae*)を植菌し、30°Cで 2 日間、インキュベーションした。その後、発酵物の一部を取り分け、酵素活性測定用のサンプルとした。残りの発酵物に 65°Cの熱水を添加して、65°Cで 8 時間抽出を行ない、発酵抽出物を得た。抽出物を成分分析、動物試験のサンプルとした。食塩添加時の発酵は、精製水を食塩水に変え、前述と同様に培養して抽出物を得た。

また、動物試験用の発酵小麦ふすまは次の通り調製した。小麦ふすま(300 g)に食塩を含む精製水(0.625%)を 240 mL 加えて、オートクレーブ処理した。サンプルが常温に戻ったのち、クモノスカビ(テンペスターター、1.5 g)を植菌し、30°Cで 2 日間、インキュベーションした。次に、65°Cの熱水(1.5 L)を添加して、65°Cで一晩糖化处理を行った。その後、糖化物を凍結乾燥し、動物試験用のサンプルとした。

2.2 発酵物中の酵素活性

発酵終了後、発酵物から粗酵素液を調製して、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、キシラナーゼの酵素活性を測定した。発酵物に 10 倍量の 0.1%食塩含有酢酸緩衝液(10 mM, pH 5.0)を加え、4°Cで一晩放置した。これを濾過し、酢酸緩衝液(10 mM, pH 5.0)に対して透析を行ない、透析液を粗酵素液とした。 α -アミラーゼ、およびグルコアミラーゼ活性はデンブロン(0.5%)を基質として、粗酵素液を反応させた後、反応で生成した糖をそれぞれジニトロサリチル酸法、ムロターゼ・グルコースオキシダーゼ法により測定した。また、キシラナーゼ活性は、キシラン(0.5%)を基質として、粗酵素液を反応させた後、反応生成糖をジニトロサリチル酸法で測定した。

2.3 発酵抽出液中の機能性成分の解析

発酵抽出液中の成分について、キャピラリー電気泳動(CE)ー質量分析機(MS)を用いて、網羅的に解析を行った。CEは 1 M ギ酸、または 20 mM ギ酸アンモニウムを電解質としてシリカキャピラリー(内径 50 μ m, 全長 100 cm)中で泳動した。得られたデータは、MS 添付の解析ソフトウェア(Agilent Analyst QC Software)で解析した。

2.4 発酵小麦ふすま抽出液の健康機能性(血圧低下作用)の解析

脳卒中易発性高血圧自然発症ラット(Stroke prone spontaneous hypertensive rat; SHRSP)(12 週齢, 雄)を使用した。16 時間絶食後、発酵抽出液を単回経口投与し、経時的に血圧を測定するとともに、血液を尾静脈から採取した。得られた血液サンプルを用いて、グルコース、トリグリセリド濃度を酵素発色法により測定した。

2.5 発酵小麦ふすま抽出液の健康機能性(潰瘍性大腸炎抑制)の解析

C57BL/6N マウス(11 週齢, 雄)にコントロール食(AIN93M 標準食, Con), 10%小麦ふすま食(WB), 10%発酵小麦ふすま食(FWB), 10%食塩添加(1%)発酵小麦ふすま食(F10)を 4 日間与えた後、飲水を 3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)溶液に換え、9 日間与え、大腸炎を誘発させた。飼育期間中、体重、DAI(disease activity index; 疾病活動指数、体重変化、下痢と血便で評価)を測定した。飼育終了後、解剖に供し、血清、組織、盲腸内容物、糞便を採取した。結腸の炎症・損傷評価を組織学的解析によって行った。また、結腸における酸化ストレスについて TBARS 値を測定して評価した。さらに、消化管内容物や糞中の短鎖脂肪酸(酢酸、酪酸、プロピオン酸)を HPLC 法によって分析した。

2.6 発酵小麦ふすま抽出液の健康機能性(糖尿病性筋萎縮抑制)の解析

SD ラット(8 週齢, 雄)にストレプトゾトシン(STZ, 40 mg/kg BW)を腹腔内投与し、I型糖尿病モデル動物を作成した。動物を 4 群に分け、コントロール食(AIN93M 標準食, STZ), 10%小麦ふすま食(STZ+WB), 10%発酵小麦ふすま食(STZ+FWB), 10%食塩添加(0.5%)発酵小麦ふすま食(STZ+NaCl FWB)を 4 週間与えた。糖尿病を誘発させていない動物にコントロール食を与えた群(Control)も設け、同様に 4 週間飼育した。飼育期間中、体重、摂食量、前足の握力を測定した。飼育終了後、解剖に供し、血液、組織(肝臓、副睾丸周囲脂肪、ヒラメ筋、長趾伸筋、前脛骨筋、足底筋、腓腹筋)を採取した。得られた血液を用いて、血中のグルコース、インスリン濃度を測定した。

3. 結果・考察

3.1 食塩存在下での米糠、小麦ふすまの発酵

食塩存在下で発酵する食塩の上限濃度を決定したところ、米糠では 1.0%、小麦ふすまでは 2.0%であった。以降の試

験では、米糠の発酵は、食塩濃度 0.5, 1.0%で、小麦ふすまの発酵は食塩濃度 1.0, 2.0%の条件で発酵させたサンプルを用いて解析を行なった。

3.2 発酵物中の酵素活性

α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、キシラナーゼは、いずれもカビにより生産される糖質分解酵素である。 α -アミラーゼは、デンプンの α -1,4 グルコシド結合を糖鎖内部から分解するエンド型酵素であるが、 α -1,6 結合は分解しない。グルコアミラーゼは、デンプンの非還元末端から分解を行うエキソ型酵素であり、 α -1,4 結合だけでなく、 α -1,6 結合も分解する。キシラナーゼはヘミセルロースのひとつであるキシランを構成するキシロースの β -1,4 結合を切断するエンド型酵素であり、水溶性食物繊維であるアラビノキシランを生成する。

米糠、小麦ふすまを麹カビ、およびクモノスカビで発酵させ、発酵物中の各酵素活性を測定したところ、米糠発酵物に比べ、小麦ふすま発酵物でいずれの酵素活性が高かった (Figure 1~Figure 3)。このことから、カビを用いた発酵では、米糠に比べ、小麦ふすまが適していると考えられた。米糠は小麦ふすまに比べ、多孔質であり細胞壁が薄い。このことは、自由水の減少や酸素供給を低下させ、カビの生育が米糠表面に限定されることとなり、酵素生産が低下したと推定された。

食塩存在下で、米糠をクモノスカビ、および麹カビで発酵させ、発酵物中の α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、 β -グルコシダーゼ、キシラナーゼの酵素活性を測定した。クモノスカビの場合、食塩の添加による菌体増殖抑制に伴い、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性が大きく減少した (Figure 2)。一方、キシラナーゼの活性は高い食塩濃度で、活性が上昇する場合があった。小麦ふすまの麹カビ発酵物では、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、キシラナーゼ活性は食塩添加で上昇する場合もあったが、米糠のように活性が低下することはなかった (Figure 3)。米糠のクモノスカビ発酵物では、食塩の添加による菌体増殖抑制に伴う、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性の大きな減少が観察された (Figure 4)。キシラナーゼ活性は、食塩添加によって上昇傾向であった。小麦ふすまのクモノスカビ発酵物においては、1.0%食塩添加で、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼの活性はコントロールと変わらなかったが、2.0%で活性の急激な減少が見られた。一方、キシラナーゼ活性は、1.0%で上昇が見られた (Figure 5)。キシラナーゼ活性の上昇は、塩分添加によって分子間エステル結合が解離して繊維の膨潤が促進し、これにより細胞壁の微細構造へのカビ菌糸の浸透が増加したため、キシラナーゼ産生が促進したと考えられた。

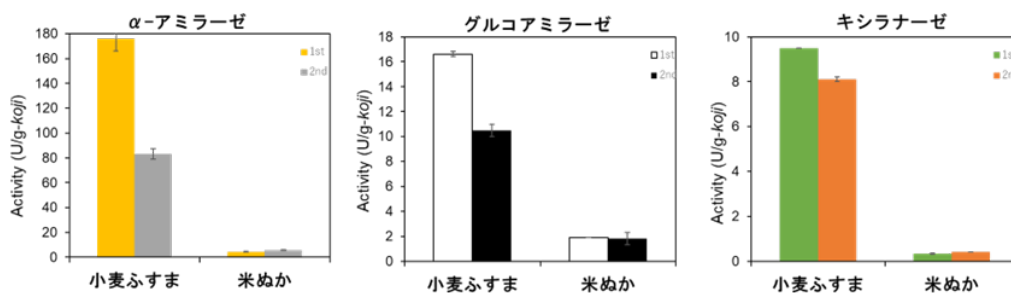


Figure 1. 小麦ふすま、米糠をクモノスカビで発酵させた発酵物の糖質分解酵素

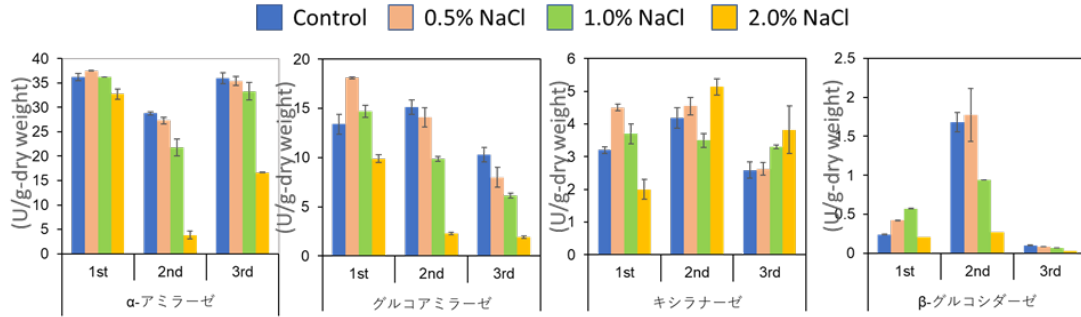


Figure 2. 米糠を *A.oryzae* RIB128 で発酵させた場合の糖質分解酵素産生に及ぼす NaCl 添加の影響

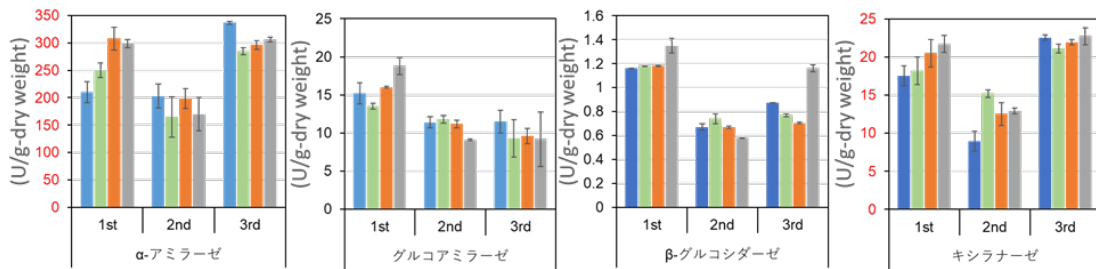


Figure 3. 小麦ふすまを *A.oryzae* RIB128 で発酵させた場合の糖質分解酵素産生に及ぼす NaCl 添加の影響
右から Control, 0.5% NaCl, 1.0% NaCl, 2.0% NaCl

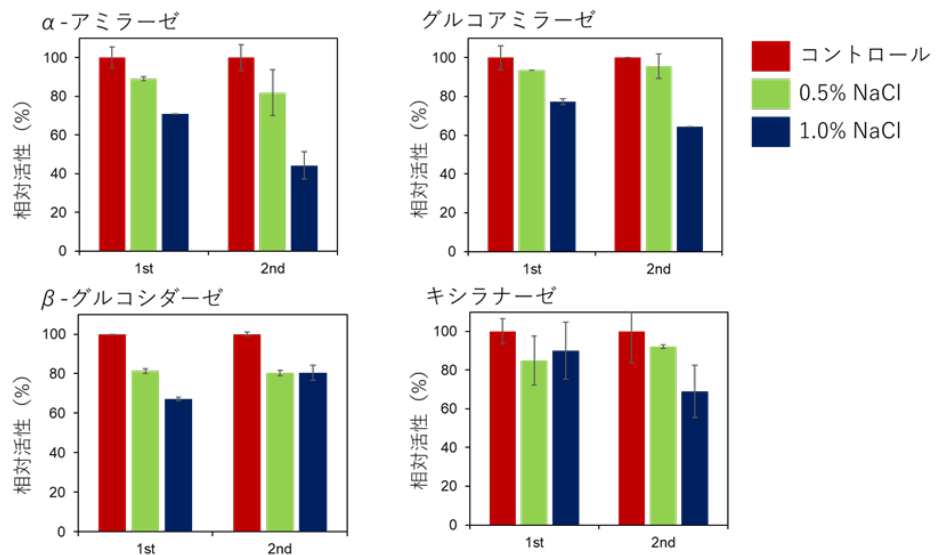


Figure 4. 米糠をクモノスカビで発酵させた場合の糖質分解酵素産生に及ぼす NaCl 添加の影響

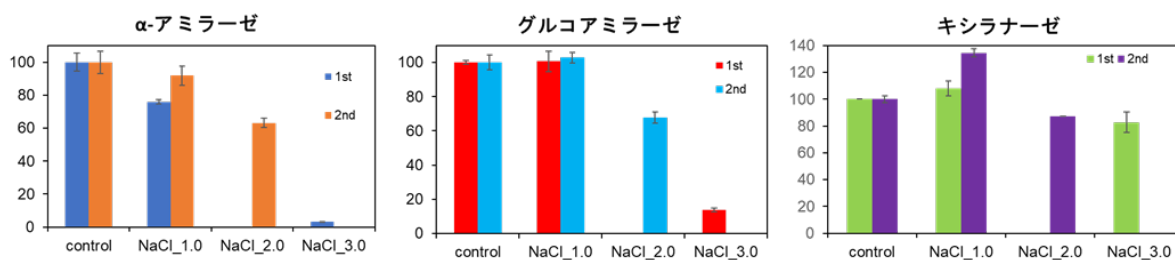


Figure 5. 小麦ふすまをクモノスカビで発酵させた場合の糖質分解酵素産生に及ぼす NaCl 添加の影響

3.3 発酵米糠抽出液中の機能性成分の解析

小麦ふすまとそのクモノスカビ発酵物について、メタボローム解析を行なった。発酵、未発酵間で存在量が大きく変化した 50 種の化合物を Figure 6 に示した。以前に行なった麴カビ (*Aspergillus kawachii*) で同様の発酵を行なった結果と合わせて示しているが、多くのアミノ酸が両発酵物において増加していた。小麦ふすまタンパク質がカビから分泌されるプロテアーゼによって消化され、遊離アミノ酸が増加すると推定された。食塩存在下での小麦ふすまクモノスカビ発酵物のメタボローム解析結果を Figure 7 に示した。 γ -アミノ酪酸 (GABA) は発酵により増加したが、食塩を添加することによって低下した。同様の変化が有機酸 (リンゴ酸、フマル酸、コハク酸、ピルビン酸) 量に見られた。一方、遊離アミノ酸量も食塩添加によって変化していたが、その変化はわずかであった。これらのことから、食塩の添加はクモノスカビの生育に影響を与えているが、分泌される総プロテアーゼ量には大きく影響しないと推定された。また、抗酸化能をもち、健康機能性が高く評価されているフェルラ酸が、食塩無添加と比べ、1.0%添加で 2 倍、2.0%添加で 1.3 倍に上昇した²⁰⁾。さらに、カビ特異的な生産物であるエルゴチオネインが、食塩無添加と比べ、1.0%添加で 2 倍上昇し、2.0%添加で 0.5 倍となった。エルゴチオネインは、ヒスチジンの代謝物で抗酸化作用を持ち、酸化ストレスによる細胞障害の保護効果を有している²³⁾。

以上のことから、1.0%食塩添加条件で、クモノスカビで小麦ふすまを発酵させた場合、健康機能性の高い物質の産生を高めることが可能であると考えられた。

米糠の麴カビ、クモノスカビ発酵物のメタボローム解析においても、多くの遊離アミノ酸量が発酵によって増加した。即ち、クモノスカビ発酵物では、食塩添加 (0.5%) によって、アラニン、グルタミン酸、トリプトファン、分枝アミノ酸などが増加していた。一方、麴カビ発酵物では、食塩添加によってアスパラギン、システイン、グルタミン酸、グルタミンなどが増加していた。

次に、カビが産生する二次代謝物についてみると、クモノスカビでは、アデノシン、エルゴチオネイン、ベタインが食塩の添加濃度依存的に増加した (Figure 8)。麴カビ発酵物では、エルゴチオネイン、コリン、デカン酸などが増加し (Figure 9)、フェルラ酸、 γ -アミノ酪酸 (GABA) は低下した (Figure 10)。アデノシンは、糖質分解脱脂米糠の有効成分として我々が同定した物質で、血圧低下、インスリン抵抗性改善作用を有している⁵⁻⁷⁾。両発酵物ともに、食塩の添加によって解糖系や TCA 回路に関与する一次代謝物が減少していたことから、代謝経路の中間体であるアミノ酸やその他の二次代謝物の合成が亢進した可能性が示唆された。また、食塩添加による浸透圧ストレスに対して、浸透圧を調整するためにアミノ酸の合成や蓄積が上昇した可能性も考えられる。



Figure 6. 発酵小麦ふすまのメタボローム解析
発酵により変化した成分(上位 50 種)を示した。

WB: 小麦ふすま, FWB_R: 発酵小麦ふすま(*Rhizopus oligosporus*), FWB_K: 発酵小麦ふすま(*Aspergillus kawachii*)

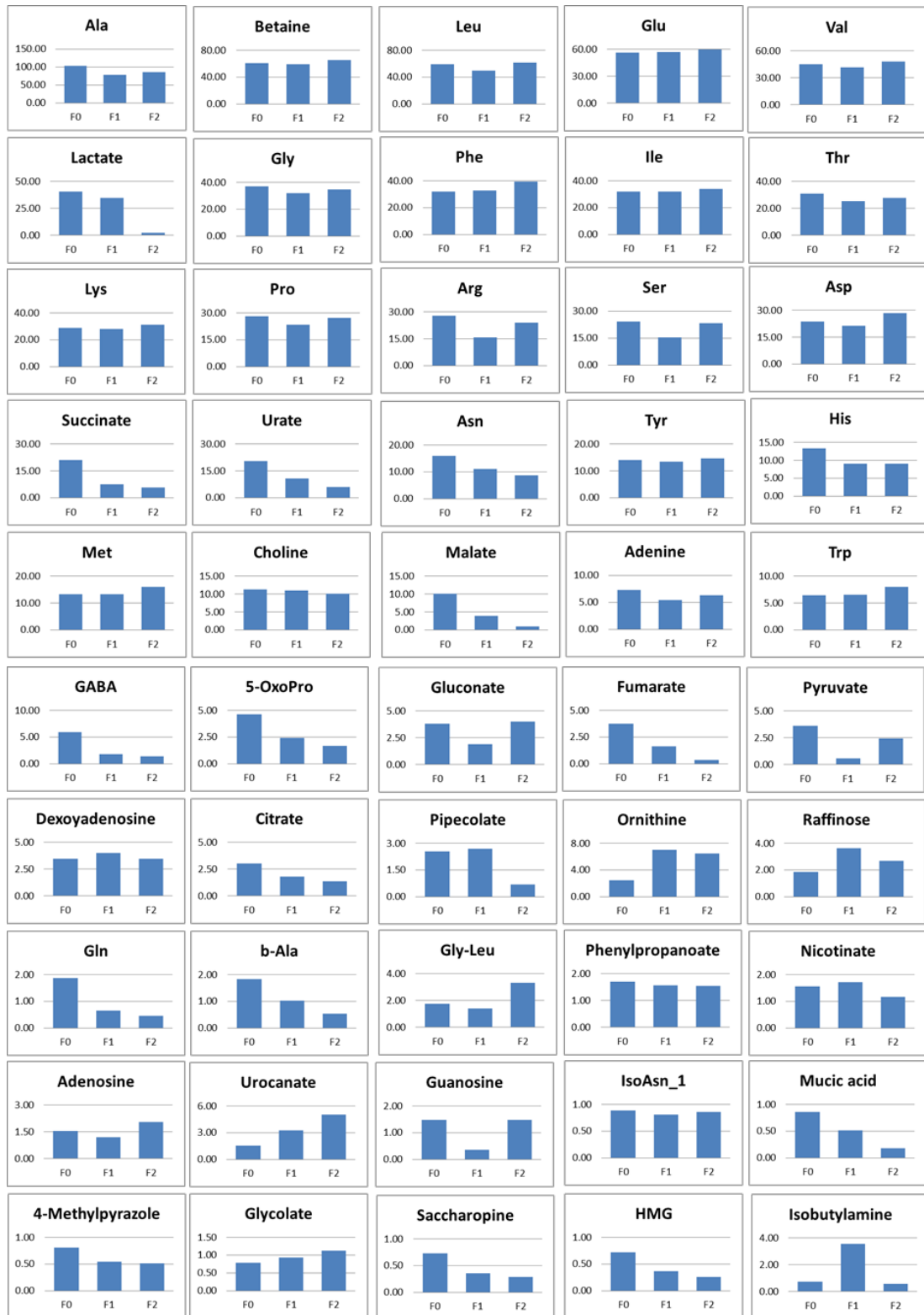


Figure 7. 食塩添加発酵小麦ふすまのメタボローム解析
 食塩添加によって変化した成分(上位 50 種)を示した。
 F0: 発酵小麦ふすま, F1: 1%食塩添加発酵小麦ふすま, F2: 2%食塩添加発酵小麦ふすま

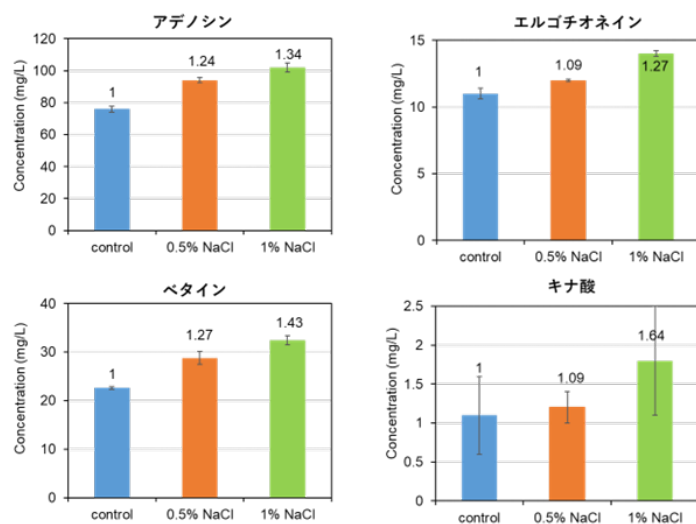


Figure 8. クモノスカビによる NaCl 添加米糠発酵物で増加した二次代謝成分

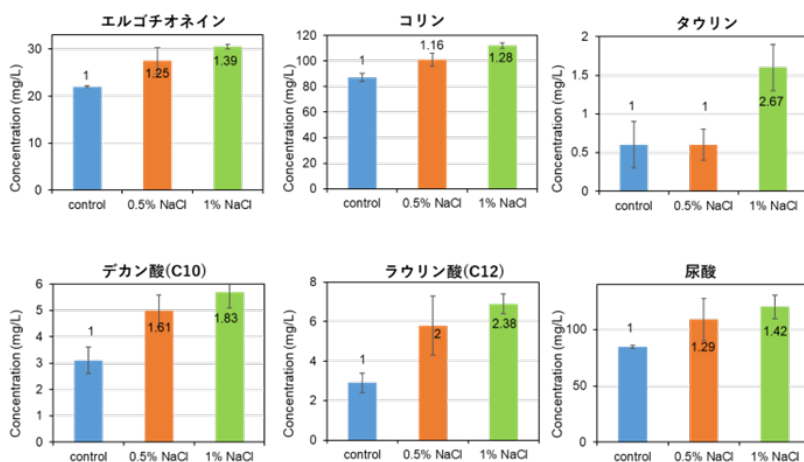


Figure 9. 麹カビによる NaCl 添加米糠発酵物で増加した二次代謝成分

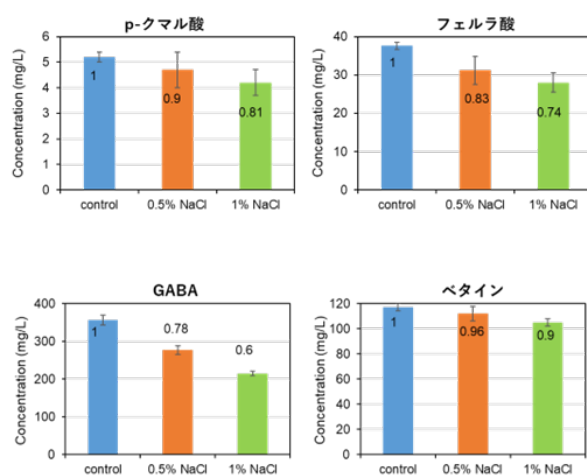


Figure 10. 麹カビによる NaCl 添加米糠発酵物で増加した二次代謝成分 (2)

3. 4 発酵小麦ふすまの健康機能性(血圧低下作用)の解析

SHRSPは、生後2か月齢より、血圧が上昇するとともに、インスリン抵抗性(血糖値の上昇)、脂質代謝異常を示す、ヒトのメタボリックシンドロームに似た症状を示す疾患動物である。まず、小麦ふすまのクモノスカビ発酵物を単回経口投与した場合の収縮期血圧に与える影響を観察した。蒸留水を与えたコントロールと比べて、発酵、未発酵小麦ふすまの両方で、投与6時間後で血圧の低下が観察された。一方、発酵、未発酵の間では差は見られなかった(**Figure 11**)。米糠のクモノスカビ発酵物について同様に解析を行なったところ、投与6時間後に収縮期血圧の有意な低下が観察された。次に、食塩添加で発酵させた小麦ふすまの血圧へ与える影響についてみたところ、投与6時間後に食塩無添加、2.0%食塩添加発酵物で有意に血圧の低下が観察された(**Figure 12**)。これら発酵物のアンジオテンシン変換酵素(ACE)の阻害活性を試験管内で測定したところ、小麦ふすま発酵物で未発酵物よりも阻害活性が高かった(**Figure 13A**)。食塩添加発酵物についてみると、小麦ふすまでは食塩濃度が上昇することに

よってACE阻害活性が低下した(**Figure 13B**)。一方、米糠発酵物ではACE阻害活性は食塩添加の影響を受けなかった。以上のことから、小麦ふすま発酵物による血圧低下作用の一部は、ACE阻害により起こる可能性が示唆された。しかし、血圧低下効果とACE阻害活性が必ずしも一致していなかったことから、ACE阻害以外の機構が関与しており、更なる解析を行う必要がある。

次に、発酵物投与に経時的に血液を採取し、血液パラメーターについて測定を行った。米糠発酵物では、血糖値、血漿インスリン値の低下が観察され、本動物の示すインスリン抵抗性の改善効果が見られた。一方、小麦ふすま発酵物では、血糖値の変化は観察されなかったが、血漿トリグリセリドの低下が観察された(**Figure 14**)。食塩添加小麦ふすまを投与した場合においても血糖値は変化しなかった。また、血漿トリグリセリド値について、食塩添加による変化はなかった。以上のことから、発酵小麦ふすまは脂質代謝を改善する可能性があり、その作用メカニズムについて肝臓などの脂質代謝関連酵素の活性やその遺伝子発現に与える影響を精査する必要がある。

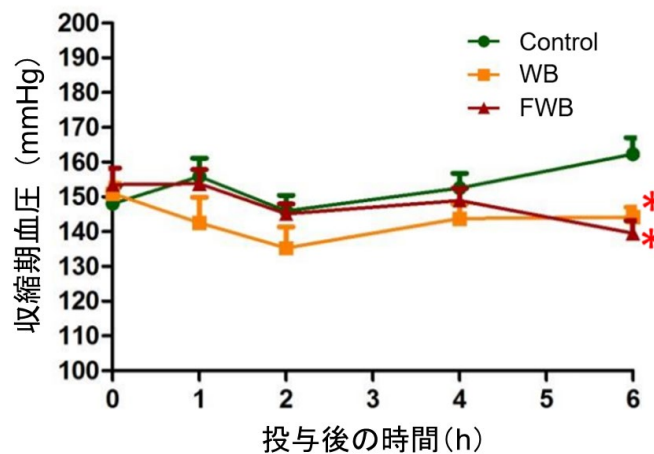


Figure 11. 発酵小麦ふすまの単回投与が収縮期血圧に与える影響
WB:小麦ふすま, FWB:発酵小麦ふすま

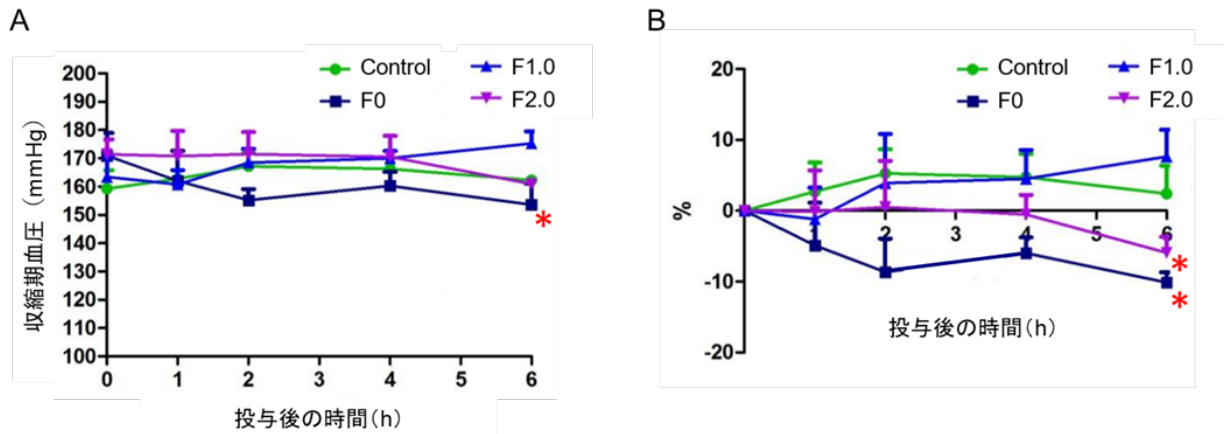


Figure 12. 発酵小麦ふすま(FWB), 未発酵小麦ふすま(WB)抽出物を単回経口投与後の収縮期血圧の経時変化 (A)収縮期血圧, (B)血圧の変化率

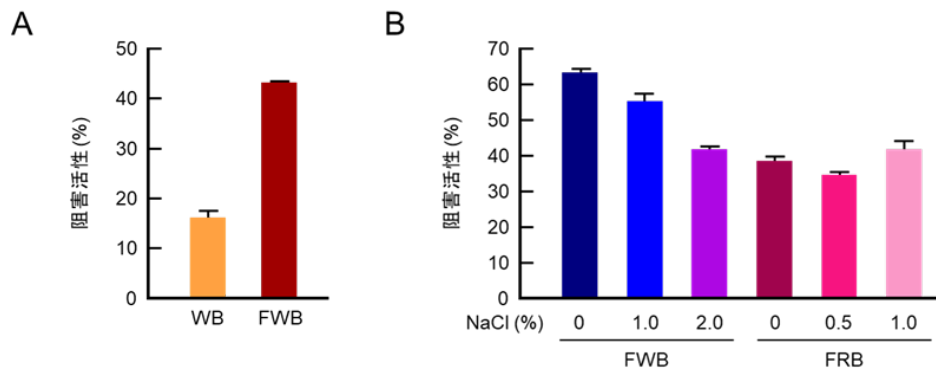


Figure 13. 発酵小麦ふすま, 発酵米糠のアンジオテンシン変換酵素阻害活性
WB:小麦ふすま, FWB:発酵小麦ふすま, FRB:発酵米糠

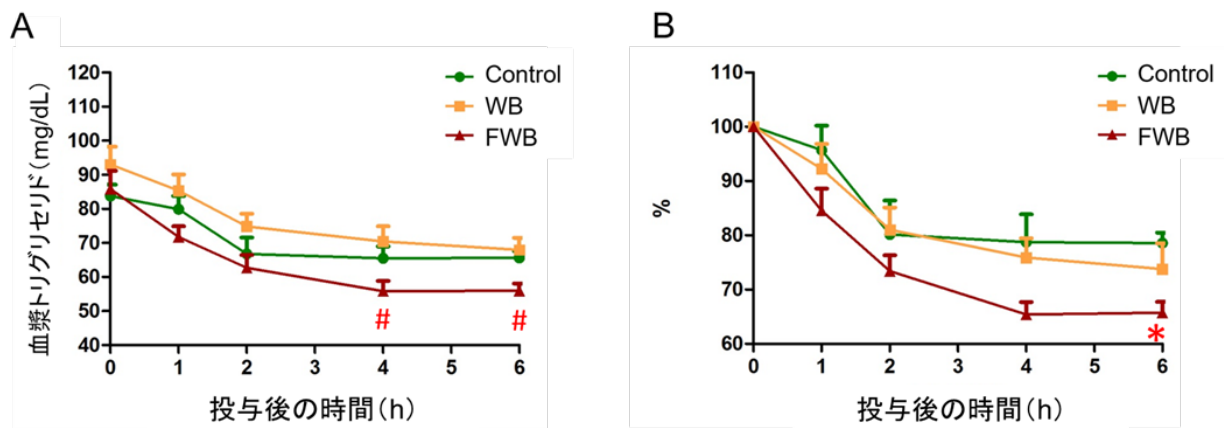


Figure 14. 発酵小麦ふすま(FWB), 未発酵小麦ふすま(WB)抽出物を単回経口投与後の血漿トリグリセリドの経時変化 (A)血漿トリグリセリド濃度, (B)トリグリセリド値の変化率

3. 5 発酵小麦ふすまの健康機能性(潰瘍性大腸炎抑制)の解析

DSS は水溶性多糖であり、実験動物に飲水として与えると腸炎を引き起こす。DSS は直接腸炎を誘導するのではなく、結腸上皮細胞に毒性を示し、上皮細胞の損傷を誘導する。このことにより、上皮細胞単層が破壊され、腸内細菌が粘膜へ侵入して炎症が惹起される。体重についてみると、Con 群ではDSSの投与によって体重が20%低下した(Figure 15)。一方、FWB 群、F10 群においては、減少が12%程度であり、有意な体重減少抑制効果がみられた。さらに、DAIの解析では、下痢、血便ともに、Con 群に比べて、FWB 群で有意に低下していた(Figure 16)。F10 群では、統計的に有意な差は無かったが低下傾向がみられた。さらに、体重変化を加えて算出した総合的なDAI値においても、DSS投与3~6日、9日のDAI値の有意な低下がFWB 群でみられた。F10 群では5~6日に

おいて、有意な低下が観察された。脾臓の大きさや重量は炎症により増加するが、解剖後に測定した脾臓の長さ、体重あたりの重量は、Con 群やWB 群に比べFWB 群で有意に低下していたが、F10 群では低下傾向であった(Figure 17)。結腸のTBARS値は、群間で差が見られなかった。また、結腸の組織学的解析においても、炎症細胞の浸潤に群間で差は無かった(Figure 18)。以上のことから、発酵小麦ふすまには、DSS誘導の大腸炎を抑制する効果があり、潰瘍性大腸炎などの改善に利用できる可能性が示唆された。一方、食塩(1%)の添加により発酵させた小麦ふすまは、改善効果が見られるものの、その活性は食塩未添加に比べると弱いことが示唆された。食塩を添加することによって増加する機能性の二次代謝物は本モデルの示す炎症反応の抑制には効果的ではないと考えられた。

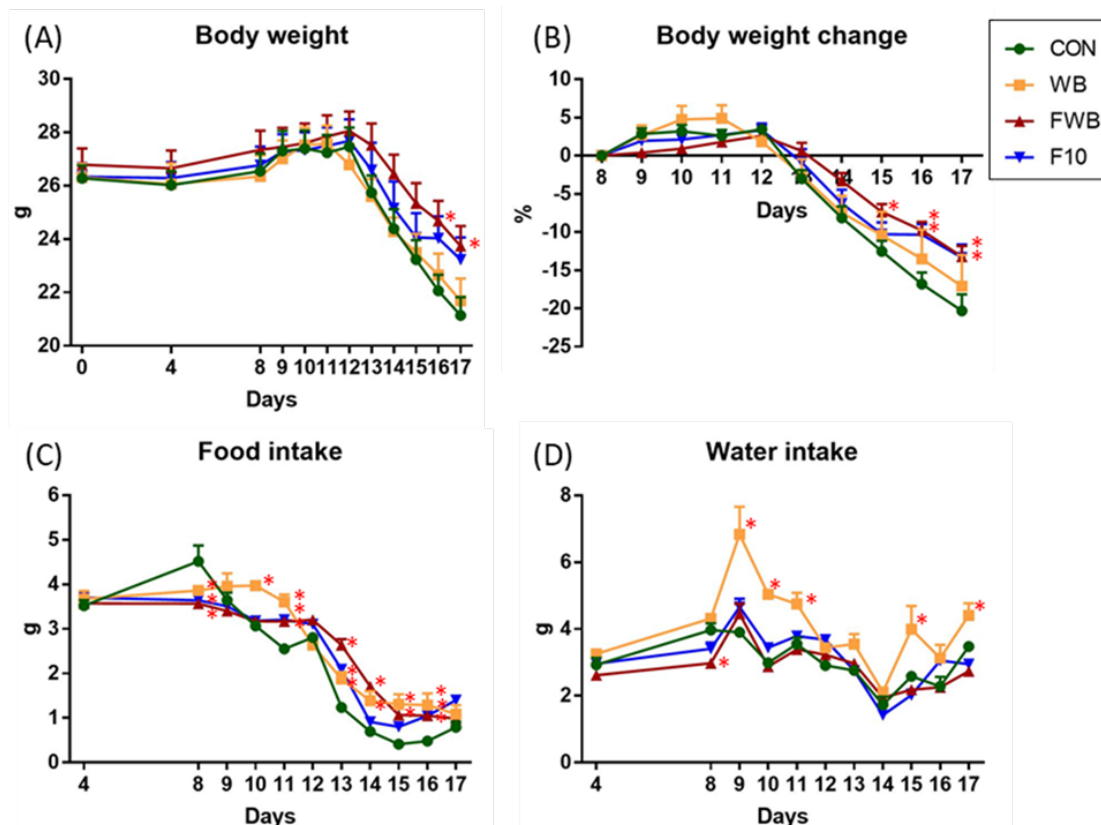


Figure 15. 発酵小麦ふすま給餌が潰瘍性大腸炎モデルマウスの病状へ及ぼす影響 (A)体重, (B)体重変化, (C)摂餌量, (D)飲水量

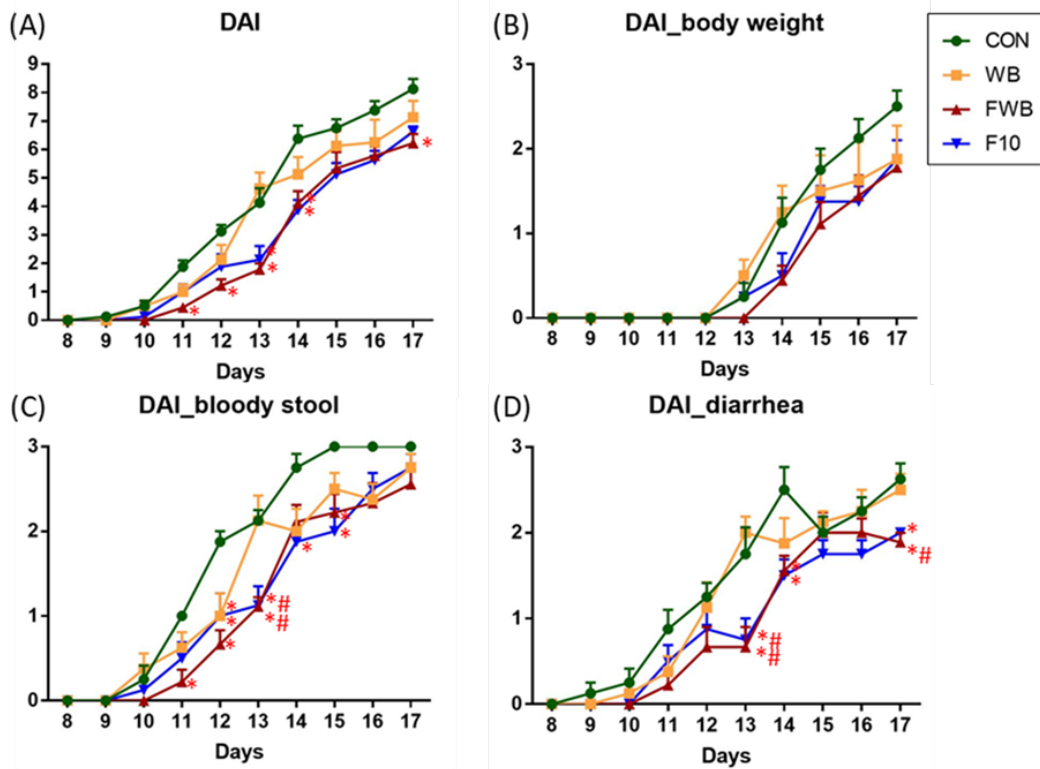


Figure 16. 発酵小麦ふすま給餌が潰瘍性大腸炎モデルマウスの病状へ及ぼす影響(2)
(A) 疾患活動指標(DAI), (B)体重変化, (C)血便, (D)下痢

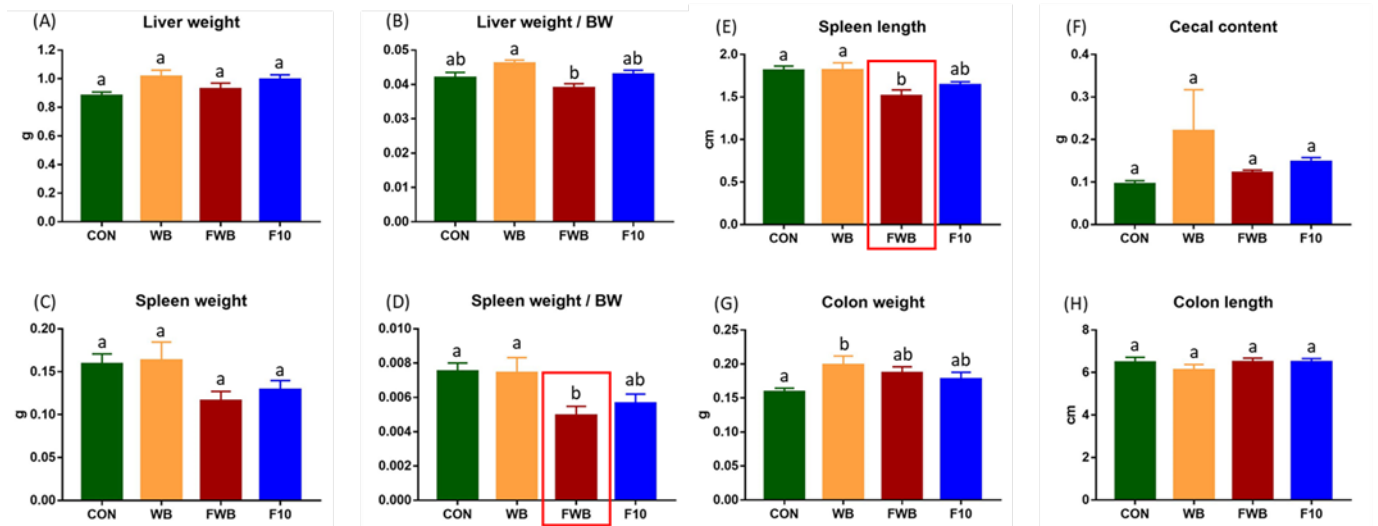


Figure 17. 発酵小麦ふすま給餌が潰瘍性大腸炎モデルマウスの臓器重量へ及ぼす影響

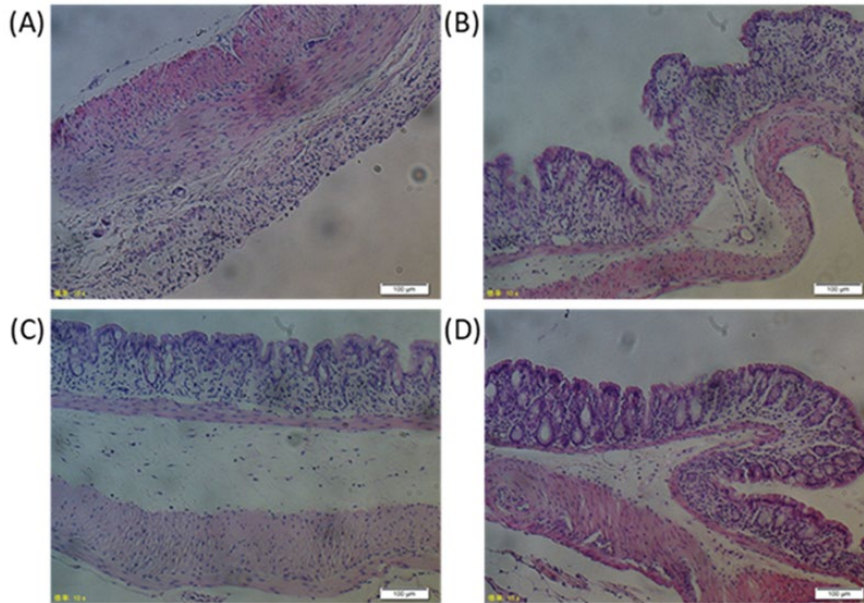


Figure 18. 発酵小麦ふすま給餌が潰瘍性大腸炎モデルマウスの臓器重量へ及ぼす影響
結腸の組織学的解析 (H&E 染色)
(A)Con 群 (コントロール), (B)WB 群, (C)FWB 群, (D)F10 群

3. 6 発酵小麦ふすまの健康機能性(糖尿病性筋萎縮抑制)の解析

ロコモティブシンドロームのひとつであるサルコペニアは筋肉量と筋力の低下を生じさせる症状を示す。筋肉量の低下は筋肉タンパク質の合成と分解のバランスが崩れ、分解速度が合成速度を上回ることにより進む。加齢は大きな要因のひとつであるが、慢性疾患や栄養素の摂取不良などでも筋肉量の低下は起こる。インスリンは骨格筋においてタンパク質合成を亢進し、分解を抑制することから、インスリン抵抗性などインスリンの作用不全によって筋肉量は低下する。ストレプトゾトシン (STZ) はアミノグリコシド系抗生物質のひとつで、実験動物に投与すると膵β細胞に取り込まれ毒性を示し、β細胞が破壊されインスリン分泌が不全となりI型糖尿病が引き起こされる。さらに、高血糖による酸化ストレスによって筋萎縮が誘導される。筋萎縮は筋特異的ユビキチンリガーゼ (FBXO32/Atrogin-1, TRIM63/MuRF1) の活性化により起こる。転写因子 NF-κB や FOXO は両ユビキチンリガーゼの発現量を上昇させるが、NF-κB は酸化ストレスによっても活性化される。一方、インスリンは FOXO の不活性化を誘導する。これらの機構によって STZ モデル動物では筋萎縮症状を示す。ラットに STZ を投与すると体重の増加が抑制され、試験

期間終了まで体重の増加は観察されなかった (Figure 19)。しかし、試験食給餌 3 週、4 週目において STZ 群に比べ、STZ + FWB 群で体重が有意に高値であった。また、統計的には差が無いが摂餌量が STZ + FWB 群で高い傾向であった。さらに、血漿インスリン濃度には変化がなかったが、血糖値は STZ + FWB 群で低値を示していた。以上のことから、小麦ふすま発酵物の給餌は STZ モデル動物においてその病態の一部を改善させる効果を示す可能性があると推定された。血漿インスリン濃度に変化がなかったことから、FWB の給餌によってインスリン感受性が上昇し、血糖値や体重の改善に繋がった可能性が考えられた。一方、食塩添加で発酵させた場合、改善効果がほとんどみられなかった。サルコペニアの診断基準に握力測定による筋力低下を評価する方法が採れていることから、グリップメーターによって前足の握力を測定した。その結果、STZ 投与によって握力は低下するもの、試験食間で変化はみられなかった (Figure 20)。飼育終了時のヒラメ筋 (soleus)、長趾伸筋 (EDL)、前脛骨筋 (TA)、足底筋 (plantaris)、腓腹筋 (GAS) の重量について解析を行った。筋線維はミトコンドリア含量の高い遅筋 (赤筋) 線維と含量の低い速筋 (白筋) 線維に大別される。サルコペニアでは、まず速筋線維の

萎縮が選択的に起こると考えられている。ここでは、腓腹筋を遅筋線維として、長趾伸筋、前脛骨筋、足底筋、腓腹筋を速筋線維として解析した。STZ の投与によってすべての筋組織の重量が低下して、筋萎縮が起こっていた (Figure 21)。一方、試験飼料の給餌による筋肉量の変化はどの部位においても観察されなかった。これらのこと

から、小麦ふすまは糖尿病誘発の筋萎縮モデルの病態を効果的に改善する作用を持たないことが示唆された。しかし、発酵物によってインスリンの感受性上昇の可能性が示唆されたことから、試験期間を延長させた試験も今後計画されるべきと考えられた。

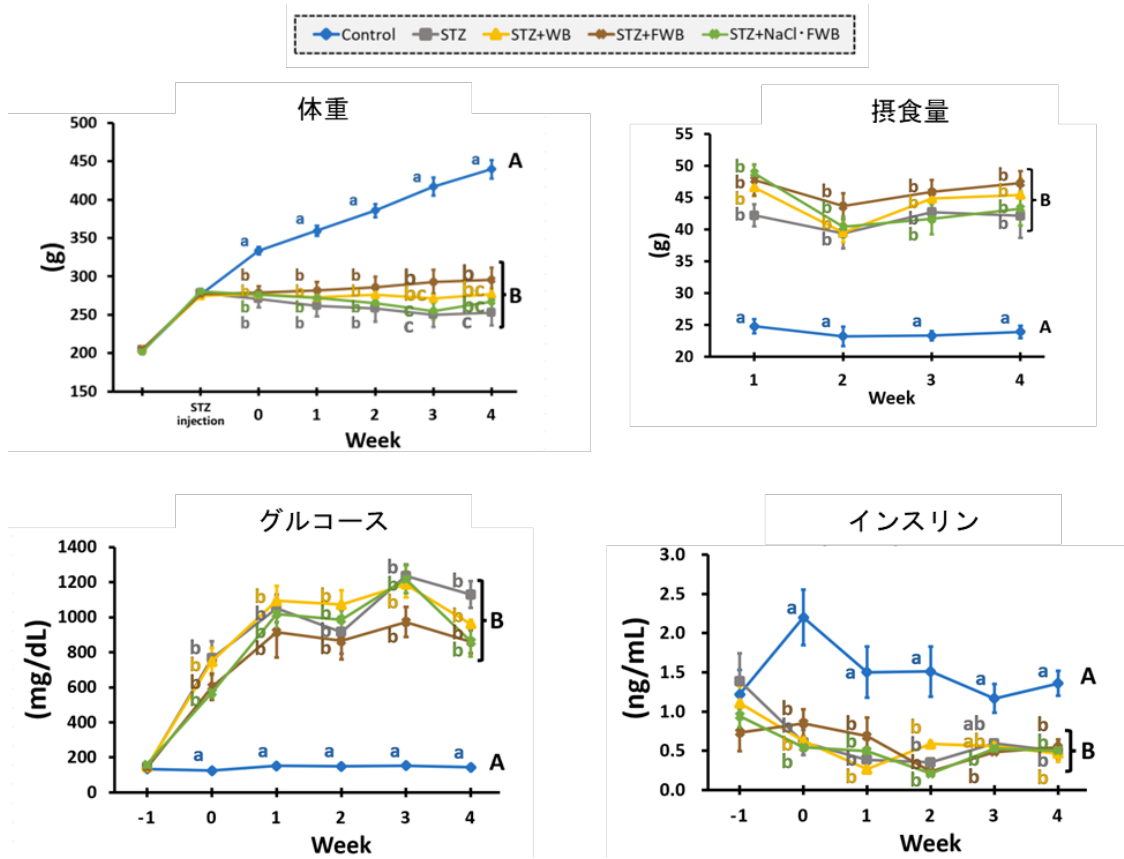


Figure 19. 飼育期間中の体重変化, 摂食量, 血中グルコースおよびインスリン濃度

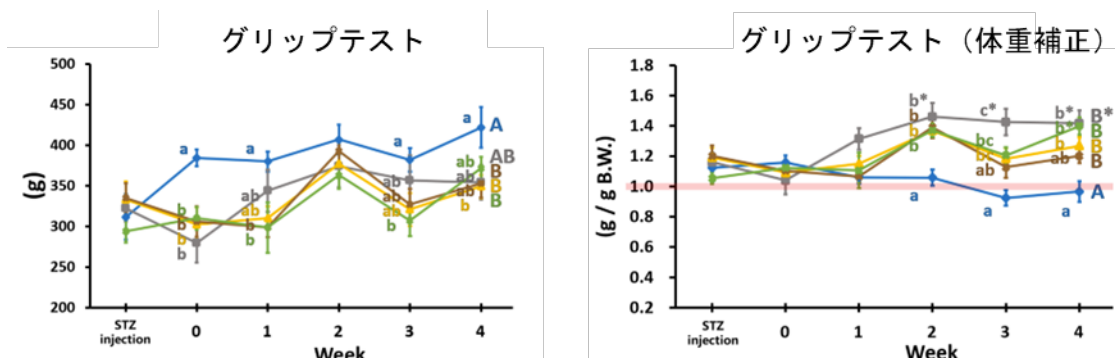


Figure 20. 飼育期間中の筋力測定(前足グリップテスト)

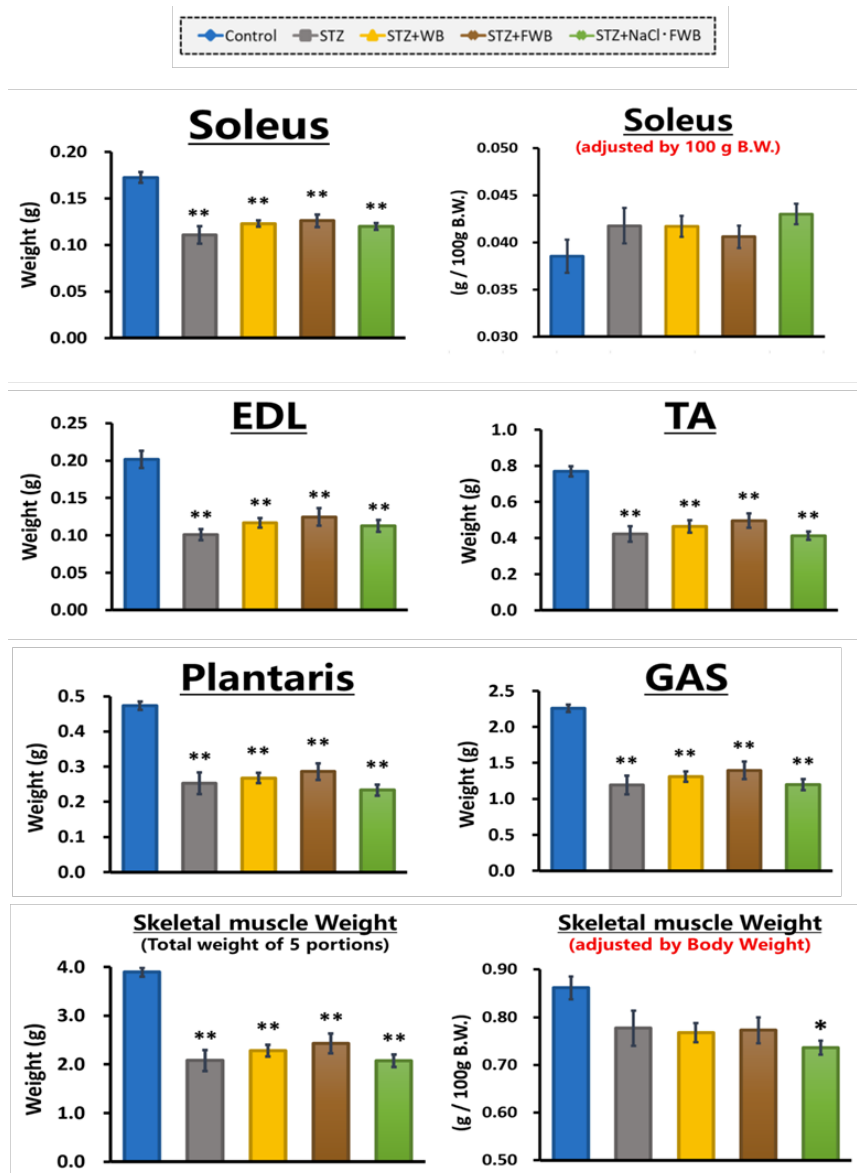


Figure 21. ヒラメ筋(soleus), 長趾伸筋(EDL), 前脛骨筋(TA), 足底筋(plantaris), 腓腹筋(GAS)の重量

4. 今後の課題

食塩存在下で米糠をクモノスカビ、麴カビを用いて発酵させた場合、キシラナーゼ活性が上昇し、水溶性食物繊維の産生が増加することが期待される。水溶性食物繊維は、消化管での糖質の吸収速度を低下させ、食後血糖値の急激な上昇の抑制や胆汁酸やコレステロールを吸着し、体外への排泄量を増加させるなど、糖尿病や脂質異常症の予防作用を有している。このことから、塩分濃度を調節して発酵によるキシラナーゼ活性上昇を至適化することによって健康機能を高めた発酵米糠が開発できると考える。

発酵小麦ふすまにおいては、発酵物により大腸炎の症状改善がみられたが、食塩添加条件では抗炎症作用の上昇は認められなかった。食塩存在下の発酵では、分岐鎖アミノ酸濃度の上昇が観察されていたことから、筋萎縮モデルを用いて発酵小麦ふすまのサルコペニア改善について試験を行ったが筋萎縮を抑制する効果を示すことができなかった。しかし、インスリン感受性上昇が期待できることから、プロトコルを変化させ試験(糖尿病モデルでの飼育期間の延長や他のサルコペニアモデルへの投与)を行って、発酵小麦ふすまの有効性を示してゆきたい。

5. 文献

1. 谷口久次, 橋本博之, 細田朝夫, 米谷俊, 築野卓夫, 安達修二. 米糠含有成分の機能性とその向上. 日本食品科学工学会誌. 59: 301-318, 2012.
2. Kurtys E, Eisel ULM, Hageman RJJ, Verkuyl JM, Broersen LM, Dierckx RAJO, de Vries EFJ. Anti-inflammatory effects of rice bran components. *Nutr Rev.*, 76: 372-379, 2018.
3. Ardiansyah, Shirakawa H, Koseki T, Ohinata K, Hashizume K, Komai M. Rice bran fractions improve blood pressure, lipid profile, and glucose metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 1914-1920, 2006.
4. Ardiansyah, Shirakawa H, Koseki T, Hashizume K, Komai M. The driselase-treated fraction of rice bran is a more effective dietary factor to improve hypertension, glucose and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats compared to ferulic acid. *Br. J. Nutr.*, 97: 67-76, 2007.
5. Ardiansyah, Shirakawa H, Shimeno T, Koseki T, Shiono Y, Murayama T, Hatakeyama E, Komai M. Adenosine, an identified active component from the Driselase-treated fraction of rice bran, is effective at improving metabolic syndrome in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 2558-2564, 2009.
6. Ardiansyah, Shirakawa H, Sugita Y, Koseki T, Komai M. Anti-metabolic syndrome activity effects of adenosine ingestion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats fed a high fat diet. *Br. J. Nutr.*, 104: 48-55, 2010.
7. Ardiansyah, Inagawa Y, Koseki T, Agista AZ, Ikeda I, Goto T, Komai M, Shirakawa H. Adenosine and adenosine-5'-monophosphate ingestion ameliorates abnormal glucose metabolism in mice fed a high-fat diet. *BMC Complement. Altern. Med.*, 18: 304, 2018.
8. Ardiansyah, Shirakawa H, Inagawa Y, Koseki T, Komai M. Regulation of blood pressure and glucose metabolism induced by L-tryptophan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Nutr. Met.*, 8: 45, 2011.
9. Alauddin M, Shirakawa H, Koseki T, Kijima N, Ardiansyah, Budijanto S, Islam J, Goto T, Komai M. Fermented rice bran supplementation mitigates metabolic syndrome in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, 16: 442, 2016.
10. M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: An Expanding Global Health Problem. *Clin. Med. Insights Gastroenterol.*, 6: 33-47, 2013.
11. Emamie AD, Rajabpour M, Ghanavati R, Asadolahi P, Farzi S, Sobouti B, Darbandi A. The effects of probiotics, prebiotics and synbiotics on the reduction of IBD complications, a periodic review during 2009-2020. *J. Appl. Microbiol.*, 130: 1823-1838, 2021.
12. Islam J, Koseki T, Watanabe K, Ardiansyah, Budijanto S, Oikawa A, Alauddin M, Goto T, Aso H, Komai M, Shirakawa H. Dietary supplementation of fermented rice bran effectively alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Nutrients*, 9: 747, 2017.
13. Agista AZ, Rusbana TB, Islam J, Ohsaki Y, Sultana H, Hirakawa R, Watanabe K, Nochi T, Ardiansyah, Slamet Budijanto S, Yang SC, Koseki T, Aso H, Komai M, Shirakawa H. Fermented rice bran supplementation prevents the development of intestinal fibrosis due to DSS-induced inflammation in mice. *Nutrients*, 13: 1869, 2021.
14. Islam J, Agista AZ, Watanabe K, Nochi T, Aso H, Ohsaki Y, Koseki T, Komai M, Shirakawa H. Fermented rice bran supplementation attenuates chronic colitis-associated extraintestinal manifestations in female C57BL/6N mice. *J. Nutr. Biochem.*, 99: 108855, 2022.
15. Islam J, Sato S, Watanabe K, Watanabe T, Ardiansyah, Hirahara K, Aoyama Y, Tomita S, Aso H, Komai M, Shirakawa H. Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice. *J. Nutr. Biochem.*, 42: 43-50, 2017.
16. Agista AZ, Tanuseputero SA, Koseki T, Ardiansyah, Budijanto S, Sultana H, Ohsaki Y, Yeh C-L, Yang S-C, Komai M, Shirakawa H. Tryptamine, a microbial metabolite in fermented rice bran suppressed lipopolysaccharide-induced inflammation in a murine macrophage model. *Int. J. Mol. Sci.*, 23: 11209, 2022.

17. Rusbana TB, Agista AZ, Saputra WD, Ohsaki Y, Watanabe K, Ardiansyah, Budijanto S, Koseki T, Aso H, Komai M, Shirakawa H. Supplementation with Fermented Rice Bran Attenuates Muscle Atrophy in a Diabetic Rat Model. *Nutrients*, 12: 2409, 2020.
18. 好井久雄 みそ, しょうゆ醸造と微生物 化学と生物 8: 674-681, 1970
19. 原山文徳, 安平仁美 *Aspergillus* 属と *Rhizopus* 属の大豆蛋白分解作用の比較 日本醸造協会誌 83: 828-833, 1988.
20. 辰巳桃子, 鮫島由香, 松井徳光 米麴の保存状態及び甘酒の塩分濃度がプロテアーゼ活性に及ぼす影響 日本調理科学会誌 52: 329-334, 2019.
21. 末澤保彦, 吉岡直美, 森治彦 醤油醸造関連微生物によるフェルラ酸および p-クマル酸の揮発性フェノール類への変換 日本農芸化学会誌 72: 43-49, 1998.
22. Stevenson L, Phillips F, O'sullivan K, Walton J. Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 63: 1001-1013, 2012.
23. Irina Borodina I, Kenny LC, McCarthy CC, Paramasivan K, Pretorius E, Roberts TJ, van der Hoek SA, Kell DB. The biology of ergothioneine, an antioxidant nutraceutical. *Nutr. Res. Rev.*, 33: 190-217, 2020.

Improvement of Flavor and Health Functionality of Fermented Rice Bran and Wheat Bran by the Regulation of Salt Concentration

Hitoshi Shirakawa¹, Takuya Koseki²

¹ Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,

² Faculty of Agriculture, Yamagata university

Summary

Rice bran (RB) and wheat bran (WB) contain several bioactive ingredients for health promotion. We previously developed dual fermented RB (FRB) using fungi and lactic acid bacteria which process improved smell of RB and increased functional ingredients. FRB has been shown to be able to improve symptoms in animal disease models. Furthermore, we observed higher functional property of RB fermented by *Rhizopus oligosporus*. In this research, we investigated the effect of NaCl supplementation in the fermentation process on the production of functional ingredients and evaluated health promotion activity using animal model.

In case of the fermentation of RB and WB with *Rhizopus* sp., the activities of α -amylase and glucoamylase was greatly reduced by NaCl supplementation. However, xylanase activity was increased by NaCl supplementation. The increase in xylanase activity was thought to be due to the dissociation of ester bonds between the molecules, and the promotion of fiber swelling in the presence of NaCl, which helps the penetration of fungal hyphae into the microstructure of the cell wall, thereby promoting xylanase production. Regarding the secondary metabolites, adenosine, ergothioneine, and betaine were increased in the addition of NaCl concentration-dependent manner. These results suggest that fermentation of RB and WB with fungi in the presence of NaCl can enhance the production of functional ingredients for health promotion. Next, we examined the health functionality of the fermented product of WB by *Rhizopus*. A significant decrease in blood pressure was observed in stroke-prone spontaneously hypertensive rats after single oral administration of fermented products under the presence of NaCl. When we evaluated using dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mice, we found that administration of the fermented product improved the weight loss caused by DSS administration. An inhibitory effect was also observed in the salt-added fermented product. Since the fermented product contains plenty of free amino acids, we administered fermented product to diabetic sarcopenia model rats. However, we could not find the muscle atrophy inhibitory effect of the fermented product in 4 weeks of feeding. However, we found that insulin sensitivity may be increased, suggesting further examination with other sarcopenia models was considered necessary using this fermented product.

食塩とアミノ酸との相互作用による風味向上の可能性について

石川 匡子

秋田県立大学生物資源科学部

概要 塩は、食品に塩味を加えたり、他の風味を強めたり抑えたりする重要な調味料である。塩分の過剰摂取は生活習慣病の原因の一つであることが知られている。そのため、減塩が推奨されている。しかし、過度の減塩は食品全体の味と美味しさの効果的なバランスに悪影響を及ぼす。塩に旨味加わると、少量の塩でも塩味が増し満足感が得られるといわれている。また、咀嚼時の唾液への味物質の溶出の程度など、素材の食感もおいしさに影響を与えると考えられている。本研究の目的は、「塩分とアミノ酸の濃度組成」、「調味料の食品への浸透性」、「食品の物性」の関係にどのような要因が強く影響するかを明らかにすることである。

3年間の研究に、次の3つの実験を行った。

- (1) 粘度の異なる水溶液を用いたアミノ酸相互作用による呈味改善効果の検討
- (2) 食感の異なる寒天を用いたアミノ酸と塩の相互作用による呈味改善効果の検討
- (3) 香気成分を添加した寒天を用いた呈味改善効果の検討

実験(1)により、旨味アミノ酸と甘味アミノ酸の相互作用により味が増強されることが確認された。味の強さは温度に大きく影響され、味のバランスや味の感じ方の違いが影響していると推測された。実験(2)では、相互作用を利用した呈味改善が液体だけでなく固形食品に対しても有効であることを確認した。また、寒天を咀嚼した際、柔らかい寒天ほど味の持続時間が短く、早く味を感じ、味が強くなることから、寒天の硬さが味の強さに影響を与えることが示唆された。実験(3)では、アミノ酸に加えて鰹節から抽出した香り成分を加えた。香り成分を含んだ寒天は風味が強くなり、余韻が長いことが確認された。香り成分のみを含む寒天は、かつお節のうま味成分と香り成分の両方を含む寒天と同等の強度を有していた。

これらの結果から、アミノ酸相互作用に加えてフレーバーを添加することで、さらに味が増強されるだけでなく、嗜好性も向上することが示唆された。

1. 研究目的

塩は味の基本となるものであり、欠かすことの出来ない調味料である。調味料として果たす味付けの役割は大きく、塩味を付与はもちろん、他の味成分と相互に作用し、増強あるいは抑制する効果を持つ。そのため、塩味は感じられない食品にも塩が添加されていることが多い。食品では、呈味成分の濃度組成が味形成に大きな影響を与えている。申請者は、申請者は、魚醤の呈味性について研究を進めている。食塩濃度 0.8%に調製した魚醤の水溶液を対象に味質評価を行ったところ、「グルタミン酸(以下 Glu)

量が多いものはうま味が強い」「アラニン(以下 Ala)やグリシン(以下 Gly)量が多いものは甘味が強い」「乳酸量が同量であっても、Glu・Ala・Glyが多いものは酸味が弱く感じられる」という結果になり、アミノ酸や有機酸の相互作用が味形成に大きく影響することを確認した¹⁾。現在、塩の過剰摂取は生活習慣病の一因といわれ、減塩が進められている。しかし、減塩は、塩味だけでなく、料理の味全体のバランスにも影響するため、最終的においしさの低下へと繋がる。申請者は、このアミノ酸の付与による味の相互作用が、減塩食品の味増強や呈味性向上に有効なのは

ないかと考えた。また、食品の食感、咀嚼に伴う唾液への味物質の溶出割合に影響を与える。本研究では、うま味・甘味アミノ酸がもたらす味への効果、またそれらアミノ酸を調味料として煮物などの料理に用いた際の味強度や食感への影響を、理化学分析によって明らかにすることを目的とした。昨年度は煮汁を想定し、粘性の異なる水溶液を対象に塩とアミノ酸の相互作用による味強度変化について検討を行い、口に含んだ際に感じられる味バランスや味の持続性が味強度に影響することを報告した。今年度は、煮物を想定し、固形モデル食品として寒天を用い、咀嚼時の味強度について検討を行った。

2. 研究方法

2.1 粘度の異なる水溶液を用いたアミノ酸と塩の相互作用の検討

2.1.1 うま味アミノ酸・有機酸の相互作用を利用した味増強効果

2.1.1.1 サンプル調製

タピオカデンプンを使用し、4% (w/w) デンプン糊液を作製した。糊液を蒸留水にて 1.2 倍、1.4 倍に希釈した溶液も調製した。各デンプン糊液に NaCl 1.5% とリンゴ酸を 0%, 0.02%, 0.03%, 0.04% 添加し、評価溶液とした。さらに、これらの溶液に MSG 0.5% 添加した溶液も調製し、うま味による効果を調査する評価溶液とした。

2.1.1.2 官能評価

食塩を添加したデンプン糊液と MSG を併用したデンプン糊液について、それぞれ 2 点識別法により味強度を評価した。また、口に含んだ際感じた味を強い順に順位付け (1 位:3 点, 2 位:2 点, 3 位:1 点) し、(1) 式から各味の割合を算出した。

各味の割合 (%) =

$$\left(\frac{\text{各味の点数合計}}{\text{全味の点数合計}} \right) \times 100 \quad \cdots (1)$$

味増強効果が認められたリンゴ酸濃度を用いて、減塩率を算出した。NaCl:リンゴ酸の濃度比率を保ちながら、NaCl 濃度を 1.5% から 1.4%, 1.3%, 1.2%... と 0.1% きざみで減らした減塩糊液を調製し、NaCl 1.5% 比較糊液との味強度を 2 点識別法により評価した。同等の味強度になる食塩濃度から、おおよその減塩率を求めた。その結果を目安に、さらに NaCl 濃度 1.35%, 1.25%... と初めに作製

した減塩糊液の中間に位置する NaCl 濃度の糊液を作製し、より詳細な減塩率を求めた。加えて粘度が異なる 1.2 倍希釈と 1.4 倍希釈のデンプン糊液についても同様に味強度を比較し、減塩率を算出した。さらに TDS 法にて味の持続時間を評価した。TDS 法ではサンプルを 10 秒間口腔内で保持した後、全量飲み込んでもらい、口に入れた瞬間から味が感じられなくなるまでの時間を Magic Sense (Taste Technology 製) で測定し、全パネルの結果を MS-Analyzer V3.2.5 を用いて統計解析後、味の持続時間として評価した。全ての官能評価において、評価試料は 70 mL プラスチックカップに 10 mL ずつ注ぎ、全量飲み込むよう指示した。本官能検査は訓練された男女のパネル 14~20 人で行った。本研究は秋田県立大学研究倫理規範第 5 条「ヒトを対象とする研究」研究倫理委員会で承認された後、実施した (受付番号第 18-32 号)。

2.1.1.3 味覚センサ測定

味認識装置 (TS-5000Z, 株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー) にて味質評価を行った。センサ応答値の測定は、基準液における膜電位応答値を測定した後、各種サンプル溶液の膜電位応答値を測定し、両者の差、すなわち基準液の値を引いた試料溶液の電位応答値を味覚センサ応答値 (mV) とした。さらに、サンプル溶液の応答値を測定後、直ちに基準液の電位を再測定し、その値から元の基準液の値を引いた電位応答値を CPA (Change of membrane potential caused by adsorption) 値とした。なお、CPA 値は、センサ膜への味物質吸着による電位の変化で、後味に相当する。得られた応答値に各呈味成分毎の係数を乗じ、味強度を算出した^{2,3)}。

2.1.2 甘味・うま味アミノ酸の相互作用を利用した味増強効果

2.1.2.1 サンプル調製

2.1.1 と同様の方法にて、1.4 倍に希釈したデンプン糊液を作製した。糊液に NaCl 1.5% と MSG 0.20% を添加した後、さらに Ala を 0%, 0.21%, 0.255%, 0.765% をそれぞれ添加した糊液を調製し、評価溶液とした。

2.1.2.2 官能評価

Ala 無添加糊液と Ala 添加糊液について、2 点識別法により味強度を評価した。また、口に含んだ際感じた味を強い順に順位付けした。味増強効果があることを確認した Ala 添加糊液に対し減塩率を算出した。また、TDS 法や

味覚センサ測定によってそれぞれの糊液の味質を測定し、結果に差異が生じるか検討した。また、味増強効果が認められた Ala 0.765% 添加糊液において、常温と 37°C、37°C と 60°C、常温と 60°C を 2 点識別法によって比較し、味の強さや塩味・うま味・甘味の強さを評価した。さらに TDS 法により経時的な味質の変化を評価した。順位付け、減塩率の算出、TDS 法などの官能評価およびパネルへのサンプル呈示は 2. 1. 2 と同様の方法にて行った。本研究は秋田県立大学研究倫理規範第 5 条「ヒトを対象とする研究」研究倫理委員会で承認された後、実施した(受付番号第 18-30, 18-31 号)。

2. 2 食感の異なる水溶液を用いたアミノ酸と塩の相互作用の検討

2. 2. 1 寒天モデル食品の作製

寒天サンプルの作製には、粉末寒天(伊那食品工業株式会社)を用いた。NaCl 1.5% と MSG 0.21% に、Gly 0.24%, 0.63%, 1.02% を添加した寒天 1.0% サンプルを作製した。さらに味物質の添加量は同一(味増強が確認できた味物質の濃度)で、硬さのみが異なる寒天(0.5%, 1.0%, 1.5%) サンプルも作製した。いずれの寒天も官能評価用に 2.5 cm × 2.5 cm × 1.0 cm にカットした。また、咀嚼モデル試験用には、2.5 cm × 2.5 cm × 3.5 cm にカットした。

2. 2. 2 官能評価

NaCl + MSG 添加寒天と NaCl + MSG + Gly 添加寒天について、それぞれ 2 点識別法により味強度を評価した。また、口に含んだ際感じた味を強い順に順位付け(1 位:3 点, 2 位:2 点, 3 位:1 点)し、(1)式から各味の割合を算出した。

$$\text{各味の割合 (\%)} = \frac{\text{各味の点数合計}}{\text{全味の点数合計}} \times 100 \quad \cdots(1)$$

味物質の添加量は同一(味増強が確認できた味物質の濃度)で、硬さのみが異なる寒天についても同様に 2 点識別法により味強度を評価した。さらに、TDS 法にて口に入れた直後から味が感じられなくなるまでの経時的な味質変化を評価した。TDS 法ではサンプルを 1 口で全量口に含んだ後、75 回/分 の速さでサンプルを咀嚼してもらった。本研究は秋田県立大学研究倫理規範第 5 条「ヒトを対象とする研究」研究倫理委員会で承認された後、実施した(受付番号第 18-32 号)。

2. 2. 3 寒天の物性測定

官能評価に用いた寒天サンプルについて、テクスチャーアナライザー(島津製作所;EZ Test)にて圧縮測定を実施した。直径 20 mm の円柱プランジャーを用い、圧縮速度 60 mm/min、試料の厚さ 70% まで圧縮させた時の荷重を測定し、最大圧縮力(N)を求めた。

2. 2. 4 寒天の咀嚼モデル試験

直径 50 mm 高さ 80 mm の筒状ポリ容器に、直径 50 mm の円型に切った濾紙(ADVANTEC 100 CIRCLES 直径 110 mm 濾紙 No.2)を 10 枚入れ、測定の都合上、官能評価よりも大きく作製した寒天(25 × 25 × 35 mm)を、濾紙上に置き圧縮試験を行った。圧縮は、テクスチャーアナライザー(島津製作所;EZ Test)を用い、直径 20 mm の円柱プランジャーにて 50 mm/min で 50%(圧縮率)まで圧縮後、25 mm/min で 70%(圧縮率)圧縮した。圧縮後に寒天を取り除き、圧縮前後の濾紙の重量差から溶出した水分量を測定した。測定に使用したサンプルは、1 種類のサンプルにつき 3 個圧縮し、その 3 回分の平均値をサンプルの溶出量とした。

2. 3 香気成分を添加した寒天を用いた呈味改善効果の検討

2. 3. 1 香気成分を添加した寒天を用いた呈味改善効果の検討

国産花かつお 20 g とイオン交換水 400 mL をアロマ水蒸気蒸留器(桐山製作所)の沸騰容器に入れ 20 分間加熱した。水蒸気を冷却装置にて冷却し、得られた液体を「かつお節香気成分」とした。香気成分抽出後に残った水溶液は「かつおだし(香気成分なし)」として使用した。また、鍋に花かつお 20 g とイオン交換水 400 mL を加え、20 分間加熱した水溶液を「かつおだし(香気成分あり)」とした。

2. 3. 2 寒天サンプルの作製

NaCl 1.5% のみ、NaCl 1.5% + MSG 0.21% , NaCl 1.5% + MSG 0.21% + Gly 1.02% をそれぞれ添加した寒天 1.0% サンプルを作製した。これらは呈味物質のみを添加した寒天サンプルとした。また、これらに 2. 3. 1 で調整したかつお節香気成分、かつおだし(香気成分なし)、かつおだし(香気成分あり)をそれぞれ添加したサンプルも調製した。これら香気成分やかつおだしは、寒天を加温し溶解させた後に添加した。いずれの寒天も 2.5 cm × 2.5 cm × 1.0 cm にカ

ットした。官能評価に用いる際は、TDS 法にはそのままのサイズで、2 点識別法と順位法の場合は、1/2 のサイズにした。

2. 3. 3 官能評価

呈味物質のみを添加した寒天、かつお節香气成分を添加した寒天、かつおだし(香りなし)を添加した寒天、かつおだし(香りあり)を添加した寒天における、好ましさ・味の強さ(味の濃さ)を順位法にて評価した。なお、1 位を 4 点、2 位を 3 点、3 位を 2 点、4 位を 1 点とし、それぞれの評価項目における合計を算出した。さらに TDS 法にて咀嚼中の【記載なし】を評価した。咀嚼中の味は、口に入れた直後から味が感じられなくなるまでの経時的な変化を選択してもらった。味の選択肢は、「塩味」、「うま味」、「甘味」、「酸味」、「寒天の味」の 5 種類、香りの選択肢は、「スモーキー(燻煙)」、「生臭い」、「香ばしい」の 3 種類とした。本研究は秋田県立大学研究倫理規範第 5 条「ヒトを対象とする研究」研究倫理委員会で承認された後、実施した(受付番号第 22-14 号)。

3. 結果および考察

3. 1 粘度の異なる水溶液を用いたアミノ酸と塩の相互作用の検討

3. 1. 1 有機酸とアミノ酸の相互作用をした味増強効果

塩味強度に対しては、酸味と塩味の相互作用による対比効果と抑制効果の両方が確認されている^{4,5)}。有機酸には酸味だけでなく、渋味や苦味、うま味などを伴うものも存在するため、有機酸の種類によって味の相互作用や味質も異なると考えられる。これまで、酢酸⁴⁻⁸⁾やクエン酸⁹⁾と食塩の相互作用では、対比効果による味増強が報告されている。本実験では、リンゴ酸における塩味に与える影響について検討を行った。NaCl 濃度は、煮物の煮汁やラーメンスープなど、食生活において口にする比較的高濃度の汁物を参考に 1.5%とした。また、私たちが液体を口にする際、溶液の粘性も味認識に影響すると考えられる¹⁰⁾。調理において汁物には、あんかけのようなどろみの強いものからスープのような比較的さらさらとしたものまである。そこで、デンプンを用いて 4% (w/w) 糊液を調製し、それらを 1.2 倍、1.4 倍に希釈して粘性の異なる溶液を調製し、粘度が味認識に及ぼす影響についても検討した。4%デンプン糊液、1.2 倍希釈、1.4 倍希釈液の粘度は、それぞれ 6 rpm において 546.9, 121.1, 23.4 cP であった。

4%デンプン糊液におけるリンゴ酸添加の味増強効果ならびに味バランスについて評価した(Fig. 1)。リンゴ酸 0.03%以上添加で有意に味が増強した。一方、味バランスについては、リンゴ酸濃度増加に伴い酸味の割合が増加し、酸味の割合が 50%を超えると酸味が強すぎるため、嗜好性が低下すると評価された。調理への応用を考え、味増強効果があり、嗜好性も良好なリンゴ酸濃度である 0.03%を対象に減塩率の算出を行った。その結果、NaCl 1.15%まで減塩した際に、比較糊液(NaCl 1.5%)と同程度の味強度であると判断し、減塩率を算出したところ、23.3%であることが分かった(Table 1)。

また、粘度が異なることで減塩率に差が生じるのかを検討したところ、デンプン 1.2 倍希釈では 20.0%、1.4 倍希釈では 16.7%と、粘度の低下に伴って減塩率も低下した(Table 1)。一般的に溶媒の粘度が増加するにつれて味の強さが弱まる傾向にあるが¹¹⁻¹³⁾、それは粘度が高まると呈味物質が味細胞に接触しにくくなるためと言われている¹³⁾。本研究において粘度が高い溶液で減塩率が高くなったのは、粘度が高くなったことで呈味物質のわずかな差を認識しにくくなったことが要因であると考えられる。実際に私たちが普段口にする食品は、塩味と酸味という 2 つの味だけではなく、うま味や甘味など、様々な味が複雑に絡まって一つの味を作り出している。酸味と塩味だけでなく、うま味が加わることで、塩味の増強^{7,8)}や味質の改善が予想される。そこで、4%デンプン糊液にさらに MSG を添加することで、有機酸とうま味との相互作用を検討した(Fig. 2)。

リンゴ酸濃度 0.04%糊液では、MSG 無添加溶液よりもさらに味が増強しただけでなく、味バランスも変化した確認できた。強すぎる酸味がうま味によって改善され、嗜好性も良好であると判断し、この濃度で減塩率を算出したところ、26.6%(NaCl・MSG 比較)、40.0%(NaCl 比較)と向上した(Table 1)。有機酸と食塩との相互作用により、味増強効果が現れるが^{4-6,9)}、うま味を併用することによってさらに高い減塩率を示すことが分かった。先行研究より、味のバランスの割合が塩味:うま味:酸味=1:1:1 になることで最も嗜好性が増すことが明らかになっている¹⁴⁾。よって MSG 添加による高い減塩率は、味バランスの向上も影響したと考えられる。一方、パネルからは高粘度の溶液では後味の持続時間が長くなり、少ない塩分量でも満足感が得られたとの意見が多く上がった。そこで、TDS 法を用い

て、後味持続時間を測定しところ、高粘度溶液ほど味の持続時間が長くなること、酸味や塩味を遅く感じる傾向にあること分かった (Fig. 3)。また、うま味を併用すると味の持続時間はさらに長くなることが分かった (Fig. 4)。TDS測定に用いた溶液を味覚センサに供したところ、サンプルの粘度が高くなるに従い、塩味の増強・酸味の抑制が強く

なっていた (Fig. 5 A)。さらに MSG を添加すると、うま味の応答が強くなった。CPA 値 (後味) も高粘度または MSG を併用したサンプルの方が高くなり、官能評価による後味持続時間測定と同様の結果となった (Fig. 5 B)。以上の結果から、口内滞留時間も味増強や減塩率に影響するものと推察される。

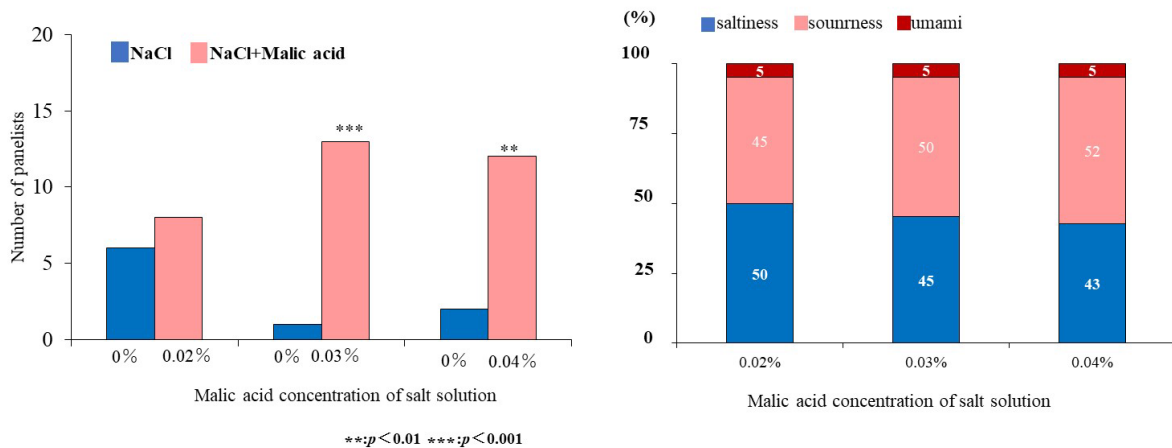


Fig. 1 Taste enhancement and taste balance of NaCl 1.5% + malic acid in 4% starch paste.

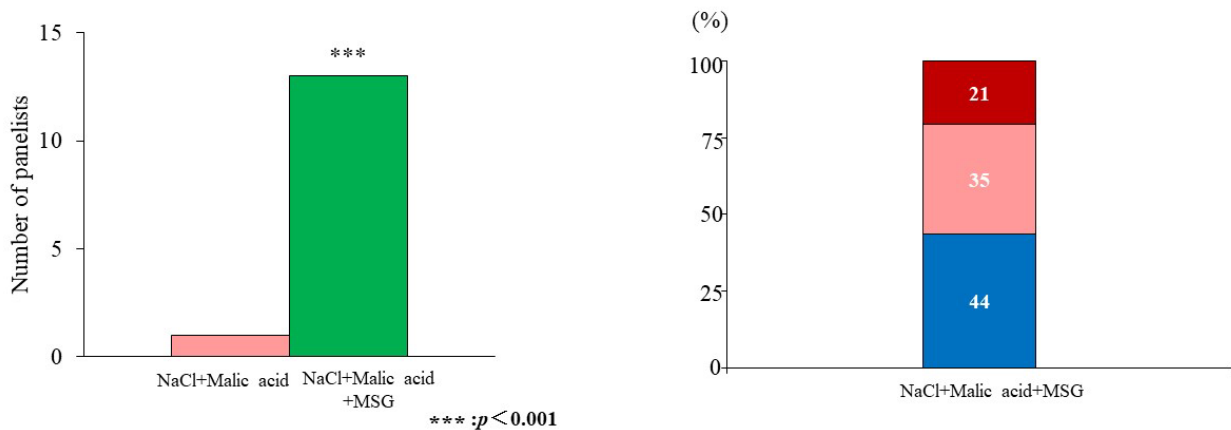


Fig. 2 Taste enhancement and taste balance of NaCl 1.5% + malic acid + MSG in 4% starch paste.

Table. 1 Taste-enhancing effect and salt reduction rate in solutions with different viscosities.

Sample	Malic acid concentration that had a taste-enhancing effect (%)	Salt reduction rate (%) (comparison with NaCl)	Salt reduction rate (%) (comparison with NaCl + MSG)
4% starch paste NaCl 1.5% + malic acid	0.03	23.3	
x1.2 diluted starch solution NaCl 1.5% + malic acid	0.03	20	
x1.4 diluted starch solution NaCl 1.5% + malic acid	0.03	16.7	
Aqueous solution NaCl 1.5% + malic acid	0.003	10	
4% starch paste NaCl 1.5% + MSG 0.5% + malic acid	0.04	40	26.6

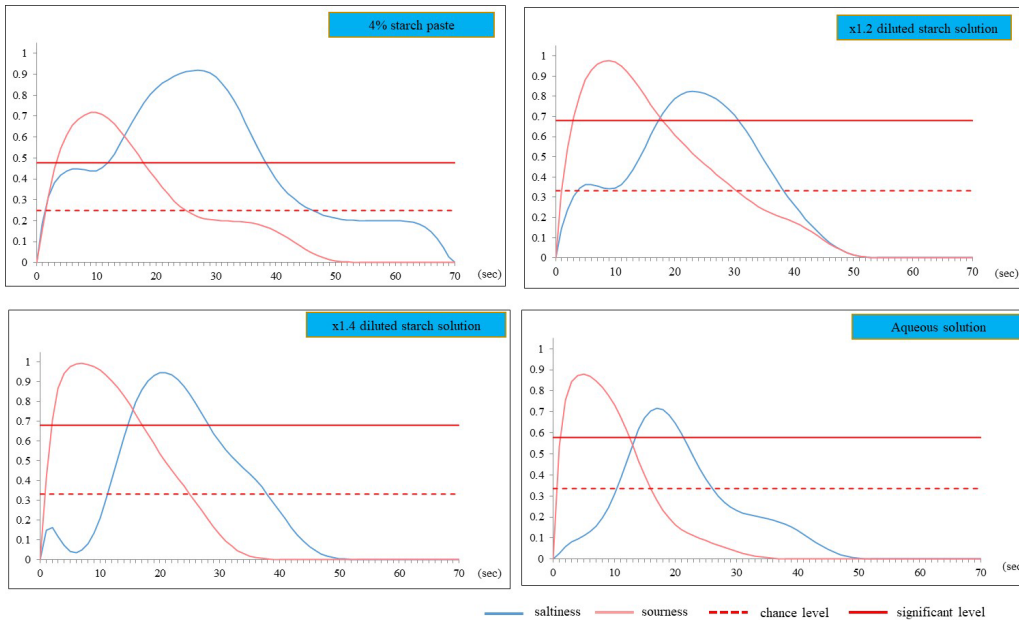


Fig. 3 TDS graphical representation for four sample solutions with different viscosities.

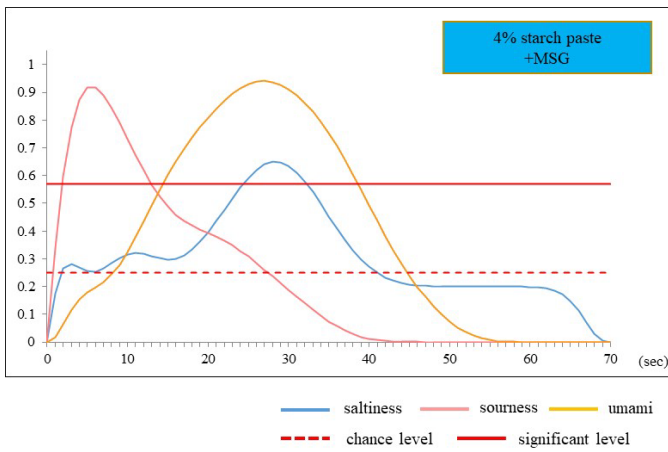


Fig. 4 TDS graphical representation of 4% starch paste with NaCl + Malic acid + MSG added.

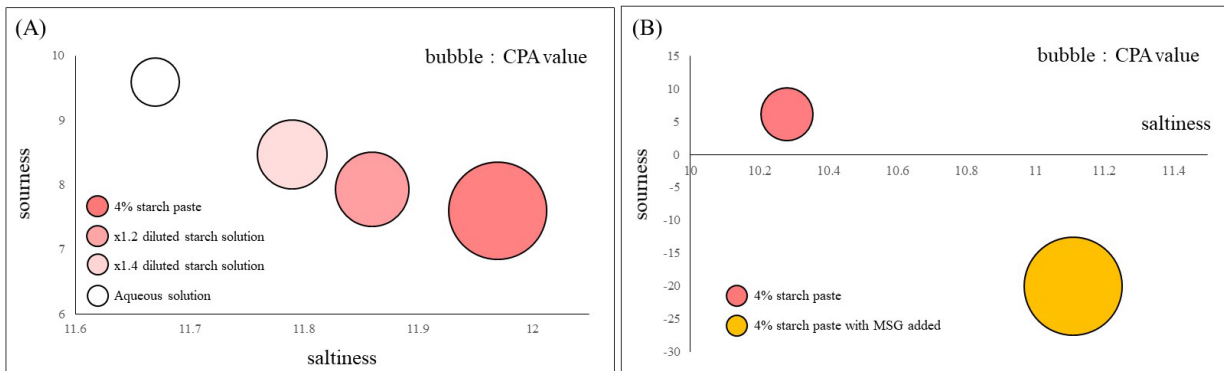


Fig. 5 Evaluation of taste characteristics by taste sensor.
 (A) 4 different viscosity solutions with NaCl and Malic acid added
 (B) Effect of adding MSG to Starch paste containing NaCl and malic acid

3. 1. 2 甘味・うま味アミノ酸の相互作用を利用した味増強効果

我々が魚醤の呈味性について調べたところ、GluやAlaなどアミノ酸や有機酸の相互作用が味形成に大きく影響することを確認した¹⁾。これら呈味アミノ酸は和食調理において使用することが多い醤油や昆布中にも多く含まれていることから、NaCl・MSG・Alaの相互作用について検討した。NaCl+MSG糊液にAla 0.765%添加すると味増強が認められ、17%の減塩が可能になった(**Fig. 6**)。Ala 0.765%添加糊液の味バランスは味増強が認められなかった他の糊液とは異なり、甘味が40%以上あった(**Fig. 6**)。甘味の増加がサンプルの味増強に繋がったものと推察される。また、TDS法にてNaClにMSGやAlaを添加した際の味の持続時間を調べたところ、NaCl < NaCl+MSG < NaCl+MSG+Alaの順で長くなった。これは、うま味や甘味アミノ酸を添加したことにより、味物質が

口内に長く残留したためだと考えられ、上記の酸味とうま味の相互作用と同様、味バランスと味の持続時間が味増強に影響を及ぼすことが示唆された。また、塩味、うま味、甘味の強度は温度によって異なる¹⁵⁻¹⁷⁾と言われており、口に含む際の温度によって味バランスも異なって感じられるのではないかと推察される。そこでAla 0.765%添加糊液を対象に、常温(24°C)、体温付近(37°C)、すらすらに飲めるスープ温度(60°C)と、様々な温度条件下における味強度を二点識別法にて評価したところ、37°Cが味増強に効果的であった。TDS法にて味質の経時変化を調べた。口に入れた直後、37°Cでは塩味、うま味、甘味が均一に感じられていたのに対し、常温や60°Cでは味に偏りが生じていた(**Fig. 7**)。同じサンプルでも温度によって味バランスや味認識に違いが生じるため、味強度に影響を及ぼしたと推察される。

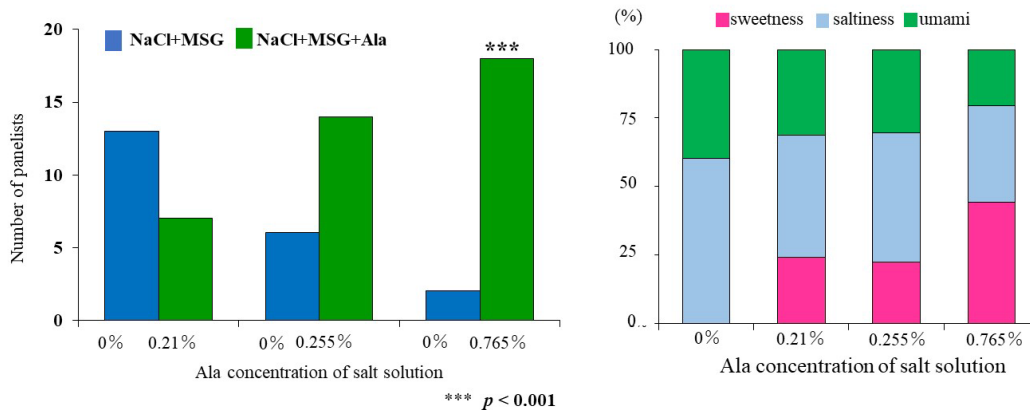


Fig. 6 Taste enhancement and taste balance of NaCl 1.5% + MSG 0.2% + Ala in starch paste.

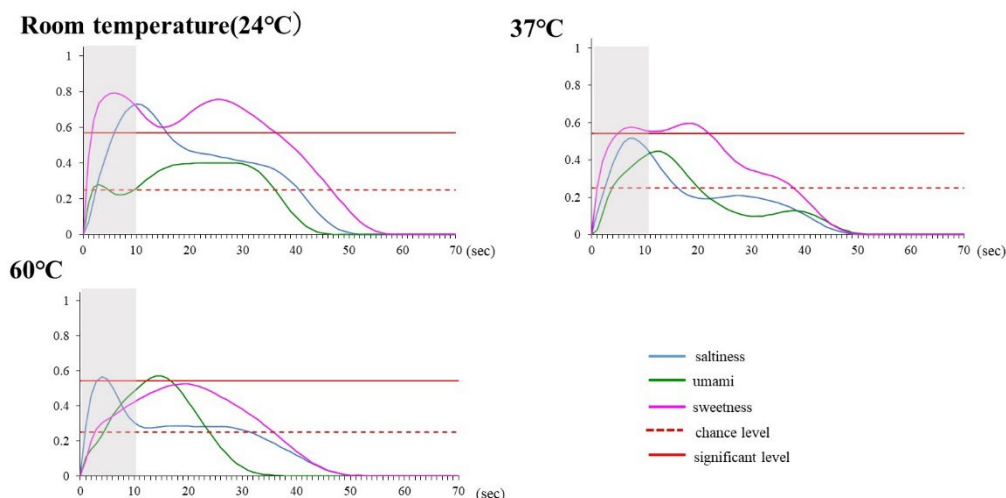


Fig. 7 TDS graphical representation for three sample solutions with different temperatures.

3. 2 食感の異なる寒天を用いたアミノ酸と塩の相互作用の検討

3. 2. 1 甘味・うま味アミノ酸の相互作用を利用した味増強効果

寒天 1.0% サンプルを用いて、甘味・うま味アミノ酸の相互作用を利用した味増強効果について検討した (Fig. 8)。その結果, Gly を 1.02%添加した寒天のみ, 味が強く感じられた ($p < 0.05$)。水溶液を対象とした実験においても, Gly 1.02%添加したものは味が強く感じられており, 食品の形状が異なる場合でも同様の結果となった。各寒天の味バランスを調べた結果を Fig. 9 に示す。Gly 添加濃度の増加に伴い, 甘味が感じられる割合も増加した。味が強く感じられた Gly 1.02%では, 甘味が 40%以上あった。

これまで我々は, 塩味・うま味・酸味が混合した水溶液において, 味増強効果を最大にする味バランスが存在することを報告してきた^{14, 18)}。また, Gly は甘味アミノ酸であるが, Glu との相互作用によりうま味強度にも寄与するという報告がある⁴⁾。我々が口に含んだ際に感じられ食品の味は, 口内中での味成分の複雑な刺激や広がりに影響されるといわれており¹⁹⁾, 本実験においては, MSGとGlyによる味の相乗効果, NaCl と Gly との対比効果など, 様々な味の相互作用が考えられるが, 甘味が 40%以上か, 甘味と塩味がほぼ同等に感じられる際に, 味増強効果が引き起こされたと推察される。

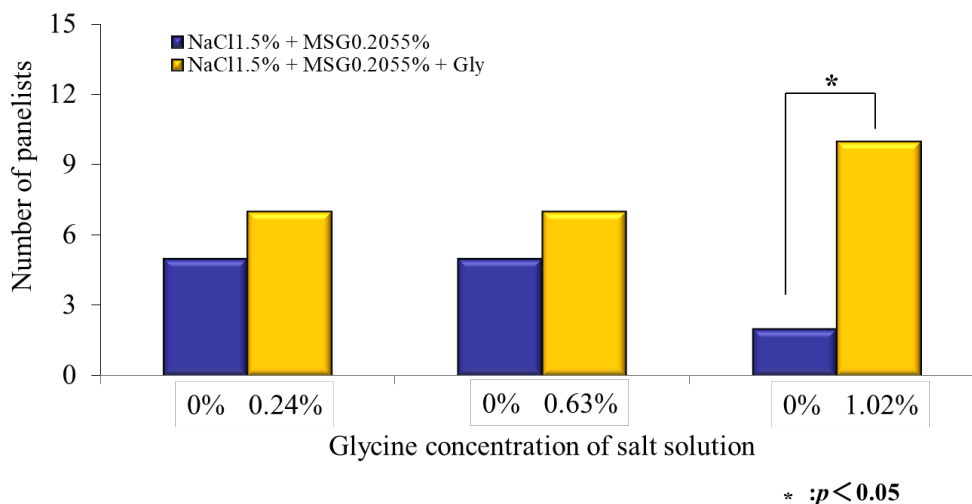


Fig. 8 Taste enhancement of NaCl 1.5% + MSG 0.2% + Gly in agar.

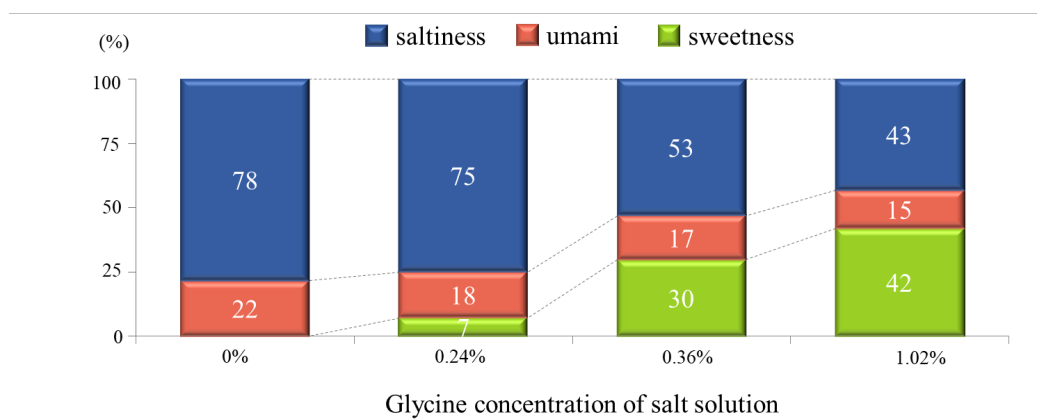


Fig. 9 Taste balance of NaCl 1.5% + MSG 0.2% + Gly in agar.

3. 2. 2 硬さの違いが味強度に与える影響

食品の硬さの違いが味強度に影響するのではないかと考え、味増強が確認できた NaCl 1.5% + MSG 0.21% + Gly 1.02% の濃度組成は変えず、硬さのみが異なる 3 つの寒天を作製し、味強度を比較した (Fig. 10)。その結果、寒天を咀嚼した際に感じられる味の強さは、柔らかいものほど味を強く感じられる傾向にあり、硬さが味強度に影響することが確認できた。これらの寒天咀嚼時の味バランスを比較したところ、サンプル間で差は認められず、これまでのような味バランスが味増強には影響していないことが分かった。そこで、寒天の硬さが咀嚼による味成分の溶出とそれに伴う味認識の変化に影響を及ぼしていると考え、TDS 測定を行った。TDS 曲線による味質比較結果を Fig. 11 に示す。寒天 0.5% サンプルでは、最初に塩味、続いて甘味とうま味が感じられていた。寒天 1.0% サンプルも同様の傾向であった。一方、寒天 1.5% サンプルでは、他のサンプルでは感じられなかった「寒天の味」を最初に感じ、その後、塩味・甘味・うま味が感じられていた。3 種類のサンプル (寒天 0.5%・1.0%・1.5%) の味認識の状態に有意差があるかを調べるため、Significant Level を超えていた時間を比較した (Fig. 11)。寒天 1.0% よりも、寒天 1.5% や 0.5% の方が Significant Level を超えた時間が短かった。寒天 1.5% が短くなった要因は、他のサンプルでは感じられなかった「寒天の味」が、他の味をマスクしたためと考えられる。一方、寒天 0.5% が短くなったのは、サンプルが柔らかいため口内で壊れやすくなり、咀嚼

時間が短くなったことが影響したのではないかと推察した。そこで、測定開始から Significant Level を下回った時点までをサンプルの咀嚼時間として算出した (Fig. 12)。その結果、サンプルの咀嚼時間は、寒天 1.5%、1.0%、0.5% の順となり、柔らかい寒天ほど咀嚼時間が短くなった。寒天の硬さは味成分の溶出のしやすさが影響したものと考え、物性測装置を用いた咀嚼モデル試験を実施した。寒天を圧縮した際に、寒天から溶出する水分量の測定結果を Fig. 13 に示す。寒天 0.5%、1.0%、1.5% いずれも、圧縮回数が増えるごとに溶出した水分量が多くなった。寒天の濃度別に水分量を比較すると、寒天 0.5% が最も多く、寒天 1.5% が最も少なかった。このことから、寒天の濃度が低く (柔らかく) なるにつれて、寒天から水分が溶出しやすくなることが分かった。固形食品では、呈味成分含量以外にも、硬さや咀嚼時の表面積の増加程度、唾液量、吸水量などが影響すること²⁰⁾、甘味は硬いゲルでは比較的弱く、柔らかいゲルでは強く感じられること^{21,22)}、塩味効率には咀嚼に伴うゲルの断片化が影響すること^{22,23)}が報告されている。寒天を用いた本実験における味の相互作用による味増強は、粘性が異なる水溶液と同様の濃度で確認できたが、味の強さと味の持続時間の関係は溶液と寒天では異なっており、固形食品の味を増強するには、咀嚼時の表面積や口内に溶出する水や成分量なども考慮する必要があることが示唆された。

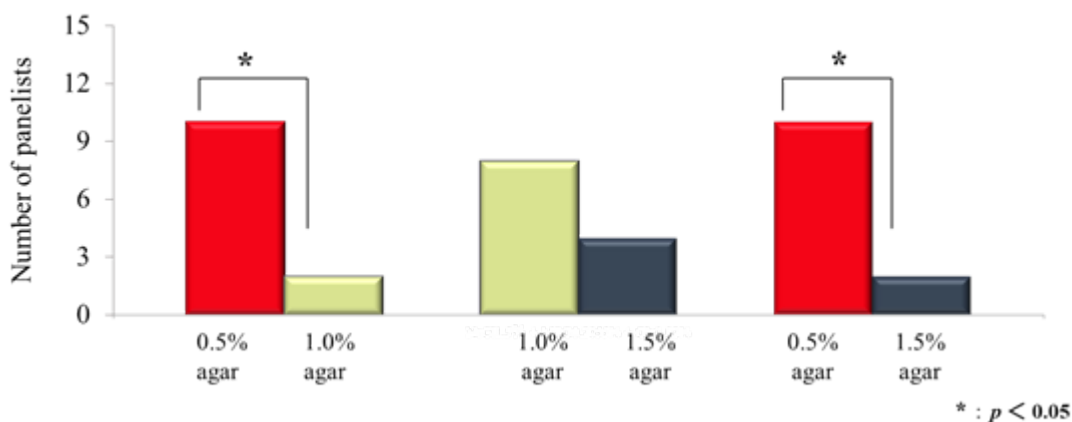


Fig. 10 Comparison of taste strength using 3 types of agar with different hardness.

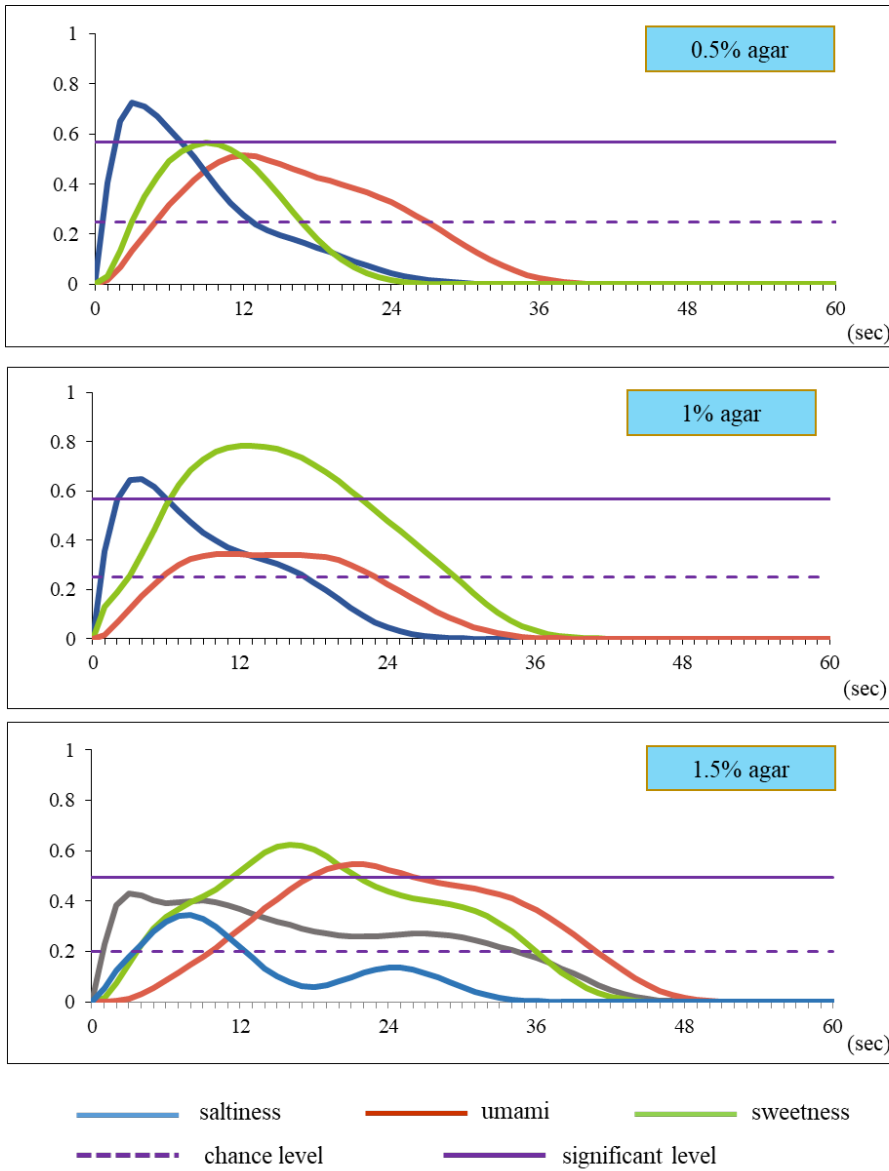


Fig. 11 TDS graphical representation for four sample agar with different hardness.

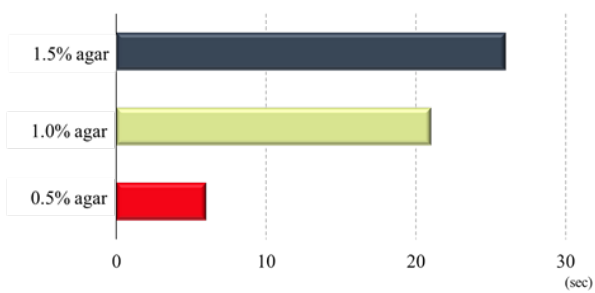


Fig. 12 Comparison of agar chewing time.

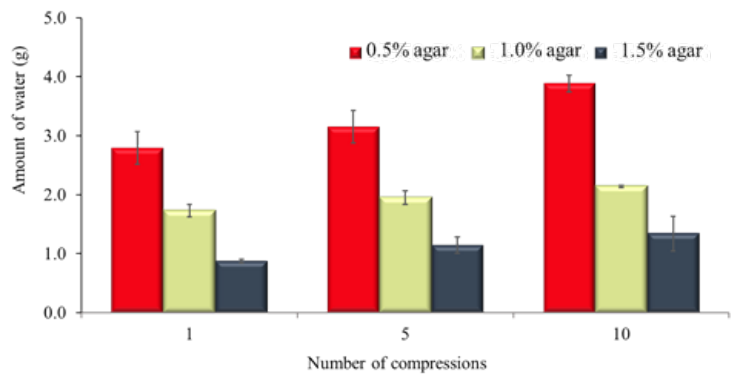


Fig. 13 Moisture elution amount during agar compression.

3. 3 香気成分を添加した寒天を用いた呈味改善効果の検討

3. 3. 1 香気成分が味強度へ及ぼす影響について

3. 2で実施した固形モデル食品を対象とした実験では, NaCl 1.5% + MSG 0.21% + Gly 1.02%の濃度組成に味増強効果が確認できたが, ダシで調理することを想定し, 香気成分と混合することによる影響について検討をした。添加する呈味物質は NaCl 1.5%のみ, NaCl 1.5% + MSG 0.21% , NaCl 1.5% + MSG 0.21% + Gly 1.02%, 以上3つを設定した。それらに呈味物質のみ, かつお節香気成分, かつおだし(香りなし), かつおだし(香りあり)をそれぞれ添加した寒天を比較し, 味の強さ, 好ましさを評価した (Fig. 14, 15)。味の強さについては, いずれの寒天においても, 呈味物質のみを添加した寒天よりかつお節香

気成分を添加した寒天, かつおだし(香りなし)を添加した寒天, かつおだし(香りあり)を添加した寒天の方が味が強いと評価された (Fig. 14)。香気成分のみを添加しただけでも, 十分に味増強が得られることが確認できた。一方, 香気成分とダシの成分が全て入ったかつおだし(香気成分なし)は, 香気成分のみよりもより効果的で, NaCl寒天, NaCl + MSG + Gly 寒天では, 最も味が濃いと評価される傾向にあった (Fig. 14)。好ましさについては, いずれの寒天もかつお節香気成分を添加したものが最も好まれた (Fig. 15)。また, NaCl 寒天においては, かつおだし(香りなし)添加寒天よりも, 呈味物質のみを添加した寒天の方が好まれる傾向にあった。パネルからは, かつおだし(香りなし)添加寒天は咀嚼中に生臭さを感じたとの意見が多く, それが評価に影響したものと考えられる。

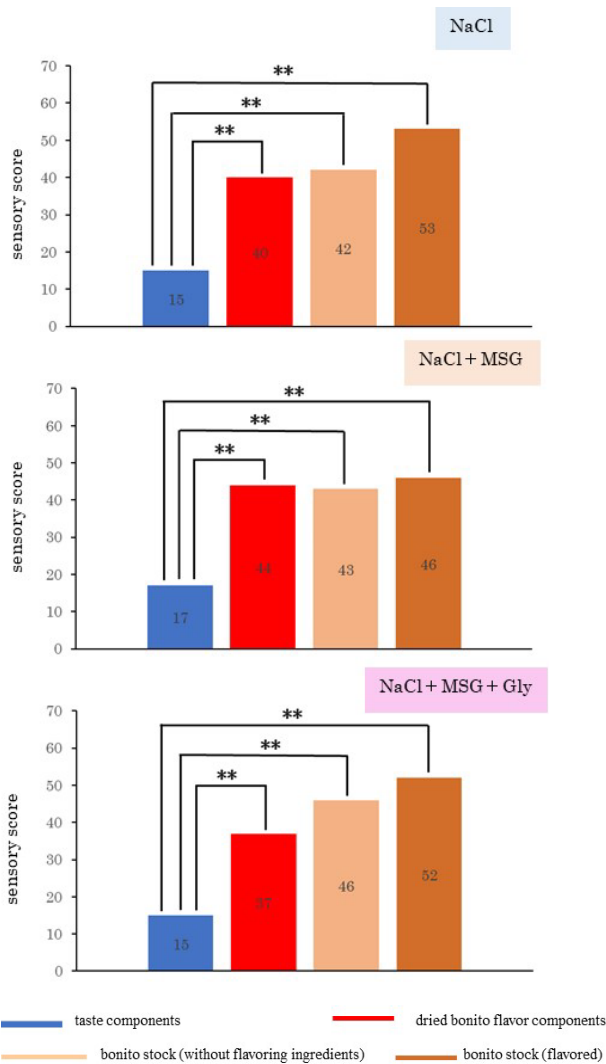


Fig. 14 Comparison of taste intensity of each agar

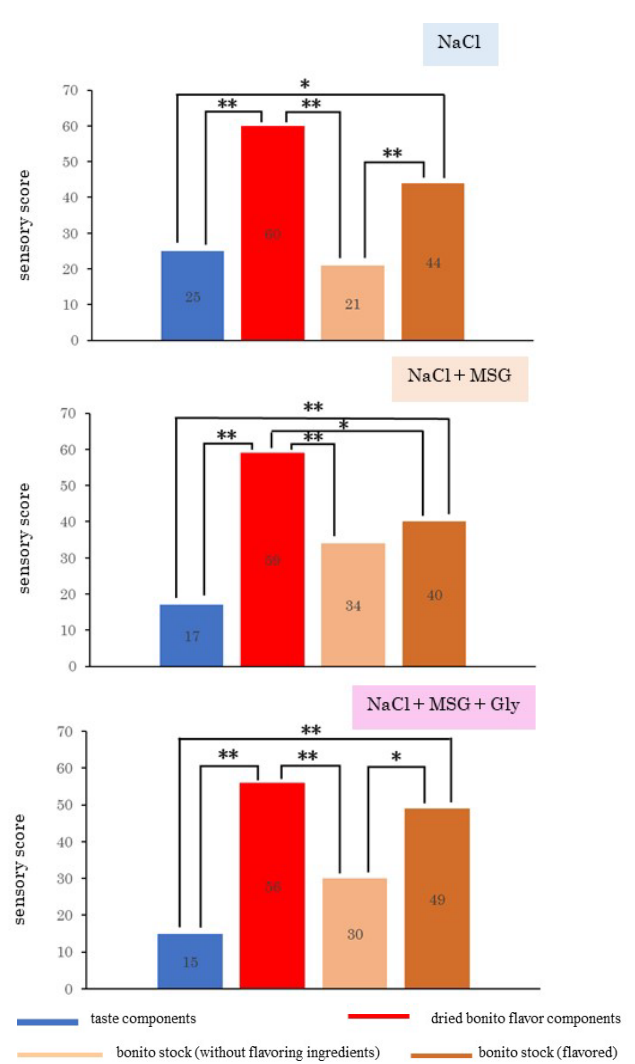


Fig. 15 Comparison of preference of each agar

続いて、TDS 法を用いてこれら寒天を咀嚼した際に感じられる経時的な変化を調べた (Fig. 16 - 19)。

呈味物質のみを添加した寒天における TDS 曲線を Fig. 16 に示す。NaCl 寒天では塩味を主要な味として感じていた。また、NaCl+MSG 寒天ではうま味を、NaCl+MSG+Gly 寒天では甘味を主要な味として感じていた。かつお節香气成分添加寒天の TDS 曲線を Fig. 17 に示す。

いずれの寒天においても、かつお節香气成分の影響が大きくなり、咀嚼直後からスモーキーな香りを強く感じており、呈味物質のみを添加した寒天のような塩味やうま味、甘味などはかなり遅れて感じられていた。NaCl+MSG+Gly 寒天は、他の寒天と比較してスモーキーな香りを感じる時間が短く、甘味の影響が大きくなっていった。

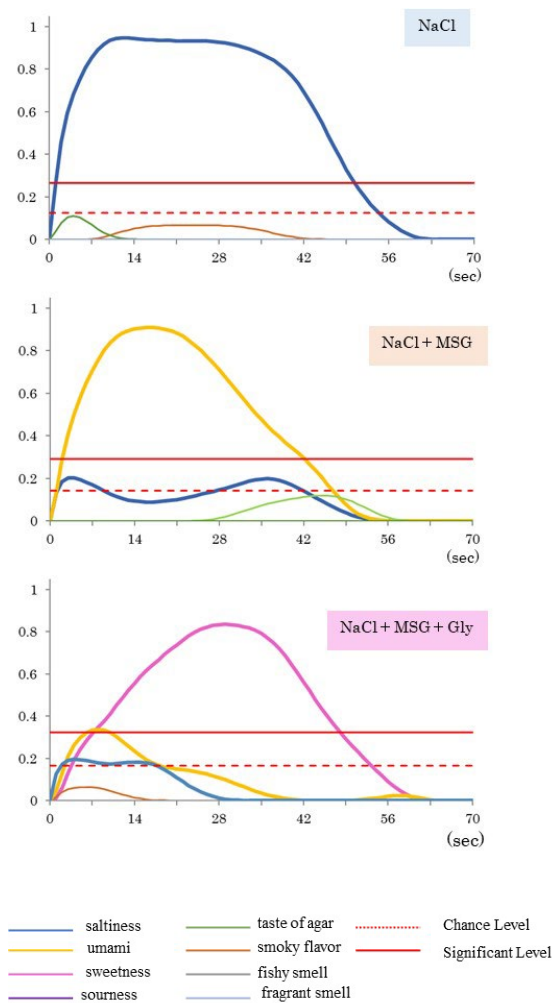


Fig. 16 TDS graphical representation of three sample agars mixed with taste components.

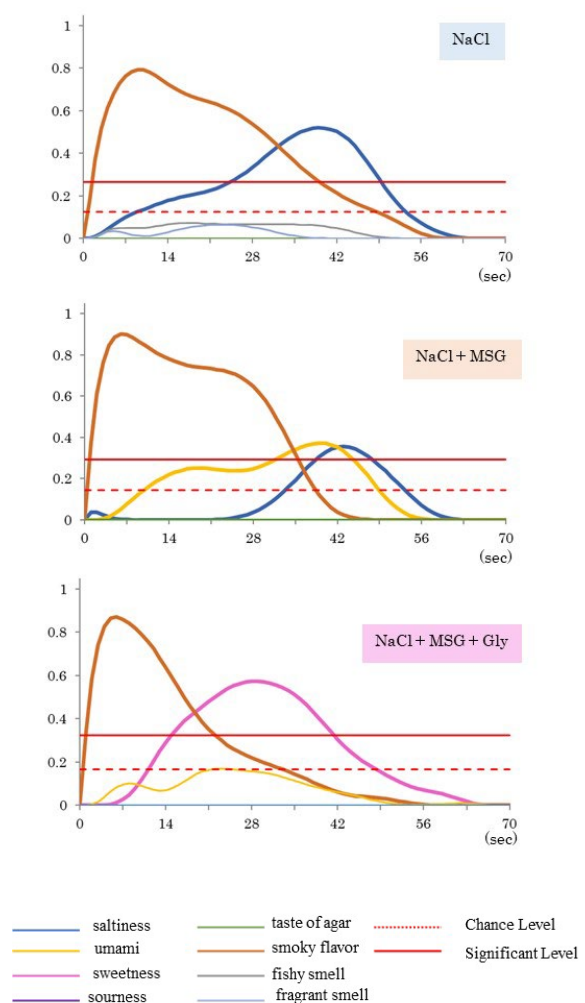


Fig. 17 TDS graphical representation of three sample agars mixed with dried bonito flavor components.

かつおだし(香気成分なし)添加寒天における TDS 曲線を Fig. 18 に示す。かつおだしは、香気成分を取り除いているため、スモーキーな香りはほとんど認識されなかった。NaCl 寒天では生臭さを強く感じていた。順位法を用いて味の好ましさを比較した際、かつおだし(香気成分なし)添加寒天の評価が低かったが(Fig. 15)、生臭さを感じたことの影響が大きかったことが確認できた。一方、他の2つの寒天では生臭さはほとんど感じられず、NaCl + MSG 寒天ではうま味、NaCl + MSG + Gly 寒天ではうま味と甘味を強く感じていた。これは、呈味物質として添加したうま味調味料のグルタミン酸ナトリウム(MSG)とかつお節のうま味成分であるイノシン酸の相乗効果が影響し、うま味が強く感じられたこと、それによって生臭さがマスクされたものと考えられる。かつおだし(香気成分あり)添加寒天の TDS 曲線を Fig. 19 に示す。NaCl 寒天と NaCl + MSG 寒天では咀嚼直後にスモーキーな香りを、続いてかつおだ

しのうま味を強く感じていた。一方、NaCl + MSG + Gly 寒天では、スモーキーな香りはほとんど認識されず、甘味が強く感じられていた。かつお節香気成分添加寒天とかつおだし(香気成分あり)添加寒天では、抽出方法の違いにより香気分量が異なっていると推察されるためその影響もあると考えられるが、一方でかつお節の香りやかつおだしのうま味と Gly との間で相互作用が生じ、甘味が強く感じられたため、スモーキーな香りやうま味がマスクされてしまったことも一因であると推察される。また、3. 2 で実施した固形モデル食品を対象とした実験では、Gly の持つ甘味が味や嗜好性の向上に良い影響を与えていた。本実験でパネルに咀嚼時における寒天の味や嗜好性について自由記載により意見を求めたところ、かつおだし(香気成分あり)を添加した場合は、甘味が強いとの評価が多かった。食品の味増強および嗜好性の向上には、呈味物質の濃度や組成も重要であると考えられる。

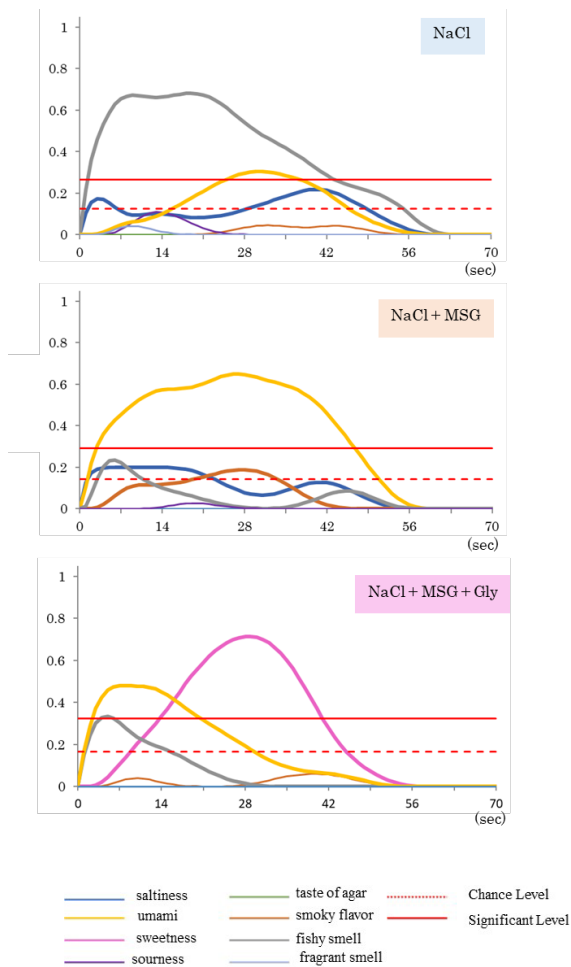


Fig. 18 TDS graphical representation of three sample agars mixed with bonito stock (without flavoring ingredients).

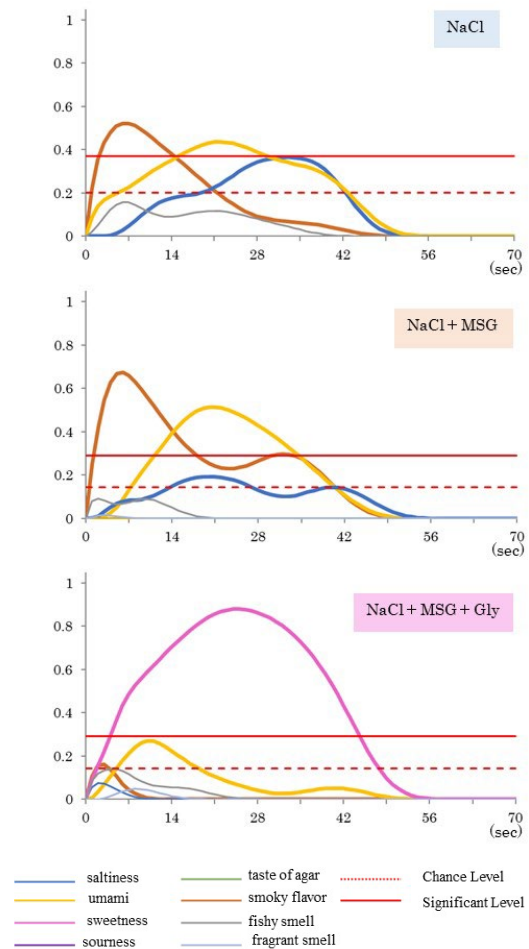


Fig. 19 TDS graphical representation of three sample agars mixed with bonito stock (flavored).

4. まとめ

本研究では、うま味・甘味アミノ酸がもたらす味への効果、またそれらアミノ酸を調味料として煮物などの料理に用いた際の味強度や食感への影響を、モデル食品を用いて検討した。始めに煮物を作る際の煮汁を想定し、粘度の異なる水溶液を用いてアミノ酸と塩の相互作用について検討した。リンゴ酸と食塩の相互作用では、対比効果による味増強が確認された。有機酸濃度の上昇に伴い味は増強するものの、強すぎる酸味が嗜好性の低下に影響を及ぼすという問題があるが、MSG を添加することで酸味の低減が可能になり、嗜好性の向上に繋がった。Ala と MSG の相互作用においても、味増強が確認された。しかし、味の強度や口内中での味の経時変化は、温度による影響も大きかった。Ala は甘味アミノ酸であるが、Glu との相互作用によりうま味強度にも寄与するという報告がある¹⁷⁾。我々が口に含んだ際に感じられ食品の味は、口内中での味成分の複雑な刺激や広がりによって引き起こされたものであると考えられる。今後、減塩食品を作製する際、添加する味物質は相互作用を最大にする濃度組成にすることはもちろん、溶液の粘度や喫食時の温度も考慮する必要がある。

続いて、うま味・甘味アミノ酸を調味料として煮物などの料理に用いた際の味強度や食感への影響を、固形モデル食品(寒天)を対象として評価した。モデル食品の味バランスは、Gly 濃度増加に伴い変化し、味増強に効果的な塩味と甘味の比率があることが示唆された。食品の硬さは、味強度にも影響し、味成分が同量含まれていても、異なって感じられた。TDS 測定の結果、柔らかい寒天ほど味を感じ始めるタイミングが早く、味の持続時間も短かった。圧縮後の寒天の様子を確認したところ、寒天 0.5%の方がゲルの崩壊度が高く、寒天の砕けやすさや離水のしやすさが味成分の溶出量に影響することが分かった。これまで溶液を用いた実験では、味バランスと味の持続時間が味増強に影響を及ぼしていたが^{14, 18)}、固形食品においては味の対比効果が起こりやすい濃度組成にするとともに水分や味成分が溶出しやすい硬さに食品を調製することで、味強度に繋がることが示唆された。

最後に、かつお節や醤油などダシによる煮物調理を想定し、香気成分を加えた寒天(ダシによる煮込みを想定し

た固形モデル食品)を用いて、香りがもたらす味強度への影響を検証した。味強度は、香気成分のみを添加した場合でも、十分な効果が得られた。醤油特有の香りが塩味を増強した²⁴⁾という報告やかつお節の香りやかつおだしの添加が味増強に効果的である²⁵⁾との報告があるように、本実験においても味成分と香気成分との混合が味強度や風味向上に影響したと考えられる。また、好ましさについても高く評価され、香気成分が風味の向上に繋がっていることが確認できた。かつおだし(香気成分あり)は、より味強度が強く感じられる傾向にあり、寒天に添加したMSG とかつお節由来のイノシン酸との相乗効果が影響したのと考えられる。これまで NaCl, MSG, Gly の相互作用によって味強度が増し、嗜好性の向上に繋がると考えてきたが、かつおだし(香気成分あり)と混合した場合は、味は増強されるものの、相互作用によって Gly の甘味が強調されてしまい、かつお節の香りやだしのうま味がマスクされるなど、味のバランスに大きく影響した。かつお節特有の香りがおいしさの低下を防ぐことに関与しているとの報告があるが²⁶⁾、食品の味増強および嗜好性の向上には、呈味物質の濃度や組成も重要であると考えられる。本実験において、香気成分だけでも十分効果があること、他の味成分との相互作用が加わることでさらに味増強を引き起こすことが示唆された。現在、実際に大根を用いて煮物を調理し、かつお節香気成分の付与が味増強に影響を与えるか、検討中である。

5. 文献

- 1) 石川匡子, 内田詩乃, 佐藤春香, 伊藤俊彦, 渡辺隆幸, “市販魚醤の品質ならびに味質評価”, 日本海水学会誌, 70, 308-316 (2016)
- 2) 遠藤由香, 石川匡子, “にがり成分が食塩の呈味性に及ぼす影響”, 日本海水学会誌, 69, 105-110 (2015)
- 3) 中村愛美, 佐藤文華, 吉田智, 熊谷昌則, 鈴木靖志, “とろみ調整食品添加に伴う味質変化の味覚センサによる評価”, 日本食品科学工学会誌, 57, 380-388 (2010)
- 4) 浜島教子, “基本的四味の相互関係について”, 調理科学, 8, 132-136 (1975)
- 5) 浜島教子, “味の相互作用について(第2報)塩から味と酸味の関係”, 家政学雑誌, 27, 255-261 (1979)
- 6) 坂本真里子, 岡田千穂, 井上あゆみ, 小笠原靖, 赤間裕文, 畑江敬子, “食酢希釈液と食塩水溶液の関

- 値および食酢と食塩の共存が閾値に及ぼす影響”, 日本調理科学会誌, 42, 167-173 (2009)
- 7) 坂本真里子, 岡田千穂, 井上あゆみ, 吉田達郎, 小笠原靖, 赤間裕文, 畑江敬子, “3種のだしにおける食酢の減塩効果の検討”, 日本調理科学会誌, 42, 159-166 (2009)
- 8) 小笠原靖, 吉田達郎, 岡田千穂, 坂本真里子, 赤間裕文, 畑江敬子, “料理における食酢の減塩効果の検討”, 日本調理科学会誌, 42, 238-243 (2009)
- 9) 石川匡子, 高橋美子, 遠藤由香, 佐藤史奈, 小笠原美穂, 奥山慧一, 熊谷昌則, 秋山美展, 松永隆司, “塩味を強調する梅塩の開発”, 日本海水学会誌, 67, 219-223 (2013)
- 10) AL. Koliandris, C. Morris L. Hewson, J. Hort, AJ. Taylor, B. Wolf, “Correlation between saltiness perception and shear flow behavior for viscous solutions”, *Food Hydrocolloids*, 24, 792-799 (2010).
- 11) 山本由喜子, 中林美希, “デンプン溶液の味覚強度(塩味・甘味)に及ぼす粘度の影響”, 日本調理科学会誌, 32, 334-337 (1999)
- 12) R. M. Pangborn, Z. M. Gibbs, C. Tassan, “Effect of Hydrocolloids on Apparent Viscosity and Sensory Properties of Selected Beverages”, *J. Texture Studies*, 9, 415-436 (1978)
- 13) 早瀬仁美, “テクスチャーの違いによる味の感じ方”, 島田淳子, 下村道子編 調理とおいしさの科学, 朝倉書店, 112 (1993),
- 14) 竹澤夏菜, 石川匡子, “他の味成分との相互作用を利用した高塩分濃度食品における減塩方法の検討”, 平成30年度日本調理科学会大会研究発表要旨集, ID24-7 (2018)
- 15) 伏木亨, “食品と味”, 光琳, pp.82-84 (2003)
- 16) 島津善美, 藤原正雄, 渡辺正澄, 太田雄一郎, “コクの要素と寄与成分を活かした食品開発”, 日本調理科学会誌, 42, 327-333 (2009)
- 17) 清水哲二, “味の混合.”, 油科学, 33, 581-587 (1984)
- 18) 石川匡子, 佐藤理央, 櫻田光佳里, 高橋美子, “酸味と塩味の相互作用による塩味増強を用いた減塩方法の検討”, 秋田県立大学ウェブジャーナル A, 8, 14-19 (2020)
- 19) 西村敏英, “コクの要素と寄与成分を活かした食品開発.”, 食品と開発, 53, 20-23 (2018)
- 20) A. Shimada, K. Hatae, A. Shimada, “Sweetness Perception of Solid Food”, *J. Home Econ. Jpn.*, 41, 137-142 (1990)
- 21) K. Kohyama, F. Hayakawa, Y. Kazami, K. Nishinari, “Sucrose release from agar gels and sensory perceived sweetness”, *Food Hydrocolloids*, 60, 405-414 (2016)
- 22) 岡崎恵美子, Tran Thi My Hanh, 神山かおる, 大迫一史, “ねり製品のテクスチャーと塩味効率”, 日本水産学会誌, 86, 95 (2020).
- 23) Tran Thi My Hanh, K. Kohyama, K. Osako, E. Okazaki, “The effect of breaking properties and fragmentation on the perceived saltiness of surimi gels prepared with various heating conditions”, *J. Exp. Food Che.*, 3, 1000125 (2017).
- 24) M. Manabe, R. Sakaue, A. Obata, “Contribution of the retronasal odor of soy sauce to salt reduction”, *J. Food Sci.*, 85, 2523-2529 (2020)
- 25) Y. Ogasawara, S. Mochimaru, R. Ueda, M. Ban, S. Kabuto, K. Abe, “Preparation of an Aroma Fraction from Dried Bonito by Steam Distillation and Its Effect on Modification of Salty and Umami Taste Qualities”, *J. Food Sci.*, 81, C308-C316 (2015)
- 26) M. Manabe, S. Ishizaki, T. Yoshioka, N. Oginome, “Improving the Palatability of Salt-Reduced Food Using Dried Bonito Stock”, *J. Food Sci.*, 74, S315-S321 (2009)

Study on the Possibility of Flavor Improvement by the Interaction of Salt and Amino Acid

Kyoko Ishikawa

Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

Summary

Salt, an important seasoning, adds saltiness to food and enhances or suppresses other flavors. Because excessive salt intake is known as one cause of lifestyle-related diseases, salt reduction is recommended. However, drastic salt reduction can adversely affect the effective balance of taste and palatability of food overall. Reportedly, when umami is added to salt, even a small amount of salt increases the saltiness and gives a feeling of satisfaction. Additionally, the texture of ingredients, such as the extent to which taste substances are eluted into saliva during mastication, is believed to affect palatability. This study was conducted to clarify factors which strongly influence the relations among "concentration composition of salt and amino acids," "permeability of seasonings into food," and "physical properties of food."

During our three years of study, we have investigated the following taste improvement effects by experimentation.

- (1) Amino acid interaction using aqueous solutions with different viscosities
- (2) Interaction of amino acids and salt using agar with different textures
- (3) Using agar to which aroma components have been added

Results of experiment (1) confirmed that interaction between umami amino acids and sweet amino acids enhances the taste of foods. It was inferred that temperature strongly affected taste intensity, and that the balance of taste and differences in perception of taste also exerted effects. From experiment (2), we confirmed that taste improvement using interactions is effective not only for liquids but also for solid foods. Moreover, results obtained from chewing agar indicate that softer agar is associated with a shorter duration of taste, earlier sensation of taste, and stronger taste, suggesting that agar hardness affects the taste strength. For experiment (3), in addition to amino acids, we added aroma components extracted from bonito flakes. The findings confirmed that agar containing fragrant ingredients has a strong flavor and a long-lasting aftertaste. Agar containing only the fragrant component had the same strength as the agar containing both the umami component and the fragrant component of katsuobushi.

These results suggest that adding flavor in addition to amino acid interactions not only enhances taste: it also improves palatability.

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

2024年3月
March, 2024

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 978-4-902192-63-6

助成研究報告書

食品科学プロジェクト研究（2020－2022）

風味に着目した塩味受容メカニズムの解明と
食品加工における塩の有効利用に関する研究

公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団