

マンガン欠乏ラットにおける組織内マンガンレベルと生理的変化の関連性

西田 幹夫・森岡 明子・矢野 誠一・山口 巧・
森友 彩 (徳島大学薬学部*)・桜井 弘 (京都薬科大学**)

Physiological Alteration and Manganese Level in Tissues Obtained from Manganese-deficient Rats

Mikio NISHIDA, Akiko MORIOKA, Seiichi YANO, Takumi YAMAGUCHI, Aya MORITOMO and Hiromu SAKURAI*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima and

**Department of Analytical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University*

The effect of manganese (Mn)-deficiency was examined on the growth, fertility and function of the thyroid in the first and second generations of rats. The retarded growth became more obvious in the second generation than the first generation, whereas abnormality in gait was frequently observed in the first generation but few in the second generation. Moreover, the delayed growth in the second generation was partly overcome by the addition of Mn. These results strongly indicate that the effect of Mn-deficiency is reversible.

Virginal smear test revealed that most of female rats in the Mn-deficient group kept a normal estrus cycle, and the rest also showed the cycle with minor irregularity. Therefore, a low-frequency of pregnancy is likely due to unsuccessful mating by abnormal movements.

Thyroid function was examined because of the retarded growth; the uptake of radioiodine by the gland was substantially decreased in Mn-deficient animals and hormones in the gland tended to be retained, which caused a decrease in the peripheral thyroxine level in male rats but did not affect that in female rats, suggesting that Mn-deficiency, indeed, affects thyroid function but may have some sex differences.

必須微量元素マンガン (Mn) の役割は各種酵素の活性維持, 呼吸能の維持, 成長発育や生殖機能の維持等, 生理的に重要な部分を担っている¹⁾。従って, 体内の Mn 過剰²⁾や欠乏状態³⁾には種々の傷害

*所在地: 徳島市庄町一丁目78 (〒770)

**所在地: 京都市山科区御陵中内町5 (〒607)

が発現する。また、疾病や薬物投与によっても Mn の分布が著しく変動することが判明している。近年、我々は⁴⁾、ラットの成長発育に Mn 欠乏が如何なる影響を及ぼすかについて詳しい観察を続けてきた。従来にも、Mn 欠乏による発育不全は報告されてきたが、我々は、動物の一世代のみならず、次代への継代飼育によって Mn 欠乏の発育に及ぼす影響を観察した。このような、世代間にわたる Mn の効果を観察した報告は他には見当たらない。本実験では、① Mn 欠乏食で飼育したラットの初代と二代目の成長曲線の比較を行い、加えて、主要臓器内 Mn 分布の変化を比較した。② Mn 欠乏による繁殖機能低下の原因を探るために雌ラットの性周期を調査した。③ 運動障害及び成長遅延の原因を究明する目的で甲状腺機能をテストした。

実 験 方 法

1) Mn 欠乏ラットの形成

出生後約一週間の新生仔を親ごと、Mn 欠乏食 (0.09ppm, 日本農産製, 注: 通常食50ppm 含有) に切り替え、発育させた群を Mn 欠乏初代とした。一定の間隔で体重測定を行い、この群のなかから雄、雌を選び、交配させて、Mn 欠乏二代目群を作成した。

2) Mn 分析

各群のラットの臓器を採取し、常法⁵⁾に従い放射化分析 (京都大学原子炉実験所共同利用計画) を行った。

3) 組織像の解析

膣脂膏テスト及び臓器の組織像の解析は、常法⁶⁾に従って試料を作成し、光学顕微鏡による観察を行った。

4) 甲状腺機能の測定

甲状腺によるヨード摂取能のテストは Halmi 等⁷⁾の方法により行い、組織内ヨード代謝は先に報告した方法に従った。

結 果

1) 外観の異常及び体重曲線上の変化

Mn 欠乏動物の外観観察により、初代群の中に、歩行時に体を傾ける、首を上下に振る、一方向に円周運動を繰り返す等異常な運動をする個体が複数現れた (ビデオテープに収録)。しかし、第二代目では、異常行動を示すラットの数及びその症状の程度が初代よりも減少した (データ省略)

初代及び第二代の成長曲線を Fig. 1 に示した。雄、雌ともに、初代では Mn 欠乏の影響は顕著でなかった。しかし、第二代目になると Mn 欠乏群の成長に明らかな遅れが認められた。

2) Mn の臓器内分布の変化

Table. 1 では、初代及び第二代目の Mn 欠乏群の臓器内 Mn と、コントロール群の臓器内 Mn 分布を比較した。初代では、いずれも Mn 欠乏食を与えた群の臓器内 Mn 量は減少した。しかし、第二代目では、むしろコントロール群と比較して Mn 含量が増加した臓器が現れた。腎臓、肺臓、胸腺、大脳がこ

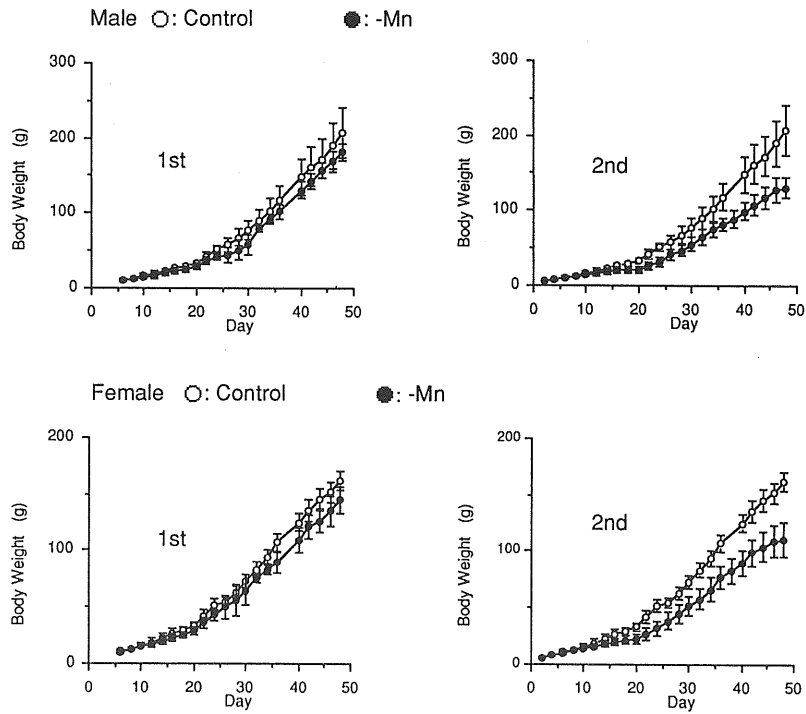


Fig. 1. Effect of Mn-deficiency on body weight of rats in two generations

Numbers of animal in each group were 4 for 1st and 2nd generations in control males, and 5 for 1st and 7 for 2nd generations in Mn-deficient males, whereas 7 animals were in all groups of control and Mn-deficient females. Values represent the mean \pm SD.

Table 1. Mn Contents in Organs Obtained from 1st and 2nd Generations of Mn-Deficient Rats.

Organ	1st Generation			2nd Generation		
	Control (A)	Mn-Deficient (B)	Ratio (A/B)	Control (A)	Mn-Deficient (B)	Ratio (A/B)
Liver	64.7	11.1	5.8	64.3	10.2	6.3
Kidney	38.7	16.1	2.4	20.7	59.8	0.35
Spleen	13.5	4.2	3.2	7.1	1.9	3.7
Pancreas	85.3	11.8	7.2	39.8	11.9	3.3
Testis	19.0	17.8	1.1	15.1	5.7	2.6
Heart	31.5	2.4	13.1	13.3	6.1	2.2
Lung	16.0	6.0	2.7	5.8	13.6	0.43
Thymus	11.8	9.3	1.3	1.9	2.2	0.86
Brain	21.3	8.7	2.5			
Cerebrum				11.3	25.8	0.44
Cerebellum				23.6	18.6	1.3
Blood	0.1	0.0	—	—	—	—
Serum	nd	nd	—	—	—	—

Mn: nmol/gr. protein

れに相当する。

3) 性周期におよぼす影響

Mn 欠乏は動物の繁殖力を低下させると考えられているので⁸⁾、その原因を探る目的で、雌成熟ラットについて膣脂膏テストを施した。Mn 欠乏群 6 匹中、周期が正常な個体は 4 匹、不規則な個体は 2 匹であった。異常行動を示す個体でも性周期は正常であった。妊娠率はコントロール群 3 匹全てが妊娠して 100%であったが、Mn 欠乏群は 10 匹中 5 匹が成功し、50%にとどまった。

4) 甲状腺機能への影響

Mn 欠乏により、運動障害や成長遅延が生じるので、組織の分化、発達を促進する甲状腺の生理機能状態を検討した。甲状腺のヨード摂取能は明らかに Mn 欠乏群で低下した (Fig. 2)。次いで、甲状腺内ヨード代謝産物の動態を検討した結果 (Table. 2)、組織に取り込まれた無機ヨードの有機化反応 (ホルモン合成への変化) がやや阻害されていること、及び、合成されたホルモンが、甲状腺内に滞留している傾向を示した。

甲状腺組織像の観察結果は、濾胞細胞の背丈が高くなり、弱いながらも機能亢進像を呈していた (データ省略)。血中のサイロキシン濃度は、雄ラットで低下し、雌では変化を認めなかった (Fig. 3)。

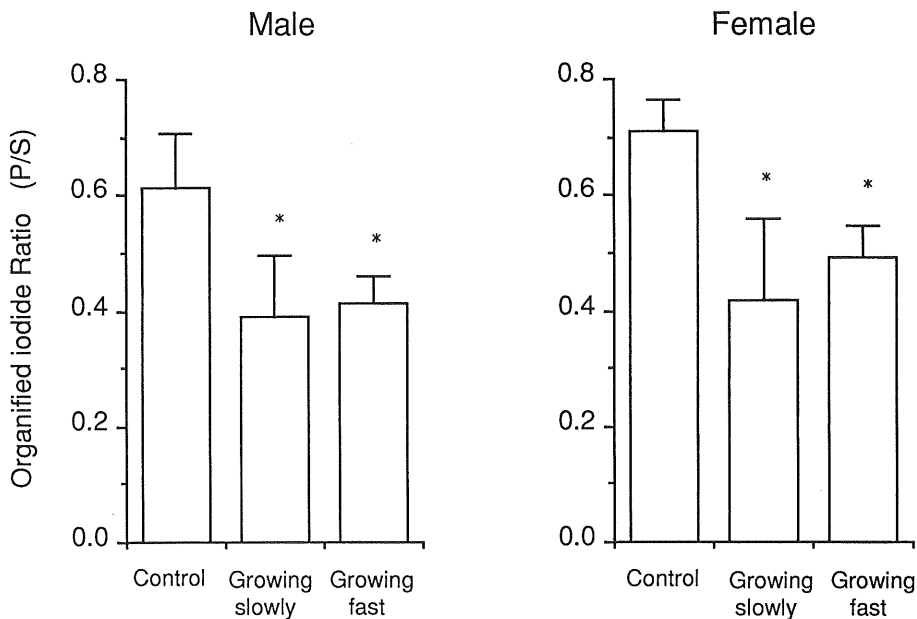


Fig. 2. Effect of Mn-deficiency on iodide-organification in rat thyroid

Animals in Mn-deficient group were classified in two sub-groups according to their growth rate; "growing slowly" was affected by Mn-deficiency more significantly than "growing fast".

Numbers of animal; 7 animals were in all groups, except for 5 in the growing slowly of male rats. Values are the mean \pm SD. *: $p < 0.01$.

Table 2. Radioiodide distribution in thyroid hydrolysates

Group	Ratio (%) to the total radioactivity							
	I ⁻	MIT	DIT	DIT/MIT	T ₄	T ₃	T ₄ + T ₃	T ₄ + T ₃ /DIT+ MIT
Male								
Control n =7	0.018 ±0.005	0.255 ±0.030	0.450 ±0.040	1.72 ±0.24	0.031 ±0.003	0.031 ±0.016	0.054 ±0.014	0.077 ±0.022
Grow slowly n =5	0.050** ±0.005	0.290 ±0.058	0.455 ±0.051	1.66 ±0.55	0.055** ±0.002	0.045 ±0.011	0.100** ±0.012	0.157** ±0.024
Grow fast n =7	0.053** ±0.009	0.293 ±0.041	0.467 ±0.028	1.63 ±0.33	0.050** ±0.006	0.046 ±0.020	0.097** ±0.018	0.151* ±0.045
Female								
Control n =7	0.017 ±0.005	0.218 ±0.013	0.471 ±0.028	2.18 ±0.01	0.038 ±0.003	0.024 ±0.008	0.063 ±0.009	0.091 ±0.014
Grow slowly n =7	0.060** ±0.013	0.222 ±0.054	0.489 ±0.045	2.33 ±0.62	0.043 ±0.012	0.042* ±0.010	0.090** ±0.011	0.127** ±0.016
Grow fast n =7	0.063** ±0.016	0.252 ±0.028	0.461 ±0.023	1.90 ±0.29	0.046 ±0.014	0.031 ±0.018	0.110* ±0.025	0.155* ±0.034

The values represent the mean ± SD. *, p < 0.01, **, p < 0.001

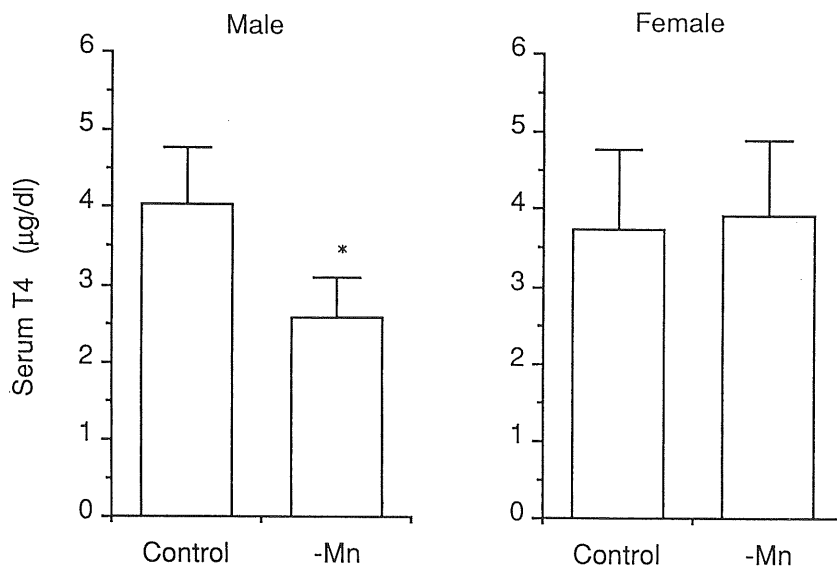


Fig. 3. Effect of Mn-deficiency on serum thyroxine level in rats
Thyroxine was determined by radioimmunoassay procedure. Values are the mean ± SD of at least 7 samples. *, p < 0.01.

考 察

Mn 欠乏の影響が全身的にいつ頃から発現し始めるか議論が別れるところである。本実験では、Mn 欠乏食を与えた初代に多くの運動障害が現れた。しかし、第二代目では、むしろ異常行動を示す個体が減少した。また、運動障害の発現には再現性に欠けた（データ省略）。したがって、異常行動等、運動障害には Mn 欠乏以外の因子の共存を考慮しなくてはならない。実験前の期待は、継代飼育により一層 Mn 欠乏が著しくなり、その影響が顕著になるものと予測したが、結果はそれを裏付けなかった。Table. 1 の主要臓器 Mn 分布では、Mn の変動幅が第二代目でむしろ減少しており、先の異常行動発現の傾向と一致している。こうした事実は、動物が厳しい Mn 欠乏状態におかれた際、本能的に代償的な恒常性を保持する機能を発揮する結果であろうと推定できる。また、第二代目の成長曲線 (Fig. 1) が雄、雌ともに、遅延の傾向を示したが、これに適切な量の Mn を添加すると、成長曲線が上向きに転じることを確認した。すなわち、少なくとも、第二代目までの Mn 欠乏による体重に及ぼす影響は可逆的である。

Mn 欠乏群では、明らかに繁殖力が低下していることが分かり、これは従来の報告とも一致している⁸⁾。しかしその原因は未だ明らかにされたとはいえない⁹⁾。本実験では、雌ラットの性周期を測定した。Mn 欠乏群の雌は、いずれも性周期を認め妊娠可能であると判断した。この結果は、性周期が欠如するという従来の報告と一致しない⁸⁾。異常行動を示す雌ラットにも性周期が観察できたが、この個体は交配が成立しなかった。その原因は、せわしく動き回る運動のため、交配のポーズがとれないことによるものと推定した。

Mn 欠乏の第二代目は体重の伸びが劣っていたので、成長、発育を司る甲状腺機能を調査した。第二代目 Mn 欠乏群のヨード摂取能は、成長の遅い群、余り成長に影響を認めない群ともに、著しい低下を示した。しかしながら、一旦甲状腺内に取り込まれたヨードの代謝像は重篤な障害を受けている徴候を認めなかった。僅かにホルモンの組織内貯留の傾向があり、それが、雄の場合血中ホルモンの減少となって現れたと推定されるものの、雌では、血中ホルモンの減少はなく、現時点では十分に説明できない。Mn 欠乏によって、甲状腺の濾胞細胞がやや刺激を受けた組織像を呈した結果の解釈を含め、今後の検討課題である。

謝辞：本研究は京都大学原子炉実験所共同利用研究計画に基づいて行われた。

文 献

- 1) MENA, I. (1981): Manganese in Disorders of Mineral Metabolism, ed by Breoner, F. and Coburn, J.W. Academic Press, New York, Vol. 1. p.233
- 2) NISHIDA, M., H. YAKUSHIJI, J. KAWADA, H. SAKURAI and J. TAKADA (1990) Biochem. Inter. 23 : 307
- 3) BALY, D.L., J.S. SCHNEIDERMAN and A.L. GARCIA-WELSH (1990) J. Nutr. 120 : 1075
- 4) NISHIDA, M., H. SAKURAI, U. TEZUKA, J. KAWADA, M. KOYAMA and J. TAKADA (1990) Clin. Chim. Acta 187 : 181

- 5) SAKURAI, H., M. NISHIDA, T. YOSHIMURA, J. TAKADA and M. KOYAMA (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 841 : 208
- 6) 平岩馨邦, 内田昭章, 吉田博一 (1960) シロネズミの発生・解剖・組織, 中山書店, 東京 : p.15
- 7) HALMI, N.S., B.N. SPIRTOS, E.M. BOGDANOVE and H.J. LIPNER (1953) *Endocrinol.* 52 : 19
- 8) BOYER, P.D., J.H. SHAW and P.H. PHILLIPS (1942) *J. Biol. Chem.* 143 : 417
- 9) 日本化学会訳編 (1975) 7. マンガン, 微量元素-栄養と毒性- p.190 丸善