

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650478

研究課題名（和文） 生体内における亜鉛代用金属としてのコバルトの挙動

研究課題名（英文） Behavior of cobalt as the in vivo zinc substitute metal

研究代表者

矢永 誠人 (YANAGA MAKOTO)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：10246449

研究成果の概要（和文）：8週齢のICR系オスマウスに亜鉛欠乏餌、対照餌、コバルト強化亜鉛欠乏餌または銅強化亜鉛欠乏餌および超純水を与えて対照飼育を行い、それらマウスの血清並びに臓器および組織中の微量元素の定量をPIXE分析法および機器中性子放射化分析法により行った。その結果、銅は亜鉛欠乏に対して何らの影響を及ぼさないが、コバルトは食餌中の亜鉛欠乏によって低下したすい臓中の亜鉛濃度を回復させる働きをすることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Male mice of the ICR strain, 8-week old, were divided into four groups. One group was fed with Zn-deficient diet and ultra pure water for one or three weeks. The second, third, and fourth group were fed with control diet, Co-enriched Zn-deficient diet, and Cu-enriched Zn-deficient diet, respectively. The change of Zn concentration in pancreases might indicate that some kinds of mechanisms which enhance the intake of Co in all the organs and tissues of Zn-def. mice could be operated, and Co functions to disturb that Zn flows out.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：核・放射化学、生物無機化学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：亜鉛欠乏、コバルト、銅、PIXE分析、INAA

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、生体微量元素の機能や微量元素欠乏による健康障害については、学問分野のみならず一般社会においても強い関心がもたれている。そのことは、ドラッグストア以外の一般のコンビニエンスストアなどでも、亜鉛や鉄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。必須微量元素が欠乏することにより現れる欠乏症の中でも亜鉛欠乏症は、その頻度が高く最も懸念されている。しかしながら、現在のところ、臨床検査データによる亜鉛欠乏の診断は困難とされ、亜鉛投与により諸症状が改善されれば、亜鉛欠乏症と診断されているの

が実情である。また、亜鉛欠乏症が発症にいたった原因が食生活である場合においても、亜鉛投与を行っただけでは完全には症状を改善させることができないことの原因は解明されていない。

(2) これまで、亜鉛欠乏マウスの各臓器・組織について、主として機器中性子放射化分析法を用いた多元素同時分析を行ってきた。その結果、亜鉛欠乏状態においては、亜鉛そのものよりも他の金属元素濃度、特にコバルト濃度が大きく変化（増加）することがわかった。この一つの原因として、亜鉛タンパク質の亜鉛と他の金属との置換を考えた。実際、

亜鉛が結合した酵素タンパク質の亜鉛を他の金属、特にコバルトと置換すると、その酵素活性が低下するどころか数倍にも増加するものも多い。また、亜鉛欠乏状態では、ある種のタンパク質は、タンパク質自体が消失している可能性が見いだされた。その理由が、コバルト置換体が生成しにくい構造のためなのか、あるいは無機態のコバルトの体内存在量が亜鉛に比べてはるかに少ないために十分な置換体が生成されないという原因によるものかなど不明な点が多い。そこで、コバルト投与が亜鉛欠乏症の病理を解明する手がかりになるのみではなく、発症の予防や症状に対する効果的な治療法の開発にもつながると考え、本研究を行うに至った。

2. 研究の目的

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、食餌中の亜鉛の代わりに通常より過剰量のコバルトを添加した飼料（通常の食餌中の亜鉛と同量程度の無機コバルトの投与）を行い、そのマウスの携帯を観察するとともに、亜鉛および亜鉛以外の金属元素の全身的挙動を追跡することにより、亜鉛欠乏に対するコバルト負荷投与方法（仮称）が亜鉛欠乏症発症のメカニズムの解明、亜鉛結合タンパク質の体内挙動の解明、亜鉛欠乏症発症の予防、また、欠乏症に対する効果的な治療法の開発のための新手法となり得るかどうか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 日本クレア(株)より購入した ICR 系マウス(オス、7 週齢)を通常の飼料(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 1 週間または 3 週間、同社に調製を委託した特殊配合飼料および超純水を用いて飼育したマウスを供試動物とした。ここで用いた特殊配合飼料は、①亜鉛欠乏餌 ($Zn < 1 \mu\text{g/g}$)、②対照餌 (亜鉛欠乏餌の原料に塩基性炭酸亜鉛の形で亜鉛を添加した飼料) ($Zn : 35 \mu\text{g/g}$)、③コバルト強化亜鉛欠乏餌 (亜鉛欠乏餌の原料に、亜鉛の代わりに、対照餌に含まれている亜鉛と同モル数となる量のコバルトを CoCl_2 の形で添加した飼料) および④銅強化亜鉛欠乏餌 (亜鉛欠乏餌の原料に、対照餌中の亜鉛と同モル数の銅を $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ の形で添加した飼料) の 4 種である。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) 一定期間の飼育を行ったマウスからエ

ーテル麻酔下で、心臓から約 1 ml の血液を採取した後、肝臓、腎臓、すい臓、精巣および骨の各臓器および組織の摘出を行った。血液は、自然凝固させた後に 3000rpm で 10 分間遠心分離することにより血清を分離した。その他の臓器および組織については、重量を測定した後、凍結乾燥した。

(3) 血清中に含まれる微量元素濃度の定量には、PIXE (荷電粒子励起 X 線発光) 分析法を用いた。PIXE 分析は、(公社)日本アイソトープ協会 仁科記念サイクロトロンセンター(NMCC) (岩手県岩手郡滝沢村) において行った。血清試料に内部標準として In 標準溶液を添加したもの約 100 μl 、または内部標準を添加することなく (無標準法)、そのままの血清数 μl を 4 μm 厚のバックリングフィルム (ポリプロピレン) 上に滴下し、ターゲットとした。真空チャンバー内にセットしたターゲットに小型サイクロトロンで 2.9 MeV に加速した陽子ビームを照射し、ターゲットから発生する特性 X 線を 2 台の Si(Li) 半導体検出器によって測定した。得られたスペクトルは、データ解析プログラム SAPIX (K. Sera et al., The Takizawa PIXE Facility Combined with a Baby Cyclotron for Positron Nuclear Medicine," *Int. J. PIXE*, 2, 47(1992)) を用いて解析した。

(4) 各臓器および組織中の微量元素の定量は機器中性子放射化分析法(INAA)によった。凍結乾燥後の臓器および組織を再度秤量した後、粉碎し、ポリエチレン袋に二重に封入して照射試料とした。熱中性子照射は京都大学原子炉実験所 (大阪府泉南郡熊取町) の研究炉において行った。各元素の定量に用いる核種の半減期に応じて、Pn-1 での 90 秒間照射および Pn-2 での 2 時間照射の 2 種類の照射を行った。短時間照射した試料については照射後 5 分から 10 分後に 120 秒間の高純度 Ge 半導体検出器を用いたガンマ線測定を行い、さらに 60 分から 150 分後に 250 秒間の測定を行った。また、長時間照射した試料については 30 日から 80 日後に、3 時間から 24 時間の測定を行った。

4. 研究成果

(1) 亜鉛欠乏餌 (亜鉛欠乏群)、対照餌 (対照群)、コバルト強化亜鉛欠乏餌 (コバルト強化群) および銅強化亜鉛欠乏餌 (銅強化群) の 4 種の飼料および純水を与える対照飼育実験を行い、各群の成長の様子を観察したところ、コバルト強化群および銅強化群については亜鉛欠乏群と同様の成長障害が認められた。このことは、細胞分裂または細胞の成長に係る亜鉛タンパク質に関しては、コバルトおよび銅は代用金属とはなり得ない可能

性が高いことを意味するが、亜鉛以外の金属濃度の強化による別種のタンパク質の誘導までに時間がかかる可能性は否定できないものと考えている。

(2) PIXE 法による血清中の微量元素の分析では、リン、硫黄、塩素、カリウム、カルシウム、クロム、コバルト、鉄、銅、亜鉛およびセレンの定量を行うことができた。ここでは、これらの元素のうち、亜鉛、コバルトおよび銅について記すこととする。

図1に各群の血清中亜鉛濃度の定量結果を示した。食餌中の亜鉛濃度が低下した場合、コバルトまたは銅濃度を強化させた飼料を与えた場合も含めて、血清中の亜鉛濃度は著しく低下していた。

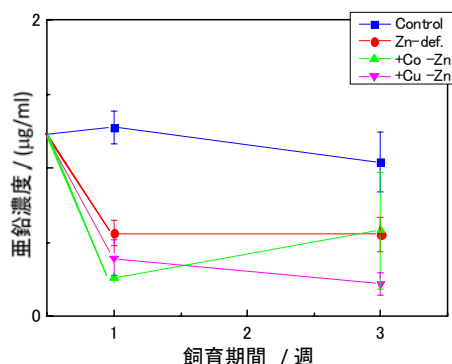


図1 血清中亜鉛濃度

血清中のコバルト濃度の分析結果を図2に示した。図に見られるように、コバルトを強化した飼料を与えた場合、血清中のコバルト濃度は著しく増加しており、2価の陽イオンであるコバルトが積極的に取り込まれたことがわかった。その一方、血清中の銅濃度に関しては各群の間に有意な差は認められず、たとえ亜鉛が欠乏した場合においてもコバルトや亜鉛と同じく2価の陽イオンである銅は、吸収量が増加しないか、あるいは吸収されても直ちに排泄されてしまうようであった。

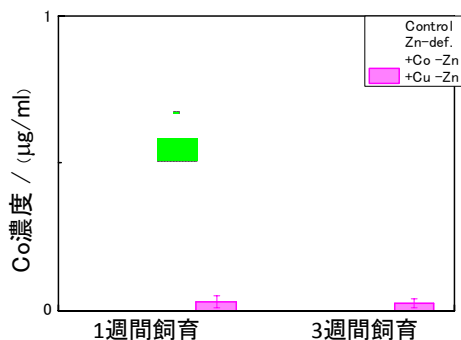


図2 血清中コバルト濃度

その他の元素については、4群間で有意な差は認められなかった。

(3) INAA による臓器および組織の分析では、ナトリウム、マグネシウム、塩素、カリウム、マンガン、鉄、コバルト、銅、亜鉛、セレンおよびルビジウムの定量を行うことができた。

図3は、肝臓中の亜鉛濃度を示したものである。肝臓および腎臓中の亜鉛濃度は4群間で有意な差は認められなかったが、精巣では食

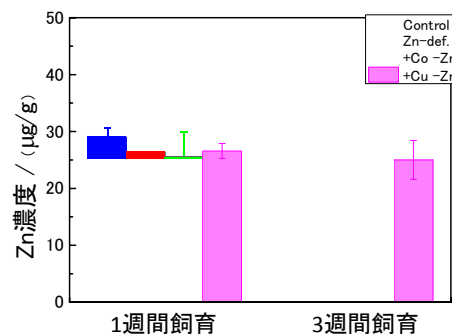


図3 肝臓中亜鉛濃度

餌中の亜鉛以外の金属濃度の強化の有無にかかわらず、亜鉛欠乏餌で飼育したマウスではややその濃度が低下する傾向が見られた。骨およびすい臓中の亜鉛濃度については、その低下は著しいものであった。骨中の亜鉛濃度の低下は、食餌中の亜鉛不足を補うために骨に蓄積されていた亜鉛を放出したものと考えられるが、すい臓中の亜鉛濃度が低下した(図6参照)は、すい臓中には食餌中あるいは血中の亜鉛濃度の低下に敏感に反応して亜鉛が遊離されるタンパク質、あるいは、亜鉛とともに消失するタンパク質が含まれているためではないかと考えている。

図4は、肝臓中の銅濃度を示したものである。銅濃度に関しては、図に示した肝臓以外の臓器および組織のいずれにおいても、銅を

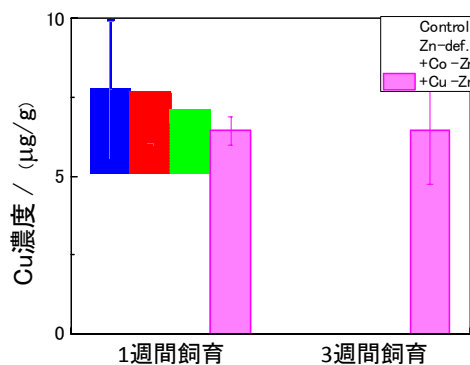


図4 肝臓中銅濃度

強化した場合であっても、その濃度の増加は

見られなかった。一方、コバルト濃度に関しては、亜鉛欠乏餌で飼育した3群のいずれにおいても、図5に示した肝臓を含めたすべての臓器および組織において濃度の増加が見られ、特にコバルトを強化した亜鉛欠乏餌で飼育したマウスのコバルト濃度の増加は著しく、亜鉛欠乏時においては、より積極的にコバルトを吸収するとともに、それが全身に分布することを示していた。

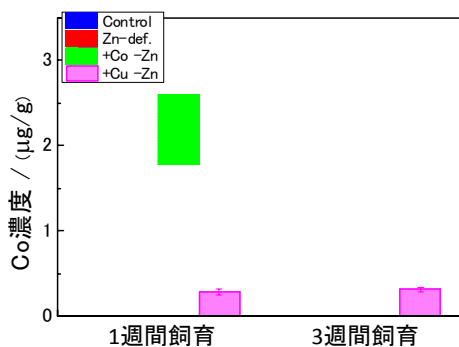


図5 肝臓中コバルト濃度

図6は、すい臓中の亜鉛濃度を示したものである。先にも記したように、食餌中の亜鉛を欠乏させた3群のいずれにおいても、亜鉛濃度は著しく低下していたが、その中でコバルト強化亜鉛欠乏餌を3週間与えた群では、他の亜鉛欠乏群に比べて亜鉛濃度は有意に高値を示していた。このことは、コバルトがすい臓からの亜鉛の流出を妨げる働きをしたか、あるいは、その量としては僅かであろうが他の臓器組織中で亜鉛タンパク質のコバルト置換体が生成され、そのためにすい臓中の亜鉛タンパク質が再合成されたためではないかと考えている。

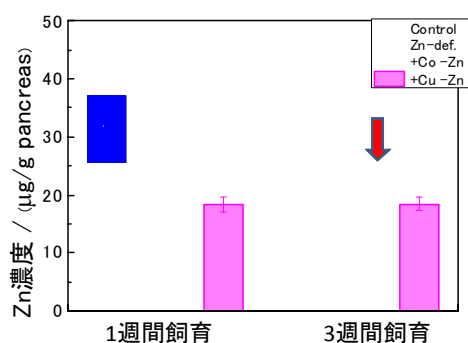


図6 すい臓中亜鉛濃度

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- (1) 矢永誠人、下山弘高、田中宏宗、世良耕一郎、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、NMCC共同利用研究成果報文集19(2012年)、査読無、2013

- (2) 矢永誠人、下山弘高、田中宏宗、池田裕亮、秋葉慎一郎、世良耕一郎、PIXE法およびINAAによる亜鉛欠乏マウス臓器中の微量元素の分析、NMCC共同利用研究成果報文集18(2011年)、査読無、2012、pp. 135-139

[学会発表] (計4件)

- ① 矢永誠人、下山弘高、田中宏宗、世良耕一郎、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、第19回NMCC共同利用研究成果発表会、平成25年5月17日、岩手医科大学(盛岡市)
- ② 矢永誠人、村松航、下山弘高、田中宏宗、亜鉛欠乏マウス臓器中の微量元素の定量とタンパク質の変化、2012日本放射化学学会年会・第56回放射化学討論会、平成24年10月5日、東京工業大学(目黒区)
- ③ 矢永誠人、下山弘高、田中宏宗、池田裕亮、秋葉慎一郎、世良耕一郎、PIXE法およびINAAによる亜鉛欠乏マウス臓器中の微量元素の分析、第17&18回NMCC共同利用研究成果発表会、平成24年5月11日、岩手医科大学(盛岡市)
- ④ 田中宏宗、下山弘高、秋葉慎一郎、池田裕亮、矢永誠人、亜鉛欠乏マウス精巣中における微量元素の定量およびタンパク質の変化、2011日本放射化学学会年会・第55回放射化学討論会、平成23年9月22日、長野市若里市民文化ホール(長野市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢永 誠人 (YANAGA MAKOTO)

静岡大学・理学部・准教授

研究者番号：10246449

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし