

総説特集 素材のおいしさを科学する - 5

素材のおいしさを測る—生物学的アプローチ—*

潮 秀樹**

(**東京海洋大学 海洋科学部)

味刺激に対する末梢の応答を解析する方法としていくつかの方法が採用されている。電気生理学的手法では、マウスやラットの鼓索神経や舌咽神経等を外科的に露出し、その電氣的活動を細胞外電極で取得する手法が良く用いられる。また、パッチクランプ法も味細胞の活動解析に用いられている。最末梢である味細胞の活動を観察できるため、単一細胞の味受容機構の解析に力を発揮する。一方で、多点の同時計測には困難が伴うため、検体数を増やすためには多大な労力を要する。カルシウムイメージングも味細胞の応答解析に良く用いられる。細胞は外部から情報を受容すると、それに応じて特有な反応を示し、細胞内に情報を伝達する。多くの細胞で Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして採用されており、味細胞も例外ではない。これまで味細胞のカルシウムイメージングでは単離味細胞やスライス試料を用いるのが一般的であった。そのため、味刺激を与えた際に味細胞の口腔側だけでなく基底側までもが同時に刺激される、味細胞の生存時間が短いなどの欠点が残っていた。我々はこの点を克服すべく、マウスの舌から剥離した舌上皮をそのままカルシウムイメージングに供する方法を確立した。本法を用いることによって多数の味細胞の応答を同時に長時間に渡って観察することが可能となった。

キーワード：味覚、味細胞、細胞内情報伝達、カルシウムイメージング、舌上皮

はじめに

素材の「おいしさ」は味覚だけではなく、視覚、嗅覚、触覚、聴覚など五感全てを用いて判定されるだけではなく、食べる側の生理的状态や習慣、文化、学習など様々な要素が関与する。そのため、素材のおいしさを総合的に判定する際の最終的な手段としてヒトによる官能検査に勝るものはないと言える。しかしながら、逆に脳の高次機能の影響を受けてしまうことやパネルに毒性のある阻害剤や賦活剤を投与できないことから、末梢における味受容機構そのものを解析するには困難が伴う。そこで、マウスなどの味覚神経応答や味細胞のパッチクランプなどの技術が用いられてきた。官能検査の詳細については他の総説等¹⁻⁴⁾を参考にして頂くとして、本稿ではこれらの実験動物や培養細胞を用いた技術を概説するとともに、我々がこれまで確立してきたマウス舌

上皮を用いたカルシウムイメージング法による味刺激応答解析法について述べたいと思う。

1. 行動学的手法

マウスやラットの嗜好性に基づいた行動学的な解析手法も用いられる。最も頻繁に用いられるのが2瓶選択法と呼ばれるもので、対照と試験液のどちらを多く摂取するかによって、実験動物の嗜好を判断するというものである。好ましいと判断した場合は多量に摂取し、好ましくないと判断した場合は摂取量が減少する。さらに、ある味質に対して嫌悪づけ学習をさせておくことにより、同等の味質として判定しているか否か、その味質に対する閾値などの情報を得ることもできる。ただし、試験液と対照との間に十分な量の差を得るためには数分から日単位の時間を要するため、一度試験に使用した個体は満

* Recieved May 20, 2005; Accepted June 28, 2005

Biological approaches for taste evaluation

** Hideki Ushio: Tokyo University of Marine Science and Technology, Department of Food Science and Technology, 5-7 Konan 4, Minato, Tokyo 108-8477, Japan; hushio@s.kaiyodai.ac.jp; Fax +81- 3-5463-0627

腹などのため摂取衝動を失い、連続した測定が不可能である。また、1日以上での測定については、消化管からの反射による影響も無視できなくなる。一方、試験液をなめる回数やその間隔を計測することにより、実験動物の嗜好性を解析することができる。リックカウンターあるいはガストメーターと呼ばれる装置を用い、電気的、機械的あるいは光学的に実験動物の舌と試験液との接触を計測する。この方法では、数秒から数分程度の短時間で解析可能なデータが取得できるため、同一個体を連続して試験に用いることもでき、多検体の試験液について解析することが可能となる⁵⁾。2瓶選択法と同様に嫌悪づけ学習を併用することで、様々な情報を得ることができる。

2. 電気生理学的手法

電気生理学的手法では、マウスやラットの鼓索神経や舌咽神経等を外科的に露出し、その電気的活動を取得する手法が良く用いられる。味細胞に刺激物質が到達すると、それに応じた電気的応答とともに味細胞から神経伝達物質が放出され、味神経へと刺激が伝達される。この際に生じるインパルスを細胞外電極で取得し、増幅して記録する(図1)。必要に応じてインパルスの積分を行い、味の強さを判断しやすくすることもある(図2)。単一神経線維の応答も取得できるが、非常に細かな作業を必要とするため、熟練が必要である。

また、1976年にNeherとSakmannによって開発されたパッチクランプ法も味細胞の活動解析に用いられている。パッチクランプ法はパッチピペットを吸引によって細胞膜に密着させ、細胞膜を介するイオンの移動を測定するものである。図3に主なモードを示す。パッチピペットをギガオーム以上の高抵抗で細胞膜に密着させ(on cellモード)、そのままパッチピペットを引きはがすと細胞内が外液に触れるinside outモードとなる。On cellモードからピペット内を陰圧にして膜を破るとconventional whole cellモードとなり、on cellモードでピペット内からイオノフォアなどによって細胞膜に部分的に穴を空けるとperforated patchモードとなる。これら2つのモードが味細胞の活動をとらえるのに用いられる。また、conventional whole cellモードでパッチピペットを引きはがすと細胞膜が裏返って再構成

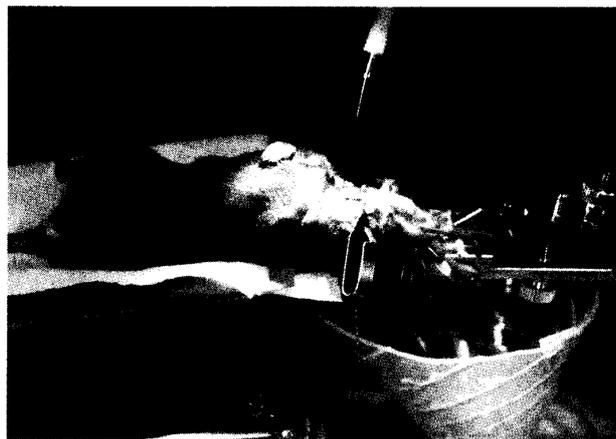


図1 マウス鼓索神経応答測定。

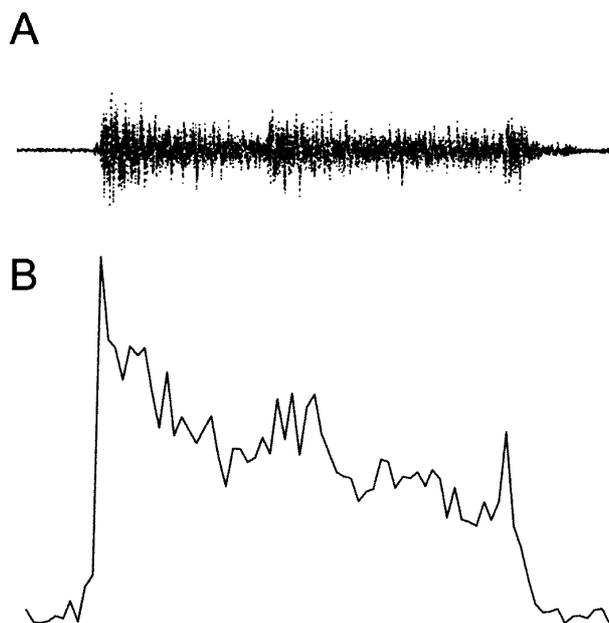


図2 マウス鼓索神経インパルス(A)およびその積分変換図(B)。

され、細胞内が外液に触れる outside out モードが得られる。その他の改良法も多数存在するが、技術的な詳細については成書をごらんいただきたい⁶⁾。本法では、最末梢である味細胞の活動を観察できるため、単一細胞の味受容機構の解析に力を発揮する。また、遺伝子導入によって受容体を発現させた細胞などで受容体の機能やその下流に存在する情報伝達機構について詳細な検討をする際にも重要な手法となる。一方で、多点の同時計測には困難が伴うため、検体数を増やすためには労力を要する。

3. カルシウムイメージング法

細胞は外部から情報を受容すると、それに応じて特有な反応を示し、細胞内に情報を伝達する。多く

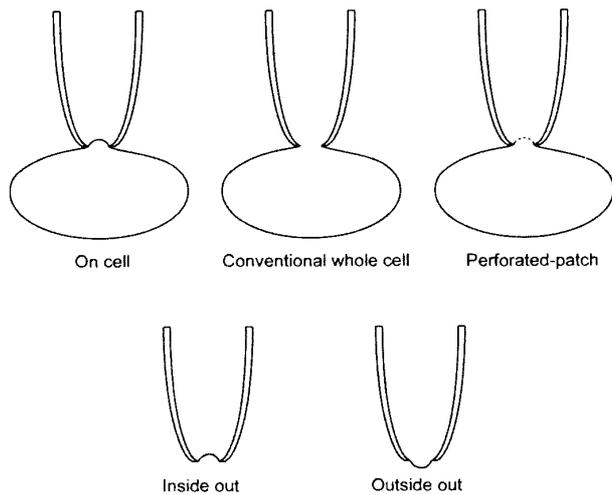


図3 一般に用いられるパッチクランプ法の種々のモード。

の細胞で Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして採用されており、味細胞も例外ではない。一般に、静止状態の細胞では Ca^{2+} 濃度は 100 nM 程度に保たれるが、刺激に対して細胞質中の Ca^{2+} 濃度が上昇する。この濃度上昇をカルシウムプローブといわれる蛍光色素で検出することができる。最も良く用いられるプローブは Fura-2 であり、その Ca^{2+} 結合型は 340 nm の励起によって 510 nm の蛍光を発生し、その蛍光強度は Ca^{2+} 濃度上昇に伴って増大する。一方、380 nm の励起光では、 Ca^{2+} 濃度上昇に伴って蛍光強度が減少するため、2 波長励起の蛍光強度比を算出することにより、細胞内の Ca^{2+} 濃度を評価できる。これらのカルシウムプローブには細胞膜透過性アセトキシメチルエステル (AM) 体があり、これを用いることによって非破壊で細胞内に導入することができる。AM 体は細胞内のエステラーゼによって遊離のプローブに変換され、 Ca^{2+} と結合して蛍光を発生するようになる。現在では、Fura-2 の他に多くのプローブが市販されており、共焦点レーザー顕微鏡で多用されるアルゴンレーザーの波長 488 nm で励起可能な Calcium Green-1 など多彩なプローブが市販されている。本法では、高感度 CCD カメラや共焦点レーザー顕微鏡を用いることで経時的に 2 次元あるいは 3 次元の解析が可能となるのが利点である。一方で、味細胞はこのようなプローブを細胞外に輸送する装置を有しているため⁷⁾、プローブの漏出が測定時の問題となることがある。

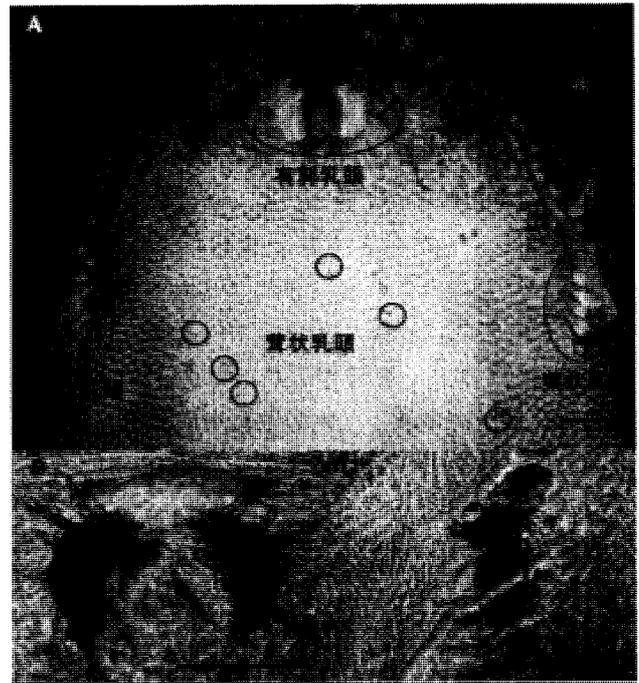


図4 マウス剥離舌上皮 (A), 有郭乳頭 (B) および葉状乳頭 (C)。図中スケールは 1 mm。

4. In situ カルシウムイメージング法による複合味応答解析

これまで味細胞のカルシウムイメージングでは単離味細胞やスライス試料を用いるのが一般的であった。そのため、味刺激を与えた際に味細胞の口腔側だけでなく基底側までもが同時に刺激される、味細胞の生存時間が短いなどの欠点が残っていた。Roper のグループはこれを改善すべく、細胞外への漏出がほとんどない Calcium Green-1 dextran を、味蕾を含むスライス標本中の味細胞に直接導入し、灌流状態において味孔付近だけに刺激物質を投与方法を採用した⁸⁾。彼らの方法はその検出感度や分解能において非常に優れたものであり、味細胞の味受容機構に関して多くの情報を提供している⁹⁻¹¹⁾。しかしながら、目的の細胞のみにプローブを導入するため、'おいしさ' という複合的な観点からあらゆる味細胞の応答を同時に取得することが困難であるという欠点が存在する。我々はこの点を克服すべく、マウスの舌から剥離した舌上皮をそのままカルシウムイメージングに供する方法の開発を試みた。マウスの舌上皮と筋層の間にコラゲナーゼなどの酵素を注入してインキュベートすると、図 4A に示すように味覚器である各種乳頭を含んだ舌上皮が剥離できる。マウスの場合、舌根部付近に 1 対の有郭乳頭が存在し、両脇に葉状乳頭が存在する。茸状乳頭は舌

中央部に散見される。有郭乳頭 (図4B) および葉状乳頭 (図4C) では外分泌腺である von Ebner's 腺が付着した状態で剥離できているのが確認できる。図5に示すようにローダミン 123 という蛍光試薬で、味蕾中の細胞が好染される。味細胞からの漏出を防ぐためにシクロスポリン A 存在下においてアルゴンレーザーで励起可能な Calcium Green-1 のAM 体を酵素的に剥離したマウス舌上皮に負荷し、高感度 CCD カメラを装着したニポウディスク型共焦点レーザー顕微鏡上で刺激物質を灌流させてその

カルシウム応答を観察すると味蕾の中に存在する細胞群が蛍光を発する。この際のシステムの概略図を図6に示す。リアルタイムでも観察できるが、全ての画像をコンピューターに直接導入することにより、刺激のシーケンスを終えた後、フリーソフトの NIH-Image や Image-J (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html> などからダウンロード可)あるいは市販の画像解析ソフトなどを用いて画像解析を行うことで、同時に多数の細胞についてカルシウム応答を測定できるのが利点である。細胞内の Ca^{2+} 濃度を顕著に上昇させることが知られている苦味物質デナトニウム、甘味物質サッカリンおよびうま味物質グルタミン酸ナトリウムを種々の濃度で投与すると、一部の細胞で図7に示すような濃度依存的な

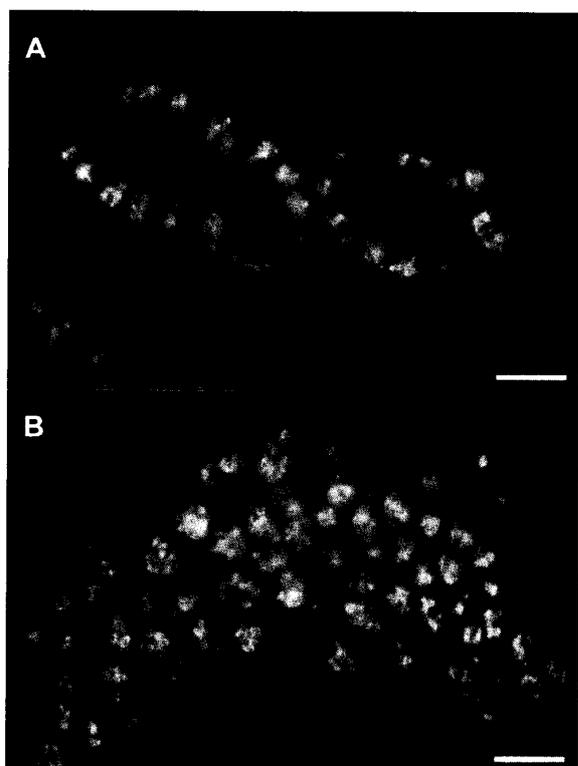


図5 葉状乳頭 (A) および有郭乳頭 (B) のローダミン 123 染色による蛍光顕微鏡像。

図中スケールは 100 μ m。

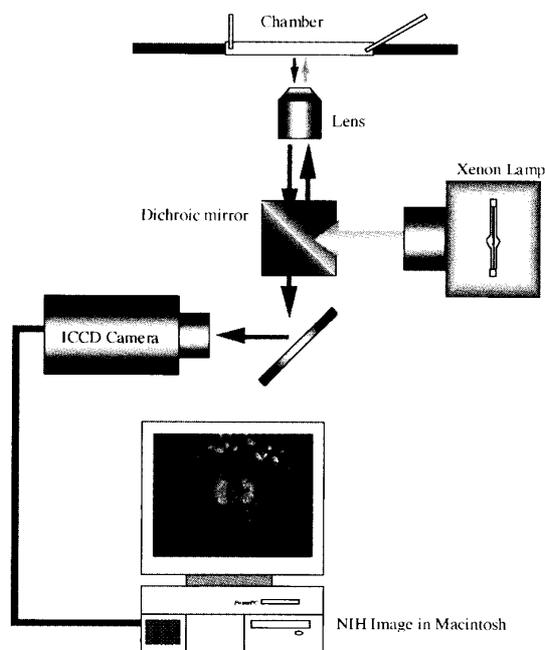


図6 In situカルシウムイメージングシステムの概略図。

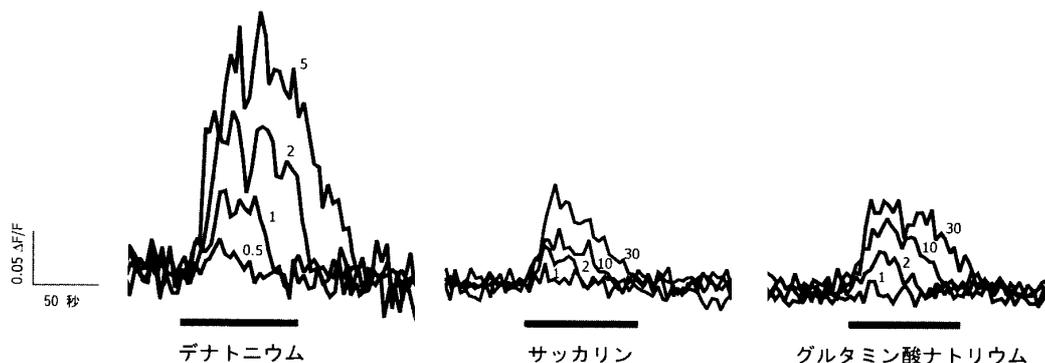


図7 デナトニウム、サッカリンおよびグルタミン酸によるカルシウム応答。

図中数字は当該物質の濃度 (mM) を示す。

カルシウム応答が観察できる。

本法の応用例について以下に述べたい。まず、複合味の基本であるグルタミン酸ナトリウムとイノシン酸の相乗効果であるが、図8に示すように本法においてもよく知られている相乗効果を示す細胞が確認できる。一方、本法の利点は多数の細胞について比較的長時間の観察が可能であることである。図9に示すように、グルタミン酸ナトリウムによってマウス舌上皮を刺激すると図中矢印に示すようにいくつかの細胞がカルシウム応答を示す。その軌跡を追うと、神経細胞の刺激伝達時に見られるように

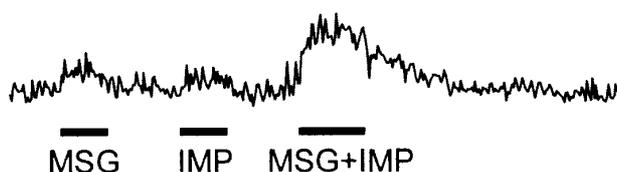


図8 グルタミン酸ナトリウム (MSG) およびイノシン酸 (IMP) による相乗作用。

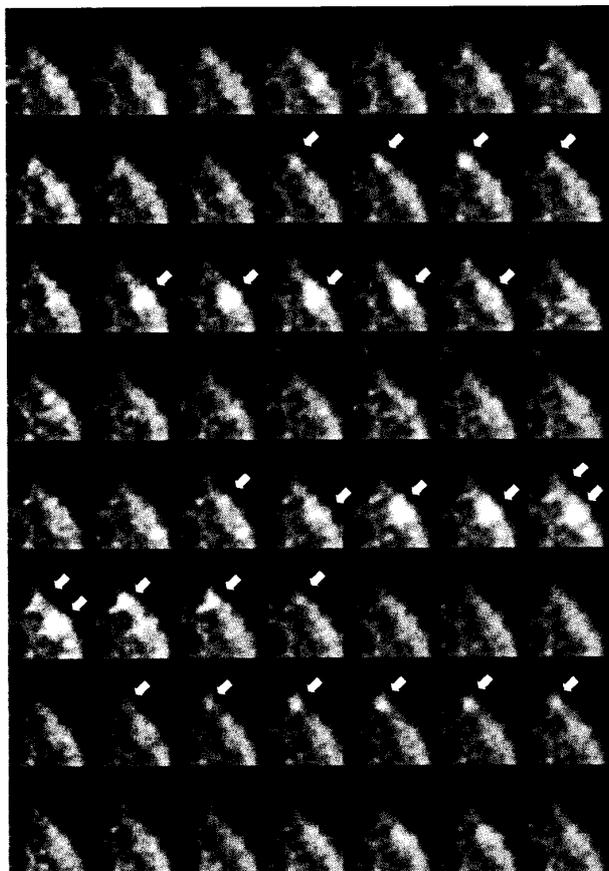


図9 グルタミン酸ナトリウム投与中における味細胞のカルシウム応答。

矢印で示した細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が見える。1枚あたり、5秒。

カルシウム応答があたかも近傍の細胞同士で伝播されているような像が確認できる。本当にこのようなことが最末梢の味細胞レベルで起こっているとすれば、味刺激に対して末梢の味細胞である程度情報が制御されてから中枢へと伝えられることになる。このことは、複合的な味覚を論ずる際に重要な意味を持つてくる。すなわち、単一の味刺激で得られる応答と、複合的な味刺激では細胞間の相互作用を介してから出力される応答では異なる可能性がある。今後この可能性について検討を加えていきたいと考えている。

また、乳頭中のどの細胞が目的の味物質に応答を示すか不明な場合にも本法はその力を発揮する。海のパイナップルとも呼ばれるホヤは、東北地方を中心に刺身等で食されている。ホヤの筋膜体を食べた後、お酒や水を飲むと非常に甘く感じるということが経験的に知られているが、その本体や甘味発現機構については全く情報が得られていない。そこで、ホヤ甘味物質に対するマウス鼓索神経の応答を調べたところ、図10Aに示すようにホヤ甘味物質の投与によって神経応答が確認され、マウス舌を水で洗浄した際にさらに大きな応答が確認された。しかし

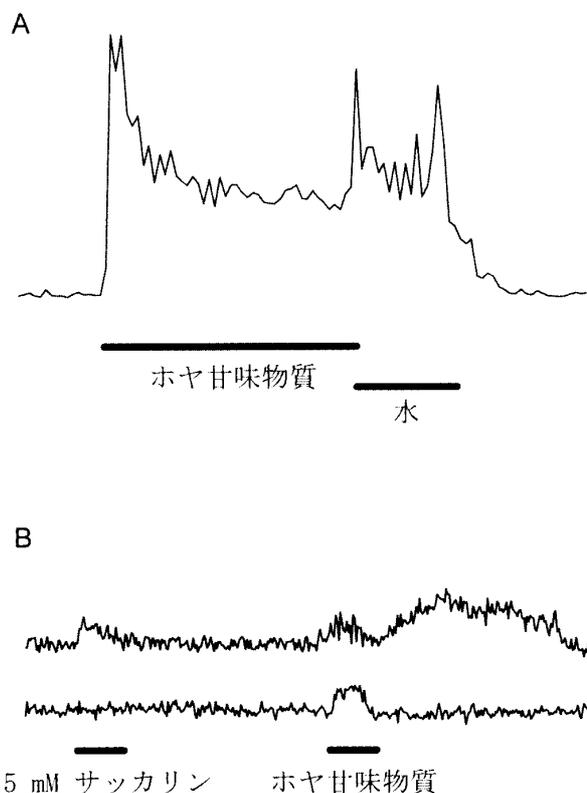


図10 ホヤ甘味物質に対するマウス鼓索神経応答 (A) およびカルシウム応答 (B)。

ながら、この結果は単一神経線維の応答ではなく、全鼓索神経線維の応答であるため、マウスが甘味を感じているかどうかは定かではない。そこで、in situ カルシウムイメージング法を用いてホヤの甘味物質に対するカルシウム応答を取得したところ、サッカリンに対してカルシウム応答を示す細胞の一部がホヤ甘味成分を除去した際に大きなカルシウム応答を示すことが明らかとなった (図 10B)。一方、サッカリンには応答せず、ホヤの甘味成分のみに応答を示す細胞も存在した。このことから、おそらくマウスは甘味とその他の味を同時に感じているものと推測できる。このように、ある味質に特異的な味細胞の活動を解析する際にも本法は有効である。

おわりに

以上、本稿では実験動物を用いた味覚の解析方法を述べてきた。素材のおいしさをとらえるには上述したようにヒトによる官能検査に勝るものはなく、さらに池崎の稿で述べられているように、ヒトの官能を模した味覚センサーも実用化されている。しかしながら、素材のおいしさを感じる機構そのものを明らかにしていこうという試みにおいては本稿で述べた手法が有用な情報を提供してくれるものと期待している。

文 献

- 1) 山口静子：官能検査による味の測定，日本味と匂い学会誌 2, 39-42 (1995)
- 2) 古川秀子：おいしさを測る．食品官能検査の実際，幸書房 (1994)
- 3) 佐藤 信：官能検査入門．日科技連出版社 (1978)
- 4) 佐藤 信：統計的官能検査法．日科技連出版社 (1985)
- 5) Glendinning JI, Gresack J and Spector AC: A high-throughput screening procedure for identifying mice with aberrant taste and oromotor function. *Chem. Senses* 27, 461-474 (2002)
- 6) 岡田泰伸：新パッチクランプ実験技術法，吉岡書店 (2001)
- 7) Jacob I, Hauser IA, Thevenod F and Lindemann B: MDR1 in taste buds of rat vallate papilla: functional, immunohistochemical, and biochemical evidence. *Am. J. Physiol.* 274, C182-C191 (1998)
- 8) Caicedo A, Jafri MS and Roper SD: In situ Ca^{2+} imaging reveals neurotransmitter receptors for glutamate in taste receptor cells. *J. Neurosci.* 20, 7978-7985 (2000)
- 9) Caicedo A and Roper SD: Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli. *Science* 291, 1557-1560 (2001)
- 10) Caicedo A, Kim K-N and Roper SD: Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *J. Physiol.* 544, 501-509 (2002)
- 11) Richter TA, Caicedo A and Roper SD: Sour taste stimuli evoke Ca^{2+} and pH responses in mouse taste cells. *J. Physiol.* 547, 475-483 (2003)

<著者紹介>

潮 秀樹 (うしお ひでき) 氏略歴

昭和 63 年 3 月 東京大学農学部水産学科卒業

平成 5 年 3 月 東京大学農学系研究科博士課程修了

平成 5 年 4 月 東京水産大学水産学部助手

平成 9 年 1 月 東京水産大学水産学部助教授

平成 15 年 4 月 東京海洋大学 (大学統合のため改称) 海洋科学部助教授 (現在に至る)