

微量栄養素摂取行動における食塩の役割について

安尾 敏明, 裕 哲崇

朝日大学歯学部

概要 体内の微量栄養素が欠乏したとき、動物は「塩味」を手掛かりとして欠乏物質を検出し、摂取すると考えられているが、その詳細な行動基盤には不明な点が多い。本研究では、ビタミン C (以下、VC) 欠乏動物に 0.3 mM VC + 300 mM NaCl、10 mM VC + 300 mM NaCl の両混合溶液 (以下、食塩含有 VC 水溶液) を摂取させると、その後、食塩含有 VC 水溶液や食塩水自体を嗜好するようになるのかどうかを検討することで、微量栄養素の摂取に塩味が関与しているのかどうか明らかにしようとした。

実験には VC を摂取しないと欠乏状態になる ODS/ShiJcl-od/od ラットを用い、正常群と欠乏群を作成した。48 時間二瓶選択法にて、NaCl (150, 300 mM) 及び食塩含有 VC 水溶液に対する嗜好率を両群で測定し、比較検討した。その結果、欠乏群の 150 mM NaCl 及び 10 mM VC + 300 mM NaCl に対する嗜好率は、正常群と比べて有意に減少していた。

両群の 10 mM VC + 300 mM NaCl に対するリック数を 1 日測定した後、NaCl (150, 300 mM) 及び 10 mM VC + 300 mM NaCl に対するリック数を 7 日間測定し、 $\text{Lick Ratio} = (\text{各種溶液のリック数}) / (\text{蒸留水のリック数}) \times 100(\%)$ にて検討した。その結果、10 mM VC + 300 mM NaCl 及び 100 mM NaCl では、両群間に主効果が認められたが、下位検定において有意差がある実験日はなかった。

正常ラットの NaCl (100, 150, 300 mM)、VC 水溶液 (0.3, 10 mM) 及び食塩含有 VC 水溶液に対するリック数を測定した後、同じラットを VC 欠乏状態に移行させ、同様の測定を行い、Lick Ratio の比較を行った。その結果、150 mM NaCl のみ両群間で有意差を認めた。

両群において NaCl (100, 300 mM)、VC 水溶液 (0.3, 10 mM) 及び VC 含有食塩水に対する鼓索神経応答解析を行った。その結果、欠乏群の VC 水溶液を除いた全溶液に対する応答値が正常群のものとは有意に減少していた。

以上の結果から、VC 欠乏時、味神経の感受性が低下するが、食塩水とともに VC を摂取しても、食塩含有 VC 水溶液や食塩水に対する嗜好性は増加せず、少なくとも食塩は VC 欠乏時における VC 選択摂取の手掛かりとはならないことが示唆された。

1. 研究目的

「味覚」は、食を通じて体内の恒常性を維持する上で欠かせない重要な感覚である。生体は、味覚情報を脳へ伝えることで、食物中に含まれる化学物質が生理学的に必要な物質かどうかを判断し、摂食行動を引き起こしている。特に、体内のミネラルが欠乏したとき、生物は「味覚」を手掛かりとしてその欠乏物質を検出し、摂取すると考えられている。近年、ミネラルやビタミンを含む微量栄養素が不足している人々が増加し、骨粗鬆症といった疾患が増加

していることが社会問題となっており、微量栄養素の摂取調節機構を解明し、その理解に基づく新たな問題解決手段を確立することが急務となっている。しかしながら、その必要量は微量であるため、どのように動物はこの不足している栄養素を検知し、摂取しているのかは大きな謎となっている。この状況を打開するためには、味覚や食に対する嗜好性が微量栄養素の充足度にどのように影響を与えているのか解明することが必要である。申請者の所属する研究室では、これまでに、微量栄養素欠乏動物を用いて、

行動学および神経科学的研究を行ってきた。その過程で、亜鉛やカルシウム欠乏動物では、食塩嗜好性が亢進すること¹⁻³⁾、ビタミン C (以下、VC) 欠乏動物では、VC に対する嗜好性が増加し、VC や酸味物質に加え、食塩に対する味神経応答が減少することを報告した⁴⁻⁶⁾。これらの結果から、微量栄養素欠乏動物は、実際に欠乏していないはずの食塩に対する末梢味覚器での受容機構を特異的に変化させ、摂取行動を変化させている可能性が考えられる。これは、自然界では、微量栄養素の存在するところには、ほぼ必ず食塩が存在するので、動物は、食塩の味を手掛かりにして、微量栄養素を見つけ出す行動に出ているのではないかと考えると合理的ではあるが、この考えはまだ憶測の域を出ない。

そこで、本研究では、微量栄養素が含まれた食塩水を動物はどのように認識し、摂取するのか、その認識は体内の微量栄養素の充足度に影響されるのかどうか、具体的には、微量栄養素欠乏時に、動物が食塩とともにその欠乏した微量栄養素を摂取(食塩含有欠乏微量栄養素水溶液を摂取)した場合、食塩含有欠乏微量栄養素水溶液や食塩水自体を嗜好するようになるか検討することで、微量栄養素の摂取に、塩味が関与しているのかどうか明らかにすることを目的とした。先行研究において、VC 欠乏が食塩に対する味覚神経応答を変化させている可能性が示されていること⁹⁾から、本研究では、微量栄養素として特に VC を取り上げることとした。

2. 研究方法

2.1 VC 欠乏動物の作製

実験動物として、グルコラクトン酸化酵素が欠損し、体内で糖質から VC を合成することができず、VC を摂取しないと欠乏状態になる Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) /ShiJcl-od/od 5 週齢雄ラット(以下、od/od ラット)⁷⁻⁹⁾を用いた。全ての動物は個別の代謝ケージ(TECNIPLAST 社製、3700M071)にて飼育し、庫内温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $45 \pm 5\%$ 、6~18 時明期、18 時~6 時暗期の 24 時間明暗サイクルの飼育庫内で維持した。実験開始までは先行研究⁴⁻⁹⁾同様に、2 g/l VC 水溶液および VC 欠乏飼料(AIN-93G 固形、日本クリア社製)を自由摂取させて飼育した。本研究は、朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認(No.2014-17)のもとに行った。

2.2 VC 欠乏時における食塩含有 VC 水溶液に対する嗜好率の計測(48 時間二瓶選択法)

48 時間二瓶選択法により、食塩を VC 水溶液に混合させた水溶液(以下、食塩含有 VC 水溶液)に対する嗜好率を VC 欠乏状態及び正常状態のラットにおいて測定し、比較検討した。特に塩味(食塩)は濃度上昇に伴い、「嗜好」から「忌避」に変化することが報告¹⁰⁾されているので、本実験では、本来ラットが忌避する濃度(300 mM)において、この嗜好率が欠乏状態では変化するのかどうかを探るとともに、含有する VC 濃度の影響についても検討した。od/od ラットを 0.3 mM VC+300 mM NaCl 正常群(n=6)、10 mM VC+300 mM NaCl 正常群(n=7)と 0.3 mM VC+300 mM NaCl 欠乏群(n=7) 10 mM VC+300 mM NaCl 欠乏群(n=8)の 4 群に分け、以下のスケジュール(**Fig. 1 A**)で実験を行うとともに、全ラットの毎日の体重、摂食量および飲水量を測定した。

実験日 1-18 日: 欠乏群には蒸留水(DW)、正常群には 2g/l VC 水溶液を二瓶で呈示した。

実験日 19-20 日: 全動物の水分摂取状態を統制するために、全群に DW のみを二瓶で呈示した。(欠乏群では、20 日間 DW が呈示されていることになり、VC 欠乏状態に移行する。)

実験日 21-22 日: 全群に 300 mM NaCl と DW を二瓶で呈示した。

実験日 23-28 日: VC 水溶液(0.3 mM 又は 10 mM)に 300 mM NaCl を添加した食塩含有 VC 水溶液と DW を二瓶で呈示した。

実験日 29-30 日: 全群に 300 mM NaCl と DW を二瓶で呈示した。

測定および解析方法: 測定の途中、呈示位置による偏好を防ぐため 24 時間目に左右の瓶の位置を入れ替えた。データは、嗜好率(%) (= 各種水溶液摂取量 ÷ 総摂取量 × 100)として処理した。有意差検定には paired *t*-test を用いた。

また、上記の実験に加えて、正常状態で嗜好される 150 mM NaCl に対する嗜好性が VC 欠乏によって変化するのいかどうかも探るために、別の od/od ラット(n=4)の VC 欠乏前後での同溶液に対する嗜好率も同様の方法により測定した。

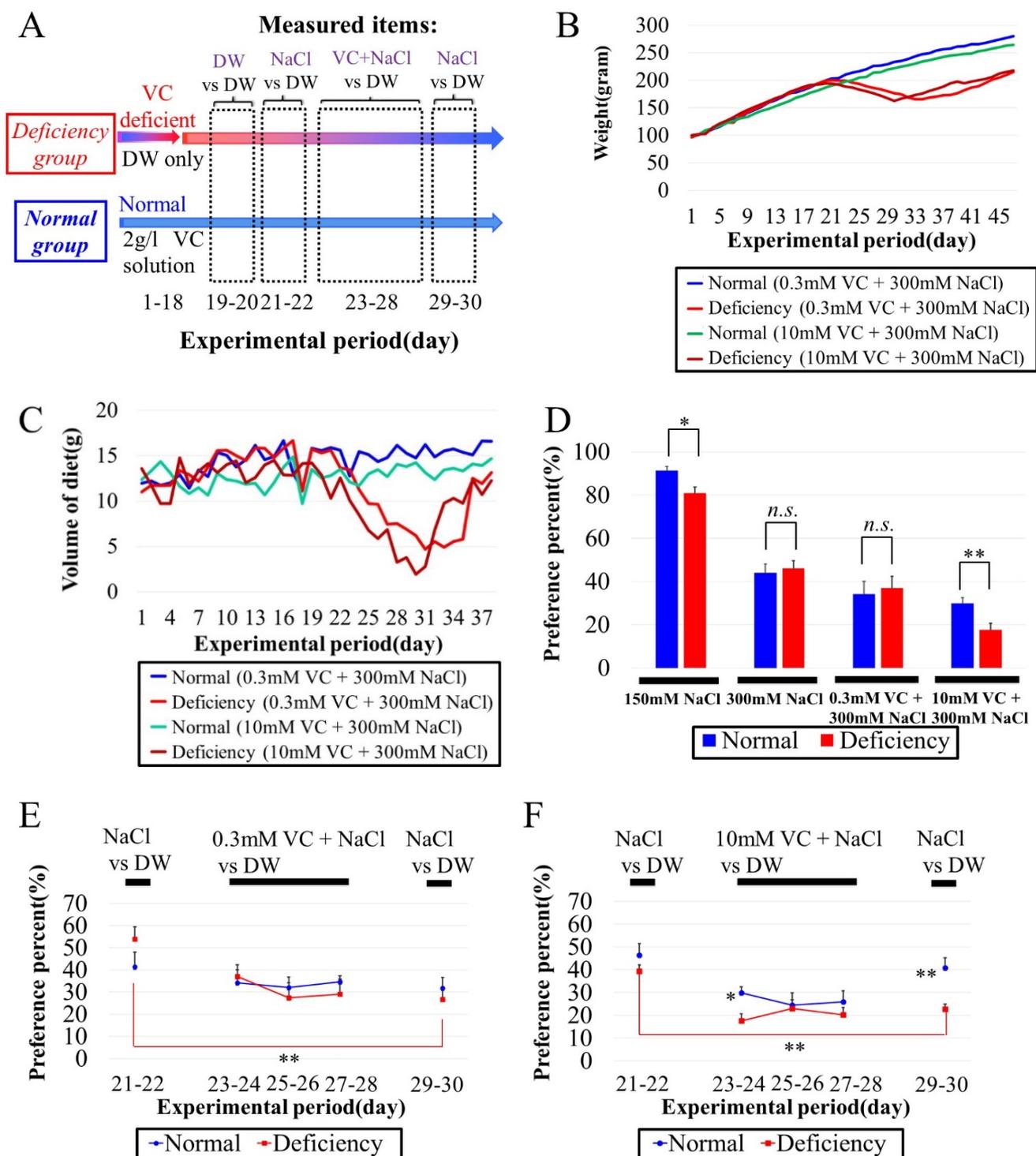


Fig. 1. 行動学的実験(48時間二瓶法)のプロトコール(A, VC; ビタミンC水溶液, DW; 蒸留水)、ビタミンC(VC)欠乏群および正常群の体重(B)および摂食量(C)の推移。48時間二瓶法におけるVC欠乏群と正常群の150mM NaCl, 300mM NaCl, 0.3mM VC+300mM NaCl および10mM VC+300mM NaCl に対する嗜好性(D, mean±S.E. paired *t*-test, *;*p*<0.05, **;*p*<0.01)および0.3mM VC+300mM NaCl 群(E, mean±S.E. paired *t*-test, **;*p*<0.01)および10mM VC+300mM NaCl 群(F, mean±S.E. paired *t*-test, *;*p*<0.05, **;*p*<0.01)における嗜好率の推移(n=6-8)。

2. 3 VC 欠乏時における食塩含有 VC 水溶液に対する 10 秒間リック数の測定

2. 3. 1 od/odラットをVC欠乏群(n=6)と正常群(n=6)の2群に分けた。実験日1-8日は両群に2 g/l VCを自由摂取させ、実験日9-22日の14日間は、正常群には2 g/l VC水溶液を、欠乏群にはDWを呈示した。続く実験日23-27日の5日間、1日につき10分間だけ、リック数測定装置内で、正常群は2 g/l VC水溶液を、欠乏群はDWを飲むように訓練を行い、実験日28日にDWおよび10mM VC+300 mM NaClに対する10秒間リック数を測定した。実験日29日以降はDWおよび各種水溶液(100 mM NaCl, 300 mM NaCl, 10 mM VC+300 mM NaCl)に対する10秒間リック数を測定した。実験期間中、両群ラットの各種溶液摂取量、体重および摂食量を毎日測定した。舌運動機能や飲水欲求等の違いによる影響を除くため、DW以外の溶液については、Lick Ratio=(各種水溶液のリック数)/(DWのリック数)×100(%)において比較を行った。有意差検定には、Two-way ANOVAを用い、[実験日×群]で主効果を認めた場合は、post hoc testとしてTukeyのHSD法にて下位検定を行った。

2. 3. 2 正常状態のod/odラット(n=14)を24時間絶水下におき、各々のラットに対して、1日につき10分間だけ、リック数測定装置内で、DWを飲むように5日間訓練を行った。実験日6日にDWおよび各種水溶液(0.3 mM VC, 10 mM VC, 100 mM NaCl, 150 mM NaCl, 300 mM NaCl, 0.3 mM VC+300 mM NaCl, 10 mM VC+300 mM NaCl)に対するリック数(10秒間)を測定した。その後、同じラットに2週間DWのみを呈示し、VC欠乏状態に移行させ、欠乏前と同様に5日間の訓練を行った後、同様の各種水溶液およびDWに対するリック数(10秒間)を測定した。リック数からLick Ratioを換算し、有意差検定にはpaired t-testを用いた。

2. 4 VC 欠乏時の食塩水に対する短時間嗜好率の計測(10分間二瓶選択法)

正常状態のod/odラット(n=4)を、1日あたり10分間の二瓶選択法の訓練を5日間行った。実験日6日に、10分間二瓶選択法(100 mM NaCl vs DW)を行い、嗜好率を求めた。その後20日間、DWを二瓶で呈示し、VC欠乏状態に移行させた後、欠乏前と同様に訓練を5日間行い、嗜好率を求めた。10分間二瓶選択法の計測中は、ボトル

の呈示位置を1分ごとに変更した。有意差検定にはpaired t-testを用いた。

2. 5 VC 欠乏時における VC 水溶液、食塩水および食塩含有 VC 水溶液に対する味神経(鼓索神経)応答解析

od/odラットをVC欠乏群(n=6)と正常群(n=7)の2群に分け、正常群には2 g/l VC水溶液を、欠乏群にはDWを14-35日間自由摂取させた。各々の動物はペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg)麻酔下で、気管カニューレを装着し、通法に従い左側鼓索神経積分応答を記録した。舌に約0.1 ml/秒の流速でNaCl(100, 300 mM)、VC水溶液(0.3, 10mM)および食塩含有VC水溶液(0.3 mM VC+300 mM NaCl, 10 mM VC+300 mM NaCl)を約30秒間刺激し、洗浄にはDWを用いた。有意差検定にはpaired t-testを用いた。

3. 結果

3. 1 VC 欠乏動物の体重および食餌量

欠乏群では、先行研究⁷⁻⁹⁾同様にDWを呈示してから約2週間以降において体重の減少(**Fig. 1 B**)および摂食量の減少(**Fig. 1 C**)が認められた。

3. 2 VC 欠乏時における食塩含有 VC 水溶液に対する嗜好率(48時間二瓶選択法)

150 mM NaClに対する嗜好率は、正常状態(VC欠乏前)と比べ、欠乏状態(VC欠乏後)の方が有意に低かった($p < 0.05$)。正常群と欠乏群を比較すると、300 mM NaClおよび0.3 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率は、有意差を認められなかった($p > 0.05$)。しかし、10 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率では、正常群と比べて、欠乏群が有意に小さかった($p < 0.01$)。また、各溶液に対する嗜好率を比較すると、両群共に、300 mM NaClに対する嗜好率と0.3 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率の間および300 mM NaClに対する嗜好率と10 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率の間に有意差があった(共に $p < 0.01$)。しかし、0.3 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率と10 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率との間の有意差は、欠乏群のみで認められた($p < 0.01$) (**Fig. 1 D**)。

実験日23-24日における0.3 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率は、欠乏群では37.0%(±S.E.5.3)、正常

群では 34.2%(\pm S.E.5.9)で両者の間に有意差は認められなかった($p>0.05$) (Fig.1 E)が、10 mM VC+300 mM NaCl に対する嗜好率では、欠乏群が 17.5%(\pm S.E.3.1)、正常群が 29.9%(\pm S.E.2.7)で、両者の間に有意差が認められた($p<0.05$) (Fig.1 F)。300 mM NaCl に対する嗜好率を実験日 21-22 日と実験日 29-30 日で比較すると、正常群では有意差は認められなかった($p>0.05$)が、欠乏群では、前者に比べて後者が有意に小さかった(共に p

<0.01) (Fig. 1 E, F)。また、10 mM VC+300 mM NaCl の実験において、実験日 29-30 日の 300 mM NaCl に対する嗜好率は、正常群と比べて欠乏群では有意に小さかった($p<0.01$) (Fig. 1 F)。

3. 3 VC 欠乏時における食塩含有 VC 水溶液に対する 10 秒間リック数

実験期間中の正常群および欠乏群ラットの溶液摂取量、体重および摂食量は図に示した (Fig. 2 A, B, C)。

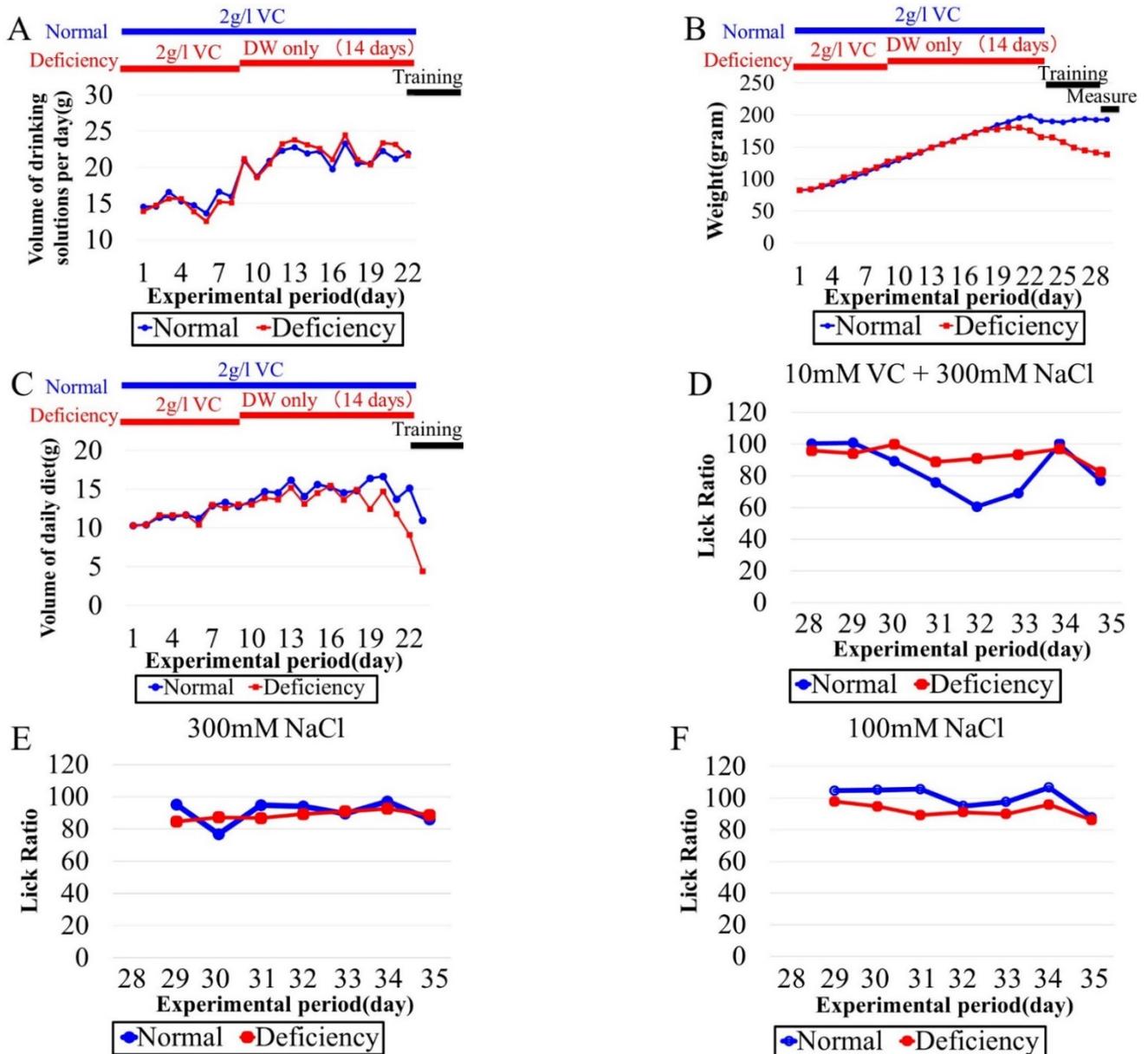


Fig. 2. ビタミン C (VC) 欠乏群 (n=6) と正常群 (n=6) の 10 秒間リック測定実験における蒸留水 (DW) と 2 g/l VC 水溶液の飲み量 (A)、体重 (B)、および摂食量 (C) の推移。VC 欠乏群 (n=6) と正常群 (n=6) の 10 mM VC+300 mM NaCl (D)、300 mM NaCl (E) および 100 mM NaCl (F) に対する Lick Ratio = (各種溶液のリック数)/(蒸留水のリック数) × 100。

3. 3. 1 正常群と欠乏群との間で、DW に対するリック数に有意差は認められなかったもの ($p > 0.05$)、10 mM VC + 300 mM NaCl および 100 mM NaCl に対する Lick Ratio では、両群間に主効果が認められた。しかし、下位検定においては有意差を認める実験日はなかった (Fig 2 D, F)。また、300 mM NaCl に対する Lick Ratio では両群間で有意な主効果は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig 2 E)。

3. 3. 2 実験を行った溶液のうち、150 mM NaCl に対する Lick Ratio のみ、正常状態と欠乏状態との間で有意差が認められた ($p < 0.01$) (Fig. 3 A)。

3. 4 VC 欠乏時における食塩水に対する短時間に対する嗜好率の計測 (10 分間二瓶選択法)

100 mM NaCl に対する嗜好率は、正常時は 75.1% (± S.E.4.3)、欠乏時は 78.5% (± S.E.3.4) であり、両者の間に有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig. 3 B)。

3. 5 VC 欠乏時における食塩含有 VC 水溶液に対する味神経 (鼓索神経) 応答解析

欠乏群の 100 mM NaCl、300 mM NaCl、0.3 mM VC + 300 mM NaCl および 10 mM VC + 300 mM NaCl に対する応答値は正常群と比べて有意に低かった ($p < 0.05$) が、0.3 mM VC および 10 mM VC では有意差は認められなかった ($p > 0.05$) (Fig. 4)。

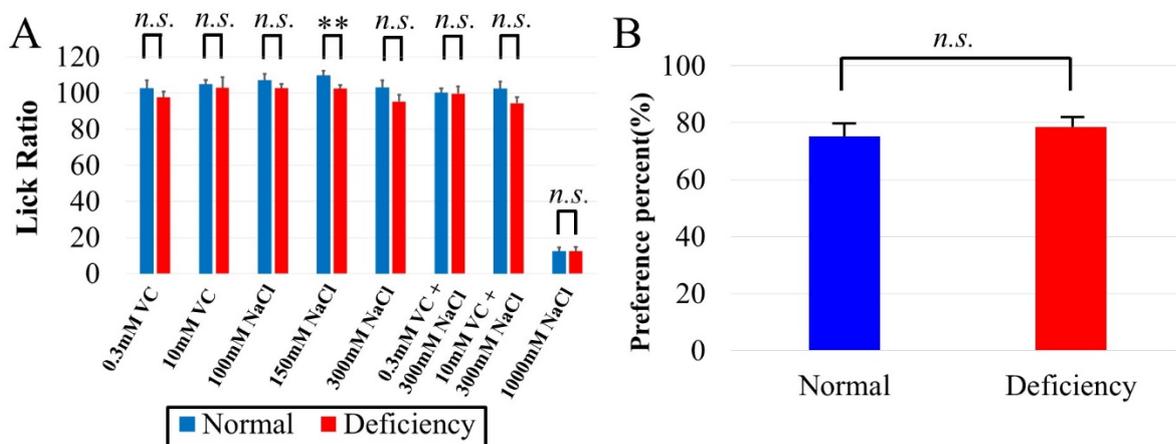


Fig. 3. 10 秒間リック測定法における正常時およびビタミン C (VC) 欠乏時の各種溶液に対するリック数 (A: mean ± S.E. paired t -test, $n = 8-14$)。短時間 (10 分間) 二瓶法における VC 欠乏群と正常群の 100 mM NaCl に対する嗜好性 (B: mean ± S.E. paired t -test, $n = 4$)。

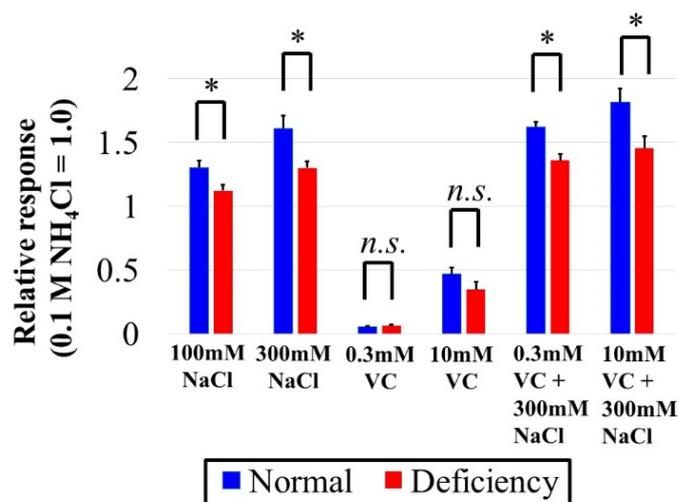


Fig. 4. ビタミン C (VC) 欠乏ラット ($n = 6$) および正常群 ($n = 7$) における鼓索神経応答値 (mean ± S.E. *: $p < 0.05$, t -test)

4. 考 察

先行研究では、0.3 mM VC 水溶液は閾値以下で味として情報伝達されていない可能性、10 mM VC 水溶液では、鼓索神経において応答が観察され、味として情報伝達されている可能性を報告した⁴⁾。本研究は、ラットが味として感知していないであろう0.3 mM VC 水溶液又は味として感知しているであろう10 mM VC 水溶液に300 mM NaClを添加した食塩含有VC水溶液や食塩水に対する嗜好性が、VC欠乏前後で変化するのかどうかを調べることで、微量栄養素を摂取する際の塩味の役割について明らかにしようとしたものである。

48時間二瓶選択法の結果、正常群と欠乏群との間で300 mM NaClに対する嗜好率に有意差は認められなかったが、150 mM NaClに対する嗜好率は欠乏群の方が有意に減少していた(Fig. 1 D)。このことから、VC欠乏の塩味に対する嗜好性への影響は、塩の濃度によって異なる可能性が示唆された。これまでに、我々は0.3 mM VC水溶液単体に対する嗜好率は欠乏状態と正常状態ともに約50%であり、両群間に差がないことを報告した⁹⁾が、0.3 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率においても、両群間に有意差はなく、共に約35%であった(Fig. 1 D)。以上の結果から、VC欠乏如何に関わらず食塩が含有した0.3 mM VC水溶液に対する嗜好性に変化が起きないこと、また、VC水溶液に300 mM NaClが含まれるとVC水溶液単体に対するものよりもその嗜好性が低下することが明らかとなった。このことは、ラットが味として感知できないであろう0.3 mM VC水溶液に300 mM NaClを添加すると、塩味のする0.3 mM VC水溶液を摂取したことになるが、この塩味の手掛かりがあったとしても、VC欠乏ラットは0.3 mM VC水溶液を嗜好しないという可能性を示している。これは、先行研究において、VC欠乏ラットが0.3 mM VC水溶液を摂取しても、十分に欠乏状態から回復しなかったこと⁹⁾を考慮すると、0.3 mM VC+300 mM NaClを摂取したところでVCが体内に十分満たされる訳ではないため、その嗜好率を上昇させなかったのかもしれない。また、先行研究の48時間二瓶選択法実験では、10 mM VC水溶液に対する嗜好率は、VC欠乏状態に陥ると一時的に増加することを報告⁹⁾したが、欠乏群の10 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率は、正常群と比べて有意に減少し(Fig. 1 D)、むしろ逆の結果になった。このことは、10 mM

VC水溶液に塩味を呈する300 mM NaClを含有させると、VCが欠乏した時に本来必要として嗜好するはずのVCに対する嗜好性を食塩が抑制したことを示しており、VC欠乏時、食塩は欠乏したVCを選択摂取する手掛かりとして働くどころかむしろ嗜好抑制に働くことを意味している。

この48時間二瓶選択法のプロトコール(Fig. 1 A)には、一つ大きな意味合いがある。それは、VC欠乏時に食塩水とともに欠乏したVCを摂取した場合、食塩含有欠乏微量栄養素水溶液や食塩水自体を嗜好するようになるか、すなわち、塩味を条件刺激とした味覚嗜好学習が起きているのか検討することである。味覚嗜好学習とは、ある食物を摂取した後、具合の悪かった体調が好転した場合はその物質の味を手掛かりとして好んで摂取するようになることであり、味覚と内臓からの快情報を連合学習したことによるものであると考えられている。例えば、必須アミノ酸のイソロイシン欠乏飼料飼育下のラットにある味溶液Aを与え、次いでイソロイシンを加えた完全食に切り替えたときに別の味溶液Bを与える。その後、いずれの溶液を好むか二瓶選択法で調べると、Bの味を好むことが示されている¹¹⁾。これは、必須アミノ酸の欠乏による体調不順の状態から完全食になって体調が回復しているときに与えられたBの味を覚えていたことを意味している。これまでに、od/odラットがVC欠乏時にVC水溶液を選択摂取することを報告した^{4,9)}が、もし、このod/odラットがVC欠乏時に食塩含有VC水溶液を摂取し、味覚嗜好学習を獲得できるのであれば、この実験において、食塩を含有した欠乏微量栄養素水溶液である0.3 mM VC+300 mM NaCl、10 mM VC+300 mM NaClや300 mM NaCl単体などの塩味を呈する全ての溶液に対する嗜好率が実験日23日以降に増加するはずである。しかし、結果として、欠乏群の0.3 mM VC+300 mM NaCl、10 mM VC+300 mM NaClに対する嗜好率は実験日23日以降増加せず、また300 mM NaCl単体に対する嗜好率も実験日21-22日と比べ実験日29-30日で増加することはなかった(Fig. 1 E, F)。このことから、VC欠乏動物が食塩を含んだVC水溶液を摂取しても食塩(塩味)そのものへの嗜好は増大せず、塩味を条件刺激とした味覚嗜好学習は少なくとも長期間獲得できていないことが示唆された。

前述の48時間二瓶選択法の実験は、所謂「味覚効果」と「食後効果」の両方を含んだ結果であり、この結果が味

覚に起因するのかどうか明らかにできていない。そこで、「食後効果」を排除した結果を得るため、以下の実験を行った。鼓索神経応答解析の結果、10 mM VC+300 mM NaCl、300 mM NaCl および 100 mM NaCl の溶液に対する応答値は正常群と比べ欠乏群では有意に低かった (Fig. 4) が、連日 10 秒間リック数を測定した結果では、両群間でこれら溶液に対するリック数に有意差が認められなかった (Fig. 2 D, E, F)。また、VC 欠乏前後でのリック数を同一動物において測定し比較した実験結果では、これら 3 溶液の Lick Ratio に有意差はなく (Fig. 3 A)、また、10 分間二瓶選択法の結果では、VC 欠乏状態と正常状態の間で 100 mM NaCl に対する嗜好率に有意差はなかった (Fig. 3 B)。以上の結果は、ラットが VC 欠乏により、これら溶液に対する鼓索神経応答を低下させるものの、味覚効果自体には大きな変化を起こさないことを示唆している。また、この結果は、48 時間二瓶選択法において 10 mM VC+300 mM NaCl に対する嗜好率が正常群より欠乏群で有意に低かった (Fig. 1 F) が、その原因が味覚効果ではなく、食後効果である可能性も示している。

先行研究において、ビタミン B₆ 欠乏ラットでは、48 時間二瓶選択法で 150 mM および 300 mM NaCl に対する嗜好性が正常ラットに比べて増大するが、NaCl に対する鼓索神経応答に変化はないこと^{12,13)}、短時間 (18 分間) 二瓶選択法で正常ラットと比べ 10 mM、150 mM および 300 mM NaCl を多く摂取し、この行動は味覚効果によること¹⁴⁾が報告されており、これらは、本研究の結果とは異なっている。また、Bernard and Halpern (1968) は、ビタミン A 欠乏ラットでは、24 時間二瓶選択法において 10 mM NaCl に対する嗜好性が低下すること¹⁵⁾を報告しており、これら のことを考慮すると、欠乏しているビタミンの種類の違いによって、食塩に対する嗜好性や味覚に与える影響も異なっていると考えられる。一方、ナトリウムが欠乏した場合には、低濃度の食塩に対する感受性が亢進し、高濃度の食塩に対してはむしろ鈍くなって、その味に快感を覚えるようになることが報告¹⁶⁾されている。また、このように食塩嗜好性が高まった動物では、鼓索神経の食塩に対する応答性が低下していること¹⁷⁾から、食塩感受性を下げることにより、本来は嫌悪感を生じるはずの高濃度の食塩を摂取可能にし、食塩摂取増進に役立っていると考えられている。しかし、VC 欠乏の場合は、食塩感受性は低くなっている

が、食塩が欠乏しているわけではないので、食塩を摂取する必要がなく、食塩嗜好性は高まらないのかもしれない。また、VC はミネラルとは異なり、自然界において食塩の存在するところに必ず存在するわけではないので、動物は、食塩を味覚のキーとして VC を探索する必要がないのかもしれない。今後は、自然界で食塩とほぼ同時に存在する微量栄養素についても本研究と同様の実験を行う必要があると考えられた。

5. 今後の課題

実験で用いた od/od ラットは実験開始前まで 2 g/l VC 水溶液にて VC 摂取を行っていたため、実験開始時点で VC 水溶液そのものに対する安全学習が起きていたと推察されるが、それと同時にこの VC 水溶液を飲まなくなつてから体調が悪くなっていることを認識し、VC を選択摂取したのかもしれない。本研究では、当初 VC 水溶液に食塩を混合することで、塩味をキーとして欠乏微量栄養素である VC を選択摂取できる可能性を想定したが、動物はむしろ、この溶液を忌避する結果になった。今後、正常動物に食塩含有微量栄養素水に対して嫌悪を条件づけ、その般化パターンを短時間リック数測定法や短時間二瓶選択法を用いて計測し、検討することで、食塩含有微量栄養素水を動物はどのように認知しているのか、食塩含有微量栄養素水に微量栄養素が含まれていることを判別できるのかも明らかにすることが必要であろう。また、本研究では、48 時間二瓶選択法においてラットが忌避する食塩濃度 (300 mM) に VC を添加したが、ラットが嗜好するもっと薄い食塩濃度 (100 mM や 150 mM) の食塩含有 VC 水溶液においても同様の実験を行う必要性もあるのかもしれない。本研究において使用した食塩水の中で、150 mM NaCl のみ 48 時間二瓶選択法の嗜好率 (Fig. 1 D) と Lick Ratio (Fig. 3 A) の両方で、正常状態と欠乏状態との間に有意差があったが、この 150 mM NaCl はほぼ生理食塩水の濃度と等しいことから何らかの生理学的意義がある可能性があると考えられ、今後の検討課題である。

また、本研究の結果から、VC 欠乏では食塩含有 VC 水溶液や食塩水に対する鼓索神経の感受性が低下する (Fig. 4) もの、味覚効果自体に大きな変化はなく、食後効果に変化がある可能性が示された。必須アミノ酸の一つであるリジンの欠乏時には、味覚を手掛かりとして味覚

嗜好学習を獲得することが、味神経(鼓索神経及び舌咽神経)切断実験により示されている¹⁸⁾。そこで、味覚効果を引き起こす情報を伝えるこれらの味神経や食後効果を引き起こす情報を伝える迷走神経を各々切断した VC 欠乏動物を作製し、本研究と同様の行動学的実験を行うことにより、VC 欠乏時に、食後効果と味覚効果のどちらの変化が原因で、摂取行動に変化が起きるのか今後より明確にしていきたい。

本研究では、微量栄養素として VC を取り上げ、VC 欠乏時に VC の選択摂取に食塩が関与するのかどうかについて検討したが、他の微量栄養素、特に自然界で食塩と共に存在する微量栄養素の欠乏の場合には、また違った結果となる可能性があり、今後さらなる研究が必要である。

6. 文献等

- 1) 麩谷 嘉一, 裕 哲崇, 中島 清人, 勝川 秀夫, 但野 正朗, 山本 宏治, 杉村 忠敬: 亜鉛欠乏食飼育ラットの食塩嗜好亢進に味覚は関与するか? 日本味と匂学会誌 12, 409-412 (2005)
- 2) 麩谷 嘉一, 裕 哲崇, 中島 清人, 中橋 章泰, 勝川 秀夫, 山本 宏治, 杉村 忠敬: 亜鉛欠乏食で一週間飼育したラットにおける食塩嗜好の亢進. 日本味と匂学会誌 13, 399-402 (2006)
- 3) 裕 哲崇, 勝川 秀夫, 中島 清人, 中橋 章泰, 小林 倫也, 杉村 忠敬: カルシウム欠乏食育ラットの食塩嗜好. 日本味と匂学会誌 14, 345-348 (2007)
- 4) 安尾 敏明, 裕 哲崇: ビタミン C 合成能欠如ラット (ODS/ShiJcl-od/od ラット) のビタミン C 水溶液に対する摂取行動および鼓索神経応答. 日本味と匂学会誌 19, 379-382 (2012)
- 5) 安尾 敏明, 諏訪部 武, 裕 哲崇: ビタミン C 欠乏の鼓索神経応答に対する影響について. 日本味と匂学会誌 20, 229-230 (2013)
- 6) 安尾 敏明, 諏訪部 武, 裕 哲崇: ビタミン C 欠乏動物における様々な濃度のビタミン C 水溶液に対する嗜好性. 日本味と匂学会誌 21, 275-276 (2014)
- 7) Mizushima Y, Harauchi T, Yoshizaki T and Makino S: A rat mutant unable to synthesize vitamin C. *Experientia* 40, 359-361 (1984)
- 8) Horio F, Ozaki K, Yoshida A, Makino S and Hayashi Y: Requirement for ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J Nutr* 115, 1630-1640 (1985)
- 9) 伊藤 道子, 古川 勇次: 形成異常 (ODS) ラットを用いたアスコルビン酸要求量に関する栄養生理学的研究. 栄養-評価と治療 15, 51(147)-55(151) (1998)
- 10) Contreras RJ, Kosten T: Prenatal and early postnatal sodium chloride intake modifies the solution preferences of adult rats. *J Nutr* 113, 1051-1062 (1983)
- 11) Naito-Hoopers M, McArthur LH, Gietzen DW, Rogers QR: Learned preference and aversion for complete and isoleucine-devoid diets in rats. *Physiol. Behav* 53, 485-494 (1993)
- 12) Chan MM and Kare MR: Effect of vitamin B-6 deficiency on preference for several taste solutions in the rat. *J Nutr* 109, 339-344 (1979)
- 13) Chan MM and Coté J: Fluid intakes and chorda tympani nerve responses in vitamin B-6 deficient rats. *Physiol Behav* 22, 401-404 (1979)
- 14) Greeley S and Gniecko K: Short-term taste behavior and copper/vitamin B-6 nutriture in Long-Evans rats. *Physiol Behav* 38, 765-771 (1986)
- 15) Bernard RA and Halpern BP: Taste changes in vitamin A deficiency. *J Gen Physiol* 52, 444-464 (1968)
- 16) 志村 剛: 食塩摂取行動の発現機構. 大阪大学人間科学部紀要 21, 175-197 (1995)
- 17) Contreras, RJ: Changes in gustatory nerve discharges with sodium deficiency: a single unit analysis. *Breim Res* 121, 373-378 (1977)
- 18) 近藤 高史, 田淵 英一, 小野 武年, 鳥居 邦夫: リジン欠乏ラットのリジン選択摂取行動学習における味神経の役割. 日本味と匂学会誌 1, S167-S170 (1994)

The Role of Salt in the Ingestive Behavior for Micronutrients

Toshiaki Yasuo, Noritaka Sako

Department of Oral Physiology, Asahi University. School of Dentistry

Summary

The aim of this study was to make clear how the animals choose their deficient micronutrients selectively. For this purpose, we investigated how the rats change their feeding behavior and taste nerve response when they lack vitamin C (VC). For that, Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) /ShiJcl-od/od rats which cannot synthesize VC were used. Methods and results can be summarized as follow; (1) When the rats were deprived VC for 20 days, the preference ratio for 150mM NaCl, and the binary mixture of 10mM VC + 300mM NaCl solutions in VC-deficient rats were significantly lower than those in normal rats. However, there was no significant difference in the preference ratios for both 300mM NaCl and the binary mixture of 0.3mM VC + 300mM NaCl between the deficient and in normal rats. (2) In the lick test, there was no significant difference in the number of licks for all tested stimuli between deficient and normal groups except when 150mM NaCl was used. (3) In the electrophysiological experiment, the chorda tympani nerve responses to 100mM NaCl, 300mM NaCl, 0.3mM VC + 300mM NaCl and 10mM VC + 300mM NaCl were evaluated. Responses were found to be significantly lower in VC-deficient rats than those in normal rats in all treatments. However, there was no significant difference between the responses to 0.3mM and 10mM VC only between deficient and normal rats. (4) Behavioral study was also used to investigate whether salty taste works as a conditioned stimulus for the conditioned taste preference, the VC-deficient rats did not generalize pure 300mM NaCl, even if they ingested 0.3 or 10mM VC solution tasted with 300mM NaCl. The aforementioned data shows that; (1) The preferences for these tested solutions may not be increased even if the taste nerve responses to all tested stimuli that contained NaCl were decreased. (2) Salty taste may not work as a conditioned stimulus of the conditioned taste preference which elicited by VC as unconditional stimulus.