

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 5 月 20 日現在

機関番号：33703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890224

研究課題名（和文） 微量栄養素摂取行動制御機構の行動学的及び神経科学的解析

研究課題名（英文） Behavioral and neural analysis of the control mechanism for ingesting micronutrients

研究代表者

安尾 敏明 (YASUO TOSHIKI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：30608469

研究成果の概要（和文）：

ビタミンC (VC) の検知摂取機序を明らかにするため、VC 合成能欠如ラットを用いて、VC 欠乏時の VC に対する嗜好性を調べるとともに、味神経応答解析を行った。その結果は、以下の通りである。ラットは味覚として VC を感知し、健康維持に必要な最低量を摂取した。VC 欠乏ラットでは、蒸留水の摂取量を減少させることで、VC に対する嗜好性を増加させ、尿量を減少させた。また、欠乏ラットでは一部の味質に対する神経応答が変化した。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the behavioral mechanism for ingesting vitamin C (VC), we conducted the behavioral and neural experiments in the rats, which were unable to synthesize VC. Results follows; Rats could recognize VC as a tastant and consume the amount beyond the minimum necessary for health. When they were deprived VC, the preferences for VC were increased and their urine outputs were decreased. These results may depend on the decrease of consumption of distilled water. And the rats deprived VC changed their taste nerve responses to some basic tastes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：

科研費の分科・細目：7402

キーワード：味覚、微量栄養素、ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

生体の健康を維持するうえで必要不可欠であるビタミンやミネラルなどの必須微量栄養素が体内で不足したとき、どのようなメカニズムでその不足した栄養素を摂取して

いるのかわかるとは未だ明らかにされていない。

三大栄養素と無機塩類が十分に与えられても動物は成長と健康を保つことができない。ビタミンもまた健康維持には必要である。

ビタミンは、周知のとおり、体の主要な構成成分ではなく、エネルギー源ともならないが、きわめて微量で動物の正常な生理機能を保持する不可欠の有機化合物で、不足すると特有の欠乏症を起こす。ビタミンは食物から取り入れなければならない大切な栄養素である。しかしながら、その選択メカニズムについては少数の報告があるのみである。例えば、Berbard and Halpern (1968)の報告によると、ビタミンA (VA) 欠乏ラットでは、塩味(塩化ナトリウム)の嗜好性及び苦味(キニーネ溶液)の忌避性が低下すること、甘味に対する嗜好性が減少すること(Reifen *et al.*, 1998)が報告され、VAが正常な味覚を維持するうえで必要であることが示されている。また、ビタミンEは味細胞の成長や発達に関与すること(Henkin and Hoetker, 2003)も推察されている。また、ビタミンB (VB)₁欠乏ラットでは、VB₁を含む食餌を好むこと(e.g. Rodgers and Rozin, 1966, Rozin, 1965)、VB₁(e.g. Appledorf and Tannenbaum, 1967)、塩化ナトリウムの嗜好性が正常ラットに比べて増大すること(Chan and Cote, 1979; Chan and Kare, 1979)が報告されている。さらに、短時間の味覚検査の結果、VB₆欠乏ラットは塩化ナトリウム、スクロース及び硫酸キニーネ溶液を多く飲み、この行動は味覚効果によること(Greeley and Gniecko, 1986)が示され、ビタミン欠乏時にある特定の味質に対する嗜好性が変化している可能性が推察されているのみである。脂溶性ビタミンは肝臓に蓄えられ、長期間保存されるのに対して、水溶性ビタミンは一度に多く摂取しても尿中に失われやすく、体内に長期保存することができない。そのため、水溶性ビタミンが不足しがちになりやすく、頻繁に体内に摂取する必要があると考えられている。しかしながら、水溶性ビタミンであり、酸化防止剤として、さまざまな食品や清涼飲料水に添加されているビタミンC(以下、VC)の味覚感知機構及び摂取行動制御機構が生体内に存在するかどうかについての報告はまだない。

2. 研究の目的

ビタミン、ミネラルなどの微量栄養素は三大栄養素と同様に生体にとって必要不可欠である。ところが、これらの必要量は微量であるため、どのように動物はこれらの栄養素を選択しているのかどうかその詳細は不明である。本研究では、この機序を明らかにするため、各種ビタミンやミネラルを欠乏させた動物を作成し、味溶液あるいは各種微量栄養素に対するこれらの動物の摂取行動を行動学的に観察することによって、その弁別システムを明らかにすることを目的としてい

る。

3. 研究の方法

実験動物として Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) /ShiJcl-*od/od* 6週齢雄ラット(以下、*od/od*)、とその野生型である ODS/ShiJcl-+/+ 6週齢雄ラット(以下、+/+)、を用いた。全ての動物は個別の代謝ケージ(TECNIPLAST社製、3700M071)にて飼育した。実験開始までは、*od/od*には2g/l VC水溶液を自由摂取させて飼育した。*od/od*及び+/+ともにVC欠乏飼料(AIN-93G 固形、日本クレア社製)を自由摂取させた。

(1) 行動応答の解析

①実験スケジュール: 以下のスケジュールで実験を行うとともに、毎日の体重、摂餌量及び飲水量を測定した。

1-2日目: *od/od*及び+/+に蒸留水のみを二瓶で呈示した。

3-4日目: 2g/l VC水溶液と蒸留水を一瓶ずつ計二瓶で呈示した。

5-29日目: 25日間蒸留水のみを呈示した。

(+/+は体内でVCを合成するが、*od/od*はVC欠乏状態に移行する。)

30-35日目: 2g/l VC水溶液と蒸留水を一瓶ずつ計二瓶で呈示した。

②測定及び解析方法: 48時間二瓶法(2g/l VC水溶液と蒸留水)により、VC水溶液に対する嗜好性を調べた。データは、嗜好率(=VC水溶液摂取量÷総摂取量×100)として処理した。途中、呈示位置による嗜好を防ぐため24時間毎に左右の瓶の位置を入れ替えた。

(2) 神経応答記録

*od/od*のうち2g/l VC水溶液を自由摂取させたラット(VC群)と、蒸留水のみを自由摂取させ14-35日おいたラット(DW群)それぞれをネンブター麻酔下で、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(時定数0.3秒)を記録した。舌に約0.1ml/秒の流速で0.01mM-1000mM VC水溶液、10mM-1000mM スクロース溶液、3mM-1000mM 塩化ナトリウム水溶液、1mM-20mM 塩酸キニーネ水溶液、0.3mM-10mM 塩酸、10mM-1000mM グルタミン酸カリウム水溶液を約30秒間刺激し、洗浄には蒸留水を用いた。

4. 研究成果

(1) 行動応答の解析

実験 1、2 日目及び 3、4 日目 (図 1A) では、*od/od* 及び *+/+* 間において、すべての計測項目に有意な差はなかった ($p > 0.05$ 、表 1 3-4 日目)。

次に、3-4 日目と 30-31 日目での *od/od* 及び *+/+* の各溶液の摂取量を比較した (図 1A*)。その結果、*od/od* (表 2 *od/od*) では、3-4 日目に比べて 30-31 日目の蒸留水摂取量は有意に減少していた ($p < 0.05$) が、VC 水溶液摂取量及び総摂取量には有意な差は見られなかった ($p > 0.05$)。一方、*+/+* (表 2 *+/+*) では、VC 水溶液摂取量及び総摂取量が 3-4 日目より 30-31 日目の方が有意に増加した

(VC 水溶液摂取量: $p < 0.05$ 、総摂取量: $p < 0.001$)。また、30-31 日目における *od/od* と *+/+* の各摂取量を比較した場合 (図 1A*、表 1 30-31 日目)、VC 水溶液摂取量には有意な差は認められなかった ($p > 0.05$) が、蒸留水摂取量及び総摂取量はいずれも *od/od* が *+/+* より有意に少なかった ($p < 0.001$)。*od/od* ラットの VC 水溶液に対する嗜好率は VC 欠乏前 (図 1B 3-4 日目) に比べ欠乏時 (図 1B 30-31 日目) では有意に増加していた ($p < 0.05$) が、*+/+* では、VC 水溶液に対する嗜好率に有意な変化は見られなかった ($p > 0.05$)。*od/od* ラットでは、蒸留水を呈示してから約 2 週間で体重の減少 (図 1C) が見られ、食餌量の減少 (図 1D) も見られた。蒸留水と 2g/l VC 水溶液の二瓶を呈示した (30-31 日目) 後、その回復が見られた。

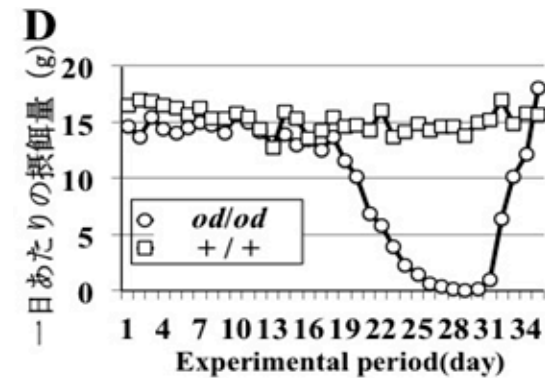
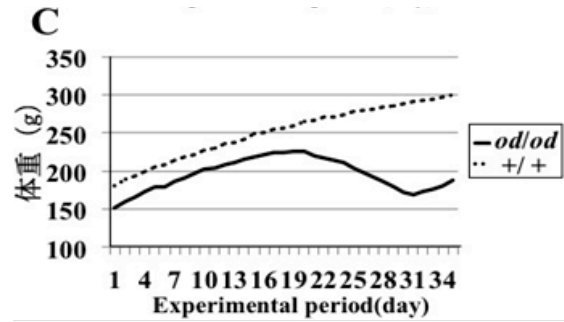
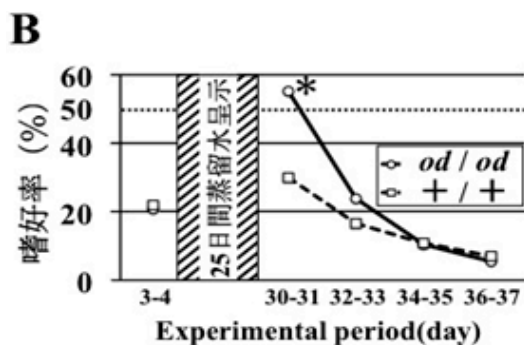
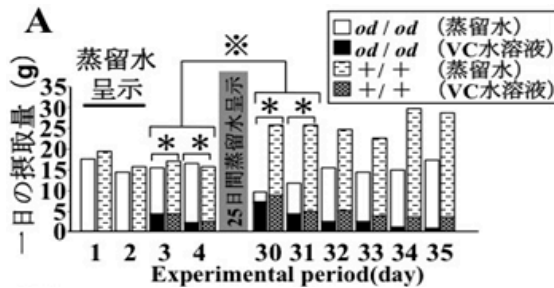


図 1 A: ODS/ShiJcl-*od/od* ラット (*od/od*) 及び ODS/ShiJcl-*+/+* ラット (*+/+*) の一日あたりの蒸留水摂取量、ビタミン C (VC) 水溶液摂取量及び総摂取量。*部分の統計処理の結果は表 1 に示す。*部分の統計処理の結果は表 2 に示す。B: *od/od* 及び *+/+* における「25 日間蒸留水呈示期間」前後 (3-4 日目と 30-31 日目) での VC 水溶液に対する嗜好性の変化。*: $p < 0.05$ 。C: *od/od* 及び *+/+* の体重の変化。D: *od/od* 及び *+/+* の摂餌量の変化。

(日本味と匂学会誌 19 巻、379-382 より引用)

	VC水溶液	蒸留水	総摂取量
3-4日目	$p > 0.05$	$p > 0.05$	$p > 0.05$
30-31日目	$p > 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.001$

表 1 「25 日間蒸留水呈示期間」前後 (3-4 日目と 30-31 日目) における ODS/ShiJcl-*od/od* ラットと ODS/ShiJcl-*+/+* ラット間での各溶液摂取量の比較。

(日本味と匂学会誌 19 巻、379-382 より引用)

	VC水溶液	蒸留水	総摂取量
<i>od/od</i>	$p>0.05$	$p<0.05$	$p>0.05$
+/+	$p<0.05$	$p>0.05$	$p<0.001$

表 2 ODS/ShiJcl-*od/od* ラット及び ODS/ShiJcl-+/+ラットの「25 日間蒸留水呈示期間」前後 (3-4 日目と 30-31 日目) での各溶液摂取量の比較。

(日本味と匂学会誌 19 巻, 379-382 より引用)

次に、欠乏前後の様々な濃度 (0.1mM、0.3mM、1mM、3mM、10mM、30mM 及び 100mM) の VC 水溶液に対する嗜好性を、同様の実験方法にて計測した。その結果、1mM 群では、欠乏後の嗜好性は VC 摂取に伴い徐々に増加していくが、3mM 群では、欠乏後数日まで増加したが、その後、欠乏前と近い値まで徐々に減少していった。10mM、30mM 及び 100mM 群では、いずれも欠乏前の嗜好性は低いが、欠乏後は増加し、VC 摂取に伴い、減少していった。0.1mM 及び 0.3mM 群では、欠乏後、VC 水溶液を摂取するが、大部分のラットが死亡した。また、1 日あたりの VC 水溶液摂取量は、1 及び 3mM 群では、欠乏時徐々に増加していくが、10mM 以上の濃度群では減少する結果になった。さらに、代謝ケージを用いた実験では、欠乏状態に陥ると、飲水量、体重、摂餌量及び尿量が減少する結果となった。1mM 以上の濃度群のラットでは、VC 欠乏状態から 34 日間 VC 水と蒸留水を呈示し続けていたが、死亡することなく生存し、体重や尿量も回復した。

以上の結果から、VC 欠乏前では 3mM 以下の濃度ではラットは忌避せず、10mM 以上の濃度の場合は忌避し、VC 欠乏状態に陥ると、3mM 以下の濃度では VC に対する嗜好性は大きくなるが、10mM 以上の濃度においても、その嗜好性は大きくなる、つまり、忌避から嗜好へと変化することが示唆された。また、ラットは VC を必要量選択して摂取し、生存することができる可能性が考えられた。

(2) 神経応答記録

od/od の鼓索神経の神経応答解析の結果、VC 欠乏前後いずれにおいても VC 水溶液に対する応答が観察され、VC 濃度が 0.3~1mM 以上で鼓索神経応答を示すことが明らかとなった。

また、VC 以外の水溶性ビタミンが欠乏した場合、ある特定の味質に対する嗜好性が変化するという報告 (e.g. Bernard and Halpern, 1968, Reifen *et al.*, 1998, Henkin

and Hoetker, 2003, Greeley and Gniecko, 1986) もあることから、VC 欠乏時においてもその変化がみられることが予測された。そこで、VC 欠乏時に、VC 水溶液及び 5 基本味に対する応答は変化するのかどうか明らかにするために、欠乏状態にある *od/od* とない *od/od* 及び+/+を用いて鼓索神経応答解析を行った。その結果、VC 欠乏状態にある *od/od* ラットでは、VC、塩酸及び塩化ナトリウムに対する応答が VC 欠乏状態にないラットに比べ、有意に減少していた。

以上の結果から、ラットは味覚として VC を感知し、生きていくのに必要な量を摂取しているが、VC 欠乏状態に陥ると、末梢での一部の味覚受容機構に変化を起し、蒸留水摂取量及び尿量を減少させ、VC に対する嗜好性を増加させ、VC の摂取行動を引き起こすことが示唆された。また、ラットの VC 水溶液に対する検知閾値は 0.3mM~1mM にある可能性が示唆された。

(3) 考察

本研究では、VC の検知摂取機序を明らかにするため、VC 合成能欠如ラット (*od/od*) の VC 欠乏時における VC 水溶液に対する嗜好性を、48 時間二瓶法により検討し、VC 水溶液及び 5 基本味に対する鼓索神経応答を記録した。その結果、VC が欠乏すると *od/od* の VC 水溶液に対する嗜好率は+/+のものより有意に大きくなった (図 1B) が、その原因は、VC 水溶液摂取量の増加によるものではなく、*od/od* の蒸留水摂取量が+/+のものより有意に少なくなること (図 1A*、表 1 30-31 日目) に依存していることが示唆された。

過去に、ビタミン B (VB)₁ 欠乏ラットでは、VB₁ 溶液に対する嗜好性を変化させることが報告されており、本研究でも同様の結果になった。また、VC 欠乏状態の *od/od* は、欠乏前と比べ、蒸留水摂取量が減少していたこと (図 1A*、表 2 *od/od*) や、VC 欠乏に陥った *od/od* の尿量が減少していたことから、VC が欠乏した動物は、水分摂取を控え、摂取した微量栄養素を尿から排泄させないようにしている可能性が考えられた。一方、+/+では、30-31 日目の VC 水溶液摂取量と総摂取量は 3-4 日目と比べて有意に増加していた (図 1A*、表 2 +/+) が、これは単純に成長に伴ったものであると推察された。

また、鼓索神経応答解析において、Hellekant ら (Hellekant *et al.*, 2010) は、Holstein bull calves の単一鼓索神経応答解析の結果、H-ベスト線維において 40mM VC 水溶液の応答が起きることを報告しており、本研究で用いたラットも VC 水溶液を酸味として感知しているものと推察される。本研究

では、酸味に対する鼓索神経応答を解析するために、塩酸を用い、VC 欠乏時に減少する傾向があることを示したが、VC は、周知の通り、L-アスコルビン酸という有機酸であるため、クエン酸や酢酸等の他の有機酸に対する応答にも変化が起きている可能性も考えられ、今後同様の実験手法を用いて、研究を進めていきたい。

ラットの肝臓における一日当たりの生合成量は 150mg/kg 体重/日であるが、2g/l の濃度の VC 水溶液を自由摂取させていると、計算上、その量を満たしているが、0.3mM 以下の濃度では、満たさない。そのため、これらの濃度群のラットは死亡する結果となったと推察できる。また、この濃度は、神経応答解析の検知閾値とほぼ一致している。これらの結果から、生体は摂取しても体内に必要な量を摂取できないような低濃度の微量栄養含有溶液に対しては、味覚として感知しないが、必要量を満たす濃度の微量栄養含有溶液に対しては味覚として感知し、当該栄養素の必要量を摂取している可能性が考えられた。

また、VC 欠乏時に中枢レベルでの変化が起き、VC に対する嗜好性が変化している可能性も考えられる。ラットの味覚投射部位である結合腕傍核では、嗜好性のある味質の入力核と、そうでない味質の入力核が、異なっていることが知られている。そこで、VC が欠乏していない状態では忌避される高濃度の VC 溶液を摂取した場合の結合腕傍核での反応核と、これらを欠乏させ、行動的にも嫌悪から嗜好に変化させた状態で、それらの反応核に変化が認められるか否かを、FOS 蛋白を指標とした免疫組織化学的実験を行って、VC 欠乏時に中枢レベルでの変化が起きているかどうかを今後明らかにしていきたい。

さらに、代謝ケージを用いた実験結果から、VC 欠乏状態に陥ると尿量が減少していたことから、VC 欠乏や VC に対する嗜好性の変化にバソプレシン等のホルモンの関与が考えられたため、VC 欠乏時の血中及び脳脊髄液等のホルモン濃度を測定する実験等で今後、微量栄養素の摂取機構に内分泌系が関与しているかどうかを明らかにしていきたい。

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 1 件)

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及び鼓索神経応答、日本味と匂学会誌、査読有、19 巻、2012、379-382

[学会発表] (計 3 件)

①安尾 敏明、裕 哲崇、L-グルノラクトンオキシダーゼ欠損ラットにおけるビタミン C 水溶液の嗜好性、第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2012 年 09 月 14 日～16 日、奥羽大学

②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 水溶液に対する嗜好性、2012 年 10 月 3 日～5 日、日本味と匂学会 第 46 回大会

③安尾 敏明、裕 哲崇、ビタミン C 欠乏ラットのビタミン C に対する嗜好、第 90 回日本生理学会大会、2013 年 03 月 27 日～29 日、タワーホール船堀
[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安尾 敏明 (YASUO TOSHIAKI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：30608469

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：