

PIXE 法および INAA による亜鉛欠乏マウス 臓器および組織中の微量元素の定量分析

矢永誠人¹、下山弘高¹、田中宏宗¹、世良耕一郎²

¹ 静岡大学大学院理学研究科化学専攻
422-8529 静岡市駿河区大谷 836

² 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

必須微量元素の一つである亜鉛は、ヒトの体内における存在量は鉄に次いで二番目であるが、極めて多くの酵素反応などに関与していることから、その重要性は最も高いものといえよう。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が、インスタント食品などの加工食品に頼りがちになってきた現代日本の食生活においては、この亜鉛をはじめとした種々の微量元素の欠乏が懸念され、学問分野のみならず一般社会においても強い関心をもたれている。それは、ドラッグストアの他、コンビニエンスストア、スーパーマーケットなどでも、亜鉛や鉄などを強化した栄養補助食品が多数販売されていることを見ても明らかである。

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。その結果、亜鉛濃度に関しては、骨およびすい臓中においては対照マウスに比べて著しく低下したことが認められたが、その他の臓器・組織については大きな変動は見られなかった。また、その他の元素として、亜鉛欠乏マウスの全ての臓器および組織中のコバルト濃度が対照群のそれに比べて大きく上昇していた。このコバルト濃度の上昇の原因の一つとして、亜鉛タンパク質の亜鉛と他の金属との置換を考えている。

本研究では、亜鉛欠乏時において、亜鉛タンパク質中の金属すなわち亜鉛が他の金属、特にコバルトと置換する可能性を考え、モデル動物としてマウスを用い、食餌中の亜鉛を欠乏させるとともに過剰量のコバルトの投与（対照餌中の亜鉛と等モルの無機コバルトの投与）を行い、各臓器および組織中の亜鉛および亜鉛以外の微量元素の分析を行い、それらの挙動について検討することとした。

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 2 群に分け、同社より購入したコバルト強化亜鉛欠乏餌(従来使用していた亜鉛欠乏餌の原料に、塩化コバルトの化学形で既存量の他に 32 $\mu\text{g/g}$ のコバルトを添加したもの)および超純水、または銅強化亜鉛欠乏餌(亜鉛欠乏餌の原料に、硫酸銅五水和物の化学形でさらに 34 $\mu\text{g/g}$ の銅を添加したもの)および超純水を与え、それぞれ 1 週間または 3 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

上記の各マウスからエーテル麻酔下で肝臓、腎臓、すい臓、精巣および骨の 5 臓器および組織を摘出した。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、血清を分離し、PIXE 分析を行った。

2.3 PIXE 分析

血清成分のみを分析対象とし、それぞれ、In を内部標準として添加し、または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 20~160 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用いた。熱中性子の照射は、京都大学原子炉実験所 KUR にて行った。短寿命核種による定量(Na、Mg、Cl、K、Ca、Mn、Cu)では、圧気輸送管 Pn-1(熱中性子束 $3.86 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$)にて 90 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 γ 線測定を行った。長寿命核種による定量(Fe、Co、Zn、Se、Rb)では、同 Pn-2(熱中性子束 $5.50 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$)にて 2 時間の熱中性子の照射を行い、照射後、30~90 日間の冷却の後、高純度 Ge 半導体検出器を用いて γ 線測定を行った。

3 結果および考察

3.1 PIXE 分析法による血清中の微量元素の定量結果

PIXE 分析法により定量したマウス血清中の亜鉛濃度と飼育期間との関係を、これまで行ってきた亜鉛欠乏餌および対照餌を用いて飼育したマウスの血清中の亜鉛濃度についての分析結果とあわせて図 1 に示した。図 1 に見られるように、マウスに亜鉛欠乏餌を与えて飼育した場合には、飼育開始 3 日後には血清中の亜鉛濃度は低下し、亜鉛欠乏餌による飼育を継続しても、その値はほぼ一定であった。今回、コバルト強化亜鉛欠乏餌(+Co-Zn と表記)または銅強化亜鉛欠乏餌(+Cu-Zn と表記)を与えて飼育した場合の血清中亜鉛濃度は、亜鉛欠乏餌を与えて飼育したマウスと同程度のものであり、コバルトまたは銅を強化した影響は認められなかった。

血清中のコバルト濃度および銅濃度を図 2 に示した。図 2 に見られるように、コバルト強化亜鉛欠乏餌を与えて飼育したマウスでは血清中コバルト濃度が大きく上昇していたのに対し、銅濃度に関しては、銅強化亜鉛欠乏餌を与えた場合でも濃度上昇は認められなかった。この事実からただちに食餌中の亜鉛の欠乏とこれらの元素の血清中濃度の変化との関連を議論することは困難であるが、亜鉛欠乏餌においてはすべての臓器および組織中のコバルト濃度のみが上昇したというこれまでの結果とは矛盾していないであろう。

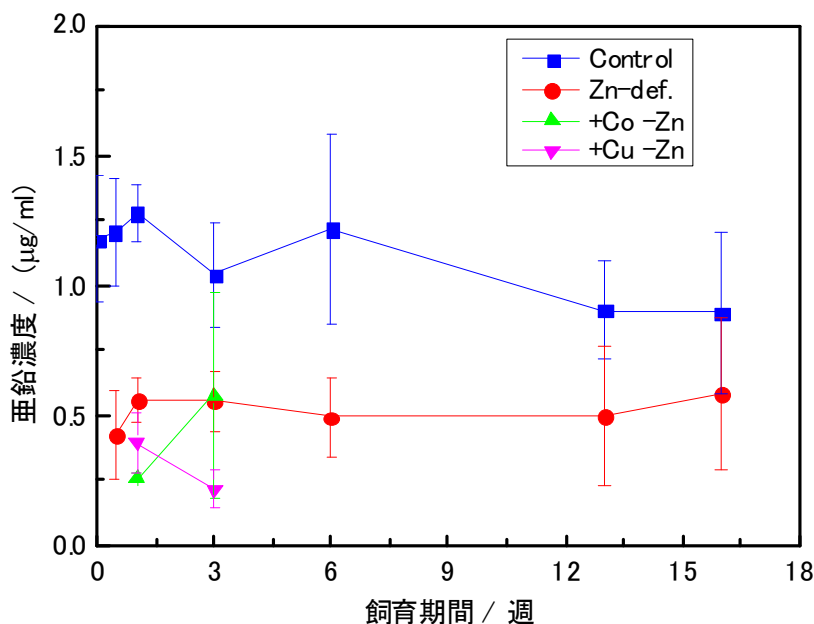


図1 マウス血清中の亜鉛濃度

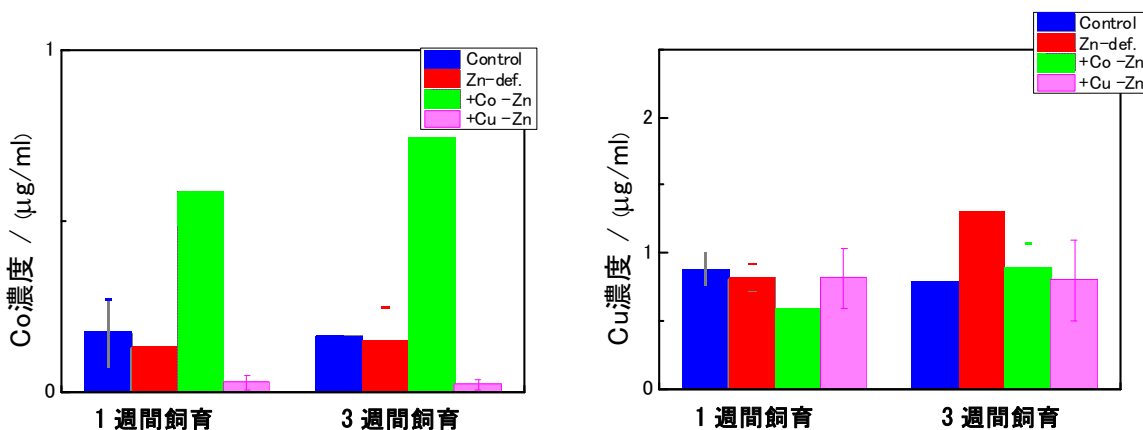


図2 血清中のコバルト濃度 (左) および銅濃度 (右)

3.2 INAAによる臓器および組織中の微量元素の定量結果

図3に、肝臓中の亜鉛濃度の分析結果を示した。肝臓中の亜鉛濃度に関しては、食餌中の亜鉛の欠乏の影響はほとんど認められず、また、コバルトまたは銅を強化した影響も認められなかった。この傾向は、腎臓や精巣についても同様であった。図4に、肝臓中のコバルト濃度および銅濃度についての分析結果を示した。図4に見られるように、コバルト濃度に関しては、亜鉛を欠乏させた3種類の飼料で飼育したマウスのすべてでその濃度の上昇が見られ、特にコバルト強化亜鉛欠乏餌を与えたマウスの肝臓中の濃度の増加は著しいものであった。このコバルト濃度に関して認められた傾向は、その他の臓器および組織についても同様であった。その一方、銅濃度に関しては4群間で有意な差を認めることはできなかった。以前、我々は、亜鉛濃度が1 μg/g未満の亜鉛欠乏餌および35 μg/gの対照餌に加え、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た。その結果、分析した臓器および組織のすべてにおいて、食餌中の亜鉛濃度が低下するにしたがってコバルト濃度が上昇していた。また、その他の元素濃度については有意な変化は認められていなかった。このことから、体内の亜鉛濃度とコバルト濃度には大きな差があるものの、亜鉛欠乏時には積極的にコバルトが体内に取り込まれるとともに、コバルトが亜鉛の一部の機能を果たすようになっているのではないかと考えている。図 5 に、すい臓中の亜鉛濃度についての分析結果を示したが、コバルト強化亜鉛欠乏餌で 3 週間飼育したマウスのすい臓中の亜鉛濃度は、亜鉛欠乏餌または銅強化亜鉛欠乏餌で 3 週間飼育したマウスのすい臓中の亜鉛濃度よりも高く、このことは、コバルトが体内で亜鉛の機能の一部を果たすことにより、すい臓中の亜鉛濃度が回復してきていることを示しているのではないかと考えている。

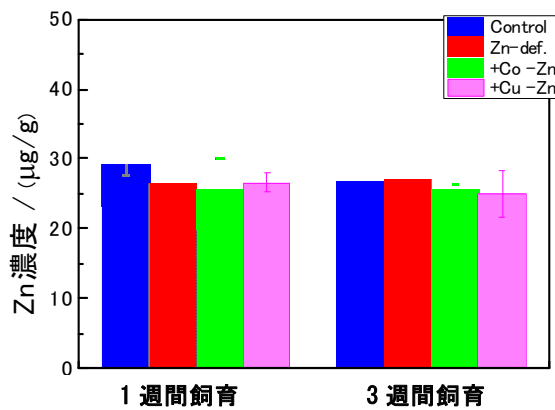


図 3 肝臓中の亜鉛濃度

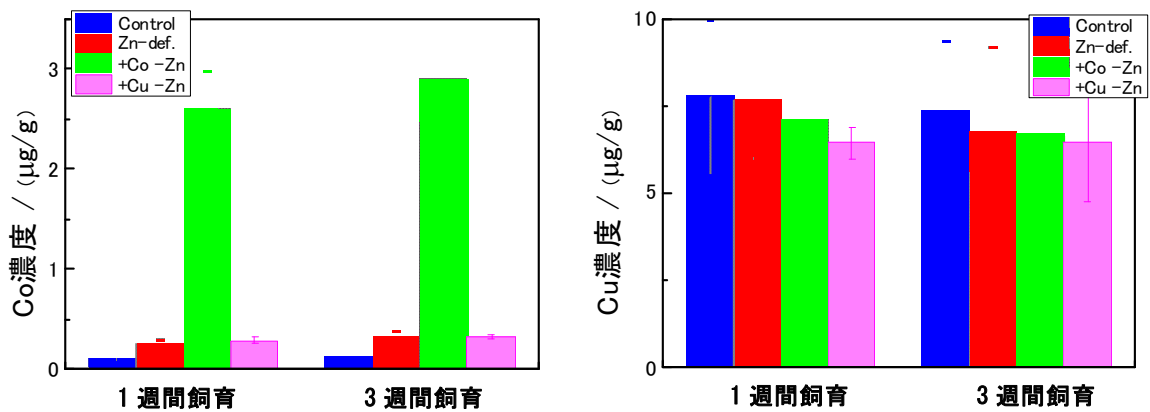


図 4 肝臓中のコバルト濃度 (左) および銅濃度 (右)

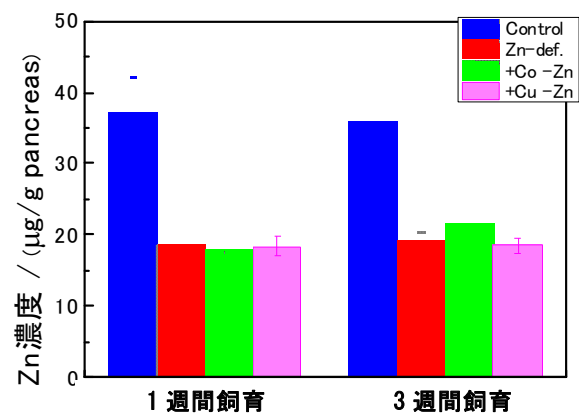


図5 すい臓中の亜鉛濃度

Determination of trace elements in organs and tissues of Zn-deficient mice by means of PIXE and INAA

Makoto Yanaga¹, Hirotaka Shimoyama¹, Hirokazu Tanaka¹ and Kouichiro Sera²

¹ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Shizuoka University
836 Ohya, Suruga-ku, Shizuoka 422-8529, Japan

² Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

Abstract

Eight-week-old male mice of ICR strain were divided into two groups, and fed with cobalt enriched zinc deficient diet (+32 $\mu\text{g/g}$ Co) and copper enriched zinc deficient (+34 $\mu\text{g/g}$ Cu), respectively, for one or three weeks. Concentrations of twelve elements in liver, kidney, pancreas, testis, and bone were determined by instrumental neutron activation analysis. Zinc concentration in serum was also determined by PIXE analytical technique. Zinc concentrations in bone and pancreas were decreased with a decrease of zinc content in diets after one week treatment. However, after that, Zn concentrations in pancreas of mice fed with cobalt enriched zinc deficient diet were increased.