

## 98. 亜鉛欠乏の免疫機能低下に関する分子生物学的機序の解明

木戸 尊將

東京慈恵会医科大学 医学部 環境保健医学講座

Key words : 亜鉛, マクロファージサブタイプ, サイトカイン, ケモカイン

### 緒言

近年、日本人の食生活の変化に伴う栄養素の偏り・欠乏が問題となっている。特に問題となっているのが必須微量元素“亜鉛”である。生体内の亜鉛不足は、成長抑制、免疫機能の低下、味覚異常などの症状を生じる。さらに、亜鉛は抗酸化酵素である Cu/Zn-SOD の活性に重要な働きを担っており、亜鉛が不足することで Cu/Zn-SOD の活性が低下し、活性酸素が増加する<sup>1)</sup>。この活性酸素の増加は、疾患の誘導や増悪を引き起こし、免疫担当細胞“マクロファージ”由来の炎症反応を増大させることも報告されている<sup>2)</sup>。亜鉛欠乏に関する研究報告として、血清中の亜鉛値が低下していることで、全身の免疫機能が低下し敗血症<sup>3)</sup>や肺炎<sup>4)</sup>などの感染性疾患を増強させ、炎症反応を増大させることが示唆されている。しかし、この亜鉛欠乏によって生じる炎症反応の増大について、明確なメカニズムの報告は少ない。この炎症反応の増大を検討する上で重要な臓器は、全身の免疫機能の中樞である“脾臓”である。脾臓にはマクロファージ、Tリンパ球、Bリンパ球が存在する。つまり、脾臓のマクロファージを検討することは、亜鉛欠乏によって生じる炎症反応の増大を解明することに重要な役割を果たす。そこで、本研究では、脾臓のマクロファージに焦点を当て、脾臓マクロファージ由来の炎症反応及びサブタイプ (M1: 炎症マクロファージ、M2: 抗炎症マクロファージ) を検討することで、脾臓で生じている病態的变化を究明した。

### 方法

#### 1. モデル動物のデザイン

Sprague-Dawley ラット 4 週令 (190~200 g) 雄 (各群 8 匹) に亜鉛欠乏食 (亜鉛無添加)、亜鉛標準食 (0.01 % 亜鉛) を毎日等量ずつ 6 週間与え、3 日間毎に体重測定を行った。6 週間後に腹部大動脈から採血を行い、脾臓を摘出した。

#### 2. *Ex-Vivo* による免疫操作

解剖により採取した脾臓をセルストレイナー (BD Falcon, Tokyo) を用いてすり潰し、マクロファージを抽出した。その後、マクロファージにリポポリサッカライドを添加し 6 時間の活性化処理後、TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific Inc, Tokyo) で保存した<sup>5)</sup>。

#### 3. Real-Time PCR による遺伝子発現

TRIzol 試薬からフェノール・クロロホルム抽出を行い、マクロファージの Total RNA を抽出し、cDNA に合成した。その後、Real-time PCR (Roche Diagnostics, Tokyo) を用いて炎症の指標である IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1 $\alpha$  mRNA 発現を観察した。

#### 4. 病理組織学的検討

病理組織学的検討を行うため Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を施し、好中球を観察するために Periodic acid-Schiff (PAS) 染色を施した。さらに免疫組織染色によってマクロファージサブタイプを検討する為に、抗 ED-1 (CD68 : 総マクロファージ)、ED-2 (CD163 : M2 マクロファージ)、ED-3 (CD169 : M1 マクロファージ) 抗体 (BMA Biomedicals

Ltd: Augst, Switzer-land) を用いて免疫組織学的に脾臓のマクロファージサブタイプを観察した。また、脾臓におけるM2マクロファージ数を計測する為に、各脾臓の組織を150倍率で10視野撮影し、イメージングソフトwinroof 2013 (Mitani Co, Tokyo) で陽性細胞数の計測を行った。

## 結 果

### 1. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの体重の推移

亜鉛欠乏食ラットの体重の変化を観察するために、3日間毎に体重を記録した。その結果、14日目より亜鉛欠乏食ラットでは、亜鉛標準食ラットよりも体重増加の抑制が示唆された (図1)。

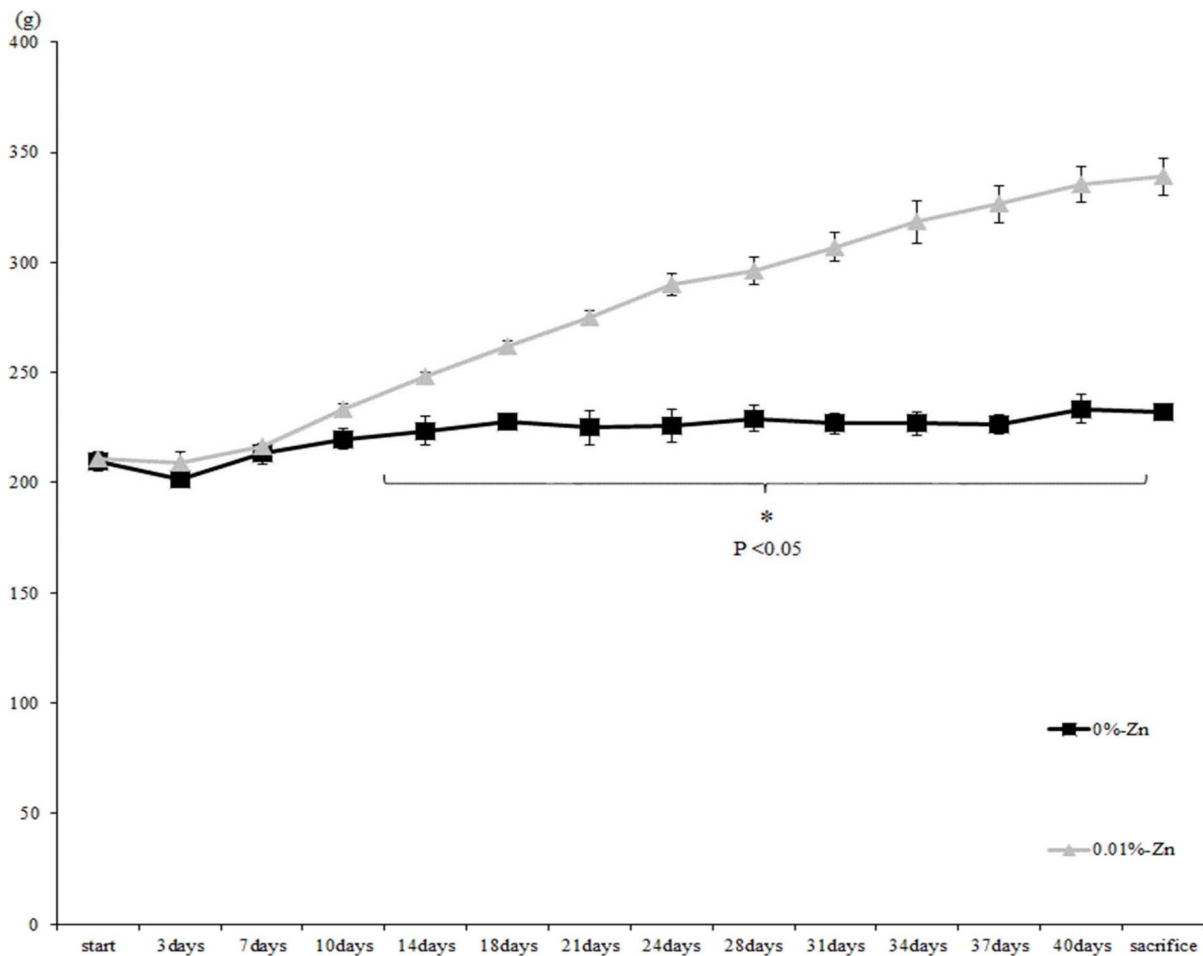


図1. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの体重の推移

Mean values  $\pm$  standard errors are indicated (N=4/groups). P < 0.05 for Student's t-test.

### 2. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの血清中の亜鉛/銅と相対脾臓重量

亜鉛欠乏食ラットでは6週間後の血清中亜鉛値が亜鉛標準食ラットよりも有意に低下し、血清中銅値は有意に増加した (図2A、B)。これは、腸管での栄養素の吸収による影響であり、腸管において亜鉛と銅の拮抗作用が崩れたために生じる影響である。相対脾臓重量は亜鉛欠乏食ラットにおいて有意に増加した。これは、体重増加の抑制が生じたために脾臓重量が増加したと考える (図2C)。

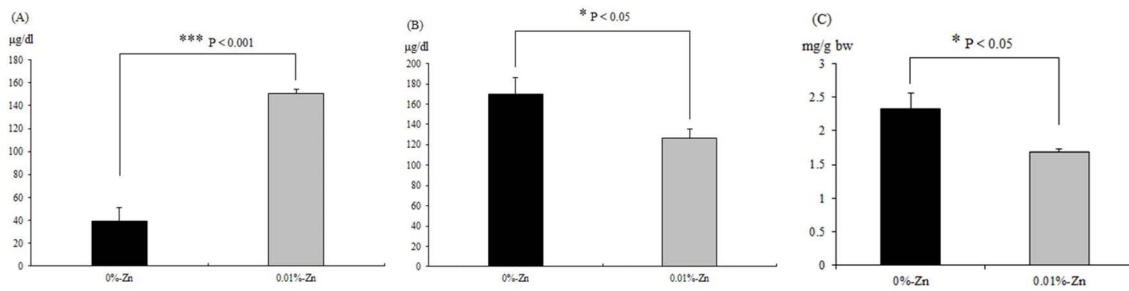


図2. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの血清中の亜鉛/銅と相対脾臓重量

Mean values  $\pm$  standard errors are indicated (N=4/groups). P < 0.05 by Student's t-test. (A) 血清中亜鉛値、(B) 血清中銅値、(C) 相対脾臓重量。

### 3. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓病理組織学的所見

H-E 染色を用いた脾臓組織の構造については、亜鉛欠乏食ラットに構造異常等は観察されなかった。PAS 染色による好中球の観察については、亜鉛欠乏食ラットの脾臓組織の辺縁体において、好中球の多増が確認された。好中球は炎症や感染が生じる部位に観察される。つまり、脾臓において炎症もしくは感染が生じている可能性がある (図3)。

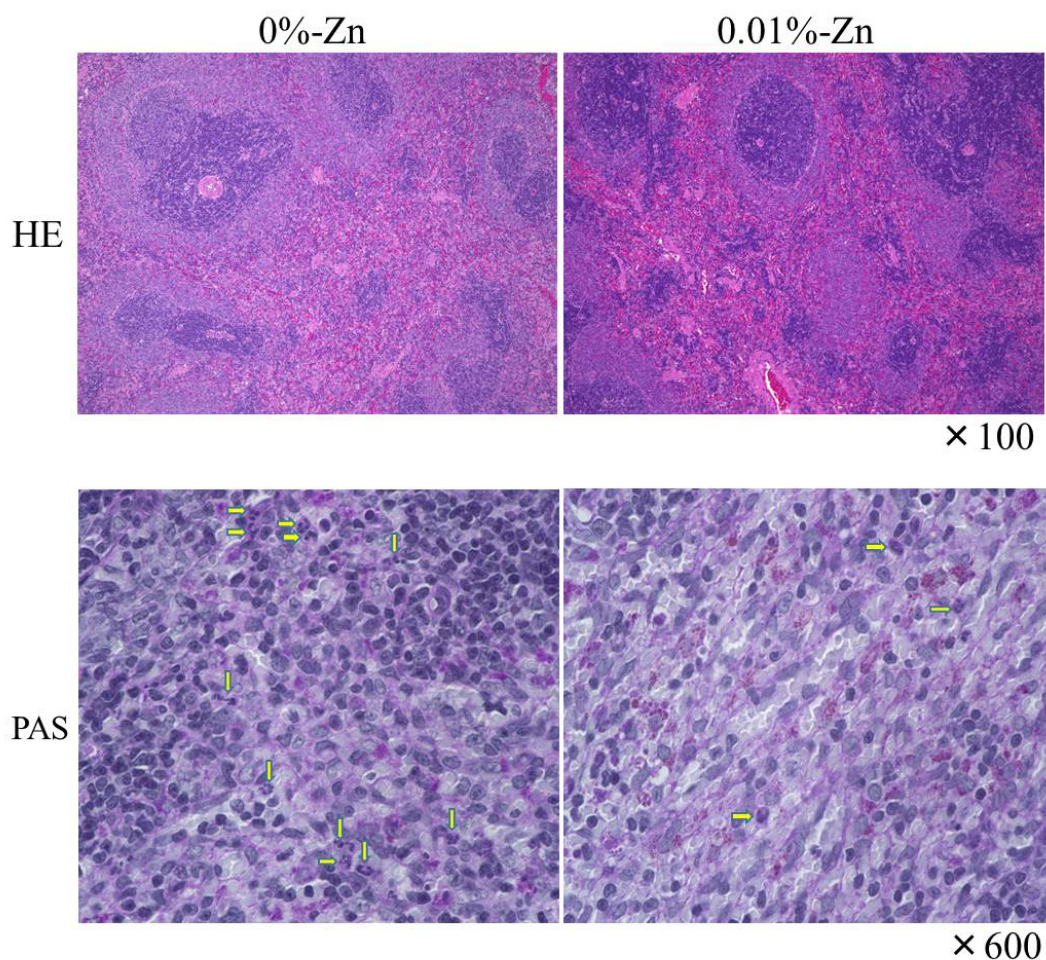


図3. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓病理組織学的所見

H-E 染色: 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓組織構造の確認。

PAS 染色: 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓組織の好中球 (矢印)。

#### 4. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓病理組織における免疫組織学的所見

亜鉛欠乏食ラットならびに亜鉛標準食ラットの脾臓病理組織の総マクロファージ及びマクロファージサブタイプ (M1・M2) の免疫組織学染色の結果については、総マクロファージと M1 マクロファージは変化は観察されなかった (図 4A)。しかし、M2 マクロファージについては減少傾向に組織所見から観察された。そこで、組織イメージング法で陽性細胞数を計測した結果、亜鉛標準食ラットよりも有意に減少した (図 4B)。つまり、亜鉛欠乏食ラットの脾臓では、M2 マクロファージによる抗炎症作用が機能していない可能性がある。

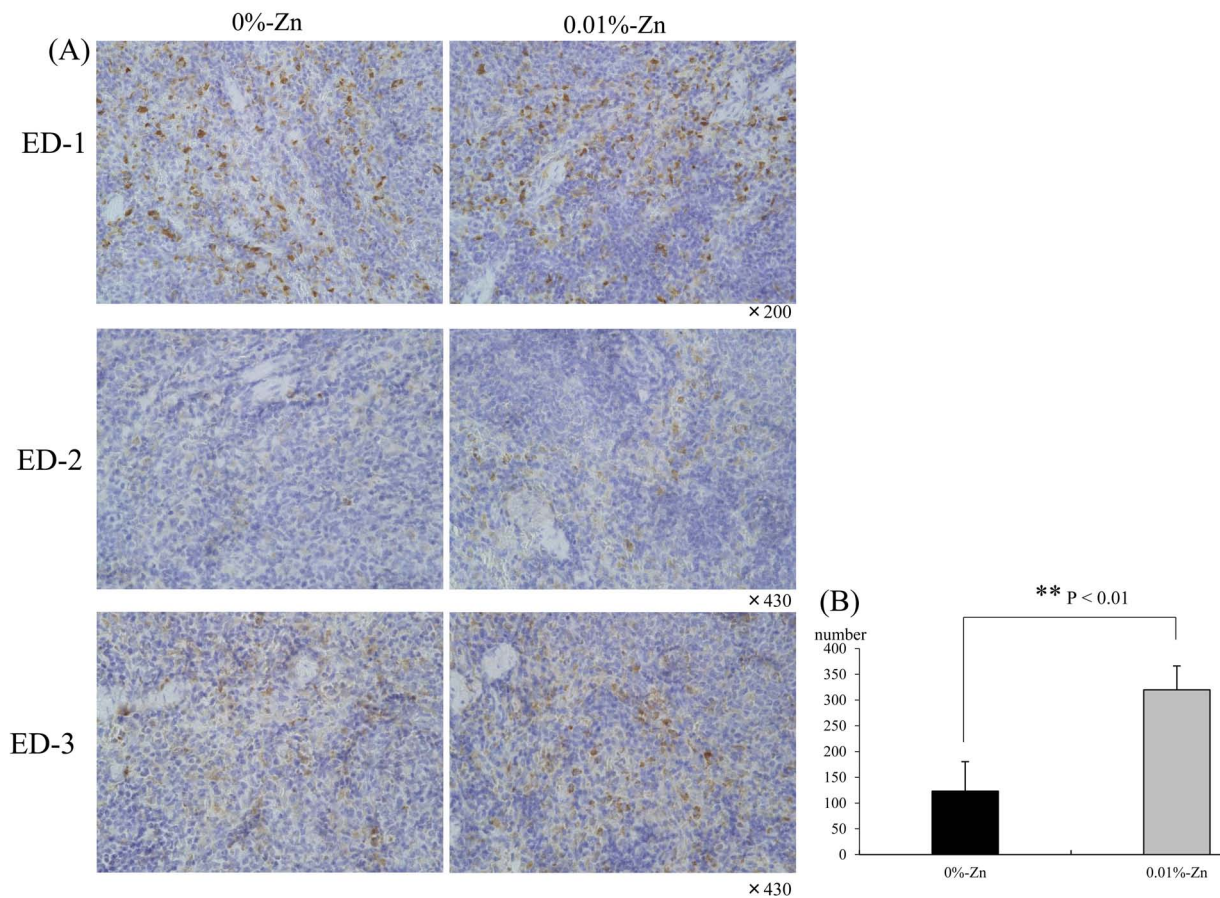


図4. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓病理組織における免疫組織学的所見

(A) ED-1 (CD68: 総マクロファージ)、ED-2 (CD163: M2 マクロファージ)、ED-3 (CD169: M1 マクロファージ) の免疫染色画像。(B) 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの ED-2 陽性細胞のイメージング法によって算出された細胞数の結果。Mean values  $\pm$  standard errors are indicated (N=4/groups).  $P < 0.05$  by Student's t-test.

#### 5. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓マクロファージから産生される炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現の結果

亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓から分離したマクロファージの炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現については、亜鉛欠乏食ラットにおいて炎症反応の指標となる IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 の発現は上昇した (図5)。このことから、脾臓では炎症反応が上昇していることが考えられる。

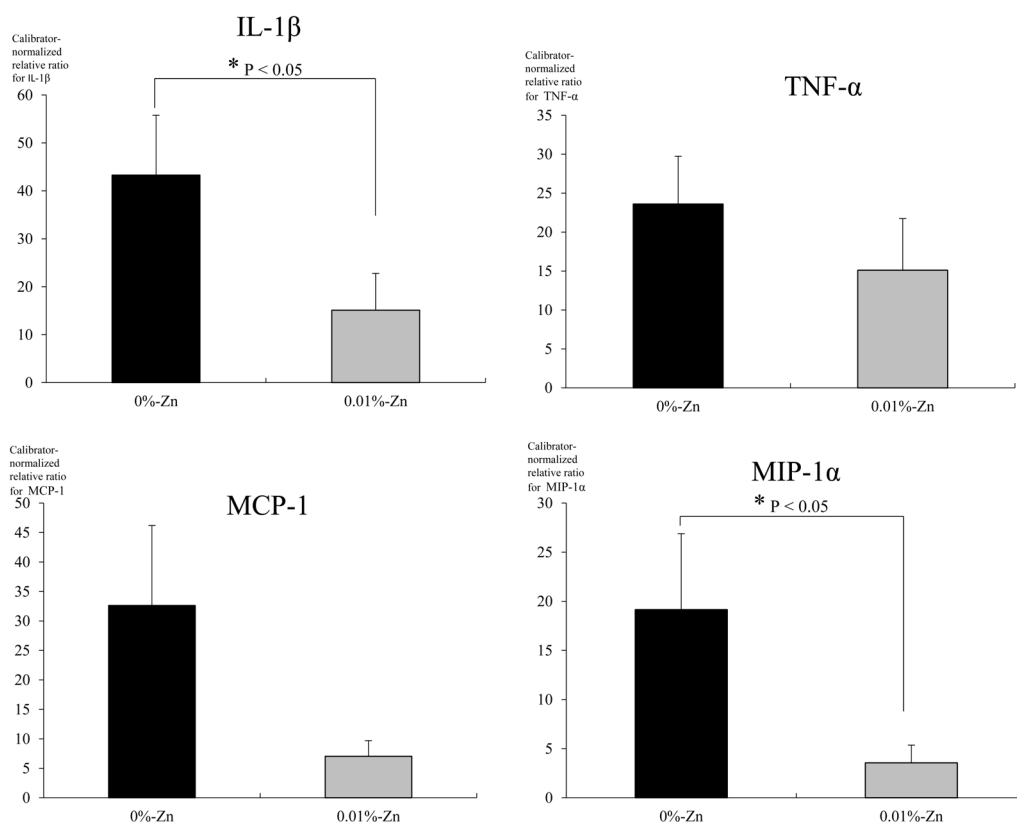


図5. 亜鉛欠乏食ラット及び亜鉛標準食ラットの脾臓マクロファージから産生される炎症性サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現の結果

Mean values  $\pm$  standard errors are indicated (N=4/groups). IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ : P < 0.05 by Student's t-test. TNF- $\alpha$ : P = 0.115, MCP-1: P = 0.093 by Mann-Whitney U test.

## 考 察

H-E 染色において、亜鉛欠乏状態の脾臓では形態学的な変化は観察されなかった。しかし、PAS 染色において、亜鉛欠乏状態では辺縁体で炎症の指標である好中球の増多が観察された。この所見に付随して、脾臓マクロファージの炎症系サイトカイン/ケモカインの mRNA 発現については、亜鉛欠乏食ラットで有意に上昇した。つまり、亜鉛欠乏状態の脾臓では炎症反応を生じていることが示唆された。さらに免疫組織学染色において、総マクロファージ数の変化は観察されなかった。しかし、抗炎症作用のある M2 マクロファージ数は亜鉛欠乏状態で減少している。このことから、亜鉛欠乏状態の炎症反応の上昇には、M2 マクロファージが減少したことで炎症反応が抑制されず、さらに、亜鉛欠乏状態が続くことにより炎症反応が持続する恐れがあると考えられた。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学環境保健講座の須賀万智である。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Yanagisawa H, Moridaira K, Wada O. Zinc deficiency further increases the enhanced expression of endothelin-1 in glomeruli of the obstructed kidney. *Kidney Int.* 2000 Aug;58(2):575-86. PMID: 10916081.

- 2) Demirbilek S, Emre MH, Aydin EN, Edali MN, Aksoy RT, Akin M, Gürünlüoğlu K, Tas E, Ay S, Yilmaz Z. Sulfasalazine reduces inflammatory renal injury in unilateral ureteral obstruction. *Pediatr Nephrol.* 2007 Jun;22(6):804-12. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17294223.
- 3) Besecker BY, Exline MC, Hollyfield J, Phillips G, Disilvestro RA, Wewers MD, Knoell DL. A comparison of zinc metabolism, inflammation, and disease severity in critically ill infected and noninfected adults early after intensive care unit admission. *Am J Clin Nutr.* 2011 Jun;93(6):1356-64. doi: 10.3945/ajcn.110.008417. Epub 2011 Apr 27. PMID: 21525204.
- 4) Natchu UC, Fataki MR, Fawzi WW. Zinc as an adjunct for childhood pneumonia - interpreting early results. *Nutr Rev.* 2008 Jul;66(7):398-405. doi: 10.1111/j.1753-4887.2008.00049.x. PMID: 18667015.
- 5) Kido T, Tsunoda M, Kasai T, Sasaki T, Umeda Y, Senoh H, Yanagisawa H, Asakura M, Aizawa Y, Fukushima S. The increases in relative mRNA expressions of inflammatory cytokines and chemokines in splenic macrophages from rats exposed to multi-walled carbon nanotubes by whole-body inhalation for 13 weeks. *Inhal Toxicol.* 2014 Oct;26(12):750-8. doi: 10.3109/08958378.2014.953275. PMID: 25265050.