

Oregano (Carvacrol) の嗅覚刺激による適塩効果に関する神経および 内分泌メカニズムの解明

長田 和実

日本大学生物資源食品開発学科食品栄養学研究室

概要

研究の目的:これまでの研究で, Oregano およびその主要活性成分の Carvacrol を雌雄の C57BL/6J (B6) マウスに暴露すると, 適塩効果を発揮することを突き止めた。また, Oregano の嗅覚刺激は分界条床核のうち食塩摂取調節領域である分界条床核腹側部を有意に刺激することが示された。本研究では, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激による食塩摂取抑制作用の神経生理学的メカニズム解明を目的とし, 以下の実験を行った。

方法:雌マウスに低 Na 食を給餌し, Oregano 1 g あるいは Carvacrol 1 μ l の匂いを 2 時間呈示しながら純水と 0.3 M 食塩水の二瓶選択実験を行った。二瓶選択実験後のマウスの脳のうち, 嗅球, 扁桃体, 視床下部など嗅覚刺激や食塩調節に関係する領域を採取し, 定量 PCR による mRNA 発現の解析を行った。さらに, Oregano 1 g または Carvacrol 1 μ l を 1 時間呈示後に雌雄マウス脳内の Na 調節に関連する中枢の Fos 陽性細胞密度の変化を, 免疫組織学的手法により評価した。

結果および考察:行動実験の結果, 匂い暴露群は対照群と比較して, 継続的に低い食塩水摂取率を示した。行動実験終了直後にマウスより脳をサンプリングし, 脳内神経伝達物質やホルモン 17 種類に対する定量 PCR を行った結果, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激により, セロトニン系とオキシトシン系の信号強度が高まった。また, Oregano 曝露では, 食塩摂取促進作用のあるオレキシン系の低下と抑制作用のあるコルチコトロピン放出ホルモンやノルアドレナリン系の増加が確認された。これらの遺伝子発現の変化が, 適塩作用を誘起することが示唆された。さらに, 扁桃体でドーパミン受容体 1, 2, 3 が増加したことは, Oregano の匂いにナトリウムに対する嗜好性を調節している可能性を示唆している。

Oregano および Carvacrol の嗅覚曝露は, 雌雄 B6 マウスで分界条床核腹側部や扁桃体中心核, セロトニン神経の起始核である縫線核など複数の食塩調節経路を形成する神経核を広範に活性化し, その結果食塩摂取抑制作用を誘起することが示唆された。一方で, 雌マウスのみドーパミン神経系の神経核である側坐核や腹側被蓋野を刺激したことは, これらの匂い成分に対する嗜好性を高め, 適塩作用を間接的に促進している可能性が示唆された。

1. 背景および研究目的

【食塩摂取量の現状】

食塩は電解質浸透圧の形成, 活動電位の発生, 共輸送による栄養素の吸収など生命現象の根幹にかかわる生理機能に関与する重要な栄養素であるが, その一方で過剰摂取により高血圧, 脳卒中, 心疾患など複数の慢性疾患を発症するリスクがある。WHO は生活習慣

病の予防の観点から, 食塩の摂取量を 5.0 g/day 未満に推奨しているが, 日本の食塩摂取量の現状は, 男性平均 10.7 g/day, 女性平均 9.1 g/day であり¹⁾, WHO の勧告を大きく上回っている。さらに, 多くのアジア・ヨーロッパの国々では 12.0 g/day 以上の食塩を摂取しており²⁾, 食塩の過剰摂取はグローバルかつ深刻な栄養学的問題であり, 適切な塩分摂取(適塩)が推奨されている。

【嗅覚と食塩摂取調節の関係】

過去の研究によれば、イワシやインスタントブイヨンスープの匂いは、食品中の塩分含量を25%程度低下させる³⁾。一方、醤油の香りには塩味増強作用があると報告されている⁴⁾。一方、ハーブやスパイスの中には塩味摂取抑制作用が報告されており⁵⁾、Wangらの報告ではハーブの香りがスープの食塩含有量を低下させると報告している⁶⁾。このように、食品の匂いが塩味調節作用を持つことを示唆する研究報告は多いが、減塩を促進する匂い物質の同定に至った研究は少ない。また、減塩することにより食材の苦みなど不快な味が際立ち、風味を損ねることも知られており⁷⁾、解決すべき課題は残されている。

我々は以前の助成研究では、塩味を調節するにおい物質として、塩味の強いイタリア料理などに使われ広く嗜まれているオレガノ(Oregano)に焦点を当てた⁸⁾。実際、可食部100g当たりのNa量はトマトケチャップ1298mgに対して、Oreganoなど香辛料を含むピザソースでは413mgと少ない。このことから、Oreganoの匂いが風味を損なうことなく食塩摂取量を抑制するという仮説を設定した。

【Oreganoの匂い成分の嗅覚刺激による適塩作用】

先行研究⁸⁾では、GC-MS分析の結果、Oreganoの揮発性成分中で最も高いピーク面積を示したのはカルバクロール(Carvacrol)であり、全揮発性成分の約66%を占めていた。このことから、Oreganoの匂いの主成分はCarvacrolであり、少なくとも主要な活性成分の一つであると考えられた。したがって、以降の実験ではCarvacrolをOreganoの主要な匂い成分と位置づけ、これらの匂い刺激による適塩作用を確認するためにマウスを用いて行動実験を実施した。

気相中Carvacrol濃度がほぼ同濃度になる条件であるOregano 1gまたはCarvacrol単体1 μ lの匂いをC57BL/6J雌雄マウスに24時間曝露し、その期間中に水と0.15M食塩水の二瓶選択行動実験を実施した結果、雌雄ともに顕著な適塩作用が確認された。しかし、Carvacrolは濃度依存的に適塩作用が誘起され、その作用から雌マウスの方が雄マウスよりも感受性が高いことが示された。この理由を明らかにするために、マウスのCarvacrolの嗜好性の性差について検討した。二瓶選択行動実験と同様の飼育環境下でCarvacrol 1 μ lを10分間呈示し、マウスの匂い嗅ぎ行動時間を測定した。その

結果、雌マウスにのみ匂いに対する誘引性が見られ、匂い嗅ぎ時間に明確な雌雄差が確認された。したがって、雌マウスは雄マウスよりも吸入されたCarvacrolの量が多かったため、Carvacrolの適塩作用が顕著に表れたものと考えられた。

さらに、Oreganoの匂い刺激による脳領域活性化の解析を目的として雌雄マウス脳内のFos陽性細胞密度の測定を実施した結果、Oreganoの匂いはNa調節作用に関与する分界条床核腹側部の神経活性を有意に刺激することが明らかになった。

【本研究の目的および意義】

上述のように、先行研究ではOreganoおよびCarvacrolによる嗅覚刺激がマウスの食塩摂取を抑制することが示されているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。これらの嗅覚刺激が中枢神経系を介して食塩摂取を調節する可能性が考えられる。これまでの研究から、食塩摂取調節には複数の脳内神経サーキットが関与することが報告されている。そこで本研究では、OreganoおよびCarvacrolの嗅覚刺激による適塩作用の神経生理学的メカニズム明らかにすることを目的とし、以下の実験を実施した：

1. 二瓶選択法を用いた適塩作用の行動学的解析
2. 定量PCRによる中枢の食塩摂取調節に関与するmRNA発現の解析
3. 免疫組織学的手法を用いたマウスの中枢の食塩調節領域に与える影響の解析

食品業界では減塩を試みるものの、多くの場合、加工食品の需要が低下するという課題がある⁸⁾。食の魅力を維持しながら減塩を実現するために、KClによる代替塩の使用⁹⁾、グルタミン酸ナトリウムの利用¹⁰⁾、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を用いた塩味抑制¹¹⁾、スピラントールやアルギニン塩酸塩¹²⁾など、さまざまな対策が提案されている。本研究では、嗅覚刺激による食塩摂取調節のメカニズムを解明することで、新たな減塩方法の開発に寄与することを目指す。

2. 研究方法

2. 1 Oregano の匂いがマウスの NaCl 嗜好性に及ぼす影響(二瓶選択行動実験)

2. 1. 1 実験動物

以下のすべての実験において実験動物は C57BL/6J マウスを用い、国立衛生研究所の実験動物の世話と使用に関するガイドに従って世話をした。本研究開始に先立ち、日本大学動物倫理研究委員会によって実験計画書の承認を受けた(承認番号: AP23BRS072-1, AP24BRS054-1, AP24BRS061-1)。C57BL/6J 雌マウス(日本クレア株式会社, 東京, 日本)を搬入後、各 3 頭のグループでポリカーボネート製の飼育ケージ(26 × 18 × 12 cm)に入れ、SPF 動物施設内の 22°C, 光周期 12 時間(非反転 12 時間明暗サイクル)の部屋に収容し、滅菌水と標準マウス飼料(Lab Chow CL-2, 日本クレア株式会社, 東京, 日本)(以下、通常食)を自由に摂取できるようにした。二瓶選択実験は①Oregano 群および対照群, ②Carvacrol 群および対照群の 2 つの組み合わせに分け、それぞれ 2 回ずつ実施した。本実験では 8 週齢のマウスを 3 頭 1 群として、①Oregano 群 n = 18(6 セット), 対照群 n = 15(5 セット), ②Carvacrol 群 n = 18(6 セット), 対照群 n = 15(5 セット)として実施した。

2. 1. 2 二瓶選択用給水瓶の作成

上径 16 mm × 下径 12 mm × 高さ 20 mm のシリコン栓 NO-1(アズワン株式会社, 大阪, 日本)の中心部に穴を空け、自動給水バルブ CTV-60 用ペンクリップ(日本クレア株式会社, 東京, 日本)を取り付けてマウスの飲水部を作成した。次に、針なし 10 ml テルモシリンジ(テルモ株式会社, 東京, 日本)の接続端部分と、作成したマウスの飲水部を結合し、漏水しないことを確認した。テルモシリンジはシリンダー部分のみを使用した。これを 2 本 1 セットとして結束バンドで上下 2 か所を結束し、二瓶選択用給水瓶を作成した。各給水瓶のノズルからきちんと水が出ることを確認した。これにより実験中に水分供給が適切に行われることを保証した。

2. 1. 3 Oregano および Carvacrol の匂い呈示方法

マウスによる Oregano や Carvacrol の経口摂取を避けるため、次のような臭気発生装置を作成した。ハンダゴテで底面部に直径 5 mm の穴を 9 個開けたポリスチレンシャーレ(φ35 mm, IWAKI, AGC テクノガラス株式会社, 静岡, 日本)と、同様に底面部全体に直径およそ 30 mm の穴を

空けたシャーレの底面を向かい合わせた部分をパラフィルムで固定した。この臭気発生装置内に 3 cm × 3 cm に切り取ったペーパーフィルターを設置し、乾燥 Oregano(株式会社 GABAN, 東京, 日本)を 1 g 敷き詰めた。

Carvacrol の場合は、臭気発生装置内に 4 cm × 4 cm の脱脂綿(イワツキ株式会社, 東京, 日本)を設置し、純度 99%以上の Carvacrol(東京化成工業, 東京, 日本) 1 μl を染み込ませた。先行実験により、Oregano 1 g が気相に発する Carvacrol 濃度は約 2~4 ppm で、これは Carvacrol 1 μl を呈示した際の気相中濃度とほぼ一致することが明らかとなっている。あるいは蒸留水 100 μl を脱脂綿に染み込ませた。それぞれの臭気発生装置をマウス飼育ケージ上部中央にテープで固定して匂いを呈示した。

2. 1. 4 二瓶選択法による食塩水摂取量の測定

二瓶選択用給水瓶(目盛付き)は飼育ケージ中央に設置し、予備実験として純水を入れて 24 時間後の二瓶の飲水量に差が無くなるまで期間を設けた。その後、0.3 M 食塩水, 低 Na⁺食(日本クレア株式会社, 東京, 日本), 匂いへの汎化期間を設けた。具体的には、通常食を給餌しながら純水および 0.3 M 食塩水の二瓶選択実験を 1 日 2 時間, 計 3 日間実施した。次に餌を低 Na⁺食に変更し、純水および 0.3 M 食塩水の二瓶選択実験を 1 日 2 時間, 計 5 日間実施した。これはマウスを低 Na⁺食に慣れさせるとともに、低 Na⁺食摂取時の食塩水摂取量を確認するためである。なお、飼料中の Na⁺量は、通常食が 0.23%に対して低 Na⁺食は 0.003%であった。その後、餌を通常食に戻し、Oregano 群には Oregano 1 g, Carvacrol 群には Carvacrol 1 μl, 対照群には純水 100 μl を呈示しながら、両瓶とも純水の二瓶選択実験を 1 日 2 時間, 計 3 日間実施した。

続いて本実験では、餌を再び低 Na⁺食に変更し、純水および 0.3 M 食塩水の二瓶選択実験を実施し、これを 0 日目のデータとした。翌日、Oregano, Carvacrol, 純水を各群に呈示しながら、純水および 0.3 M 食塩水二瓶選択実験を 1 日 2 時間, 5 日間にわたって実施した。なお、予備実験および本実験の両方において、二瓶の飲水量に左右差が生じないよう、隔日で給水瓶の配置を反転させた。

2. 2 Oregano 及び Carvacrol の嗅覚刺激によるマウス組織中 mRNA 発現への影響

2. 2. 1 実験動物

二瓶選択行動実験の5日目終了後のマウスを使用した(Oregano 群 n = 18, 対照群 n = 15 / Carvacrol 群 n = 18, 対照群 n = 15)。

2. 2. 2 組織および mRNA の採取

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、解剖したマウスの脳を 3 ml の組織用安定化溶液 (RNA later™, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, 東京, 日本) に 4°C で 24 時間浸漬した後, -80°C で保存した。そして, これらのサンプルから mRNA を収集するために, 保存された脳を室温で解凍した。その後, 脳サンプルの採取¹³⁾は, マウス脳アトラス¹⁴⁾を用いて確認しながら, 嗅球, 扁桃体, 視床下部の組織をそれぞれ約 10 mg 摘出し, チューブに入れた。各サンプルを BioMasher Standard (Takara, 東京, 日本) によりホモジナイズした。mRNA は以下のように抽出された。圧砕された各サンプルは, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, 東京, 日本) によって RNA を精製するために使用した。なお, RNeasy Plus Mini Kit による RNA の精製の際には, ゲノム DNA 汚染を回避するため RNase-free DNase (Qiagen, 東京, 日本) 処理をした。cDNA は, PrimeScript™ キット (Takara, 東京, 日本) を使用し, 逆転写によって生成された。ゲノム DNA がシグナルに影響を与えないように, RNA を逆転写酵素の存在下と非存在下で並行して処理した。

2. 2. 3 リアルタイム定量 PCR

マウスへの Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激による影響を検討するために, リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) アッセイを実行した。測定した遺伝子は表 1 に示す。リアルタイム定量 PCR 反応は, 以下の条件を用いて行った:

94°C で 1 分間 (1 サイクル), 94°C で 10 秒, 62°C で 10 秒, 72°C で 10 秒 (40 サイクル)。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナー (GAPDH) は, 標的 mRNA 発現を正常化するために使用された⁵⁾。リアルタイム定量 PCR 反応は, Kapa SYBR® FAST (Kapa; Salt River Cape Town, South Africa) を用いて実行した。

表 1. 測定した遺伝子の種類とその分類

セロトニン系	セロトニン受容体 1a (5-HTR1a)
	セロトニン受容体 2b (5-HTR2b)
	セロトニン受容体 2c (5-HTR2c)
	セロトニン受容体 3a (5-HTR3a)
	トリプトファンヒドロキラーゼ (Tph2)
オキシトシン系	オキシトシン (Oxt)
	オキシトシン受容体 (Oxtr)
ストレス関連	副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (Crh)
ノルアドレナリン系	アドレナリン受容体 α1 (AdRa1)
	アドレナリン受容体 β1 (AdRβ1)
オレキシン系	オレキシン (Orx)
	オレキシン受容体 1 (Orx1r)
	オレキシン受容体 2 (Orx2r)
レニン-アンジオテンシン系	アンジオテンシン II 受容体 1a (At2r1a)
ドーパミン系	ドーパミン受容体 1 (DR1)
	ドーパミン受容体 2 (DR2)
	ドーパミン受容体 3 (DR3)

2. 2. 4 脳切片作成方法

脳を安定してスライスするためにゲル (アガロース 0.45 g / TAE 30 ml) で脳を固定した。固定した脳はビブラーム (D.S.K LINEAR SLICER MODEL PRO7, 堂阪イーエム社) を用いて, Bregma より 0.6 mm 前方から 5.4 mm 後方の脳領域を冠状断に 100 μm の厚さでスライスした。脳切片はマウス 1 頭につき 48 枚作成し, 2 枚ずつ PBS を入れた 24 ウェルプレート (接着細胞培養プレート 24F 独立ウェルタイプ, 住友ベークライト社) に並べた。

2. 2. 5 脳切片染色方法

染色手順を示す。24 ウェルプレート内の PBS を除去し, 脳切片を 0.4% Triton X-100 / PBS (PBSx) (2 ml/well) で 2 回洗浄した。内在性ペルオキシダーゼ活性を不活性化するため, 0.6% H₂O₂ / PBSx (500 μl/well) で 30 分インキュベートし, 再び PBSx (2 ml/well) で 2 回洗浄した。

次にブロッキング溶液 (0.3% ヤギ血清 (NGS) / PBSx, 160 μl/well) で室温, 1 時間インキュベート後, 溶液を除去し,

一次抗体混合溶液(0.2%一次抗体/ 0.8% NGS/PBSx, 160 μ l/well)を加え, 4°Cで24時間インキュベートした。

インキュベート後, PBSx(2 ml/well)で2回洗浄し, 二次抗体混合溶液(0.03%二次抗体/ 1.0% NGS/PBSx, 160 μ l/well)で室温, 1時間インキュベートした。その後, PBSx(2 ml/well)で2回洗浄し, アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(160 μ l/well)で1時間インキュベートした。再度 PBSx(2 ml/well)で2回洗浄後, DAB/ H_2O_2 染色液(160 μ l/well)で20分間染色反応を行った。最後に蒸留水で洗浄し, スライドガラスの表面左端に上から日付け, 性別およびマウス番号, 実験群名(Control, Oregano, Carvacrol)脳切片番号を記載した。スライドガラスをキムワイプでよく拭いた後, 裏面を上にして脳の左右を確認しながら右上から左下にかけて6枚の組織切片を並べ, マリノール 400 cps をカバーガラス中央に7~9滴ほど帯状に滴下し, 封入した。

2. 2. 6 Fos 陽性細胞密度の測定方法

染色した脳切片は BZ-X810 オールインワン顕微鏡(KEYENCE, 日本, 大阪)を用いて観察および撮影した。撮影後, コンピューター画像解析システムハイブリッドセルカウント BZ-H4C を用いて Fos 陽性細胞の密度を計測した。計測は, c-Fos 陽性細胞の面積比を算出し, 対照群との相対比較を行った。

2. 2. 7 測定した脳部位

1) 摂水のコントロールセンターである終板血管器官(VOLT), 2) AT2 による Na^+ のホメオスタシスに関与することが報告されている¹⁶⁾。正中視索前核(MnPO), 外側視索前核(LPO), 分界条床核周辺領域(STLP, STLD, STMA, vBNST, PS, SHy), 視床下部室傍核(PVN), 3) 味覚刺激による Na^+ 調節の神経経路である扁桃体中心核内側部(CeM), 視床下部外側野(LH), 青斑核(LC), 外側結合腕傍核(LPBC)¹⁷⁾, 4) Na^+ の欲求に直接関係するドーパミン神経汎性投射系の神経核である側坐核(NAc), 腹側被蓋野(VTA), 5) セロトニン神経の起始核である縫線核(DR)¹⁸⁾, 6) その他嗅覚に関係する中枢である視床室傍核(PV), 扁桃体内側核(前背部:MeAD, 前腹部:MeAV), 扁桃体皮質核(ACo)などを観察した。4%PFA で固定し, 30%ショ糖溶液に浸漬した脳サンプルは, 嗅球より4~4.5 mm 後方を切断し, Bregma 0.74 mm~0.98 mm から Bregma -2.18 mm まで採取した。その後, 脳サンプルを後方より Bregma -5.52 から Bregma -4.60 付近まで切片を合計48枚作成した。

3. 研究結果

3. 1 Oregano の匂いがマウスの $NaCl$ 嗜好性に及ぼす影響(二瓶選択行動実験)

Oregano 曝露群では Control 群よりも継続して低い Na^+ 嗜好率を示し, 特に2, 3, 5日目においては有意な低下が見られた。さらに, Carvacrol 曝露では実験開始から2日目において, Carvacrol 群で有意に食塩摂取率が低下し, これは実験期間内で常に低い傾向にあった。

3. 2 Oregano 及び Carvacrol の嗅覚刺激によるマウス組織中 mRNA への影響

嗅球, 扁桃体, 視床下部を用いてリアルタイム定量PCR分析を実施した。リアルタイム定量PCRにより遺伝子解析したすべての標的遺伝子を GAPDH の発現量によって正規化した後に, 対照群を基準として相対的に遺伝子発現量を算出した。以下, 分類ごとに結果をまとめた。統計処理は Mann-Whitney *U*-test を用いた。

(1) セロトニン系の mRNA 発現は, 対照群と比較して Oregano 曝露群において, 嗅球と扁桃体の *5-HTR1a* および *5-HTR2b* の発現量が有意に増加した(*5-HTR1a*: 嗅球 $P=0.033$, 扁桃体 $P=0.048$, *5-HTR2b*: 嗅球 $P=0.040$, 扁桃体 $P=0.046$) (図1)。さらに, 視床下部では *5-HTR2b* の発現量が有意に増加した($P=0.038$)。また, 対照群と比較して Carvacrol 曝露群において, 視床下部で *5-HTR2c* 発現量が有意に増加し($P=0.004$), 扁桃体では *5-HTR1a* の発現量が有意に増加した($P=0.013$)。セロトニン合成酵素である *Tph2* の発現量は Oregano 曝露群および Carvacrol 曝露群において, いずれの脳領域においても有意な変化は見られなかった。これらの結果より, Oregano 1 g および Carvacrol 1 μ l の2時間曝露によってセロトニン系の信号強度の増加が示された(図1)。

(2) オキシトシン系では対照群と比較して, Oregano 曝露群において視床下部の *Oxt* 発現量が有意に増加した($P=0.003$)。また, Carvacrol 曝露群においては嗅球の *Oxtr* 発現量が有意に増加した($P=0.001$)。これらの結果より, Oregano および Carvacrol の曝露によってオキシトシン系の信号強度の増加が示された(図1)。

(3) ノルアドレナリン系では Oregano 曝露群において, 嗅球および扁桃体で *AdRa1* の発現量が有意に増加した(嗅球 $P=0.040$, 扁桃体 $P=0.002$) が, *AdR β 1* の発現量はいずれの脳領域においても変化は見られなかった。また,

Carvacrol 曝露群においては *AdRa1*, *AdRβ1* ともにいずれの脳領域においても有意な変化は見られなかった (図 2)。

(4) ストレス関連遺伝子では, *Crh* の mRNA 発現量は, 対照群と比較して Oregano 曝露群において, 扁桃体での発現量が有意に増加した ($P=0.002$)。その他の脳領域および Carvacrol 曝露群のいずれの脳領域においても, 発現量に変化は見られなかった。

(5) オレキシン系すなわち *Orex*, *Orex1r*, *Orex2r* の mRNA 発現量は, Oregano 曝露群および Carvacrol 曝露群の嗅球, 視床下部, 扁桃体のいずれの脳領域においても変化は見られなかった。

(6) レニン-アンジオテンシン系では, *At2r1a* の mRNA 発現量は Oregano 曝露群および Carvacrol 曝露群の嗅球, 視床下部, 扁桃体のいずれの脳領域においても変化は見られず, レニン-アンジオテンシン系の信号強度には影響を与えなかった。

(7) ドーパミン系の mRNA 発現は, 大將軍と比較して Oregano 曝露群において, 扁桃体で *DR1*, *DR2*, *DR3* の発現量が有意に増加した (*DR1*: $P=0.036$, *DR2*: $P=0.012$, *DR3*: $P=0.037$) (図 2)。一方, Carvacrol 曝露群においては *DR* の発現量が有意に減少した ($P=0.037$)。

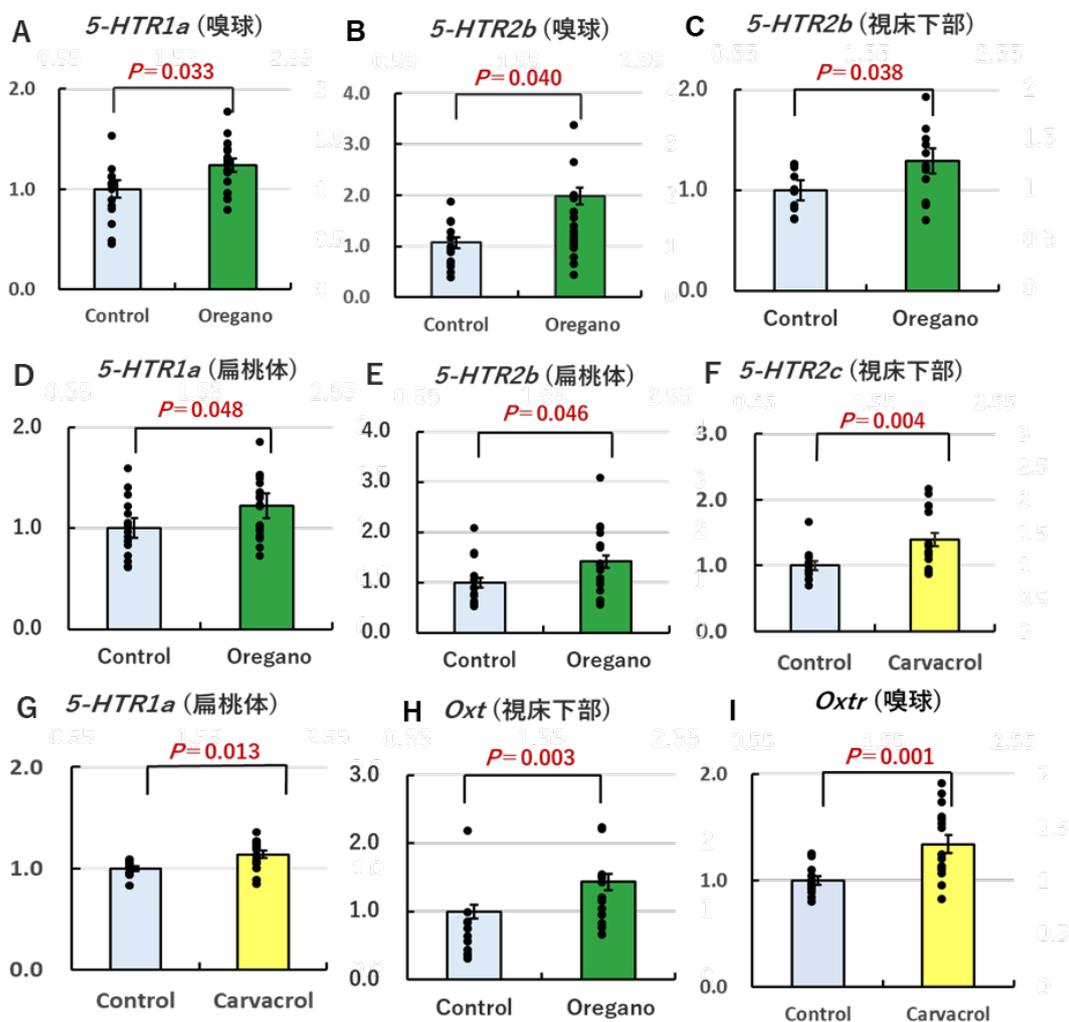


図 1. Oregano および Carvacrol 曝露が C57BL/6J マウス♀の脳領域におけるセロトニン-オキシトシン系の mRNA 発現に及ぼす影響

A: *5-HTR1a* (嗅球), B: *5-HTR2b* (嗅球), C: *5-HTR2b* (視床下部), D: *5-HTR1a* (扁桃体), E: *5-HTR2b* (扁桃体), F: *5-HTR2c* (視床下部), G: *5-HTR1a* (扁桃体) H: *Oxt* (視床下部), I: *Oxtr* (嗅球) の mRNA 発現量。縦軸は「それぞれの標的遺伝子の発現量/GAPDH の発現量」をコントロールを 1 とした場合の比率を示している。対照群に対する Oregano 曝露群または Carvacrol 曝露群の 2 群間における統計的有意性は, Mann-Whitney *U* test によって検出された。N = 11~18 頭/1 群

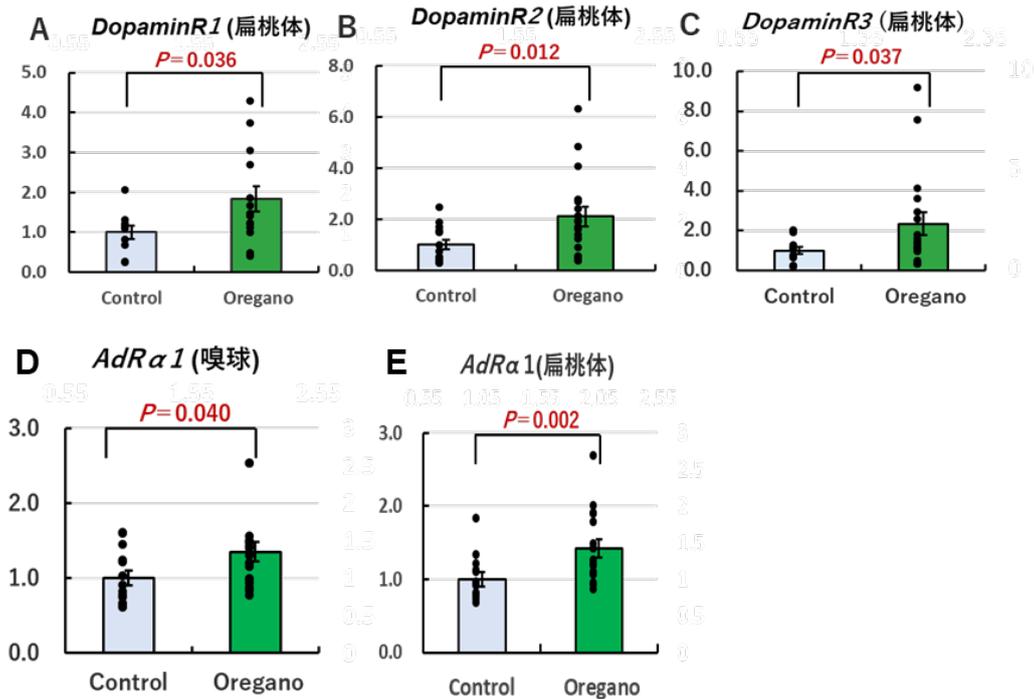


図2. 雌マウスに対する Oregano 曝露がドーパミン系, ノルアドレナリン系 mRNA 発現に及ぼす影響
 Oregano 曝露群の扁桃体における A:ドーパミン受容体(DR)1, B:DR2, C:DR3, D-E:アドレナリン受容体 $\alpha 1$ mRNA の発現量を示す。
 縦軸は「それぞれの標的遺伝子の発現量/GAPDH の発現量」をコントロールの 1 とした場合の比率を示している。
 Mann-Whitney *U* test

3. 2 免疫組織化学的研究法によるマウス脳内の Fos 陽性細胞密度の計測(表 2)

3. 2. 1 電解質ホメオスタシス調節系に対する影響

食塩摂取調節に関与する分界条床核腹側部 (vBNST) および扁桃体中心核 (CeM) について, 雌マウスでは Oregano, Carvacrol 曝露群ともに Fos 陽性細胞数が有意に増加した (vBNST: Oregano 曝露群 $P = 0.001$, Carvacrol 曝露群 $P = 0.005$, CeM: Oregano 曝露群 $P = 0.024$, Carvacrol 曝露群 $P = 0.032$)。雄マウスでは, vBNST で Oregano および Carvacrol 曝露群において Fos 陽性細胞数が有意に増加したが (vBNST: Oregano 曝露群: $P < 0.0001$, Carvacrol 曝露群 $P < 0.0001$), CeM では有意な変化は見られなかった。また, 水分摂取調節に関与する終板血管器官 (VOLT) では, 雌雄マウスにおいて Oregano, Carvacrol 曝露群ともに有意な変化は見られなかった。

分界条床核腹側部の近傍の領域に存在する, 分界条床核外側後方部 (STLP), 分界条床核外側背側部 (STLD), 傍分界条床核 (PS), 分界条床核 (STMA), 視

床下部中郭核 (Shy) については雌雄マウスともに, Oregano および Carvacrol 曝露の嗅覚刺激による有意な変化は見られなかった。

3. 2. 2 セロトニン神経汎性投射系に対する影響

セロトニン神経の起始核である縫線核 (DR) では, 雌雄マウスともに, Oregano および Carvacrol 曝露群で Fos 陽性細胞密度が有意に増加した (雌マウス: Oregano 曝露群 $P = 0.007$, Carvacrol 曝露群: $P = 0.01$, 雄マウス: Oregano 曝露群 $P < 0.0001$, Carvacrol 曝露群 $P = 0.046$)。

3. 2. 3 味覚刺激による Na^+ 調節系への影響

外側結合腕傍核 (LPBC) では, 雌マウスにおいて Oregano および Carvacrol 曝露で Fos 陽性細胞密度が有意に増加したが (Oregano 曝露群 $P = 0.019$, Carvacrol 曝露群 $P = 0.033$), 雄マウスでは Oregano 曝露群でのみ Fos 陽性細胞密度が有意に増加した ($P = 0.009$)。一方で, 味覚刺激による Na^+ 調節系に関与し, ノルアドレナリン神経の起始核である青斑核 (LC) では雌マウスにおいて変化は見られず, 雄マウスの Oregano 曝露群でのみ有意な増加が見られた ($P = 0.039$)。

表 2. Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激による Fos 陽性細胞密度への影響

	♀ マウス			♂ マウス		
	対照群	Oregano群	Carvacrol群	対照群	Oregano群	Carvacrol群
分界条床核腹側部 vBNST	1.00 ± 0.14 ^a	3.09 ± 0.65 ^b	5.88 ± 0.57 ^b	1.00 ± 0.19 ^c	3.59 ± 0.47 ^d	3.08 ± 0.33 ^d
扁桃体中心核 CeM	1.00 ± 0.21 ^a	8.18 ± 2.28 ^b	5.39 ± 0.31 ^b	1.00 ± 0.22	1.42 ± 0.62	1.29 ± 0.27
終板血管器官 VOLT	1.00 ± 0.21	2.29 ± 0.97	1.96 ± 0.68	1.00 ± 0.50	1.17 ± 0.57	1.61 ± 0.69
青斑核 LC	1.00 ± 0.32	3.57 ± 1.04	1.91 ± 0.71	1.00 ± 0.26 ^c	2.62 ± 0.22 ^d	1.74 ± 0.24
外側結合腕傍核 LPBC	1.00 ± 0.17 ^a	9.08 ± 2.08 ^b	1.12 ± 0.22 ^b	1.00 ± 0.12 ^c	4.09 ± 0.99 ^d	8.76 ± 3.06
縫線核 DR	1.00 ± 0.18 ^a	2.01 ± 0.21 ^b	2.23 ± 0.16 ^b	1.00 ± 0.29 ^c	3.95 ± 0.58 ^d	2.05 ± 0.059 ^d
視床下部室傍核 PVN	1.00 ± 0.24 ^a	5.04 ± 0.99 ^b	4.70 ± 0.84 ^b	1.00 ± 0.29 ^c	2.52 ± 0.70	3.76 ± 0.29 ^d
正中視索前核 MnPO	1.00 ± 0.16 ^a	2.33 ± 0.51 ^b	2.46 ± 0.55 ^b	1.00 ± 0.49 ^c	3.17 ± 0.37 ^d	4.01 ± 0.39 ^d
視床室傍核 PV	1.00 ± 0.15	1.01 ± 0.15	0.62 ± 0.065	1.00 ± 0.19	1.42 ± 0.26	0.75 ± 0.26
視床下部外側野 LH	1.00 ± 0.19 ^a	2.27 ± 0.60 ^b	2.03 ± 0.080 ^b	1.00 ± 0.15	2.12 ± 0.57	2.64 ± 0.33
側坐核 NAc	1.00 ± 0.25 ^a	4.37 ± 0.98 ^b	5.70 ± 1.29 ^b	1.00 ± 0.43	2.37 ± 0.69	2.93 ± 0.67
腹側被蓋野 VTA	1.00 ± 0.22 ^a	2.08 ± 0.75 ^b	3.27 ± 0.92 ^b	1.00 ± 0.27	2.36 ± 0.19	0.81 ± 0.21
扁桃体内側核前背部 MeAD	1.00 ± 0.25 ^a	1.13 ± 0.32	2.56 ± 0.077 ^b	1.00 ± 0.21	1.21 ± 0.40	1.21 ± 0.22
扁桃体内側核前腹部 MeAV	1.00 ± 0.31 ^a	1.28 ± 0.49	2.92 ± 0.29 ^b	1.00 ± 0.56	0.41 ± 0.23	0.27 ± 0.059
扁桃体皮質核 ACo	1.00 ± 0.33	0.87 ± 0.14	1.33 ± 0.45	1.00 ± 0.26	0.35 ± 0.13	0.63 ± 0.19
分界条床核 STMA	1.00 ± 0.19	1.74 ± 0.33	1.28 ± 0.21	1.00 ± 0.27	1.64 ± 0.69	1.07 ± 0.19
分界条床核外側後方部 STLP	1.00 ± 0.22	1.85 ± 0.43	1.08 ± 0.21	1.00 ± 0.24	2.06 ± 0.26	1.52 ± 0.20
分界条床核外側背側部 STLD	1.00 ± 0.13	1.43 ± 0.51	1.34 ± 0.37	1.00 ± 0.39	2.13 ± 0.30	1.82 ± 0.44
傍分界条床核 PS	1.00 ± 0.30	1.67 ± 0.28	1.54 ± 0.42	1.00 ± 0.16	1.38 ± 0.39	2.28 ± 0.55
視床下部中郭核 Shy	1.00 ± 0.14	1.24 ± 0.22	1.66 ± 0.10	1.00 ± 0.24	2.05 ± 0.84	2.52 ± 0.18

b-d: 異なる符号間に有意差あり, P<0.05

3. 2. 4 視床下部—正中視索前核, 視床下部室傍核, 視床下部外側野への影響

正中視索前核(MnPO)視床下部室傍核(PVN), 視床下部外側野(LH)については, 雌マウスの Oregano 曝露群および Carvacrol 曝露群において, 有意に Fos 陽性細胞密度が増加した(MnPO:Oregano 曝露群 $P=0.023$, Carvacrol 曝露群 $P=0.039$, PVN:Oregano 曝露群 $P=0.006$, Carvacrol 曝露群 $P=0.036$, LH:Oregano 曝露群 $P=0.021$, Carvacrol 曝露群 $P=0.025$)。一方で, 雄マウスでは MnPO は Oregano および Carvacrol 曝露群で, PVN は Carvacrol 曝露群でのみ有意に Fos 陽性細胞密度が増加していた(MnPO:Oregano 曝露群 $P=0.025$, Carvacrol 曝露群 $P=0.006$, PVN: $P=0.007$)。また, LH では有意な差は見られなかった。

3. 2. 5 報酬系—側坐核, 腹側被蓋野

側坐核(NAc), 腹側被蓋野(VTA)については, 雌マウスでのみ Oregano 曝露群および Carvacrol 曝露群で有意に Fos 陽性細胞密度が増加し(NAc:Oregano 曝露群 $P=0.024$, Carvacrol 曝露群 $P=0.009$, VTA:Oregano 曝露群 $P=0.0027$, Carvacrol 曝露群 $P=0.004$)。雄マウスでは両群において有意な差は見られなかった。

4. 考察

Oregano 1 g および Carvacrol 1 μ l を雌マウスに 2 時間呈示した結果, 両群で適塩作用が確認された。したがって, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激は短時間曝露においても適塩作用を誘起することが示された。

また, 定量 PCR の結果, セロトニン系, オキシトシン系, ノルアドレナリン系および副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの発現が複数の部位で有意に活性化していた。特に, セロトニン神経系を介したオキシトシンの分泌の促進が示唆され, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激による適塩作用のメカニズムの一端が明らかになった。一方, オレキシン系やレニン-アンジオテンシン系にはいずれの脳領域においても変化は見られず, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激はこれらの系の信号強度には影響を与えないことが示された。また, 扁桃体や視床下部におけるドーパミン受容体の発現量の増加は, Oregano および

Carvacrol の匂いに誘引性があり, 間接的に食塩摂取抑制を促進した可能性を示唆している。

免疫組織化学的解析では, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激によって, 雌マウスにおいて食塩摂取調節に関与する vBNST, CeM, LPBC, PVN, MnPO, LH の Fos 陽性細胞密度が有意に増加した。雄マウスでは vBNST および MnPO での活性化が確認されたが, それ以外の神経核では効果は限定的であった。また, 味覚刺激による Na⁺調節系に関与する LC では, Oregano 曝露後に雄マウスで Fos 陽性細胞が増加したものの, 雌マウスでは変化がなく, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激による食塩摂取抑制に雌雄差があることが示唆された。一方, 水分摂取調節に関与する VOLT では, 雌雄ともに変化が見られなかったことから, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激が水分摂取には影響を与えない可能性が示唆された。

さらに, 忌避, 嫌悪および恐怖反応に関与する STLP, STLD, ACo, STMA の神経活動には変化が見られず, Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激がマウスに対して忌避や嫌悪, 恐怖反応を引き起こさないことが示された。一方, 本能的な嗜好行動に関与する扁桃体内側核(MeAd, MeAV)では, Carvacrol 曝露群の雌マウスで神経活動の亢進が認められた。また, 報酬系に関与する側坐核(NAc)および腹側被蓋野(VTA)は雌マウスでのみ確認され, 雄マウスでは変化がなかった。この結果は, 匂い嗅ぎ行動試験で雌マウスのみが Oregano および Carvacrol に誘引性を示したことと一致し, 適塩作用に雌雄差が生じた一因である可能性がある。

定量 PCR および Fos 陽性細胞数の測定結果を図 3 に示す。Oregano および Carvacrol の嗅覚刺激は複数の食塩摂取調節経路を形成する神経核を広範に活性化し, 適塩作用を誘起することが示された。また, 定量 PCR の結果は, 食塩調節に関連する神経核の活性化と概ね整合性があり, 例えば, Oregano あるいは Carvacrol によって刺激された扁桃体, 視床下部で, 適塩作用のあるセロトニン神経や, オキシトシン分泌が活性化している。その他アドレナリン神経, ドーパミン神経の信号強度の上昇にも影響が及んでおり, これらの嗅覚刺激の脳内に及ぼす広範かつ明確な影響力を示すものである。

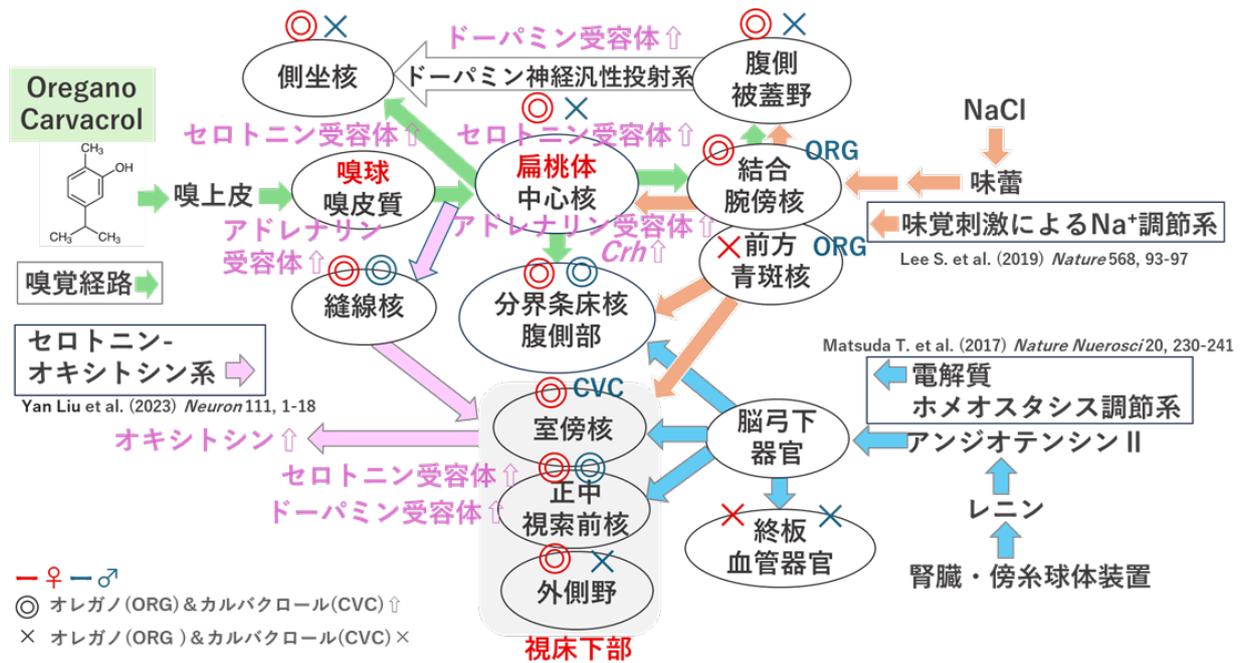


図3. Na⁺調節機構と嗅覚に関係する脳領域における、定量PCR および Fos 陽性細胞数測定の結果
 図に示した◎は対照群と比較して、Oregano および Carvacrol 曝露群の両群で有意に Fos 陽性細胞密度が増加したことを、×はどちらも変化が見られなかったことを示している。どちらか一方で有意に増加した場合は、Oregano 曝露群は ORG, Carvacrol 曝露群は CVC で示した。記号の赤色が♀マウス、青色が♂マウスの結果を示している。

5. 今後の課題

Oregano (Carvacrol) によって刺激された食塩調節中枢の神経の種類を明らかにするために Fos および神経伝達物質 (GABA, グルタミン酸, セロトニンなど) の抗体との二重染色を行う。さらに Carvacrol の刺激の受容細胞が嗅細胞であるか体性感覚細胞であるかを明らかにするために TRPA1KO マウスおよび methimazole (75 mg/kg) を腹腔内投与することにより嗅覚欠失マウスを作成し、Oregano (Carvacrol) の適塩効果を確認する。それらの実施にはフロセミドおよび低 Na⁺食を用いてマウスの Na⁺状態を低値安定に調節する実験系の作出が必要である。

6. 文献

- 厚生労働省, 令和 5 年「国民健康・栄養調査」
<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001338334.pdf>
- Strazzullo, Pasquale, et al. “Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies.” *BMJ (Clinical research ed.)* vol. 339 b4567. (2009)
- Aaslyng, Margit Dall, et al. The effect of salt reduction on sensory quality and microbial growth in hotdog sausages, bacon, ham, and salami. *Meat Science* vol. 96 (2014): 47-55.
- 下田満哉. 塩味・うま味増強香気成分による減塩食の嗜好性改善 *日本味と匂い学会誌* vol 22, (2015): 22,151-156.
- Anderson, C A M, et al., Effects of a behavioral intervention that emphasizes spices and herbs on adherence to recommended sodium intake: results of the SPICE randomized clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* vol. 102, (2015): 671-9.
- Wang C, et al., Consumer acceptance of model soup system with varying levels of herbs and salt. *Journal of Food Science* vol. 79, (2014): S2098-106.
- Breslin, P A, and G K Beauchamp, Salt enhances flavor by suppressing bitterness. *Nature* vol. 387, 6633 (1997) : 563.

- 8) Osada K, et al., Oregano leaf odor regulates sodium chloride consumption in mice. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* vol 89, (2025): 776-786.
- 9) Sinopoli, DA. and Harry TL., Taste properties of potassium chloride alone and in mixtures with sodium chloride using a check-all-that-apply method. ” *Journal of Food Science* vol. 77,9 (2012): S319-22.
- 10) Rotola-Pukkila Minna K et al., Concentration of Umami Compounds in Pork Meat and Cooking Juice with Different Cooking Times and Temperatures. *Journal of Food Science* vol. 80,12 (2015): C2711-6
- 11) Osada K, et al., Capsaicin modifies responses of rat chorda tympani nerve fibers to NaCl. *Chem Senses* vol. 22 (1997): 249-255.
- 12) Xu, Jiang et al. “Spilanthol Enhances Sensitivity to Sodium in Mouse Taste Bud Cells.” *Chemical senses* vol. 44,2 (2019): 91-103.
- 13) Nishiuchi M, Sakai K, Tajima H, Katayama K, Kimura F, Hoshi S, Goto T, Shirakawa H, Komai M. (2018) Orexigenic action of oral zinc: metabolomic analysis in the rat hypothalamus. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 82, 2168-2175.
- 14) Franklin K.B.J.P., Paxinos G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (3rd editon). ELSEVIER Academic Press (USA), March 18, 2008.
- 15) Yamamoto T, Inui T, Tsuji T.(2013) The odor of *Osmanthus fragrans* attenuates food intake. *Sci. Rep.*, 3, 1518.
- 16) Matsuda, Takashi et al. “Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ.” *Nature neuroscience* vol. 20,2 (2017): 230-241.
- 17) Lee, Sangjun et al. “Chemosensory modulation of neural circuits for sodium appetite.” *Nature* vol. 568,7750 (2019): 93-97.
- 18) Polli, Filip de Souza et al. “Inhibition of salt appetite in sodium-depleted rats by carvacrol: Involvement of noradrenergic and serotonergic pathways.” *European journal of pharmacology* vol. 854 (2019): 119-127.

The Neural and Endocrinological Mechanisms of the Salt Reduction Effect Induced by Oregano Odor

Kazumi Osada

College of Bioresource Science, Nihon University

Summary

Background and Objective: Previous studies have demonstrated that exposure to oregano and its major active component, carvacrol, in male and female C57BL/6J (B6) mice exhibits a salt-sparing effect. Additionally, olfactory stimulation by oregano was shown to significantly activate the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis, a region involved in salt intake regulation. In this study, we aimed to elucidate the neurophysiological mechanisms underlying the inhibitory effects of olfactory stimulation with oregano and carvacrol on salt intake and conducted the following experiments.

Methods: Female mice were fed a low-sodium diet and presented with the odor of oregano (1 g) or carvacrol (1 μ l) for 2 hours while performing a two-bottle choice experiment with pure water and 0.3 M saline. Following the two-bottle choice experiment, brain tissue from mice was collected, including regions related to olfactory stimulation and salt regulation, such as the olfactory bulb, amygdala, and hypothalamus. mRNA expression was then analyzed using quantitative PCR. Additionally, after presenting oregano 1 g or carvacrol 1 μ l for one hour, the changes in Fos-positive cell density in central regions related to sodium regulation in the brains of male and female mice were evaluated using immunohistochemical techniques.

Results and discussion: In the behavioral experiment, the odor-exposed group showed a consistently lower saltwater intake rate compared to the control group. Immediately after the behavioral experiment, brains were sampled from mice, and quantitative PCR was performed on 17 types of neurotransmitters and hormones in the brain. The results showed that olfactory stimulation by Oregano and Carvacrol increased the signal intensity of the serotonin and oxytocin systems. Additionally, in the oregano-exposed group, a decrease in the orexin system, which promotes salt intake, and an increase in corticotropin-releasing hormone and norepinephrine systems, which have inhibitory effects, were confirmed. These changes in gene expression suggest that they may induce a salt-regulating effect. Furthermore, the increase in dopamine receptors 1, 2, and 3 in the amygdala suggests that the odor of oregano may regulate sodium preference.

Olfactory exposure to oregano and carvacrol extensively activated multiple neural nuclei involved in salt regulation pathways, including the ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis, the central nucleus of the amygdala, and the raphe nucleus, which is the origin of serotonin neurons, in both male and female B6 mice. These results suggest that this exposure induces inhibitory effects on salt intake. Furthermore, stimulation of the nucleus accumbens and ventral tegmental area, which are neural nuclei of the dopamine system, in female mice alone suggested that this may be directly stimulated by these odor components and indirectly promote salt-regulating effects.