

## 中等度亜鉛欠乏がラットの肝臓および脾臓中非ヘム鉄濃度に与える影響

許斐亜紀<sup>1)†</sup>, 横井克彦<sup>2)</sup><sup>1)</sup>桐生大学 医療保健学部 栄養学科, <sup>2)</sup>聖徳大学大学院 人間栄養学研究科)

(受付 2024年9月1日, 受理 2024年10月16日)

## Effects of moderate zinc deficiency on non-heme iron concentration of liver and spleen in rats

Aki KONOMI<sup>1)†</sup> and Katsuhiko YOKOI<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Nutrition, Kiryu University<sup>2)</sup>Department of Human Nutrition, Seitoku University Graduate School

## Summary

Iron biological parameters (hemoglobin concentration, hematocrit and serum iron concentration) are being used to check for iron nutritional condition. However, these parameters are changed by iron deficiency and other mineral deficiency, especially by zinc deficiency. We measured liver and spleen non-heme iron concentrations (supernatant and coagulum) in moderate zinc deficiency or with diet restriction. Thirty 3-week-old male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided to control group (Control), pair-fed group (PF) and moderately zinc-deficient group (ZD), and fed for 4 weeks. Non-heme iron fractions (supernatant and coagulum) were separated and measured by atomic absorption spectrometry. Differences between groups were statistically analyzed by the Brown-Forsythe ANOVA and *post hoc* Welch's t-test. P value less than 0.05 was considered significant. Liver supernatant non-heme iron concentration was significantly increased by zinc deficiency and significantly decreased by diet restriction. Spleen supernatant non-heme iron concentration was not significantly changed by ANOVA. Liver coagulum and spleen coagulum non-heme iron concentration were not significantly changed in all groups. These results suggest that iron accumulation in liver is remarkable by zinc deficiency *per se*, removing the effect of low food intake by paired-feeding technique.

鉄の栄養状態を判定する際には、鉄栄養指標として血中ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、トランスフェリン飽和率などが一般的に用いられる。しかし、これら鉄栄養指標は鉄欠乏時に低下するだけでなく、亜鉛欠乏時には上昇し、鉄と亜鉛が同時に欠乏した時には鉄欠乏による低下が亜鉛欠乏によって軽微ながら抑制される<sup>1)</sup>。また、血漿中鉄濃度も鉄欠乏時には低下し、亜鉛欠乏時には上昇する<sup>2)</sup>。鉄が欠乏する際には、体内では貯蔵鉄から消耗しはじめ、最終的にヘモグロビン鉄が減少していく<sup>3)</sup>。このことから、貯蔵鉄量を反映する血清フェリチン値のほうが、貧血の診断項目である血中ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値の低下前から変動し、鉄栄養状態を鋭敏に反映することが知られている<sup>4)</sup>。

平成15年から平成21年の国民健康・栄養調査でのみ血清フェリチン値を測定項目に採用していたが、貯蔵鉄の枯渇を示す30 ng/mLを下回る者の割合は、男性で10%程

度、女性では40%程度となっている(図1)。国際的には30 ng/mLを採用している国や組織が多いが<sup>5)</sup>、日本での基準値の最大値は日本鉄バイオサイエンス学会の12 ng/

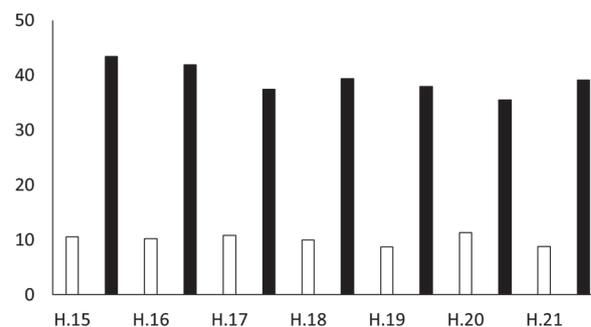


Figure 1. Prevalence of low iron storage (serum ferritin < 30 ng/ml) in Japan.

White bar shows the prevalence of low iron storage in men, and black bar shows the prevalence of low iron storage in women.

\*所在地：群馬県みどり市笠懸町阿左美606-7 (〒379-2392)

†連絡先：TEL: 0277-48-9127 E-mail: konomi-a@kiryu-u.ac.jp

mLである<sup>6)</sup>。日本の基準で判断すれば、鉄欠乏である者が少なく見積もられる恐れがある。

鉄栄養指標と亜鉛代謝指標の同時解析<sup>7)</sup>や、臨床的な症状や治療効果<sup>6)</sup>から、貧血患者では鉄が単独で欠乏している者だけでなく、亜鉛が同時に欠乏している者が相当の程度存在すると考えられる。

一般的な鉄栄養指標について鉄と亜鉛の欠乏状態が影響することと、鉄栄養状態には亜鉛栄養状態も大きく影響することを明らかにしてきた<sup>8,9)</sup>。しかし、亜鉛栄養状態が貯蔵鉄の状態に与える影響についてこれまでにほとんど報告がない。日本鉄バイオサイエンス学会の貧血治療指針でも、サラセミアと骨髄異形成症による無効造血に伴う鉄過剰が記載されているものの亜鉛欠乏の関与については記載がない<sup>6)</sup>。そこで、本報告では亜鉛欠乏が体内での貯蔵鉄の状態に及ぼす影響を明らかにするために、肝臓中および脾臓中の非ヘム鉄濃度について検討した。また、亜鉛欠乏時には食餌摂取量が低下することからPair-fed群を設定し、亜鉛欠乏自体の影響と摂食量の低下自体の影響について検討することとした。

## 1 実験方法

### 1-1 飼料組成

実験に用いた飼料はAIN-93G<sup>10)</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、EDTA溶液および超純水(Millipore

Table 1. Diet composition

| Ingredients            | Control*  | ZD       |
|------------------------|-----------|----------|
|                        | g/kg diet |          |
| α-Cornstarch           | 397.216   | 397.265  |
| Casein**               | 200       | 200      |
| Dextrinized cornstarch | 132       | 132      |
| Sucrose                | 100       | 100      |
| Soybean oil            | 70        | 70       |
| Fiber source           | 50        | 50       |
| Mineral mixture***     | 35        | 35       |
| AIN-93 Vitamin mixture | 10        | 10       |
| L-Cystine              | 3         | 3        |
| Choline bitartrate     | 2.5       | 2.5      |
| Tert-butylhydroquinone | 0.014     | 0.014    |
| Ferric citrate         | 0.21200   | 0.21200  |
| Zinc carbonate         | 0.05758   | 0.00863  |
| Total                  | 1000.000  | 1000.000 |

\*AIN-93G formulation

\*\*Mineral removed by EDTA wash

\*\*\*AIN-93G mineral mixture without ferric citrate and zinc carbonate

社; MilliQ) で洗浄した後に乾燥させて使用している<sup>1)</sup>。

### 1-2 実験方法

動物の飼育は室温 21 ± 2°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、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) および聖徳大学動物実験指針を遵守して行った (聖徳大学動物実験委員会承認番号: No. 154)。

Sprague-Dawley 系 3 週令雄ラット 30 匹を日本 SLC 社から購入して使用した。体重が等しくなるように、Control 群 (Control), 中等度亜鉛欠乏群 (ZD), pair-fed 群 (PF) に 10 匹ずつ群別した。

Control と PF には Table 1 に示した AIN-93G 標準飼料 (Zn 30 ppm), ZD には亜鉛欠乏食 (Zn 4.5 ppm) を与えた。PF 群のラットには、対になる ZD 群のラットが前日に摂取した飼料摂取量と同量の AIN-93G 標準飼料を給餌した。飲水にはイオン交換水を与え、ステンレス製ケージで 4 週間の個別飼育とした。

飼育 4 週間目に肝臓と脾臓を採取し、各組織中の熱可溶性非ヘム鉄分画および熱凝固性非ヘム鉄分画を測定した<sup>11)</sup>。試料溶液中鉄濃度の測定には、原子吸光法 (日立ハイテクノロジーズ社製 偏光ゼーマン原子吸光光度計 Z-2300 形フレーム専用機) を用いた。

### 1-3 統計処理

データは Brown-Forsythe ANOVA<sup>12)</sup>で検定後、Welch's t-test で検定した。全てのデータで危険率 5% 未満を有意とした。

## 2 結果および考察

体重あたりの臓器重量を Table 2 に示す。体重あたりの肝臓重量と脾臓重量は亜鉛欠乏による変化はなく、摂食量の低下により低下し、PF が他の 2 群に比べ有意に低下した。

臓器中熱可溶性非ヘム鉄分画および熱凝固性非ヘム鉄分画濃度を Table 3 に示す。肝臓中熱可溶性非ヘム鉄分画濃度は亜鉛欠乏により著しく増加し、摂食量の低下により減少した。3 群間のすべてに有意な差がみられた。Brown-

Table 2. Relative organ weights

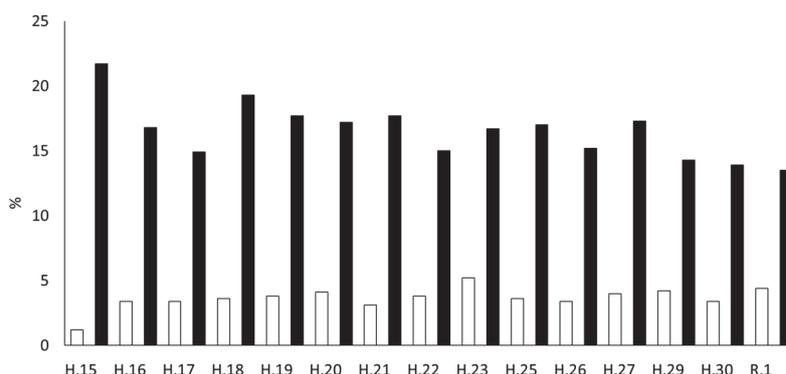
|         | Liver weight (g/g BW)    | Spleen weight (g/g BW)     |
|---------|--------------------------|----------------------------|
| Control | 2.97 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.203 ± 0.005 <sup>a</sup> |
| ZD      | 2.92 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.219 ± 0.012 <sup>a</sup> |
| PF      | 2.77 ± 0.06 <sup>b</sup> | 0.183 ± 0.006 <sup>b</sup> |

Values not sharing common superscript are significantly different (P < 0.05) by Welch's t-test after the Brown-Forsythe ANOVA (P < 0.05).

**Table 3.** non-heme iron concentration in liver and spleen

|         | Liver                  |                 | Spleen                   |                 |
|---------|------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|
|         | Supernatant (µg/g)     | Coagulum (µg/g) | Supernatant (µg/g)       | Coagulum (µg/g) |
| Control | 3.9 ± 0.1 <sup>a</sup> | 11.2 ± 0.2      | 26.9 ± 2.6 <sup>ab</sup> | 393 ± 63        |
| ZD      | 6.3 ± 0.5 <sup>b</sup> | 12.3 ± 0.5 n.s. | 26.4 ± 1.3 <sup>a</sup>  | 318 ± 59 n.s.   |
| PF      | 3.3 ± 0.2 <sup>c</sup> | 11.1 ± 0.3      | 30.8 ± 1.4 <sup>b</sup>  | 357 ± 44        |

Values not sharing common superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ), and “n.s.” shows no significant effect by the Brown-Forsythe ANOVA.



**Figure 2.** Prevalence of anemia (hemoglobin concentration < 12 g/dl) in Japan. White bar shows the anemia rate of men, and black bar shows the anemia rate of women.

Forsythe の ANOVA で有意ではなかったが ( $P=0.066$ ), 肝臓中熱凝固性非ヘム鉄分画濃度は亜鉛欠乏により増加する傾向がみられた (Control vs ZD  $P = 0.077$ , PF vs ZD  $P=0.061$ ). 亜鉛欠乏時, 特に飼料中鉄過剰が重なると, 肝臓中に鉄が蓄積することが報告されていたが, 2 要因実験によるものであり, 摂食量の低下の影響は除去されていなかった<sup>13)</sup>. フェリチンは耐熱性タンパク質であり, 熱可溶性非ヘム鉄分画は, ほぼフェリチン鉄に相当する<sup>11)</sup>. 摂食量の低下の影響を除いた今回の研究において亜鉛欠乏で肝臓中にフェリチン鉄が蓄積したことから, 亜鉛欠乏によって鉄利用が低下する可能性が示された。

肝臓中熱可溶性非ヘム鉄分画濃度は亜鉛欠乏により有意に増加していた。亜鉛欠乏により, 体内の鉄利用の低下が生じていると推察される。また, 亜鉛欠乏に伴うものではないが, 摂食量の低下により, 肝臓中熱可溶性非ヘム鉄分画濃度が有意に低下していることから, 全体的な栄養摂取状況の悪化により貯蔵鉄が減少することが確認された。

脾臓中熱可溶性非ヘム鉄分画濃度には, Brown-Forsythe の ANOVA で有意ではなかったが ( $P=0.218$ ), Control と ZD 間にほとんど差はみられず, PF で増加していた。ANOVA が有意でないので *post hoc* test は行うべきではないが, 仮に行った PF と ZD 間の Welch's t-test の結果は  $P=0.030$  であった。この結果は, Control の標準偏差が ZD と PF の約 2 倍であったので, 十分な検出力がなかったことに起因すると思われる。タンパク欠乏やタン

パク・エネルギー欠乏では, 脾臓に鉄が蓄積することが知られているので<sup>14, 15)</sup>, 今後, 摂食量の低下のみで脾臓に鉄蓄積が生ずるのかどうか検討する必要があるだろう。

### 3 まとめ

国民健康・栄養調査からもわかるように日本人の鉄摂取状況は望ましい状態ではない。平成 29 年から令和元年における年齢別鉄摂取量の中央値は調査時点で使用されていた日本人の食事摂取基準 (2015 年版) の推奨量と比較すると, 男性では 100% 程度になるのに対し, 女性では 65% に満たない。特に 30 歳未満においては 60% にも満たず, 女性の鉄摂取状況の悪さが顕著である。20 歳以上の被験者へ実施されている血液検査結果では, 貧血の診断基準である血中ヘモグロビン濃度 12 g/dL を下回る者の割合は男性で全年齢の 4% 前後なのに対し, 女性では 15% から 20% ほどと摂取状況と同じく女性のほうが鉄栄養状態の悪さが明らかである (図 2)。

本報告では, 臓器中の熱可溶性非ヘム鉄分画を測定した。肝臓中のフェリチン鉄は貯蔵鉄の意味合いが強いのにに対し, 脾臓中のフェリチン鉄は赤血球が破壊されて生じたものが主であると考えられる。肝臓中の熱可溶性非ヘム鉄分画濃度が, 亜鉛欠乏によって増加していたことから, 亜鉛栄養状態が体内での鉄利用において重要であると考えられる。

## 文 献

- 1) Konomi A, Yokoi K (2005) Zinc deficiency decreases plasma erythropoietin concentration in rats. *Biol Trace Elem Res* 107: 289-292.
- 2) 許斐亜紀, 横井克彦 (2013) 鉄・亜鉛の単独もしくは同時欠乏が血中脂質およびタンパク質検査値に与える影響. *Biomed Res Trace Elements* 24 : 7-12.
- 3) Herbert V (1987) Recommended dietary intakes (RDI) of iron in humans. *Am J Clin Nutr* 45: 679-686.
- 4) Cook JD, Finch CA (1979) Assessing iron status of a population. *Am J Clin Nutr* 32: 2115-2119.
- 5) Yokoi K, Konomi A (2017) Iron deficiency without anaemia is a potential cause of fatigue: meta-analysis of randomised controlled trials and cross-sectional studies. *Br J Nutr* 117: 1422-1431.
- 6) 日本鉄バイオサイエンス学会治療指針作成委員会 (2015) 鉄剤の適正使用による貧血治療指針 改訂第3版. 響文社, 札幌.
- 7) Yokoi K, Sandstead HH, Egger NG, Alcock NW, Sadagopa Ramanujam VM, Dayal HH, Penland JG (2007) Association between zinc pool sizes and iron stores in premenopausal women without anaemia. *Br J Nutr* 98: 1214-1223.
- 8) Konomi A, Yokoi K (2006) Effect of zinc and/or iron deficiency on rectal temperature in rats. *Biol Trace Elem Res* 109: 49-54.
- 9) 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* 18 : 281-285.
- 10) 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-76 A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
- 11) Yokoi K, Kimura M, Itokawa Y (1991) Determination of nonheme iron using inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Biol Trace Elem Res* 31: 265-279.
- 12) Brown MB, Forsythe AB (1974) The Small Sample Behavior of Some Statistics Which Test the Equality of Several Means. *Technometrics* 16: 129-132.
- 13) Zaslavsky B, Uthus EO (2002) Response of liver and heart trace elements in rats to the interaction between dietary zinc and iron. *Biol Trace Elem Res* 88: 165-183.
- 14) Ahmed SM, Kimura M, Itokawa Y (1988) Iron and zinc status of protein-energy malnourished rats. *Trace Nutrients Research (Kyoto)* 4: 121-126.
- 15) Borelli P, Blatt S, Pereira J, Beutler de Maurino B, Tsujita M, Cristina de Souza A, Guilherme Xavier J, Ambrósio Fock R (2007) Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *Br J Nutr* 97: 307-314.