



Title	実験的低垂鉛がラット味覚受容・伝達に及ぼす影響
Author(s)	河野, 彰代
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/67082
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

実験的低亜鉛がラット味覚受容・伝達に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

高次脳口腔機能学講座

(歯科麻酔学教室)

河野彰代

2017年

要約

亜鉛は必須微量元素の一つであり、生体の多くの重要な代謝に関与している。亜鉛欠乏は、発育遅延、食欲不振、脱毛、性機能不全、感覚器、特に味覚障害を生じることが知られており、味覚障害患者に対して亜鉛の内服投与で味覚障害が改善される場合が多いと報告されている。

本研究では、低亜鉛飼料で飼育したラットの味覚障害の病態を明らかにし、低亜鉛状態がラットの味覚、特に苦味の受容・伝達に及ぼす影響を、結合腕傍核（PBN）における c-Fos 発現を指標として免疫組織化学的に検討した。さらに味覚受容器である味蕾の味蕾細胞の分化や味蕾構成細胞型に対する低亜鉛の影響についても検討を加えた。

実験動物として、3週齢ラットを用い、4週間低亜鉛飼料で飼育した低亜鉛群。3週齢より4週間正常飼料で飼育した低亜鉛対照群。亜鉛再投与による効果を調べるため、3週齢より4週間低亜鉛飼料で飼育後、4週間正常飼料で飼育した低亜鉛回復群。3週齢より8週間正常飼料で飼育した低亜鉛回復対照群の4群に分けた。

低亜鉛飼料で飼育した低亜鉛群の動物では低亜鉛対照群と比較して体重が有意に減少し、血清亜鉛濃度も有意に低下していた。また、ヒトに認められる亜鉛欠乏症の症状と同様の発育遅延や脱毛が認められた。味覚に関しては、2瓶選択法の結果、苦味、塩味、酸味に対して低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて嗜好率の有意な上昇を認め、Brief access testの結果、高濃度の甘味、塩味、苦味に対して低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて lick ratio の上昇を認めた。

各ラットの舌上皮に苦味刺激として 1mM 塩酸キニーネ（QHCl）を30分滴下し、味覚伝達の中継核である PBN における c-Fos 陽性ニューロン数の定量的変化を検討したところ、低亜鉛対照群では QHCl 刺激により、苦味に応答するニューロンが多いといわれている PBN の外部外側亜核（elPBN）、外部内側亜核（emPBN）において、蒸留水（DW）刺激と比較して有意に多い c-Fos 陽性ニューロンが認められたが、低亜鉛群では QHCl 刺激

による elPBN と emPBN での c-Fos 陽性ニューロンの増加は認められなかった。低亜鉛回復群では、QHCl 刺激後の elPBN、emPBN での c-Fos 陽性ニューロンの数は低亜鉛対照群と同程度であり、DW 刺激に比べて有意に増加していた。一方、甘味に応答するニューロンが多いといわれている背側外側亜核 (dlPBN) では低亜鉛対照群、低亜鉛群、低亜鉛回復群で、QHCl 刺激と DW 刺激後の c-Fos 陽性ニューロンの数に有意差は認められなかった。

低亜鉛の味蕾への影響を調べるため、味蕾の細胞数を調べたところ、味蕾細胞の数に変化は認められなかった。有郭乳頭味蕾での細胞増殖のマーカである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞の比率は低亜鉛群では低亜鉛対照群の約 2/3 に低下していたが、低亜鉛回復群では低亜鉛回復対照群とほぼ同じであった。低亜鉛群の味蕾での各細胞型の割合は低亜鉛対照群と比べて変化は認められなかった。

低亜鉛群の動物では苦味に応答するニューロンが多いと報告されている elPBN、emPBN において QHCl 刺激後の c-Fos 陽性ニューロンの数が減少したが、甘味に応答するニューロンが多いと報告されている dlPBN では、低亜鉛による影響はほとんど認められなかったことより、苦味を甘味など異なる味として感じる「錯味症」ではなく、苦味の味覚閾値が上昇して「味覚減退」が起きていると考えられる。このような、低亜鉛による PBN における苦味の情報処理の変化は、亜鉛正常飼料の摂取によって回復することが明らかとなった。

また、低亜鉛により細胞増殖マーカである PCNA 陽性細胞の割合が約 2/3 に減少したが、味蕾の細胞数や各細胞型の割合には変化が認められなかったことより、味蕾細胞の turnover time が約 1.5 倍に延長し、この影響は全ての細胞型に及んでいると考えられた。亜鉛正常飼料の摂取により、PCNA 陽性細胞の割合は対照群と同程度に回復し、味蕾細胞数には変化がないことより、味蕾細胞の turnover time の延長も回復したと考えられる。

緒言

日本の味覚障害患者数は 2003 年の調査によると年間 24 万人と言われ、その数は 10 年間で約 1.8 倍に増加している。味覚障害はその自覚症状によって、「味が薄い、味を感じにくい」と言った味覚減退、「味を感じない」味覚消失・無味症、「ある特定の味だけを感じない」解離性味覚障害、「甘味を塩味と感じるなど他の味と錯覚する」異味症、錯味症、「何を食べても嫌な味に感じる」悪味症、「味が濃く感じる」味覚過敏、「口の中に何も無いにも関わらず苦みや渋みを感じる」自発性異常味覚、「一側のみに見える味覚障害」片側性味覚障害がある¹⁾。原因としては薬剤性、亜鉛欠乏性、心因性、全身疾患性などがあり、ラットを用いて、薬剤性や亜鉛欠乏性の味覚障害の研究が行われているが、亜鉛欠乏性味覚障害では症状としてどのような味覚障害が発症するかということは、あまり報告されていない。

亜鉛は必須微量元素の一つであり、生体の多くの重要な代謝に関与している。亜鉛の欠乏は、発育遅延、食欲不振、皮膚炎、性機能不全、感覚器、特に味覚障害を生じることが知られている。また、臨床的にも味覚障害患者に対して亜鉛の内服投与にて、味覚が改善される場合が多いと報告されている²⁻⁴⁾。

亜鉛と味覚障害の関わりについて、最初に報告したのは Prasad (1963) であり、中近東の地方病であった青年男子の二次性徴の遅滞、脱毛、皮膚病変、異食症を合併する一群が、食事中的フィチンに基づく亜鉛欠乏症であることを発見した⁵⁾。1970 年には Henkin らが、味覚障害患者に対して硫酸亜鉛を用いた亜鉛治療を行い、味覚障害が改善したという報告を行い²⁾、その後も亜鉛欠乏性の味覚障害に対して亜鉛治療が有効であるとの報告は続いた^{3,4)}。このように、臨床においては、亜鉛と味覚障害の関係は広く認識されているが、一方で亜鉛欠乏により味覚障害が引き起こされる発生機序については、未だ不明な点が多い。

味覚は、口腔内に摂取された食物が唾液や水に溶け、分子やイオンの形で口腔内上皮中に分布する味蕾の味細胞の膜に存在する受容体に接触することにより生じる感覚である。物質の作用により味細胞の細胞内伝達系が活性化し、味覚神経線維とのシナプスを介して

電氣的興奮が脳に送られ味を受容する。ヒトの感じる味のうち塩味、酸味、苦味、甘味、うま味は五基本味と言われ、味細胞の膜表面にはこの五基本味物質のそれぞれに対応する、異なった受容体が存在する⁶⁾。

味蕾は味物質を受容する味覚受容器であり、形態学的には細長い紡錘形の細胞が50～100個集合して成る、長径約80 μ m、短径約50 μ mのタマネギ状の構造物である。上皮表面には微絨毛が露出しており、この部分で味物質の受容を行っていると考えられている。哺乳類では、味蕾は、舌背部に存在する有郭乳頭、葉状乳頭、茸状乳頭、糸状乳頭に加え、口蓋部の切歯乳頭、軟口蓋、咽頭や喉頭の上皮組織にも存在する。

味蕾細胞は10～14日周期で上皮細胞から次々にturnoverを繰り返し、味覚の受容器としての機能を維持している^{7,8)}。未分化細胞は味蕾基底部に存在し、それが味蕾中央部へ移動して、味覚受容などの機能を有する成熟した細胞となり、やがて細胞死を迎える⁹⁾。また、味蕾細胞は、電子顕微鏡観察による電子密度と形態による違いから、I～IV型に分類される¹⁰⁾。I型～III型は紡錘形をした味覚の受容に関与した機能を持つ成熟した細胞であり、IV型は味蕾基底部に存在する球形の細胞で、特定の機能をもたない未分化な細胞と考えられている。I型細胞は電子顕微鏡下で暗調に見えることから、暗調細胞ともいわれ、中間径フィラメントに富み、他の細胞型を示す細胞を取り囲むように存在することから支持細胞として働くと考えられ、味蕾細胞の約半数を占めるといわれている¹¹⁾。それに対して、II型細胞、III型細胞は明調細胞ともいわれる。II型細胞は、神経細胞と接しているが、シナプスを形成せず、生理学的には甘味、うま味、苦味の受容に関与し、味蕾細胞の約30%を占める¹²⁾。III型細胞は、味神経線維とシナプスを形成しており、酸味、塩味受容に関与し、味蕾細胞の約15%を占めるといわれている¹³⁾。

また、味蕾を構成する細胞を組織化学的に同定する試みも行われており、これまでの組織化学的研究の結果より、I型細胞はcarbonic anhydrase isoform II (CA II)やglutamate aspartate transporter (GLAST)、human blood group antigen H (AbH)を持つことが報

告されている¹⁴⁻¹⁶)。II型細胞は苦味受容に関連するGタンパクである α -gustducin や type III IP3 receptor (IP3R3)、phospholipase C β 2 (PLC β 2) を持つことが明らかになっている¹⁷⁻¹⁹)。一方、III型細胞は、protein gene product 9.5 (PGP9.5)、neural cell adhesion molecule (NCAM)、synaptosomal associated protein-25kDa (SNAP-25)、serotonin (5-HT) などを持つことが報告されている²⁰⁻²⁴)。さらにIV型細胞では、sonic hedgehog mRNA や Jacalin などの報告がある^{25,26})。味蕾細胞全体のマーカーとしては cytokeratin 7,6,8,20 などの様々な cytokeratin の存在や、レクチンの1種である Ulex europaeus agglutinin- I (UEA- I) が報告されている^{27,28})。

亜鉛欠乏飼料で飼育されたラットでは、高率に味覚障害が観察される^{29,30})。それらのラットでは、走査型電子顕微鏡により軟口蓋の味蕾を有する乳頭の数の減少、乳頭の扁平化、味孔内に観察される味細胞先端の microvilli の消失などが観察されている³¹)。また、透過型電子顕微鏡にて、味細胞先端の microvilli の減少や断裂、味孔内に存在する electron dense substance の消失、味細胞内に分布するゴルジ由来の dark granule の減少、さらには味細胞の空胞化などが観察されている³²)。また、亜鉛は DNA-polymerase の活性に直接関与して DNA 合成機能に影響するとともに、RNA-polymerase 活性にも関与し、細胞分裂能および蛋白合成能という個体の成長や蛋白代謝の面で重要な役割を担っている。正常ラットの味細胞は約 250 時間で上皮細胞から次々に turnover を繰り返し、味覚の受容器としての機能を維持している⁷)。しかし、味覚障害のみられた亜鉛欠乏ラットでは、この turnover time が 100 時間以上延長することが報告されている³³)。また、亜鉛欠乏ラットでは味蕾の味細胞の膜上にある苦味受容体の遺伝子発現が減少しているという報告もある^{34,35})。これらが、味細胞の機能を低下させると指摘されているが、実際に味の受容・伝達がどのように変化しているかについての知見は少ない。

味覚を伝える 1 次求心性ニューロンは、主として孤束核を構成している神経細胞に投射する。味覚伝導路はさらに三叉神経主知覚核と孤束核から間脳までの第二次ニューロン、そ

して間脳から大脳皮質味覚野までの第三次ニューロンへとつながっていく。Yamamoto らによると味覚刺激によって第二次ニューロンの介在部である孤束核から、視床および視床下部に至る味覚伝導路の中継核である結合腕傍核 (PBN) において神経活動の指標となる c-Fos が発現し、味質により応答する神経細胞の空間分布に差が観察されることが免疫組織化学的に確認されている³⁶⁾。しかしながら低亜鉛に代表される味覚障害を示す動物において、PBN における c-Fos 発現がどのように変化するかについての報告はみられない。そこで本研究では、低亜鉛状態がラットの味覚の受容・伝達に及ぼす影響を調べるため、(1) 低亜鉛飼料を与えることで作製した食事性亜鉛欠乏性味覚障害モデルラットの評価、(2) 苦味刺激に対する PBN における神経活動の変化 (3) 味蕾細胞の増殖や分化に対する低亜鉛の影響について検討した。

材料と方法

モデル動物の作製

実験動物として Sprague-Dawley 系ラット (雄性、3 週齢) (日本動物、大阪) を用いて、以下のモデル動物群 (各群 12 匹) を作製した。なお本実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物委員会の定める動物実験ガイドラインに従って行った (動物実験承認番号、動歯・24-009-0)。

- I 低亜鉛群 ラットを 3 週齢より 4 週間低亜鉛飼料 (亜鉛含量 0.12mg/100mg) で飼育。
- 2) II 低亜鉛対照群 ラットを 3 週齢より 4 週間正常飼料 (亜鉛含量 5.28mg/100mg) で飼育。
- III 低亜鉛回復群 ラットを 3 週齢より 4 週間低亜鉛飼料で飼育後、4 週間正常飼料で飼育。
- IV 低亜鉛回復対照群 ラットを 3 週齢より 8 週間正常飼料で飼育。

全ての群の動物に飲水として蒸留水 (DW) を与え、餌は自由摂取とした。

(1) 食事性亜鉛欠乏性味覚障害モデルラットの評価

① 生理学的変化

飼育開始 1 週間毎の体重測定、皮膚の状態の観察を行った。

② 血清亜鉛濃度測定

各モデル群作製後、灌流固定前に、抱水クロラル (400 mg/kg) の腹腔内投与にて深麻酔を得た後、少量のヘパリンを注入し、心臓より採血を行った。得られたサンプルは、3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清をサンプルとし、測定まで -20°C で保存した。測定はファルコバイオシステムズ総合研究所 (京都、日本) に委託した。血清亜鉛濃度に加え、Na, K, Cl, Ca, Mg についても測定した。

③ 48 時間二瓶選択実験

低亜鉛による基本味に対する嗜好性の変化を調べるために 48 時間二瓶選択実験を行った。9 時間の絶水後、ラットに対して、DW と味溶液を同時に呈示し 48 時間自由摂取させた後、各飲水量を測定した。ただし、左右の場所による偏好を防ぐため、呈示 24 時間後には二瓶の場所を入れ替えた。味溶液に対する嗜好率は、嗜好率 (%) = 味溶液の飲水量 / 総飲水量 × 100 という式を用いて算出した。呈味溶液は、苦味として 0.01mM キニーネ塩酸塩 (QHCl)、甘味として 10mM サッカリン、塩味として 0.3M NaCl、酸味として 10mM HCl を用いた。各群の平均 ± 標準誤差を示した。統計学的解析には対応のない t 検定を用い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

④ Brief access test

低亜鉛によるラットの基本味に対する感受性の変化を調べるため、リック計測器 (FA システムズ、筑波、日本) を用いて Brief access test を行った。2 瓶選択法は測定が長時間に

渡るため、口腔内情報とともに代謝後の効果など食後効果も結果に影響を与えるのに対して、Brief access test は短時間で測定が終了することから、口腔内の味情報のみが反映されることが考えられている。本試験では 10 秒間にラットが味溶液をなめる回数 (lick 数) を水の lick 数に対する比である lick ratio として算出した³⁷⁾。ラットがリック計測器の中で飲水行動ができるよう、本実験を行う前にトレーニングを行った。ラットを 24 時間以上絶水条件においた後、リック計測器のゲージに移し、DW を給水孔から飲水できることを覚えさせた。その後、DW と NaCl (0.01、0.05、0.1、0.5、1M)、サッカリン (0.1、0.5、1、10、100 mM)、HCl (0.1、0.5、1、10、100mM)、QHCl (0.001、0.01、0.05、0.1、1mM) の各味溶液を 10 秒間ずつ飲水させ、新しい味に対する新奇恐怖を消し去り、リック計測器での飲水行動に慣れさせた³⁸⁾。

本試験は各モデル動物作製の最終週後半に行った。トレーニングと同様に、試験前 24 時間以上の絶水を行った。まず、絶水による過度な飲水を防ぐために、試験前に約 2 分間、リック計測器内で給水孔より DW を摂取させた。その後、トレーニングと同じ順番で 10 秒間ずつ各味溶液および DW を提示し、lick 数を計測した。各群の平均±標準誤差を示した。統計学的解析には対応のない t 検定を用い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(2) 苦味刺激に対する PBN における神経活動の変化

48 時間 2 瓶選択法の実験後少なくとも 12 時間以上の間隔を開けて、コントロール群と低亜鉛群ラットに対して、抱水クロラル 400mg/kg で腹腔内麻酔を行い、開口器を用いて開口させ、舌後方に 1mM QHCl、または DW を 3 分毎に 40 μ l ずつ 30 分間滴下した (各群 6 匹計 24 匹)。滴下終了 90 分後に 0.02M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて瀉血後 4% パラホルムアルデヒド (PFA) にて灌流固定し、PBN を含む脳幹部を摘出した。同時に有郭乳頭を含む舌も摘出した。1 週間程度 4%PFA にて後固定を行い、その後 20%ショ糖含有 PBS に一晚浸漬した。Freezing Microtome を用いて厚さ 40 μ m の凍結切片を作成し、抗 c-

Fos 抗体 (1:2000: Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) を用いて免疫組織化学を行い、ABC 法にて発色させた。

Yamamoto らの報告では、ラットに苦味刺激を与えると、PBN の外部外側亜核 (elPBN) と外部内側亜核 (emPBN) に c-Fos 陽性細胞が多く認められ、DW や甘味刺激を与えると PBN の背側外側亜核 (dlPBN) に c-Fos 陽性細胞が多く認められることから、本実験では elPBN、emPBN と dlPBN における c-Fos 陽性細胞の数を計測した^{36,39)}。具体的には、elPBN と emPBN は、中脳下室と橋が交わっている高さより 0.25mm 尾側の連続した 3 切片を、dl PBN については、中脳下室と橋が交わっている高さより 0.5mm 尾側の連続した 3 切片を抽出した。光学顕微鏡下で camera-lucida を用いて片側の各部位を記録し、c-Fos 陽性細胞の数をカウントした (各群 n=6)。PBN の亜核の部位は Fulwiler and Saper (1984)⁴⁰⁾ 及び Paxinos and Watson (2007)⁴¹⁾ を参考とした。各部位における 3 切片の c-Fos 陽性細胞数を合計し、各群の平均±標準誤差を示した。統計学的解析には対応のない t 検定を用い p<0.05 を有意差ありとした。

(3) 味蕾細胞の増殖や分化に対する低亜鉛の影響

低亜鉛群、低亜鉛対照群、低亜鉛回復群、低亜鉛回復群に対して、灌流固定後に有郭乳頭付近の組織を採取し、4%PFA にて後固定し、その後 20%ショ糖含有 PBS に浸漬した。試料を Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) にて包埋し、凍結させ、クライオスタット (Microtom, Walldorf, Germany) にて、14 μ m の凍結切片を作成した。

免疫染色 (味蕾細胞数、細胞型の検出)

味蕾の細胞数、細胞型の検出には各細胞型に対応した抗体と味蕾のマーカーである UEA-I、さらに DAPI を用いて免疫組織化学による、多重染色を施した。切片を PBS にて洗浄

後、界面活性剤を添加したクエン酸液に浸漬し、3分間マイクロウェーブ照射を行って抗原賦活化処理後、非特異的反応を抑制するために、室温で1% normal swine serum (DAKO, Copenhagen, Denmark)、3% bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, MO) を含む PBS で30分間ブロッキングを行ったのち、一次抗体を室温で16~18時間反応させた。一次抗体として、ポリクロナール抗 PLC β 2 抗体 (1:500; Santa Cruz Biotechnology Inc.)、ポリクロナール抗 NCAM 抗体 (1:500; Chemicon, Temecula, CA) そして、レクチン組織化学として fluorescence isothiocyanate (FITC) 標識 Jacalin (0.5mg/ml; Vector, Burlingame, CA) を用いた。PBS 洗浄後、Jacalin 以外の抗体についてはすべて Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR) にて、室温で2時間反応させた。さらに洗浄後すべて Texas Red isothiocyanated UEA- I (0.5 μ g/ml; Vector) にて2時間反応させた。PBS、DW で洗浄後、VectaShield with DAPI (Vector) で封入し、蛍光顕微鏡 (Axioskop 2 plus, Jena, Germany) により観察した。切片は、CCD カメラ (Axio Cam; Carl Zeiss) にて撮影した後、Photoshop^R (Adobe, San Jose, CA) にて明暗、コントラスト等の画像処理を行った。

定量解析のため、味蕾細胞数については1匹の有郭乳頭の試料から少なくとも20個の味蕾を含む味蕾を抽出した。UEA- I で標識された味蕾内の DAPI 陽性細胞の数を計測し、平均して1匹の値とし、各群6匹ずつ計測した。また、各マーカー陽性細胞の割合を調べるため、1匹の有郭乳頭の試料から細胞マーカーごとに少なくとも5個の味蕾について、UEA- I で標識された味蕾内の DAPI 陽性細胞の数とマーカー陽性細胞の数を計測し、マーカー陽性細胞の割合を算出した。各細胞型について、低亜鉛対照群と低亜鉛群の6匹ずつ計測し、それぞれの平均を比較した。

免疫染色 (増殖細胞の検出)

味蕾の増殖細胞の検出には抗 PCNA 抗体 (1:10000; DAKO) と味蕾のマーカーである

UEA-I、さらに DAPI を用いて免疫組織化学による多重染色を施した。上記と同様の方法で観察を行い、舌有郭乳頭の味蕾細胞中の PCNA 陽性細胞の割合を調べた。定量解析のために、1 匹の有郭乳頭の試料から 20 枚の切片を選び、味蕾内の PCNA 陽性細胞の発現の割合を算出し、各群 6 匹ずつの平均を比較した。

結果

(1) 食事性亜鉛欠乏性味覚障害モデルラットの評価

① 生理学的変化

モデル動物の生理学的変化として体重変化を調べた。低亜鉛群の体重増加は、低亜鉛飼料開始直後より対照群に比べて緩やかになり、開始 2 週間後より有意差を認めた。また低亜鉛群では、目の周囲皮膚の皮膚炎、体毛の減少が認められた。低亜鉛回復群では、正常飼料に戻した直後より、再び体重増加が認められ、正常飼料に戻した 1 週間後には目の周囲皮膚の皮膚炎も回復した (図 1、2)。

② 血清亜鉛濃度測定

低亜鉛飼料投与後 4 週の低亜鉛群では、正常飼料を投与した低亜鉛対照群に比べて、血清亜鉛濃度は有意に低下した。他の電解質 (Na, Cl, K, Ca, Mg) については低亜鉛対照群と低亜鉛群の間に差は認められなかった。低亜鉛回復群では、血清亜鉛値は低亜鉛回復対照群とほぼ同じにまで回復した (表 1)。

③ 48 時間二瓶選択実験

行動学的変化として 48 時間二瓶選択実験を行った。0.01mM QHCl に対して低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて、苦味溶液に対する嗜好率が有意に増加した。一方、低亜鉛回

復群では、苦味溶液に対する嗜好率は低亜鉛回復対照群と同様の値を示した（図 3）。その他の基本味については、甘味（10mM サッカリン）に対しては低亜鉛群と低亜鉛対照群の間に嗜好率に変化は認められなかった。塩味（0.3M NaCl）と酸味（10mM HCl）に対しては、低亜鉛群では、低亜鉛対照群に比べて嗜好率の有意な増加を認めた（図 4）。

④ Brief access test

低亜鉛によるラットの基本味に対する感受性の変化を調べるため、Brief access test を行った。苦味として QHCl を用いて調べたところ、測定濃度中最も高い 1mM において lick ratio が低亜鉛群では低亜鉛対照群に対して有意に高くなった。甘味と塩味でも、それぞれ測定濃度中の最も高い濃度である（100 mM サッカリン、1M NaCl）において lick ratio が低亜鉛群では低亜鉛対照群に対して有意に高くなった。酸味でも最も高い濃度（100mM HCl）で低亜鉛群が低亜鉛対照群に比べて高くなる傾向を示していた（図 5）。

（2）苦味刺激に対する PBN における神経活動の変化

elPBN、emPBN、dlPBN の部位における DW と 1mM QHCl による苦味刺激後の、c-Fos 陽性細胞を調べた。低亜鉛対照群、低亜鉛群、低亜鉛回復群の 3 群とも、DW 刺激により elPBN、emPBN、dlPBN の全ての部位で c-Fos 陽性細胞の発現を認めた（図 6, 7）。elPBN と emPBN の部位において、低亜鉛対照群では、DW 刺激に比べて苦味刺激によって c-Fos 陽性細胞の数が増加した（図 6 A, B）。一方、低亜鉛群では苦味刺激による c-Fos 陽性細胞の増加は見られず、DW 刺激と同程度の数の c-Fos 陽性細胞の発現が見られた（図 6 C, D）。低亜鉛回復群では、苦味刺激後の c-Fos 陽性ニューロンの数は低亜鉛対照群と同程度の発現が認められ、DW 刺激に比べて再び有意に増加していた（図 6 E, F）。dlPBN の部位においては、低亜鉛対照群では DW と苦味刺激と両方でほぼ同数の c-Fos 陽性細胞の発現が見られた（図 7 A, B）。これは、低亜鉛群でも、低亜鉛回復群でも同様であった（図 7 C, D, E, F）。

elPBN と emPBN の部位の c-Fos 陽性細胞の数を計測したところ、低亜鉛対照群では DW 刺激後 elPBN で 292.7 ± 18.8 個、emPBN で 17.3 ± 2.9 個（平均±標準誤差）であったのに対して、苦味刺激後 c-Fos 陽性細胞数はそれぞれ 428.7 ± 23.3 個、 41.0 ± 4.1 と有意な増加を認めた。一方、低亜鉛群では DW 刺激後の elPBN と emPBN の部位の c-Fos 陽性細胞の数は 276.0 ± 27.9 個、 17.3 ± 2.9 個で、苦味刺激後は 278.3 ± 8.0 個、 18.3 ± 3.2 個といずれの部位でも、DW 刺激と苦味刺激で c-Fos 陽性細胞の数に変化は認められなかった。また、低亜鉛対照群に比べて苦味刺激後の c-Fos 陽性細胞数は elPBN、emPBN の両部位で有意に低下していた。低亜鉛回復群では、DW 刺激後の c-Fos 陽性細胞数は elPBN で 280.2 ± 16.4 個、emPBN で 15.5 ± 1.4 個で、苦味刺激後の c-Fos 陽性細胞数はそれぞれ 429.2 ± 20.4 個、 45.3 ± 6.8 個と低亜鉛対照群と同程度まで回復し、両部位で DW 刺激に比べて再び有意に増加していた（図 8 A, B）。

dIPBN の部位では、低亜鉛対照群の DW 刺激後と苦味刺激後の c-Fos 陽性細胞の数は 68.7 ± 6.1 個と 69.5 ± 20.1 個で有意な差は見られなかった。低亜鉛群においても、 61.0 ± 8.2 個と 48.5 ± 8.6 個で有意な差は見られなかった。また、低亜鉛回復群においても、 52.3 ± 7.5 個と 57.8 ± 3.7 個と有意な差は認められなかった（図 8 C）。

（3）味蕾細胞の増殖や分化に対する低亜鉛の影響

低亜鉛が味覚受容器である味蕾に及ぼす影響を調べるため、味蕾細胞の増殖や分化について検討した。

① 味蕾細胞数

味孔を含む味蕾を動物 1 匹当たり少なくとも 20 個ずつ抽出し、味蕾内の細胞数を調べたところ、低亜鉛対照群 28.9 ± 2.4 個（平均±標準偏差）、低亜鉛群 30.5 ± 1.2 個、低亜鉛回復対照群 31.4 ± 1.7 個、低亜鉛回復群 30.6 ± 2.6 個と、全ての群間で味蕾細胞数に有意差は認められなかった（図 9、表 2）。

② 増殖細胞数の割合

有郭乳頭味蕾における PCNA 陽性細胞の発現に対する、低亜鉛の影響を調べた。低亜鉛対照群では PCNA 陽性細胞は味蕾の基底層や味蕾周囲の上皮基底層に多く発現が認められたが、低亜鉛群では PCNA 陽性細胞の発現は、味蕾の基底層や味蕾周囲の上皮基底層でも少なく、味蕾内 PCNA 陽性細胞の数も減少していた。低亜鉛回復群では低亜鉛回復対照群と同じ程度の PCNA 陽性細胞の発現が味蕾や味蕾周囲の上皮基底層に認められた (図 10)。

有郭乳頭味蕾内の PCNA 陽性細胞の割合を調べたところ、低亜鉛対照群 $17.5 \pm 1.6\%$ (平均 \pm 標準誤差) に比べ低亜鉛群では $9.9 \pm 1.0\%$ と PCNA 陽性細胞が約 3 分の 2 に有意に減少していた。低亜鉛回復群では $14.7 \pm 1.0\%$ と再び低亜鉛回復対照群 $14.5 \pm 1.2\%$ と同じ程度の PCNA 陽性細胞の発現が見られた (図 11)。

③ 味蕾の細胞型別の割合

味蕾の細胞型別のマーカーを用いて味蕾細胞の割合に対する低亜鉛の影響を調べた。有郭乳頭味蕾における各マーカー陽性細胞の発現は、II 型細胞のマーカーである PLC β 2 陽性細胞が低亜鉛対照群 $20.5 \pm 1.5\%$ (平均 \pm 標準誤差)、低亜鉛群 $20.2 \pm 0.8\%$ 、III 型細胞のマーカーである NCAM 陽性細胞が $14.0 \pm 1.5\%$ と $12.4 \pm 2.0\%$ 、IV 型細胞のマーカーである Jacalin 陽性細胞が $16.9 \pm 2.9\%$ と $13.9 \pm 1.9\%$ と、全ての細胞型で低亜鉛対照群と低亜鉛群の間で有意差は認められなかった (図 12、13)。

考察

(1) 食事性亜鉛欠乏性味覚障害モデルラットの評価

本実験では、低亜鉛飼料を 28 日間投与することで、食事性亜鉛欠乏性味覚障害モデル動物を作成した。この方法は、簡便であることから、低亜鉛動物の作成に広く用いられている^{32,33,43,45,46}。Golub (1995) らは、飼料の亜鉛濃度が 10 mg/kg 以下であれば、動物に軽度の亜鉛欠乏を引き起こし、亜鉛濃度が 5~7 mg/kg であれば、中等度の亜鉛欠乏を、1~2 mg/kg では重度の亜鉛欠乏を引き起こすと報告している⁴²⁾。本実験で用いた低亜鉛飼料の亜鉛濃度は 1.2 mg/kg で、3 週齢から 28 日間与えた。これは、同様に亜鉛濃度 2.2mg/kg や 0.6mg/kg の低亜鉛飼料を与えることで、亜鉛欠乏性味覚障害モデルラットを作製し、実験を行っていた先行研究を参考とした^{45,46}。28 日後の血清亜鉛濃度は亜鉛正常飼料を与えた低亜鉛対照群に対して、有意に低下していたが、他の電解質に変化は認められなかった。本実験で用いた、低亜鉛モデルラットは、成長障害や皮膚炎など、亜鉛欠乏特有の症状を示した。臨床においては、亜鉛欠乏性味覚障害の患者に対して、亜鉛の投与にて血清亜鉛濃度の正常化や味覚症状の回復を認めたという報告が見られる^{3,4,5)}。本実験においても、低亜鉛飼料投与後に再び亜鉛正常飼料を投与した低亜鉛回復群では、血清亜鉛濃度の回復、成長の回復、皮膚症状の回復が認められた。

食事性亜鉛欠乏性モデル動物の味覚変化について

亜鉛欠乏性味覚障害の症状について、臨床報告によると、「肉の味がおかしくなった。」「キャンディーの味がわかりにくくなった。」「歯磨き粉が苦く感じる。甘みや塩味もしなくなった。」といったように、ある基本味に特定に症状が現れるといった報告は見られない⁴⁷⁾。

本実験では、低亜鉛モデル動物の味覚感受性の変化を調べるために苦味、甘味、塩味、酸味の 4 基本味について 48 時間 2 瓶選択法を行った。その結果、低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて苦味、塩味、酸味に対する嗜好率の増加を認めた。苦味と酸味は低亜鉛対照群でも

低亜鉛群においても味溶液に対する忌避（嗜好率 50%未満）を示すが、低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて嗜好率は有意に上昇していた。これは、低亜鉛による味覚の変化が、忌避行動の減弱を引き起こしたと考える。塩味は特殊な性質を持ち低濃度では美味しく、高濃度では不快な味と感じる。0.3M の高濃度 NaCl 溶液では、低亜鉛対照群は忌避行動を示したが、低亜鉛群では嗜好性（嗜好率 50%以上）を示した。このことは低亜鉛動物では 0.3M は実際よりも低濃度として認知している可能性を示す。ただし、亜鉛欠乏性味覚障害ラットの食塩に対する嗜好率の上昇は味覚系に原因があるのではなく、中枢性の疾病やホルモンなど体液性成分が関与した食後効果によると考えられることが報告されている⁴⁸⁾。

Brief access test は短時間で測定が終了することから、口腔内の味情報のみが反映され、食後効果は影響を及ぼさないと考えられている。Brief access test の結果、苦味、甘味、塩味の最も高い濃度で lick ratio が、低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて有意に高くなり、酸味でも最も高い濃度で lick ratio が、低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて高くなる傾向を示した。低亜鉛により高濃度味溶液に対する忌避行動の減弱を認めたことより、味覚障害の中でも味覚減退が起こっていると考えられる。

甘味について、10mM サッカリンを用いた 2 瓶選択法では低亜鉛による嗜好率の変化を認めなかったが、Brief access test では 100mM サッカリンで低亜鉛による味覚の変化を認めた。これは、サッカリンは嗜好性の味質であり 10mM 濃度サッカリンでは低亜鉛対照群でも低亜鉛群でも強い嗜好性を示したため変化が認められなかったと考えられる。しかし、サッカリンも濃度が高くなると後味の苦味が強くなり、100mM サッカリンでは忌避性の味質となる。そのため、低亜鉛対照群と低亜鉛群の間で変化が見られたのではないかと考えられる。以上より、食事性亜鉛欠乏性味覚障害モデルラットでは忌避性の味に対する味覚減退を示す可能性が示唆された。亜鉛欠乏ラットを用いた報告では、Catalanotto らによると甘味（ショ糖）、苦味（QHCl）、塩味（NaCl）、酸味（HCl）に対して 2 瓶選択法を用いた実験で、嗜好率の増加を認めたという報告がある⁴³⁾。一方で、Goto らによると、塩味

(NaCl)、苦味 (QHCl) を用いた 2 瓶選択法で亜鉛欠乏ラットにおける嗜好率の低下を示し、塩味、酸味、苦味、うま味に対する鼓索神経応答が減弱したという報告がある⁴⁵⁾。ショ糖は食後効果の影響を強く受けることより、2 瓶選択法の嗜好率の増加が味覚の変化だけによるものかどうかは判断できない。嗜好性の味質に対する低亜鉛の影響についてはさらなる研究が必要である。

また、味覚減退を示すのであれば、低濃度の忌避性の味溶液の飲水量の増加、または低濃度の嗜好性の味溶液の飲水量の減少が認められると考えられるが、本研究では低濃度においては低亜鉛対照群と低亜鉛群の間の変化は見られなかった。これは、本研究では絶水によってラットの飲水欲求を高めているため、水と低濃度味溶液の 10 秒間の lick 数はほぼ同等、すなわち lick ratio はほぼ 1 となり、低濃度味溶液での低亜鉛群と低亜鉛対照群との差を検出することができなかつたのではないかと考えられる。低亜鉛対照群と低亜鉛群では体重や低亜鉛による行動への影響により⁴⁴⁾、10 秒間の lick 数にかなり差が見られたため、本実験では DW と味溶液の lick 数の比を用いた。低濃度味溶液に対する低亜鉛群ラットの味覚変化を調べるためには、絶水せずに Brief access test を行うなど、方法の変更が必要と考えられる。

また、飲水量は体重の影響を受けるため、0.01mM QHCl を用いた 2 瓶選択法で体重 100g 当たりの飲水量を調べたところ、低亜鉛群では体重当たりの 0.01mM QHCl の飲水量、体重当たりの DW 飲水量も有意に増加していた。Catalanotto らによると、亜鉛欠乏ラットにおいて味溶液の飲水量の増加が起きること、また忌避性の味に対しては DW の飲水量も増加するが、嗜好性の味では DW の飲水量は変化しなかつたと報告されている⁴³⁾。臨床においては、亜鉛欠乏の症状で多飲に関する報告は認められない。DW の飲水量が増えた原因は不明だが、亜鉛欠乏による血清の電解質の変化が生体の水分バランスに影響を及ぼした結果、多飲になった可能性は考えられる。亜鉛欠乏によって、多飲になるメカニズムに関してはさらなる研究が必要である。

(2) 苦味刺激に対する PBN における神経活動の変化

低亜鉛対照群ラットでは、苦味刺激を与えると elPBN と emPBN の部位では DW 刺激に比べて c-Fos 陽性細胞数は増加を示し、一方 dlPBN では苦味刺激後の c-Fos 陽性細胞数は DW 刺激後と比べて変化しなかった。これは、Yamamoto らの報告と一致する³⁹⁾。また、低亜鉛群ラットでは、苦味刺激に対する c-Fos 陽性細胞数は、elPBN、emPBN、dlPBN の全てで DW 刺激と比べて変化は見られなかった。このことは、低亜鉛状態が味覚伝導路において神経活動を低下させ、味覚異常を引き起こしたと考えられる。一方で、低亜鉛動物を用いた実験では、記憶や学習障害、うつ状態など様々な神経学的な変化が起こることが報告されている⁴⁴⁾。PBN における味覚神経細胞は末梢の味覚受容体からの上行性の神経入力を受けるとともに、前頭葉からの下行性の神経入力も受けるため、大脳皮質レベルで苦味の情報処理に変化が認められた可能性も考えられる。以上より、低亜鉛状態によって引き起こされる味覚異常は、味覚伝導路だけでなく、様々な神経学的変化によって引き起こされたものであろうことが示唆された。

また、味覚の一次中継核である孤束核においても、低亜鉛の影響によって苦味刺激に対する神経活動に変化が起こっているのかという問題に対しては、今回の実験では調べられておらず、他にも報告は見当たらず不明である。しかし、亜鉛欠乏ラットを用いて味神経（鼓索神経）応答を調べた Goto らの報告によると、長期の亜鉛欠乏ラットにおいては、甘味以外の塩味、苦味、酸味、うま味刺激に対する鼓索神経応答が減弱しており⁴⁵⁾、このことから、中枢における味覚の一次中継核である孤束核での苦味刺激に対する神経活動も減少していると考えられる。

また、低亜鉛により elPBN と emPBN において苦味刺激後の c-Fos 陽性細胞の数は減少したが、水や甘味を感じる dlPBN においては、低亜鉛による影響は認められなかった。このことは、苦味を甘味など異なる味として感じる「錯味症」ではなく、2 瓶選択法や Brief access test での行動実験で示されたのと同様、苦味の味覚閾値が上昇する、「味覚減退」が

起きたと考えられる。

また、低亜鉛による苦味に対する味覚減退は、亜鉛正常飼料の摂取によって回復することが明らかとなった。

(3) 味蕾細胞の増殖や分化に対する低亜鉛の影響

低亜鉛により味蕾の細胞増殖マーカーである PCNA 陽性細胞の割合が約 2/3 に減少したが、味蕾細胞数に変化はなかった。味蕾細胞の life span が変わらなければ、低亜鉛群での味蕾の細胞数は減少していると考えられるが、味蕾の細胞数が変わらなかったことより、低亜鉛群では味蕾細胞の life span が約 1.5 倍に延長していると考えられた。Ohki らによる ³H-thymidine 取り込み実験の報告では、正常ラットの味蕾細胞の turnover time が約 238 時間であるのに対して、亜鉛欠乏性味覚障害ラットで 356 時間と turnover time が約 1.5 倍に延長しており、本実験の結果と一致している³³⁾。Miura らの報告によると、味蕾基底部分には分泌性の誘導因子であり、細胞の増殖と分化の調節に重要な役割を果たしている Sonic hedgehog (Shh) が発現しており、味蕾基底部の周囲上皮には Shh の受容体である Patched-1 (Ptc) や、Shh シグナル系の下流で発現する Zn フィンガー因子である Gli1 の発現も認められる^{25, 49, 50)}。低亜鉛によって Gli1 の発現が減少することで、Shh シグナル系が抑制され、味蕾細胞の新生、増加も減少したのではないかと考えられる。

低亜鉛回復群では PCNA 陽性細胞の数が、低亜鉛回復対照群と同程度に回復し、味蕾の細胞数には変化がなかったことより、亜鉛正常飼料の摂取により、味蕾細胞の turnover time の延長も回復したと考えられる。上述した Ohki の実験でも、亜鉛欠乏性味覚障害ラットへの亜鉛の再投与にて turnover time が正常に戻ったと報告されている³³⁾。

次に、低亜鉛が味蕾細胞の新生、増殖だけでなく、味蕾細胞の分化にも影響を与えているのかどうかを調べるために、味蕾の 4 種の細胞型別のマーカーを用いてその割合に対する低亜鉛の影響を調べた。有郭乳頭味蕾における各マーカー陽性細胞の発現は II 型細胞マ-

カーの PLC β 2 陽性細胞、III型のマーカーである NCAM 陽性細胞、IV型細胞マーカーの Jacalin 陽性細胞の発現の全てで、低亜鉛対照群と低亜鉛群の間で変化は認められなかった。味蕾細胞の細胞分化における細胞系譜については、多くの研究が行われているが、未だ一致した見解は得られていない。大きく 2 つの説があり、1 つは前駆細胞であるIV型細胞がそれぞれ I 型細胞、II 型細胞、III型細胞へ分化するという多元説と、IV型細胞から I 型細胞、II 型細胞さらにIII型細胞へと順を追って成熟していくという一元説がある。今回の結果より、低亜鉛による味蕾細胞の turnover time の延長は、細胞系譜の詳細は不明であるが、味蕾の全ての細胞型に及んでいると考えられた。このことより、低亜鉛による味蕾細胞の新生・増加に加えて、分化も遅延している可能性が示唆された。

結論

今回の研究により、食事性亜鉛欠乏性動物では苦味刺激に対して味覚伝導路の中継核である PBN において、神経活性の指標となる c-Fos 発現が減少していることが明らかになった。このことより、低亜鉛により、苦味の受容・伝達に変化が起き、苦味に対する味覚減退が生じていることが示唆された。また、味蕾細胞の増殖や分化に対する低亜鉛の影響を調べたところ、味蕾細胞の turnover time が延長し、その影響は味蕾の全ての細胞型に及んでいることが明らかとなった。このことより、低亜鉛により味蕾細胞の新生・増加に加えて、分化も遅延しており、味蕾細胞の turnover time の延長が細胞の老朽化を引き起こし、受容機能に影響を及ぼすことで、味覚障害を引き起こすことが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた大阪大学大学院歯学研究科 歯科麻酔学教室 丹羽均教授さらに研究の遂行にあたり終始御懇篤なるご指導と御教示を賜りました口腔解剖学第一教室 脇坂聡教授ならびに梅花女子大学看護保健学部 口腔保健学科 本間志保教授に心より御礼申し上げます。最後に本研究に対し多くのご援助、ご協力を頂いた大阪大学大学院歯学研究科 歯科麻酔学教室および口腔解剖学第一教室の皆様方に感謝致します。

文献

- 1) 厚生労働省 (2011) 重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬物性味覚障害.
- 2) Henkin RI and Bradly DF. (1969) : Reguration of taste acuity by thiols and metal ions. *Proc Natl Acad Sci USA*. **62**, 30-37.
- 3) Henkin RI, Schechter PJ, Friedewald WT, Demets DL, Raff M. (1976) : A double blind study of the effects of zinc sulfate on taste and smell dysfunction. *Am J med Sci.*, **272**, 285-299.
- 4) Heckmann SM, Hujoel P, Habiger S, Friess W, Wichmann M, Heckmann JG, Hummal T. (2005) : Zinc gluconate in the treatment of dysgeusia- a randomized clinical trial. *J Dent Res*, **84**, 35-38.
- 5) Prasad AS, Miale Jr, A, Farid, Z., Sandstead, H.H., Shulert, A, R. (1963) : Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism, *J Lab Clin Med.*, 61, 537-549.
- 6) Lindemann B. (2001) : Receptors and transduction in taste. *Nature*, **413**, 219-225.
- 7) Beidler LM, Smallman RL. (1965) : Renewal of cells within taste buds. *J Cell Biol.*, **27**, 263-272.
- 8) Cho YK, Farbman AI, Smith DV. (1998) : The timing of alph-gustducin expression during cell renewal in rat vallate taste buds. *Chem Senses*, **23**, 735-742.
- 9) Hamamichi R, Asano-miyoshi M, Emori Y. (2006) : Taste bud contains both short-lived and long-lived cell populations. *Neuroscience*, **141(4)**, 2129-38.
- 10) Murry RG, Murry A.(1960) : The fine structure of the taste buds of rhesus and synomalgus monkys. *Anat Rec.*, **138**, 211-33.

- 11) Pumplim DW, Yu C, Smith DV. (1997) : Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *J Comp Neurol.*, **378**, 389-410.
- 12) Smith CA, Rasmussen GL. (1965) : Degeneration in the different nerve endings in the cochlea after axonal section. *J Cell Biol.*, **26**, 64-77.
- 13) Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K. (2011) : Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci.*, **14(6)**, 685-687.
- 14) Daikoku H, Morisaki I, Ogawa Y, Maeda T, Kurisu K, Wakisaka S.(1999) : Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozyme II in the gustatory epithelium of the adult rat. *Chem Senses*, **24**, 255-261.
- 15) Lawton DM, Furness DN, Lindemann B, Hakney CM. (2000) : Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur J Neurosci.*, **12**, 3163-3171.
- 16) Smith DV, Klevitsky R, Akeson RA, Shipley ML. (1994) : Taste bud expression of human blood group antigens. *J Comp Neurol.*, **343**. 130-142.
- 17) Yang R, Tabata S, Crowlwy HH, Margolskee RF, Kinnamon JC. (2000) : Ultrastructural localization of gustducin immunoreactivity in microvilli of type II taste cells in the rat. *J Comp Neurol.*, **425**, 139-151.
- 18) Clapp TR ,Stone LM, Margolskee RF, Kinnamon SC. (2001) : Immunocytochemical evidence for co-expression of TypeIII IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci.*, **2**, 6.
- 19) Clapp TR, Yang R, Stoick CL, Kinnamon SC, Kinnamon JC. (2004) : Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of phospholipase C signaling pathway. *J Comp Neurol.*, **468**, 311-321.

- 20) Kanazawa H, Yoshie S. (1996) : The taste bud and its innervation in the rat as studied by immunohistochemistry for PGP 9.5. *Arch Histol Cytol.*, **59**, 357-367.
- 21) Nelson GM, Finger TE. (1993) : Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *J Comp Neurol.*, **336**, 507-516.
- 22) Smith DV, Klevitsky R, Akeson RA, Shipley MT. (1993) : NCAM expression by subsets of taste cells is dependent upon innervation. *J Comp Neurol.*, **336**, 493-506.
- 23) Yang R, Crowley HH, Rock ME, Kinnamon JC. (2000) : Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *J Comp Neurol.*, **424**, 205-215.
- 24) Yee CL, Yang R, Bottger B, Finger TE. (2001) : “TypeIII” cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J Comp Neurol.*, **440**, 97-108.
- 25) Miura H, Kusakabe Y, Kato H, Miura-Ohnuma J, Tagami M, Ninomiya Y, Hini A. (2003) : Co-expression pattern of Shh with Prox1 and that of Nkx2.2 with Mash1 in mouse taste bud. *Gene Expr Patterns.*, **3**, 427-430.
- 26) Taniguchi R, Shi L, Fujii M, Ueda K, Honma S, Wakisaka S. (2005) : Jacalin and peanut agglutinin (PNA) bindings in the taste bud cells of the rat: new reliable markers for type IV cells of the rat taste buds. *Arch Histol Cytol.*, **68**, 243-250.
- 27) Knapp L, Lawton A, Oakley B, Wong L, Zhang C. (1995) : Keratins as markers of differentiated taste cells of the rat. *Differentiation*, **58**, 341-349.
- 28) Taniguchi R, Shi L, Honma S, Fujii M, Ueda K, El-Sharby A, Wakisaka S. (2004) : Localization of Ulex europaeus agglutinin- I (UEA- I) in the developing gustatory epithelium of the rat. *Arch Histol Cytol.*, **67**, 187-193.

- 29) Hasegawa H and Tomita H. (1986) : Assessment of taste disorders in rats by simultaneous study of the two-bottle preference test and abnormal ingesting behavior. *Auris Nasus Larynx.*, **13** (Suppl.1), 33-41.
- 30) Komai M, Goto T, Suzuki H, Takeda T and Furukawa Y. (2000) : Zinc deficiency and taste dysfunction; contribution of carbonic anhydrase, a zinc-metalloenzyme, to normal taste sensation. *Biofactors*, **12**, 65-70.
- 31) Naganuma M, Ikeda M and Tomita H. (1988) : Changes in soft palate taste buds of rats due to aging and zinc deficiency. Scanning electron microscopic observation. *Auris Nasus Larynx.*, **15**. 117-127.
- 32) Kobayashi T & Tomita H (1986) : Electron microscopic observation of vallate taste buds of zinc-deficient rats with taste disturbance. *Auris Nasus Larynx.*, **13** (Suppl.1), 25-31.
- 33) Ohki M. (1990) : Turnover of taste bud cells in rats with taste disorder caused by zinc deficiency. *J Nihon Univ Med Assoc.*, **49**, 189-199.
- 34) Sekine H, Takao K, Kokubun S, Ikeda M. (2012) : Effects of zinc deficiency and supplementation of gene expression of bitter taste receptors (TAS2Rs) on the tongue in rat. *Laryngoscope*, **122**, 2411-2417.
- 35) Ikeda A, Sekine H, Takao K, Ikeda M. (2013) : Expression and localization of taste receptor genes in the vallate papillae of rats: effect of zinc deficiency. *Acta Oto Laryngol.*, **133**, 957-964.
- 36) Yamamoto T, Shimura T, Sakai N, Ozaki N. (1994) : Representation of hedonics and quality of taste stimuli in the parabrachial nucleus of the rat. *Physiol Behav.*, **56**, 1197-1202.

- 37) Martin B, Shin YK., White CM, Ji S, Kim W, Carlson OD, Napora JK., Chadwick W, Chapter M, Waschek JA, Mattson MP, Maudsley S, Egan JM. (2010) : Vasoactive intestinal peptide-null mice demonstrate enhanced sweet taste preference, dysglycemia, and reduced taste bud leptin receptor expression. *Diabetes*, **59**, 1143-1152.
- 38) Schier LA, Spector AC. (2016) : Post-oral sugar detection rapidly and chemospecifically modulates taste guided behavior. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, **311**, R742-R755
- 39) Yamamoto T, Sawa K. (2000) : Comparison of c-Fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusion of chemical solutions in rats. *Brain Res.*, **866**, 144-151.
- 40) Fulwiler CE, Saper CB. (1984) : Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res Rev.*, **7**, 229-259.
- 41) Paxinos G, Watson C. (2007) : In "The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates." (6th edition), *Academic Press (Elsevier)*, Amsterdam, Netherlands.
- 42) Golub MS, Keen CL, Gershwin ME, Hendrickx A G. (1995) : Developmental zinc deficiency and behavior. *J Nutr.*, **125**, 2263-2271.
- 43) Catalanotto FA, Lacy P. (1977) : Effect of a zinc-deficient diet upon fluid intake in rat. *J Nutr.*, **107**, 436-442.
- 44) Hagemeyer S, Haderspeck JC, Grabrucker AM. (2015) : Behavioral impairments in animal models for zinc deficiency. *Front Behav Neurosci.*, **8**, 1-16.
- 45) Goto T, Komai M, Suzuki H and Furukawa Y. (2001) : Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J Nutr.*, **131**, 305-310.

- 46) Hamano H, Yoshinaga K, Eta R, Emori Y, Kawasaki D, Iino Y, Kuroda H, Takei M. (2006) : Effect of polaprezinc on taste disorders in zinc-deficient rats. *Biofactors*, **28**, 185-193.
- 47) Henkin RI, Patten BM., Re PK., Bronzert DA. (1975) : A syndrome of acute zinc loss. *Arch Neurol.*, **32**, 745-751.
- 48) Jakinovich W Jr and Osborn DW. (1981) : Zinc nutrition and salt preference in rat. *Am J Physiol.*, **241**, R233-R239.
- 49) Miura H, Kusakabe Y, Sugiyama C, Kawamatsu M, Ninomiya Y, Motoyama J, Hino A. (2001) : Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in adult mice. *Mech Dev.*, **106**, 143-145
- 50) Miura H, Kato H, Kusakabe Y, Tagami M, Miura-Ohnuma J, Ninomiya Y, Hino A. (2004) : A strong nerve dependence of sonic hedgehog expression in basal cells in mouse taste bud and an autonomous transcriptional control of genes in differentiated taste cells. *Chem Senses*, **29**, 823-831.

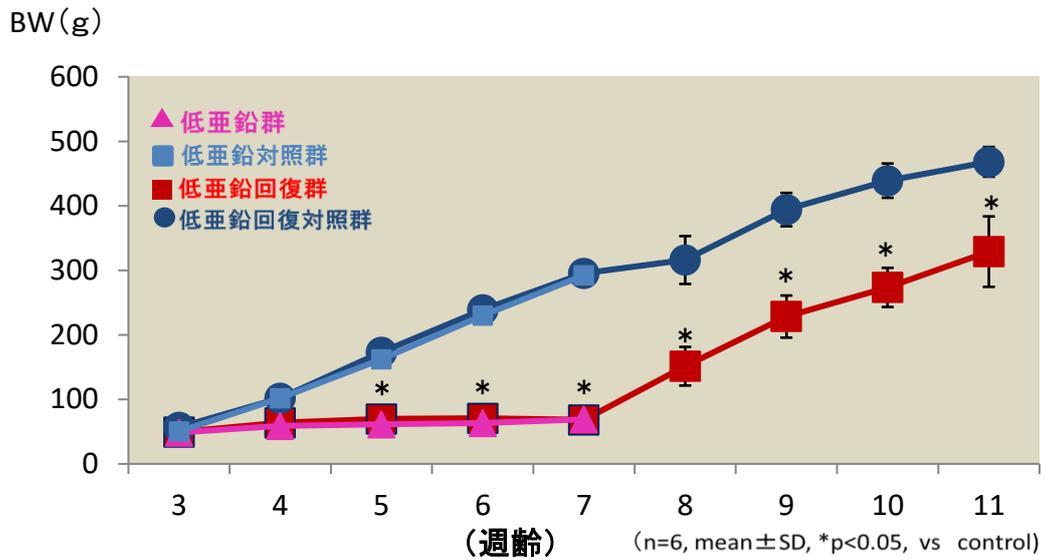


図 1. ラットの体重変化

低亜鉛群の体重増加は、低亜鉛飼料開始直後より対照群に比べて緩やかになり、開始2週間後より有意差を認めた。低亜鉛回復群では、正常飼料に戻した直後より、再び体重増加が認められた。BW: body weight.

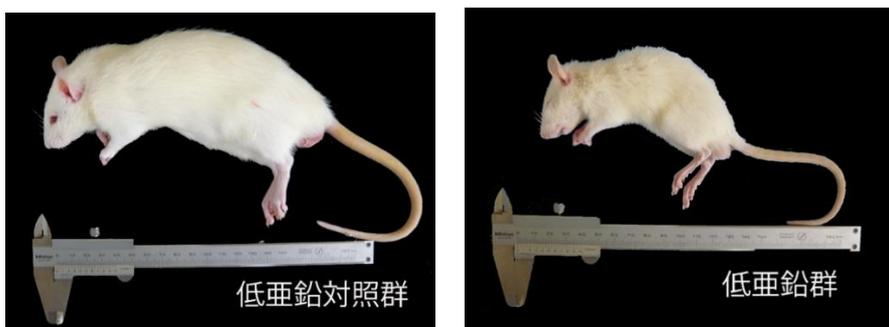


図 2. 7週齢の低亜鉛対照群ラットと低亜鉛群ラット

低亜鉛群は、低亜鉛対照群に比べて体格が小さく、目の周囲皮膚の皮膚炎、体毛の減少が認められた。

	7 weeks		11 weeks	
	低亜鉛対照群	低亜鉛群	低亜鉛回復対照群	低亜鉛回復群
Zn (μg/dl)	129.8 ± 13.5	36.1 ± 23.3**	136.3 ± 12.3	151.6 ± 24.0
Na (mEq/l)	134.3 ± 3.8	136.4 ± 6.1	136.3 ± 2.4	136.2 ± 3.3
Cl (mEq/l)	97.1 ± 4.0	95.9 ± 3.1	96.5 ± 1.7	96.4 ± 3.0
K (mEq/l)	7.2 ± 1.3	6.2 ± 0.4	6.6 ± 0.5	6.4 ± 0.5
Ca (mEq/dl)	10.0 ± 0.4	9.5 ± 1.4	10.6 ± 0.6	10.3 ± 0.5
Mg (mEq/dl)	2.3 ± 0.5	1.8 ± 0.2	2.9 ± 0.4	2.9 ± 0.2

(n=6, mean ± SD, ** p<0.01, vs control)

表 1. 血清亜鉛濃度およびその他電解質

低亜鉛群では、低亜鉛対照群に比べて、血清亜鉛濃度は有意に低下したが他の電解質については低亜鉛対照群との間に差は認められなかった。低亜鉛回復群では、血清亜鉛濃度は低亜鉛回復対照群とほぼ同じにまで回復した。

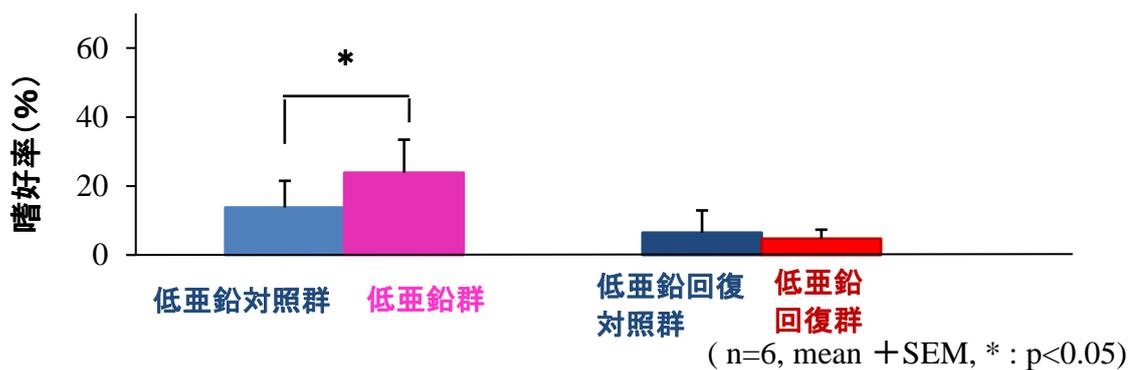


図 3. 2 瓶選択法による苦味 (0.01mM QHCl) に対する嗜好性の変化

低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて、苦味溶液に対する嗜好率が有意に増加した。一方、低亜鉛回復群では、苦味溶液に対する嗜好率は低亜鉛回復対照群とほぼ同様であった。

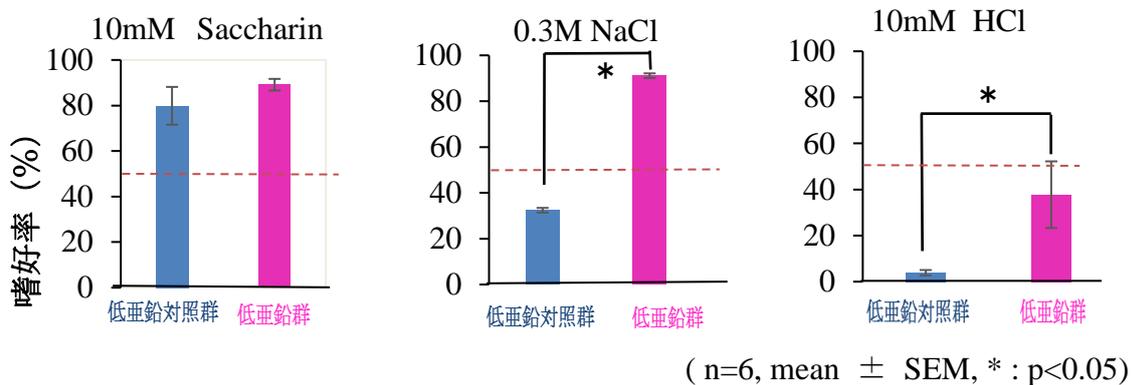


図 4. 2 瓶選択法による甘味 (10mM Saccharin)、塩味 (0.3M NaCl)、酸味 (10mM HCl) に対する嗜好性の変化

甘味に対しては低亜鉛群と低亜鉛対照群の間に変化は認められなかったが、塩味と酸味に対しては、低亜鉛群では、低亜鉛対照群に比べて嗜好率の増加を認めた。

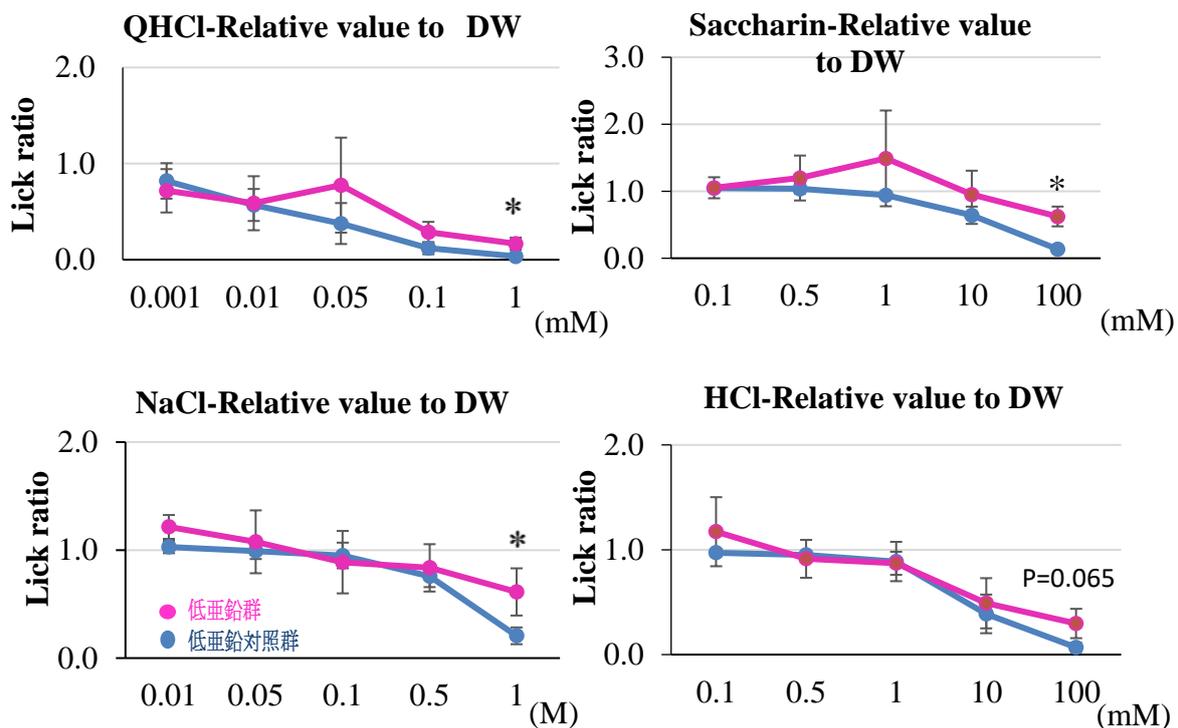


図 5. Brief access test による基本味に対する嗜好性の変化

苦味、甘味、塩味の最も高い濃度で lick ratio が、低亜鉛群では低亜鉛対照群に比べて有意に高くなった。酸味でも最も高い濃度で低亜鉛群が低亜鉛対照群に比べて高くなる傾向を示していた。(n=6, mean ± SEM, * p<0.05 v.s control.)

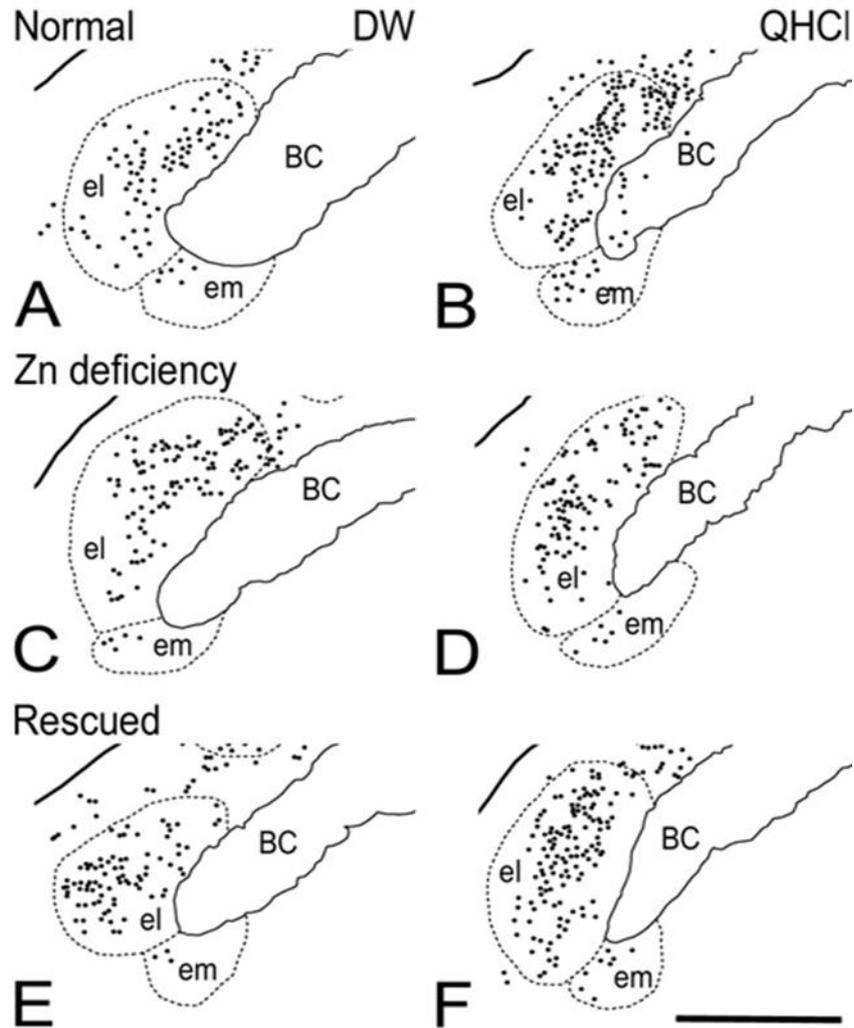


図 6. DW (A, C, E) と QHCl (B, D, F) による苦味刺激後の、elPBN、emPBN における、c-Fos 陽性ニューロンの発現

低亜鉛対照群 (A, B) では、DW 刺激に比べて苦味刺激によって c-Fos 陽性ニューロンが増加しているが、低亜鉛群 (C, D) では苦味刺激による c-Fos 陽性ニューロンの増加は見られず、DW 刺激と同程度の数の c-Fos 陽性ニューロンの発現が認められた。低亜鉛回復群 (E, F) では苦味刺激後に c-Fos 陽性ニューロンの発現が増加していた。

BC : 結合腕、el : 外部外側亜核、em : 外部内側亜核、Scale bar = 500 μ m

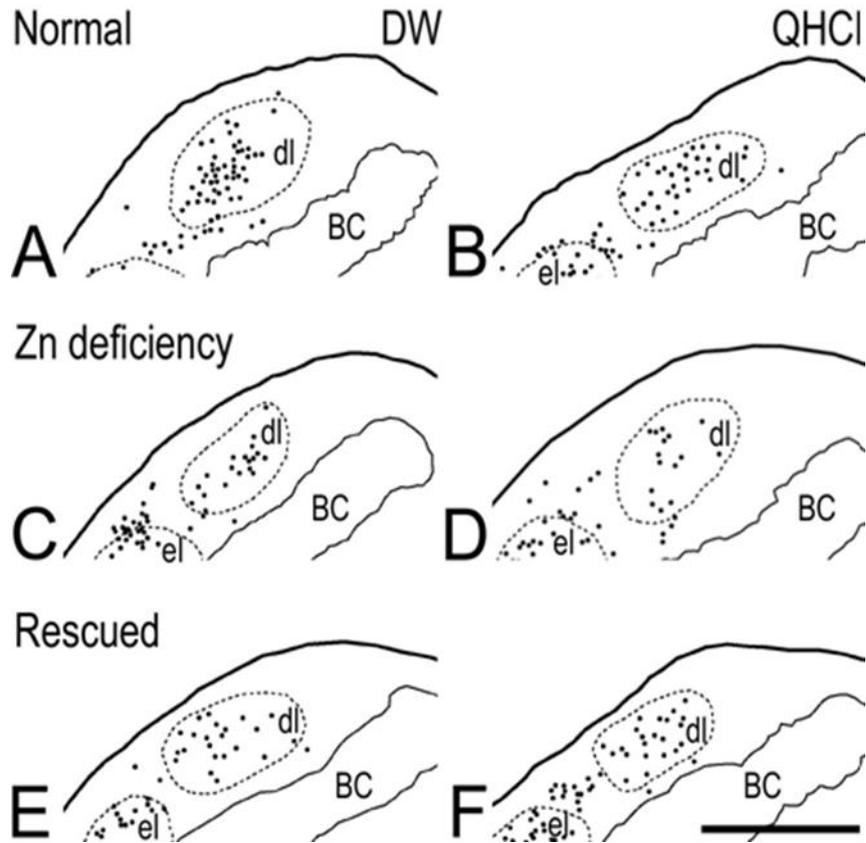


図7. DW (A, C, E) と QHCl (B, D, F) による苦味刺激後の、dIPBN における、c-Fos 陽性ニューロンの発現。

低亜鉛対照群 (A, B) では DW 刺激と苦味刺激の両方でほぼ同数の c-Fos 陽性ニューロンが確認され、変化は認められなかった。低亜鉛群 (C, D) でも、低亜鉛回復群 (E, F) でも同様であった。

BC : 結合腕、dl : 背側外側亜核、el : 外部外側亜核、Scale bar = 500 μ m

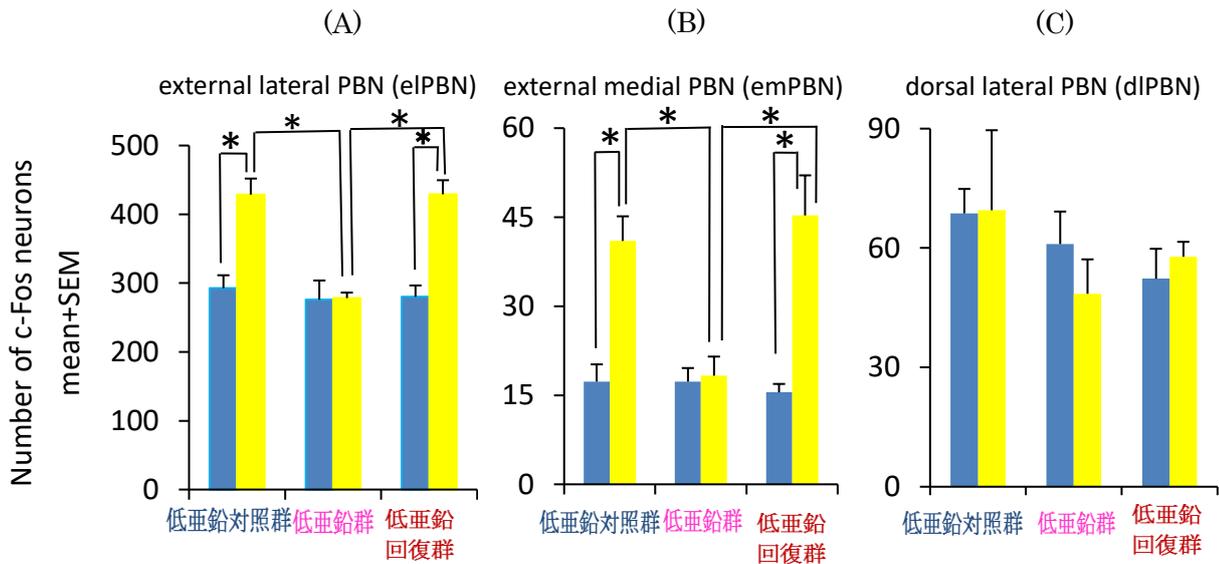


図 8. DW (■) と QHCl (■) による苦味刺激後の、elPBN (A)、emPBN (B)、dlPBN (C) における、c-Fos 陽性ニューロンの発現数。各群 n=6、*p<0.05。

elPBN (A)、emPBN (B) では、低亜鉛対照群では DW 刺激に比べて苦味刺激後 c-Fos 陽性ニューロンの有意な増加を認めた。一方、低亜鉛群では苦味刺激による c-Fos 陽性ニューロンの増加は認められず、対照群に比べて有意に低下していた。低亜鉛回復群では、苦味刺激後の c-Fos 陽性ニューロンの数は正常と同程度の発現が認められ、DW 刺激に比べて有意に増加していた。

dlPBN (C) では低亜鉛対照群、低亜鉛群、低亜鉛回復群とも、DW 刺激と苦味刺激後の c-Fos 陽性ニューロン数に有意な差は認められなかった。

低亜鉛対照群

低亜鉛群

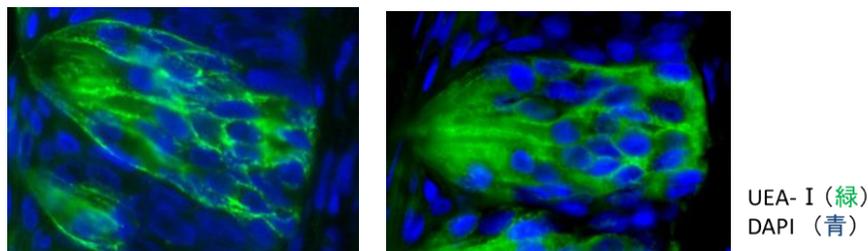


図 9. 低亜鉛対照群ラットと低亜鉛群ラットの有郭乳頭味蕾の像

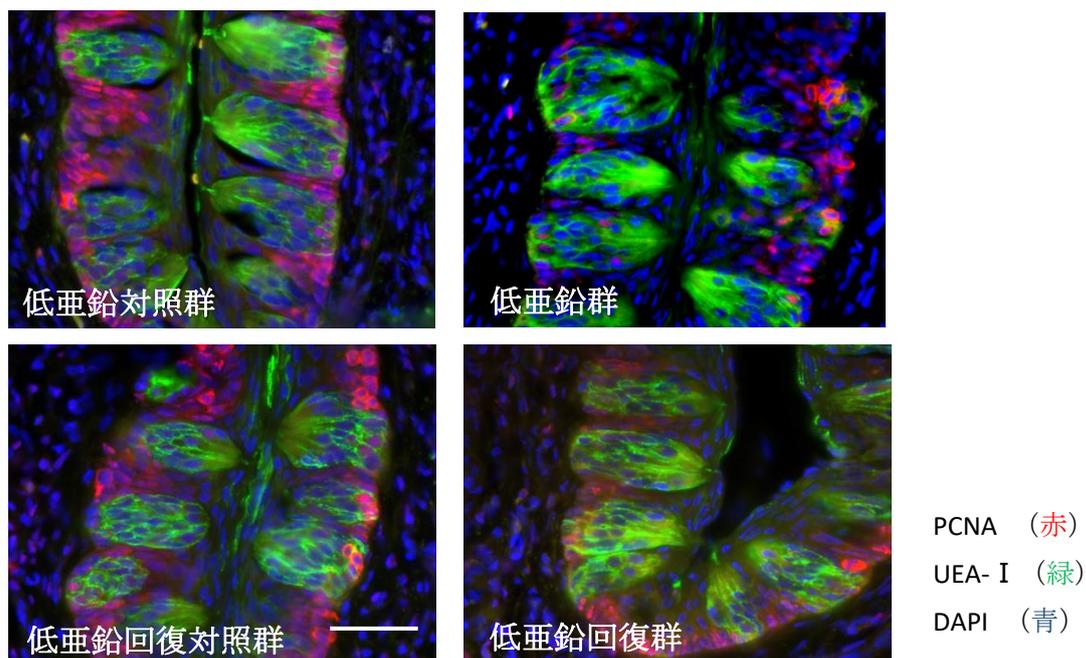
味蕾細胞数(個)

7 週齢		11 週齢	
低亜鉛対照群	低亜鉛群	低亜鉛回復対照群	低亜鉛回復群
28.9±2.4	30.5±1.2	31.4±1.7	30.6±2.6

(n=6, mean ± SD)

表 2. 各群の有郭乳頭味蕾内の味蕾細胞数

全ての群間で味蕾細胞数に変化は認められなかった。



Scale bar = 50 μ m

図 10. 有郭乳頭味蕾における PCNA 陽性細胞の発現

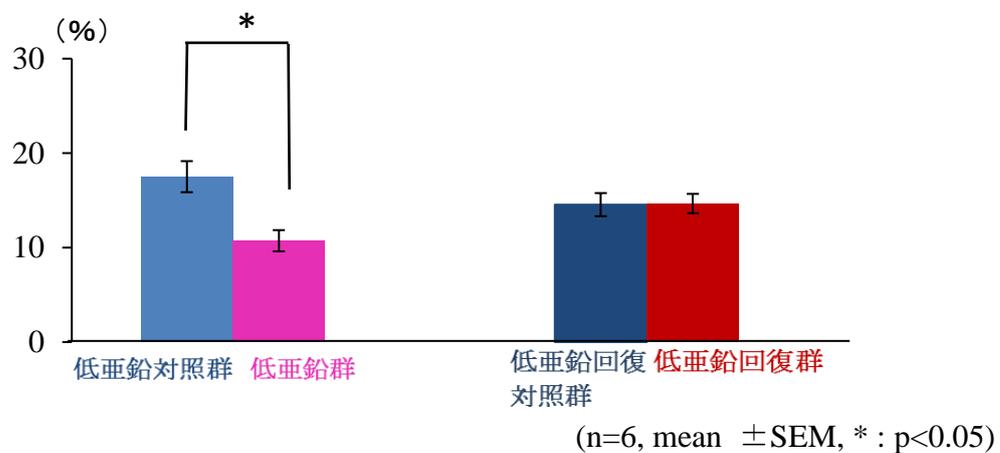


図 11. 有郭乳頭味蕾内の PCNA 陽性細胞の割合

低亜鉛対照群に比べ低亜鉛群では PCNA 陽性細胞が約 3 分の 2 に有意に減少していた。

低亜鉛回復群では再び低亜鉛回復対照群と同じ程度の PCNA 陽性細胞の発現が見られた。

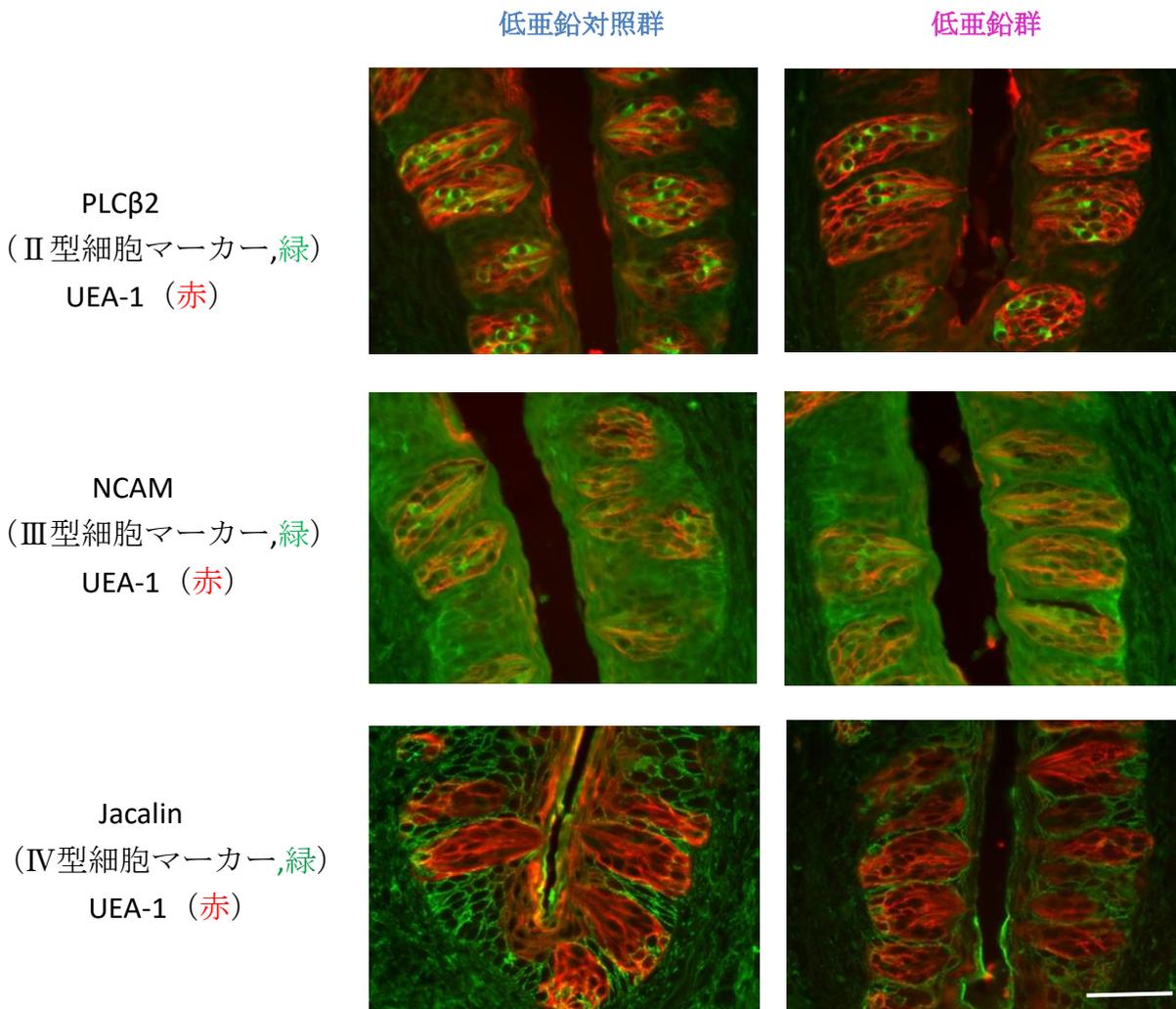


図 12. 有郭乳頭味蕾における各マーカー陽性細胞の発現。Scale bar = 50 μ m

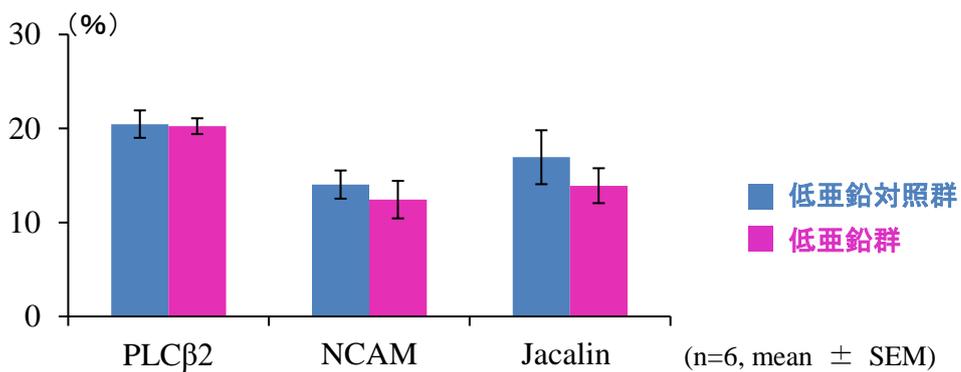


図 13. 有郭乳頭味蕾における各マーカー陽性細胞の割合

PLC β 2 (Ⅱ型細胞のマーカー)、NCAM (Ⅲ型細胞のマーカー)、Jacalin (Ⅳ型細胞のマーカー) 全てで、低亜鉛対照群と低亜鉛群の間で有意な差は認められなかった。

