

ラットにおける亜鉛の栄養状態とアルコール経口摂取との関係

原田 まつ子^{1, 2)} 林 あつみ¹⁾ 吉田 正雄²⁾
井上 聡³⁾ 菊田 香苗²⁾

Association between Alcohol Consumption and Nutritional Status of Zinc in Female Rats

Matsuko HARADA Atsumi HAYASHI Masao YOSHIDA
Satoshi INOUE Kanae KARITA

要旨

先行研究では、若年女性で味覚感度が低下している者において亜鉛摂取不足や飲酒習慣の関与が報告されている。そこで本研究では、若年女性の生活習慣改善の一助となることを目的に、成長期の雌性正常ラットを用い、活性中心に亜鉛を必要とする ACE 活性比と LAP 活性値、ALP 活性値および血中亜鉛濃度を亜鉛栄養状態の指標とし、エタノールの習慣的摂取が亜鉛要求量にどのような影響を及ぼすか、エタノール摂取を中止すると血清亜鉛濃度が回復するかこれらの関連性について検討を行った。その結果、亜鉛含有量の違いによる摂食量およびエタノール摂取量は実験期間を通して大きな差異は認められなかった。また、体重においても有意な関連は認められなかった。臓器重量は、コントロール食の水からエタノールに切替えた群と比較して低亜鉛食の水からエタノールに切替えた群では、腎周囲脂肪重量が有意に低い結果となった。

亜鉛欠乏状態の指標となるデータについて飲料水切替前後の変化を追跡したところ、コントロール食群では、水からエタノールに切替えた後に血清 ALP 活性値の低下のみが観察されたが、エタノールから水に切替えると元の値に戻った。一方、低亜鉛食群では、血清亜鉛濃度、ACE 活性比および ALP 活性値に有意な変動がみられ、アルコール摂取の影響を大きく受けていることが示唆された。

以上、本研究における成長期の雌性正常ラットの ACE 活性比および血清亜鉛濃度の結果から、低亜鉛食の摂取による亜鉛欠乏状態を確認することができた。亜鉛が充足したバランスの良い栄養素の摂取状態では、アルコールを摂取した場合でもアルコール脱水素酵素の代謝が順調に行われ、アルコール摂取を中止すれば回復する可能性が示された。しかし、低亜鉛食摂取状態の持続は、アルコール摂取が亜鉛要求量に影響を及ぼすことが推察された。若年女性においても、欠食や偏食等による亜鉛摂取量の不足に加え、食品添加物の多い食事やアルコール摂取量が増えることで、アルコール脱水素酵素の分解能力の低下に陥り、さらなる亜鉛欠乏状態を招くおそれがある。

キーワード：ラット、亜鉛、アルコール、亜鉛栄養状態

1. 緒言

亜鉛欠乏症状の1つとして味覚障害が挙げられるが、2003年の調査において味覚障害患者は13年前に比べて約10万人も増加し、約24万人にのぼることが報告されている^{1, 2)}。また、愛場

ら³⁾の大阪市立病院と大阪医療センターの味覚外来患者を1992～2009年に調査した結果でも同様に増加傾向にあり、若年者における味覚低下も多いことが報告されている⁴⁾。味覚障害の原因としては、亜鉛等の栄養素摂取量⁵⁻⁷⁾や飲酒習慣^{7, 8)}のほか、加齢や性別^{1, 8-13)}、抑うつ状態^{14, 15)}、喫煙^{9, 11, 8, 17)}、月経周期¹⁸⁻²⁵⁾、嗜好²⁶⁻²⁸⁾などの報告がある。

若年期女性の食生活状況については、瘦身願

1) 東京家政大学家政学部栄養学科
2) 杏林大学医学部衛生学公衆衛生学教室
3) 帝京科学大学総合教育センター

望や朝食欠食、外食、偏食等によるアンバランスな栄養素摂取が指摘されており²⁹⁻³⁵⁾、内閣府の調査³⁶⁾では若年者の朝食欠食の割合は4割にも達し、平成28年度国民健康・栄養調査によると女性では20歳代が23.1%と最も高く³⁷⁾、亜鉛摂取量の不足による味覚の異常についても懸念されている。また、生活習慣病のリスクを高める量を飲酒している女子の割合は、平成28年国民健康・栄養調査³⁷⁾では平成24年に7.6%であったのに対して9.1%と増加している^{37,38)}。我々は、味覚感度が低下している若年女性で亜鉛摂取量の不足や飲酒習慣の関与が示唆されることを報告してきた⁷⁾。適量のアルコール摂取は、冠動脈疾患の死亡率を低下させ³⁹⁻⁴⁰⁾、ストレス解消にも役立つといわれている。しかし、過剰のアルコール摂取は、脂肪肝や肝硬変などの肝障害、アルコール依存症をはじめ、肥満や高血圧、脂質異常症、慢性腎臓病といった生活習慣病の原因となるため、習慣的なアルコール過剰摂取の健康への影響が危惧されている。

一方、亜鉛は生物の成長に必須の栄養素^{41,42)}であり、ヒトでは体重70kgの人で骨格筋、骨、皮膚、肝臓、脳、腎臓等の体内に約2.0g分布し⁴³⁾、皮膚代謝、核酸・たんぱく質の合成、ホルモンの合成・分泌、味蕾形成など多くの生理的役割に関与している。亜鉛は、Keilinら⁴⁴⁾が炭酸脱水酵素の構成成分であることを報告したのをはじめ、代謝に関与する300種類以上の酵素成分として生体内の種々の生理機能を担っており⁴⁵⁾、主要なものとしてアルコール脱水素酵素 (ADH)、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)、アルカリホスファターゼ (ALP)、スーパーオキシドジムスターゼ (SOD)、アンギオテンシン変換酵素 (ACE)、DNAポリメラーゼ等が知られている。

亜鉛の栄養状態の判定には、近年、Whiteら

⁴⁶⁾やDahlheimら⁴⁷⁾が実験動物において血中には亜鉛と結合した活性型 ACE と結合していない非活性型 ACE (apo-ACE) が存在していることを報告し、坂井⁴⁸⁾、武田⁴⁹⁾、小林^{50,51)}、高岡⁵²⁾、猿倉⁵³⁾はヒトで、また、Apgar⁵⁴⁾はモルモットで、亜鉛欠乏状態では ACE の活性型に対する非活性型の割合が上昇するため、ACE 活性比が指標として有用であると報告している。また Weismann ら⁵⁵⁾は、亜鉛欠乏状態では ALP 合成が制限され活性低下が見られ、柏原ら⁵⁶⁾も同様に LAP や ALP の活性低下を報告し、亜鉛の体内貯蔵量の指標として有用であることを示している。

一方、飲酒習慣者では、アルコールの分解に必要な ADH が亜鉛含有酵素であるため過度のアルコール摂取は血中と肝臓中の亜鉛濃度を低下させる。このような亜鉛栄養レベルの低下は肝障害の程度と相関し、肝硬変を生じることが報告されている⁵⁷⁾。

以上のことより、味覚低下には、亜鉛摂取量不足やアルコールの過剰摂取がそれぞれ関与すると推察される。そこで本研究では、若年女性を対象としているため、正常雌性ラットを用い、血清亜鉛濃度および ACE 活性比、LAP 活性および ALP 活性値を亜鉛栄養状態の指標とし、アルコール摂取による亜鉛要求への影響と関連性を検討することを目的とした。

2. 実験方法

(1) 実験動物、飼料および飼育条件

4週齢の Sprague-Dawley (SD) 雌性ラット 21匹を三協ラボサービス株式会社 (東京) より購入し、3週間標準固形飼料 (クレア精製飼料, 日本クレア (株), 東京) にて予備飼育後、7週齢時に各群の平均体重が同じになるよう以下の4群に分けた。

- ① コントロール食（クレア精製飼料：亜鉛濃度35.3ppm）+水道水（以下水）群5匹
 ② コントロール食+10%エタノール水（以下エタノール）群5匹
 ③ 低亜鉛食（亜鉛濃度0.7ppm）+水群5匹
 ④ 低亜鉛食+エタノール群6匹
 これらの条件下で7週齢から3週間飼料および飲料水とも自由摂取させ、9週齢時に尾静脈より採血した後、10週齢から3週間は、各群飼

料はそのまま飲料水のみ①と②、および③と④の水とエタノールを相互に交換して飼育を継続し、12週齢時に再び採血し、エタノール経口摂取の有無による亜鉛指標値の変化を観察した。コントロール食および低亜鉛食の組成は表1に示した。飼育は個別のケージで、室温23±2℃、湿度55±10%、8:00~20:00の12時間照明の条件下で行った。すべての実験動物についての取り扱いは、2006年環境省告示第88号「実

表1 飼料の基本組成および亜鉛濃度

| 飼料組成 (%) | コントロール食および低亜鉛食 | |
|--|----------------|---------|
| コーンスターチ | 30.0 | |
| グラニュー糖 | 33.0 | |
| α化デンプン | 1.0 | |
| 卵白粉末 | 20.0 | |
| コーンオイル | 5.0 | |
| セルロースパウダー | 3.0 | |
| ビタミンミックス(クレア精製) | 1.0 | |
| ミネラルミックス*1 | 7.0 | |
| *1 ミネラルミックスの配合量 (mg/飼料 100g) | | |
| | コントロール食 | 低亜鉛食 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,730.0 | 1,730.0 |
| CaHPO ₄ · 2H ₂ O | 1,500.0 | 1,500.0 |
| CaCO ₃ | 1,355.4 | 1,355.4 |
| コーンスターチ | 806.0 | 800.0 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 800.0 | 800.0 |
| NaCl | 600.0 | 600.0 |
| FeC ₆ H ₅ O ₇ · 5H ₂ O | 190.0 | 190.0 |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 15.4 | 15.4 |
| 2ZnCO ₃ · 3Zn(OH) ₂ · H ₂ O | 6.0 | — |
| Ca(IO ₃) ₂ | 1.54 | 1.54 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 1.26 | 1.26 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.4 | 0.4 |
| 合計 | 7,000.0 | 7,000.0 |

験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」を遵守して行い、東京家政大学動物実験委員会の承認を受けて行った研究である（承認番号：2015-01）。

(2) 食餌摂取量・飲水量および体重の推移

摂食量，飲水量および体重は，実験期間中週に2回測定した。摂食量および飲水量は，飲料水切替前および切替後の1匹あたりの平均値を求めた。体重については群ごとと，週ごとの1匹あたりの平均値を求めた。

(3) 解剖および採血方法

実験飼料投与前の6週齢，飲水交換前の9週齢および12週齢に尾静脈より採血を行い，血清中亜鉛含有酵素活性および亜鉛濃度を測定した。血液は遠心分離後，血清を分離し，分析時まで -75°C で凍結保存した。

実験期間終了後の14週齢時に12時間絶食後，イソフルラン麻酔下，腹部大動脈からの全血採血により屠殺した。心臓，肺，肝臓，胃，腎臓，腎周囲脂肪，脳を摘出し生理食塩水で洗浄後，各重量を測定した。

(4) 血清亜鉛濃度の測定

血清亜鉛濃度は，メタロアッセイ亜鉛測定LS（メタロジェニックス株式会社，千葉）で測定した。発色液 $230\mu\text{L}$ に血清試料 $12\mu\text{L}$ を混合し，室温5～10分後，マイクロプレートリーダー（バイオラッド iMark，東京）を用いて主波長 560nm および副波長 690nm の吸光度を測定することにより求めた。

(5) アンギオテンシン変換酵素（ACE）[EC 3.4.15.1] 活性測定および活性比算出

血清中のACE活性の測定には，アンギオテ

ンシン変換酵素キット ACE カラー（富士レビオ（株），東京）を使用し，坂井⁴⁸⁾および小林⁵¹⁾の方法に従って測定した。活性型ACEの測定には， $\text{pH}8.3$ に調整した 1mM リン酸緩衝液（ $150\mu\text{M}$ H_2SO_4 を含む），非活性型ACEを含むACE活性の測定には，亜鉛添加の 1mM リン酸緩衝液（ $150\mu\text{M}$ ZnSO_4 を含む）を用い，あらかじめ水中で血清と等量混合した後，キットの方法に従って測定した。すなわち，基質としてp-ヒドロキシベンゾイル-グリシル-L-ヒスチジル-L-ロイシンを用い，予備加温後，各リン酸緩衝液と合わせた血清に混合し， 37°C 20分反応後，反応を停止し， 505nm で吸光度を測定した。ACE活性比は，坂井⁴⁸⁾やApgar⁵⁴⁾の方法に準じ，以下の式により算出した。なお，亜鉛欠乏度が高いほど，非活性型ACE活性が高くなるためACE活性比は上昇すると報告されている^{48-51, 54)}。

ACE活性比（%）＝非活性型ACE活性／活性型ACE活性 $\times 100$

(6) ロイシンアミノペプチダーゼ（LAP）[EC 3.4.11.1] 活性測定

LAP活性の測定は，基質としてL-ロイシル-p-ニトロアニリド（メルク，ドイツ）を使用し，血清 $10\mu\text{L}$ に基質 $490\mu\text{L}$ を添加後， 37°C 90分反応させ，30%酢酸 $150\mu\text{L}$ で反応を停止した。遊離したp-ニトロアニリンを 410nm の吸光度で測定し，1分間に $1\mu\text{mol}$ のp-ニトロアニリンを遊離させる酵素量を1単位（U）とした。

(7) アルカリフォスファターゼ（ALP）[EC 3.1.3.1] 活性測定

ALP活性の測定は，基質にp-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System（p-NPP）

(シグマアルドリッチジャパン, 東京) を用いることにより測定した。血清10 μ L に p-NPP 490 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C 30分間反応させ、3M NaOH 150 μ L で反応を停止した後、遊離した p-ニトロアニリンを405nm で測定した。1分間に1 μ mol の p-ニトロアニリンを遊離させる酵素量を1単位 (U) とした。

(8) 統計処理

すべての実験データは平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で表示した。統計検定には、統計ソフト SPSS Statistics 24 (日本アイ・ビー・エム株式会社, 東京) を使用し、多群間の比較では一元配置分散分析により解析後、多重比較は Tukey 法を用いた。週齢間の比較は Wilcoxon 符号付順位和検定を行った。いずれの検定も有意水準 p 値は 5% 以下とした。

3. 実験結果

(1) 食餌摂取量・飲水量および体重の変化

飲料水切替前後の平均摂食量および飲水量を表2に示した。摂食量は切替前の7~9週齢では、亜鉛含有量の異なる飼料およびエタノール摂取の有無による有意な差はみられなかったが、切替後の10~12週齢では、低亜鉛食群間において④のエタノールから水に切替えた群と比較して③の水からエタノールに切り替えた群で有意に低い結果となった。切替前後の比較では、①コントロール食群および③低亜鉛食群の水からエタノールに切り替えた群において切替後に有意な摂食量の低下が観察された。

飲水量は、切替前の7~9週齢では、①群と比較して④群において有意に低い結果となったが、飲料水切替後は各群間に有意な差は観察されなかった。また、飲料水切替前後の比較では、①群において水からエタノールに切替えたこと

表2 飲料水切替前後の摂食量および飲水量

| | (g/匹/日) | | | |
|-----------------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| | 摂食量 | | 飲水量 | |
| | 7-9 週齢 (切替前) | 10-12 週齢 (切替後) | 7-9 週齢 (切替前) | 10-12 週齢 (切替後) |
| ①コントロール食 水 \rightarrow エタノール | 17.8 \pm 0.83 | 14.2 \pm 0.64 # | 28.1 \pm 5.89 *b | 19.2 \pm 2.09 # |
| ②コントロール食 エタノール \rightarrow 水 | 15.7 \pm 1.29 | 15.9 \pm 0.86 | 19.2 \pm 1.10 | 26.9 \pm 8.91 |
| ③低亜鉛食 水 \rightarrow エタノール | 14.9 \pm 0.55 | 12.4 \pm 1.26 *a# | 21.9 \pm 1.64 | 19.8 \pm 1.90 |
| ④低亜鉛食 エタノール \rightarrow 水 | 15.3 \pm 1.52 | 16.6 \pm 1.64 *a | 16.2 \pm 2.33 *b | 32.1 \pm 9.88 # |

Mean \pm S.E

*ab 同一符号間における有意差 p<0.05

#切替前後の有意差 p<0.05

により有意に減少した。④群ではエタノールから水に切替たことにより有意に増加した結果となった。

実験期間中に飼料および飲料水から摂取した各群の亜鉛およびエタノールの摂取量を1匹・1日あたりで算出した。なお、水道水中の亜鉛含量は、1.0mg/L (1 μ g/mL) とした。亜鉛摂取量は、コントロール食群①：587.5 μ g, ②：579.8 μ g, 低亜鉛食群③群：29.4 μ g, ④：34.5 μ g となり、低亜鉛食群はコントロール群と比較しておよそ1/18量となった。エタノール摂取量は、コントロール食群①1.92g (10~12週齢), ②1.92g (7~9週齢)、低亜鉛食群③1.98g (10~12週齢), ④1.62g (7~9週齢) であった。

体重については、いずれの週齢においても各群間に有意な差は観察されなかった。

(2) 各臓器重量

実験期間終了後の体重100gあたりの臓器重量を表3に示した。心臓、肺、肝臓、胃、腎臓、脳、腎臓周囲脂肪重量について測定したが、有

意な差がみられたのは腎臓周囲脂肪重量のみであった。いずれも水からエタノールに切替えた群の①コントロール食群に比較して③低亜鉛食群において有意に低い結果となった。その他の臓器については亜鉛欠乏による変化は認められなかった。

(3) 亜鉛の栄養状態

血清中の亜鉛の栄養状態を調べるために血清亜鉛濃度、ACE活性およびLAP活性、ALP活性を測定した。血清亜鉛濃度(表4)、飲料水切替前の9週齢では個体差が大きかったためか4群間に有意な差はみられなかったが、②のコントロール食エタノール摂取群に比較して③の低亜鉛食水摂取群において低い傾向(p=0.089)が観察された。飲料水切替後の12週齢では、①のコントロール食群に比較して③と④の低亜鉛食群において有意に低く、②のコントロール食群に比較して③と④の低亜鉛食群において有意に低い結果となった。飲料水切替前後の比較では、コントロール食群では水からエタノールおよびエタノールから水に切替えたこと

表3 実験期間終了後の臓器重量

| | (g/100g body weight) | | | |
|-------|----------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| | ①コントロール食 水→エタノール | ②コントロール食 エタノール→水 | ③低亜鉛食 水→エタノール | ④低亜鉛食 エタノール→水 |
| 心臓 | 0.35 \pm 0.01 | 0.34 \pm 0.01 | 0.33 \pm 0.01 | 0.36 \pm 0.01 |
| 肺 | 0.45 \pm 0.01 | 0.52 \pm 0.08 | 0.46 \pm 0.00 | 0.45 \pm 0.01 |
| 肝臓 | 2.74 \pm 0.09 | 2.59 \pm 0.06 | 2.71 \pm 0.06 | 2.79 \pm 0.14 |
| 胃 | 0.45 \pm 0.02 | 0.47 \pm 0.02 | 0.51 \pm 0.02 | 0.51 \pm 0.03 |
| 腎臓 | 0.73 \pm 0.02 | 0.74 \pm 0.03 | 0.75 \pm 0.01 | 0.78 \pm 0.03 |
| 腎周囲脂肪 | 5.87 \pm 0.59 *a | 4.82 \pm 0.39 | 3.46 \pm 0.47 *a | 4.46 \pm 0.77 |
| 脳 | 0.74 \pm 0.02 | 0.79 \pm 0.04 | 0.84 \pm 0.01 | 0.83 \pm 0.06 |

Mean \pm S.E

*a 同一符号間における有意差 p<0.05

による血中亜鉛濃度の変化は観察されなかったが、低亜鉛食群においては④のエタノールから水に切替えた群において低値 (p=0.028) が観察された。

血清中の ACE 活性比 (表 4) は、9 週齢では①と②のコントロール食群に対して③の低亜鉛食群において有意に高い結果となり、低亜鉛

食群同士ではエタノール摂取群について有意に低い結果となった。飲料水切替後の12週齢では、①と②のコントロール食群に比較して④の低亜鉛食群において有意に高くなった。飲料水切替前後の比較では、低亜鉛食群について③の水からエタノールに切替えた群で有意に低く、④のエタノールから水に切替えた群においては有意

表 4 血清中亜鉛濃度および ACE 活性比

| | 血清中亜鉛濃度 (μg/dL) | | ACE 活性比 (%) | |
|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 9 週齢 (切替前) | 12 週齢 (切替後) | 9 週齢 (切替前) | 12 週齢 (切替後) |
| ①コントロール食 水→エタノール | 191.0±15.69 | 200.3±9.31 *ab | 3.54±1.48 *e | 5.80±0.80 *h |
| ②コントロール食 エタノール→水 | 197.4±43.69 | 199.7±15.21*cd | 6.23±1.12 *f | 4.43±0.58 *i# |
| ③低亜鉛食 水→エタノール | 93.6±8.88 | 77.1±13.49 *ac | 15.44±3.22 *efg | 7.87±1.10 # |
| ④低亜鉛食 エタノール→水 | 122.6±29.62 | 65.1±8.15 *bd# | 7.81±0.74 *g | 11.00±1.64 *h# |

Mean±S.E.

*a-i 同一符号間における有意差 p<0.05

#9 週齢との有意差 p<0.05

表 5 血清 LAP 活性および ALP 活性

| | 血清 LAP 活性(U/mL) | | 血清 ALP 活性(U/mL) | |
|---------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | 9 週齢 (切替前) | 12 週齢 (切替後) | 9 週齢 (切替前) | 12 週齢 (切替後) |
| ①コントロール食 水→エタノール | 9.20±0.40 *a | 9.87±0.45 | 45.07±6.65 | 29.88±4.02 # |
| ②コントロール食 エタノール→水 | 10.79±0.46 *a | 11.55±1.75 | 28.26±3.23 | 31.39±6.44 |
| ③低亜鉛食 水→エタノール | 9.51±0.18 | 9.29±0.32 | 19.07±1.67 | 26.09±11.01 # |
| ④低亜鉛食 エタノール→水 | 9.72±0.28 | 9.50±0.34 | 26.36±3.70 | 51.88±11.01 # |

Mean±S.E.

*a 同一符号間における有意差 p<0.05

#9 週齢との有意差 p<0.05

に高い結果となった。

血清 LAP 活性 (表5) は、9 週齢では、コントロール食で①の水を摂取した群に対して②のエタノールを摂取した群において有意に高くなったが、低亜鉛食の影響はみられなかった。切替後は各群間に有意な差は観察されなかった。切替前後の比較でもエタノール摂取の影響は認められなかった。

血清 ALP 活性 (表5) は、9 週齢では①コントロール食水摂取群に対して③低亜鉛食水摂取群において平均値では低い結果となったが、エタノール摂取による有意な影響は観察されなかった。飲料水切替後の12週齢においても同様に各実験群間に有意な差は観察されなかった。切替前後の比較では、①のコントロール食群において水からエタノールに切替えたことにより

有意に低下し、低亜鉛食群では、③の水からエタノールに切替えた群および④のエタノールから水に切替えた群いずれにおいても有意な上昇が観察された。

飲料水切替後の血清中の亜鉛栄養状態の変化を表6にまとめた。コントロール食群では、エタノール摂取の影響は、①の水からエタノールに切替後に ALP 活性値の低下にのみ表れ、その他の測定項目に変化はみられなかった。一方、低亜鉛食群では、血清亜鉛濃度について④群で低下、ACE 活性比において③群で低下、④群で上昇し、ALP 活性では、③④群ともに上昇した結果となった。

4. 考察

これまで我々は、若年女性のうち味覚感度の

表6. 飲料水切替後 (12 週齢) の血清亜鉛濃度, ACE 活性比, LAP・ALP 活性値, 亜鉛及びエタノール摂取量の変化

| | 9 週齢 (切替前) から 12 週齢 (切替後) の変化 | | | |
|--------------|-------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | コントロール食 | | 低亜鉛食 | |
| | ①水 ↓ エタノール | ②エタノール ↓ 水 | ③水 ↓ エタノール | ④エタノール ↓ 水 |
| 血清亜鉛濃度 | → | → | → | ↓* |
| ACE 活性比 | → | → | ↓* | ↑* |
| LAP 活性値 | → | → | → | → |
| ALP 活性値 | ↓* | → | ↑* | ↑* |
| 亜鉛摂取量 (μg)/日 | 587.5 | 579.8 | 29.4 | 34.5 |
| エタノール量 (g)/日 | 1.92 | 1.92 | 1.98 | 1.62 |

注) 飲料水切替前 (9 週齢) から切替後 (12 週齢) の血清亜鉛濃度, ACE 活性比, LAP・ALP 活性値の亜鉛栄養状態の変化は、変化なし「→」、低下「↓」、上昇「↑」で示した。

* 有意差 p<0.05

低下している者において亜鉛摂取量の不足および飲酒習慣のあることを報告してきた⁷⁾。すなわち、亜鉛欠乏とアルコール摂取が相乗的に味覚感度の低下に関与していることが考えられる。アルコールの代謝には、亜鉛含有酵素であるアルコール脱水素酵素が必要であるため、飲酒によりさらに亜鉛要求量が増加するものと推察される。そこで、本実験では、成長期の雌性正常ラットを用いることにより、エタノールの習慣的摂取が亜鉛要求量に影響するか、エタノール摂取を中止すると回復するかについてヒトに外挿できるデータを蓄積することを目的として検討を行った。エタノール摂取期間は、亜鉛欠乏の影響は3週間飼育で十分な成績が得られ⁵⁸⁾、また、亜鉛欠乏ラットの味蕾のターンオーバーが約365時間と報告されている⁵⁹⁾ことより、低亜鉛食で3週間飼育後、飲料水を交換することとした。

実験食開始3週間(7~9週齢)では、コントロール食および低亜鉛食群ともに摂食量に有意な差はなく、飲水量ではエタノール摂取群において低い傾向にあった。飲料水切替後(10~12週齢)では、同様にエタノールに切替えた群において摂食量および飲水量とも低い傾向がみられたが、コントロール食群においては水からエタノールに切替えた群で飲水量が有意に減少し、低亜鉛食群では、エタノールから水に切替えた群で有意に増加した結果となり、亜鉛含有割合の異なる飼料摂取による一定の傾向は観察されなかった。また、体重にも有意な影響はみられなかった。低亜鉛食および亜鉛欠乏食給餌により、投与4日目で摂食量が減少したことが報告されている^{60, 61)}が、本実験では亜鉛含有量の違いによる摂食量における差異はみられなかった。そこで、各々の飼料群における亜鉛およびエタノール摂取量を求めたところ、コント

ロール食群で1匹あたり584 μg /日、低亜鉛食群で32 μg /日と、低亜鉛食群はコントロール食の18分の1以下の亜鉛摂取量であったことがわかった。エタノール摂取量は実験期間を通して4群間に大きな差異は認められなかった。

臓器重量については、腎周囲脂肪重量のみコントロール食の水からエタノールに切替えた群に対して低亜鉛食の水からエタノールに切替えた群において有意に低い結果となった。これについては飲料水の条件は同一のため低亜鉛食の影響と考えられる。Hamaguchiら⁵⁸⁾も、3週間および8週間の亜鉛欠乏食投与による精巣周囲脂肪の著しい減少を報告している。しかし、本実験と異なり体重も減少しており、試料中の亜鉛含有量あるいは動物種の違いによるものであるのかは不明である。

エタノール摂取による亜鉛の栄養状態は、血清亜鉛濃度、ACE活性比および亜鉛含有酵素により評価した。血清亜鉛濃度は、飲料水切替前の9週齢では平均値を比較するとコントロール食群が高く低亜鉛食群で低い傾向がみられるが、個体差が大きかったためか統計学的有意差はみられなかった。12週齢では、コントロール食群では血清亜鉛濃度に変化はみられなかったが、低亜鉛食群ではいずれの飲料水においてもさらに血清亜鉛濃度が低下傾向にあった。また、エタノール摂取の影響では、コントロール食群においては血清亜鉛濃度に影響を及ぼすことはなく、低亜鉛食においては平均値に変動はみられたものの有意な差は得られなかった。これらのことより、コントロール食群のように亜鉛摂取量が十分である場合、1日あたり1.92gのエタノール代謝に支障はなく、亜鉛要求量に影響は及ぼさなかったものと推察される。しかし低亜鉛食群では、水からエタノールに切替えた群とエタノールから水に切替えた群のいずれにお

いても、血清亜鉛濃度はコントロール食群と比較して有意に低下したため、エタノール摂取の有無によらず、亜鉛欠乏度がさらに亢進したものと考えられる。

ACE 活性比は亜鉛欠乏状態のよい指標となり、欠乏度が高いほど血清中の非活性型 ACE が上昇するため高値になることが報告されている⁴⁸⁻⁵²⁾。コントロール食群では水からエタノールに切替えた群とエタノールから水に切替えた群いずれにおいても、実験群間および切替前後に有意な差はみられなかった。一方、低亜鉛食群では、9 週齢における水摂取群および12週齢におけるエタノールから水に切替えた群において、コントロール群に比較して有意に上昇したため、低亜鉛食摂取により亜鉛欠乏度が亢進したことが明らかとなった。エタノール摂取の影響では、低亜鉛食群において9 週齢でエタノール摂取群と比較して水摂取群において有意に高い結果となり、12週齢では同様に水に切替えた群において有意に高い結果となった。これらのことより、亜鉛を十分量摂取している場合は血清亜鉛濃度と同様にエタノールの代謝には支障はなかったが、食餌からの亜鉛欠乏状態において本実験条件ではエタノール摂取の中止が ACE 活性比をさらに上げるなど逆の結果が得られた。亜鉛の腸管からの吸収率は摂取量によって変動するため、低亜鉛食ラットにおいて吸収率が亢進していたことが考えられる。一方で、アルコールの慢性多量摂取者では低亜鉛血症が多く、亜鉛の吸収阻害、肝臓での貯蔵亜鉛の低下、尿中排泄量が増したとする報告がある⁵⁷⁾。また、エタノールを投与したラットの糞便中の亜鉛排泄量の増加が認められ⁶²⁾、食餌中の亜鉛濃度が減少すると血清中亜鉛濃度が低下し、肝臓に蓄積され、生命維持活動に優先的に動員されて、最後までホメオスタシスは保持さ

れるともいわれている⁶³⁾。本実験では、もともと低亜鉛状態であったため腸管からの吸収率が上昇してもアルコール代謝のために亜鉛が消費された可能性が考えられるが、今後機序を明らかにする必要がある。

LAP は ACE と同様に亜鉛含有酵素であるが、コントロール食群において水摂取群と比較してエタノール摂取群で高い結果となったが、その他の条件による差異は観察されなかった。亜鉛欠乏状態の指標としては適さないのかもしれない。ALP 活性は、9 週齢において水摂取群で、コントロール食群に比較して低亜鉛食群が有意に低い結果となったが、水からエタノールに切替えた群で、コントロール食群では有意に低下したが低亜鉛食群では有意に上昇し、低亜鉛食群においては水からエタノールに切替えた群においても有意に上昇した。食餌からの亜鉛欠乏状態では一定の傾向が観察されない可能性も否定できない。小島ら⁶³⁾は、高亜鉛食、低亜鉛食および亜鉛欠乏食で6 週間飼育し、血清中亜鉛濃度と ALP 活性を測定しているが、亜鉛欠乏食群と対照食の間に有意な差は認められなかったことを報告している。

最後に、亜鉛栄養状態の指標となるデータについて、飲料水切替前の9 週齢時と切替後の12 週齢時の測定結果の変化を追跡したところ、亜鉛が充足したバランスのよい栄養素の摂取状況下では、アルコールを摂取した場合でも ALP 活性値が低下したのみでアルコール摂取後、水を摂取することにより、元の値に戻る証拠が示された。このことより、亜鉛が適量摂取されていれば、アルコール脱水素酵素の分解能力に影響を及ぼすことはなく、また回復においても影響はないことが示唆された。一方、低亜鉛食条件下では、一定の傾向はみられなかったものの、血清亜鉛濃度、ACE 活性比、血清 ALP 活

性値に変動がみられたことより、明確にアルコール摂取の影響を受けていることが推察された。

平成28年度国民健康・栄養調査結果³⁷⁾によると、若い世代ほど外食や中食の利用割合が高いことが報告されている。現代の食生活は豊かになる一方で、食材や料理の酸化防止目的などにより、リン酸塩類、クエン酸、フィチン酸、グリシン等のキレート作用のある食品添加物が使用されている。亜鉛摂取量不足に食品添加物の摂取による吸収阻害が伴うと、さらに亜鉛の利用効率は低下するものと考えられる。若年女性においても、欠食や偏食等による亜鉛摂取量の不足に加え、食品添加物の多い食事やアルコール摂取量が増えることで、アルコール脱水素酵素の分解能力の低下に陥り、さらなる亜鉛欠乏状態を招くおそれがあり、さらに詳細な検討が必要である。

5. 結論

本実験における低亜鉛食の摂取による亜鉛欠乏状態は、ACE 活性比および血清亜鉛濃度の結果から確認された。また、アルコール脱水素酵素が亜鉛を活性中心に持つため、亜鉛が充足している状態ではアルコールを摂取した場合でも代謝が順調に行われ、アルコール摂取を中止すれば回復する可能性が示された。しかし、低亜鉛食摂取状態の持続は、アルコール摂取が亜鉛要求量に影響を及ぼすことが明らかとなった。亜鉛摂取不足により味覚障害を誘発することが知られているが、さらに慢性的な亜鉛欠乏により、300種類以上におよぶ亜鉛含有酵素活性に影響が及ぼされるため、亜鉛充足状態におけるアルコール摂取時とは異なる吸収および代謝変化が生じる可能性が示唆された。

6. 謝辞

本研究にご協力を頂きました杏林大学の松永直美氏、阿部淑子氏、また東京家政大学の後藤春日氏、高橋里穂氏に深く感謝申し上げます。

7. 引用文献

- 1) 池田稔. 加齢と味覚障害. 日本口腔・咽頭科学会誌, 2012; 25: 133-138.
- 2) 村野健三, 原口兼明, 渡辺荘郁, 他. 味覚障害臨床の診療側の現状. 日本口腔・咽頭科学会誌, 1992; 4: 31-40.
- 3) 愛場庸雅. 味覚障害患者の動向. 日本口腔・咽頭科学会誌, 2011; 24: 135-140.
- 4) 的場幸子, 志村文隆, 新井松夫, 他. 若年者の味覚異常に関する調査研究—第2報— 鶴見大学紀要, 2005; 42: 39-47.
- 5) 富田寛. 亜鉛欠乏と味覚障害—増えている食事性亜鉛欠乏性味覚障害の診断と対策—. The Japanese Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2000; 22: 97-104.
- 6) 石田裕美. 若年成人女子における潜在的亜鉛欠乏と塩味に対する味覚. 日本栄養・食糧学会誌, 1993; 46: 299-307.
- 7) 原田まつ子, 吉田正雄, 井上聡, 他. 若年女性の味覚感度低下と食生活習慣およびストレスとの関連性について. 民族衛生, 2016; 82: 99-109.
- 8) 澤田真人. 味覚閾値測定ならびに味覚閾値に影響する要因. 口腔病学会雑誌, 2005; 72: 28-41.
- 9) 山内由紀, 遠藤壮平, 吉村功. 全口腔法味覚検査 (第2報) —加齢変化と性差・喫煙による影響—. 日本耳鼻咽喉科学会会報, 1995; 98: 1125-1134.
- 10) 大和田国夫, 田中平三, 伊東正明, 他. 加齢に伴う味覚の感受性の変動に関する研

- 究. 日本衛生学雑誌, 1972; 27: 243-247.
- 11) 中里真帆子, 遠藤壮平, 富田寛, 他. 電気味覚閾値の加齢変化について. 日本耳鼻咽喉科学会会報, 1995; 98: 1140-1153.
- 12) 金子真紀子, 水沼俊美, 久野一恵, 他. 肥満における味覚の変化について. 肥満研究, 1999; 5: 30-34.
- 13) 久木野憲司, 水沼俊美, 金子真紀子, 他. 加齢にともなう味覚機能の変化について. 福岡医学雑誌, 1998; 89: 97-101.
- 14) 角田博之, 上島国利, 宮岡等, 他. 味覚閾値と抑うつ程度. 心身医学, 2002; 42: 218-224.
- 15) 村野健三, 原口兼明, 渡辺莊那, 他. 味覚障害臨床の診療側の現状. 口咽科, 1992; 4: 31-41
- 16) Karita K, Harada M, Yosida M, et al. Factors associated with dietary habits and mood states affecting. J Nutr Sci Vitaminol, 2012; 58: 360-365.
- 17) 古場久代. 女性の甘味覚と月経周期. 活水論文集, 1991; 34: 49-56.
- 18) Aiberti-Fidanza A, Fruttini D, Servili M. Gustatory and food habit changes during the menstrual cycle. Internat J Vit Nutr. Res, 1998; 68: 149-153.
- 19) Edward VG, Arnold RK. The Menstrual Cycle and Sensitivity of Taste Perception. Am J Obst & Gynec, 1965; 189-194. 巻数 (vol.) 無し
- 20) 渡利英道, 和泉宏彌, 田中俊誠, 藤本征一郎. 女性と味覚. 臨床婦人科産科, 1992; 46: 115-119.
- 21) 坂口けさみ, 氷見圭子. 性周期に伴う味覚感受性の変動に関する研究. 三重看護, 1989; 10: 121-127.
- 22) 末田香里, 渥見協子, 稲吉友恵, 他. 月経周期における味覚感受性. 名古屋女子大学紀要, 2004; 50: 29-34.
- 23) 山根美智子, 花木啓一, 佐々木くみ子, 他. 女性の味覚と月経周期・体組成との関連. 米子医学雑誌, 2007; 58: 141-146.
- 24) 喜多村尚, 小原郁夫. 月経周期における味覚感度の変動. 日本栄養・食糧学雑誌, 2008; 62: 291-296.
- 25) Peter Wright, Rosemart A Crow. Menstrual Cycle: Effect on Sweetness Preferences in Women. Hormones and Behavior, 1973; 4: 387-391.
- 26) 水田栄之助. 味覚嗜好・感度が各生活習慣病に与える影響 —甘味・塩味を中心に—. 臨床栄養, 2011; 19: 246-247.
- 27) Verma P, Mahaja KK, Mittal S, et al. Salt Preference across Different Phases of Menstrual Cycle. Indian J Physiol Pharmacol, 2005; 49: 99-102.
- 28) 原田まつ子. 栄養士課程の女子学生における食生活要因と自覚症状との関連について. 栄養学雑誌, 1988; 46: 175-184.
- 29) 天本 理恵, 堂蘭美奈, 外山健二. 栄養科学学生における食生活の実態と不定愁訴との関連. 西南女学院大学紀要, 2004; 8: 75-85.
- 30) 池田順子, 福田小百合, 村上俊男, 他. 青年女子の痩せ志向. 日本公衆衛生雑誌, 2008; 55: 777-785.
- 31) 尾峪麻衣, 高山智子, 吉良尚平. 女子大学生の食生活状況および体型・体重調節志向と疲労自覚症状との関連. 日本公衆衛生雑誌, 2005; 52: 387-397.
- 32) 亀崎幸子, 岩井伸夫. 女子短大生の体重調節志向と減量実施及び自覚症状との関連性

- について. 栄養学雑誌, 1998 ; 56 : 347-358.
- 33) 齋藤さな恵, 下田妙子. 女子大学生の栄養素等摂取量と欠食との関連. 東京医療保健大学紀要, 2006 ; 1 : 31-37.
- 34) 原田まつ子, 吉田正雄, 小風暁, 他. 女子短大生の時間帯別の食品群及び栄養素等摂取量と朝食欠食等に関する実態調査. 日本食生活学会誌, 2010 ; 21 : 189-198.
- 35) 内閣府食育推進室. 大学生の食に関する実態・意識調査報告書、<http://ww8.cao.go.jp/syokuiku/more/reseach/pdf/syokugaiyo.pdf>,(2009)
- 36) 厚生労働省健康局健康課栄養指導室 <http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000142359.html> (2017年8月9日)
- 37) 厚生労働省健康局健康課栄養指導室 <http://www.mhlw.go.jp/file/04-houdouhappyou-1094750-kekoukyoku-gantaisakukenzouzoushinka/kekkaigyoku> (2017年11月20日)
- 38) Sesso HD. Alcohol and cardiovascular health : recent findings. *Am. J. Cardiovasc Drugs.* 2001 ; 1 : 167-172.
- 39) Muntwyler J., Hennekens CH, Buring JE. et al. Mortality and light to moderate alcohol consumption after myocardial infarction. *Lancet.* 1998 ; 216 : 86-95.
- 40) Gaziano JM., Buring JE. Alcohol intake, lipids and risks of myocardial infarction. *Novartis.* 1998 ; 86-95.
- 41) Todd W. R., Elvehjem C. A., Hart E.B. Zinc in the Nutrition of the Rat. *Am. J. Physise,* 1934 ; 107 : 146-156.
- 42) Prasad Ananda S., Miale August, et al. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J. laboratory and Clinical Medicine.* 1963 ; 61 : 537-549.
- 43) 宮田學, 諸疾患における亜鉛測定の意義—内科領域を中心として—. 亜鉛栄養治療, 2010 ; 1 : 5-25.
- 44) Keilin D., Mann T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *J. Biochemical.* 1940 ; 34 : 1163.
- 45) 織田公光, 脚光を浴びる亜鉛ホメオスタシス. 新潟歯学会誌, 2006 ; 36 : 243-245.
- 46) White CL., Pschorr J., Jacob IC. M. et al. The effect of zinc in vivo and vitro on the activities of angiotensin converrrting enzyme and kininase- I in the plasma of rats. *Bioc. Pharniacology.* 1986 ; 35 : 2489-2493.
- 47) Dahlheim H., White CL., Rothemund J., et al. Effect of zinc depletion on angiotensin I-converting enzyme in arterial walls and plasma of the rat. *Miner Electrolyte Metab.* 1989 ; 15 : 125-129.
- 48) 坂井孝. ラットの血清亜鉛濃度及びアンギオテンシン変換酵素活性に及ぼす亜鉛欠乏食摂取の影響. 国際研究論叢, 2013 ; 26 : 79-86.
- 49) 武田憲昭. 亜鉛酵素「アンギオテンシン変換酵素」活性比を用いた味覚障害患者の亜鉛栄養状態の評価. *Biomed Res Trace Elements.* 2010 ; 21 : 32-37.
- 50) 小林秀之, 根津理一郎, 高木洋治, 他. アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 活性を用いた亜鉛栄養状態の評価についての臨床的検討. *Biomed Res Trace Elements.* 1993 ; 4 : 57-58.
- 51) 小林秀之. 血漿アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 活性を用いた亜鉛栄養状態の評価. *外科と代謝・栄養.* 1997 ; 31 : 65-75.
- 52) 高岡司. 亜鉛欠乏の機能評価法 : アンギオ

- テンシン変換酵素活性比と味覚障害患者への応用. 口咽科, 2005 ; 17 : 221-226.
- 53) 猿倉薫子. 健常成人における亜鉛栄養状態評価指標としてのACE活性比の検討. 栄養学雑誌. 2011 ; 69. 261-266.
- 54) Apgar J., Everett GA. Low zinc intake affects maintenance of pregnancy in guinea pigs. J. Nutr. 1991;121 : 192-200.
- 55) Weismann K. Hoyer H. Serum alkaline phosphatase and serum zinc levels in the diagnosis and exclusion of zinc deficiency in man. Am. J. Clin Nutr. 1985 ; 41 : 1214-1219
- 56) 柏原典雄, 丸山博隆, 山下佳子, 近藤敏. ラット血清中の酵素, 糖, 脂質, および含窒素成分におよぼす亜鉛欠乏の影響. 日本栄養・食糧学雑誌. 1983 ; 36. 5-13.
- 57) 荒川泰行. 肝疾患とバイオメタル. 黒船出版. 1998.
- 58) Hamaguchi K. Michukawa Y. Uchida N. Ogimoto K. Imai S. Effect of long-term zinc-deficient feeding to the growth of rats. Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ. 2006 ; 55. 89-98.
- 59) 大木光義, 藤田幸子, 富田寛. 亜鉛欠乏による味覚障害ラットの味蕾細胞 turnover について. 味と匂のシンポジウム論文集. 1998 ; 22. 41-44.
- 60) 小松裕介, 後藤知子, 白川仁, 駒井三千夫. 亜鉛欠乏食給餌ラットの摂食量減少期における摂食調節ペプチドの変化. 日本味と匂い学会誌. 2012 ; 19. 387-388. .
- 61) 今野美帆, 後藤知子, 白川仁, 駒井三千夫. 亜鉛欠乏ラットにおける糖溶液嗜好性の変化. 日本味と匂い学会誌. 2014 ; 21. 349-350.
- 62) 谷川久一, 安本潔, 安倍弘彦. : アルコール起因性代謝異常 微量金属代謝異常, 日本臨床 1988 ; 46. 130-134,
- 63) 小島幸美, 林寿美子, 牧憲司, 木村光孝. 成長期ラット唾液腺における亜鉛酵素の亜鉛酵素の性質に関する研究. 九州歯会誌. 2004 ; 58. 203-212.

Abstract

In our previous study, we observed an association between decline in sensing taste and insufficient zinc levels and alcohol consumption in young women. Therefore, we examined whether ethanol consumption is related to the amount of zinc, and whether blood zinc density recovers when ethanol consumption is stopped. For this study, female rats in a period of growth were used, and the angiotensin converting enzyme (ACE) activity ratio, which requires zinc, leukocyte alkaline phosphatase (LAP) activity, alkaline phosphatase (ALP) activity, and blood zinc density as indexes of the nutritional status of zinc, were evaluated. We aimed at helping toward the betterment of the lifestyle of young women. We found almost no difference in the amount of food and ethanol ingested with respect to the zinc content through the experimental period. Moreover, there were no significant differences in weight. However, with respect to organ weight, significantly lower weight of the perinephric fat was observed in the group of rats initially fed low zinc content water and then substituted with ethanol administration compared to that in the group of rats initially controlled water meal and then substituted with ethanol.

The study as determined the changes before and after switching the water with ethanol as an index of decrease in zinc levels. As a result, the group of rats fed a controlled meal exhibited decreased serum ALP activity after substituting water with ethanol. Moreover, serum ALP activity value of the group returned to its original value after changing ethanol to water. However, in the group fed a low zinc meal, blood zinc density, ACE activity ratio, and ALP activity values changed significantly. Therefore, it was suggested that these factors are highly influenced by alcohol consumption.

From the above mentioned results, the decrease in zinc, confirmed by the ACE activity ratio and serum zinc concentration, was found to be due to the low zinc meal in female rats during growth. In case of females consuming a meal with well balanced nutrients and adequate zinc levels, following alcohol consumption, oxidation by alcohol dehydrogenase is normal. Moreover, there is a possibility that blood zinc density will return to normal values after stopping alcohol consumption. However, in this study, the rats were continually fed a low zinc meal, and it was inferred that oxidation of alcohol requires zinc. In addition, in young women, insufficient zinc content because of various reasons, such as missing a meal, consumption of an unbalanced diet, and consuming high levels of many food additives and alcohol, may decrease the levels of alcohol oxidizing agents such as zinc and alcohol dehydrogenase.

Keywords : Rat, Zinc, Alcohol, Nutritional state of zinc