

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500753

研究課題名（和文） 幼児期の苦味忌避緩和に重要な苦味経験時期の検索

研究課題名（英文） The research on the most important point for tolerance of bitter aversion in early childhood

## 研究代表者

河合 崇行（KAWAI TAKAYUKI）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・主任  
研究員

研究者番号：50425550

研究成果の概要（和文）：胎児マウスを包む羊膜内の羊水中に苦味溶液を直接注入する前処理と、母マウスの給水瓶に苦味溶液入れ、母体を介して苦味を経験させる前処理を施したのち、生まれたきたマウスに対し、苦味溶液と水との二瓶選択試験を実施した。その結果、いずれの前処理を施したマウスにおいても、苦味溶液に対する嗜好や忌避減少は認められず、その大きさは未処理マウスのもと同程度であった。このことは、妊娠中の母親の食事が仔の味嗜好（忌避）形成へ影響しにくいことを示している。

研究成果の概要（英文）：To expose bitter taste to pre-born mice, bitter solutions were injected to inside amnion liquid by surgical operation. To expose bitter taste to infant mice, their mother were fed with bitter solution instead to water. Then, the tolerance for bitter taste of new born mice were investigated by 48h two-bottle preference tests with the bitter solution and water. As a result, any difference in preference or aversion to bitter solution was not observed between pretreatment mice and intact mice. This result suggests that the taste preference of younger children would not be affected by their mother's diets in their fetal and lactation periods.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：苦味・成長

## 1. 研究開始当初の背景

成長とともに変化する味覚に関する研究は少なく、離乳期前後の味の経験が将来の味の嗜好に影響するという報告が数例あるだけである。その中では、離乳前にカツオダ

シを混ぜた餌でマウスを飼育すると、成熟後のカツオダシ餌に対する嗜好性が高まるという報告もある。このことは、親の食べた食事の味成分や香気成分が母乳を介して子供に伝わり、好ましいものとして記憶される機

構が存在することを示唆している。苦味であっても経験の仕方によっては、同様の現象が起きるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

幼い子供は本能的に苦味を嫌いますが、成長に従って苦味を嫌わなくなり、ついには苦味も美味しさを構成する一部と感じるようになる。早い段階から苦味を持つ食品を食べられるようになれば、食の幅が広くなり、抗酸化性物質をはじめとする多種の食品成分を摂り入れることができ、健康維持にも役立つことが期待できる。本研究課題では、胎生期・乳児期・離乳期に苦味を経験させ、幼少期（離乳後～成熟期）や成熟後の苦味嗜好にどのように影響するかを実験動物を用いて解析し、早い段階で苦味嫌悪を減らす方法を提案することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 羊膜内への苦味物質の注入法

出産予定の4~7日前のICR系妊娠マウスに対し、イソフルラン吸引麻酔を施し、はさみ・メス等を利用して開腹した。子宮を引出し、30ゲージの細い注射針を用いて、苦味溶液を胎児がつつまれている各羊膜内へ100 $\mu$ Lずつ注入した。注入溶液に食用色素を混ぜておき、羊水内に溶液が入っていることを目視で確認しながら作業した。注入後、腹膜・皮膚を接合し、個別ケージに戻した。

### (2) 二瓶選択実験法

群飼育している仔マウスを2~3匹ずつ小型ケージに移し、吸水管のついた容器をに入れた苦味溶液と水の2溶液を給水管の先どろしが5cm程度離れるように調整して、各ケージにセットした。24時間後に溶液の減少量を天秤で測ったのち、2溶液の提示場所を入れ替えてさらに24時間提示した。再び、溶液の減少量を天秤で測ったのち、前日得られたデータと足し合わせて48時間摂取量とした。苦味溶液の摂取量を水との総摂取量で割ったものを苦味溶液のPreference値として算出した。

### (3) 苦味リック試験法

12時間以上絶水させたマウスを小さな小窓（自動シャッター付き）のあるケージに移し替え、小窓から様々な濃度の苦味溶液を提示した。マウスが溶液を舐める時の舌の動きを光センサーでとらえ、リック回数を測定した。1サンプル10秒間のみ提示とし、次々と溶液を換えて、それぞれの溶液に対するリック数データを取得した。苦味物質が濃い、あるいは苦味感が強い溶液では、リック数は少なくなる。水を10秒間提示した際に示すリック回数を基準とし、各苦味溶液を提示した際のリック数を比率で現したものを解析に用いた。

### (4) 苦味感低減率の計算法

種々濃度の苦味溶液に対するリック数比を濃度に対してプロットし、4パラメータS字曲線に近似し、EC50値を算出した。甘味やうま味を足すことで苦味感が低減されれば、近似曲線は、苦味濃度濃い側へシフトする。甘味・うま味を混和した苦味溶液の近似式から得られるEC50値を苦味物質単独溶液からのEC50値で除したものを、苦味感低減率とした。2倍濃い苦味溶液であっても同じリック数比を示す場合は、低減率は2倍と算出される。

### (5) 麻薬拮抗剤の投与方法

甘味による苦味感低減のメカニズム解析するために、脳内報酬系に作用する薬剤を用いた。12時間以上絶水させたマウスを2群に分け、片方にナルトレキソンあるいはハロペリドールを生理食塩液に溶かしたものを腹腔内投与し、他方に生理食塩液を腹腔内投与した。約5時間後に苦味リック試験を行い、甘味を添加した際の苦味感低減率に差があるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 胎児期に苦味を経験したマウスの苦味嗜好解析

妊娠マウスを用意し、胎児を包む羊膜内に苦味物質（安息香酸デナトニウムあるいはシクロヘキシミド）を注入した。仔マウスが安定して生まれてくる濃度を検討し、安息香酸デナトニウム注入は0.05mMを100 $\mu$ L/胎児、シクロヘキシミド注入は0.02mg/胎児以下と決定した。それより高いドーズの場合は、出生率が半分程度にまで落ちていた。出産4日前、あるいは1週間前に羊水内へ苦味物質を注入した仔マウスと、対照マウスに準備し、安息香酸デナトニウム注入実験では1mM安息香酸デナトニウム溶液と水との48時間二瓶選択実験を、シクロヘキシミド注入実験では0.0001mg/mLシクロヘキシミド溶液と水との48時間二瓶選択実験を行った。その結果、安息香酸デナトニウムに対するPreference値は注入群で $0.20 \pm 0.06$  (n=10)、対照群で $0.20 \pm 0.04$  (n=20)であり、シクロヘキシミドに対するPreference値は注入群で $0.35 \pm 0.02$  (n=78)、対照群で $0.47 \pm 0.03$  (n=33)であり、いずれの苦味に関しても羊水への注入によるPreference値の上昇は認められなかった（図1）。値は平均±標準誤差である。

### (2) 乳児期及び離乳期に苦味を経験したマウスの苦味嗜好解析

妊娠マウスを用意し、乳児期から離乳期において、飲料水に安息香酸デナトニウムを加え、苦味経験させたマウスについても苦味溶液と水との二瓶選択試験を行ったところ、

Preference 値は  $0.20 \pm 0.04$  ( $n=18$ ) となり、前述の羊水への注入群、対照群と差のない結果が得られた (図 1)。これらのことから、苦味経験による苦味寛容は起きないものと考えられる。苦味単独と水の比較ではなく、甘味やうま味などと共存させた場合についても検討するべきかもしれない。値は平均±標準誤差である。

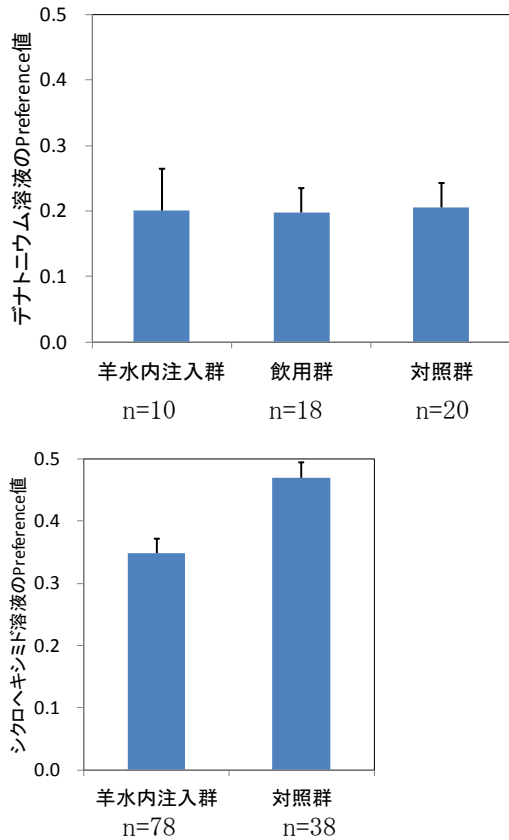


図 1. 胎児期、乳幼児期に苦味を経験したマウスの苦味嗜好性

### (3) 甘味物質を加えた場合の苦味感低減効果の定量化

苦味単独では、種々の経験をしていても苦味に寛容になる傾向が全く認められないため、苦味に他の呈味物質を混ぜて、苦味感を減らす方法を検討した。本試験では、リック試験法を用いて、苦味濃度に対する苦味感=嫌悪感を数値化し、呈味物質による嫌悪感低減効果を定量化した。その結果、キニーネ塩酸塩溶液に 2%スクロースを加えた場合の苦味感低減率は 2.3 倍、4%スクロースを加えた場合の苦味感低減率は 2.6 倍、0.025%サッカリン Na を加えた場合の苦味感低減率は 2.7 倍、0.05%サッカリン Na を加えた場合の苦味感低減率は 2.9 倍、0.02%スクラロースを加えた場合の苦味感低減率は 1.8 倍であった。一部を抜粋して図 2 に示す。また、安息香酸デナトニウム溶液に 4%スクロースを加えた場合の苦

味感低減率は 1.4 倍、0.05%サッカリン Na を加えた場合の苦味感低減はほとんど認められなかった。一部を抜粋して図 3 に示す。値は平均±標準誤差である。

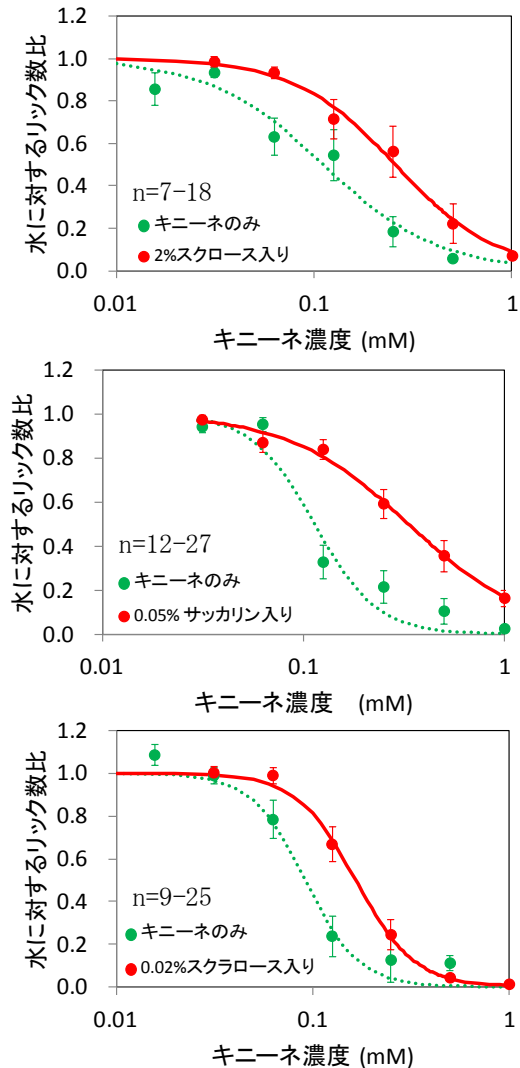


図 2. キニーネ塩酸塩溶液に甘味物質を加えた際のリック数比変化

### (4) うま味物質を加えた場合の苦味感低減効果の定量化

うま味物質であるグルタミン酸を苦味溶液に加えた場合の苦味感低減を調べた。その結果、キニーネ塩酸塩溶液に 500 mM グルタミン酸 Na を加えた場合の苦味感低減率は 2.5 倍、安息香酸デナトニウムに 500 mM グルタミン酸 Na を加えた場合の苦味感低減率は 3.1 倍であった (図 4)。甘味物質と異なり、安息香酸デナトニウムに対する効果の方が大きく出ることがわかった。本研究手法は、国内外において、苦味感の低減効果を数値化した研究はなく、様々な味の組み合わせ評価に応用できる手法である。実験動物とヒトとの間で、苦味・甘味の感じ方に違いがあるため、

動物実験で得られた数値を直接ヒトの研究に外挿することはできないが、物質それぞれの係数で補正することで、ヒト感覚への外挿も可能であろうと考えられる。値は平均±標準誤差である。

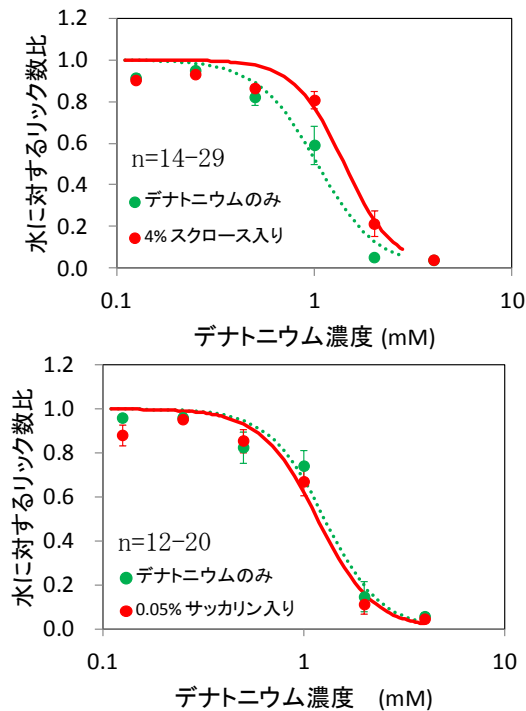


図3. 安息香酸デナトニウム溶液に甘味物質を加えた際のリック数比変化

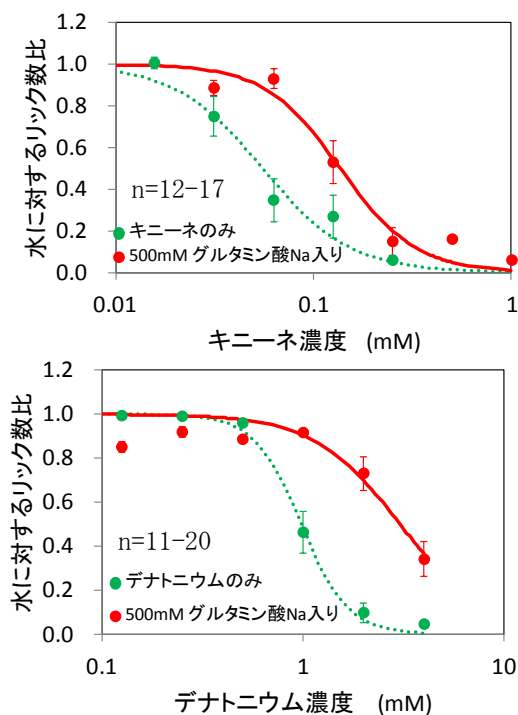


図4. 苦味溶液にうま味物質を加えた際のリック数比変化

(5) 甘味による苦味感低減のメカニズム解析  
従来の様々な報告からは、甘味とが苦味受容体に作用して苦味認識を拮抗阻害しているとは考えにくいので、甘味添加による苦味感低減作用は脳内処理に起因するのではないかと考えた。甘味は脳内報酬系を刺激し、ドーパミンやセロトニン、脳内オピオイドを分泌させることが知られている。これによる快感と苦味による嫌悪感のバランスが傾くことで、苦味感=嫌悪感が低減しているのではないかと推測した。そこで、甘味による快感を抑えるべく、ナルトレキソン（オピオイド受容体拮抗剤）、ハロペリドール（ドーパミン受容体拮抗剤）を前投与した場合の苦味低減作用変化を検討した。苦味単独でのリックカーブに影響を及ぼさない投与適量を調べ、ナルトレキソン0.02 mg/匹、ハロペリドール0.01 mg/匹を腹腔内投与することに決定した。これらを投与後に安息香酸デナトニウム溶液に4%スクロースを加えた溶液に対するリック数変化を調べたところ、いずれの場合においても、投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった（図5）。水への欲求性に影響を及ぼすと苦味感低減効果を解析できないと考えて濃度を決定したが、12時間以上絶水したマウスにおいては、水への欲求性が甘味へ欲求性よりも大きかったことが考えられる。本メカニズムを詳細に解明するためには、さらなる実験設計が必要であると考えられる。値は平均±標準誤差である。

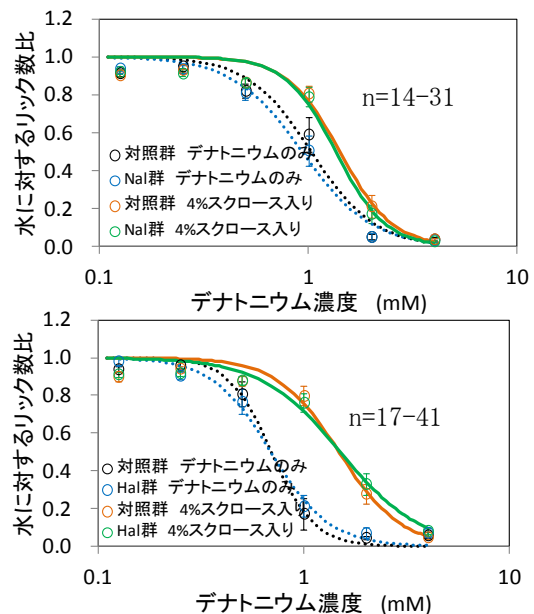


図5. 苦味感低減における麻薬拮抗剤の影響  
Nal 群はナルトレキソン投与群、Hal 群はハロペリドール投与群

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① 河合崇行、日下部裕子、実験動物を利用した甘味・うま味の苦味感低減効果の定量的解析、日本味と匂学会誌、査読有、19巻、2012、375-378
- ② 河合崇行、日下部裕子、苦味マスキング効果の定量的解析、食品総合研究所研究報告、査読有、76巻、2012、9-16

[学会発表] (計5件)

- ① 河合崇行、日下部裕子、動物行動学に基づいたうま味の相乗効果評価、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、仙台
- ② 河合崇行、日下部裕子、実験動物を利用した甘味・うま味の苦味感低減効果の定量的解析、日本味と匂学会第 46 回大会、2012 年 10 月 4 日、大阪
- ③ Takayuki Kawai, Yoko Kusakabe, Quantitative analysis for the hedonic effects of sweet tastants in the bitter masking, XVI International Symposium on Olfaction and Taste, 2012 年 6 月 25 日、ストックホルム (スウェーデン)
- ④ Takayuki kawai, Yuko Kusakabe, Quantitative analysis for the masking effects to bitter taste, Association for Chemoreception Sciences 2012 Annual Meeting, 2012 年 4 月 28 日、ハンチントン (アメリカ)
- ⑤ 河合崇行、日下部裕子動物行動学に基づいた間接的苦味マスキング効果の定量的解析、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河合 崇行 (KAWAI TAKAYUKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品機能研究領域・主任研究員

研究者番号：50425550