

# P I X E 分析法および機器中性子放射化分析法による マウス肝臓中および血清・血漿中の微量元素の定量 ( )

矢永誠人 川本有美 梶田良行 小木貴憲 大山拓也

野口基子<sup>\*1</sup> 菅沼英夫 二ツ川章二<sup>\*2</sup> 世良耕一郎<sup>\*3</sup>

静岡大学理学部放射化学研究施設  
422-8529 静岡市大谷 836

<sup>\*1</sup> 静岡大学理学部生物地球環境科学科  
422-8529 静岡市大谷 836

<sup>\*2</sup> (社)日本アイソトープ協会仁科記サイクロトロンセンター  
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

<sup>\*3</sup> 岩手医科大学サイクロトロンセンター  
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

## 1 はじめに

必須微量元素の1つである亜鉛は、生体内において多くのタンパク質と結合して亜鉛酵素という形で様々な酵素反応に関わっている。この亜鉛が欠乏すると、味覚・嗅覚障害、成長障害、脱毛、皮膚障害、性腺機能低下、免疫機能低下などの様々な亜鉛欠乏症状が現れてくることが知られている。近年の日本の食生活においては、インスタント食品やスナック菓子等に頼るといふ、特に若い世代に多く見られる日常的な偏食に起因する亜鉛の摂取不足や作物中のミネラル不足による亜鉛の摂取不足、あるいは、食品添加物による亜鉛の吸収阻害等が原因となり、慢性的な亜鉛摂取不足状態にあるといわれている。実際、女子学生などにおける味覚障害の報告例も増えてきている。

これまで、我々は、亜鉛欠乏餌および対照餌を用いてマウスを飼育することにより、亜鉛欠乏モデルマウスおよび対照マウスを得、これらマウスの臓器・組織中の微量元素濃度の定量を行い、比較・検討してきた。しかしながら、これまで用いてきた飼料中の亜鉛濃度は、対照餌中の亜鉛濃度が 30  $\mu\text{g/g}$  であるのに対して、亜鉛欠乏餌中のその濃度は 1  $\mu\text{g/g}$  未満と極度に低く、我々の実際の食生活においてここまでの極端な亜鉛摂取不足は考えにくい。そこで我々は昨年より、日本の食生活、特に若い世代の食生活の現状を鑑み、これまで用いてきた2種類の餌に加え、亜鉛濃度が 3  $\mu\text{g/g}$  および 7  $\mu\text{g/g}$  の餌を用いる

ことにより、亜鉛濃度が異なる 4 種類の餌によってマウスを飼育し、食餌中の亜鉛濃度とマウス体内の亜鉛および他の微量元素濃度の関係について調べ、軽度の亜鉛欠乏がそれらに与える影響について検討を行なっている。

## 2 実験

### 2.1 供試動物

日本クレア(株)より購入した I C R 系マウス(オス、7 週齢)を通常餌(日本クレア実験動物用飼料, C E - 2)による 1 週間の予備飼育を行い、その後 4 群にわけ、実験に供した。すなわち、同社より購入した亜鉛欠乏餌およびミリポア水、亜鉛濃度 3  $\mu\text{g/g}$  飼料およびミリポア水、亜鉛濃度 7  $\mu\text{g/g}$  飼料およびミリポア水、または対照餌およびミリポア水を与え、それぞれ 1、3 および 6 週間の飼育を行った。なお、予備飼育を含めた飼育期間中は、各ケージの中にステンレス製ネットを二重に敷き、いずれの場合も飼料および水以外の敷き藁あるいは排泄物等を摂取できない条件とした。

### 2.2 分析試料

上記の各マウスをエーテル麻酔下で心臓より採血した後、肝臓、腎臓、すい臓、精巣、骨の各臓器・組織を摘出した。摘出した各臓器・組織は凍結乾燥を行い、分析試料とした。また、血液に関しては、血漿を分離し、一部について生化学的検査を行った後、P I X E 分析を行った。

### 2.3 P I X E 分析

血漿成分のみを分析対象とし、それぞれ、内部標準を加えることなくその数  $\mu\text{l}$  をバックリング膜(ポリプロピレン膜)上に滴下し、ターゲットとした。

### 2.4 機器中性子放射化分析 ( I N A A )

肝臓、骨および他の摘出した臓器・組織について I N A A を行った。各組織について 20 ~ 130 mg を精秤し、ポリエチレン袋に二重に封入したものを照射・分析用試料とした。標準試料には、NIST SRM 1577b Bovine Liver の一定量を同様に二重封入したものをを用いた。熱中性子の照射は、日本原子力研究所 JRR-3 または JRR-4 にて行った。短寿命核種による定量(Na, Mg, Cl, K, Ca, Mn, Cu)では、JRR-3 放射化分析用照射設備 PN-3(熱中性子束  $1.9 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )あるいは JRR-4 気送管(熱中性子束  $4.0 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )にて 10 秒間の照射を行い、照射後直ちに、あるいは 1 ~ 3 時間後に高純度 Ge 半導体検出器を用いて 線測定を行った。長寿命核種による定量(Fe, Co, Zn, Se, Rb)では、JRR-3 気送照射設備 PN-1(熱中性子束  $6.0 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )または JRR-4 水力照射設備 T-パイプ(熱中性子束  $6.0 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )にて 20 分間の熱中性子の照射を行い、照射後、10 ~ 60 日間の冷却の後、高純度 Ge 半導体検出器を用いて 線測定を行った。

### 2.5 生化学的分析

一部のマウスについては、血漿中の微量元素の P I X E 分析を行うにあたり、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、 $\gamma$ -グルタミントランスペプチターゼ( $\gamma$ -GTP)、クレアチニン、総タンパク、乳酸脱水素酵素(LDH)、アルカリフォスファターゼ(ALP)等について、動物用生化学自動分析装置「富士ドライケム 3500V」((株)富士フイルム)により分析を行った。

## 3 結果および考察

### 3.1 PIXE分析によるマウス血漿中の微量元素の定量結果

PIXE分析を行った結果、血漿中のNa、Mg、P、S、Cl、K、Ca、Fe、Cu、Zn、Se、Brの12元素について定量を行うことができたが、いずれの週齢のマウスにおいても、各群の間では、亜鉛についての有意な差を認めることができた。その亜鉛濃度の変化を図1に示した。この図に見られるように、亜鉛欠乏マウスでは、飼育1週間で急激に亜鉛濃度が低下し、その後は、ほぼ一定の値を示しているようであった。3  $\mu\text{g/g}$  群マウスの血漿中亜鉛濃度は、飼育開始3週間まではゆるやかに減少していたが、その後はさらにその濃度が低下することはなく、ほぼ一定となった。これに対して、7  $\mu\text{g/g}$  群マウスの血漿中亜鉛濃度は、対照群マウスのそれよりも低下しているようにも見えるが、標準偏差を考慮にいと、両者の間には有意な差はなく、また、6週間の飼育期間を通してほぼ一定の濃度を保っているようである。これら4群のマウスの間には、体重等の外見的な所見では、何らの食餌中の影響は認められていなかったが、血漿中の亜鉛濃度の変化を見る限りにおいては、食餌中の亜鉛濃度が7  $\mu\text{g/g}$  あたりに軽度の亜鉛欠乏の影響が現れるラインがあることを示唆しているのではないかと考えられる。

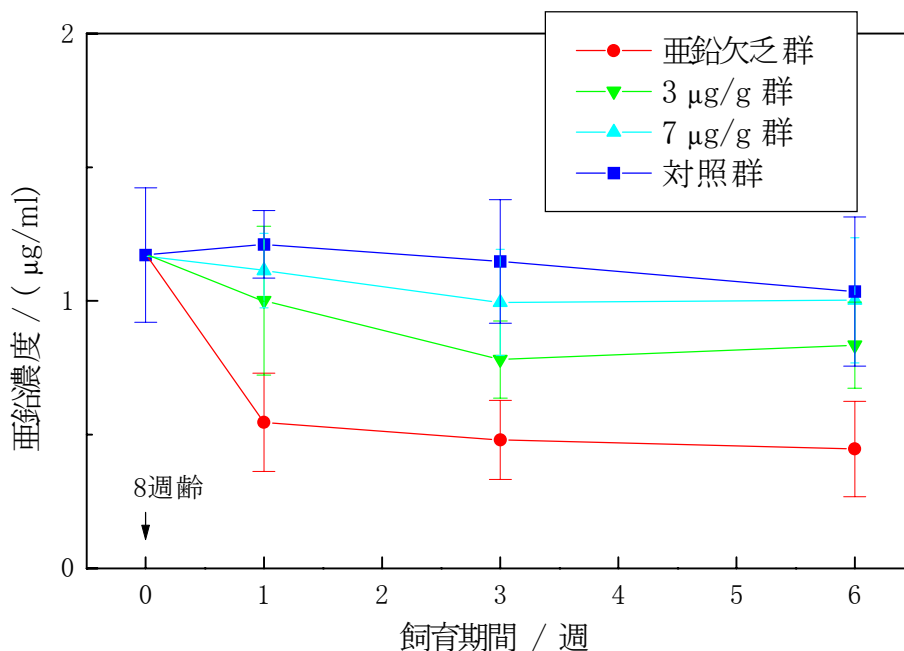


図1 血漿中亜鉛濃度の変化

### 3.2 生化学的分析の結果

各マウスについて行った血液生化学的検査の結果のうち、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の変化を図2に示した。各群とも週齢が進むに従ってALP活性が低下する傾向が見られるが、この傾向は、以前、3週齢あるいは4週齢から一定期間の飼育を行ったマウスの場合にも見られた傾向であり、成長するにつれてALP活性が低下していくことは一般的な傾向のようである。

ALPは亜鉛を含む酵素タンパク質であるが、血漿中の亜鉛のうち、ALPに結合している亜鉛はその一部である。亜鉛欠乏群のALP活性は、血漿中の亜鉛濃度と同様に他の群のマウスと比較して飼育開始1週間で有意に低下し、その後も活性は低下し続けていた。これに対して、血漿中の亜鉛濃度については飼育開始1週間で対照群と比較して有意に低下していた3  $\mu\text{g/g}$  群マウスでは、飼育開始1週間後の段階では、ALP活性については対照群や7  $\mu\text{g/g}$  群マウスのそれと変わらず、3週間経過した後になって有意な低下を認めることができた。しかしながら、3  $\mu\text{g/g}$  群マウスのALP活性は、飼育6週間後には対照群マウスや7  $\mu\text{g/g}$  群マウスの値と同様になっていた。このことは、食餌中の亜鉛濃度

が低下すると、体内の亜鉛含有量は低下し、そのことが血漿中の亜鉛濃度として現れているが、亜鉛が関わる機能を維持するために、全体量が減少した亜鉛を体内では激しくやりとりしていることを示しているのではないかと考えている。

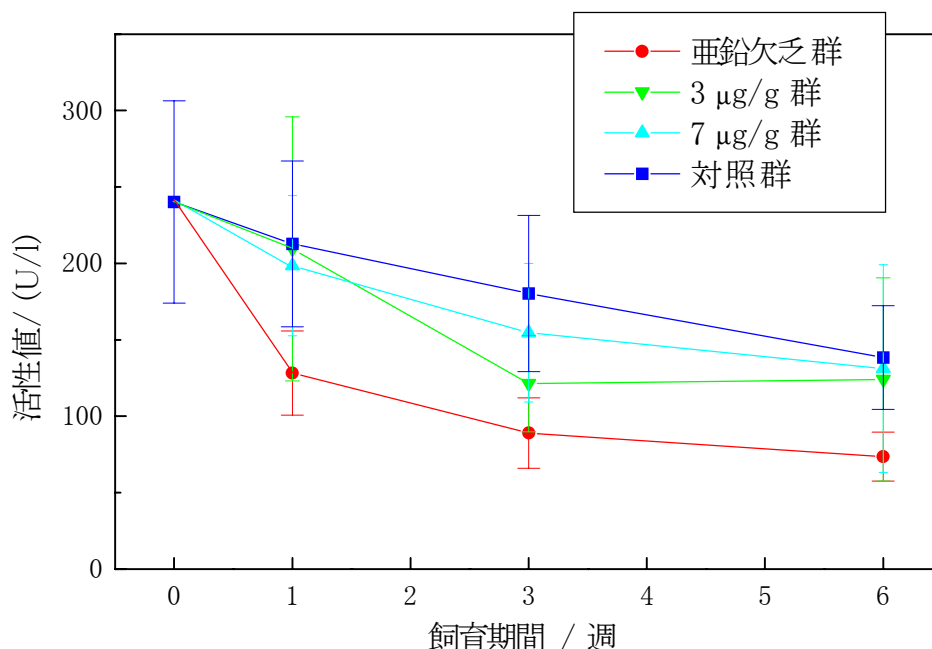


図2 血漿中アルカリフォスファターゼ活性の変化

### 3.3 I N A Aによるマウス臓器中の微量元素の定量結果

4種類の飼料を用いて8週齢から6週間の飼育を行った各群マウスの肝臓、大腿骨およびすい臓中の各元素についてI N A Aにより定量した結果を、それぞれ、図3～図5に示した。

肝臓中の亜鉛濃度は、以前に亜鉛欠乏餌を用いて3週間の飼育を行った場合においては、対照マウスの濃度よりも低下するという傾向は見られていなかった。図1では、4種の飼料を用いて6週間の飼育を行った場合には飼料中の亜鉛濃度に応じて肝臓中の亜鉛濃度が変化しているようにも見えるが、標準偏差を考慮すれば、このことを断定することはできない。これと同様の傾向をセレン濃度にも見ることができる。これらについては今後、更に検討していく予定である。一方、以前から指摘しているコバルト濃度については、3週間の飼育を行った場合と同様に、飼料中の亜鉛濃度が低下する、すなわち、摂取する亜鉛の量が低下するに従って肝臓中のコバルト濃度が有意に上昇する傾向が認められていた。

骨中の亜鉛濃度について見てみると、以前に行った3週間の飼育の場合と同様に、その亜鉛濃度は飼料中の亜鉛濃度に依存する傾向を示すようであったが、飼育期間を6週間にした本研究の場合においても、図4に見られるように、対照群マウスと7 μg/g 群マウスとの間には有意に差は認められなかった。また、週齢による変化を見てみると、対照群マウスおよび7 μg/g 群マウスの骨中亜鉛濃度が飼育開始の8週齢から週齢が進むに従って増加していたのに対し、3 μg/g 群マウスではほぼ一定、亜鉛欠乏群では飼育開始から3週目までは減少し、その後は一定となるという傾向が見られた。この全体の結果として、大きく3群間の亜鉛濃度に有意な差が認められているようである。このことは、マウスの場合には、食餌中の亜鉛濃度が少なくとも7 μg/g 以上であれば骨中に亜鉛を備蓄することができること、食餌中の亜鉛濃度が3 μg/g 程度の場合には、血漿中の亜鉛濃度の低下も抑制されていることも考慮すれば、骨中の亜鉛の備蓄を増加させることはできないが体内の亜鉛量のある一定の範囲内に維持できること、さらに、食餌中の亜鉛濃度がそれ以下になってしまうと、亜鉛を必要とする臓器や組織に骨からの亜鉛の供給が

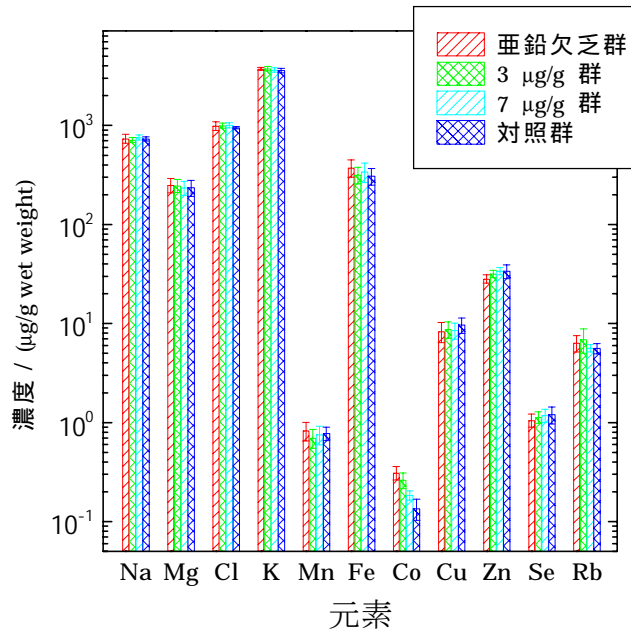


図3 各飼料により6週間飼育したマウス (14週齢) 肝臓中の各元素濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

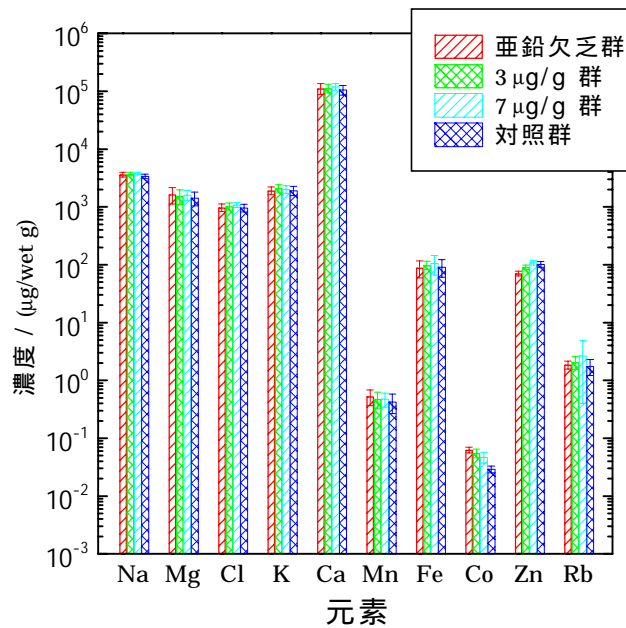


図4 各飼料により6週間飼育したマウス (14週齢) 大腿骨中の各元素濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

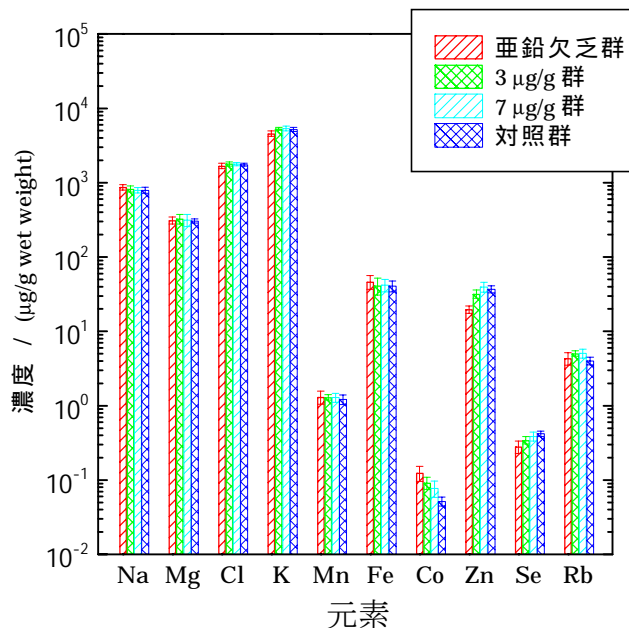


図5 各飼料により6週間飼育したマウス(14週齢)すい臓中の各元素濃度(µg/g)

継続する状態になり、血漿中の亜鉛濃度もかなり低下した状態を維持することになっていることを示しているものと考えられる。

すい臓中の亜鉛濃度も、図5のように、対照群マウスと7 µg/g 群マウスとの間には有意に差は認められないのに対して、3 µg/g 群マウスでは若干の濃度の低下が認められ、亜鉛欠乏群ではさらにその濃度が低下するという、大腿骨についての亜鉛濃度と類似した傾向が見られていた。しかしながら、その濃度の変化の様子は骨の場合とは大きく異なっていた。すなわち、飼育開始1週間後のすい臓中の亜鉛濃度は、食餌中の亜鉛濃度の減少に応じた大きな濃度低下を示し、その後、3 µg/g 群マウスおよび7 µg/g 群マウスでは亜鉛濃度が上昇し、飼育開始6週間後には、7 µg/g 群マウスについては対照群の濃度と同値を示すまでに回復していた。このことは、すい臓中の亜鉛濃度は、食餌中亜鉛濃度あるいは血漿中亜鉛濃度に極めて鋭敏に反応し、これらの濃度が低下すると直ちにすい臓中の濃度も低下するが、わずかな亜鉛供給があれば徐々に回復していく臓器であることを示している。このことが、すい臓の機能の変化をも意味しているのか、あるいは、すい臓もわずかではあるが亜鉛を備蓄する臓器であって、亜鉛を一時的に他の組織に供給することができる臓器であるのかは今後の検討課題である。一方、コバルト濃度は他の臓器・組織と同様に、食餌中の亜鉛濃度の減少に伴って、その濃度が増加する傾向が見られた。この傾向は飼育期間全体を通して見られた傾向であったが、このすい臓中のコバルトの挙動と亜鉛の挙動との関係、また、肝臓よりも顕著に認められるセレンの濃度の傾向(食餌中の亜鉛濃度が低下するにしたがって、すい臓中のセレン濃度が低下している。)についても今後検討していく予定である。