

# 簡易な低マンガン飼料を投与したラットにおける肝臓アルギナーゼ活性の低下と血清鉄濃度の上昇

吉田 宗弘<sup>†</sup>, 藺田 峻輔, 山口 由貴, 細見 亮太, 福永 健治

(関西大学化学生命工学部食品栄養化学研究室\*)

(受付 2024年8月26日, 受理 2024年9月26日)

## Decreased liver arginase activity and increased serum iron concentration in rats fed a simple low-manganese diet

Munehiro Yoshida<sup>†</sup>, Shunsuke SONODA, Yuki YAMAGUCHI, Ryota HOSOMI, Kenji FUKUNAGA  
*Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering,  
Kansai University*

### Summary

AIN93G diet without manganese carbonate was used as a simple low-manganese diet, and the extent to which manganese status is reduced when it is administered to growing rats was examined. Twelve 4-week-old male Wistar rats were divided into two groups, one of which received the AIN93G diet (manganese concentration, 10 µg/g) and the other the AIN93G diet without manganese carbonate (manganese concentration, 0.3 µg/g) for 4 weeks. There was no difference in rat growth between the two groups, and no clinical signs related to manganese deficiency were observed at all in the low-manganese diet group. Organ manganese concentrations were clearly reduced by the low manganese diet, with values in the low manganese group being 28.4% of the control group in the liver and 49.3% of the control group in the kidneys. Arginase activity in the liver was also significantly decreased in the low manganese group, but the decrease was not as pronounced as in the manganese concentration, as 79.2% of the values were maintained in the low manganese group compared to the control group. In serum biochemical tests, the low-manganese diet group showed slightly but significantly higher serum iron concentration and transferrin saturation than the control group. To induce manganese deficiency with a simple low-manganese diet, it may be necessary to administer a low-manganese diet immediately after weaning for multiple generations.

マンガンはヒトを含む高等動物において必須の微量元素であり、ラットなどの実験動物に長期にわたって低マンガン飼料を投与した場合、成長阻害や骨格異常などの症状が出現する<sup>1)</sup>。ヒトでのマンガン欠乏は、胆管に存在する胆汁中マンガンの再吸収に関わるタンパク質が先天的に変異している事例において認められているが<sup>2)</sup>、食事性のマンガン欠乏は実験的に低マンガン食を投与した場合も含めて明確でない<sup>3)</sup>。鉄の消化管吸収に関わる輸送担体である Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) がマンガンも輸送するため<sup>1)</sup>、鉄の摂取量が少ない場合、マンガンの吸収量が増加し、マンガンが臓器に蓄積することが確認されているが<sup>4)</sup>、マンガン摂取量が少ない場合の影響については明確でない。

マンガン欠乏の影響を検討するには、マンガン濃度の低

い飼料が必要である。ラットの栄養試験で汎用される AIN93G 飼料には、炭酸マンガンを飼料中マンガンの濃度として 10 µg/g 配合されている<sup>5)</sup>。マンガンの低い飼料として、炭酸マンガンを非添加の AIN93G 飼料が考えられるが、このような簡易な低マンガン飼料によって、実験動物のマンガン状態をどの程度低くできるかは明確でない。そこで本研究では、簡易な低マンガン食飼料を成長期ラットに投与し、臓器中マンガンの濃度、マンガン含有酵素アルギナーゼ活性、および血清鉄濃度の変化について検討した。

### 実験方法

#### 1. 実験動物の飼育

4週齢の Wistar 系雄ラット (清水実験材料株式会社,

<sup>†</sup>連絡先 (Corresponding author), Tel: 090-9990-1853, E-mail: gshpx44@xb3.so-net.ne.jp

\*所在地: 大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

京都) 12頭を2群に分け, 1群(対照群)には10 µg/gのマンガンを炭酸マンガンを添加しているAIN93G飼料, もう1群(低マンガング群)にはAIN93G飼料に用いるミネラル配合から炭酸マンガンを除去して調製した低マンガング飼料を投与し, 4週間飼育した。飼育期間終了後, 肝臓, 腎臓, 血液を採取した。

本動物実験は, 関西大学動物実験委員会の承認(承認番号, 2202)を得て実施した。

## 2. 分析

血液試料については, 血球計算と血清生化学検査を日本医学株式会社(貝塚)に委託した。得られた測定値中の血清鉄濃度と総鉄結合能の比よりトランスフェリン飽和率(%)を算定した。肝臓と腎臓, および飼料は, 10倍量の硝酸を用いて灰化し, 得られた分解液を適宜希釈して含有されるマンガンを誘導結合プラズマ質量分析(ICPMS)にて定量した。ICPMSによる分析においては, 機器としてICPM2030(島津製作所, 京都), 分析質量数として55, 内部標準として<sup>103</sup>ロジウムを用いた。

肝臓の一部を9倍量の生理食塩水でホモジナイズし, 10%ホモジネートを調製した。ホモジネート0.1 mLに25 mM Tris塩酸緩衝液(pH 7.2) 0.3 mLと同緩衝液に溶解した50 mM アルギニン0.1 mLを加え, 37°Cで反応させた。10分後に1.5 Mの過塩素酸を1 mLを加えて反応を停止させ, さらに2 Mの炭酸カリウムを加えて中和した。この反応液を遠心して得られる上清中のオルニチンを, フェニルイソチオシアネート試薬を用いるプレカラム誘導体化法による高速液体クロマトグラフィーにより定量し, 反応時間1分あたりに生成するオルニチン量に基づいてアルギナーゼ活性を求めた。

対照群と低マンガング群間の比較は対応のないt検定によって行った。

## 結果

ミネラル配合から炭酸マンガンを除去することによって調製した低マンガング飼料のマンガング濃度は0.3 µg/gであった。

飼育期間終了後のラットの体重(平均値±標準誤差)は, 対照群296 ± 4 g, 低マンガング食群289 ± 6 gであり, 差を認めなかった。また, 低マンガング食群において, マンガング欠乏に関連するような臨床症状はまったく認められなかった。

Table 1に肝臓と腎臓のマンガング濃度と肝臓のアルギナーゼ活性値をまとめた。臓器中マンガング濃度は低マンガング飼料の投与によって明らかに低下し, 低マンガング群では対照群に比較し, 肝臓で28.4%, 腎臓で49.3%の値であった。肝臓のアルギナーゼ活性も低マンガング群で有意に低下したが, 対照群の79.2%の値であり, マンガング濃度ほど顕著な低下ではなかった。

Table 2に血清鉄濃度, 血清鉄と血清総鉄結合能から算出したトランスフェリン飽和率, およびヘモグロビン濃度をまとめた。血清鉄濃度とトランスフェリン飽和率は, 低マンガング食群において, 数値的にはわずかであるが有意に高い値を示した。

## 考察

本研究では, AIN93G飼料のミネラル配合から炭酸マンガンを除去したものを簡易な低マンガング飼料として用いた。この低マンガング飼料を分析したところ0.3 µg/gのマンガングが存在していた。このことは, AIN93G飼料の調製に用いたミルクカゼインまたはトウモロコシデンブんにマンガングが混入していたことを示している。AIN93G飼料は半精製飼料であり, 天然物であるカゼインやトウモロコシデンブンを使用していることから, ある程度のマンガングの混入は避けられないといえよう。厳密なマンガング欠乏食を調製するには, 試薬グレードのアミノ酸やグルコースを用いる必

**Table 1** Effect of low manganese diet on organ manganese and hepatic arginase activity

Experimental group	Manganese concentration (µg/g)		Hepatic arginase activity (µmol ornithine/min/g liver)
	Liver	Kidney	
Control	3.22 ± 0.09	1.41 ± 0.03	5.30 ± 0.19
Low manganese	0.91 ± 0.03***	0.70 ± 0.02***	4.20 ± 0.19**

Values are means ± SEM (n=6). Significant difference was observed from control group at  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.001$  (\*\*\*).

**Table 2** Effect of low manganese diet on blood indicators of iron nutritional status

Experimental group	Serum iron (µg/dL)	Transferrin saturation (%)	Hemoglobin (g/dL)
Control	223 ± 6	42.4 ± 1.5	14.0 ± 0.3
Low manganese	272 ± 5***	51.3 ± 0.8***	14.1 ± 0.1

Values are means ± SEM (n=6).

\*\*\*, Significant difference was observed from control group at  $p < 0.001$ .

要があるだろう。

簡易な低マンガン飼料を成長期ラットに与えた場合、肝臓や腎臓のマンガン濃度はかなり低くなったが、マンガン含有酵素であるアルギナーゼの活性は20%程度しか低下していなかった。本実験に用いたラットは4週齢であり、離乳後から1週間程度は天然物からなる固形飼料(MF, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京)を摂取していた。オリエンタル酵母社の資料によれば、このMF飼料には52 µg/gのマンガンが含有されている<sup>6)</sup>。すなわち、今回用いたラットは、母ラットから受け継いだマンガンを加えて、AIN93G飼料の5倍以上の濃度のマンガンを含む飼料を1週間摂取しており、栄養試験開始時点において体内に相当量のマンガンを蓄積していたと考えられる。マンガンの排泄経路は胆汁であるが、胆汁中のマンガンの多くは胆管に存在するZrt、Irt-like protein 8 (ZIP8)によって再吸収されることが知られおり<sup>7)</sup>、体内に存在するマンガンのうち体外に排泄される割合はきわめて低いと考えられる。このため、簡易な低マンガン飼料を投与しても臓器中マンガンの総量が大幅に減少することなく、成長に伴う臓器重量の増加に伴い、濃度としては希釈されたかたちで低い値を示したと考えられる。一方、マンガン含有酵素であるアルギナーゼ活性の低下は緩やかであり、マンガン欠乏の症状が出現するに至らなかった。今回のような簡易な低マンガン飼料を用いて、生体内の機能性マンガン含有分子の発現を低下させてマンガン欠乏症を誘発するには、複数世代にわたる飼育、さらに離乳直後からの低マンガン飼料の投与が必要であろう。

簡易な低マンガン飼料の投与により、血清鉄濃度とトランスフェリン飽和率はわずかではあるが有意に上昇していた。マンガンの消化管吸収には鉄の輸送体であるDMT1が関わっており<sup>1)</sup>、鉄とマンガンの吸収は拮抗していると考えられる。AIN93G飼料における鉄とマンガンの濃度のモル比は3.7:1であることから、低マンガン飼料投与ではマンガン摂取量が少ない分だけ鉄の吸収量が増えた可能性が高い。ただし、マンガン摂取量の低下に伴い、DMT1の発現量が増えた可能性も考えられることから、低マンガン飼料投与がDMT1や胆管におけるZIP8の発現に及ぼす影響も検討する必要があるだろう。

今回の研究の目的は、マンガン非添加のAIN93G飼料という簡易な低マンガン飼料によって、ラットのマンガン状態がどの程度低下するかを検討することであった。簡易な低マンガン飼料の投与は臓器中マンガン濃度を相当に低

くすることができたが、マンガン含有酵素の活性低下は有意ではあったが大きいものではなく、マンガン欠乏と考えられる症状は生じなかった。簡易な低マンガン飼料を用いてマンガン欠乏を惹起するには、離乳直後からの低マンガン飼料の複数世代にわたる投与が必要であろう。

## 文 献

- 1) Nielsen FH (2020) Manganese, molybdenum, boron, and other trace elements. In: Present Knowledge in Nutrition: Basic Nutrition and Metabolism 11th ed. (ed by Marriott BP, Birt DF, Stallings VA, Yates AA), Academic Press is an imprint of Elsevier, London, 485-500.
- 2) Park JH, Hogrebe M, Gruneberg M, DuChesne I, von der Heiden AL, Reunert J, Schlingmann KP, Boycott KM, Beaulieu CL, Mhanni AA, Innes AM, Hörtnagel K, Biskup S, Gleixner EM, Kurlemann G, Fiedler B, Omran H, Rutsch F, Wada Y, Tsiakas K, Santer R, Nebert DW, Rust S, Marquardt T (2015) SLC39A8 deficiency: a disorder of manganese transport and glycosylation. *Am J Hum Genet* 97: 894-903.
- 3) Friedman BJ, Freeland-Graves JH, Bales CW, Behmardi F, Shorey-Kutschke RL, Willis RA, Crosby JB, Trickett PC, Houston SD (1987) Manganese balance and clinical observations in young men fed a manganese-deficient diet. *J Nutr* 117: 133-143.
- 4) 由上文子, 津本真也, 齊 悦, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘 (2017) 低鉄飼料投与ラットにおけるマンガンの臓器蓄積, *微量栄養素研究* 34: 47-51.
- 5) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76 A rodent diet. *J Nutr*. 123: 1939-1951.
- 6) オリエンタル酵母工業株式会社: 飼料の主要成分一覧, <https://www.oyc.co.jp/bio/LAD-equipment/LAD/ingredient.html> (2024年8月21日アクセス)
- 7) 藤代瞳, 姫野誠一郎 (2018) 生体内カドミウム・マンガン輸送における重鉛輸送体 ZIP8 の役割. *生化学* 90: 340-347.