

助成番号 0914

消化管上皮及び粘膜免疫系機能に及ぼす摂取亜鉛の役割に関する研究

石塚 敏

北海道大学大学院農学研究院

概要 本研究では飼料中の亜鉛添加量を調整することにより亜鉛欠乏ラットを作出し、亜鉛欠乏が血中亜鉛濃度、腸管各部位における上皮の動態に与える影響、および dextran sulfate sodium (DSS) により誘導される大腸炎に与える影響を調べた。まず、腸管各部位における上皮の動態に与える摂取亜鉛の影響を調べる実験を行った。WKAH 系ラット 3 週齢雄を 30 匹、餌の亜鉛添加量によって 5 群に分け飼育した。飼料中亜鉛濃度が 1 未満(亜鉛欠乏群, ZD)、5、10 mg/kg 飼料のものを亜鉛欠乏群とし、30 mg/kg 飼料のものをコントロールとした。また 1 mg/kg 飼料の群と摂食量を合わせたコントロール飼料摂取群を pair-fed (PF) 群とした。4 週間飼育後、腸管組織をブロモデオキシウリジンで免疫染色し増殖細胞数を、フォイルゲン染色により陰窩の分裂頻度を調べた。結果として、ZD や PF 群では摂食量が著しく低下するために各臓器重量が大きく低下するが、それ以外の群では基本飼料(30 mg Zn/kg 飼料)と同等の成長及び臓器重量となることを確認した。また、血清中亜鉛濃度は飼料中亜鉛濃度に大きく依存することが確認された。次に、DSS 腸炎発症における軽度亜鉛欠乏の影響を調べる実験を行った。軽度の亜鉛欠乏状態(5 mg Zn/kg 飼料, MZD)または基本飼料(30 mg Zn/kg 飼料, ZA)としたラットの血中亜鉛濃度を確認した後に 2% DSS 水を与えることにより大腸炎を誘発した。ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性、Disease active index (DAI) により炎症の程度を評価し、さらに結腸粘膜組織における TNF α 産生を測定した。興味深いことに、MZD 群に DSS 大腸炎を発症した状態では、DAI スコアや結腸粘膜における MPO 活性及び TNF α 産生に比べて有意に上昇した。一方、ZA 群では DSS 投与においても有意な MPO 活性及び TNF α 産生の増加は見られなかった。大腸炎が惹起されていない通常状態では、MZD 群においても上皮細胞の形態や増殖に異常はなく、腸管上皮のホメオスタシスを維持し得る状態にあると考えられる。しかし、DSS を用いて大腸炎を惹起した場合には、軽度の亜鉛欠乏において症状がより悪化する事を見いだした。MZD でも、上皮細胞の増殖等の機能は正常であることを考えると、血中亜鉛の低下は免疫系に影響していると考えられる。これらのことは、腸炎の病態発症を抑制するために、摂取亜鉛が極めて有効な作用を持つことを示すと考えられる。

1. 研究目的

亜鉛は生体に必須のミネラルの一つであり、その欠乏による味覚障害や摂食障害はよく知られている。また、亜鉛は細胞内に存在する多くの酵素において、その活性維持に必須なミネラルとされている。これまでに我々は、食餌亜鉛量を厳密に制御したラットにおける血中亜鉛含量の評価により、軽度の亜鉛欠乏状態を作出する事を可能にした⁽¹⁾。この状態では見かけ上摂食量や体重増加に異常は見られないが、血中亜鉛濃度は正常時に比べて有意に減少していた。消化管粘膜は栄養素の摂取に関わる

とともに、外界とのインターフェースとして外来の抗原などの侵入を制限するバリア機能を持ち合わせている。実際にその役割を担う細胞群としては粘膜表面を覆う上皮細胞と粘膜内に存在する免疫担当細胞が重要と考えられる。消化管上皮細胞は高頻度に細胞増殖を行う細胞群であり、一方で、免疫担当細胞は外来の抗原の侵入に際して短期的にはあるが抗原特異的に反応できる細胞群が増殖する性質がある。様々な障害が明らかである重度の亜鉛欠乏ではなく、軽度の亜鉛欠乏状態においてこれらの細胞の機能は維持されているのだろうか。また、特に消化管

粘膜における免疫系細胞については、脾臓などの全身免疫系に関わる細胞群と異なる機能を持つことが示されている。これまでに我々はラットの小腸及び大腸から免疫系細胞分離法を確立しており⁽²⁾、粘膜免疫系細胞は脾臓における免疫系細胞とは異なる性質を持つことを見出している。さらに粘膜免疫系細胞の中でも上皮内と粘膜固有層内に存在する免疫系細胞では、構成細胞が異なることも明らかにした。本研究では、見かけ上正常に見える軽度の亜鉛欠乏状態において、消化管粘膜の維持に関わる上皮の増殖が影響を受けるかどうかを検討した。一方、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)はラットやマウス等の実験動物の大腸部位に特異的に炎症を起こさせることが知られている。そこでこの大腸炎誘発モデル系を用いて、軽度亜鉛欠乏が大腸炎の惹起に影響を及ぼすか否かについても併せて検討した。

2. 研究方法

2.1 血清中亜鉛濃度及び消化管上皮の増殖に及ぼす摂取亜鉛の作用

AIN-93G ミネラル組成を基準として、亜鉛を 0、5、10 及び 30 mg/kg 含み卵白をタンパク源とした飼料を作成した。亜鉛無添加飼料摂取では摂食障害が起こるため、亜鉛 30 mg/kg 添加飼料を摂取させる pair-fed 群を設け、計 5 群で実験を行った。予備飼育後 4 週間の実験食摂取期間の後に解剖し、血清中亜鉛濃度を測定するとともに下記項目を検討した。

解剖 1 時間前にチミジンのアナログであるブロモデオキシウリジン(BrdU, 15 mg/kg 体重)を投与した個体から腸管組織の組織切片を作成し、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色を行うことで上皮細胞増殖を評価した。小腸から大腸にわたる複数の部位について、陰窩内における細胞位置ごとに BrdU 陽性頻度を算出して、消化管上皮の増殖動態が亜鉛摂取状態による制御を受けるか否かを検討した。また、消化管粘膜組織の増加に関わる因子として、上皮細胞そのものの増殖以外にも陰窩分裂が考えられる。同じ組織から得られたサンプルの一部を、Carnoy 固定液で固定後、1 M HCl を加えて加熱後水で洗浄したものに Schiff 試薬を反応させ、45% 酢酸に置き換えた。このサンプルから粘膜を回収してスライドガラス上で押しつぶし、陰窩分裂の頻度を計測した。

2.2 DSS 腸炎発症に及ぼす軽度亜鉛欠乏の影響

亜鉛 5 mg/kg 飼料を与えて軽度の亜鉛欠乏状態としたラット、あるいは対照として亜鉛を 30 mg/kg 飼料をそれぞれ与えた群の二群を設定して 2 週間飼育後、血清中亜鉛含量を測定して血中亜鉛濃度を確認した。以後 2% DSS 水を 7 日間与えることにより大腸炎を誘発した。体重変化、糞の性状及び血便を指標とした方法を用いた disease activity index (DAI)⁽³⁾ を調べることで炎症の程度を評価した。DSS 投与 7 日後に解剖を行い、結腸粘膜におけるミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性を測定するとともに、TNF α 産生についても ELISA kit を用いて測定した。また、免疫染色法により CD8⁺ 上皮細胞間リンパ球などの免疫細胞を染色し陽性細胞数を計測した。また、同一条件で飼育したラットの結腸を分離し、Ussing chamber を用いて粘膜の経上皮電気抵抗(TER)、及びルシファーイエロー(LY)透過性を評価した。

3. 研究結果

3.1 血清中亜鉛濃度及び消化管上皮の増殖に及ぼす摂取亜鉛の作用

試験飼育 3 日目以降、亜鉛欠乏食群(ZD)では摂食量の低下が見られたため、その摂食量に合わせて基本飼料(30 mg Zn/kg 飼料)を摂取させる群として pair-fed(PF)群を設定した。ZD 及び PF 群では摂食量の低下に伴い体重増加の抑制が見られたが、それ以外の群は基本飼料群と同等の成長を示した。飼料中の亜鉛の亜鉛含量を変えた飼料で 4 週間飼育すると、血清中亜鉛濃度は摂取する飼料の亜鉛含量に依存して異なることが確認された(Table 1)。見かけ上問題なく成長している群(5、10 及び 30 mg/kg)のなかでは、5 mg/kg 群における血清亜鉛において、他の 2 群(10 及び 30 mg/kg)に比べて血清中亜鉛濃度の有意な低下が確認された。

このとき、小腸、盲腸、結腸、胸腺、大腿骨、腎臓、肝臓の組織重量は摂食量の低い ZD 及び PF に比べ他の 3 群で有意に高いことは確認できた一方、BrdU の取り込み及び陰窩分裂頻度については明確な差異は見られなかった。

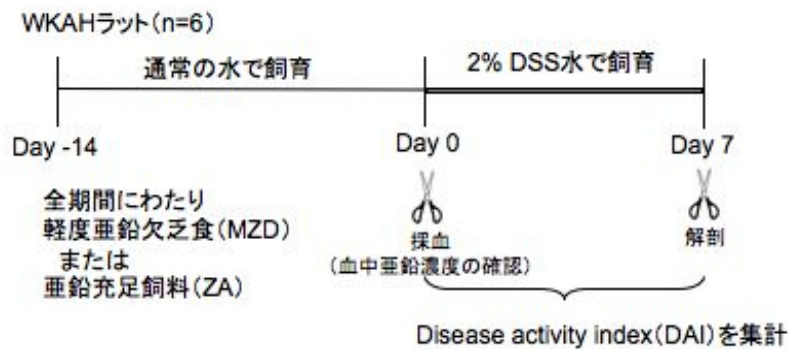
3.2 DSS 腸炎発症に及ぼす軽度亜鉛欠乏の影響

前述の実験において、亜鉛欠乏のみでは消化管上皮動態に大きな影響を及ぼさないことが明らかになったので、

Table 1. 亜鉛制限食で4週間飼育した場合のラット血清中亜鉛含量

ZD	5 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	PF
μg/dL				
53.5 ± 19.4 ^b	66.9 ± 8.4 ^b	143.0 ± 6.7 ^a	167.0 ± 11.5 ^a	184.8 ± 21.0 ^a

数値は平均値 ± 標準誤差として示した (n = 6)。ZDは亜鉛欠乏食、PFはZDに対するpair-fed群(飼料中亜鉛濃度は30 mg/kg)を示す。英字の異なる数値には有意差があることを示す(Tukey-Kramer test, $P < 0.05$)。

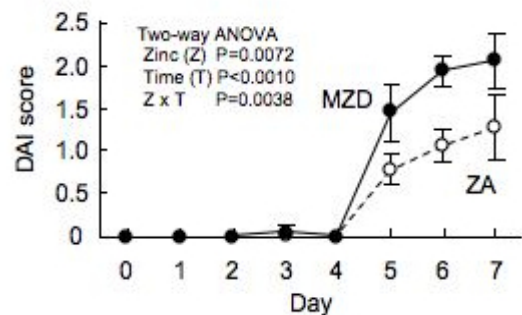
**Fig. 1.** 軽度亜鉛欠乏 (MZD, 5 mg Zn/kg 飼料) 及び亜鉛充足 (ZA, 30 mg Zn/kg 飼料) ラットにおける DSS 投与実験概要

消化管病態モデルとして DSS 腸炎を誘導させた場合の亜鉛欠乏の影響を検討した。完全な亜鉛欠乏では摂食量の低下に伴う体重増加抑制等多くの問題が生じるため、見かけ上問題なく成長するが血中亜鉛濃度は通常の 1/3 程度となる軽度亜鉛欠乏群 (MZD) と基本飼料摂取群 (亜鉛充足群, ZA) に絞り、軽度亜鉛による影響を検討した (Fig. 1)。試験飼育 2 週間後に血清亜鉛濃度を測定して軽度亜鉛欠乏が起こっていることを確認できたので、以後 2% DSS を飲水投与する方法で実験を行った。

結果として、MZD 群では ZA 群に比べ DAI の有意な悪化が確認された (Fig. 2)。

また、DSS 投与 7 日後の結腸粘膜における MPO 活性 (Fig. 3) は、どちらの群でも DSS 投与で有意に増加する傾向が観察されたが、明確な有意差が見られたのは MZD 群のみであった (Fig. 3)。

さらに、MZD 群のみで DSS 投与による有意な結腸粘膜中 TNF α 産生の増加が観察された (Fig. 4)。DSS を投与しない対照群 (Cont) でも MZD において ZA で数値が高い傾向がみられた。しかし対照群では DSS 投与による TNF α 産生の有意な増加は確認できなかった。

**Fig. 2.** 軽度亜鉛欠乏 (MZD, 5 mg Zn/kg 飼料) 及び亜鉛充足 (ZA, 30 mg Zn/kg 飼料) ラットに DSS を投与後での disease activity index (DAI) の経時的変化。数値は平均値 ± 標準誤差として示した (n = 6)。

また、免疫染色法により CD8⁺ 上皮細胞間リンパ球などの免疫細胞を染色し陽性細胞数を計測したが群間で有意差は見られなかった。同一条件で飼育したラットの結腸を分離して Ussing chamber を用いた経上皮抵抗、物質透過性評価をおこなったが、TER 値及び LY 透過性に群間で有意な差異は見られなかった。

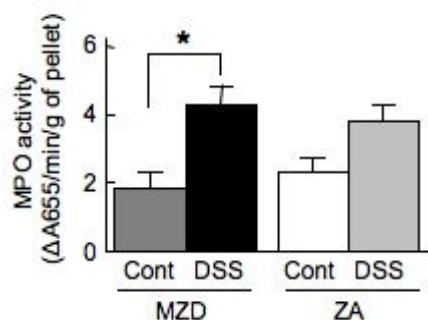


Fig. 3. 軽度亜鉛欠乏 (MZD, 5 mg Zn/kg 飼料) 及び亜鉛充足 (ZA, 30 mg Zn/kg 飼料) ラットに DSS を投与 7 日後の結腸粘膜の myeloperoxidase (MPO) 活性。数値は平均値 ± 標準誤差として示した (n = 6)。アスタリスクは当該数値間に有意差があることを示す (Student's *t*-test, $P < 0.05$)。

4. 考 察

本研究では、血清中亜鉛濃度が摂取飼料中の亜鉛含量に著しく依存することが確認された一方で、MZD 状態でも各臓器重量に大きな差は見られなかった。つまり MZD 状態では血中の亜鉛を減らしてでも各臓器の亜鉛濃度を維持していることが考えられる。また、MZD 状態でも成長や消化管上皮を含む各臓器機能は比較的正常に保たれていることが推察された。一方で、MZD 群では ZA 群に比べて DSS 腸炎が結果的に悪化することが見いだされた。腸炎の病態時には、各臓器を正常に機能させるために亜鉛の需要が増加することが推察される。実際に、MZD での上皮細胞の増殖や陰窩分裂等の機能は正常であることを考えると、血中亜鉛の低下は免疫系に影響していると考えられる。Peterson ら⁽⁴⁾ は、lipopolisaccharide に対する腸管免疫系のレスポンスが軽度の亜鉛欠乏で影響されることを示しており、本研究の結果と一致している。一方、亜鉛濃度の減少だけでなく、亜鉛濃度の増加も免疫系機能に影響を及ぼす⁽⁵⁾ ことを我々は示しており、免疫系細胞を取り巻く環境における亜鉛がその機能を調節し得ることを示している。MZD において結腸 TNF α 産生の DSS 投与による有意な増加や、結腸粘膜 MPO 活性の増加が観察されたことから、MZD は結腸粘膜免疫系の機能に大きな影響を及ぼしていることが推察された。これらのことは、腸炎の病態発症を抑制するために、食餌中の亜鉛が極めて有効な作用を持つことを示唆している。

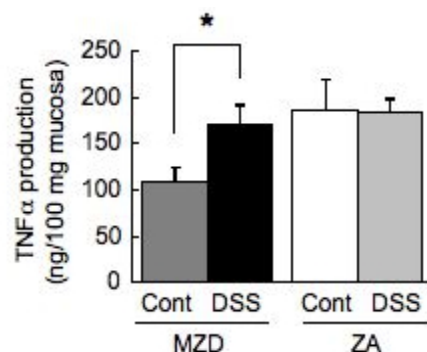


Fig. 4. 軽度亜鉛欠乏 (MZD, 5 mg Zn/kg 飼料) 及び亜鉛充足 (ZA, 30 mg Zn/kg 飼料) ラットに DSS を投与 7 日後の結腸粘膜における TNF α 産生。数値は平均値 ± 標準誤差として示した (n = 6)。アスタリスクは当該数値間に有意差があることを示す (Student's *t*-test, $P < 0.05$)。

5. 今後の課題

亜鉛の要求量は他のミネラルに対して微量であるために、その重要性を見過ごされがちである。しかしながら見かけ上正常な場合においても、血中亜鉛含量が低下している場合、特に免疫系機能を介した病態の重篤化を招く危険性があることを示している。本研究では、血中亜鉛が軽度亜鉛欠乏の確認に重要であることを示した。健康診断等で血中亜鉛を測定することで、病態予防の可能性を判断することも可能ではないかと考えられるが、個体差を考慮すると長期にわたり血中亜鉛濃度を経時的にモニターしつつ病態発症との関連を検討する必要がある。また、免疫系の関与する病態としては、炎症だけにとどまらず、癌、アレルギー、メタボリックシンドローム等多様な病態が想定される。このような病態の発症予防にも軽度の亜鉛欠乏が影響する可能性があり、免疫系機能に及ぼす亜鉛環境の影響を正確に把握することが必要であると考えられる。

文 献

1. Hara H, Konishi A, Kasai T. Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats. *J Nutr.* 2000 130(1): 83-9.
2. Lee JS, Oka K, Obara M, Nishimukai M, Yoo YC, Yamada K, Tsukahara T, Nakayama K, Hara H, Ishizuka S. Improved isolation methods for mucosal leukocytes from small and large intestines in rats. *Biosci Biotechnol*

- Biochem. 2009 73(8): 1732-40.
3. Katada K, Yoshida N, Suzuki T, Okuda T, Mizushima K, Takagi T, Ichikawa H, Naito Y, Cepinskas G, Yoshikawa T. Dextran sulfate sodium-induced acute colonic inflammation in angiotensin II type 1a receptor deficient mice. *Inflamm Res.* 2008 Feb;57(2): 84-91.
 4. Peterson DG, Scrimgeour AG, McClung JP, Koutsos EA. Moderate zinc restriction affects intestinal health and immune function in lipopolysaccharide-challenged mice. *J Nutr Biochem.* 2008 19(3): 193-9.
 5. Hayashi K, Ishizuka S, Yokoyama C, Hatae T. Attenuation of interferon-gamma mRNA expression in activated Jurkat T cells by exogenous zinc via down-regulation of the calcium-independent PKC-AP-1 signaling pathway. *Life Sci.* 2008 83(1-2): 6-11.

No. 0914

Contribution of Dietary Zinc to the Function of Intestinal Epithelia and Mucosal Immune System

Satoshi Ishizuka

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan

Summary

Zinc is involved in many cellular functions. We previously found that zinc concentration in serum was strictly regulated by dietary zinc. Severe anorexia was found in zinc deficiency induced by ingestion of zinc-depleted diet. In contrast, marginal zinc deficiency (MZD, 5 mg Zn/kg diet) did not develop any apparent diseases. In this study, we investigated whether dietary zinc level modulates epithelial functions including proliferation and responses in experimental colitis induced by administration of dextran sulfate sodium (DSS). Male WKAH/HkmSlc (3 weeks old) were fed AIN-93-based diet containing 0 (zinc deficiency, ZD), 5, 10 or 30 mg Zn/kg diet for 4 weeks after acclimation. Pair-feeding for ZD was also performed to monitor an influence of food restriction in ZD rats. We determined bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation and crypt fission in intestinal epithelial cells as well as serum zinc concentration. There was no significant difference in BrdU incorporation and crypt fission in intestine between the groups. However, serum zinc concentration strictly depended on the dietary zinc concentration. In the second experiment, male WKAH/HkmSlc (3 weeks old) were fed AIN-93-based diet containing either 5 (marginal zinc deficiency, MZD) or 30 mg Zn/kg (zinc adequate, ZA) diet for 2 weeks after acclimation. Serum concentration of zinc was almost one-third in rats fed MZD rats compared to that in ZA at this point. We investigated influence of MZD on DSS-induced colitis in the same experimental design. The rats were administered 2% DSS in drinking water after analysis of the serum zinc concentration. We measured disease activity index (DAI), myeloperoxidase (MPO) activity, and TNF α production in colonic mucosa in MZD and ZA rats. As a result, MZD enhanced DAI, colonic MPO activity, and colonic TNF α production. These results suggest that MZD exacerbates experimental colitis without retardation of epithelial barrier.