

ラットの血清亜鉛濃度及びアンギオテンシン変換酵素活性 に及ぼす亜鉛欠乏食摂取の影響

坂井 孝*

Effects of Zinc Deprivation on Zinc Concentration and Activity of Angiotensin Converting Enzyme in Rat Serum

Takashi Sakai*

Abstracts

The effects of dietary zinc deprivation on zinc concentration, the activity of angiotensin converting enzyme (ACE) and the ratio of apo/holo-activity of ACE (ACE ratio) in the serum of rats were examined.

The rats were fed either a zinc-deficient diet or a control diet for up to 3, 7, 14 or 21 days. Zinc concentration in the serum was measured by atomic absorption spectrophotometry. Also, the activity of ACE in the serum was measured using ACE assay kits.

There was a significant decrease in zinc concentration and of the activity of holo-ACE in the serum of rats fed a zinc-deficient diet. The ACE ratio was significantly increased in the rats deprived of dietary zinc.

These results suggested that the ACE ratio is as sensitive as the serum zinc concentration in the evaluation of zinc deficiency and can be used for the biochemical diagnosis of zinc nutritional status.

Key words

Zinc deprivation, serum zinc concentration, angiotensin converting enzyme

はじめに

亜鉛は、哺乳動物の必須微量元素である。生体内の亜鉛が欠乏すると、成長障害⁽¹⁾、味覚異常⁽²⁾、食欲不振⁽³⁾、皮膚炎⁽⁴⁾などの症状が認められる。

亜鉛の栄養状態を評価する臨床指標として、一般的に血清亜鉛濃度が用いられている⁽⁵⁾。ところが、亜鉛は生体内で恒常性機構が働いており、食事や疾患によりある程度

*さかい たかし：大阪国際大学短期大学部准教授〈2012.12.7受理〉

の影響を受けても一定に保たれることから⁽⁶⁻⁹⁾、食事からの亜鉛摂取量に単純に相関しないなど、血清亜鉛濃度による評価の精度が低いのではという議論がなされている。したがって、現在では、生体内での亜鉛栄養状態を評価できるその他の指標と総合的に評価することが望ましいとされている。これまでに我々は、血清試料以外にも毛髪を用いた評価を試みてきた⁽¹⁰⁻¹²⁾。また、亜鉛の生体機能からみた味覚試験、リンパ球遊走能、創傷治癒能なども亜鉛栄養状態を表す指標として検討されてきたが、必ずしも亜鉛栄養状態に鋭敏に反応かつ特異的であるとはいえない⁽¹³⁾のが現状である。

近年、亜鉛要求性酵素の一つであるアンギオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme : ACE, EC 3. 4. 15. 1) を用いて、亜鉛の栄養状態を評価する方法が試みられている^(14, 15)。動物実験において、Whiteら⁽¹⁶⁾やDahlheimら⁽¹⁷⁾は、亜鉛欠乏食で飼育したラットから採取した血清中に*in vitro*で無機亜鉛を添加するとACEの活性が上昇すること、また活性中心に亜鉛を持たない非活性型ACEが血清内に存在することを報告した。一方、ヒトを対象としたBakenら⁽¹⁸⁾の研究では、血清ACE活性が低下している肺がん患者は血清亜鉛濃度も低いこと、血清亜鉛濃度と血清ACE活性に有意な正の相関があることが報告されている。

そこで今回我々は、亜鉛欠乏状態における血清亜鉛濃度と血清中活性型及び非活性型ACEの活性値の関係について実験動物を用いて検討することを目的として実験を行った。

実験方法

(1) 実験動物及び食餌

実験動物は、6週齢Sprague-Dawley系雄ラットを日本SLC (静岡) より購入した。すべてのラットは購入後、実験期間終了まで、室温 20 ± 1 ℃、湿度約50%、明暗時間各12時間 (明期6:00-18:00、暗期18:00-6:00) サイクルの動物室内で、プラスチックケージにて個別飼育を行った。購入後環境馴化のため7日間予備飼育期間を設定した。予備飼育期間は、標準食及びイオン交換水は自由に摂取させた。予備飼育終了後、体重にバラつきがないよう標準食群 (C群) 及び亜鉛欠乏食群 (ZD群) に分けた。さらにそれぞれの実験食群を摂取期間3日間 (Day 3群)、7日間 (Day 7群)、14日間 (Day14群) 及び21日間 (Day21群) に分けた (各群5匹)。標準食及び亜鉛欠乏食の組成は表1に示した。標準食及び亜鉛欠乏食の亜鉛含有量は、それぞれ1gあたり $40 \mu\text{g}$ 及び $0.6 \mu\text{g}$ である。

それぞれ設定した実験期間は、亜鉛欠乏食群は亜鉛欠乏食を自由に摂取させた。一方、標準食群は亜鉛欠乏食群の平均摂取量と同量の標準食を与えた (pair-feeding法)。イオン交換水は自由摂取とした。両群の実験期間終了後、エーテル麻醉下で開腹し、下大静脈より採血を行った。採血シリンジは、事前にヘパリン処理したものを使用した。採取した血液は、直ちに遠心分離 (10,000rpm、5分間) を行い、血清を採取した。血清は分析まで -20°C で保管した。すべての動物は、「動物実験の飼養および保管に関する基準 (昭和55年3月総理府告示第6号) に従い取り扱った。

表1 食餌成分 (g/100g)

Ingredient	亜鉛欠乏食群	標準食群
Egg-white protein	20	20
L-cystine	0.3	0.3
Corn starch	39.7	39.7
Alpha-starch	13.2	13.2
Sucrose	10	10
Soy-based oil	7	7
Cellulose	5	5
Mineral mixture [§]	3.5	3.5
Vitamin mixture ^{§§}	1	1
Coline bitartrate	0.25	0.25
<i>t</i> - butylhydroquinone	0.0014	0.0014
ZnSO ₄ unhydrate	—	0.004

§; AIN-93GTM mineral mixture without ZnCO₃ obtained from the Oriental Yeast (Tokyo)

§§; AIN-93VX vitamin mixture , obtained from the Oriental Yeast (Tokyo)

(2) アンギオテンシン変換酵素活性の測定

血清中のACE活性の測定は、アンギオテンシン変換酵素活性測定キット（ACEカラー、富士レビオ（株）⁽¹⁹⁾）を用いた。血清試料50 μ lにpH8.3に調整した無機亜鉛無添加の1 mM リン酸緩衝液50 μ lを添加後、それに基質となる10mMHGHL (*p*-hydroxybenzoyl-glycyl-L-histidyl-L-leucine, pH8.3) 0.5mlを加えた。37℃、20分間インキュベートして、反応停止発色試薬（3mMEDTAと6.5mMメタ過ヨウ素酸の混合液）1.5mlを加えた。さらに37℃で3分間インキュベートした後、505nmで吸光度を測定した。この手順により測定した結果は、血清中の活性型ACE (holo-ACE) の活性値を示している⁽²⁰⁾。次に、*in vitro*で血清中に十分量の無機亜鉛を添加してからACE酵素活性を測定すると、非活性型ACE (apo-ACE) にも亜鉛が結合してholo-ACEとなり、より高い酵素活性が測定される⁽²⁰⁾。そこで、本実験では血清試料50 μ lに亜鉛濃度として終濃度が150 μ Mとなるように調整した無機亜鉛含有1 mMリン酸緩衝液 (pH8.3) 50 μ lを添加し、同様にACE活性を測定した。*In vitro*で無機の亜鉛を添加して測定したACE活性値から活性型ACEの活性値を差し引くことで非活性型ACE (apo-ACE) の活性値を求めることができる。双方で活性値を測定後、Apgar⁽²⁰⁾らの方法に準じて、次の式によりACE活性比を算出した。

$$\text{ACE活性比 (\%)} = \text{非活性型ACEの活性値} / \text{活性型ACEの活性値} \times 100$$

(3) 血清中亜鉛濃度の測定

血清中亜鉛濃度は、AA-6300型フレーム原子吸光分光光度計（島津製作所製、京都）を用いた。保存血清を1%硝酸溶液で希釈した後、検量線法及び標準添加法により測定した⁽¹²⁾。分析に使用した亜鉛標準液（100mg/l）は原子吸光用を、濃硝酸は精密分析用を和

光純薬（株）より購入した。

（４）統計処理

すべての測定結果は、平均値±標準偏差で表した。得られた結果は、統計解析アドインソフトエクセル統計2010（SSRI、東京）を用いて一元分散分析（one-way ANOVA）を行った。Tukey-Kramer法を用いて実験期間の違いについて群間比較を行った。また、同一実験期間の亜鉛欠乏食群と標準食群両群間の差については、Student's *t* test又はWelch testを行い、その有意性について確認をした。また、血清中亜鉛濃度とACE活性との関係についてはPearson相関分析を行い、相関係数を算出した。すべての統計分析は、有意水準1%（ $p < 0.01$ ）未満を有意性有りとみなした。

結 果

表2に標準食群及び亜鉛欠乏食群の血清中亜鉛濃度を示した。標準食群と比較して、欠乏3日群（ZD-Day 3群）、欠乏7日群（ZD-Day 7群）、欠乏14日群（ZD-Day14群）及び欠乏21日群（ZD-Day21群）すべてにおいて有意に低値を示した。亜鉛欠乏食群において、血清中亜鉛濃度の変化は、ZD-Day 3群とZD-Day 7群の間に有意な低下が認められ、その後ZD-Day14群及びZD-Day21群はZD-Day 7群とほぼ同じレベルであった。一方、標準食群は、実験期間における有意な変化は認められなかった。

標準食群の血清中活性型ACEの活性値は、実験期間における有意な変化は認められなかった（表2）。一方、亜鉛欠乏食群の血清中の活性型ACE（apo-ACE）の活性値は、ZD-Day21群において、他の実験期間より有意に低下した。同一実験期間において両群を比較すると、ZD-Day21群のみ亜鉛欠乏食群で有意に低値を示した。一方、ACE活性比では、標準食群及び亜鉛欠乏食群それぞれ同じレベルであった。しかしながら、同一実験期間でACE活性比を比較したところ、すべての実験期間において亜鉛欠乏群で有意に高い値を示した。

血清中亜鉛濃度とACE活性比の関係を図1に示した。血清中亜鉛濃度とACE活性比の間には有意な負の相関関係が認められた（ $r = -0.8707$ ）。

考 察

本実験において、亜鉛欠乏ラットの血清中亜鉛濃度は、標準食群と比較して有意に低値を示した。これは、血清中亜鉛濃度が生体内の亜鉛の栄養状態の評価に利用できることを示している。実際にこれまでもヒト^(5, 18)及び実験動物^(21, 22)を対象とした研究で利用されている。しかしながら、味覚異常など亜鉛欠乏症状が認められているにもかかわらず、血清中亜鉛濃度は基準値内を示した報告⁽²³⁾も少なくない。このことは、血清中の亜鉛濃度の変化は、亜鉛の栄養状態を必ずしも反映していないことを示唆しており、その理由として、血液中の亜鉛は、その約80%がアルブミンと、約18%が α_2 -マクログロブリンと結合

ラットの血清亜鉛濃度及びアンギオテンシン変換酵素活性に及ぼす亜鉛欠乏食摂取の影響

表2 亜鉛欠乏ラットの血清中亜鉛濃度、活性型アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 活性及び ACE 活性比

	Control	Zinc deficiency
<u>Zinc concentration (μ g/100ml)</u>		
Day 3	73.9 \pm 3.7	46.4 \pm 0.5 ^{*,a}
Day 7	71.6 \pm 1.7	30.8 \pm 0.5 ^{*,b}
Day 14	77.4 \pm 7.3	31.6 \pm 1.8 ^{*,b}
Day 21	71.6 \pm 6.6	32.4 \pm 3.0 ^{*,b}
<u>Holo-ACE activity (nmol/ml/min)</u>		
Day 3	33.8 \pm 2.9	23.7 \pm 2.7 ^{*,a}
Day 7	30.1 \pm 4.1	24.5 \pm 1.8 ^{*,a}
Day 14	29.7 \pm 4.3	24.6 \pm 1.1 ^{*,a}
Day 21	32.4 \pm 3.0	21.6 \pm 1.6 ^{*,b}
<u>ACE ratio (%)</u>		
Day 3	4.4 \pm 1.7	34.5 \pm 7.8 [*]
Day 7	6.0 \pm 2.3	35.8 \pm 13.6 [*]
Day 14	5.8 \pm 2.5	36.6 \pm 14.6 [*]
Day 21	8.0 \pm 3.8	37.7 \pm 6.7 [*]

データは平均値 \pm 標準偏差で示した (n = 5)

*; control v.s. zinc deficiency

a, b; 実験期間による比較、異なるアルファベットの間で有意性あり

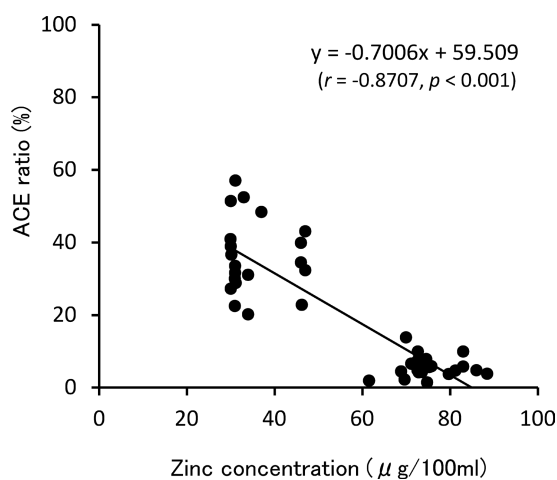


図1 血清中亜鉛濃度と ACE 活性比との関係
すべてのラットのデータをプロットした (n = 40)

しており、侵襲や炎症などの影響を受けやすい⁽²⁴⁾ことが関与しているものと推察される。

近年、ACEのような亜鉛要求性酵素を用いて亜鉛の栄養状態を評価する方法が検討されてきた。ジペプチダーゼであるACEの作用発現には亜鉛が必要であり、ACEは、高血圧の臨床診断などに用いられている酵素である^(25, 26)。これまでに、Whiteら⁽¹⁶⁾及びDahlheimら⁽¹⁷⁾が、亜鉛欠乏状態のラットの血清中には、非活性型ACEが存在すること、*in vitro*で亜鉛添加すると活性値が増加することを報告している。データは示していないが、本実験の亜鉛欠乏食群では、*in vitro*で無機亜鉛を添加して測定した活性値は、無添加時よりも高値を示した。このことから、本実験においても亜鉛欠乏状態にあるラットの血清中には非活性型ACEが増加していることが明らかとなった。さらに、本実験結果ではDay21群で標準食群より亜鉛欠乏食群で有意に低値を示していた。これは、Reevesらも⁽²⁷⁾同様の結果を示している。しかしながら、9日間の亜鉛欠乏食を摂取させたマウスの血清中亜鉛濃度は有意に低値を示したが、ACE活性は同じレベルであるという本実験結果と異なる報告もある⁽¹⁵⁾。本実験で得たACE活性は、亜鉛欠乏摂取14日間 (Day14) まではほぼ亜鉛欠乏食群と標準食群とは同じレベルで、21日間 (Day21) で有意な低下が認められていることから、実験結果の相違は、おそらく亜鉛欠乏食摂取期間や使用している実験動物の違いも関係しているものと考えられる。

血清中の亜鉛濃度とACE活性比の間に負の相関 ($r = -0.8707$) が認められた (図1) が、亜鉛濃度と活性型ACE活性値の間には明確な相関関係が認められなかった。このことは、生体における亜鉛の栄養状態を示す指標として、活性型ACEの活性値よりもACE活性比がよりの確に評価できることを意味している。つまり、我々の示した結果は、亜鉛欠乏を評価するために血清中ACE活性比が血清中亜鉛濃度と同じくらい敏感で特異的な指標であることを示している。しかしながら本実験結果では、実験開始3日目で血清中亜鉛濃度が有意に低値を示したことから、亜鉛濃度とACE活性比のどちらがより特異的に亜鉛の栄養状態を反映しているかは明らかにすることができなかった。今後、亜鉛摂取量を調整して、様々な状態の亜鉛欠乏ラットを作成し、血清中亜鉛濃度とACE活性比の関係についてデータを蓄積することにより、亜鉛の栄養状態を評価する指標の一つとして、より明確にする必要である。

まとめ

本実験において、亜鉛欠乏ラットの血清中亜鉛濃度とアンギオテンシン変換酵素 (ACE) の活性の関係について検討した結果、血清中亜鉛濃度が低下するとACE活性比が上昇すること、両者の間に有意な負の相関があることを示した。以上のことから、血清ACE活性比が亜鉛の栄養状態を評価する指標となり得る可能性が示唆された。

謝辞

本実験を遂行するにあたり、ご協力賜りました鎌倉女子大学家政学部管理栄養学科土谷

知弓先生及び鈴峯女子短期大学食物栄養学科山内有信先生に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Prasad AS *et al.*: Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia, *Am. J. Med.*, vol. 31, 532-546, 1961.
- 2) Henkin RI *et al.*: Hypogeusin corrected by Ni⁺⁺ and Zn⁺⁺, *Life Sci.*, vol. 9, 701-709, 1970.
- 3) Hambidge KM *et al.*: Trace Elements in Human and Animal Nutrition, vol. 2 (Orland), Academic Press, 1-137, 1986.
- 4) Aggets PJ *et al.*: Severe zinc deficiency. In: Mills CF, editor. Zinc in Human Biology (London), International Life Sciences Institutes, 259-279, 1986.
- 5) Lowe NM, Fekete K, Decsi T: Methods of assessment of Zinc status in humans: asystematic review, *Am. J. Clin. Nutr.*, 89, 2040S-2051S, 2009.
- 6) Jackson MJ, Jones DA, Edwards RH *et al.*: Zinc homeostasis in man: studies using a new stable isotope dilution technique, *Br. J. Nutr.*, vol. 51, 199-208, 1984.
- 7) Lee DY, Prasad AS, Hydrick-Adair C. *et al.*: Homeostasis of zinc in marginal human zinc deficiency: role of absorption and endogenous excretion of zinc, *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 122, 549-556, 1993.
- 8) Ogirima M., Kurasawa R, Kubori S *et al.*: Ratio of low serum zinc levels in elderly Japanese people living in the central part of Japan, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 61, 375-381, 2007.
- 9) Hotz C, Peerson JM, Brown KH: Suggested lower cutoffs of serum zinc concentrations for assessing zinc status: reanalysis of the second National Health and Nutrition Examination Survey data (1976-1980), *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 756-764, 2003.
- 10) Sakai T *et al.*: Changes in trace elements concentrations in hair of growing children, *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 77, 43-51, 2000.
- 11) Miki F, Sakai T. *et al.*: Measurements of zinc, copper, manganese, and iron concentrations in hair of pituitary dwarfism patients using flameless atomic absorption spectrophotometry, *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 85, 127-136, 2002.
- 12) Sakai T *et al.*: Comparative Study of Zinc, Copper, Manganese, and Iron Concentrations in Organs of Zinc-Deficient Rats and Rats Treated Neonatally with L-Monosodium Glutamate, *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 97, 163-181, 2004.
- 13) Solomons NW : Zinc and copper, In : Modern Nutrition in Health and Disease, Shils ME, Young VR (eds). Lea and Febiger, Philadelphia, 238-262, 1988.
- 14) 小林秀之：血漿アンギオテンシン変換酵素（ACE）活性を用いた亜鉛栄養状態の評価、vol. 31 (2)、65-76、1997.
- 15) 猿倉 薫子：健常成人における亜鉛栄養状態評価指標としてのACE活性比の検討－長野県一地域の健康診査受診者における検討－、vol. 69(5)、261-266、2011.
- 16) White CL, Pschorr J, Jacob ICM *et al.*: The effect of zinc *in vivo* and *in vitro* on the activities of angiotensin converting enzyme and kininase-1 in the plasma of rats, *Biochemi. Pharm.*, vol. 35, 2489-2493, 1986.
- 17) Dahlheim H, White CL, Rothmund J *et al.*: Effect of zinc depletion on angiotensin 1-converting enzyme in arterial walls and plasma of the rat. *Miner. Elec. Metab.*, vol. 15, 125-129, 1989.
- 18) Bakan N, Bakan E, Suerdem M *et al.*: Serum zinc and angiotensin-converting enzyme levels in patients with lung cancer, *Bio. Factors*, vol. 1, 177-178, 1988.
- 19) Kasahara Y, Ashihara Y: Colorimetry of angiotensin 1-converting enzyme activity in serum, *Clin. Chem.*, vol. 27, 1922-1931, 1981.
- 20) Apgar J, Everett GA: Low zinc intake affects maintenance of pregnancy in guinea pigs, *J. Nutr.*, vol. 121, 192-200, 1991.
- 21) Kotani M *et al.*: Magnesium and calcium deficiencies additively increase zinc concentrations and

- metallothionein expression in the rat liver, *Br. J. Nutr.*, vol. 9, 1-8, 2012.
- 22) Miyazaki T *et al.*: Lipopolysaccharide-induced overproduction of nitric oxide and overexpression of iNOS and interleukin-1 β proteins in zinc-deficient rats, *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 145(3), 375-381, 2012.
 - 23) Yoshida S, Endo S, Tomita H: A double-blind study of the therapeutic efficacy of zinc gluconate on the taste disorder, *Auris. Nasus. Larynx.*, Vol. 18, 153-161, 1991.
 - 24) Beisel WN, Pelarek RS: Acute stress and trace element metabolism. Ln: Pfeifer CC ed. *Neurobiology of the Acute Metals Zinc and Copper*, New York: Academic Press 53-82, 1972.
 - 25) Lanzillo JJ, Fanburg BL: Angiotensin I converting enzyme from human plasma, *Biochemistry*, vol. 16, 5491-5495, 1977.
 - 26) Beneteau-Burnat B, Baudin B: Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. *CritRev. Clin. Lab. Sci.*, vol. 28, 337-356, 1991.
 - 27) Reeves PG and O'Dell BL: An experimental study of the effect of zinc on the activity of angiotensin converting enzyme in serum. *Clin. Chem.*, vol. 31, 581-584, 1985.