



Title	亜鉛欠乏飼料摂取がラット三叉神経中脳路核ニューロンの活動特性に与える影響
Author(s)	山田, 早織
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61642">https://doi.org/10.18910/61642</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 山 田 早 織 )

## 論文題名

亜鉛欠乏飼料摂取がラット三叉神経中脳路核ニューロンの活動特性に与える影響

## 論文内容の要旨

## 【目的】

亜鉛は生体恒常性維持に重要な微量元素の一つであり、欠乏状態では食欲不振・減退、成長遅延、味覚障害、皮膚炎等の様々な症状を引き起こすことが報告されている。亜鉛欠乏による摂食行動変化に関する過去の研究では、亜鉛欠乏飼料給餌により摂食量は減少し、摂食行動開始までの時間は延長すると報告がある一方、亜鉛欠乏飼料給餌ラットの視床下部弓状核では摂食促進ペプチドであるNeuropeptide Y (NPY) の発現は増加していることが報告されている。当教室のこれまでの研究より、咀嚼機能低下条件が加わることで亜鉛欠乏による学習記憶能力の低下が増長されることや、亜鉛欠乏飼料給餌ラットに一定時間標準飼料を与えると、標準飼料のみで飼育する場合と比較して累積摂食量は増大し、摂食行動開始までの時間は短縮することが明らかとなっているが、顎運動出力に直接関わる三叉神経系ニューロンの応答特性に如何なる変化をもたらすか明らかにされていない。三叉神経中脳路核ニューロンは、一次感覚ニューロンとして、末梢感覚受容器からの求心性情報を統合するだけでなく、脳幹内に細胞体を有して介在ニューロンとしても機能し、三叉神経運動ニューロンからの出力を修飾するなど顎運動パターン形成に深く関与していることが知られている。また、三叉神経中脳路核ニューロンは周波数依存性膜応答特性といった他の三叉神経系ニューロンにはない特性を有し、亜鉛欠乏状態で脳内発現レベルが上昇するとされているNPYによりスパイク周波数等、発火活動パターンが修飾されることが当教室の最近の研究より明らかとなっている。そこで本研究では、亜鉛欠乏飼料を摂取させた母獣ラットにおける新生仔ラットの三叉神経中脳路核ニューロンの活動特性を明らかにするため、従来明らかにされている発火活動、膜応答特性を指標に比較するとともに、NPYによる神経修飾作用への影響についても明らかにする目的で、電気生理学的に検討を行った。

## 【研究方法】

研究にはSD系新生仔ラットを用いた。母獣ラットに給餌する飼料として、亜鉛欠乏飼料 (Zn含有量: 0.07 mg/100 g, ZD群)、標準飼料 (Zn含有量: 4.89 mg/100 g, CT群) をそれぞれ用いて比較検討した。電気生理学的検討にはホールセルパッチクランプ法を適用した。イソフルラン吸入麻酔下で三叉神経中脳路核を含む厚さ300  $\mu$ mの冠状脳幹スライスを作製し、赤外線透視条件下で三叉神経中脳路核ニューロンを同定後、先端抵抗値3-5 M $\Omega$ のパッチ電極を用いてホールセル記録を行った。細胞内液にはグルコン酸カリウムを含む標準的内液、細胞外液には記録用標準人工脳脊髄液 (ACSF)、h-current誘発を目的としたチャンネルブロッカーを含む人工脳脊髄液 (modified-ACSF) を条件に応じて灌流し、Voltage-clamp (v-clamp) もしくはCurrent-clamp (c-clamp) 記録条件下で以下の検討を行った。

1. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における生後体重変化と三叉神経中脳路ニューロン基本膜特性の変化
  - 1-1: ZD群の生後1-12日齢 (P1-12) までの生後体重変化、ならびに血清亜鉛、血清総蛋白値についてCT群と比較検討した。
  - 1-2: Whole-cell記録状態での基本膜特性 (静止膜電位:  $V_{res}$ , 膜容量値:  $C_m$ , 入力抵抗値:  $R_m$ ) をP10-12, P15-17を対象にCT, ZD群間で比較検討した。
2. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における三叉神経中脳路核ニューロン発火活動特性の変化
  - 2-1: c-clamp条件下で矩形波脱分極パルス (3 ms) を細胞内通電して活動電位 (AP) を誘発し、AP特性 (閾膜電位、Spike height, Half width, Slope, AHP振幅・持続時間) をCT, ZD群間で比較検討した。
  - 2-2: 矩形波脱分極パルス (1 s) を細胞内通電して誘発される連続発火活動 (spike train: ST) 特性をCT, ZD群間で比較検討した。
  - 2-3: 0-250 Hzの可変周波数電流 (ZAP current) 刺激により、三叉神経中脳路核ニューロンで誘発される周波数依存

性膜応答特性 (Membrane Resonance) の内、Low frequency resonance, High frequency resonance (LFR, HFR) の周波数応答曲線 (FRC) におけるピーク周波数であるresonant frequency (Fres) ならびにQuality value (Q-value) をCT, ZD群間で比較検討した。

### 3. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下におけるh-channel活動特性の変化

三叉神経中脳路核ニューロンにおいて静止膜電位、LFR形成に関与するh-channel活性が、亜鉛欠乏条件下で如何なる変化をきたすか明らかにする目的で、c-clamp, v-clamp条件で検討を行った。c-clamp条件下でVoltage sag, v-clamp条件下で矩形波過分極パルスにより導出される内向き電流の初期成分 ( $I_{KIR}$ ) と遅延成分 (h-current:  $I_h$ ) を測定し、電流振幅値、電流密度、活動曲線、活動時定数についてCT, ZD群間で比較検討した。

### 4. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下におけるNPYによる三叉神経中脳路核ニューロンの神経修飾作用

摂食促進ペプチドであるNPY投与により三叉神経中脳路核ニューロンで観察される内向き電流形成、ならびにスパイク再分極過程の短縮を伴うスパイク周波数上昇変化が亜鉛欠乏条件下で如何なる変化をもたらすか比較検討を行った。

## 【研究結果】

### 1. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における生後体重変化と三叉神経中脳路ニューロン基本膜特性の変化

1-1: ZD群ではCT群と比較して体重増加量は明らかに減少し、血清亜鉛値は有意に低値を示した。血清総蛋白値に関してはCT, ZD群間で差を認めなかった。

1-2: ZD群ではP10-12, P15-17ともにVresの軽度上昇傾向を認めた。Cm値はP10-12でCT群よりも低値を示したが、Rm値については両日齢群ともCT, ZD群間で差を認めなかった。

### 2. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における三叉神経中脳路ニューロン発火活動特性の変化

2-1: ZD群ではCT群と比較してAP誘発に要する刺激強度 (基電流) は有意に減少した。Spike height, Slopeは増大、Half widthは短縮する傾向を示し、AHP振幅の増大と持続時間の短縮傾向を伴い、spike再分極過程の促進傾向が観察された。

2-2: CT群と比較してST誘発に要する基電流の減少とスパイク周波数 (1st ISI, 平均周波数) の上昇を認めた。

2-3: LFR, HFR誘発時のFRCにおけるFres, Q-valueはCT, ZD群間で差を認めなかった。

### 3. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下におけるh-channel活動特性の変化

ZD群ではc-clamp条件下でh-channel活性を反映するVoltage sagは遅延した。また、v-clamp条件下では $I_{KIR}$ の電流振幅値、電流密度はCT, ZD群間で差を認めなかったが、 $I_h$ については、ZD群において電流密度の減少、活動曲線の左方偏位を伴うチャネルゲート特性の変化と活動時定数の上昇がみられた。

### 4. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下におけるNPYによる三叉神経中脳路ニューロンの神経修飾作用

CT群においてNPY投与時に観察されるAP, AHP再分極の短縮ならびにST誘発時のスパイク周波数上昇効果について、ZD群においてAHPの修飾効果は一部減弱がみられたが、CT群と同様の修飾変化が観察された。

## 【考察・結論】

亜鉛欠乏状態は、新生仔ラットの生後体重増加を明らかに抑制し、離乳開始期までの三叉神経中脳路ニューロンの成長に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、静止膜電位の上昇、活動電位誘発時の基電流の減少、連続発火活動誘発時のスパイク周波数の上昇を伴い、血清亜鉛濃度が正常な状態に比較して易発火性で興奮性が増大していると考えられた。一方、三叉神経中脳路ニューロンの特性の一つである周波数依存性膜応答特性は、亜鉛欠乏状態でも有意差はなく、特定の周波数帯を有するシナプス入力に対するニューロンの応答特性は変化しないことが推察された。さらに、静止膜電位やLFRの形成、スパイク周波数の制御に関わるh-channel活性は、亜鉛欠乏状態で低下する傾向を認めたことから、三叉神経中脳路ニューロン興奮性の増大には内向き整流性Kコンダクタンスは関与していないと考えられた。摂食促進ペプチドであるNPYによる三叉神経中脳路ニューロンの神経修飾作用は、AHPに対する修飾変化が一部減弱したもの、ニューロンの発火特性に対する修飾効果に明らかな差はなかったことから、亜鉛欠乏状態において三叉神経中脳路ニューロンは、NPYに対する応答性には変化なく、定常状態における興奮性が増大することで運動ニューロンからの出力を修飾している可能性が推察された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 山 田 早 織 )				
	(職)		氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	古 郷	幹 彦
	副 査	教授	吉 田	篤
	副 査	准教授	中 村	渉
	副 査	准教授	中 澤	敬 信
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>本研究は、母親の亜鉛摂取量の減少が新生仔期における三叉神経中脳路核ニューロンの活動特性に与える影響について検討したものである。本研究結果より、亜鉛欠乏の母乳栄養では、体重増加量の減少に加えて、スパイク再分極過程の促進、スパイク周波数の上昇変化を伴いニューロンは易発火性であることが明らかとなった。また、周波数依存性膜応答特性に変化はなく、内因性バースト活動は持続時間の短縮を認めたこと、摂食促進ペプチドである <b>neuropeptide Y</b> による応答性に明らかな変化はなかったことから、細胞内外の <math>\text{Ca}^{2+}</math> 動態の変化が修飾の一因となっている可能性が示唆された。</p> <p>本研究は亜鉛欠乏の母親における新生仔の摂食行動の生後発達を明らかにする上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。</p>				