



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14527
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93676
Type	doctoral thesis
File Information	Nanae_Yasuura.pdf



博 士 論 文

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－

令和 3 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

保浦 七愛

序 論

1. メタロチオネイン (MT) とは

メタロチオネイン (MT) はカドミウムと結合するタンパク質としてウマの腎皮質から発見された (Margoshes, M.L. & Vallee, B.L., 1957) . その後, MT を構成するアミノ酸残基の約 1/3 を占めるシステインに重金属との結合能があることが解明され, カドミウムの他, 亜鉛, 銅, 水銀, 銀, 白金との結合能が明らかにされた (Nielson, K. B., et al., 1985) . MT の生理機能は多岐にわたっており, 亜鉛や銅などの微量元素の恒常性維持, DNA 損傷からの保護, 活性酸素の除去, アポトーシスの回避, 重金属の解毒作用があるとされる (Klaassen, C.D., et al., 2009 ; Krężel, A. & Maret, W., 2017 ; Santos, C.R.A., et al., 2012) . MT には 4 つのアイソフォーム (MT- I, II, III, IV) が存在し, MT- I, II は成長発育段階からほとんどの組織に存在し (Palmiter, R.D., 1987 ; Palmiter, R.D., et al., 1993) , MT- III は主に脳の神経細胞に局在し (Masters, B.A., et al., 1994) , MT- IV は重層扁平上皮に局在を認める (Quaife, C.J., et al., 1994) . 中枢神経系における MT- I, II は主に星状細胞で検出されるが, それらの発現量は, 外傷性, 外毒性, および虚血性/低酸素性損傷などにより増加することが報告されており, 中枢神経系のニューロンを保護する作用があるとされる (Rebollar, D.J., et al., 2017) . また, MT- I, II は脳の認知機能の調節に関与しており, MT- I, II の発現が細胞内亜鉛によって調節を受けることも明らかにされている (Itoh, T., et al., 2010) .

2. メタロチオネイン (MT) と亜鉛動態

細胞内の亜鉛濃度は非常に低く 0.1~1.0nmol/l 以下に維持されている (Tatsumi, T. & Fliss, H., 1994 ; Kimura, T. & Kambe, T., 2016) . 細胞内亜鉛濃度の調節には, MT などの金属タンパク質との結合や, 細胞内小器官および小胞への取り込みなどが関与している. 細胞内亜鉛濃度が高くなると MT- I, II は, 細胞内で亜鉛とキレート化し, 反対に細胞内亜鉛が不足している場合に MT- I, II は分解されて速やかに亜鉛を遊離し, 細胞内亜鉛濃度は一定に保たれる. 一方, 脳細胞に局在する MT- III は, 細胞内亜鉛が不足しても分解されない (Palmiter, R.D., 1995) .

体内の総亜鉛量の主な調節は腸管における吸収と糞便中への排泄により行われる (Maarea, M. & Haase, H., 2020) . 腸管での MT 発現量は食餌中の亜鉛含有量が増加すると上昇し, 腸管の亜鉛蓄積量も MT 合成量に依存する (Richards, M.P. & Cousins, R. J., 1975) . しかし, 高濃度亜鉛を経口投与した場合に MT は腸管での亜鉛吸収効率を低下させるという報告もある (Davis, S.R., et al., 1998) . 腸管の細胞内に亜鉛を取り込む役割を果たすのは, 亜鉛トランスポーター (ZnT, ZIP) である (Cousins, R.J., 2010) . 細胞によっては他の亜鉛トランスポーターが存在しており, MT と共に亜鉛ホメオスタシスに関わっている. 亜鉛は, 細胞内シグナル伝達酵素や転写因子など, 多くのタンパク質における必須構成成分である (Vallee, B.L. & Auld, D.S., 1993) . 遺伝子発現を調節する働きをする多く

の転写因子が DNA に結合するためには、補酵素として亜鉛が必要である。したがって、細胞内の亜鉛濃度は亜鉛トランスポーターや亜鉛結合分子によって厳密に制御されている（Eide, D.J., 2004；Cousins, R.J. & McMahon, R.J., 2000）。

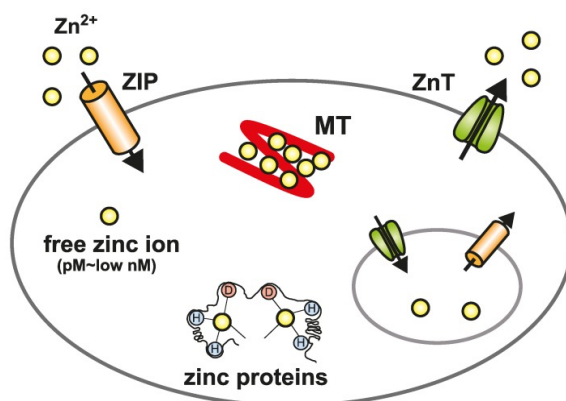


Fig.1 メタロチオネインの細胞内亜鉛濃度の調節（Kimura, T. & Kambe, T., 2016）

亜鉛の細胞内への流入は ZIP（亜鉛トランスポーター）を介して、細胞内から細胞外への流出は ZnT（亜鉛トランスポーター）を介して行われる。細胞内に亜鉛が流入すると、MT が誘導され亜鉛と結合する。更に、必要に応じてその他の亜鉛タンパク質との結合や、各細胞小器官への亜鉛分配などにより、細胞内亜鉛濃度は低値に保持される。

3. MT および亜鉛による生理機能の調節

必須微量元素である亜鉛は、味覚、免疫、生殖機能、皮膚・毛髪の維持、成長発育、精神や行動への影響など多くの生体機能に関与している（Yanagisawa, H., 2004；MacDonald, R.S., 2000）。亜鉛は海馬や扁桃体を含む大脳辺縁系に高度に分布している（Fjerdingsstad, E., et al., 1974；Hesse, G.W., 1979；Cuajungco, M.P., & Lees, G.J., 1997）。亜鉛欠乏やメタロチオネインの欠損で空間学習能力が低下することが報告されている（Yoshida, M., et al., 2011）。亜鉛欠乏症では体重減少、脱毛、下痢、味覚障害などの様々な症状が起こるとされるが（Prasad, A.S., 1985）、MT とこれらの症状との関連は不明である。

4. 亜鉛と味覚障害

味覚障害には、全く味を感じない「無味症」や味全般の感受性が低下した「味覚減退症」、特定の味のみがわからない「解離性無味症」、味の感受性が亢進した「味覚過敏症」、ある味を別の味質に感じる「異味症」などがある（Ackerman, B.H., & Kasbekar, N., 1997）。味覚障害の原因には、薬剤の副作用、舌炎、味覚神経障害、口腔粘膜障害、高血圧、肝障害、がんなどの全身疾患がある（Heckmann, J.G. et al., 2003；Smith, F.R., et al., 1976）。亜鉛欠乏症も味覚障害の原因とされる

(Henkin, R.I., 1984) . 薬剤の副作用や食品添加物や防腐剤による亜鉛のキレート化や食事による亜鉛摂取不足により亜鉛が欠乏すると、細胞分裂が阻害され、味細胞のターンオーバー速度を低下させると考えられている (Ikeda, M., et al., 2008) . 亜鉛欠乏症と味覚障害のメカニズムについては不明な点が多かったが、最近、亜鉛欠乏に伴い亜鉛要求性酵素活性の低下が起こり、細胞外 ATP の分解が遅延することが明らかにされ、亜鉛欠乏症の様々な症状が細胞外 ATP 代謝の異常により引き起こされる可能性が示された (Takeda, T., et al., 2018, ; Idzko, M., et al., 2014) .

5. 齧歯類の 5 基本味に対する味覚嗜好性

味覚には甘味、苦味、酸味、塩味、うま味の 5 つの基本味がある。甘味はショ糖やブドウ糖などの糖類が呈する味であり、生体にとってエネルギー源を示すシグナルとなる。一般的に苦味は毒物のシグナルであり、酸味は腐敗物、塩味はミネラル、うま味はアミノ酸やタンパク質源のシグナルである。生物は栄養素の補給のために食物を摂取するが、基本的に甘味、塩味、うま味を呈する食物を好んで摂取し、苦味や酸味を嫌い、摂取を避ける (Scott, T.R., 1987). このような味覚嗜好性による摂食行動の調節はヒトと齧歯類に共通して見られる生得的な傾向である (Lemon, C.H., 2015) .

6. 味覚の生理学

味刺激は味細胞で受容され、味細胞で生じた興奮は味神経へ伝達されて、孤束核、結合腕傍核 (齧歯類の場合)、視床のニューロンを介して大脳皮質味覚野へ至る (Herbert, H., et al., 1990) . 味細胞には I, II, III, IV 型があるが、味覚受容に関わっているのは II 型 (甘味, うま味, 苦味) と III 型 (酸味, 塩味) であり、神経線維終末とシナプスを形成しているのは III 型細胞のみである (Banik, D.D., et al., 2020) . II 型細胞はシナプスを形成していないが、ATP を放出することにより味神経に味情報を伝えている (Taruno, A., 2013) . 正常なマウスはサッカリンナトリウム溶液 (以後サッカリン溶液という) に対して強い嗜好性があり、他の人工甘味料よりも甘味受容体への作用が強いとされる (Sclafani, A., et al 2010) . 本研究においても甘味溶液としてサッカリン溶液を用いているのは、カロリーの無い溶液を用いることにより、甘味だけの影響を調べるためである。

7. 条件付け味覚嫌悪 (Conditioned Taste aversion : CTA)

動物は未経験の食物を警戒し、直ぐに多く摂取しないよう注意深い行動をとるが、これは毒物の摂取を避けるための本能行動と考えられる。ラットやマウスにとって、通常の飼育では甘味物質の摂取は未経験のため、最初は警戒し、少量しか摂取しない。この現象を、新奇恐怖 (neophobia) と呼ぶ (Barnett, S.A., 1958) . 摂取経験を重ねていくうちに新奇恐怖は低減されて、すなわち安全学習を行い、

それが嗜好性のある物質の場合は次第に摂取量が増加する。新規の食物を摂取したあとに嘔吐などを経験すると、その後再びその食物を呈示されても摂食を拒否する現象を、条件付け味覚嫌悪、あるいは条件付け味覚嫌悪学習という (Garcia, J., et al., 1955 ; Ingram, D.K., 1982) 。本稿ではサッカリンナトリウム溶液 (甘味) による味覚刺激を条件刺激 (conditioned stimulus, CS) として与えた後に、塩化リチウムの腹腔内注射により誘発された内蔵不快感 (悪心) を無条件刺激 (unconditioned stimulus, US) として実験を行った。古典的な連合学習と異なり、味覚と内臓感覚の連合学習の場合、CS と US の対呈示を 1 回行うだけで CTA が獲得され、また CS を呈示してから数時間が経過してから US を呈示しても CTA が獲得される (Lamprecht, R., 1997) 。

8. 本研究の目的

上述のとおり亜鉛と味覚障害との関連や、MT と亜鉛が記憶・学習の脳機能に関連していることなどから、MT と亜鉛が味覚嫌悪学習の獲得にも関与している可能性があり、これを明らかにするために MT- I, II 欠損や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た。

方 法

本研究における全ての実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程 (平成 19 年 4 月 1 日海大達 61 号) に従って行った。

1. 実験動物の種類と飼育環境

実験動物として 129/Sv マウスの野生型 (WT, 雄性 37 匹, 雌性 10 匹, 実験開始時に 8 ~15 週齢) と MT- I, II 遺伝子欠損型 (KO, 雄性 28 匹, 雌性 19 匹, 実験開始時に 8 ~15 週齢) を合計 94 匹用いた。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) で飼育した群 (WT-D, KO-D) に分けて実験を行った。各群のマウスは個別にプラスチック製のケージ (225 x 338 x 140 c m) 入れて、室温 23℃, 湿度 60%, 12 時間毎の明暗サイクル (午前 7 時から明期, 午後 7 時から暗期) に設定された飼育室で飼育した。

2. 甘味および苦味嗜好性の評価

サッカリン溶液の摂取経験があるマウスを通常餌および低亜鉛餌で飼育した 2 群に分けた。各群のマウスにサッカリン溶液を入れた給水瓶と蒸留水を入れた給水瓶の 2 瓶を同時に呈示して 48 時間自由に摂取させた。給水瓶の位置の影響を除外するために、給水瓶呈示から 24 時間後に 2 本の給水瓶の位置を入れ替え

た．給水瓶呈示から 24 時間後と 48 時間後に各給水瓶の重量を測定して，呈示前の重量から換算して各液の摂取量を算出した．48 時間のサッカリン摂取量が総飲水量に占める割合（サッカリン摂取量が総飲水量）を算出して嗜好率とした（Fig 2）．給水瓶の位置への嗜好性を除外するために，24 時間で給水瓶の位置の入れ替を行った．また，サッカリン溶液の濃度を通常餌群，0.0125%～0.4%；低亜鉛餌群，0.0125～0.2%に変えて実験を行った．塩酸キニーネでも同様の方法を用いて苦味嗜好性を調べた．キニーネ溶液の濃度は通常のマウスの嗜好性が低下する濃度である 0.5 または 1.0 mM を用いた．

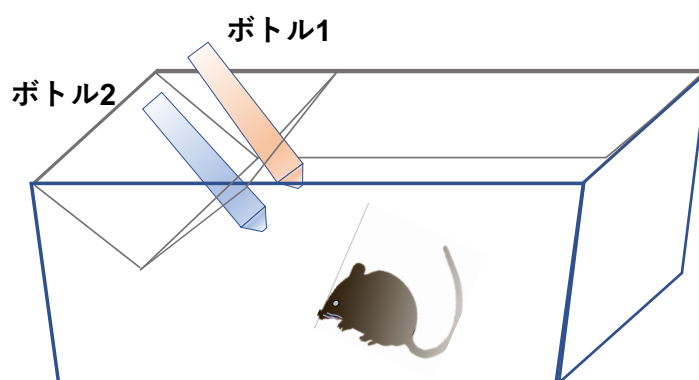


Fig. 2 甘味および苦味に対する味覚嗜好性の評価に用いた実験の概略図

ケージのサイズ：225 x 338 x 140cm

ボトル 1; 蒸留水

ボトル 2; 味溶液（サッカリンナトリウム溶液，0.0125，0.025，0.05，0.1，0.2，0.4%，または塩酸キニーネ溶液，0.5，1.0 mM）

餌は自由摂取

3. 味覚嫌悪学習（CTA）獲得の評価

CTA の獲得を評価する方法として，条件刺激として用いたサッカリン溶液に対する嗜好性の変化を測定する方法（1 瓶法または 2 瓶法）が一般的によく用いられる．1 瓶法はサッカリン溶液の摂取量で評価する方法であり，2 瓶法は蒸留水とサッカリン溶液の摂取量の比（嗜好率）で評価する方法である．2 瓶法の方が 1 瓶法よりも CTA 獲得の有無について検出力が高いとの見解もあるが，2 瓶法は 2 つの飲み口を実験動物が自由に選択できることから，飲み口の微妙な口当たりや設置場所等を覚えてそれらに嗜好性を示すことがデメリットとなる．1 瓶法で明確な CTA 獲得が評価できるのであれば，2 瓶法を行うまでも無く結論を導くことが可能である．本研究においては，これらの点を考慮して適宜 1 瓶法または 2 瓶法を用いてデータを取得し解析を行った．また，低亜鉛餌で飼育したマウスについても同様の実験を行った．

1) 1 瓶法を用いた CTA 実験プロトコール A

Fig. 3 に示すように、実験日 1~5 日をトレーニング期間、6 日をコンディショニング実施日、7 日を回復日、8~10 日をテスト日とした。全ての実験日において、マウスには 1 日当たり 20 時間絶水させた後、蒸留水を入れた給水瓶 (Fig. 5A) 1 瓶を 20 分間だけ呈示して飲水可能とした。この 20 分間だけでは 1 日に必要な水分量を摂取できないため、40 分間の絶水期間を挟んだ 180 分間において蒸留水を入れた給水瓶 1 瓶を呈示して飲水可能とした。各飲水期間の水分摂取量は給水瓶の重量変化を測定することで計測した。トレーニング期間には、給水瓶の金属の飲み口からの飲水に慣れさせることと、実験者によるハンドリングを行うことで実験者の操作に慣れさせるために行った。条件付けでは味覚条件付けのための条件刺激 (CS) として 0.1% サッカリン溶液を同型の給水瓶に入れて 20 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 塩化リチウムを体重の 2% 量で腹腔内注射を行い、CS と US の対呈示による条件付けとした。回復日には蒸留水のみを呈示した。テスト期間の 20 分間飲水可能期間に 0.1% サッカリン溶液を同型の給水瓶に入れて呈示した。

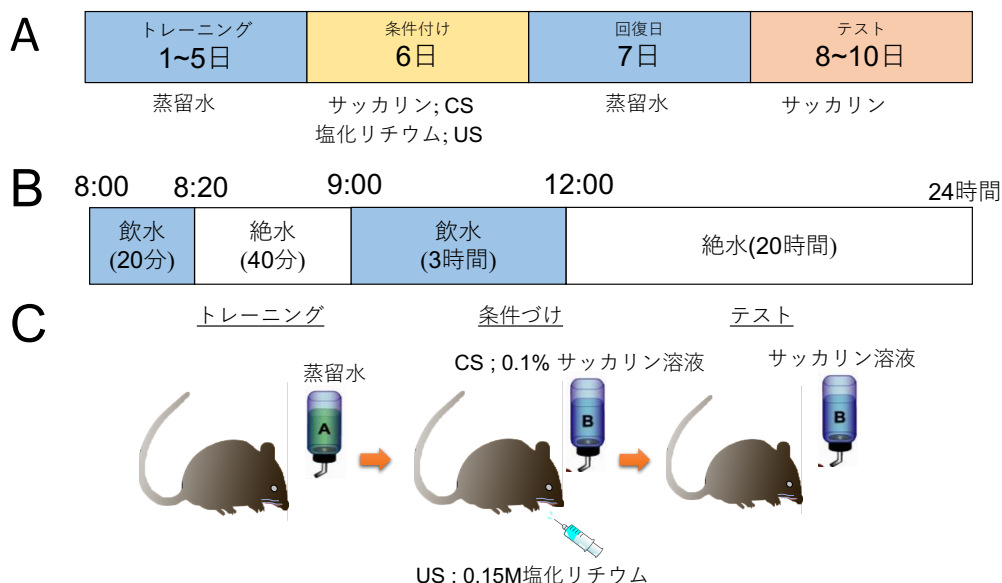


Fig. 3 1 瓶法を用いた CTA 実験プロトコール A

A; 実験日程

B; 実験期間における飲水スケジュール

C; マウスの条件付けとテスト方法

CS; 0.1% サッカリン溶液

US; 0.15M 塩化リチウム (2%体重, 腹腔内投与)

2) 1 瓶法を用いた CTA 実験プロトコール B

Fig. 4 に示すように、上述のプロトコール A の変法として、Fig. 5B に示す自作の給水瓶を用いて、絶水時間を 19 時間 45 分に、絶水後最初の飲水時間を 15 分間とした。その後の絶水時間を 120 分間、続く補水のための飲水時間を 120 分間とした。実験日 6 日と 8 日の計 2 回の条件付けを行った。CS は 0.2% サッカリン溶液、US は 0.3 M 塩化リチウムを体重の 2% 量で腹腔内注射することとした。条件付けを 2 回行い、回復日を設けて 3 日間のテストを行った。2 回の条件付けと 4 回の回復日を設定したことで実験日は合計 14 日である。

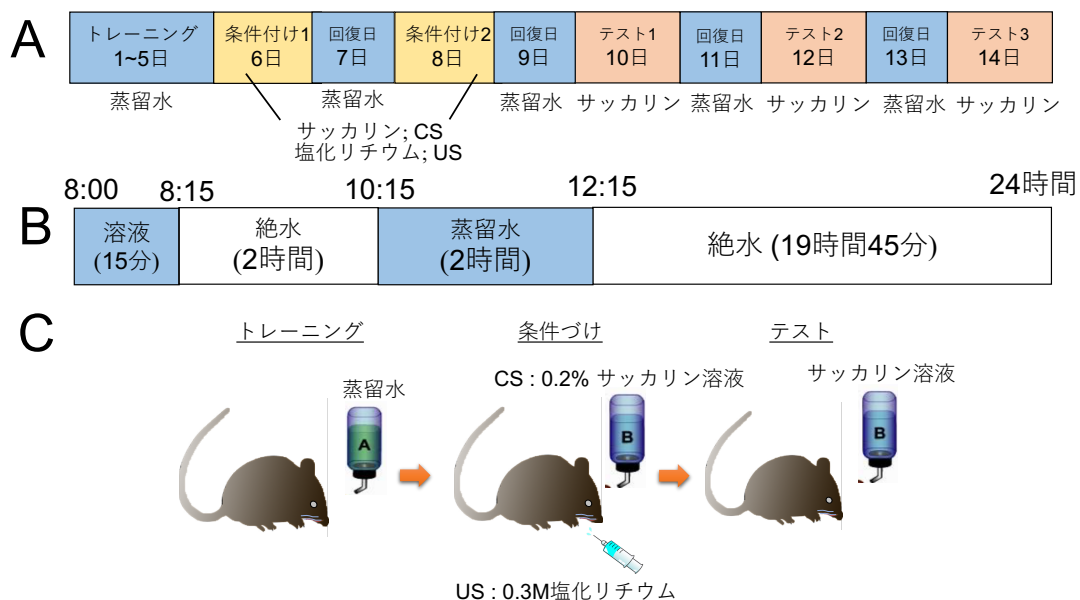


Fig. 4 1 瓶法を用いた CTA 実験プロトコール B

A; 実験日程

B; 各実験日における飲水スケジュール

C; マウスの条件付けとテスト方法

CS; 0.2% サッカリン溶液

US; 0.3M 塩化リチウム (1%体重, 腹腔内投与)

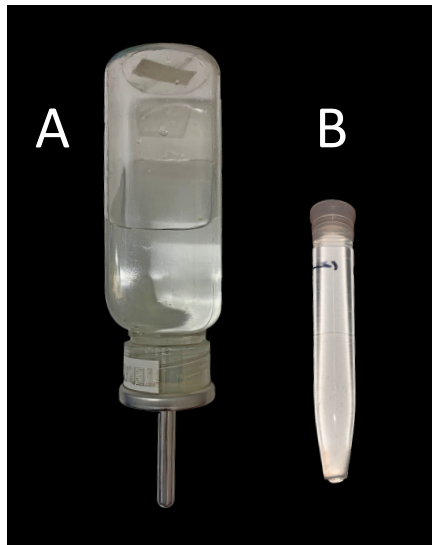


Fig.5 給水瓶の形状

1 瓶法を用いた CTA 実験において、A のプロトコルは A の給水瓶を用いた。しかし、給水や絶水の際の瓶の移動で約 1ml 前後の溶液の喪失があり、正確な測定が困難だったため、B のプロトコルでは溶液の喪失がない B の給水瓶を用いた。

A; 市販のマウス、ラット用給水瓶
B; 自作のスパウト

3) 2 瓶法を用いた CTA 実験プロトコル

Fig.6 に示すように、実験日 1～5 日をトレーニング期間、6 日を条件付け実施日、7 日を回復日、8～12 日をテスト日とした。全ての実験日において、マウスには 1 日当たり 23 時間 30 分絶水させた後、蒸留水を入れた給水瓶 (Fig. 5B) 2 瓶 (トレーニング期間と回復日) または一方に蒸留水を他方に 0.2% サッカリン溶液を入れた給水瓶 2 瓶 (条件付け日とテスト日) を 30 分間だけ呈示して飲水可能とした。各飲水期間の蒸留水とサッカリン溶液の摂取量は給水瓶の重量を測定することで算出した。味覚条件付けのための CS として 0.2% サッカリン溶液を用い、その後できる限りすみやかに US として 0.3 M 塩化リチウムを体重の 1% 量で腹腔内注射を行い、CS と US の対呈示による条件付けとした。各測定日のサッカリン嗜好率 (30 分間のサッカリン摂取量 / 30 分間の蒸留水とサッカリン摂取量を合わせた総飲水量) を算出して CTA 獲得の有無を評価した。通法に従い、サッカリン嗜好率が 0.5 より低い場合はサッカリンに嗜好性がないと判定し、同時に統計学的に有意差の検定を行った。

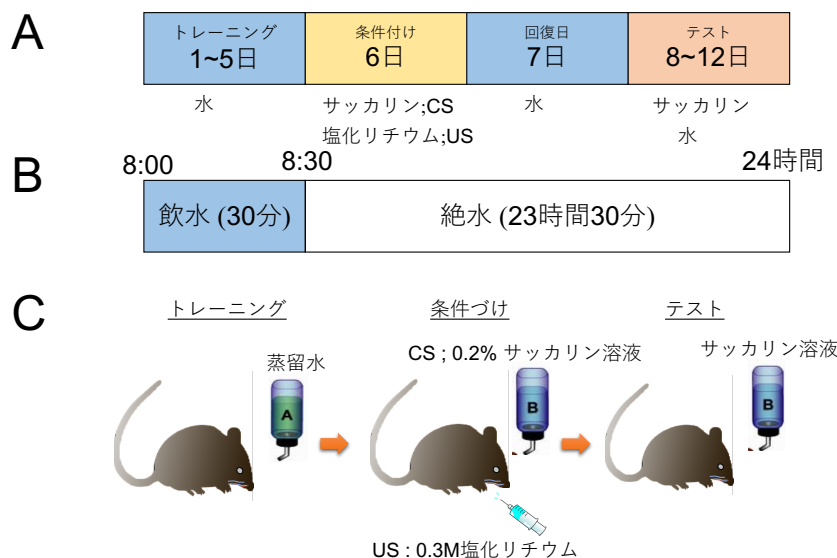


Fig 6. 2 瓶法を用いた CTA 実験プロトコル

A; 実験日程

B; 各実験日における飲水スケジュール

C; マウスの条件付けとテスト方法

CS; 0.2% サッカリン溶液

US; 0.3 M 塩化リチウム (1%体重、腹腔内投与)

4. 血漿亜鉛濃度の測定

CTA 実験の開始時間に相当する午前 8 時頃に、マウスを麻酔下 (3 種混合麻酔: メデトミン 0.3 mg/Kg, ミダゾラム 4 mg/Kg, ベトルファール 5 mg/Kg) にて、開腹して右心室より全血液を注射針で採取した。採取した血液は 1.2U/mL のヘパリンを加えたチューブに入れて 1200×g, 4°C, 30 分間遠心分離し、上清を得た。この上清の亜鉛濃度をメタロアッセイ (Metallogenics Co.,Ltd) を用いて測定した。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。

5. 統計学的解析

味覚刺激に対する嫌悪学習の強さをテスト時のサッカリン摂取量とサッカリン嗜好率によって評価した。1 瓶法の CTA 実験により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。2 瓶法の CTA 実験で得られたデータ (Fig.10E) は系統と飼料の 2 要因分散分析によって解析し、一部は系統、飼料、および日数の 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 (Fig.10F) . 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を Student's t 検定を用いて解析した.

結 果

1. 129/Sv マウスの味覚嗜好性

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) について, 甘味と苦味に対する嗜好性を調べた. 異なる濃度のサッカリン溶液 (0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4%) を用いて甘味嗜好性を調べた結果を Fig. 7 に示す. 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 (Fig. 7A) . 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 (Fig. 7B) . 塩酸キニーネ溶液 (0.05, 0.1, 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 (Fig. 7C) .

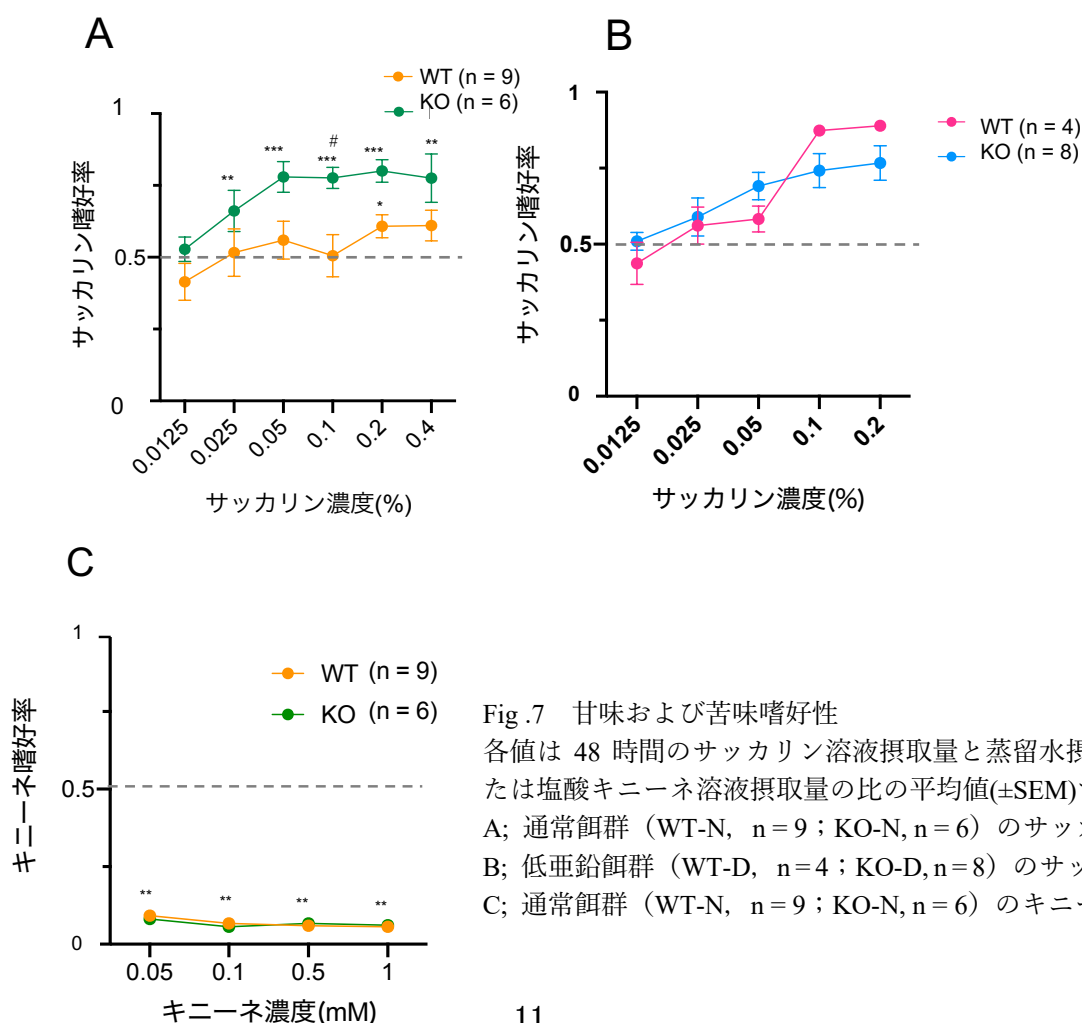


Fig. 7 甘味および苦味嗜好性

各値は 48 時間のサッカリン溶液摂取量と蒸留水摂取量の比, または塩酸キニーネ溶液摂取量の比の平均値(±SEM)である.

A; 通常餌群 (WT-N, n=9; KO-N, n=6) のサッカリン嗜好率

B; 低亜鉛餌群 (WT-D, n=4; KO-D, n=8) のサッカリン嗜好率

C; 通常餌群 (WT-N, n=9; KO-N, n=6) のキニーネ嗜好率

2. CTA 獲得の解析

1 瓶法を用いた CTA 実験プロトコール A (CS:0.1%サッカリン溶液, US:0.15 M 塩化リチウム, 2%体重, 条件付け 1 回, 各群 n=5) により得られたデータを Fig.8 に示す. Fig.8A に示すように総飲水量は WT 群、KO 群共に、全ての実験日において大きな変動はなかった. Fig.8B は実験日 6, 8~11 日における 20 分間のサッカリン溶液摂取量を示す. WT 群も KO 群も共に日毎にサッカリン摂取量が増加し、全てのテスト日においてサッカリン溶液摂取量は条件付け日より多くなった. このことから全テスト日において CTA の獲得は認めないと判定した. 条件付け日 (6 日目) から 10,11 日目のサッカリン摂取量は有意に増加した. (Fig.8B) .

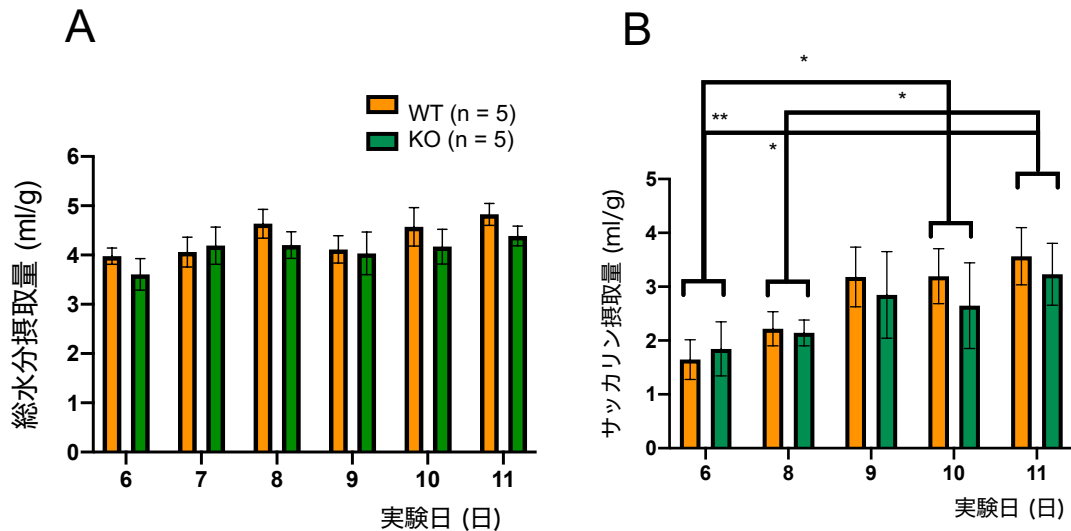


Fig.8 1 瓶法 (CTA 実験プロトコール A) による CTA 獲得実験
6 日目; 条件付け, 7 日目; 回復日, 8~11 日目; テスト

A; 各実験日の総飲水量, B; サッカリン摂取量

実験日のサッカリン摂取量における有意差 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,

上述の実験において CTA 獲得を認めなかったため、サッカリン溶液の濃度を 2 倍にし、条件付けを 2 回行うように変更した 1 瓶法による CTA 実験プロトコール B (CS:0.2%サッカリン溶液, US:0.3 M 塩化リチウム, 1%体重, 条件付け 2 回, 各群 n=12) により再度 CTA 実験を行った. 得られたデータを Fig. 9 に示す. 通常餌で飼養した WT 群と KO 群において、1 回目の条件付け日のサッカリン摂取量と比較して、2 回目の条件付け日およびその後 3 日間のテスト期間に

におけるサッカリン摂取量は有意に減少した ($F(2, 44) = 98.80, p < 0.05$) (Fig. 9A). この結果から WT 群と KO 群の両群のマウスが CTA を獲得したと判定した. 1 回目の条件付け日のサッカリン摂取量に対するテスト時のサッカリン摂取量は, WT 群の方が KO 群よりも少ない傾向があったが有意差はなかった (Fig. 9B).

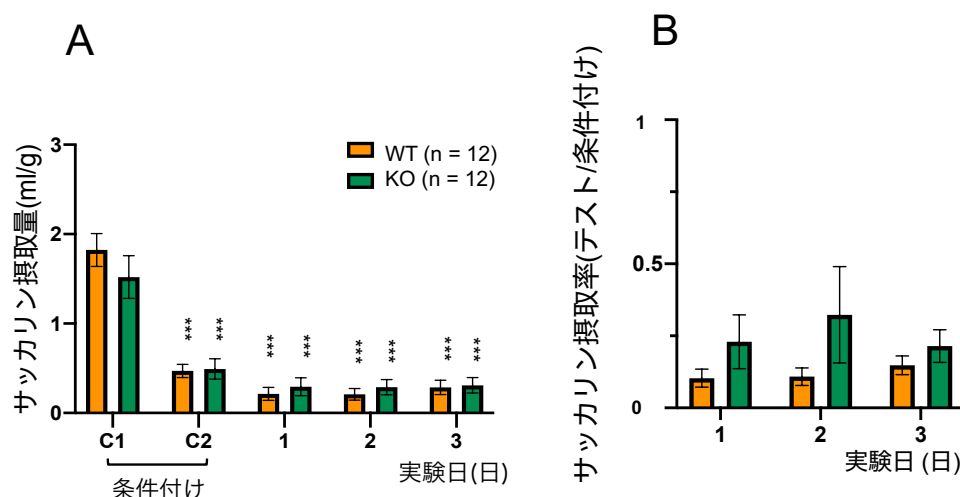


Fig. 9. 1 瓶法 (CTA 実験プロトコル B) による CTA 獲得実験

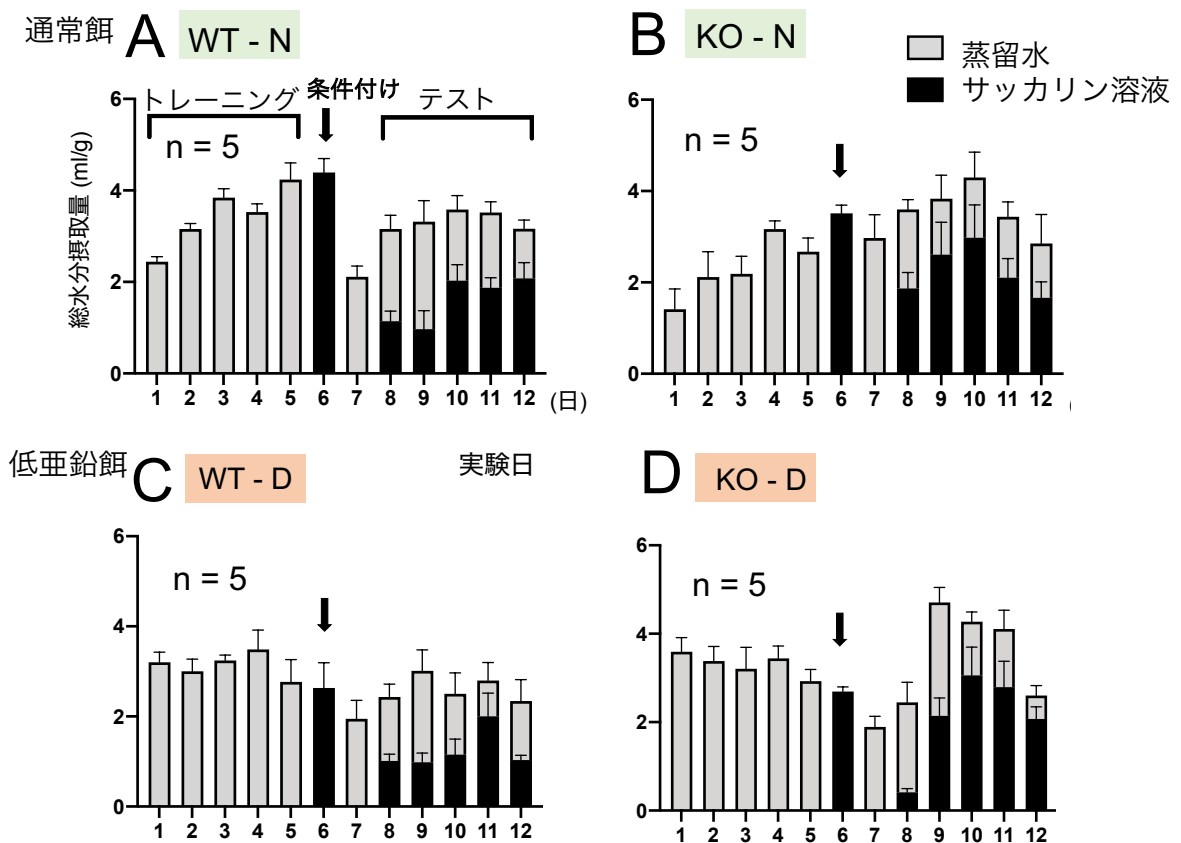
6 日目: 条件付け 1 回目, 8 日目: 条件付け 2 回目, 10, 12, 14 日目: テスト

A: 条件付け時とテスト時におけるサッカリン摂取量

B: 条件付け 1 のサッカリン摂取量に対する各テスト時のサッカリン摂取割合
各実験日のサッカリン摂取量の有意差 * $p < 0.05$,

上述の 1 瓶法を用いた実験結果から, 当該マウスの味覚条件付けに必要なサッカリン溶液の濃度が 0.1% では味覚刺激として十分ではなく, より高い濃度のサッカリン溶液を用いることが必要であることが示唆された. そこで, 1 瓶法で CTA 獲得を認めた 0.2% サッカリン溶液を CS として, 2 瓶法 (US: 0.3 M 塩化リチウム, 1% 体重, 条件付け 1 回) でも検証することにした. 実験動物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 群とした (Fig. 10). Fig. 10A, B, C, D に示す総飲水量の変化を見ると, 各実験日当たりの総飲水量は, 実験期間を通じて各群において同様に推移しており, トレーニング時とテスト時を比較しても, また, 4 群間で比較しても統計学的有意差を認めなかった. Fig. 9E に示すように, 各実験群におけるテスト 1 日目のサッカリン嗜好率の平均値は, WT-N, 0.33; KO-N, 0.53; 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 ($t = 3.069, df = 4, p < 0.05$), 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 (Fig. 10E) . 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 ($F(1,16)=7.673, p<0.05$) . ボンフェローニの多重比較検定を行ったところ、KO-D は KO-N 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 (Fig. 10F) . 更に各群をサッカリンし効率 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 ($t=3.069, df=4, p<0.05$) . 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.



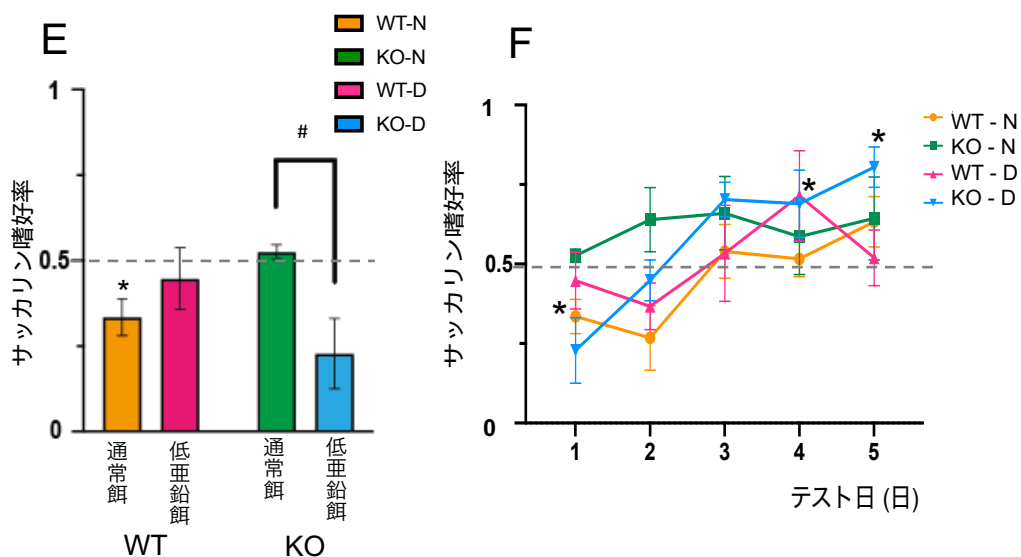


Fig. 10 2 瓶法による CTA 獲得実験

A; 総飲水量 (WT-N), B; 総飲水量 (WT-D), C; 総飲水量 (KO-N), D; 総飲水量 (KO-D), E; テスト 1 日目のサッカリン嗜好率, KO の餌 (普通食, 低亜鉛餌) の群間での有意差 $*p < 0.05$, F; 実験日 1~5 日のサッカリン嗜好率, サッカリン嗜好率 0.5 に対する有意差 $*p < 0.05$

3. マウスの血漿亜鉛濃度の測定

WT 群 (7~15 週齢) と KO 群 (7~15 週齢) のマウスの血漿亜鉛濃度の平均値を Fig. 11 に示す. 自由摂餌または 20 時間の絶食後に 2 時間摂食させた場合でも, 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 (Fig. 11A, B). ただし, 20 時間の絶食後に 2 時間摂食させた場合には, WT 群において血漿亜鉛濃度が低下する傾向を認めた (Fig. 11B).

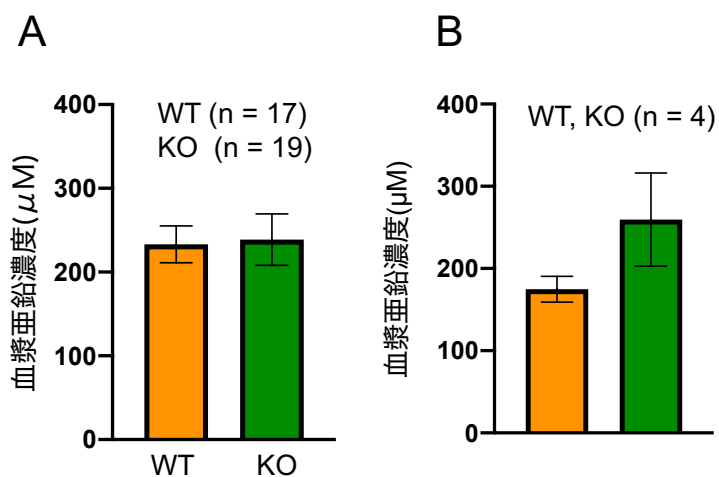


Fig. 11 マウスの血漿亜鉛濃度

A; 通常餌を与えたマウスの血漿亜鉛濃度

B; 20 時間絶食後 2 時間摂食時間を設けた後に測定した血漿亜鉛濃度

考 察

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.

1. 味覚嗜好性

動物はエネルギー源のサインである甘味を生得的に好み, 甘味溶液と蒸留水を呈示する 2 瓶選択試験を行うと, 蒸留水より甘味溶液の摂取量が多くなる. 同様に, 人工甘味料を呈示した場合でも, 人工甘味溶液に高い嗜好を示す. この甘味に対する嗜好性はマウスの系統および甘味料の種類により, 程度が異なることが報告されている (Bachmanov, A.A., et al., 2013). 本研究で用いた 129 系統マウスは, サッカリンと蒸留水を用いた 2 瓶選択試験において, 0.2%にて最適濃度を示し, 最適濃度付近にて高い嗜好性を示すとされる. また甘味に対する選好閾値について, 実験動物としてより広く用いられている C57BL/6 マウスと比較すると, 129 系統マウスは選好閾値が高いことに加え, 甘味を感じる濃度の範囲は狭いとされる. これら, マウスの系統間における甘味料の選好性は遺伝的に決定しており, とりわけ味覚神経の反応性が影響していると考えられている (Bachmanov, A.A., et al., 1997; Bachmanov, A.A., et al., 1996). 本研究で用いた WT (129/Sv) も先行研究同様, 0.2%のサッカリン濃度で最適濃度を示した. この系統において, MT- I, II 欠損マウスの嗜好性は WT 群よりも高く, 選好閾値は低値を示し, 広い範囲の濃度に嗜好性を示した. 一般的に, 味覚障害と亜鉛欠乏には関連があると報告されているが (Henkin, R.I., 1984), 本研究は MT がサッカリン嗜好性に影響を与えることを明らかにした.

低亜鉛餌群のマウスでは WT, KO 群共にサッカリン濃度の上昇により, 高い嗜好性を示し, 本研究で用いたサッカリン濃度の範囲で味覚の低下を示さなかった. 亜鉛欠乏により塩味感受性が低下し, 塩味嗜好性が上昇するという報告があるが (Goto, T., 2008; McDaic, O., et al 2007), 低亜鉛餌による亜鉛欠乏が甘味の嗜好率に影響を与えるという報告はなく, 本研究における結果と一致する. キニーネに嗜好性を示さなかったことから, 低亜鉛餌は甘味や苦味の味覚閾値に影響を与えないことが明らかとなった.

2. CTA

味刺激に対する嗜好や嫌悪、情動の情報伝達には中枢神経系が深く関わっている。齧歯類の中枢神経系における味覚情報の伝達経路において、舌から中枢へ伸びる味覚神経は延髄の孤束核へ投射し（Ricardo, J.A., & Koh, E.T., 1978）、齧歯類の孤束核ニューロンは橋にある結合腕傍核へ投射した後、結合腕傍核ニューロンは視床でニューロンを変えて、大脳皮質味覚野（前頭弁蓋部と島のおおびそれらの移行部）へ味覚情報を伝達する。大脳皮質味覚野からは眼窩前頭皮質（第2次味覚野）や扁桃体へと味覚情報が伝えられる（Nakashima, M., et al., 2000）。結合腕傍核から扁桃体や視床下部へと投射する経路もあるとされている（Fulwiler, C.E., & Saper, C.B., 1984; Norgren, R., 1974, 1976）。結合腕傍核から島皮質へ至る経路は味の強さや質の分析に関与し、扁桃体へ至る経路は味刺激による快・不快の情動行動に関与するとされる（Yamamoto, T., 1997）。驚くべきことに、扁桃体や海馬の亜鉛含有量は多く、この部位を介した記憶の成立には亜鉛が不可欠であることが報告されている（Sindreu, C., & Storm, D.R., 2011）。CTAは味覚と内臓感覚の連合学習が成立することで獲得される。味覚に関連する中枢および末梢の神経機序と記憶・学習に関連する脳機能とが連合学習の成立に寄与していることが明らかであるが、その連合学習成立における亜鉛やMTの重要性を評価する方法は未だ確立されていなかったため、MT欠損マウスのCTAを評価した本研究の試みは有意義であった。

前述したとおり、マウスの系統により甘味の感受性が異なる。CTAの確立には条件刺激および無条件刺激が必要であり、CTAの成立には条件刺激で用いるサッカリンの濃度がマウスの甘味の感受性と一致することが必要である。このサッカリン濃度を0.2%と設定し、CTA獲得の評価を行った。

本研究で用いたマウスのWT群（129/Sv）は1瓶法または2瓶法のいずれの方法による実験においてもCTAの獲得を認めた。一方、MTKOマウスは1瓶法ではWT群より少し弱いながらCTAの獲得を認めたが、2瓶法ではCTA獲得は更に減弱して平均サッカリン嗜好率は0.5以上で有意差を認めなかった。KO群の方がサッカリンに対する嗜好性が高いため、CTAの獲得に有利に働くと予想されたが、2瓶法による実験においては予想に反してKO群はCTAを獲得しなかった。更に低亜鉛餌で飼養したマウスではWT, KO群共にCTAを獲得した。このことから低亜鉛はCTAの獲得経路に影響を与えない事が明らかとなった。先行研究から、中枢神経系における亜鉛濃度は低亜鉛状態に陥ったとしても、他の組織と比較して変動しにくい事が報告されている（Takeda A., et al., 2000）。一方、低亜鉛餌による亜鉛欠乏は、脳内の亜鉛ホメオスタシスに影響を及ぼし、学習障害などの脳機能障害を引き起こす可能性があるという報告という報告もある（Takeda, A., et al., 2000）。本研究の結果からは、低亜鉛餌で飼育したWT群

マウスは KO 群より血漿亜鉛濃度の低下が著しいことが予想されるが、この点については今後の研究課題としたい。

また別の先行研究によると、高濃度の亜鉛を経口投与すると MT が腸管の亜鉛吸収を抑制することが報告されており (Davis, S.R., et al., 1998), 2 瓶法で CTA を獲得しなかった KO-N 群の腸管における亜鉛吸収率が上昇し、血漿亜鉛濃度が WT より高値になっている可能性も考えられた。更に、高濃度亜鉛の長期経口摂取がマウスの学習に影響を与えるという報告 (Yang, Y., et al., 2013) もあり、CTA 獲得による学習成立に亜鉛が関わっている可能性は大いにあると考えられる。

本研究における血漿亜鉛濃度の測定結果からは、適量の亜鉛を餌から摂取していれば MT- I, II の有無によって血漿亜鉛濃度が大きく変動することはなかった。一方、絶食期間を設けて餌を与えると WT 群では十分な餌を摂取している場合に比べて血漿亜鉛濃度が低下するが、KO 群においては通常餌を自由摂取させた場合と同じ血漿亜鉛濃度になる事が示された。先行研究では、絶食により WT, KO 群共に血漿亜鉛濃度は同程度低下するが、その後、高濃度の亜鉛溶液を経口投与すると KO 群の血漿亜鉛濃度は WT 群よりも有意に増加する事が報告されており、本研究の結果もこれと同様の結果であると考えられた (Davis, S.R., et al., 1998)。更に、低亜鉛血症の両群マウスに高濃度亜鉛を腹腔内投与すると WT 群の肝臓や脾臓亜鉛濃度が上昇する事が示され、MT 群が速やかに亜鉛を組織に取り込む事で、細胞内亜鉛を保持していることが示されている (Kelly, E., et al 1996)。本研究において絶食後に 2 時間餌を与えた場合に WT 群の血漿亜鉛濃度の方が KO 群よりも低い値になった原因として、絶食中の亜鉛欠乏を補うために 2 時間で摂取された餌に含まれる亜鉛は細胞内亜鉛濃度保持のために速やかに各組織に運搬されて細胞内に入り MT と結合した可能性が考えられた。絶食後に 2 時間餌を与えた KO 群の細胞内亜鉛濃度を計測してみるとさらに詳細が明らかになると考えられ、今後の研究課題としたい。

参考文献

- Ackerman, B. H., Pharm, D., & Kasbekar, N., 1997 Disturbances of taste and smell induced by drugs. *Pharmacotherapy* 17 482-496
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Ninomiya, Y., Inoue, M., Tordoff, M. G., Price, R. A., & Beauchamp, G. K., 1997 Sucrose consumption in mice: major influence of two genetic loci affecting peripheral sensory responses. *Mammalian Genome*. 8 545-548.
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Tordoff, M. G., Price, R. A., & Beauchamp, G. K., 1996 Intake of ethanol, sodium chloride, sucrose, citric acid, and quinine hydrochloride solutions by mice: a genetic analysis. *Behavior Genetics* 26 563-573
- Bachmanov, A. A., Tordoff, M. G., & Beauchamp, G.K., 2013 Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chemical senses* 2001 26 905-913
- Banik, D. D., Benfey, E. D., Martin, L. E., Kay, K. E., Loney, G. C., Nelson, A. R., Ahart, Z. C., Kemp, B. T., Kemp, B. R., Torregrossa, A. M., & Medler, K. F., 2020 A subset of broadly responsive Type III taste cells contribute to the detection of bitter, sweet and umami stimuli. *Plos Genetics* 16 e1008925
- Barnett, S. A., 1958 Experiments on 'Neophobia' in wild and laboratory rats. *British Journal of psychology* 49 195-201
- Cousins, R. J., & McMahon, R. J., 2000 Integrative aspects of zinc transporters. *The Journal of Nutrition* 130 1384-1387
- Cousins, R. J., 2010 Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 80 243-248
- Cuajungco, M. P., & Lees, G. J., 1997 Zinc Metabolism in the Brain: Relevance to Human Neurodegenerative Disorders. *Neurobiology of Disease* 4 137-169
- Davis, S. R., McMahon, R. J., & Cousins, R. J., 1998 Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc Transporter-1 Expression. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients* 128 825-831
- Eide, D. J., 2004 The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447 796-800
- Fjeringstad, E., Danscher, G. Fjeringstad, E. J., 1974 Zinc content in hippocampus and whole brain of normal rats. *Brain Research* 79 338-342

- Fulwiler, C. E., & Saper, C. B. 1984 Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Research* 319 229-259
- Goto, T., Komai, M., 2008 Salt preference and taste. *Bulletin of the Society of Sea Water Science* 62 3-8
- Grarcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. 1955 Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122 157-158
- Heckmann, J. G., Heckmann, S. M., Lang, C. G., Hummel, T., 2003 Neurological aspects of taste disorders. *JAMA Neurology* 60 667-671
- Henkin, R. I., 1984 Zinc in taste function. *Biological Trace Element Research* 6 263-280
- Herbert, H., Moga, M. M., & Saper, C. B. 1990 Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 293 540-580
- Hesse, G. W., 1979 Chronic zinc deficiency alters neuronal function of hippocampal mossy fibers. *Science* 205 1005-1007
- Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H.K., 2014 Nucleotide signalling during inflammation *Nature* 509 310-317
- Ingram, D. K., 1982 Lithium chloride-induced taste aversion in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Journal of General Psychology* 106 233-249
- Ikeda, M., Hirai, R., Shigihara, S., & Ikui, A., 2008 Taste disorders and zinc deficiency. *Oral medical Science* 6 105-111
- Itoh, T., Nakai, K., Satoh, M., Satoh, C., Kameo, S., Nakagi, Y., Saijo, Y., Yoshida, T., Naganuma, A., Imai, H., & Satoh, H., 2013 Effect of zinc deficiency on the behavior of metallothionein-I, II knockout mice. *Biomedical Research on Trace Elements* 21 204-213
- Kelly, E. J., Quaife, Carol. J., Froelick, G. J., & Palmiter, Fichard. D., 1996 Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *The Journal of Nutrition* 126 1782-1790
- Kimura, T., Kambe, T., 2016 The Functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 17 336
- Klaassen, C. D., Liu, J., & Diwan, B. A., 2009 Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238 215–220
- Krężel, A., & Maret, W., 2017 The Functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 18 1237

- Lamprecht, R., Hazvi, S., Dudai, Y., 1997 cAMP Response element-binding protein in the amygdala is required for long-but not short-term Conditioned taste aversion memory. *The Journal of Neuroscience* 17 8443-8450
- Lemon, C. H., 2015 Perceptual and neural responses to sweet taste in humans and rodents. *Chemosens Percept* 8 46-52
- Levin, E. D., Perraut, C., Pollard, N., & Freedman, J. H., 2006 Metallothionein expression and neurocognitive function in mice. *Physiology & Behavior* 87 513-518
- Maarea, M., Haase, H., 2020 A Guide to Human Zinc Absorption: General Overview and Recent Advances of In Vitro Intestinal Models. *Nutrients* 12 762
- MacDonald, R. S., 2000 The role of zinc in growth and cell proliferation. *The Journal of nutrition* 130 1500-1508
- McDaic, O., Stewart-Knox, B., Parr, H., & Simpson, E., 2007 Dietary zinc intake and sex differences in taste acuity in healthy young adults, *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 20 103-110
(2007)
- Margoshes, M., & Vallee, B.L., 1957 A Cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society* 79 4813-4814
- Masters, B. A., Quaife, C.J., Erickson, J. C., Kelly, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., Brinster, R. L., & Palmiter, R. D., 1994 Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *Journal of Neuroscience* 14 5844-5857
- Nakashima, M., Uemura, M., Yasui, K., Ozaki, H.S., & Taen, A., 2000 An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neuroscience Research* 36 297-309
- Nielson, K. B., Atkin, C. L., & Winge, D. R., 1985 260 5342-5350
- Norgren, R., 1974 Gustatory afferents to ventral forebrain. *Brain Research* 81 285 295
- Norgren, R., 1976 Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *Journal of Comparative Neurology* 166 17-30
- Norgren, R. 1978 Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 3 207-218
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Koeller, D. M., & Brinster, R. L., 1993 Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Molecular and Cellular Biology* 13 5266-5275

Palmiter, R.D., 1995 Constitutive expression of metallothionein-III (MT-III), but not MT-I, inhibits growth when cells become zinc deficient. *Toxicology and Applied Pharmacology* 135 139-146

Prasad, A. S., 1985 Clinical Manifestations of zinc deficiency. *Annual Review of Nutrition* 5 341-363

Rebollar, D. J., Rios, C., Ruíz, C. N., & Armenta, M. M., 2017 Metallothionein in Brain Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2017, Article ID 5828056, 12 pages,

Richards, M. P., & Cousins, R. J., 1975 Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 64 1215-1223.

Ricardo, J.A., & Koh, E.T., 1978 Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Research* 153 1-26

Santos, C. R. A., Martinho, A., Quintela, T., & Gonçalves, I., 2016 Neuroprotective and neuroregenerative properties of metallothioneins. *IUBMB Life* 64 125-136

Sclafani, A., Bahrani, M., Zukerman, S., Ackroff, K., 2010 Stevia and saccharin preferences in rats and mice. *Chemical Senses* 35 433-443

Scott, T. R., Mark. G. P., 1987 The taste system encodes stimulus toxicity. *Brain research* 414 197-203

Sindreu, C., & Storm, D.R., 2011 Modulation of neuronal signal transduction and memory formation by synaptic zinc. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 5 68

Smith, F. R., Henkin, R. I., & Dell, R. B., 1976 Eisordered gustatory acuity in liver disease. *Gastroenterology* 70 568-571

Steven, R., Davis, Robert, J., McMahon & Cousins, R. J., 1998 Metallothionein Knockout and Transgenic Mice Exhibit Altered Intestinal Processing of Zinc with Uniform Zinc-Dependent Zinc Transporter-1 Expression. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients* 128 825-831

Takeda, A., 2000 Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Research Reviews* 34 137-148

Takeda, T., Miyazaki, S., Kobayashi, M., Nishino, K., Goto, T., Matsunaga, M., Ooi, M., Shirakawa, H., Tani, F., Kawamura, T., Komai, M., Kambe, T., 2018 Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Communication Biology* 1 113

Taruno, A., 2013 CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 495 223-226

Vallee, B. L., & Auld, D. S., 1993 Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 2715-2718

Yamamoto, T., Sako, N., Sakai, N., & Iwafune, A., 1997 Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. *Neuroscience Letters* 226 127-130.

Yanagisawa, H., 2004 Zinc Deficiency and Clinical Practice. *Japan Medical Association Journal* 47 359-364

Yang, Y., Jing, X.P., Zhang, S.P., Gu, R.X., Tang, F.X., Wang, S.L., Xiong, Y., Qiu, M., Sun, X.Y., Ke, D., Wang, J.Z., Liu, R., 2013 High dose zinc supplementation induces hippocampal zinc deficiency and memory impairment with inhibition of BDNF signaling. *Plos One* 8 e55384

Yoshida, M., Honda, M., Watanabe, C., Satoh, M., Yasutake, A., 2011 Neurobehavioral changes and alteration of gene expression in the brains of metallothionein-I/II null mice exposed to low levels of mercury vapor during postnatal development. *The Journal of Toxicological Sciences* 36 539-547

謝 辞

本論文の作成にあたり、実験計画・方法から論文執筆に至るまで、全ての面においてご指導頂いた、口腔生理学教室 船橋 誠 教授に厚く御礼申し上げます。また、研究内容や論文の理論的構成、実験方法への助言やご指摘を頂いた口腔生理学教室 乾 賢 准教授に感謝申し上げます。本研究を進めるにあたりご協力いただきました歯科矯正学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。