

亜鉛欠乏食摂取に伴う骨密度の低下

野 寺 誠¹⁾, 宮 嶋 由 佳¹⁾, 宮 崎 孝²⁾

(¹⁾埼玉医科大学 保健医療学部 健康医療科学科, ²⁾埼玉医科大学 地域医学医療センター)*

Reduced bone mineral density and increased urinary phosphate excretion in zinc-deficient rats

Makoto NODERA¹⁾, Yuka MIYAJIMA¹⁾, Takashi MIYAZAKI²⁾

¹⁾Saitama Medical University School of Medical Technology and Health,

²⁾Saitama Medical University Community Health Science Center

Summary

This study assessed bone mineral density (BMD) using dual-energy x-ray absorptiometry (DXA), the alkaline phosphatase (ALP) and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity in the femur, and the excretion of calcium (Ca) and phosphate (P) in 15-h urine in zinc-deficient rats.

Male SD rats (150 ± 10g) were used. They were kept in individual cages and fed zinc-containing (10 mg/100g diet; Pf group) or zinc-deficient (ZnD group) diets for 4 weeks. After 4 weeks, the BMD of the femur assessed by DXA was significantly lower in the ZnD group compared with the Pf group. The ALP level, a measure of osteoblastic activity in the femur, was significantly lower in the ZnD rats. The TRAP level, a measure of osteoclastic activity, was the same in both groups. The urine volume collected in a metabolic cage for 15 h was significantly lower in the ZnD group at 4 weeks. The urine Ca concentration did not differ between the two groups, but the mean urine P concentration was 1.535 and 0.025 mg/dl/mg creatinine in the ZnD and Pf groups, respectively. The urinary P excretion was significantly higher in the ZnD rats (p=0.0049). The results suggest that reduced BMD in zinc-deficient rats is related to increased urinary P excretion and decreased osteoblastic activity.

Keywords: Zinc deficiency, Bone mineral density, ALP, TRAP

我が国は、先進国の中では例を見ない早さで高齢化が進んでいる。年齢3区分別人口では、老年人口の構成割合が23.1%（平成21年度）に達しており、今後30年間で40%近くまで増加することが見込まれている。こうした背景の中で、健康増進法の施行やとくに生活習慣病に主眼を置いた健康日本21の策定など積極的な健康増進対策が推進されている。しかしながら、日本人の健康問題を考えるうえで、生活習慣病と並んで骨粗鬆症の増加も重要な課題であることは以前から周知されており、その対策が急がれている。骨粗鬆症は骨折の原因となり、とくに高齢者には長期的なQOLの低下をもたらす。さらには骨折に伴う、いわゆる寝たきり老人の増加などは、介護保険制度における要支援および要介護対象者の増加に拍車をかける。このことは、福祉、保健および医療に関わる経済全般にも大きな影響を及ぼすことは明白である。骨粗鬆症対策には医療および福祉関連施設の充実のみならず、予防医学における一次

予防が重要である。とくに日々の食生活の見直しや改善など栄養学的視点からの取り組みが重要であることは以前から指摘されている。

骨はカルシウムとリンの結晶構造をとっている非常に強固な臓器であるが、常に破骨細胞の活性と骨芽細胞の活性が相互に関与して維持される臓器である¹⁻³⁾。正常な骨構造は、これらの細胞による破骨と骨新生のバランスが良好に保たれている。何らかの原因によって、このバランスが崩れた場合には骨粗鬆症などの疾病を誘引することになる。

骨は、基本的にカルシウムとリンが主要な構成元素である。したがって、いくつかの骨関連病変ではカルシウムとリンなどの吸収不全や排泄の亢進が関わっている。

また、骨にはカルシウムとリン以外にも元素も含まれるが、中でも亜鉛（Zn）は比較的多く含まれている元素である^{4,5)}。成長過程にあるラットに亜鉛欠乏食を与えるとすみやかに成長が阻害されることが知られている。本実験

*所在地：埼玉県日高市山根1397-1（〒350-1241）
1397-1 Yamane, Hidaka-shi, Saitama 350-1241, Japan

では、亜鉛欠乏ラットを作成し、骨形成に関わるいくつかの因子を調べ、亜鉛欠乏が骨に及ぼす影響を調べた。今回は、骨代謝全般の指標として Dual X-ray energy absorptiometry (DXA) 法による大腿骨の骨密度 (Bone mineral density; BMD)、骨芽細胞の動態に関わる指標として alkaline phosphatase (ALP)、破骨細胞の動態に関わる指標として tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 及び破骨細胞の分化因子である receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を測定した。加えて、尿中のカルシウムおよびリンの排泄との関連も検討した。

方法

体重 150 ± 10 g の SD 系雄ラットを個別ゲージで 1 週間馴化した。馴化後、ラットを 2 群に分けて、一方は亜鉛欠乏特殊食群 (ZnD 群, $n=15$) で飼育した。他方は、亜鉛欠乏特殊食 100g 当たり 10mg の硫酸亜鉛を添加した亜鉛添加餌群 (Pf 群, $n=15$) で 4 週間飼育した⁶⁾。実験前のコントロールは、2 群に分けた時点で、飼育開始前に大腿骨試料を採取して後の分析に使用した。上記の特別食による飼育開始から 4 週間後、エーテル麻酔下で大腿骨を摘出し、実験試料とした。摘出した試料は、同時に大腿骨 BMD、ALP 活性および TRAP 活性を測定するために -80°C の冷凍庫に保存した。BMD の測定は、右大腿骨を使用して、骨周囲の結合組織を剥離後、二重エネルギー X 線吸収装置 (Lunar PIXImus; GE Healthcare, WI, USA) で測定した。また、左大腿骨を用いて、ALP と TRAP 活性を測定した。これらの測定の前処置として、骨から結合組織を剥離し、さらに両端の軟骨を除去して長骨部分を残した。この長骨を縦に分割し、生理食塩水で洗浄して骨髄を除去、残った部分を実験試料とした。この試料を 4°C の生理食塩水で洗浄し、細かく破碎した後、タンパク抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH7.5, 150 mM NaCl, 1% CHAPS, 1.0 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail) に投入し、更にポリトロンで粉碎して骨抽出液を得た。骨抽出液は、 4°C で 12000 rpm 30 分遠心分離した。この上清を用いて ALP と TRAP 酵素活性を測定した。ALP 酵素活性は 10 mM の disodium p-nitrophenyl phosphate hexahydrate (PNPP) を基質とする PNPP 基質法 (1.0 mM MgCl を含む 100 mM 炭酸-重炭酸緩衝液 pH 10,) で測定した。同様にして、TRAP 酵素活性は PNPP 基質法 (50 mM sodium tartrate を含む 100 mM 酢酸緩衝液 pH 5.0) で測定した。ALP と TRAP 活性反応測定は 37°C で行い、0.5 M NaOH で反応終了後、4.5 nm の吸光度を分光光度計 (Beckman Coulter; DU800, Ca, USA) で行った。また、特別食による飼育 4 週間後から 3 日前に、尿中のカルシウムと尿中のリンの測定を行った。採尿は、代謝ケージを用いて午後 6 時より翌日午前 9 時までの 15 時間行った。尿中カルシウムとリンの濃度の測定には、市販のキット (カルシウム C-テストワコー、ホスファ C-テストワコー、ク

レアチニン-テストワコー、和光純薬工業(株) 大阪) を用い、得られた値はクレアチニン値で補正した。

統計処理

統計処理はデータ解析ソフトウェア KaleidaGraph (version4) を用いて、対応のない Student's t test を行った。解析の結果は p 値が 0.05 以下を統計学的に有意差ありとした。

結果

特別食による飼育前の体重は、 161 ± 6.6 g であった。特別食による飼育開始から 4 週間後の ZnD 群の体重は、 164.0 ± 6.6 g、Pf 群は 185.1 ± 7.6 g であった (Fig. 1)。

特別食による飼育前的大腿骨 BMD 値は 0.10 ± 0.005 g/cm² であった。特別食による飼育開始から 4 週間後、ZnD 群の大腿骨の骨密度は 0.1128 ± 0.0032 g/cm²、Pf 群は 0.1317 ± 0.0027 g/cm² であった (Fig. 2)。

特別食による実験開始前の ALP 活性は 0.65 ± 0.03 μmol PNPP/mg protein であった。特別食による飼育開始 4 週間後、ALP 活性は ZnD 群で 0.331 ± 0.01 μmol PNPP/mg protein、Pf 群で 0.552 ± 0.02 μmol PNPP/mg protein であった (Fig. 3)。

特別食による実験開始前の TRAP 活性は 0.07 ± 0.0069 μmol PNPP/mg protein であった。特別食による飼育開始 4 週間後、ZnD 群の TRAP 活性は 0.015 ± 0.0016 μmol PNPP/mg protein、Pf 群が 0.0165 ± 0.002 μmol PNPP/mg protein であった (Fig. 4)。

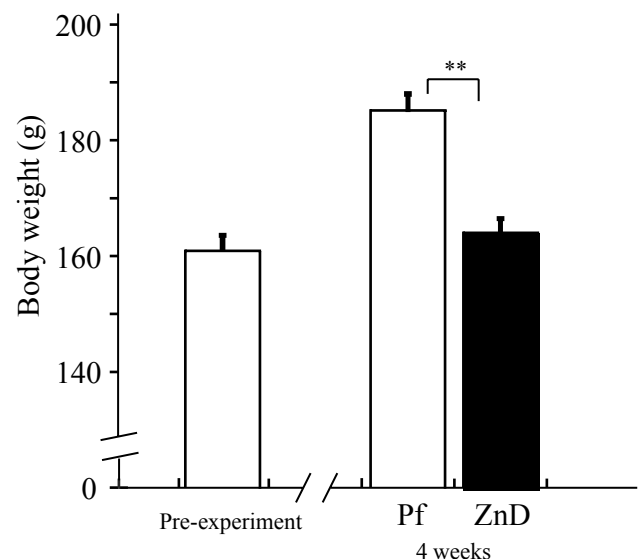


Fig. 1

Body weight were shown at pre-experiment and 4 weeks after ingested special diet, Pf group ($n=7$ at each point) and ZnD group ($n=7$ at each point). The values reported as a mean \pm SE, coefficient values $p < 0.01$ were considered statistically significant, in comparing to Pf group, an indicated p value was less than 0.001 (**).

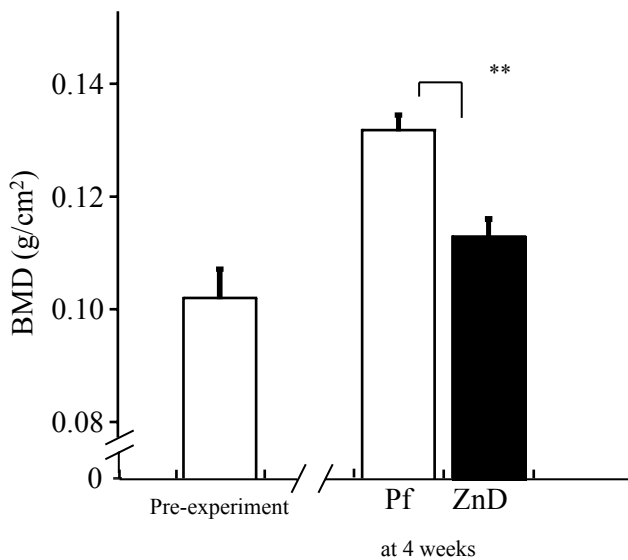


Fig. 2 BMD value estimated by dual-X-ray absorption method were shown at pre-experiment and 4 weeks after ingested special diet, Pf group (n=7 at each point) and ZnD group (n=7 at each point). The values shown as a mean \pm SE, coefficient values $p < 0.05$ were considered statistically significant, in comparing to Pf group, an indicated p value was less than 0.001 (**).

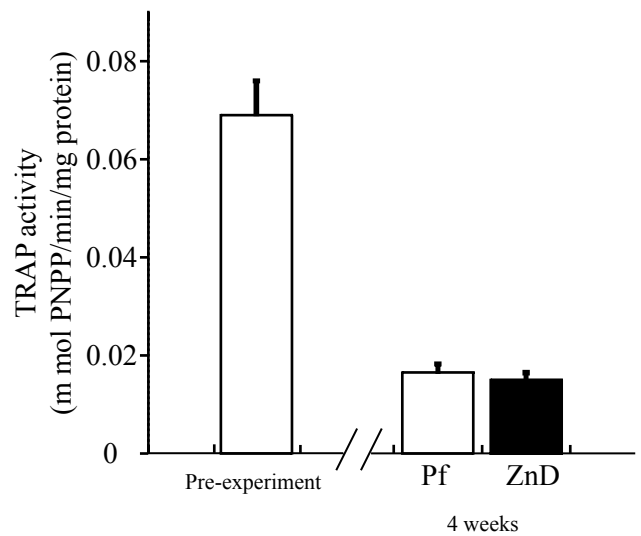


Fig. 4 TRAP activity in extracted buffer solution from femur bone were shown at pre-experiment and 4 weeks after ingested special diet, Pf group (n=6) and ZnD group (n=6). The substrate of TRAP assay was used by para-nitrophenyl phosphate (PNPP) in 50 mM acetic acid buffer pH5.0 and 50 mM sodium tartrate.

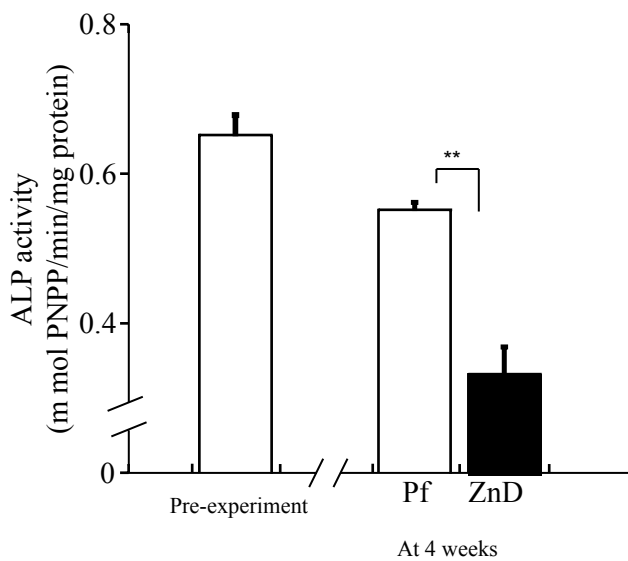


Fig. 3 ALP activity in extracted buffer solution from femur bone were shown at pre-experiment and 4 weeks after ingested special diet, Pf group (n=6) and ZnD group (n=6). The substrate of ALP assay was used by para-nitrophenyl phosphate (PNPP). The values reported as a mean \pm SE, coefficient values $p < 0.01$ were considered statistically significant, in comparing to Pf group, indicated p value was less than 0.001 (**).

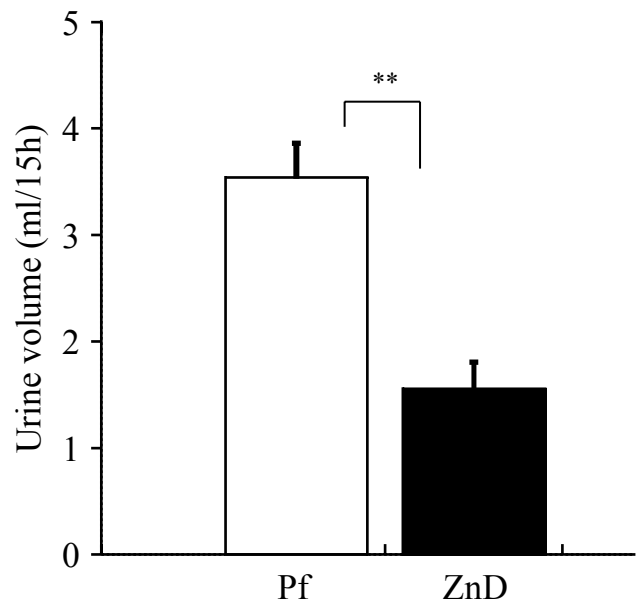


Fig. 5 Urine volume collected by metabolic cage for 15 h was shown at 3 days before from 4 weeks after special diet. The values reported as a mean \pm SE, coefficient values $p < 0.01$ were considered statistically significant, in comparing to Pf group, (**) is indicated as p value less than 0.001.

特別食による実験開始4週間後から3日間の尿量は、ZnD群で 1.55 ± 0.25 ml/15h, Pf群で 3.54 ± 0.32 ml/15hであった (Fig. 5)。

特別食による実験開始4週間後から3日間の尿中カルシウム濃度は、ZnD群で 0.0698 ± 0.011 mg/dl/mg creatinine, Pf群で 0.0526 ± 0.023 mg/dl/mg creatinineであった (Fig. 6)。

特別食による実験開始4週間後から3日間の尿中リン濃

度は、ZnD群で 1.535 ± 0.38 mg/dl/mg creatinine, Pf群で 0.025 ± 0.009 mg/dl/mg creatinineであった (Fig. 7)。

考 察

本実験結果から、亜鉛欠乏による骨密度の低下が骨芽細胞活性の低下と尿中リン排泄の増加とに起因したものであ

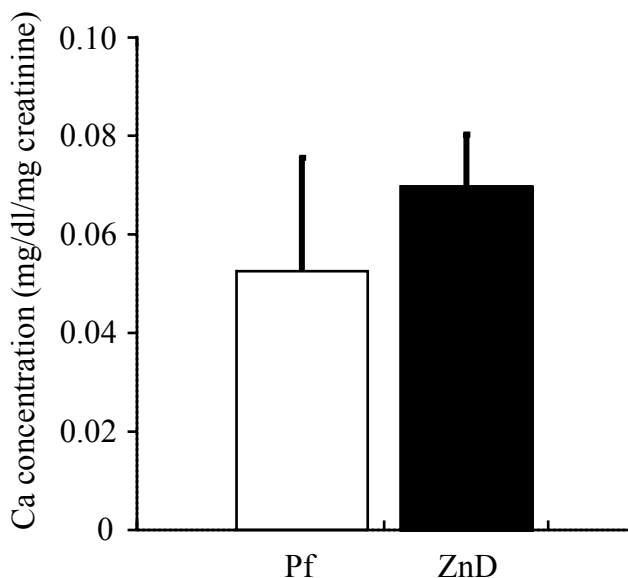


Fig. 6

Ca concentration in the urine collected by metabolic cage for 15 h was shown at 3 days before from 4 weeks after special diet, Pf group (n=6) and ZnD group (n=6). The values reported as a mean \pm SE, coefficient values $p < 0.01$ were considered statistically significant, in comparing to Pf group, an indicated p value was less than 0.001 (**).

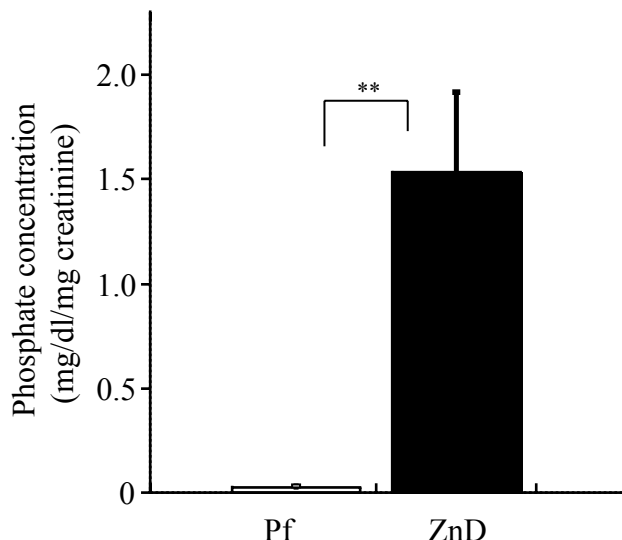


Fig. 7

Ca concentration in the urine collected by metabolic cage for 15 h was shown at 3 days before from 4 weeks after special diet, Pf group (n=6) and ZnD group (n=6). The values reported as a mean \pm SE, coefficient values $p < 0.01$ were considered statistically significant, in comparing to Pf group, an indicated p value was less than 0.001 (**).

ることが示唆された。

骨は骨新生と破骨が同時に行われる。本実験で確認された ALP 活性の低下は、骨新生が低下したことを示している。ALP は活性中心に亜鉛をもつ代表的亜鉛酵素の一つであることから、亜鉛摂取不足によりその活性が低下したと考えられる^{3,7)}。一方、破骨の指標である TRAP はその活性中心が鉄である。そのため亜鉛摂取不足による影響は少なく、ZnD 群と Pf 群間に差を生じさせなかったと考える。以上の結果は、亜鉛欠乏による骨密度の低下が骨形成の相対的低下を示すと考えられる。

また、今回は図示していないが、血清中 RANKL 濃度の ZnD 群と Pf 群に有意な差は認められなかった。この結果は、亜鉛の欠乏が RANKL におよぼす影響も少ないことを示唆している。

ZnD 群の尿量の低下は、従来報告されている腎血流量の低下によるかもしれない⁸⁾。しかしながら、ZnD 群におけるリン値の増加は、亜鉛の欠乏時におけるリンの尿中排泄増加を示すものである。

リンは成人で1日あたり約1gが摂取され、そのうち約75%が腸管で吸収される。吸収されたリンは血液と骨との間で平衡関係を保ち、85%が骨に存在する。また、腎臓の糸球体で濾過されたリンは、その約80%が近位尿細管で再吸収される。近年明らかにされた Fibroblast growth factor23 (FGF23) は、腎臓においてリンの再吸収を抑制すると報告されている⁹⁾。この FGF23 は以前我々が報告した Klotho と強く関連しており、亜鉛欠乏ラットでの Klotho 遺伝子の発現低下は、FGF23 の発現を亢進させる可能性がある。したがって、腎臓でのリンの再吸収に対し

FGF23 の発現亢進は尿細管でのリンの再吸収を抑制し尿中リンの排泄亢進に繋がったと考えられる。近年、FGF23 を過剰発現させると骨芽細胞の分化を抑制するだけでなく、骨芽細胞による骨化も抑制すると報告している⁹⁾。本実験で明らかになった尿中リン値の増加には、骨芽細胞活性の低下と、Klotho 遺伝子の発現低下^{10,11)} および FGF23 発現亢進^{12,13)} などの関与が伺われる。これらの機序の詳細については今後検討の余地がある。

本研究で得られた知見は、骨粗鬆症の予防的観点からは、亜鉛が重要な微量栄養素であることを示唆するものである。

参考文献

- 1) Holloway WR, Collier FM, Herbst RE, Hodge JM, Nicholson GC. (1996) Osteoblast-mediated effects of zinc on isolated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and enhancement of osteoclast number. *Bone* 19: 137-42.
- 2) Brown AJ, Ritter CS. (2011) The vitamin D analog 1 α ,25-Dihydroxy-2 β -(3-Hydroxypropyloxy) vitamin D(3) (Eldecalcitol) is a potent regulator of calcium and phosphate metabolism. *Calcif Tissue Int.* 89: 372-8.
- 3) Miyazaki T, Matsunaga T, Miyazaki S, Hokari S, Komoda T. (2004) Changes in receptor activator of nuclear factor-kappaB, and its ligand, osteoprotegerin, bone-type alkaline phosphatase, and tartrate-resistant acid phosphatase in ovariectomized rats. *J*

- Cell Biochem. 93: 503–12.
- 4) W. M. Becker and W.G. Hoekstra, (1966) Effect of vitamin D on ⁶⁵Zn absorption, distribution and turnover in rats J. Nut. 90: 301–9.
 - 5) William A. H, Ross M.W, Darrellere R.C, Effect of phytic acid on the absorption, distribution, and endogenous excretion of zinc in rats, J. Nut 1982; 112: 941–53.
 - 6) Nodera M, Yanagisawa H, Wada O. (2001) Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. Life Sci. 69: 1639–49.
 - 7) Stěpán JJ, Tesarová A, Havránek T, Jodl J, Formánková J, et al., (1985) Age and sex dependency of the biochemical indices of bone remodelling. Clin Chim Acta. 151: 273–83.
 - 8) Houston J, Smith K, Isakova T, Sowden N, Wolf M, Gutiérrez OM. (2012) Associations of Dietary Phosphorus Intake, Urinary Phosphate Excretion, and Fibroblast Growth Factor 23 With Vascular Stiffness in Chronic Kidney Disease. J Ren Nutr. In press
 - 9) Kurihara N, Yanagisawa H, Sato M, Tien CK, Wada O. (2002) Increased renal vascular resistance in zinc-deficient rats: role of nitric oxide and superoxide. Clin Exp Pharmacol Physiol. 29: 1096–104.
 - 10) Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, et al., (2008) Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. J Bone Miner Res. 23: 939–48.
 - 11) Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Forster R, Saini R, et al., (2012) The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. Rev Endocr Metab Disord. 13: 57–69.
 - 12) Miyazaki T, Takenaka T, Inoue T, Sato M, Eiki Y, et al., (2009) Zinc deficiency may accelerate aging by inhibiting Klotho mRNA expression Trace Nutrients Research. 25: 1–5
 - 13) Rendina D, Esposito T, Mossetti G, De Filippo G, Gianfrancesco F, et al., (2012) A functional allelic variant of the FGF23 gene is associated with renal phosphate leak in calcium nephrolithiasis. J Clin Endocrinol Metab. 97: E840–4.