



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	メタロチオネイン-Ⅰ,Ⅱおよび血漿亜鉛が味覚嫌悪行動に及ぼす影響 : 129/Sv マウスを用いた行動生理学的研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	保浦, 七愛
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14527号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81192
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Nanae_Yasuura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 保浦 七愛

学 位 論 文 題 名

メタロチオネイン-I, II および血漿亜鉛が味覚嫌悪行動に及ぼす影響
-129/Sv マウスを用いた行動生理学的研究-

キーワード(5つ) メタロチオネイン, 亜鉛, Conditioned taste aversion (CTA),
味覚, 129/Sv マウス

本研究はメタロチオネイン (MT) - I, II 欠損と亜鉛動態が味覚嫌悪 (CTA) 獲得
に与える影響を明らかにすることを目的として行った。

MT の4つのアイソフォーム (MT- I, II, III, IV) の中で, MT- I, II はほと
んどの組織で発現しており (Palmiter et al., 1993 ; Palmiter, 1987), 細胞内に流入
した亜鉛をキレート化することにより細胞内亜鉛濃度を低濃度に維持する機能
を担っている (Kimura & Kambe, 2016). 逆に細胞内亜鉛が不足すると MT- I, II
は分解されて速やかに亜鉛を遊離する. MT の生理機能は多岐にわたっており,
細胞内亜鉛の貯蔵庫としての機能をはじめ, DNA 損傷からの保護, 活性酸素の
除去, アポトーシスの回避, および重金属の解毒作用があるとされる (Santos et

al., 2012). 中枢神経系の MT-I,II が認知機能の調節に関与していることも報告されている (Itoh et al., 2010). これらの先行研究から, MT と亜鉛が CTA の獲得に何らかの役割を果たしているのではないかという仮説に基づいて実験計画を立案した.

実験動物として 129/Sv マウス (雄 65 匹, 雌 29 匹, 実験開始時に 8~15 週齢) を用いた. 野生型マウス (WT, 47 匹) と MT- I ,II 遺伝子ノックアウトマウス (KO, 47 匹) を実験に供した. WT 群および KO 群の各群のマウスについて, 通常餌 (固形飼料, CE-2, 日本クレア, Zn, 6.87mg/100g) で飼育した群 (WT-N, KO-N) と, 低亜鉛餌 (特注固形飼料, 日本クレア, Zn, 0.07mg/100g) で飼養した群 (WT-D, KO-D) に分けて実験を行った.

最初に甘味および苦味嗜好性の評価を行った. サッカリン溶液の摂取経験がある通常餌マウスは 0.0125~0.4%, 低亜鉛餌マウスは 0.0125~0.2%のサッカリン溶液と蒸留水を 2 瓶で 48 時間呈示し, 各液の摂取量を測定してサッカリン嗜好率 (サッカリン摂取量/総飲水量) を算出した. 塩酸キニーネ (0.5, 1.0 mM) でも同様方法で嗜好率を算出した.

次に、味覚嫌悪学習（CTA）獲得について、1 瓶法と 2 瓶法を用いて実験を行った。味覚条件付けのための条件刺激（CS）として 0.1 または 0.2% サッカリン溶液を同型の給水瓶に入れて 15～30 分間呈示した。その後できる限りすみやかに無条件刺激（US）として 0.15M 塩化リチウム（2% 体重、腹腔内注射）または 0.3M 塩化リチウム（1% 体重、腹腔内注射）を行い、CS と US の対呈示による条件付けとした。1 瓶法ではサッカリン溶液の摂取量で、2 瓶法では蒸留水とサッカリン溶液の摂取量の比でそれぞれ CTA の獲得について評価を行った。

一部のマウスにおいては、採血してメタロアッセイ（Metallogenics Co., Ltd）を用いて、自由摂餌群と 20 時間絶食後に 2 時間の摂食時間を設けた群について、血漿亜鉛濃度の測定を行った。

得られたデータは系統と日数の 2 要因分散分析によって解析し、主効果あるいは交互作用が有意であった場合は下位検定としてボンフェローニの多重比較検定を行った。系統と飼料との関係については、2 要因分散分析によって解析し、系統、飼料、および日数の関係については 3 要因分散分析とボンフェローニの多重比較検定を行った。更に、サッカリン嗜好率の解析の基準である 0.5 に対する各群の嗜好率については Student's t 検定を行った。

129/Sv マウスの味覚嗜好性の実験において、WT-N 群は 0.2%サッカリンで嗜好率が 0.68 で最大となり、その他の濃度では 0.5 前後であった。なお、KO-N 群のサッカリン嗜好率は 0.05, 0.1, 0.2%の濃度でそれぞれ 0.82, 0.85, 0.86 と高いサッカリン嗜好性を示した。低亜鉛餌群では WT-D 群で 0.1, 0.2%、KO-D 群で 0.05, 0.1, 0.2%サッカリン溶液に対し、高いサッカリン嗜好性を示した。塩酸キニーネ溶液 (0.5, 1.0 mM) に対する嗜好性については、いずれの実験群においてもキニーネ嗜好率は著しく小さく、全く嗜好性を示さなかった。

次に、CTA 獲得の解析を行ったところ、0.1%サッカリン溶液を CS とした 1 瓶法による実験では CTA の獲得を認めなかった。0.2%サッカリン溶液を CS とした 1 瓶法による実験では、WT 群と KO 群において、サッカリン摂取量は有意に減少した ($F(2, 44) = 98.80, p < 0.05, n = 12$)。0.2%サッカリン溶液を CS とし、2 瓶法による実験では、通常餌で飼育した WT マウス (WT-N) と KO マウス (KO-N)、低亜鉛餌で飼育した WT マウス (WT-D) と KO マウス (KO-D) の 4 群において、テスト 1 日目のサッカリン嗜好率の平均値は、WT-N, 0.33 ; KO-N, 0.52 ; WT-D, 0.44 ; KO-D, 0.23 であり、WT-N 群のサッカリン嗜好率は 0.5 より低く、かつ統計学的に有意差を認めたが ($p < 0.05, n = 5, t$ 検定), WT-D 群

については 0.5 より低い値であるものの、統計学的有意差を認めなかった。一方、KO-N 群のサッカリン嗜好率は 0.5 より高く、KO-D 群の嗜好率は 0.5 より低かったが、統計学的に有意ではなかった。系統と飼料を要因とした 2 要因分散分析を行ったところ、交互作用が有意であった ($p < 0.05$, $n = 5$)。ボンフェローニの多重比較検定を行ったところ、KO-D 群のサッカリン嗜好率は KO-N 群より有意に低いことがわかった。テスト期間におけるサッカリン嗜好率の変化について比較すると、WT-N 群、WT-D 群および KO-D 群ではサッカリン嗜好率がテスト 1 日目と 2 日目で 0.5 より低く、CTA 獲得を認めた。更に各群をサッカリン嗜好率 0.5 と比較し、Student's t 検定で解析したところ、WT のテスト 1 日目のサッカリン嗜好率は 0.5 より有意に低い事が明らかとなった ($p < 0.05$, $n = 5$)。一方、KO-N 群ではいずれのテスト日においてもサッカリン嗜好率が 0.5 以上を示し、CTA の獲得は無いと判定した。以上の結果から、低亜鉛餌による血漿亜鉛濃度の低下は CTA 獲得に影響しないことが明らかになった。

マウスの血漿亜鉛濃度については、自由摂餌させた WT 群と KO 群のマウスの血漿亜鉛濃度に有意差を認めなかった。一方、20 時間の絶食後に 2 時間摂食させた場合、WT 群の血漿亜鉛濃度は自由摂餌させた場合より低値になり、KO

群においては自由摂餌の場合と同程度であった。

本研究は MT- I, II 欠損マウスを用いて, MT および血漿亜鉛濃度の変化が CTA 獲得に与える影響について調べ, MT 欠損マウスは WT マウスと比較してサッカリンに対する嗜好性が高いこと, および, 通常餌で飼育した場合には WT マウスは CTA を獲得するが, MT 欠損マウスは WT マウスと比較して CTA の獲得が減弱することが明らかになった。さらに, 低亜鉛餌で飼育した場合には, MT 欠損マウスも強い CTA を獲得することが明らかになった。これらは MT および血漿亜鉛濃度が CTA 獲得に与える影響に関する新たな知見であり, 今後の研究の発展に大きく貢献できるものと確信する。