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

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科　統合機能口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座　口腔外科学第一教室

(指導教官:古郷　幹彦　教授)

木田　久美子

緒言

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，皮膚炎，味覚障害，性腺機能低下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亜鉛が関連することも報告されている．摂食調節においては，1．亜鉛欠乏飼料給餌により，摂食量が減少すること[1, 2)]，2．亜鉛欠乏飼料給餌ラットの視床下部内では摂食促進ペプチド NPY の発現が増加していることが報告されている[3)]．これらの報告から，亜鉛欠乏飼料給餌動物は，脳内で摂食行動が促進される因子が存在する一方で，摂食量は低下するという一見相反する傾向が共存していると考えられ，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，学習記憶においては，1．亜鉛は海馬に多く含まれること，2．亜鉛は神経細胞のシナプス小胞内に存在し，神経活動に伴いシナプス間隙に放出されること[4)]，3．亜鉛欠乏動物は空間記憶能力が低下し[5, 6, 7)]，海馬ニューロンのアポトーシス性の形態変化が観察されることが報告されている[8)]．また，亜鉛とは無関係に老化促進マウス(senescence-accelerated mice 8：SAMP8)において咀嚼機能を低下させると，海馬 CA1 領域の GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein)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ことが報告されている[9)]．このように学習記憶へ影響を与える因子として亜鉛欠乏および咀嚼機能低下が報告されているが，この両者の複合による空間記憶能力への影響については検討されていない．

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，亜鉛欠乏飼料給餌ラットを用いて，日中および夜間の摂食行動を観察し，摂食

量，摂食行動開始までの時間，一定量の飼料に対する摂食率，摂食開始から終了までに要する時間，bout†の回数などから摂食行動特性を評価した．また，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，抜歯および咬筋切断にて咀嚼機能低下モデルマウスを，亜鉛欠乏飼料給餌にて亜鉛欠乏モデルマウスを作成し，water maze test にて空間記憶能力の評価を行った．また海馬における GFAP 陽性アストロサイトの変化を定量的および形態学的に評価した．(bout†：摂食の単位であり，「途切れることのない単一の摂餌/摂水」と定義される [10]．)

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

実験には，SD 系雄性成獣ラット 7 週齢(体重 210～270 g，日本チャールス･リバー株式会社)12 匹を供した．ラットを標準飼料給餌(CT)群(n=6)，亜鉛欠乏飼料給餌(ZD)群(n=6)の二群に分け，それぞれ7週齢第1日目より標準飼料(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)を自由摂取させて飼育した(温度：20～22 ℃，湿度：40～50%，照明：明期 8 時～20 時)．8 週齢第 1 日目，ラットをペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®注射液，大日本製薬) 50 mg/kg にて腹腔内注射麻酔下，ラットを背位にし，前胸郭口より 22 G 注射針にて刺入し，心臓採血法にて5～10 ml の血液を採取した．採取した血液を酸処理チューブ(オリエンタル酵母㈱)に入れ，3,000 rpm，10 分間遠心し，血清を採取した．血清中の亜鉛濃度(μg/dL)(原子吸光分析法，原子吸光光度計(日立 Z6100)，オリエンタル酵母㈱ 長浜研究所 長浜ライフサイエンスラボラトリー)および総蛋白(mg/dL)(Biuret 法，日立 7180 型自動分析装置，オリエンタル酵母㈱ 長浜研究所 長浜ライフサイエンスラボラトリー)を測定した．二群間の有意差検定には unpaired t-test を用いた．

なお，研究1～3を通して，実験動物は全て大阪大学大学院歯学研究科動物実験規定と動物の愛護および管理に関する法律を遵守し取り扱った．

研究1－②：亜鉛欠乏飼料給餌動物の摂食行動特性の解析

実験には，SD 系雄性成獣ラット 7 週齢(体重 200～280 g，日本チャールス・リバー株式会社)14 匹を供した．ラットはプラスチックケージにて 1 匹ずつ飼育した(温度：20～22 ℃，湿度：40～50%，照明：明期 8 時～20 時)．ラットを標準飼料給餌(CT)群(n=5)，亜鉛欠乏飼料給餌(ZD)群(n=9)の二群に分け，それぞれ 7 週齢第 1 日目より標準飼料もしくは亜鉛欠乏飼料を 1 週間自由摂取させた．8 週齢第 1 日目に，ZD 群の飼料を標準飼料に変更し，さらに 1 週間飼育を続けた．8 および 9 週齢第 1 日目に，日中(10 時～14 時)および夜間(18 時～22 時)のラットの摂食行動を，HDD Video Camera(GZ-HD30，Victor)を用いて二方向から録画した [11]．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さらに標準飼料を追加し，自由摂取させた．観察時間 4 時間における累積摂食量(g)，観察開始から摂食行動開始までの時間(min)，2 g 飼料の摂食に要した時間(min)と摂食率(mg/sec)，2 g 飼料の摂食開始から終了までに要した時間(途中で摂食中断した場合はその時間も含む)，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．二群間の有意差検定には unpaired t-test を用いた．

研究2：咀嚼機能低下及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

実験には，ICR 系雄性マウス 3 週齢(体重 13～18 g，日本チャールス・リバー)46 匹を供した．マウスは 1 匹ずつプラスチックケージにて飼育した(温度：20～22 ℃，湿度：40～50%，照明：明期 6 時～18 時)．マウスを四群に分け，コントロール(CT)群(n=12)，抜歯(Ext)群(n=11)，亜鉛欠乏飼料

給餌(ZD)群(n=12), 抜歯＋亜鉛欠乏飼料給餌(EZD)群(n=11)とした. 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, ペントバルビタールナトリウム(ネンブタール®注射液, 大日本製薬) 2.5 mg にて腹腔内注射麻酔下, 左側上下臼歯抜歯および左側咬筋切断を行った. 8 週齢, 13 週齢, 22 週齢時に water maze test にて空間記憶能力の評価を行った.

water maze test はマウスやラットにおいて空間情報を手がかりとした退避行動を利用する行動実験手法で, 空間記憶能力の評価に用いられる. 1980 年代に R. Morris により提唱され [12, 13], 以降それぞれの研究者により改変されながら利用されている [5, 8, 14,]. 本研究では, 内径 120 cm, 高さ 40 cm のプールを毎回同じ部屋の同じ位置に設置し, プール内の同じ位置に直径 10 cm, 高さ 15 cm の台(platform)を設置し, プールに水を張った(水温 22～25 ℃, 図 1). 水面に径 2 mm 程度の発泡ビーズを浮かべ, 水面下の状況が見えないようにした. プールを扇型に四区画に分割する線とプールの縁との交点四ヶ所をスタート地点とし, 1 日 4 回異なるスタート地点からマウスを遊泳させた. 連続する 8 日間で実験を行い, スタート地点は毎日ランダムに変更した. 初めの連続する 6 日間は, platform を水面下 5 mm に設定し, 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. platform に到達した後はその場に 15 秒間滞在させた後, マウスをすくい上げ, 3 分間ケージ内で休憩させ, 次の試行を行った. 制限時間 60 秒以内に platform に到達しなかった場合は, マウスを platform まで誘導し, その場に 15 秒間滞在させた後, マウスをすくい上げその回の試行を終了とし, escape latency は 60 秒と判定した [15]. 7 日目は platform を取り除き,

platformのあった四分割区域での滞在時間(以下，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5 mm出し黒色の旗を設置し，スタート地点からplatformに到達するまでの遊泳時間を測定した(visible probe test).

day 1～day 6のescape latencyおよび制限時間内にゴールに到達しなかった回数(以下，ゴール非到達回数)，day 7のprobe testのゴールエリア滞在時間，day 8のvisible probe testのescape latencyを空間記憶能力の評価項目とした．day 1～day 6のescape latencyおよびゴール非到達回数の有意差検定には，one-way repeated measures ANOVAを用い，Post Hoc TestにはTukey/Kramerを用いた．体重増加量，probe testのゴールエリア滞在時間，visible probe testのescape latencyの有意差検定には，two-way factorial ANOVAを用いた．交互作用を認めた場合はone-way factorial ANOVAにて多重比較を行い，有意差を認めた場合Post Hoc TestにはTukey/Kramerを用いた．

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

実験には，研究2で用いたICR系雄性マウス20匹を供した．研究2で8週齢時にwater maze testをday 8まで施行した，CT群(n=5)，Ext群(n=5)，ZD群(n=4)，EZD群(n=6)のマウスについて，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ナトリウム(ネンブタール®注射液，大日本製薬) 2.5 mg腹腔内注射麻酔下，まず0.02 Mリン酸緩衝食塩水(PBS, pH 7.4) 40 ml，次に0.4%パラホルムアルデヒドを含む0.1 Mリン酸緩衝液(PB, pH

7.4)100 ml を用いて，マウスを経心臓的に灌流固定した．抜脳した組織を 0.4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M PB で 1 日間固定し，さらに 30%スクロースを含む 0.1 M PB 中で脳が沈むまで浸漬した．海馬を含む厚さ 40 μm の連続前頭断凍結切片を 12 枚作成した(Bregma -2.0 mm)．0.3% H_2O_2 を含む 0.02 M PBS で 20 分間内因性ペルオキシダーゼを反応させ，10%ヤギ血清(NGS, VECTOR)にて室温で 2 時間ブロッキングし，一次抗体として，アストロサイトのマーカーである抗 GFAP(Glial Fibrillary Acidic Protein)ウサギポリクロナール抗体(DAKO, 1：1,000)を用い，4 ℃にて 72 時間反応させた．次に，ビオチン標識二次抗体としてヤギ抗ウサギ IgG 抗体(VECTOR, 1：200)を 30 分間反応させ，ABC 試薬(ABC kit, VECTOR)にて 30 分間増幅反応を行い，DAB(3,3,-ジアミノベンジジン)にて発色反応を行った．切片をプレパラートに乗せ乾燥させたのち，エタノールにて脱水，レモゾールにて透徹し，封入を行った．光学顕微鏡下にて海馬三領域 CA1，CA3，DG のそれぞれにおける 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 [9]，その中の細胞数を画像処理ソフト Image J を用いて計測した．有意差検定には two-way factorial ANOVA を用いた．交互作用を認めた場合は one-way factorial ANOVA にて多重比較を行い，有意差を認めた場合 Post Hoc Test には Tukey/Kramer を用いた．

結果

全ての実験結果は，平均値±標準誤差(S.E.)で表記した．有意差の検定は，Stat View(SAS Institute)を用い，有意水準は 5%とした．

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

実験開始時(7 週齢時)の体重の平均は両群間に有意差を認めなかった(CT 群：233.0±7.7 g, ZD 群：233.4±2.6 g, p=0.96)．亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌後(8 週齢時)の ZD 群の血清亜鉛値は，CT 群に比較し有意に低値であった(CT 群：110.5±1.4 μg/dL, ZD 群：13.5±1.5 μg/dL, $p<0.05$, 図 2A)．血清総蛋白は CT 群，ZD 群間に差を認めなかった(CT 群：6.35±0.06 mg/dL, ZD 群：5.23±0.11 mg/dL, p=0.36, 図 2B)．

研究1－②：亜鉛欠乏飼料給餌動物の摂食行動特性の解析

1．体重増加量

亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌後(8 週齢時)の ZD 群の体重増加量は，CT 群に比較し有意に少なかった(CT 群：63.0±6.1 g, ZD 群：25.1±3.3 g, $p<0.05$)．ZD 群の飼料を標準飼料に変更すると，急激な体重増加を認め，9 週齢時の体重増加量は CT 群と ZD 群の間に有意差を認めなかった(CT 群：117.5±7.9 g, ZD 群：102.0±13.6 g, p=0.44, 図 3)．

2. 4 時間の累積摂食量

7 週齢第 1 日目から CT 群に標準飼料, ZD 群に亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌し, 8 週齢第 1 日目に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の 4 時間の累積摂食量は, 日中・夜間とも ZD 群の方が CT 群に比較し有意に多かった(日中 CT 群:1.7±0.3 g, ZD 群:7.1±0.7 g, $p<0.05$, 夜間 CT 群:2.8±0.3 g, ZD 群:6.7±0.7 g, $p<0.05$). その後両群とも標準飼料を 1 週間給餌し, 9 週齢第 1 日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の 4 時間の累積摂食量は, ZD 群で 8 週齢時より減少し, CT 群との間に有意差を認めなかった(CT 群:1.4±0.4 g, ZD 群:2.0±1.4 g, $p=0.76$). 9 週齢第 1 日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の 4 時間の累積摂食量は, ZD 群の方が CT 群に比較し有意に多かった(CT 群:3.0±0.3 g, ZD 群:6.2±0.6 g, 図 4).

3. 摂食行動開始までの時間

7 週齢第 1 日目から CT 群に標準飼料, ZD 群に 亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌し, 8 週齢第 1 日目に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の摂食行動開始までの時間は, 日中・夜間とも ZD 群の方が CT 群に比較し有意に短かった (日中 CT 群:73.4±35.2 min, ZD 群:9.2±3.5 min, $p<0.05$, 夜間 CT 群:85.4±26.1 min, ZD 群:3.5±0.6 min, $p<0.05$). その後両群とも標準飼料を 1 週間給餌し, 9 週齢第 1 日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の摂食行動開始までの時間は ZD 群で 8 週齢時より延長し, CT 群との間に有意差を認めなかった(CT 群:43.4

±8.5 min, ZD 群:89.5±50.6 min, p=0.52). 9 週齢第 1 日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の摂食行動開始までの時間は, ZD 群の方が CT 群に比較し有意に短かった(CT 群:46.0±14.5 min, ZD 群:6.7±2.2 min, p<0.05, 図 5).

4. 2 g の標準飼料 の摂食に要した時間

7 週齢第 1 日目から CT 群に標準飼料, ZD 群に 亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌し, 8 週齢第 1 日目に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた 2 g の標準飼料の摂食に要した時間は, 日中・夜間とも CT 群と ZD 群の間に有意な差を認めなかった(日中 CT 群:8.60±0.24 min, ZD 群:8.16±0.93 min, p=0.74, 夜間 CT 群:8.18±0.53 min, ZD 群:10.18±1.63 min, p=0.39). その後両群とも標準飼料を 1 週間給餌し, 9 週齢第 1 日目に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた 2 g 標準飼料の摂食に要した時間は日中・夜間とも CT 群と ZD 群の間に有意差を認めなかった(日中 CT 群:8.15±0.79 min, ZD 群:9.40±1.24 min, p=0.48, 夜間 CT 群:8.38±0.37 min, ZD 群:9.18±0.89 min, p=0.53, 図 6).

5. 2 g の標準飼料の摂食率

7 週齢第 1 日目から CT 群に標準飼料, ZD 群に 亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌し, 8 週齢第 1 日目に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた 2 g の標準飼料の摂食率は, 日中・夜間とも CT 群と ZD 群の間に有意な差を認めなかった(日中 CT 群:3.9±0.1 mg/sec, ZD 群:

4.5±0.5 mg/sec, p=0.36, 夜間 CT 群:4.2±0.3 mg/sec, ZD 群:3.7±0.4 mg/sec, p=0.43). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 g の標準飼料の摂食率は日中・夜間とも CT 群と ZD 群の間に有意差を認めなかった(日中 CT 群:4.3±0.5 mg/sec, ZD 群:4.0±0.6, p=0.76 mg/sec, 夜間 CT 群:4.0±0.2 mg/sec, ZD 群:3.9±0.4 mg/sec, p=0.82, 図 7).

6. 2 g の標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間

7週齢第1日目から CT 群に標準飼料, ZD 群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 g の標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間(途中で摂食中断した場合はその時間も含む)は, ZD 群の方が CT 群に比較して有意に短縮した (CT 群:139.59±20.10 min, ZD 群:9.29±1.11min, p<0.05). 8 週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 g の標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間は, ZD 群の方が長い傾向を示したが, CT 群との差は有意ではなかった(CT 群:8.17±0.53 min, ZD 群:36.21±17.50 min, p=0.24). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 g の標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間は, ZD 群の方が CT 群より短い傾向を示したが, 有意差は認めなかった(CT 群:134.77±47.81 min, ZD 群:50.52±22.27 min, p=0.10). 9 週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 g の標準

飼料の摂食開始から終了までに要した時間は, ZD 群の方が CT 群に比較して長い傾向を示したが, 有意差は認めなかった (CT 群:8.30±0.47 min, ZD 群:42.39±12.84 min, p=0.10, 図 8).

7. 2 g の標準飼料に対する bout の回数

7 週齢第 1 日目から CT 群に標準飼料, ZD 群に亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌し, 8 週齢第 1 日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout の回数は, CT 群と ZD 群の間に有意差を認めなかった. 8 週齢第 1 日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout の回数は, ZD 群の方が有意に多かった(日中 CT 群:2.6±0.4 回, ZD 群:3.0±0.8 回, p=0.72, 夜間 CT 群:1.0±0.0 回, ZD 群:4.3±1.0 回, p<0.05). その後両群とも標準飼料を 1 週間給餌し, 9 週齢第 1 日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout の回数は, CT 群と ZD 群の間に有意差を認めなかった. 9 週齢第 1 日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout の回数は, ZD 群の方が有意に多かった(日中 CT 群:3.0±0.55 回, ZD 群:3.9±1.2 回, p=0.58, 夜間 CT 群:1.2±0.2 回, ZD:4.6±0.6 回, p<0.05, 図 9).

8. 2 g の標準飼料に対する bout(1 回)の平均時間

7 週齢第 1 日目から CT 群に標準飼料, ZD 群に 亜鉛欠乏飼料を 1 週間給餌し, 8 週齢第 1 日

目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際，初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout(1 回)の平均時間は，CT 群と ZD 群の間に有意差を認めなかった．8 週齢第 1 日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際，初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout(1 回)の平均時間は，CT 群に比較し ZD 群の方が有意に短かった(日中 CT 群：212.80±23.69 sec，ZD 群：250.54±49.28 sec，p=0.60，夜間 CT 群：495.40±32.91 sec，ZD 群：195.00±53.52 sec，p<0.05)．その後両群とも標準飼料を 1 週間給餌し，9 週齢第 1 日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際，初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout の平均時間は，CT 群と ZD 群の間に有意差を認めなかった．9 週齢第 1 日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際，初めに与えた 2 g の標準飼料に対する bout の平均時間は，ZD 群の方が有意に短かった(日中 CT 群：248.32±97.07 sec，ZD 群：225.46±56.13 sec，p=0.83，夜間 CT 群：435.40±66.07 sec，ZD 群：207.41±51.21 sec，p<0.05，図 10)．

<u>研究2：咀嚼機能低下及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</u>

1．体重増加量

3 週齢時から 4 週齢時の体重増加量は，CT 群・Ext 群に比較し，ZD 群・EZD 群で有意に少なかった．また，CT 群・ZD 群に比較し，Ext 群・EZD 群でも有意に少なかった(CT 群：13.0±0.3 g，Ext 群：11.1±0.4 g，ZD 群：3.6±0.6 g，EZD 群：2.2±0.8 g，main effect of Ext；F(1,41)=6.85，p<0.05，main effect of zinc；F(1,41)= 252.35，p<0.05，no significant interaction Ext×zinc；F(1,41)=0.37，

p=0.54). 4 週齢時以降も体重増加量は CT 群・Ext 群に比較し, ZD 群・EZD 群で有意に少なかった. また, 4～6 週齢時, CT 群・ZD 群に比較し Ext 群・EZD 群でも体重増加量が有意に少なかったが, 7 週齢時以降は CT 群・ZD 群と Ext 群・EZD 群の間に差を認めなかった. 12 週齢時, 標準飼料に変更すると ZD 群・EZD 群は急激な体重増加を認めた(図 11).

２. escape latency

8 週齢時の試行にて, CT 群の escape latency は day 1 に比較し, day 4,5,6 で有意に短縮した(day 1：44.4±3.2 sec, day 2：32.1±3.2 sec, day 3：34.8±3.7 sec, day 4：28.6±5.1 sec, day 5：26.1±4.1 sec, day 6：28.9±3.6 sec, F(5,55)=3.50, p<0.05(one-way repeated measures ANOVA), day 4,5,6；p<0.05(Tukey/Kramer)). Ext 群の escape latency は day 1 に比較し, day 2,3,4,5,6 で有意に短縮した(day 1：48.5±3.7 sec, day 2：35.2±4.5 sec, day 3：32.1±4.3 sec, day 4：32.5±4.4 sec, day 5：28.6±3.6 sec, day 6：26.3±3.3 sec, F(5,50)=6.78, p<0.05(one-way repeated measures ANOVA), day 2,3,4,5,6；p<0.05(Tukey/Kramer)). ZD 群の escape latency は day 1 に比較し, day 6 でのみ有意に短縮した(day 1：44.3±3.0 sec, day 2：43.8±3.7 sec, day 3：34.8±3.8 sec, day 4：34.6±5.3 sec, day 5：34.4±4.9 sec, day 6：30.2±4.5 sec, F(5,55)=3.34, p<0.05(one-way repeated measures ANOVA), day 6；p<0.05(Tukey/Kramer)). EZD 群の escape latency は day 1 に比較し, day 2～6 にかけて有意差を認めなかった (day 1：40.3±4.7 sec, day 2：35.6±3.6 sec, day 3：41.3±3.6 sec, day 4：39.9±4.1 sec, day 5：33.1±3.9 sec, day 6：36.9±5.0 sec, F(5,50)=1.02, p=0.42,

図 12A).

ZD 群, EZD 群の飼料を標準飼料に変更後の 13 週齢時の試行では, CT 群, Ext 群の day 1 の escape latency は, 8 週齢時の試行の day 6 の escape latency と同程度の値を示し, 6 日間で大きく変化しなかった(CT 群 day 1:16.3±2.3 sec, day 6:14.6±2.8 sec, Ext 群 day 1:20.2±4.5 sec, day 6:15.7±2.9 sec), ZD 群の escape latency は day 1 に比較し, 有意ではないが短縮傾向を認めた(day 1:36.6±6.1 sec, day 2:30.2±4.2 sec, day 3:21.7±2.8 sec, day 4:26.6±6.1 sec, day 5:32.5±5.4 sec, day 6:22.7±4.4 sec, $F(5,25)=2.45$, $p=0.06$). EZD 群の escape latency は day 1 に比較し, 短縮傾向を認めたが有意ではなかった(day 1:43.3±7.6 sec, day 2:34.4±9.4 sec, day 3:35.8±8.8 sec, day 4:35.5±8.5 sec, day 5:41.5±7.8 sec, day 6:23.5±9.6 sec, $F(5,20)=1.47$, $p=0.24$, 図 12B).

さらに 22 週齢時の試行では, CT 群, Ext 群, ZD 群の day 1 の escape latency は, 13 週齢時の試行の day 6 の escape latency と同程度の値を示し, 6 日間で大きく変化しなかった(CT 群 day 1:16.3±2.7 sec, day 6:12.0±3.0 sec, Ext 群 day 1:16.4±3.2 sec, day 6:10.8±2.8 sec, ZD 群 day 1:24.1±3.7 sec, day 6:18.1±1.7 sec). EZD 群の escape latency は 6 日間で減少傾向を示した(day 1:33.7±10.2 sec, day 2:24.2±4.1 sec, day 3:21.0±2.5 sec, day 4:17.7±3.0 sec, day 5:22.9±5.5 sec, day 6:19.2±3.0 sec, 図 12C).

3. ゴール非到達回数

8 週齢時の試行において, CT 群のゴール非到達回数は day 1 と比較し, day 6 で減少傾向を認めた(day 1:1.58±0.26 回, day 2:1.00±0.28 回, day 3:1.08±0.29 回, day 4:1.00±0.44 回, day 5:0.58±0.29 回, day 6:0.42±0.19 回, $F(5,55)=2.20$, $p<0.05$(one-way repeated measures ANOVA), day 6;$p<0.05$(Tukey/Kramer)). Ext 群のゴール非到達回数は day 1 と比較し, day 3,4,5,6 で有意に減少した. (day 1:2.27±0.49 回, day 2:1.36±0.45 回, day 3:0.82±0.40 回, day 4:1.00±0.27 回, day 5:0.55±0.16 回, day 6:0.36±0.15 回, $F(5,50)=5.57$, $p<0.05$(one-way repeated measures ANOVA), day 3,4,5,6;$p<0.05$(Tukey/Kramer)). ZD 群, EZD 群のゴール非到達回数は変化が有意ではなかった(ZD 群 day 1:1.92±0.34 回, day 2:1.83±0.46 回, day 3:1.25±0.39 回, day 4:1.33±0.45 回, day 5:1.08±0.43 回, day 6:0.83±0.37 回, $F(5,55)=1.89$, $p=0.11$, EZD 群 day 1:1.00±0.00 回, day 2:1.82±0.44 回, day 3:1.09±0.29 回, day 4:1.64±0.34 回, day 5:1.09±0.48 回, day 6:0.91±0.34 回, $F(5,50)=1.48$, $p=0.21$, 図 13A).

ZD 群, EZD 群の飼料を標準飼料に変更後の 13 週齢時の試行では, CT 群, Ext 群の day 1 のゴール非到達回数は 8 週齢時の試行の day 6 のゴール非到達回数と同程度の値を示し, 6 日間で大きく変化しなかったが, ZD 群のゴール非到達回数は day 1 に比較し, 減少傾向を示した(day 1:1.33±0.61 回, day 2:0.50±0.34 回, day 3:0.17±0.17 回, day 4:0.67±0.49 回, day 5:0.33±0.21 回, day 6:0.33±0.21 回). EZD 群のゴール非到達回数は day 1 に比較し, 減少傾向を示さなかった（day 1:1.00±0.77 回, day 2:0.80±0.80 回, day 3:0.80±0.80 回, day 4:1.40±0.87 回, day 5:

0.80±0.80 回, day 6:0.80±0.80 回, 図 13B).

さらに 22 週齢時の試行では, CT 群, Ext 群, ZD 群の day 1 のゴール非到達回数は 13 週齢時の試行の day 6 のゴール非到達回数と同程度の値を示し, 6 日間で大きく変化しなかったが, EZD 群はゴール非到達回数の減少傾向を示した(day 1:1.20±0.80 回, day 2:0.40±0.24 回, day 3: 0.40±0.24 回, day 4:0.00±0.00 回, day 5:0.20±0.20 回, day 6:0.20±0.20 回, 図 13C).

4. probe test, ゴールエリア滞在時間(表1A)

8 週齢時の試行において, Ext 群, ZD 群のゴールエリア滞在時間は CT 群に比較し, 有意差を認めなかった. EZD 群のゴールエリア滞在時間は CT 群に比較し, 有意差はないが短い傾向を示した(main effect of Ext; $F(1,42)=0.76$, $p=0.39$, main effect of zinc; $F(1,42)=1.89$, $p=0.18$, significant interaction Ext × zinc ; $F(1,42)=5.54$, $p<0.05$ (two-way factorial ANOVA) , $F(4,53)=2.13$, $p=0.09$(one-way factorial ANOVA)).

ZD 群, EZD 群の飼料を標準飼料に変更後の 13 週齢時の試行では, Ext 群・EZD 群のゴールエリア滞在時間は CT 群・ZD 群に比較し, 短い傾向を示した(main effect of Ext; $F(1,19)=10.01$, $p<0.05$, main effect of zinc ; $F(1,19)=3.06$, $p=0.10$, no significant interaction Ext × zinc ; $F(1,19)=1.71$, $p=0.21$).

さらに 22 週齢時の試行では, 四群間に有意差を認めなかった(main effect of Ext; $F(1,19)=0.14$, $p=0.71$, main effect of zinc ; $F(1,19)=0.03$, $p=0.87$, no significant interaction Ext × zinc ;

F(1,19)=0.63, p=0.44).

５. visible probe test, escape latency(表1B)

8 週齢時の試行において, ZD 群・EZD 群の escape latency は CT 群・Ext 群に比較し, 有意に延長した(main effect of Ext;F(1,42)=0.81, p=0.37, main effect of zinc;F(1,42)=5.29, p<0.05, no significant interaction Ext×zinc;F(1,42)=2.318e^{-5}, p=0.9962).

ZD 群, EZD 群の飼料を標準飼料に変更後の 13 週齢時の試行では, ZD 群・EZD 群の escape latency は CT 群・Ext 群に比較し, 有意に延長した(main effect of Ext;F(1,19)=2.60, p=0.12, main effect of zinc;F(1,19)=6.12, p<0.05, no significant interaction Ext×zinc;F(1,19)=0.92, p=0.35).

さらに 22 週齢時の試行では, ZD 群・EZD 群の escape latency は 13 週齢時と比較すると短縮傾向を認めたものの(main effect of zinc;F(1,19)=14.44, p<0.05(two-way repeated measures ANOVA), 13w vs 22w;p=0.06, 8w vs 22w;p<0.05(Fisher's PLSD)), CT 群・Ext 群と比較すると有意に延長した. (main effect of Ext;F(1,19)=1.83, p=0.19, main effect of zinc;F(1,19)=10.96, p<0.05, no significant interaction Ext×zinc;F(1,19)=2.65, p=0.12).

visible probe test ではゴールが視認できるため, 空間記憶能力に関わらず, 各群同程度の結果となることが予想されたが, 本研究では 8 週齢時の試行において ZD 群・EZD 群の escape latency が CT 群・Ext 群に比較し有意に延長した. このことが ZD 群・EZD 群のマウスの体重増加量が少ないことに起因する可能性を考え, ZD 群・EZD 群と体重が同程度の標準動物にて同様の実験を行

った．実験にはICR系雄性マウス4週齢(体重 21～26 g，日本チャールス･リバー)12匹を供した(CT4w群)．4週齢時より標準飼料を給餌し，water maze testを開始した．スケジュールは他の四群と同様で，day 1～6にescape latencyおよびゴール非到達回数を測定し，day 7はprobe test，day 8はvisible probe testを行った．試行開始時の体重はZD群24.1±1.2 g，EZD群21.9±0.9 g，CT4w群24.0±0.3 gであり，三群間に有意差を認めなかった(F(2,32)=1.03，p=0.37 one-way factorial ANOVA)．CT4w群のday 1～6のescape latencyは，day 1に比較しday 3,4,5,6で有意に短縮した(day 1：52.6±2.3 sec，day 2：46.5±3.5 sec，day 3：38.6±3.8 sec，day 4：37.6±3.9 sec，day 5：36.8±3.2 sec，day 6：34.0±3.8 sec，F(5,55)=5.98，p<0.05(one-way repeated measures ANOVA)，day 3,4,5,6；p<0.05(Tukey/Kramer)，図14A)．CT4w群のday 1～6のゴール非到達回数は，day 1に比較しday 3,4,5,6で有意に短縮した(day 1：3.3±0.3回，day 2：2.1±0.4回，day 3：1.5±0.4回，day 4：1.6±0.4回，day 5：0.9±0.3回，day 6：0.9±0.3回，F(5,55)=8.59，p<0.05(one-way repeated measures ANOVA)，day 3,4,5,6；p<0.05 (Tukey/Kramer)，図14B)．probe testでのゴールエリア滞在時間はCT群と比較し有意差を認めなかった(unpaired t-test，p=0.92)．visible probe testでのescape latencyはCT群と比較し有意に延長した(unpaired t-test, p<0.05，表2)．

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

海馬のGFAP免疫組織化学染色の切片写真を図15Aに示す．海馬三領域においてグリッド内の

GFAP 陽性細胞数を測定した(図 15B～D). 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 群で有意に増加した(main effect of Ext; $F(1,16)=0.66$, $p=0.43$, main effect of zinc; $F(1,16)=14.65$, $p<0.05$, no significant interaction Ext×zinc; $F(1,16)=0.48$, $p=0.50$, 表 3). また視覚的にも 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 群の方が多かった(図 16).

また, GFAP 陽性アストロサイトの形態について強拡大で観察したところ, 四群間においてアストロサイトの細胞体の大きさや突起の長さ, 太さなどの形態的な相違点を認めなかった(図 17).

考察

亜鉛欠乏飼料給餌動物の血清亜鉛値，総蛋白，体重増加量の変化

亜鉛欠乏飼料給餌動物は，飼料給餌開始 4 日目から摂食量が低下し，体重増加量が減少すること [1,2]，標準飼料給餌動物に比較し，6 時～19 時までの体重あたりの摂食量に差を認めないが，19 時以降の夜間の体重あたりの摂食量は減少すると報告されている [16]．また，亜鉛欠乏飼料給餌動物の血清亜鉛値は，亜鉛欠乏飼料給餌開始 3 日目では有意な減少は認めないが，5 日目では有意な減少を認めると報告されている [17]．本研究では，亜鉛欠乏飼料給餌開始 7 日目の ZD 群の血清亜鉛値が CT 群より低値であり，亜鉛欠乏状態が確認された．また，ZD 群の体重増加量が CT 群に比較し有意に少なかったことから，亜鉛欠乏症状の発現も確認された．亜鉛欠乏ラットの栄養状態については，ZD 群の血清総蛋白が CT 群と比較し差を認めなかったことから，1 週間の亜鉛欠乏飼料給餌はラットの栄養状態に影響を与えないことが確認された．

亜鉛欠乏飼料給餌動物の摂食行動特性

本研究では ZD 群は CT 群に比較し，日中・夜間の 4 時間の累積摂食量が増加し，過去の報告にみられる「摂食量の低下」と一見矛盾するようにみられるが，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．亜鉛欠乏飼料給餌ラットに標準飼料と亜鉛欠乏飼料を同時に提示した際に，標準飼料の摂取量が有意に多いと報告されており [2]，結果は示していないが我々も同様の結果を得た．本研究では夜間における ZD 群の標準

飼料の摂取量が CT 群の 2 倍以上であり，本来摂食行動のあまりみられない日中においては CT 群の3倍以上であった．これらのことから亜鉛欠乏ラットは，亜鉛欠乏飼料より標準飼料を好むだけでなく，標準飼料に対しては摂食が促進されている可能性が考えられた．

Rita G Lee らは，亜鉛欠乏動物の視床下部弓状核での NPYmRNA の発現および室傍核での NPY ペプチドの発現が増加していると報告している[18]．また，Ohinataらは，亜鉛欠乏飼料給餌ラットに $ZnSO_4$ を腹腔内投与しても摂食量に変化を認めなかったが，経管投与すると視床下部で NPY や Orexin などの摂食促進ペプチドの発現増加を伴い，摂食量の増加を認めると報告している[17]．さらに亜鉛欠乏飼料給餌ラットの迷走神経遮断により，経管亜鉛投与による摂食量増加が抑制されると報告している[17]．これらの報告から，亜鉛欠乏状態においては，脳内の摂食促進ペプチドの発現が増加しており，亜鉛を投与すると消化管で生じた亜鉛シグナルが迷走神経を介して中枢に伝達され，摂食促進ペプチドの発現がさらに増加し，摂食量が増加すると考えられる．本研究において亜鉛欠乏飼料給餌動物に標準飼料を与えた際，標準飼料中に含まれる程度の微量の亜鉛濃度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，それまで摂食行動に結びつかなかった脳内の通常より多いと推定される摂食促進ペプチドの発現を反映して，摂食行動が誘発・加速され，本来摂食行動のあまりみられない日中にも摂食量の増加を認めた可能性が考えられる．

Rains らは，亜鉛欠乏飼料給餌ラットにおいて摂食行動開始までの時間が延長すると報告している[19]．本研究では，摂食行動開始までの時間は日中・夜間とも短縮したことから，亜鉛欠乏ラットは標準飼料中に亜鉛を含むことを何らかの形で認識できる可能性が考えられたが，その機序につい

ては検討できなかった.

亜鉛欠乏ラットにおける摂食行動特性すなわち「食べ方」について，まず 2 g 飼料に対する摂食時間および摂食率を検討したところ，日中・夜間とも変化を認めなかった. NPY の脳室内投与時は摂食率の増加を認めると報告されていることから [20]，亜鉛欠乏動物における摂食率すなわち咀嚼筋による咀嚼運動様式，噛み方については NPY 投与時の噛み方とは異なることが示唆された.

その他の食べ方の評価として，ZD 群の 2 g の標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間が日中で有意に短くなり，夜間では有意ではないが長い傾向を示した. 2 g の標準飼料に対する bout の回数や bout1 回の持続時間は日中では変化しないが，夜間で ZD 群の bout の回数が有意に多く，bout1 回の持続時間も有意に短くなった. bout の回数が増加するということは，2 g 標準飼料の摂食開始から終了までの間に摂食行動が中断されることを意味する. ビデオ撮影による摂食行動観察において，ZD 群は日中・夜間とも短時間の摂食行動の中断が観察され，その間多動性が亢進していた. CT 群では日中に長時間の摂食行動の中断が見られ，摂食行動を完全に中止し就寝する様子が観察された. ZD 群の日中の bout の回数や bout1 回の持続時間は CT 群と比較し変化しなかったが，ZD 群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ものと考えられる. 一方，CT 群では日中は本来摂食行動のみられない時間帯であり，摂食に対する意欲がないため摂食行動が中断され，夜間は本来摂食行動のみられる時間帯であるため，中断することなく摂食したものと考えられる.

ZD 群の飼料を標準飼料に変更した後の摂食量及び摂食行動特性については，CT 群の値に

近くなる項目もあれば，変化しない項目もみられた．夜間の摂食量などについては亜鉛欠乏による成長の遅延を補うための反応である可能性が考えられた．

以上より，亜鉛欠乏ラットにおいて，1．脳内で発現が上昇していると報告のある NPY などの摂食促進ペプチドの影響を受けるためか，夜間だけでなく日中も標準動物より多く標準飼料を摂食すること，2．その際の食べ方は，摂食率で表される噛み方は変化しないが，bout 数で表される摂食に対する集中力が標準動物より低下していることが推察された．

亜鉛欠乏および咀嚼機能低下が空間記憶能力へ与える影響

亜鉛と認知・学習記憶の関係については，1980 年前半から行動生理学的な手法を用いて研究が行われている．妊娠期から授乳期にかけて母親ラットに亜鉛欠乏飼料を給餌し，子供の学習記憶を検討したところ，1．短期記憶は障害されるが，長期記憶は障害されない [6)]，2．空間記憶能力が障害されると報告されている [5, 8)]．一方，離乳後の動物に亜鉛欠乏飼料を給餌し，空間記憶能力を検討したところ，1．若年(62 日齢以下)のラットでは短期記憶が障害されるが長期記憶は障害されず，高齢のラットではどちらも障害されない [7)]，2．27～31 日齢の成獣ラットでは短期記憶，長期記憶とも障害されない [14)]，3．4 週齢マウスでは空間記憶能力は障害されないと報告されている [16)]．一方，5 ヶ月齢(mature group)および 9 ヶ月齢(old group)の老化促進マウス(SAMP8)において咀嚼機能を低下させると空間記憶能力の低下を認めるが，5 週齢(young group)では咀嚼機能を低下させても空間記憶能力の低下を認めないと報告されている [9, 21, 22)]．

本研究で用いたマウスは，行動実験時 8 週齢と若年であり，Ext 群の空間記憶能力の低下を認めなかったことは過去の報告と一致する．ZD 群は，空間記憶能力の低下の程度は顕著ではないが，CT 群や Ext 群ほど高い空間記憶能力は示さなかったと考えられる．亜鉛欠乏飼料給餌期間が 2～3 週間と短期間である場合，platform の位置を固定し連日施行する water maze test において空間記憶能力の低下を認めず，脳内の亜鉛濃度の低下も認めないと報告されているが [7, 14, 15]，Takeda らは，亜鉛欠乏飼料給餌期間がさらに長期間となった場合，脳内の亜鉛濃度の低下を生じる可能性があると指摘している．また，ラット脳における亜鉛の生物学的半減期は 16～42 日であるため [4]，本研究において 5 週間の亜鉛欠乏飼料給餌マウスで観察された空間記憶能力の低下を示唆する結果に脳内の亜鉛濃度の低下が関与していた可能性があると推察される．EZD 群は，すべての評価項目において空間記憶能力の低下が示唆された．

ZD 群および EZD 群の visible probe test の結果に関して，マウスの体重の条件を検討したところ，ZD 群，EZD 群，CT4w 群の visible probe test の結果に差を認めなかった．CT4w 群の escape latency とゴール非到達回数は day 1 と比較して day 6 で有意に短縮・減少し，probe test におけるゴールエリア滞在時間は CT 群と差を認めなかった．このことから escape latency の値そのものは体重による影響を受けるが，escape latency・ゴール非到達回数の短縮・減少やゴールエリア滞在時間は体重による影響を受けないことが示唆された．

ZD 群および EZD 群の飼料を標準飼料に変更すると，空間記憶能力が回復し，過去の報告とも一致した [7, 8]．

亜鉛欠乏および咀嚼機能低下による海馬アストロサイトの変化

亜鉛欠乏飼料給餌による空間記憶能力の低下の背景にある因子として，XiaoDan らは海馬 CA3 領域におけるニューロンのアポトーシス性変化を認めることを報告している[8)]．一方，老齢の老化促進マウスの咀嚼機能低下による空間記憶能力の低下の背景にある因子として，Onozuka らは，若年マウスでは海馬 CA1 領域における GFAP 陽性アストロサイト密度の変化を認めないが，老齢のマウスでは細胞密度の増加とアストロサイトの肥大化を認め，咀嚼機能を低下させるとその傾向が強くなると報告している[9)]．アストロサイトは中枢神経において物理的な構造維持に働く他，血液脳関門を形成し物質輸送に関与したり，シナプス前細胞，シナプス後細胞とグリア細胞の三者で tripartite synapse を形成したりしている[23)]．GFAP はアストロサイトの細胞骨格を成す中間径フィラメントで，成熟アストロサイトのマーカーである．空間記憶能力とアストロサイトの関連について，Onozuka らの報告の他，Lu Yang らは，頻回の熱性痙攣後にラットの空間記憶能力が低下するとともに，海馬における GFAP 発現増加を認めることを報告している[24)]．その他に，アストロサイトが海馬の LTP(long-term potentiation)の形成に関与しているという報告もみられ[25,26,27)]，アストロサイトが記憶の形成に関与している可能性が考えられる．

本研究では，海馬 CA1 領域における Ext 群のアストロサイトの細胞密度は変化せず，過去の報告[9)]と一致した．また，空間記憶能力の低下傾向を示した ZD 群，EZD 群の二群において GFAP 陽性アストロサイトの細胞密度が増加したことから，亜鉛欠乏飼料給餌による空間記憶能力低下にもアストロサイトが関与していることが予測される．しかし行動生理学的に ZD 群と EZD 群の空間記

憶能力低下傾向の差が見られたのに対し，アストロサイトの細胞密度には差が見られなかったこと，アストロサイトの形態学的な差も光学顕微鏡下では確認されなかったことから，アストロサイトの機能および形態についてはさらに詳細な検討が必要であると考える．

また，亜鉛欠乏動物では血清コルチコステロンレベルの上昇を認めることが報告されており [14, 15]，亜鉛欠乏状態がストレスと関連すると考えられている [4]．成獣ラットの頚部にコルチコステロン小粒を埋め込み，慢性的にコルチコステロンレベルを上昇させることにより容量依存的に海馬 CA1 領域におけるアストロサイト数の増加がみられること，CA3 領域のアストロサイト数は変化しないことが報告されており [28]，血清コルチコステロン濃度上昇と海馬内のアストロサイト数増加の間の関連が示唆される．以上より，亜鉛欠乏による血清コルチコステロン上昇が海馬 CA1 領域のアストロサイト数を変化させ，空間記憶能力の低下を生じている可能性が推察されるが，さらなる検討が必要であると考える．

結語

亜鉛欠乏飼料給餌により，血清亜鉛レベルの低下を認め，一日のうち夜間だけでなく，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の増加および摂食行動開始までの時間の短縮を認めた．過去の報告から脳内の摂食関連ペプチドの発現の変化が予想されるが，摂食率には変化を認めなかった．日中・夜間におけるbout数の増加および摂食行動のビデオ観察から多動性の亢進が見られたことから，亜鉛欠乏動物は食餌に対する集中を欠いている可能性が推察され，亜鉛欠乏動物における摂食行動特性の変化がみられた．亜鉛欠乏飼料から標準飼料に給餌変更することで，回復する項目もあったが，回復しない項目もあった．

亜鉛欠乏飼料給餌により，マウスの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その傾向が明瞭化した．亜鉛欠乏飼料給餌群および亜鉛欠乏飼料給餌と咀嚼機能低下併存群では，海馬 CA1 領域における GFAP 陽性アストロサイトの細胞密度の上昇を認めた．

謝辞

稿を終えるに臨み，終始御懇切なる御指導を賜りました，顎口腔病因病態制御学講座(口腔外科学第一教室)古郷幹彦教授，ならびに本研究の遂行に際し終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りました，大阪警察病院歯科口腔外科 部長 田中 晋先生，済生会松阪総合病院 辻 忠孝先生に心より謝意を評します．最後に，この研究の円滑な進展のために特別な御配慮を頂いた顎口腔病因病態制御学講座口腔外科学第一教室の教室員諸兄に深く御礼を申し上げます．

文献

1) Tamaki, N., Fujimoto-Sakata, S., Kikugawa, M., Kaneko, M., Onosaka, S., Takagi, T. (1995) ： Analysis of cyclic feed intake in rats fed on a zinc-deficient diet and the level of dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2). *Br J Nutr.*, 73, 711-722.

2) Chesters, J. K., Quarterman, J. (1970) ： Effects of zinc deficiency on food intake and feeding patterns of rats. *Br J Nutr.*, 24, 1061-1069.

3) Jing, MY., Sun, JY., Wang, JF. (2008) ： The effect of peripheral administration of zinc on food intake in rats fed Zn-adequate or Zn-deficient diets. *Biol Trace Elem Res.*, 124, 144-156.

4) 駒井三千夫, 神戸大朋 (2013) ： 亜鉛の機能と健康―新たにわかった多彩な機能―. 初版, 建帛社, 東京, 131-150, 平成 25.

5) Tahmasebi, Boroujeni, S., Naghdi, N., Shahbazi, M., Farrokhi, A., Bagherzadeh, F., Kazemnejad, A., Javadian, M. (2009) ： The effect of severe zinc deficiency and zinc supplement on spatial learning and memory. *Biol Trace Elem Res.*, 130, 48-61

6) Halas, ES., Eberhardt, MJ., Diers, MA., Sandstead, HH. (1983) ： Learning and memory impairment in adult rats due to severe zinc deficiency during lactation. *Physiol Behav.*, 30, 371-381.

7) Keller, KA., Grider, A., Coffield,. JA. (2001) ： Age-dependent influence of dietary zinc restriction on short-term memory in male rats. *Physiol Behav.*, 72, 339-348

8) Yu, X., Jin, L., Zhang, X., Yu, X. (2013) ： Effects of maternal mild zinc deficiency and zinc supplementation in offspring on spatial memory and hippocampal neuronal ultrastructural changes. *Nutrition.*, 29, 457-461.

9) Onozuka M, Watanabe K, Nagasaki S, Jiang Y, Ozono S, Nishiyama K, Kawase T, Karasawa N, Nagatsu I. (2000) ： Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. *Behav Brain Res.*, 108, 145-155

10) Ulman, E.A., Compton, D., Kochanek, J.(2008) ： Measuring food and water intake in rats and mice. *ALN magazine*, Oct

11) Tsuji, T., Yamamoto, T., Tanaka, S., Bakhshishayan, S., Kogo, M. (2011) ： Analyses of the facilitatory effect of orexin on eating and masticatory muscle activity in rats. *J Neurophysiol.*, 106, 3129-3135.

12) Richard, G.M. Morris, (1981) ： Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239-260

13) Richard, G.M.Morris, (1984) ： Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47-60

14) Chu, Y., Mouat, MF., Harris, RB., Coffield, JA., Grider, A. (2003) ： Water maze performance and changes in serum corticosterone levels in zinc-deprived and pair-fed rats. *Physiol Behav.*, 78, 569-578.

15) Takeda, A., Yamada, K., Tamano, H., Fuke, S., Kawamura, M., Oku, N. (2008) ： Hippocampal calcium dyshomeostasis and long-term potentiation in 2-week zinc deficiency. *Neurochem Int*., 52, 241-246.

16) Reeves, PG. (2003) ： Patterns of food intake and self-selection of macronutrients in rats during short-term deprivation of dietary zinc. *J Nutr Biochem.* 14, 232-243

17) Ohinata, K., Takemoto, M., Kawanago, M., Fushimi, S., Shirakawa, H., Goto, T., Asakawa, A., Komai, M. (2009) ： Orally administered zinc increases food intake via vagal stimulation in rats. *J Nutr.*, 139, 611-616.

18) Lee, RG., Rains, TM., Tovar-Palacio, C., Beverly, JL., Shay, NF. (1998) ： Zinc deficiency increases hypothalamic neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA levels and does not block neuropeptide Y-induced feeding in rats. *J Nutr*., 128, 1218-1223.

19) Rains, TM., Hedrick, S., Randall, AC., Lee, RG., Kennedy, KJ., Shay, NF.(1998) : Food intake patterns are altered during long-term zinc deficiency in rats. *Physiol Behav.*, 65, 473-478.

20) Clark, JT., Kalra, PS., Crowley, WR., Kalra, SP. (1984) : Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology.*, 115, 427-429.

21) Watanabe, K., Ozono, S., Nishiyama, K., Saito, S., Tonosaki, K., Fujita, M., Onozuka, M. (2002) : The molarless condition in aged SAMP8 mice attenuates hippocampal Fos induction linked to water maze performance. *Behav Brain Res.*, 128, 19-25.

22) Yoko, Hioki, Mitsuo, Iinuma, Chika, Kurata, Yukiko, Ichihashi, Yasuo, Tamura, Kin-ya, Kubo, (2009) : Effects of early tooth loss on the hippocampus in senescence-accelerated mice. *Pediatric Dental Journal*, 19, 196-205.

23) Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, RP., Haydon, PG. (1999) : Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.*, 22, 208-215.

24) Yang, L., Li, F,. Zhang, H., Ge, W., Mi, C., Sun, R., Liu, C. (2009) : Astrocyte activation and memory impairment in the repetitive febrile seizures model. *Epilepsy Res.*, 86, 209-220.

25) Bracchi-Ricard, V., Brambilla, R., Levenson, J., Hu, WH., Bramwell, A., Sweatt, JD., Green, EJ., Bethea, JR. (2008) ： Astroglial nuclear factor-kappaB regulates learning and memory and synaptic plasticity in female mice. *J Neurochem.*, 104, 611-623.

26) Ben, Menachem-Zidon, O., Avital, A., Ben-Menahem, Y., Goshen, I., Kreisel, T., Shmueli, EM., Segal, M., Ben, Hur, T., Yirmiya, R.. (2011) ： Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. *Brain Behav Immun.*, 25, 1008-1016.

27) Suzuki, A., Stern, SA., Bozdagi, O., Huntley, GW., Walker, RH., Magistretti, PJ., Alberini, CM. (2011) ： Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*.,144, 810-823.

28) Bridges, N., Slais, K., Syková, E. (2008) ： The effects of chronic corticosterone on hippocampal astrocyte numbers： a comparison of male and female Wistar rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*., 68, 131-138.

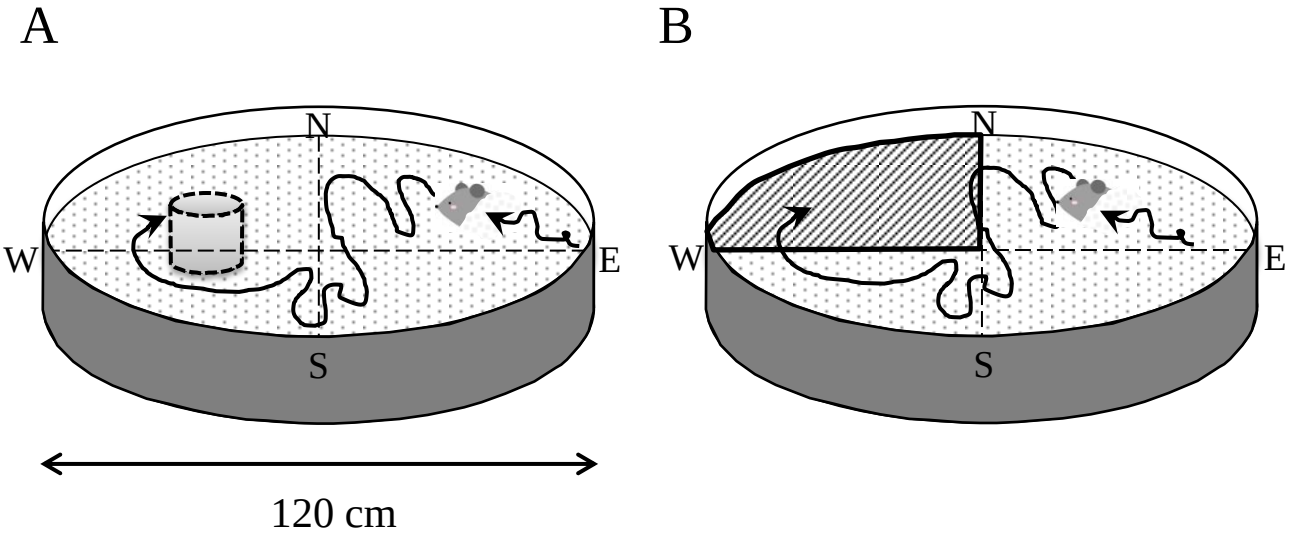

図1. water maze test

A：内径120 cm，高さ40 cmのプール内に直径10 cm，高さ15 cmの台(platform)を設置し，プールに水を張った(水温22～25 ℃)．水面に径2 mm程度の発泡ビーズを浮かべ，水面下の状況が見えないようにした．プールを扇型に四区画に分割する線とプールの縁との交点四ヶ所をスタート地点とし，1日4回異なるスタート地点からマウスを遊泳させ，platformに到達するまでの時間(escape latency)，制限時間60秒以内にplatformに到達しなかった回数を測定した(day 1-6)．day 8はplatformを水面上に出し，黒色の旗を設置し，escape latencyを測定した(visible probe test)．

B：day 7はplatformを取り除き，platformのあった四分割区域での滞在時間を計測した(probe test)．

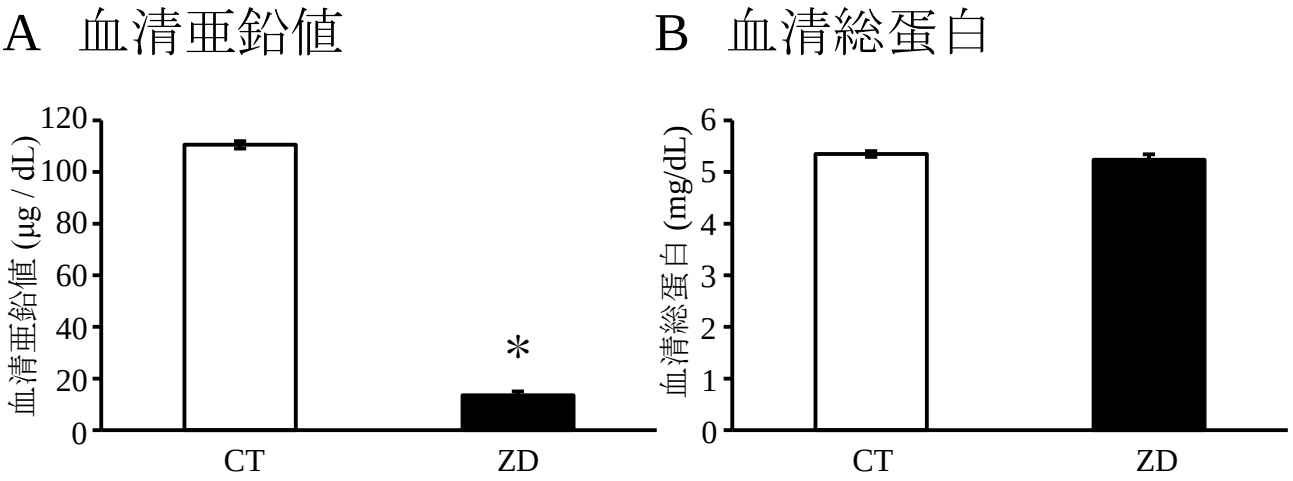

図2

A 血清亜鉛値：亜鉛欠乏飼料を1週間給餌後のZD群の血清亜鉛値は，CT群に比較し有意に低値であった(＊ $p<0.05$)

B 血清総蛋白：亜鉛欠乏飼料を1週間給餌後の血清総蛋白は，CT群およびZD群の間に有意差を認めなかった($p=0.36$)

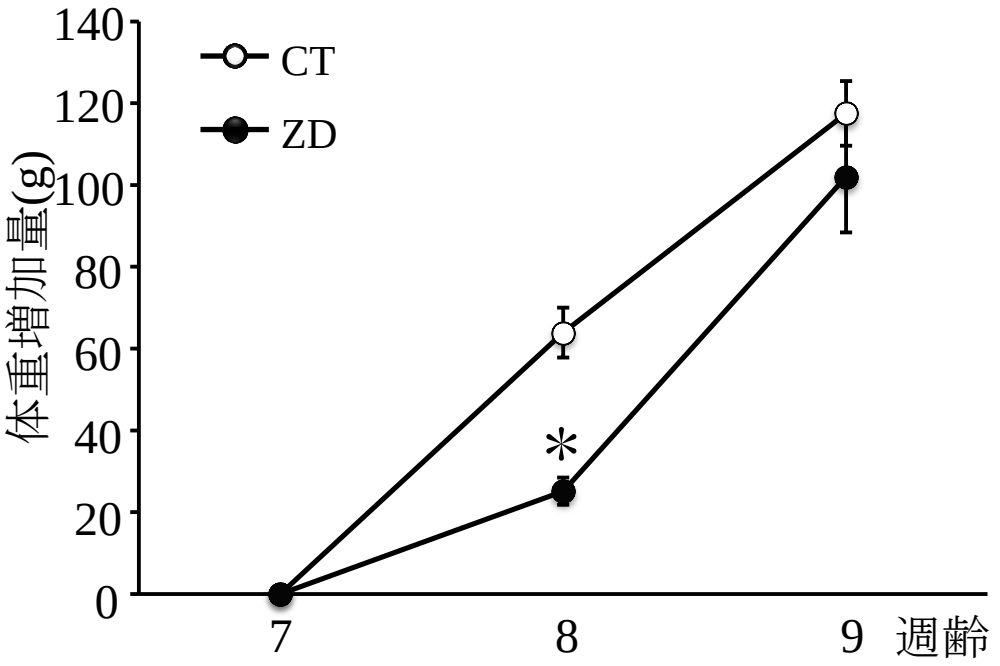

図3. 体重増加量

亜鉛欠乏飼料を1週間給餌後(8週齢第1日目)のZD群の体重増加量は, CT群に比較し有意に少なかった(＊p<0.05).

ZD群の飼料を標準飼料に変更し1週間後(9週齢第1日目)の体重増加量は, CT群との間に有意差を認めなかった(p=0.44).

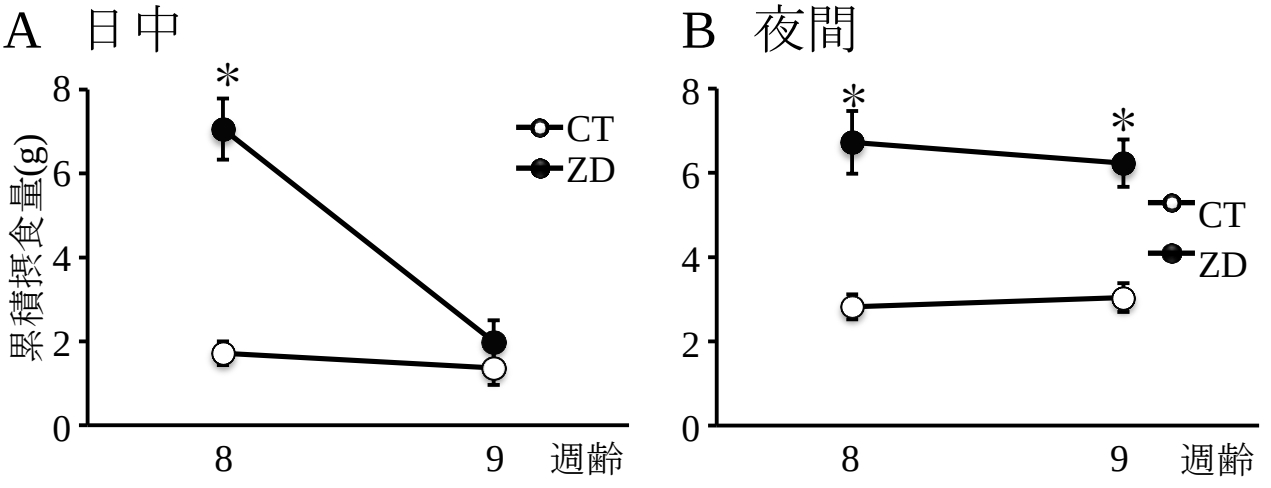

図4. 4時間の累積摂食量

A 日中:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中4時間に標準飼料を与えた際の4時間累積摂食量は, ZD群の方がCT群に比較し有意に多かった(＊p<0.05). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中4時間に与えた標準飼料の4時間累積摂食量は, ZD群で8週齢時より減少し, CT群との間に有意差を認めなかった(p=0.76).

B 夜間:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の夜間4時間に標準飼料を与えた際の4時間累積摂食量は, ZD群の方がCT群に比較し有意に多かった(＊ p<0.05). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の夜間4時間に与えた標準飼料の4時間累積摂食量は, ZD群の方がCT群に比較し有意に多かった(＊ p<0.05).

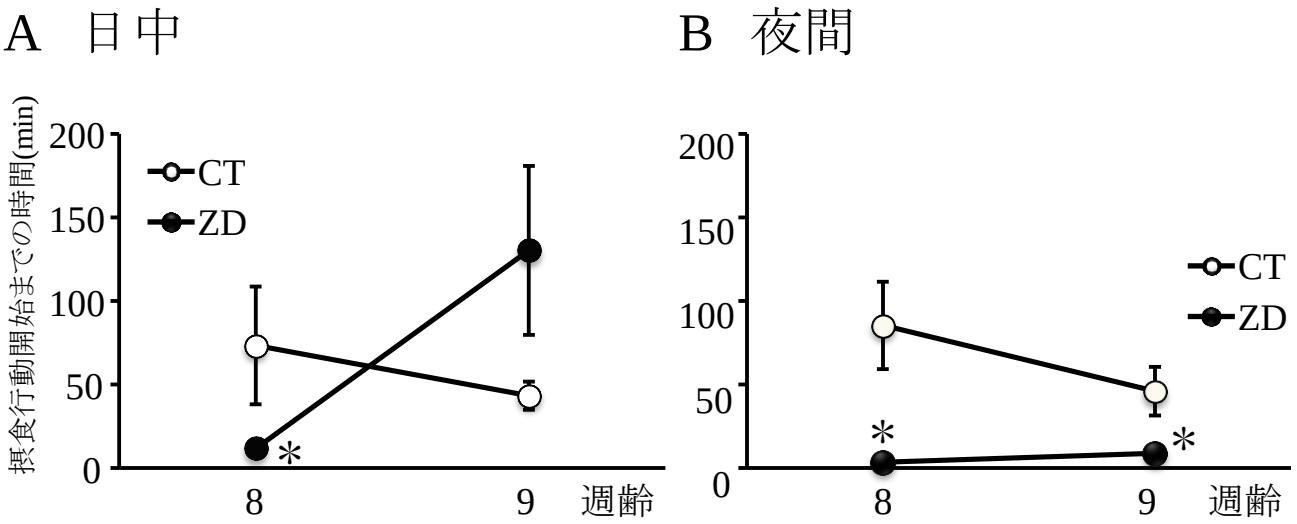

図5. 摂食行動開始までの時間

A 日中:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の摂食行動開始までの時間は, ZD群の方がCT群に比較し有意に短かった(＊ $p<0.05$). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の摂食行動開始までの時間はZD群で8週齢時より延長し, CT群との間に有意差を認めなかった($p=0.52$).

B 夜間:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の摂食行動開始までの時間は, ZD群の方がCT群に比較し有意に短かった(＊ $p<0.05$). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際の摂食行動開始までの時間はZD群の方がCT群に比較し有意に短かった(＊ $p<0.05$).

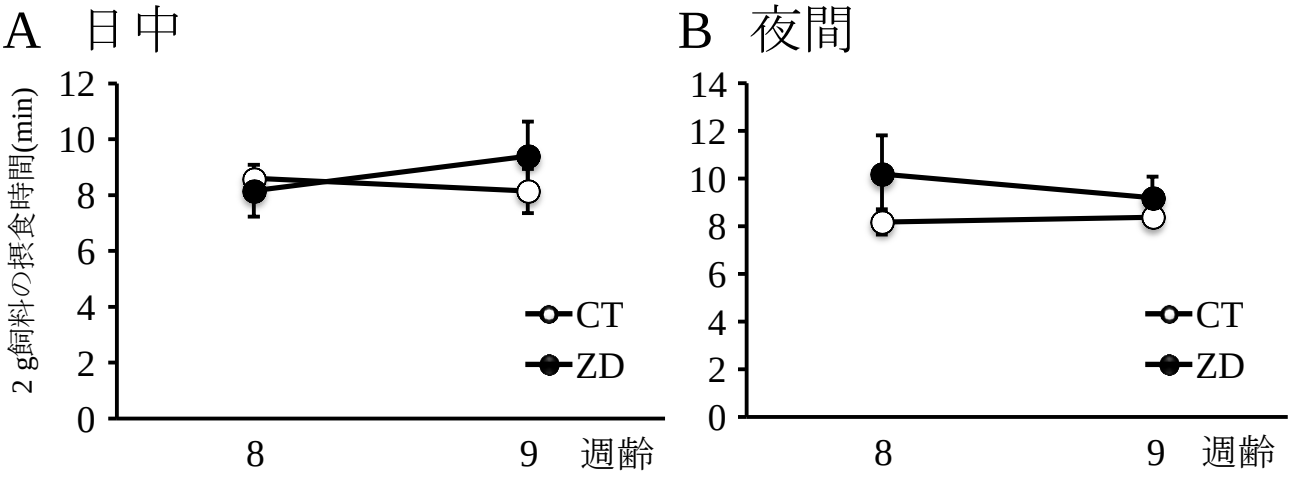

図6. 2 gの標準飼料の摂食に要した時間

A 日中:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食に要した時間は, CT群とZD群の間に有意な差を認めなかった($p=0.74$). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食に要した時間は, CT群とZD群の間に有意差を認めなかった($p=0.48$).

B 夜間:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食に要した時間は, CT群とZD群の間に有意な差を認めなかった($p=0.39$). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食に要した時間は, CT群とZD群の間に有意差を認めなかった($p=0.53$).

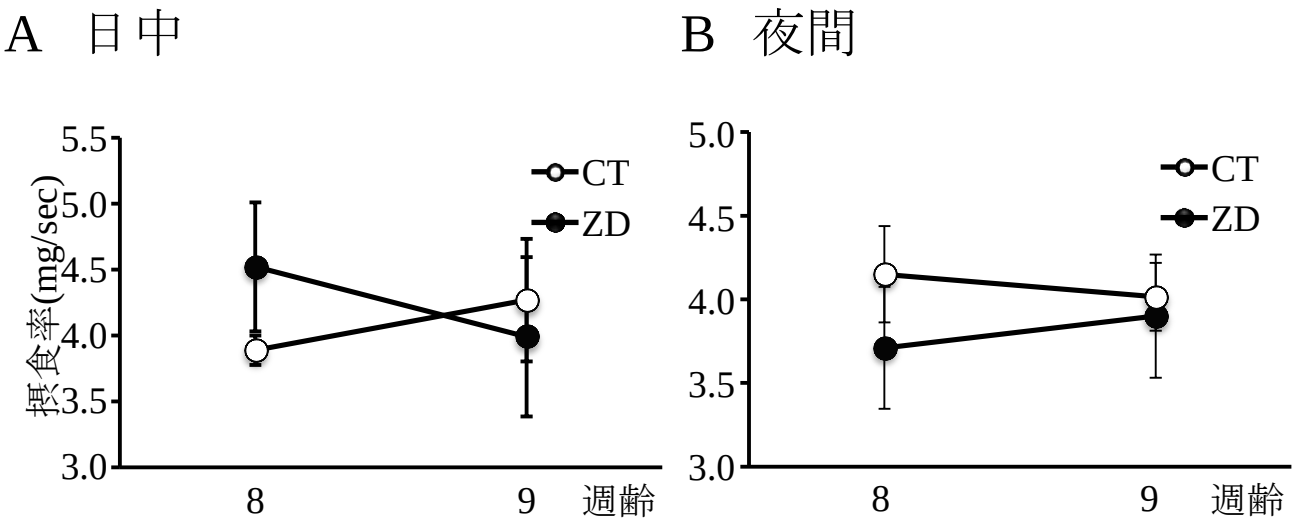

図7. 2 gの標準飼料の摂食率

A 日中:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食率は, CT群とZD群の間に有意な差を認めなかった(p=0.36). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食率は, CT群とZD群の間に有意差を認めなかった(p=0.76).

B 夜間:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食率は, CT群とZD群の間に有意な差を認めなかった(p=0.43). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食率はCT群とZD群の間に有意差を認めなかった(p=0.82).

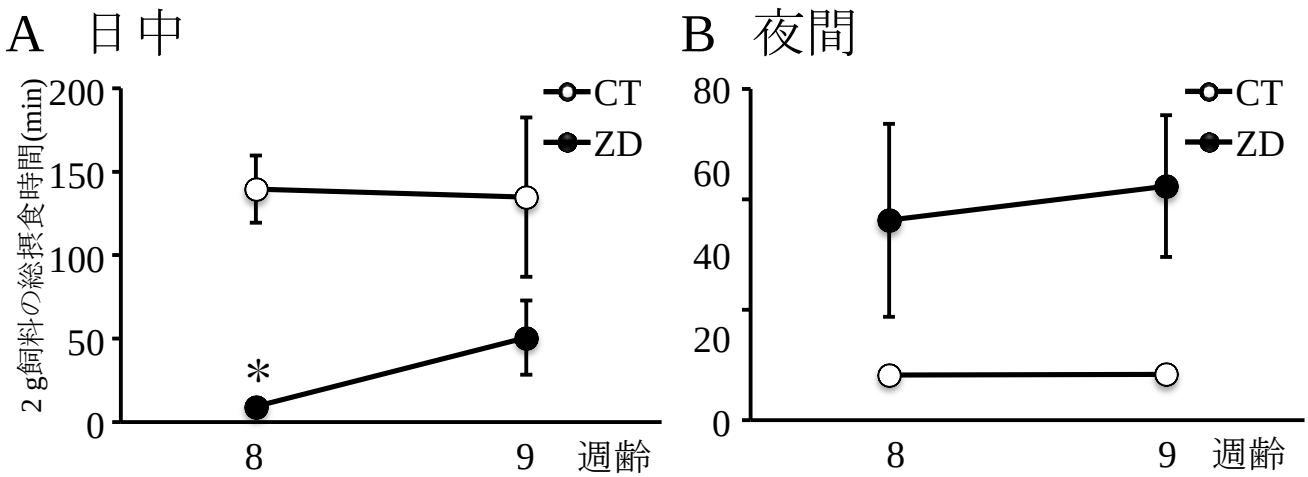

図8. 2 gの標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間

A 日中:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間は, ZD群の方がCT群に比較し有意に短縮した (＊ p<0.05). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間は, ZD群の方がCT群に比較し短い傾向を示したが, 有意差は認めなかった (p=0.10).

B 夜間:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間は, ZD群の方がCT群に比較して長い傾向を示したが, 有意差は認めなかった(p=0.24). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料の摂食開始から終了までに要した時間は, CT群に比較して長い傾向を示したが, 有意差は認めなかった (p=0.10).

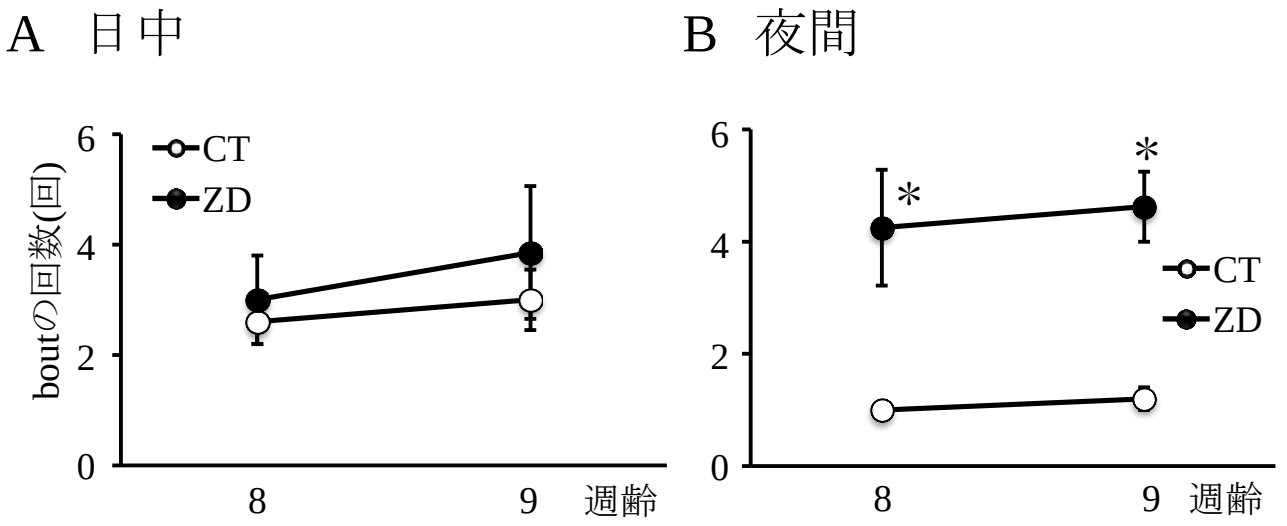

図9. 2 gの標準飼料に対するboutの回数

A 日中:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの回数は, CT群とZD群の間に有意差を認めなかった(p=0.72). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの回数はCT群とZD群の間に有意差を認めなかった(p=0.58).

B 夜間:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの回数は, ZD群の方がCT群に比較し有意に多かった (＊p<0.05). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの回数はCT群に比較し有意に多かった (＊p<0.05).

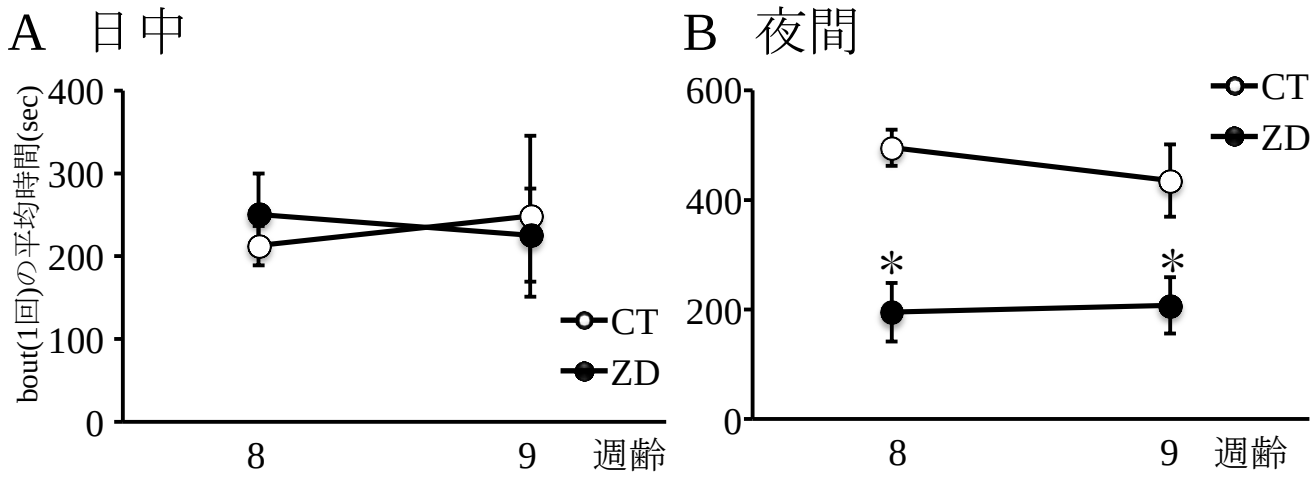

図10. 2 gの標準飼料に対するbout(1回)の平均時間

A 日中:7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの平均時間は, CT群とZD群の間に有意差を認めなかった (p=0.60). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の日中に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの平均時間は, CT群とZD群の間に有意差は認めなかった(p=0.83).

B 夜間: 7週齢第1日目からCT群に標準飼料, ZD群に 亜鉛欠乏飼料を1週間給餌し, 8週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの平均時間は, ZD群の方がCT群に比較し有意に短かった (＊ p<0.05). その後両群とも標準飼料を1週間給餌し, 9週齢第1日目の夜間に標準飼料を用いて摂食行動観察を行った際, 初めに与えた2 gの標準飼料に対するboutの平均時間は, ZD群の方がCT群に比較し有意に短かった(＊ p<0.05).

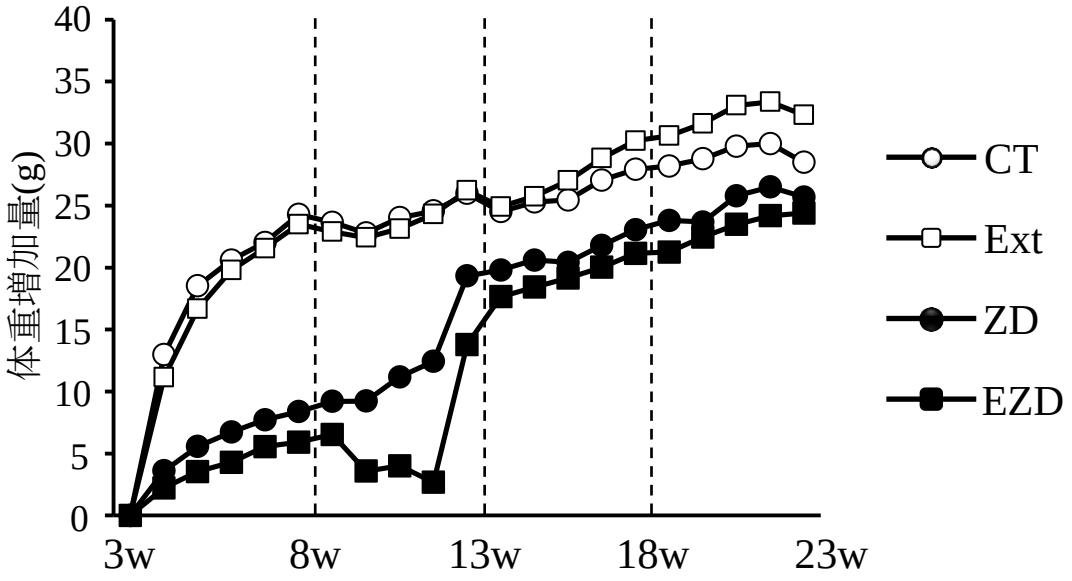

図11. 体重増加量

4～23週齢時，ZD群・EZD群の体重増加量は，CT群・Ext群に比較し有意に少なかった($p<0.05$)．12週齢時，ZD群およびEZD群の飼料を標準飼料に変更すると，急激な体重増加を認めた．

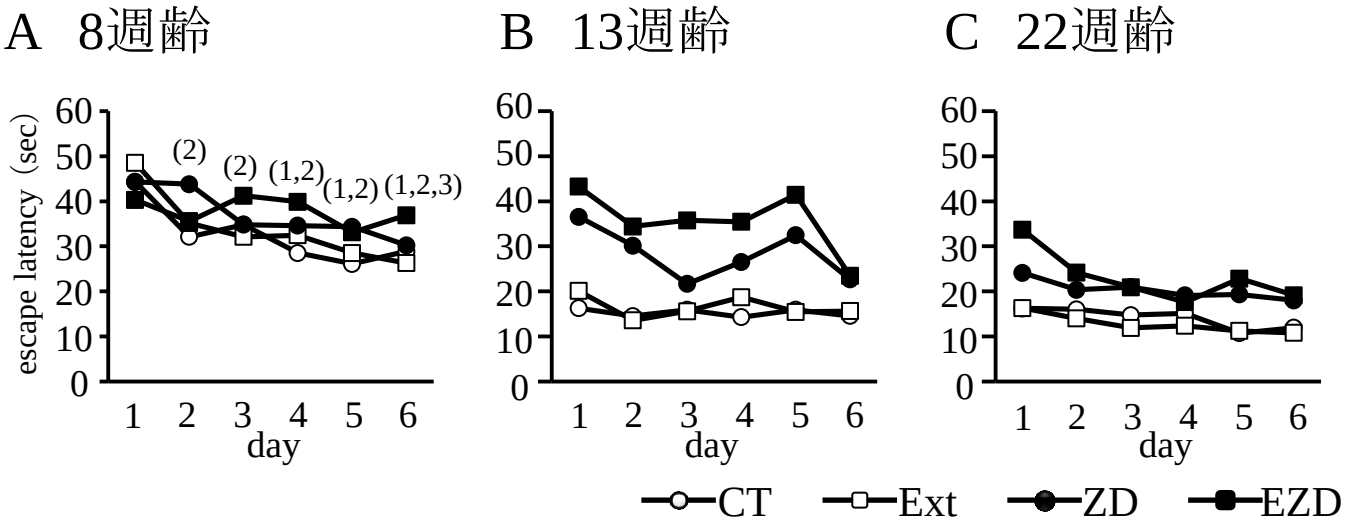

図12. escape latency

A 8週齢：CT群，Ext群は6日間でescape latencyの短縮を認めた．ZD群はday 6でのみescape latencyの短縮を認めた．EZD群のescape latencyは短縮傾向を示したが有意ではなかった．

B 13週齢：ZD群のescape latencyはday 1に比較し有意ではないが短縮傾向を認めた．

C 22週齢：EZD群のescape latencyはday 1に比較し短縮傾向を認めた．

(1)：CT群 $p<0.05$(vs day 1)，(2)：Ext群 $p<0.05$(vs day 1)，(3)ZD群 $p<0.05$(vs day 1)

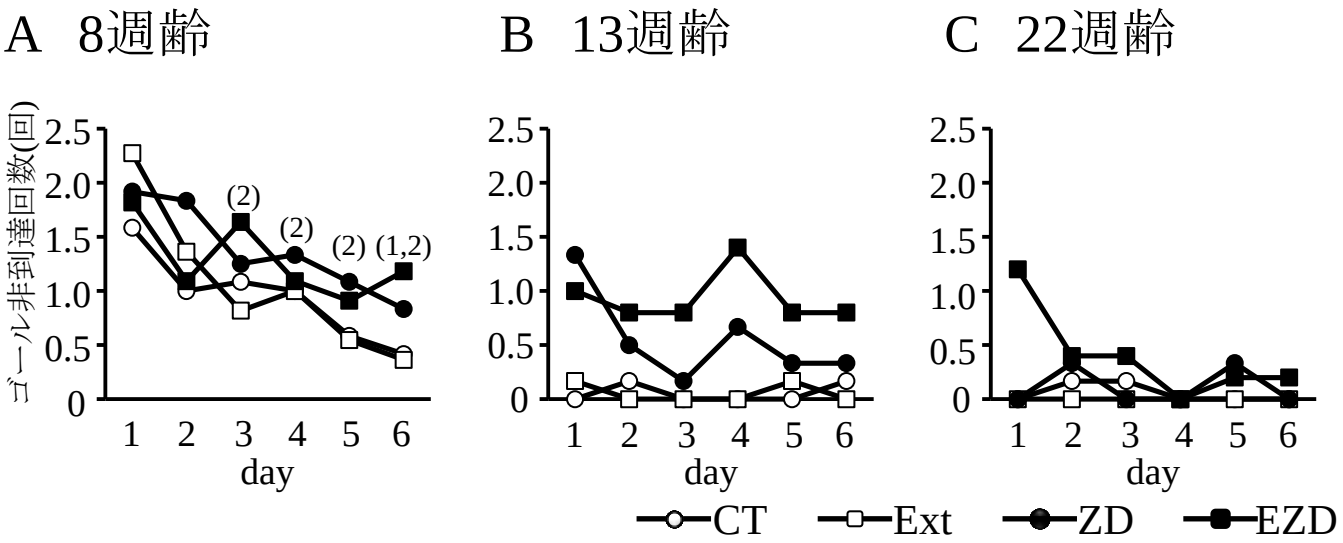

図13. ゴール非到達回数

A 8週齢：CT群，Ext群は6日間でゴール非到達回数の減少を認めた．ZD，EZD群ゴール非到達回数の減少は有意ではなかった．

B 13週齢：ZD群のゴール非到達回数はday 1に比較し有意ではないが短縮傾向を認めた．

C 22週齢：EZD群のゴール非到達回数はday 1に比較し短縮傾向を認めた．

(1)：CT群 $p<0.05$(vs day 1)，(2)：Ext群 $p<0.05$(vs day 1)

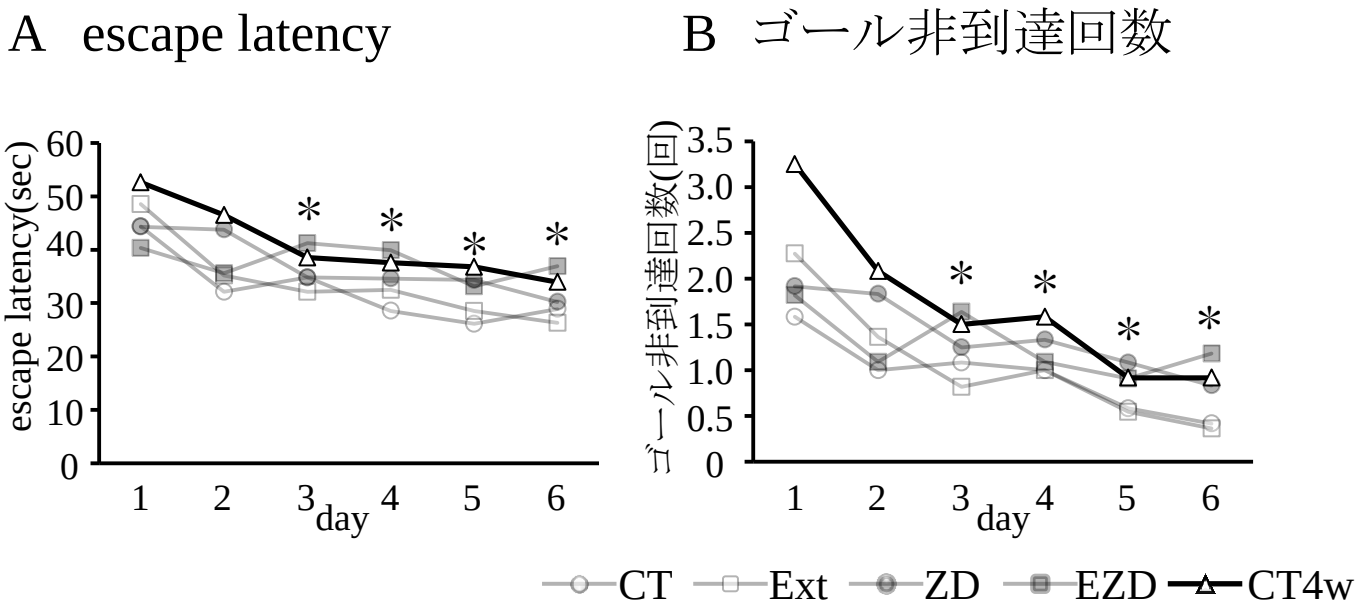

図14

A escape latency：CT4w群のescape latencyは，day 1に比較しday3,4,5,6で有意に短縮した(＊ $p<0.05$，vs day 1).

B ゴール非到達回数：CT4w群のゴール非到達回数は，day 1に比較しday3,4,5,6で有意に短縮した(＊$p<0.05$，vs day 1).

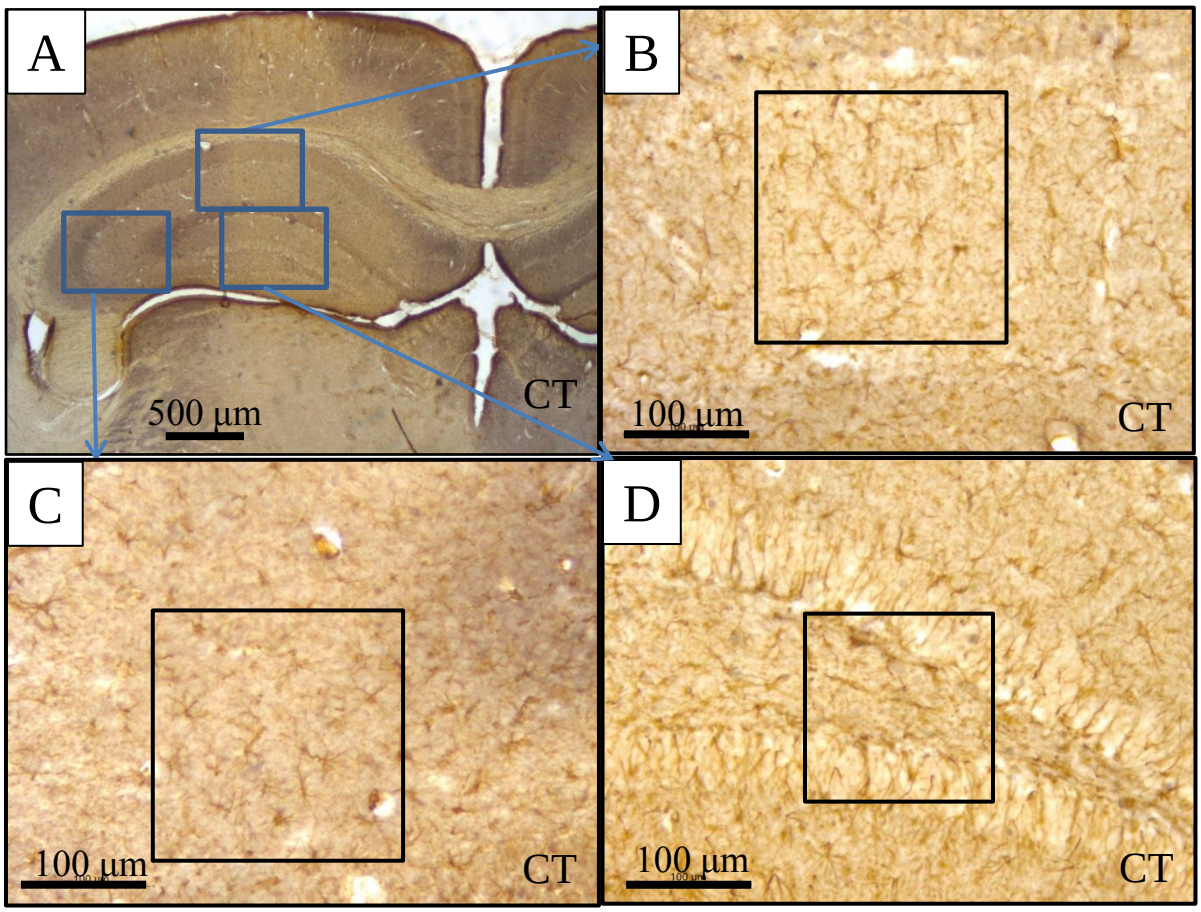

図15. 海馬のGFAP免疫組織化学染色

A：CT群の海馬GFAP免疫組織化学染色切片の弱拡大図

B～D：CT群マウスの海馬GFAP免疫組織化学染色切片の三領域拡大図．星型の細胞であるアストロサイトが染色された．CA1，CA3領域は200 µm四方，DG領域は200µm四方のグリッド内のGFAP陽性細胞数について，画像処理ソフトImage Jを用いてGFAP陽性細胞をプロットし細胞数を測定した．

B：CA1領域，C：CA3領域，D：DG領域

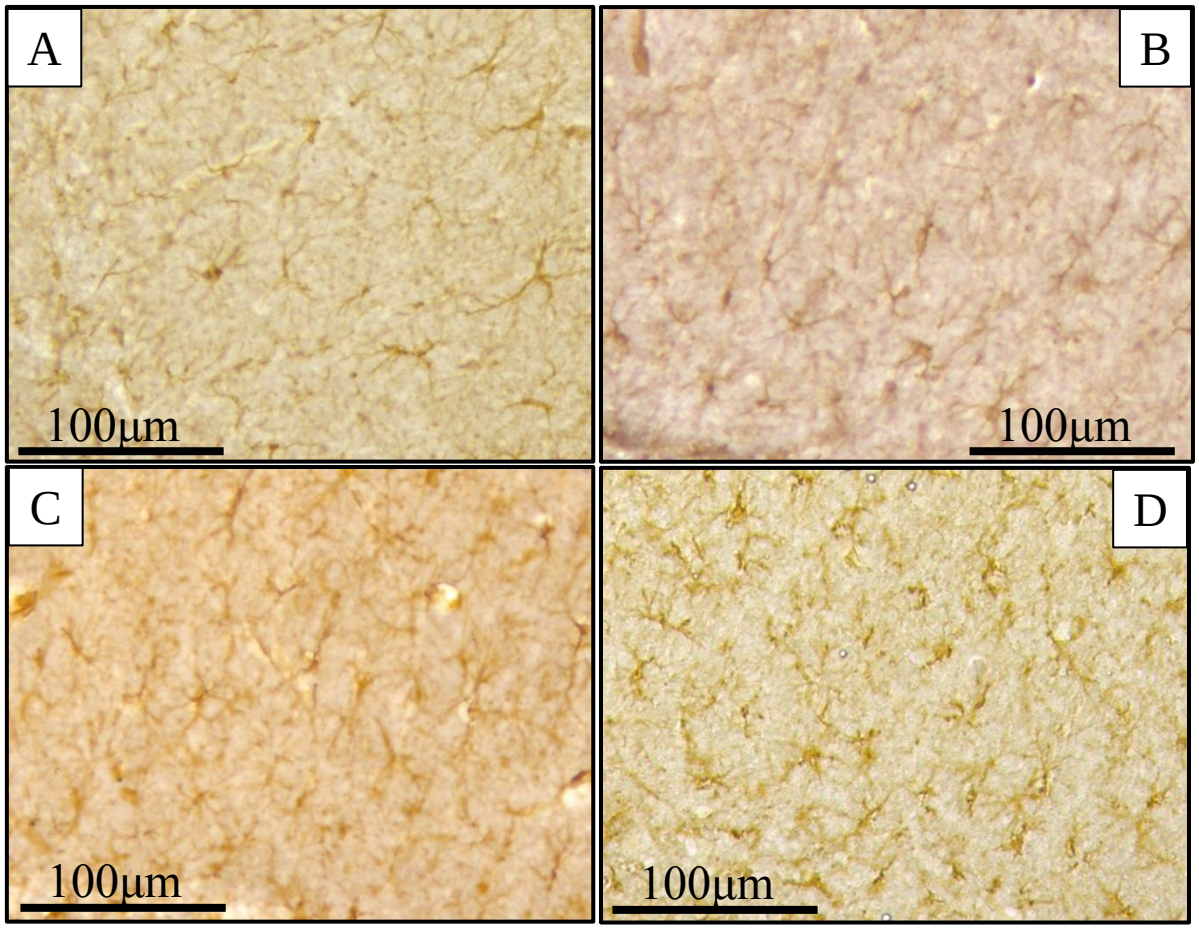

図16. 海馬CA1領域におけるGFAP免疫組織化学染色
A:CT群　B:Ext群　C:ZD群　D:EZD群
ZD群，EZD群のGFAP陽性細胞密度がCT群，Ext群に比較し視覚的に多い.

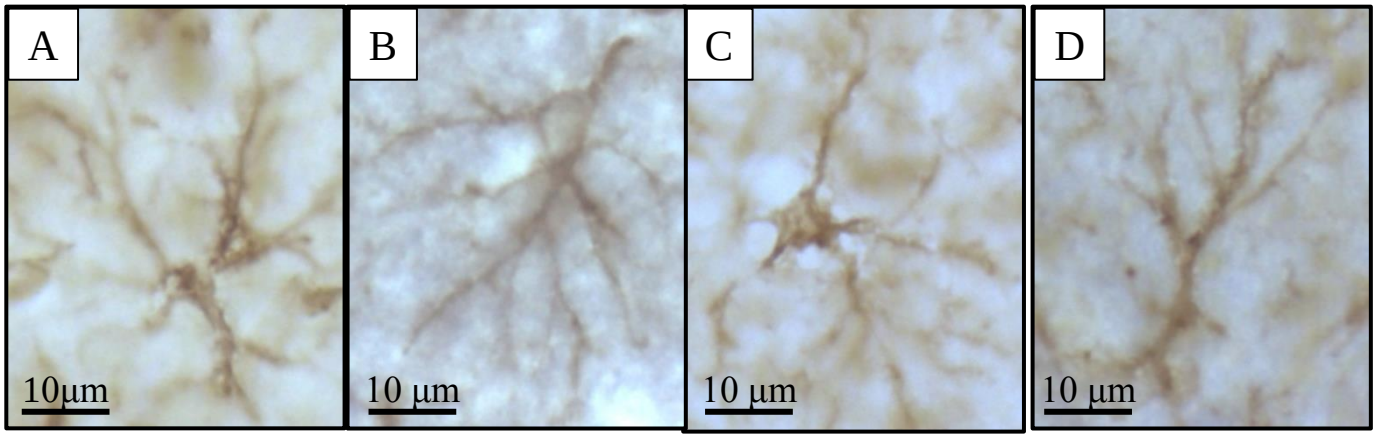

図17　GFAP陽性アストロサイト(強拡大)
A:CT群　B:Ext群　C:ZD群　D:EZD群
四群間においてアストロサイトの細胞体の大きさや突起の長さ，太さなどの形態的な相違点を認めなかった.

A　probe test
(ゴールエリア滞在時間(sec))

	8w	13w	22w
CT	25.9±2.7	39.9±3.7	36.1±5.8
Ext	29.8±2.3	33.0±1.5	38.2±4.4
ZD	28.5±2.8	38.3±4.2	39.3±4.4
EZD	20.1±2.4	21.7±4.9	33.5±4.9

B　visible probe test
(escape latency(sec))

	8w	13w	22w
CT	20.5±3.4	14.3±3.7	10.6±2.8
Ext	25.1±3.9	18.0±3.1	9.7±2.1
ZD	32.2±6.0	22.7±4.8	16.0±2.8
EZD	36.9±6.5	37.0±9.8	25.8±5.3

表1.
A　probe test(ゴールエリア滞在時間(sec))：
8週齢時の試行ではEZD群のゴールエリア滞在時間は有意ではないが短い傾向を示した($p=0.09$).
13週齢時の試行ではExt群・EZD群のゴールエリア滞在時間はCT群・ZD群に比較し，短い傾向を示した(CT・ZD vs Ext・EZD；$p<0.05$).
22週齢時の試行では四群間に有意差を認めなかった(main effect of Ext; $p=0.71$, main effect of zinc; $p=0.87$).
B　visible probe test(escape latency(sec))：
8週齢時の試行では，ZD群・EZD群のescape latencyはCT群・Ext群に比較し，有意に延長した(CT・Ext vs ZD・EZD；$p<0.05$).
13週齢時の試行では，ZD群・EZD群のescape latencyはCT群・Ext群に比較し，有意に延長した(CT・Ext vs ZD・EZD；$p<0.05$).
22週齢時の試行では，ZD群・EZD群のescape latencyは13週齢時と比較すると短縮傾向を認めたものの，CT群・Ext群と比較すると有意に延長した(CT・Ext vs ZD・EZD；$p<0.05$).

	CT	Ext	ZD	EZD	CT(4w)
probe test	25.9±2.7	29.8±2.3	28.5±2.8	20.1±2.4	25.6±2.1
visible probe test	20.5±3.4	25.1±3.9	32.2±6.0	36.9±6.5	33.4±4.7

表2. probe test(ゴールエリア滞在時間(sec))，visible probe test(escape latency(sec))
CT4w群のゴールエリア滞在時間は，CT群に比較し有意差を認めなかった($p=0.92$).
visible probe testのCT4w群のescape latencyは，CT群と比較し有意に延長した($p<0.05$).

	CA1	CA3	DG
CT	41.5±1.4	36.7±1.4	25.0±2.6
Ext	38.1±1.1	35.8±0.9	25.8±1.3
ZD	48.7±3.7	38.7±7.0	33.6±2.8
EZD	48.4±1.7	38.0±1.8	25.0±1.8

表3. GFAP陽性細胞数

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群で有意に増加した(CT・Ext vs ZD・EZD；$p<0.05$).