

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本栄養・食糧学会誌 (2014) Vol. 67 No. 5:p. 245-253 .

タンパク質・エネルギー栄養障害ラットのヘプシジン誘導と鉄代謝に関する研究

坂田 文子, 佐々木 勝則, 内田 貴之, 知久 一雄, 高後 裕

タンパク質・エネルギー栄養障害ラットの ヘプシジン誘導と鉄代謝に関する研究

坂田 文子^{*1}, 佐々木 勝則², 内田 貴之¹,
知久 一雄¹, 高後 裕³

(2014年4月3日受付; 2014年5月28日受理)

要旨: タンパク質・エネルギー栄養障害時にはしばしば貧血が認められ、主な原因は鉄欠乏と考えられている。近年、鉄代謝の解明が進み、ヘプシジン-25が鉄代謝の中心的役割を果たすことが明らかになった。これまでに、ヘプシジン-25と栄養状態の関係についての報告はない。そこで、タンパク質・エネルギー栄養障害時にみられる貧血とヘプシジン-25との関連について、成長期の無タンパク質食摂取ラットを用いて検討した。さらに、無タンパク質食への鉄配合の有無が鉄代謝に及ぼす影響についても検討した。その結果、成長期のタンパク質・エネルギー栄養障害時にみられる貧血の原因は絶対的鉄欠乏ではなく、ヘプシジン-25産生亢進による鉄代謝阻害、すなわち鉄の利用障害である機能性鉄欠乏と考えられた。タンパク質・エネルギー栄養障害時には蓄積鉄は増加し、鉄補給なしでも鉄欠乏にはならず、安易な鉄補給は鉄過剰を招く危険性がある。病態の改善には、栄養状態の回復が最善の解決策である。

キーワード: タンパク質・エネルギー栄養障害, 貧血, ヘプシジン-25, 機能性鉄欠乏

タンパク質・エネルギー栄養障害はタンパク質およびエネルギーの欠乏により起こる病的な症状で、一般的にマラスムス、クワシオルコル、この両方の特徴を有するマラスムス型クワシオルコルの3型がある。マラスムスはタンパク質とエネルギー供給が同時に不足することで発症する病態で、不足したタンパク質やエネルギーを補うために、体タンパク質や体脂肪が分解し、著しい体重減少が認められるが、内因性のアミノ酸が供給されるので血清アルブミンは正常値を示し浮腫は出現しにくい。一方、クワシオルコルは、エネルギー供給は比較的充足しているが、タンパク質が量的、質的に不足することで発症する。エネルギー不足が深刻ではないため、体タンパク質の分解が少なく内因性のアミノ酸供給が減少することから、血清アルブミンは低下し浮腫が認められる。更に、クワシオルコルのなかで、血清アルブミンが低下しさらに体重減少の著しいものはマラスムス型クワシオルコルに分類される¹⁾。

タンパク質・エネルギー栄養障害では、しばしば貧血が観察されるが、この原因としては造血に関係する鉄、葉酸、ビタミンA、ビタミンCやタンパク質などの各種栄養素の欠乏、エリスロポエチンの低下など多くの因子が挙げられている²⁻⁵⁾。これまでに、タンパク質欠乏

によるタンパク質低栄養ラットでは十二指腸での鉄吸収が著しく減少し、血清鉄が低下していることが確認されており⁶⁻⁸⁾、この貧血の主な原因は鉄欠乏であると考えられている⁹⁾¹⁰⁾。しかしながら、貧血を発症したクワシオルコルの幼児で肝臓に非ヘム鉄が増加している症例も多数確認されている¹¹⁾。また、タンパク質欠乏マウスの骨髄や肝臓、脾臓にはフェリチンが高濃度に存在し、トランスフェリン飽和度も上昇していることが確認され、タンパク質・エネルギー栄養障害で認められる貧血は鉄欠乏のみが原因ではないとの報告がある¹²⁾。さらに、タンパク質・エネルギー栄養障害ラットの脾臓や肝臓などの組織中鉄濃度は増加していることが明らかになり、本障害に伴う貧血では、鉄代謝の変化が原因である可能性が考えられる¹³⁾。さらに、肥満ラットへの50%制限食投与は肝臓への鉄沈着を招き、これは鉄利用能の低下が原因と報告されている¹⁴⁾。

鉄は、積極的な排泄経路を持たず、ヒトでは消化管上皮細胞の脱落などで1日あたり1mgが排泄され、これに見合った量を消化管から吸収しているのみである¹⁵⁾。赤血球合成に必要な1日あたり20-25mgの鉄は、老廃赤血球が網内系マクロファージで処理されヘムから取り出された鉄が再利用されていて、生体内鉄代謝は半閉鎖

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: Fumiko_Sakata@terumo.co.jp)

¹ テルモ株式会社研究開発本部 (259-0151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500)

² 旭川医科大学消化管再生修復医学講座 (078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1-1)

³ 旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 (078-8510 北海道旭川市緑が丘東2条1丁目1-1)

系回路になっている¹⁶⁾。近年、鉄代謝研究において、ヘプシジン-25が鉄代謝の中心的役割を果たすことが明らかとなった。ヘプシジン-25は肝臓で合成分泌され、腸管での鉄吸収と網内系マクロファージからの鉄放出を抑制することで鉄代謝を負に制御するペプチドホルモンである¹⁷⁾。ヘプシジン-25は鉄負荷や炎症、骨髄機能の低下により発現が増加し、低酸素状態や赤血球合成促進により発現が減少する¹⁸⁾。骨髄造血機能が低下した場合、赤芽球への鉄取り込み減少によって上昇した血清鉄が、肝細胞に存在するセンサーであるトランスフェリン受容体2を介してヘプシジン-25を誘導し、血中ヘプシジン-25の上昇を引き起こす¹⁹⁾。血中ヘプシジン-25は、網内系細胞表面に存在するフェロポルチンの細胞外ループに結合、細胞内部に移行しヘプシジン-25とともにフェロポルチン自体もライソゾームで分解される。フェロポルチンが新規に合成されるまでに2-3日を要するため、その間はフェロポルチンの膜分布密度が低下し、細胞からの鉄放出量が減少する。その結果、ヘモグロビン鉄は減少し網内系マクロファージに鉄が蓄積される²⁰⁾。

これまでに、タンパク質・エネルギー栄養障害時にみられる鉄代謝異常について、血清ヘプシジン-25と栄養状態の関係を検討した報告はない。そこで、本研究では、無タンパク質食摂取によってタンパク質・エネルギー栄養障害ラットを作製し、本栄養障害でみられる鉄代謝異常と血清ヘプシジン-25との関連について検討した。さらに、タンパク質・エネルギー栄養障害時の試験食への鉄配合の有無が鉄代謝に及ぼす影響についても検討した。

実験方法

1. 試験食組成

試験食組成を表1に示した。試験食はAIN-93G配合に準じた組成とした。20%タンパク質食(以下、20%Pとする)はカゼインをタンパク質含量20%になるように試験食100gあたり23.7g配合した。さらにL-シスチ

ンをタンパク質あたり1.5%(w/w)添加した。無タンパク質食(以下、0%Pとする)は20%PからカゼインおよびL-シスチンを除き、これらの減量分はコーンスターチ:アルファ化コーンスターチが3:1になるようにそれぞれ配合した。鉄配合食(以下、+Fe食とする)はAIN-93Gミネラル混合を、鉄無配合食(以下、-Fe食とする)はクエン酸鉄を除いたAIN-93Gミネラル混合を用いた。試験食中の鉄含量はICP発光分析法にて測定した。鉄含量は、20%P+Fe食3.72mg/100g、20%P-Fe食0.19mg/100g、0%P+Fe食3.89mg/100g、0%P-Fe食は定量下限(0.1mg/100g)以下であった。

2. 実験動物および飼育条件

実験動物には8週齢Crl:CD(SD)系雄性ラットを日本チャールス・リバー(株)より購入し実験に供した。飼育環境は室温23±2℃、湿度約50%、明暗サイクル12時間(明期8:00-20:00)とした。予備飼育は市販固形飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を自由摂取させ7日間行った。予備飼育期間はプラスチックケージを用いて、1ケージあたり3-4匹で飼育した。本実験はテルモ(株)研究開発センター動物実験規定に基づき、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

3. 実験計画

予備飼育後、体重差がないように、20%P+Fe群(20%タンパク質・鉄配合食)、20%P-Fe群(20%タンパク質・鉄無配合食)、0%P+Fe群(無タンパク質・鉄配合食)、0%P-Fe群(無タンパク質・鉄無配合食)の4群に群分けした。試験食摂取期間は14日間とし、表1に示した各試験食を自由摂取させ、ワイヤーケージを用いて個別で飼育した。

試験食摂取開始当日と8日後および14日後に体重を測定し、体重変化量と変化率を算出した。14日間の試験食摂取期間終了後にイソフルラン麻酔下で下大静脈より1mL採血し、EDTA-2Kを20μL加えたチューブ(スクリーキャップマイクロチューブ, ザルスタット(株))

表1 試験食組成

(g/100g)	20%P + Fe	20%P - Fe	0%P + Fe	0%P - Fe
カゼイン	23.7000	23.7000	—	—
L-シスチン	0.3600	0.3600	—	—
コーンスターチ	36.8886	36.8886	54.9486	54.9486
アルファ化コーンスターチ	12.3000	12.3000	18.3000	18.3000
スクロース	10.0000	10.0000	10.0000	10.0000
大豆油	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
セルロースパウダー	5.0000	5.0000	5.0000	5.0000
AIN-93G ミネラル混合 (鉄配合)	3.5000	—	3.5000	—
AIN-93G ミネラル混合 (鉄無配合)	—	3.5000	—	3.5000
AIN-93 ビタミン混合	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
重酒石酸コリン	0.2500	0.2500	0.2500	0.2500
第三ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014

20%P食はカゼインをタンパク質含量20%になるように配合した。ミネラル混合(鉄無配合)は、ミネラル混合(鉄配合)からクエン酸鉄を除いた。

に移した。その後、腹大動脈より全採血し、真空採血管（ベノジェクトⅡ真空採血管，テルモ（株））に移した。真空採血管の血液は、凝固を確認した後、3,000 rpmで10分間室温にて遠心し血清を分離して測定に供するまで -80°C で凍結保存した。採血後、肝臓、脾臓および腓腹筋を摘出し重量を測定した。肝臓および脾臓は10%中性ホルマリンに浸漬固定した。

4. 測定項目

血液学検査は、白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、血小板数（PLT）、ヘモグロビン（HGB）、ヘマトクリット（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球色素量（MCH）および平均赤血球色素濃度（MCHC）とし、多項目自動血球分析装置（Sysmex 社）を用いて測定した。

血清生化学検査は、血清タンパク質、血清アルブミン、血清鉄、総鉄結合能とし三菱化学メディエンス（株）に依頼した。なお、トランスフェリン飽和度は血清鉄/総鉄結合能 $\times 100$ で算出した。血清ヘプシジン-25は、HPLC-MS/MS法による測定を（株）エムシープロット・バイオテクノロジー（金沢）に依頼した。

肝臓および脾臓はホルマリン固定後パラフィン切片を作製し、ベルリン青染色（鉄染色）を行った。鏡検による脾臓鉄染色の典型例を図1に示すが、所見なし、極軽度、軽度、中等度、重度の5段階に分類した。

5. データ処理

結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。4群間の比較は一元配置分散分析（ANOVA）後、Tukeyの多重比較を用いて検定した。統計学的有意差は、 $p < 0.05$ をもって有意とした。統計はJMP5.0 software（SAS institute, Cary, NC, USA）を用いた。

結 果

1. 体重および臓器重量

試験食摂取期間の体重推移を図2に、体重変化量、体重変化率および臓器重量を表2に示した。14日間の試験食摂取により20%P + Fe群と20%P - Fe群の体重は同等に増加した。一方、0%P + Fe群と0%P - Fe群の体重は同等に減少した。試験食摂取8日後および14日後ともに、20%P + Fe群および20%P - Fe群の

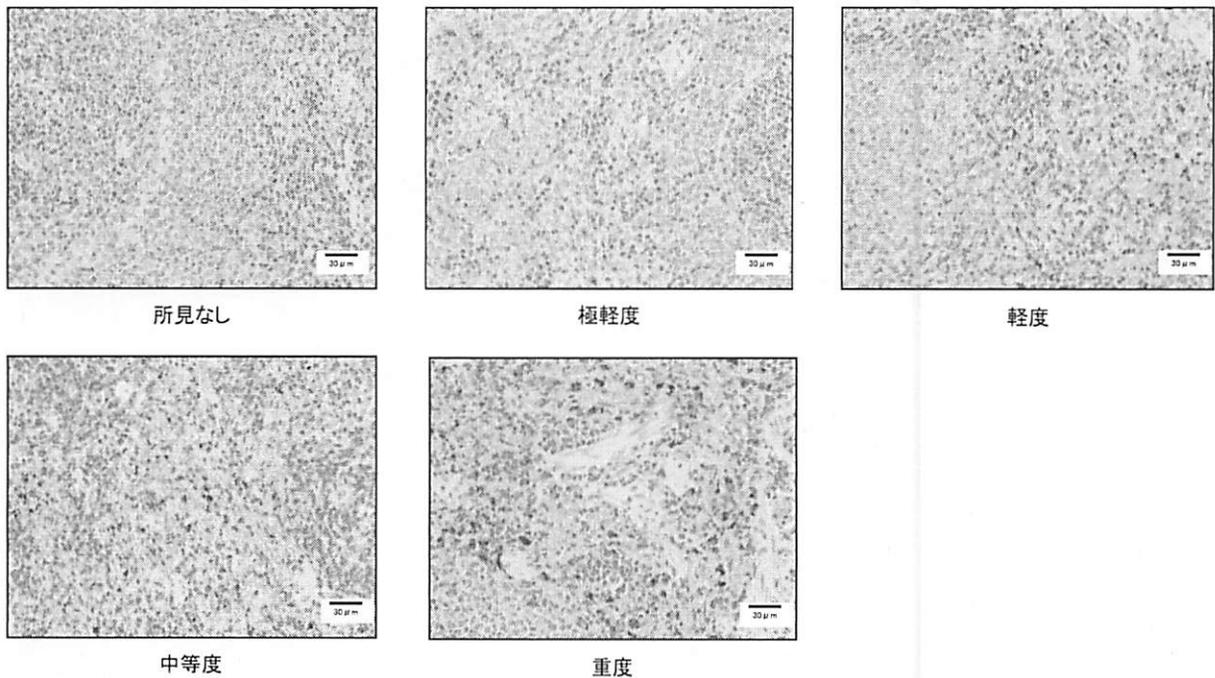


図1 脾臓鉄染色の典型例
脾臓ベルリン青染色（鉄染色）の典型例を示す。

表2 体重変化量、体重変化率および臓器重量

		20%P + Fe <i>n</i> = 10	20%P - Fe <i>n</i> = 10	0%P + Fe <i>n</i> = 10	0%P - Fe <i>n</i> = 10
体重変化量	g	69.1 \pm 13.3 ^a	69.5 \pm 2.3 ^a	-50.3 \pm 6.0 ^b	-49.6 \pm 6.0 ^b
体重変化率	%	20.4 \pm 3.4 ^a	20.6 \pm 3.3 ^a	-14.9 \pm 1.6 ^b	-14.7 \pm 1.7 ^b
肝臓重量	g	14.22 \pm 1.10 ^a	14.02 \pm 1.24 ^a	8.70 \pm 0.64 ^b	8.98 \pm 0.61 ^b
脾臓重量	g	0.78 \pm 0.11 ^a	0.74 \pm 0.10 ^a	0.42 \pm 0.04 ^b	0.43 \pm 0.05 ^b
腓腹筋重量	g	5.37 \pm 0.40 ^a	5.36 \pm 0.30 ^a	3.98 \pm 0.17 ^b	3.91 \pm 0.25 ^b

数値は、平均値 \pm 標準偏差を示す。同一の肩文字を持たない群間に $p < 0.05$ にて有意差あり（Turkeyの多重比較）。

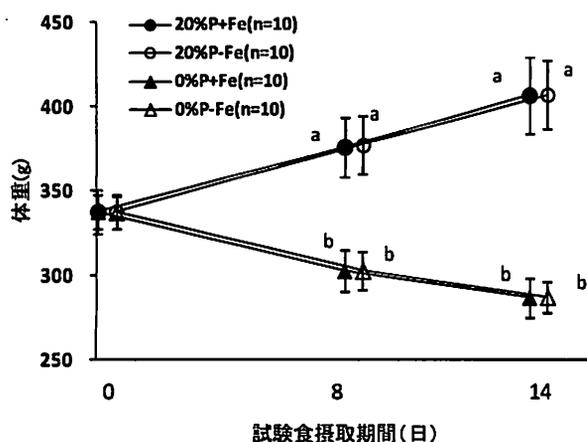


図 2 試験食摂取期間の体重推移

試験食摂取開始当日、8日後および14日後の体重を示す。平均値±標準偏差 ($n = 10$)。同一の肩文字を持たない群間に $p < 0.05$ にて有意差あり (Tukey の多重比較)。

体重に対して、0%P + Fe 群および 0%P - Fe 群は有意に低値であった。体重変化率は 20%P + Fe 群あるいは 20%P - Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に低値であったが、20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群の間に有意な差は認められなかった。肝臓、脾臓および腓腹筋重量は、20%P + Fe 群あるいは 20%P - Fe 群に対して 0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に低値であったが、20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群の間に有意な差は認められなかった。累積摂食量は、20%P + Fe 群 346.0 ± 40.1 g、20%P - Fe 群 343.3 ± 35.4 g、0%P + Fe 群 201.0 ± 25.7 g、0% - Fe 群 199.7 ± 24.3 g であった。20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は同等であったが、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群の累積摂食量は 20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群の 60% 程度であった。試験食摂取 14 日後では、体重、肝臓、脾臓重量および腓腹筋重量で、鉄配合、無配合群いずれでも 20%タンパク質食に比べ無タンパク質食群で有意な低下を認めた。

2. 血液学検査

血液学検査値を表 3 に示した。RBC は 20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に高値であったが、20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群の間に有意な差は認められなかった。HGB は 20%P + Fe 群に対して、20%P - Fe 群が有意に低値であった。また、20%P + Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に高値であった。さらに、20%P - Fe 群に対しても 0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に高値であった。HCT は 20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に高値であった。PLT は 20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に低値を示したが、20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群の間に有意な差は認められなかった。

試験食摂取 14 日後では、RBC、HGB および HCT は鉄配合、無配合群いずれでも 20%タンパク質食に比べ無タンパク質食が有意に高値を示した。

3. 血清生化学検査

血清タンパク質、血清アルブミンおよび鉄関連指標を図 3 に示した。血清タンパク質および血清アルブミンは、20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群に対して 0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に低値であったが、20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群の間に有意な差は認められなかった。

血清鉄は、20%P + Fe 群に対して、20%P - Fe 群が有意に低値であった。また、20%P + Fe 群と 20%P - Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に高値であった。さらに、0%P + Fe 群に対して、0%P - Fe 群は有意に低値であった。総鉄結合能は、20%P + Fe 群に対して、20%P - Fe 群が有意に高値であった。また、20%P + Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群が有意に低値であった。トランスフェリン飽和度は、20%P + Fe 群に対して、20%P - Fe 群が有意に低値であった。また、20%P + Fe 群に対して、0%P + Fe 群と 0%P - Fe 群は有意に高値であった。さらに、

表 3 血液学検査

		20%P + Fe $n = 10$	20%P - Fe $n = 10$	0%P + Fe $n = 10$	0%P - Fe $n = 10$
WBC	/ μ L	100 \pm 12	115 \pm 31	113 \pm 38	129 \pm 47
RBC	$\times 10^4$ / μ L	755 \pm 31 ^a	747 \pm 31 ^a	818 \pm 29 ^b	800 \pm 37 ^b
HGB	g/dL	14.2 \pm 0.3 ^a	13.5 \pm 0.4 ^b	15.0 \pm 0.6 ^c	14.8 \pm 0.3 ^c
HCT	%	44.3 \pm 1.5 ^a	42.4 \pm 2.0 ^a	47.4 \pm 1.7 ^b	46.6 \pm 1.4 ^b
MCV	fL	58.7 \pm 2.2	56.8 \pm 0.9	57.9 \pm 2.2	58.3 \pm 1.5
MCH	pg	18.8 \pm 0.7	18.1 \pm 0.3	18.3 \pm 0.7	18.5 \pm 0.7
MCHC	%	32.1 \pm 0.5	31.9 \pm 0.6	31.7 \pm 0.3	31.8 \pm 0.6
PLT	$\times 10^4$ / μ L	87.4 \pm 11.9 ^a	94.5 \pm 10.2 ^a	74.9 \pm 5.6 ^b	70.5 \pm 9.1 ^b

数値は、平均値±標準偏差を示す。同一の肩文字を持たない群間に $p < 0.05$ にて有意差あり (Turkey の多重比較)。

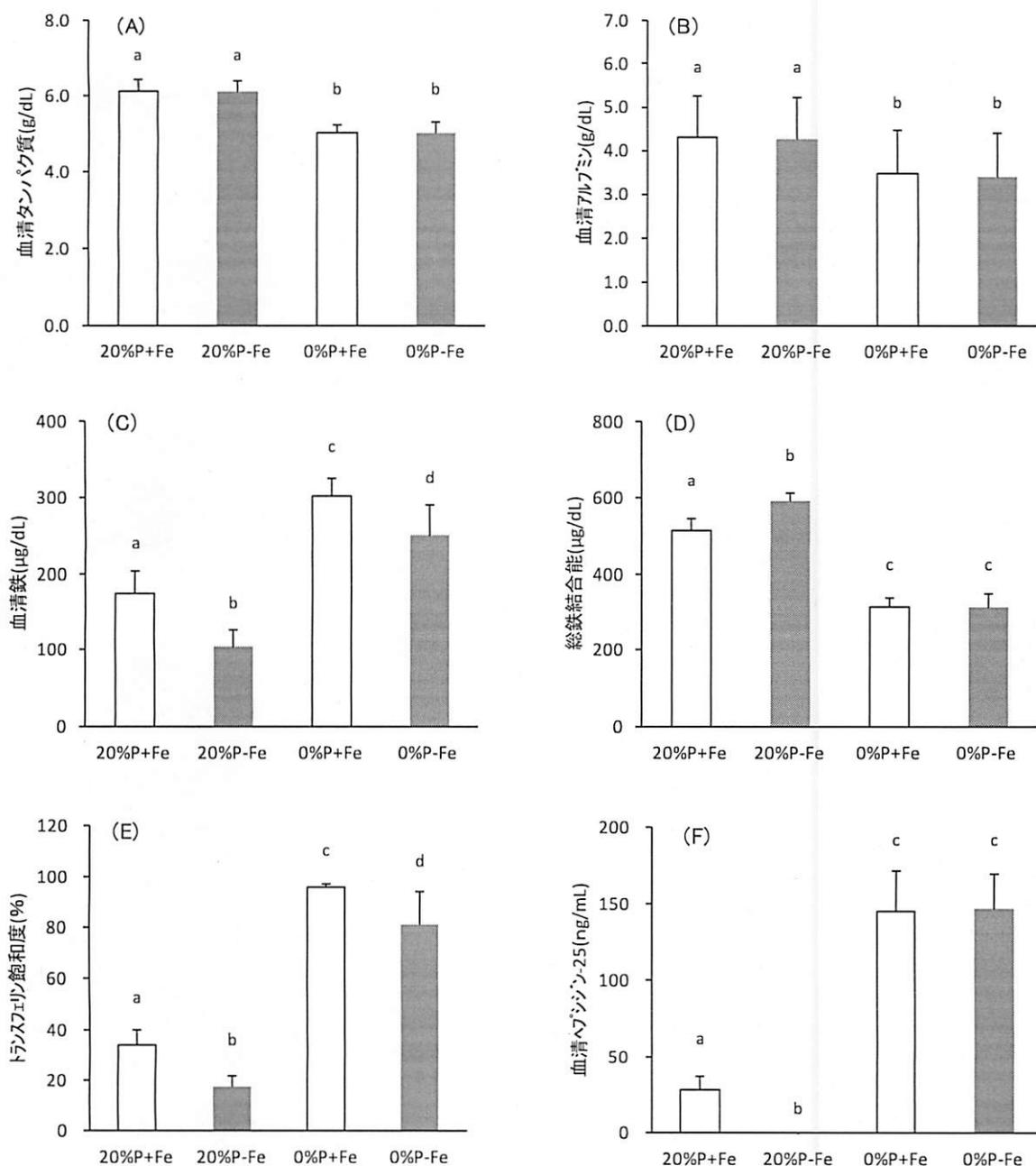


図3 血清タンパク質、血清アルブミンおよび鉄関連指標

試験食摂取開始14日後の(A)血清タンパク質(g/dL)、(B)血清アルブミン(g/dL)、(C)血清鉄($\mu\text{g/dL}$)、(D)総鉄結合能($\mu\text{g/dL}$)、(E)トランスフェリン飽和度(%), (F)血清ヘプシジン-25(ng/mL)を示す。平均値 \pm 標準偏差($n = 10$)。同一の肩文字を持たない群間に $p < 0.05$ にて有意差あり(Tukeyの多重比較)。

0%P + Fe群に対して、0%P - Fe群は有意に低値であった。血清ヘプシジン-25は、20%P + Fe群に対して、20%P - Fe群が有意に低値であった。また、20%P + Fe群と20%P - Fe群に対して、0%P + Fe群と0%P - Fe群は有意に高値であったが、0%P + Fe群と0%P - Fe群の間に有意な差は認められなかった。

鉄配合時(20%P + Fe群と0%P + Fe群)の鉄代謝は試験食中のタンパク質配合の有無の影響を受け、血清鉄濃度およびトランスフェリン飽和度は20%P + Fe群

に比べ0%P + Fe群が有意に高く、総鉄結合能は有意に低くなっていた。また、0%P + Fe群の血清ヘプシジン-25は有意に高かった。

4. 病理検査

肝臓の鉄沈着を表4に示すが、20%P + Fe群、20%P - Fe群ともに全例所見なしであったのに対し、0%P + Fe群は極軽度9例、軽度1例であった。0%P - Fe群は極軽度10例であった。

脾臓赤脾髄の鉄沈着を表5に示した。20%P + Fe群

表4 肝臓間質鉄沈着

	所見なし	極軽度	軽度	中等度	重度
20%P + Fe <i>n</i> = 10	10				
20%P - Fe <i>n</i> = 10	10				
0%P + Fe <i>n</i> = 10		9	1		
0%P - Fe <i>n</i> = 10		10			

図1に示した鉄染色の典型例に従い5段階に分類した。

表5 脾臓赤脾髄鉄沈着

	所見なし	極軽度	軽度	中等度	重度
20%P + Fe <i>n</i> = 10	1	8	1		
20%P - Fe <i>n</i> = 10	10				
0%P + Fe <i>n</i> = 10			2	2	6
0%P - Fe <i>n</i> = 10			2	8	

図1に示した鉄染色の典型例に従い5段階に分類した。

は所見なし1例, 極軽度8例, 軽度1例であった。20%P - Fe群は所見なし10例であった。0%P + Fe群は軽度2例, 中等度2例, 重度6例であった。0%P - Fe群は軽度2例, 中等度8例であった。

無タンパク質食群では, 鉄配合および無配合群とも, 脾臓赤脾髄の鉄沈着が増加していたが, とくに鉄配合群で顕著であった。肝臓では脾臓に比べ鉄沈着は軽微であった。

考 察

近年, ヘプシジン-25が鉄代謝の中心的役割を果たすことが明らかとなった。本研究では, 20%タンパク質食(20%P + Fe群と20%P - Fe群)あるいは無タンパク質食(0%P + Fe群と0%P - Fe群)を14日間自由摂取させ, 試験食中のタンパク質の有無が鉄代謝すなわち血清ヘプシジン-25濃度と体内鉄動態に及ぼす影響を検討した。さらに, 鉄配合の有無がこれら鉄代謝に及ぼす影響についても検討した。

累積摂取量は20%タンパク質食に比べ無タンパク質食で低下したが, 鉄配合の有無による影響は認められなかった。自由摂取の本研究では, 無タンパク質食は20%タンパク質食(20%P + Fe群と20%P - Fe群)に比べ, 累積摂取量が60%程度で, タンパク質だけでなくエネルギーも制限状態となり, マラスムス型クワシオルコルであると考えられた。20%タンパク質食は14日間で約20%体重増加と良好な成長を認めたが, 無タンパク質(0%P + Fe群と0%P - Fe群)は14日間で約15%体重減少した(図2, 表2)。栄養指標の血清タンパク質および血清アルブミンも体重と同様に, タンパク質とエネルギー不足の影響を受けていたが, 鉄配合の有無による影響はなかった。

血液学検査値のRBC, HGBおよびHCTは20%タンパク質食に比べ無タンパク質食が有意に高値を示し, 貧血を発現していなかった(表3)。藤井²¹⁾は, ラットに

無タンパク質食を摂取させると著明な体重減少を来し血清タンパク質と血清アルブミンは初期から急激に低下するが, RBC, HGBおよびHCTは初期においては正常値を上回る値を示し, 無タンパク質食摂取が20日間を経過するとHGBは激減し, HCTは18日頃より急激に低下することを報告している。また, Asanuma *et al.*²²⁾は, 自由摂餌の33%あるいは66%制限給餌を14日間行いタンパク質・エネルギー栄養障害としたラットではHGBおよびHCTが高値になることを報告している。本研究では, 14日間の無タンパク質食を摂取させた状態で, RBC, HGBおよびHCT値は上昇を示し, 藤井²¹⁾, Asanuma *et al.*²²⁾の報告と一致している。藤井²¹⁾, Asanuma *et al.*²²⁾は, ラットの飲水行動は摂食行動で誘発されることから, 摂食量が減少すると飲水量も減少し脱水となるため, HGBおよびHCTは一時的に高値を示すと報告している。本研究の無タンパク質食を14日間摂取後では, 体重, 肝臓, 脾臓重量および腓腹筋重量で, 鉄配合, 無配合群いずれでも20%タンパク質食に比べ無タンパク質食群で有意な低下を認め, RBC, HGBおよびHCT値の上昇と合わせ, 本実験モデルでは鉄配合の有無に関係なくタンパク質・エネルギー栄養障害の初期の反応を示していると考えられた。

一方, 鉄配合時(20%P + Fe群と0%P + Fe群)の鉄代謝は試験食中のタンパク質配合の有無の影響を受け, 0%P + Fe群の血清ヘプシジン-25, 血清鉄濃度およびトランスフェリン飽和度は20%P + Fe群に比べ有意に高く, 総鉄結合能は有意に低く, 脾臓赤脾髄の鉄沈着は増加していた(図3, 表4, 5)。Singhal *et al.*²³⁾は, 3%タンパク質食を35日間摂取させたラットではHGBおよびHCTの低下が観察され, これは赤血球合成の抑制によると報告している。また, 先に述べたAsanuma *et al.*²²⁾は, タンパク質・エネルギー栄養障害ラットでは網状赤血球が低値であり, 赤血球合成は低栄養の影響を受けやすいことを報告している。Khalil *et al.*²⁴⁾は幼児の

クワシオルコルではエリスロポエチン活性が低下していること、また、Okano *et al.*²⁵⁾、Sasaki *et al.*²⁶⁾は、タンパク質・エネルギー栄養障害での赤血球合成抑制はエリスロポエチンの低下によると報告している。本研究において、網状赤血球およびエリスロポエチンの測定は行っていないが、これらの報告から推測すると、0%P + Fe群では赤血球合成が抑制され鉄利用が低下した結果、血清鉄濃度が上昇したものと考えた。Said *et al.*²⁾はPEMの幼児ではトランスフェリン飽和度が高値を示すこと、また、Asanuma *et al.*²²⁾はPEMのラットでは総鉄結合能が低下し、血清鉄濃度は上昇することを報告している。0%P + Fe群での血清ヘプシジン-25の上昇は、血清鉄濃度およびトランスフェリン飽和度の上昇により、ヘプシジン-25が誘導されたと判断した。脾臓では網内系マクロファージが老廃した赤血球を処理し鉄を再利用するが¹⁶⁾²⁷⁾、通常は病的に極軽度の沈着が確認される。しかしながら、本研究の0%P + Fe群においては軽度から重度の沈着が確認され、体内の鉄は分布異常を呈していた。0%P + Fe群では血清ヘプシジン-25が上昇していることから、網内系マクロファージからの鉄放出が抑制され蓄積された可能性が考えられた。タンパク質・エネルギー栄養障害時には、鉄の再利用が抑制され、貧血悪化の一因になると考えられる。本研究の無タンパク質食摂取は14日間と短かったために脱水の影響を大きく受け、貧血を発現しなかった。長期の無タンパク質食飼育では、骨髄での赤血球合成抑制とヘプシジン-25による鉄利用障害のため、貧血を発現すると考えられる。

20%タンパク質食(20%P + Fe群と20%P - Fe群)での鉄代謝は試験食中の鉄配合の有無の影響を受けた。20%P - Fe群のRBC、HGB、HCTは20%P + Fe群に比べ有意に低下した(表3)。また、血清ヘプシジン-25は検出限界以下、総鉄結合能は有意に高値を示し、脾臓赤脾髄の鉄は観察されなかった(図2、表4、5)。これらのことから20%P - Fe群は鉄不足状態であると考えられた。鉄はヘモグロビン合成、酸化還元反応の活性に重要な成分であり、必須の金属元素である²⁸⁾。本研究で用いた成長期のラットにおいては、より多くの鉄を必要とする。20%P - Fe群では鉄不足となり、腸管からの鉄吸収と網内系マクロファージからの鉄供給を増加させる必要があるためにヘプシジン-25産生が抑制されたと考えられる。良好な成長が認められる栄養状態で鉄を補給しないと、早期に鉄欠乏を引き起こす可能性がある。

無タンパク質食(0%P + Fe群と0%P - Fe群)での鉄代謝における鉄無配合の影響は、20%タンパク質食の鉄無配合の影響に比べてわずかであった。20%P - Fe群の血清ヘプシジン-25は20%P + Fe群に比べ有意に低下したが、0%P - Fe群の血清ヘプシジン-25は0%P + Fe群と同等で高値を示した。また、20%P - Fe群の脾臓赤脾髄には鉄の沈着は認められず鉄不足と考えられたが、0%P - Fe群の脾臓赤脾髄には軽度から中等度

の鉄沈着が認められ鉄不足にはならなかった(図2、表4、5)。Herskovic²⁹⁾はタンパク質・エネルギー栄養障害では、腸粘膜が委縮することで鉄吸収が低下し、鉄欠乏貧血を惹起すると報告している。しかしながら、本研究結果では0%P + Fe群、0%P - Fe群ともに体内の蓄積鉄は過剰状態にあり、タンパク質・エネルギー栄養障害時における貧血の原因は、血清ヘプシジン-25が高値であるため、網内系マクロファージからの鉄供給が抑制された鉄利用障害であると考えられる。

鉄は必須の金属であるが、良好な栄養状態で成長期には必要量が高まり、鉄補給がなされないと早期に鉄欠乏を引き起こす。一方、成長期におけるタンパク質・エネルギー栄養障害でみられる貧血は、絶対的鉄欠乏ではなく、ヘプシジン-25の産生亢進による鉄代謝阻害、すなわち機能的鉄欠乏が一因であると考えられた。タンパク質・エネルギー栄養障害時には血清ヘプシジン-25値からも明らかに鉄代謝は抑制されている。

本研究はテルモ(株)研究開発本部と旭川医科大学内科学講座消化器血液腫瘍制御内科分野との共同研究契約に基づき実施した。

文 献

- 1) 山本 茂(2007) タンパク質栄養の異状: タンパク質・アミノ酸の新栄養学(岸 恭一, 木戸康博編), p 158-65. 講談社, 東京.
- 2) Said A, El-Hawary MF, Sakr R, Khalek MKA, El-Shobaki FA, Noseir MB (1975) Biochemical and haematological aspects of anaemia associating protein energy malnutrition (PEM). *Gaz Egypt Paediatr Assoc* 23: 139-44.
- 3) Khalil M, Tanios A, Moghazy M, Aref MK, Mahmoud S, EL Lozy M (1973) Serum and red cell folates, and serum vitamin B₁₂ in protein calorie malnutrition. *Arch Dis Child* 48: 366-9.
- 4) Edozien JC, Rahim-khan MA (1968) Anaemia in protein malnutrition. *Clin Sci* 34: 315-26.
- 5) Adams EB (1970) Anemia associated with protein deficiency. *Semin Hematol* 7: 55-66.
- 6) Enwonwu CO, Monsen ER, Jacobson K (1972) Absorption of iron in protein-calorie deficient rats and immediate effects of re-feeding an adequate protein diet. *Dig Dis* 17: 959-68.
- 7) Sood SK, Deo MG, Ramalingaswami V (1965) Anemia in experimental protein deficiency in the rhesus monkey with special reference to iron metabolism. *Blood* 26: 421-32.
- 8) Massa E, MacLean WC Jr, Lopez de Romana G, de Martinez Y, Graham GG (1978) Oral iron absorption in infantile protein-energy malnutrition. *J Pediatr* 93: 1045-9.
- 9) Yip R (1996) Prevention and control of iron deficiency in developing countries. *Curr Issues Public Health* 2: 253-63.
- 10) Ozkale M, Sipahi T (2014) Hematologic and bone

- marrow changes in children with protein-energy malnutrition. *Pediatr Hematol Oncol* 31: 349-58.
- 11) EL-Shobaki FA, El-Hawary MF, Morcos SR, Abdelkhalek MK, El-Zawahry K, Sark R (1972) Iron metabolism in Egyptian infants with protein-calorie deficiency. *Br J Nutr* 28: 81-9.
 - 12) Borelli P, Blatt S, Pereira J, de Maurino BB, Tsujita M, de Souza AC, Xavier JG, Fock RA (2007) Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *Br J Nutr* 97: 307-14.
 - 13) アーメッド・マアタブディン・サイアッド, 木村美恵子, 山川知之, 糸川嘉則 (1986) 低蛋白質・低エネルギーラットにおける生体内マグネシウム, カルシウム及び鉄の変動. *マグネシウム* 5, 15-23.
 - 14) 木村美恵子, 石川円香, 武田厚子, 今西雅代, 武田隆司, 武田隆久 (2004) 50%制限食によるラット肝臓への鉄沈着一肥満ラット (Minko rat) に関する研究 (19)一. *Biomed Res Trace Elements* 15, 105-7.
 - 15) 生田克哉, 高後 裕 (2009) 1 生体内鉄代謝の機構. 鉄剤の適正使用による貧血治療指針 改訂 [第2版] (日本鉄バイオサイエンス学会治療指針作成委員会編), p 2-3. 響文社, 札幌.
 - 16) 生田克哉, 高後 裕 (2011) 1. 鉄の生理～鉄のリサイクリング機構～. *血液フロンティア* 21, 23-30.
 - 17) 川端 浩 (2012) 〈検査指標〉ヘプシジン. *臨床検査* 56, 1064-9.
 - 18) 友杉直久 (2009) ヘプシジン-フェロポルチン系による鉄代謝制御機構. *金沢大学十全医学会雑誌* 118, 61-2.
 - 19) 友杉直久 (2011) 2. 鉄代謝制御因子～ヘプシジン～. *血液フロンティア* 21, 31-9.
 - 20) 友杉直久 (2007) 2 ヘプシジン. *Iron Overloadと鉄キレート療法* (大屋敷一馬, 小澤敬也, 高後 裕, 中尾眞二編), p 37-46. メディカルレビュー社, 東京.
 - 21) 藤井春男 (1982) 低蛋白血症の創傷治癒に及ぼす影響 I. 実験的低蛋白血症作成について. *日本口腔外科学会誌* 28, 1433-48.
 - 22) Asanuma F, Miyata H, Iwaki Y, Kimura M (2011) Feature on erythropoiesis in dietary restricted rats. *J Vet Med Sci* 73: 89-96.
 - 23) Singhal V, Sood SK, Mathur M (1981) Erythropoiesis in protein deficiency: A ferrokinetic study in male albino rats. *Indi J Exp Biol* 19: 577-9.
 - 24) Khalil M, Awwad H, Hafez M (1969) Plasma and red cell iron turnover in protein calorie malnutrition. *Arch Dis Child* 44: 124-30.
 - 25) Okano M, Ohnota H, Sasaki R (1992) Protein deficiency impairs erythropoiesis in rats by reducing serum erythropoietin concentration and the population size of erythroid precursor cells. *J Nutr* 122: 1376-83.
 - 26) Sasaki R, Ohnota H, Yanagawa S, Chiba H (1985) Dietary protein-induced changes of the erythropoietin level in rat serum. *Agric Biol Chem* 49: 2671-83.
 - 27) 高後 裕, 生田克哉 (2007) 1 総論—生体鉄代謝の分子機構. *Iron Overloadと鉄キレート療法* (大屋敷一馬, 小澤敬也, 高後 裕, 中尾眞二編), p 25-36. メディカルレビュー社, 東京.
 - 28) 小船雅義, 加藤淳二 (2009) 1. 鉄代謝関連遺伝子発現制御機構～鉄代謝制御の分子標的～. *血液フロンティア* 19, 21-30.
 - 29) Herskovic T (1969) Protein malnutrition and the small intestine. *Am J Clin Nutr* 22: 300-4.
-

J Jpn Soc Nutr Food Sci 67: 245-253 (2014)

Original Paper

Study of Iron Metabolism and Hepcidin Induction in Rats with Protein-energy Malnutrition

Fumiko Sakata,^{*1} Katsunori Sasaki,² Takayuki Uchida,¹
Kazuo Chiku,¹ and Yutaka Kohgo³

(Received April 3, 2014; Accepted May 28, 2014)

Summary: Anemia is often observed in protein-energy malnutrition, and one of the major reasons for this is thought to be iron deficiency. It is now known that hepcidin-25 plays a critical role in iron metabolism. However, no reported studies have yet investigated the relationship between hepcidin-25 and nutritional conditions. From this viewpoint, we investigated the relationship between hepcidin-25-related iron metabolism and protein-energy malnutrition using rats fed a protein-free diet during their growth period. In addition, we investigated how the presence and absence of iron in a protein-free diet affects iron metabolism. Our findings suggested that anemia observed in protein-energy malnutrition during the growth period was attributable to functional iron deficiency, i.e. impairment of iron metabolism due to an increase of hepcidin-25 synthesis, and not to absolute iron deficiency. The iron supply would incur a risk of inducing an excess of iron, since the stored iron was increased in protein-energy malnutrition and no iron deficiency was observed even in the absence of an iron supply. Thus, it appears that the best way to overcome this disease condition is to rectify the nutritional deficiency.

Key words: protein-energy malnutrition, anemia, hepcidin-25, functional iron deficiency

* Corresponding author (E-mail: Fumiko_Sakata@terumo.co.jp)

¹ Terumo Corporation R & D Headquarters, 1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-0151, Japan

² Department of Gastrointestinal Immunology and Regenerative Medicine, Asahikawa Medical University, 2-1-1, Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-2462, Japan

³ Division of Gastroenterology and Hematology/Oncology Department of Medicine, Asahikawa Medical University, 2-1-1, Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-2462, Japan