

## 慢性腎不全や糖尿病状態では、高濃度塩味刺激に対する忌避行動の減弱が塩分過剰摂取を助長する

草場 哲郎

京都府立医科大学腎臓内科

**概要** 適切な血圧コントロールには塩分摂取制限は重要であるが、いまだ我が国の平均塩分摂取量は目標に到達していない。減塩に対する取り組みは、『ヒトは食塩を好む』という観点から行われているが、哺乳類では、低濃度の食塩水には嗜好性が見られる一方で、ある濃度以上の食塩水に対しては忌避行動をとることが示されている。塩の食行動は、低濃度塩味への嗜好性(アクセル)と、高濃度塩味への忌避性(ブレーキ)のバランスにより既定されると想定される。今回、塩味覚の認知だけでなく、塩味嗜好性、塩味忌避性という概念を加え、『低濃度の食塩に対する嗜好性ではなく、高濃度の塩分に対する忌避性の減弱がヒトにおける塩分過剰摂取に寄与している』という仮説を立て、健康人、および慢性腎不全患者、糖尿病患者を対象に味覚試験を行った。また疾病に伴う味覚障害の分子生物学的機序を明らかにするために、野生型および疾患モデルマウスを用いて、種々の味覚に対する行動解析を行った。

臨床研究では、種々の塩分を浸透させた濾紙を口に含ませ塩味覚の閾値を定量するとともに、その味覚に対する忌避性を質問形式により回答を得た。まず健康人(n = 103, 平均年齢 40.3 歳)に対する味覚検査を行ったところ、塩味に対する忌避反応は塩味刺激濃度を上昇させるにつれて忌避を示す被験者の割合は上昇し、10%の塩味刺激に対しては約50%の被験者が、20%の塩味刺激に対しては約70%の被験者が忌避反応を示した。一方で慢性腎不全患者(n = 57, 平均年齢 64.2 歳, 平均 Cr 3.46 mg/dl)では明らかに高濃度塩味刺激に対する忌避反応が減弱しており、10% NaCl の塩味刺激、20% NaCl の塩味刺激に対して忌避反応を示す被験者の割合はそれぞれ約15%, 約20%と高度に低下していた。基礎研究では、塩味に対する嗜好実験、忌避実験を5/6腎摘出を行った慢性腎不全モデルマウスと野生型マウスに対して行ったところ、野生型(n=6)、慢性腎不全マウス(n=5)の両群間で、各種味覚の忌避行動に大きな差異は認めなかった。

以上のことから、今回の研究ではヒトで認められている高濃度塩味刺激に対する忌避反応が定量的に確認され、慢性腎不全患者ではその減弱を認めた。一方で、マウスを用いた基礎研究では短期的な腎不全状態では高濃度塩味刺激に対する忌避反応に変化は認めなかった。腎不全に曝されている期間が短いために忌避行動に差を生じなかった可能性を考えられ、慢性腎不全誘導後に更に時期を空けて行動実験を行う予定である。

### 1. 研究背景, 目的

高齢化, 食生活の変化に伴い, 糖尿病, 高血圧, 慢性腎不全などの生活習慣病患者は増加している。塩分摂取は血圧を上昇させ, 多くの疫学研究で塩分摂取量と血圧の間には強い正の相関関係が示されている。適切な血圧コントロールには塩分摂取制限は重要であり, 申請者は以前に味覚の観点から減塩の効果を検討し, 慢性腎不全

患者では塩味覚認知機能が減弱しており, 1 週間の減塩によりそれが改善することを示している<sup>1)</sup>。以前に比し我が国の平均塩分摂取量は減少傾向にあるが, いまだ目標塩分摂取量には程遠く, 更なる取り組みが求められている。

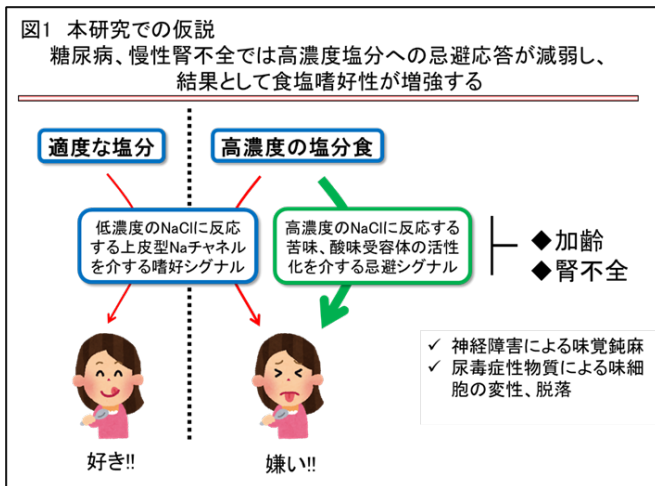


図 1. Hypothesis of this project

上記の減塩に対する取り組みの多くは、『ヒトは食塩を好む』という観点から行われている。しかし哺乳類では、低濃度の食塩水には嗜好性が見られる一方で、ある濃度以上の食塩水に対しては忌避行動をとることが示されている（海水を好んで飲まないことは、これを支持している）。低濃度の食塩に対する嗜好性は舌の味蕾に存在する味細胞上に発現する上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) が担っていることが示されている<sup>2)</sup>。一方、高濃度の食塩水に対する忌避行動は ENaC とは無関係とされ、それを担う味覚受容体は同定されていない。但し、高濃度の食塩水を負荷した際には苦味と酸味の受容体が活性化され、それらの抑制により高濃度塩味に対する忌避行動が消失することから<sup>3)</sup>、塩味に対する食行動には他の味覚との相互作用の存在が示唆されている。塩の食行動は、低濃度塩味への嗜好性(アクセル)と、高濃度塩味への忌避性(ブレーキ)のバランスにより既定されると想定されるが、この忌避行動の解明には塩味だけでなく、他の味覚との相互作用に関する検討が必要である。

そこで今回、塩味覚の認知だけでなく、塩味嗜好性、塩味忌避性という概念を加え、『低濃度の食塩に対する嗜好性ではなく、高濃度の塩分に対する忌避性の減弱がヒトにおける塩分過剰摂取に寄与している』という仮説を立て(図 1)、健常人、および慢性腎不全患者、糖尿病患者を対象に味覚試験を行う計画を立案した。また疾病に伴う味覚障害の分子生物学的機序を明らかにするために、野生型および疾患モデルマウスを用いて、種々の味覚に対する行動解析を行う。加えて、マウスの味細胞表面上の

味覚感受チャネルの発現解析、および味細胞から延髄弧束核への求心性ニューロンである鼓索神経での種々の味覚刺激に対する神経活動を解析し、疾病状態での味覚の認知機能、塩味嗜好性を基礎、臨床双方から、統合的に解析する。

現在までのヒトを対象とした味覚の研究は、味覚障害を訴える患者において、『味覚認知機能障害の有無』、『味覚認知機能の障害がどのような病態や背景に起因するか』、ということを中心に検討されてきた。近年動物を用いた味覚研究、および味覚に対する行動解析の知見が集積しており、今回、生活習慣病患者が潜在的に有する味覚異常、およびそれに引き続く塩分摂取に対する行動解析に注目した研究を計画した。また疾病動物モデルを用いた味覚研究、および味覚に対する行動解析を行った研究はなく、今回それらを行うことを着想した。本研究により、慢性腎不全や糖尿病において、低濃度の塩味覚認知機能ではなく、高濃度の塩味に対する忌避行動の欠落が、塩分過剰摂取を誘導していることが明らかになれば、減塩を行う際に塩味だけでなく、苦味、酸味の味覚異常を検討する必要がある。また、それらの味覚の相互作用に関与する味覚刺激物質が開発できれば、より低い濃度の塩味で減塩行動を誘導できる可能性がある。

## 2. 研究方法

慢性腎不全や糖尿病での味覚異常の評価、及び塩味嗜好性、忌避性の検討のため、ヒトに対する臨床研究(図 3)と、その生物学的機序を明らかにするためにマウスを用いた基礎研究(図 4)を行った。

### 2.1 臨床研究

本臨床研究は京都府立医科大学の倫理委員会に承認された後(承認番号 ERB-C-2081-1, 承認日 令和3年11月5日)、塩味、甘味、酸味、苦味の味覚に関する半定量的評価を、濾紙による味覚検査試薬を用いて、健常ボランティア、および慢性腎不全患者、糖尿病患者に行った。具体的な方法は以下である。

#### 2.1.1 被験者の募集、選定

##### 【観察及び検査項目】

健康ボランティアの募集は一般公募を第一とし、文書による研究の同意が取得できた段階で、試薬による味覚検査を行った。患者基本情報として、年齢・性別・身長・体重・基礎疾患・内服薬・飲酒歴・喫煙歴・義歯の有無をア

ンケートで収集した。また、直近1年以内の健康診断結果を持参して頂き、血清クレアチニン値、HbA1cの値を可能な限り収集した。

慢性腎不全・糖尿病患者に関しては、当院、共同研究機関で入院・通院された患者を対象に行った。文書による研究の同意が取得できた段階で、研究デザインに記載している通り、試薬による味覚検査を行った。患者基本情報は、健康ボランティアと同様の項目を患者診療録より収集した。血液検査・尿検査は、過去の診療で行った検査結果をデータとして使用した。

#### 【味覚検査の実施方法】

味覚異常の検査薬であるテストディスクを用いて行った。グルコース(甘味)、塩化ナトリウム(塩味)、酒石酸(酸味)、塩酸キニーネ(苦味)を用いて作成した種々の濃度の検査試薬を濾紙に浸透させ、それを口に含むことで各味覚の認知閾値を半定量的に評価した。甘味、酸味、苦味は既定の4段階の濃度を用いるが、塩味に関しては詳細に評価するために検査濃度を10段階(0%, 0.3%, 0.6%, 0.9%, 1.2%, 1.5%, 2.0%, 5%, 10%, 20%)に増やし、検査を行った。実際の手順は、テストディスクの添付文書通り行った。

### 2.2 基礎研究

臨床研究で予想される腎不全状態や糖尿病状態における味覚異常の生物学的機序を明らかにするため、以下の疾患モデルマウスを用いて研究した。味覚行動実験には、野生型としてC57BL/6マウス、5/6腎摘による慢性腎不全モデルマウス、C57BL/6マウスにSTZ投与により誘導した1型糖尿病モデルマウスを用いた。5/6腎摘マウスの作成に関しては、10週齢のC57BL/6マウスをイソフルラン吸入麻酔下に両側背部を切開し、右腎を結紮摘出、左腎の上下極を切除後手動的に圧迫止血し創部を縫合することで作成した。1型糖尿病モデルマウスに対して50 mg/kgのSTZを1日おきに5日連続投与し、2週間後に血糖値が300 mg/dl以上に上昇したものを利用した。

#### 2.2.1 行動実験(味覚嗜好実験)

塩味、甘味、苦味、酸味に対する嗜好実験を疾患モデルマウスに対して、リックテストを行った。リックテストは、一本のボトルから短時間テスト溶液を提示した際にマウスが飲水口を舐める頻度(リック回数)を測定し、味嗜好性を定量化する。実験24時間前に各味覚に応じて、飲水、食事

などの制限を行い摂取に対する欲求を高めた上で、低濃度から高濃度のグルコース(甘味)、NaCl(塩味)、塩酸キニーネ(苦味)、クエン酸ナトリウム(酸味)のボトルを舐める行動の頻度により嗜好性、忌避性を定量化した。

#### 2.2.2 神経伝導解析

味覚の求心性ニューロンである鼓索神経の活動電位を解析する。各種疾病モデルマウスに対し、全身麻酔下に気管内挿管を行う。人工呼吸管理下に鼓索神経を露出し、電極に固定する。各種味覚刺激を30秒間行い、発生したシグナルを記録する。各シグナルにより発生した神経シグナルを定量化し、比較、解析を行う。

#### 2.2.3 味覚受容体発現解析

マウスを安楽死させ、舌組織を採取する。パラフィン切片、凍結切片を作成し、舌組織における味蕾の数、単位味蕾当たりの各種味覚受容体の発現を免疫化学染色、蛍光免疫染色により解析、定量する。

### 3. 研究結果

#### 3.1 臨床研究

##### 3.1.1 被験者背景

本臨床研究は令和3年11月5日に京都府立医科大学の倫理委員会に承認され(承認番号 ERB-C-2081-1)、その後研究を開始した。2022年4月30日現在で、健康人103名、慢性腎臓病患者57名の被験者に対して、味覚試験を行った。

図2 被験者の背景

	Normal subject	CKD patients
Number of subject	103	57
Age	40.3 ± 14.3	64.2 ± 16.4
Gender(M/F)	48/55	33/24
Smoking (smoker/past smoker/No)	14/9/80	19/16/22
Drinking(Yes/No)	56/47	24/33
False teeth(Yes/No)	13/90	18/39
Cr (mg/dL)	0.78 ± 0.21 (n=34)	3.46 ± 3.5 (n=57)
eGFR (mL/min/1.73m2)	98.3 ± 27.3 (n=34)	34.7 ± 30.1 (n=57)

図2. Characteristics of participants (including healthy volunteers and chronic kidney disease patients)

患者背景は健常人の平均年齢は 40.3 歳, 男性 (46.6%), 女性 (53.4%), 平均のクレアチニン値は 0.78mg/dl であった(表)。慢性腎不全患者の被験者の背景は年齢が 64.2 歳, 男性 (64.1%), 女性 (35.9%), 平均のクレアチニン値は 3.46 mg/dl であった(図 2)。現在被験者をリクルート過程であり, 両群の統計学的な差異を解析, 検討は行っていないが, 今後は健常ボランティアに関しては男性, 高齢者を中心に行っていく方針である。

### 3. 1. 2 味覚検知閾値

塩味認知閾値の検討では, 健常人では一般的に正常範囲と考えられる 0.3, 0.6%の被験者の割合が高く, 高濃度になるに従ってその頻度の減少は低下した。一方, 腎機能障害を有する患者では閾値が 0.6%の被験者が最も多かったが, 健常ボランティアに比しその分布は高濃度側にシフトしており, 塩味の認知機能障害の存在が示唆された。甘味の認知閾値の検討では, 健常人, 慢性腎不全患者ともに, 10%スクロースで最も頻度が高いという分布に大きな差異を認めなかった。酸味認知閾値に関しては, 健常人では 2%のクエン酸で最も頻度が高かった一方, 慢性腎不全患者では, 酸味が脱失している被験者の割合が最も高かった。また苦味の認知閾値に関しては, 健常被験者では 0.1%のキニーネで最も高く, ほとんどの被験者ではそれ以下の濃度で苦味を認知していた。一方で, 慢性腎不全患者では 0.1%未満で苦味を認知できたものはおらず, 健常ボランティアに比し明らかに苦味の認知閾値が上昇していた(図 3)。

### 3. 1. 3 各種味覚に対する忌避反応

塩味に対する忌避反応は塩味刺激濃度を上昇させるにつれて忌避を示す被験者の割合は上昇し, 10%の塩味刺激に対しては約 50%の被験者が, 20%の塩味刺激に対しては約 70%の被験者が忌避反応を示した。一方で慢性腎不全患者では明らかに高濃度塩味刺激に対する忌避反応が減弱しており, 10%NaCl の塩味刺激, 20%NaCl の塩味刺激に対して忌避反応を示す被験者の割合はそれぞれ約 17.5%, 約 22%と高度に低下していた(図 4)。酸味に対する忌避に関して, 8%クエン酸に対する忌避反応を示す割合は健常ボランティアでは 70%に達していたが, 慢性腎不全患者では 25%と高度に低下していた。

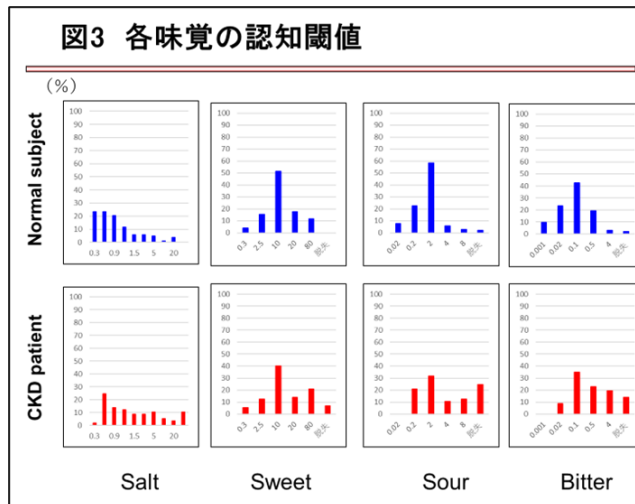


図 3. Recognition thresholds in each tastes (salt, sweet, sour, and bitter)

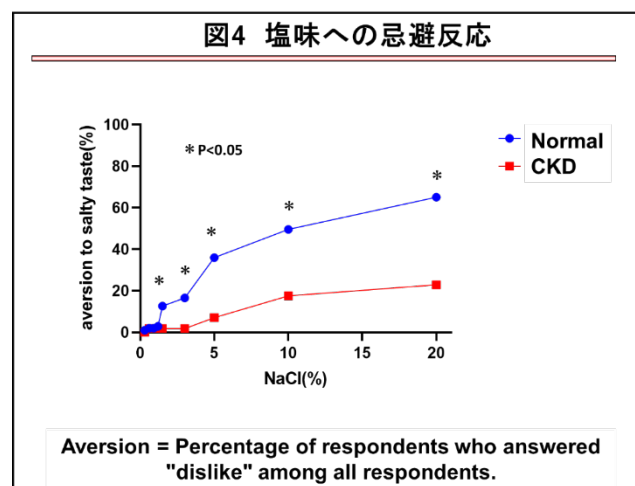


図 4. Aversive response against high concentration of salty taste. Aversive response against high salt is impaired in chronic kidney disease patients.

苦味に対する忌避に関しては, 健常ボランティアでは 0.1%キニーネで約 90%, 4%キニーネではほぼ 100%の被験者で忌避反応を示したが, 慢性腎不全患者では忌避反応を示す患者の割合はそれぞれ約 40%, 60%にとどまり, 苦味に対する忌避反応は顕著に減弱していた(図 5)。

図5 各種味覚への忌避反応

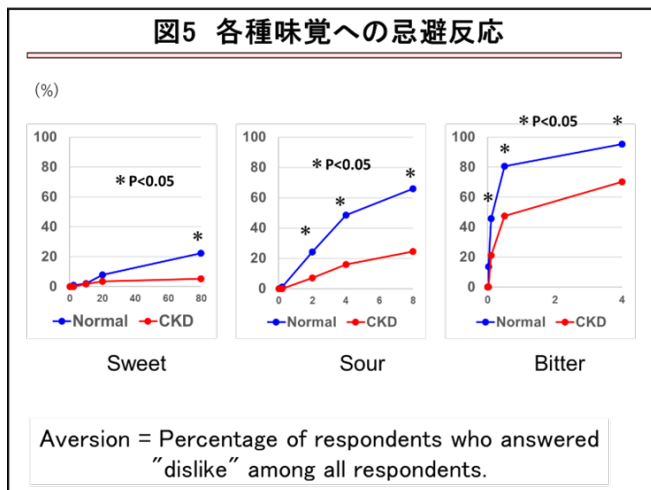


図 5. Aversive response against high concentration of sweet, sour and bitter tastes. Aversive responses against high concentration of sour and bitter are impaired in chronic kidney disease patients.

図6 Mouse Taste lick test

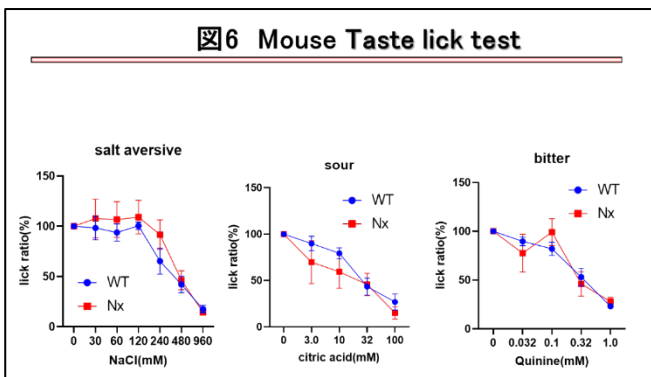


図 6. Mouse taste lick test There was no difference in aversive responses against salt, sour, and bitter taste between wild-type control and chronic kidney disease models.

### 3. 2 基礎研究

#### 3. 2. 1 行動実験(味覚嗜好実験)

塩味, 甘味, 苦み, 酸味に対する嗜好実験を 5/6 腎摘出を行った慢性腎不全モデルマウスと野生型マウスに対して行った。10 週齢の BL6 マウスに対して 5/6 腎摘出を行い, 約 20 週間の観察期間をおいたマウスを使用した。BUN は 5/6 腎摘マウスでは約 50 mg/dl まで上昇し, 腎機能障害を認めた。同マウスを用いた塩味, 苦味, 酸味に対する忌避実験では, 野生型 (n = 6), 慢性腎不全マウス (n = 5) の両群間で, 各種味覚の忌避行動に大きな差異は認めなかった(図 6)。腎不全に曝されている期間が短いために忌避行動に差を生じなかった可能性を考え, 慢性腎不全誘導後に更に時期を空けて行動実験を行う予定とする。

### 4. 考察

高濃度塩味刺激に対して忌避反応を示すことは日常生活でよく経験される現象であるにもかかわらず, 現在までにヒトにおいて味覚の忌避性を定量的に評価した研究はない。今回, 我々は高濃度塩味刺激に対する忌避行動が, 慢性腎不全状態で減弱しているという仮説を立て, 研究を行った。現時点ではまだ十分な被験者数が集まっている状況ではないが, 現時点での得られている臨床研究の成果は, 以下の 3 点である。

- ① 今回の我々の方法によりヒトで認められている高濃度塩味刺激に対する忌避反応が定量的に確認されたこと
- ② 腎不全患者では塩味, 酸味, 苦味の味覚認知閾値が上昇していたこと
- ③ 慢性腎不全患者では塩味, 酸味, 苦味に対する忌避反応が減弱していたこと

一方で, マウスを用いた基礎研究では短期的な腎不全状態では高濃度塩味刺激に対する忌避反応に変化は認めなかった。

ある味覚刺激に対して忌避行動を示すことは, 生体にとって危険性を有する物質から生命を防御するという観点から合目的な反応であると考えられる。陸上生物において細胞外液量を維持する主たる陽イオンである Na の体内量を適正に維持することは非常に重要であり, 低濃度塩味に対する嗜好性を有している。しかし, 過剰な Na の体内への流入を防ぐ目的と考えられるが, 高濃度塩味刺激に対して忌避反応を示すことは日常生活でよく経験される現象である。今回我々の研究ではヒトにおいては, 健康人でも高濃度味覚刺激, 特に塩味, 酸味, 苦味で忌避反応を認め, 定量的に評価可能であった。その結果として塩味, 酸味は苦味に比し高濃度でも忌避反応を呈さない被験者もあり, これはその味覚に対する嗜好に由来するものと考えられる。

また今回の我々の検討では, 慢性腎不全患者では塩味, 酸味, 苦味の味覚認知閾値の上昇を認め, これは既報にも合致していた。但し, 今回の検討における慢性腎不全の被験者では健康被験者に比し, 高齢であること, 男性の割合が高く, これらが強く結果に影響した可能性を

考えており、今後は年齢、性別などの被験者背景をそろえるように、被験者の募集を行っていく必要がある。

今回の我々の検討では、慢性腎不全患者では高濃度塩味、苦味、酸味刺激への忌避反応の減弱を認めた。このことは、通常濃いと感じられる味覚に対しても、患者自身が濃いと感じていないことを示唆している。生活習慣病の治療を行うにあたり、減塩を中心とした適切な食事療法は重要であることを踏まえると、慢性腎不全患者での味覚障害はより減塩を困難にしている可能性があり、注意が必要と考えられる。

一方で、我々がヒトに対して行った味覚嗜好、忌避研究の結果を動物実験で再現することは、現時点の条件検討では困難であった。慢性腎不全患者では年余にわたり腎不全状態に曝されていることが、味覚変化に寄与している可能性を考え、マウスにおける基礎的検討においても腎不全導入後、味覚検査までの期間を延長して解析することを今後検討している。

加えて腎不全に曝されている期間など時間軸上の異なりに加えて、マウスに対する味覚行動実験の方法および結果の解釈に関して、ヒトでの現象を模していると判断するには、いくつかの懸念が存在する。一つは味覚検査で忌避行動を検査する際には前日から24時間の飲水制限が前処置として行われる。この飲水制限により、マウスの血中Na濃度および血清浸透圧の上昇とそれに引き続くADHの上昇を認めている状態と推定される。この状態下ではマウスは高度に口渇を感じ飲水行動をとる一方、Naの摂取をすることによる更なる高浸透圧状態を避けるために、高濃度塩味に対する忌避反応が惹起されるものと考えられる。一方で、塩味嗜好性を検査する際には、前日にフロセミドの投与を行いその後絶食としている。この状態では、体内のNa量、ひいては細胞外液量を減少させ、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAA系)を亢進させることで、NaCl摂取への嗜好性を高めていると推

察される。ヒトの食塩の嗜好性は、動物実験での前処置のような人工的な環境によって誘導されるのではなく、日常生活や食習慣などの社会活動によって形成されると考えられる。今後は、以上のような動物実験とヒトでの研究結果の間の整合性、齟齬にも焦点を当てて、解釈を行う必要があると思われる。

## 5. 今後の課題と展望

今後、学会発表、学術誌への発表に向けて以下の課題が残されていると考えている。

- ・ ヒト研究対象者のリクルート、特に疾病を有している対象者のリクルート。
- ・ 動物実験において短期間の疾病状態では十分な差異を見いだすことが困難であった。これらの結果を踏まえ、もう少し長期間マウスを疾病状態に曝したうえで、味覚検査を実施する
- ・ 動物に対する味覚検査の結果が明らかになれば、味蓄の遺伝子発現、組織変化、味覚受容体に対する免疫染色を行う。
- ・ ヒトの味覚試験と動物実験の結果を合わせ解釈し、両者間の整合性、齟齬を明らかにする。

## 6. 文献

1. Kusaba, T. et al. Sodium restriction improves the gustatory threshold for salty taste in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 76, 638-643, doi:10.1038/ki.2009.214 (2009).
2. Chandrashekar, J. et al. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464, 297-301, doi:10.1038/nature08783 (2010)
3. Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N. J. & Zuker, C. S. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 494, 472-475, doi:10.1038/nature11905 (2013).

## Attractive and Aversive Response against Sodium Chloride under the Disease Conditions Including Diabetes and Chronic Kidney Disease

Tetsuro Kusaba

Kyoto Prefectural University of Medicine, Department of Nephrology

### Summary

Due to an aging society, the number of patients with hypertension, cardiovascular diseases and chronic kidney disease (CKD) is increasing. Epidemiological studies have shown that high blood pressure is one of the strongest predictor for developing chronic kidney disease as well as cardiovascular diseases. It is well known that excessive oral salt intake may induce high blood pressure. Thus, sodium restriction is quite a beneficial and reasonable treatment for high blood pressure; however, sodium restriction is sometimes difficult to achieve and excessive restriction affects a patient's quality of life. One candidate factor relevant to the disturbance of salt restriction is impaired sensitivity to salty taste, and previous reports showed that the CKD patient cannot sense salty taste accurately, oral sodium intake may increase. In addition, mammals exhibit sodium attraction for low to moderate sodium concentration, however, in case of higher sodium concentration, sodium attraction shifts to aversive behavior. On this basis, we hypothesized that aversive response against high sodium concentration is disturbed in CKD or diabetic patients.

In order to investigate our hypothesis, we performed the combined analyses of clinical investigation of taste tests, and experimental investigations of lick tests in murine disease models. We first performed the taste tests for healthy volunteers (n = 103, average age 40.3 y.o.) using sodium impregnated filter paper with various concentrations and found that 50% of participants exhibited the aversive response against 10% of sodium solution. In CKD patients (n = 57, average age 64.2 y.o, average Cre 3.46mg/dl), only % of CKD patients exhibited the aversive response against 10% of sodium solution. Regarding the sodium aversive test using disease murine models, we generated CKD murine model by 5/6nephrectomy and type 1 diabetic murine model by repeated low dose streptozotocin injection. We performed the sodium lick tests for these models, however, we could not find any differences in the sodium attractive and aversive responses between the wild-type control mice and various disease model mice.

In summary, we verified significant disturbance in aversive responses against higher salty taste in CKD patients, whereas it was not found in murine experiments. Further experiments and alternative interpretations to explain this inconsistency will be required.