

脂質・セルロース膜の味物質応答

林 健司・脇田 靖浩*・森山 和明

(受理 平成7年5月31日)

Responses to Taste Substances of Lipid and Cellulose Membranes

Kenshi HAYASHI, Yasuhiro WAKITA and Kazuaki MORIYAMA

Abstract

Lipid and ion exchange cellulose were examined for transducer materials of a taste sensor. A biomembrane is a receptor of taste stimuli. The membrane was composed of lipid, protein and glycocalyx, so that lipid and cellulose materials were adopted in the present study. Present transducers can detect four out of five basic tastes, except for sweet substances. It is noticeable that ethanol can be detected with the lipid/cellulose membrane. Furthermore, transient responses of membrane potential can be easily measured in the cellulose contained membranes because of the hydrophilic surface of the membrane. With this membrane, the degree of saltiness can be quantified through waveform analyses of the responses.

1. はじめに

現在、味をセンサにより計測する試みは、脂質膜をトランスデューサとしたマルチチャンネル型味覚センサにより実現に近づいている^{1,2)}。マルチチャンネル型味覚センサは、味受容において生体膜の構成成分のうちの脂質部位が重要であるという考えに基づき、複数の特性の異なる脂質膜をトランスデューサとして用意し、そこから得られる電位パターンが持つ情報から味を判断する。このセンサは非常に感度が高く、人間の味覚を超える部分もある。しかしながら、甘味物質や苦味物質の一部には応答感度が悪いこと、感度が高いものについても味強度の定量性に不十分な点があるなど改良すべき余地を残している。

本研究では、トランスデューサ材料としてイオン交換セルロースに着目した。生体膜の主要構成成分は脂質とタンパク質であり、マルチチャンネルセンサは脂質をトランスデューサ材料に用いている。タンパク質は人工膜に導入し再構成することが困難で、センサに用いることは今のところ現実的でない。一方、生体膜表

面は電荷を有する糖鎖で覆われており、この糖鎖は生体において重要な働きをしていると考えられている³⁾。本研究においてもセルロース膜を用いることでその可能性を確かめた。

さらに、本研究では膜電位の過渡応答から味に関する情報を引き出すことを試みた。実用的な味覚センサの実現は、トランスデューサである膜から、味に関する情報をどれだけ多く得ることができるかが鍵を握っている。マルチチャンネル型味覚センサでは膜電位の静止特性を情報とし、チャンネルの数を複数にして味のセンシングを行っている。しかし、我々が味を感じるのに1秒とかからないことから分かるように、膜電位が定常状態に達するまでの過渡的部分にも味の情報が含まれる可能性が考えられる^{4,5)}。また、マルチチャンネル型味覚センサでは、味の強度といった点で人間のものと完全な一致が得られていない。生物の嗅覚や視覚においては動的な情報が重要であることが示唆されている^{6,7)}。味覚においては過渡的な受容器電位応答が味覚に果たす役割は明確ではない。また、マルチチャンネル型センサではチャンネル数を増やすことで情報を増

やしているが、さらに動的な応答、すなわち時間軸に折り込まれた情報を引き出してやることで、味の識別能力がさらに高くなることが期待される。本研究で用いた脂質セルロース膜は比較的容易に膜電位の過渡応答を計測可能であり、その味計測への応用の可能性を調べた。

2. 実験

2.1 トランスデューサ膜の作製

本研究で用いた脂質およびイオン交換セルロースを含むトランスデューサ膜は次のような手順で成膜した。まず、テトラヒドロフランにポリ塩化ビニル (PVC) を150mg溶かし、可塑剤としてリン酸トリクレジル (TCP) を0.5ml加える。その中に、表1に示した脂質、およびセルロースを加える。これをシャーレに移

表1 膜材料の配合比

膜番号	(C ₈) ₂ POOH	Pセルロース	DEAEセルロース
1	0.2ml		
2	0.2ml	200mg	
3		200mg	
4			200mg
5	0.2ml		200mg

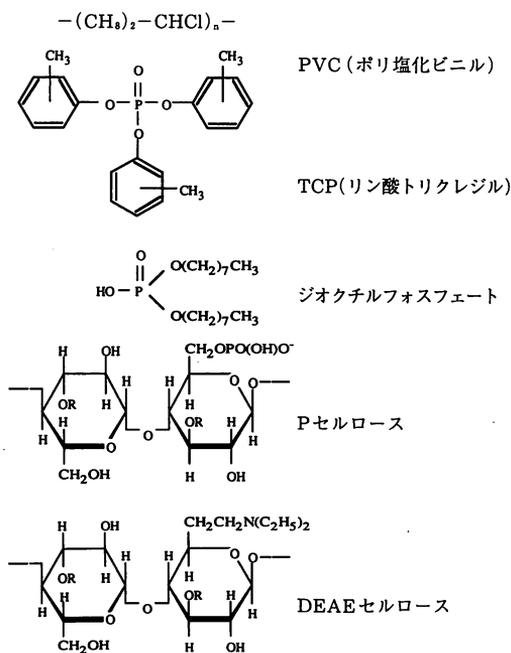


図1 膜材料の構造

し、一晚放置して溶媒を揮発させる。このようにして、5種類のフィルム状の膜を製作した。1の膜は透明であるが、セルロースを含む膜については可塑剤と高分子膜中にセルロースが溶け込み難いため、膜表面近くに分散し、白濁した膜であった。なお膜に用いた脂質、セルロース、可塑剤などの構造式は図1のとおりである。本研究では、陽イオンの交換体としてPセルロース (官能基: リン酸基)、陰イオンの交換体としてDEAEセルロース (官能基: ジエチルアミノ基) を使用した。イオン交換セルロースはセルロース粉末に各種の解離性置換基を導入しイオン交換の性質を持たせたセルロース誘導体である。本研究ではセルロースと糖などの非電解質性との相互作用、さらにイオン交換基を介した電気的な応答の可能性を調べた。

2.2 濃度依存性測定

濃度依存性を測定する場合、高濃度の被測定溶液を基準液に添加し目的の濃度とした。基準液として、10mM KClを用いた。測定溶液中にも同濃度のKClを混入し、常に等KCl濃度となるようにした。電位測定は濃度を変化させた後、2分で行った。用いた味物質は、塩味: NaCl, 酸味: HCl, 苦味: キニーネHCl, 甘味: ショ糖, うま味: MSG (グルタミン酸ナトリウム), その他: エタノールである。

電極にはマルチチャンネル型電極を用いた。参照電極はAg/AgCl+飽和KCl電極である。電位変化は高入力インピーダンスのマルチチャンネル増幅器を通し、スキャナで切り替えながらデジタルボルトメータ (横河7562) により測定し、コンピュータに取り込んだ。

2.3 過渡応答測定

図2に示す電極を用いて、イオン交換セルロース膜によって過渡応答測定を行った。電極は、アクリル板に測定用電極と参照電極を埋め込んだものである。脂質膜では膜表面が疎水性であり、溶液中でなければ膜に直接味刺激を与えることができなかった。しかし、セルロース膜は表面が親水性のため、比較的容易に過渡応答測定が可能になった。膜表面は濾紙を介して図のように参照電極との電気的な導通状態を得る。この膜表面に味刺激を与え、応答を測定する。

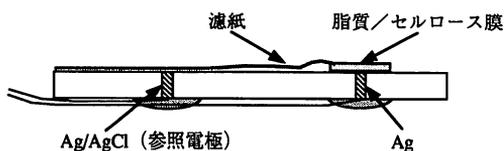


図2 過渡応答測定用電極

測定の手順は次の通りである。まず、基準液として 10mM KCl を用いた。測定電極の電位を 50ms 間隔でコンピューターに取り込み、スポイトで味溶液を 1 滴膜上に滴下した。滴下後の 5 秒間の過渡応答波形を取り込んだ。この後、すぐに電極を基準液で洗浄し、再び測定を繰り返した。

この測定法は次の点でセンサとして優れている。

1. 基準電極がいわゆる電気化学で用いられる参照電極である必要がなく、電極の構造が非常に簡単である。
2. 過渡応答を情報とするため、測定に要する時間が特に短い。
3. 短時間測定であるため、化学センサとして問題となることが多いトランスデューサ膜の汚染、劣化が少ない。

今回の過渡応答測定は、塩味強度の定量を目的として行った。同濃度における NaCl, NH₄Cl, LiCl, KCl の 4 種類の物質は似た塩味を呈するものの、その強度に差があることが人間の官能検査の結果から分かっている。従来の人工脂質膜を用いたマルチチャンネル型センサによる膜電位の定常値の測定では、その値が人間のものと一致せず、強度の情報は過渡応答部分にあるのではないかと考えている。そこで、この 4 種類の塩味物質について過渡応答測定の実験を行った。

3. 結 果

3.1 5 基本味に対する応答の濃度依存性

5 基本味に対する電位応答の濃度依存性（膜別の平均値）を図 3 に示す。図中では、場合によって (C₈)₂ POOH を (C₈)₂, P セルロースを P, DEAE セルロースを DEAE と略記する。甘味以外の 4 つの味（塩味、酸味、苦味、うま味）に対しては濃度の増加に対して電位応答が増加する。甘味に対する応答は小さかった。イオン交換セルロースの交換基により甘味への応答を期待したが、甘味の応答機構、吸着サイトなどの研究も含めて甘味を高い感度で検出できるセンサの研究は今後の課題である。応答の大きさだけを考えると、脂質のみの 1 の膜がもっとも大きく応答した。どの膜についてもいえることであるが、電解質によって応答が現れると考えられている塩味、酸味の応答が大きいものとなっている。1 の膜では苦味に対する応答が大きいことが特徴である。また、応答の極性をみてみると (C₈)₂ POOH のみの膜と P セルロースを用いた膜は電位が正の方向に反応し、DEAE セルロースを用い

た膜は逆に負の方向に反応している。これは、膜表面の電荷の極性を反映した結果である。

次に、各味質に対する応答を検討してみる。まず塩味に対する応答であるが P セルロースの膜以外は対数濃度に対して応答が直線的に増加している様子が分かる。P セルロースの膜は高濃度になると応答が飽和し、応答が減少に転じている。これは膜の荷電密度が小さく、膜透過性が高いことが原因であると考えられる。酸味に関しては塩味よりも応答の刺激閾値が低く、100 μM から急激に応答が増加する。同濃度では正に荷電した膜、すなわち 4 と 5 の膜のアニオンへの応答は現れない。

電位変化はまず脂質やセルロースの親水基が水溶液中で解離し正負いずれの電荷を持つかに最も左右される。負に荷電した膜と考えられる 1 から 3 の膜は、もともと負であった膜の表面電位が味物質の陽イオンの濃度上昇により中和され、膜表面電位が消失する方向（零の方向）への反応となり、初期電位からの相対反応値は正方向への変化となる。4, 5 の膜は逆方向の電位反応となっているため、この 2 つの膜は極性が正の膜と考えられる。塩味に関してはこのことが特に顕著に現れている。

次に苦味への反応をみてみると、脂質だけの膜にくらべてセルロース膜、脂質とセルロースを混入した膜は反応がかなり小さい。苦味物質は生体膜の疎水性部位に吸着すると考えられている。また苦味アルカロイドの中には、キニーネやストリキニーネのように中性溶液中で正の電荷を有するものが多い。味受容膜表面は負の電荷を有するので、正電荷を有する苦味物質は味受容膜に特に吸着しやすく、従って味覚閾値濃度が低い。これまでの味覚センサの実験で用いられてきた人工脂質膜もキニーネ HCl などの苦味に対する感度は非常に高い。1 の膜も苦味の反応閾値濃度が最も低い。しかしながら、他の味にくらべて苦味だけに敏感に反応するというのでは優れた味覚センサであるとはいえない。今回の実験で、親水性の解離基を持ち、膜の表面を親水性にするイオン交換セルロースを膜に混入したことで膜の親水性部位の割合が増し、苦味の疎水性吸着が減少する結果が出たといえる。いい換えると、苦味の疎水性吸着という説を裏付ける結果が得られたともいえる。今後は、この反応のバランスを考慮することによりセンサの感度を調節することが可能で、より人間の味覚に近い特性を持たせることが可能であると思われる。

甘味は、応答値が他と比べて非常に小さいものであるため、はっきりと甘味の応答であるとは言えない。うま味物質として用いたMSGはナトリウムイオンを含むため塩味の応答と比較してどのような差が出るかが興味ある点である。うま味に関する電気生理学的実験は、ラット、マウス、ハムスター、イヌなどを用いて行われてきたが、MSGに対する応答がうま味応答

か塩応答なのかを区別することが困難であった。今回の実験結果をみると、濃度範囲は違うものの、特に1の膜について明らかに応答の濃度依存性が異なっている。中濃度領域までは負方向に応答値が変化しているが、その後正方向に転ずる。うま味物質は味受容膜に吸着する¹⁾。これと、Na⁺イオンによる静電相互作用のバランスにより今回の電氣的応答特性になっている

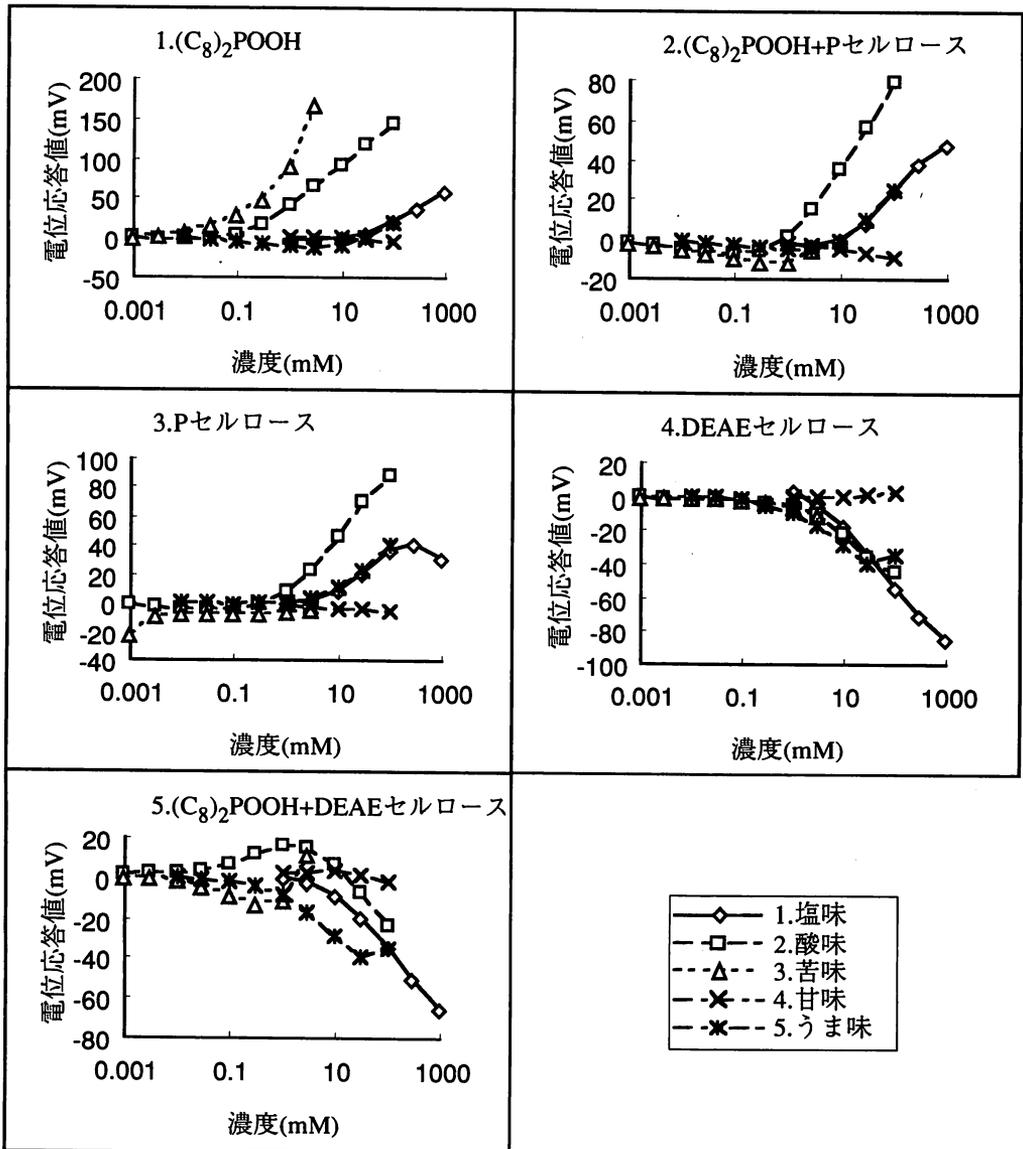


図3 5 基本味物質応答

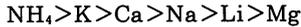
ものと思われる。

3. 2 エタノール応答

エタノールに対する応答の濃度依存性を図4に示す。今回の測定結果から、エタノールに対する応答が確認できた。図から分かるように5の膜が他の膜に比べ最も大きく応答している。5の膜は脂質と DEAE セルロースの混合膜である。この膜は今回使用した膜のうち唯一、極性が負の脂質と正のセルロースという極性の異なる物質を混入した膜である。エタノールは電荷を持っていないが、その疎水基でもって脂質膜内に浸透し、膜抵抗を変えるとともに膜の電荷密度を変化させ、これが膜電位変化の原因となると考えられる。5の膜は正負両方の電荷を持つため、膜は中性に近づき、エタノールが侵入しやすく、膜と相互作用できることが理由であると思われる。しかしながら、このように大きな電位応答が非電解質によって生じるメカニズムは現在のところ不明であり、今後の課題である。

3. 3 塩味物質応答

塩の味質は陽イオンと陰イオンの両者に依存する。陽イオンのみについて考えてみると、塩味強度は簡単には、次の序列にまとめることが可能である。



本研究では NaCl, NH₄Cl, KCl, LiCl の4種類についてその塩味度の定量を試み、実験を行った。

(1) 応答パターン (静的応答特性)

4種類の塩味物質に対する応答の濃度依存性はどれも似たようなものであった。全ての塩味物質について Pセルロース膜を除いて対数濃度に対して応答が直線的に増加する。Pセルロースのみの膜は、NaClと同様に高濃度領域で応答が飽和し、減少に転じる傾向がみられた。図5に濃度300mMにおける応答パターンを示す。同じ塩味物質であるから応答のパターンは似

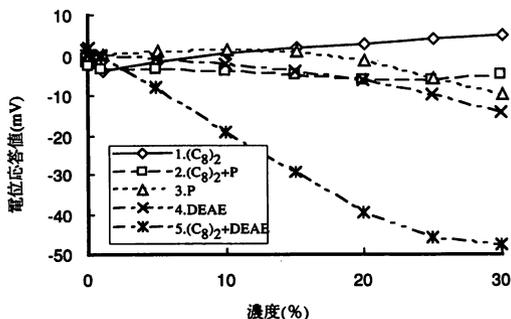


図4 エタノールに対する応答パターン。チャンネル1から5は表1に示した膜に対応

たものとなっている。これは従来のマルチチャネル型味覚センサの結果と同じである。実験で用いた塩味物質は、全てアニオンがClのものを用いているため、正荷電膜である4, 5の膜は物質の差が小さく、さらに陰イオン交換体である DEAE セルロースのみの4の膜はその差が最も小さくなっていることがわかる。

脂質のみの1の膜では4つの塩味物質の応答値に差がみられるが、応答の順位は先に述べた塩味強度の序列とは一致していない。1の膜では、実験に用いた4種類の物質のうち最も塩味度の低い LiCl の応答値が大きく出ている。LiCl 応答が小さければ塩味度の序列と一致することになるが、ここで Pセルロースのみを含む3の膜をみても、逆に LiCl が最も小さいことが分かる。従って、脂質とセルロースの割合を調整することによって塩味強度を再現できるのではないかと考えられる。

(2) 過渡応答 (動的応答特性)

本研究ではイオン交換セルロースを膜材料に用いたことで膜表面に直接刺激を与える過渡応答測定が可能

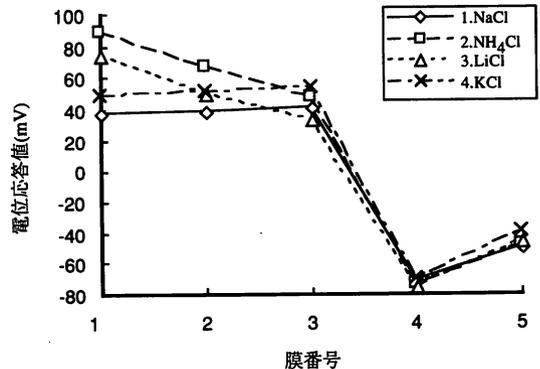


図5 各種塩味物質に対する応答パターン

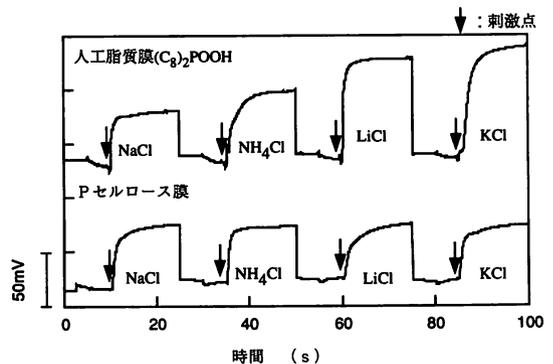


図6 脂質膜とPセルロース膜の電位の過渡応答

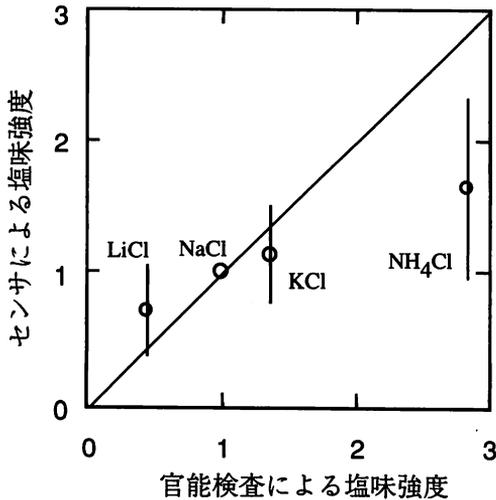


図7 過渡応答による塩味強度の定量。NaClを1としたときの相対的な強度。図中の縦の棒線は標準偏差を表す。

となった。過渡応答の測定方法という点で本研究で用いた膜および方法は、人が舌で味わうのと同じような刺激方法を用いている。

4種類の塩味物質を用いてその過渡応答波形を測定した(図6)。人工脂質膜による過渡応答波形では定常的な応答値に物質による差が出ているものの、これは人間の感じる塩味強度とは一致しない。一方、Pセルロースのみの膜の過渡応答は図6のように応答の定常的な値に物質の差がほとんどない。この過渡応答部分の解析、定量化を行った。

図7は、過渡応答波形において刺激点から1秒間の電位変化の積分値を取り、NaClを1として相対的な強度をそれぞれ算出して比較したものである。横軸は人間の感じる塩味強度(塩味強度)を表し、縦軸はセンサによる定量結果である。図から、人間の感じる強度と実験結果に相関関係がみられることが分かる。このような結果は、人間の感覚受容のメカニズムを探る上からも興味深い。しかし、塩味強度の大小関係は判るものの定量された強度にばらつきが大きく、実用的な味覚センサに用いるためには、過渡応答を再現性良く定量化する改良が必要である。なお、脂質膜の場合は定常値の差が過渡応答の波形解析値に大きく反映されるため、塩味強度の定量はできなかった。

4. 検 討

本研究により、脂質膜と同様にイオン交換セルロース膜は味覚センサのトランスデューサ材料として有用であることが判った。すなわち、セルロース膜から得られる情報は脂質膜から得られる情報とは異なるものであり、セルロース膜を用いることでマルチチャネルセンサの情報を増やすことが出来る。

さらに、過渡的な応答を情報として用いることにより、静的な応答値では出来なかった塩味強度の定量化の可能性が確かめられた。このようなダイナミックな情報を用いることは、センサの高感度化、多機能化につながると思われる^{10,11)}。従来のセンサの多くは定常値を測定値とするものが多いが、過渡応答を情報とするセンサは前述したとおり、いくつかの利点がある。また、この結果は味受容における受容器電位の過渡的な変化の重要性を示唆することになると考えられる。

一方、イオン交換セルロース膜を用いた目的の一つである糖への応答は確認できなかった。これは、甘味を呈する糖が単糖や2糖類であるため、セルロースとの相互作用の強さが十分でない事が理由として考えられる。さらに、たとえ相互作用により解離基の状態が変化したとしても電位変化として現れるには膜の透過性が高く、界面電位の変化が膜電位変化としては現れにくいことも理由として挙げられる。このように、今後の課題として残る甘味の高感度検出については、膜の表面状態を計測する必要があると考えられる¹²⁾。

謝 辞

本研究を進める上で貴重な示唆を九州大学の都甲博士から頂いた。ここに記して感謝の意を表す。また、本研究の一部は電気通信フロンティア研究開発による研究の成果である。

References

- 1) 都甲編：味覚センサ 朝倉書店(1993)。
- 2) K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko and K. Yamafuji: Sens. Actuators, B2, 205 (1990)。
- 3) 松尾ほか：日経サイエンス, 23(4), 16 (1993)。
- 4) H. Ogawa, S. Yamashita and M. Sato: J. Neurophysiol., 37, 443 (1974)。
- 5) T. Nagai and K. Ueda: J. Neurophysiol., 45, 574 (1981)。
- 6) C. A. Skarda and W. J. Freeman: Behav. Brain Sci., 10, 161 (1987)。

-
- 7) C. M. Gray, P. Konig, A. K. Eengel and W. Singer: *Nature*, 338, 334 (1989).
 - 8) C. Pfaffmann: *Handbook of Physiology*, 1-1, 507 (1959).
 - 9) M. Murata et al.: *Sens. Materials*, 4, 81 (1992).
 - 10) S. Iiyama et al.: *Sens. Materials*, 4, 21 (1992).
 - 11) K. Hayashi, K. Toko and K. Yamafuji: *Jpn. J. Appl. Phys.*, 28, 1507 (1989).
 - 12) K. Hayashi: *Sens. Materials*, 7, 203 (1995).