

亜鉛欠乏ラットに対する2 ATA酸素曝露の影響

永木由佳¹⁾, 野寺誠¹⁾, 佐藤真喜子²⁾, 宮崎孝²⁾,
荒木隆一郎²⁾, 富永信子³⁾, 柳澤裕之⁴⁾

(¹⁾埼玉医大・保健医療学部健康医療科学科*, (²⁾埼玉医大・地域医学・医療センター**,

³⁾埼玉医大・中央研究施設実験動物***, (⁴⁾東京慈恵医大・環境保健医学****)

Effect of Oxygen Exposure at 2 ATA in Zinc-deficient Rat Models

Yuka EIKI¹⁾, Makoto NODERA¹⁾, Makiko SATOH²⁾, Takashi MIYAZAKI²⁾,
Ryuichiro ARAKI²⁾, Nobuko TOMINAGA³⁾ and Hiroyuki YANAGISAWA⁴⁾

¹⁾*School of Medical Technology and Health, Faculty of Health and Medical Care, Saitama Medical University*

²⁾*Community Health Science Center, Saitama Medical University*

³⁾*Division of Laboratory Animal Medicine, Faculty of Medicine, Saitama Medical University*

⁴⁾*Department of Public Health and Environmental Medicine, Faculty of Medicine, The Jikei University*

Summary

Zinc (Zn) is an essential trace element and a cofactor of over 300 enzymes. Various symptoms such as growth retardation and dermatitis are associated with Zn deficiency. In recent years, it has been suggested that Zn deficiency causes alteration in the biological defense system. To investigate effects of Zn deficiency on lungs, we examined morphological changes and expression of TNF- α mRNA in the lung tissue after high pressure exposure to oxygen.

In the present study, two special diets were prepared; a Zn deficient diet and a standard diet (0.01 % Zn). Seven-week-old SD strain male rats were fed either on a Zn deficient (Zn-D group, n = 16) or a standard (Control group, n = 16) diets for 5 weeks. Eight of 16 Zn-D rats and 8 of 16 Control rats were exposed to 2 ATA pure oxygen for 5 hours (ZnD-O₂ and Control-O₂ groups). Then, determination of the number of white blood cells (WBC) and serum CRP level, histopathological examination of lung tissue and detection of TNF- α expression in the tissue were carried out.

Severe pathological changes such as congestion, destruction of alveoli and the appearance of inflammatory cells were seen in ZnD-O₂ rats, suggesting that Zn deficiency reduces the threshold level of oxygen toxicity in the pulmonary tissue. On the other hand, increase in TNF- α mRNA was not detected in ZnD-O₂ animals, although severe damage in the lung was observed. Further studies including localization of TNF- α mRNA expression within the tissue are required to clarify the mechanism of the synergistic effects of Zn deficiency on the lung lesions caused by inhalation of high pressure oxygen.

*所在地：埼玉県日高市山根1397-1 (〒350-1241)

**所在地：埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 (〒350-0495)

***所在地：埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 (〒350-0495)

****所在地：東京都港区西新橋3-25-8 (〒105-8461)

亜鉛 (Zn) は、300種類以上の酵素活性に関与するなど、生体にとって不可欠な微量元素である。Zn欠乏時には、成長障害や味覚異常、脱毛、皮膚炎、生殖能低下など多様な症候がみられることが知られている¹⁾。しかしながら、Znの存在量は微量であり、しかも生体内に広く分布しているため、Znの役割や欠乏時にみられる症候の機序には不明な点が多い。Znは生体防御にも関与していることが知られている。Zn欠乏状態では感染に対する抵抗性が低下することが指摘されている。また、Zn欠乏時には、胸腺は萎縮する。これは、Zn供給が減少すると速やかに胸腺細胞がapoptosisを起こすことに起因する¹⁾。しかしながら、これらの現象とZn欠乏時にみられる易感染性など生体防御機構の変化との関与についても、詳細は明らかにされていない。

ある種の呼吸・循環器障害では高分圧酸素呼吸を長期間にわたり継続する必要がある。また、一酸化炭素中毒や空気塞栓症 (air embolism) の治療では、高気圧環境下で100%酸素を呼吸する高圧酸素療法 (HBO)²⁾ が行われる。これらの場合、酸素中毒が起らないように曝露条件が考慮されている。栄養摂取状態などの要因でZn欠乏もしくは亜欠乏状態にある場合、健康人に比して感染等に対する抵抗性が低下している可能性がある。このような状態にある患者が高分圧酸素呼吸を行うと、その副作用が強まる可能性がある。さらに、高分圧酸素呼吸時には、肺は過剰なoxygen free radicalに曝露されることになる。Cu-Zn SOD (Super Oxide Dismutase : SOD) はZn酵素である。したがって、Zn欠乏状態になると、その活性に影響を及ぼす可能性がある。もし、Zn欠乏によりSOD活性が低下するならば、酸素呼吸時の肺への悪影響はさらに増強されることが予想される。

Zn欠乏の肺における生体防御機構への影響を明らかにするため、ラットを用いてZn欠乏モデルを作製し、肺の変化を病理組織学的、生化学的に検証した。さらに、本研究ではZn欠乏モデルに高圧酸素曝露を行い、その変化についても調べた。

実験方法

Zn欠乏食と標準食の2種類の特別食を用意した³⁾。標準食はZn欠乏食100 g当たり10 mgのZnを添加したものである。体重105 g～115 gの7週齢SD系雄ラットを使用した。これらを個別ケージに入れ、Zn欠乏食または標準食で5週間飼育した。飼育期間中、体重変化と皮膚症状発現の有無を観察した。飼料は1日1回、いずれのラットにも同量与え、すべてのラットが同一カロリーを摂取するようにした。飲水には蒸留水を用い、自由摂取とした。Zn欠乏食で飼育したラットをZn欠乏群 (ZnD)、標準食で飼育したラットをコントロール群 (Control) とした。ZnD中の8匹とControl中の8匹は、高圧タンク内に入れ、2 ATA (atmosphere absolute) にて5時間、100%酸素で加圧した (Fig. 1)。高圧酸素曝露中は、酸素中毒の有無を確認するためラットの動作を随時観察した。減圧時の肺損傷による空気塞栓症を予防するた

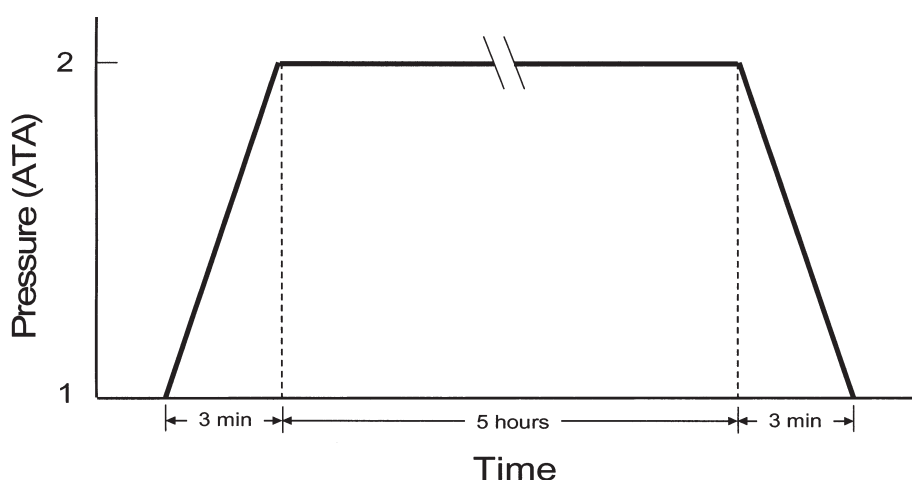


Fig. 1 Compression- decompression profile of oxygen exposure.

め、大気圧 (1 ATA) まで3分で減圧した。減圧中および減圧終了から60分間、ラットの状態を観察し、減圧障害がないことを確認した。減圧終了から24時間後、軽いエーテル麻酔下で下大動脈から採血し、さらに肺の摘出を行い、実験試料とした。Zn欠乏食で飼育したラットのうち高圧酸素曝露した8匹をZnD・O₂、標準食で飼育したラットのうち高圧酸素曝露した8匹をControl・O₂とした。同時にZnDの8匹とControlの8匹についても採血と肺摘出を行った。ZnDおよびZnD・O₂、Control、Control・O₂の各群について、白血球数、血清Zn濃度、血清銅(Cu)濃度、血清SOD活性およびCRP値を測定した。血清ZnおよびCu濃度は原子吸光法で測定した。摘出した肺の一部は10%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。本実験では、厚さ6 mmの薄切標本を作製し使用した。この標本は、ヘマトキシリン・エオジン染色(H-E染色)を行い、病理組織学的に検討した。肺組織のそれ以外の部分は直ちに液体窒素で凍結した。この試料を用いて、TNF- α mRNAの発現を調べた。TNF- α mRNAの発現の有無は、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (Takara Co. Japan)を用い、RT-PCR (Polymerase Chain Reaction) 法で調べた。詳細は以下のとおりである。肺組織は、ISOGEN (Japan gene Co. Japan) 0.5 mL中でホモジナイズした。室温で5分間放置後、クロロホルム0.25 mLを加えて攪拌した。これを遠心分離し(12,000 rpm, 15分間, 4°C)、上清中のRNAを抽出した。これにイソプロパノールを加え、室温で10分間放置した後、RNAを沈殿させるために遠心分離した(12,000 rpm, 15分間, 4°C)。次いで、70%エタノールを0.5 mL加えて遠心分離(7,500 rpm, 5分間, 4°C)を2回繰り返し、イソプロパノール沈殿を行った。イソプロパノール沈殿後、乾燥させ、50 mLの滅菌蒸留水で溶解することにより、Total RNAを抽出した。抽出されたTotal RNAサンプルを逆転写酵素(AMV Reverse Transcriptase XL)を用いてRT反応(30°C, 10分間, 42°C, 30分間, 99°C, 5分間)を行い、一本鎖DNAを作製した。これをPCR法で増幅(37 cycle, 94°C, 1分, 60°C, 1分, 72°C, 2分)し、TNF- α mRNAの発現を調べた。用いたprimerはTable 1に記した。RT-PCR産物は、2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド(ethidium bromide: EtBr)染色後、デンシトメーター(ATTO Co., Japan)を使用し、紫外線下でTNF- α mRNAを検出した。

Table 1 TNF- α primers

sense primer
5'-TAGCAAACCACCAAGCAGAG-3'
anti-sense primer
5'-TCCCTCAGGGGTGTCCTTAG-3'

実験結果

飼育期間中、いずれのラットにも異常所見は認められなかった。ZnDでは、脱毛や四肢末端および眼瞼周囲の皮膚炎も認められなかった。また、高圧酸素曝露を行ったControl・O₂およびZnD・O₂のいずれのラットにも高圧曝露中および減圧終了後を通じて、酸素中毒やair embolismを伺わせるような異常な動作・兆候は認められなかった。

標準食で飼育したラットとZn欠乏食で飼育したラットの体重の変化をFig. 2に示した。飼育期間を通して、標準食で飼育したラットは順調に体重が増加した。これに対し、Zn欠乏食で飼育したラットは特別食による飼育を始めた直後より体重増加率が減少した。飼育開始から5週間後、標準食で飼育したラットの平均体重は172.8 gであった。これに対し、Zn欠乏食で飼育したラットは147.4 gであり、有意に体重が少なかった。

Control、Control・O₂、ZnD、ZnD・O₂の白血球数は、それぞれ4375/ μ L (SD 1811)、3900/ μ L (SD 1331)、5943/ μ L (SD 2455)、7463/ μ L (SD 1853)であった。標準食で飼育したラットでは高圧酸素曝露により白血球数は増加しなかったが、Zn欠乏食で飼育したラットでは高圧酸素曝露後に白血球数の有意な増加が認められた。

各群の血清Zn濃度、血清Cu濃度およびCu/Zn比は以下の通りである。血清Zn濃度は、標準食で飼育したラットが122.6 μ g/dLであったのに対し、Zn欠乏食で飼育したラットは32.8 μ g/dLであり、Zn欠乏食で飼育したラットにおける有意な低下が確認された。血清Cu濃度は、標準食で飼育したラットが104.9 μ g/dLであったのに対し、Zn欠乏食で飼育したラットは114.8 μ g/dLであり、有意ではないがZn欠乏食で飼育したラットにおいて増加が確認された。その結果、

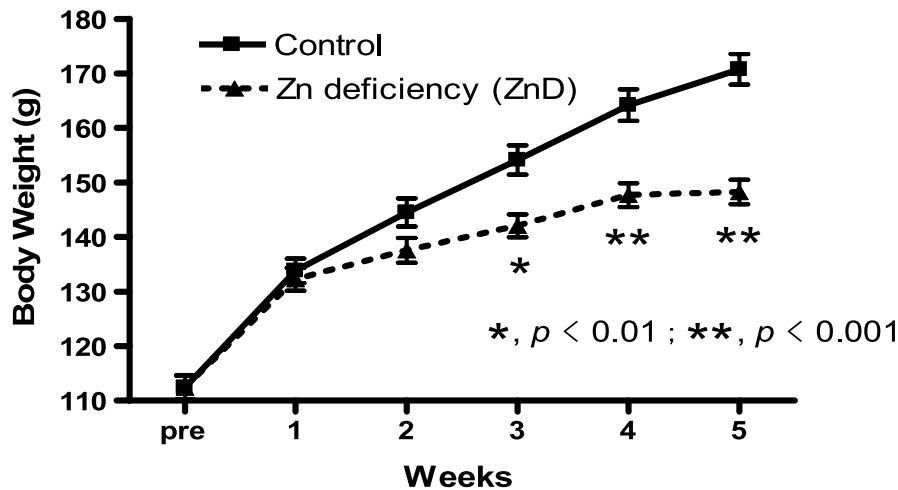


Fig. 2 Changes in body weight (n = 16, Mean \pm SEM)

Cu/Zn比は、標準食で飼育したラットが0.86であったのに対し、Zn欠乏食で飼育したラットでは3.61であり、Zn欠乏食で飼育したラットにおける有意な上昇が確認された。

各群の血清SOD活性の測定結果をFig. 3に示した。Controlが26.7 U/mL (SD 3.3), Control \cdot O₂が24.5 U/mL (SD 4.3), ZnDが14.2 U/mL (SD 3.0), ZnD \cdot O₂が17.2 U/mL (SD 1.7)であった。なお、CRP値の上昇はいずれの群でも認められなかった。

肺摘出時の肉眼所見では、ZnD \cdot O₂にのみうっ血が観察された。各群の肺の顕微鏡写真 (H-E染色) をFig. 4に示した。Fig. 4-AがControl, Fig. 4-BがZnD, Fig. 4-Cが、Control \cdot O₂, Fig. 4-DがZnD \cdot O₂である。高圧酸素曝露によりControl, ZnDともに肺胞壁の肥厚および細胞浸潤が観察された (Fig. 4-A, C \cdot Fig. 4-B, D)。とくに、ZnD \cdot O₂では細胞浸潤が顕著であった。また、肺胞の破壊を伺わせる所見も認められた (Fig. 4-C, D)。なお、ZnDに見られた肺胞壁の変化は、Control \cdot O₂, ZnD \cdot O₂に比べ軽微であった (Fig. 4-B)。

各群のTNF- α mRNAの発現強度 (TNF- α /GAPDH Ratio) は、Controlが1.24 (SD : 0.23), ZnDが1.02 (SD : 0.19), Control \cdot O₂が1.43 (SD : 0.61), ZnD \cdot O₂が0.93 (SD : 0.25)であった。

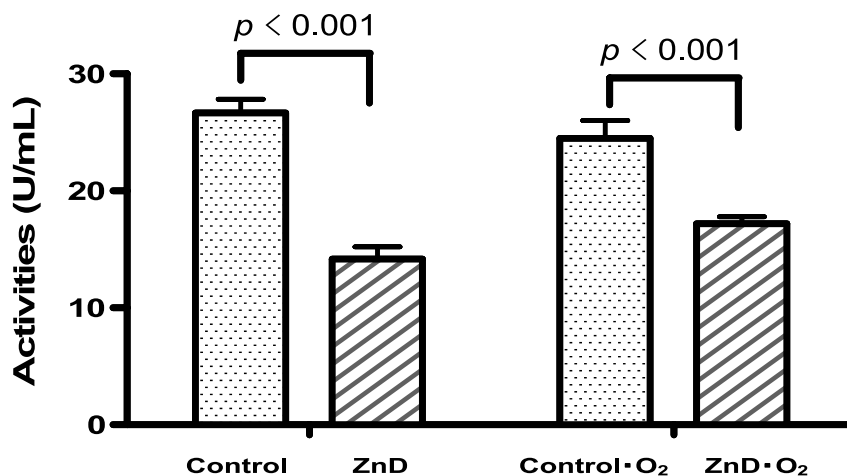


Fig. 3 Serum super oxide dismutase activities (n = 8, Mean \pm SEM)

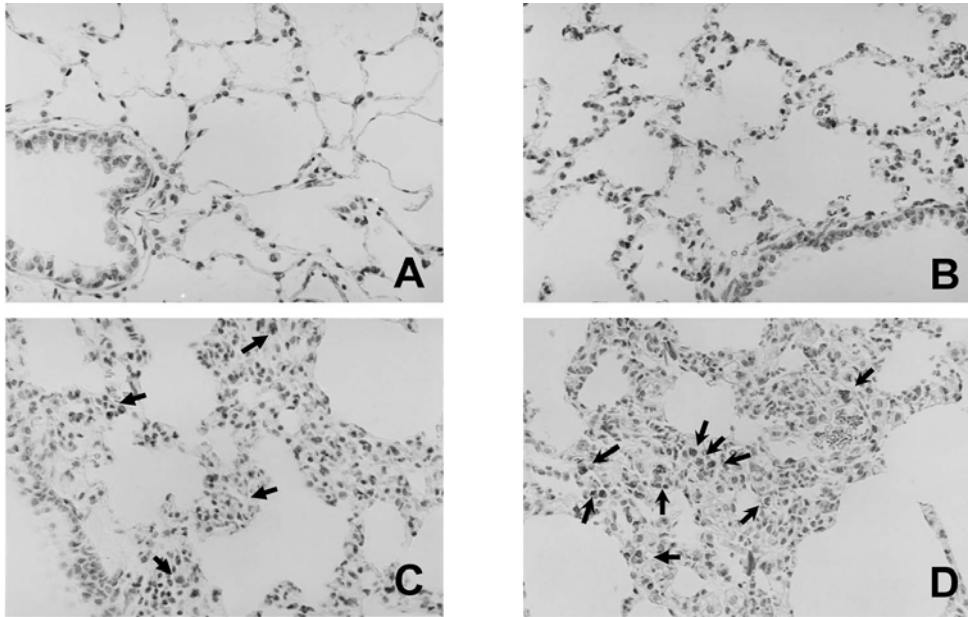


Fig. 4 Photomicrographs of the lung (H-E stain).

A: Control Group left in Room air (Control), B: Zn-deficient group left in Room air (ZnD), C: Control group exposed to 2 ATA oxygen for 5 hours (Control·O₂), D: Zn-deficient group exposed 2 ATA oxygen for 5 hours (ZnD·O₂). Hypertrophic Change in alveoli was seen after hyperbaric oxygen exposure at 2 ATA for 5 hours (C and D). Appearance of many inflammatory cells and destruction of alveoli were seen in Zn deficient rats after hyperbaric oxygen exposure (D).

考 察

本実験でZn欠乏食を与えたラットの体重増加量は標準食を与えたものに比べ、きわめて小さかった。また、血清Zn濃度の低下と血清Cu濃度の増加に伴う、Cu/Zn比の増加が確認された。これは、本実験で用いたラットがZn欠乏モデルとして妥当であることを示す。著者らが作製し、従来の実験に用いてきたZn欠乏ラットでは全身の脱毛、四肢末端部と眼瞼周囲を主とする皮膚炎がみられた。さらに、全身性の皮膚炎や潰瘍性皮膚炎を起こす例もあったが、これらの症状はZn欠乏食投与から7週間以上経過してから認められる³⁾。これに対し、本実験で用いたZn欠乏モデルでは、これらの症状は認められなかった。これは、Zn欠乏食で飼育した期間が5週間であったことによる。したがって、本実験で用いたZn欠乏ラット (ZnDおよびZnD·O₂) はZn欠乏状態にはあるが、炎症を起こすに至らない程度のZn欠乏状態であると考えられる。

減圧症および減圧によるair embolismの治療では再圧療法が唯一の治療法となる。この場合、酸素を併用したHBOを行うと治療効果は劇的に高まることが知られている²⁾。HBOは、一酸化炭素中毒、ガス壊疽などの嫌気性菌感染症や難治性の脳梗塞などでも有効な治療手段となる。また、呼吸・循環器の障害によって肺換気障害が強い患者は、常時anoxiaの状態にあるため、酸素療法が行われる。この場合、大気圧下で長時間にわたる高分圧酸素吸入を行うことになる。高圧環境下あるいは大気圧環境下で長時間、酸素吸入を行った場合、酸素の毒性が発現し肺傷害が起こる。このため、酸素中毒の予防として酸素分圧の調節あるいは酸素呼吸時間の調節が行われる。酸素中毒の機序は複雑であり、詳細については解明されていない点が多いが、肺型の酸素中毒の場合、高分圧酸素呼吸によるoxygen free radicalの増加が、肺毛細血管内皮細胞や肺胞内皮細胞に作用し、炎症性的変化として現れる⁴⁾。

本実験では、標準食を与えたラットおよびZn欠乏食を与えたラットのいずれにおいても、高圧酸素曝露を行った群では炎症性細胞の浸潤を伴う肺胞壁の肥厚が顕微鏡的に観察された。高圧酸素曝露によるこれらの変化はControl·O₂よりもZnD·O₂で強かった。加えて、ZnD·O₂の顕微鏡的観察ではうっ血に加えて広範囲にわたる肺胞の破壊を伺わせ

る所見も認められた。Zn酵素の一つであるSODは組織障害の原因となる活性酸素を除去する作用があり、生体防御面で重要な役割を担う酵素である。本実験では、Zn欠乏ラット (ZnDおよびZnD・O₂) におけるSOD活性はそれぞれ14.2および17.2 U/mLであり、標準食を与えたラットであるControlの26.7, Control・O₂の24.5 U/mLに比して有意に低かった。このため、大量のoxygen free radicalが存在する環境下では、SOD活性の減弱したZnD・O₂がControl・O₂よりも強い影響を受けたと考えられる。肉眼的観察では減圧性肺傷害がないにもかかわらず、ZnD・O₂のみにうっ血がみられたのはこれを裏付けるものと考えられる。本実験で、高圧酸素曝露によって生じた肺胞壁の肥厚等の所見は、従来報告と一致する⁶⁾。また、より重篤な酸素中毒の場合には肺胞壁の破壊が起こる。本実験で用いた圧曝露profileは正常ラットには重篤な酸素中毒を起こさないものであった。したがって、本実験ではZn欠乏が肺型酸素中毒の発現閾値を下げる事が明らかになった。一方、酸素曝露を行わなかったZnDでは、高圧酸素曝露を行ったラットのような顕著な肺胞壁の肥厚は認められず、細胞浸潤も軽度であった。また、いずれの実験群においても白血球数が極端に増加した群はなく、正常値の範囲内にとどまった。CRP値もまた上昇した群はなかった。本実験からは、ZnDにおける変化がZn欠乏による感染に対する抵抗性の低下によるものなのか、あるいはSOD活性の低下によるものかは明らかに出来なかった。しかしながら、ZnDでは肺が前炎症状態になっていることは明らかであった。

炎症性サイトカインの一つであるTNF- α の発現は、病理組織学的な変化が生じているにもかかわらず、Zn欠乏あるいは高圧酸素曝露によって増強しなかった。また、もっとも組織傷害の著しいZnD・O₂では、TNF- α mRNAの発現が減弱傾向にあった。この原因についても、本研究では解明するに至らなかった。著者らは、より重篤なZn欠乏症のラットを高圧酸素曝露すると、死亡することを以前の論文で報告した⁵⁾。しかしながら、これらのラットでは強い肺の炎症が認められたにもかかわらず、白血球数は減少していた。一連の実験結果は、とくにZnD・O₂のTNF- α 発現細胞に強度の障害が起こっていたことによっても考えられる。したがって、本研究で見られた病理組織学的所見と炎症反応を示す指標の不一致の原因を明らかにするためには、今後詳細なTNF- α 発現部位を調べ、明らかにする必要がある。

参考文献

- 1) Nodera M, Yanagisawa H, Wada O (2001) Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficiency rats. *Life Sciences* 69: 1639 - 1649.
- 2) Davis JC, Hunt TK (1977) *Hyperbaric Oxygen Therapy*. by the Undersea Medical Society, Inc. Maryland: pp. 3-10, 61-77.
- 3) Nodera M, Yanagisawa H, Moridaira K, Shimoguchi Y, Wada O (1998) Reevaluation of Zinc Deficiency Models. *Biomed Res Trace Elements* 9(1): 19-24.
- 4) Davis JC, M. D. (1981) *HYPERBARIC & UNDERSEA MEDICINETM*. by the Medical Seminars, Inc. One Elm Place-Suite 204 11107 Wurzbach Road San Antonio Texas: Volume One/Number 17.
- 5) Nodera M, Yanagisawa H, Wada O (2002) Effects of oxygen breathing at 2.8 ATA on Zinc deficiency rats. *Biomed Res Trace Elements* 13(4): 318-319.
- 6) 関 邦博, 坂本和義, 山崎晶廣 (1988) *高圧生理学*, 朝倉書店, 東京: pp. 75-78.