

鉄欠乏性貧血の成因に関する研究

— Puromycin aminonucleoside 投与腎障害に由来する 実験的鉄欠乏状態の検討 —

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

藤 井 総 一 郎

(平成 5 年 11 月 25 日受稿)

Key words : urinary iron, renal injury, iron deficiency anemia,
Puromycin aminonucleoside, rat

緒 言

鉄欠乏性貧血は、潜在患者も含めると比較的高頻度にみられる疾患であり、その成因は鉄の摂取不足、鉄の喪失、鉄需要の増大に大別される¹⁾。しかし、詳細な検索にもかかわらず鉄欠乏の成因が不明な、いわゆる特発性とも言える症例が存在し、長期の観察中に再発を繰り返し難治化の経過を辿る場合が多い。それらは特発性鉄欠乏性貧血あるいは特発性低色素性貧血と総称される¹⁾。かかる鉄欠乏性貧血を招く病態は、半閉鎖系をなす鉄代謝の回路が負の平衡状態となるため、その主要因として鉄の過剰喪失が考えられる。男性や閉経後の女性では消化管出血、成人女性では性器出血が多く、その他に消化管粘膜²⁾³⁾⁴⁾、尿、皮膚上皮⁵⁾、汗⁶⁾⁷⁾、胆汁⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾からの喪失も無視することはできない。かかる観点から、1937年に Barer は臨床例の検討で尿中への鉄の喪失が特発性低色素性貧血の成因となることを報告し¹²⁾、1967年に木村は臨床例の検討と動物実験で胃液への鉄の喪失が鉄欠乏性貧血の成因となる可能性を示唆した¹³⁾¹⁴⁾。その後、教室の宮田は、deferoxamine 投与により強制的に尿中鉄排泄を亢進させると鉄欠乏性貧血の状態が再現できることを報告し¹⁵⁾、また、教室の中西は腎障害性のある Puromycin aminonucleoside (PAN)¹⁶⁾¹⁷⁾を動物に投与すると尿中への鉄排泄が亢進することを報告してい

る¹⁸⁾。そこで今回、特発性鉄欠乏性貧血の成因を解明する一環として、臨床的には顕著ではない腎障害状態のモデルを PAN 反復投与により作製し、尿中への鉄排泄を亢進させることにより鉄欠乏、さらに鉄欠乏性貧血が惹起されうる可能性について検討した。

対 象 と 方 法

1. 動物実験

動物実験は、Wistar 系ラット雄性で 6 週令の 24 匹 (150 g ~ 170 g) を用いた。

2. 実験群の設定と観察期間

PAN を反復投与した群 (PAN 群)、鉄欠乏食を投与した群 (ID 群)、鉄欠乏食投与と PAN を反復投与した群 (ID+PAN 群) 並びに、普通飼料を投与した対照群 (control 群) の 4 群を設定し、各群 6 匹ずつとした。

3. PAN 投与の設定

PAN 投与は中西の方法¹⁸⁾を参考にして、ラットにそれぞれ体重 100 g 当り 1 mg, 1.5 mg, 2 mg, 2.5 mg, 4 mg の PAN を尾静脈より投与した。PAN 4 mg を投与した群では、8 日目に 6 μ g/日の尿中鉄量と 60 mg/日の尿蛋白が一過性に認められたが、その他の群ではいずれも陰性であった。また、PAN 2.5 mg の反復投与では成長障害と肝の非ヘミン鉄量の増加が認められたことから、2.5 mg の反復投与では負荷が強すぎると考えられた。従って、長期投与を目的とする際の投与量は体重

100 g 当り1.5mgとして、2週間間隔で6回投与した。なお、control 群と ID 群には PAN の代わりに生理食塩水を投与した。

4. 飼育と器具の脱鉄処理

飼料は control 群、PAN 群には普通固形飼料(鉄含量0.02 g/100 g) (オリエンタル酵母株式会社製 MF) を用い、ID 群、ID+PAN 群には鉄欠乏飼料を用いた。給水は control 群、PAN 群には水道水を与え、ID 群、ID+PAN 群には脱イオン水を与えた。また、飼育には全群ステンレス製 cage を用い、尿の採取及び鉄測定にあたって使用した器具は希塩酸にて脱鉄処理を行い、再蒸留水にて洗浄したものを用いた。

5. 検体の採取

(1) 採尿

尿採取には、尿と便を別個に回収できる代謝 cage を用い、アルミニウム製の採尿用漏斗部分を脱イオン水で洗浄した後、パラフィンを塗布し使用した。採尿時ラットは24時間絶食としたが、脱イオン水は自由に与え、採尿は0, 3, 7, 11, 13週に行った。検体は24時間蓄尿したものを採取し、遠沈(室温, 1500 rpm, 10分)後、上清部分を尿中クレアチニン、尿蛋白、尿中铁、尿中トランスフェリン(Transferrin: Tf)の測定に供した。なお、便の混入が明かな検体は測定から除外した。

(2) 採血及び組織の摘出

PAN 投与開始後、0, 4, 8 週に24時間前より絶飲食として内頸静脈より採血し、血球数を算定した。また、第13週には、sodium pentobarbital (40mg/kgBW) を腹腔内投与して麻酔を行い、開腹後、下大静脈より採血し、血液生化学検査、血清鉄、総鉄結合能(total iron binding capacity: TIBC) を測定した。次いで、組織の摘出は門脈へ留置針を挿入後、糸で固定しへパリン加生理食塩水100mlから150mlを用いて灌流を行った後、肝、脾、腎、大腿骨を摘出した。組織鉄は肝、脾の非ヘミン鉄と肝フェリチン(Ferritin: Ft)分画鉄を測定し、大腿骨内の骨髓総鉄量測定と貯蔵鉄の半定量を行った。また、赤芽球内可溶性鉄顆粒数を算定した。腎は10%ホルマリン固定後パラフィン包埋し、Hematoxylin-eosin(H-E)染色と鉄染色を行い、

光顕観察に供した。

6. 検体の測定法

(1) 末梢血液像及び生化学検査

血球数の算定は自動血球計数装置にて行った。生化学検査は、クレアチニン、間接ビリルビン(ID-Bil), LDH, 網状赤血球数(Reti)を測定し、血清エリスロポエチン(S-Epo)は radioimmunoassay 法にて測定した。また、クレアチニンクリアランス(Ccr)を算定した。

(2) 尿蛋白の測定

尿蛋白は pyrogallol red 法に従って比色定量した。

(3) 血清鉄、尿中铁、TIBC の測定

血清鉄、尿中铁は松原による国際標準改良法¹⁹⁾に従って比色定量した。また、TIBC は Ramsay 法に準じた松原の変法²⁰⁾に従って比色定量した。

(4) 尿中 Tf の測定

尿中 Tf の測定は比色混濁法²¹⁾にて行った。すなわち、PBS にて希釈した検体に抗ラット Tf 抗体(Cappel 社)と反応用緩衝液(Hoechst 社)を加えて6分間反応後、生じた凝集をレーザーネフェロメーターにて840nmにおける散乱光の変化として計測した。

(5) 肝、脾の非ヘミン鉄量の測定

肝と脾の非ヘミン鉄量の測定は Brünckmann and Zondeck 加温ピロリン酸法²²⁾²³⁾に準じて行った。すなわち、採取した一定量の組織に飽和ピロリン酸 trichloro acetic acid (TCA) を加えて homogenate し、24時間放置した。100℃にて10分間加熱処理した後、冷却遠沈(3000rpm, 20分)して得られた上清部分を取り、再び沈査部分に飽和ピロリン酸 TCA を加え、同様の操作を行い上清部分を回収した。回収した上清にさらに飽和ピロリン酸 TCA を加え、全体を一定量として、その鉄量を飽和酢酸ナトリウム、ascorbic acid, O-phenanthroline methanol 溶液を用いて510μmにて比色定量し、単位重量当りの非ヘミン鉄量を算定した。

(6) 肝 Ft 分画鉄量の測定

肝 Ft 分画の分離は Linder and Munro の方法²⁴⁾に準じて行った。すなわち、採取した一定量の組織に3倍量の蒸留水を加えて homogenate し、75℃にて15分間加熱処理した後、冷却遠沈

(3500rpm, 30分)して得られた上清部分を肝 Ft 分画とした。鉄量は松原による国際標準改良法により比色定量し、単位重量当りの Ft 分画鉄量を算定した。

(7) 骨髓鉄量の測定

骨髓鉄量の測定は検体が微量であったため、原子吸光分析法²⁵⁾にて行った。まず、大腿骨より採取した骨髓の重量を測定後、濃硝酸を加え24

時間放置して溶解し、蒸留水にて希釈し試料とした。次に、鉄量を原子吸光法分析装置を用いて標準添加法にて測定した。すなわち、未知試料と4種類の濃度の異なる標準試料(0, 10, 20, 50 $\mu\text{g/l}$)をパイル型キュベット中で混合させ、50℃から100℃で30秒、100℃から120℃で30秒、120℃から200℃で10秒間乾燥し、さらに200℃から500℃で30秒、630℃にて30秒間灰化し、

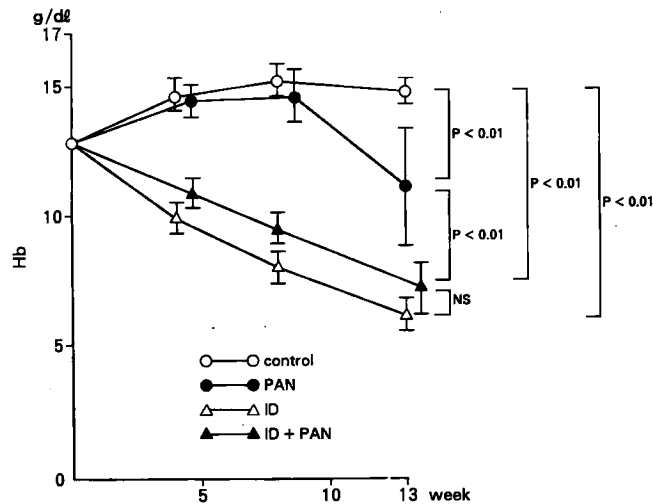


図1 全経過を通じての各群における Hb 値の変化

control: 対照群

PAN: Puromycin aminonucleoside (PAN) を反復投与した群

ID: 鉄欠乏食を投与した群

ID + PAN: 鉄欠乏食投与と PAN を反復投与を合わせて行った群

mean $\pm$ SD

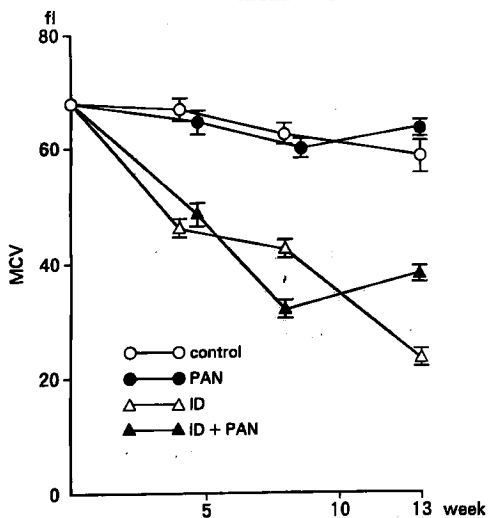


図2 全経過を通じての各群における MCV の変化

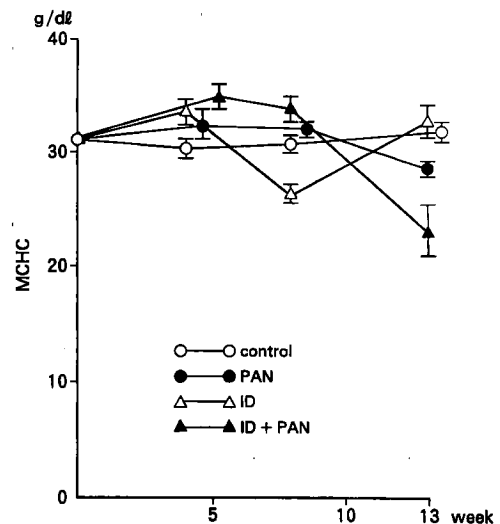


図3 全経過を通じての各群における MCHC の変化

表 1 第13週での各群における末梢血液検査及び各種生化学検査の比較

	control	PAN	ID	ID + PAN
S-Epo (mU/ml)	16.6 ± 2.0	21.7 ± 4.6*	670.3 ± 327.6**	265 ± 184.7*
Ccr/100 g BW (ml/min/100 g)	0.40 ± 0.06	0.45 ± 0.08	0.41 ± 0.09	0.41 ± 0.03
ID-Bil (mg/dl)	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.05	0.18 ± 0.04	0.10 ± 0.09
LDH (IU/l)	3180 ± 1080	2130 ± 790	3120 ± 860	3120 ± 950
Reticulocyte (%)	27 ± 3	81 ± 19**	140 ± 37**	137 ± 22**
WBC (/mm ³)	5900 ± 1300	6200 ± 1100	5100 ± 1000	6200 ± 2000
Plt (×10 ⁴ /μl)	69.5 ± 13.2	98 ± 22.5*	—	—

* P < 0.05 to control

** P < 0.01 to control

2700℃にて10秒間原子化を行い、その原子化部分を通過する時に生じる248nmにおける共鳴線の吸光現象を測定し、単位重量当りの鉄量を算出した。

(8) 骨髓貯蔵鉄の半定量

骨髓貯蔵鉄量は Rath and Finch の方法²⁶⁾に準じた原田の方法²⁷⁾に従い半定量した。すなわち、大腿骨より採取した骨髓の圧搾標本を作成し鉄染色を行い、原田の分類に従い grade 0 から 4 + までの 5 段階に分類した。

(9) 赤芽球内可溶性鉄顆粒数の算定

骨髓塗抹標本を Kaplan の変法²⁸⁾にて鉄染色し、赤芽球は正染性と多染性のものを観察した。赤芽球は100個観察し、胞体内の可溶性鉄顆粒数を算定して赤芽球 1 個当りの平均値を求めた。

7. 統計学的検討

結果の数値は全て mean ± SD にて表示し、検定には student's T 検定を用い、P value は p < 0.05 を統計学的に有意差ありと判定した。

結 果

1. 体重の変化

PAN 群、ID 群、ID + PAN 群において若干の体重増加に差が生じたものの、いずれの群でもほぼ同等の成長が認められた。

2. 末梢血液像及び血液生化学検査

Hb 値の変化は、第13週までの間、図 1 のごとく PAN 群では第 8 週まで変化は認められなかったが、第13週には control 群に比較して有意の低下が認められた (p < 0.01)。これに対して

ID 群及び ID + PAN 群では、第 4 週には control 群と比較していずれも有意の低下が認められ (p < 0.01, p < 0.01)、さらに第13週にかけ Hb 値の低下は進行したが、両群間には差が認められなかった。

MCV の変化は、図 2 のごとくであり第 4 週には ID 群、ID + PAN 群ともに小球性貧血を呈し、その後も進行した。一方、PAN 群では第13週に至り正球性貧血となった。

MCHC の変化は、図 3 のごとくであり第13週に至り PAN 群では低色素性貧血を呈した。

第13週における血液生化学検査では、表 1 のごとく、S-Epo は PAN 群、ID 群、ID + PAN 群では貧血に相応する上昇が認められたが、Ccr、ID-Bil、LDH は control 群と他の 3 群との間に差は認められなかった。一方、網状赤血球数は、control 群に比較して PAN 群、ID 群、ID + PAN 群で有意の増加が認められた (p < 0.01, p < 0.01, p < 0.01)。白血球数は control 群と他の 3 群の間に差は認められず、血小板数は、control 群に比較して PAN 群では軽度の増加が認められた (p < 0.05)。

3. 尿蛋白量

第13週までの 1 日当りの尿蛋白量の変化は、図 4 のごとく PAN 群では第 3 週より尿蛋白は陽性となり、その後、徐々に増加し、第11週以降 plateau となった。また、ID + PAN 群では PAN 群と同様、第 4 週より尿蛋白は陽性となったが PAN 群に比較して変化は軽度で、しかも第11週から第13週にかけては減少傾向を示した。

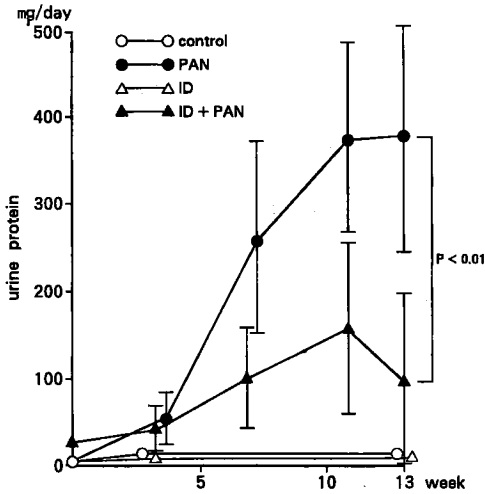


図4 全経過を通じての各群における1日当りの尿蛋白量の変化

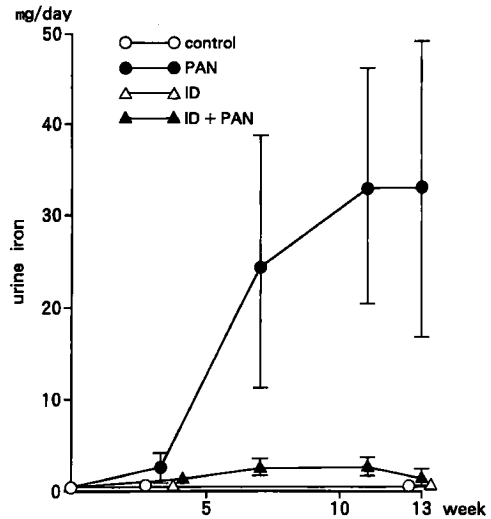


図5 全経過を通じての各群における1日当りの尿中鉄量の変化

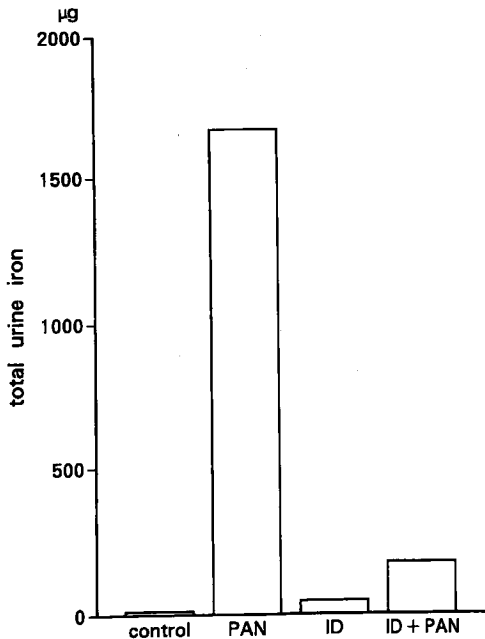


図6 全経過を通じての各群における尿中鉄量の累積の比較

ID + PAN 群の尿蛋白量は、第13週には control 群に比べ有意に増加したものの、PAN 群に比較すると有意に低値であった ($p < 0.01$)。なお、control 群と ID 群には尿蛋白は認められなかった。

4. 尿中鉄量

第13週までの1日当りの尿中鉄量の変化は、図5のごとく PAN 群では control 群に比較して第3週より有意な増加が認められ ($p < 0.01$)、その後著明に増加し、第11週以降 plateau となった。一方、ID + PAN 群では PAN 群に比較すると全体に尿中鉄量は低値を示し、第7週より尿中鉄が検出されたもののその後変化はなく、第11週以降は減少傾向を示し、第13週には control 群との間に差は認められなくなった。なお、ID 群では control 群と同様、尿中鉄は認められなかった。

全経過を通じての尿中鉄量の累積は、図6のごとく ID + PAN 群の150 μg に比して、PAN 群では1700 μg と著明に高値であった。

5. 尿中 Tf

第13週における1日当りの尿中 Tf 量は、図7-Aのごとく ID + PAN 群では PAN 群に比較してやや低値を示した ($p < 0.05$)。なお、control 群と ID 群では測定感度以下であった。TIBC/Tf 比²⁹⁾より算定した尿中鉄飽和率は、PAN 群では $74.0 \pm 11.0\%$ となった。また、ID + PAN 群では尿中 Tf は認められるものの尿中鉄値が低値であるため、鉄飽和率は極めて低値となることが推定された。

第13週に普通飼料を投与した群(control 群と PAN 群)を対象として尿中鉄と尿中 Tf の関係を検討したところ、図7-Bのごとく尿中鉄の増加に従い尿中 Tf は増加し、両者間には $r = 0.99$ の強い正の相関が認められた。

6. 血清鉄, TIBC, 血清鉄飽和率

第13週に血清鉄を検討したところ、図8-Aのごとく、PAN 群では control 群に比較して有意な低下が認められ($p < 0.05$)、ID 群と ID + PAN 群ではさらに著明な低下が認められた($p <$

0.01 , $p < 0.01$)。しかし、ID 群と ID + PAN 群の間に差は認められなかった。

TIBC は、図8-Bのごとく PAN 群で control 群に比較して有意な低下が認められ($p < 0.01$)、ID 群では有意な上昇が認められた($p < 0.01$)。

血清鉄飽和率は、図8-Cのごとく PAN 群では control 群に比較して有意の上昇が認められたが ($p < 0.01$)、ID 群と ID + PAN 群は control 群に比較して有意な低値を示した ($p < 0.01$, $p < 0.01$)。なお、PAN 群では尿中鉄飽

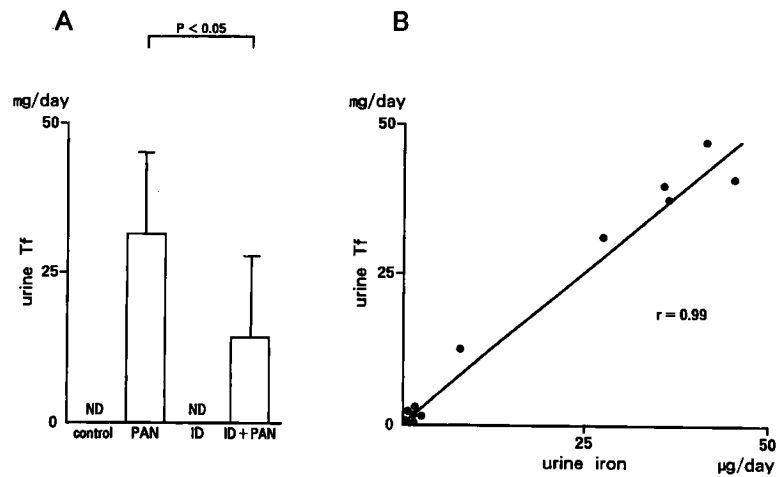


図7 第13週での A. 各群における1日当りの尿中 Tf 量の比較, B. 普通飼料を投与した群 (control+PAN) を対象とした時の尿中鉄量と尿中 Tf 量の関係 ND: not detectable

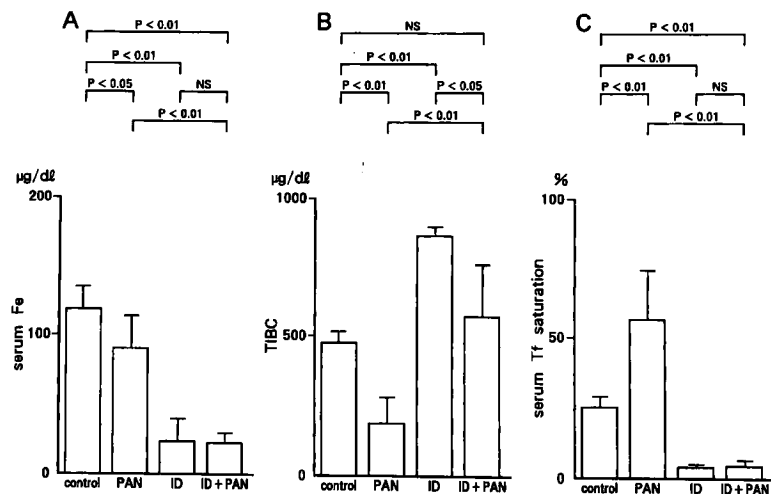


図8 第13週での各群における A. 血清鉄, B. TIBC, C. 血清鉄飽和率の比較

和率と比較的近似値を認めた。

7. 組織非ヘミン鉄量, 肝 Ft 分画鉄量

第13週での肝重量1g当りの非ヘミン鉄量の検討では, 図9-AのごとくPAN群ではcontrol群に比較して有意の減少が認められ($p < 0.01$), ID群とID + PAN群ではさらに有意な減少が認められた($p < 0.01$, $p < 0.01$)。しかし, ID群とID + PAN群の間に差は認められなかった。さらに, 肝重量1g当りのFt分画の鉄量は, 図9-Bのごとく肝非ヘミン鉄量と同様, PAN群ではcontrol群に比較して有意な減少が認められ($p < 0.01$), ID群とID + PAN群ではさらに有意な減少が認められた($p < 0.01$, $p < 0.01$)。

また, 脾重量0.5g当りの非ヘミン鉄量は, 図9-CのごとくID群とID + PAN群ではcontrol群に比較して有意に著明な減少が認められたもの($p < 0.01$, $p < 0.01$), PAN群ではcontrol群と比較して差は認められなかった。

8. 骨髓鉄量, 赤芽球内可溶性鉄顆粒数

第13週での重量10mg当りの鉄量は, 表2のごとくPAN群ではcontrol群に比較して有意な減少が認められ($p < 0.05$), ID群とID + PAN群にも同様に, 有意な減少が認められた($p < 0.01$, $p < 0.01$)。なお, 鉄量はPAN群, ID群, ID + PAN群の順に減少していた。

骨髓貯蔵鉄量については, 原子吸光法ではヘム鉄の影響を受けるため骨髓圧挫鉄染色標本を

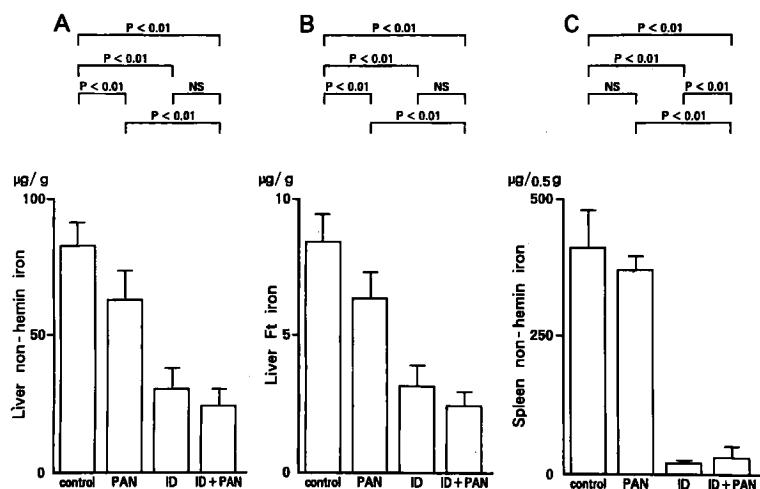


図9 第13週での各群における A. 肝重量1g当りの非ヘミン鉄量, B. 肝重量1g当りのFt分画鉄量, C. 脾重量0.5g当りの非ヘミン鉄量の比較

表2 第13週での各群における原子吸光法による骨髓重量10mg当りの鉄量, 骨髓圧挫標本鉄染色による貯蔵鉄量(原田の分類), 赤芽球1個当りの可溶性鉄顆粒数の比較

		control	PAN	ID	ID + PAN
原子吸光法	($\mu\text{g}/10\text{mg}$)	17.70 ± 4.11	$9.92 \pm 2.32^{**}$	$5.38 \pm 1.47^*$	$1.68 \pm 0.59^*$
圧挫標本 鉄染色 (原田の分類)	0	—	—	6	6
	1+	—	5	—	—
	2+	6	1	—	—
	3+	—	—	—	—
	4+	—	—	—	—
赤芽球可溶性鉄顆粒数 (/cell)		0.47 ± 0.20	0.30 ± 0.08	$0.08 \pm 0.03^*$	$0.05 \pm 0.02^*$

* $P < 0.01$ to control

** $P < 0.05$ to control

原田の分類で半定量し、同時に赤芽球内の可溶性鉄顆粒数を検討した。貯蔵鉄量は重量当りの鉄量と同様に、PAN 群では control 群に比較して減少し、ID 群と ID + PAN 群ではさらに著明な減少が認められた。また、可溶性鉄顆粒数は、ID 群と ID + PAN 群で control 群に比較して有意な減少が認められたものの ($p < 0.01$, $p < 0.01$)、PAN 群と control 群の間に差は認められなかった。

9. 組織学的検討

H-E 染色標本では、PAN 群と ID + PAN 群で種々の程度の腎障害が認められた。強拡大 ($\times 400$) 所見では、PAN 群で糸球体に分節性硬化や硝子様物質の沈着、細胞浸潤が認められ、尿細管には上皮細胞の萎縮、管腔の拡大と管腔内に硝子様物質の存在が認められた。また、間質には線維化と細胞浸潤が観察された。ID + PAN 群では糸球体の分節性変化と尿細管の管腔内に硝子様物質が認められるものの頻度は少なく、所見も軽度であった。

鉄染色標本における強拡大 ($\times 1000$) 所見では、頻度は少ないものの、PAN 群の一部の近位尿細管上皮内に可溶性鉄顆粒が認められたが、糸球体、遠位尿細管、集合管には鉄顆粒は観察されなかった。

考 察

生体における鉄の代謝は閉鎖循環系が形成され、しかも、ごく微量の鉄の吸収と排泄により調節されている³⁰⁾³¹⁾³²⁾。かかる閉鎖系が破綻し鉄喪失を過剰に生じた時、鉄欠乏が生じることが想定されるが、腎障害時には、尿中へ鉄が排泄されることが報告されている¹⁸⁾。そこで、著者は腎障害が存在するものの臨床的には明瞭でない場合に、尿中への鉄排泄が持続すると鉄欠乏状態、さらに鉄欠乏性貧血が惹起される可能性を想定して、ラットに少量の PAN を 2 週間間隔で 13 週間投与した。その結果、第 3 週より尿中鉄排泄が認められ、第 13 週には貧血の出現と血清鉄の低下、肝と骨髓での貯蔵鉄の減少が認められた。かかる貧血は正球性低色素性貧血で TIBC は低下していた。さらに本実験では腸管からの鉄吸収による代償を除く目的で、鉄欠乏

食投与と PAN の反復投与の両方を行う群 (ID + PAN 群) を設け検討したところ、第 3 週より尿中への鉄排泄亢進を生じたが PAN 群と比較して排泄は少量で、ID 群に比較すると骨髓鉄の低下は認められたものの Hb 値と血清鉄や肝の貯蔵鉄には差は認められなかった。

まず貧血に関して、PAN 群に生じたそれは正球性低色素性であり、TIBC は低値で典型的な鉄欠乏性貧血とは言い難かった。そこでさらに、PAN 群の貧血に対する他因子の影響を検討したところ、S-Epo と網状赤血球数は、貧血を生じた 3 群では貧血に相応する上昇が認められたが、Ccr, ID-Bil, LDH, 白血球数は 4 群間に差は認められなかった。従って、PAN 群の貧血には腎不全、溶血、骨髓抑制、炎症等の関与は少ないことが推測された。鉄欠乏性貧血においても貧血が軽度な時期には、MCV や MCHC に変化を認めないこと³³⁾もあるので、PAN による貧血に貯蔵鉄の低下が何らかの関連を有することも推定された。なお、PAN 群では血小板数は軽度上昇を示しており、これは鉄欠乏性貧血に併発しやすい所見で、IL-6 の関与等も考えられ興味深い点であった³³⁾。

次に、貯蔵鉄に関して、従来、鉄欠乏を生じる時、貯蔵鉄の中でも Ft 分画の鉄が利用され減少し、次いでヘモジデリン (Hemosiderin : Hd) 分画の鉄が減少すると報告されている³⁴⁾。しかし、本実験では、肝 Ft 分画鉄量は、いずれの群においても肝の非ヘミン鉄量と同様の減少傾向を示し、組織鉄内でも Ft 分画と Hd 分画の間に一定の平衡が成立しつつ血中への動員が行われていることが推定された。また、骨髓鉄では、その減少は圧搾標本による半定量では ID 群と ID + PAN 群において顕著で、原子吸光法では ID + PAN 群で最も顕著であった。これに対して、Hb 値と赤芽球内可溶性鉄顆粒数は ID 群と ID + PAN 群の間に差は認められなかった。この点に関して、in vitro で PAN により培養細胞の Tf-receptor の messenger-RNA の発現が促進された報告があり³⁵⁾、詳細は不明であるが、赤芽球における Tf-receptor の増加が鉄欠乏をある程度相殺する可能性が考えられるかもしれない。

生理的状态での鉄排泄は微量で1 mg/日以下とされ³⁶⁾, 尿中への排泄はさらに微量で鉄代謝に対し, ほとんど影響を及ぼすことはない³⁷⁾. しかし, 本実験では PAN の反復投与により腎障害を惹起し蛋白尿と同時に尿中への鉄排泄が認められた. この現象は Alfrey により報告されており, 彼はラットに PAN を投与すると一過性に尿蛋白とともに尿中铁を生じることを見だし³⁸⁾, 山谷もラットへの PAN の連日投与により一過性に尿中铁を生じることを報告している³⁹⁾. また, 腎障害と尿中铁や尿中 Tf との関連について, 臨床での研究も散見され⁴⁰⁻⁴⁵⁾. Wiltink は腎障害のある臨床例の検討で, 血清鉄飽和率が尿中の鉄飽和率と近似することを報告し, 尿中铁が Tf に結合して排泄されることを推論している⁴⁶⁾. これは著者の結果に一致するものであろう. さらに, 尿中に排泄された鉄が血尿由来のヘム鉄である可能性も考えられるので, 検体を濃縮して尿中 Hb の定量を試みたが, 結果は検出感度以下であり, 排泄鉄量に相応する Hb は認められず, その量は微量であると推定された. また, 同一検体で全尿と尿上清部分の鉄量を比較したところ, 両者間に差が認められなかったことから, 沈査中に存在する上皮内の鉄も少量であると考えられた. 本実験から, PAN 群で尿蛋白と尿中铁において類似する変動が認められたこと, 第13週には尿中铁と尿中 Tf の間に正の強い相関が認められたこととも合わせて考えると, Wiltink の推論のごとく, 軽度の腎障害時には, 腎からの出血や尿路から剥離した上皮細胞を介して鉄は尿中へ排泄されるのではなく, Tf 鉄として排泄され则认为すべきであろう.

また, TIBC, すなわち血中 Tf は, 第13週には PAN 群で低値となった. その原因に腎障害に伴う尿中への喪失や PAN の直接作用である蛋白合成障害作用⁴⁷⁾等が考えられたが, 血清中に低蛋白は認められず, 単なる尿への喪失がその主因であると推定された. 体内鉄は Tf 鉄として組織間を常に移動し, 造血や鉄貯蔵に利用されており, 低 Tf 血症が二次的に鉄欠乏状態をもたらした可能性も考えられた.

一方, 今回の実験において PAN 群より鉄欠乏の強い ID + PAN 群では, PAN 群に比べ尿

蛋白は半分以下で, 病理所見上も腎障害が軽度であった. この成績は, nephrotoxic serum nephritis の動物モデルを用いて, 鉄欠乏状態を示す方が腎障害が軽度であるとする Alfrey の報告⁴⁸⁾に一致する結果であった. また, 一般に, 組織障害には活性酸素や free radical が関与しており, 活性酸素のうち hydrogen peroxide は Fe^{2+} の存在下で hydroxyl radical となり, 強い細胞障害性を有し組織障害を及ぼすとされている⁴⁹⁾. 恐らく, PAN による腎障害の発症機序においても鉄の存在が関与することを示唆しているものと推定される.

鉄欠乏性貧血の成因には鉄の過剰喪失があり, 原因で頻度の高いものは消化管出血と性器出血で, いずれも出血の形をとるヘム鉄の喪失である¹⁾. しかし, 吸収障害も出血も認められず, 原因不明のまま再発を繰り返す難治例があり, かかる鉄欠乏性貧血は特発性鉄欠乏性貧血もしくは特発性低色素性貧血として総括される¹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾. その1例にスポーツマンに生じるスポーツマン貧血⁵²⁾があり, 汗, 尿への鉄の喪失が成因となる可能性が想定され種々の検討が行われている⁶⁾⁷⁾. 教室の木村は, 鉄欠乏性貧血の難治例における発症と再発に, 消化管粘膜や尿からの非ヘム鉄の喪失が成因となりうる可能性を想定し, 臨床例や動物実験例にて検討を行ない¹³⁾¹⁴⁾, それが原因となる鉄欠乏性貧血を鉄漏出性貧血 (Iron-losing anemia)⁵³⁾⁵⁴⁾と呼ぶことを提唱している. 教室の宮田はラットに deferoxamine を5週間連日投与すると尿中へ鉄排泄が持続し, 鉄欠乏と貧血を生じることを報告し¹⁵⁾, 次いで, 教室の中西はラットに中等量の PAN を反復投与して尿中の鉄排泄と貧血が出現することを報告している¹⁸⁾. さらに, 伊藤はラットに adriamycin を隔日2回投与し腎障害を生じさせ, 尿中铁の排泄亢進とその後, 一過性に血清鉄の低下を生じることを報告しており⁵⁵⁾, それらの報告は木村の提唱する鉄漏出性貧血の概念を支持する結果であると思われる. また, 臨床例の検討では, 透析が行われていない慢性腎不全の患者においては, 貯蔵鉄の減少をきたすことも報告されており⁵⁶⁾, 今回, 尿中への Tf 鉄の喪失が鉄欠乏を惹起し貧血を生じた成績とあわせると, 尿路系

からの鉄喪失が鉄欠乏の成因となりうることが考えられた。

本実験より尿への鉄喪失が鉄欠乏性貧血の成因となる可能性が示唆されたことにより、臨床病態においても生体からの非ヘミン鉄の喪失が鉄欠乏性貧血の成因となりうる可能性があり、今後より詳細な検討が行われることが望まれる。

結 論

特発性鉄欠乏性貧血の成因とその難治化の機序解明目的として、実験動物に腎障害性薬剤である Puromycin aminonucleoside (PAN) の少量を反復投与して尿中への鉄排泄状態の亢進が長期間持続するモデルを作製し、その際の末梢血及び組織鉄を測定した。

1. PAN 群では control 群に比較して第3週以降、尿蛋白と尿中鉄が、ともに有意に増加し ($p < 0.01$, $p < 0.01$)、第13週には control 群と PAN 群において尿中鉄と尿中 Tf の間に強い正の相関 ($r = 0.99$) が認められた。また、PAN 群で第13週の血清と尿中での鉄飽和率は近

似していた。

2. PAN 群では control 群に比較して、第13週で血清鉄の低下と貯蔵鉄の減少が認められ、かつ、末梢血では正球性低色素性貧血を呈した。

3. ID + PAN 群では PAN 群に比較して、尿中への鉄喪失は少量で、早期よりの貧血の出現が認められたものの、Hb 値では第13週でも ID 群との間に差は認められなかった。

以上より、尿への Tf 鉄の喪失により鉄欠乏状態と貧血が惹起されることが判明し、鉄欠乏性貧血の臨床例では腎障害は認められないものの、長期間にわたる尿中への非ヘミン鉄の喪失が特発性鉄欠乏性貧血の一因となりうることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深謝致しますとともに、終始懇切なる御指導と助言をいただいた国立療養所南岡山病院高橋 清先生、宗田 良先生、教室の木村文昭助手に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Wintrobe MM : Clinical Hematology, 9th ed., Lea and Febiger, Philadelphia (1993) pp 808-839.
- 2) Croby WH : Control of iron absorption by internal mucosa. Am J Clin Nutri (1968) **21**, 1189-1193.
- 3) Conrad ME and Crosby WH : Intestinal mucosal mechanisms controlling iron absorption. Blood (1963) **22**, 406-415.
- 4) Nathanson MH, Muir A and McLaren GD : Iron absorption in normal and iron-deficient beagle dogs : mucosal iron kinetics. Am J Physiol (1985) **249**, 439-448.
- 5) Weitraub LR, Demis DJ, Conrad ME and Crosby W H : Iron excretion by the skin. selective localization of iron 59 in epithelial cells. Am J Pathol (1964) **46**, 121-127.
- 6) Poulev PE, Jordal R and Pedersen NS : Dermal excretion of iron in intensely training athletes. Clin Chim Acta (1983) **127**, 19-27.
- 7) Aruoma OI, Reilly T, McLaren D and Halliwell B : Iron, copper and zinc concentrations in human sweat and plasma : the effect of exercise. Clin Chim Acta (1988) **177**, 81-88.
- 8) Raedsch R, Stiehl A, Walker S, Thelmann L, Kommerell B, Waldherr R and Senn M : Biliary excretion of iron in healthy man and in patients with alcoholic cirrhosis of the liver. Clin Chim Acta (1990) **193**, 49-54.
- 9) Hultcrantz R, Angelin B, Björn-Rasmussen E, Ewerth S and Einarsson K : Biliary excretion of iron and ferritin in idiopathic hemochromatosis. Gastroenterology (1989) **96**, 1539-1545.
- 10) Schümann K, Schäfer SG and Forth W : Iron absorption and biliary excretion of transferrin in rats. Res Exp Med (1986) **186**, 215-219.

- 11) Greenberg DM, Copp DH and Cuthbertson EM : Studies in mineral metabolism with the aid of artificial radioactive isotopes 7 the distribution and excretion, particularly by way of the bile, of iron, cobalt, and manganese. *J Biol Chem* (1942) **147**, 749—756.
- 12) Barer AP and Fowler WM : Urinary iron excretion. *J Lab Clin Med* (1937) **23**, 148—155.
- 13) Kimura I and Yamana M : The iron content of gastric juice : In relation to the cause of idiopathic hypochromic anemia. *Acta Med Okayama* (1967) **21**, 177—183.
- 14) 木村郁郎, 山名正俊, 西下 明 : 胃粘膜の鉄排泄における粘膜平衡. *医学と生物学* (1969) **79**, 247—252.
- 15) 宮田 明 : 鉄欠乏性貧血の成因に関する研究 第2編 鉄過剰排泄による実験的貧血. *岡山医誌* (1978) **90**, 1029—1039.
- 16) Glasser RJ, Velosa JA, and Michael AF : Experimental model of focal sclerosis 1. Relationship to protein excretion in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* (1977) **36**, 519—526.
- 17) Velosa JA, Glasser RJ, Nevins TE and Michael AF : Experimental model of focal sclerosis. II. Correlation with immunopathologic changes, macromolecular kinetics, and polyanion loss. *Lab Invest* (1977) **36**, 527—534.
- 18) 中西徳彦 : 鉄欠乏性貧血の発症要因に関する研究 第2編 鉄漏出性貧血の動物モデル作製の試みとその評価. *岡山医誌* (1992) **103**, 813—821.
- 19) International Committee for Standardization in Haematology : Recommendations for measurement of serum iron in human blood. *Br J Haematol* (1978) **38**, 291—294.
- 20) 松原高賢 : 生物学的材料特に血清並びに血液の鉄の定量法に関する研究. *日血会誌* (1961) **24**, 434—452.
- 21) Ritchie RF, Alper CA, Graves J, Pearson N and Larson C : Automated quantitation of proteins in serum and other biologic fluids. *Am J Clin Pathol* (1973) **59**, 151—159.
- 22) Brunckmann G and Zondeck SG : An improved method for the determination of non-hemin iron. *J Biol Chem* (1940) **135**, 23—30.
- 23) 増田正典, 滝野辰郎, 高田 洋, 大前典俊, 入江和夫, 大川原康夫, 辻 俊三, 島田恒弘, 西村二郎, 藤田圭吾, 野島 豊, 河谷貞佳 : 放射性鉄を用いた組織非ヘミン鉄代謝の研究 : 実験術式とその検討. *日新医学* (1960) **47**, 765—775.
- 24) Linder MC and Munro HN : Assay of tissue ferritin. *Anal Biochem* (1972) **48**, 266—278.
- 25) Salvin W : Atomic absorption spectroscopy. Interscience Publishers, New York (1969) pp 159—163.
- 26) Rath CE and Finch CA : Sternal marrow hemosiderin. *J Lab Clin Med* (1948) **33**, 81—86.
- 27) 原田契一 : 骨髓貯蔵鉄の検査法とその鉄欠乏性貧血診断法としての意義. *臨床血液* (1976) **17**, 737—741.
- 28) Kaplan E, Zuelzer WW and Mouriquand C : Sideroblasts : A study of stainable nonhemoglobin iron in marrow normoblasts. *Blood* (1954) **9**, 203—213.
- 29) 前畑英介, 滝本泰博 : 血清鉄, 鉄結合能. *Medical Technology* (1983) **11**, 1000—1005.
- 30) Finch CA : Body iron exchange in man. *J Clin Invest* (1959) **38**, 392—396.
- 31) Price DC, Cohn SH, Wasserman LR, Reizenstein PG and Cronkite EP : The determination of iron absorption and loss by whole body counting. *Blood* (1962) **20**, 517—531.
- 32) Finch CA and Cook JD : Iron deficiency. *Am J Clin Nutri* (1984) **39**, 471—477.
- 33) Ishibashi T, Kimura H, Shikama Y, Uchida T, Kariyone S, Hirano T, Kisimoto T, Takatsuki F, and Akiyama Y : Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* (1989) **74**, 1241—1244.
- 34) 吉田幹男 : 鉄欠乏ラットにおける造血と貯蔵鉄量について. *福島医誌* (1987) **37**, 495—503.
- 35) Koeller DM, Horowitz JA, Casey JL, Klausner RD and Harford JB : Translation and the stability of mRNAs encoding the transferrin receptor and c-fos. *Proc Natl Acad Sci USA* (1991) **88**, 7778—

- 7782.
- 36) Green R, Charlton R, Seftel H, Bothwell T, Mayet F, Adams B, Finch CA and Layrisse M : Body iron excretion in man : A collaborative study. *Am J Med* (1967) **45**, 336—353.
 - 37) Tavenier P, Raaijmakers CE, Van Eijk HG and Leijnse B : Determination of iron and transferrin in normal human urines. *Clin Chim Acta* (1971) **32**, 63—66.
 - 38) Alfrey AC and Hammond WS : Renal iron handling in the nephritic syndrome. *Kidney Int* (1990) **37**, 1409—1413.
 - 39) 山谷真己, 樋口 晃, 岡田敏夫 : ネフローゼ症候群における尿中微量金属の排泄動態についての検討. *日小会誌* (1988) **92**, 1286—1293.
 - 40) Ellis D : Anemia in the course of the nephritic syndrome secondary to transferrin depletion. *J Pediatr* (1977) **90**, 953—955.
 - 41) Hancock DE, Onstad JW and Wolf PL : Transferrin loss into the urine with hypochromic, microcytic anemia. *Am J Clin Pathol* (1976) **65**, 73—78.
 - 42) Brown EA, Sampson B, Muller BR and Curtis JR : Urinary iron loss in the nephritic syndrome—unusual cause of iron deficiency with a note on urinary copper losses. *Postgrad Med J* (1984) **60**, 125—128.
 - 43) Dagg JH, Smith JA and Goldberg A : Urinary excretion of iron. *Clin Sci* (1966) **30**, 495—503.
 - 44) Warshaw BL, Check IJ, Hymes LC and Dirusso SC : Decreased serum transferrin concentration in children with the nephrotic syndrome : Effect on lymphocyte proliferation and correlation with serum immunoglobulin levels. *Clin Immunol Immunopathol* (1984) **33**, 210—219.
 - 45) Rifkind D, Kravetz HM, Knight V and Schade AL : Urinary excretion of iron-binding protein in the nephrotic syndrome. *N Engl J Med* (1961) **265**, 115—118.
 - 46) Wiltink WF, Van Eijk HG, Bobeck-Rutsaert MM, Gerbrandy J and Leijnse B : Urinary iron excretion in nephrotic syndrome. *Acta Haematol* (1972) **47**, 269—276.
 - 47) Nathans D : Puromycin inhibition synthesis : in corporation of puromycin into peptide chains. *Proc Natl Acad Sci* (1964) **51**, 585—592.
 - 48) Alfrey AC, Froment DH and Hammond WS : Role of iron in the tubulo-intestinal injury in nephrotoxic serum nephritis. *Kidney Int* (1989) **36**, 753—759.
 - 49) Biemond P, Swaak AG, Van Eijk HG and Koster JF : Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radical Biol & Med* (1988) **4**, 185—198.
 - 50) Beveridge BR, Bannerman RM, Evanson JM and Witts LJ : Hypochromic anemia. *Q J Med* (1965) **134**, 145—161.
 - 51) Witts LJ : Hypochromic Anaemia. Fa Davis Co, Philadelphia (1969) pp 61—65.
 - 52) Lampe JW, Slavin JL and Apple FS : Poor iron status of women runner training for a marathon. *Int J Sports Med* (1986) **7**, 111—114.
 - 53) 木村郁郎 : 鉄欠乏性貧血. *内科* (1972) **29**, 1278—1283.
 - 54) 木村郁郎 : 鉄欠乏性貧血の成因に関する研究 — 鉄排泄試験と Iron-losing anemia —. *Blood & Vessel* (1976) **2**, 133—136.
 - 55) 伊藤敦子, 伊藤金次 : 腎障害時の金属代謝に関する研究. *炎症* (1987) **7**, 187—191.
 - 56) Milman N, Bangsbøll S, Pedersen NS and Visfeldt J : Serum ferritin in non-dialysis patients with chronic renal failure : Relation to bone marrow iron stores. *Scand J Haematol* (1983) **30**, 337—344.

**The pathogenesis of iron deficiency anemia :
Experimental iron deficiency derived from
renal injury induced by Puromycin aminonucleoside**

Soichiro FUJII

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

To clarify the pathogenesis of idiopathic iron deficiency anemia, small amounts of Puromycin aminonucleoside (PAN) which is known to be nephrotoxic, was administered repeatedly to induce continuous urinary iron excretion in rats.

Urinary iron, serum iron, stored iron content and hemoglobin concentration were investigated.

Urinary iron excretion was increased by PAN administration along with increased excretion of urinary transferrin. Consequently, a large amount of urinary iron seemed to be excreted in the form of transferrin iron. Further, a decrease in serum iron and stored iron was observed with respect to continuous urinary iron excretion, manifesting normocytic hypochromic anemia at 13th week.

These results suggest that prolonged loss of small amounts of iron through the urinary tract causes iron deficiency without clinical manifestation of renal failure.