

ミネラル供給源としての牛乳 —運動・ストレス・加齢とミネラルバランス—

順天堂大学医学部衛生学教室 助教授 千葉 百子
講 師 篠 原 厚 子
関 根 美 和

1. はじめに

本研究の目的は運動・ストレス・加齢が体内のミネラルバランスに及ぼす影響を明らかにすることと、ミネラル補給源としての普遍的でかつ低廉な牛乳の有効性を実験的に観察することである。

初年度では市販の牛乳と粉ミルクに含有される元素の種類と濃度を測定し、比較検討を行った。中間年である昨年度はモデル動物として10～70週齢のマウスを使い、自由運動をさせ、血液、骨及び筋肉中の微量元素濃度、カルシウム代謝関連物質の測定、骨密度及び骨の力学特定の測定を行い、牛乳給与実験のための基礎データを得た。

本年度（最終年）はこれまでの実験結果に基づき、牛乳給与実験に取り組むことにした。すなわち、ミネラル欠乏食を与え、飲料として牛乳を自由に摂取できるようにした。対照として、脱イオン水の他に、牛乳摂取量に見合う熱量を補給する群、飼料から抜いたミネラルを飲料水から補給する群を設けた。運動負荷はこれまで水泳、体重負荷、自由走行運動などを試みたが、ここでは自由走行運動を採用した。

本研究ではこの動物について食餌摂取量および飲水量を計測する必要がある。個室ケージは市販品を買い足したが、給餌器と給水ビンは通常飼育に使用しているものでは正確さを欠き、不適当であるため、目的に合ったものを実験を重ねながら整えた。

マウスに供給する牛乳は、市販品の牛乳ではそのまま与えると下痢の原因となり不適当であるとの意見もあり、乳糖不耐症用粉ミルク、スキムミルク等について検討したが、最終的には市販の低脂肪牛乳を2倍希釈して与えることとした。

結果として、5%グルコースを含む飲料は予想よりもはるかに多量を被験動物が摂取したため、牛乳と比較するには要因が複雑に交絡するので、ここでは飲料は脱イオン水と牛乳の2種について報告する。

2. 材料と方法

<飼料>

A：基礎食

B：亜鉛 (Zn) 欠乏食 (基礎食と同じ組成で Zn のみを含まないもの)

C：マグネシウム (Mg) 欠乏食 (基礎食と同じ組成で Mg を含まないもの)

飼料 A~C を特別注文 (オリエンタル酵母工業株式会社) した。

この基礎食は通常飼育用に市販されているものとは異なる粉末飼料である。

<飲料水>

a：脱イオン水

b：牛乳……市販低脂肪牛乳を脱イオン水で2倍希釈したもの

c：5%グルコース溶液……ミルクの消費に見合うカロリーをグルコースで補うという算定で採用した。マウス一匹当たりの1日平均飲水量は5~10mLである。低脂肪牛乳は0.455Kcal/mLであり、2倍希釈牛乳として与えたので0.227Kcal/mLであり、これに対応するグルコースは約0.05g/mLとなる。

d：5%グルコース溶液に牛乳消費量相当分のZn、Mgを添加したもの……牛乳中にはZnが約4ppm、Mgが約100ppm含まれているので、2ppm Zn相当の硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、50ppm Mg相当の塩化マグネシウム (MgCl_2) の5%グルコース溶液として与えた。

<動物>

本実験を開始する時期は幼年期が望ましいと考え、5週齢からとした。

ICR系雌雄マウスを4週齢で購入し、1週間の予備飼育後、各群に分けた。通常の飼育ケージに一匹ずつ飼育する群は1群6匹とした。自由に歯車を回転させて走行運動ができ、走行距離数の計測器の付いたケージに一匹づつ入れて飼育する群は回転ケージ数に制限があるため、原則として1群2匹、欠乏食に牛乳を与えた群のみ、1群3匹とした。

従って餌と飲料の組み合わせは3(飼料)×4(飲料)×2(通常の飼育群と自発運動群)×2(雄と雌)=48群となった。

血液、臓器および骨に対する影響を観察するため、通常のケージで飼育した各群の半数を2週間後に、残りを6週間後に屠殺した。自発運動群については2週間後に屠殺した。

<飼育条件>

被験動物は、温度 $23 \pm 5^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、明7:00~19:00、暗19:00~7:00に設定されている人工気候室内で飼育した。餌と飲料は自由に摂取させた。飲料の消費量は原則として毎日、餌の消費

量は3～4日に1回測定した。

<体重と運動量の測定>

隔日毎に全動物の体重を測定した。回転ケージ群の走行距離数は適宜チェックした。

<血液と臓器の摘出>

エーテル麻酔下で股静脈から血液を採取した後、頸椎を脱臼させてから下大動脈および門脈から5%グルコース液で灌流し、脳、顎下腺、胸腺、心臓、肺、脾臓、膵臓、腎臓、大腿骨、大腿部筋肉、雄では精巣と精囊、雌では卵巣と子宮を摘出し、重量を測定した。

エーテル麻酔下で股静脈から採血する際に、ヘマトクリット値(Ht)を計測した。血液はヘマトクリット値を求めたら、直ちに血漿と血球に分離した。これらの飼料は分析まで-80℃に保存した。

3. 結 果

(a) 体重の変化

<雄>

(i) 非運動群

脱イオン水引用の対照群、Zn欠乏食群、Mg欠乏食群の6週間までの体重変化を平均値と標準偏差(SD)として図1に示す。2週間までは1群6匹、それ以後は1群3匹である。2週間までは各群間に差はみられなかった。それ以後、対照群に対してZn欠乏食群では体重は低下し、Mg欠乏食群では体重は増加した。

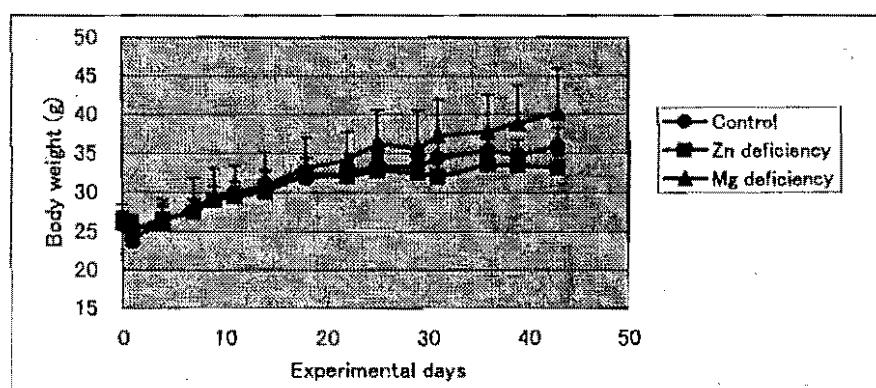


図1. 非運動群の体重の推移 (雄)

上記3群を脱イオン水摂取群と牛乳摂取群とで体重を比較してみると、対照群では殆ど差はない(図2-A)。Zn欠乏食群では脱イオン水群では体重の減少が見られたが、牛乳群では体重減少の抑制が観察された(図2-B)。Mg欠乏食群の脱イオン水群では体重増加が見られたが、牛

乳群では体重増加が抑制され対照群（基礎食・脱イオン水）に近い体重変化を示した（図2-C）。

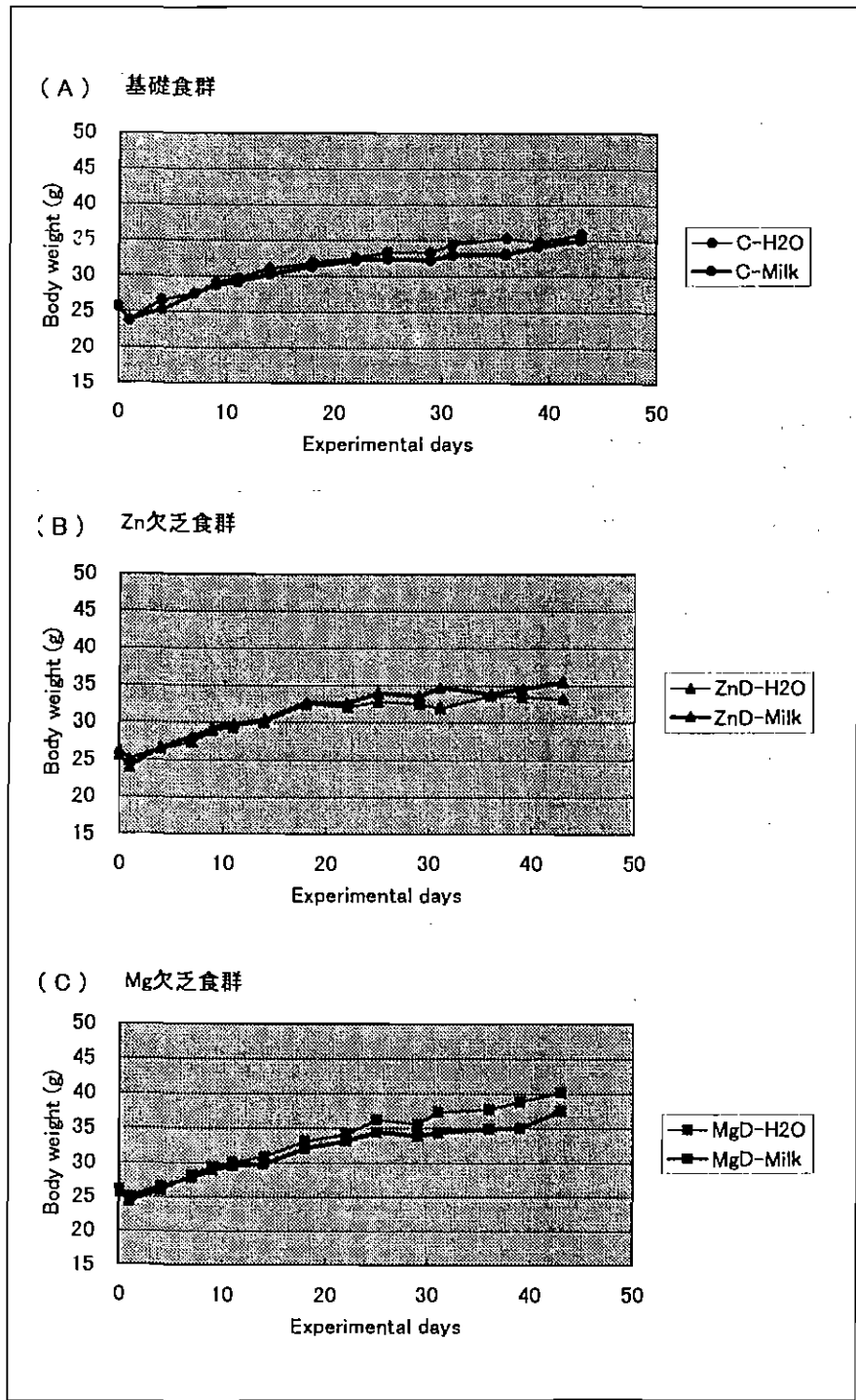


図2. 非運動群の体重変化—脱イオン水と牛乳の比較（雄）—

(ii) 自発運動群

回転車に自由に接近できる付属品の付いたケージで飼育した対照群、Zn 欠乏食群、Mg 欠乏食群（いずれも脱イオン水を供与）の体重変化を見ると、対照群に対して Zn 欠乏食群と Mg 欠乏食群では体重が減少した。その度合いは Zn 欠乏食群の方が大であった（図3）。

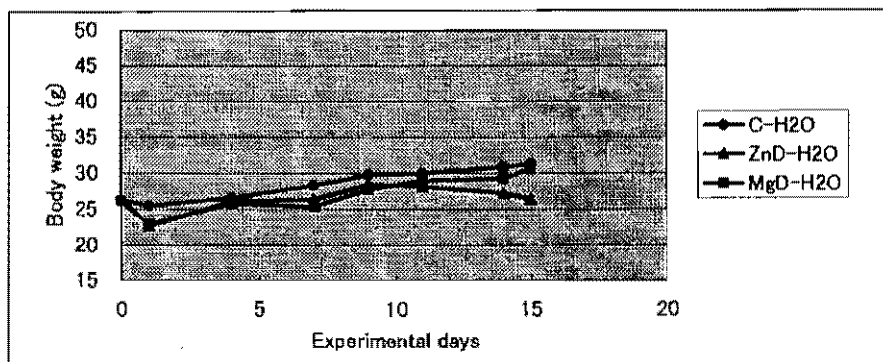


図3. 運動群の体重の推移 (雄)

上記3群を脱イオン水摂取群と牛乳摂取群とで体重を比較してみると、対照群では牛乳群の体重がやや低値であったが(図4-A)、Zn欠乏食群の体重は飲料の種類による差は明瞭でなかった(図4-B)。Mg欠乏食群の体重は脱イオン水群より牛乳群の方が体重はやや高値で推移した(図4-C)。

(iii) 運動の有無の比較

飲料水として脱イオン水を与えた3群で、自発運動の有無による体重の差を検討した。基礎食群では差は認められなかった(図5-A)。Zn欠乏食群では運動群の方が体重は低値であった(図5-

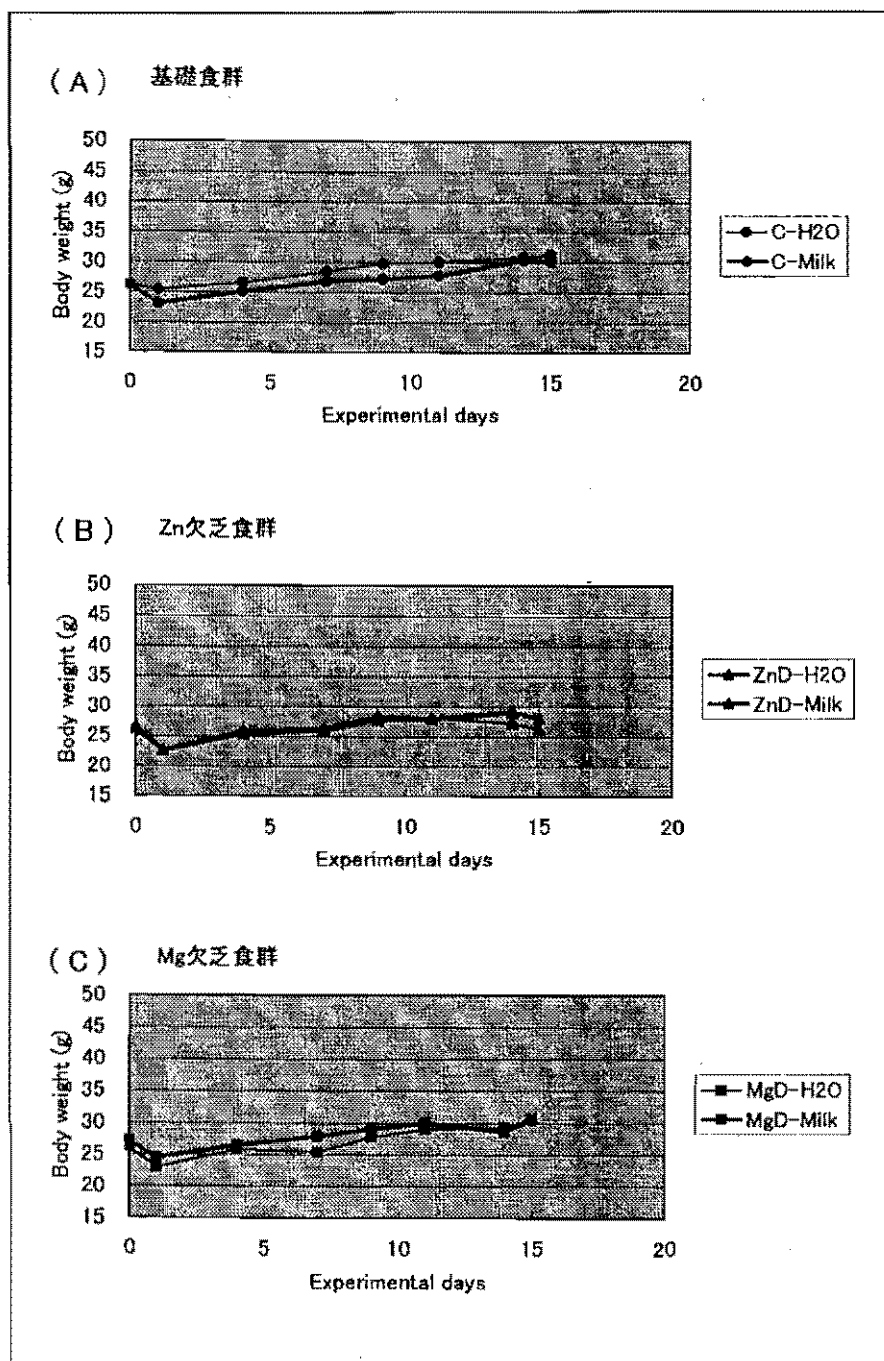


図4. 運動群の体重の推移—脱イオン水と牛乳の比較 (雄)—

B)。Mg 欠乏食群でも運動群の体重が低値であったが、15日目は差がなくなった（図5-C）。

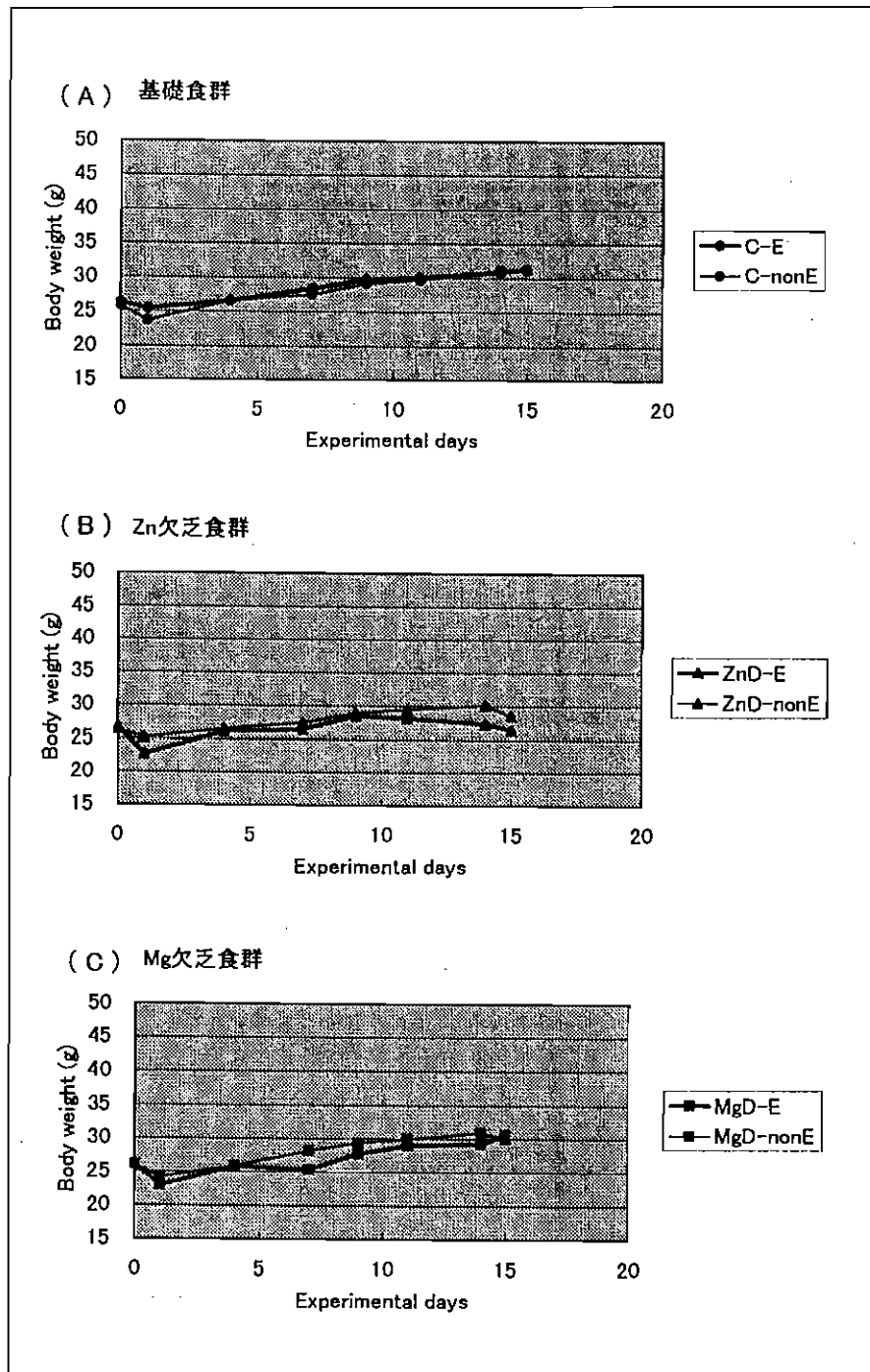


図5. 体重の変化—非運動群と運動群の比較（雄）—

<雌>

(i) 非運動群

対照群、Zn 欠乏食群、Mg 欠乏食群の6週間までの体重変化を各群の平均値と標準偏差 (SD) として図6に示す。2週間までは各群間に差は見られない。それ以後、対照群に対してZn 欠乏食群では体重は低下した。Mg 欠乏食群では雄の場合と異なり、体重は対照群と同じか、やや低めであった。

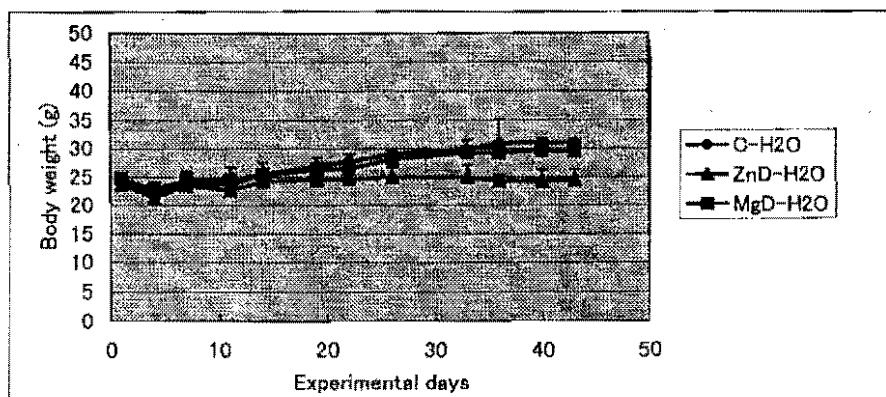


図6. 非運動群の体重の変化(雌)

上記3群を脱イオン水摂取群と牛乳摂取群とで体重を比較してみると、対照群(図7-A)、Zn欠乏食群(図7-B)、Mg欠乏食群(図7-C)ともに2週目までは体重に差は認められなかった。Zn欠乏食群では2週目以降に牛乳群で体重増加が認められた。

(ii) 自発運動群

脱イオン水供与の対照群とZn欠乏食群の体重には差がない状態で推移していたが2週間後に対照群で認められたのに対して、Zn欠乏群では増加しなかった。Mg欠乏食群では初期に体重の低下がみられたが、その後は

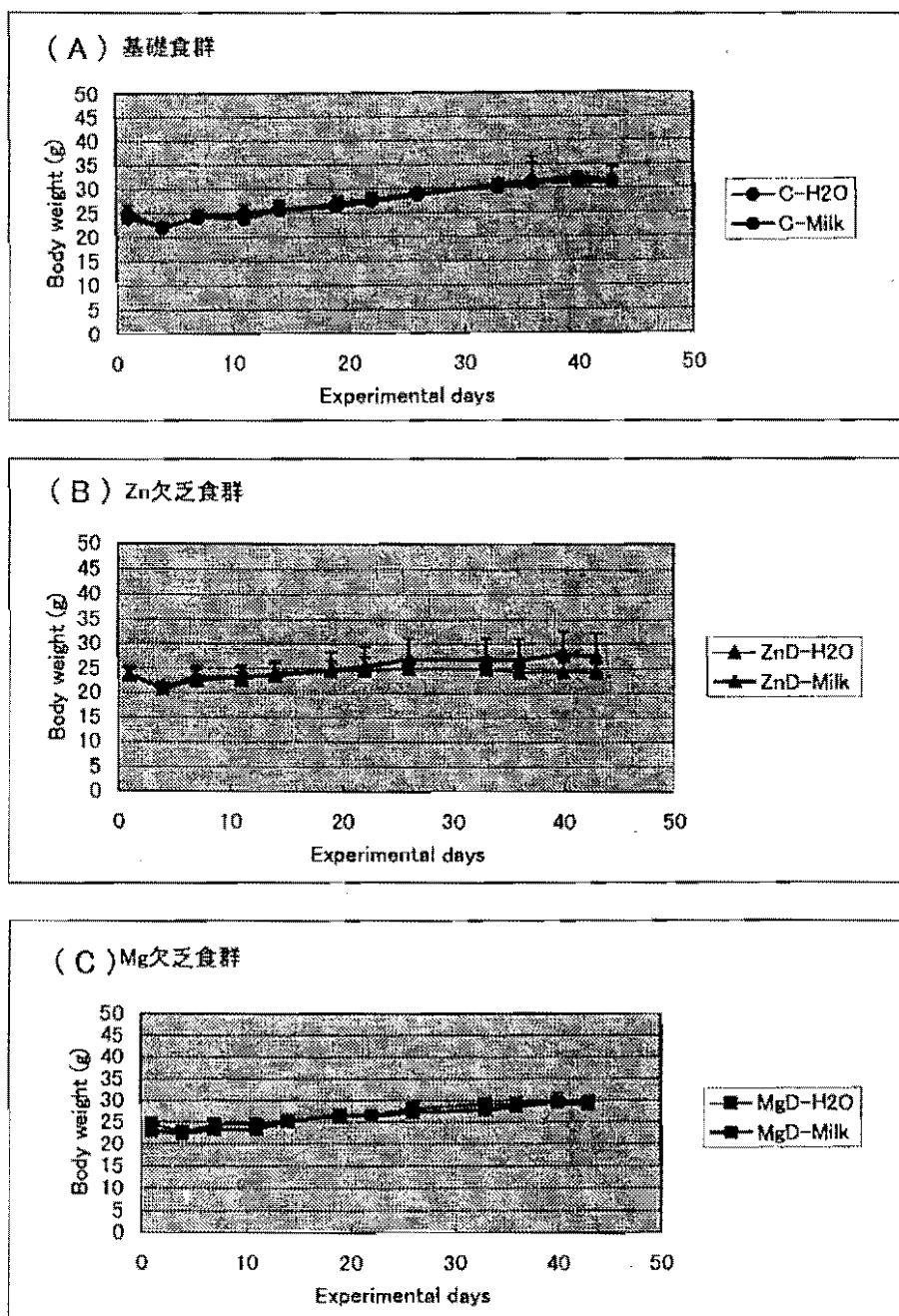


図7. 非運動群の体重変化—脱イオン水と牛乳の比較(雌)—

対照群と Zn 欠乏群に近似した推移を示した (図 8)。

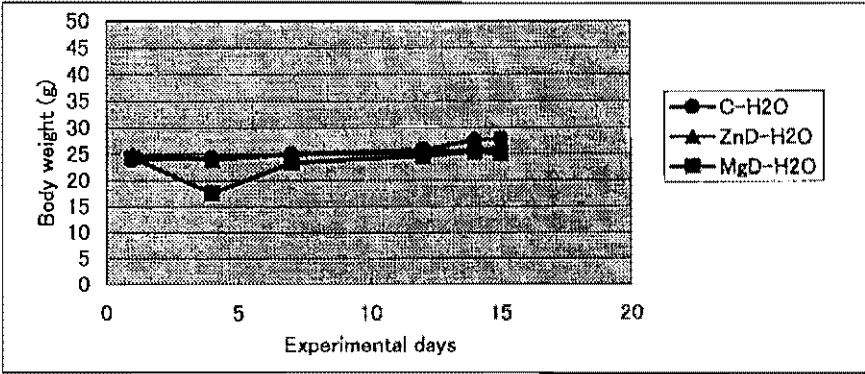


図 8．運動群の体重変化 (雌)

上記 3 群について脱イオン群と牛乳摂取群を比較してみると、対照群では牛乳群の体重が初期に一次的に低下が観察された (図 9 - A)。Zn 欠乏食群では 2 群間に体重の差はなかった (図 9 - B)。Mg 欠乏食群では脱イオン水群で初期に体重低下があったが、牛乳群では殆ど変化なかった (図 9 - C)。

(iii) 運動の有無の比較

飲料水として脱イオン水を与えた 3 群で、自発運動の有無による体重の差を検討した。基礎食群では運動群の方が高体重を維持した (図10-A)。Zn 欠乏食群では両群間に差はなかった (図10-B)。Mg

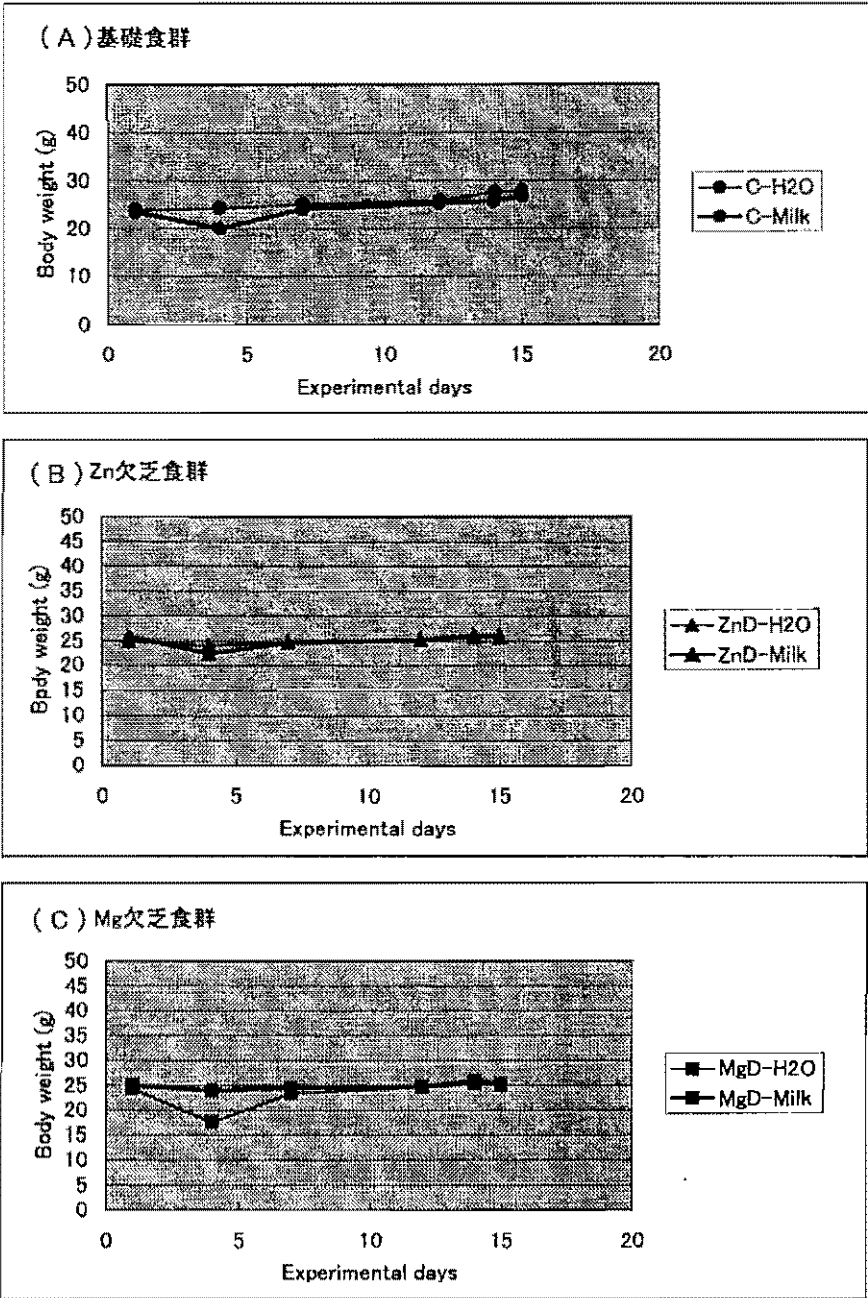


図 9．運動群の体重変化—脱イオン水と牛乳の比較 (雌)—

欠乏食群では4日後のみ運動群の体重が低値であった（図10-C）。

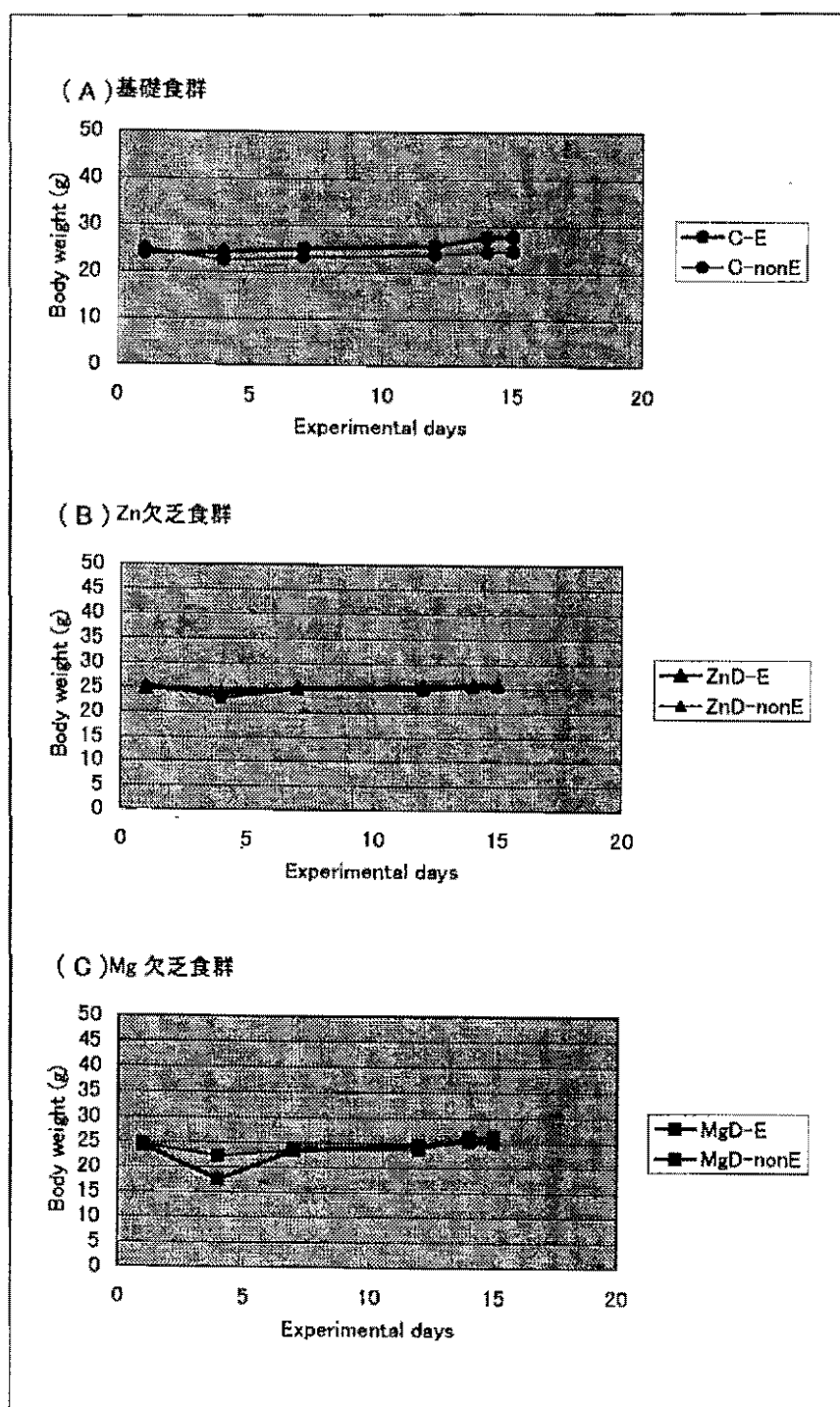


図10. 運動群の体重の推移（雌）

(B) ヘマトクリット値

<雄>

非運動群の雄について2週間後と6週間後の結果を図11に示す。3群ともに2週間後も、6週間後も脱イオン水摂取群と牛乳摂取群間に差はなかった。

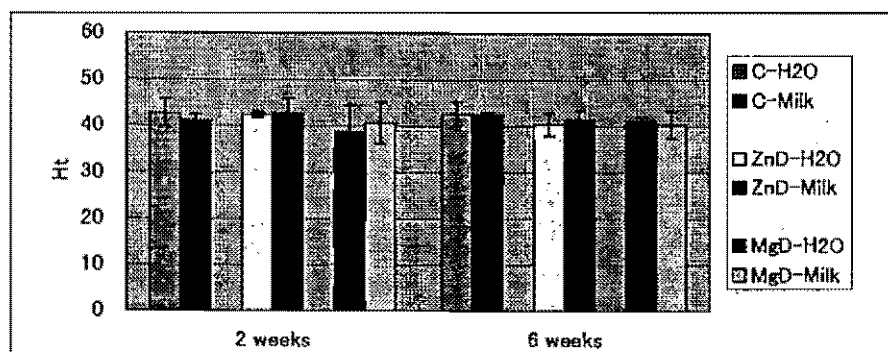


図11. 非運動群のヘマトクリット値 (雄)

自発運動群 (2週間) では基礎食・脱イオン水摂取群と比較して Mg 欠乏食・脱イオン水群で Ht 値は低下する傾向がみられたが、Mg 欠乏食・牛乳摂取群では Ht 値が上昇する傾向が見られた (図12)。

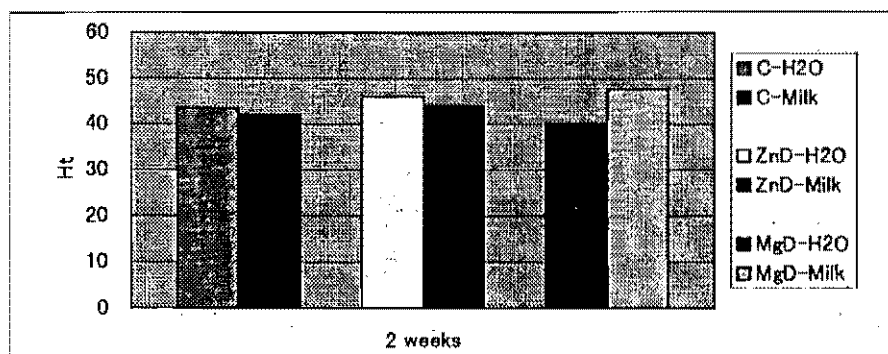


図12. 運動群のヘマトクリット値 (雄)

<雌>

非運動群の雌について2週間後と6週間後の結果を図13に示す。雄と同様に大きな変化はなかった。

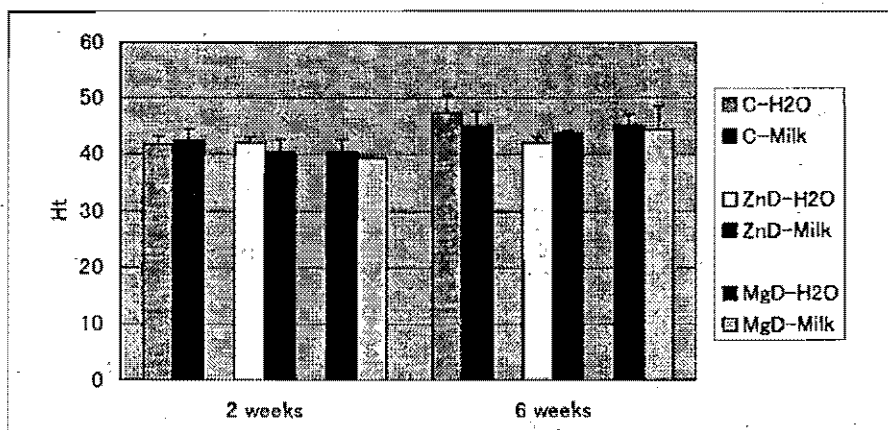


図13. 非運動群のヘマトクリット値 (雌)

自発運動群（2週間）では雄の例と類似していたが、Mg 欠乏・牛乳群に Ht 値の上昇はみられなかった（図14）。

雄雌ともに非運動群の間には差が認められなかった。

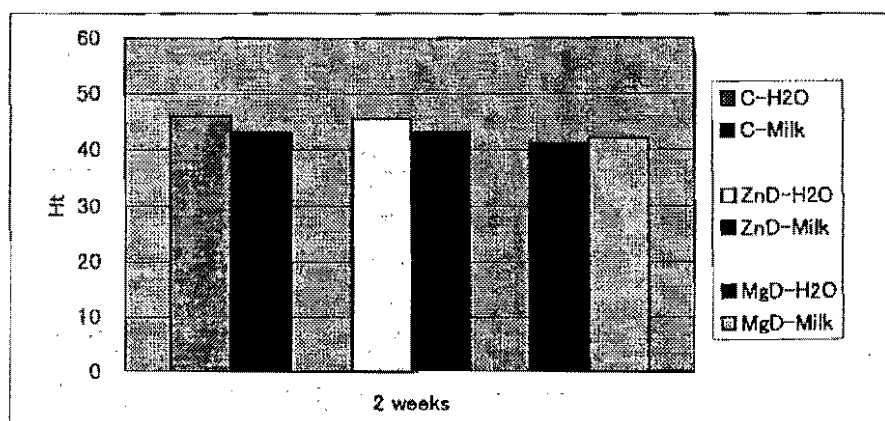


図14. 運動群のヘマトクリット値（雌）

(C) 臓器重量

<雄>

(i) 肝臓重量

雄の屠殺時の肝臓重量を図15に示す。基礎食・脱イオン水群に比べて、Zn 欠乏食・脱イオン水群では2週間後、6週間後ともに肝臓重量は低下した。Zn 欠乏食群では6週後に牛乳群で重量が増え、差がなくなった。Mg 欠乏食群では基礎食・脱イオン水群に比べて、2週間後の牛乳群で肝臓重量は低かった。6週後には脱イオン水群で高値を示したが、牛乳群では対照群と差はなかった。

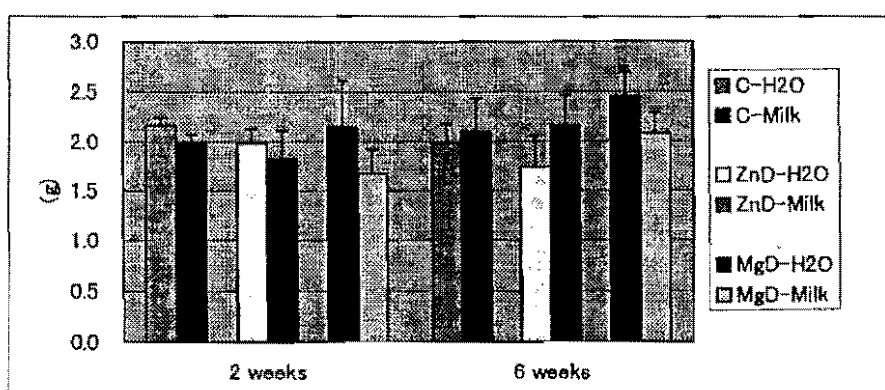


図15. 非運動群の肝臓重量—脱イオン水と牛乳の比較（雄）—

肝臓重量を体重に対する割合で図16に示す。2週間後には6～7%であり、乳群がやや低めであったのに対して、6週後には5～6%であり、基礎食群とZn 欠乏食群で脱イオン水群より牛乳群で高値を示した。

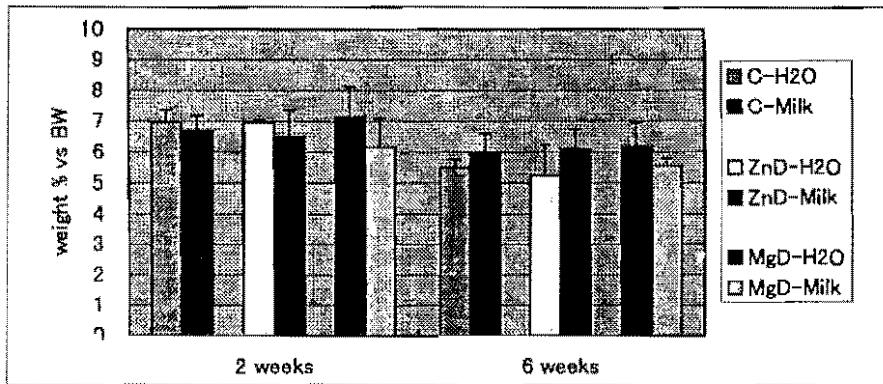


図16. 非運動群の肝臓重量の体重比—脱イオン水と牛乳の比較 (雄)—

(ii) 腎臓重量

雄の屠殺時の腎臓重量を図17に示す。脱イオン水群では2週間後、6週間後ともにZn欠乏食群でやや低値を示した。牛乳群では6週間後に基礎食、Zn欠乏食、Mg欠乏食群共に脱イオン水群より高値であった。

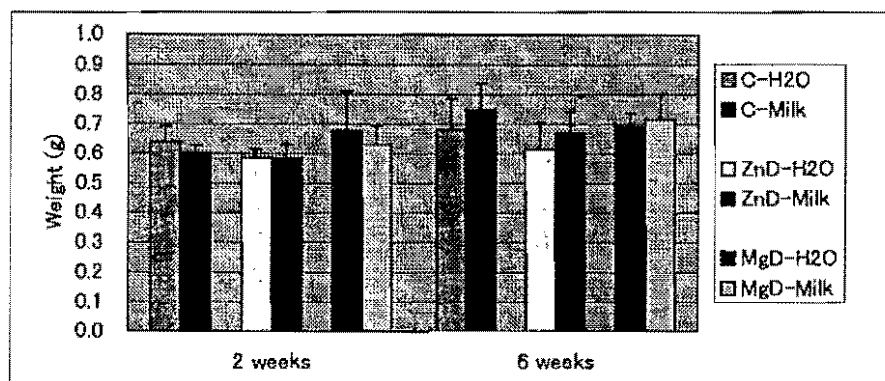


図17. 非運動群の腎臓重量—脱イオン水と牛乳の比較 (雄)—

(iii) その他の臓器重量

雄の2週間後の屠殺時臓器重量を図18に、6週後の屠殺時臓器重量を図19に示す。摘出して重量を計測した臓器は肝臓と腎臓の他に、精巣 (testis)、精囊 (SV)、心臓 (heart)、肺 (lung)、胸腺 (thymus)、顎下腺 (SG)、および脳 (brain) である。6週間後においては牛乳群の方が脱イオン水群より高値を示す臓器が多かった。

(iv) 自発運動の臓器重量への作用

自発運動群の2週間屠殺時の臓器重量を図20に示す。Zn欠乏食・脱イオン水群における臓器重量の低下 (肝臓、精巣、精囊、心臓、肺、顎下腺) に対して牛乳群では対照 (基礎食・脱イオン水) 群に近い値であった。すなわちZn欠乏による臓器重量の低下を牛乳が抑制する効果が観察された。

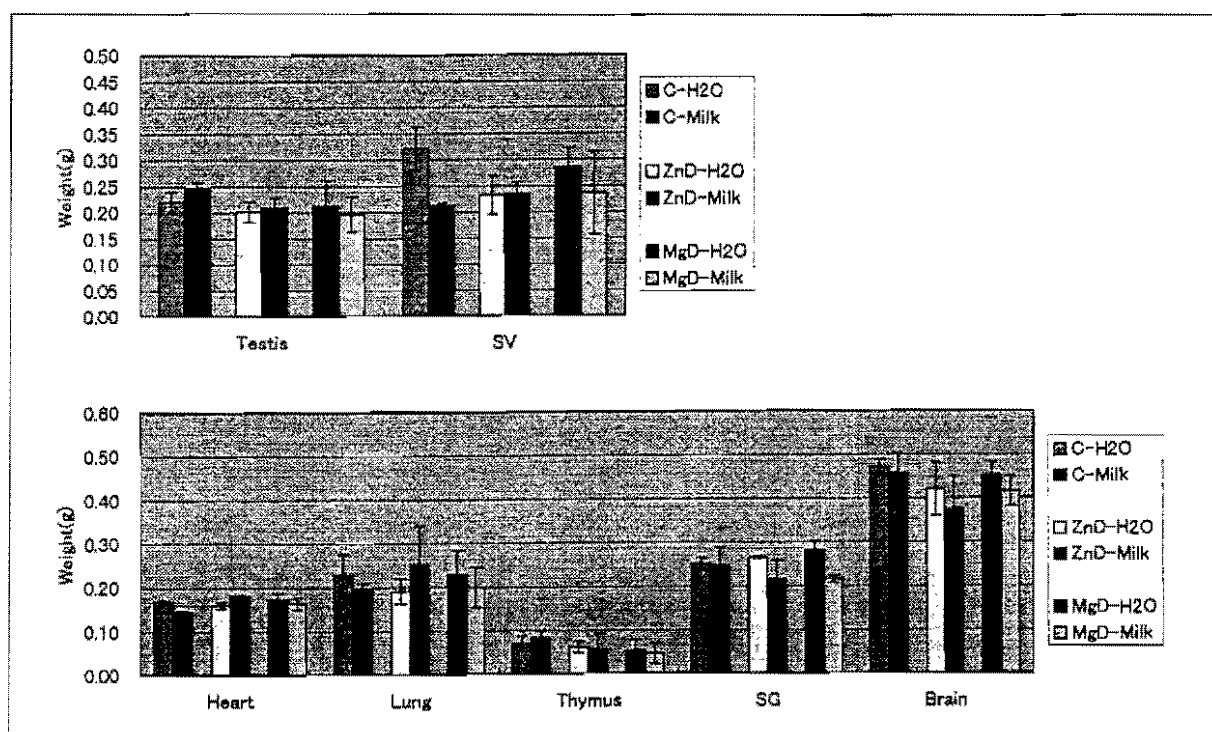


図18. 非運動群 2 週間後のその他の臓器重量—脱イオン水と牛乳の比較 (雄)—

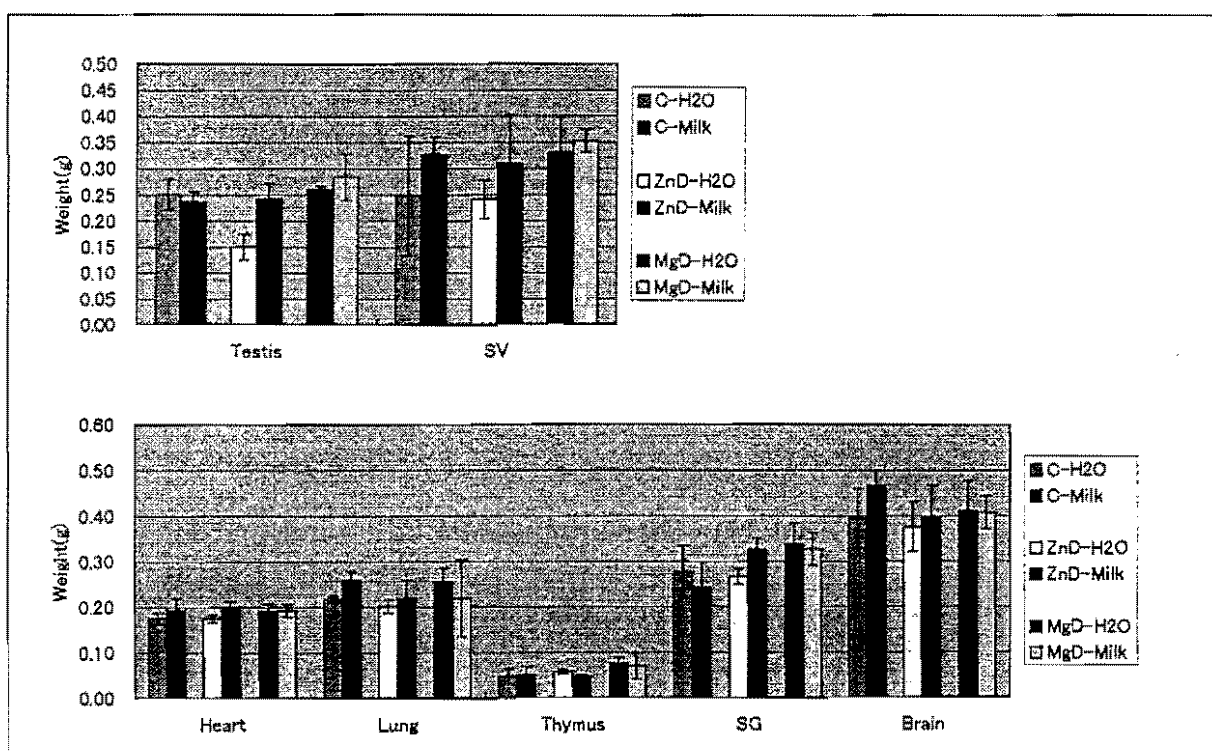


図19. 非運動群 6 週間後のその他の臓器重量—脱イオン水と牛乳の比較 (雄)—

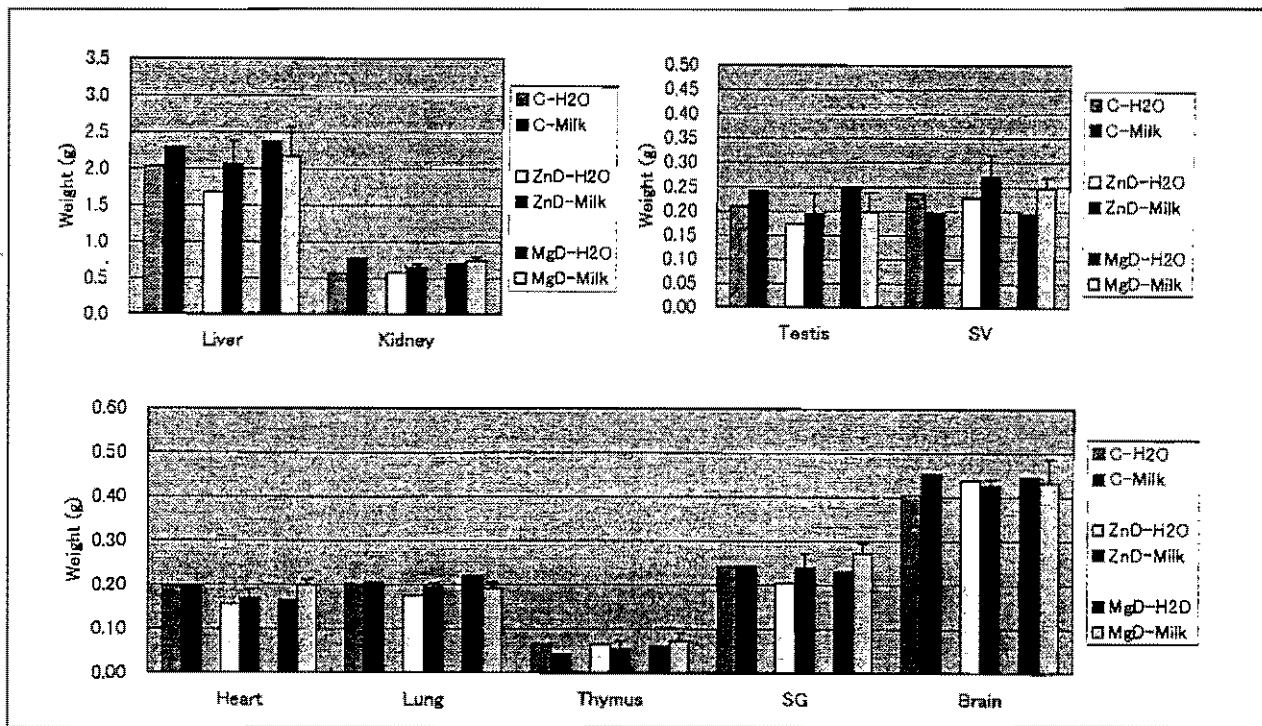


図20. 運動群の臓器重量—脱イオン水と牛乳の比較 (雄)—

(v) 非運動群と運動群の比較

肝臓と腎臓の重量に関して非運動群と自発運動群を比較した (図21)。肝臓、腎臓共に基礎食群と Zn 欠乏食群では運動群より高値であったが、Mg 欠乏食群では逆に運動群の方が高値であった。

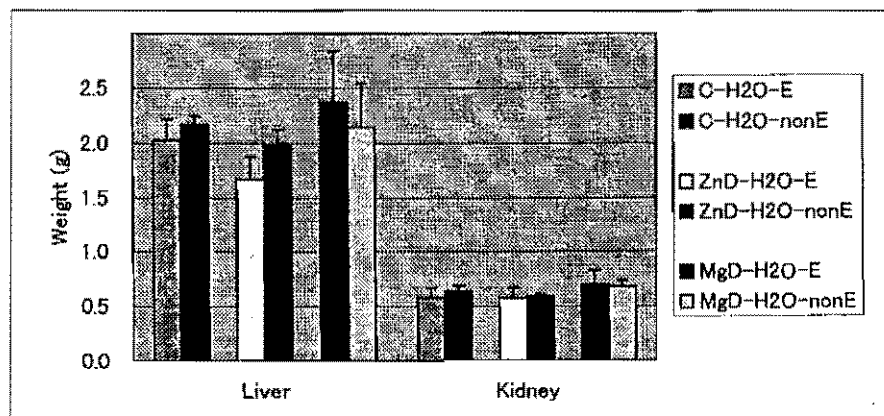


図21. 肝臓、腎臓の重量—運動群、非運動群の比較 (雄)—

<雌>

(i) 肝臓重量

雌の屠殺時の肝臓重量とその体重比を図22に示す。2週間後における Zn 欠乏食群の肝臓重量低下が著しいが、牛乳群では脱イオン水の低下を抑制する現象が観察された。6週間後では Mg 欠乏食群の肝臓重量低下が著しく、この場合も牛乳群では脱イオン水群における低下が抑制されていた。

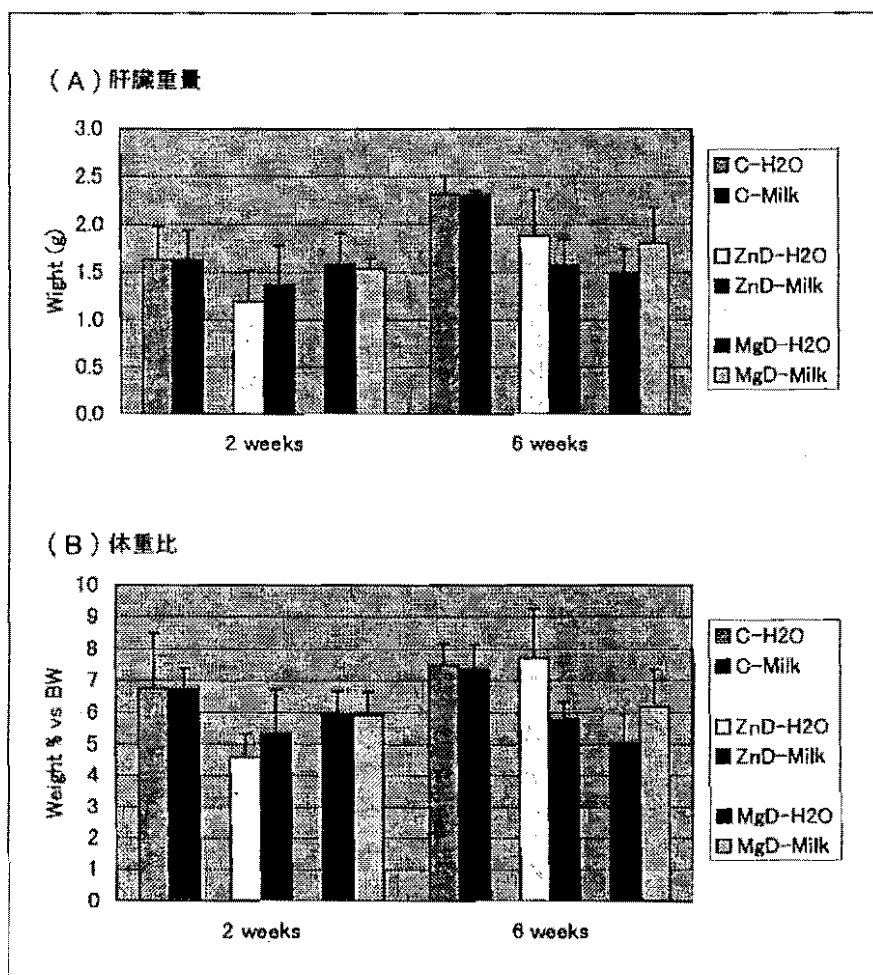


図22. 非運動群の肝臓重量—脱イオン水と牛乳の比較 (雌)—

(ii) 腎臓重量

雌の屠殺時の腎臓重量とその体重比を図23に示す。2週間後では脱イオン水のみで比較すると、Zn 欠乏食群がやや低値であったが、Zn 欠乏食群では基礎食群と差がなかった。脱イオン水群と牛乳群を比較すると牛乳群の方が3種の食餌群で高値であった。6週間後では脱イオン水を与えた時、基礎食群、Zn

欠乏食群、Mg 欠乏食群の順に腎臓重量は低かった。牛乳群では基礎食群は脱イオン水群と差がなく、Zn欠乏食群よりMg欠乏食群の方が、腎臓重量の低下抑制効果が明らかであった。

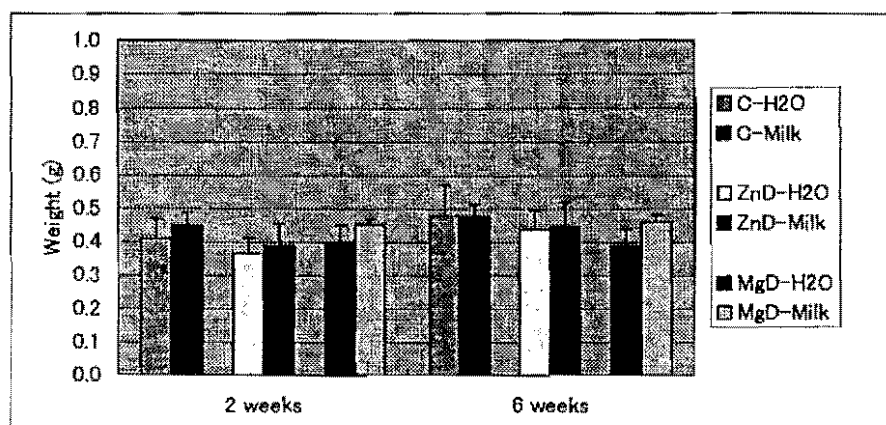


図23. 非運動群の腎臓重量—脱イオン水と牛乳の比較 (雌)—

(iii) その他の臓器重量

雌の2週間後の屠殺時臓器重量を図24に、6週間後の屠殺時臓器重量を図25に示す。摘出して重

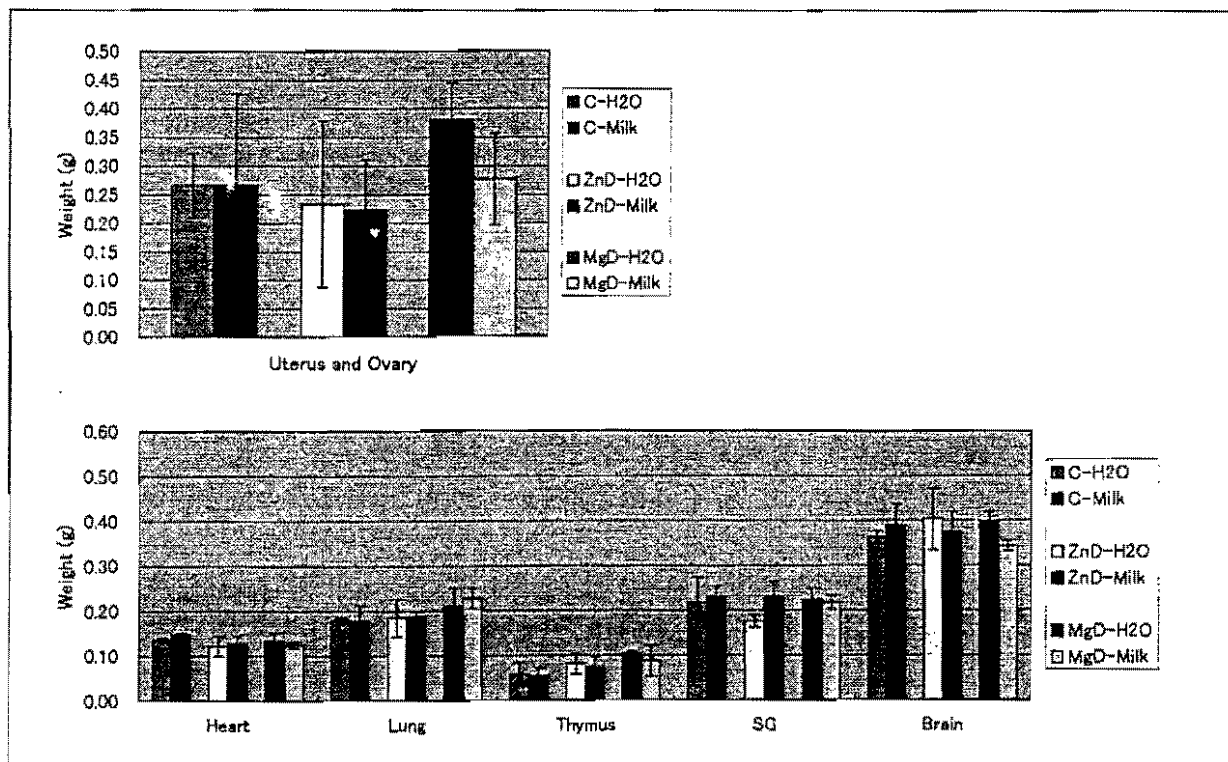


図24. 非運動群2週間後のその他の臓器重量—脱イオン水と牛乳の比較(雌)—

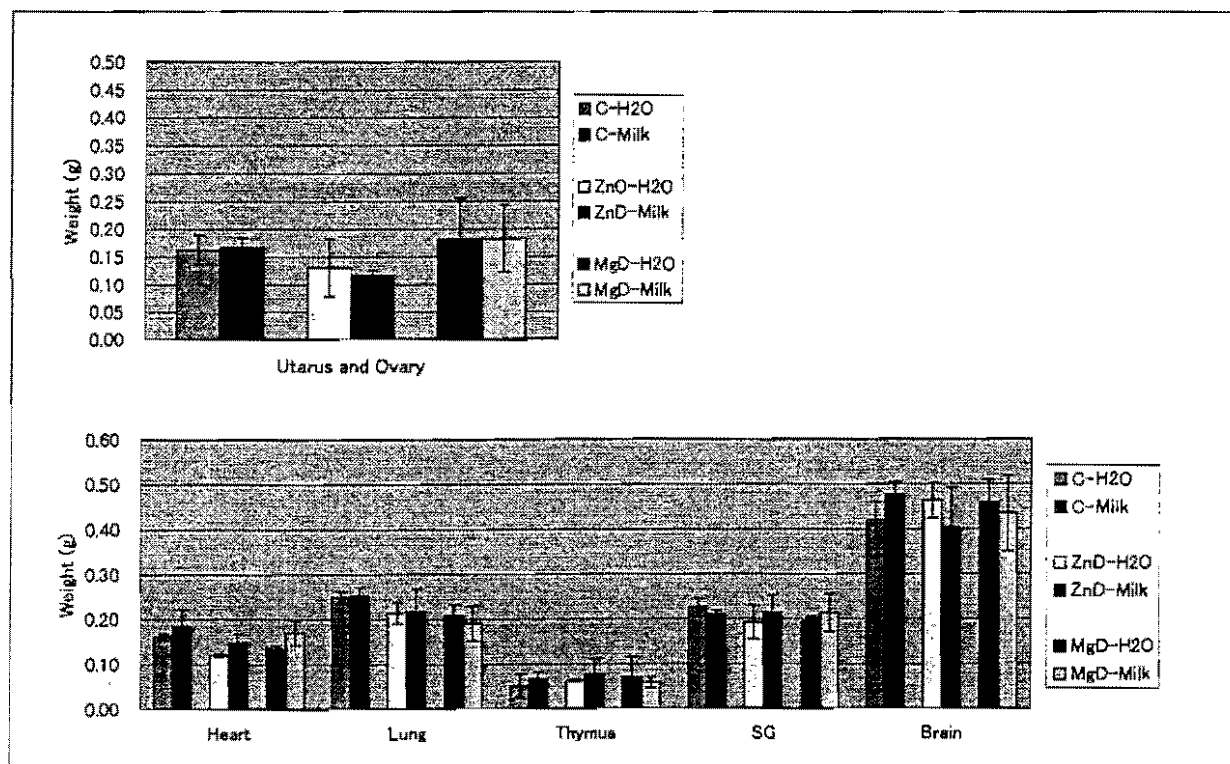


図25. 非運動群6週間後のその他の臓器重量—脱イオン水と牛乳の比較(雌)—

量を計測した臓器は雄の場合と異なるのは精巣と精嚢に代って子宮・卵巣である。マウスの年齢が比較的若い（7週齢と11週齢）ので、子宮と卵巣は分離せず、一体として摘出し、秤量した。

2週間後のMg欠乏食・脱イオン水群の子宮・卵巣重量が高値であったが、その牛乳群では対照群と同程度であった。6週間後の子宮・卵巣重量はZn欠乏食群で脱イオン水群、牛乳群共に低値であった以外は対照群と差はなかった。

心臓と顎下腺のZn欠乏食・脱イオン水群の重量が2週後、6週後とも対照群より低値であるが、牛乳群では対照群と差がないことが観察された。

(iv) 自発運動の臓器重量への影響

自発運動群の2週後屠殺時の肝臓と腎臓の重量を図26に示す。Zn欠乏食・脱イオン水群の子宮・卵巣重量の低下が著明であったが、その牛乳群は基礎食・牛乳群のそれと差がなかった。やはりZn欠乏食・脱イオン水群の肝臓重量が対照に比べて低値であったが、これも牛乳群では対照の値と差がない。雄とは異なり、Zn欠乏食・脱イオン水群におけるその他の臓器重量の低下は観察されなかった。

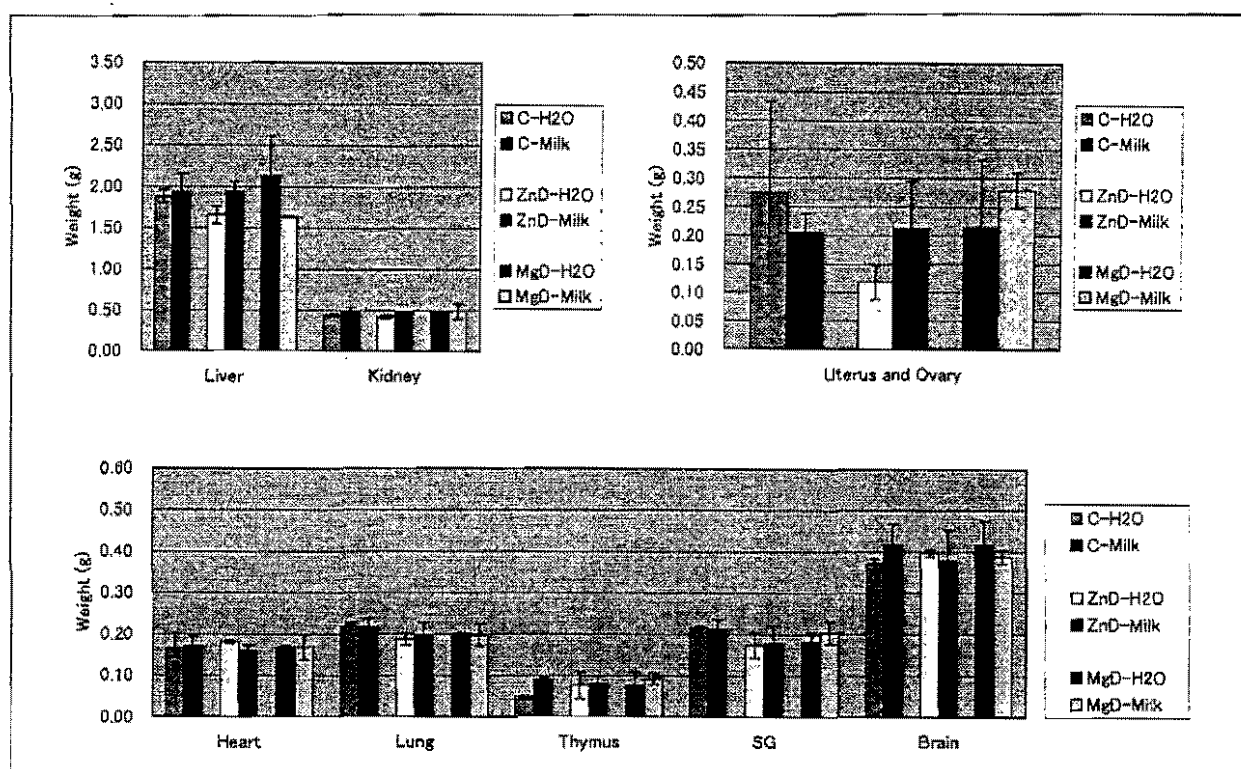


図26. 運動群の臓器重量—脱イオン水と牛乳の比較（雌）—

(v) 非運動群と運動群の比較

肝臓と腎臓の重量に関して非運動群と自発運動群を比較した（図27）。肝臓、腎臓共に基礎食群とZn欠乏食群では非運動群の方が運動群より高値であったが、Mg欠乏食では逆に運動群の方が高値であり、肝臓の方が腎臓よりその差は明瞭である点も雄と同様であった。

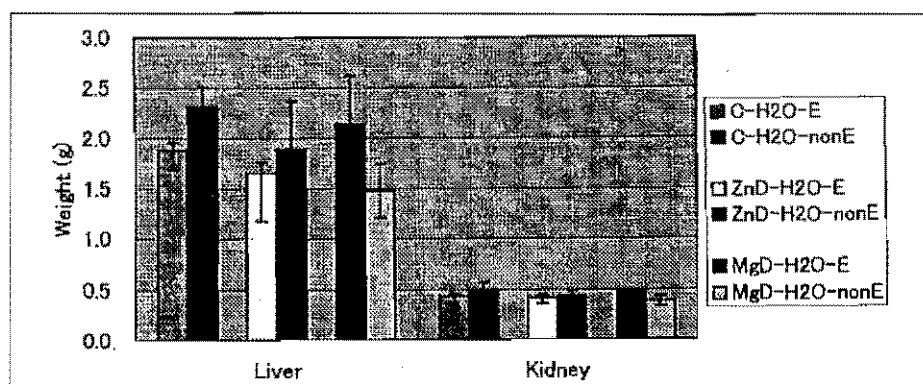


図27. 肝臓、腎臓の重量—運動群、非運動群の比較 (雌)—

4. 考察

昨年度までの実験では食餌は正常食を与え、飲料水は脱イオン水を与え、運動と生体内元素の動きを明確にした。初年度は牛乳中のミネラルの分析を行った。本年度はこれらの結果に基づき、Zn または Mg 欠乏の状態を作りだし、生じたミネラルバランスの乱れを牛乳によってどの程度抑制または改善できるかを観察することを目的とした。体重の変動も一つの指標となしえると考えられるが、この場合には食餌摂取量が問題となる。そこで今回は通常の固形飼料ではなく、粉末飼料を採用することにした。飼料はオリエンタル酵母工業㈱に特別注文し、Zn または Mg を含まない餌と、組成が同じで必要量の Zn または Mg を含有する基礎食の調整を依頼した。

飲料としては対照は従来通り脱イオン水とした。牛乳はそのままマウスに飲ませることには問題点もあり、検討した結果、市販の低脂肪牛乳を脱イオン水で2倍希釈して与えることにした。ただし、人工気候室内(23℃)では時間が経過すると分離するため、毎日交換した。

牛乳を飲料として与えられた群のマウスは必然的に摂取熱量がその分だけ多くなるので、それに見合うだけの熱量のみを補う群として、5%グルコース溶液群を置いたが、結果的にはその群のマウスは予想よりも多くを摂取した。

一方、基礎食には Zn は57mg/100g 含まれており、注文した Zn 欠乏食には0.06mg/100g 含まれている。Mg は基礎食には1.434g/100g、Mg 欠乏食には2.33mg/100g が含まれている。

実験結果を体重と臓器重量を図に示したが、今後、飼料および飲量の摂取量との関係を解析する必要がある。

今年度の一連の実験から Mg 欠乏よりも Zn 欠乏の方が体重および臓器重量に及ぼす影響は大きいこと、その影響は雌より雄で強く現れることがわかった。観察期間が比較的短期であったために、Mg は体内貯蔵部分から容易に動員され、正常を維持したのに対して、Zn は体内貯蔵量が Mg に比べて少なく、または動員されがたく、観察期間中に正常範囲の維持がなされなかったと考えられる。この Zn 欠乏に対して牛乳を与えられたマウスの体重、臓器重量は基礎食・脱イオン水群のそれに近似す

ることから、牛乳中の Zn が有効に働いたと考えられる。Zn 関連酵素の活性などを測定すればより確実な裏付けが得られるが、今回はそこまでは行えなかった。性差については現在性ホルモンレベルとの関係も含めて、別途に研究中である。

今後の課題として

1) 骨関係指標の測定と解析

骨密度、骨量、骨皮質幅比、骨断面積、最大応力、弾性係数、骨中元素濃度を測定し、その役割、生じた現象を考察する。2週間と短時間ではあるが、自発運動を行った群と非運動群とを比較すると、牛乳の効果がもっと明らかになる可能性がある。

2) 肝臓、腎臓をはじめ、多くの臓器を摘出、保存してあるので、多種元素の測定を行うと、ミネラルバランスについての考察が可能となる。

3) 食餌、食料の摂取量と体重、臓器重量の変化の相関を解析する。

4) 飲料中に添加した Zn または Mg と牛乳中の Zn または Mg の利用率について解析する。また、多種元素の測定結果を導入し、ミネラルバランスについても添加した元素に、牛乳中に含まれている元素について考察する。

5. 結 論

1) 5週齢（体重増加時期である）の雄雌マウスに Zn 欠乏食または Mg 欠乏食を与えると、2週間以降に体重増加が抑制される。抑制の程度は Mg 欠乏より、Zn 欠乏の方が大である。Mg 欠乏による体重増加抑制は雌より雄で大である。

2) 飲料として牛乳（以下すべて市販の低脂肪牛乳を脱イオン水で2倍希釈したもの）を自由に摂取させると、雄では Mg 欠乏より Zn 欠乏のほうが体重増加抑制が軽減する。雌では Mg 欠乏は対照群と差はなく、Zn 欠乏群で3週間以降に体重増加抑制が観察されるが、対照群より軽微である。

3) ヘマトクリット値には大きな変化はなかった。

4) 雄の臓器重量に関しては Zn または Mg 欠乏で重量が対照群のそれより低下する臓器であるが、牛乳群では低下しない。その効果は2週間後より6週間後の方が大きく、例えば精巣、精囊（図19参照）などに著明である。

雌では雄ほど明らかでない。

6. 参考文献

1. 千葉百子、篠原厚子、稲葉 裕、山城雄一郎：粉ミルク中の元素濃度、日本小児科学会雑誌 102, 6-15, 1998.
2. Chiba M, Shinohara A, Inaba Y. : Selenium concentrations in milk, with International Symposium on selenium in Biology and Medicine, Abstract Book : Part II 56, 1996.
3. Hoshi A, Watanabe H, Chiba M, Inaba Y : Effects of swimming and weight loading on bone density and mechanical properties of femoral bone in mice. Environ Health Prev Med, 1 : 128-132, 1996.
4. Hoshi A, Watanabe H, Chiba M, Inaba Y : Effects of exercise at different ages on bone density and mechanical properties of femoral bone of aged mice, Tohoku J Exper Med, 185:15-24, 1998.
5. Hoshi A, Chiba M. et al : Bone density and mechanical properties in femoral bone of swim-loaded aged mice, Biomed. Environ. Sciences, 11:243-250, 1998.
6. Chiba M, Watanabe H, Hoshi A, Inaba Y : Trace elements and lipid peroxidation in organs of swimming trained mice. Abstracts 4th International Congress on International Society for Trace Elements Research in Humans, 73, Italy, 1995.
7. Chiba M, Watanabe H, Shinohara A, Inaba Y, Sophasan S, Endou H : Effects of Mg and K deficiency on male and female mice, J Toxicol Sci 23 Supple II , 246-249, 1998.