

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 前津仁美 川本有美 小池真理子 小木貴憲 大山拓也

野口基子^{*1} 菅沼英夫 二ツ川章二^{*2} 世良耕一郎^{*3}

静岡大学理学部放射化学研究施設
422-8529 静岡市大谷 836

^{*1} 静岡大学理学部生物地球環境科学科
422-8529 静岡市大谷 836

^{*2} (社)日本アイソトープ協会滝沢研究所
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

^{*3} 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

亜鉛は生体内において必須微量元素として鉄に次いで存在量が多く、亜鉛酵素という形で様々な酵素反応に関わっている。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。それにもかかわらず、現在、亜鉛欠乏が一般に注目されているということは、軽度な亜鉛不足も十分生体に影響を及ぼすのではないかと考えられる。

そこで本研究では、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うこととした。

2 実験

2.1 供試動物

日本クレア(株)より購入したICR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, CE-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 µg/g 飼料およびミリポア水、亜鉛濃度7 µg/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および3週間の飼育を行った。なお、予備飼育のみを行ったマウスを飼育0週間とした。また、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、一部については生化学的検査を行った後、分析を行った。

2.3 PIXE分析

血漿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 µl 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(INAA)

肝臓、骨および他の摘出した臓器・組織についてINAA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PIXE分析を行うにあたり、グルタミン酸オキザ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)、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 INAAによるマウス臓器中の微量元素の定量結果

3週間飼育後の11週齢となったマウスの骨中における各元素の濃度を図1に示した。ほぼ全ての元素について4群間で有意な濃度差は認められなかった。しかしながら、亜鉛とコバルト濃度に関しては4群間で明らかな差がみられ、食餌中の亜鉛濃度が低下するとともに亜鉛濃度は低下し、逆にコバルト濃度は増加していた。

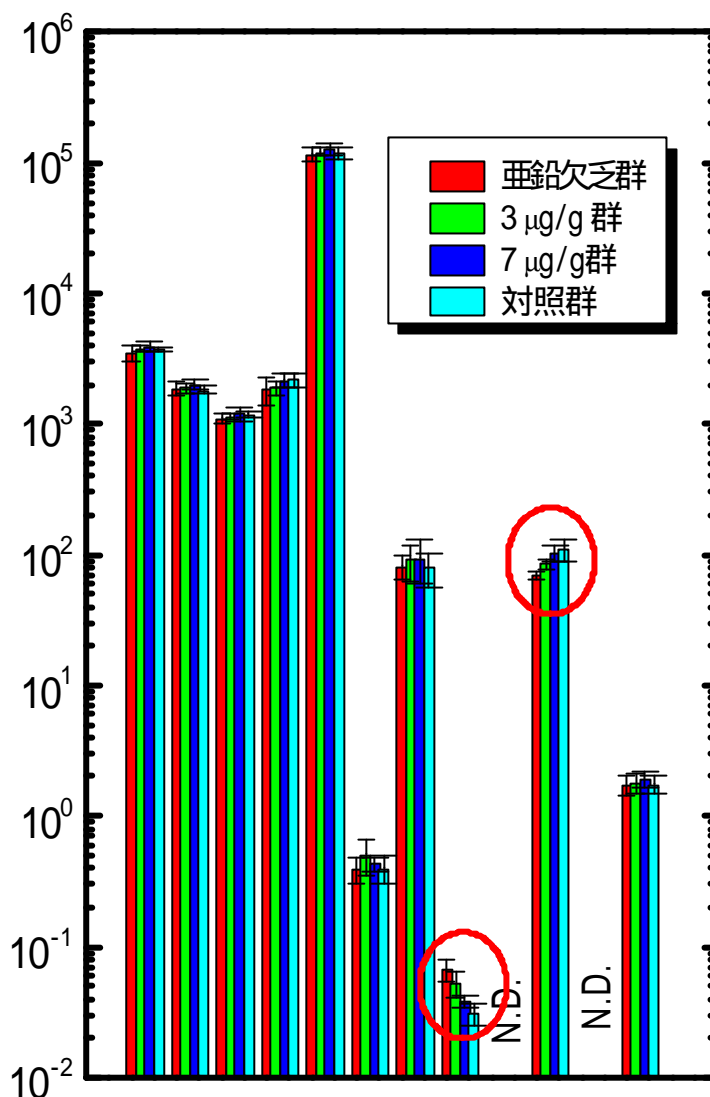


図1 各飼料により3週間飼育したマウス(11週齢)骨中の各元素濃度(µg/g).

図2は、同じく3週間飼育したマウスの肝臓中の各元素濃度を示したものである。骨の場合と同様に、ほぼ全ての元素について4群間で有意な濃度差は見られなかった。また、肝臓では、骨の場合とは異なり、亜鉛濃度についても4群間で明らかな濃度差は確認できなかったが、コバルト濃度に関しては、骨と同様に4群間に差がみられ、食餌中の亜鉛濃度の低下に伴いコバルト濃度は増加を示した。

その他の臓器に関しては、腎臓や精巣については、肝臓と同様の傾向が示され、また、すい臓に関しては、骨と同様の傾向を示していた。すなわち、亜鉛濃度に関しては、骨およびすい臓において、各群の間に有意な差が見られ、コバルト濃度に関しては、食餌中の亜鉛濃度が減少するとともに、全ての臓器でその濃度が高まっていく傾向が認められた。

ここで、亜鉛濃度に注目すると、骨中の亜鉛濃度は飼育期間が長くなるにつれ、ゆるやかな減少を示した。骨は亜鉛の貯蔵器官と考えられるので、亜鉛が欠乏する期間が長くなるにつれて、肝臓、精巣などの臓器に亜鉛を供給していると考えられる。この理由により、肝臓や精巣中の亜鉛濃度には4群間で有意な差が見られなかったものと考えられる。

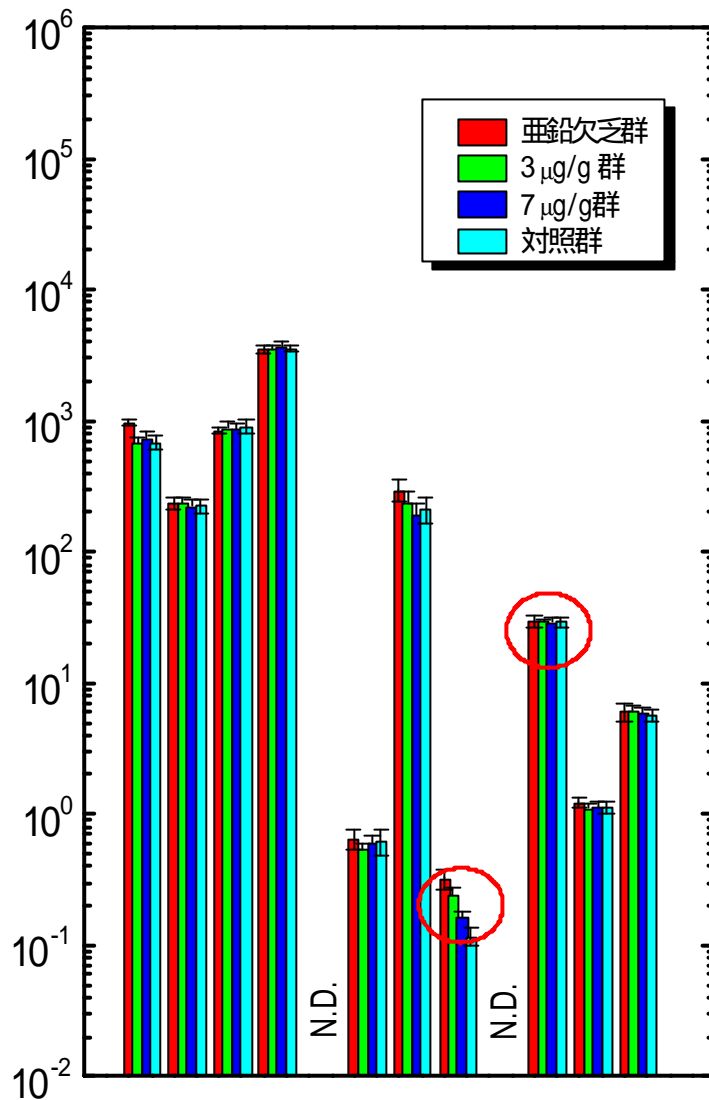


図2 各飼料により3週間飼育したマウス(11週齢)肝臓中の各元素濃度(µg/g).

一方ですい臓中の亜鉛濃度は、飼育1週間で食餌中の亜鉛濃度に応じた減少を示し、その後はそれぞれの濃度を保ったままであった。以前に行なった実験では8週齢と比較して亜鉛欠乏群では、飼育3日ですでに亜鉛濃度が約20 µg/gまで低下し、その後は、ほとんど変化しなかった。本研究でも亜鉛欠乏群において飼育1週間で亜鉛濃度は20 µg/gまで低下していたが、3 µg/g群および7 µg/g群のすい臓中の亜鉛濃度が亜鉛欠乏群と対照群の間に位置するという興味深い結果が得られた。

3.2 血漿試料についてのPIXE法による分析結果

PIXE分析の結果、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。血漿中の元素については、他の臓器・組織の場合とは異なり、各群の間では、亜鉛についてののみ有意な差を認めることができた。亜鉛濃度についての分析結果を図3に示した。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、その後一定となった。対照群は標準偏差を考慮にいれると飼育期間を通してほぼ一定濃度であり、また、7 µg/g、3 µg/g群

はその中間に位置し、食餌中の亜鉛濃度に依存した結果となった。

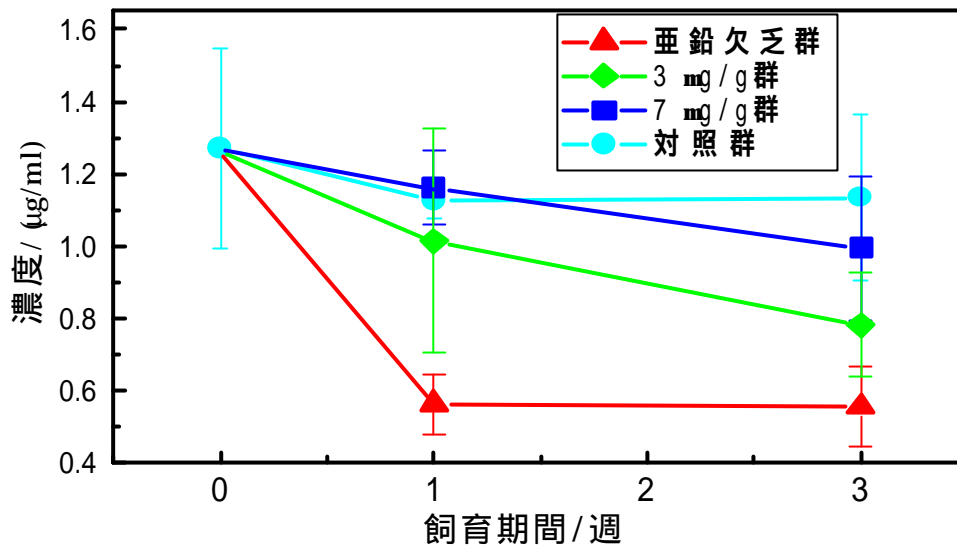


図3 マウス血漿中での亜鉛濃度の変化

生体に取り込まれた亜鉛は腸管から吸収され、その後、毛細血管に移行し各臓器および組織に運ばれる。その際に亜鉛結合タンパクであるアルブミンと結びついて運ばれていく。生体において、食事からの亜鉛摂取不足が起こった場合に最初に影響を受けるのが血漿中の亜鉛濃度と考えられる。今回の実験結果では、4群間で、亜鉛の濃度に有意な差があらわれていることから、飼料中の亜鉛濃度に応じた影響を生体が受けていることが示唆される。

血液生化学的検査の結果においては、ALP活性のみが、血漿中の亜鉛濃度の減少に応じて、低下する傾向が認められた。