

潜在性亜鉛欠乏時の食行動ならびに味神経応答に関する研究

駒井 三千夫・後藤 知子・鈴木 均*・古川 勇次
(東北大学農学部栄養学教室, 石巻専修大学理工学部*)

はじめに

近年、インスタント加工食品に多く含まれるポリリン酸(亜鉛キレート効果を有し、腸管からの亜鉛吸収を阻害する)等の加工食品成分の偏食的な摂取過剰に起因すると考えられる潜在性の亜鉛欠乏性味覚障害が増えていると報告されている。この研究は、この亜鉛欠乏性味覚障害の発症機構を、実験動物(ラット)の食行動と味神経応答の面から探ったものである。

今回の研究のねらいは、とくに、亜鉛欠乏下(外見症状のみみられる重篤な欠乏)と潜在性の亜鉛欠乏下(外見からはわからない程度の欠乏だが、味覚異常が生ずるなどで近年増えてきている)におけるこうした味覚異常の程度の違いを明らかにすることである。また、亜鉛欠乏による味覚異常の発症機構の一つを、舌表皮組織や唾液腺中に存在する炭酸脱水酵素(亜鉛酵素の一つ)の活性の低下にあると考え、これに焦点を当てて検討した。なぜならば、三叉神経舌枝を用いたこれまでの我々の研究で、溶存炭酸ガス(炭酸水)によって起こるirritationの感覚の受容には、舌上皮組織中に存在する炭酸脱水酵素(Carbonic Anhydrase=CA)が関与していることを明らかにしてきたからである。また、炭酸脱水酵素阻害剤であるMK-927(Merck Sharp and Dohme, Inc., USAから提供)を舌表面に滴下してその後の応答をみたところ、基本味である旨味(L-グルタミン酸)や苦味(塩酸キニーネ)、そして炭酸水の

鼓索神経による受容が低下することも報告してきたからである。

今回、亜鉛欠乏ラットと潜在性亜鉛欠乏ラットを作成し、まず各種の基本味溶液の嗜好選択実験を行い代表的な味の嗜好について調べた後、三叉神経舌枝による炭酸水の受容と、鼓索神経による基本味の受容について、亜鉛欠乏の程度によってどのように異なるのか、あるいは、対照群との違いはどの程度なのかなどについて調べた。最後に、亜鉛欠乏状態で実際に舌上皮組織の炭酸脱水酵素活性が低くなっているのか否かを確かめることによって、この酵素の味覚異常への関わりについて調べた。

1. 亜鉛欠乏ラットを用いた基本味溶液の嗜好実験

1.1 方法

実験動物は、4週齢のSD系雄ラット(SD/Sic)を用いた。基本的には、タンパク質源として卵白(25%卵白食)を用いて、以下の4つの実験群を設けた。亜鉛欠乏食群(亜鉛は全く添加していないが、原子吸光分析の結果2.2ppmの亜鉛が含まれていた=Zn-Def群)、低亜鉛食群(亜鉛含有量4.1ppm=Low Zn群)、亜鉛添加食群(亜鉛含有量33.7ppm=Zn-Suf群)、そして、Pair-fed対照群(亜鉛欠乏食群のラットと同じ量の亜鉛添加食を食べさせた群=Pair-fed群)の4つである。実験によっては、卵白の対照として全卵タンパク質を用いた全卵タンパク食群(亜鉛含有

量53.4ppm=Whole Egg 群)を用いた場合もある(表1)。なお、高卵白食によるビオチン欠乏症の発症を防ぐため、ビオチンを1.5mg/100g dietの量で添加した。各群5匹ずつを、選択実験用の大型金網ケージに入れて集団飼育した(選択実験の種類ごとに別の動物を用いた)。味溶液の選択嗜好実験は、飼育開始直後から数週間、鳥居らの方法による2瓶での自由選択法によって行った。

1.2 結果と考察

(1) 亜鉛欠乏状態の確認

飼育開始後の体重の変化を図1に示した。亜鉛欠乏群では、飼育開始後3週目頃から亜鉛欠乏の症状が見られるようになったが、低亜鉛食群では

表1 実験食の組成

ingredient	%
Egg white*	25.0
Corn Starch	55.7
Sucrose	5.0
Cellulose	3.0
Soybean oil	5.0
L-Methionine	0.3
Vitamin mixture	2.0
Mineral mixture**	4.0

* 亜鉛欠乏食群(Zn-Def), 低亜鉛食群(Low-Zn), 亜鉛添加食群(Zn-Suf), Pair-fed対照群(Pair-fed)で用いた。
卵白の対照として全卵タンパク質を用いた群(Whole egg)を設けた。
** Zn-def(No zinc), Low-Zn(96.0ppm zinc), Zn-Suf・Whole egg・Pair-fed(846.0ppm zinc)
各実験食の亜鉛含量: Zn-def(2.2ppm), Low-Zn(4.1ppm zinc), Zn-Suf・Pair-fed(33.7ppm zinc), Whole egg(53.4ppm)

体重の増加は緩やかだが外見的な欠乏症状は認められなかった。飼育後7週目の各実験群のラットの血漿中亜鉛含量を表2に、大腿骨中の亜鉛含量を表3に示した。これらの値の測定結果から、亜鉛欠乏の程度に応じて血漿中ならびに大腿骨中亜鉛含量が少なくなっていることが確認された。なお、低亜鉛食群では外見的には欠乏の症状が見られなかったので、この群は、人間でよくみられる潜在性の欠乏の状況とよく似ており、ヒトのモデルとして使うに好都合であると考えられた。

(2) 食塩水溶液の選択実験

図2に、実験食で飼育開始直後からの毎日の飲

表2 血漿中亜鉛含量

Plasma Zn level (ng/ml)	n	mean±SD	
Zn-def	5	470.4±183.1	a
Low-Zn	5	639.6±141.8	a
Zn-suf	5	1747.0±72.4	b
Whole egg	5	1646.1±216.2	b
Pair-fed	4	1419.0±35.9	b

a,b: Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

表3 大腿骨中亜鉛含量

大腿骨中亜鉛含量 ($\mu\text{g/g}$)	n	mean±SD	
Zn-def	4	60.8±6.9	a
Low-Zn	5	100.2±14.6	b
Zn-suf	5	345.1±36.3	c
Whole egg	5	332.9±31.0	c
Pair-fed	5	332.5±19.6	c

a,b: Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

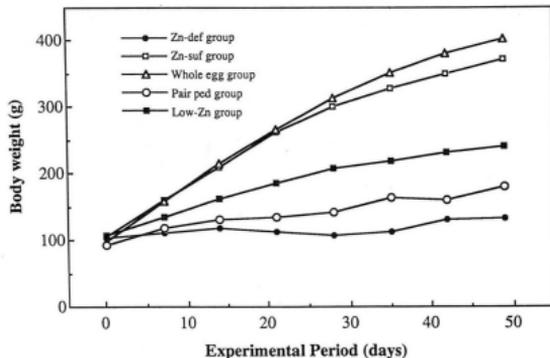


図1 各実験群のラットの体重変化

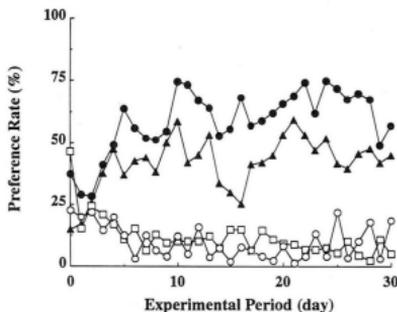


図2 食塩水溶液の選択嗜好率 (2瓶選択法)

Preference rate for 154mM NaCl solution against water by two-bottle preference test in experimental groups; Zn-Def (●, n=5), Low-Zn (▲, n=5), Zn-Suf (□, n=5) and Pair-fed (○, n=5) (Mean Values).

水 (蒸留水と154mM の食塩水溶液の2瓶) からの食塩溶液の選択摂取率 (%) をまとめてみた。その結果、亜鉛欠乏食群と低亜鉛食群では、飼育開始4日目からすでに食塩水溶液の嗜好率が上昇することがわかった。このことから、からだの亜鉛欠乏のシグナルが敏感に食塩嗜好に反映すること、また、食塩嗜好率の上昇は、食餌中の亜鉛含量に依存していることが示唆された。

亜鉛欠乏では、忌避物質である塩酸キニーネ溶液 (10^{-5} M) の識別能が低下することも知られている。亜鉛欠乏群で感じ方が鈍感になってこの溶液の選択率が上昇したのは、実験食開始後8~10日目であり、食塩水の場合よりも遅いことがわかった (図3)。また、低亜鉛食群では、塩酸キニーネ溶液の選択摂取率は対照群よりもむしろ低い傾向があり、この味をむしろ忌避するような別の味質としてとらえている可能性が示唆された。

これまで我々が行ってきた NaCl または KCl の選択実験や、グルタミン酸ナトリウムまたは L-グルタミン酸の選択実験の結果から、亜鉛欠乏ラットではナトリウムの欲求が高まっていることを示唆してきた。この原因は、味受容サイトにおける味受容の異常が原因となっているのか、ある

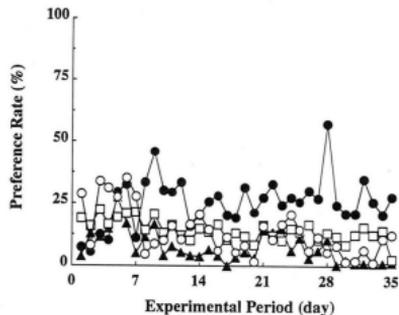


図3 キニーネ溶液の選択嗜好率 (2瓶選択法)

Quinine-HCl solution (10^{-5} M) preference rate against distilled water measured by two-bottle preference test for 30 days in experimental groups; Zn-Def (●, n=5), Low-Zn (▲, n=5), Zn-Suf (□, n=5) and Pair-fed (○, n=5) (Mean Values).

いは、からだの代謝上で必要に迫られて高次の中枢で要求指令が出ているのかなどについては、依然として不明のままであった。そこで、以下では、塩味等の受容能の違いについて、神経生理学的に調べた。

2. 亜鉛欠乏ラットを用いた味神経応答に関する実験

先に述べたように、亜鉛欠乏時にナトリウムの嗜好が高まっていることと、以前の我々の検討によって炭酸水の摂取量が多くなっていることが示されてきた。受容サイトにおけるナトリウムあるいは炭酸水の受容能が悪くなっているためか、あるいはこれとは関係なく中枢を介した生理的要求が高くなっていることによるものと考えられる。ここでは、主として基本味の受容能の低下があるのか否かについて明らかにする目的で以下の実験を進めた。

2.1 方法

選択実験終了後のラットを、ネプタール (65 mg/kg 体重) とウレタン (150mg/kg 体重) の併用麻酔下に頭部を固定して気管カニューレ装着後に手術を施し、鼓索神経または三叉神経舌枝を

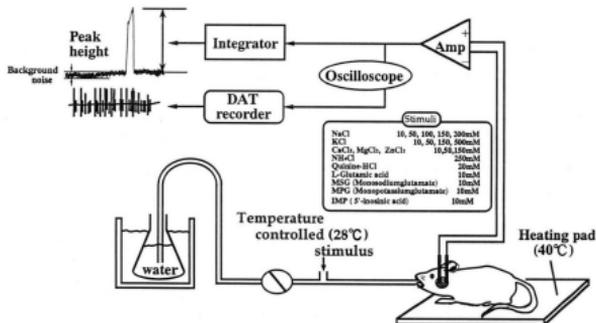


図4 味覚神経応答の記録法

嫌的な状況下（ミネラルオイル中で）で露出させた。神経応答の大きさは、神経を白金電極に接触させ、舌に刺激溶液を流したときに生ずるインパルス放電をアンプで増幅して、テープに記録するとともに、積分器を用いて積分して（時定数＝5.6秒）記録した（図4）。なお、鼓索神経応答の大きさは、whole nerveのインパルス放電を積分した値のピーク高さをバックグラウンドノイズで割ったもので表わした。

また、これとは別に組んだ選択実験終了後のラットを用いて、炭酸水の刺激に対する三叉神経舌枝（舌神経）応答をとる実験に供した。三叉神経舌枝は、神経束を細かく分けたbundle（1種～数種の神経単位が混在）で、1匹につき平均して3つのbundleについての刺激応答をとった。

2.2 結果と考察

(1) 鼓索神経応答

各種の濃度の食塩水の刺激に対する鼓索神経応答は、亜鉛欠乏群と低亜鉛群で有意に低下していた（図5）。他の塩味刺激液についても同様の傾向があり、0.1MKCl溶液や0.25MNH₄Cl溶液についても、亜鉛欠乏群では鼓索神経応答が有意に低下していた。さらに、他の味溶液については、酸味溶液や甘味溶液においては、実験群間に大きな差が認められなかったが、塩酸キニーネ（苦味）やL-グルタミン酸（うま味）の応答が亜鉛

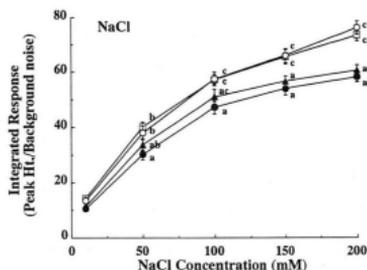


図5 種々の濃度の食塩水の刺激に対する鼓索神経応答

Chorda tympani nerve responses to various concentrations of NaCl solution. Values are means±SE. Differences among Zn-Def (●, n=12), Low-Zn (▲, n=9), Zn-Suf (□, n=11) and Pair-fed (○, n=10) groups were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. Values with different letters show significant difference. a, b=p<0.05 at 50mM, a, c=p<0.005 at 100, 150 and 200mM.

欠乏群と低亜鉛群で有意に低下していたことが特徴的だった。

したがって、食塩溶液の受容サイトでの受容能の低下が食塩水の選択摂取量の増加の部分的な説明とはなるが、なお、亜鉛欠乏時のナトリウムバランスについて検討を行う必要がある。

(2) 炭酸水の刺激に対する三叉神経舌枝応答

図6は、炭酸水の刺激に対する三叉神経舌枝応答を、インパルス放電でみたものである。これまでの著者らの研究で、2.5MNH₄Clに反応する神経繊維のほとんどが炭酸水にも反応することがわかっているため、これを基準物質として炭酸水に対する反応の強さを比較した。亜鉛欠乏ラットで

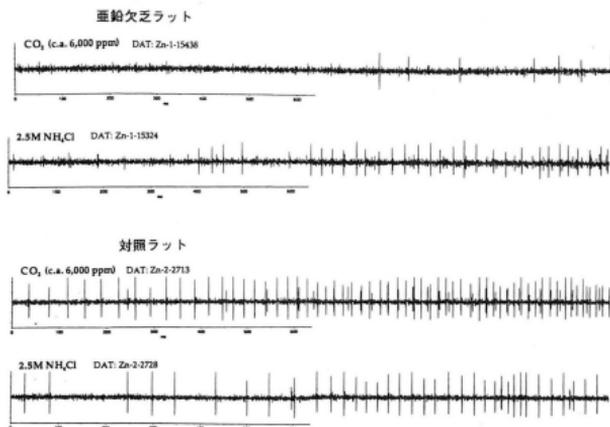


図6 炭酸水の刺激に対する三叉神経舌枝応答（2群のラットとも上段が炭酸水の刺激、下段が基準物質の刺激。応答初期のインパルス放電を抜粋したもの。）

表4 炭酸水の刺激に対する三叉神経舌枝の積分応答値
(2.5M NH₄Cl=100としたときの相対値)

integrated CO ₂ response (2.5MNH ₄ Cl=100)			
Group	Rat (n)	Bundle number	Mean±SD
Zn-def	(8)	29	38.2±21.7 a
Low-Zn	(5)	14	86.4±28.3 b
Zn-suf	(7)	20	85.9±31.6 b
Pair-fed	(7)	24	103.7±40.5 b

a,b: Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

は、明らかに炭酸水に対する応答が下がっていることがわかった。各実験群の炭酸水に対する積分応答(2.5MNH₄Clに対する応答を100にして表した)を、表4にまとめてみた。その結果、亜鉛欠乏群では他の群よりも応答が著しく低く、他の多くの群のほぼ半分の値になっていることがわかった。また、低亜鉛群では、この応答の顕著な低下は認められなかった。

以上の鼓索神経と三叉神経舌枝の両方の検討結果から、炭酸水の選択実験で亜鉛欠乏食群で多くの炭酸水を飲んだのは、炭酸水の受容能が低下したことによるものと判断された。

3. 亜鉛欠乏ラットの舌上皮組織および顎下腺の炭酸脱水酵素活性

亜鉛酵素である炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase, 以降 CA と略) は、以下の反応式のようにより、炭酸ガスの水和または炭酸水素 (別名重炭酸) イオンの脱水を触媒する酵素で、生物体に広く分布し、pH 維持などに寄与している。

末梢組織 CA



肺 CA 非酵素的反応

口腔内では、味細胞膜に存在して味覚受容に関わっているとされている。また、唾液分泌機構にも大きく関与しているので、CA が味覚に及ぼす影響は大きいものと考えられる。今回、亜鉛欠乏ラットで炭酸水の応答が低下しているのは、亜鉛酵素である炭酸脱水酵素の活性が低くなっていることによるものと予測されたため、以下の実験を行った。

3.1 方法

まず、舌を摘出後 (約 2 cm 程度の長さ)、即刻液体窒素に入れて急速凍結させて、分析するま

で -85°C 下で保存した。舌表皮組織のはぎ取りは、凍結させたままステンレス製替え刃用メスで少しずつ削り取り、これを集めて試料とした。顎下腺の場合は、片側の組織まるごとをホモジェネート調製用に供した。9倍量のトリス・塩酸塩緩衝液(pH7.20)を加えてホモジェネートをつくり、これを氷冷下に遠心し(1,000g, 15min), 上清と沈澱部の両方を酵素活性ならびに蛋白質含量測定用の試料とした。

炭酸脱水酵素の活性の測定は、Marenの微量定量法のBruns & Grosらによる改良法によって行った。すなわち、酵素単位(EU)は、

$$\text{EU} = (t_0 - t) / t \quad (t_0: \text{ブランクの反応時間},$$

$$t: \text{ホモジェネートの反応時間})$$

として常法通りに従って表した。

3.2 結果と考察

ホモジェネートの調製用の溶液を、従来法で使われていた蒸留水からトリス・塩酸塩緩衝液(pH7.20)に変更したことにより、再現性のあるデータが得られるように改善できた(後藤知子ら, 1997年)。図7と図8に、各実験群の舌表皮組織あるいは顎下腺の炭酸脱水酵素の活性の測定

結果(タンパク質1mgあたりの酵素活性)を示した。この結果、亜鉛欠乏ラットでは、炭酸脱水酵素活性が最も低く、低亜鉛群では次に低い値になっていることがわかった。このように、炭酸脱水酵素の活性は、亜鉛欠乏の程度に応じて低い値になっていることがわかった。さらに、味蕾の味細胞膜周辺の炭酸脱水酵素の活性を、Hansson法による酵素組織化学的方法で証明してみたところ、やはり、亜鉛欠乏群と低亜鉛群では、対照群と比べて著しく炭酸脱水酵素活性が低下していることが証明され、この活性の低下が味覚障害に大きく関与していることが示唆された。

まとめ

この研究によって、重症の亜鉛欠乏症の場合には味覚障害の程度も重いことを確認できたが、外見症状の認められない潜在性の亜鉛欠乏症においても、①味の嗜好が大きく変化していること、②一部の味物質の受容サイトにおける受容能が低下していること、③味細胞ならびに唾液腺の炭酸脱水酵素の活性が顕著に低下していることなどが解明された。生体内に200種類以上あるといわれる

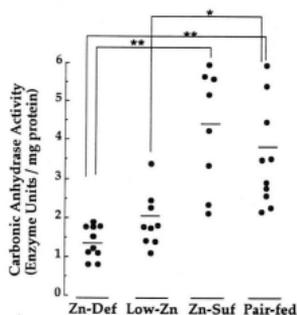


図7 舌表皮組織の炭酸脱水酵素活性

Carbonic anhydrase activity in the tongue epithelium of experimental rats (Horizontal bar shows mean value). Differences among Zn-Def (n=10), Low-Zn (n=9), Zn-Suf (n=8) and Pair-fed (n=10) groups were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. **: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$.

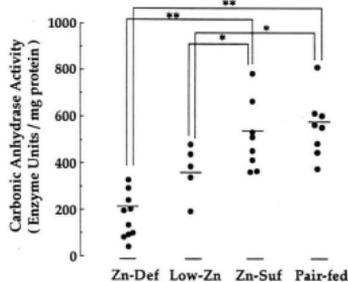


図8 顎下腺の炭酸脱水酵素活性

Carbonic anhydrase activity in the submandibular gland of experimental rats (Horizontal bar shows mean value). Differences among Zn-Def (n=10), Low-Zn (n=5), Zn-Suf (n=8) and Pair-fed (n=8) groups were analyzed by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. **: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$.

亜鉛酵素の代表的な酵素である炭酸脱水酵素の活性低下は、生体内での代謝にも悪影響を及ぼすものと考えられる。最初は気づかない程度の亜鉛欠乏でも、味覚の異常から代謝の異常につながり、それが老化や各種の生活習慣病につながるものが十分に考えられる。若者にも多くなってきているといわれる潜在性亜鉛欠乏は、国民の健康の維持にマイナスとなるものである。今後の食生活の上で、充分注意していく必要があろう。

本研究成果は、(財) 浦上食品・食文化振興財団のご支援によってまとめることができました。ここに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 富田 寛：微量金属代謝，1，61-68，1975
- 2) 大木光義：日大医誌，49，189-199，1990
- 3) Maren, T.H. and Couto, E.O.: *Archiv. Biochem. Biophys.*, **196**, 501-510, 1979
- 4) 石田裕美：日本栄養・食糧学会誌，46，299-307，1993
- 5) Komai, M. and Bryant, B.: *Brain Res.*, **612**, 122-129, 1993.
- 6) Komai, M., et al.: in *Olfaction and Taste XI*, ed. by Kurihara, K., et al., Springer-Verlag, Tokyo, p.92, 1994.
- 7) 駒井三千夫：New Food Industry, **37** (＃5), 55-64, 1995 (食品資材研究会刊，東京)
- 8) Bruns, W. and Gros, G.: in *The Carbonic Anhydrases*, ed. by Dodgson, S.J., et al., Plenum Press, New York, pp. 127-131, 1991.
- 9) 駒井三千夫, Bryant, B.P.: 化学と生物, **33**, 145-146, 1995
- 10) 後藤知子, 駒井三千夫, 鈴木 均, 古川勇次：日本味と匂学会誌, **3**, 608-611, 1996
- 11) Goto, T., et al: *Chem. Sens.*, **22**, 689, 1997

Behavioral and physiological study on the taste abnormality in marginal zinc-deficient rats

Michio Komai, Tomoko Goto, Hitoshi Suzuki* and Yuji Furukawa

(Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku University,

and Ishinomaki-Senshu University*)

It is well known that zinc deficiency causes abnormalities in general taste sensation. A recent clinical investigation revealed that taste abnormalities caused by marginal zinc-deficiency has gradually been increasing in Japan. To clarify the mechanisms underlying any taste insensitivity in marginal zinc-deficiency, we studied the NaCl and quinine-HCl preference rate, and the chorda tympani nerve responses to these tastants in rats. Furthermore, carbonic anhydrase (CA) is one of the zinc-enzymes, and we have previously shown that this enzyme plays an important role for the induction of irritation sensation (CO_2 in water) via lingual trigeminal nerve, and possibly of CO_2 , bitter (Quinine·HCl), and umami (L-Glutamic acid) taste sensation via chorda tympani nerve. We therefore investigated the effect of marginal zinc-deficiency on the CA activity in the tongue epithelium and submandibular glands of the rat.

Twenty male SD rats, 4 weeks old, were divided into four groups (Zn-Def, Low-Zn, Zn-Suf, and Pair-fed). Each group was housed in a cage with two bottles: the taste solution (154mM of NaCl or 10^{-5} M quinine-HCl) and distilled water, to each of which they had free access. After taking part in the preference tests for 6 weeks or more, the rats were used for the recording of chorda tympani nerve responses. The whole-nerve integrated response was assessed by calculating the ratio: peak height/background noise height. After taking part in second preference tests for 42 days, the rats were sacrificed and the tongue and submandibular gland excised. These were homogenized with Tris-HCl buffer (pH 7.20) and centrifuged (1,000g for 15min). The CA activity in the supernatant was measured by modified Maren's micromethod.

Interestingly, in both Zn-Def and Low-Zn rats, an increase in preference was observed for NaCl on day 4-5 of the test. In Zn-Def rats an increase was also observed for quinine-HCl on day 8, but the Low-Zn rats rather avoided it than the control rats. The chorda tympani nerve responses to NaCl and L-glutamic acid in the Zn-Def and Low-Zn groups, and to KCl and quinine·HCl in Zn-Def group were significantly lower than the responses to the control group. The CA activity of the tongue epithelium and the submandibular gland was significantly lower in Zn-Def and Low-Zn rats than in Zn-Suf and Pair-fed rats. These results indicate that CA activity, considered to be an indispensable

factor for the maintenance of normal taste sensation, is affected by the dietary zinc content.