HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低亜鉛血症を伴う炎症性腸疾患患者に対する酢酸亜鉛水和物製剤投与の有効性
Author(s)	桜井, 健介
Description	配架番号：2761
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15443号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15443
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89981
Type	doctoral thesis
File Information	SAKURAI_Kensuke.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

低亜鉛血症を伴う炎症性腸疾患患者に対する

酢酸亜鉛水和物製剤投与の有効性

(Effectiveness of administering zinc acetate hydrate to patients with inflammatory bowel disease and zinc deficiency)

2023 年 3 月

北海道大学

桜井　健介

学位論文

低亜鉛血症を伴う炎症性腸疾患患者に対する

酢酸亜鉛水和物製剤投与の有効性

(Effectiveness of administering zinc acetate hydrate to patients with inflammatory bowel disease and zinc deficiency)

2023 年 3 月

北海道大学

桜井　健介

目　　次

発表論文目録および学会発表目録 …… 1頁
要旨 …… 2頁
略語表 …… 5頁
緒言 …… 6頁
研究方法 …… 9頁
研究結果 …… 14頁
考察 …… 58頁
結論 …… 63頁
謝辞 …… 65頁
利益相反…… 66頁
引用文献 …… 67頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文にて発表/報告した。

1. Kensuke Sakurai, Shigeru Furukawa, Takehiko Katsurada, Shinsuke Otagiri, Kana Yamanashi, Kazunori Nagashima, Reizo Onishi, Keiji Yagisawa, Haruto Nishimura, Takahiro Ito, Atsuo Maemoto, Naoya Sakamoto. Effectiveness of administering zinc acetate hydrate to patients with inflammatory bowel disease and zinc deficiency: a retrospective observational two-center study

Intestinal Research 2022;20(1):78-89

本研究の一部は以下の学会にて発表した。

1. 桜井　健介、桂田　武彦、青山　慶哉、福島　新弥、大西　礼造、西村　東人、伊藤　貴博、古川　滋、前本　篤男、坂本　直哉

低亜鉛血症を有する炎症性腸疾患患者に対する亜鉛補充療法の有効性：二施設共同後方視的観察研究

第 13 回日本炎症性腸疾患学会、2022 年 11 月 25 日～11 月 26 日、大阪（予定）

2. Kensuke Sakurai, Takehiko Katsurada, Shinsuke Otagiri, Kana Yamanashi, Reizo Onishi, Haruto Nishimura, Takahiro Ito, Shigeru Furukawa, Atsuo Maemoto, Naoya Sakamoto.

Efficacy of zinc acetate hydrate administration for zinc deficiency in patients with Inflammatory Bowel Disease：a multi-center retrospective study.

15th European Crohn's and Colitis Organisation 2020、2020 年 2 月 12 日～2 月 15 日、ウィーン（オーストリア）

要　旨

【背景と目的】

炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease, IBD）は主としてクローン病（Crohn's disease, CD）と潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis, UC）で構成される消化管の慢性炎症性疾患である。IBD 患者は一般的に体重減少や栄養失調と関連があるとされている。それに伴う微量元素の欠乏症が高頻度に見られると報告されており、欧米のガイドラインでは IBD 患者における微量元素欠乏症の定期的なスクリーニングが推奨されている。亜鉛は微量元素の一つであり生殖機能や骨格の発育、味覚の維持、免疫機能などに関与している。IBD 患者においては健常人に比べて低亜鉛血症の割合が多く、CD 患者で 42.2%、UC 患者で 38.6%とされており高い頻度で遭遇する病態である。IBD 患者の低亜鉛血症の原因としては亜鉛の摂取不足や吸収障害、慢性炎症による低アルブミン血症が影響していると考えられている。また低亜鉛血症を有する IBD 患者では、低亜鉛血症を有さない IBD 患者と比較し IBD 関連手術、IBD 関連入院および IBD 関連合併症のリスクが高く予後が悪いことが示されている。In vivo の研究では、IBD モデルマウスに対する亜鉛の経口投与にて腸管の炎症が改善することや、亜鉛欠乏状態の IBD モデルマウスでは大腸粘膜中の炎症型 M1 マクロファージが増加し naïve T 細胞の Th17 細胞への分化を促進させることが報告されている。In vitro の研究では細胞が亜鉛欠乏状態となると腸管粘膜上皮細胞間の Tight junction の構成成分である膜貫通タンパク質 Occludin や裏打ちタンパク質 ZO-1 の発現が低下し管腔内抗原や腸内細菌が通過しやすくなると報告されている。

一方、本邦では亜鉛を含有する治療薬としては Polaprezinc（Promac®）があるが、消化性潰瘍に対する治療薬としてのみ保険承認されており低亜鉛血症に対する亜鉛補充療法を行うことができなかった。ところが 2017 年にウィルソン病に対する銅キレート薬である酢酸亜鉛水和物製剤（Zinc acetate hydrate、ZAH, Nobelzin®)が低亜鉛血症に対する亜鉛補充療法薬として保険承認された。それを受け､本邦では低亜鉛血症を有する IBD 患者に対する亜鉛補充療法が徐々に行われるようになってきた。

しかし、低亜鉛血症を有する IBD 患者に対し亜鉛製剤を投与する有効性に関する検討は未だ見られていない。本研究の目的は、低亜鉛血症を有する炎症性腸疾患患者に対する ZAH 投与の有効性を検討することである。

【対象と方法】

2017 年 3 月から 2021 年 11 月までに、低亜鉛血症を呈し ZAH を投与された IBD 患者が登録された。二施設（北海道大学病院、札幌東徳洲会病院）共同後方視的観察研究を行い、ZAH 投与前後（投与開始日と、投与開始 4 週後または投与

開始 20 週後での比較）の血清亜鉛濃度の変化、疾患活動性や内視鏡所見の変化、血清亜鉛濃度と疾患活動性または CRP、アルブミンとの相関、疾患活動性の改善に寄与する因子を評価した。また ZAH 投与開始前 52 週以内かつ開始後 52 週以内に下部消化管内視鏡検査が施行され、それぞれ同部位より腸管粘膜を組織生検にて採取された症例を対象とし腸管粘膜上皮検体に対し免疫染色を施行し Tight Junction を構成するタンパク（Occludin、ZO-1、Claudin 1、E-cadherin）と、M1/M2 マクロファージの浸潤、および IL-17 の発現状況の変化を評価した。

疾患活動性や内視鏡的重症度は、CD 患者では Crohn's Disease Activity Index（CDAI）と Simple Endoscopic Score for Crohn's disease（SES-CD）を、UC 患者では partial Mayo score（PMS）と Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity（UCEIS）を用いて評価した。低亜鉛血症の定義は日本臨床栄養学会の定義に則り血清亜鉛濃度が 80μg/dL 未満の場合に低亜鉛血症と定義した。

【結果】

2017 年 3 月から 2021 年 11 月の期間に低亜鉛血症を呈し ZAH が投与された IBD 患者 196 例が登録された。その内、人工肛門造設後の患者が 25 例、内服自己中断や転医により 15 例、潰瘍性大腸炎における大腸全摘後の 3 例、ZAH 投与後 4 週、20 週共に血清亜鉛濃度がフォローされていない患者 33 例が除外され、ZAH 投与後 4 週または 20 週のいずれかで血清亜鉛濃度が 1 回以上評価された IBD 患者 120 例（CD 82 例、UC 38 例）の内、ZAH 投与 4 週後に血清亜鉛濃度が測定された CD 患者 61 例、UC 患者 33 例と、ZAH 投与 20 週後に血清亜鉛濃度が測定された CD 患者 55 例、UC 患者 15 例に対し解析を行った。

CD 患者では ZAH 投与開始 4 週後の血清亜鉛濃度中央値は投与前と比較し 59.0μg/dl から 92.3μg/dl（P<0.001）と有意に上昇し、CDAI 中央値は 118 から 86 と有意に改善された（P<0.001）。ZAH 投与開始 20 週後の血清亜鉛濃度中央値は 58.5μg/dl から 82.0μg/dl（P<0.001）と有意に上昇し、CDAI 中央値は 96 から 78 と有意に改善された（P<0.001）。ZAH 投与前 4 週以内かつ投与後 60 週以内の両者で内視鏡検査が施行された 18 例においては、SES-CD 中央値は 11.5 から 5.5（P<0.001）へ有意に改善した。ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と CDAI、CRP、アルブミンには軽度～中等度の相関を認めた。ロジスティック回帰分析により疾患活動性の改善に寄与する因子として ZAH 投与 4 週後では、ZAH 投与前の CDAI ≧51、5-アミノサリチル酸製剤の併用、ZAH 投与 20 週後では ZAH 投与前の CDAI≧96、血清亜鉛濃度≧49μg/dl が抽出された。ZAH 投与前後に腸管上皮検体を採取し得た 3 症例において、ZO-1 と Claudin 1 では全例で染色率が上昇した。

UC 患者では、ZAH 投与開始 4 週後の血清亜鉛濃度中央値は投与前と比較し 63.0μg/dl から 94.0μg/dl（P<0.001）と有意に上昇し、PMS 中央値は 2 から 0 へ有意に改善した（P=0.002）。ZAH 投与開始 20 週後の血清亜鉛濃度中央値は 62.0μg/dl から 100.0μg/dl（P<0.001）と有意に上昇し、PMS 中央値は 1 から 0 へ改善したが有意差は認めなかった。ZAH 投与前 4 週以内かつ投与後 60 週以内の両者で内視鏡検査が施行された 12 例においては、UCEIS 中央値は 5 から 3（P=0.004）へ有意に改善した。ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と PMS、CRP、アルブミンには軽度～中等度の相関を認めた。ロジスティック回帰分析により、疾患活動性の改善に寄与する因子として ZAH 投与 4 週後では、ZAH 投与前の血清亜鉛濃度＜65μg/dl が抽出された。ZAH 投与前後に腸管上皮検体を採取し得た 6 症例のうち、Occludin、ZO-1、Claudin 1、E-cadherin では 5 例で染色率が上昇（それぞれ P=0.063、P=0.219、P=0.063、P=0.156）し、IL-17 では 5 例で染色率が低下（P=0.063）したが有意差は認めなかった。

【考察】

本観察研究では、1）低亜鉛血症を伴う IBD 患者において ZAH 投与により有意に血清亜鉛濃度が上昇し疾患活動性の改善が得られた。2）ZAH 投与前後に内視鏡検査が施行された症例は限られるが、ZAH 投与後に有意に内視鏡的重症度の改善が得られた。3）ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と疾患活動性、CRP、アルブミンには有意な相関を認めた。4）ZAH 投与前の血清亜鉛濃度や疾患活動性が、ZAH 投与による疾患活動性の改善に寄与する因子である可能性が示唆された。5）有意差は認めなかったものの ZAH の投与により Occludin や Claudin 1 の発現が改善し、かつ IL-17 の発現が低下する傾向が認められた。

本研究における限界として症例数が少ないことや、ZAH 投与前後に内視鏡検査/組織採取を施行し得た症例が少ないこと、血清亜鉛濃度の日内変動が考慮されていないことが挙げられる。従って今後は、患者背景や採血時間を統一した上で亜鉛補充に関する前向き試験を行い、疾患活動性や腸管粘膜の炎症の程度を評価する事が求められる。今後は前向き観察研究を計画し亜鉛補充療法の臨床的有効性を検証し、腸管粘膜の病理学的な検討を行い、疾患活動性を改善する機序を明らかにする方針である。

【結論】

低亜鉛血症を有する IBD 患者に対する酢酸亜鉛水和物製剤の投与は低亜鉛血症の改善に非常に有効であり、IBD における疾患活動性の改善に寄与する可能性が示唆された。

略　語　表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

ALB	albumin
ALT	alanine aminotransferase
AST	aspartate aminotransferase
CD	Crohn's disease
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
Crea	creatinine
CRP	C-reactive protein
DSS	dextran sulfate sodium
Hb	hemoglobin
IBD	inflammatory bowel disease
IL	interleukin
JAK	Janus kinase
PLT	platelet
PMS	partial Mayo score
SASP	salazosulfapyridine
SES-CD	Simple Endoscopic Score for Crohn's disease
TNF	tumor necrosis factor
UC	ulcerative colitis
UCEIS	Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity
WBC	white blood cell
ZAH	Zinc Acetate Hydrate
5ASA	5-aminosalicylic acid

緒　　言

炎症性腸疾患（inflammatory bowel disease, IBD）は主としてクローン病（Crohn's disease, CD）と潰瘍性大腸炎 （ulcerative colitis, UC）から成る消化管の慢性炎症性疾患である（Xia B et al., 1998)。

CD は全消化管に敷石像や縦走潰瘍などを起こす慢性炎症性疾患であり、腹痛、下痢、血便などの腹部症状を特徴とし、進行すると腸管狭窄、瘻孔形成、穿孔などをきたす（Baumgart DC et al., 2012)。近年、患者数は急増しており、現在本邦で約 7 万人と報告されている（図 1)。

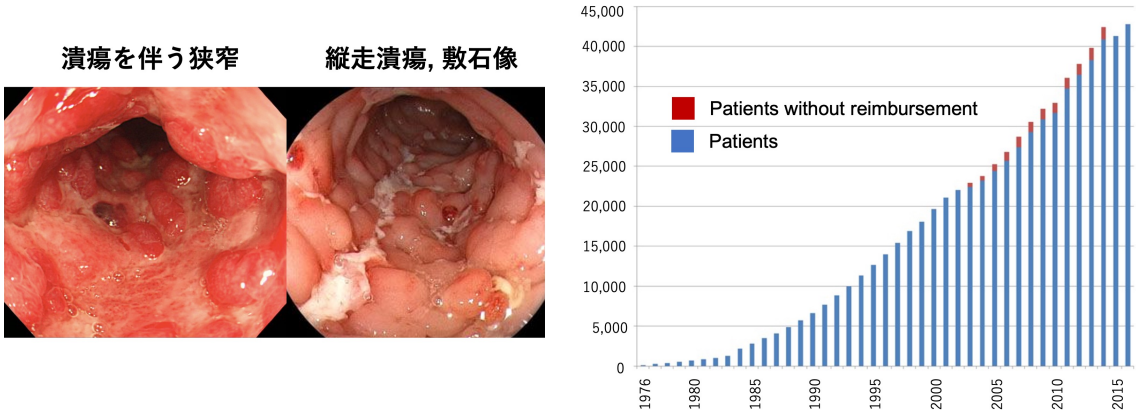

図 1. クローン病の内視鏡像と、医療受給者証交付件数の推移、厚生労働省難病情報センターホームメージ（https://www.nanbyou.or.jp)より引用。

UC は、大腸に限局したびまん性の粘膜炎症を特徴とする慢性疾患である。下痢、血便、腹痛、発熱等の症状を呈し、内視鏡所見では細顆粒状粘膜、潰瘍などを認める（Kornbluth A et al., 2010)。CD と同様に患者数は急増しており本邦で現在約 22 万人と報告されている（図 2)。

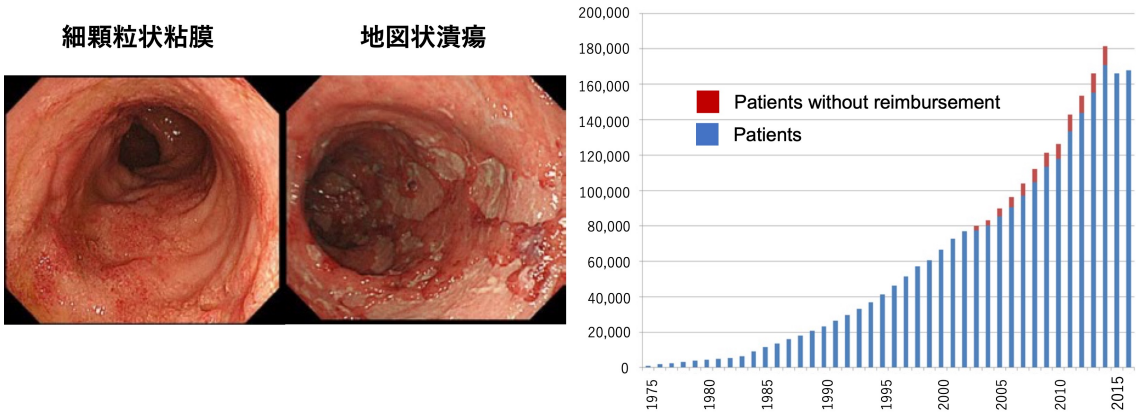

図 2. 潰瘍性大腸炎の内視鏡像と、医療受給者証交付件数の推移、厚生労働省難病情報センターホームメージ（https://www.nanbyou.or.jp)より引用。

IBD の治療法については 5-アミノサリチル酸製剤（5-aminosalicylic acid, 5ASA)、サラゾスルファピリジン（salazosulfapyridine, SASP)、ステロイド製剤、免疫調節薬、生物学的製剤などがあり、重症度に応じてこれらを単剤あるいは組み合わせて行うが、治療の選択肢は限られており治療に難渋し外科的治療を要する症例も多い（Matsuoka K et al., 2018）。

IBD 患者は一般的に体重減少や栄養失調と関連があるとされている（Mekhjian HS et al., 1979; Harries AD et al., 1983)。それに伴う微量元素の欠乏症も高頻度に見られると報告されており、各種微量元素の欠乏は貧血（鉄・葉酸・VitB12 欠乏)、骨疾患（Ca、VitD 欠乏)、凝固能亢進（葉酸・VitB6・VitB12)、創傷治癒遅延（亜鉛、VitA、VitC）など様々な症状と関連があるとされている（Hwang C et al., 2012)。故に欧米（British Society of Gastroenterology）のガイドラインでは IBD 患者における微量元素欠乏症の定期的なスクリーニングが推奨されている（Lamb CA et al., 2019)。
亜鉛は微量元素の一つであり生殖機能や骨格の発育、味覚の維持、免疫機能などに関与している（Walsh CT et al., 1994)。IBD 患者においては健常人に比べて低亜鉛血症の割合が多く、その頻度は CD 患者で 42.2%（326/773)、UC 患者で 38.6%（86/223）とされており非常に高い頻度で遭遇する病態である（Siva S et al., 2017)。IBD 患者の低亜鉛血症の原因としては食事制限による亜鉛の摂取不足（Sturniolo GC et al., 1980)、腸管炎症や腸管切除に伴う吸収障害（Naber TH et al., 1998)、慢性炎症に伴う低アルブミン血症により亜鉛の尿中排泄が増加する（Solomons NW et al., 1977）ことなどが影響していると考えられている。また低亜鉛血症を有する IBD 患者では、低亜鉛血症を有さない IBD 患者と比較し IBD 関連手術、IBD 関連入院、および IBD 関連合併症のリスクが高いことが示されており、さらに低亜鉛血症を有する IBD 患者において低亜鉛血症が継続した患者と比較し 12 ヵ月以内に血清亜鉛濃度の正常化が見られた患者では、IBD 関連手術、IBD 関連入院、および IBD 関連合併症のリスクが低下したことも示されている（Siva S et al., 2017)。

一方、低亜鉛血症が腸管に与える影響としては既報から以下の 2 つの要素が主に関与していると想定される。

① 腸管バリア機能の低下

腸管の恒常性維持に必須な因子の一つに上皮によって形成される細胞密着結合（Tight Junction）がある。隣接する細胞の細胞膜を密着させることで腸管粘膜の選択的透過性を制御するものであるが、in vitro の研究では細胞が亜鉛欠乏状態となると Tight Junction の構成成分である膜貫通タンパク質

Occludin や裏打ちタンパク質 ZO-1 の発現が低下し管腔内抗原や腸内細菌が通過しやすくなると報告されている（Albert F et al., 2008)。

② 炎症制御機能の低下

亜鉛はマクロファージを通して T 細胞系に影響を与えることが報告されており、亜鉛欠乏状態の IBD モデルマウスを用いた研究では大腸粘膜中の炎症型 M1 マクロファージが増加するとともに M1 マクロファージが naïve T 細胞の Th17 細胞への分化を促進させることも報告された（Higashimura Y et al., 2020)。

さらに亜鉛補充の有効性に関しては、デキストラン硫酸ナトリウム（dextran sulfate sodium, DSS）投与にて腸炎を惹起した IBD モデルマウスに対する亜鉛の経口投与により、コントロール群と比較し亜鉛投与群では有意に腸管の炎症が改善したとの報告も見られる（Li J at al., 2017)。

本邦では亜鉛を含有する治療薬としては Polaprezinc（Promac®）があるが、消化性潰瘍に対する治療薬としてのみ保険承認されており低亜鉛血症に対する亜鉛補充療法を行うことができなかった。ところが 2017 年にウィルソン病に対する銅キレート薬である酢酸亜鉛水和物製剤（Zinc Acetate Hydrate, ZAH, Nobelzin®）が低亜鉛血症に対する亜鉛補充療法として保険承認された。それを受け本邦では低亜鉛血症を有する IBD 患者に対する亜鉛補充療法が徐々に行われるようになってきた。

しかし低亜鉛血症を有する IBD 患者に対し積極的に亜鉛製剤を投与する有効性に関する検討は未だ見られていない。本研究の目的は低亜鉛血症を有する IBD 患者に対する ZAH 投与の有効性を検討することである。

研　究　方　法

1. 研究デザインと目的

北海道大学病院と札幌東徳洲会病院において二施設共同後方視的観察研究を行い、ZAH 投与前と、投与 4 週後、投与 20 週後の血清亜鉛濃度と疾患活動性の変化を解析した。亜鉛補充療法施行前後に下部消化管内視鏡検査が施行され腸管粘膜を組織生検にて採取された症例に対し、免疫染色を行い亜鉛補充療法が Tight junction の構成蛋白や免疫細胞に与える影響を評価した。
観察期間は 2017 年 3 月から 2021 年 11 月とした。

2. 低亜鉛血症の定義

亜鉛の効果的な生体内利用を得るためには血清亜鉛濃度を 80μg/dL 以上に維持することが推奨されており、また日本臨床栄養学会では血清亜鉛濃度が 80μg/dL 未満の患者に対して亜鉛補充療法を行うことを推奨している（Tomita H et al., 2008)。したがって今回我々は血清亜鉛濃度 80μg/dL 以上の場合に正常、80μg/dL 未満の場合に低亜鉛血症と定義した。

3. 患者登録

<u>適格基準</u>

1) 臨床所見、内視鏡所見、病理学的診断基準に基づき UC または CD と診断されている患者（Matsuoka K et al., 2018)。
2) 2017 年 3 月から 2021 年 11 月の期間に低亜鉛血症を呈し、ZAH が投与された IBD 患者。
3) ZAH 投与開始後少なくとも 1 回は follow up され、血清亜鉛濃度ならびに疾患活動性が評価されている患者。

<u>除外基準</u>

1) 内服自己中断、転医により ZAH 内服が継続できなかった患者。
2) UC における大腸全摘出術後の患者。
3) 人工肛門造設後の患者。
4) ZAH 投与後 4 週、20 週共に血清 Zn 濃度が測定されていない患者。

4. 評価項目

<u>主要評価項目</u>

低亜鉛血症を伴う IBD 患者における ZAH 投与後 4 週、20 週における血清亜鉛濃度の変化。

副次的評価項目

1) ZAH 投与後 4 週、20 週における疾患活動性や血液学的検査の変化。
2) ZAH 投与前後の内視鏡的重症度の変化。
3) 血清亜鉛濃度と、疾患活動性または CRP、血清アルブミン値との相関。
4) ZAH 投与後の血清亜鉛濃度や疾患活動性の変化に寄与する因子の解析。
5) ZAH 投与前後の腸管粘膜上皮における Tight Junction を構成するタンパク(Occludin, ZO-1, Claudin1, E-cadherin)と、M1/M2 マクロファージの浸潤、および IL-17 の発現状況の変化。

ZAH 投与 4 週後に血清亜鉛濃度の測定が実施されていない症例では、投与 8 週後まで観察を行い最も投与 4 週後に近い測定日のデータを採用した。投与 20 週後でも同様に投与 24 週後まで観察を行い最も投与 20 週後に近い測定日のデータを採用した。
2)に関しては ZAH 投与前 4 週以内かつ投与後 60 週以内の両者で内視鏡検査が施行された症例を対象とした。
4)に関しては ZAH 投与前 52 週以内かつ投与後 52 週以内の両者で下部消化管内視鏡検査が施行され、それぞれ同部位より腸管粘膜を組織生検にて採取された症例を対象とした。

疾患活動性や内視鏡的重症度は、CD 患者では Crohn's Disease Activity Index (CDAI)(表 1)(Best WR et al., 1979)と Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) (表 2) (Daperno M et al., 2004) を、UC 患者では partial Mayo score (PMS) (表 3) (Schroeder KW et al., 1987) と Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) (表 4) (Travis SP et al., 2013) を用いて評価した。

表 1. Crohn's Disease Activity Index (CDAI)。CDAI score は各項目の数値を合計する。

Variable	Scale	Weight
Liquid or very soft stools	Number of liquid or soft stools for summed daily for 7 days	x 2
Abdominal pain:	Sum of 7 days of daily ratings as 0 = none, 1 = mild, 2 = moderate, 3 = severe	x 5
General well being:	Sum of 7 days of daily ratings as 0 = generally well, 1 = slightly below par, 2 = poor, 3 = very poor, 4 = terrible	x 7
Presence of complications:	Any of the extra intestinal diseases present during the previous 7 days	x 20
Taking Lomotil or Opiates for diarrhea	0 = no, 1 = yes	x 30
Presence of an abdominal mass:	0 as none, 2 as suspicious, 5 as definite	x 10
Hematocrit:	Males:(47-hematocrit), Females(42-hematocrit)	x 6
% Body weight below standard	100 × [1 − (body weight/standard weight)]	x 1

表 2. Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD)。腸管を 5 つの区域（回腸、右結腸、横行結腸、左結腸、直腸）に分割し、各領域をそれぞれ下記 4 項目で評価をし、各領域のスコアを合計する。

	0	1	2	3
Size of ulcers	None	Aphthous ulcers (diameter 0.1-0.5 cm)	Large ulcers (diameter 0.5-2 cm)	Very large ulcers (diameter > 2cm)
Ulcerated surface	None	< 10%	10-30%	> 30%
Affected surface	Unaffected segment	< 50%	50-75%	> 75%
Presence of narrowings	None	Single, can be passed	Multiple, can be passed	Cannot be passed

表 3. Partial Mayo score (PMS)。UC の活動性評価として主に用いられる評価方法である Mayo score から、内視鏡所見の項目を除外し日常診療にて用いやすく簡略化した評価方法。排便回数、血便の頻度、医師による全般的評価の 3 項目からスコアリングを行う。

Stool frequency	Score	Finding on endoscopy	Score
Normal no. of stools	0	Normal	0
1-2 stools more than normal	1	Mild disease	1
3-4 stools more than normal	2	Moderate disease	2
5 or more stools more than normal	3	Severe disease	3
Rectal bleeding	Score	Physician's global assessment	Score
No blood seen	0	Normal	0
Streaks of blood with stool less than half the time	1	Mild disease	1
Obvious blood with stool most of the time	2	Moderate disease	2
Blood alone passes	3	Severe disease	3

表 4. Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) 下記 3 項目の合計をスコアとする。

Vascular pattern	Bleeding	Erosions and ulcers
Normal (0)	None (0)	None (0)
Patchy obliteration (1)	Mucosal (1)	Erosions (1)
Obliterated (2)	Luminal mild (2)	Superficial ulcer (2)
	Luminal moderate or severe (3)	Deep ulcer (3)

5. 病理学的検討方法

日常診療にて内視鏡下生検にて採取された腸管粘膜上皮の組織切片に対し抗 Occludin 抗体、抗 ZO-1 抗体、抗 Claudin1 抗体、抗 E-cadherin 抗体、抗 CD80 抗体（M1 マクロファージ)、抗 CD163 抗体（M2 マクロファージ)、抗 IL-17 抗体（Th17）を用いた免疫染色を行い、画像解析ソフト（三谷商事株式会社、WinROOF2021）を用いた色抽出にて各抗体による染色率を定量化し、ZAH 投与前後で比較検討を行った。Occludin、ZO-1、Claudin1、E-cadherin に関しては

0.04 平方ミリメートル、CD80、CD163、IL-17 に関しては強拡大一視野を関心領域とし、各切片毎に無作為に 10 箇所を選択し、各関心領域における染色率の中央値を各検体の代表値として採用した。使用した試薬と希釈濃度を下記に示す。
抗 Occludin 抗体（希釈濃度 1:200、Abcam, Cambridge, United Kingdom）
抗 ZO-1 抗体（希釈濃度 1:500、Abcam, Cambridge, United Kingdom）
抗 Claudin1 抗体（希釈濃度 1:400、Abcam, Cambridge, United Kingdom）
抗 E-cadherin 抗体（希釈濃度 1:100、DAKO Japan, Tokyo, Japan）
抗 CD80 抗体（希釈濃度 1:100、R&D Systems, Minneapolis, USA）
抗 CD163 抗体（希釈濃度 1:100、Leica Biosystems, Wetzlar, Germany）
抗 IL-17 抗体（希釈濃度 1:200、Gene Tex, California, USA）

6. 統計解析
全ての統計解析には、JMP Pro v16.1.0 software package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。すべての変数は中央値（range）または数値（%）として表記した。P 値は 0.05 未満を有意差ありとし、2 群間の比較にはカイ二乗検定、マンホイットニーU 検定、ウィルコクソンの符号順位検定を用いた。相関解析にはスピアマンの順位相関係数を用い、相関係数 r±0.20～±0.40 を軽度の相関、±0.40～±0.70 を中等度の相関、±0.70～を強度な相関と定義した。カットオフ値は、ROC 曲線分析において Youden の指標が最大となるよう算出した。単変量解析とロジスティック回帰分析を用いて各種目的変数に寄与する因子に関して評価を行った。多変量解析における説明変数の選択は単変量解析にて P 値が 0.15 未満であり、既報や臨床的に目的変数に寄与すると想定される項目について実施した。

7. 倫理的考慮事項
本研究は、北海道大学病院（IRB-019-0241）および札幌東徳洲会病院（IRB-TGE01301-012）における倫理審査委員会での承認を取得し、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従って実施された。研究プロトコルは全ての参加施設のウェブサイトに掲載されており、患者同意に関してはオプトアウトの形式をとった。

研　究　結　果

1. 患者登録

2017 年 3 月から 2021 年 11 月の期間に低亜鉛血症を呈し ZAH が投与された IBD 患者 196 例が登録された。その内、人工肛門造設後の患者が 25 例、内服自己中断や転医により 15 例、潰瘍性大腸炎における大腸全摘後の 3 例、そして ZAH 投与後 4 週、20 週共に血清亜鉛濃度がフォローされていない患者 33 例が除外され、ZAH 投与後 4 週または 20 週のいずれかで血清亜鉛濃度が 1 回以上評価された IBD 患者 120 例（CD 82 例、UC 38 例）の内、ZAH 投与 4 週後に血清亜鉛濃度が測定された CD 患者 61 例、UC 患者 33 例と、ZAH 投与 20 週後に血清亜鉛濃度が測定された CD 患者 55 例、UC 患者 15 例に対し解析を行った（図 3)。

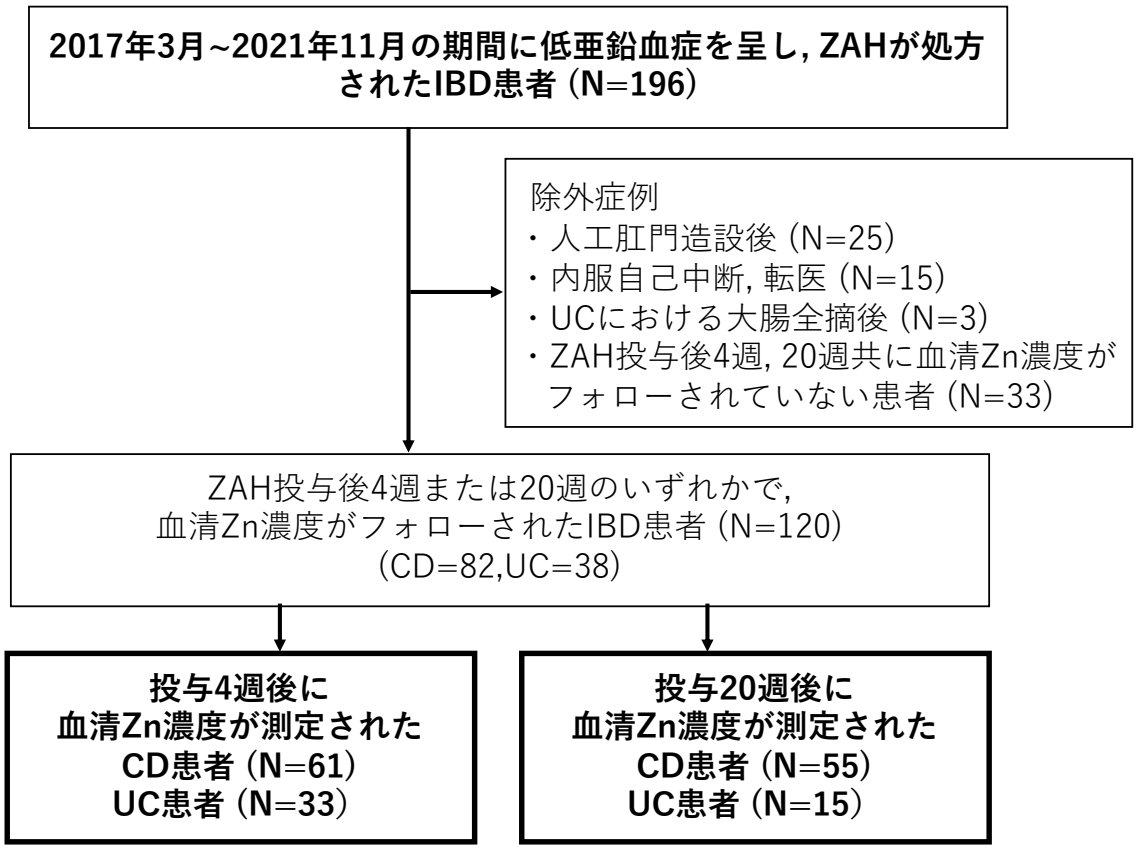

図 3. 患者登録

2. CD patients

1) 患者背景

CD 患者では年齢中央値が 39 歳（17-72)、男性が 57 例（69.5%)、女性が 25 例（30.5%)、罹病期間中央値は 10 年（0-35)、病型は小腸型が 13 例（18.3%)、大腸型が 7 例（8.5%)、小腸大腸型が 62 例（75.6%）であった。CDAI 中央値は 118（15-478)、血清亜鉛濃度中央値は 58.8μg/dl（38-77.5)、ZAH 投与量中央値は 50mg/day（25-150）であった。併用薬に関しては経腸栄養剤が 55 例（67.1%)、5ASA/SASP が 57 例（69.5%)、ステロイド製剤が 13 例（15.9%)、免疫調節薬が 45 例（54.9%)、抗 TNFα抗体製剤が 47 例（57.3%)、抗インテグリン抗体製剤が 4 例（4.9%)、抗 IL12/23p40 抗体製剤が 17 例（20.3%）であった（表 5)。

表 5. 患者背景 (CD, N=82)。

Age (years)	39 (17-72)
Male/Female (n(%))	57 (69.5%) / 25 (30.5%)
Medical history (years)	10 (0-35)
Smoking status Current/Former/Never (n(%))	15 (18.3%) / 6 (7.3%) / 61 (74.4%)
Disease type ileitis/colitis/ileo-colitis (n(%))	13 (15.9%) / 7 (8.5%) / 62 (75.6%)
Activity index (CDAI)	118 (15-478)
Serum zinc level (μg/dl)	58.8 (38-77.5)
Dose of ZAH (mg/day)	50 (25-150)
Concomitant medication	
Enteral nutrition (n(%))	55 (67.1%)
5ASA, SASP (n(%))	57 (69.5%)
Corticosteroid (n(%))	13 (15.9%)
Immunomodulator (n(%))	45 (54.9%)
Anti-TNFα (n(%))	47 (57.3%)
Anti-integrin (n(%))	4 (4.9%)
Anti-IL12/23 (n(%))	17 (20.3%)

Values are presented as median (range) or number (%).

CD, Crohn's disease; CDAI, Crohn's disease activity index; ZAH, zinc acetate hydrate; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin.

2）CD 患者における、ZAH 投与 4 週後の血清亜鉛濃度と疾患活動性の変化

CD 患者において ZAH 投与開始 4 週後に血清亜鉛濃度が測定された CD 患者は 61 例であった。ZAH 投与開始 4 週後の血清亜鉛濃度中央値は投与前と比較し 59.0μg/dl から 92.3μg/dl と有意に上昇し（P<0.001）、68.9%（42/61）の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。CDAI 中央値は 118 から 86 と有意に改善された（P<0.001）（図 4）。

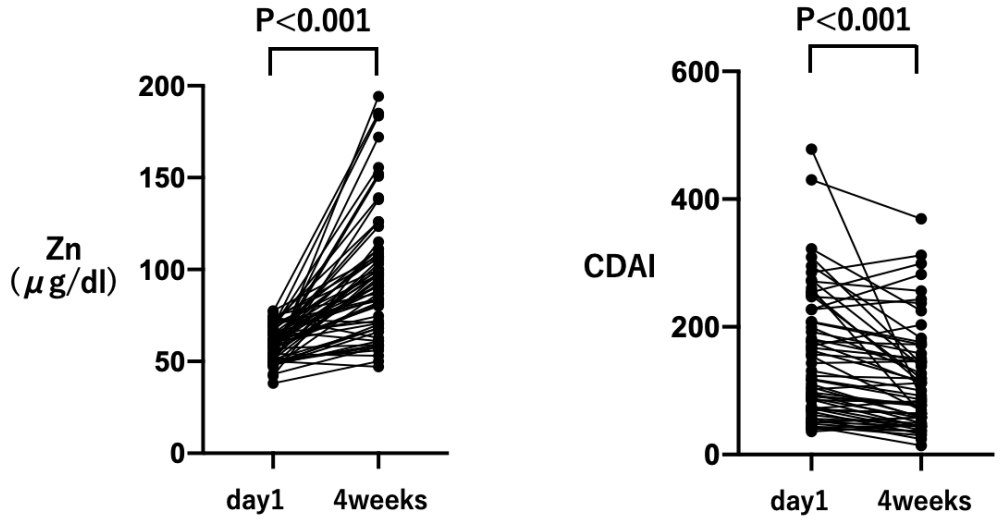

図 4. CD 患者における ZAH 投与前と投与 4 週後の、血清亜鉛濃度と CDAI の変化。

ZAH 投与 4 週後の CDAI の変化をサブスコア毎に解析すると水様便の回数、一般状態、腸管外症状の項目がそれぞれ有意に改善し、ヘマトクリットに関しては有意に低下した（表 6)。

表 6. CD 患者における ZAH 投与 4 週後の CDAI サブスコアの変化 (N=61)。

	day1	4weeks	P
No. liquid/soft stools, 1 wk	42 (0-140)	28 (0-140)	<0.001
Sum of 7 daily abdominal pain ratings	0 (0-80)	0 (0-70)	0.293
Sum of 7 daily ratings, well being	0 (0-133)	0 (0-133)	<0.001
No. of other groups of symptoms/findings	0 (0-40)	0 (0-40)	0.002
Arthritis/arthralgias	4 (6.5%)	3 (4.9%)	0.697
Iritis/uveitis	1 (1.6%)	0 (0%)	n.s
Erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, or aphthous stomatitis	3 (4.9%)	1 (1.6%)	0.309
Anal fissure, fistula, or abscess	10 (16.4%)	5 (8.2%)	0.168
Other fistula	2 (3.3%)	1 (1.6%)	0.558
Fever/temperature > 100° F/37.8° C	2 (3.3%)	0 (0%)	0.154
Taking opiate antidiarrheal agent	0 (0-30)	0 (0-30)	0.125
Abdominal mass	0 (0-20)	0 (0-0)	n.s
Hematocrit	42 (6-126)	37 (0-132)	0.004
Bodyweight percent below standard wt.	5 (0-31)	7 (0-29)	0.488

Values are presented as median (range) or number (%).

ZAH 投与開始 4 週前から投与 4 週後までに ZAH 以外の治療変更が実施されなかった CD 患者は 80.3%（49/61）であり、同群における ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度中央値は 60.0μg/dl（38-78）から 92.3 μg/dl（50-194）と有意に上昇し（P<0.001）、69.4%（34/49）の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。CDAI 中央値は 102（36-430）から 78（14-369）と有意に改善された（P<0.001）（図 5）。

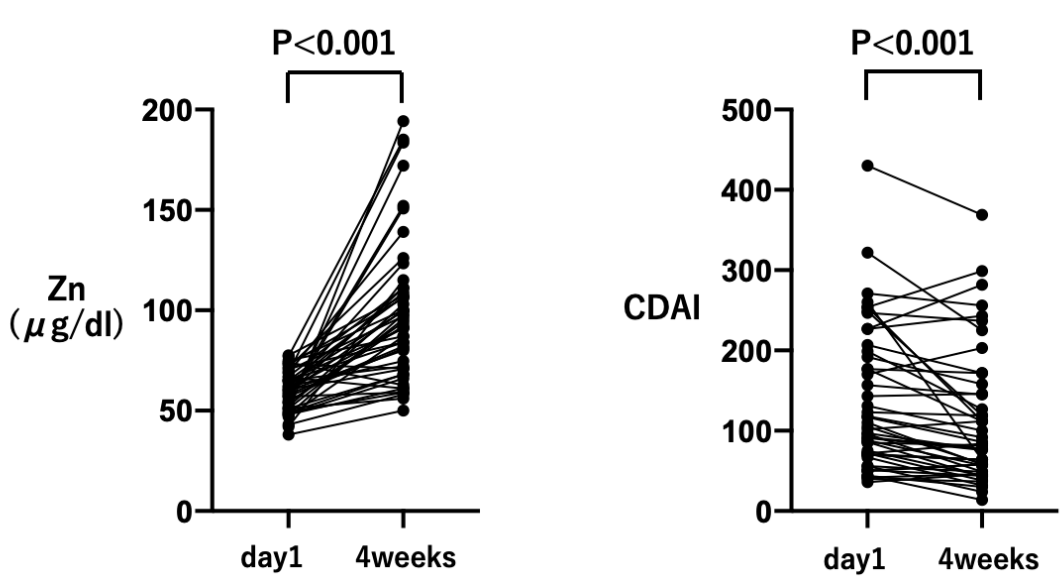

図 5. ZAH 投与開始 4 週間前から投与 4 週後までに、ZAH 以外の治療変更が実施されなかった CD 患者における、ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度と CDAI の変化。

3）CD 患者における、ZAH 投与 20 週後の血清亜鉛濃度と疾患活動性の変化

ZAH 投与開始 20 週後に血清亜鉛濃度が測定された CD 患者は 55 例であった。ZAH 投与開始 20 週後の血清亜鉛濃度中央値は投与前と比較し 58.5μg/dl（42-78）から 82.0μg/dl（54-177）と有意に上昇し（P<0.001）、60.0%（33/55）の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。CDAI 中央値は 96（15-478）から 78（24-425）と有意に改善された（P<0.001）（図 6）。

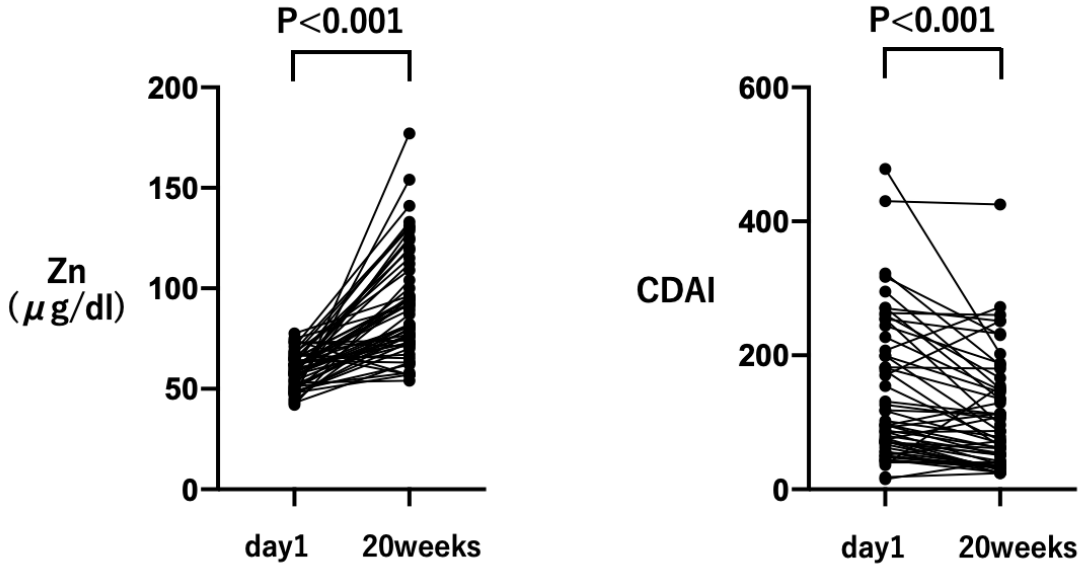

図 6. CD 患者における ZAH 投与前と投与 20 週後の、血清亜鉛濃度と CDAI の変化。

ZAH 投与 20 週後の CDAI の変化をサブスコア毎に解析すると水様便の回数、一般状態、腸管外症状の項目がそれぞれ有意に改善した（表 7)。

表 7. CD 患者における ZAH 投与 20 週後の CDAI サブスコアの変化 (N=55)。

	day1	20weeks	P
No. liquid/soft stools, 1 wk	42 (0-140)	24 (0-210)	0.001
Sum of 7 daily abdominal pain ratings	0 (0-80)	0 (0-70)	0.170
Sum of 7 daily ratings, well being	0 (0-133)	0 (0-119)	0.005
No. of other groups of symptoms/findings	0 (0-40)	0 (0-20)	0.002
Arthritis/arthralgias	0 (0%)	0 (0%)	n.s
Iritis/uveitis	1 (1.8%)	0 (0%)	0.315
Erythema nodosum, pyoderma gangrenosum, or aphthous stomatitis	2 (3.6%)	1 (1.8%)	0.558
Anal fissure, fistula, or abscess	11 (20%)	4 (7.3%)	0.052
Other fistula	2 (3.6%)	1 (1.8%)	0.558
Fever/temperature > 100° F/37.8° C	2 (3.6%)	0 (0%)	0.154
Taking opiate antidiarrheal agent	0 (0-30)	0 (0-30)	0.125
Abdominal mass	0 (0-20)	0 (0-0)	n.s
Hematocrit	41 (0-126)	36 (6-104)	0.173
Bodyweight percent below standard wt.	1 (0-31)	2 (0-25)	0.214

Values are presented as median (range) or number (%).

ZAH 投与開始 4 週前から投与 20 週後までに ZAH 以外の治療変更が実施されなかった CD 患者は 76.4%（42/55）であり、同群における ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度中央値は 60.0μg/dl（44-78）から 91.0μg/dl（54-177）と有意に上昇し（P<0.001）、64.3%（27/42）の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。CDAI 中央値は 88（15-430）から 61（24-425）と有意に改善された（P=0.001）（図 7）。

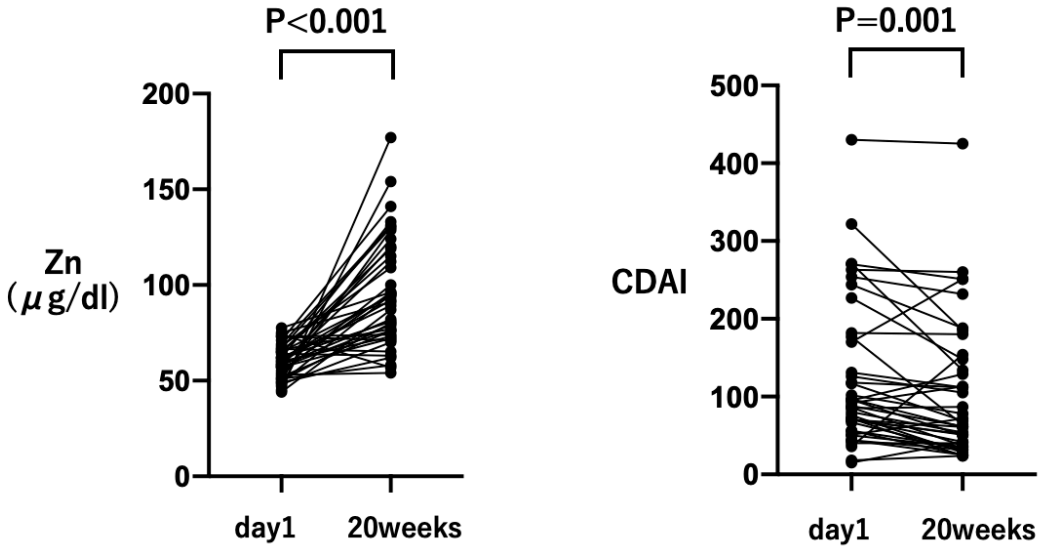

図 7. ZAH 投与開始 4 週前から投与 20 週後までに、ZAH 以外の治療変更が実施されなかった CD 患者における、ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度と CDAI の変化。

4) CD 症例における ZAH 投与 4 週後、20 週後の採血項目の変化

CD 症例における ZAH 投与 4 週後または 20 週後の、亜鉛以外の採血項目の変化を表に示す。ZAH 投与 4 週後において CRP 中央値が 0.15mg/dl (0.01-12.82) から 0.10mg/dl (0.01-9.61) へ僅かに低下していた (P=0.047) (表 8)。

表 8. CD 症例における ZAH 投与 4 週後、20 週後の他採血項目の変化。

	At 4 weeks			At 20 weeks		
	day1	4weeks	P	day1	20weeks	P
WBC (/μl)	5910 (1500-13950)	6100 (1390-13750)	0.250	5700 (1500-13950)	5900 (1230-16200)	0.695
Hb (g/dl)	13.1 (8.5-15.8)	12.9 (8.1-16.1)	0.082	13.2 (8.5-15.8)	13.0 (9.2-15.5)	0.548
PLT ($x10^4$/μl)	28.1 (11.7-43.4)	28.4 (17.1-49.5)	0.379	26.5 (7.1-42.8)	26.6 (6.8-49.4)	0.077
CRP (mg/dl)	0.15 (0.01-12.82)	0.10 (0.01-9.61)	0.047	0.17 (0.01-12.82)	0.17 (0.01-3.78)	0.588
ALB (g/dl)	3.7 (2.5-4.8)	3.7 (2.4-4.6)	0.138	3.8 (2.5-4.8)	3.8 (2.8-4.6)	0.161
AST (IU/l)	19 (10-63)	18 (8-91)	0.812	20 (10-63)	20 (10-41)	0.321
ALT (IU/l)	17 (6-73)	17 (6-136)	0.151	17 (6-67)	17 (6-45)	0.531
Crea (mg/dl)	0.73 (0.41-1.43)	0.73 (0.40-1.67)	0.757	0.76 (0.41-2.63)	0.77 (0.37-2.61)	0.806

Values are presented as median (range).

CD, Crohn's disease; ZAH, zinc acetate hydrate; WBC, white blood cell; Hb, hemoglobin; PLT, platelet; CRP, C-reactive protein; ALB, albumin; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; Crea, creatinine.

5）CD 症例における、ZAH 投与前後の内視鏡的重症度の変化

ZAH 投与前後における内視鏡的重症度の変化に関して、ZAH 投与前 4 週以内かつ投与後 60 週以内の両者で下部消化管内視鏡検査が施行された症例は 18 例であった。ZAH 投与開始後、初回内視鏡施行までの期間中央値は 41 週（2-60）であった。SES-CD の中央値は 11.5（0-33）から 5.5（0-18）へ有意に改善した（P<0.001）。SES-CD サブスコアに関しても全ての項目が有意に改善した（図 8、表 9）。

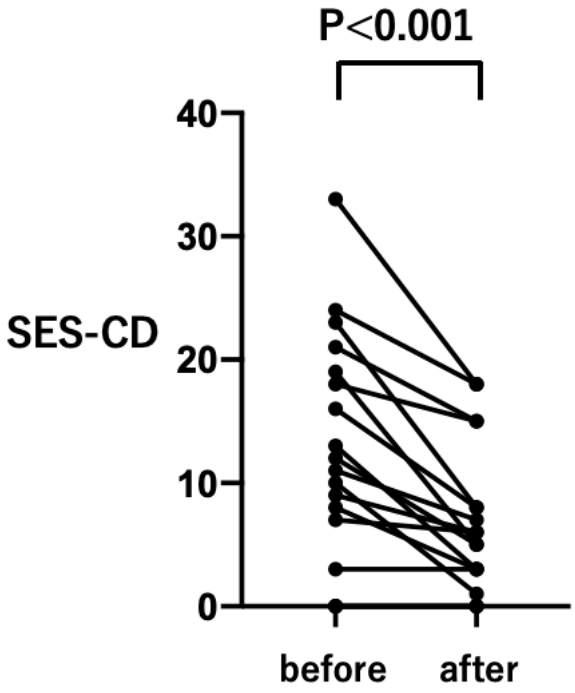

図 8. CD 症例における ZAH 投与前後の SES-CD の変化。

表 9. CD 症例における ZAH 投与前後の SES-CD サブスコアの変化 (N=18)。

	SES-CD subscore		
	before	after	P
Size of ulcers	4.5 (0-12)	2 (0-7)	<0.001
Ulcerated surface	3 (0-10)	2 (0-5)	<0.001
Affected surface	2 (0-7)	1 (0-4)	0.001
Presence of narrowings	1.5 (0-5)	0 (0-5)	0.039

Values are presented as median (range).

SES-CD, Simple Endoscopic Score for Crohn's disease.

6) CD 症例における、ZAH 投与前、4 週後、20 週後における血清亜鉛濃度と CDAI、CRP、血清アルブミン値の相関

血清亜鉛濃度と、CDAI、CRP、血清アルブミン値の相関に関して解析を行った。ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と CDAI (r=-0.306、P=0.005) または CRP (r=-0.393、P<0.001)、には軽度の負の相関を認め、ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と血清アルブミン値には中等度の正の相関 (r=0.527、P<0.001) を認めた (図 9A)。一方で ZAH 投与 4 週後の血清亜鉛濃度の変化と、CDAI や CRP、血清アルブミン値の変化には有意な相関は認められなかった (図 9B)。同様に ZAH 投与 20 週後でも血清亜鉛濃度の変化と、CDAI または CRP、血清アルブミン値の変化には有意な相関は認められなかった (図 9C)。

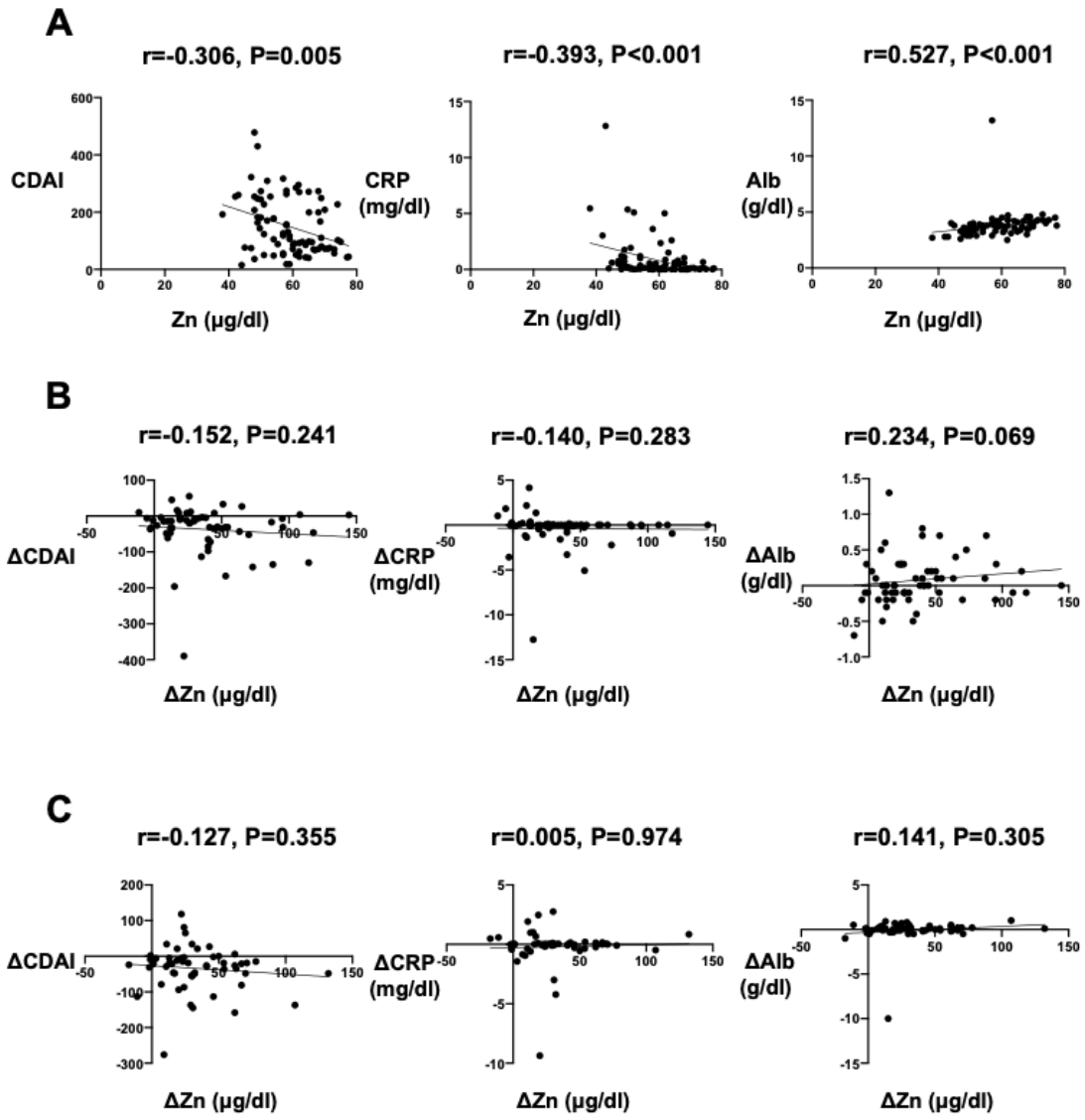

図 9. CD 患者における血清亜鉛濃度と、CDAI、CRP、血清アルブミン値の相関。(A) ZAH 投与開始前の血清亜鉛濃度と、CDAI、CRP、血清アルブミン値の相関、(B) ZAH 投与 4 週後の血清亜鉛濃度の変化と、CDAI、CRP、血清アルブミン値の変化における相関、(C) ZAH 投与 20 週後の血清亜鉛濃度の変化と、CDAI、CRP、血清アルブミン値の変化における相関。

7）CD 症例における、ZAH 投与に伴う血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子

ZAH 投与後において血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子に関して解析を行った。ZAH 投与 4 週後における血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子として、単変量解析では女性、ZAH 投与前の血清亜鉛濃度が 52μg/dl 以上、CRP が 0.11mg/dl 未満、罹病期間が 6 年未満、免疫調節薬の併用、抗 TNFα 抗体の併用、抗 IL12/23 抗体の未使用、が抽出された。ロジスティック回帰分析では ZAH 投与前の血清亜鉛濃度が 52μg/dl 以上、が血清亜鉛濃度の正常化に寄与する独立した予測因子として抽出された（表 10)。

ZAH 投与 20 週後における血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子に関して単変量解析では有意な予測因子は抽出されなかった。ロジスティック回帰分析では 43 歳以上、罹病期間が 8 年以上、CRP が 0.62mg/dl 未満、が独立した予測因子として抽出された（表 11)。

表 10. CD 症例における ZAH 投与 4 週後において、血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子。

	Univariate Analyses			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age ≧25 years at inclusion	1.96	0.27-23.6	0.155			
Sex-male	0.28	0.10-0.92	0.025			
Serum zinc levels ≧52 μg/dl at baseline	8.25	2.22-24.99	<0.001	7.23	2.05-28.28	0.002
Dose of ZAH ≧75 mg/day	3.08	0.95-9.33	0.066			
CDAI ≧88 at baseline	0.69	0.22-2.26	0.590			
CRP ≧0.11 mg/dl at baseline	0.22	0.05-1.00	0.044			
Disease duration ≧6 years	0.22	0.05-1.00	0.044			
Small intestinal lesion	0.44	0.09-2.67	0.377			
Prior intestinal resections	0.58	0.19-1.52	0.299			
Concomitant medication						
5ASA, SASP	0.16	0.01-0.97	0.051			
Corticosteroid	2.71	0.45-31.6	0.344			
Immunomodulator	4.10	1.39-11.9	0.008			
Anti-TNFα	6.25	2.07-17.73	<0.001	3.17	0.91-11.61	0.071
Anti-integrin	0.14	0.01-1.31	0.075			
Anti-IL12/23	0.20	0.06-0.81	0.017			
Enteral nutrition	2.14	0.73-6.58	0.179			
Change of treatment	0.57	0.16-1.89	0.398			

CD, Crohn's disease; ZAH, zinc acetate hydrate; CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin.

表 11. CD 症例における ZAH 投与 20 週後において、血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子。

	Univariate Analyses			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age ≧43 years at inclusion	2.98	0.86-9.31	0.077	7.89	1.93-40.50	0.003
Sex-male	1.46	0.44-4.56	0.537			
Serum zinc levels ≧53 μg/dl at baseline	1.79	0.59-5.45	0.332			
Dose of ZAH ≧100 mg/day	1.08	0.32-3.63	0.897			
CDAI ≧322 at baseline	3.20	0.35-47.59	0.332			
CRP ≧0.62 mg/dl at baseline	0.32	0.10-1.02	0.064	0.20	0.04-0.83	0.026
Disease duration ≧8 years	3.20	0.97-9.71	0.054	9.34	2.14-54.31	0.002
Small intestinal lesion	1.55	0.23-10.4	0.672			
Prior intestinal resections	1.36	0.47-4.29	0.580			
Concomitant medication						
5ASA, SASP	0.86	0.25-3.06	0.809			
Corticosteroid	0.47	0.10-2.13	0.323			
Immunomodulator	1.18	0.40-3.45	0.760			
Anti-TNFα	0.56	0.19-1.69	0.312			
Anti-integrin	1.36	0.15-20.47	0.809			
Anti-IL12/23	1.71	0.37-6.62	0.476			
Enteral nutrition	1.17	0.35-3.80	0.802			
Change of treatment	0.39	0.12-1.27	0.129			

CD, Crohn's disease; ZAH, zinc acetate hydrate; CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin.

8）CD 症例における、ZAH 投与に伴う疾患活動性の改善に寄与した因子

ZAH 投与後において疾患活動性の改善に寄与した因子に関して解析を行った。ZAH 投与 4 週後における疾患活動性の改善に寄与した因子として単変量解析では、ZAH 投与前の CDAI が 51 以上、が抽出された。ロジスティック回帰分析では ZAH 投与前の CDAI が 51 以上、5ASA の併用、が疾患活動性の改善に寄与する独立した予測因子として抽出された（表 12)。

ZAH 投与 20 週後における疾患活動性の改善に寄与する因子として単変量解析では、ZAH 投与前の血清亜鉛濃度が 49μg/dl 以上、ZAH 投与前の CDAI が 96 以上、経腸栄養の未使用、が抽出された。ロジスティック回帰分析では ZAH 投与前の血清亜鉛濃度が 49μg/dl 以上、ZAH 投与前の CDAI が 96 以上、が疾患活動性の改善に寄与する独立した予測因子として抽出された（表 13)。

表 12. CD 症例における ZAH 投与 4 週後において、疾患活動性の改善に寄与した因子。

	Univariate Analyses			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age ≧20 years at inclusion	2.20	0.62-8.70	0.234			
Sex-male	2.50	0.72-8.18	0.156			
Serum zinc levels ≧73 μg/dl at baseline	0.27	0.06-1.23	0.101			
Dose of ZAH ≧50 mg/day	0.89	0.17-4.95	0.891			
CDAI ≧51 at baseline	5.63	1.36-21.80	0.021	7.03	1.29-38.37	0.024
CRP ≧0.18 mg/dl at baseline	1.77	0.46-6.97	0.451			
Disease duration ≧4 years	0.45	0.09-2.16	0.334			
Small intestinal lesion	1.02	0.08-7.53	0.984			
Prior intestinal resections	1.27	0.35-4.18	0.349			
Concomitant medication						
5ASA, SASP	3.45	0.98-11.21	0.056	4.22	1.01-17.62	0.048
Corticosteroid	0.83	0.18-4.46	0.835			
Immunomodulator	0.79	0.24-4.18	0.727			
Anti-TNFα	1.35	0.40-4.95	0.652			
Anti-integrin	1.26	0.43-5.71	0.477			
Anti-IL12/23	0.83	0.18-4.46	0.835			
Enteral nutrition	1.47	0.43-5.47	0.556			
Change of treatment	3.18	0.50-37.18	0.270			

CD, Crohn's disease; ZAH, zinc acetate hydrate; CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin.

表 13. CD 症例における ZAH 投与 20 週後において、疾患活動性の改善に寄与した因子。

	Univariate Analyses			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age ≧41 years at inclusion	1.66	0.22-20.55	0.652			
Sex-male	3.50	0.84-14.58	0.074			
Serum zinc levels ≧49 μg/dl at baseline	5.33	1.28-22.85	0.026	8.27	1.37-67.52	0.021
Dose of ZAH ≧100 mg/day	1.31	0.99-1.96	0.052			
CDAI ≧96 at baseline	5.47	1.05-27.11	0.031	7.81	1.47-73.29	0.014
CRP ≧0.87 mg/dl at baseline	1.29	0.94-2.26	0.184			
Disease duration ≧12 years	0.53	0.16-1.91	0.373			
Small intestinal lesion	0.80	0.67-1.59	0.328			
Prior intestinal resections	0.80	0.71-1.25	0.750			
Concomitant medication						
5ASA, SASP	0.55	0.11-3.03	0.484			
Corticosteroid	0.23	0.05-1.09	0.070			
Immunomodulator	1.00	0.28-3.54	n.s			
Anti-TNFα	0.59	0.15-2.71	0.476			
Anti-integrin	0.42	0.05-6.68	0.484			
Anti-IL12/23	2.25	0.32-27.17	0.458			
Enteral nutrition	0.139	0.04-0.69	0.006			
Change of treatment	1.45	0.31-7.52	0.662			

CD, Crohn's disease; ZAH, zinc acetate hydrate; CDAI, Crohn's disease activity index; CRP, C-reactive protein; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin.

9) CD 症例における ZAH 投与に伴う病理学的変化

CD 患者では亜鉛補充療法施行前後に同部位より腸管粘膜検体を採取し得た症例は 3 例のみであった。対象となった患者の背景としては、ZAH 投与前の組織採取から投与開始までの期間はそれぞれ 24、8、1 週間、ZAH 投与開始から投与後の組織採取までの期間はそれぞれ 13、36、57 週間であった。採取された組織は回腸が 1 例、直腸が 2 例で、疾患活動性に関して、ZAH 投与前の CDAI はそれぞれ 125、194、151、ZAH 投与後の CDAI はそれぞれ 170、67、150 であった。内視鏡的重症度に関しては、ZAH 投与前の SES-CD はそれぞれ 21、21、0、ZAH 投与後の SES-CD はそれぞれ 22、4、0 であった（表 14)。

表 14. CD 症例における病理組織学的検討の対象となった患者の背景（N=3)。

	Case 1	Case 2	Case 3
Age (years)	38	29	45
Sex (Male/Female)	Male	Male	Male
Time from tissue collection to ZAH administration (weeks)	24	8	1
Time from ZAH administration to tissue collection (weeks)	13	36	57
Site of tissue collection Ileum/Colon/Rectum	Rectum	Ileum	Rectum
Dose of ZAH (mg/day)	100	50	50
Activity index before ZAH administration (CDAI)	125	194	151
Activity index after ZAH administration (CDAI)	170	67	150
Endoscopic activity index before ZAH administration (SES-CD)	21	21	0
Endoscopic activity index after ZAH administration (SES-CD)	22	4	0

CD, Crohn's disease; ZAH, zinc acetate hydrate; CDAI, Crohn's disease activity index; SES-CD, Simple Endoscopic Score for Crohn's disease.

ZAH 投与前後における Occludin、ZO-1、Claudin1、E-cadherin、CD80（M1 マクロファージ)、CD163（M2 マクロファージ)、IL-17 の染色率の変化、および代表的な病理組織像を示す（図 10)。Tight Junction を構成するタンパクに関して、ZO-1 や Claudin1 では全例で染色率が上昇し、Occludin や E-cadherin では 3 例中 2 例で染色率が上昇した。マクロファージの浸潤に関して、CD80 の染色率が 3 例中 2 例で低下、CD163 の染色率は 3 例中 2 例で上昇、IL-17 の染色率に関しては 3 例中 1 例でのみ低下した（図 10)。

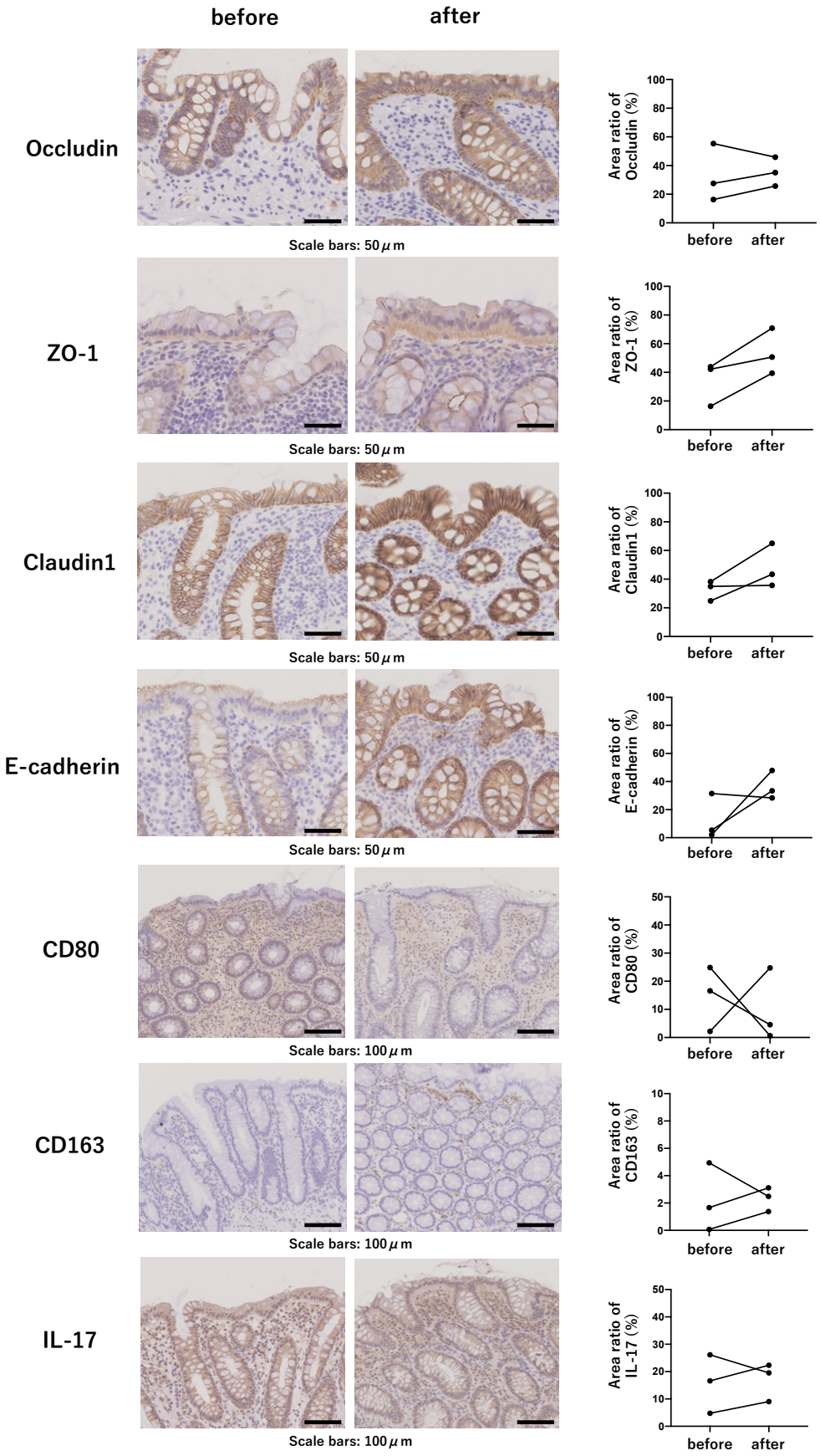
before
after
Occludin
Scale bars: 50 μm
Area ratio of Occludin (%)
ZO-1
Scale bars: 50 μm
Area ratio of ZO-1 (%)
Claudin1
Scale bars: 50 μm
Area ratio of Claudin1 (%)
E-cadherin
Scale bars: 50 μm
Area ratio of E-cadherin (%)
CD80
Scale bars: 100 μm
Area ratio of CD80 (%)
CD163
Scale bars: 100 μm
Area ratio of CD163 (%)
IL-17
Scale bars: 100 μm
Area ratio of IL-17 (%)
before
after

図 10. CD 症例における、ZAH 投与前後の Occludin、ZO-1、Claudin1、E-cadherin、CD80（M1 マクロファージ)、CD163（M2 マクロファージ)、IL-17 の染色率の変化、と代表的な病理組織像。

3. UC patients

1) 患者背景

UC 患者では年齢中央値が 43.5 歳（18-87)、男性が 18 例（47.4%)、女性が 20 例（52.6%)、罹病期間中央値は 5 年（0-47)、病型は直腸炎型が 0 例（0%)、左側結腸型が 4 例（10.5%)、全大腸炎型が 34 例（89.5%）であった。PMS 中央値は 2（0-9)、血清亜鉛濃度中央値は 63.0μg/dl（34-75)、ZAH 投与量中央値は 50mg/day（25-100）であった。併用薬に関しては、5ASA/SASP が 30 例 (78.9%)、ステロイド製剤が 9 例（23.7%)、免疫調節薬が 18 例（47.5%)、カルシニューリン阻害薬が 0 例（0%)、抗 TNFα 抗体製剤が 10 例（26.3%)、抗インテグリン抗体製剤 2 例（5.3%)、抗 IL12/23 抗体製剤 が 2 例（5.3%)、ヤヌスキナーゼ阻害薬が 1 例（2.6%）であった（表 15)。

表 15. 患者背景 (UC, N=38)。

Age (years)	43.5 (18-87)
Male/Female (n(%))	18 (47.4%) / 20 (52.6%)
Medical history (years)	5 (0-47)
Smoking status Current/Former/Never (n(%))	31 (81.6%) / 2 (5.3%) / 5 (13.2%)
Disease type Proctitis/left side/pancolitis (n(%))	0 (0%) / 4 (10.5%) / 34 (89.5%)
Activity index (PMS)	2 (0-9)
Serum zinc level (μg/dl)	63.0 (34-75)
Dose of ZAH (mg/day)	50 (25-100)
Concomitant medication	
5ASA,SASP (n(%))	30 (78.9%)
Corticosteroid (n(%))	9 (23.7%)
Immunomodulator (n(%))	18 (47.5%)
Calcineurin inhibitor (n(%))	0 (0%)
Anti-TNFα (n(%))	10 (26.3%)
Anti-integrin (n(%))	2 (5.3%)
Anti-IL12/23 (n(%))	2 (5.3%)
JAK inhibitor (n(%))	1 (2.6%)

Values are presented as median (range) or number (%).

UC, ulcerative colitis; PMS, partial Mayo score; ZAH, zinc acetate hydrate; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; JAK, Janus kinase.

2）UC 患者における、ZAH 投与 4 週後の血清亜鉛濃度と疾患活動性の変化

UC 患者において ZAH 投与開始 4 週後に血清亜鉛濃度が測定された UC 患者は 33 例であった。ZAH 投与開始 4 週後の血清亜鉛濃度中央値は投与前と比較し、63.0μg/dl から 94.0μg/dl と有意に上昇し（P<0.001）、69.7%（23/33）の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。PMS 中央値は 2 から 0 と有意に改善された（P=0.002）（図 11）。

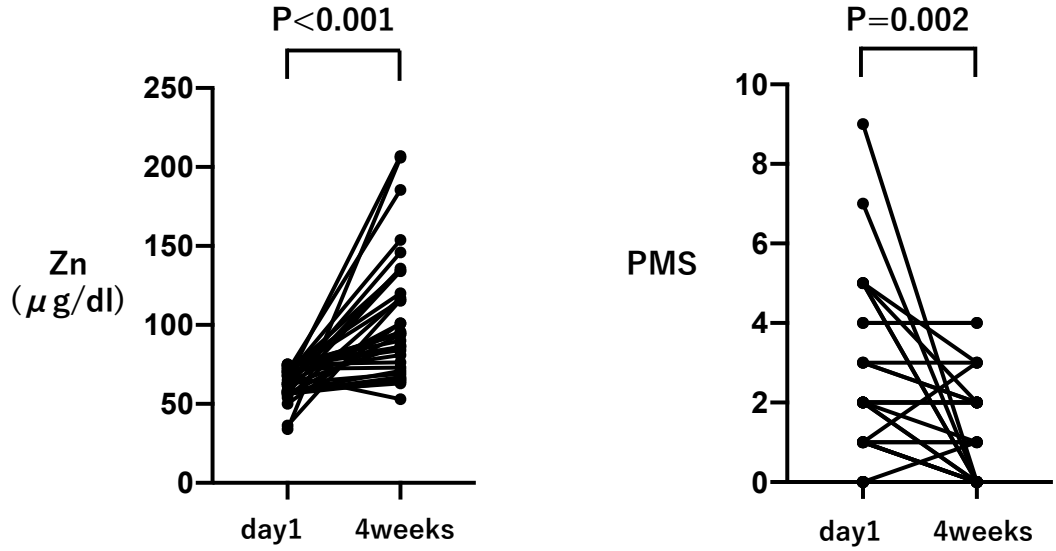

図 11. UC 患者における ZAH 投与前と投与 4 週後の、血清亜鉛濃度と PMS の変化。

ZAH 投与 4 週後の PMS の変化をサブスコア毎に解析すると排便回数、全身状態の項目がそれぞれ有意に改善した。(表 16)。

表 16. UC 患者における ZAH 投与 4 週後の PMS サブスコアの変化 (N=33)。

	day1	4weeks	P
Stool frequency	1 (0-3)	0 (0-2)	0.007
Rectal bleeding	0 (0-3)	0 (0-1)	0.133
Physician's global assessment	0 (0-3)	0 (0-2)	0.014

Values are presented as median (range).

ZAH 投与開始 4 週前から投与 4 週後までに ZAH 以外の治療変更が実施されなかった UC 患者は 72.7% (24/33) であり、同群における ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度中央値は 68.1μg/dl (54-75) から 94.5μg/dl (53-207) と有意に上昇し (P<0.001)、75.0% (18/24) の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。PMS 中央値は 1 (0-5) から 1 (0-4) と有意な変化を認めなかった (P=0.125) (図 12)。

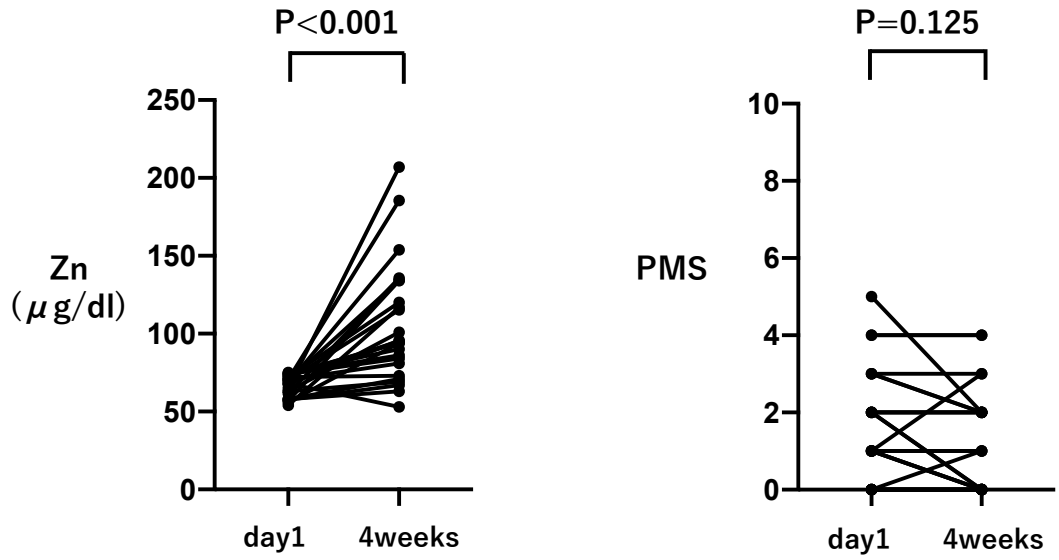

図 12. ZAH 投与開始 4 週間前から投与 4 週後までに、ZAH 以外の治療変更が実施されなかった UC 患者における、ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度と PMS の変化。

3）UC 患者における、ZAH 投与 20 週後の血清亜鉛濃度と疾患活動性の変化

ZAH 投与開始 20 週後に血清亜鉛濃度が測定された UC 患者は 15 例であった。ZAH 投与開始 20 週後の血清亜鉛濃度中央値は投与前と比較し 62.0μg/dl（36-73）から 100μg/dl（61-249）と有意に上昇し（P<0.001）、73.3%（11/15）の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。PMS 中央値は 1（0-8）から 0（0-5）と低下したが有意差は認めなかった（P=0.088）（図 13）。ZAH 投与 20 週後の PMS サブスコアには有意な変化を認めなかった。（表 17）。

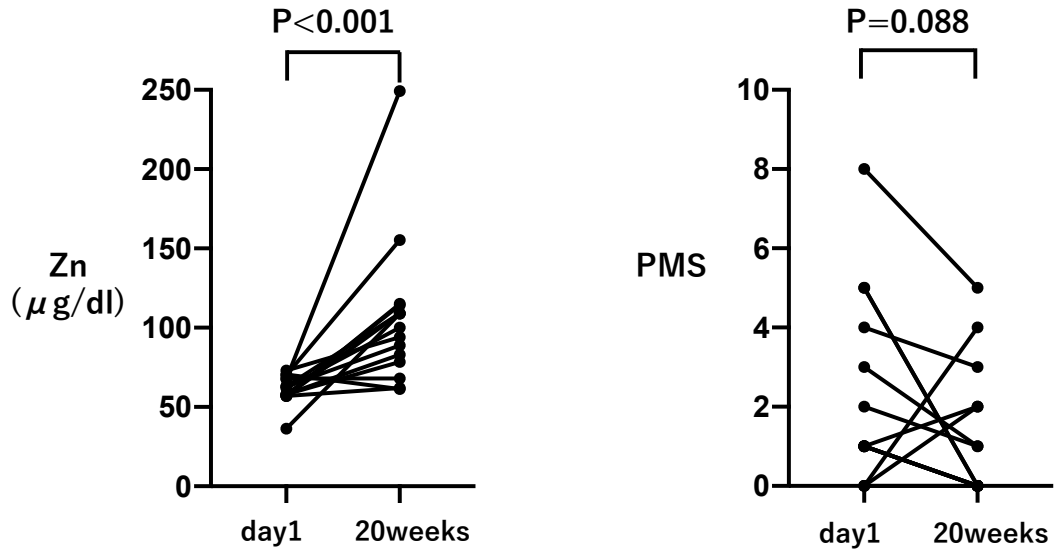

図 13. UC 患者における ZAH 投与前と投与 20 週後の、血清亜鉛濃度と PMS の変化。

表 17. UC 患者における ZAH 投与 20 週後の PMS サブスコアの変化（N=15）。

	day1	20weeks	P
Stool frequency	1 (0-3)	1 (0-2)	0.271
Rectal bleeding	0 (0-3)	0 (0-1)	0.375
Physician’s global assessment	0 (0-2)	0 (0-2)	0.438

Values are presented as median (range).

ZAH 投与開始 4 週前から投与 20 週後までに ZAH 以外の治療変更が実施されなかった UC 患者は 66.7%（10/15）であり、同群における ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度中央値は 60.5μg/dl（57-73）から 101.5μg/dl（62-249）と有意に上昇し（P=0.004)、70.0%（7/10）の患者の血清亜鉛濃度が正常化した。PMS 中央値は、1（0-8）から 0.5（0-5）へ低下したが有意差は認めなかった（P=0.223）（図 14)。

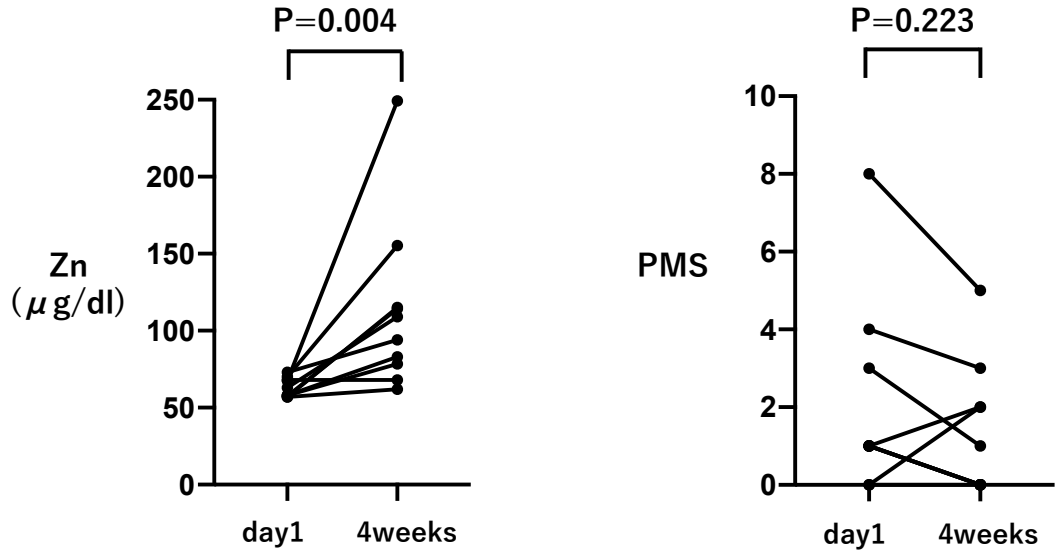

図 14. ZAH 投与開始 4 週間前から投与 20 週後までに、ZAH 以外の治療変更が実施されなかった UC 患者における、ZAH 投与前後の血清亜鉛濃度と PMS の変化。

4) UC 症例における ZAH 投与 4 週後、20 週後の採血項目の変化

UC 症例における ZAH 投与 4 週後または 20 週後の亜鉛以外の採血項目の変化を表に示す。ZAH 投与 4 週後においてヘモグロビン中央値が 12.6g/dl (6.9-15.6) から 12.9g/dl (8.9-16.1) へ上昇し (P=0.040)、投与 20 週後において血小板中央値が 19.9 x10^4/μl (10.9-35.5) から 21.2 x10^4/μl (12.7-44.5) へ上昇 (P=0.004) した (表 18)。

表 18. UC 症例における ZAH 投与 4 週後、20 週後の採血項目の変化。

	At 4 weeks			At 20 weeks		
	day1	4weeks	P	day1	20weeks	P
WBC (/μl)	5400 (2660-21120)	5600 (3100-18800)	0.387	4700 (2660-9710)	4900 (3330-7700)	0.902
Hb (g/dl)	12.6 (6.9-15.6)	12.9 (8.9-16.1)	0.040	12.4 (6.9-15.6)	11.8 (10.0-16.2)	0.990
PLT (x10^4/μl)	23.7 (9.4-61.9)	24.4 (13-46)	0.244	19.9 (10.9-35.5)	21.2 (12.7-44.5)	0.004
CRP (mg/dl)	0.05 (0.01-25.6)	0.04 (0.01-3.32)	0.229	0.17 (0.01-12.82)	0.17 (0.01-3.78)	0.588
ALB (g/dl)	4.0 (1.8-5.0)	4.1 (2.0-4.8)	0.218	3.9 (2.0-4.4)	3.9 (2.0-4.2)	0.995
AST (IU/l)	18 (9-59)	20 (10-59)	0.879	19 (9-57)	22 (13-85)	0.091
ALT (IU/l)	13 (7-99)	17 (7-84)	0.077	17 (7-49)	16 (7-63)	0.581
Crea (mg/dl)	0.73 (0.44-1.16)	0.74 (0.44-1.22)	0.141	0.67 (0.53-0.99)	0.70 (0.52-1.11)	0.336

Values are presented as median (range).

UC, ulcerative colitis; ZAH, zinc acetate hydrate; WBC, white blood cell; Hb, hemoglobin; PLT, platelet; CRP, C-reactive protein; ALB, albumin;AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; Crea, creatinine.

5) UC 症例における、ZAH 投与前後の内視鏡的重症度の変化

ZAH 投与前後における内視鏡的重症度の変化に関して、ZAH 投与前 4 週以内、かつ投与後 60 週以内の両者で下部消化管内視鏡検査が施行された症例は 12 例であった。ZAH 投与開始後、初回内視鏡施行までの期間中央値は 28 週（1-57）であった。UCEIS の中央値は 5（3-7）から 3（0-5）へ有意に改善した（P=0.004）。UCEIS サブスコアに関しても、全ての項目が有意に改善した（図 15、表 19）。

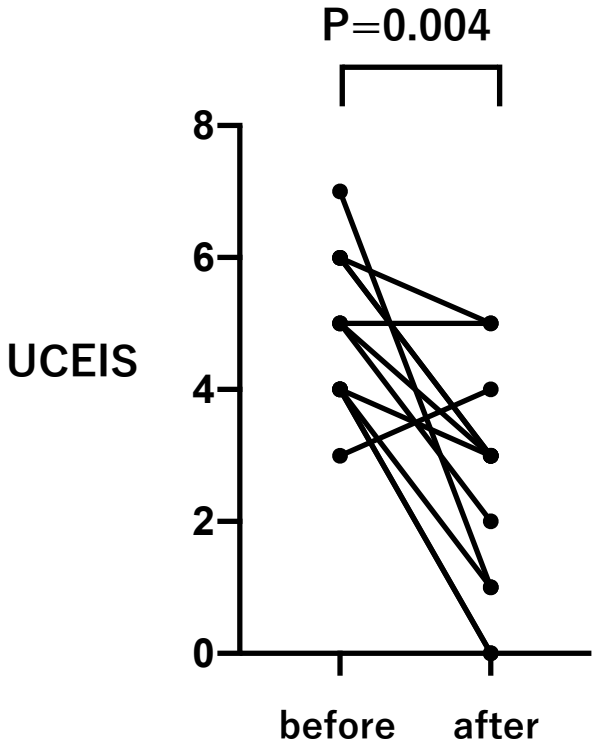

図 15. UC 症例における ZAH 投与前後の UCEIS の変化。

表 19. UC 症例における ZAH 投与前後の UCEIS サブスコアの変化。

	UCEIS subscore		
	before	after	P
Vascular pattern	2 (2-2)	1 (0-2)	0.016
Bleeding	1 (1-2)	0 (0-1)	0.008
Erosions and ulcers	1.5 (0-3)	1 (0-2)	0.031

Values are presented as median (range).

UCEIS, ulcerative colitis endoscopic index of severity.

6) UC 症例における、ZAH 投与前、4 週後、20 週後における血清亜鉛濃度と PMS、CRP、血清アルブミン値の相関

血清亜鉛濃度と、PMS、CRP、血清アルブミン値の相関に関して解析を行った。ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と PMS（r=-0.349、P=0.032）または CRP（r=-0.328、P=0.045）には軽度の負の相関を認め、ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と血清アルブミン値には中等度の正の相関（r=0.512、P=0.001）を認めた（図 16A)。一方で ZAH 投与 4 週後の血清亜鉛濃度の変化と PMS や CRP、血清アルブミン値の変化には有意な相関は認められなかった（図 16B)。同様に ZAH 投与 20 週後でも血清亜鉛濃度の変化と、PMS または CRP、血清アルブミン値の変化には有意な相関は認められなかった（図 16C)。

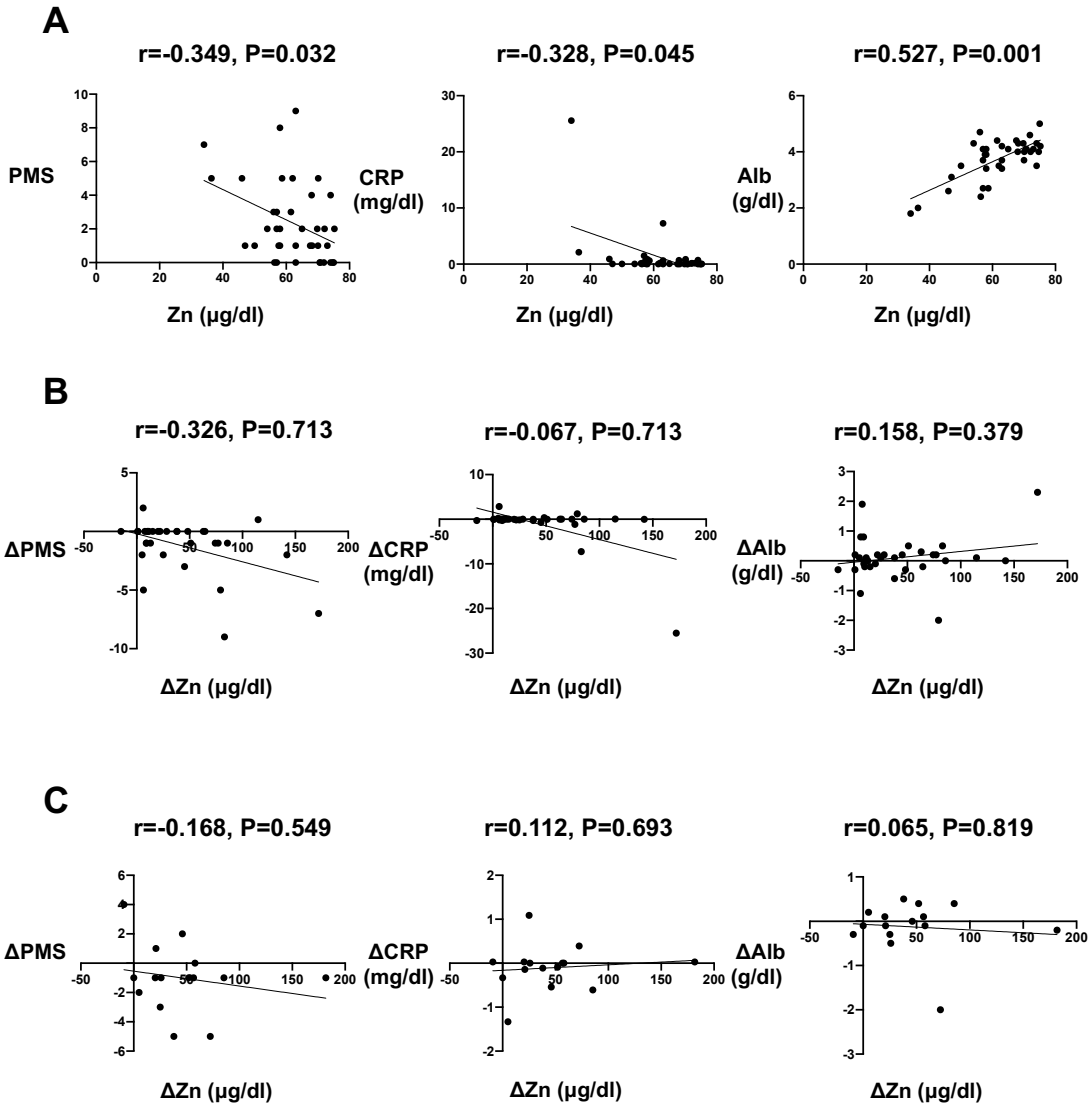

図 16. UC 患者における血清亜鉛濃度と PMS、CRP、血清アルブミン値の相関。（A）ZAH 投与開始前の血清亜鉛濃度と PMS、CRP、血清アルブミン値の相関、（B）ZAH 投与 4 週後の血清亜鉛濃度の変化と PMS、CRP、血清アルブミン値の変化における相関、（C）ZAH 投与 20 週後の血清亜鉛濃度の変化と PMS、CRP、血清アルブミン値の変化における相関。

7）UC 症例における、ZAH 投与に伴う血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子

ZAH 投与後において血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子に関して解析を行った。ZAH 投与 4 週後における血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子として、単変量解析では ZAH の投与量が 1 日 75mg 以上が抽出された。ロジスティック回帰分析では有意な予測因子は抽出されなかった。(表 20)。

ZAH 投与 20 週後における血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子に関して、単変量解析では ZAH の 1 日投与量が 75mg 未満、免疫調節薬の未使用が抽出された。ロジスティック回帰分析は症例数が少なく行わなかった（表 21)。

表 20. UC 症例における ZAH 投与 4 週後において、血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子。

	Univariate Analyses			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age ≧57 years at inclusion	3.93	0.46-48.68	0.208			
Sex-male	0.92	0.20-4.25	0.909			
Serum zinc levels ≧62 μg/dl at baseline	3.43	0.77-13.06	0.110	3.41	0.74-17.37	0.115
Dose of ZAH ≧75 mg/day	5.33	1.16-22.14	0.035	1.13	0.18-6.10	0.893
PMS ≧3 at baseline	0.39	0.07-2.03	0.284			
CRP ≧1.48 mg/dl at baseline	0.53	0.04-4.33	0.586			
Disease duration ≧21 years	0.74	0.05-5.63	0.806			
Presence of pancolitis	0.53	0.04-4.33	0.586			
Concomitant medication						
5ASA, SASP	1.54	0.33-7.38	0.611			
Corticosteroid	0.82	0.15-3.69	0.817			
Immunomodulator	1.09	0.24-5.07	0.909			
Anti-TNFα	0.82	0.15-3.69	0.817			
Anti-integrin	0.41	0.02-8.58	0.532			
Anti-IL12/23	0.41	0.02-8.58	0.532			
JAK inhibitor	0.41	0.02-8.58	0.532			
Change of treatment	0.42	0.10-1.76	0.279			

UC, ulcerative colitis; ZAH, zinc acetate hydrate; PMS, partial Mayo score; CRP, C-reactive protein; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; JAK, janus kinase.

表 21. UC 症例における ZAH 投与 20 週後において、血清亜鉛濃度の正常化に寄与した因子。

	Univariate Analyses		
	OR	95% CI	P
Age ≧39 years at inclusion	0.89	0.05-8.71	0.930
Sex-male	0.53	0.03-4.69	0.623
Serum zinc levels ≧67 μg/dl at baseline	0.38	0.05-3.47	0.409
Dose of ZAH ≧75 mg/day	0.07	0.01-0.88	0.039
PMS ≧5 at baseline	0.89	0.05-8.71	0.929
CRP ≧0.66 mg/dl at baseline	1.50	0.08-16.46	0.770
Disease duration ≧5 years	2.50	0.27-38.15	0.475
Presence of pancolitis	1.50	0.08-16.46	0.770
Concomitant medication			
5ASA, SASP	3.33	0.13-68.54	0.423
Corticosteroid	1.13	0.11-19.01	0.930
Immunomodulator	0.05	0.22-0.90	0.029
Anti-TNFα	0.22	0.25-2.33	0.218
Anti-integrin	0.30	0.01-7.48	0.423
Anti-IL12/23	1.40	0.283-1.95	0.533
JAK inhibitor	0.30	0.01-7.48	0.423
Change of treatment	1.71	0.19-27.22	0.680

UC, ulcerative colitis; ZAH, zinc acetate hydrate; PMS, partial Mayo score; CRP, C-reactive protein; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; JAK, janus kinase.

8) UC 症例における、ZAH 投与に伴う疾患活動性の改善に寄与した因子。

ZAH 投与後において疾患活動性の改善に寄与した因子に関して解析を行った。ZAH 投与 4 週後における疾患活動性の改善に寄与した因子として、単変量解析では ZAH 投与前の血清亜鉛濃度が 65μg/dl 未満、ZAH の 1 日投与量が 50mg 以上、ZAH 投与前の PMS が 3 以上、ZAH 投与前の CRP が 0.18mg/dl 以上、が抽出された。ロジスティック回帰分析では ZAH 投与前の血清亜鉛濃度が 65μg/dl 未満、が疾患活動性の改善に寄与する独立した予測因子として抽出された（表 22)。

ZAH 投与 20 週後では有意な疾患活動性の改善が認められず予測因子に関しては解析を行わなかった。

表 22. UC 症例における ZAH 投与 4 週後において、疾患活動性の改善に寄与した因子。

	Univariate Analyses			Multivariate analysis		
	OR	95% CI	P	OR	95% CI	P
Age ≧53 years at inclusion	0.313	0.08-1.35	0.138			
Sex-male	4.00	0.88-16.45	0.056			
Serum zinc levels ≧65 μg/dl at baseline	0.09	0.02-0.54	0.003	0.12	0.02-0.59	0.001
Dose of ZAH ≧50 mg/day	8.91	1.09-106.30	0.032			
PMS ≧3 at baseline	2.29	1.01-5.92	0.047	4.14	0.72-29.06	0.112
CRP ≧0.18 mg/dl at baseline	7.50	1.33-30.62	0.010			
Disease duration ≧3 years	0.25	0.07-1.27	0.064			
Presence of pancolitis	2.80	0.37-38.62	0.381			
Concomitant medication						
5ASA, SASP	0.79	0.19-3.22	0.767			
Corticosteroid	1.75	0.35-6.77	0.476			
Immunomodulator	3.14	0.70-14.43	0.112			
Anti-TNFα	0.50	0.12-2.35	0.392			
Anti-integrin	1.21	0.06-24.3	0.894			
Anti-IL12/23	1.21	0.06-24.3	0.894			
JAK inhibitor	1.21	0.06-24.3	0.894			
Change of treatment	4.38	0.97-18.07	0.062			

UC, ulcerative colitis; ZAH, zinc acetate hydrate; PMS, partial Mayo score; CRP, C-reactive protein; 5-ASA, 5-aminosalicylic acid; SASP, salazosulfapyridine; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; JAK, janus kinase.

9) UC 症例における、ZAH 投与に伴う病理学的変化

UC 患者では、亜鉛補充療法施行前後に同部位より腸管粘膜検体を採取し得た症例は 6 例であった。対象となった患者の背景としては、ZAH 投与前の組織採取から投与開始までの期間中央値は 12 週間（1-30)、ZAH 投与開始から投与後の組織採取までの期間中央値は 36 週（5-51）であった。採取された組織は回腸が 0 例、結腸が 1 例、直腸が 5 例で、疾患活動性に関して ZAH 投与前の PMS 中央値が 1.5（0-4)、ZAH 投与後の PMS 中央値は 0.5（0-4）であった。内視鏡的重症度に関しては ZAH 投与前の UCEIS 中央値は 3（0-5)、ZAH 投与後の UCEIS 中央値は 1.5（0-4）であった（表 23)。

表 23. UC 症例における病理組織学的検討の対象となった患者の背景（N=6)。

Age (years)	37.5 (18-58)
Male/Female (n(%))	4 (66.7%) / 2 (33.3%)
Time from tissue collection to ZAH administration (weeks)	12 (1-30)
Time from ZAH administration to tissue collection (weeks)	37 (5-51)
Site of tissue collection Ileum/Colon/Rectum	0 (0%) / 1 (16.7%) / 5 (83.3%)
Dose of ZAH (mg/day)	50 (25-50)
Activity index before ZAH administration (PMS)	1.5 (0-4)
Activity index after ZAH administration (PMS)	0.5 (0-4)
Endoscopic activity index before ZAH administration (UCEIS)	3 (0-5)
Endoscopic activity index after ZAH administration (UCEIS)	1.5 (0-4)

Values are presented as median (range) or number (%).

UC, ulcerative colitis; ZAH, zinc acetate hydrate; PMS, partial Mayo score; UCEIS, ulcerative colitis endoscopic index of severity.

ZAH 投与前後における Occludin、ZO-1、Claudin1、E-cadherin、CD80（M1 マクロファージ)、CD163（M2 マクロファージ)、IL-17 の染色率の変化、および代表的な病理組織像を示す（図 17)。Tight Junction を構成するタンパクに関して、Occludin、ZO-1、Claudin1、E-cadherin のいずれにおいても、ZAH 投与後に 6 例中 5 例で染色率が上昇し、特に Occludin（P=0.063）や Claudin1（P=0.063）では有意傾向にある差を認めた。マクロファージの浸潤に関して、CD80 の染色率が 6 例中 3 例で低下、CD163 の染色率は 6 例中 2 例のみ上昇、IL-17 の染色率に関しては 6 例中 5 例で低下しており、IL-17（P=0.063）では有意傾向にある差を認めた（図 17)。

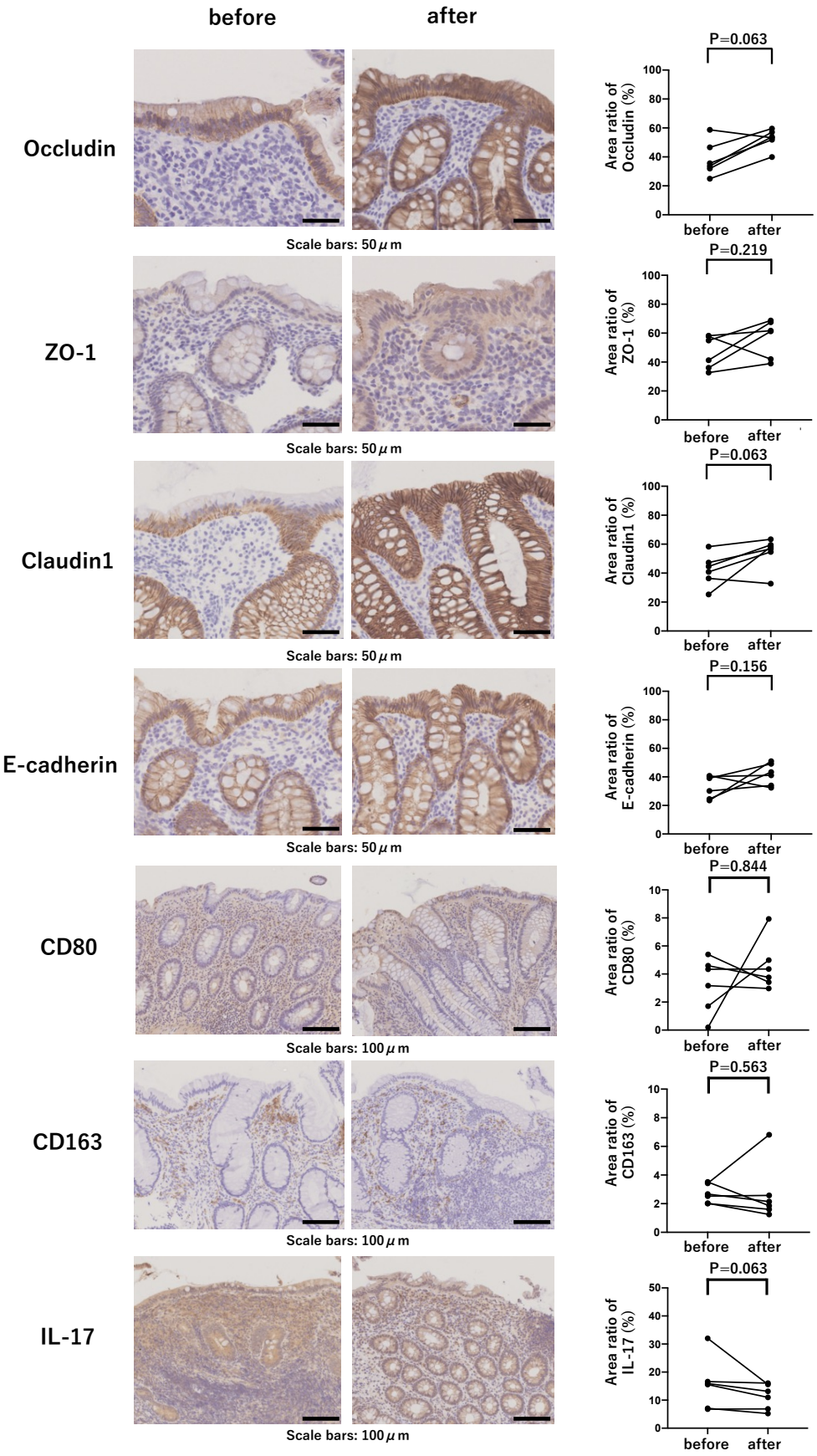
before
after
Occludin
Scale bars: 50 μm
P=0.063
Area ratio of Occludin (%)
ZO-1
Scale bars: 50 μm
P=0.219
Area ratio of ZO-1 (%)
Claudin1
Scale bars: 50 μm
P=0.063
Area ratio of Claudin1 (%)
E-cadherin
Scale bars: 50 μm
P=0.156
Area ratio of E-cadherin (%)
CD80
Scale bars: 100 μm
P=0.844
Area ratio of CD80 (%)
CD163
Scale bars: 100 μm
P=0.563
Area ratio of CD163 (%)
IL-17
Scale bars: 100 μm
P=0.063
Area ratio of IL-17 (%)

図 17. UC 症例における、ZAH 投与前後の Occludin、ZO-1、Claudin1、E-cadherin、CD80（M1 マクロファージ)、CD163（M2 マクロファージ)、IL-17 の染色率の変化、と代表的な病理組織像。

4. 有害事象

ZAH 内服開始後 120 症例中 7 例に腹部不快感、2 例に嘔吐、1 例に悪心を認めたが、服用中止により症状は速やかに消失した。また、元々ZAH は、銅のキレート薬としての側面もあり投与中は血清銅濃度のフォローアップが推奨されている。本研究にて血清銅濃度が測定された症例においては、ZAH 投与 4 週後では 61 症例中 3 例に低銅血症を認め、ZAH 投与 20 週後では 35 症例中 1 例に低銅血症を認めた。

考　察

IBD 患者における各種微量元素欠乏症は以前より指摘されており、疾患活動性の高さや、多数回の手術歴がある症例においてより頻度が高くなる傾向にある（Hwang C et al,. 2012)。また低亜鉛血症に関しては CD、UC 共に 40%近い有病率を認めており、コントロール群と比較し CD 患者では有意に低亜鉛血症が高頻度に見られる（血清亜鉛濃度中央値、CD 群：74.3±9.7μg/dl、コントロール群：62.3±9.3μg/dl、P＜0.001）(Solomons NW et al., 1977; Siva S et al., 2017)。また UC 発症前の亜鉛摂取量の低さが UC 発症と関連している（Kobayashi Y et al., 2019)。IBD 患者における低亜鉛血症の存在が IBD 関連手術、IBD 関連入院、および IBD 関連合併症のリスクを高めることも報告されている（Siva S et al., 2017)。

以上のように IBD 患者において高頻度に低亜鉛血症が認められることと、それによる不利益が報告されている。

一方で亜鉛補充の有効性に関しては、IBD モデルマウスに対する亜鉛の投与により炎症が改善したとの報告も見られる。一般的に腸管長は炎症が強くなると短くなる性質があるが、コントロール群と比較し DSS 腸炎群では有意に腸管が短縮していたが、DSS 腸炎に対する亜鉛投与群では用量依存性に腸管短縮が改善し、また病理スコアに関しても同様に、DSS 腸炎群と比較し亜鉛投与群では用量依存性に改善を認めたと報告されている（Li J at al., 2017)。

一方低亜鉛血症を伴う IBD 患者に対し亜鉛製剤を投与することの有用性を検討した研究はこれまでに報告されていないのが現状であるため、今回の研究を行なった。その結果、亜鉛製剤内服により多くの症例で低亜鉛血症が改善し、IBD 患者における疾患活動性が改善したという結論が得られた。

登録された患者背景としては、CD 群では小腸病変を含む症例が 91.5%と多くの症例に小腸病変を認めた。亜鉛の主な吸収部位は十二指腸および空腸であり、小腸における炎症が亜鉛の吸収障害をきたしていた可能性が考えられる（Krebs NF., 2000)。また CD 患者では 67.1%が亜鉛を含む経腸栄養療法を施行されていたにも関わらず低亜鉛血症を呈していた。IBD 患者における亜鉛補充療法として、エレンタール®（亜鉛含有量 1.8mg/300kcal/1p）やラコール®（亜鉛含有量 1.28mg/200kcal/1p）など既存の経腸栄養剤では不十分であった可能性が考えられる。ZAH 投与前の CDAI 中央値は 118 と疾患活動性が軽度の患者が主ではあったが、77.6%の患者で生物学的製剤が使用されていた。UC 患者では生物学的製剤が使用されている患者は 27.2%であったが、ステロイド製剤は

23.7%に併用され、ステロイド製剤の漸減中止が出来ないステロイド依存症例が少なからず認められた。IBD 領域においてステロイド抵抗性/依存性の患者や、初発時に重症であった患者に生物学的製剤が導入される事が多く、かつ残された治療選択肢が限られていることが多い。そのような難治性の患者に対し、亜鉛補充療法が有効であった今回の結果は、IBD 領域に新たな治療選択肢を提供する貴重な結果となった。

本研究は後ろ向き研究であり外来患者が主な対象となったため ZAH 投与開始後に一定のタイミングで患者を診察することが難しかった。故に本研究では血清亜鉛濃度や疾患活動性の評価に於いては、ZAH 投与後 4〜8 週、20〜24 週という期間の幅を設定し、その観察期間内における、より 4 週後または 20 週後に近いタイミングにおける採血データと疾患活動性を採用した。

その結果 ZAH 投与前と比較し ZAH 投与後の血清亜鉛濃度と疾患活動性は、CD 群において ZAH 投与後 4 週、20 週共に有意に改善し、UC 群でも ZAH 投与 4 週後において有意な改善が見られた。しかし、他治療による疾患活動性の改善が、血清亜鉛濃度の改善に影響した可能性も否定できない。そこで、観察期間内に ZAH が開始されたこと以外に治療変更がなされなかった群においても同様の検討をした。実臨床において複数の薬剤を同時に開始した場合、有害事象が発生した際に原因薬剤の特定が難しくなるため、緊急性が無い限り複数の薬剤を同時に開始することは避けられる事が多く、ZAH 以外の治療変更がなされた症例は比較的少数例であった。ZAH 投与開始 4 週間前から投与開始 4 週または 20 週後までに、ZAH 以外の治療変更が施行されなかった CD 患者の割合はそれぞれ 80.3%（49/61）、76.4%（42/55）、UC 患者の割合はそれぞれ 72.7%（24/33）、66.7%（10/15）であり、CD 群においては ZAH 投与 4 週後、20 週後に有意に血清亜鉛濃度と疾患活動性の改善を認めた。そのことは、亜鉛補充療法に伴う血清亜鉛濃度の正常化により、CD の疾患活動性が改善した可能性を示唆していると考えられる。また、CD 群における CDAI サブスコアの変化を解析すると、ZAH 投与後 4 週、20 週共に、過去 1 週間の水様便/泥状便の回数、過去 1 週間の一般状態、腸管外症状、が有意に改善していた。UC 群における PMS サブスコアに関しても投与後 4 週において、排便回数と一般状態の項目が有意に改善していた。元々、低亜鉛血症により慢性的な下痢症状が引き起こされることや、亜鉛補充により腸管粘膜の透過性が改善されることが報告されている（Hwang C et al., 2012; Sturniolo GC et al., 2001）ことから、本検討においても亜鉛補充療法により便回数減少効果が認められた可能性が考えられる。また一般状態の改善に関しては、低亜鉛血症とサルコペニアの関連性が報告されている（Nishikawa H et al., 2019）事から、亜鉛補充に伴う筋肉量や倦怠感の改善が得られた可能性が推察されるが、さらなる検討が必要である。

腸管外症状に関しては、改善した詳細な症状は特定できなかったが亜鉛はマクロファージを通してT細胞系に影響を与え、免疫機能の調節に関与することが報告されている（Higashimura Y et al., 2020）ことから、粘膜上皮の改善だけでなくIBDに伴う全身の炎症症状に有効である可能性が考えられる。

内視鏡所見に関しては亜鉛補充療法施行前後に、亜鉛補充療法の評価目的に内視鏡検査を行うことは現状ではほとんど無いため症例数が限られた。故に内視鏡所見に於いてはZAH投与前4週以内かつZAH投与後60週以内に施行された症例を対象とし、ZAH投与後の内視鏡施行までの期間は症例毎に大きく異なる結果となった。限定的な検討ではあるが、ZAH投与前後においてCD群、UC群ともに内視鏡的重症度の改善が得られたことはIBD患者に対する亜鉛補充療法を支持する貴重な結果となった。

IBD患者におけるZAH投与前の血清亜鉛濃度と疾患活動性、CRP、血清アルブミン値に関して解析を行ったところ、ZAH投与前における血清亜鉛濃度と疾患活動性、CRP、血清アルブミン値に関しては軽度～中等度の相関が認められた。渉猟しえた限りではこのような報告は見られず、貴重な新知見となった。一方で、ZAH投与に伴う血清亜鉛濃度の変化と、疾患活動性やCRP、血清アルブミン値の変化に関しては、ZAH投与4週後、20週後のいずれも有意な相関を認めなかった。ZAH投与後の血清亜鉛濃度は正常上限である130μg/dl以上となる症例も多く、一定の値以上に血清亜鉛濃度を上昇させても疾患活動性の改善は得られない可能性も考えられる。

ZAH投与に伴う血清亜鉛濃度の正常化や疾患活動性の改善に寄与する因子に関する解析では、ZAH投与前の血清亜鉛濃度や疾患活動性、ZAHの投与量などが寄与している可能性が窺われたが一定の傾向を確認することはできなかった。症例数が少なく、ロジスティック回帰分析における説明変数として選択可能な項目も限られ、今後は症例数を増やして再度検討していく必要がある。

IBD患者に対する亜鉛補充療法の病態改善機序としては緒言でも述べた通り、亜鉛補充によるTight junctionの構造修復による機能の改善と、M1型マクロファージの不活化およびそれに伴うナイーブT細胞のヘルパーT17細胞への分化の抑制、の2経路を想定している（図18）。

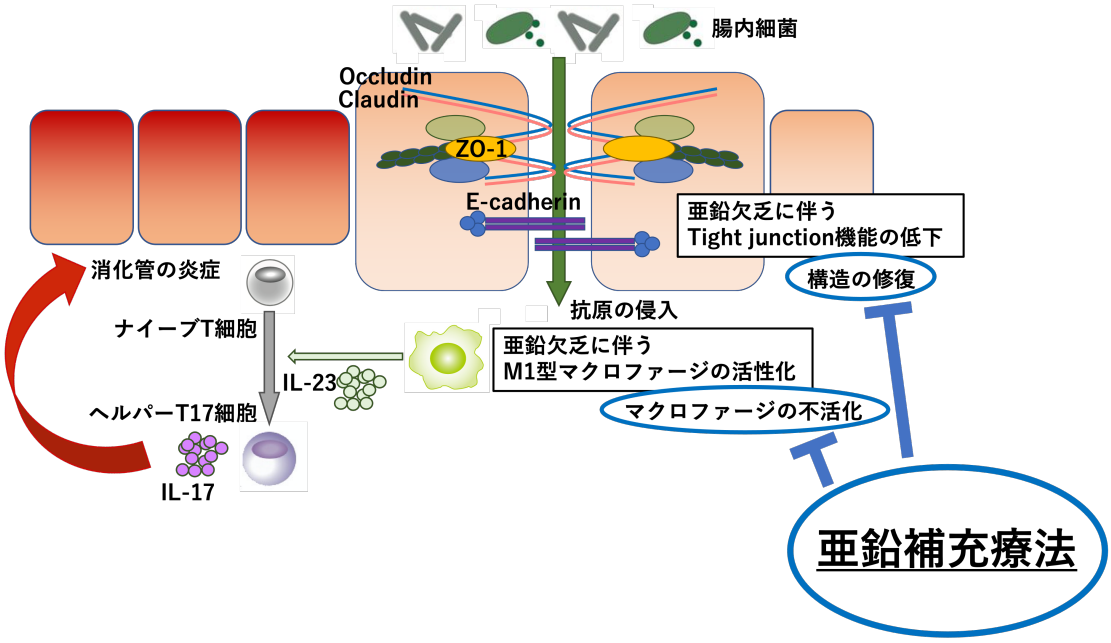

図 18. IBD 患者における亜鉛補充療法による病態改善機序（仮説）。

本研究において、内視鏡下組織生検にて採取した腸管粘膜上皮を既報で示されている Tight junction を構成するタンパク質である ZO-1、Occludin に対する抗体を用いて免疫染色し、ZO-1 と結合しながら密着結合の基本骨格を作る Claudin1 や E-cadherin の染色も行うことで、各タンパク質の発現を評価した。さらに抗 CD80 抗体(M1 マクロファージ)、抗 CD163 抗体(M2 マクロファージ)、抗 IL-17 抗体(Th17)を用いた免疫染色を行い、亜鉛補充療法前後で比較検討することで亜鉛補充による免疫細胞への影響を評価した。その結果、有意差は認めないものの ZAH 投与後において、特に Tight junction を構成するタンパク質の染色率が上昇する結果となった。症例数が少なく、ZAH 投与から組織採取までの期間も統一されていない事から限定的な検討ではあるが、ヒトにおいても亜鉛補充による Tight junction 機能の改善が期待できる結果となった。

また、もともと ZAH はウィルソン病に対する治療薬として使われ、銅キレート作用があるため低銅血症を呈する可能性がある（Hoogenraad T.U., 1979; Illing AC., 2012)。本研究では経過中に血清銅濃度が測定された症例は投与 4 週後で 61 症例、20 週後で 35 例であったが、そのうち低銅血症を認めた症例は 4 週後に 3 例、20 週後に 1 例のみであり、比較的安全に ZAH を使用することができた。ZAH 内服中は血清亜鉛濃度だけでなく血清銅濃度の測定も必須と考えられる。

この研究にはいくつかの limitation がある。(1) CD 群、UC 群ともに症例数が限られている (2) 内視鏡的重症度の評価に於いて、ZAH 投与開始から内視鏡施行までの期間が統一されていない (3) 病理組織学的検討においても同様に、ZAH 投与開始前の組織採取から投与開始までの期間と、ZAH 投与開始から組織採取までの期間が統一されていない (4) 血清亜鉛濃度は日内変動し、また食事や freeT4 などのホルモンにも影響を受ける (Kanabrocki EL et al., 2008; McMillan EM., 1982.) ことが知られているが、患者背景や検体の採取状況を統一出来ていない、以上が limitation として挙げられる。

従って今後は患者背景や採血時間、評価時期の統一をした上で亜鉛補充に関する前向き試験を行い、疾患活動性や内視鏡的重症度を評価する事が求められる。

しかしながら本研究は、低亜鉛血症を伴う IBD 患者に対する亜鉛製剤の投与が、血清亜鉛濃度の正常化と、疾患活動性の改善に寄与する可能性を示したことにより、低亜鉛血症を呈する IBD 患者に対する積極的な亜鉛補充療法を支持する貴重な結果となった。

総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

・CD 患者において、ZAH 投与開始 4 週後、20 週後のいずれにおいても、有意な血清亜鉛濃度の上昇と、CDAI の低下が認められた。

・CD 患者において、CDAI の変化に関するサブスコア毎の解析では、ZAH 投与 4 週後、20 週後にいずれにおいても水様便の回数、一般状態、腸管外症状がそれぞれ有意に改善した。

・CD 患者における内視鏡的重症度に関して、ZAH 投与後において、SES-CD の有意な低下が認められた。

・UC 患者において、ZAH 投与開始 4 週後、20 週後において有意な血清亜鉛濃度の上昇を認め、ZAH 投与開始 4 週後において有意な PMS の低下が認められた。

・UC 患者において、PMS の変化に関するサブスコア毎の解析では、ZAH 投与 4 週後において排便回数、全身状態がそれぞれ有意に改善した。

・UC 患者における内視鏡的重症度に関して、ZAH 投与後において、UCEIS の有意な低下が認められた。

・CD 患者、UC 患者共に、ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と CDAI または CRP には軽度の負の相関を認め、ZAH 投与前の血清亜鉛濃度と血清アルブミン値には中等度の正の相関を認めた。

上記は全て、本研究により新たに発見された知見である。
IBD 領域において、CD や UC はいずれも若年より発症し、QOL を大きく低下させ、現段階では根治不可能な慢性炎症性疾患であり、治療選択肢も非常に限られている。本研究から新たに得られた知見により、亜鉛補充療法が IBD 患者における新たな治療選択肢となりうる可能性が示唆された。
一方で、血清亜鉛濃度の正常化と疾患活動性の改善に寄与する因子の解析や、亜鉛補充療法に伴う病理学的変化における検討を行ったが、後ろ向き研究であることや、症例数が限られていることもあり、一定の傾向は見られたもの

の、確信的な結果は得られなかった。

今後は、患者背景や採血時間を統一した上で亜鉛補充に関する多施設前向き試験を行い、疾患活動性や内視鏡的重症度、変化に寄与した因子を評価する事が求められる。今後は前向き観察研究を計画し亜鉛補充療法の臨床的有効性を検証しつつ、腸管粘膜の病理学的な検討を行い、疾患活動性を改善する機序を明らかにする方針である。

謝　　辞

本研究を遂行するにあたり、共同研究施設として参加を頂きました、札幌東徳洲会病院IBDセンター 前本篤男先生、古川滋先生、伊藤貴博先生、西村東人先生、八木澤啓司先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

同教室：桂田武彦助教には、臨床研究における心構え、信念、データ解析、論文作成そして学会での発表方法など、あらゆる面において御指導・御支援を頂きました、厚く御礼申し上げます。

同教室：大西礼造先生、長島一哲先生、山梨香菜先生、小田切信介先生、福島新弥先生、青山慶哉先生には、臨床における技術指導や、論文作成、学会発表などの指導にご尽力頂きました、深謝いたします。

最後に、本研究において診療情報を提供して頂いた患者様に深く感謝いたします。

2023 年　3 月
桜井　健介

利　益　相　反

開示すべき利益相反状態はない。

引 用 文 献

Best, W.R., Becktel, J.M., Singleton, J.W. (1979). Rederived values of the eight coefficients of the Crohn's Disease Activity Index (CDAI). Gastroenterology. 77, 843-846.

Baumgart, DC., Sandborn, W.J. (2012). Crohn's disease. Lancet. 380, 1590-1605.

Daperno, M., D'Haens, G., Assche, G.V., Baert, F., Bulois, P., Maunoury, V., Sostegni, R., Rocca, R., Pera, A., Gevers, A., et al. (2004). Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. Gastroint. Endosc. 60, 505-512.

Fleming, C.R., Huizenga, K.A., McCall, J.T., Gildea, J., Dennis, R. (1981). Zinc nutrition in Crohn's disease. Dig. Dis. Sci. 26, 865-870.

Finamore, A., Massimi, M., Devirgiliis, L.C., Mengheri, E. (2008). Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells. J. Nutr. 138, 1664-1670.

Sturniolo, G.C., Leo, V.D., Ferronato, A., D'Odorico, A., D'Inca, R. (2001). Zinc Supplementation Tightens "Leaky Gut" in Crohn's Disease. Inflamm Bowel Dis. 7(2), 94-98.

Hoogenraad T.U., Koevoet, R. (1979). Oral zinc sulphate as long-term treatment in Wilson's diseas. Eur. Neurol. 18, 205-211.

Harries, A.D., Heatley, R.V. (1983). Nutritional disturbances in Crohn's disease. Postgrad. Med. J. 59, 690-697.

Hwang, C., Ross, V., Mahadevan, U. (2012). Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease: from A to zinc. Inflamm. Bowel Dis. 18, 1961-1981.

Higashimura, Y., Takagi, T., Naito, Y., Uchiyama, K., Mizushima, K., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Itoh, Y. (2020). Zinc Deficiency Activates the IL-23/Th17 Axis to Aggravate Experimental Colitis in Mice. J. Crohn's Colitis. 14, 856-866.

Illing, AC., Shawki, A., Cunningham, C.L., Mackenzie, B. (2012). Substrate profile and metal-ion selectivity of human divalent metal-ion transporter-1. J. Biol. Chem. 287, 30485-30496.

Kanabrocki, EL., Sothern, R.B., Ryan, M.D., Kahn, S., Augustine, G., Johnson, C., Foley, S., Gathing, A., Eastman, G., Friedman, N. (2008). Circadian characteristics of serum calcium, magnesium and eight trace elements and of their metallo-moieties in urine of healthy middle-aged men. Clin. Ter. 159, 329-346.

Kobayashi, Y., Ohfuji, S., Kondo, K., Fukushima, W., Sasaki, S., Kamata, N., Yamagami, H., Fujiwara, Y., Suzuki, Y., Hirota, Y., et al. (2019). Association between dietary iron and zinc intake and development of ulcerative colitis: A case-control study in Japan. J Gastroenterol Hepatol. 34, 1703-1710.

Kornbluth, A., Sachar, D.B. (2010). Ulcerative Colitis Practice Guidelines in Adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am. J. Gastroenterol. 105, 501-523.

Li, J., Chen, H., Wang, B., Cai, C., Yang, X., Chai, Z., Feng, W. (2017). ZnO nanoparticles act as supportive therapy in DSS-induced ulcerative colitis in mice by maintaining gut homeostasis and activating Nrf2 signaling. Sci. Rep. 7, 43126.

Lamb, C.A., Kennedy, N.S., Raine, T., Hendy, P.A., Smith, P.J., Limdi, J.K., Hayee, B., Lomer, M.C.E., Parkes, G.C., Selinger, C., et al. (2019). British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. Gut. 68, s1-s106.

Mekhjian, H.S., Switz, D.M., Melnyk, C.S., Rankin, G.B., Brooks, R.K. (1979). Clinical features and natural history of Crohn's disease. Gastroenterology. 77, 898-906.

McMillan, EM., Rowe, DJF. (1982). Clinical significance of diurnal variation in the estimation of plasma zinc. Clin. Exp. Dermatol. 7, 629-631.

Matsuoka, K., Kobayashi, T., Ueno, F., Matsui, T., Hirai, F., Inoue, N., Kato, J., Kobayashi, K., Kobayashi, K., Koganei, K., et al. (2018). Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease. J. Gastroenterol. 53, 305-353.

Naber, TH., Van den Hamer CJ., Baadenhuysen, H., Jansen, JB. (1998). The value of methods to determine zinc deficiency in patients with Crohn's disease. Scand J Gastroenetrol. 33, 514-522.

Krebs, NF. (2000). Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. J Nutr. 130, 1374S-1377S.

Nishikawa, H., Enomoto, H., Yoh, K., Iwata, Y., Sakai, Y., Kishino, K., Ikeda, N., Takashima, T., Aizawa, N., Takata, R., et al. (2019). Serum Zinc Concentration and Sarcopenia: A Close Linkage in Chronic Liver Diseases. J Clin Med. 8(3), 336.

Solomons, N.W., Rosenberg, I.H., Sandstead, H.H., Vo-Khactu, K.P. (1977). Zinc deficiency in Crohn's disease. Digestion. 16, 87-95.

Sturniolo, GC., Molokhia, M.M., Shields, R., Turnberg, L.A. (1980). Zinc absorption in Crohn's disease. Gut. 21, 387-391.

Schroeder, K.W., Tremaine, W.J., Ilstrup, D.M. (1987). Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized Study. N. Engl. J. Med. 317, 1625-1629.

Siva, S., Rubin, D.T., Gulotta, G., Wroblewski, K., Pekow, J.l.

(2017). Zinc deficiency is associated with poor clinical outcomes in patients with inflammatory bowel disease. Inflamm. Bowel Dis. 23, 152-157.

Tomita, H. (2008). A proposal of the clinical standard value for diagnose of zinc deficiency by serum zinc value. Biomed. Res. Trace Elem. 19, 22-24.

Travis, S.P.L., Schnell, D., Krzeski, P., Abreu, M.T., Altman, D.G., Colombel, J.F., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lichtenstein, G.R., Marteau, P.R. (2013). Reliability and initial validation of the ulcerative colitis endoscopic index of severity. Gastroenterology. 145, 987-995.

Walsh. CT., Sandstead, H.H., Prasad, A.S., Newberne, P.M., Fraker, P.J. (1994). Zinc: Health effects and research priorities for the 1990s. Environ. Health Perspect. 102, 5-46.

Xia, B., Crusius, J.B.A., Meuwissen, S.G.M., and Peña, A.S. (1998). Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. World J. Gastroenterol. 15, 446-458.