

妊娠期の亜鉛欠乏が出生仔の骨代謝に与える影響

学位論文内容の要旨

我が国における妊婦の栄養摂取実態は、妊娠適齢期を迎えている女性のやせ化や低出生体重児の年々の増加などから問題視されている。また、妊娠期間中の低栄養状態と、出生子の骨粗鬆症を含む生活習慣病発症のリスクが密接に関連していることが示唆されている。一方、骨折の予防は今後も高齢化が加速度的に進行する我が国において焦眉の課題といえる。亜鉛は必要不可欠な微量元素であり、欠乏することによって生体への様々な悪影響が懸念される。国民健康栄養調査等でも明らかなように、日本人の女性、とりわけ妊婦の亜鉛摂取は非常に悪い実態にあると示唆される。妊婦の慢性的な亜鉛摂取不足は、出生子に対して骨代謝を含む様々な悪影響を与えることが懸念される。本研究では、このような妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏が出生仔の骨に与える影響を明らかにする一環として、妊娠前及び妊娠期の低亜鉛食が、出生仔の出生時における骨に与える影響についてラットを用いて検討を行った。また、亜鉛欠乏状態が骨の石灰化に与える影響およびその際の細胞における亜鉛運搬機構を解明するために、マウス骨芽細胞株を用いて、様々な亜鉛濃度下における骨石灰化への影響および、当該細胞の亜鉛輸送に関与する分子の発現変化を検討した。さらに本研究では、妊娠前および妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏が出生仔の成長後の骨に与える影響を、骨粗鬆症マウスモデルを用いて検討した。

1. 妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏状態が、出生仔の骨に与える影響の解明

ヒトにおける大部分の慢性的な亜鉛欠乏は中程度亜鉛欠乏という食事性の亜鉛欠乏である。これまで、中程度亜鉛欠乏の妊娠動物からの出生仔への長管骨への影響が報告されているが、出生仔の骨代謝に与える影響は把握されていない。中程度亜鉛欠乏を惹起させるために7 ppmの亜鉛を含む飼料を妊娠前のラットに摂取させ、妊娠期間も同飼料を摂取させた。その結果、出生時の出生仔の中程度亜鉛欠乏による出生仔の頭蓋冠器官培養における骨形成の減弱化、出生仔の骨における亜鉛および他のミネラル含量の低下、そして中程度亜鉛欠乏状態にある母獣とその出生仔における骨形成マーカーである血清オステオカルシン濃度の有意な低下が認められた。これらの原因として、妊娠期における母獣から胎児への亜鉛供給減少の関与が示唆された。

2. 骨の石灰化における亜鉛欠乏の影響と細胞内亜鉛運搬機構の解明

妊娠期における胎児への亜鉛供給減少が、骨の石灰化に与える影響を詳細に把握するこ

とを目的に、マウス骨芽細胞株の石灰化における亜鉛欠乏が石灰化に与える影響と、石灰化における亜鉛の細胞内輸送動態を検討した。血中レベルを想定して、様々な亜鉛濃度となるように当該細胞の培養を続け、石灰化早期および石灰化後期それぞれにおける石灰化の状態を確認したところ、石灰化早期では単位タンパク質量当たりの石灰化能が亜鉛濃度依存的に増加し、また石灰化後期では、タンパク質量を掛け合わせた石灰化量が亜鉛濃度依存的増加を示した。これらより、亜鉛供給が低下した状況下では骨芽細胞の石灰化が遅延する可能性が示唆され、骨石灰化における亜鉛の栄養学的な重要性が示唆された。さらに、これらの現象には、細胞中の亜鉛含量の変化、亜鉛トランスポーターの一種 ZnT-2 と細胞内亜鉛貯蔵タンパク質メタロチオネインそれぞれのメッセンジャーRNA 発現変化が、それぞれ関与していることが示唆された。

3. 妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏状態から出生した仔の成長後における骨への影響の解明

妊娠前を含む妊娠期の中程度亜鉛欠乏が胎児に与えた骨への悪影響が、出生後も長期的に持続するか、あるいは出生後潜在化し成長後に顕在化されるかを明らかにすべく、骨粗鬆症モデルマウスを用いて検討した。1の実験と同様の飼料を妊娠前と妊娠中に摂取させた後、出生後は亜鉛を十分量含む通常飼料を摂取させた。途中、出生仔が4, 8, 12週齢に骨形態計測を実施した。オス・メスそれぞれの出生仔を20週齢で解剖し、骨を摘出して骨強度測定、詳細な骨形態計測を実施した。その結果、出生時に悪影響を与えていた骨への影響は途中で消失したが、驚くべき事に、中程度亜鉛欠乏の母獣のオス出生仔のみにおいて、解剖時の骨強度の低下、および大腿骨における長軸長の低下、さらには骨組織体積の有意な低下が認められた。このことから、中程度亜鉛欠乏状態の母獣から出生したオス特異的に、成長期以降の骨の脆弱化とそれに伴う骨折リスク上昇が示唆された。また、解剖時の血中25(OH)ビタミンD3濃度が中程度亜鉛欠乏の母獣由来オス出生仔特異的に低下したことから、これら骨への影響には25(OH)ビタミンD3濃度が関与していることが示唆された。

以上より、妊娠前および妊娠中の慢性的な亜鉛摂取不足は、出生仔の骨に短期的かつ長期的に悪影響を与えることが明らかとなった。ヒトの慢性的な亜鉛摂取不足を模倣したモデルにおける出生仔の骨への出生時での影響は、動物ではほとんどなされていない。また、母親の慢性的な亜鉛欠乏による、出生仔の成長後での骨への悪影響は、これまでに全く知られていない。さらに、骨の石灰化における細胞レベルでの亜鉛の栄養学的役割評価の研究は少なく、その際の細胞内の亜鉛輸送についての研究は全く知られていない。本研究は、これら新規知見を明らかにすることで、胎児の適切な発生・発育のために、妊娠期における適切な量の亜鉛摂取を強く提案する。妊娠を準備する者の亜鉛不足は、児の成長後における骨折リスクを増大させる可能性がある。児の将来の骨折予防の観点から、本研究では、特に妊娠期の女性は日常より亜鉛を十分量摂取する必要があることを強く提案する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 博
副 査 教 授 横 田 篤
副 査 准教授 石 塚 敏

学 位 論 文 題 名

妊娠期の亜鉛欠乏が出生仔の骨代謝に与える影響

本論文は、122頁からなる和論文であり、図32と表9を含み、参考論文3編（内1編は総説）が添えられている。

我が国における妊婦の栄養摂取実態は、妊娠適齢期を迎えている女性のやせ化や低出生体重児の年々の増加などから問題視されている。また、妊娠期間中の低栄養状態と、出生子の骨粗鬆症を含む生活習慣病発症のリスクが密接に関連していることが示唆されている。一方、骨折の予防は今後も高齢化が加速度的に進行する我が国において焦眉の課題といえる。亜鉛は必要不可欠な微量元素であり、その欠乏は骨代謝をはじめとして生体に様々な悪影響を及ぼすことが知られている。日本人の女性、とりわけ妊婦における亜鉛の栄養状態は非常に悪いことが指摘されており、妊娠期の慢性的な亜鉛摂取不足は、出生子に対して骨代謝に悪影響を及ぼすことが懸念される。本論文では、このような妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏が出生仔の骨に与える影響を明らかにする一環として、以下3点を検討している。

1) 正常ラットを用いて、妊娠前及び妊娠期の低亜鉛食摂取が出生仔の骨に与える影響を観察した試験。2) 骨の石灰化に与える亜鉛の影響を詳細に把握することを目的に、様々な亜鉛濃度で培養したマウス骨芽細胞株を用いて、その石灰化と細胞内亜鉛輸送に関与する分子の発現変化を観察した試験。3) 骨粗鬆症マウスモデルを用いて、妊娠前および妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏が出生仔の成長後の骨に与える長期的影響を観察した試験。以上、一連の研究により、以下のような結果を得ている。

1. 妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏状態が、出生仔の骨に与える影響

ヒトにおける亜鉛欠乏の大部分を占める、中程度亜鉛欠乏モデルとして7ppmの亜鉛を含む飼料を、妊娠前および妊娠期間のラットに摂取させた。その結果、中程度亜鉛欠乏の母獣から出生した仔において、①頭蓋冠器官培養における骨形成の減弱化、②骨における亜鉛および他のミネラル含量の低下、③骨形成マーカーである血清オステオカルシン濃度

の有意な低下、がそれぞれ認められた。本実験では、妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏により、母獣から胎児への亜鉛供給減少を介して胎児の骨発育に悪影響を与えることを示している。

2. 骨の石灰化における亜鉛欠乏の影響と細胞内亜鉛運搬機構の解明

亜鉛欠乏がマウス骨芽細胞株の石灰化に与える影響と、石灰化における亜鉛の細胞内輸送動態の検討においては、血中レベルを想定した、様々な亜鉛濃度で当該細胞を培養した結果、石灰化早期および石灰化後期、いずれの時期においても亜鉛供給が低下した状況下では骨芽細胞の石灰化が遅延することが明らかとなり、骨石灰化における亜鉛の栄養学的な重要性が示された。これらの現象には、亜鉛トランスポーターの一種 ZnT-2 と細胞内亜鉛貯蔵タンパク質メタロチオネインの発現変化が関与していることが示唆された。

3. 妊娠期の慢性的な亜鉛欠乏状態から出生した仔の成長後における骨への影響

妊娠期の中程度亜鉛欠乏が、出生後の胎児に長期的にどのような影響を与えるかを、骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 を用いて検討した。中等度亜鉛欠乏飼料をを妊娠前と妊娠中に摂取させた後、出生仔は亜鉛を十分量含む通常飼料を摂取させ、4, 8, 12 週齢に骨形態計測を実施、本モデルマウスにおいて骨量減少が顕著となる時期である 20 週齢で、オス・メスそれぞれ解剖し、骨を摘出して骨強度測定、詳細な骨形態計測を実施した。その結果、出生時の骨への悪影響は一旦消失したが、中程度亜鉛欠乏の母獣出生仔では、オスのみ 20 週の解剖時において、①骨強度の低下、②大腿骨における長軸長の低下、③骨組織体積の有意な低下、④血中 25(OH)ビタミン D3 濃度の低下、が明らかとなった。すなわち、中程度亜鉛欠乏状態の母獣から出生したオス特異的に、成長期以降の骨の脆弱化とそれに伴う骨折リスクが上昇することを示唆しており、これら骨への影響には 25(OH)ビタミン D3 が関与している可能性を示した。

本論文は、妊娠前および妊娠中の慢性的な亜鉛摂取不足により、出生仔の骨に短期的かつ長期的に悪影響を与えることを明らかにした。ヒトの慢性的な亜鉛摂取不足を模倣したモデルにおける出生仔の骨への影響を検討した実験は、これまでほとんどない。また、母親の慢性的な亜鉛欠乏による、出生仔の成長後の骨への影響は、これまでに全く知られていない。胎児の適切な発生・発育のために、さらに児の将来の骨折予防の観点から、妊娠可能なライフステージにある女性は日常より亜鉛を十分量摂取すべきであることを提案した本論文は、高く評価できる。

よって、審査員一同は、長田昌士が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。