

報 文

苦味マスキング効果の定量的解析

河合 崇行, 日下部 裕子

農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所

Quantitative analysis for the masking effects to bitter taste

Takayuki Kawai and Yuko Kusakabe

National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

Abstract

On behavior tests for taste evaluation with mice, lick number to the test solutions depends on their favorability. So, we analyzed the favorability of various concentration of denatonium benzoate bitter solution based on animal behavior. We also analyzed and quantified the favorability changes when sodium saccharin as sweet compound, mono-sodium glutamate as umami compound, or sodium chloride as salty compound was added to the bitter test solutions. As a result, the addition of 2.5 mM of sodium saccharin, 500 mM of mono-sodium glutamate, and 100 mM of sodium chloride showed the ability to suppress bitter taste as 40%, 69%, 46%, respectively. These results suggest that the bitter masking effects could be evaluated objectively by animal behavior, without having human sensory evaluation by well-trained panelists.

Keywords: 安息香酸デナトニウム, マスキング, マウス, 行動学, うま味

緒 言

苦味は動物にとって元来忌避する味質である。苦味は対照物中に毒の存在を示す情報の一つであるため忌避しても良い味である。少量のエネルギー摂取で済む小動物は敢えて苦味を含む食餌を摂る必要はないが、ヒトを始めとする大動物では多種多様な食品から栄養

素を摂取しなくてはならない。根菜や新鮮な葉物野菜はビタミン類やミネラル類の供給源である。また、分岐鎖アミノ酸やポリフェノール類の多くも苦味を呈しており、健康維持のためにこれらの機能性成分を含む食品を積極的に摂ることが推奨されている。苦味を上手にマスキングすることができれば、苦味に敏感な幼児期から多くの食経験をを得ることが可能である。苦味のマスキングについては、古くより多くの研究がなさ

れており、大別すると物理的、化学的、生化学的及び官能的手法で進められている。物理的手法とは苦味成分を小さな分子カプセルに閉じ込める¹⁾、フィルム状にして口の中で溶けないようにする²⁾、表面積を小さくする³⁾などの方法で、化学的手法とは対イオンや官能基の種類を置き換えたり、架橋剤を利用して複合体にしたりする方法で、いずれも製剤分野で著しい研究進展が認められる。一方、生化学的手法とはリポ蛋白質⁴⁾や酸性ジペプチド⁵⁾などの添加剤を苦味受容部位に反応させ苦味の応答を抑える方法で、食品一般に利用が可能である。苦味受容体の遺伝子 T2Rs⁶⁾が見つかった以来、受容体を強制発現させた細胞でマスキング効果を測定する手法も開発されている⁵⁾。官能的手法とは苦味そのものを抑えるのではなく、甘味⁷⁾や塩味^{8,9)}、香料などを用いて苦味を感じさせにくくさせる方法である。苦味を食べると脳内で DBI (Diazepam Binding Inhibitor) 様物質が放出され不快な感覚を覚える¹⁰⁾が、甘味や脂肪分などの好ましい味を食べると脳内で β -エンドルフェインが放出され快感が生み出される¹¹⁾。この2種類の脳内物質のバランスにより、苦味の軽減が起きているものと考えられている。 β -エンドルフェインは脳内麻薬用物質の一つであり、苦味だけでなく痛みまでの軽減するほど強烈な快感物質である。苦味そのものの溶出を抑えたり苦味受容体へ直接作用させたりして得られる苦味抑制効果は、市販の味覚センサーや細胞応答を利用して評価することができるが、脳内物質のバランスによる抑制効果は生体を利用しなければ評価できない。熟練した官能パネリストを用いて評価する方法が一般的である。

そこで筆者らは、より客観性の増した生体利用評価を行うために、マウスを用いた味覚評価法を開発した。動物は提示された食べ物が好まなければ好ましいほど多く食べ、まずければまずいほど食べなくなる。短時間に限定すると、好ましいければ単位時間あたりにアクセスする(かじる、舐める等)回数が増え、その嗜好に依存して回数が増えることが知られている¹²⁾。筆者らはマウスの習性を利用し、マウスが溶液を舐める回数を自動的に測定するリック自動計測装置を作製した¹³⁾。本研究では、遺伝子背景、食経験の揃ったマウスを用いて種々濃度の苦味溶液の嗜好、及びマスキング物質を添加したときの嗜好変化を解析し、マスキング効果の数値化を試みた。

実験材料及び方法

1. 動物及び飼育法

本実験は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物実験等実施規定に従って実験を行った。自家繁殖によって得た C57BL/6 系統マウス 8~12 週齢(雄 7 匹、雌 4 匹)を用いた。遺伝子多様性によるデータのばらつきを最小限にとどめるため、近郊系マウス種を用いた。アルミニウム製ケージ(15×25×10cm)の中にパルプ製の床敷を敷き 3~4 匹ずつの群飼育とした。室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $45 \pm 2\%$ 、12 時間明期-12 時間暗期サイクルを維持できるチャンバー内で飼育した。特に記載がない限り餌にはオリエンタルバイオ社製 CMF、水には脱イオン水を使い自由摂取可能とした。リックトレーニング及びリック計測は、マウス活動期にあたる暗期時間帯内に実施した。

2. 計測機器

本実験には、カスタムメイドのリック計測器を使用した。マウスケージは日本クレア製ポリカーボネートケージ(11×20×11cm)の一側面をくり抜き、後述の仕切り板を取り付けられるように加工した。溶液提示部には直径 24cm のアルミ円盤の外周近くに 80 度の角度で 8.1mm の穴 20 個を均等に割りふって開けたものを用意した。試験溶液はポリプロピレン製 15mL 遠心チューブに金属製の日本クレア製玉付きマウス給水用先管を取り付けたものに入れて円盤の穴に挿し込んだ。溶液の提示は円盤に取り付けたステッピングモータをシーケンスソフトによって制御し、任意の時間、任意の順で行うことができるように設計した。マウスケージと溶液提示部の接続部は幅 3.5mm のスリットがあいたアクリル製仕切り板を設置し、マウスが舌のみを突き出して提示溶液の給水用先管の先端を舐められるようにした。仕切り板の溶液提示部側には、スライド式シャッター、光センサーを取り付け、シャッター解放時のマウス舌の出し入れ回数(リック数)を計測できるようにした。シャッター開閉時間、リック開始信号、リック回数計測も上記シーケンスソフトに組み込んで、一括制御できるよう設計した。リック数計測は室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で制御している動物飼育室内に設置した。

3. リックトレーニング

マウスを群飼状態から個飼いケージに移したり、

不慣れな匂いのする場所に移したりすると、マウスは落ち着きなく探索行動を行う。また、先の見えない穴に鼻を差し込むことはあっても、舌だけを差し込むことには抵抗があるように見える。再現性の良い安定した結果を得るためには、予めリック計測器による実験に慣れさせておく必要がある。トレーニング1～2日目はリック計測器の環境に慣れさせることを目的に行った。リック計測器のマウス用ケージと溶液提示部の接続部に幅5mmのスリットのあいた透明アクリル仕切り板(厚さ2mm)を取り付け、給水用先菅の先端がスリットに接触するように調整し、5%スクロース溶液を提示した。マウスを1匹ずつケージ内に入れ、10分以上舐めたのを確認した。トレーニング3～4日目は舌をスリットから大きく出すこと及びシャッターの開閉に慣れさせることを目的に行った。給水用先菅の先端とスリットの間隔が2mmとなるように調整し、4%スクロース溶液を提示し、リック開始から30秒間シャッターを解放した後に15秒間シャッターを閉じるサイクルを10回繰り返した。トレーニング5日目は不透明な仕切り板のスリットから舌を出すことに抵抗感を慣れさせることを目的に行った。仕切り板を幅3.5mmのスリットのあいた不透明なアクリル板(厚さ2mm)に取り替えて、3～4日目と同様のトレーニングを行った。トレーニング6日目は提示溶液に好ましい味や好ましくない味があることを学ばせるために行った。2%スクロース溶液、10mM キニーネ塩酸塩、水の3種類の溶液を用意し、それぞれ30秒ずつ提示するサイクルを4回繰り返した。トレーニング7～8日目はリック行動が嗜好の強さに対応していることを確認する目的で行った。4%・2%・1%スクロース溶液と水の4種類の溶液を用意し、それぞれ10秒ずつ提示するサイクルを4回行った。高濃度から低濃度、低濃度から高濃度と提示順を入れ替えながら行った。

4. リック計測法

安息香酸デナトニウム溶液及びそれらにサッカリンNa・グルタミン酸Na、塩化ナトリウムを添加した溶液に対するリック計測を行うときには、12時間以上絶水させたマウスを用いた。リック計測実験終了後に絶水を解き、1日以上回復させた後に再び12時間以上絶水させ、次の計測を行った。0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM 安息香酸デナトニウム溶液を用意し、濃度が高くなる順に提示することを1サイクルとした。各溶液ともリックし始めるまではタイマーは止めたままにし、最初のリックから10秒たってからシャッターを閉じ、

その間のリック数を求めた。60秒たってもリックしない場合は、強制的にシャッターを閉じ、次の試料溶液に進めた。この操作を最低2サイクル以上行い、各試料溶液に対するリック数を記録した。甘味・うま味・塩味を添加してマスキング効果を検討するときには、0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM 安息香酸デナトニウム溶液を二組作製し、片方にサッカリンNa、グルタミン酸Na、塩化ナトリウムを添加した。安息香酸デナトニウムのみの溶液を苦味濃度が高くなる順に提示した後、マスキング剤入りの溶液を苦味濃度が高くなる順に提示した。さらに順序を入れ替えて同様の操作を繰り返した。別の日に、もう一度マスキング剤入り溶液とマスキング剤なし溶液の計測順を入れ替えた実験を行った。甘味の持つマスキング特性を検討するには、0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM 安息香酸デナトニウム溶液と2 mM 安息香酸デナトニウム溶液に0.06, 0.19, 0.56, 1.7, 5, 15 mM サッカリンNaを添加した溶液を作製した。安息香酸デナトニウムの濃度が高くなる順に提示した後、サッカリンNa添加溶液は甘味濃度が低くなる順に提示することを1サイクルとした。さらに順序を入れ替えて同様の操作を1サイクル繰り返した。別の日に、もう一度サッカリンNa入り溶液と入っていない溶液の計測順を入れ替えた実験を2サイクル行った。うま味の持つマスキング特性を検討するには、2 mM 安息香酸デナトニウム溶液に1.2, 3.7, 10, 30, 100, 300 mM グルタミン酸Naを添加した溶液を作製した。サッカリンNa添加の場合と同様の提示順及び順序を入れ替えた実験を行った。

甘味溶液に対するリック数を計測するときは、絶水処理は行わず6時間以上絶食したマウスを使用した。1.25, 2.5, 5, 10, 20 mM サッカリンNa溶液及び4%スクロース溶液を用意し、甘味濃度が高から低、低から高の順になるように提示した。サッカリンNaは甘味物質であるがカロリーが無く、長期間摂取により嗜好性低下が見られることがある。実験中の嗜好性低下を防ぐために、甘味もカロリーもある4%スクロースを提示溶液の中にいれておいた。うま味溶液に対するリック数を計測するときも、絶水処理は行わず6時間以上絶食したマウスを使用した。150, 300, 600, 1200 mM グルタミン酸Naに30 mM 塩化ナトリウムを添加した溶液及び4%スクロース溶液を用意し、うま味濃度が高から低、低から高の順になるように提示した。グルタミン酸Naだけの溶液ではうま味が弱いため、うま味が認識されやすいよう一定濃度の塩化

ナトリウムを加えた。

いずれの計測も溶液提示順序を入れ替えた実験を必ず行い、極力順番効果の影響を小さくするようにした。

5. データ解析

12時間絶水により水への欲求の強さをほぼ同じにすることができるが、全てのマウス、全ての試験で測定開始時から終了時まで同条件を維持することは難しい。水への欲求が過度に強い場合は、濃い苦味溶液であっても積極的に摂取しようとする。一方、水への欲求が過度に弱い場合は、苦味の入っていない溶液であっても摂取しようとしなくなる。10秒間にリックする最大値が80程度であることから、本実験ではその半値40を制限値とし、濃い苦味溶液である4 mM 安息香酸デナトニウム溶液を10秒間に40回以上リックした場合は、水への欲求が過度に強い条件下での測定であったと判断し、その溶液提示サイクルのデータを解析から排除した。また、水あるいは薄い苦味溶液である0.25 mM 安息香酸デナトニウム溶液を10秒間に40回未満しかリックしない場合は、水への欲求が過度に弱い条件下での測定であったとし、その溶液提示サイクルのデータを解析から排除した。好ましい味である甘味及びうま味溶液に対するリック計測では、絶水処理を行っていないので、水を提示してもほとんどリックしようとしなない。マウスの好ましい味を摂取したいというモチベーションが十分に高い条件下でなければ甘味・うま味溶液の評価をすることが難しい。そこで、本実験では濃い甘味溶液である4 %スクロース溶液を10秒間に40回未満しかリックしない場合は、好ましい味に対する摂取モチベーションが過度に低い条件下にあるとし、そのサイクルのデータを解析から排除した。さらに、リックをせずに次の提示溶液に移った場合、つまりリック回数が「0」と記録されたデータについては、そのデータのみ解析から排除した。1種類の実験は何度か繰り返して行い、新規恐怖の影響を避けるため、初日のデータは解析に用いなかった。

実験結果および考察

1. 苦味のリック解析

24時間絶水後に0.125～4 mM 安息香酸デナトニウム溶液を提示し、各溶液10秒間のリック数を計測した結果を図1 aに示す。マウスは元来、苦味は嫌いであるが、飲水欲求とのバランスにより、安息香酸デナトニウム0.5mM程度の苦味までは積極的に摂取行動を

とっていることが示されている。1 mM以上では、濃度依存的にリック数が減少し、2～4 mMでは忌避していると判断した。24時間絶水により安定したリック数が再現されるものの、実験日より多少の変動があるため、以降の苦味マスキング実験の際には、その都度苦味溶液単独の希釈系列を提示し、同一日の同一条件でマスキング効果を検討することにした。

2. 甘味・うま味・塩味による苦味のマスキング

苦味マスキング効果を数値化するために種々の濃度の苦味溶液に一定量の甘味・うま味・塩味を添加する実験を行った。0.125～4 mMの安息香酸デナトニウムに2.5mM サッカリン Na を添加した溶液を提示した場合のリック数を図1 bに示す。サッカリン Na 添加により1及び2 mM 安息香酸デナトニウム溶液でリック数の増加が認められ、リックカーブは高苦味濃度側へのシフトが見られた。リック数が最大値の半値を示す苦味濃度を比較することにより、2.5mM サッカリン Na 添加は安息香酸デナトニウムの苦味を約40%弱めていると推算される。0.125～4 mMの安息香酸デナトニウムに500mM グルタミン酸 Na を添加した溶液を提示した場合のリック数を図1 cに示す。グルタミン酸 Na 添加により1～4 mM 安息香酸デナトニウム溶液でリック数の増加が認められ、リックカーブは高苦味濃度側へのシフトが見られた。リック数が最大値の半値を示す苦味濃度を比較することにより、500 mM グルタミン酸 Na 添加は安息香酸デナトニウムの苦味を約69%弱めていると推算される。0.125～4 mMの安息香酸デナトニウムに100mM 塩化ナトリウムを添加した溶液を提示した場合のリック数を図1 dに示す。塩化ナトリウム添加により1及び2 mM 安息香酸デナトニウム溶液でリック数の増加が認められ、リックカーブは高苦味濃度側へのシフトが見られた。リック数が最大値の半値を示す苦味濃度を比較することにより、100mM 塩化ナトリウム添加は安息香酸デナトニウムの苦味を約46%弱めていると推算される。

3. 甘味・うま味の苦味マスキング特性

苦味マスキング効果の特性を検討するために一定量の苦味溶液に種々の濃度の甘味・うま味を添加する実験を行った。2 mM 安息香酸デナトニウム溶液に0.06～15mM サッカリン Na を添加した場合のリック数を図2 aに示した。添加量の増加に応じたリック数の増加が認められた。2 mM 安息香酸デナトニウム溶液に1.2～300mM グルタミン酸 Na を添加した場合のリッ

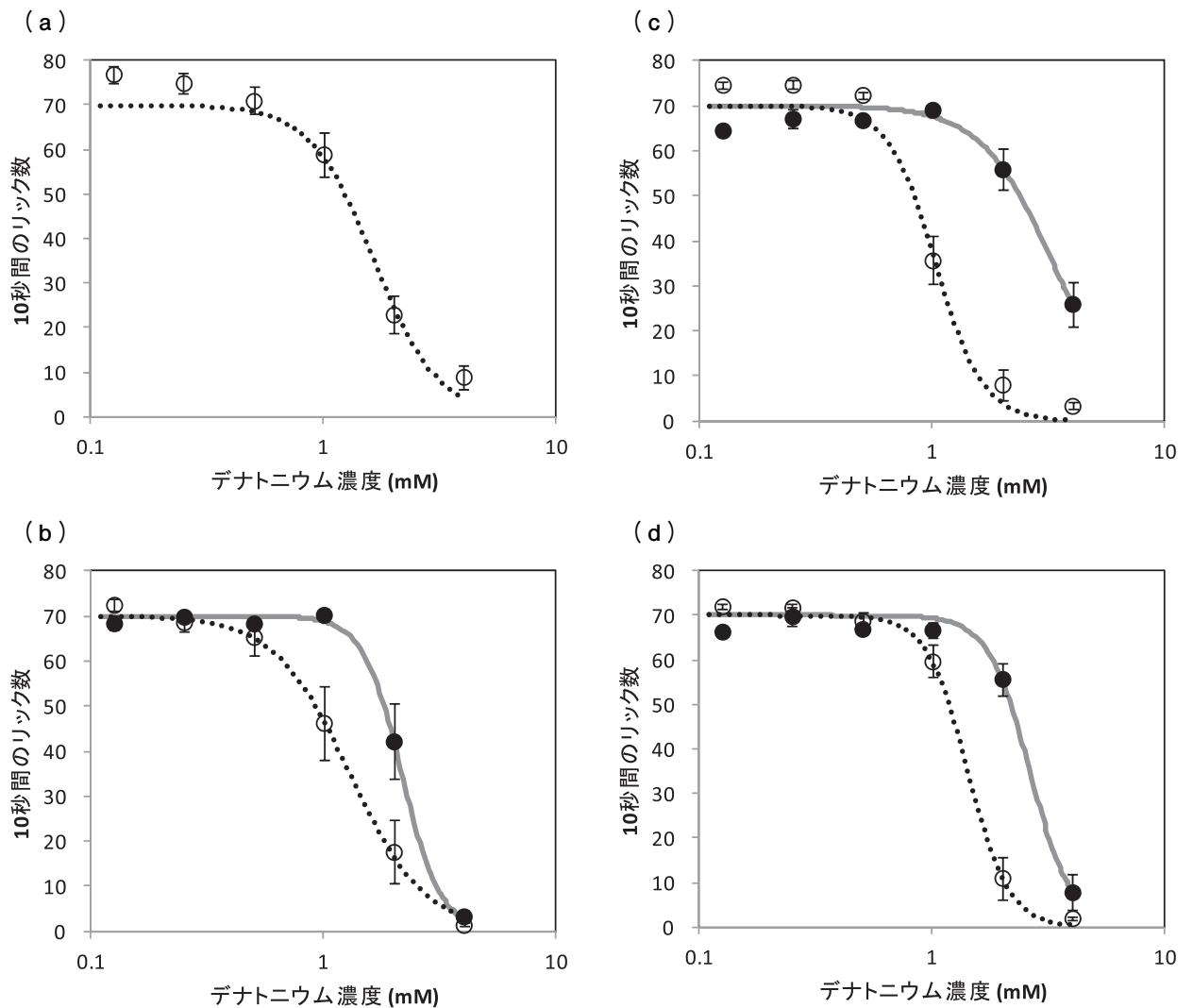


図1. 甘味・うま味・塩味による苦味マスキング効果

○は苦味単独, ●は甘味/うま味/塩味を添加した溶液に対するリック数. a) は濃度の異なる安息香酸デナトニウム溶液に対する嗜好の大きさを示す. $n = 32-42$. b) は2.5mM サッカリン Na を添加した時の嗜好変化を示す. $n = 5-20$. c) は500mM グルタミン酸 Na を添加した時の嗜好変化を示す. $n = 16-40$. d) は100mM 塩化ナトリウムを添加した時の嗜好変化を示す. $n = 9-40$. いずれも値は平均 $\pm$ 標準誤差.

ク数を図2 bに示した. 添加によりリック数の増加が認められたが, 1.2~30mM の間で増加量の変化は見られず, サッカリン Na 添加のような濃度相関は見られなかった. 今回使用した濃度範囲のサッカリン Na やグルタミン酸 Na は単独で苦味を感じるという報告はなく, 苦味受容体への直接作用はないことから, 末梢での阻害ではなく, 苦味, 甘味, うま味の情報が別個に脳まで伝達され, 脳内で β -エンドルフィンが放出されることによる嫌悪感の中和処理が行われることで苦味感の低下が起きているものと予想される. マスキング効果における脳内処理の関与の大きさを調べる

には, ナロキソン投与等による β -エンドルフィン作用の阻害実験が必要となると考えられる.

4. 甘味・うま味溶液に対する嗜好性試験

甘味・うま味に対する嗜好の濃度依存性を検討するために以下の実験を行った. 1.25~20mM サッカリン Na に対するリック数を図3 aに, 150~1200mM グルタミン酸 Na に対するリック数を図3 bに示した. 本実験では絶水処理を施さず, 水単独への欲求が小さくなっている条件下で試験を行った. いずれの場合も濃度増加に応じたリックスの増加が認められ, サッカリ

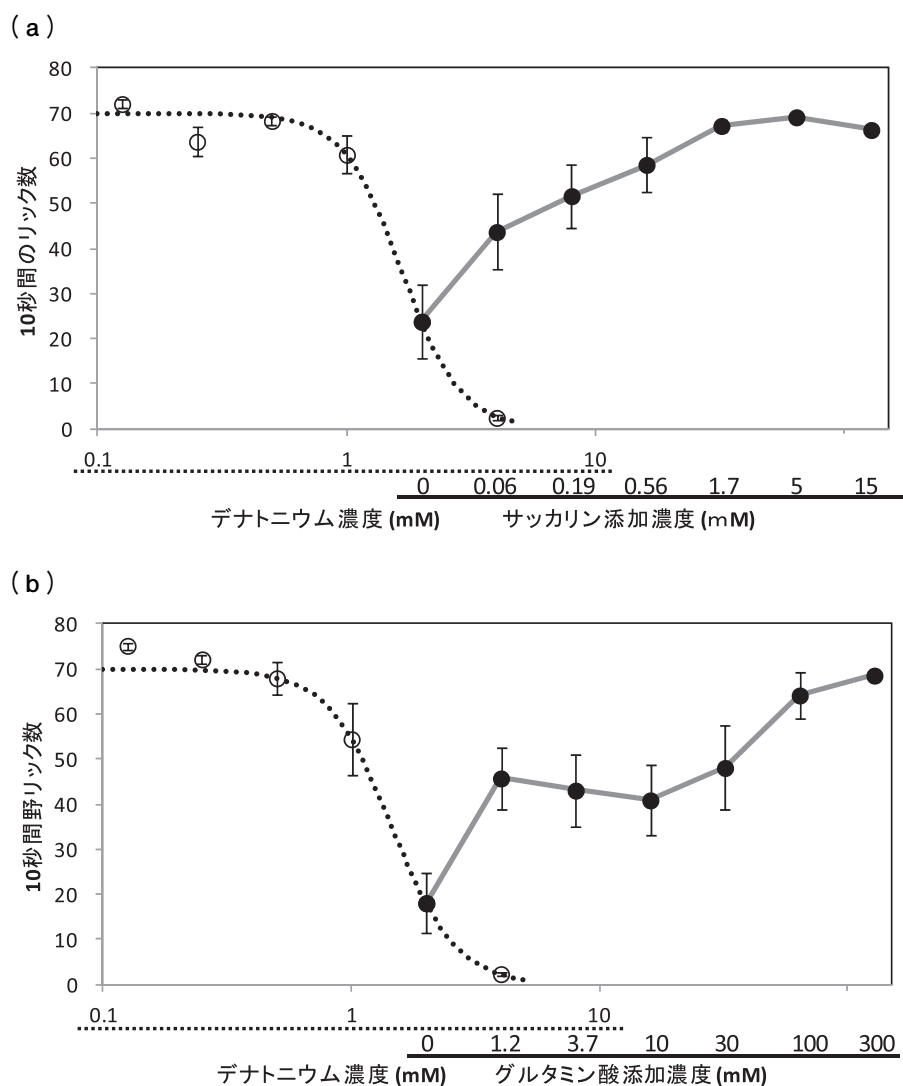


図 2. 甘味・うま味の苦味マスキング特性

○は苦味単独, ●は甘味／うま味を添加した溶液に対するリック数. a) は 2 mM 安息香酸デナトニウム溶液に濃度の異なるサッカリン Na を添加した時の嗜好変化を示す. $n = 13-20$. b) は 2 mM 安息香酸デナトニウム溶液に濃度の異なるグルタミン酸 Na を添加した時の嗜好変化を示す. $n = 14-20$. いずれも値は平均 $\pm$ 標準誤差.

ン Na 溶液, グルタミン酸 Na 溶液を好ましい味として認識していることが確認できた. いずれの場合も 2 倍希釈系列であるが, グルタミン酸 Na のリック数増加の方がサッカリン Na に比べて緩やかである傾向が認められた. この行動学実験の結果は, 苦味をマスキングした際のサッカリン Na とグルタミン酸 Na の効果特性の違いにつながっている可能性がある. 苦味物質・甘味物質・うま味物質には多種多様なものがあり, 種々の組み合わせによりマスキング特性は異なることが容易に想像できる.

本手法は苦味物質とマスキング剤が直接作用するこ

とによって起こるマスキング効果評価に限らず, 苦味物質と他の味物質からの味覚情報が別個に脳へ伝えられた後の脳内処理によって起こる間接的なマスキング効果評価, あるいはそれらの混合系における効果評価にも応用できる長所がある. しかし, マウスとヒトで脳内処理機構が同じであっても, その大きさや影響力が同じであるとは限らない. ヒト官能試験の前段階として利用可能であるものの, 遺伝的背景・食経験の異なる群であるヒトに外挿するには, いっそうの詳細データ蓄積が必要となるものと考えられる.

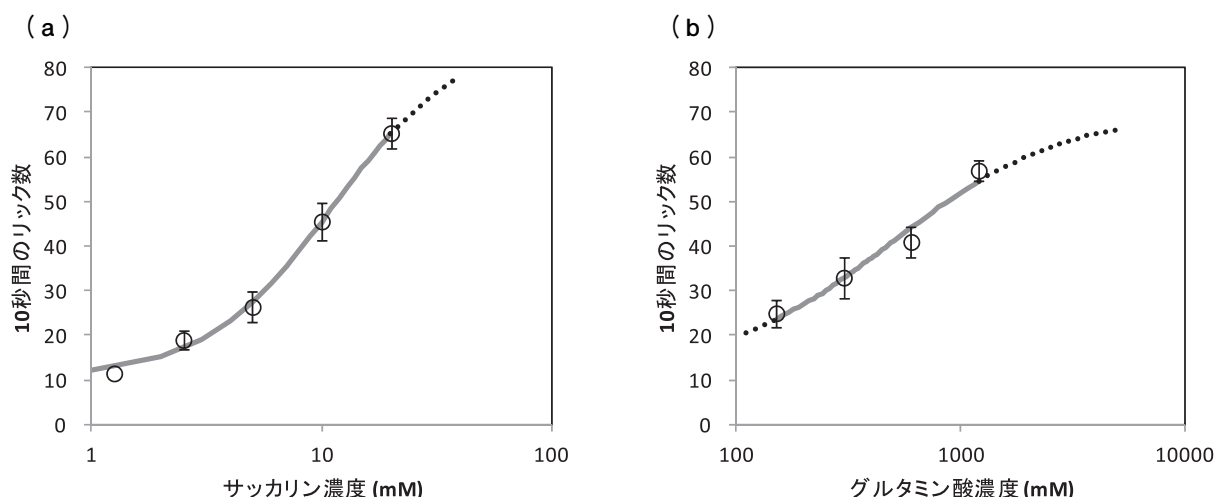


図3. 甘味・うま味の嗜好性試験

a) は濃度の異なるサッカリン Na 溶液に対する嗜好の大きさを示す. $n = 20-22$. b) は濃度の異なるグルタミン酸 Na 溶液に対する嗜好の大きさを示す. $n = 27-50$. いずれも値は平均 $\pm$ 標準誤差.

要約

マウスは提示された試料溶液の嗜好に依存して、その溶液を舐める回数が増える。この習性を利用して、種々の濃度の安息香酸デナトニウム苦味溶液に対する嗜好性を解析した。さらに、甘味素材であるサッカリン Na、うま味素材であるグルタミン酸 Na、塩味素材である塩化ナトリウムを苦味溶液に添加した場合の嗜好性変化を検討し、変化の大きさを数値化した。その結果、2.5mM サッカリン Na では約40%、500mM グルタミン酸 Na では約69%、100mM 塩化ナトリウムでは約46%苦味を弱くさせている可能性が示された。このことは、ヒト官能パネリスト試験の前段階として、実験動物を用いたマスキング効率の客観的評価が有効である可能性を示唆している。

参考文献

- 1) 植田真澄. 粒剤の苦味マスキングのための最近の製剤化技術と展望. 岐阜薬科大学紀要, **44**, 18-31 (1995).
- 2) Hamashita T, Matsuzaki M, Ono T, Ono M, Tsunenari Y, Aketo T, Watano S. Granulation of Core Particles Suitable for Film Coating by Agitation Fluidized Bed

II. A Proposal of a Rapid Dissolution Test for Evaluation of Bitter Taste of Ibuprofen. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 883-887 (2008).

- 3) 湯浅宏. 製剤技術の最新動向 微粒子乾式コーティング法を用いた製剤化技術. 粉体技術, **2**, 48-54 (2010).
- 4) 桂木能久. 苦味阻害剤. 表面科学, **21**, 376-381 (2000).
- 5) Sakurai T, Misaka T, Nagai T, Ishimaru Y, Matsuo S, Asakura T, Abe K. pH-Dependent Inhibition of the Human Bitter Taste Receptor hTAS2R16 by a Variety of Acidic Substances. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 2508-2514 (2009).
- 6) Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*. **100**, 703-711 (2000).
- 7) 芳仲幸治, 竹村優子. 高甘味度甘味料スクラロース・ソーマチンの農畜水産加工品への応用. FFI ジャーナル, **215**, 333-337 (2010).
- 8) Breslin PA, Beauchamp GK. Suppression of bitterness by sodium: variation among bitter taste stimuli. *Chem. Senses.*, **20**, 609-623 (1995).
- 9) Keast RS, Canty TM, Breslin PA. The influence of sodium salts on binary mixtures of bitter-tasting compounds. *Chem. Senses.*, **29**, 431-439 (2004).

- 10) Manabe Y, Kuroda K, Imaizumi M, Inoue K, Sako N, Yamamoto T, Fushiki T, Hanai K. Diazepam-binding in hibitor-like activity in rat cerebrospinal fluid after stimulation by an aversive quinine taste. *Chem. Senses.*, **25**, 431–439 (2000).
- 11) Yamamoto T, Sako N, Maeda S. Effects of taste stimulation on beta-endorphin levels in rat cerebrospinal fluid and plasma. *Physiol. Behav.*, **69**, 345–350 (2000).
- 12) Harder DB, Whitney G, Frye P, Smith JC, Rashotte ME. Strain difference among mice in taste psychophysics of sucrose octaacetate. *Chem. Senses*, **9**, 311–323 (1984).
- 13) 河合崇行. 動物行動学に基づいた美味しさの評価およびリック計測器の開発. *食糧*, **49**, 1–20 (2011).