

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

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

中 西 徳 彦

(平成 3 年 3 月 22 日受稿)

Key words : iron deficiency anemia, iron-losing anemia, puromycin aminonucleoside

緒 言

体内鉄量が常に一定に保たれていることについては、以前より吸収段階の調節機構が考えられており、Hahn¹⁾ と Granick²⁾ らの mucosal block theory 以来多くの検討がなされているが、体外への鉄の排泄による調節機構は充分検討されてはいない。鉄欠乏性貧血の原因についても鉄喪失は消化管出血や月経過多による失血以外には考えられておらず、鉄排泄過剰による貧血という病態はほとんど考えられていない。しかし、明らかな出血源が存在しないにもかかわらず ⁵⁹Fe を用いた whole body iron counting で正常人に比し ⁵⁹Fe の体内からの減少の早い鉄欠乏性貧血症例が存在することも報告されている³⁾。かかる症例は従来の検査法では検出できない程度の微量の出血があるものと考えられているが、教室の木村は消化管粘膜の鉄の吸収と排泄の検討から粘膜内外の鉄量の動態による粘膜平衡 mucosal equilibrium の存在を想定し、その破綻による鉄漏出性貧血 iron-losing anemia なる概念を提唱した⁴⁻⁶⁾。

教室の宮田は幼若ラットに鉄のキレート剤である desferrioxamine を投与することにより、非ヘミン鉄の尿中への喪失を惹起させそれにより実験的に肝臓内非ヘミン鉄の減少を伴う低色素性貧血モデルが作製できることを示した⁷⁾。この非ヘミン鉄の過剰排泄による鉄欠乏性貧血のモデルは木村の提唱する鉄漏出性貧血 iron-

losing anemia⁴⁾ の存在の可能性を支持するものと思われる。しかし、直接的に鉄をキレートする薬剤である desferrioxamine による鉄欠乏状態のモデルは、鉄漏出性貧血のモデルとはいえない。筆者は第 1 編において Puromycin aminonucleoside (PA) 投与におけるネフローゼモデル⁸⁾では含糖酸化鉄の尿中へのクリアランスが著明に亢進していることを示した。そこで PA を長期少量投与して軽微な腎障害を惹起させると尿中へ鉄が喪失して鉄欠乏性貧血ができるのではないかと考え、以下の動物実験を行った。

対 象 と 方 法

1. 対 象

実験動物は Wistar 系雄性ラットを用いた。

2. 方 法

1) PA 単回投与法による、尿中鉄排泄の検討

PA 投与量による尿、血液学的、生化学的変化を知る目的で体重 100 g あたり 1, 2.5, 5, 15 mg の PA を尾静脈より一回注射した。各群 9 匹ずつ用意しさらに同数の対照群を同じ飼料、環境で飼育した。飼料はオリエンタル MF (片山化学) を用いた。PA 静注後 1, 2, 4 週目に PA 群、対照群各 3 匹ずつ各々のラットにつき CBC、血清鉄、尿中鉄、血清アルブミン、血清クレアチニン、尿蛋白、肝臓内鉄量を測定し、PA 群と対照群とを比較した。尿、血液、脱血肝組織

は第1編と同じ方法で得た。

2) PA 連続投与方法による尿中鉄排泄の検討

PA の尿蛋白増加は静注後2～3週間続き以後は尿蛋白はほぼ正常に復することがPA単回投与の結果判明したので、PAを2週毎に静注しPAの長期投与における血液学的変化を検討した。またPAの投与量も単回投与の結果尿蛋白の増加の得られる最少量として体重100gあたり5mgとし、PA群と対照群各12匹を同じ条件で飼育し、実験開始後2, 4, 6, 10週目で単回投与の際と同じ要領で3匹ずつ屠殺し同様の項目について検討した。さらに、一部肝、脾、腎

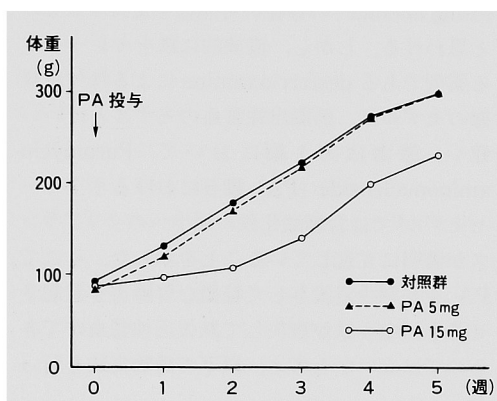


図1 PA 15mg, PA 5mg単回投与時の体重変動
PA 15mg投与群では対照に比し40%の成長障害が認められたが、5mg投与群では対照と差がみられず2.5mg群、1mg群でも同様であった。

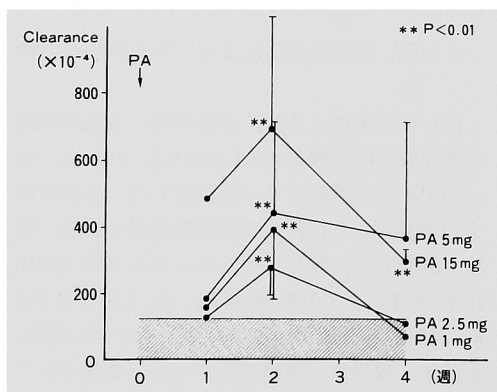


図2 PA単回投与後の含糖酸化鉄尿中クリアランスの経時的変動

における組織学的検討も加えた。

結 果

1. PA 単回投与方法による尿中鉄排泄の検討

PAを1, 2.5, 5, 15mgと単回投与しその後の体重増加の傾向をみると15mg群では対照に比し約40%の成長障害が認められたが、5mg以下では差は認められなかった(図1)。次に尿蛋白の推移を検討すると、15mg, 5mg投与群ではそれぞれPA静注2週後に 2540 ± 870 mg/dl, 497 ± 31 mg/dlの著明な尿蛋白を認め、この投与量でPAが腎糸球体に作用したことを示した。2.5mg投与群、1mg投与群ではそれぞれ 63 ± 36 mg/dl, 66 ± 15 mg/dlと対照群の 40 ± 3 mg/dlに比し有意な蛋白尿は認められなかった。さらに一部この尿蛋白をSDS-PAGEに展開し蛋白組成を分析したところ、大部分はアルブミンであったが相当量の鉄飽和トランスフェリンを確認した。さらに、

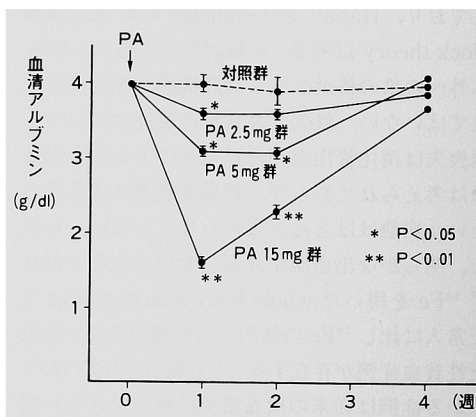


図3 PA単回投与後の血清アルブミンの変動

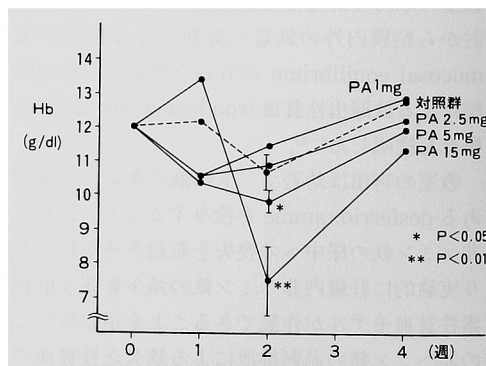


図4 PA単回投与後のヘモグロビン値の変動

第1編と同様の方法を用いて含糖酸化鉄による尿中鉄クリアランスをみると、15mg群、5mg群、2.5mg群、1mg群のいずれも2週目には対照群に比し有意に亢進しており、4週目には15mg群のみ対照群に比し高かった(図2)。血清アルブミンの低下は15mg群、5mg群で1、2週に顕著であり、2.5mg群では対照群より低下はするものの有意な変化ではなかった(図3)。これら尿蛋白、血清

アルブミン量の変化は1、2週では著明であったが4週では対照群と同じレベルに回復した。PA投与群の鉄クリアランスは4週目にも対照群より高値を示し、鉄クリアランスでみる腎からの排泄機構の回復には時間がより必要であると考えられた。

末梢血の血液学的検討ではヘモグロビン値が

表1 PA 5 mg/100 g体重投与群と対照群との各種血液生化学検査の比較

	PA 群	対照群
LDH	1525±477	1913±795
T-Bil	0.17±0.06*	0.05±0.06
M/E	1.58±0.52	1.15±0.26
Ret.	31.3±2.1	46.3±18.0
WBC	3560±230	3170±560
脾重量	0.56±0.01	0.61±0.03

(* p<0.01 vs 対照群)

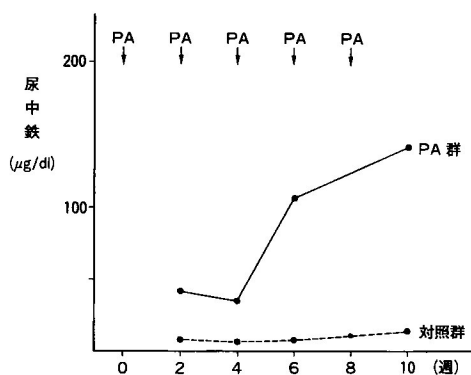
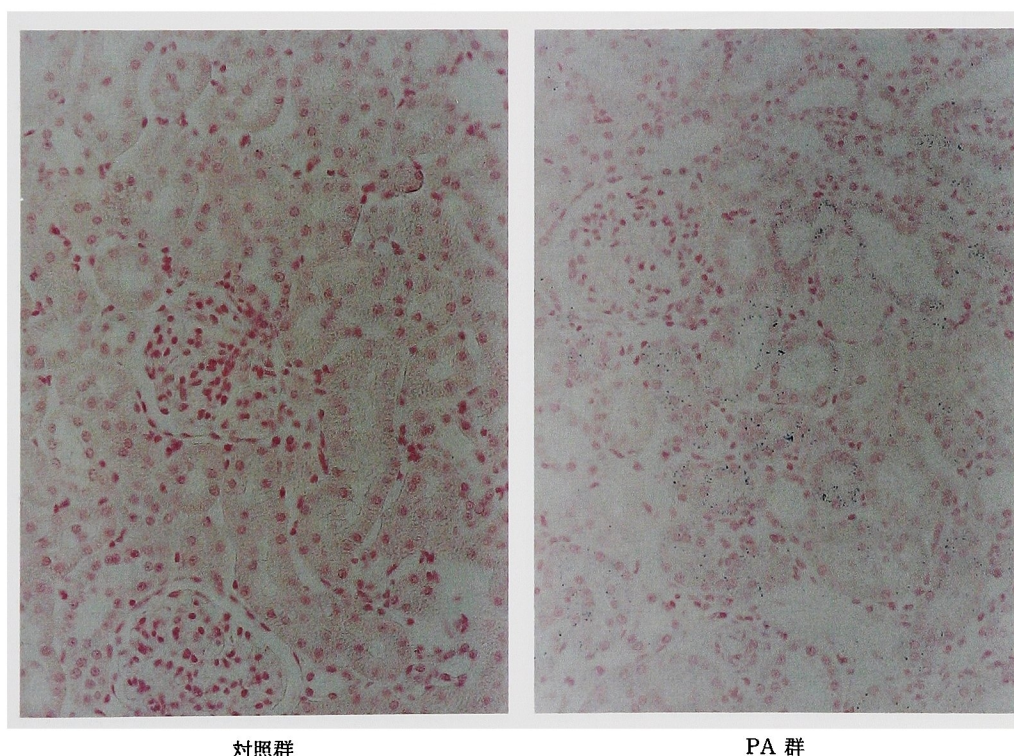


図5 PA 連続投与による尿中鉄の変動



対照群

PA 群

図6 対照群とPA群の腎鉄染色標本

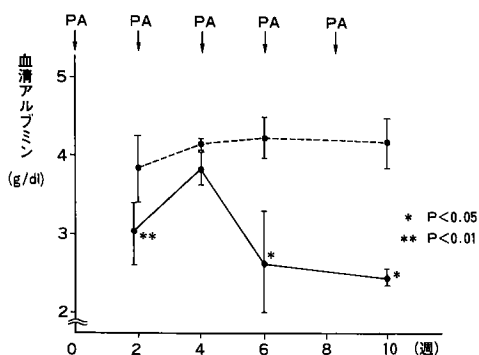


図7 PA 連続投与による血清アルブミンの変動

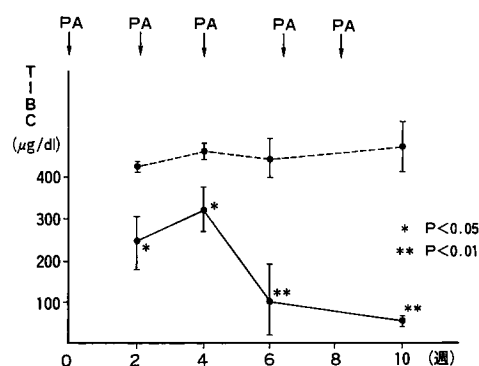


図8 PA 連続投与による TIBC の変動

15mg群及び5mg群で2週目に有意の低下を認めたが4週目には対照と同じレベルに回復した(図4)。その他LDH、T-Bilirubin、網状赤血球数、白血球数、骨髓細胞M/E比を検討したところ、PA投与群においてT-Bilirubinがやや高い傾向を認めたが、LDH、網状赤血球は変化を示さず、明らかな溶血所見は認められなかった(表1)。

2. PA 連続投与法による尿中鉄排泄の検討

前述したごとくPAによる尿中鉄排泄増加、尿蛋白増加の作用は一時的なものであったため、連続投与することによって持続的な尿中鉄排泄亢進を惹起させるかどうかを試みた。体重100gあたり5mgのPAを2週毎に投与すると、尿中鉄はPA群で持続的に排泄された(図5)。かかるPA投与10週目での腎組織のHE染色標本をみると、PA群では尿細管細胞の変性、細胞分裂像の増加、間質の増生がみられ、鉄染

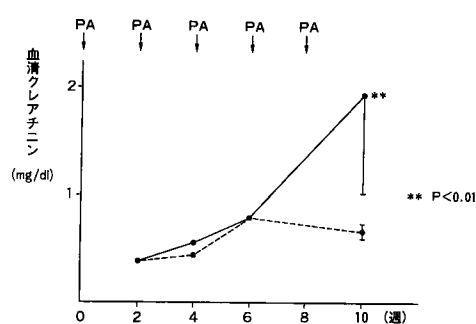


図9 PA 連続投与による血清クレアチニンの変動

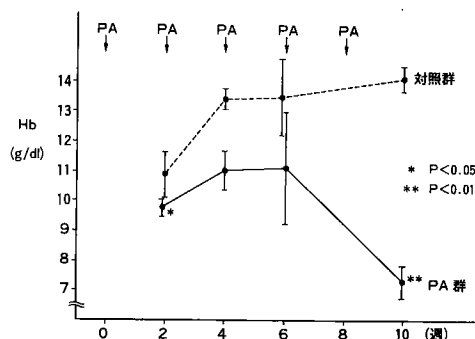


図10 PA 連続投与によるヘモグロビン値の変動

色標本では近位尿細管に可溶性鉄顆粒の増加がみられたが、糸球体、遠位尿細管、間質への可溶性鉄顆粒は認められなかった(図6)。

3. PA 連続投与によるその他の影響

尿蛋白は持続的に排泄されていたが、血清アルブミン、TIBCの変化は4週目までは軽度の低下にとどまっていたものの、6週以降は著明に低下した(図7, 8)。血清クレアチニンの変動は6週目までは正常範囲内であったが10週目には高値となり、ネフローゼから腎不全へ移行したものと考えられた(図9)。

ヘモグロビン値は2週目より明らかな低下がみられたが(図10)、2~6週の変化と6~10週にかけての変化とは明らかに異なる態度を示し6週目以降はPA投与による付加的要因がヘモグロビン合成に影響を及ぼした可能性が考えられた。

肝臓内鉄量は4週目までは対照群に比しやや低値を示したが、6週以降は逆に対照群に比し著明に増加していた(図11)。肝臓の組織標本は、

HE 染色では明らかな変化はみられなかったものの、鉄染色では10週目ではグリソン鞘周囲の肝実質細胞内に可溶性鉄顆粒の増加がみられた(図12)。なお、脾、骨髓における組織像には特徴的な変化は認められなかった。

考 察

鉄欠乏性貧血の一因として、第1編で得られた成績から鉄漏出性貧血の存在を想定し、本編

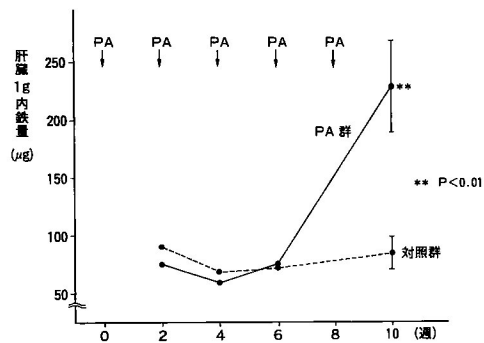
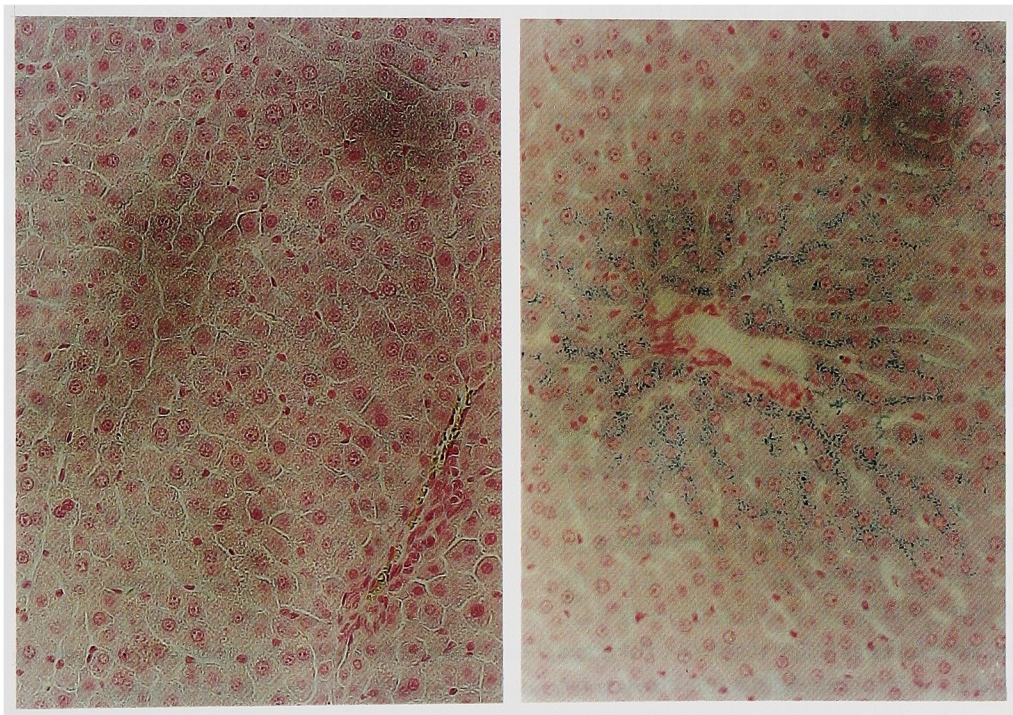


図11 PA 連続投与による肝臓内鉄量の変動

では持続的なトランスフェリン鉄の尿中への排泄をおこして鉄欠乏性貧血の動物モデルを作ることを試みる目的で、Puromycin aminonucleoside (PA) によるネフローゼモデルのラットを作製しその鉄代謝を検討した。第2編ではPAを15mg/100gBW静注し8日後に観察し、尿中鉄排泄亢進を認めたがHb値は有意な変化が認められなかった。一方、本編の実験でPAの5mg及び15mg/100gBW単回静脈内投与では、2週後にHbの低下、尿中鉄の増加、尿蛋白の増加がみられたがいずれも4週目には正常に復しており、PAの効果は可逆的なものと考えられた。そこでPAの2週毎の連続投与を行うと持続的な貧血、低蛋白血症、尿蛋白の増加と同時に尿中鉄の増加がみられることが判明し、本編の目的にある程度かなう動物モデルが得られた。

今回の腎障害動物モデル作製に用いた Pur-
omycin は尿蛋白増加を起こすことが知られている。その機序については, horseradish peroxidase
や dextran を使った実験⁹⁾により charge barrier



対照群

PA 群

図12 対照群と PA 群の肝鉄染色標本

と size barrier の障害により尿蛋白増加が起これるとされ、特に前者の障害が主であると考えられている。PA は腎糸球体の heparan sulfate の減少をおこすとともに上皮細胞に対し強い代謝障害をおこすことにより GBM の AS が減少し尿蛋白が増加すると考えられている⁹⁾。かかる動物モデルでの鉄の尿中排泄・尿蛋白増加に伴う変化として、PA を投与したラットの腎の組織標本をみると、PA 連続投与の10週目のラットの HE 染色で間質細胞の増生と尿細管上皮細胞の破壊、再生像がみられ、さらに鉄染色では主に近位尿細管に鉄顆粒の沈着がみられていた。この現象の解釈については次の2通りがあらう。第1に糸球体から濾過された鉄が再吸収により沈着したとの解釈である。この再吸収の機序については、ラットの腎のトランスフェリンレセプターは近位尿細管にはほとんどなく遠位尿細管に多いとの報告もあり、receptor-mediated uptake ではなく非特異的な再吸収によるものかも知れない。第2の解釈としては腎尿細管細胞の basolateral side からの血清中の鉄の取り込みの増加である。尿細管上皮細胞の basolateral side には transferrin receptor が存在するとされているので、この部位からの鉄の吸収増加であるとする receptor-mediated uptake であるが transferrin receptor の発現は多くの報告では細胞内鉄量により down regulation を受けており、尿細管上皮での transferrin receptor 発現もそうであるとすればかかる PA 投与腎での TfR 発現は極少数であるはずで、PA 投与ラットの血清鉄が低値であるにもかかわらず尿細管上皮細胞に過剰の鉄が沈着すると考えるのは困難である。

一方、肝臓については、体内鉄が減少すればそれに平行して肝臓内鉄量も低下するはずであるが連続投与の際の PA 群では尿中鉄増加が持続していたにもかかわらず肝臓内鉄量が増加していた。これは血清アルブミンとともに TIBC も減少しているため鉄の運搬能力が低下し、atransferrinemia に近い状態になっているため、肝臓よりの鉄の移動が制限されたのかもしれない。また、尿中鉄漏出にともない消化管よりの鉄吸収が亢進し、さらに炎症に伴う網内系の鉄

取り込み増加の一現象として肝臓に鉄が増加している可能性も考えられる。

一方、今回作製した PA 投与による貧血モデルでは、正球性色素性貧血を示し赤血球数、ヘモグロビン値ともに低下しており、その成因については鉄欠乏以外に失血、溶血、骨髓造血能の低下、炎症に伴う貧血、腎性貧血なども考えられた。

まず、失血についてであるが、解剖時肉眼的に腹腔内、消化管内、膀胱内に出血がみられなかったことよりヘモグロビンの低下を惹起するほどの出血はまず否定的であると考えられる。次に PA 投与後の貧血が起きるまで比較的短期間であることから溶血が疑われるが、血清生化学的に bilirubin の上昇は認めるものの LDH、網状赤血球の増加、骨髓 M/E 比の低下がないこと、脾臓の重量が対照群に比し PA 群で低下していることなどが溶血と合致せず、末梢血標本をみても赤血球の形態異常などは明らかでなかった。

PA の作用機序はさらに、Puromycin の構造がアミノアシル tRNA のアミノ酸末端部分との構造が類似しているためリボゾームの D 座に結合しているペプチジル tRNA とペプチド転移酵素によって反応し peptidyl-puromycin を生じ、リボゾームから遊離する。こういった蛋白合成障害のほかに Friend erythroleukemia cell に対し分化誘導し増殖を抑制するという報告もあり¹⁰⁾、骨髓造血障害が起こる可能性がある。今回の PA 群の貧血については、早い経過で貧血が起きていることから骨髓低形成のみでは説明できない。また末梢血所見で白血球数は対照群と PA 群とで差がみられないことも骨髓造血障害の程度の低いことを示していると思われる。3 系統のうち赤血球系のみの低下がみられるとしたら、赤芽球癆も考慮にいれなければならないが、先に述べたように経過から考えると合致しないし、PA 投与後の1週目の骨髓細胞の M/E 比をみても対照群と明らかな差はなかった。

炎症に伴う貧血の場合は網内系により鉄の取り込みが増大し造血における鉄利用率の低下、血清鉄低値がみられる。Konijn らによるとラットに turpentine を投与することによって炎症を

惹起すると肝臓及び脾臓の ferritin の増加と血清鉄の低下がみられる事を報告している¹¹⁾。炎症時にマクロファージから放出される interleukin-1 (IL-1) や tumor necrotizing factor (TNF) により HepG2 細胞の diferric transferrin の取り込みが増加し、さらに transferrin の放出の低下、ferritin 合成の増加がみられたとの報告もあり¹²⁾、PA 投与によって全身に炎症類似の反応が惹起され、それがために尿中への鉄の喪失とともに網内系へ鉄の取り込みが増大し貧血が起きた可能性はあるが、さらに検討が必要と思われる。

次に腎障害に合併してみられる貧血はエリスロポエチンの腎臓よりの分泌の低下が主な原因とされ、今回のモデルでも PA 連続投与による変化では特に10週目では血清クレアチニンが増加したことからエリスロポエチンの低下による貧血である可能性が高い。エリスロポエチンの産生は、腎の間質細胞であるという報告¹³⁾とメサンギウム細胞であるという報告¹⁴⁾があるが、いずれにしても組織への酸素供給の低下に反応して分泌される¹⁵⁾。慢性腎不全の際には腎の組織障害のためエリスロポエチンの分泌能が低下すると考えられている。今回作製したモデルはネフローゼであり、持続する尿蛋白のために尿細管細胞の障害が起こりさらに間質性腎炎が生じたと考えられる。一般にネフローゼにおける間質性腎障害の機序として、尿蛋白以外に尿中鉄の多寡も関与しているという報告もあり¹⁶⁾、本実験での10週目からの貧血の亢進にはエリスロポエチンの障害を含む腎障害が関与している可能性はある。

興味あることに Hancock らは、ネフローゼ症候群において尿中に transferrin が失われ血清鉄の低下とともに小球性低色素性貧血がみられた症例を報告している¹⁷⁾。その症例では TIBC

が12 μ g/dlと著明な低値であり、貧血の原因として尿中への鉄の喪失のみならず貯蔵鉄の利用障害の関与も示唆している。この症例では尿中への鉄の喪失による鉄欠乏が起きると、代償性に消化管からの鉄の吸収が増大し喪失分を補うはずであるが、低 transferrin 血症のため消化管あるいは網内系から骨髄に輸送し造血に利用できないものと推測している。今回の実験で出来たモデルはこの症例に類似した点が多く、腎障害が軽微すなわちエリスロポエチンが低下しない程度でかつ尿蛋白は持続的に排泄されるような病態では鉄漏出性の貧血が惹起される可能性があることを示唆していると思われる。

結 論

第1編において Puromycin aminonucleoside (PA) 投与により、尿中鉄排泄が亢進することを示したが、さらに長期投与により鉄代謝に与える影響を観察し以下の結果を得た。

1. PA をラットに投与することにより尿中鉄排泄亢進状態が得られた。
2. 体重100gあたり5mgの PA を2週毎に静注することによって持続的な貧血状態が得られた。
3. PA 連続投与によって惹起される貧血は腎性因子や炎症性因子など多様な因子の関与した病態ではあるが、尿中鉄排泄亢進による鉄欠乏状態もその一因として重要であると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表するとともに、終始御懇篤なる御指導を賜った高橋 清講師、宗田良助手に深謝致します。

(本論文の要旨は第32回日本臨床血液学会総会で発表した。)

文 献

- 1) Hahn PF, Bale WF, Ross JF, Balfour WM and Whipple GH: Radioactive iron absorption by the gastrointestinal tract. Influence of anemia, anoxia and antecedent feeding. Distribution in growing dogs. J Exp Med (1943) 78, 169—188.
- 2) Granick S: Ferritin. Its properties and significance for iron metabolism. Chem Rev (1946) 38, 379

—403.

- 3) 刈米重夫：鉄欠乏の臨床。日内会誌 (1988) **77**, 143—153.
- 4) 木村郁郎, 山名正俊, 大契泰亮, 西崎良知：胃液の鉄量について — 本態性低色素性貧血の成因に関連して —。日血会誌 (1968) **31**, 199—203.
- 5) 木村郁郎：消化管粘膜と鉄代謝 — 胃粘膜からの鉄の吸収と排泄 —。血液と脈管 (1970) **1**, 233—239.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Olson JL, Rennke HG and Venkatachalam MA : Alterations in the charge and size selectivity barrier of the glomerular filter in aminonucleoside nephrosis in rats. Lab Invest (1981) **44**, 271—279.
- 9) Brenner BM, Hostetter TH and Humes HD : Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. New Engl Med (1978) **298**, 826—833.
- 10) Lacour F, Harel L, Friend C, Huynh T and Holland JG : Induction of differentiation of murine erythroleukemia cells by aminonucleoside of puromycin and inhibition of this induction by purines and purine derivatives. Proc Natl Acad Sci USA (1980) **77**, 2740—2742.
- 11) Konijn AM and Hershko C : Ferritin synthesis in inflammation. I . Pathogenesis of impaired iron release. Br J Haematol (1977) **37**, 7—16.
- 12) 新谷直昭, 高後 裕, 近藤 仁, 平山真章, 宮崎 悦, 藤川幸司, 対島伸泰, 新津洋司郎：Cytokine (IL-6, IL-1, TNF) による肝フェリチン合成調節機序の解析。第14回鉄代謝研究会発表抄録 (1990) pp 20—22.
- 13) Koury ST, Bondurant MC and Koury MJ : Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ* hybridization. Blood (1988) **71**, 524—527.
- 14) Kurz A, Jelkmann W, Sinowatz F and Bauer C : Renal mesangial cell cultures as a model for study of erythropoietin production. Proc Natl Acad Sci USA (1983) **80**, 4008—4011.
- 15) Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ and Caro J : Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. Blood (1987) **70**, 316—318.
- 16) Alfrey AC, Froment DH and Hammond WS : The role of iron in the tubulointestinal injury and functional deterioration in nephrotoxic serum nephritis. Kidney Int (1989) **36**, 753—759.
- 17) Hancock DE, Onstad JW and Wolf PL : Transferrin loss into the urine with hypochromic, microcytic anemia. AJCP (1976) **65**, 73—78.

Studies on pathogenesis in iron deficiency anemia

Part 2. Anemia induced by administration

of puromycin aminonucleoside

Norihiko NAKANISHI

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Iron deficiency anemia results from various factors, such as blood loss, malabsorption, and increased demand for iron due to pregnancy or growth. However, iron hyper-excretion has not been reported except in the cases of bleeding. Previously, we found increased iron excretion in the urine in patients with iron-losing anemia, such as idiopathic hypochromic anemia.

To examine the relationship between iron excretion and anemia, puromycin aminonucleoside (PA) was administered in rats to induce anemia. In such rats, considerable amounts of iron were continuously excreted in the urine and the animals became anemic. However, the anemia in this model was normocytic and normochromic, and the liver iron content was reversely increased. In conclusion, PA administration in rats induces not only iron deficiency as hyper-excretion but also abnormalities of iron metabolism as indicated by the other pathological findings, such as inflammatory change and renal failure.