

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	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 顎口腔病因病態制御学講座

顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）

（指導教官：古郷 幹彦 教授）

山田 早織

## 緒言

亜鉛は生体恒常性維持に重要な微量元素の一つであり、低含有食品摂取や長期の静脈栄養・経腸栄養による摂取不足、小腸からの吸収障害等、様々な原因によって亜鉛が欠乏すると食欲不振・減退、成長遅延、味覚障害、皮膚炎等の症状を引き起こすことが報告されている (Chesters and Quarterman, 1970; Tamaki et al., 1995; Goto et al., 2001; Küry et al., 2002; Wang et al., 2002)。

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 (Chesters and Quarterman, 1970; Tamaki et al., 1995)、摂食行動開始までの時間は延長する (Rains et al., 1998) 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の一つである Neuropeptide Y (NPY) の発現は増加していることが報告されている (Lee et al., 1998)。当教室の木田らは、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 (Kida et al., 2015)、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を報告している。こうした摂食行動の変調には、亜鉛欠乏に伴う中枢神経系における様々な応答変化が関与していると推察されるが、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については明らかにされていない。

三叉神経中脳路核 (MTN) 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 (Rokx et al., 1986; Shigenaga et al., 1989; Luo and Dessem, 1995; Kolta et al., 1990, 1995)。また、MTN ニューロンは周波数依存性膜応答特性 (membrane resonance) 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 (Khakh and Henderson, 1998; Wu et al., 2001; Tanaka et al., 2003)、摂食促進作用を有する 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関らの研究より明らかとなっている (Seki et al., 2015)。

そこで本研究では、亜鉛欠乏状態が MTN ニューロンの活動特性ならびに、摂食促進ペプチドによる MTN ニューロンの神経修飾効果へ如何なる影響を及ぼすか明らかにする目的で、これまでに報告されている発火活動、膜応答特性 (Del Negro and Chandler, 1997; Wu et al., 2001, 2005; Tanaka et al., 2003) を指標に、標準飼料で飼育した場合と比較して電気生理学的に検討を行った。

## 研究材料と方法

### 研究材料

本研究における実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定と動物の愛護および管理に関する法律を順守して行った。

研究対象には、Sprague-Dawley 系新生仔ラット（日本動物株式会社）を用いた。ラットを標準飼料給餌（CT）群、亜鉛欠乏飼料給餌（ZD）群の二群に分け、生後 1 日目よりそれぞれの母獣ラットへ標準飼料（亜鉛含有量: 4.89 mg /飼料 100 g）、亜鉛欠乏飼料（亜鉛含有量: 0.07 mg/飼料 100 g）を自由摂食させて飼育した（温度: 20-22 °C，湿度: 40-50 %，照明: 明期 8-20 時）。

### 研究方法

#### 生後体重変化および血清亜鉛、総蛋白値の測定

生後 1 日目から生後 12 日目まで、午前 8 時に新生仔ラットの体重を測定した。また、亜鉛欠乏状態が得られているか検証する目的に、生後 10 日齢のラットを三種混合麻酔薬（ドミトール 0.375 mg/kg、ドルミカム 2 mg/kg、ベトルフェール 2.5 mg/kg）を腹腔内麻酔下、背位の状態で、前胸郭口より 26 G 注射針にて刺入し、心臓採血法にて血液を採取した。採取した血液を採血管（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に入れ、3,000 rpm，10 分間遠心し、血清を採取し、血清中の亜鉛濃度 ( $\mu\text{g/dL}$ ) 【原子吸光分析法、原子吸光分光光度計

(アジレントテクノロジー株式会社)、(株) ビー・エム・エル 総合研究所】および総蛋白 (g/dL) 【比色法 (Biuret 法)、自動分析装置 (LABOSPECT008 (株式会社 日立ハイテクノロジーズ), BIOMAJESTY JCA-BM8060 (日本電子株式会社)、(株) ビー・エム・エル 総合研究所】を測定した。

### 冠状脳幹スライス標本の作製

実験には、生後 10 日から 17 日齢の SD 系新生仔ラットを用いた。これまで報告されている方法に準じて (Del Negro and Chandler, 1997; Wu et al., 2001, 2005; Tanaka et al., 2003, 2006) イソフルランにて深麻酔後、断頭し、冷却した Cutting 用人工脳脊髄液 (cutting artificial cerebrospinal fluid; 以下 C-ACSF. 組成; 126 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 MgCl, 4 lactic acid (mM)) に浸漬した状態で頭蓋骨を除去し、脳幹組織を摘出した。脳幹ブロックを作製後に、超低融点アガロースゲル (agarose type VII, Sigma-Aldrich 社製) を用いてスライス標本作製装置 (linearslicer PRO 7, 堂阪イーエム社製) に固定し、MTN ニューロンを含む厚さ 300 μm の冠状脳幹スライス標本作製した。作製したスライス標本を室温 (22-24°C) の記録用標準人工脳脊髄液 normal-ACSF (以下 N-ACSF. 組成; 124 NaCl, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub> (mM)) に移し、40-50 分静置した後、記録に用いた。また、Voltage-clamp 条件下で h-current 誘発を目的に記録を行った際は、チャンネルブロッカーを含む人工脳脊髄

液 modified-ACSF (組成; 114.25 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 glucose, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 TEA-Cl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.1 CdCl<sub>2</sub>, 2 4-AP, 0.0005 TTX (mM)) を用いた (Tanaka et al., 2003)。すべての細胞外液は、95 %O<sub>2</sub>+ 5 %CO<sub>2</sub> 混合ガスにて飽和させた状態で使用した。

### Whole-cell patch-clamp 法を用いた記録

正立型 Nomarski 赤外線微分干渉顕微鏡 (BX51W1, オリンパス社製) のステージ上に設置した記録用チャンバー (アクリル製、用量 2.0 ml) に脳幹スライス標本を静置し、スライスマンカー (Warner Instruments 社製) を用いて固定した。N-ACSF を 2 ml/min の速度で灌流しながら赤外線透視条件下で MTN を同定し、直径約 20-40 μm の偽単極性の類円形細胞である MTN ニューロンからギガシール形成後、Whole-cell 記録を行った。記録用電極は、微小ガラス管電極作製装置 (P-87, Sutter Instruments 社製) を用いて、外径 1.5 mm、内径 1.12 mm のボロシリケート製ガラス管 (150 EA/PKG, インターメディカル社製) を先端抵抗値が 3-5 MΩ となるように作製した。電極内液は、カリウム塩を主成分とするものを用い、組成は 115 K-gluconate, 25 KCl, 9 NaCl, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 1 MgCl<sub>2</sub>, 3 K<sub>2</sub>-ATP, 1 Na-GTP (mM) とし、pH7.25 に調整した。ニューロン表層と電極間で形成されるアクセス抵抗値は 15 MΩ 未満のニューロンのみを記録対象とし、Voltage-clamp (v-clamp) あるいは Current-clamp (c-clamp) 条件下で MTN ニューロンの電気活動を記録した。電気信号は、パッチクランプ用増幅器 (Multiclamp 700 B, Molecular Devices 社製) で増幅後に

アナログ-デジタル変換器 (Digidata 1322 A, Molecular Devices 社製) でデジタル変換し、パーソナルコンピュータと専用ソフトウェア (pCLAMP9.2, Molecular Devices 社製) を用いて記録および解析を行った。

### 薬剤投与

本研究において用いた薬剤は、蒸留水に溶解し、以下の最終濃度となるように Bath 内灌流投与した。NPY (Human, Rat 0.1  $\mu$ M, 株式会社ペプチド研究所)、tetrodotoxin (TTX: 0.0005 mM, 和光純薬工業株式会社)

### 統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.) の形で表示した。有意差検定には Two-way repeated measures ANOVA あるいは Student's t-test を用い、有意水準は 5 %とした。



## 結果

### 研究 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 MTN ニューロン基本膜特性変化

#### 研究 1-1. 生後体重変化および血清亜鉛、総蛋白値の測定

体重増加曲線において、ZD 群は CT 群と比較して P8 以降より体重増加が減少する傾向を示した (P10, CT 群:  $15.5 \pm 0.5$  g, n=14, ZD 群:  $12.5 \pm 0.2$  g, n=13,  $p < 0.05$ , 図 1C)。一方、P10 における ZD 群の血清亜鉛値は、CT 群と比較し有意に低値を示したが (CT 群:  $263.1 \pm 9.3$   $\mu\text{g/dL}$ , ZD 群:  $152.6 \pm 24.3$   $\mu\text{g/dL}$ ,  $p < 0.05$ , 図 2A)、血清総蛋白は、二群間で有意差を認めなかった (CT 群:  $3.58 \pm 0.07$  g/dL, ZD 群:  $3.57 \pm 0.04$  g/dL,  $p = 0.94$ , 図 2B)。

#### 研究 1-2. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における MTN ニューロン基本膜特性

Whole-cell 記録条件下における MTN ニューロンの基本膜特性 (静止膜電位;  $V_{\text{res}}$ , 膜容量値;  $C_m$ , 入力抵抗値;  $R_m$ ) を P10-12, P15-17 の日齢群を対象に CT, ZD 群間で比較検討した。ZD 群では、CT 群と比較し、P10-12 では  $C_m$  値は小さく (CT 群:  $69.5 \pm 6.0$  pF, ZD 群:  $59.6 \pm 3.3$  pF,  $p = 0.16$ )、また、 $V_{\text{res}}$  は脱分極傾向【P10-12 (CT 群:  $-58.0 \pm 0.7$  mV, ZD 群:  $-56.4 \pm 0.4$  mV,  $p = 0.09$ ), P15-17 (CT 群:  $-57.4 \pm 0.7$  mV, ZD 群:  $-55.8 \pm 0.6$  mV,  $p = 0.10$ )】を示したが二群間に有意差は認めなかった。 $R_m$  についても二群間で有意差を認めなかった【P10-12 (CT 群:  $79.5 \pm 3.8$  M $\Omega$ , ZD 群:  $80.0 \pm 5.1$  M $\Omega$ ,  $p = 0.93$ ), P15-17

(CT 群:  $74.6 \pm 4.6 \text{ M}\Omega$ , ZD 群:  $77.2 \pm 4.3 \text{ M}\Omega$ ,  $p=0.69$ )】(表 1)。

## 研究 2. 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における MTN ニューロン発火活動特性 の変化

### 研究 2-1. MTN ニューロン活動電位特性の比較

MTN ニューロンが母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌によって如何なる活動電位特性変化を示すか検討する目的で、c-clamp 条件下で静止膜電位の MTN ニューロンに 3 ms の矩形波脱分極パルスを細胞内通電して誘発された活動電位 (Action potential: 以下 AP) の各パラメータの変化 (図 3) について CT, ZD 群間で比較検討した。ZD 群では CT 群と比較して閾膜電位に明らかな差は認めず (CT 群:  $-44.1 \pm 0.9 \text{ mV}$ , ZD 群:  $-45.0 \pm 0.8 \text{ mV}$ ,  $p=0.44$ )、AP 誘発に要する刺激強度 (基電流) は有意に減少した (CT 群:  $252.4 \pm 13.1 \text{ pA}$ , ZD 群:  $206.5 \pm 14.5 \text{ pA}$ ,  $p<0.05$ , 表 2)。また、Spike height (CT 群:  $92.5 \pm 1.7 \text{ mV}$ , ZD 群:  $94.4 \pm 1.4 \text{ mV}$ ,  $p=0.41$ )、Slope 値 (CT 群:  $-181.1 \pm 11.8 \text{ mV/ms}$ , ZD 群:  $-209.4 \pm 12.3 \text{ mV/ms}$ ,  $p=0.11$ ) は ZD 群で増大、Half width 値 (CT 群:  $0.62 \pm 0.03 \text{ ms}$ , ZD 群:  $0.57 \pm 0.03 \text{ ms}$ ,  $p=0.23$ ) は ZD 群で短縮する傾向をそれぞれ示したが、有意差は認めなかった。活動電位後過分極 (AHP) に関しては、ZD 群において Peak amplitude が有意に増大し (CT 群:  $-11.9 \pm 0.2 \text{ mV}$ , ZD 群:  $-13.2 \pm 0.4 \text{ mV}$ ,  $p<0.05$ )、Duration は短縮傾向を認め (CT 群:  $30.3 \pm 3.4 \text{ ms}$ , ZD 群:  $25.9 \pm 2.7 \text{ ms}$ ,  $p=0.32$ )、spike 再分極過程の促進傾向が観

察された (図 4, 表 2)。

## 研究 2-2. MTN ニューロン連続発火活動特性の比較

1 s の矩形波過分極パルスにより誘発される連続発火活動 (Spike train: 以下 ST) を CT, ZD 群間で比較検討したところ、ST 誘発に必要な基電流は ZD 群において減少する傾向を認めた (CT 群:  $450 \pm 53.5$  pA, ZD 群:  $325 \pm 52.6$  pA,  $p=0.12$ , 図 5E)。周波数電流曲線 (F-I curve) では、CT 群と比較し ZD 群において第一、第二スパイクで形成される周波数である 1st ISI、平均周波数 (Mean frequency) とともに有意に上昇した (図 5A-D, F)。

MTN では、P8 以降のニューロンにおいて、膜電位を持続的に脱分極させることによって自発的な内因性バースト活動 (Bursting activity: BA) が出現する (Wu et al., 2001)。そこで持続的な細胞内通電によって BA を誘発し、CT, ZD 群間でバースト活動特性を表す各パラメータ値を比較検討した (図 6A)。CT 群と比較し、ZD 群では BA 誘発に必要なとされる電流刺激強度は減少する傾向を示し、バースト持続時間 (Duration. CT 群:  $3.1 \pm 0.6$  s, ZD 群:  $1.1 \pm 0.2$  s,  $p<0.05$ )、バースト間インターバル (Interval. CT 群:  $7.0 \pm 0.9$  s, ZD 群:  $3.1 \pm 1.0$  s,  $p<0.05$ ) は有意に減少し、バースト出現頻度は増加する傾向を示した (Burst frequency. CT 群:  $0.18 \pm 0.08$  Hz, ZD 群:  $0.39 \pm 0.13$  Hz,  $p=0.30$ )。また、バースト内スパイク周波数は ZD 群で有意に減少した (Intraburst spike frequency. CT 群:  $130.9 \pm 13.2$  Hz, ZD 群:  $84.0 \pm 5.8$  Hz,  $p<0.05$ , 図 6B, C, 図 7)。

### 研究 2-3. MTN ニューロンにおける Membrane resonance の比較

MTN ニューロンは 0-250 Hz の可変周波数電流 (ZAP current) 刺激により特定の周波数帯に対する応答特性を示すことが明らかとされている (Wu et al., 2001; Tanaka et al., 2003)。

そこで、MTN ニューロンで誘発される Membrane resonance について CT, ZD 群間で比較検討した。脱分極あるいは過分極電位条件下における Frequency-response curve (FRC) を二群間で比較検討したところ、脱分極条件下で観察される High frequency resonance について、Resonant frequency は ZD 群で減少傾向を示したものの有意差はなく (Fres. CT 群:  $52.1 \pm 3.1$  Hz, ZD 群:  $48.0 \pm 4.9$  Hz,  $p=0.49$ )、Quality value についても差を認めなかった (Q-value; CT 群:  $2.6 \pm 0.3$ , ZD 群:  $2.6 \pm 0.6$ ,  $p=0.98$ , 図 8A, C, E, 表 3)。また、過分極条件下で観察される Low frequency resonance についても、Peak impedance (CT 群:  $63.4 \pm 8.1$  M $\Omega$ , ZD 群:  $74.8 \pm 7.8$  M $\Omega$ ,  $p=0.33$ ) は ZD 群において高値となる傾向を示したが、Fres (CT 群:  $5.6 \pm 0.6$  Hz, ZD 群:  $5.7 \pm 0.7$  Hz,  $p=0.92$ )、Q-value (CT 群:  $2.0 \pm 0.2$ , ZD 群:  $2.0 \pm 0.2$ ,  $p=0.97$ ) については二群間で差を認めなかった (図 8B, D, F, 表 4)。

### 研究 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

内向き整流作用は、多くの神経細胞において観察される膜の過分極変化に伴って観察される特性の一つで (Womble and Moises, 1993; Travagli and Gillis, 1994; Maccaferri and

McBain, 1996; Bordey and Sontheimer, 1997)、MTN ニューロンにおいても本特性は強く発現しており、静止膜電位の形成、スパイク周波数の制御、過分極条件下で観察される Low frequency resonance の形成等に関与していることを当教室の田中らが明らかとしている (Tanaka et al., 2003)。c-clamp 条件下で 1 s の矩形波過分極パルスを細胞内通電して誘発される Voltage sag について CT, ZD 群間で比較検討したところ、CT 群と比較して ZD 群では Voltage sag はピークからの経過が遅延する傾向を認め、sag の振幅も有意に減少した (CT 群:  $50.2 \pm 0.8$  mV, ZD 群:  $46.4 \pm 1.6$  mV,  $p < 0.05$ , 図 9)。そこで、v-clamp 条件下で modified-ACSF を還流し、矩形波過分極パルスによる刺激にて内向き電流を誘発し、CT, ZD 群間で電流特性を比較検討した (図 10)。電流の初期成分である  $Ba^{2+}$ -sensitive fast inward rectifying current ( $I_{KIR}$ , 図 10C inset) について、電流振幅値および単一チャンネルに流れる電流強度を表す電流密度は二群間で差を認めなかった (図 11A, B)。一方、遅発性電流成分である h-current ( $I_h$ , 図 10C) については、ZD 群において電流密度は減少する傾向を認めた (図 11C, D)。さらに、内向き電流誘発後に流れる Tail current を、最大電流値を基準として正規化し、チャンネルのゲート特性を表す活動曲線を求めると、CT 群と比較して ZD 群では、コンダクタンス 50 % 活性値を示す電位 ( $V_{1/2}$ ) の左方偏位がみられた (図 12A, B)。また、活動時定数についても fast, slow 成分ともに ZD 群で延長した (図 12C, D, E)。

#### 研究 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 MTN ニューロン

##### 神経修飾作用

母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における MTN ニューロンの NPY による神経修飾作用について検討するため、c-clamp, v-clamp 条件下で NPY (0.1  $\mu$ M) を灌流投与し、薬剤投与前後での膜電位、膜電流の変化を記録した。静止膜電位において NPY を灌流投与すると、v-clamp 条件下で内向き電流が観察され (図 13A)、c-clamp 条件下では脱分極変化を認め (図 13B)、二群間で有意差は認めなかった。

次に、NPY (0.1 $\mu$ M) 投与前後における AP パラメータの変化を CT, ZD 群間で比較検討した (図 3)。ZD 群において NPY 投与後、有意な Half width 値の短縮 (NPY 投与前:  $0.57 \pm 0.03$  ms, NPY 投与後:  $0.53 \pm 0.02$  ms,  $p < 0.05$ )、Slope 値の増大 (NPY 投与前:  $-209.4 \pm 12.3$  mV/ms, NPY 投与後:  $-222.8 \pm 11.7$  mV/ms,  $p < 0.05$ )、AHP 持続時間の短縮 (NPY 投与前:  $25.9 \pm 2.7$  ms, NPY 投与後:  $19.6 \pm 1.8$  ms,  $p < 0.05$ ) を認めた (図 14, 表 5)。以上の変化について NPY 投与前の各パラメータ値を 1 とした際の NPY 投与後の変化について、CT, ZD 群間で比較すると、AHP 持続時間の短縮に関しては ZD 群で変化率が有意に小さくなったが、その他の項目に関しては同様の修飾変化率を示した (図 15)。

さらに、1 s の矩形波脱分極パルスにより誘発される ST に対する NPY の修飾作用に関して CT, ZD 群間で比較検討した。AP 同様に、NPY (0.1  $\mu$ M) 投与前後で ST 特性を比較したところ、1st ISI, Mean frequency とともに上昇傾向を認めた (図 16A-D)。また、CT 群

と比較すると、ZD 群では NPY 投与による 1st ISI においてスパイク周波数の変化率は小さくなる傾向を認めたが、Mean frequency に関しては差を認めなかった (図 16E, F)。

## 考察

### 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 MTN ニューロンの基本膜特性変化

亜鉛欠乏飼料給餌ラットの血漿中の亜鉛濃度は、亜鉛欠乏飼料給餌開始から 3 日後では有意な減少は認めず、5 日後では有意に減少すると報告されている (Ohinata et al., 2009)。また、当教室の木田らは、亜鉛欠乏飼料給餌開始から 7 日後に血清亜鉛値が有意に減少することを明らかにしている。一方、ヒトの母乳には、血清中と比較して高濃度の亜鉛が含まれており、体重当たりの亜鉛需要量が多い乳児が亜鉛欠乏状態の母親の母乳を摂取した場合、亜鉛欠乏症を発症しやすいことが報告されている (Aggett et al., 1980; Yamawaki et al., 2005; Itsumura and Kambe, 2014)。本研究では、生後 1 日齢より母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌を開始し、生後 10 日齢時に新生仔ラットの血液検査を行った結果、ZD 群の血清亜鉛値は CT 群と比較して有意に減少することが確認された。体重変化に関しては、生後 8 日齢以降、ZD 群において体重増加量は CT 群よりも明らかに減少傾向を認めたものの、血清総蛋白値は二群間で有意差を認めず、母獣ラットが摂取した飼料は亜鉛含有量以外には成分の差はなかった。以上のことより、生後早期に観察された発育抑制は血清中の亜鉛濃度が低下したことが大きく影響していると推察されるが、今後、新生仔発育に関わる他の因子についても詳細に検討する必要があると考えられる。

亜鉛欠乏状態が神経細胞の成長発育に如何なる影響を及ぼすかについては、これまで殆



ど明らかにされていない。免疫組織学的研究より Dvergsten らは、生直後より母獣ラットに亜鉛欠乏飼料を給餌した場合、標準飼料給餌群と比較し、仔ラット（生後 21 日齢）小脳皮質の顆粒細胞層は薄く、顆粒細胞数は有意に減少すること、プルキンエ細胞の樹状突起幅は有意に小さくなること、分子層の籠細胞および星状細胞の樹状突起幅は有意に小さくなるが、細胞体の大きさに関しては小さくなる傾向を認めるものの有意差は認めないことを報告している (Dvergsten et al., 1983, 1984a, 1984b)。ラット MTN ニューロンについては、基本膜特性に関して検討した過去の報告より、生後 12 日齢までに入力抵抗値は減少、膜容量値は増大、静止膜電位は脱分極変化が観察されることが明らかとなっている (Tanaka et al., 2003)。本研究において、入力抵抗値は CT, ZD 群間で変化を認めなかったが、膜容量値は、P10-12 群の ZD 群において低値を示す傾向を認め、静止膜電位は P10-12, P15-17 群ともに ZD 群で脱分極傾向を認めた。MTN ニューロンは偽単極性の細胞であり、膜容量はニューロン表層の面積に比例することから、亜鉛欠乏状態は新生仔期における MTN ニューロンの成長に影響を与える可能性が示唆されたが、ニューロンの分布様式や形態、成熟度等、今後、免疫組織学的検索を含めて詳細な検証が必要と考えられる。

#### 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における MTN ニューロン発火活動特性と h-コンダクタンスの変化

ラット MTN ニューロンにおいては、ニューロン表層に存在する各種イオンチャネルの

生後変化、成熟に伴い、三叉神経運動ニューロンより顕著な AHP が形成される他、膜の持続的脱分極に伴い連続発火活動、内因性バースト活動が誘発されることが明らかとされている (Wu et al., 2001; Tanaka et al., 2003)。本研究では、血清亜鉛欠乏状態が、こうした多様な発火活動特性に如何なる影響を及ぼすか検討を行った。活動電位については、閾膜電位の低下、基電流の減少、AP, AHP 振幅値の増大傾向に加えて、再分極過程を示す AP, AHP の持続時間は短縮傾向を示し、ニューロンは易発火性で興奮性が増大していると考えられた。連続発火活動においても同様の変化を反映して、1st ISI, Mean frequency はともに有意に上昇することで周波数-時間曲線は亜鉛欠乏状態では全体的に上方へ shift することが明らかとなった。Model neuron を用いた研究を始め、スパイク周波数すなわち発火頻度を規定する因子として AHP 形成コンダクタンス ( $g_{AHP}$ ) が重要であることが報告されている (Yarom et al., 1985; Meunier and Borejsza, 2005)。MTN において  $g_{AHP}$  を構成するコンダクタンスとしては、4-AP 感受性電位依存性 K コンダクタンス ( $g_{K4-AP}$ )、 $Ca^{2+}$  依存性 K コンダクタンス ( $g_{KCa}$ )、内向き整流性 K コンダクタンス ( $g_h$ ) が報告されており (Del Negro and Chandler, 1997; Wu et al., 2001; Tanaka et al., 2003)、各コンダクタンスの生後変化に伴って新生仔早期には振幅の小さい early AHP と持続時間の長い late AHP による二峰性の波形が観察されるのに対して、新生仔後期には early AHP の振幅増大と late AHP 再分極過程の短縮により二峰性は消失し、AHP は増大する (Tanaka et al., 2003)。c-clamp 条件で過分極電流パルスを通電した際に特徴的に観察される Voltage sag は  $g_h$  を

反映しており、生後 h-channel の成熟とともに sag も増大する傾向を示すが、亜鉛欠乏条件下では、sag の振幅は減少し、ピークからの再分極も遅延する傾向を認め、h-channel 特性が変化している可能性が考えられたため、v-clamp 条件下で内向き整流性電流を誘発し、h-channel 活動特性についてさらに検討を行った。本研究より内向き整流性電流の内、速い電流成分である Ba<sup>2+</sup>-sensitive I<sub>KIR</sub> は亜鉛欠乏条件下でも変化を認めなかったのに対し、遅延性電流成分である I<sub>h</sub> は電流密度の減少と活動時定数の延長がみられたことから、単一チャンネルを流れる電流値は減少することが明らかとなった。さらに、チャンネルのゲート特性を表す活動曲線は過分極側に shift したことから、fast AHP 形成から静止膜電位に再分極する過程で通常活性化される I<sub>h</sub> は亜鉛欠乏条件下では抑制されることが推察された。I<sub>h</sub> の特異的拮抗薬である ZD7288 (Harris and Constanti, 1995) を投与すると静止膜電位は過分極変化をきたし、AHP 再分極過程の遅延とスパイク周波数の低下が観察されることから (Tanaka et al., 2003)、亜鉛欠乏状態で観察された膜の脱分極変化やスパイク周波数上昇を伴ったニューロンの興奮性増大に g<sub>h</sub> は関与していないと考えられる。

## 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における周波数依存性膜応答特性と内因性バースト活動特性変化

MTN ニューロンでは、生後 8 日齢頃より膜の脱分極変化に伴い高周波数 (> 50 Hz) の自発的な oscillation が観察されるようになり、内因性バーストを誘発する driving force と

して作用することが知られている (Wu et al., 2001)。一方、脱分極条件下で 0-250 Hz の周波数の混在した可変電流 (ZAP current) を通電すると、高周波数域 (> 50 Hz) で特異的にインピーダンス値の上昇を認める。すなわち MTN ニューロンに投射される様々なシナプス入力を周波数依存性に選別して、興奮性を増幅する膜応答特性 (High frequency resonance) が特徴的に観察される (Wu et al., 2001, 2005)。両者の活動形成には MTN ニューロンの early AHP 形成に関わっている  $g_{K4-AP}$  が必須で、持続性 Na コンダクタンス ( $g_{NaP}$ ) は resonance の増幅に重要であることがこれまでの研究で明らかとなっている (Wu et al., 2001, 2005)。本研究において High frequency resonance を構成するピーク周波数 ( $F_{res}$ )、Q-value は亜鉛欠乏条件下においても標準飼料群と比較して有意な変化はみられなかった。また、バースト活動については model simulation を含めたこれまでの報告から、 $g_{K4-AP}$  は burst pattern 形成に必須で、コンダクタンス抑制に伴い tonic firing に活動が変換される一方、 $g_{NaP}$  はバースト持続時間、バースト発生頻度を調整する役割を果たし、コンダクタンスが増大することでバースト持続時間は延長、バースト周波数は上昇することが明らかとなっている (Wu et al., 2005)。亜鉛欠乏条件下ではバースト持続時間は短縮、バースト周波数は上昇したことや High frequency resonance における Q-value に変化が見られなかったことから、亜鉛欠乏条件下においてニューロンの興奮性増大に寄与する  $g_{NaP}$  の変化は起こっていないと考えられる。

## 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における MTN ニューロン興奮性増大に関わるメカニズム

亜鉛は動物全般にわたり多くの蛋白質の合成、代謝に不可欠で、脳内亜鉛は神経新生に関わる細胞分裂、分化に強く影響を及ぼし、脳の成長と機能発現に重要な役割を果たしている (Burdette and Lippard, 2003; Georgieff, 2007; Prasad, 2008)。脳内亜鉛濃度は生後徐々に上昇し、成長後は恒常性を保つように制御されており、特に海馬や扁桃体において発現が高いことが知られている (Takeda and Tamano, 2009)。そして、亜鉛欠乏食により血清亜鉛濃度が低下すると脳機能を維持するために、血液脳脊髄液関門や血液脳関門からも亜鉛の脳内移行が起こるとされている (Takeda, 2000)。脳内亜鉛濃度については、食餌性に亜鉛欠乏状態をきたしても影響は受けないとする報告がある一方 (Szerdahelyi et al., 1982; Wallwork et al., 1983)、ラット成獣に 12 週間亜鉛欠乏飼料を給餌した際に、標準飼料で飼育した場合と比較して体内、特に海馬および肝臓において亜鉛濃度が顕著に低下するとされており、橋・延髄レベルでは変化は少ないとの報告がある (Takeda et al., 2001)。本研究は特に亜鉛の需要が高い新生仔期のラットを対象としており、成獣と比較して脳内亜鉛濃度分布や欠乏飼料給餌によって予想される脳内亜鉛濃度の変化を同一に評価はできない。しかしながら、新生仔あるいは海馬以外の脳内部位を対象に亜鉛欠乏条件下でのニューロンの活動変化について報告例はこれまでになく、本研究は亜鉛欠乏飼料給餌による亜鉛濃度の変化が比較的少ないとされる橋・延髄レベルにおいても、ニューロンの発火特性が変化

しうる結果を示すものと考えられる。

海馬ニューロンを対象とした研究より、亜鉛は神経細胞のシナプス小胞に存在し、細胞内への亜鉛流入は電位依存性 Ca チャネルや NMDA 受容体、Ca 透過性 AMPA 型受容体、亜鉛トランスポーターを介して行われることが明らかとされている (Takeda, 2014)。この点について、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングはニューロンの興奮性に密接に関与しており、Ca チャネル等を介して  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの cross-talk が発現していること、2 週間亜鉛欠乏飼料を給餌したラットの海馬、特に C3 領域に対してカルシウムイメージング法を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定すると、亜鉛欠乏状態では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を認め、海馬ニューロンの異常興奮とそれに続く記憶障害に関わっていると報告されている (Geng et al., 2002; Takeda et al., 2005, 2006, 2009; 駒井ら, 2013)。亜鉛欠乏状態の MTN における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態については今後さらに検証が必要であるが、gAHP の内、late AHP の再分極過程の制御に関わる  $g_{\text{K}/\text{Ca}}$  を  $\text{CdCl}_2$  投与により抑制すると、内因性バースト持続時間が有意に延長すること (Wu et al., 2001, 2005)、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇により三叉神経運動ニューロン同様 (Inoue et al., 1999)、early AHP の振幅増大、late AHP 再分極短縮が観察されることから (Seki et al., 2015)、MTN においても血清亜鉛濃度低下とそれに続く脳内亜鉛濃度の低下に伴い、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングの増強や  $g_{\text{K}/\text{Ca}}$  が増大することで MTN の活動電位、バースト活動特性が興奮性に修飾される可能性が考えられる。

## 母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌条件下における摂食促進ペプチドによる MTN ニューロンの神経修飾作用

MTN ニューロンは末梢感覚受容器あるいは中枢の他のニューロンからの入力により活動が修飾されることが知られているが、この際、細胞間の情報伝達に種々の神経伝達物質が関与していると考えられる。中でも 5-HT や代謝型グルタミン酸受容体作動薬である ACPD は MTN ニューロンに直接作用して  $g_h$  や  $g_{NaP}$  を修飾することでニューロンの興奮性を制御していることが、これまでの研究で明らかとされている (Tanaka et al., 2006, 2008)。MTN ニューロンには様々なペプチド作動性入力も存在するが、強力な摂食促進作用を有する NPY (Tatemoto et al., 1982) について、Wolak らは成獣ラットの MTN ニューロンには Y1, Y5 受容体が存在することを免疫組織学的研究により報告している (Wolak et al., 2003)。*In vivo* におけるこれまでの研究より、第三脳室、側脳室、室傍核などへの NPY 投与によって摂食量が増大することや (Stanley and Leibowitz, 1984; Morley et al., 1987; Currie and Coscina, 1995)、*bout* を指標とした摂食効率や開閉口筋の咀嚼準備期、粉碎期における筋活動パターンの変化を伴い、NPY 脳室内投与により摂食行動は促進されることが当教室の牛村らにより明らかとなっている (Ushimura et al., 2014)。MTN ニューロンに対しては、NPY 投与により  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  による内向き電流が誘発され、活動電位の AHP 持続時間の短縮、スパイク周波数が上昇することで、定常状態におけるニューロンの興奮性が増大することや、神経修飾作用に Y1 および Y5 受容体が関与していることを明らかにしている

(Seki et al., 2015)。

亜鉛欠乏状態では、視床下部弓状核における NPY の発現は増加するという報告 (Lee et al., 1998) がある一方で、亜鉛欠乏状態の症状としては食欲不振、摂食量の減少等が知られており、亜鉛欠乏状態において NPY に対する MTN ニューロンの応答性に変化がみられるか明らかにする目的で今回検討を行った。本研究結果より亜鉛欠乏条件下においても NPY による MTN ニューロンの活動電位、連続発火活動特性について、関ら (Seki et al., 2015) が報告したのと同様の修飾効果が確認されたが、AHP の修飾作用、すなわち振幅の増大と持続時間の短縮効果については、いずれも標準飼料群と比較して変化率は小さい傾向を示した。NPY による神経修飾作用は  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入により発現することが明らかとなっているが、脳内亜鉛濃度低下により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングが増大することで、NPY による修飾効果が一部減弱した可能性が推察される。

海馬ニューロンにおいては、血清亜鉛濃度低下の結果、ストレス応答に関与する Hypothalamo-pituitary-adrenocortical system (HPA 系) が活性化され、副腎皮質からのグルココルチコイド分泌が増加することに伴い、細胞外グルタミン酸濃度が過剰に上昇することも細胞の興奮性上昇に関与していることが明らかとされている (Takeda et al., 2009; 駒井ら, 2013)。MTN ニューロンにおける興奮性の増大に同様の変化が関与しているかは不明であるが、亜鉛欠乏状態がグルタミン酸受容体活性による MTN ニューロン応答特性 (Tanaka et al., 2008) に如何なる影響を及ぼすか、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を含めて今後さらな



る検討が必要と考えられる。

## 結語

本研究より、母獣ラットへの亜鉛欠乏飼料給餌は新生仔ラットの生後体重増加を抑制し、MTNニューロンにおいて静止膜電位の上昇、活動電位、連続発火活動誘発時の基電流の減少、スパイク再分極過程の促進、スパイク周波数の上昇を伴い、血清亜鉛濃度が正常な場合と比較してニューロンの興奮性は増大することが明らかとなった。脱分極あるいは過分極条件下における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伴って活動が亢進したことから、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナリングの増大が修飾の一因となっている可能性が示唆された。また、NPYによるMTNニューロンの神経修飾効果については、AHPに対する修飾変化が一部減弱したものの、NPYに対する薬剤応答性に有意な変化はなく、MTNニューロンは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ことが推察された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御助言を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。本研究の立案から論文作成と、細部にわたり御指導を賜りました、大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）講師 田中晋先生に深甚なる謝意を表します。最後に、本研究の円滑な進行のために御協力、御配慮を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座 顎顔面口腔外科学（口腔外科学第一教室）の教室員諸兄に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- Aggett, P.J., Atherton, D.J., More, J., Davey, J., Delves, H.T., Harries, J.T. (1980): Symptomatic zinc deficiency in a breast-fed, preterm infant. *Arch Dis Child*. 55, 547-550.
- Bordey, A. and Sontheimer, H. (1997): Postnatal development of ionic currents in rat hippocampal astrocytes in situ. *J Neurophysiol*. 78, 461-477.
- Burdette, S.C. and Lippard, S.J. (2003): Meeting of the minds: metalloneurochemistry. *Proc Natl Acad U S A*. 100, 3605-3610.
- Chesters, J.K. and Quarterman, J. (1970): Effects of zinc deficiency on food intake and feeding patterns of rats. *Br J Nutr*. 24, 1061-1069.
- Currie, P.J. and Coscina, D.V. (1995): Dissociated feeding and hypothermic effects of neuropeptide Y in the paraventricular and perifornical hypothalamus. *Peptides*. 16, 599-604.
- Del Negro, C.A. and Chandler, S.H. (1997): Physiological and theoretical analysis of K<sup>+</sup> currents controlling discharge in neonatal rat mesencephalic trigeminal neurons. *J Neurophysiol*. 77, 537-553.
- Dvergsten, C.L., Fosmire, G.J., Ollerich, D.A., Sandstead, H.H. (1983): Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. I . Impaired acquisition of granule cells. *Brain Res*. 271, 217-226.
- Dvergsten, C.L., Fosmire, G.J., Ollerich, D.A., Sandstead, H.H. (1984a): Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. II . Impaired maturation of purkinje cells. *Dev Brain Res*. 16, 11-20.
- Dvergsten, C.L., Johnson, L.A., Sandstead, H.H. (1984b): Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. III . Impaired dendritic differentiation of basket and stellate cells. *Dev Brain Res*. 16, 21-26.
- Geng, Z., Hong, Y., Li, S., Wang, D. (2002): Effect of zinc deficiency on the behavior and calcium status of hippocampal neurons in rats. *Wei Sheng Yan Jin*. 31, 90-92.

- Georgieff, M.K. (2007): Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr.* 85, 614S-620S.
- Goto, T., Komai, M., Suzuki, H., Furukawa, Y. (2001): Long-term zinc deficiency decreases taste sensitivity in rats. *J Nutr.* 131, 305-310.
- Harris, N.C. and Constanti, A. (1995): Mechanism of block by ZD7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 74, 2366-2378.
- Inoue, T., Itoh, S., Kobayashi, M., Kang, Y., Matsuo, R., Wakisaka, S., Morimoto, T. (1999): Serotonergic modulation of the hyperpolarizing spike afterpotential in rat jaw-closing motoneurons by PKA and PKC. *J Neurophysiol.* 82, 626-637.
- Itsumura, N. and Kambe, T. (2014): Transient neonatal zinc deficiency and low milk zinc concentrations caused by mutations of the zinc transporter ZnT2. *Biomed Res Trace Elements.* 25, 1-7.
- Khakh, B.S. and Henderson, G. (1998): Hyperpolarization-activated cationic currents ( $I_h$ ) in neurones of the trigeminal mesencephalic nucleus of the rat. *J Physiol.* 510, 695-704.
- Kida, K., Tsuji, T., Tanaka, S., Kogo, M. (2015): Zinc deficiency with reduced mastication impairs spatial memory in young adult mice. *Physiol Behav.* 152, 231-237.
- Kolta, A., Lund, J.P., Rossignol, S. (1990): Modulation of activity of spindle afferents recorded in trigeminal mesencephalic nucleus of rabbit during fictive mastication. *J Neurophysiol.* 64, 1067-1076.
- Kolta, A., Lund, J.P., Westberg, K.G., Clavelou, P. (1995): Do muscle-spindle afferents act as interneurons during mastication? *Trends Neurosci.* 18, 441.
- Küry, S., Dréno, B., Bézieau, S., Giraudet, S., Kharfi, M., Kamoun, R., Moisan, J.P. (2002): Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nat Genet.* 31, 239-240.

Lee, R.G., Rains, T.M., Tovar-Palacio, C., Beverly, J.L., Shay, N.F. (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.

Luo, P. and Dessem, D. (1995): Morphological evidence for recurrent jaw-muscle spindle afferent feedback within the mesencephalic trigeminal nucleus. *Brain Res.* 710, 260-264.

Maccaferri, G. and McBain, C.J. (1996): The hyperpolarization-activated current ( $I_h$ ) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J Physiol.* 497, 119-130.

Meunier, C. and Borejsza, K. (2005): How membrane properties shape the discharge of motoneurons: a detailed analytical study. *Neural Comput.* 17, 2383-2420.

Morley, J.E., Levine, A.S., Gosnell, B.A., Kneip, J., Grace, M. (1987): Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol.* 252, R599-R609.

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.

Prasad, A.S. (2008): Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Mol Med.* 14, 353-357.

Rains, T.M., Hedrick, S., Randall, A.C., Lee, R.G., Kennedy, K.J., Shay, N.F. (1998): Food intake patterns are altered during long-term zinc deficiency in rats. *Physiol Behav.* 65,473-478.

Rokx, J.T., Jüch, P.J., van Willigen, J.D. (1986): Arrangement and connections of mesencephalic trigeminal neurons in the rat. *Acta anat.* 127, 7-15.

Seki, S., Tanaka, S., Ono, Y., Tsuji, T., Kogo, M. (2015): Neuropeptide Y modulates the spike discharge characteristics in mesencephalic trigeminal neurons. Society of Neuroscience (Abstract). 672.08/C41.

Shigenaga, Y., Doe, K., Suemune, S., Mitsuhiro, Y., Tsuru, K., Otani, K., Shirana, Y., Hosoi, M., Yoshida, A., Kagawa, K. (1989): Physiological and morphological characteristics of periodontal mesencephalic trigeminal neurons in the cat-intra-axonal staining with HRP. *Brain Res.* 505, 91-110.

Stanley, B.G. and Leibowitz, S.F. (1984): Neuropeptide Y: Stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* 35, 2635-2642.

Szerdahelyi, P., Kozma, M., Ferke, A. (1982): Zinc deficiency-induced trace element concentration and localization changes in the central nervous system of albino rat during postnasal development: II. Atomic absorption spectrophotometric examinations. *Acta Histochem.* 70, 173-182.

Takeda, A. (2000): Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Rev.* 34, 137-148.

Takeda, A., Minami, A., Takefuta, S., Tochigi, M., Oku, N. (2001): Zinc homeostasis in the brain of adult rats fed zinc-deficient diet. *J Neurosci Res.* 63, 447-452.

Takeda, A., Yamada, K., Minami, A., Nagano, T., Oku, N. (2005): Enhanced excitability of hippocampal mossy fibers and CA3 neurons under dietary zinc deficiency. *Epilepsy Res.* 63, 77-84.

Takeda, A., Itoh, H., Tamano, H., Oku, N. (2006): Responsiveness to kainate in young rats after 2-week zinc deprivation. *Biometals.* 19, 565-572.

Takeda, A. and Tamano, H. (2009): Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. *Brain Res Rev.* 62, 33-44.

Takeda, A. (2014): Significance of Zn<sup>2+</sup> signaling in cognition: Insight from synaptic Zn<sup>2+</sup> dyshomeostasis. *J Trace Elem Med Biol.* 28, 393-396.

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.

Tanaka, S., Wu, N., Hsaio, C.F., Turman, J.Jr., Chandler, S.H. (2003): Development of inward rectification and control of membrane excitability in mesencephalic V neurons. *J Neurophysiol.* 89, 1288-1298.

Tanaka, S. and Chandler, S.H. (2006): Serotonergic modulation of persistent sodium currents and membrane excitability via cyclic AMP-protein kinase A cascade in mesencephalic V neurons. *J Neurosci Res.* 83, 1362-1372.

Tanaka, S., Yasuda, K., Furusawa, K. (2008): Glutamatergic modulation of slow inward rectification in trigeminal primary sensory neurons. *Matsumoto Shigaku.* 34, 1-12.

Tatemoto, K., Carlquist, M., Mutt, V. (1982): Neuropeptide Y—a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296, 659-660.

Travagli, R.A. and Gillis, R.A. (1994): Hyperpolarization-activated currents,  $I_H$  and  $I_{KIR}$ , in rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 71, 1308-1317.

Ushimura, A., Tsuji, T., Tanaka, S., Kogo, M., Yamamoto, T. (2014): Neuropeptide-Y modulates eating patterns and masticatory muscle activity in rats. *Behav Brain Res.* 278, 520-526.

Wallwork, J.C., Milne, D.B., Sims, R.L., Sandstead, H.H. (1983): Severe zinc deficiency: effects on the distribution of nine elements (potassium, phosphorus, sodium, magnesium, calcium, iron, zinc, copper and manganese) in regions of the rat brain. *J Nutr.* 113, 1895-1905.

Wang, K., Zhou, B., Kuo, Y.M., Zemansky, J., Gitschier, J. (2002): A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet.* 71, 66-73.

Wolak, M.L., DeJoseph, M.R., Cator, A.D., Mokashi, A.S., Brownfield, M.S., Urban, J.H. (2003): Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *J Comp Neurol.* 464, 285-311.

Womble, M.D. and Moises, H.C. (1993): Hyperpolarization-activated currents in neurons of the rat basolateral amygdala. *J neurophysiol.* 70, 2056-2065.



Wu, N., Hsiao, C.F., Chandler, S.H. (2001): Membrane resonance and subthreshold membrane oscillations in mesencephalic V neurons: participants in burst generation. *J Neurosci.* 21, 3729-3739.

Wu, N., Enomoto, A., Tanaka, S., Hsiao, C.F., Nykamp, D.Q., Izhikevich, E., Chandler, S.H. (2005): Persistent sodium currents in mesencephalic V neurons participate in burst generation and control of membrane excitability. *J Neurophysiol.* 93, 2710-2722.

Yamawaki, N., Yamada, M., Kan-no, T., Kojima, T., Kaneko, T., Yonekubo, A. (2005): Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J Trace Elem Med Biol.* 19, 171-181.

Yarom, Y., Sugimori, M., Llinás, R. (1985): Ionic currents and firing patterns of mammalian vagal motoneurons in vitro. *Neuroscience.* 16, 719-737.

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.

A



B



C

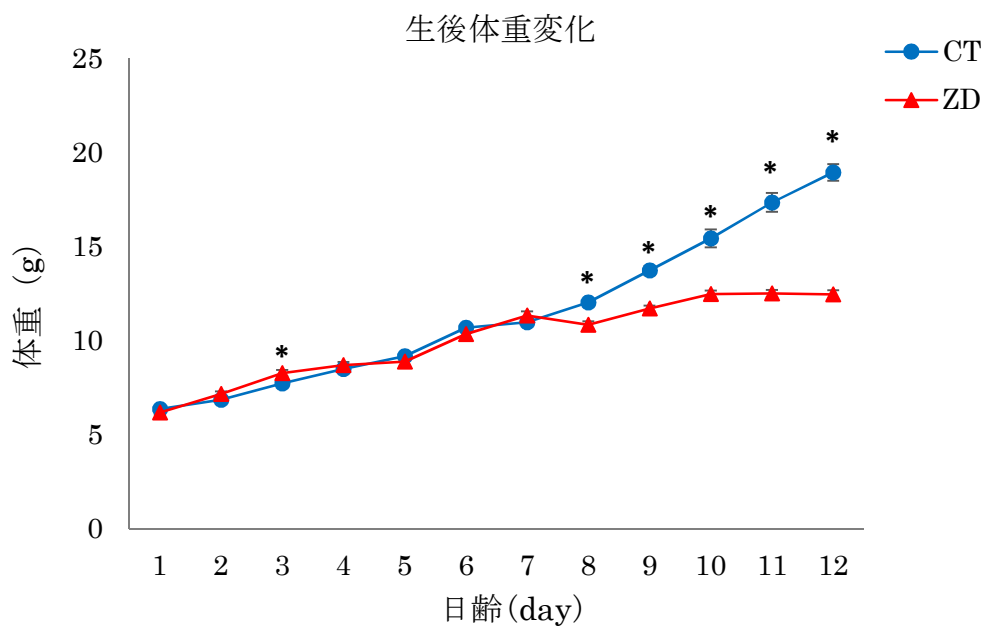


図1. CT群、ZD群の生後体重変化

CT群 (A) 及びZD群 (B) におけるP12の写真を示す。C: P1からP12までの生後体重変化を示す。ZD群はCT群と比較し体重増加は小さくなる傾向を示した (CT群: n=14, ZD群: n=13, \* $p < 0.05$ )。

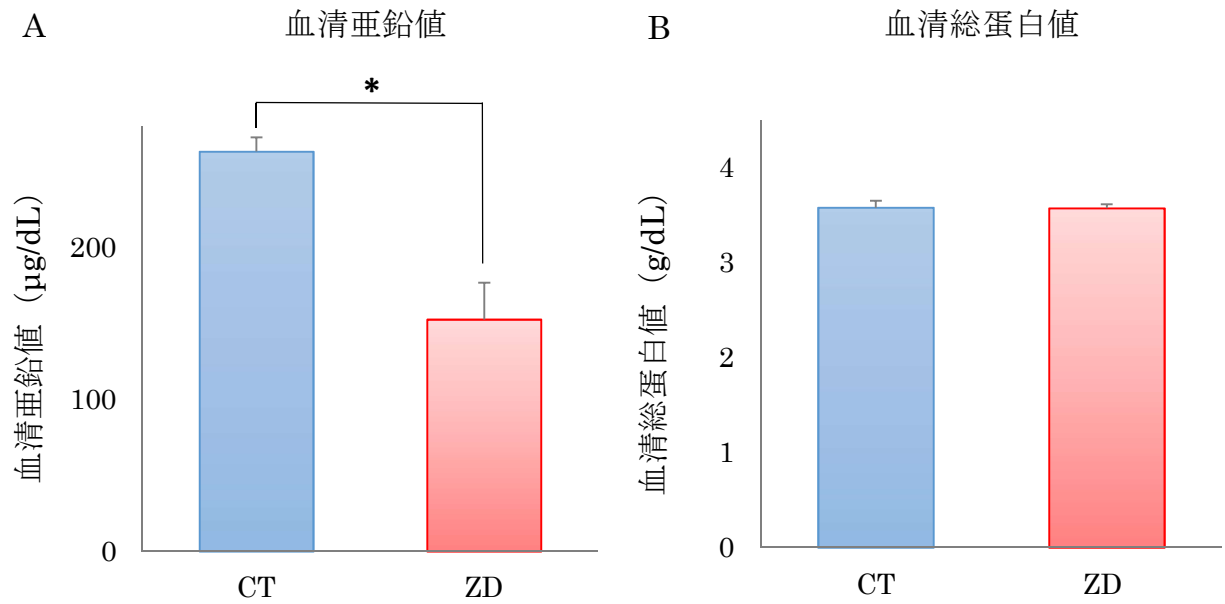


図2. 血清中の亜鉛濃度、総蛋白  
P10のCT群、ZD群の血清亜鉛値 (A) 及び総蛋白値 (B) を示す。血清亜鉛値はCT群と比較して有意に低値であった。総蛋白値は二群間で有意差を認めなかった (CT群: n=9, ZD群: n=7, \* $p<0.05$ )。

表1. MTNニューロン基本膜特性の比較

日齢	n	静止膜電位 $V_{res}$ (mV)	入力抵抗 $R_m$ (M $\Omega$ )	膜容量 $C_m$ (pF)	
P10-12	CT	34	$-58.0 \pm 0.7$	$79.5 \pm 3.8$	$69.5 \pm 6.0$
	ZD	33	$-56.4 \pm 0.6$	$80.0 \pm 5.1$	$59.6 \pm 3.3$
.....					
P15-17	CT	21	$-57.4 \pm 0.7$	$74.6 \pm 4.6$	$76.2 \pm 8.3$
	ZD	38	$-55.8 \pm 0.6$	$77.2 \pm 4.3$	$75.4 \pm 6.2$

ZD群ではCT群と比較して日齢の若いP10-12群では $C_m$ 値は小さく、 $V_{res}$ は脱分極する傾向を示したが二群間に有意差は認めなかった。 $R_m$ 値は両日齢群ともに有意差は認めなかった。

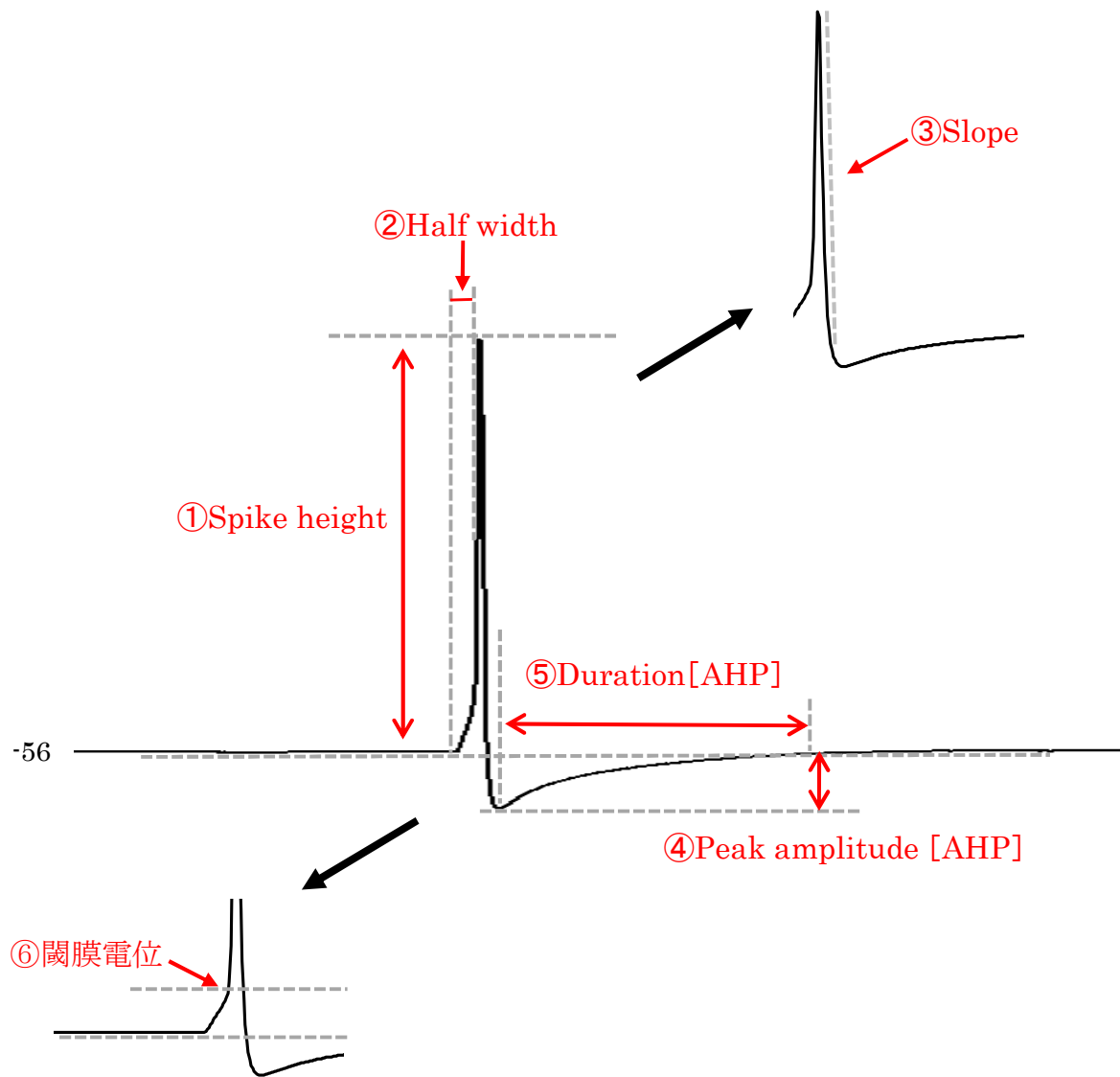


図3. Action potential (AP) 特性の解析

APにおけるパラメータを示す。

- ①: スパイクの高さ (Spike height, mV)
- ②: ①の50%を示す位置の時間幅 (Half width, ms)
- ③: スパイクの減衰における最大の傾き (Slope, mV/ms)
- ④: 後過分極 (AHP) のピーク値 (Peak amplitude, mV)
- ⑤: ④の時間幅 (Duration, ms)
- ⑥: 閾膜電位 (mV)

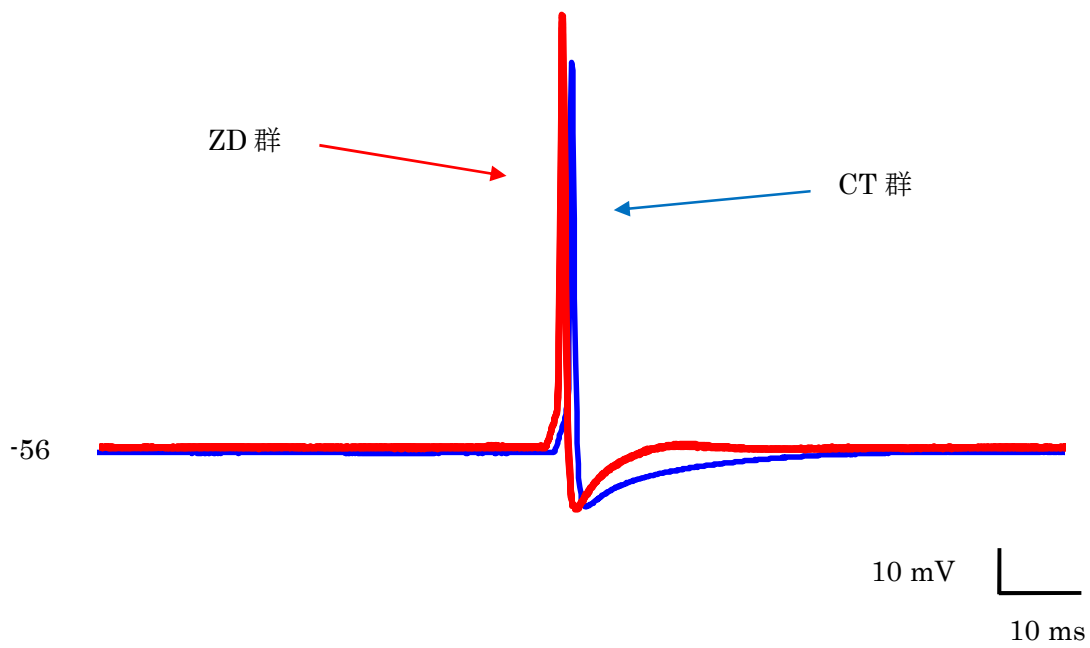


図4. CT群、ZD群におけるMTNニューロンの典型的なAP波形  
P13のCT群、P17のZD群で誘発されたAPの波形を示す。

表2. AP特性の比較

	CT	ZD
閾膜電位 (mV)	-44.1±0.9	-45.0±0.8
基電流 (pA)	252.4±13.1	206.5±14.5*
AP		
Spike height (mV)	92.5±1.7	94.4±1.4
Half width (ms)	0.62±0.03	0.57±0.03
Slope (mV/ms)	-181.1±11.8	-209.4±12.3
AHP		
Peak amplitude (mV)	-11.9±0.2	-13.2±0.4 *
Duration (ms)	30.3±3.4	25.9±2.7

ZD群ではCT群と比較して閾膜電位に明らかな差は認めず、基電流値は有意に減少した (CT群: n=21, ZD群: n=23, \*p<0.05)。また、Spike height, slopeは増大、Half widthは短縮する傾向を示したが、有意差は認めなかった。AHPに関しては、Peak amplitudeが有意に増大し、Durationは短縮傾向を認め、spike再分極過程の促進傾向が観察された (CT群: n=10, ZD群: n=10, \*p<0.05)。

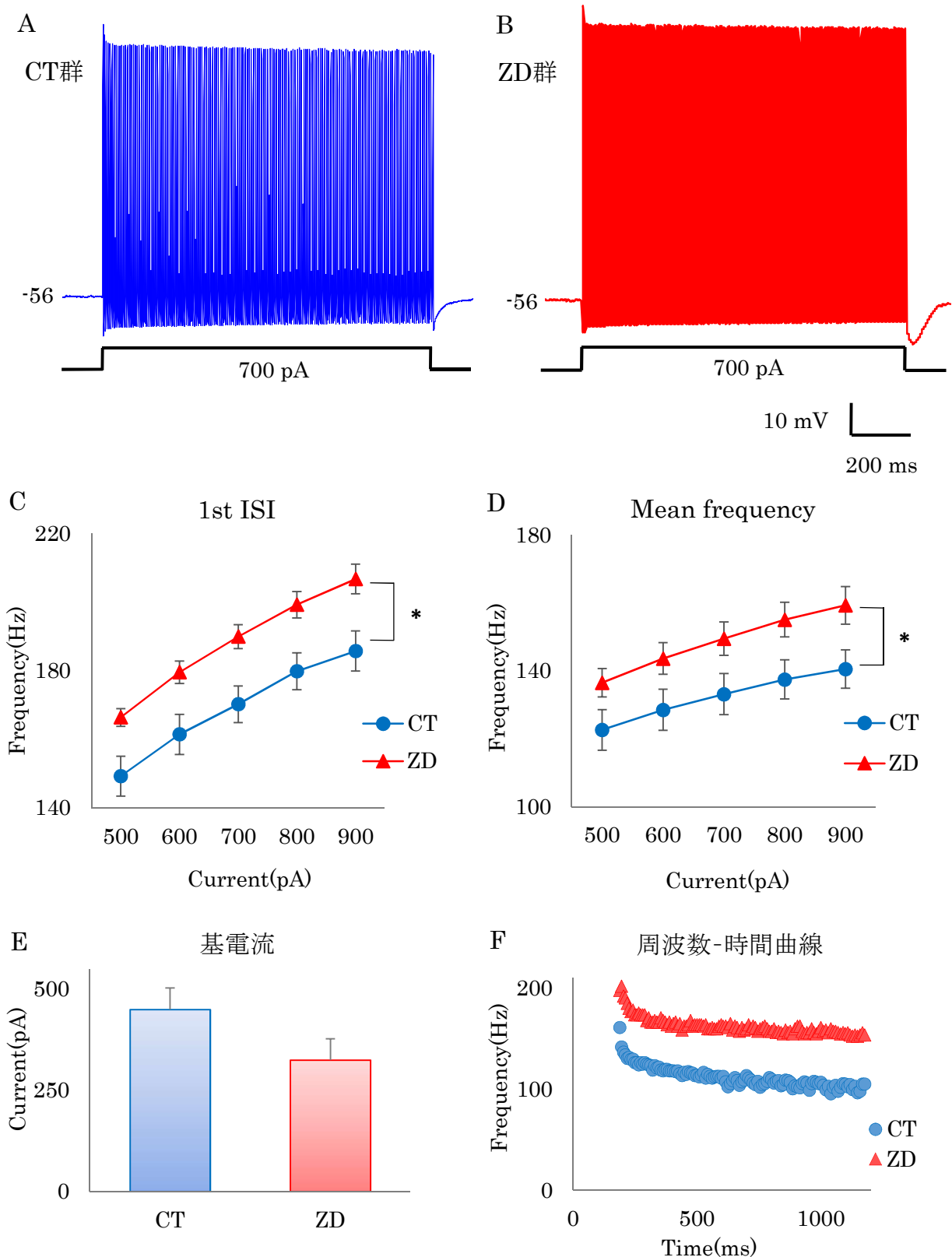


図5. Spike train (ST) 特性の比較

A,B: MTNニューロンにおいて1sの矩形波脱分極刺激により誘発された連続発火活動 (ST) を示す (A: CT群 (P15)、B: ZD群 (P17))。C,D: 周波数-電流曲線を示す。ZD群はCT群と比較し、1st ISI (C)、Mean frequency (D) とともに有意に上昇した (\* $p < 0.05$ )。E: ST誘発に必要な基電流値はZD群において減少する傾向を認めた (CT群:  $n=8$ , ZD群:  $n=8$ )。F: 周波数-時間曲線を示す。



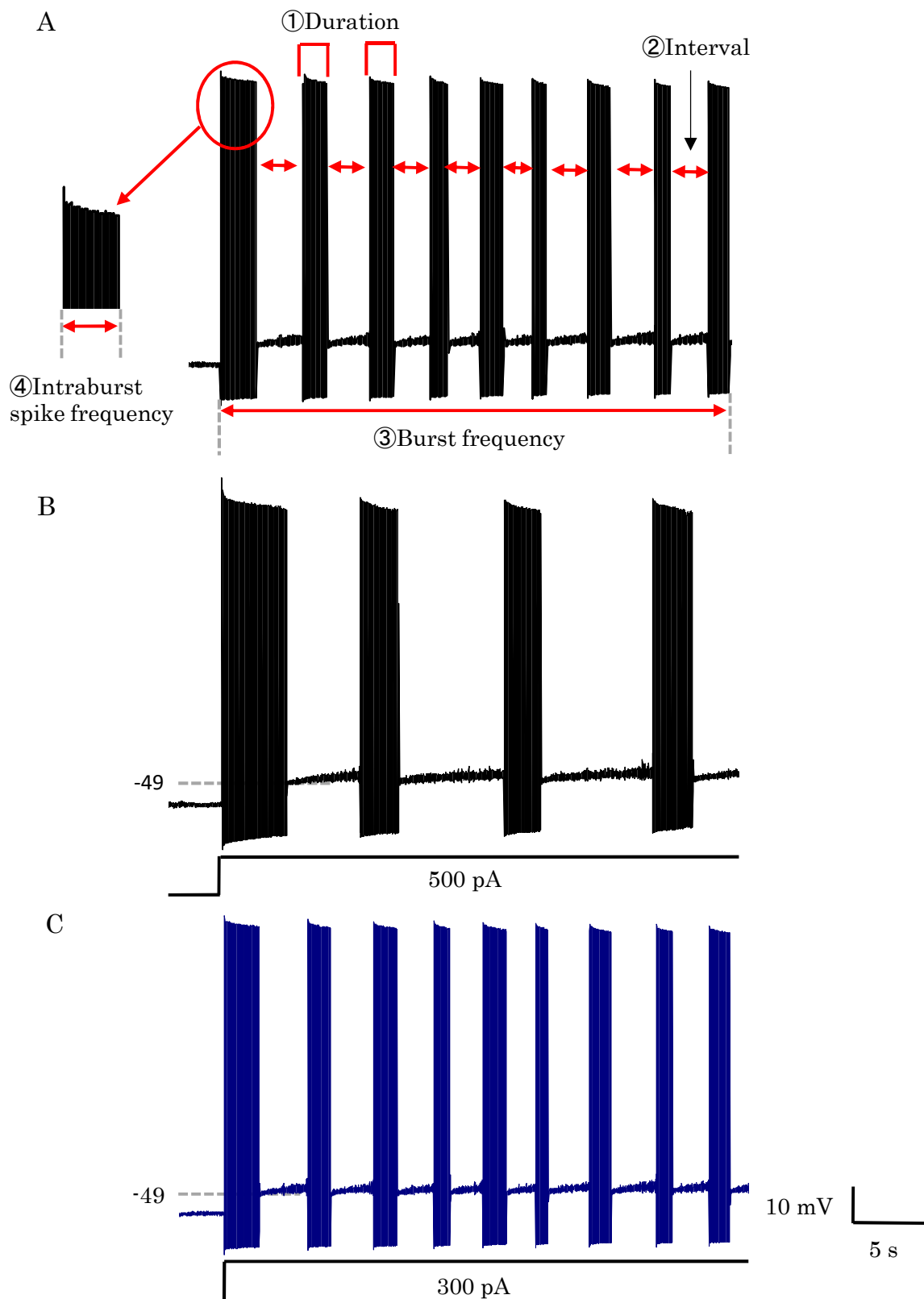


図6. BA特性の比較

A: BA計測項目を示す。①: バースト持続時間 (Duration) ②: バースト間インターバル (Interval) ③: バースト周波数 (Burst frequency) ④: バースト内スパイク周波数 (Intraburst spike frequency) B: CT群のMTNニューロンにおいて誘発したBAを示す。C: ZD群のMTNニューロンにおいて誘発したBAを示す。

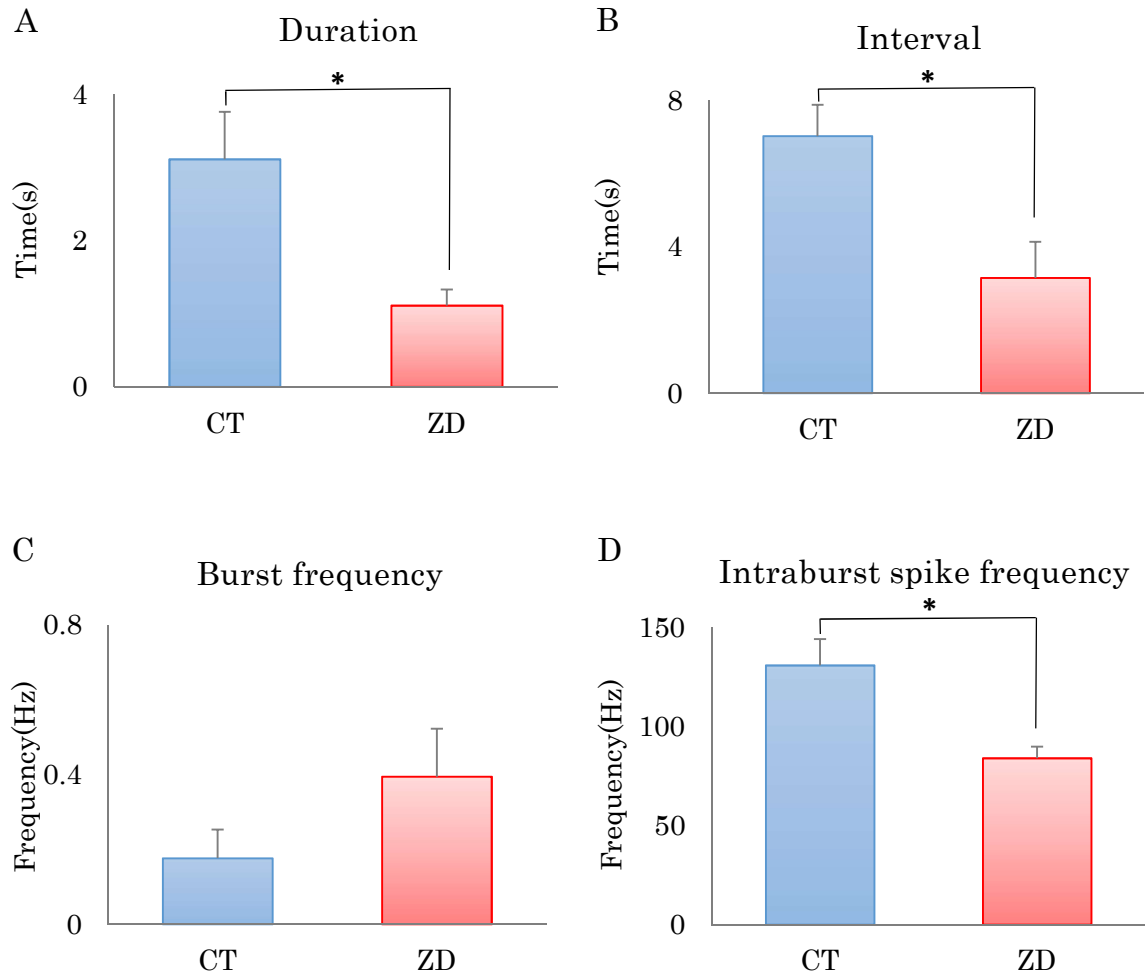


図7. MTNニューロンのBAにおけるCT, ZD群間の比較  
 CT群及びZD群におけるBAの各パラメータの平均値を示す。  
 ZD群においてバースト周波数 (C) は上昇する傾向を認め、バースト持続時間 (A)、バースト間インターバル (B)、バースト内スパイク周波数 (D) は有意に減少した (CT群: n=3, ZD群: n=6, \*p<0.05)。

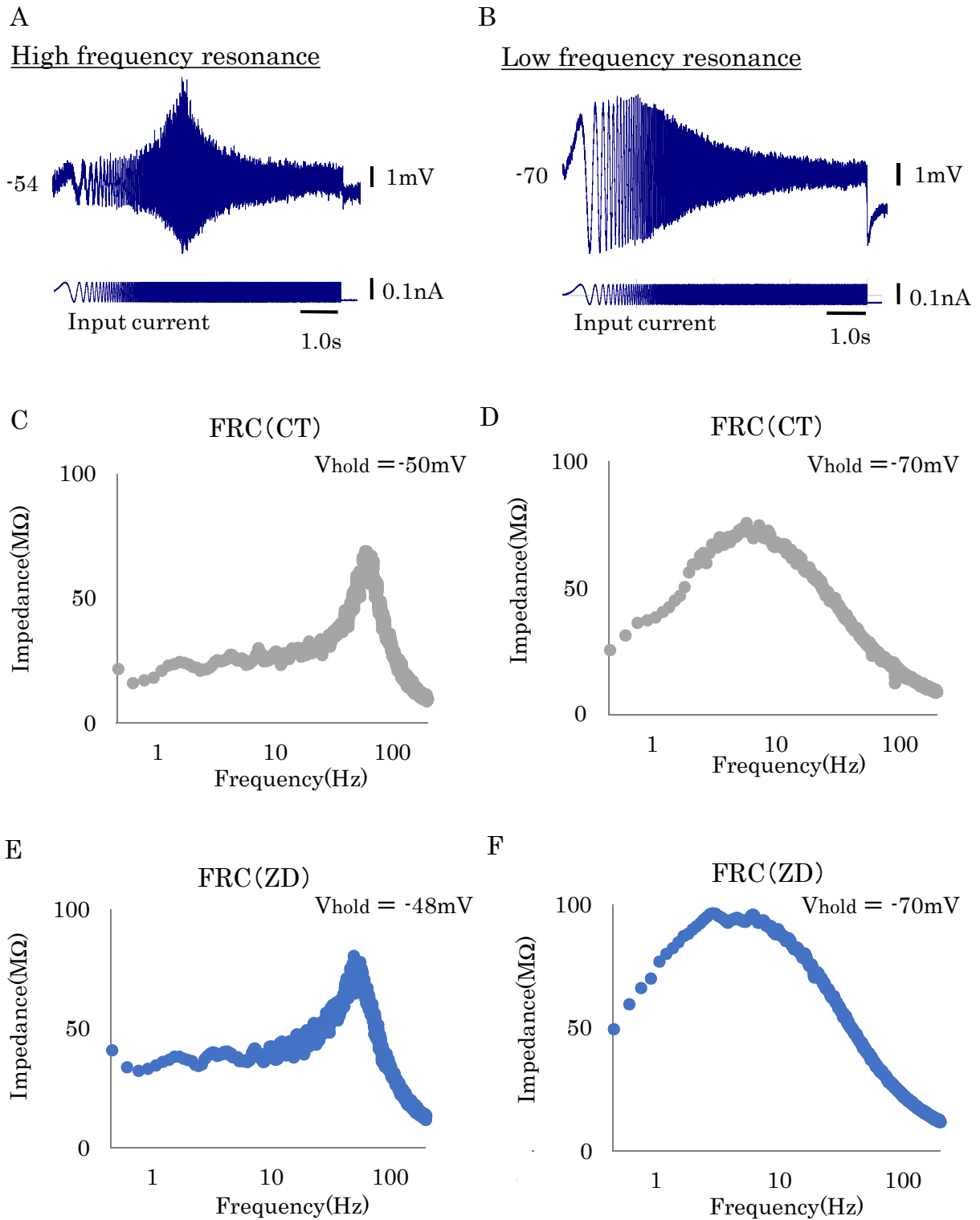


図8. MTNニューロンのMembrane resonanceにおけるCT, ZD群間の比較

A: P14のZD群における脱分極条件下で観察される典型的なHigh frequency resonanceの波形を示す。 B: ZD群における過分極条件下で観察される典型的なLow frequency resonanceの波形を示す。 C,D: CT群におけるFrequency-response curve (FRC)を示す (C: 脱分極条件、D: 過分極条件)。 E,F: ZD群におけるFRCを示す (C: 脱分極条件、D: 過分極条件)。

表3. MTNニューロンの脱分極条件下でのMembrane resonanceにおけるCT, ZD群間の比較

	n	Peak Impedance(M $\Omega$ )	Q value	Fres(Hz)
CT	8	69.0 $\pm$ 5.2	2.6 $\pm$ 0.3	52.1 $\pm$ 3.1
ZD	8	74.0 $\pm$ 8.0	2.6 $\pm$ 0.6	48.0 $\pm$ 4.9

脱分極条件下で観察されるHigh frequency resonanceについて、FresはZD群で減少傾向を示したものの有意差はなく、Q-valueについても差を認めなかった。

表4. MTNニューロンの過分極条件下でのMembrane resonanceにおけるCT, ZD群間の比較

	n	Peak Impedance(M $\Omega$ )	Q value	Fres(Hz)
CT	8	63.4 $\pm$ 8.1	2.0 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.6
ZD	8	74.8 $\pm$ 7.8	2.0 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.7

過分極条件下で観察されるLow frequency resonanceについても、Peak impedanceはZD群において高値となる傾向を示したが、Fres, Q-valueについてはCT, ZD群間で差を認めなかった。

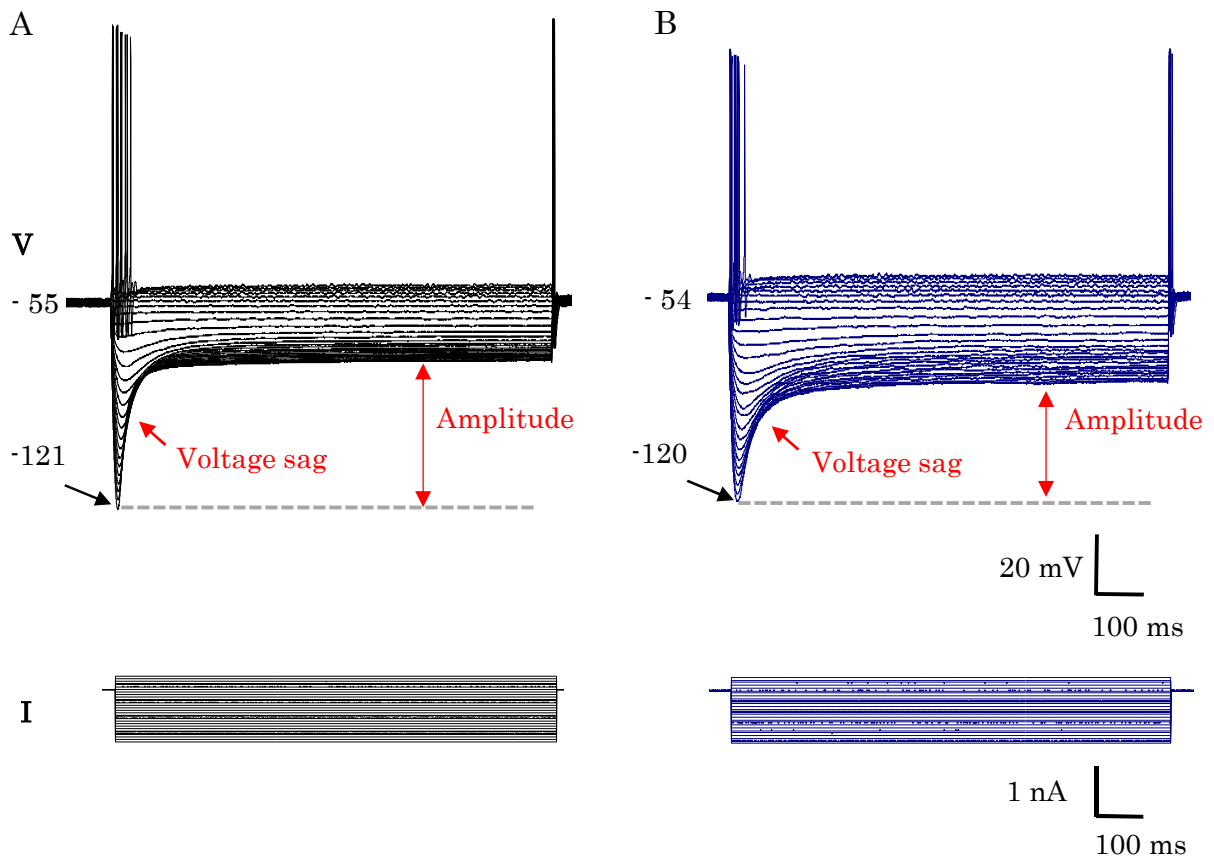


図9. Voltage sagの比較

A,B: c-clamp条件下で1 sの矩形波過分極刺激を細胞内通電して誘発されるVoltage sagについて示す(A: CT群 (P10)、B: ZD群 (P12))。CT群と比較してZD群ではVoltage sagはピークからの経過が遅延する傾向を認めた。C: CT群と比較してZD群ではVoltage sagの振幅は有意に減少した (CT群: n=11, ZD群: n=6, \*p<0.05)。

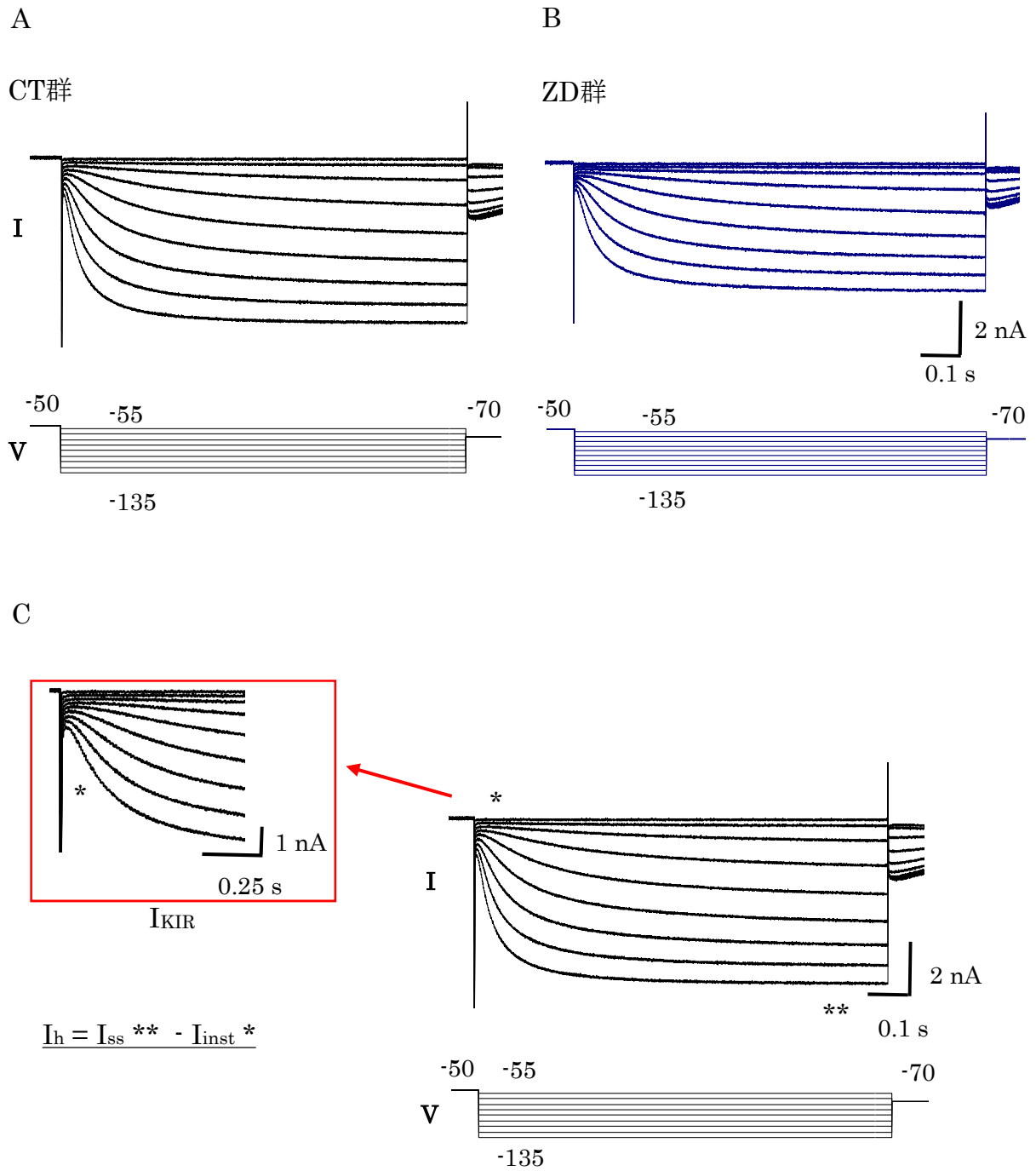


図10. MTNニューロンの矩形波過分極刺激による内向き電流

A,B: modified-ACSF灌流下にて、-50 mVに電位固定した状態で-55 mV~-135 mVの間で電位を変化させた際に観察されるP13のCT群、ZD群における内向き電流の典型的な波形を示す(1 s)。 C:  $I_{KIR}$ 及び $I_h$ を示す。

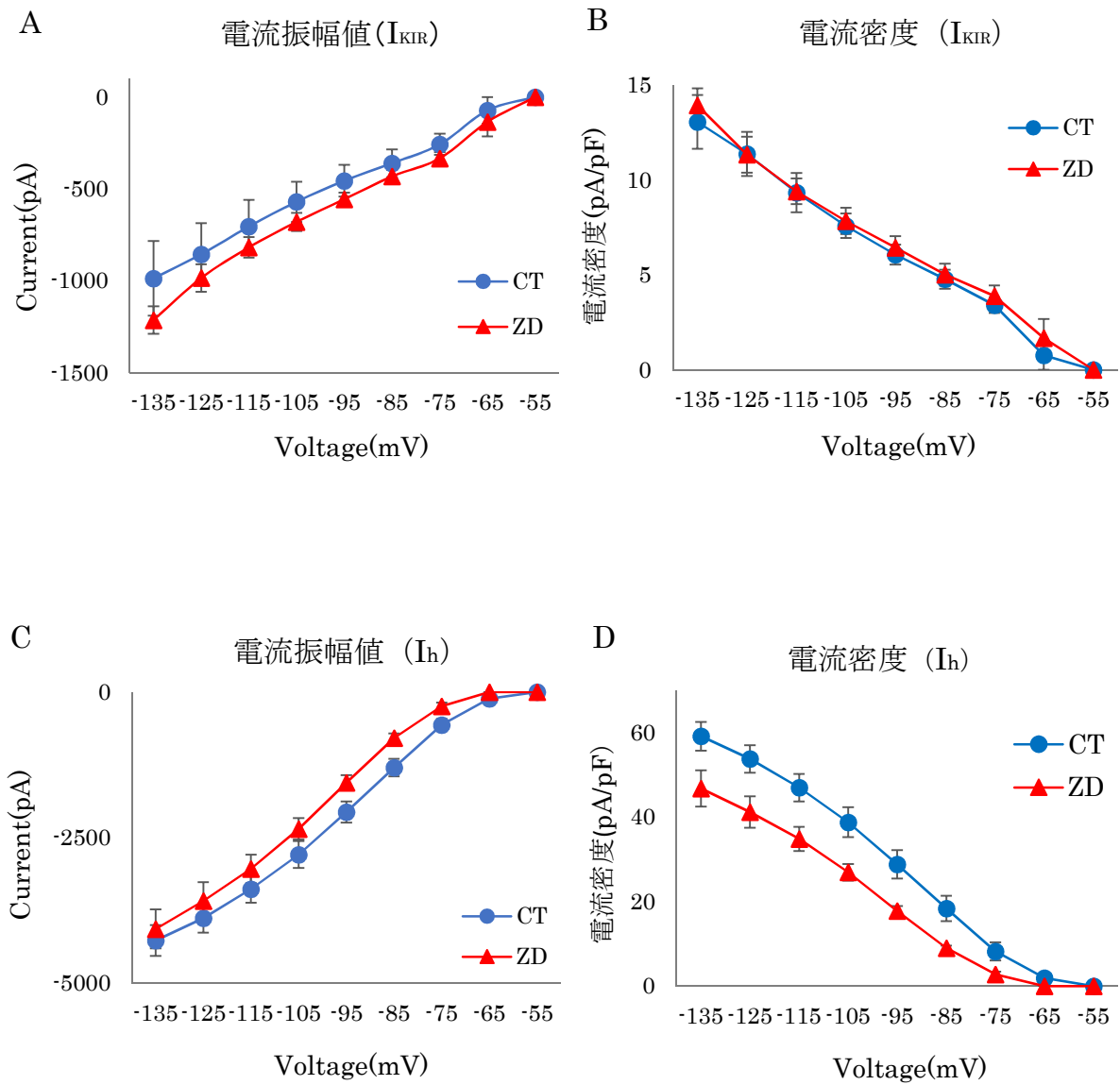
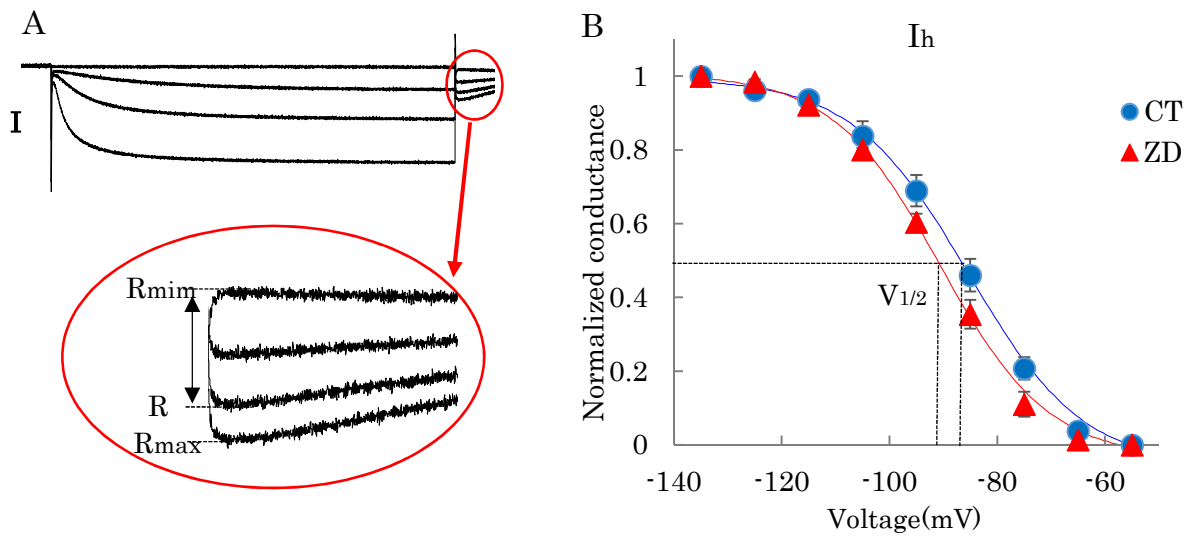


図11. MTNニューロンの $I_{KIR}$ ,  $I_h$ 特性の比較

A,B:  $I_{KIR}$ で電流振幅値および単位膜容量あたりに流れる電流の強さ（電流密度）は二群間で差を認めなかった（CT群:  $n=4$ , ZD群:  $n=4$ ）。

C,D: 遅発性電流成分であるh-current ( $I_h$ )は、ZD群において電流密度は減少する傾向を認めた。



$$R_{norm} = (R - R_{min}) / (R_{max} - R_{min})$$

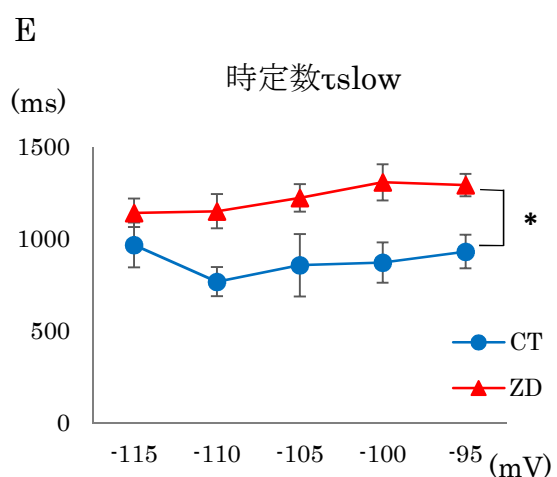
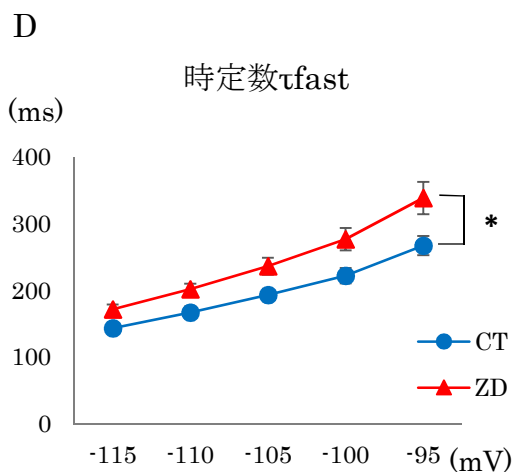
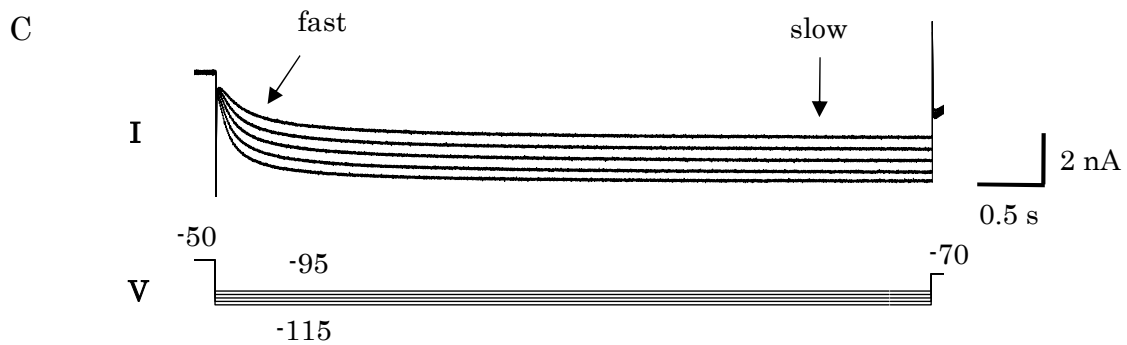


図12. MTNニューロンの $I_h$ 活動特性の比較

A:  $I_h$ 誘発後に流れるTail currentの波形を示す。 B: Tail currentの最大電流値を基準として正規化し、ボルツマン関数を用いて求めたチャネルのゲート特性を表す活動曲線を示す。CT群と比較してZD群では、コンダクタンス50%活性値を示す電位( $V_{1/2}$ 。CT群:  $-85.9 \pm 1.6$  mV, ZD群:  $-90.1 \pm 1.5$  mV,  $p=0.10$ )の左方偏位がみられた (CT群:  $n=4$ , ZD群:  $n=4$ )。 C: -50 mVに電位固定した状態で-95 mV~-115 mVの間で電位を変化させた際に観察されるP13における内向き電流の典型的な波形を示す (5 s)。 D,E: 活動時定数はfast, slow成分ともにZD群で延長した (CT群:  $n=4$ , ZD群:  $n=4$ ,  $*p<0.05$ )。



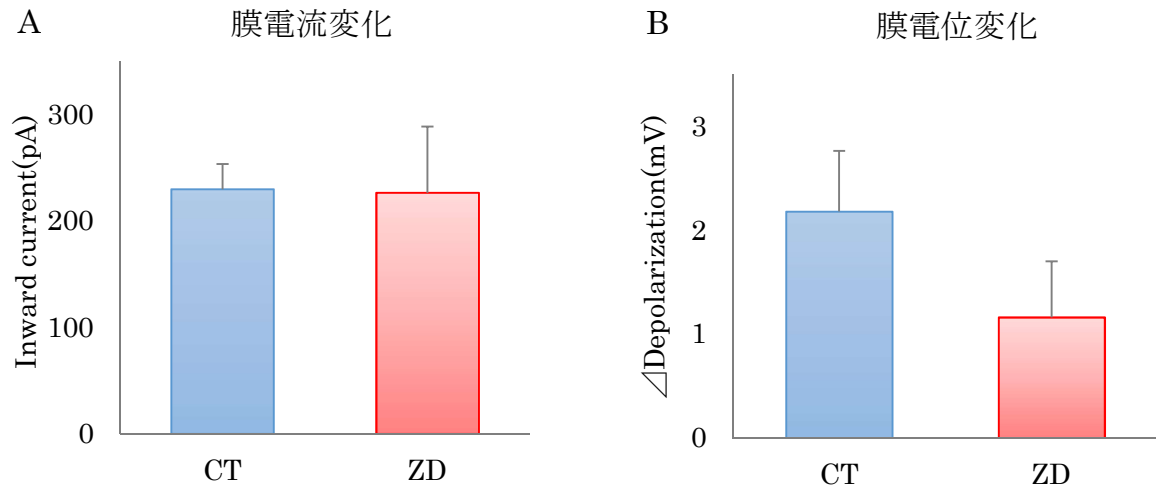


図13. NPY投与によるMTNニューロンの膜電流、膜電位変化  
 A: CT群 (n=4) とZD群 (n=3) において膜電流変化に有意差を認めなかった。  
 B: CT群 (n=10) とZD群 (n=10) において膜電位変化に有意差を認めなかった。

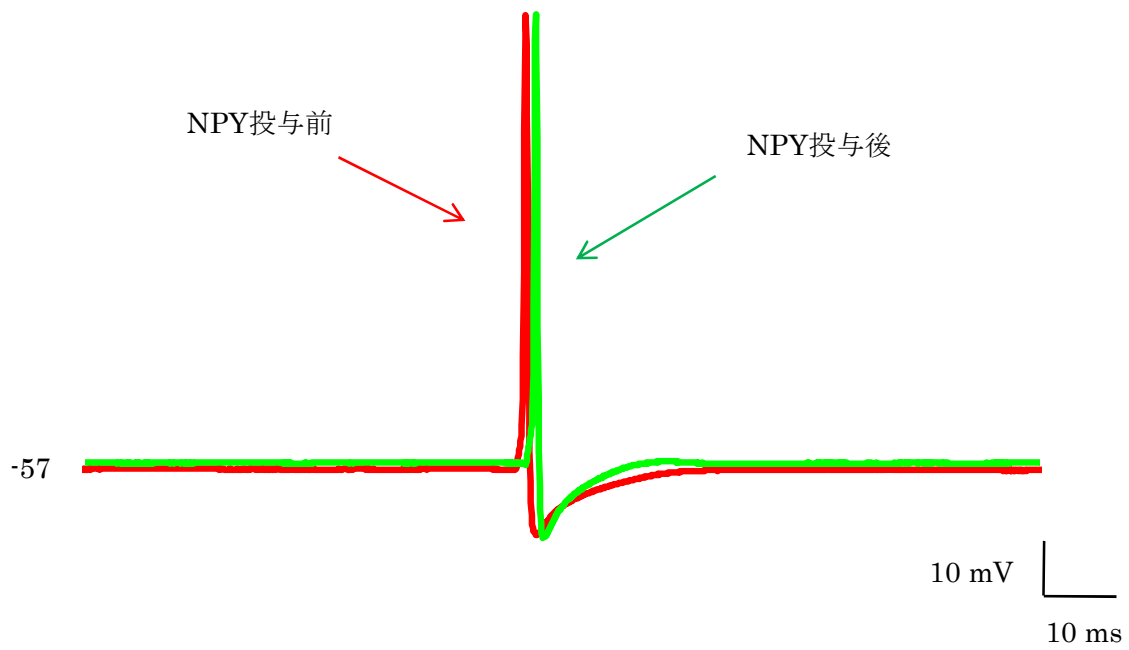


図14. ZD群におけるNPY投与前後でのMTNニューロンの典型的なAP波形  
 P17のZD群MTNニューロンより誘発された、NPY投与前後でのAP波形を示す。

表5. NPY投与によるMTNニューロンのAP特性の修飾作用

	NPY投与前	NPY投与後
AP		
Spike height (mV)	94.4±1.4	95.2±1.7
Half width (ms)	0.57±0.03	0.53±0.02*
Slope (mV/ms)	-209.4±12.3	-222.8±11.7*
AHP		
Peak amplitude (mV)	-13.2±0.4	-13.7±0.5
Duration (ms)	25.9±2.7	19.6±1.8*

ZD群においてNPY投与後、有意なHalf widthの短縮、Slopeの増大、AHP持続時間の短縮を認めた (n=10, \*p<0.05)。

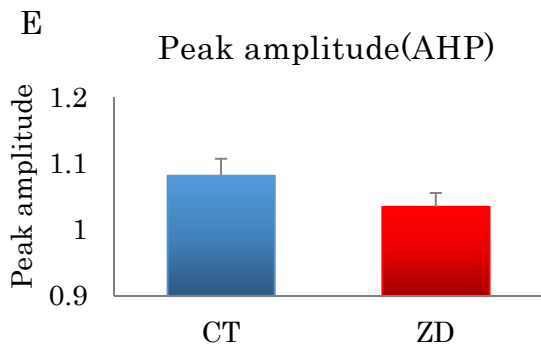
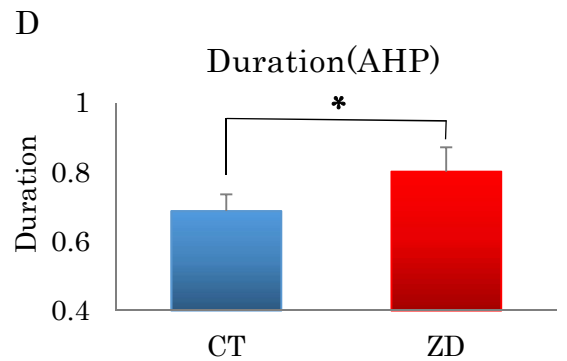
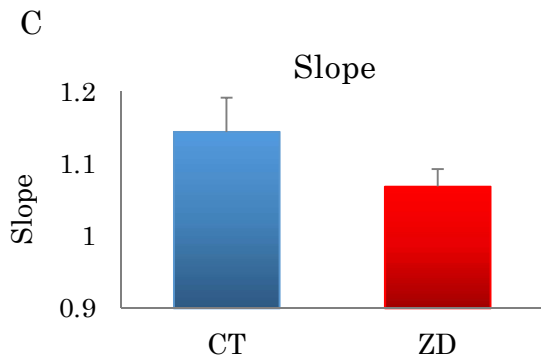
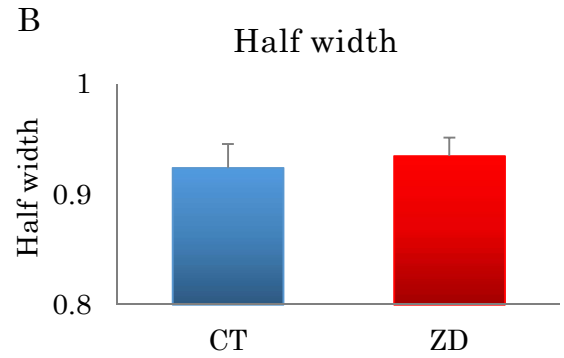
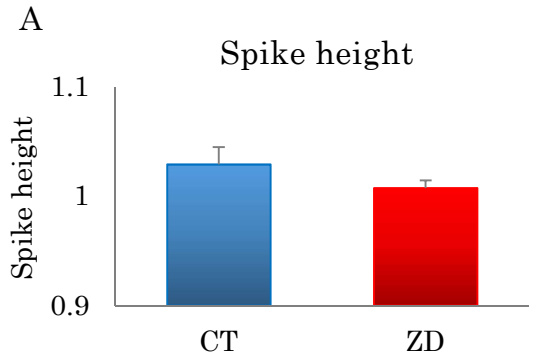


図15. NPYによるAP特性の変化 (CT群との比較)

CT群、ZD群それぞれのNPY投与前の各パラメータ値を1とした場合のNPY投与後の変化率をグラフに示す。AHP持続時間短縮に関してはZD群で変化率が有意に小さくなる傾向を示した (D)。他の項目は同様の修飾変化率を示した (CT群: n=10, ZD群: n=10, \*p<0.05)。

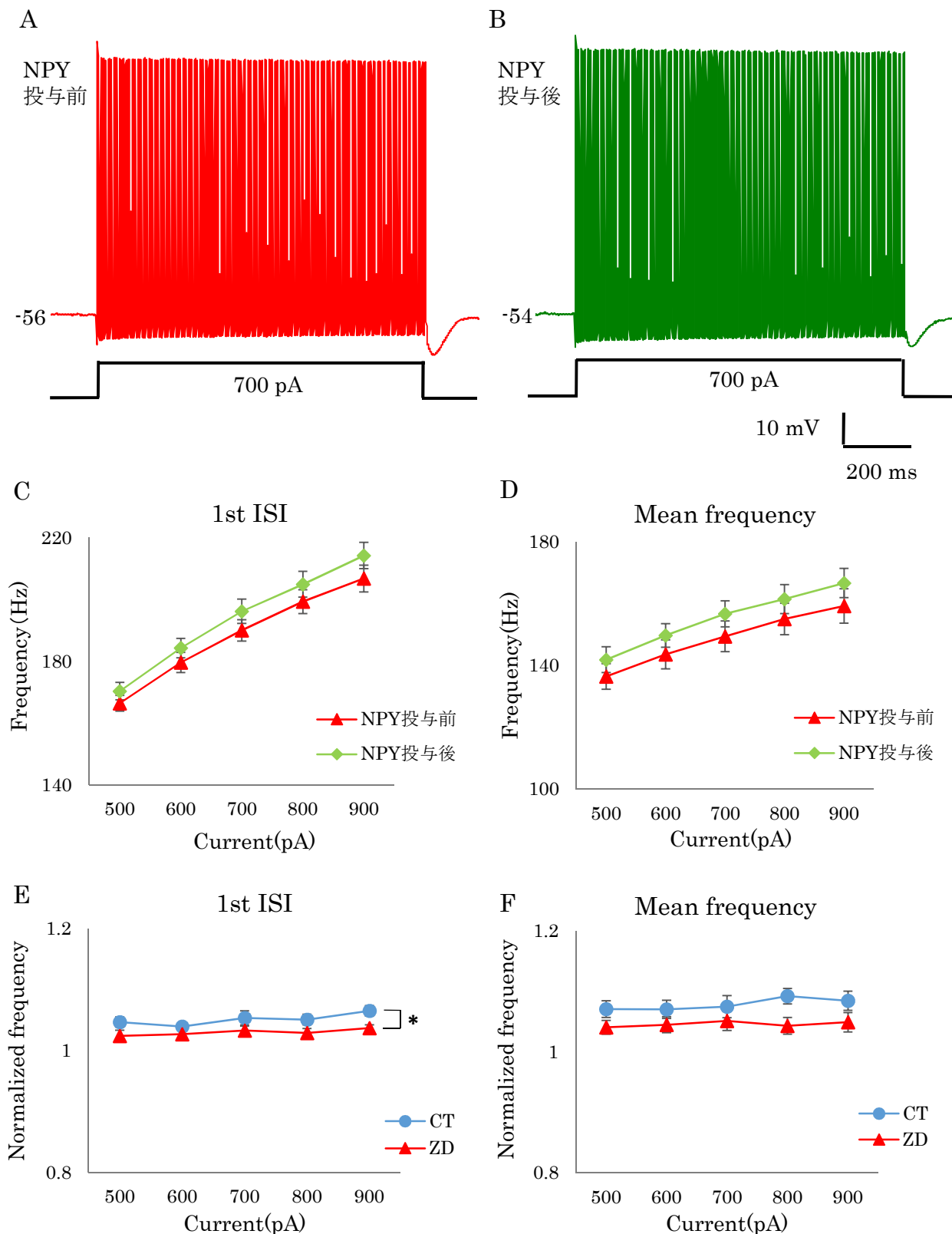


図16. NPYによるST特性の変化

A,B: P17のZD群MTNニューロンにおいて1 sの矩形波脱分極刺激により誘発されたNPY投与前後のST波形を示す (A: NPY投与前、B: NPY投与後)。C-F: NPY投与後、1st ISIの変化率は小さくなる傾向を認めたが、1st ISI, Mean frequencyともに上昇傾向を認めた (CT群: n=8, ZD群: n=8, \*p<0.05)。