

哺乳動物における低亜鉛状態の体細胞および配偶子細胞に 及ぼす細胞遺伝学的影響

渡 辺 敏 明

山形大学医学部衛生学教室*

Cytogenetic Effects of Zinc Deficiency on Mitotic and Meiotic Cells in Mammals

Toshiaki WATANABE

Department of Hygiene and Preventive Medicine, Yamagata University School of Medicine, Yamagata

The cytogenetic effects of short-term zinc deficiency on bone marrow cells and unfertilized oocytes were studied in rodents. Simultaneously, the susceptibility to mutagens in the zinc-deficient state was examined *in vivo*.

Male mice were given control or zinc-deficient diet for 4 weeks. The incidence of sister chromatid exchanges (SCE) of bone marrow cells in zinc-deficient mice was 11.4 ± 1.0 , which was different from 6.9 ± 1.7 in control mice. There was a dose response with respect to SCE frequencies in the mitomycin C (MMC)-treated groups. The MMC-induced SCE were additively increased in zinc-deficient mice. However, no differences in mitotic chromosome aberrations and cell cycle kinetics were not found among groups. There may be a fundamental relationship between the induction of SCE and the disturbed zinc metabolism.

In female hamsters given zinc-deficient diet for 8 days (2 estrous cycles), the mean number of ovulated oocytes (11.6 ± 1.6) was decreased significantly compared with 14.1 ± 1.6 for the controls. However, no apparent increases of degenerated oocytes and meiotic chromosome aberrations were encountered in both hamsters. The increase in diploid oocytes was the most prominent effect in cadmium-treated hamsters. However, there was no difference in the incidence of diploid oocytes between control and zinc-deficient hamsters. These findings indicate a possible inhibitory effect of zinc deficiency on ovulation.

亜鉛は微量元素の一つであり、生体内において種々の生理機能を維持するために重要な役割を果た

*所在地：山形市飯田西2-2-2 (〒990-23)

している¹⁾。そのため、生体内の亜鉛レベルが低下したり、欠乏したりすると、動物の成長や性成熟の抑制がみられるばかりでなく、皮膚障害、脱毛や骨の異常などの特徴的な症状が出現することが知られている。また、亜鉛は免疫機能や細胞の増殖・分化を維持するためにも必要とされている。

母体が妊娠中に低亜鉛状態になると、胎仔の発育遅延や外脳症などの重篤な形態異常が誘発される^{2,3)}。また、亜鉛欠乏ラットにおいては、着床前の受精卵に卵割や胞胚形成の異常が報告されている⁴⁾。我々は、これまでに、妊娠マウスを用いて、胎仔に形態異常が誘発しない亜鉛不足状態において、重金属の胎仔への影響が増強されることをみいだした⁵⁾。また雌性マウスでは、亜鉛欠乏状態になると、変性卵が増加したり、未受精卵に染色体異常が高率にみられた。一方、雄性マウスでは、亜鉛欠乏状態になっても、精祖細胞や精原細胞に染色体異常の増加はみられなかった。しかし、精子に種々の形態異常が増加することを観察した⁶⁾。

本研究においては、マウスの骨髄細胞およびハムスターの未受精卵における生体内低亜鉛状態の細胞遺伝学的影響を検索した。

実験方法

実験に使用した動物は、市販のJcl/ICR マウス（日本クレア(株)）およびゴールデンハムスター（Std: Syrian）（日本エスエルシー(株)）である。これらの動物は、温度および湿度が自動制御されている動物飼育室で飼育した。

生後4週齢の雄性マウスに低亜鉛飼料を与え、4週間飼育した。その後5-bromodeoxyuridine (BrdU) $5 \times 10^{-2} \text{M}$ および deoxycytidine $2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ を1時間ごとに10回腹腔内投与した。屠殺2時間前にコルヒチンを腹腔内に投与し、骨髄細胞の染色体標本を空気乾燥法によって作成した。さらにFPG（蛍光色素+ギムザ）法に従って、姉妹染色分体の分染を行い、姉妹染色分体交換（SCE）頻度を分裂中期像あたりで計数した。分染パターンの違いから、第1分裂中期（M1）、第2分裂中期（M2）、第3分裂中期（M3）を判別し、それぞれの割合から細胞分裂周期を算出した。また分裂細胞の割合を分裂指数（mitotic index）として算出した。

一方、雌ハムスターは低亜鉛飼料で1週間（2性周期）以上飼育した後、膣分泌液によって発情期にある個体を確認した。翌朝、卵管から排卵直後の未受精卵を採取し、hyaluronidase 処理によって顆粒膜細胞を取り除いた。形態的に異常のあるものを変性卵とし、染色体分析には供しなかった。卵子の染色体標本はTarkowski法を改良した方法によって作成した。減数分裂の第2分裂中期にある染色体像を観察し、染色体異常の有無を調べた。

動物はステンレス網の中敷を入れたプラスチックケージの中で、ケージあたり2匹を同居させて飼育した。低亜鉛飼料は粉末の精製飼料（TD80325, Teklad Test Diets, Madison, USA）で、その組成はTable 1に示したとおりである。この飼料に炭酸亜鉛 89.3mg/kg を添加したものを対照飼料とした。また飲料水としては蒸留水を用い、飼料と飲料水は自由に与えた。

同時に低亜鉛状態の化学物質への感受性についても観察するため、一部のマウスには、BrdU投与8時間後、既知の突然変異原である mitomycin C (MMC) あるいは4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) を1

Table 1. The composition of the basal diet¹

Ingredient	Amount (g/kg)
Zinc-deficient diet	
Spray-dried Egg white solid	200.0
Dextrose	632.2
Corn oil	100.0
Nonnutritive cellulose fiber	30.0
Mineral mix (without zinc)	26.2
Vitamin mix	10.0
L-tryptophan	1.6
Biotin	0.004
Zinc-control diet	
Zinc carbonate	0.0893

¹TD 80325, Teklad Test Diets, USA

回腹腔内投与し、あるいはX線を全身照射した。またハムスターには、カドミウムを屠殺12時間前に腹腔内投与した。

実験結果

マウス骨髓細胞における低亜鉛状態の細胞遺伝学的影響をまとめたものがTable 2およびTable 3で

Table 2. SCE frequencies and cell cycle kinetics of bone marrow cells in zinc-deficient mice *in vivo*

	No. of females	SCE frequencies	No. of metaphases			Mitotic index
			M1	M2	M3	
Control						
0 (untreated)	4	6.9±1.7 ^a	0.27	0.69	0.05	0.039
MMC 0.5mg/kg	3	9.3±0.3 [†]	0.28	0.69	0.03	0.049
MMC 2.5mg/kg	4	16.5±2.4 [†]	0.37 [†]	0.60	0.03	0.046
X-ray 1Gy	4	10.2±1.8 [†]	0.45 [†]	0.54	0.02	0.045
4NQO 50mg/kg	3	15.7±1.4 [†]	0.18	0.76	0.05	0.045
Zinc deficiency						
0 (untreated)	7	11.4±1.0 [*]	0.25	0.73	0.02	0.046
MMC 0.5mg/kg	4	14.4±1.0 ^{*,†}	0.23	0.74	0.03	0.039
MMC 2.5mg/kg	5	21.0±3.2 ^{*,†}	0.40 [†]	0.59	0.01	0.032
X-ray 1Gy	4	11.8±3.0	0.41 [†]	0.57	0.02	0.038
4NQO 50mg/kg	3	16.7±2.4 [†]	0.29	0.68	0.04	0.040

^amean ± S.D.[†]p < 0.05, compared with the untreated group.^{*}p < 0.05, compared with the similarly treated group of the control mice.

Table 3. Chromosome aberrations of bone marrow cells in zinc-deficient mice in vivo

	No. of females	No. of metaphases	No. of chromosome aberrations	
			numerical anomalies	structural anomalies
Control				
0 (untreated)	4	200	2 (1.0) ^a	3 (1.5) ^a
MMC 0.5mg/kg	3	150	0 (0.0)	6 (4.0)
MMC 2.5mg/kg	4	175	6 (3.4)	14 (8.0) [†]
X-ray 1Gy	4	175	5 (2.9)	32 (18.3) [†]
4NQO 50mg/kg	3	150	0 (0.0)	3 (2.0)
Zinc deficiency				
0 (untreated)	7	350	5 (1.4)	12 (3.4)
MMC 0.5mg/kg	4	200	2 (1.0)	14 (7.0) ⁺
MMC 2.5mg/kg	5	250	4 (1.6)	26 (10.4) [†]
X-ray 1Gy	4	150	3 (2.0)	18 (12.0) [†]
4NQO 50mg/kg	3	125	2 (1.6)	3 (2.4)

^apercentage.[†]p < 0.05, ⁺p < 0.1, compared with the untreated group.

ある。低亜鉛マウスにおける無処理群の SCE 頻度は平均11.4であり、対照マウスの無処理群での平均6.9と比べ、有意に増加した。一方、MMC (0.5mg, 2.5mg/kg) 投与群での SCE 頻度は、対照マウスでは平均9.3, 16.5と投与量に依存して増加した。低亜鉛マウスでは平均14.4, 21.0と、対照マウスに比べ付加的に増加した。しかしながら、4NQO 投与群および X 線照射群での SCE 頻度は、対照マウスでは有意に増加したが、低亜鉛マウスでは無処理群と同程度であった。細胞分裂周期は、両飼育マウスとも、MMC 投与群および X 線照射群で延長がみられた他に、相違は認められなかった。また、染色体異常頻度および分裂指数は、各処理群とも両飼育マウスで、有意な差は観察されなかった。

Table 4 は雌ハムスターにおける低亜鉛状態とカドミウムの生殖生理機能への影響をみたものである。低亜鉛ハムスターにおける回収卵数は平均11.6個と対照ハムスターの平均14.1個と比べ有意に減少した。しかし、変性卵はまったく観察されなかった。カドミウム (1.0mg/kg) を投与すると、対照ハムスターでも回収卵数の減少 (平均8.6個) と変性卵数の増加 (5.3%) がみられた。しかし、これらの変化は、低亜鉛状態にしてもあまり増強されなかった。

ハムスター卵子の減数分裂の第2分裂中期において、低亜鉛状態とカドミウムの細胞遺伝学的影響をみたものが Table 5 である。低亜鉛ハムスターの卵子における異数性 (n-1, n+1) および構造的異常の頻度は、対照ハムスターのそれと比べ増加はしていなかった。一方、対照ハムスターでカドミウムを投与した場合には、異数性異常および構造異常の頻度に変化はみられなかったが、二倍体 (2n, n+n) の異常が約30%と高率にみられた。しかし、二倍体の出現頻度は低亜鉛ハムスターでもほとんど変わらなかった。

Table 4. Reproductive effects of dietary zinc-deficiency on female hamsters

CdCl ₂	No. of females	No. of oocytes	
		recovered	degenerated
Control			
0 (untreated)	15	211 (14.1±1.6) ^a	0
1.0	11	94 (8.6±2.8) [†]	6 (5.3) ^b
2.0	10	89 (8.9±2.6) [†]	5 (5.6)
4.0	8	40 (5.0±2.4) [†]	3 (7.5)
Zinc deficiency			
0 (untreated)	28	326 (11.6±1.6) [*]	0
1.0	10	104 (10.4±2.6) [*]	1 (1.0)
2.0	8	52 (6.5±3.2) ^{*†}	5 (9.6)
4.0	13	70 (5.4±2.6) [†]	2 (2.9)

CdCl₂, mg/kg body weight.^amean ± S.D.^bpercentage.[†]p < 0.05, compared with the untreated group.^{*}p < 0.05, compared with the similarly treated group of the control hamster.**Table 5.** Cytogenetic effects of dietary zinc-deficiency on metaphase II-oocytes in hamsters

CdCl ₂	No. of females	No. of oocytes analyzed	No. of oocytes with chromosome aberrations					
			numerical anomalies				structural anomalies	
			n-1	n+1	2n	anaphase I	gap	other
Control								
0 (untreated)	15	148	3	1	0	0	1	0
1.0	11	65	0	1	12 (18.5) ^{a,†}	2	0	0
2.0	10	64	1	2	19 (35.2) [†]	3	0	0
4.0	8	30	1	1	11 (36.7) [†]	0	0	1
Zinc deficiency								
0 (untreated)	28	205	3	2	2 (1.0)	0	2	0
1.0	10	63	2	0	2 (3.2)	0	0	0
2.0	8	31	0	1	13 (41.9) [†]	1	1	0
4.0	13	52	2	1	19 (36.5) [†]	0	1	0

CdCl₂, mg/kg body weight.^apercentage.[†]p < 0.05, compared with the untreated group.

考 察

SCE の生物学的意義はよく分かっていないが、SCE の形成には DNA の障害と修復が関与していると考えられている。一方、亜鉛は superoxide dismutase (SOD) の成分として、フリーラジカルを除去し

たり、membrane stabilizer としての役割を果たしている⁷⁾。このため、生体内亜鉛が欠乏すると過酸化水素やフリーラジカルによる過酸化作用を受け易くなり、DNA や膜の形成が障害されてくることが推測される。またDNA 合成に関与している thymidine kinase や DNA polymerase も亜鉛のメタロエンザイムである。このため、亜鉛が低下するとこれらの活性も低下する。このように亜鉛は、生体防御、細胞分裂や DNA 合成において重要な役割を果たしていることが考えられる。今回の結果では、低亜鉛状態によってマウス骨髄細胞の SCE 頻度が増加することが観察された。しかし、遺伝性亜鉛欠乏の仔ウシでは末梢リンパ球の SCE 頻度はむしろ減少していることが報告されている⁸⁾。このようなことから低亜鉛状態でみられる体細胞での SCE 頻度の変化は、亜鉛の低下による代謝の変化と関連があるのかもしれない。

雌性マウスを今回と同じ方法で低亜鉛状態にした場合に、卵子形成では卵子に染色体異常が誘発された。また精子形成では精母細胞などに染色体の異常は観察されなかったが、精子数が減少し、精子に形態異常が高率に認められた。一方、著者らのこれまでの観察ではハムスターに2週間低亜鉛飼料を与えると、血清の亜鉛レベルは対照の半分以下に低下する⁹⁾。しかし低亜鉛ハムスターでは、マウスとは異なり、卵子に染色体異常の増加は観察されなかった。これは卵子の低亜鉛状態への感受性に動物種差や性差があるのかも知れない。Bell ら¹⁰⁾ は、亜鉛欠乏ラットの体細胞（骨髄および肝臓）において、断裂や切断などの構造異常が増加することを報告している。これらの染色体異常は亜鉛欠乏による DNA や RNA 合成の阻害によることを示唆している。しかしながら、著者らの観察では低亜鉛状態によって、配偶子細胞ばかりでなく、骨髄細胞にも染色体の構造異常や数的異常の増加は認められていない。

今回の観察では、低亜鉛ハムスターで回収卵数の減少がみられた。これは低亜鉛マウスでの結果と一致している⁶⁾。亜鉛が排卵にどのように関与しているのかあまり明らかではない。これまでに性ホルモン投与によって血清亜鉛レベルが変動することが知られている。著者らの観察では、血清亜鉛レベルは日内変動するばかりでなく、排卵前後で変動パターンが異なっている⁹⁾。対照ハムスターでは排卵時に血清亜鉛レベルが低くなるのに対して、低亜鉛ハムスターでは排卵前夜に高くなっている。このことは排卵に亜鉛が必要であることを示している。また亜鉛欠乏動物ではホルモン（FSH, LH）の合成や分泌が障害されている^{11,12)}。このように亜鉛は排卵や内分泌機能と関わっていることが考えられる。とくに雌性動物においては亜鉛が低下すると、卵子形成や排卵などの卵子の成熟が影響されるのかもしれない。最近、亜鉛が卵子や初期胚の細胞膜の構造や機能に影響し、膜の透過性を変化させることが報告されている^{13,14)}。これによって卵子の成熟や発育異常の起こることが示唆されている。今後、生体内の亜鉛レベルとホルモンや酵素活性などとの関連について検討する予定である。

以上のように、哺乳動物において、生体内低亜鉛状態の細胞遺伝学的影響が認められたが、突然変異原に対する修飾作用は明らかではなかった。また亜鉛は排卵や精子形成などの生殖生理機能の維持にも不可欠であることが示唆された。

文 献

- 1) Prasad, A. S., D. Oberleas and D. Koniuch (1974) J. Lab. Clin. Med. 84 : 634.

- 2) Hurley, L. S. (1980) Trace elements II : manganese and zinc. in *Developmental Nutrition*, Prentice-Hall, New Jersey : pp.199-227.
- 3) Record, I. R. (1987) *Neurotoxicol.* 8 : 369.
- 4) Peters, J. M., L. M. Wiley, S. Zidenberg-Cherr and C. L. Keen (1991) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198 : 561.
- 5) Sato, F., T. Watanabe, E. Hoshi and A. Endo (1985) *Teratology* 31 : 13.
- 6) Watanabe, T., F. Sato and A. Endo (1983) *Yamagata Med. J.* 1 : 13.
- 7) Riordan, J. F. (1977) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 7 : 119.
- 8) Bosma, A. A., B. M. J. L. Mannaerts, N. A. de Haan and J. Kroneman (1988) *Vet. Quart.* 10 : 230.
- 9) Shimada, T., T. Watanabe and A. Endo (1978) *Experientia* 36 : 971.
- 10) Bell, L. T., M. Branstrator, C. Roux and L. S. Hurley (1975) *Teratology* 12 : 221.
- 11) Gombe, S., J. Apgar and W. Hansel (1973) *Biol. Reprod.* 9 : 415.
- 12) Root, A. W., G. Duckett, M. Sweetland and E. O. Reiter (1979) *J. Nutr.* 109 : 958.
- 13) Record, I. R., R. S. Tulsi, I. E. Dreosti and F. J. Fraser (1985) *Teratology* 32 : 397.
- 14) Harding, A. J., I. E. Dreosti and R. S. Tulsi (1988) *Life Sci.* 42 : 889.