

## 鉄・亜鉛の単独および同時欠乏が生体に及ぼす影響

許 斐 重 紀, 横 井 克 彦

(聖徳大学大学院 人間栄養学研究科\*)

### Effect of Iron and/or Zinc Deficiency in Rats

Aki KONOMI and Katsuhiko YOKOI

*Department of Human Nutrition, Seitoku University Graduate School*

#### Summary

Iron (Fe) and zinc (Zn) are suspected to be easily depleted in humans at the same time, because dietary sources such as meat and major absorption inhibitors such as calcium and phytate are common for Fe and Zn. To determine the effects of Fe and/or Zn deficiencies on physiological parameters in rats, forty 4-week-old male Sprague-Dawley rats were assigned into 4 dietary treatment groups: severely Fe-deficient (FD), moderately Zn-deficient (ZD), severely Fe-deficient/moderately Zn-deficient (FZD), and control (Cont). Body temperature of FD and ZD were decreased, but that of FZD was not changed. TIBC was decreased by Fe deficiency. Hemoglobin and hematocrit were decreased by Fe deficiency and increased by Zn deficiency. Total body water per body weight was increased in FZD and intracellular water/extracellular water ratio was increased in ZD. Plasma erythropoietin concentration was markedly decreased by Zn deficiency.

鉄と亜鉛は生体にとって必要不可欠なミネラルである<sup>1)</sup>。しかし、供給源が同じであるだけでなく、フィチン酸やカルシウム<sup>2-4)</sup>など、吸収阻害因子も同じであるためにヒトでは同時に欠乏しやすいことが指摘されている<sup>5)</sup>。鉄欠乏性貧血もしくはその前段階である潜在性鉄欠乏の有病率は、世界人口の約65% (約40億人) であるとWHO, UNICEF, UNUは共同で報告している<sup>6)</sup>。鉄・亜鉛の欠乏症の克服は国際的な課題であり、UNICEFは鉄欠乏の克服を政策目標として掲げている<sup>7)</sup>。Prasadらは鉄欠乏者が亜鉛欠乏を併発していることが多かったと報告し<sup>5)</sup>、亜鉛欠乏者は現在、世界人口の約25%だと考えられている<sup>8)</sup>。実際、鉄欠乏性貧血患者の血漿亜鉛濃度が低いこと<sup>9)</sup>や、月経のあるアメリカ人女性で軽度亜鉛欠乏症と貯蔵鉄不足が併発していたこと<sup>10, 11)</sup>が報告されている。

鉄欠乏性貧血の診断基準は貯蔵鉄枯渇を伴う小球性低色素性貧血であるが、実際に鉄欠乏性貧血と診断された患者は亜鉛欠乏を併発していることが多いと考えられており、貧血の予防・治療法として、鉄と亜鉛を同時に投与すべきではないかという議論がある。また、亜鉛栄養評価指標である血漿(清)亜鉛濃度については、集団に対しては有効であるが、日内変動・個人間変動が大きく、採血前の摂食状況の影響を受けやすいため個人に関しては信頼性が低いことが問題となっている<sup>10, 11)</sup>。個人の亜鉛栄養状態の評価が難しいことから、鉄および亜鉛の栄養状態が正しく診断できない。

鉄単独投与によって治癒せず、鉄および亜鉛の投与によって治癒したという日本人の貧血患者の症例報告<sup>12, 13)</sup>やインドネシアの乳児に鉄と亜鉛を同時に投与して症状が改善されたという報告<sup>14, 15)</sup>がある一方で、鉄と亜鉛を同時に投与すると両者が吸収を阻害しあい、単独投与よりも効果が悪かった<sup>16)</sup>、という2つの異なる研究結果が出ている。この問題を解決するためには、欠乏レベルにおける鉄と亜鉛の生体内での相互作用を理解し、単独欠乏と同時欠乏の症状お

\*所在地：千葉県松戸市岩瀬550 (〒270-8555)

よび徴候を明らかにする必要がある。

著者らは、これまでラットを用いて鉄・亜鉛の単独および同時欠乏が生体に及ぼす影響について検討し報告してきた。ここに、これまでの報告内容について述べる。

## 実験方法

### 1. 飼料組成

実験に用いた飼料はAIN-93G<sup>17)</sup>に準じて、アルミナ製ポットミルで調製した。飼料組成はTable 1に示した。AIN-93Gに通常用いられるミルクカゼインには亜鉛が多く含まれるため亜鉛欠乏が発生しない。一方、亜鉛欠乏を発生させるために卵白を用いると鉄を含むために重度の鉄欠乏が発生しない。このため現在までに報告されている研究は、鉄の単独欠乏ないし亜鉛の単独欠乏に限られており、欠乏レベルにおける鉄・亜鉛の相互作用の研究が進んでいない。我々は、各飼料の作製に、EDTA溶液および超純水 (Millipore社; MilliQ) で洗浄し乾燥したミルクカゼインを使用した<sup>18)</sup>。

### 2. 実験計画および方法

実験には日本SLCより購入した4週齢Sprague-Dawley系雄ラットを用いた。1群あたり10匹ずつ、対照群 (Cont群)、重度鉄単独欠乏群 (FD群)、中等度亜鉛<sup>19)</sup>単独欠乏群 (ZD群)、重度鉄・中等度亜鉛同時欠乏群 (FZD群) の4群に体重が均等になるよう割り付けた。室温 $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度約50%、明暗時間各12時間 (明期7:00-19:00、暗期19:00-7:00) サイクルの動物室で、ステンレスケージで4週間、個別飼育した。飼料およびイオン交換水は自由摂取とした。動物の飼育は「実験動物の飼養及び保管に関する基準 (総理府告示第6号)」および本学の「聖徳大学 動物実験委員会規程」を遵守して行なった。

飼育19日目に飲水量の測定を行なった。飼育24~26日目に中心体温を測定した。27日目にバイオインピーダンス (Xitron社製; 4000C) で体水分量 (総体水分量: TBW, 細胞内水: ICW, 細胞外水: ECW) を測定し、生体中のICWとECWの比を求めた<sup>20)</sup>。飼育28-29日目に1晩絶食の後に解剖し、自動血球計数測定装置 (日本光電社製; Celltac MEK-5258) で血球計測ならびにヘモグロビンの測定を行なった。ヘマトクリットはキャピラリー法で測定した。全血は3000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ で20分間遠心して血漿を分離し、 $-80^\circ\text{C}$ で各種測定まで保存した。

### 3. 統計処理

データは全てTukeyの多重比較検定および二元配置分散分析 (two way ANOVA) で解析し、全てのデータで危険率5%を有意とした。統計ソフトはSYSTAT (SPSS Inc.) およびエクセル統計付録ソフトStatcell ver. 2を用いた。

**Table 1** Composition of diets

Group	Fe (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Cont*	35	30
FD	0	30
ZD	35	4.5
ZFD	0	4.5

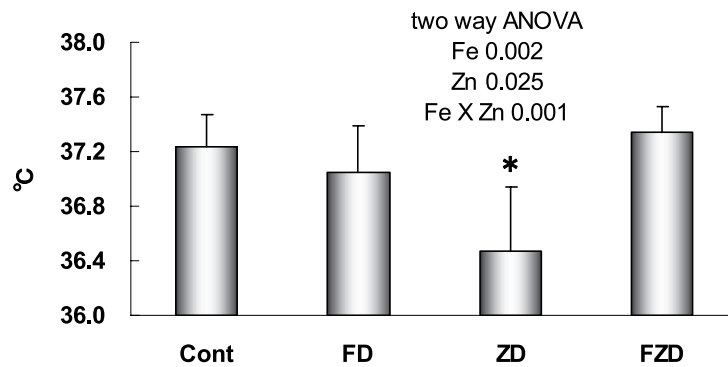
\*AIN-93G formulation

Diets were made with EDTA-treated bovine milk casein (vitamin free casein, Sigma-Aldrich Fine Chemicals Co.).

## 実験結果および考察

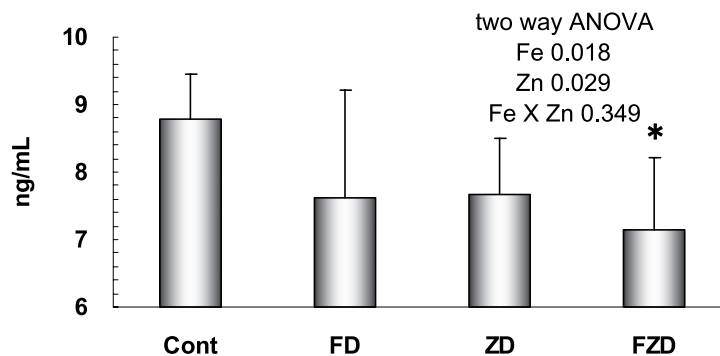
### 1. 中心体温および甲状腺ホルモン<sup>21)</sup>への影響

中心体温に対して鉄、亜鉛、その相互作用の全てで有意な効果が見られた。中心体温はZD群がCont群に比較し有意に低下し、FD群は低下する傾向にあった。FZD群はCont群の体温とほぼ同じであり、差が見られなかった (Fig. 1)。しかし、FZD群の血漿中甲状腺刺激ホルモン (TSH) およびサイロキシン ( $T_4$ ) 濃度は4群間で最も低値であった (Fig. 2, 3)。これまで、亜鉛単独欠乏で中心体温が低下することは報告されており<sup>22)</sup>、鉄単独欠乏についても報告されている<sup>23)</sup>。体温低下の原因としては、甲状腺ホルモンが考えられており、これまでに単独亜鉛欠乏時<sup>24)</sup> および単独鉄欠乏時<sup>25)</sup> には甲状腺ホルモンの値が低下することが報告されている。また、マウスに大量の甲状腺ホルモンを静脈内投与した場合、Phosphatidylinositol-3-kinaseおよびNOSを介して血管拡張することが報告されている<sup>26)</sup>。しかし、FZD群の体温はCont群と差が見られなかったが、TSH濃度および $T_4$ 濃度はFZD群が4群間で最も低値を示した。Malikら<sup>27)</sup>はNOS inhibitorを投与すると体温が低下することを報告しており、NOが体温調節に関与していると示唆している。血漿中NO (nitrate/nitrite) 濃度は体温に似たパターンを示し (Fig. 4)、鉄と亜鉛の相互作用は有意に近かった ( $p = 0.084$ )。



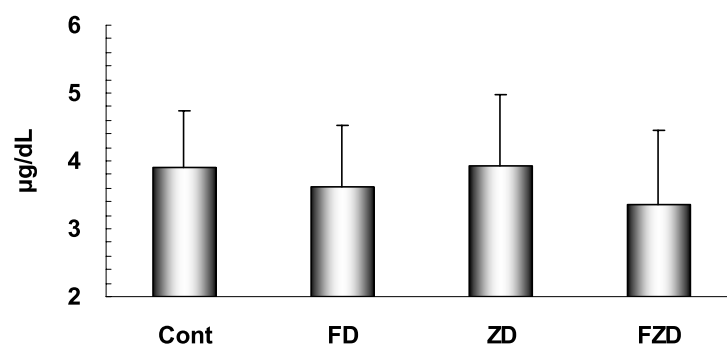
**Fig. 1** Body temperature of rats.

The columns indicate means, and the short bars show standard deviation.  
\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from Control group using Tukey's multiple comparison test.

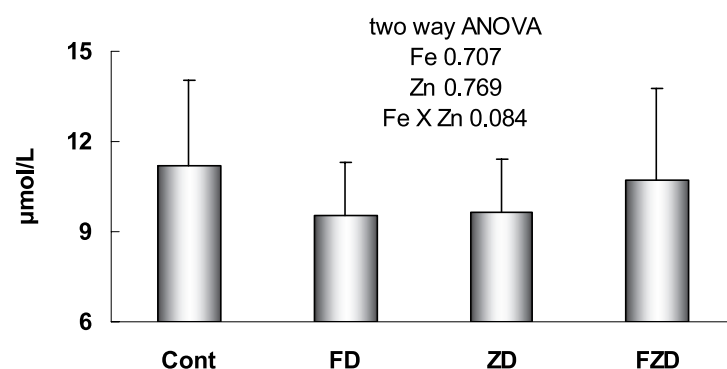


**Fig. 2** Plasma TSH concentration of rats.

The columns indicate means, and the short bars show standard deviation.  
\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from Control group using Tukey's multiple comparison test.



**Fig. 3** Plasma T<sub>4</sub> concentration of rats.  
The columns indicate means, and the short bars show standard deviation.



**Fig. 4** Plasma NO (nitrate/nitrite) concentration of rats.  
The columns indicate means, and the short bars show standard deviation.

## 2. 血漿中各種ミネラル濃度<sup>28)</sup>への影響

結果はTable 2に示した。鉄の単独欠乏の主効果が見られた元素は5種 (Mg, Fe, Mn, Se, Mo ; Znでは $p = 0.050$ ), 亜鉛の単独欠乏の主効果が見られた元素は4種 (Mg, Fe, Zn, Se), 鉄と亜鉛の相互作用が見られたのは5種 (Ca, Fe, Zn, Mn, Se) だった。Cu, As, Niは二元配置分散分析でも多重比較検定でも有意な差が見られなかった。

鉄単独欠乏時に見られたMn, Se, Mo濃度の変化は同時欠乏時には軽減され、とくにSeは変化が見られなくなった。Seの測定により鉄・亜鉛同時欠乏と鉄単独欠乏の判別が可能になるとも考えられる。

また、亜鉛栄養状態評価に用いられるZn濃度はFD群でも濃度低下が見られたので、亜鉛栄養評価時に用いる際には注意が必要であることが示唆された。

**Table 2** Plasma mineral concentrations

Group	n	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)	Fe (µg/L)	Zn (µg/L)	Mn (µg/L)	Se (µg/L)	Mo (µg/L)
Cont	10	13.5 ± 1.7	101.1 ± 6.1	686 ± 146	1350 ± 84	4.95 ± 0.92	525 ± 32	13.1 ± 1.6
FD	10	16.4 ± 1.1*	92.5 ± 5.2	323 ± 63*	1196 ± 115*	0.98 ± 0.92*	438 ± 34*	8.4 ± 2.0*
ZD	7	15.6 ± 1.7	85.5 ± 13.5*	915 ± 198*	994 ± 189*	3.67 ± 1.88	562 ± 52	13.6 ± 4.1
FZD	9	17.3 ± 2.0*	103.5 ± 6.6	321 ± 53	956 ± 74*	2.63 ± 1.51*	545 ± 40	10.0 ± 2.7*
ANOVA-P Values								
Fe		0.001	0.087	0.001	0.050	0.001	0.001	0.001
Zn		0.011	0.395	0.009	0.001	0.677	0.001	0.591
FeXZn		0.323	0.001	0.008	0.030	0.002	0.001	0.078

Values are mean ± SD

\* Significantly different ( $p < 0.05$ ) from Control group in the same item using Tukey's multiple comparison test.

### 3. 血中鉄指標とバイオインピーダンス<sup>18)</sup>への影響

血中鉄指標の全てで鉄と亜鉛の相互作用に有意な効果が見られた。総鉄結合能 (TIBC) は鉄欠乏により上昇した。トランスフェリン飽和率 (Trf-Sat), ヘモグロビン (Hgb), ヘマトクリット (Hct) はFD群とFZD群で減少し, ZD群で上昇した (Table 3)。体水分量 (TBW, ECW, ICW) を測定した結果, FD群のTBW/Body weight比がCont群に比べ有意に増加しており, 鉄欠乏によって総体水分量が増加することが明らかになった。ZD群のICW/ECW比はCont群に比べ有意に増加した。また, FZD群でも増加する傾向にあり, 亜鉛欠乏によって細胞内水の増加, すなわち細胞内浮腫が起きていることが明らかになった (Table 4)。飼育19日目に測定した飲水量は, 全群がほぼ同じ値だった ( $p = 0.967$ )。ICW/ECW比の変動から, 亜鉛欠乏時には総血漿量が減少したと考えられ, HctとHgbの上昇は造血の亢進ではなく, 血液濃縮によることが示唆された。Trf-Satの上昇は亜鉛欠乏により組織での鉄の利用効率が低下した結果だと考えられた。

**Table 3** Hematological parameters

Group	n	TIBC ( $\mu\text{g/dL}$ )	Trf-Sat (%)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)
Cont	10	643 $\pm$ 22	10.7 $\pm$ 2.3	12.4 $\pm$ 0.6	37.9 $\pm$ 1.8
FD	10	935 $\pm$ 26*	3.5 $\pm$ 0.7*	6.9 $\pm$ 0.4*	21.1 $\pm$ 1.8*
ZD	10	604 $\pm$ 41*	15.1 $\pm$ 2.9*	14.3 $\pm$ 0.4*	43.0 $\pm$ 1.4*
FZD	10	964 $\pm$ 33*	3.3 $\pm$ 0.5*	7.4 $\pm$ 0.5*	22.2 $\pm$ 1.6*
ANOVA-P Values					
Fe		0.001	0.001	0.001	0.001
Zn		0.626	0.001	0.001	0.001
FexZn		0.001	0.001	0.001	0.001

Values are mean  $\pm$  SD

\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from Control group in the same item using Tukey's multiple comparison test.

**Table 4** Water distribution

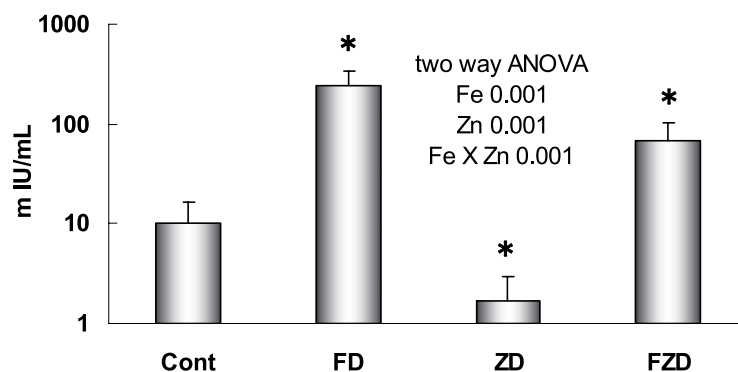
Group	n	Total body water/ Body weight (%)	Intracellular water/ Extracellular water
Cont	10	65.0 $\pm$ 4.8	2.60 $\pm$ 0.25
FD	10	69.1 $\pm$ 4.4	2.73 $\pm$ 0.42
ZD	10	67.6 $\pm$ 3.0	3.10 $\pm$ 0.50*
FZD	10	71.6 $\pm$ 5.2*	3.07 $\pm$ 0.48
ANOVA-P Values			
Fe		0.007	0.645
Zn		0.077	0.002
FexZn		0.991	0.505

Values are mean  $\pm$  SD

\*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from Control group in the same item using Tukey's multiple comparison test.

### 4. 血漿中エリスロポエチン濃度<sup>18)</sup>への影響

これまでに, 血漿中エリスロポエチン濃度は鉄欠乏時に上昇することが報告されているが, 亜鉛欠乏時のエリスロポエチン濃度についての報告はなかった。FD群はCont群の約24倍にまで濃度が上昇したが, FZD群ではFD群の約3分の1まで上昇が抑えられた。また, ZD群はCont群の約5分の1と著しい濃度低下を示した (Fig. 5)。血漿中エリスロポエチン濃度が低下していることから, 亜鉛欠乏下で造血系の働きが抑制されていることが示唆された。



**Fig. 5** Plasma erythropoietin (EPO) concentration of rats. The vertical axis indicates plasma erythropoietin concentration shown with using the logarithmic scale. \*Significantly different ( $p < 0.05$ ) from Control group using Tukey's multiple comparison test.

### まとめ

本研究の結果では、血漿中各種ミネラル濃度・体水分分布・血漿中エリスロポエチン濃度の全てで鉄単独欠乏群と鉄・亜鉛同時欠乏群との間に明らかな差が見られた。中心体温は、亜鉛単独欠乏群のみで低下した。

現在の鉄欠乏性貧血の診断基準でもある血中鉄指標では、全ての項目で鉄単独欠乏群と鉄・亜鉛同時欠乏群との間に差が見られなかったことから、鉄単独欠乏と鉄・亜鉛同時欠乏の分類が大変困難であることが再認識された。しかし、本研究の結果から血中鉄指標のみでなく、中心体温・血漿中各種ミネラル濃度・体水分分布・血漿中エリスロポエチン濃度などの項目を複合すれば、鉄単独欠乏と鉄・亜鉛同時欠乏の分類が可能であることが示唆された。また、亜鉛栄養状態評価に用いられている血漿亜鉛濃度が鉄単独欠乏時に低下したことが確認できたことから、鉄欠乏状態における亜鉛栄養評価について新たな指標を設ける必要があるだろう。しかし、本報告の結果は全てラットによるデータであるため、ヒトの診断へはすぐに適用できない。今後も、正確な栄養状態評価を可能にするために、ヒトにおいてのさらなる検討が必要である。

### 謝 辞

本研究の一部は、財団法人 日本科学協会 笹川科学研究助成の援助を受けて行なった。

### 参考文献

- 1) Prasad AS, Miale A, Jr., Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR (1963) Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. J Lab Clin Med 61: 537-549.
- 2) O'Dell BL, Savage JE (1960) Effect of phytic acid on zinc availability. Proc Soc Exp Biol Med 103: 304-306.
- 3) Pecoud A, Donzel P, Schelling JL (1975) Effect of foodstuffs on the absorption of zinc sulfate. Clin Pharmacol Ther 17: 469-474.
- 4) Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P (1991) Calcium supplementation: effect on iron absorption. Am J Clin Nutr 53: 106-111.
- 5) Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M (1961) Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism, geophagia. Am J Med 31: 532-546.
- 6) WHO/UNICEF/UNU: Iron deficiency anaemia: assessment, prevention, and control. A guide for programme managers, Geneva, World Health Organization, 2001 (WHO/NHD/01.3). ([http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida\\_assessment\\_prevention\\_control.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf), accessed on November 24, 2004)

- 7) Yip R (2002) Iron supplementation: country level experiences and lessons learned. *J Nutr* 132: 859S - 861S.
- 8) Maret W, Sandstead HH (2006) Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol* 20: 3 - 18.
- 9) Sipahi T, Akar N, Dincer N, Cin S (2001) Plasma zinc levels in patients with iron-deficiency anemia. *J Trop Pediatr* 47: 122 - 123.
- 10) Yokoi K, Alcock NW, Sandstead HH (1994) Iron and zinc nutriture of premenopausal women: associations of diet with serum ferritin and plasma zinc disappearance and of serum ferritin with plasma zinc and plasma zinc disappearance. *J Lab Clin Med* 124: 852 - 861.
- 11) Yokoi K, Egger NG, Ramanujam VM, Alcock NW, Dayal HH, Penland JG, Sandstead HH (2003) Association between plasma zinc concentration and zinc kinetic parameters in premenopausal women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E1010 - 1020.
- 12) Nishiyama S, Irisa K, Matsubasa T, Higashi A, Matsuda I (1998) Zinc status relates to hematological deficits in middle-aged women. *J Am Coll Nutr* 17: 291 - 295.
- 13) Nishiyama S, Kiwaki K, Miyazaki Y, Hasuda T (1999) Zinc and IGF-I concentrations in pregnant women with anemia before and after supplementation with iron and/or zinc. *J Am Coll Nutr* 18: 261 - 267.
- 14) Lind T, Lonnerdal B, Stenlund H, Gamayanti IL, Ismail D, Seswandhana R, Persson LA (2004) A community-based randomized controlled trial of iron and zinc supplementation in Indonesian infants: effects on growth and development. *Am J Clin Nutr* 80: 729 - 736.
- 15) Lind T, Lonnerdal B, Stenlund H, Ismail D, Seswandhana R, Ekstrom EC, Persson LA (2003) A community-based randomized controlled trial of iron and zinc supplementation in Indonesian infants: interactions between iron and zinc. *Am J Clin Nutr* 77: 883 - 890.
- 16) Dijkhuizen MA, Wieringa FT, West CE, Martuti S, Muhilal (2001) Effects of iron and zinc supplementation in Indonesian infants on micronutrient status and growth. *J Nutr* 131: 2860 - 2865.
- 17) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939 - 1951.
- 18) Konomi A, Yokoi K (2005) Zinc deficiency decreases plasma erythropoietin concentration in rats. *Biol Trace Elem Res* 107: 289 - 292.
- 19) 許斐亜紀, レカ・ラジュ・ジュネジャ, 横井克彦 (2007) 卵白ベース飼料におけるラットの亜鉛適正量の検討. *Biomed Res Trace Elements*. in press.
- 20) Yokoi K, Lukaski HC, Uthus EO, Nielsen FH (2001) Use of bioimpedance spectroscopy to estimate body water distribution in rats fed high dietary sulfur amino acids. *J Nutr* 131: 1302 - 1308.
- 21) Konomi A, Yokoi K (2006) Effects of zinc and/or iron deficiency on rectal temperature in rats. *Biol Trace Elem Res* 109: 49 - 54.
- 22) O'Dell BL, Reynolds G, Reeves PG (1977) Analogous effects of zinc deficiency and aspirin toxicity in the pregnant rat. *J Nutr* 107: 1222 - 1228.
- 23) Beard J, Green W, Miller L, Finch C (1984) Effect of iron-deficiency anemia on hormone levels and thermoregulation during cold exposure. *Am J Physiol* 247: R114 - 119.
- 24) Lukaski HC, Hall CB, Marchello MJ (1992) Impaired thyroid hormone status and thermoregulation during cold exposure of zinc-deficient rats. *Horm Metab Res* 24: 363 - 366.
- 25) Beard JL, Brigham DE, Kelley SK, Green MH (1998) Plasma thyroid hormone kinetics are altered in iron-defi-

cient rats. *J Nutr* 128: 1401-1408.

- 26) Hiroi Y, Kim HH, Ying h, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY, Liao JK (2006) Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11104-14109.
- 27) Malik SS, Fewell JE (2003) Thermoregulation in rats during early postnatal maturation: importance of nitric oxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R1366-1372.
- 28) 許斐亜紀, 横井克彦 (2007) 鉄・亜鉛の単独および同時欠乏が血漿中各種ミネラル濃度に与える影響. *Biomed Res Trace Elements*. in press.