

塩味抑制物質アミロライドの NaCl 感受性に及ぼす影響

Effects of Salty Taste Inhibitory Substance, Amiloride,
on Sodium Chloride Sensitivities

小林三智子¹⁾²⁾
Michiko KOBAYASHI
岡田 幸雄²⁾
Yukio OKADA

田中 茂¹⁾
Shigeru TANAKA
戸田 一雄²⁾
Kazuo TODA

ABSTRACT

Using the whole mouth gustatory test ascending series and the triangle test, the effects of amiloride on the gustatory sensitivities to three types of salty taste were investigated in young women. In addition, the effects of amiloride on gustatory sensitivities to five basic taste stimuli were investigated. When the tongue was pretreated with 20 ml of 10 μ M amiloride, the detection thresholds of salty tastes of sodium chloride and sodium acetate and sour taste of tartaric acid were increased, decreasing the gustatory sensitivities, which resulted in inhibition of the responses. However, changes in the detection thresholds of sweet taste of sucrose, bitter taste of quinine sulfate, umami taste of monosodium glutamate, and salty taste of lithium chloride were small, exhibiting no inhibitory effect of amiloride. These results suggest the possibility that amiloride inhibits saltiness of sodium salts by blocking the sodium ion channel in humans.

1) 十文字学園女子大学人間生活学部食物栄養学科

2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

1) Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University

2) Integrative Sensory Physiology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

ランニングタイトル: NaCl 感受性に及ぼすアミロライドの影響

キーワード: 味覚感受性、アミロライド、全口腔法、プロビット分析、NaCl 感受性、検知閾値

Key words: gustatory sensitivity, amiloride, whole mouth gustatory test, probit analysis, sodium chloride sensitivity, detection threshold

緒 言

利尿剤として開発されたアミロライド (amiloride) は、主に高血圧の治療薬として用いられる。降圧剤の種類ではカリウム保持性の分類に含まれ、尿細管 Na^+ チャネル阻害薬であるため、利尿を促し、血圧を下げる作用をすることになる。

塩辛い (salty) という感覚は主にナトリウムイオン (Na^+) によって引き起こされる。ナトリウムイオンが味覚細胞に分布するナトリウムチャネルを通過して細胞内に流入すると脱分極が起こり、さらに電位依存性のナトリウムやカリウムのイオンチャネルが開いてアクションポテンシャルが発生し、塩辛いという感覚が伝達される。アミロライドは上皮性ナトリウムチャネルをブロックするので舌に作用させると塩辛さを感じなくなる。

アミロライドと味覚の関係を最初に報告したのは、Heck らである¹⁾。その後、多くの研究が重ねられ、種々の哺乳動物で舌をアミロライドで処理した後、食塩と塩化リチウムの味神経応答は抑制されるが、他の塩の応答は抑制されないことが報告されている²⁾³⁾。これらのメカニズムに関しては、Lindemann の総説⁴⁾に詳しくまとめられている。

ヒトの官能評価による Schiffmann⁵⁾らの研究では、アミロライドが塩味応答と甘味応答を抑制すると報告している。しかし、その後の研究では否定的な結果も報告されており、食塩応答にアミロライド感受性 Na^+ の関与する程度は約20%であるとの報告もある⁶⁾。さらに、アミロライドによる舌の前処理あるいはアミロライド添加 NaCl 水溶液を用いた全口腔法による官能評価の結果、ヒトの味覚感受性の応答は抑制されなかったと報告されている⁷⁾。しかし、いずれにしてもヒトでは、アミロライドにより多かれ少なかれ塩味の抑制や味質の変化が生じる⁸⁾。

本研究では、ヒトにおける NaCl 感受性に及ぼすアミロライドの影響を、官能評価の方法を用いて検知閾値の点から検討した。あわせて、5 基本味の味覚感受性に対するアミロライドの影響を同様の方法で検討した。

方 法

1. 対 象

19～21歳の健康な女性30名を対象とした。本研究の実施にあたってはヘルシンキ宣言の精神にのっとり、この研究の目的や意義を文書で提示するとともに、十分に口頭で説明し、同意書に署名する形でインフォームド・コンセントを得た。さらに、データの取り扱いには十分注意し、個人のプライバシーの保護に留意した。対象者は全員非喫煙者であり、測定前には口腔内にう歯や口内炎による痛みのないこと、食後2時間以上経過していることを確認した。味覚感度テスト⁹⁾を行い、合格基準に達した者をパネルとして選定した。

2. 試 料

測定に用いた5基本味の呈味物質およびその水溶液濃度を表1に示した。5基本味は甘味(スクロース)、塩味(塩化ナトリウム)、酸味(酒石酸)、苦味(硫酸キニーネ)およびうま味(グルタミン酸ナトリウム; MSG)である。試薬はいずれも和光純薬(特級)を用い、水の純

度も重要なファクターとなる可能性があるので、超蒸留水を使用した（Millipore 社、Direct-Q）。測定に用いた 5 基本味溶液の濃度は、予備実験で大多数のパネルが認知できる濃度を予め決定し、その前後の 5 段階濃度について測定を行なった。濃度の間隔は、等倍希釈である。アミロライドは Sigma 社のもの、対照として用いたカフェイン（無水）、酢酸ナトリウム、塩化リチウムは和光純薬（特級）を用いた。カフェイン水溶液の濃度は 2.50mM、酢酸ナトリウムおよび塩化リチウムの水溶液濃度は、塩化ナトリウム水溶液と同じである。

表 1 5 基本味の呈味物質と水溶液濃度

呈味の種類	呈味物質	水溶液濃度 (mM)				
甘味	スクロース	5.00	10.00	20.00	40.00	80.00
塩味	塩化ナトリウム	0.32	0.63	1.25	2.50	5.00
酸味	酒石酸	3.91×10^{-2}	7.81×10^{-2}	1.56×10^{-1}	3.13×10^{-1}	6.25×10^{-1}
苦味	硫酸キニーネ	3.81×10^{-5}	7.63×10^{-5}	1.53×10^{-4}	3.05×10^{-4}	6.10×10^{-4}
うま味	グルタミン酸ナトリウム	1.25	2.50	5.00	10.00	20.00

3. 測定方法

1) 実験 1：閾値の測定は、全口腔法、上昇系列、3 点識別法を用いた。図 1 に実験 1 と実験 2 の概略を示した。実験 1 では、まずコントロール（超蒸留水）を 20ml、10 秒間口に含み、吐き出した後、検査に移る。検査溶液は、5 基本味のいずれかの溶液 1 つに対して、超蒸留水 2 個のグラスを加えた計 3 個を味わい、味の異なるものを 1 個選択する 3 点識別法である。パネルには味があるものは 3 個の試料のうち 1 個であること、1 系列の中では検体の種類は同じであることを知らせた。検査溶液は 10ml を 10 秒間口に含み、吐き出させた。初めと、試料の組の間では、十分に超蒸留水で口を濯ぐように指示した。その後、超蒸留水の代わりに 10.00

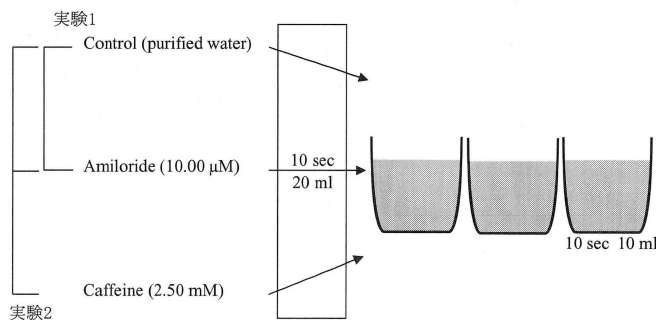


図 1 実験 1 および実験 2 の検査方法

最初に超蒸留水 20 ml を 10 秒間口腔内に含み、吐き出す。その後、3 個のグラスの評価をし、味溶液 1 個を選択する。次に、超蒸留水の代わりに 10.00 μ M アミロライド溶液についても、同様の測定を行う。実験 2 では、さらにカフェインについても同様の測定を行う。

μM アミロライド溶液20mlを10秒間口に含み、吐き出し、同様に 3 個の試料の中から味の異なるものを選ばせた。3 点識別法の検定のための表¹⁰⁾を用い、有意差が出る値をその溶液の閾値とした。

測定はいずれも20～23℃の室内で行い、味溶液は恒温槽で管理し、室温と同じ温度でパネルに供した。

2) 実験 2：測定で使用したアミロライド水溶液は10.00 μM と非常に薄い濃度だが、苦味が若干感じられる。したがって、苦味の影響で閾値が高くなることも考えられるので、10.00 μM アミロライドと同程度の苦味となる2.50mMのカフェイン水溶液についても同様の検査を行った。実験 2 では、実験 1 と同様に、事前にコントロールである超蒸留水20mlを口に含み吐き出した後、検査溶液 3 個（試料溶液 1 個と超蒸留水 2 個の計 3 個）の中から、味溶液のグラスを選択する。次に、10.00 μM のアミロライド20mlで舌を刺激後、3 個の検査溶液の中から 1 個の味溶液を選択する。最後に、2.50mMカフェイン溶液刺激後、3 個の検査溶液から 1 個の味溶液を選択する 3 段階の検査となる。実験 1 と同様に、パネルは検査前と試料の組の間には、超蒸留水でよく口をゆすいだ。

3 点識別法では、パネルが味を識別できずにランダムに回答しても1/3の正解率が出てしまう。また、濃度の切り方によって、閾値は異なる濃度となる。したがって、実験 2 ではより正確な閾値を求めるために、統計解析ソフト SPSS12.0J (Regression Models) を用い、プロビット分析¹¹⁾¹²⁾¹³⁾により回答率の正解者の割合が2/3となる濃度を求め、その値を試料溶液の検知閾値とした¹⁴⁾。図 2 に、検知閾値の求め方を示した。

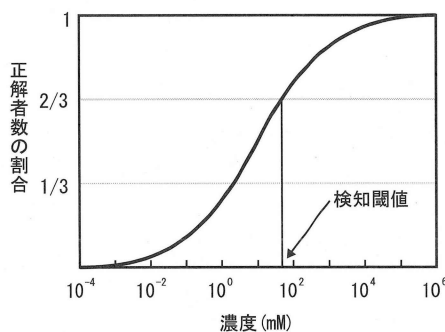


図 2 プロビット法による検知閾値の求め方

パネル全体の 2/3 が正解となる濃度を曲線より求め、その溶液の濃度を検知閾値とした。

結 果

1. 実験 1

1) 5 基本味の検知閾値

表 2 に、3 点識別法で求めた 5 基本味の検知閾値を示した。3 点識別法では、異なる味を 1 個選択するので、味質がわからなくても正解となる。したがって、ここで求めた閾値は検知閾値である。上段が溶液の濃度、下段が30名のパネルのうち正解の試料を選んだ人数である。3

点識別試験の検定では、15名以上、すなわちパネルの半数以上が正解であれば5%の有意差があることになり、有意差が出た濃度をその溶液の検知閾値とした。スクロース（甘味）20.00 mM、塩化ナトリウム（塩味）1.25mM、酒石酸（酸味） 1.56×10^{-1} mM、硫酸キニーネ（苦味） 1.53×10^{-4} mMおよびグルタミン酸ナトリウム（うま味）5.00mMであった。

表 2 5 基本味の検知閾値 (実験 1)

呈味物質	濃度 (mM)				
	正答数				
スクロース	80.00	40.00	20.00	10.00	5.00
	30***	29***	22***	9	6
塩化ナトリウム	5.00	2.50	1.25	0.63	0.32
	29***	20***	17**	14	9
酒石酸	6.25×10^{-1}	3.13×10^{-1}	1.56×10^{-1}	7.81×10^{-2}	3.91×10^{-2}
	30***	26***	21***	14	8
硫酸キニーネ	6.10×10^{-4}	3.05×10^{-4}	1.53×10^{-4}	7.63×10^{-5}	3.81×10^{-5}
	29***	17**	15*	12	6
グルタミン酸ナトリウム	20.00	10.00	5.00	2.50	1.25
	29***	22***	22***	10	7

n=30, * p<0.05, ** p<0.01, ***<0.001

2) アミロライド刺激後の閾値の変化

表3に、表2で示した5基本味の検知閾値が、アミロライド刺激後にどのように変化したかを示した。甘味、苦味およびうま味に関しては、刺激前後で値にまったく変化がなかった。一方、塩味ではアミロライド刺激後に1.25から2.50mMへと2倍の濃度に、酒石酸では 1.56×10^{-1} から 6.25×10^{-1} mMへと4倍の値になった。

表 3 アミロライド刺激後の5基本味の検知閾値の変化

呈味物質	(mM)	
	アミロライド刺激前	アミロライド刺激後
スクロース	20.00	20.00
塩化ナトリウム	1.25	2.50
酒石酸	1.56×10^{-1}	6.25×10^{-1}
硫酸キニーネ	1.53×10^{-4}	1.53×10^{-4}
グルタミン酸ナトリウム	5.00	5.00

2. 実験2

図3に、測定結果の中からプロビット分析後の塩化ナトリウム水溶液の結果を示す。舌の刺激を、コントロール（超蒸留水）（●：---）、アミロライド（■：——）、カフェイン（▲：

---) で示した。この正解者数の曲線から、正解者の割合が2/3になるときの濃度を、その溶液の検知閾値とした。その結果、プロビット分析で求めた塩味の検知閾値（超蒸留水）は2.23 mMであり、アミロライド刺激後は4.01mM、カフェイン刺激後は1.67mMと変化した。図3の分布曲線の傾斜から、これらの違いの統計的な有意性についても検討したが、有意差は認められなかった。

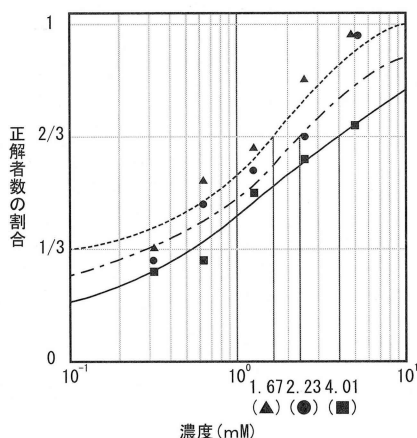


図3 アミロライド刺激後の塩化ナトリウム水溶液の検知閾値の変化

プロビット分析後の NaCl 水溶液の結果を示す。舌の刺激方法を、コントロール（超蒸留水）（●：---）、アミロライド（■：——）、カフェイン（▲：---）で示した。この正解者数の曲線から、正解者の割合が 2/3 になるときの濃度を、その溶液の検知閾値とした。

表4にプロビット法で求めた、アミロライド刺激後の5基本味および他の塩の検知閾値の変化を示した。ここで、酢酸ナトリウムと塩化リチウムを加えた理由は、実験1でNaClではアミロライド刺激後に閾値の上昇、すなわち味覚感受性の低下が見られたので、 Na^+ の影響と Cl^- の影響を検討するためである。

表4 アミロライド刺激後の5基本味および他の塩の検知閾値の変化
(プロビット法による)

呈味物質	超蒸留水	アミロライド	カフェイン
スクロース	35.06	30.08	31.22
塩化ナトリウム	2.23	4.01	1.67
酒石酸	1.42×10^{-1}	2.95×10^{-1}	1.08×10^{-1}
硫酸キニーネ	1.50×10^{-4}	1.46×10^{-4}	1.38×10^{-4}
グルタミン酸ナトリウム	6.33	7.18	7.04
酢酸ナトリウム	1.44	3.99	8.19×10^{-1}
塩化リチウム	6.06×10^{-1}	6.54×10^{-1}	6.26×10^{-1}

n=30

アミロライド刺激後、スクロース、硫酸キニーネおよびグルタミン酸ナトリウムでは、閾値の変化は認められなかった。一方、塩化ナトリウムと酒石酸の閾値ではカフェイン刺激後はコントロールよりも低い値となっているのに対して、アミロライド刺激後は2倍程度の濃度の上昇が認められた。しかし、塩化ナトリウムと同様に酒石酸においても、これらの値の有意差は認められなかった。酢酸ナトリウムでは、塩化ナトリウムと同様にアミロライド刺激後に検知閾値が上昇し、塩化リチウムではその影響は認められなかった。

考 察

1. 閾 値

表1に示した5基本味の検知閾値は、全口腔法¹⁵⁾¹⁶⁾で閾値を求めた他の文献値と比べると、Pfaffmannら¹⁷⁾、官能検査ハンドブック¹⁸⁾の値と大差はなかった。しかし、味溶液の閾値の測定法はスタンダードのものがなく、文献値もさまざまな手法を取り入れているため、それらの値には大きなバラつきがある。本研究と同様に3点識別法で閾値を求めている山口ら¹⁴⁾の結果と比較すると、本研究で求めた閾値は、甘味、酸味、うま味では高く、塩味および苦味は低かったが、ほぼ似た傾向が示された。

2. アミロライドの影響

先に述べたように、種々の上皮細胞膜でのNaイオンの輸送をブロックするアミロライドの作用で、Na塩に対する味覚神経応答が強く抑制されることが知られている。種々の哺乳動物で舌をアミロライドで処理した後、塩化ナトリウムと塩化リチウムの味神経応答は抑制されるが、他の塩では抑制されないことが報告されている²⁾³⁾が、本実験では、塩化ナトリウム、酢酸ナトリウムおよび酒石酸では閾値は上昇したが、他の味物質では影響を受けなかった。本実験で、Na塩と酸味が閾値の上昇、すなわち味覚感受性の低下が認められたことは、味情報の伝達の差が影響していると考えられる。5基本味は大まかに2種類に分類され、塩味と酸味はイオンチャネル型受容体である。他の3味はGたんぱく質共役型受容体である。この差が、アミロライドの作用の違いになったと考えられる。

アミロライドの舌の刺激方法には、アミロライドを味溶液に添加する方法⁷⁾も考えられるが、この方法ではアミロライドの苦味が本来の味を分からなくしてしまい、閾値の測定には不向きと思われる。

また、マウスを用いた実験で、舌咽神経の食塩応答はアミロライド非感受性、鼓索神経はアミロライド感受性であるという¹⁹⁾²⁰⁾。舌の部位によって支配する味神経が異なるので、ヒトの官能評価においても、部位別のアミロライドの影響を測定する必要がある。さらに、閾値の測定と併せて、閾上刺激で味の強さなどを比較した実験を加える必要があると考える。

要 約

全口腔法、上昇系列、3点識別法を用い、3種類の塩味におけるアミロライドの味覚感受性への影響を若年女性について検討した。あわせて、5基本味の感受性についてもアミロライドの影響を検討した。検知閾値は、プロビット法により、正解者が全体の2/3となる濃度を求め

た。

アミロライドで舌の前処理を行うと、塩化ナトリウムと酢酸ナトリウムの塩味、および酒石酸の酸味に対しては、閾値が上昇し味覚感受性の応答が低下した。しかし、スクロースの甘味、硫酸キニーネの苦味、グルタミン酸ナトリウムのうま味および塩化リチウムに対しては、閾値の変化は少なく、アミロライドの影響は認められなかった。

ヒトにおいて、アミロライドは塩化ナトリウムと酢酸ナトリウムのナトリウム塩と酸味に関しては、その感受性に抑制効果が認められる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は平成17年度十文字学園女子大学人間生活学部共同研究費の助成のもとに行われた。本研究を行うにあたり、有益なご助言を頂いた東京農業大学教授山口静子博士に感謝いたします。また、本研究におけるデータの収集にご協力いただいた学生の皆さんに感謝いたします。

文 献

- 1) Heck GL, Mierson S. and DeSimone JA., Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* 223: 403-405 (1984)
- 2) Nimomiya, Y. and Funakoshi, M.: Brain Res. Amiloride inhibition of responses of rat single chorda tympani fibers to chemical and electrical tongue stimulations, 451, 319-325 (1988)
- 3) Brand, J.G. Teeter, J.H. and Silver, W.L.: Brain Res., Inhibition by amiloride of chorda tympani responses evoked by monovalent salts. 334, 207-214 (1985)
- 4) Lindemann, B.: Taste reception. *Physiol. Reviews*, 97 (3) 719-766 (1996)
- 5) Schiffman, S.S., Lockhead, E. and Maes, F.W.: Amiloride reduces the taste intensity of Na⁺ and Li⁺ salts and sweeteners. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6136-6140 (1983)
- 6) Smith, D.V. and Ossbaard, C.A.: Amiloride suppression of the taste intensity of sodium chloride: Evidence from direct magnitude scaling. *Physiol. Behav.*, 57, 773-777 (1995)
- 7) Desor, J.A. and Finn, J.: Effects of amiloride on salt taste in humans. *Chem. Senses*, 14 (6), 793-803 (1989)
- 8) Ossebaard, C.A. and Smith, D.V.: Effect of amiloride on the taste of NaCl, Na-gluconate and LCl in humans: implications for Na⁺ receptor mechanisms. *Chem. Senses*, 20, 37-46 (1995)
- 9) 古川秀子：おいしさを測る－食品官能検査の実際－, pp.7-14 (2000) 幸書房、東京
- 10) 佐藤 信：統計的官能検査法, pp.316 (1998) 日科技連、東京
- 11) 丹後敏郎、山岡和枝、高木晴良：ロジスティック回帰分析, pp.14-18 (2004) 朝倉書店、東京
- 12) Gescheider, G.A. 著、宮岡徹監訳：心理物理学 方法・理論・応用 上巻, pp.37-41 (2002) 北大路書房、京都
- 13) 石村貞夫：SPSS による多変量データ解析の手順, pp.40-53 (2004) 東京図書、東京
- 14) 山口静子、菅野幸子、芳賀敏郎：うま味および4基本味の閾値に関する検討, *日本味と匂学会誌* 2 (3), 467-470 (1995)

- 15) O'Mahony M, Atassi-Sheldon S, Wong. J. *et al.*: Salt taste sensitivity and stimulus volume:sips and drops. Some implication for the Henkin taste test. *Perception* 13, 725-737 (1984)
- 16) Brosvic GM and McLaughlin WW: Quality specific differences in human taste detection thresholds as a function of stimulus volume. *Physiol Behav.*, 45, 15-20 (1989)
- 17) Pfaffmann, C. , Bartoshuk, L.M and McBurney, D.H. Taste psychophysics. In L.M. Beidler (ed.), *Handbook of sensory physiology. Vol.IV. Part 2. Taste.* pp.75-101 (1971) Springer-verlag.
- 18) 日科技連官能検査委員会編：新版 官能検査ハンドブック, pp.163, (2002) 日科技連, 東京
- 19) Formaker, B.K. and Hill, D.L.: Lack of amiloride sensitivity in SHR and WKY glossopharyngeal taste responses to NaCl. *Physiol. Behav.*, 50, 765-769 (1991)
- 20) Smith, D.V. And Frank, M.E.: Mechanism of taste transduction. Chapter 12. Sensory coding by peripheral taste fibers., pp.295-338 (1993) CRC Press