

2世代にわたる亜鉛投与量の違いがマウスの組織亜鉛濃度に及ぼす影響

安部 麻美子¹⁾, 松田 芳和¹⁾, 小邨 奈未¹⁾, 福永 健治²⁾,
栗山 孝雄³⁾, 荒川 泰昭³⁾, 吉田 宗弘²⁾

(¹⁾日本クリニック(株)中央研究所*, (²⁾関西大学化学生命工学部食品工学研究室**,

³⁾静岡県立大学公衆衛生学生体衛生学***)

Effect of Dietary Zinc Level on Tissue Zinc Distribution in Mice over Two Generations

Mamiko ABE¹⁾, Yoshikazu MATSUDA¹⁾, Nami KOMURA¹⁾, Kenji FUKUNAGA²⁾,
Takao KURIYAMA³⁾, Yasuaki ARAKAWA³⁾ and Munehiro YOSHIDA²⁾

¹⁾Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd.

²⁾Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry,

Materials and Bioengineering, Kansai University

³⁾Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Sciences, The University of Shizuoka

Summary

Effect of dietary zinc (Zn) level on tissue Zn distribution in mice was examined over two generations. Male and female eight-week-old ddy mice were fed diets containing 10 or 100 ppm of Zn as zinc sulfate or an oyster extract; there were four dietary groups consisted of both male and female mice. The groups were designated as follows: 10 ppm Zn as zinc sulfate, SL; 100 ppm Zn as zinc sulfate, SH; 10 ppm Zn as oyster extract, OL; 100 ppm Zn as oyster extract, OH. After 2 weeks of feeding, the mice were mated in each dietary group and then fed each diet for 6 weeks further. The second generation of mice born during these 6 weeks were nursed by the mother mouse and then fed each diet for 3 weeks. In the first generation mice, serum Zn levels of the SH and OH groups were higher than those of the SL and OL groups, but there were no difference among the four dietary groups in Zn levels of the liver, kidney, spleen, tibia, testis and hair. In the second generation, Zn levels in tibia, testis, hair and serum of the SH and OH groups were higher than those of the SL and OL groups. Differences in the sex and dietary Zn source (zinc sulfate or oyster extract) did not influence the serum, organ or hair Zn levels. These findings indicate that organ and hair Zn levels remain constant in mature female mice throughout their pregnancy and lactation periods even though they are fed diets with Zn levels varying from 10 to 100 ppm. However, organ and hair Zn levels in immature mice varied with dietary Zn intake.

亜鉛はヒトを含む高等動物にとって必須の微量ミネラルであり、生殖機能や成長において重要な役割を担っている。亜鉛の必要量は、妊娠期、授乳期、成長期において、急速に高まることが知られている¹⁾。日本人の食事摂取基準(2005年版)において、亜鉛の推奨摂取量は成人男性9 mg、女性7 mg、さらに妊婦、授乳婦の付加量は3 mg、上限量

*所在地：京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

**所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

***所在地：静岡市谷田52-1 (〒422-8526)

は30 mgとされている²⁾。これに対して、平成16年国民健康栄養調査によると、日本人の一日の平均亜鉛摂取量は、男性9.0 mg、女性7.6 mgであるが、妊娠・授乳女性では8.1 mgにすぎない³⁾。さらに母乳栄養児には現在でも亜鉛欠乏による腸性肢端性皮膚炎が散発的に発生していることから、妊娠・授乳期における亜鉛摂取の充足が大きな課題といえる。

このように亜鉛栄養においては、妊娠・授乳期における亜鉛摂取量は大きな意味を持つ。本研究では、二世代のマウスに、異なる亜鉛濃度（ヒトの亜鉛摂取量に換算するとEAR（推定平均必要量）に相当する10 ppmと、LOAEL（最低副作用発現量）に相当する100 ppm）⁴⁾、および異なる亜鉛供給源（硫酸亜鉛および牡蠣抽出物）の飼料を投与して、妊娠・授乳期、成長期、成熟期の亜鉛栄養状態と亜鉛の体内分布の関連を検討した。

実験方法

1. 実験動物と飼育条件

体重33～38 gの8週齢のddY系雄マウス20匹、および体重28～33 gの雌マウス20匹をそれぞれ5匹ずつ4群に分け、Table 1に示す卵白アルブミンをタンパク質源とした亜鉛含有量0.6 ppmの亜鉛欠乏基本飼料（オリエンタル酵母社製）に、亜鉛濃度が10 ppm(L)もしくは100 ppm(H)になるように亜鉛源（硫酸亜鉛(S)または牡蠣抽出物(O)）を添加した亜鉛添加飼料をそれぞれ投与し、自由摂取法で2週間予備飼育を行った。なお本実験では、亜鉛の供給源が硫酸亜鉛で飼料亜鉛濃度が10 ppmの群をSL、濃度が100 ppmの群をSH、亜鉛の供給源が牡蠣抽出物で飼料亜鉛濃度が10 ppmの群をOL、濃度が100 ppmの群をOHと呼ぶ。飲料水は蒸留水とした。本研究では牡蠣熱水抽出物^{5, 6)}と牡蠣亜鉛濃縮物⁷⁾を混合して2種類の牡蠣抽出物（抽出物I（亜鉛濃度1500 ppm）と抽出物II（亜鉛濃度15000 ppm））を調製した。その組成はTable 2に示したとおりである。OL群には抽出物I、OH群には抽出物IIを投与した。

予備飼育終了後、各群内で交配させ妊娠動物を得た。妊娠および授乳期間中も引き続き各飼料を投与した。親マウスの飼育期間は妊娠期間3週間と授乳期間3週間の計6週間とした。仔マウスの飼育期間は5週齢までの5週間とした。それぞれの飼育期間終了後、肝臓、脾臓、腎臓、脛骨、精巣、血清、体毛を採取した。

2. 亜鉛の定量

体毛はアセトン-蒸留水-アセトンの順に洗浄した。すなわち、体毛約0.1 gに洗浄液をそれぞれ10 mLずつ加え軽く振盪し、1時間放置後、回収し、風乾して試料とした。血清以外の試料は濃硝酸を用いて湿式灰化し、希釈後、フレイム原子吸光光度計で測定した。血清は灰化せずに0.1 N硝酸で適宜希釈し、フレイムレス原子吸光光度計で測定した。

Table 1 Composition of basal zinc-deficient diet

Ingredient	%
Egg albumin	20
Dextrose	63.7
Corn oil	10
Cellulose powder	2
Mineral mix ^a	3.13
Vitamin mix ^b	1.17

^a Supplied per 100 g of diet: 17.75 g of NaCl, 34.16 g of K₂HPO₄, 5.28 g of MgSO₄, 7.96 g of CaHPO₄, 31.79 g of CaCO₃, 2.91 g of Fe-Citrate, 0.084 g of KI, 0.028 g of MnSO₄·4H₂O, 0.032 g of CuSO₄·5H₂O, 0.006 g of CoCl₂·6H₂O.

^b Supplied per 100 g of diet: 85,470 IU of Vitamin A, 10,680 IU of Vitamin D₃, 940 mg of Vitamin E, 2.82 mg of Vitamin K₃, 85.5 mg of Vitamin B₁, 51.3 mg of Vitamin B₂, 34.2 mg of Vitamin B₆, 0.17 mg of Vitamin B₁₂, 34.2 mg of Biotin, 4.27 mg of Folic acid, 136.8 mg of Calcium pantothenate, 213.7 mg of Nicotinic acid, 12.8 g of Choline chloride with cellulose powder as a carrier.

Table 2 Composition of oyster extract mixture

Components		Contents	
		I	II
Water	(g/100 g)	3.9	3.7
Protein	(g/100 g)	28.3	31.0
Fat	(g/100 g)	2.0	1.8
Ash	(g/100 g)	15.8	20.1
Carbohydrate	(g/100 g)	48.5	41.9
Zinc	(mg/100 g)	150	1500
Sodium	(g/100 g)	3.7	4.2
Calcium	(mg/100 g)	211.1	572.2
Phosphorus	(mg/100 g)	737.9	1434.3
Potassium	(g/100 g)	2.1	1.8
Magnesium	(mg/100 g)	403.0	403.4
Iron	(mg/100 g)	14.7	95.7
Copper	(mg/100 g)	9.6	57.3
Manganese	(mg/100 g)	5.6	27.1
Selenium	(μ g/100 g)	192.7	178.2
Chromium	(mg/100 g)	0.1	0.1
Cobalt	(μ g/100 g)	23.7	31.4
Lithium	(mg/100 g)	0.14	0.13
Vanadium	(mg/100 g)	0.01	0.15

Oyster extract was manufactured by Japan Clinic Co., Ltd.

結 果

各群マウスは両世代とも、飼育期間中の様子および解剖所見において異常が認められなかった。なお、出生数はすべての群間で差は見られなかったが、仔マウスの死亡率はOL群が他の群に比較して高かった。Fig. 1に飼育期間中の仔マウスの体重増加を示した。OH群は有意でないものの、仔マウスの出生時と26日目の体重、および雌マウスの妊娠中の最大体重が、他の群に比較して大きい傾向にあった。

Table 3に飼育期間終了後の各群の親、および仔マウスの体重と組織重量を示した。親マウス、仔マウスともに、各群間に有意な差は認められなかった。

Table 4に各群の親、および仔マウスの組織中亜鉛濃度をまとめた。親マウスの組織中亜鉛濃度は、血清では雌雄ともに、SH、OH群がSL、OL群に比較して有意に高値を示したが、亜鉛源の違いによる差は見られなかった。しかし、血清を除く組織（肝臓、腎臓、脾臓、脛骨、精巣）、および体毛中の亜鉛濃度には4群間に差を認めなかった。これに対して、仔マウスの組織中亜鉛濃度は、精巣において、OH群はOL群に比較して有意に高値を示した。さらに脛骨において、SH、OH群はSL、OL群に比較して有意に高値を示した。また血清および体毛において、SH、OH群はSL、OL群に比較して高値を示す傾向が見られた。

第一世代と第二世代を比較すると、仔マウス（第二世代）の体毛においては、SL、OL群の亜鉛濃度は親（第一世代）マウスと同程度であったが、SH、OH群は親マウスに比較して高い傾向にあった。同様に脛骨において、仔マウスのSL、OL群の亜鉛濃度は親マウスと同程度であったが、SH、OH群は親マウスに比較して有意に高値を示した。

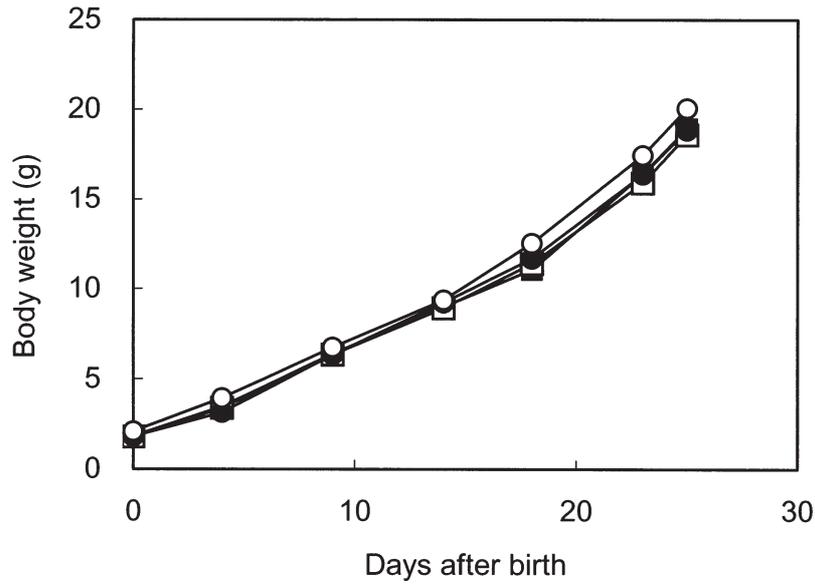


Fig. 1 Changes in body weight of 2nd generation mice fed experimental diets. Markers represent means.
 ■: SL; □: SH; ●: OL; ○: OH

Table 3 Body and tissue wet weights of mice fed experimental diets

Tissues	Wet weight (g)			
	SL	SH	OL	OH
1st generation				
Female				
Whole body	37.4 ± 3.3 ^a	36.7 ± 1.8 ^a	35.2 ± 5.2 ^a	36.4 ± 1.0 ^a
Liver	2.89 ± 0.45 ^a	2.40 ± 0.14 ^a	2.68 ± 0.18 ^a	2.85 ± 0.34 ^a
Spleen	0.20 ± 0.07 ^a	0.21 ± 0.03 ^a	0.17 ± 0.03 ^a	0.15 ± 0.06 ^a
Kidney	0.46 ± 0.07 ^a	0.45 ± 0.05 ^a	0.43 ± 0.02 ^a	0.42 ± 0.02 ^a
Tibia	0.12 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.00 ^{ab}	0.14 ± 0.01 ^b
Male				
Whole body	35.9 ± 2.9 ^a	36.7 ± 1.1 ^a	35.8 ± 1.8 ^a	37.1 ± 3.0 ^a
Liver	1.57 ± 0.07 ^a	1.67 ± 0.09 ^a	1.62 ± 0.11 ^a	1.68 ± 0.15 ^a
Spleen	0.09 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.04 ^a	0.12 ± 0.03 ^a	0.11 ± 0.03 ^a
Kidney	0.51 ± 0.04 ^a	0.56 ± 0.03 ^a	0.55 ± 0.07 ^a	0.51 ± 0.05 ^a
Tibia	0.15 ± 0.01 ^a	0.16 ± 0.00 ^a	0.16 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.02 ^a
Testis	0.27 ± 0.05 ^a	0.23 ± 0.04 ^a	0.27 ± 0.03 ^a	0.26 ± 0.02 ^a
2nd generation				
Female				
Whole body	26.9 ± 1.1 ^a	26.4 ± 0.9 ^a	26.9 ± 1.8 ^a	26.3 ± 1.4 ^a
Liver	1.47 ± 0.08 ^a	1.42 ± 0.09 ^a	1.47 ± 0.16 ^a	1.36 ± 0.07 ^a
Spleen	0.11 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.04 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.02 ^a
Kidney	0.32 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	0.32 ± 0.03 ^a	0.33 ± 0.03 ^a
Tibia	0.09 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.00 ^a
Male				
Whole body	31.7 ± 1.3 ^a	30.9 ± 2.0 ^a	30.8 ± 1.2 ^a	30.0 ± 1.6 ^a
Liver	1.96 ± 0.23 ^a	1.90 ± 0.28 ^a	1.97 ± 0.13 ^a	1.88 ± 0.20 ^a
Spleen	0.15 ± 0.02 ^{ab}	0.12 ± 0.03 ^{ab}	0.16 ± 0.03 ^b	0.12 ± 0.02 ^a
Kidney	0.47 ± 0.06 ^a	0.50 ± 0.06 ^a	0.48 ± 0.04 ^a	0.50 ± 0.04 ^a
Tibia	0.10 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^a
Testis	0.23 ± 0.02 ^a	0.20 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.02 ^a

Values are mean ± SD (n = 5 for 1st generation, n = 6 for 2nd generation). Values in the same row not sharing a common superscript differ significantly (*p* < 0.05).

Table 4 Distribution of zinc in several tissues of mice

Tissues	Tissue zinc concentration ($\mu\text{g/g}$ wet weight)			
	SL	SH	OL	OH
1 st generation				
Female				
Liver	24.3 \pm 2.3 ^a	25.4 \pm 2.8 ^a	24.6 \pm 1.9 ^a	24.4 \pm 2.0 ^a
Spleen	19.6 \pm 1.4 ^a	21.1 \pm 1.3 ^a	20.5 \pm 0.3 ^a	20.8 \pm 0.7 ^a
Kidney	20.6 \pm 1.2 ^a	20.7 \pm 2.2 ^a	20.4 \pm 0.3 ^a	19.2 \pm 1.3 ^a
Tibia	102.9 \pm 21.5 ^a	118.7 \pm 15.8 ^a	102.2 \pm 15.4 ^a	117.9 \pm 10.2 ^a
Serum	0.70 \pm 0.20 ^a	2.02 \pm 0.63 ^b	0.92 \pm 0.08 ^a	1.79 \pm 0.40 ^b
Hair*	132.2 \pm 16.2 ^a	129.2 \pm 5.9 ^a	129.9 \pm 8.7 ^a	131.5 \pm 5.6 ^a
Male				
Liver	30.8 \pm 2.8 ^a	32.1 \pm 2.3 ^a	30.4 \pm 1.3 ^a	32.2 \pm 2.4 ^a
Spleen	22.0 \pm 2.3 ^a	22.2 \pm 4.9 ^a	20.7 \pm 2.7 ^a	20.8 \pm 3.6 ^a
Kidney	20.7 \pm 1.0 ^a	21.0 \pm 0.9 ^a	21.4 \pm 0.9 ^a	20.3 \pm 0.9 ^a
Tibia	107.3 \pm 6.4 ^a	118.2 \pm 9.7 ^a	111.5 \pm 13.3 ^a	113.1 \pm 5.8 ^a
Testis	23.6 \pm 1.0 ^a	22.1 \pm 0.6 ^a	22.6 \pm 1.5 ^a	23.1 \pm 0.5 ^a
Serum	0.75 \pm 0.24 ^a	1.65 \pm 0.49 ^b	0.72 \pm 0.23 ^a	1.58 \pm 0.46 ^b
Hair*	120.8 \pm 14.0 ^a	129.2 \pm 7.9 ^a	115.2 \pm 16.3 ^a	117.9 \pm 15.8 ^a
2 nd generation				
Female				
Liver	28.4 \pm 1.4 ^a	28.5 \pm 1.6 ^a	27.8 \pm 1.2 ^a	30.4 \pm 2.7 ^a
Spleen	21.5 \pm 2.0 ^a	19.3 \pm 0.7 ^a	20.4 \pm 1.6 ^a	20.4 \pm 1.2 ^a
Kidney	21.7 \pm 2.3 ^a	22.0 \pm 0.7 ^a	20.2 \pm 0.8 ^a	22.6 \pm 1.8 ^a
Tibia	11.63 \pm 12.4 ^a	152.8 \pm 9.1 ^b	116.6 \pm 10.0 ^a	160.3 \pm 10.9 ^b
Serum	0.78 \pm 0.23 ^a	1.29 \pm 0.57 ^a	0.80 \pm 0.17 ^a	1.30 \pm 0.78 ^a
Hair*	131.2 \pm 18.3 ^{ab}	150.3 \pm 19.5 ^{ab}	124.2 \pm 13.7 ^a	153.6 \pm 17.3 ^b
Male				
Liver	28.1 \pm 2.4 ^a	29.6 \pm 2.4 ^{ab}	27.9 \pm 1.5 ^a	32.3 \pm 3.0 ^b
Spleen	19.7 \pm 0.5 ^a	19.5 \pm 1.1 ^a	19.6 \pm 0.9 ^a	19.7 \pm 0.5 ^a
Kidney	22.2 \pm 0.5 ^a	23.2 \pm 1.1 ^a	22.2 \pm 0.8 ^a	23.2 \pm 1.3 ^a
Tibia	119.0 \pm 4.5 ^a	151.4 \pm 18.9 ^b	122.4 \pm 10.2 ^a	160.1 \pm 21.0 ^b
Testis	24.0 \pm 0.9 ^{ab}	23.4 \pm 0.8 ^{ab}	23.0 \pm 1.2 ^a	25.0 \pm 1.4 ^b
Serum	1.21 \pm 0.30 ^{ac}	1.68 \pm 0.29 ^b	1.13 \pm 0.34 ^a	1.71 \pm 0.25 ^{bc}
Hair*	133.6 \pm 23.9 ^a	158.3 \pm 11.2 ^a	131.0 \pm 19.6 ^a	142.6 \pm 13.9 ^b

Values are means \pm SD (n = 5 for 1st generation, n = 6 for 2nd generation). Values in the same row not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$).

* Unit of hair zinc $\mu\text{g/g}$ dry weight.

考 察

授乳期間終了後の親（第一世代）の雌マウスにおいて、亜鉛投与量の違いは血清以外の組織亜鉛濃度に反映されなかった。このことから、飼料亜鉛濃度10～100 ppm、つまりヒトに換算してEAR～LOAELの範囲では、妊娠、出産、授乳の過程を経ても、親マウスにおいては、体内亜鉛量は一定に維持されると考えられる。亜鉛の吸収、排泄は摂取量によって影響を受けることが報告されている^{8, 9)}。たしかに、亜鉛の消化管からの見かけの吸収率は亜鉛摂取量の増加とともに低下することが観察されている。しかし本実験では、吸収量を反映すると考えられる血清濃度には、飼料中亜鉛濃度の違いが反映されていた。したがって、飼料亜鉛濃度が100 ppmのSH, OH群では10 ppmのSL, OL群と比較して、吸収量は多かったが排泄量の増加によって、体内亜鉛量が一定範囲に維持されたと考えられる。すなわち、体内亜鉛を一定範囲に維持する機構としては、消化管吸収率よりも排泄量の調節のほうがウェイトは大きいと思われる。亜鉛の消化管からの見かけの吸収率が亜鉛摂取量の増加とともに低下するのは、亜鉛摂取の増加とともに亜鉛の消化管排泄量が増加することを反映しているのだろう^{9, 10)}。

一方、仔マウス（第二世代）では、脛骨と体毛において飼料亜鉛濃度の違いが組織中亜鉛濃度に反映されていた。飼料亜鉛濃度10 ppmでは血清亜鉛濃度は減少するが、母乳の亜鉛濃度は変化しないという報告がある¹¹⁾。このことから、飼料亜鉛濃度が仔マウスの脛骨と体毛の組織亜鉛濃度に影響を与えたのは、離乳後に各飼料を摂取したことによるとと思われる。仔マウスの体毛と脛骨においては、SH, OH群の亜鉛濃度は親マウスに比較して高かった。仔マウス

は成長期であり，体内亜鉛量を一定範囲に保つ機能が未熟であること，および組織の成長のために亜鉛が成熟期よりも多量に必要であるため，100 ppmという高用量の影響を受け，亜鉛の蓄積が生じたと考えられる。

本研究では，交配は一世代しか行わなかったが，繁殖の一期間としての亜鉛による影響をより正確に評価するために，次の世代のマウスの繁殖，成長などを評価する必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Evans GW, Reis BL (1976) Zinc turnover in mice during pregnancy, lactation, and growth. *Am J Clin Nutr* 29 (8): 814-816.
- 2) 日本人の食事摂取基準 (2005年版)，厚生労働省.
- 3) 平成16年国民健康栄養調査の概要 (2006)，厚生労働省.
- 4) Mertz W (1993) Risk assessment of essential elements. *Scand J Work Environ Health* 19 Suppl 1: 112.
- 5) かき肉エキス製法特許I 特許第1770901号.
- 6) かき肉エキス物質製法特許II 特許第1813693号.
- 7) かき肉エキスW抽出製法特許III 特許3429726号.
- 8) 安部麻美子，松田芳和，小邨奈未，川島朋絵，吉田宗弘 (2004) ラットにおける亜鉛栄養状態の差が亜鉛の吸収と体内分布に及ぼす影響. *微量栄養素研究* 21: 127-132.
- 9) King JC, Shames DM, Woodhouse LR (2000) Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 130: 1360S-1366S.
- 10) Krebs NF (2000) Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* 130: 1374S-1377S.
- 11) Chowanadisai W, Kelleher SL, Lönnerdal B (2004) Maternal zinc deficiency raises plasma prolactin levels in lactating rats *J Nutr* 134: 1314-1319.