

機関番号：33904

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21800073

研究課題名（和文） 亜鉛代謝異常による難治性造血障害発生メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of hematopoietic impairment due to abnormal zinc metabolism

研究代表者

許斐 亜紀 (KONOMI AKI)

愛知学泉大学・家政学部・講師

研究者番号：40529658

研究成果の概要（和文）：

造血機構における亜鉛の作用メカニズムは不明である。そこで、亜鉛欠乏が腎臓中エリスロポエチン（EPO）濃度に与える影響について検討した。Sprague-Dawley 系 3 週齢雄ラットを対照群(CON)、亜鉛欠乏群(ZD)、Pair-Fed 群(PF)の 3 群に振り分け 4 週間飼育した。データは Fisher の PLSD で統計処理を行い、有意水準は 5%とした。血中 EPO 濃度は CON に比べ ZD が有意に低値を示し、PF が低い傾向を示した。腎臓皮質中 EPO 濃度は ZD が PF に比べ低値を示し、有意差は見られなかった。PF は CON に比べ高い値を示した。腎臓髄質中 EPO 濃度には差は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：

Thirty 3-week-old male SD rats were assigned into 3 groups of 10 for the 4-week study. Difference between groups was statistically analyzed by Fisher's PLSD. P value less than 0.05 was considered significant. Plasma EPO concentration of zinc-deficient group was significantly decreased compared with control group, and pair-fed group was marginally decreased compared with control group (P=0.056). Kidney cortex EPO concentration was decreased in zinc-deficient group compared with pair-fed group. Kidney cortex EPO concentration in pair-fed group was higher than that of control group but the difference was not significant. No significant difference was observed in kidney medulla EPO concentration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	770,000	231,000	1,001,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,840,000	552,000	2,392,000

研究分野：栄養学・栄養生理学・微量栄養素学

科研費の分科・細目：医歯薬・応用健康科学

キーワード：亜鉛、造血、栄養、鉄不応性貧血、エリスロポエチン

1. 研究開始当初の背景

鉄と亜鉛はその化学的性質が類似している事から同時に欠乏しやすいことが明らかになっている。これら微量元素の欠乏は、先

進国・後進国を問わず、世界中で蔓延している健康問題であり、その生体影響、予防策・改善策に関する研究が世界中で推進されている。

諸外国では WHO (世界保健機関) や UNICEF (国連児童基金) などの国際機関による研究の推進もあり、鉄もしくは亜鉛欠乏の研究が活発に行なわれている (Lind T et al. *Am J Clin Nutr* 2004)。いずれの国でも鉄欠乏症の発生率が高率である事が報告されている。そして数多くの研究によって、鉄もしくは亜鉛の単独欠乏であるのか、同時欠乏であるのかの鑑別診断は依然困難である事が証明されている (Cherry FF et al. *Am J Clin Nutr*, 1981., Chipionkar SA et al. *J Am Coll Nutr*, 2004.)。これら疾患の鑑別を行うためには、まず単独欠乏と同時欠乏の間にある病態生理上の差異について基礎的な知見を蓄積する必要があるが、実験モデルを作製することに技術的な困難があり、解明が遅れていた。申請者は、実験モデル動物の作製に成功し、臨床に役立てる基礎研究を行なっている。

貧血の主な治療法は鉄剤投与である。しかし、この治療法によって症状の悪化もしくは改善が見られない鉄不応性貧血が存在する。この鉄不応性貧血は亜鉛の代謝異常によって発生すると考えられている。しかし、その発生メカニズムは不明のため治療法はなく、難治性造血障害の1つとなっている。我々は、これまでに亜鉛欠乏により、造血ホルモンであるエリスロポエチンの血中濃度が低下している事を世界で初めて明らかにした (Konomi A & Yokoi K. *Biol Trace Elem Res*, 2005)。

本研究では、すでに保存済みの亜鉛欠乏モデルラットの腎臓組織を用いて、亜鉛欠乏が腎臓でのエリスロポエチンの産生にどのような影響を与えているのかを精査することと、亜鉛欠乏がタンパク質合成レベルでどのような影響を与えているのかを精査する事を主目的として、実験を行なった。

また、現時点で世界最高レベルの分析機器である、MALDI-TOF-MS-MS (マトリックスアシストレーザーイオン化飛行時間分解型質量分析計) および RT-RT-PCR (リアルタイム定量 PCR システム) を使用し、遺伝子レベルおよびタンパク質合成レベルでの亜鉛欠乏の影響の検討を試みた。

2. 研究の目的

これまでに、亜鉛欠乏が血中エリスロポエチン濃度を低下させることを明らかにしている。そこで、亜鉛欠乏が腎臓におけるエリスロポエチン産生にどのような影響を及ぼしているかを検討した。亜鉛は遺伝子レベルでタンパク質合成に関わる微量元素なので、亜鉛代謝異常によって発生する難治性造血障害の発生メカニズム解明にとって、本実験計画の遂行は必要不可欠である。

3. 研究の方法

亜鉛欠乏がエリスロポエチンの産生および血球の産生自体に与える影響を検討することを主目的とし、腎臓中皮質および髄質中エリスロポエチン濃度およびヘムオキシゲナーゼ-1 の測定を行った。また、すでに採取・保存済みの組織を、二次元電気泳動にかけ、亜鉛欠乏により大きく変動したタンパクについて MALDI-TOF-MS-MS によるタンパク質の同定を開始した。MALDI-TOF-MS-MS による分析は(株)島津製作所に依頼しており、現在、分析結果を国際的データベースに照合し、データ化しているところである。

4. 研究成果

(1) 腎臓髄質中のエリスロポエチン濃度の測定を行なった。亜鉛欠乏時には食餌摂取量が低下するので、この要因を削除する為に pair-fed study を行なった。対照群 (Cont) に比べ、亜鉛欠乏群 (ZD) および食餌摂取量の対照群である pair-fed 群 (PF) で濃度が低下した。しかし、統計的に有意な差は見られなかった。

この結果は、血漿中エリスロポエチン濃度のパターンに似ていた。

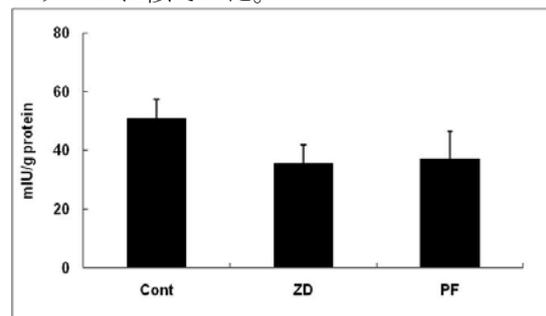


図 1. 腎臓髄質中のエリスロポエチン濃度

(2) 腎臓皮質中のエリスロポエチン濃度の測定を行なった。皮質中のエリスロポエチン濃度は、Cont と ZD および PF の間には差は見られなかったが、Cont に比べ、ZD では減少する傾向が、PF は上昇する傾向が見られた。ZD と PF の間には統計的に有意な差が見られた。この結果から、造血ホルモンのエリスロポエチンの生成・分泌レベルにおいて、亜鉛欠乏と食餌摂取量の低下では異なる影響を与えることが明らかになった。

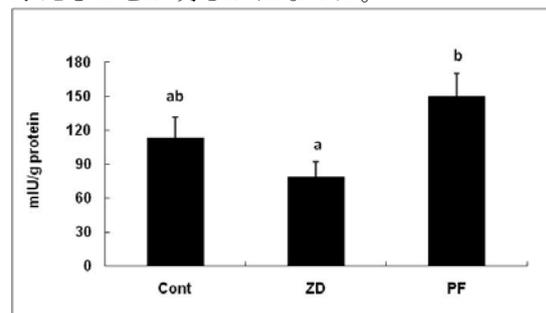


図2. 腎臓皮質中のエリスロポエチン濃度
*異なるアルファベットの時に有意な差を認める。(P<0.05)

上に示す、腎臓髄質および皮質中のエリスロポエチン濃度の動態についての結果は、国内外の学会において報告を行なった。米国最大の医学系学会 (FASEB) において、医学・生理学者から高い評価を得た。また、国内においては、日本微量元素学会大会において、ミニシンポジウム (病態・医薬品) に採択され、研究成果が高く評価された。血漿中のエリスロポエチン濃度の変化に続いた結果であり、今後も実験の遂行が必要不可欠である。

(3) 腎臓中へムオキシゲナーゼ-1 濃度の測定を行なった。本来は肝臓に多く存在するHO-1 だが、今回は、腎臓機能の検討のために測定した。Cont に比べ、ZD で大きく減少した。PF にも有意な低下が見られ、ZD との間で統計的に有意な差が見られた。

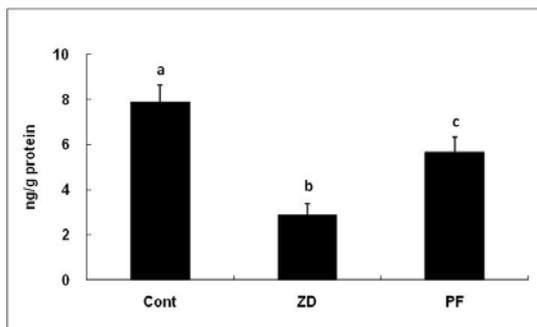


図3. 腎臓中へムオキシゲナーゼ-1 濃度
*異なるアルファベットの時に有意な差を認める。(P<0.05)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Katsuhiko Yokoi, Aki Konomi, Miki Otagi. Iron bioavailability of cocoa powder as determined by the Hb regeneration efficiency method. *British Journal of Nutrition*. **102**: 215-220. 2009. 査読有り
- ② 許斐 亜紀. 小児における亜鉛の摂取上限量の検討—小児と亜鉛サプリメント—*ファルマシア*. **45**(3): 269-270, 2009. 査読有り

- ③ 内田 由佳, 許斐 亜紀, 横井 克彦. ラットにおける飼料中ルビジウムと組織中ルビジウムの用量効果関係. *微量栄養素研究 (Trace Nutrients Research)*. **27**: 64-68. 2010. 査読有り
- ④ Aki Konomi, Katsuhiko Yokoi. A possible role of plasma aldosterone in hypotension secondary to iron deficiency anaemia combined with zinc deficiency in rats. *British Journal of Nutrition*. **105**: 535-538. 2011. 査読有り
- ⑤ Katsuhiko Yokoi, Aki Konomi, Miki Otagi. Comparison of a modified hemoglobin regeneration efficiency method with a slope-ratio assay in measuring relative bioavailability of cocoa powder iron using rats. *Biological Trace Element Research*. DOI 10.1007/s12011-010-8953-1. 査読有り

[学会発表] (計 15 件)

- ① Katsuhiko Yokoi, Aki Konomi. Iron and zinc deficiencies affect zinc kinetic parameters in rats. Experimental Biology, USA. *The FASEB JOURNAL*, **23**: 216.7, 2009年4月20日
- ② Aki Konomi, Katsuhiko Yokoi. Effects of iron and/or zinc deficiency on blood biochemical parameters in rats. Experimental Biology, USA. *The FASEB JOURNAL*, **23**: 921.13, 2009年4月21日
- ③ 許斐 亜紀, 横井 克彦. 鉄・亜鉛の同時もしくは単独欠乏が血液生化学検査値に及ぼす影響. 第63回 日本栄養・食糧学会大会, 2009年5月21日
- ④ 横井 克彦, 許斐 亜紀, 小田木 美喜. ココア中铁の生体利用性の測定—ヘモグロビン再生法の改良. 第63回 日本栄養・食糧学会大会, 2009年5月21日
- ⑤ 横井 克彦, 許斐 亜紀. 亜鉛安定同位体を用いたラットの速度論的亜鉛代謝指標の測定. 第26回 日本微量元素学会学術集会, 2009年6月5日
- ⑥ 横井 克彦, 許斐 亜紀. 亜鉛および鉄欠乏ラットにおける速度論的亜鉛代謝指標の検討. 第20回 日本微量元素学会, 2009年7月2日

- ⑦ Aki Konomi, Katsuhiko Yokoi. Changes of erythropoietin concentration in plasma and kidney induced by zinc deficiency. *Experimental Biology, USA. The FASEB JOURNAL*, **24**: 718.2. 2010年4月26日
- ⑧ Katsuhiko Yokoi, Aki Konomi, Miki Otagi. Hemoglobin regeneration efficiency method revisited: an alternative bioassay for iron bioavailability. *Experimental Biology, USA. The FASEB JOURNAL*, **24**: 717.13. 2010年4月26日
- ⑨ 許斐 亜紀、横井 克彦. 亜鉛欠乏下での造血障害発生メカニズムの解明 - 腎臓中H0-1濃度への影響 -. 第64回日本栄養・食糧学会大会 (於 アスティ徳島). 要旨集 109頁. 2010年5月22日
- ⑩ 横井 克彦、許斐 亜紀、小田木 美喜. 鉄欠乏ラットにみられた血液生化学検査値の異常. 第64回日本栄養・食糧学会大会 (於 アスティ徳島). 要旨集 110頁. 2010年5月22日
- ⑪ 許斐 亜紀、横井 克彦. 亜鉛欠乏下における腎臓中ヘムオキシゲナーゼ-1濃度の変化. 第27回日本微量栄養素学会学術集会 (於 京都リサーチパーク). 要旨集 16頁. 2010年6月9日
- ⑫ 内田 由佳、許斐 亜紀、横井 克彦. ラットにおける飼料中ルビジウムと組織中ルビジウムの用量効果関係の検討. 第27回日本微量栄養素学会学術集会 (於 京都リサーチパーク). 要旨集 17頁. 2010年6月9日
- ⑬ 許斐 亜紀、横井 克彦. 亜鉛欠乏下における腎臓中エリスロポエチン濃度の変化. Changes of Kidney Erythropoietin Concentration in Moderately Zinc-Deficient Rats. ミニシンポジウム 病態・医薬品. 第21回日本微量元素学会 (於 京都大学百周年時計台記念館). 要旨集 105頁. 2010年7月3日
- ⑭ 横井 克彦、許斐 亜紀、小田木 美喜. 食品中铁の生物学的利用効率に関するバイオアッセイ. A bioassay for Iron Bioavailability in Foods. 第21回日本微量元素学会 (於 京都大学百周年時計台記念館). 要旨集 115頁. 2010年7

月3日

- ⑮ 内田 由佳、許斐 亜紀、横井 克彦. 過剰量のルビジウムがラットの血漿生化学パラメーターに及ぼす影響. 第21回日本微量元素学会 (於 京都大学百周年時計台記念館). 要旨集 123頁. 2010年7月3日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

許斐 亜紀 (KONOMI AKI)

愛知学泉大学 家政学部 講師

研究者番号 : 40529658

(2) 研究協力者

横井 克彦 (YOKOI KATSUHIKO)

聖徳大学 人間栄養学部 教授

研究者番号 : 10200883

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :