The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	亜鉛欠乏飼料給餌動物における摂食行動の解析，亜鉛欠乏と咀嚼機能低下が空間記憶能力へ与える影響
Author(s)	木田，久美子
Citation	大阪大学，2014，博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34374
rights	© 2015. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　木田　久美子　）	
論文題名	亜鉛欠乏飼料給餌動物における摂食行動の解析，亜鉛欠乏と咀嚼機能低下が空間記憶能力へ与える影響

論文内容の要旨

【研究背景】

亜鉛は生体にとって重要な微量元素の一つであり，亜鉛欠乏は食欲不振，成長遅延など様々な症状を発現する．さらに，摂食調節や学習記憶にも亜鉛が関連すると報告されている．摂食調節においては，亜鉛欠乏動物では摂食量が低下し，視床下部内では摂食促進ペプチドの発現が増加していると報告されているが，亜鉛欠乏状態における摂食行動特性について詳細は不明である．

また，亜鉛欠乏動物では空間記憶能力が低下すると報告されており，咀嚼機能を低下させた老齢の老化促進マウスでは，海馬CA1領域のGFAP陽性アストロサイトの細胞密度の増加を伴い，空間記憶能力が低下すると報告されている．

そこで本研究では，亜鉛欠乏状態における摂食行動特性，すなわち「食べ方」について検討することを目的とし，摂食行動実験を行った．さらに，亜鉛欠乏および咀嚼機能低下の二つの条件の複合が空間記憶能力に与える影響について検討することを目的とし，行動生理学的に評価するとともに，記憶に関連するとされる海馬において免疫組織学的に評価を行った．

【研究方法】

研究１：亜鉛欠乏飼料給餌動物の摂食行動特性の解析

研究１－①：亜鉛欠乏飼料給餌動物の血清亜鉛値および総蛋白の測定

SD系雄性成獣ラット7週齢を標準飼料給餌(CT)群，亜鉛欠乏飼料給餌(ZD)群の二群に分け，それぞれ7週齢時より標準飼料(亜鉛含有量 4.89 mg/飼料100 g)もしくは亜鉛欠乏飼料(亜鉛含有量 0.06 mg/飼料 100 g)を自由摂取させた．8週齢時，ペントバルビタール腹腔内麻酔下，心臓採血法にて採血し，血清中の亜鉛濃度および総蛋白を測定した．

研究１－②：亜鉛欠乏飼料給餌動物の摂食行動特性の解析

SD系雄性成獣ラット7週齢をCT群，ZD群の二群に分け，それぞれ7週齢時より標準飼料もしくは亜鉛欠乏飼料を自由摂取させた．8週齢時，ZD群の飼料を標準飼料に変更した．8，9週齢時，日中および夜間のそれぞれ4時間のラットの摂食行動を観察した．観察開始時ケージ内に2 gの標準飼料を与え，すべて摂食した時点で飼料を追加し，自由摂取させた．4時間における累積摂食量，摂食行動開始までの時間，2 g飼料の摂食時間と摂食率，摂食中断時間を含めた2 g飼料の摂食時間，2 g飼料に対するboutの回数とbout(1回)の平均時間を測定し，これらを評価項目とした．

研究２：咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスにおける空間記憶能力の行動生理学的検討

ICR系雄性マウス3週齢を，コントロール(CT)群，抜歯(Ext)群，亜鉛欠乏飼料給餌(ZD)群，抜歯＋亜鉛欠乏飼料給餌(EZD)群の四群に分けた．CT群，Ext群は3週齢時より標準飼料を与えた．ZD群，EZD群は3週齢時より亜鉛欠乏飼料を与え，12週齢時以降は標準飼料を与えた．Ext群，EZD群は3週齢時，左側上下臼歯抜歯および左側咬筋切断を行った．8，13，22週齢時にwater maze testを行った．連続する8日間の試行で，初めの6日間はスタート地点からplatformに到達するまでの遊泳時間(escape latency)を測定した．7日目はplatformを取り除き，ゴールエリア滞在時間を計測した(probe test)．8日目はplatformを水面上に出しescape latencyを測定した(visible probe test)．day 1～6のescape latencyおよびゴール非到達回数，probe testのゴールエリア滞在時間，visible probe testのescape latencyを空間記憶能力の評価項目とした．

研究３：咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスの海馬における免疫組織学的検討

研究２のCT群(n=5)，Ext群(n=5)，ZD群(n=4)，EZD群(n=6)のマウスについて，8週齢時にday8までwater maze testを施行後，9日目にplatformを再度水面下に設置してescape latencyを測定した．90分後，ペントバルビタール腹腔内麻酔下，経心臓的に灌流固定した．抜脳した組織から海馬を含む連続前頭断凍結切片を作成し，抗GFAP抗体を用い免疫組織化学染色を行った．光学顕微鏡下にて海馬三領域CA1，CA3，DGにおけるGFAP陽性細胞を観察し，CA1，CA3領域では200 μm四方，DG領域では150 μm四方のグリッドを設定し，その中の細胞数を計測した．

【結果】

研究１：亜鉛欠乏飼料給餌動物の摂食行動特性の解析

研究１－①：亜鉛欠乏飼料給餌動物の血清亜鉛値および総蛋白の測定

ZD群の血清亜鉛値はCT群に比較し，有意に低値であった．血清総蛋白は両群間に有意差を認めなかった．

研究１－②：亜鉛欠乏飼料給餌動物の摂食行動特性の解析

8週齢時，ZD群の日中および夜間における4時間の累積摂食量はCT群に比較し有意に多く，摂食行動開始までの時間は有意に短縮した．ZD群の2 g飼料に対する摂食時間および摂食率はCT群と有意差を認めなかった．ZD群の摂食中断時間を含めた2 g飼料の摂食時間はCT群に比較し日中で有意に短縮し，夜間では延長する傾向を示した．ZD群のboutの回数は夜間で有意に増加し，bout1回の持続時間は有意に低下した．ZD群の飼料を標準飼料に変更すると，日中の摂食量は低下し，摂食行動開始までの時間は延長したが，その他の項目はほぼ変化を認めなかった．

研究２：咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスにおける空間記憶能力の行動生理学的検討

ZD群･EZD群は亜鉛欠乏飼料給餌期間中，CT群･Ext群に比較し有意に体重増加量が少なかった．8週齢時の試行において，CT群，Ext群はday1に比較し有意にescape latencyの短縮，ゴール非到達回数の減少を認めた．ZD群，EZD群はescape latencyの短縮およびゴール非到達回数の減少が有意ではなかった．probe testのゴールエリア滞在時間はEZD群で短い傾向を示した．visible probe testのescape latencyはZD群･EZD群がCT群･Ext群に比較し有意に延長した．ZD群，EZD群の飼料を標準飼料に変更すると，ZD群，EZD群のescape latencyの減少，ゴール非到達回数の減少傾向を認めた．

研究３：咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスの海馬における免疫組織学的検討

海馬CA1領域におけるGFAP陽性細胞密度はCT群･Ext群に比較し，ZD群･EZD群で有意に高かったが，CA3・DG領域では四群間に有意な差は認めなかった．CA1領域における各群のGFAP陽性細胞の形態に差を認めなかった．

【考察】

亜鉛欠乏動物では摂食量が低下すると報告されているが，本研究ではZD群はCT群に比較し，日中･夜間の摂食量が2倍以上増加した．本研究が過去の報告と異なる点は，行動観察の際に使用した飼料が両群とも標準飼料であったことである．亜鉛欠乏動物では脳内の摂食促進ペプチドの発現が増加し，亜鉛欠乏ラットに$ZnSO_4$を経管投与すると摂食促進ペプチドの発現が増加するとともに，摂食量も増加することが報告されている．本研究では亜鉛欠乏ラットに標準飼料を与えた際，飼料中に含まれる程度の亜鉛であっても消化管から吸収されることがトリガーとなり，脳内の摂食促進ペプチドの発現増加により摂食行動が誘発・加速され，摂食量の増加を認めた可能性が考えられる．また，ZD群は日中・夜間とも多動性の亢進による短時間の摂食行動の中断が観察された．boutの回数は摂食行動の中断回数を意味するが，夜間ではboutの回数が多く，総摂食時間は延長傾向を示した．これらの結果から，亜鉛欠乏動物では摂食に対する集中力を欠いていたため摂食行動の中断を生じた可能性が考えられる．

亜鉛欠乏動物では空間記憶能力が低下するという報告がある一方，2～3週間の亜鉛欠乏飼料給餌では空間記憶能力の低下を認めないとも報告されている．また，咀嚼機能を低下させた老齢の老化促進マウスでは空間記憶能力が低下すると報告されている．本研究で用いたマウスは若齢であり，過去の報告と同様にExt群は空間記憶能力の低下を認めなかった．ZD群では空間記憶能力の低下傾向を認め，亜鉛欠乏と咀嚼機能低下の両者が併存したEZD群では空間記憶能力の低下が増強した．ラット脳における亜鉛の生物学的半減期は16～42日であることから，本研究における5週間の亜鉛欠乏飼料給餌では脳内の亜鉛濃度が低下し，空間記憶能力が障害された可能性が考えられる．

空間記憶能力の低下の背景にある因子の検索として本研究では海馬のアストロサイトに着目した．咀嚼機能を低下させた老齢の老化促進マウスでは海馬CA1領域のGFAP陽性アストロサイトの密度増加とアストロサイトの肥大化を認めると報告されている．本研究では，ZD群･EZD群においてGFAP陽性アストロサイトの細胞密度が増加し，亜鉛欠乏飼料給餌による空間記憶能力低下にアストロサイトが関与する可能性が示唆された．

【結論】

亜鉛欠乏ラットでは，夜間だけでなく，摂食行動の活発でない日中においても標準飼料の摂食量が増加した．また，bout数の増加および多動性の亢進による摂食行動の中断が観察され，亜鉛欠乏動物における摂食行動特性の変化を認めた．

亜鉛欠乏飼料給餌により，海馬CA1領域におけるGFAP陽性アストロサイトの細胞密度の増加および空間記憶能力の低下傾向を認め，咀嚼機能低下条件が併存することで空間記憶能力の低下が増強することが明らかとなった．

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　木田　久美子　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	古郷　幹彦
	副 査	教授	姜　英男
	副 査	准教授	竹村　元秀
	副 査	准教授	小野　高裕

論文審査の結果の要旨

本研究は、摂食行動特性ならびに空間記憶能力に対して亜鉛が与える影響について、咀嚼機能低下を複合させた条件を含めて検討したものである。

本研究結果より、亜鉛欠乏条件下では、摂食量に加えて bout 数、bout 平均時間等摂食行動特性に変化を認めた。また、水迷路実験より亜鉛欠乏条件下では空間記憶能力は低下し、咀嚼機能低下条件を伴うとその効果は増強することが示唆された。さらに、亜鉛欠乏条件下では海馬 CA1 領域における GFAP 陽性アストロサイトの細胞密度が増加することが明らかとなった。

本研究は、生体内における亜鉛の摂食調節および学習記憶能力への関わりを解明する上で重要な知見を得るものであり、博士(歯学)の学位に十分値するものであると認める。