

酵母に取り込ませた亜鉛の有効性について

鈴木 美季子¹⁾, 柴 沼 真友美¹⁾, 香 取 輝 美¹⁾,
増 田 佳 史²⁾, 藤 田 剛²⁾, 木 村 修 一¹⁾

(¹⁾昭和女子大学大学院生活機構研究*, (²⁾オリエンタル酵母工業株式会社**)

Effectiveness of Zinc Introduced into Baker's Yeast

Mikiko SUZUKI¹⁾, Mayumi SHIBANUMA¹⁾, Terumi KATORI¹⁾, Yosifumi MASUDA²⁾,
Tuyosi FUJITA²⁾ and Shuichi KIMURA¹⁾

¹⁾Showa Women's University Graduate School of Human Life Science,

²⁾Oriental Yeast Co., Ltd.

Summary

In Japan, number of people who have taste abnormality due to zinc deficiency is increasing. It was reported that chronic intake of alcohol induces the zinc deficiency. In this paper, mice were caused severe zinc deficiency through zinc deficiency diet and alcohol intake and we studied the influence of zinc deficiency and alcohol intake on immune functions by flow cytometry. Then mice were given recovery diet and the recovery of immune function was examined. Zinc introduced into yeast or Zn-CO₃ was used as a recovery diet in this study. It was observed that the immune function of thymus from zinc deficiency mice was lower than that of the control mice. When mice were given Zn-CO₃ or the zinc introduced into yeast diet, the immune function of the mice was recovered. Previously, we have shown that the absorption of the zinc from the zinc introduced into yeast is slow compared with Zn-CO₃. Though the absorption of the zinc introduced into yeast is slow, it has recovered function of the immune as well as Zn-CO₃.

ヒトの成長や発達にとって重要な亜鉛の欠乏が日本においてもしばしば問題となってきた。これは、日本人の食生活の乱れやアルコール摂取習慣の変化が影響しているためと考えられる。平成 15 年国民健康・栄養調査によると、日本における飲酒習慣の状況は、全国で男女合わせて飲酒習慣のある者（週 3 日以上で 1 日 1 合以上飲酒する者）24.9%、飲酒習慣のない者 75.1% である。そのうち男性は、飲酒習慣のある者 42.9%、飲酒習慣のない者 57.1%、女性は、飲酒習慣のある者 9.3%、飲酒習慣のない者 90.7% である¹⁾。前年度と比較しても、男女ともに飲酒習慣のある者は増加していることが報告されている²⁾。また、同じく厚生労働省の「平成 16 年国民健康・栄養調査の概要」のなかの生活習慣に関する調査では、男性の 5.4%、女性の 0.7% が、多量飲酒者であると報告されている³⁾。アルコール性肝臓疾患患者や慢性エタノール投与ラットの臓器中亜鉛量が低下することが報告されているように^{4,5)}、アルコールの過剰摂取により亜鉛欠乏が誘発されることが分かっている。つまり、アルコールの過剰摂取は亜鉛欠乏を引き起こす可能性が高い。また、慢性的なエタノール投与

および亜鉛欠乏は免疫能にも影響を与えることが示されている^{6,7)}。アルコール依存症は細胞性および液性免疫に有害な影響を与えることが報告されている^{8,9)}。このように、アルコールの習慣的な多量飲酒は健康に著しい悪影響を及ぼす。本研究では亜鉛無添加食を用いさらにアルコール摂取によって過度の亜鉛欠乏を誘発させた場合、この回復に酵母に取り込ませた亜鉛の有効性を検討することを目的とした。近年、特殊培養技術によりパン酵母菌体中にとりこませた食品素材が種々の食品に利用されてきているからである。これまでに、パン酵母は、発酵工業においては古くから使用されきわめて安全性が高く、また種々の生体調節機能を示す成分の存在が確認され注目されつつある¹⁰⁻¹²⁾。今回の実験では、亜鉛含有酵母による回復効果を、成長、臓器重量および免疫能を指標とし、無機亜鉛 (ZnCO₃) と比較検討した。

そこで、本研究では、慢性的なエタノール投与が免疫能にも影響を与えることが示されていることから関連させ、亜鉛欠乏食という条件にさらにアルコール摂取によって過度の亜鉛欠乏を誘発させた場合、免疫能にどのように影響

*所在地：東京都世田谷区太子堂 1-7 (〒154-8533)

**所在地：東京都板橋区小豆沢 3-6-10 (〒174-8505)

を与えるかを検討するとともに、その、回復食に対して無機亜鉛と亜鉛含有酵母の添加結果を、免疫能の回復効果によって比較検討した。

実験方法

1. 実験群およびデザイン

実験動物として4週齢のC57BL/6NCrj雄マウスをオリエンタル酵母(株)より購入した。動物飼育は、動物飼育室で行い、室内環境条件は、温度 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間明期(20時から8時)、12時間暗期(8時から20時)の条件下で飼育した。ケージに個別に収容し、飲料水は自由飲水とした。なお亜鉛欠乏を容易にするために飲料水はエタノールを20%含むものとした。飼料は、粉末状のものを餌箱に入れて与えた。また、糞食防止のために、ケージの底面を金網とした。

2. 飼料組成

コントロール食は、AIN93Mに準じたものである。亜鉛欠乏食は、ミネラル混合から亜鉛を除いた組成のミネラル混合を使用し、作成したものを使用した。回復実験において、コントロール食の亜鉛含有が充分量なので、比較する目的には適切と考えられないので無機亜鉛添加食の亜鉛含量は、コントロール食亜鉛含量の1/5とした。回復実験に用いた亜鉛含有酵母添加食は、無機亜鉛添加食と等量の亜鉛になるようにした。

3. 群構成

・コントロール群 (Control)

30日間コントロール食, 2.5% グルコース溶液摂取 4匹

・亜鉛欠乏群 (Zn-deficiency)

30日間亜鉛欠乏食, 20% アルコール・2.5% グルコース溶液摂取 6匹

・無機亜鉛添加群 (Zn-CO₃)

30日間亜鉛欠乏食, その後7日間無機亜鉛添加食, 20% アルコール・2.5% グルコース溶液摂取 5匹

・亜鉛含有酵母添加群 (Zn-HF)

30日間亜鉛欠乏食, その後7日間亜鉛含有酵母添加食, 20% アルコール・2.5% グルコース溶液摂取 6匹

上記の4群で実験を行った。なお、20% アルコールにはラットが好みやすいように、2.5% グルコースを添加して甘くして投与した。

4. 観察ならびに実験方法

亜鉛欠乏期間は30日間とし、回復実験の期間は7日間とした。毎日飼料摂取量を測定し、体重は、2日毎に測定した。実験終了後に屠殺し、血液を採取、胸腺、脾臓、精巢の重量を測定した。そして、脾臓・胸腺はさらに細胞数を検討した。血液、脾臓、胸腺については、フローサイト

メトリーにて表面解析を行った。

5. フローサイトメトリーによる表面解析

1) 細胞の分離方法

摘出した各臓器をピンセットを使用して細かくし、RPMI-1640 倍地に浮遊させ、遠心により細胞を集めた。胸腺は培地に再浮遊し、細胞数を計測した。脾臓は上記の処理の後、溶血剤を加え溶血させた後、再度洗浄し培地に再浮遊させ、細胞数を計測した。

2) モノクローナル抗体

FITC 標識抗マウス CD3 抗体, PE 標識抗マウス CD19 抗体, PE 標識抗マウス CD8a(Ly-2) 抗体, PE 標識抗マウス CD4 抗体 (L3T4) は, Phar-Mingen 社のものを使用した。

3) モノクローナル抗体による染色と測定

胸腺・脾臓は 5×10^5 個のリンパ球と、至適濃度に希釈した各抗体 $10 \mu\text{L}$ を、4度で30分間反応させた。血液は、下記のモノクローナル抗体で染色し、溶血を行い測定に用いた。血液・脾臓は① FITC 標識抗マウス CD3 抗体と PE 標識抗マウス抗体 CD19, ② FITC 標識抗マウス CD3 抗体と PE 標識抗マウス抗体 CD4, ③ FITC 標識抗マウス CD3 抗体と PE 標識抗マウス抗体 CD8 の3種類の組み合わせで2重染色を、胸腺は、① FITC 標識抗マウス CD8 抗体と PE 標識抗 CD4 マウス抗体の組み合わせで、2重染色を行い、PBSで2回洗浄した。死細胞を取り除くためにさらに、Propidium Iodide (PI) 色素を反応させ、フローサイトメトリーでリンパ球を10,000個カウントし陽性細胞率を求めた。

6. 統計処理法

実験結果は、平均値 \pm 標準誤差により示した。有意差の検定は、一元配置分散分析を用いて統計学的に解析し、危険率5%未満を有意差ありとした。

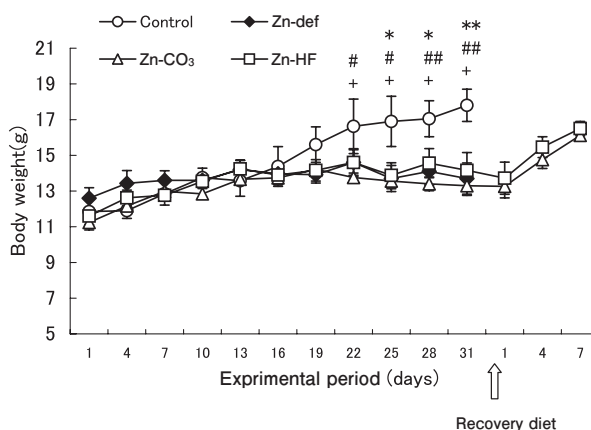


Fig. 1

Body weight change of control, Zn-def, Zn-CO₃, Zn-HF mice.

Value are means \pm SE.

** $P < 0.05$ Zn-def, ## $P < 0.05$ Zn-CO₃, ++ Zn-HF compared with the control mice.

結果と考察

1. 成長曲線・観察 (Fig. 1)

毛並みの悪さ、成長遅延の状態から、亜鉛欠乏状態を誘発できたことが確認できたので、回復実験に進んだ。回復食として対照食の亜鉛含量の1/5量の亜鉛を含む無機亜鉛添加食および亜鉛含有酵母添加食を7日間与えることにより、回復状態を観察した。その結果、欠乏食により抑制されていた体重増加が再び顕著に現れ、コントロール群に近い体重まで回復し、毛並みも良くなり、回復していることが示された。

2. 臓器重量 (Table 1)

亜鉛欠乏群では、コントロール群に比べて免疫関連臓器である脾臓や胸腺の体重あたりの臓器重量が減少していることが示された。マウス個体当たりの細胞数においても減少するという結果を得た。このことは、免疫能の低下を示唆するものである。また、精巣も亜鉛欠乏で、顕著な重量の低下が見られた。これらの亜鉛欠乏動物に対する無機亜鉛および亜鉛含有酵母による回復を検討するため、欠乏一ヶ月のマウスに回復食を7日間与えたところ、脾臓重量および胸腺重量はコントロール群とほぼ同様の値まで回復した。亜鉛欠乏群によって脾臓細胞数も有意に低下した。これに回復食を与えるとコントロール群に近い値まで上昇し

Table 1 Effect of Zn-deficiency and recovery diet on the organ weights and cell numbers of thymus and spleen

	Spleen weight g/100 g body wt.	Thymus weight g/100 g body wt.	Testis weight g/100 g body wt.
Control	0.291 ± 0.009	0.288 ± 0.027	0.883 ± 0.024
Zn-def	0.184 ± 0.004 **	0.084 ± 0.012 **	0.324 ± 0.065 **
Zn-CO ₃	0.325 ± 0.021 ++	0.264 ± 0.023 ++	0.376 ± 0.019 **
Zn-HF	0.356 ± 0.039 ++	0.242 ± 0.025 ++	0.381 ± 0.017 **

	Spleen cells ×10 ⁴ /organ wt.	Thymus cells ×10 ⁴ /organ wt.
Control	1127 ± 145	1755 ± 279
Zn-def	623 ± 55.6 **	395 ± 96 **
Zn-CO ₃	1011 ± 270	1122 ± 191 ***
Zn-HF	968 ± 92.8	1366 ± 175 ++

Significantly different from the control values at $P < 0.01$ **
 $P < 0.05$ *

Significantly different from the Zn-def values at $P < 0.01$ +
 $P < 0.05$ ++

Values are means ± SE.

たが、亜鉛欠乏群との有意な差は見られなかった。胸腺細胞数においては、亜鉛欠乏により有意に低値を示し、欠乏群は回復食を与えることにより無機亜鉛・亜鉛含有酵母両群とも亜鉛欠乏群と有意な差が見られる程度まで回復した。しかし、精巣は回復食摂取後も低値を示したままであった。亜鉛欠乏によって萎縮した精巣が回復するまでにさらに期間がかかると思われる。

3. フローサイトメトリーによる結果

胸腺においては (Table 2), 亜鉛欠乏によって未熟な細胞を示す CD4+CD8+ の比率が低下し、CD4+ または CD8+

Table 2 Lymphocytes subsets from thymus of mice

Organ	Thymus		
	CD4+CD8-	CD4-CD8+	CD4+CD8+
	Mature T cell	Mature T cell	Immature T cell
	%		
Control	6.17 ± 1.26	1.04 ± 0.18	90.43 ± 1.51
Zn-def	14.75 ± 1.97 **	5.79 ± 1.12 **	69.76 ± 4.07 **
Zn-CO ₃	2.60 ± 0.58 ++	1.06 ± 0.06 ++	87.21 ± 2.67 ++
Zn-HF	4.07 ± 1.23 ++	0.76 ± 0.19 ++	90.19 ± 1.76 ++

の成熟細胞の割合が高くなっていることが確認された。これまでの報告で、亜鉛欠乏動物では、胸腺が萎縮するとともに未熟細胞である、CD4+CD8+ の細胞の損傷を受けやすく、相対的に CD4+ 単独陽性、CD8+ 単独陽性の割合が高くなることが示されている¹³⁾。今回の、フローサイトメトリーによる結果は、上記の報告を支持する結果となり、亜鉛欠乏が胸腺に影響を与えていることが確認された。回復実験においてはとくに胸腺における回復が顕著であった。すなわち、回復食を与えると、萎縮した胸腺重量が戻るとともに、胸腺における免疫能もコントロール群に近い値まで回復した。亜鉛含有酵母は無機亜鉛に比べ吸収が緩やかであるとのわれわれは観察しているが¹⁴⁾、この実験では無機亜鉛および亜鉛含有酵母を与えることにより、両群とも細胞性免疫を司る胸腺における免疫能もコントロール群の状態まで回復したことから、ほぼ同様に欠乏状態が回復することが確認された。

脾臓においては (Table 3, 4), フローサイトメトリーの結果を細胞の実数換算と比較したところ、B 細胞では亜鉛欠乏においてコントロール群に比べて有意に低値を示す結果が得られた。回復実験では、回復食である無機亜鉛添加食および亜鉛含有酵母添加食を与えることによっていずれもコントロール群近くまで回復するという結果が得られた。しかし亜鉛欠乏によって低値を示した T 細胞は、回復食を与えても回復が見られなかった。同様の結果がヘルパー T 細胞・キラー T 細胞でも確認された。骨髄の幹細胞で作られた T 細胞は、胸腺を経由して分化することが知られている。上に示したように、胸腺では回復食によって未熟な細胞が回復していることが認められており、その効果が脾臓の T 細胞で認められるためにはもう少し時間がかかるものと思われる。したがって、7日間の回復食投与では脾臓での T 細胞の免疫能は回復していなかったものと

Table 3 Lymphocytes subsets from spleen of mice

Organ	Spleen			
	CD3-CD19+	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+
	B cell	T cell	Helper T	Killer T
	%			
Control	38.51 ± 4.46	43.99 ± 1.34	19.83 ± 1.13	17.46 ± 1.81
Zn-def	44.81 ± 3.16	42.30 ± 2.27	23.81 ± 2.16	15.62 ± 1.42
Zn-CO ₃	50.78 ± 4.14 *	26.48 ± 3.68 ** ++	10.68 ± 2.01 * ++	10.64 ± 2.59 *
Zn-HF	51.14 ± 3.82 *	31.23 ± 3.49 * +	12.87 ± 2.85 ++	12.96 ± 1.33

Table 4 Lymphocytes cell numbers from spleen of mice

Organ	Spleen			
	CD3-CD19+	CD3+	CD3+CD4+	CD3+CD8+
	B cell	T cell	Helper T	Killer T
	×10 ⁴			
Control	649.91 ± 94.4	781.13 ± 137.9	340.80 ± 46.6	319.82 ± 71.5
Zn-def	270.93 ± 8.15 **	259.56 ± 17.7 **	143.81 ± 7.92 **	77.21 ± 19.7 **
Zn-CO ₃	544.96 ± 72.4 ++	278.45 ± 43.5 **	109.55 ± 21.4 **	107.21 ± 26.9 **
Zn-HF	502.58 ± 79.0 +	292.03 ± 16.2 **	117.93 ± 18.3 **	121.29 ± 5.90 **

Table 5 Lymphocytes subsets from blood of mice

Organ	Blood			
	CD3-CD19+ B cell	CD3+ T cell	CD3+CD4+ Helper T	CD3+CD8+ Killer T
	%			
Control	36.04 ± 1.61	40.36 ± 5.09	25.56 ± 4.11	12.28 ± 2.33
Zn-def	32.30 ± 2.51	52.89 ± 1.45	32.06 ± 1.72	18.00 ± 0.82*
Zn-CO ₃	30.46 ± 4.01	50.72 ± 3.44**	29.32 ± 3.50	16.98 ± 1.59+
Zn-HF	28.11 ± 3.00	61.22 ± 3.39**+	34.70 ± 2.41	23.45 ± 1.76**+

Values are means ± SE.

Significantly different from the control values at $P < 0.01$ **

$P < 0.05$ *

Significantly different from the Zn-def values at $P < 0.01$ ++

$P < 0.05$ +

推測される。

血液（末梢血）においては（Table 5），B細胞には4群間において有意な差は見られなかったが，T細胞には影響が見られた。すなわち，コントロール群に比べ欠乏群は細胞性免疫が有意に増加したことが示された。なお，興味有ることは回復実験ではコントロールと同様，その割合が低値に戻ることはなく亜鉛欠乏と同じレベルを保つか，欠乏群よりも有意に高値を示したことである。すなわち，亜鉛含有酵母添加群は亜鉛欠乏群と比較して有意に増加していた。回復食の亜鉛含量が対照食の1/5と低いためコントロール群レベルまで回復はしなかった可能性はあるが，この現象から亜鉛欠乏下ではB細胞よりもT細胞を割合的に増加させることにより，限られた免疫担当細胞による生体防御の体制を形成していることが推察される。

まとめ

亜鉛含有酵母中の亜鉛の有効性を検討するため，亜鉛の機能の一つである免疫能で比較検討した。その際，コントロール食の1/5亜鉛含量の無機亜鉛添加食および亜鉛含有酵母添加食を与えることで検討を行った。その結果いずれの亜鉛添加食でも胸腺における細胞性の免疫能がコントロール群に近い値まで回復することが確認された。亜鉛酵母は無機亜鉛に比べ吸収が緩やかであるとわれわれは観察しているが¹⁴⁾，無機亜鉛とはほぼ同様に亜鉛含有酵母を与えることにより，亜鉛欠乏で誘発された成長遅延を回復させ，細胞性免疫を司る胸腺における免疫能もコントロール群の状態まで回復した。脾臓・胸腺重量および細胞数をコントロール群に近い値まで回復させたことは，亜鉛含有酵母は十分に欠乏状態を回復させることを示したものである。

亜鉛欠乏によるT細胞の免疫能の回復は，胸腺においては速やかにあらわれた。しかし，脾臓においては細胞実数換算した比較で回復が認められなかった。この回復期のずれは，骨髄で幹細胞から産生された免疫担当細胞が胸腺でT細胞に変るというプロセスを考えると，7日の回復実験では見られない可能性も考えられた。さらには，対照食の1/5の亜鉛含量であることも一つの原因になっているかもしれない。さらに検討すべきであろう。

参考文献

- 1) 厚生労働省統計表データベースシステム 厚生労働省平成15年国民健康・栄養調査報告
- 2) 国民栄養の現状 平成14年厚生労働省国民栄養調査結果 健康・栄養情報研究会編 第一出版
- 3) 厚生労働省統計表データベースシステム 厚生労働省平成16年国民健康・栄養調査報告
- 4) Bode JC, Hanisch P, Henning H, Koenig W, Richter FW, Bode C, Bode JC (1988) Hepatic zinc content in patients with various stages of alcoholic liver disease and in patients with chronic active and chronic persistent hepatitis. *Hepatology* 8: 1605-1609.
- 5) 山岡茂夫 (1989) 慢性エタノール投与ラットの臓器中金属量の変動に関する研究. *Jpn. J. Alcohol & Drug Dependence* 24 (3): 154-171.
- 6) Wu WJ, Wolcott RM, and Pruett SB (1944) Ethanol decreases the number and activity of splenic natural killer cells in a mouse model for binge drinking. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* Nov; 271 (2): 722-729.
- 7) Song K, Coleman RA, Zhu X, Alber C, Ballas ZK, Waldschmidt TJ, Cook RT (2002) Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *Journal of leukocyte biology*; 72 (6): 1109-1116.
- 8) MacGregor RR (1986) Alcohol and immune defence. *J Am med Assoc* 256: 1474-1479.
- 9) Meadows GG, Blank SE (1993) Modulation of natural killer cell activity by alcohol. In *Alcohol, and Cancer* (Yumiya R and Taylor AN eds.). CRC Press, Boca Raton: pp. 55-85.
- 10) 辻村 卓, 日笠志津, 嶋田昇二 (1999) 亜鉛および鉄強化パン酵母の亜鉛および鉄の生体利用性について. *女子栄養大学紀要* 30: 159-165.
- 11) 和田良樹, 鈴木康生 (1998) 食品素材としての有用菌の利用ミネラル強化パン酵母の開発. *食品と開発* 33: 10-12.
- 12) 和田良樹, 鈴木康生 (1998) 健康食品素材としての酵母の利用. *New Food Industry* 40: 11-16.
- 13) 荒川泰昭, 室賀清美, 小石秀夫, 森田 亮, 岩崎 徹, 中島晴信, 堀伸二郎 (1991) 胸腺における微量元素とT細胞の動態. *微量栄養素研究* 8: 117-124.
- 14) 尾崎瑞枝, 馬飼野浩子, 稲毛寛子, 木村修一 (2004) 酵母に結合した亜鉛の吸収に関する研究. 第58回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集: pp. 87.