

鉄欠乏による高エネルギーリン酸レベルの 低下が筋代謝に及ぼす影響

鹿屋体育大学教授 大 平 充 宣
開 発 健 一
刈 谷 文 彦
田 中 隆 人
日本女子体育大学教授 黒 田 善 雄

鉄欠乏は特に開発途上国で深刻であるが、先進諸国においても無視できない未解決の健康問題の一つである。我が国においても、特に女性スポーツ選手に顕著な鉄欠乏が報告されている(1-3)。鉄欠乏は血中ヘモグロビン(Hb)や組織中铁含有タンパク質の合成を抑制する。従って、血液による酸素運搬のみならず組織における酸素利用も低下するため、筋及び全身持久力も減少してしまう(4-8)。

鉄の静注(9, 10)や鉄剤の経口投与(11)などにより、鉄欠乏は軽減できる。しかしながら、鉄の過剰投与は危険でもあり、出来るなら食事による治療や予防が望ましいのは当然である。我々はカルシウム代謝調節機構を追求する目的で牛乳を使った研究も実施しているが、鉄及び鉄代謝調節に関する研究にも牛乳の利用を実施している。牛乳中の鉄含有量が少ないのは欠点でもあるが、鉄含有量を低～高レベルへ自由に調節できる訳であるから、考え方を変えると利点でもある。鉄投与量の違いが、筋代謝に及ぼす影響を追求中であるが、今回は筋中高エネルギーリン酸含有量が低下するくらい鉄欠乏が強度な場合の鉄代謝について報告したい。尚、鉄欠乏ではないが、筋中高エネルギーリン酸レベルが低いグループも加えて、筋代謝調節メカニズムを検討した。

方 法

3週齢のWistar系雄ラットを任意に、2種類のコントロール粉末食群（CE-2、日本クレア、東京；及びTD92118, Teklad, Madison, WI, USA）、 β -guanidinopropionic acid (β -GPA) 食群、鉄欠乏（2 ppm Fe, No. 170365, Teklad）食群、及び β -GPA+鉄欠乏食群に分けた（各群 $n=8$ ）。 β -GPA食には粉末飼料（CE-2, 日本クレア）に1%濃度で β -GPAを混入した。Tekladから購入したコントロール食は鉄欠乏食（2 ppm Fe）にferric citrateを100 ppm 添加したものである。 β -GPA+鉄欠乏食には2 ppm Feの飼料に1%濃度で β -GPAを混入した。

飼料はカップで与え、全群に同量ずつpair feedingした。飼料の摂取量は発育に応じて増やし、3週目から1匹当たり20 g/日ずつ与えた。また水は蒸留・脱イオン水を自由に摂取させた。ラットは2匹ずつステンレススチール製のケージ内で飼育した。飼育環境は、温度約23°C、湿度約55%に保ち、明暗は12時間毎（明6:00～18:00、暗18:00～6:00）に切り替えた。

筋中高エネルギーリン酸量測定

飼育約14週目頃、sodium pentobarbitalの腹腔内注入（5 mg/100 g 体重）によりラットを麻酔した後、剃毛したラット後肢ふくらはぎ部における高エネルギーリン酸含有量を、 ^{31}P -核磁気共鳴（NMR）装置（大塚電子製、BEM170/200）を用い測定した(12)。スペクトルで得たピーク高を利用し、 Pi/PCr 、 $\text{PCr}/(\text{PCr}+\text{Pi})$ 比などを求めた（Pi: 無機リン酸、PCr: クレアチンリン酸）。

血液分析

飼育約15週目、sodium pentobarbitalの腹腔内注入による麻酔後、ヘパリンコーティングしたシリンジを用い、ラット頸静脈より採血した。その後、血液自動分析装置（日本テクニコン社製、MEK-4500）を用い、赤血球（RBC）数、Hb濃度、ヘマトクリット（Hct）値を測定した。

筋中酵素活性の測定

採血後、麻酔下のラットよりヒラメ筋を摘出し、生化学的手法により酵素活性の測定を行った。ヒラメ筋は湿重量を測定した後、175mMKCl、10mMTrisHCl、2mMEDTA、pH7.2のバッファー内でPolytronを用いホモジナイズした。測定した酵素はlactate dehydrogenase(LDH, 13)、 β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase(HAD, 14)、citrate synthase(CS, 15)、succinate dehydrogenase(SDH, 16)、それにcytochrome oxidase(COX, 17)である。

結果及び考察

図-1に示されるように2ppm Fe食により強度な貧血が誘発された。100ppm Fe群のHbが 16.4 ± 0.8 (平均 $\pm$ SEM)g/100mlであったのに対し、2ppm Fe群は 3.4 ± 0.4 g/100mlであった($p < 0.001$)。コントロール食又は鉄欠乏食に β -GPAを投与してもHb値には有意な影響は現れなかった。RBC数及びHct値にも同じような変化が認められた。

相対的PCrレベルを示唆するPCr/(PCr+Pi)比は β -GPA投与により有意に低下した(図-2, $p < 0.001$)。有意ではなかったが、鉄欠乏でもわずかに減少する傾向が見られた。2ppm Fe食を与え、Hbが約3.5g/100mlの貧血に達したラットのヒラメ筋では、生化学的に測定されたPCr値がコントロール食群より低く、逆にPi値は上昇していた(18)。しかしながら、速筋である足底筋には有意な変化は認められなかった。本研究での高エネルギーリン酸の分析は、 ^{31}P -NMRスペクトルにより、ふくらはぎ部で非侵襲的に実施されたので、値は主として速筋である腓腹筋中の分布を示唆するものであらうと思われる。従って、遅筋であるヒラメ筋では、我々の以前の報告(18)と同じようにPCr含量は減少しているものと推察される。鉄欠乏食に β -GPAを混入すると、PCr含量は更に減少した($p < 0.001$)。Pi/PCr比は逆に β -GPA投与で増大した。

鉄含有酵素であるSDH(図-3)及びCOX(図-4)の活性は鉄欠乏により減少し、 β -GPA投与で上昇した。これらの結果は、これまでの報告と一致するものである(18-21)。鉄欠乏食に β -GPAを混入して与え、PCr値が更に低くなっ

た場合、SDH及びCOXの活性は有意に上昇した。鉄欠乏の程度は同じであるにもかかわらず、筋中PCrの低下により筋への鉄の動員が高進されたものと考えられる。

非鉄含有ミトコンドリア酵素であるHAD（図-5）及びCS（図-6）は、鉄欠乏及び β -GPA投与により活性化される傾向にあった。特にHAD活性の上昇は有意であり、このことからヒラメ筋中のPCr値は2 ppm Fe群も正常より低かったことが示唆される（18）。鉄欠乏にクレアチン枯渇が併合され、PCr含量の低下が更に進行すると、これらの酵素の活性化は更に進行した。

ヒラメ筋中LDH活性は鉄欠乏で上昇し、逆に β -GPA投与により低下した（図-7、 $p<0.01$ ）。鉄欠乏食に β -GPAを混入しても変化は起きなかったが、2 ppm Fe食は強度の貧血及び筋中鉄欠乏を招くため、代謝が解糖系に依存していることが示唆される。我々は以前、鉄欠乏によりLDHの中でもM-type isozymeの増加が起ることを報告しているが（22）、今回も同様な変化が起きているものと思われる。 β -GPAはミトコンドリアによる有酸素的エネルギー代謝を刺激するため、解糖系代謝は抑制されるものと推察される。しかしながら、その調節メカニズムの詳細は不明である。

まとめ

ラットにおける強度の鉄欠乏及びクレアチン枯渇、又は両者の併合による筋中高エネルギーリン酸（特にPCr）含量が低下した場合の、ヒラメ筋代謝を検討した。クレアチン枯渇に対しては、ミトコンドリア酵素が活性化され、LDH活性は低下した。有酸素性代謝の高進が示唆される。鉄欠乏は当然鉄含有酵素活性を低下させるが、非鉄含有酵素は活性が上昇した。LDH活性も高く、解糖系代謝の高進が示唆されるが、代償的にミトコンドリア代謝も改善されると言える。鉄欠乏とクレアチン枯渇を併合して、PCr値を下げると、鉄含有ミトコンドリア酵素も活性化され、ミトコンドリア代謝が更に改善されるという結果を得た。ミトコンドリア代謝は高エネルギーリン酸含量に顕著に影響されることが示唆された。

参考文献

1. Kilbom, Å. Physical training with submaximal intensities in women. I. Reaction to exercise and orthostasis. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28: 141-161, 1971.
2. Kilbom, Å. and I. Astrand. Physical training with submaximal intensities in women. II. Effect on cardiac output. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28: 163-175, 1971.
3. Ohira, Y., V. R. Edgerton, M. K. Day, C. W. Gardner, R. Green, J. Hegenauer, and S. Ikawa. Responses of hematology and work capacity to iron in sedentary and trained women. In "Physical Fitness Research", ed. by T. Ishiko, Baseball Magazine Sha, pp. 65-81, 1983.
4. Gardner, G. W., V. R. Edgerton, B. Senewiratne, R. J. Barnard, and Y. Ohira. Physical work capacity and metabolic stress in subjects with iron deficiency anemia. Am. J. Clin. Nutr. 30: 910-917, 1977.
5. Davies, K. J. A., C. M. Donovan, C. J. Refino, G. A. Brooks, L. Packer, and P. R. Dallman. Distinguishing effects of anemia and muscle iron deficiency on exercise biogenesis in the rat. Am. J. Physiol. 246 (Endocrinol. Metab. 9): E535-E543, 1984.
6. Edgerton, V. R., S. L. Bryant, C. A. Gillespie, and G. W. Gardner. Iron deficiency anemia and physical performance and activity of rats. J. Nutr. 102: 381-399, 1972.
7. Edgerton, V. R., L. B. Diamond, and J. Olson. Voluntary activity, cardiovascular and muscular responses to anemia in rats. J. Nutr. 107: 1595-1601, 1977.
8. Koziol, B. J., Y. Ohira, V. R. Edgerton, and D. R. Simpson. Changes in work tolerance associated with metabolic and physiological adjustment to moderate and severe iron deficiency anemia. Am. J. Clin. Nutr. 36: 830-839, 1982.

9. Ohira, Y., V. R. Edgerton, G. W. Gardner, K. A. Gunawardena, B. Senewiratne, and S. Ikawa. Work capacity after iron treatment as a function of hemoglobin and iron deficiency. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 27: 87-96, 1981.
10. Ohira, Y., D. R. Simpson, V. R. Edgerton, G. W. Gardner, and B. Senewiratne. Characteristics of blood gas in response to iron treatment and exercise in iron-deficient and anemic subjects. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 29: 129-139, 1983.
11. Edgerton, V. R., G. W. Gardner, Y. Ohira, K. A. Gunawardena, and B. Senewiratne. Iron-deficiency anaemia and its effect on worker productivity and activity patterns. *Brit. Med. J.* 2: 1546-1549, 1979.
12. Ohira, Y., K. Saito, T. Wakatsuki, W. Yasui, T. Suetsugu, K. Nakamura, H. Tanaka, and T. Asakura. Responses of β -adrenoceptor in rat soleus to phosphorus compound levels and/or unloading. *Am. J. Physiol.* 266(Cell Physiol. 35): C1257-C1262, 1994.
13. Pesce, A., R. H. McKay, F. Stolzenbach, R. D. Cahn, and N. O. Kaplan. Comparative enzymology of LDH. *J. Biol. Chem.* 239: 1753-1761, 1964.
14. Bass, A., D. Brdiczka, P. Eyer, S. Hoffer, and D. Pette. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Europ. J. Biochem.* 10: 198-206, 1969.
15. Sreere, P. A. Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13: 3-5, 1969.
16. Singer, T. P. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and α -glycerophosphate dehydrogenase. *Methods Biochem. Anal.* 22: 123-175, 1974.
17. Wharton, D. C. and A. Tzagoloff. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol.* 10: 245-250, 1967.
18. Ohira, Y., L.-J. Cartier, M. Chen, and J. O. Holloszy. Induction of an increase in mitochondrial matrix enzymes in muscle of iron-deficient

- rats. *Am. J. Physiol.* 253(Cell Physiol. 22): C639-C644, 1987.
19. Cartier, L.-J., Y. Ohira, M. Chen, R. W. Cuddihee, and J. O. Holloszy. Perturbation of mitochondrial composition in muscle by iron deficiency. *J. Biol. Chem.* 261: 13827-13832, 1986.
20. Ohira, Y., T. Wakatsuki, N. Inoue, K. Nakamura, T. Asakura, K. Ikeda, T. Tomiyoshi, and M. Nakajoh. Non-exercise-related stimulation of mitochondrial protein synthesis in creatine-depleted rats. In "Integration of Medical and Sports Sciences", ed. by Y. Sato, J. Poortmans, I. Hashimoto, and Y. Oshida, Karger, Basel, Switzerland, pp. 318-323, 1992.
21. Shoubridge, E. A., R. A. J. Challiss, D. J. Hayes, and G. K. Radda. Biochemical adaptation in the skeletal muscle of rats depleted of creatine with the substrate analogue β -guanidinopropionic acid. *Biochem. J.* 232: 125-131, 1985.
22. Ohira, Y., C.-S. Chen, J. Hegenauer, and P. Saltman. Adaptations of lactate metabolism in iron-deficient rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 173: 213-216, 1983.

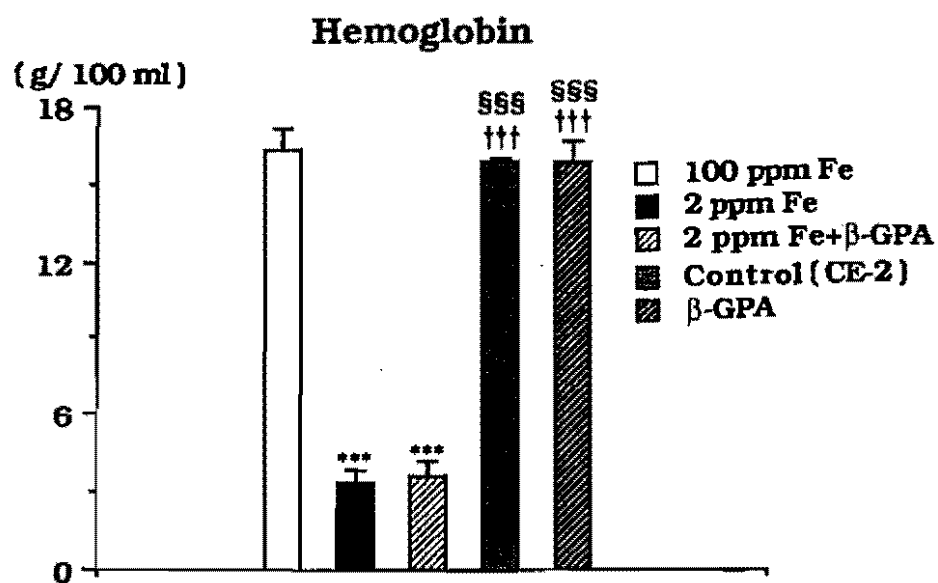


図-1 : 血中ヘモグロビン濃度。平均±SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100ppmFe, †††: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe, and §§§: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe+β-GP A.

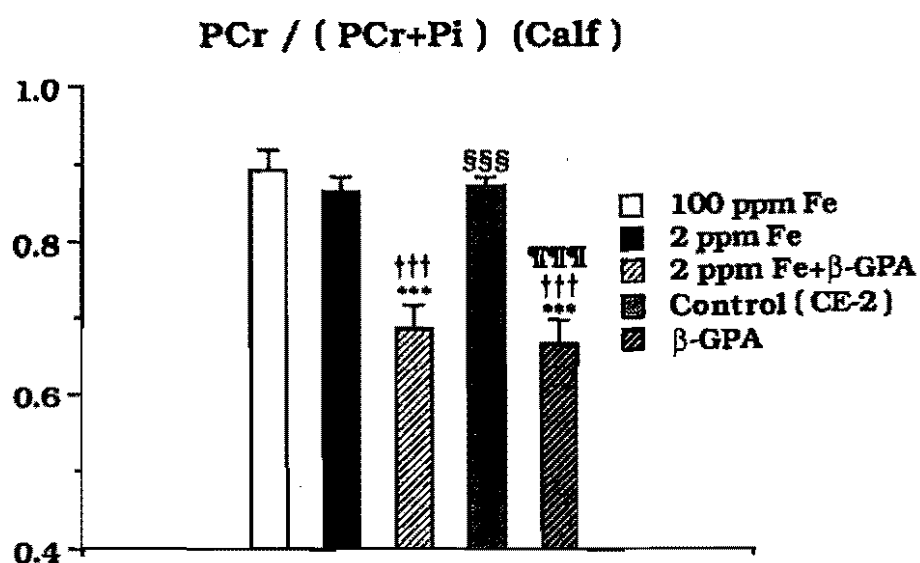


図-2 : ふくらはぎ部筋のPCr/ (PCr+Pi) 比。平均±SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100ppmFe, †††: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe, §§§: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe+β-GPA, and ¶¶¶: $p < 0.001$ vs. control (CE-2)

Succinate dehydrogenase (Soleus)

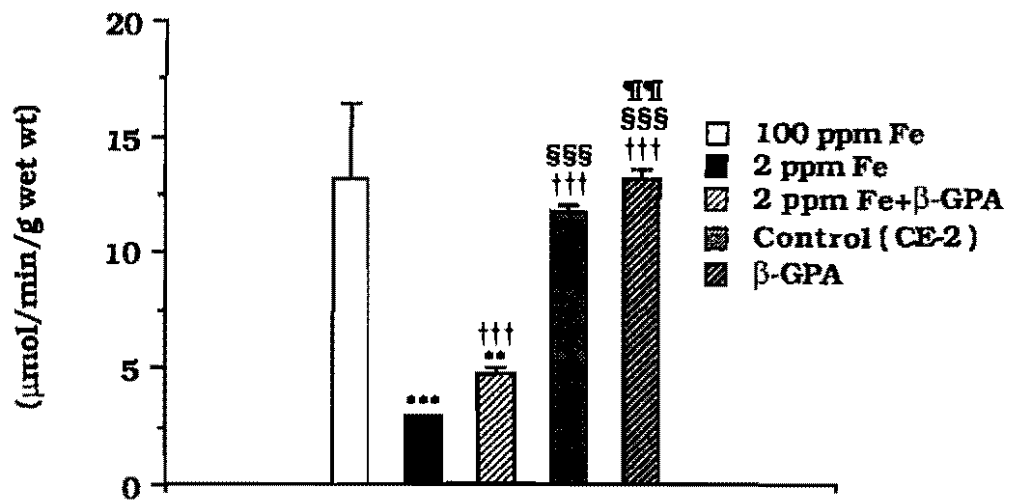


図-3 : ヒラメ筋中succinate dehydrogenase活性。平均±SEM。**: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ vs. 100ppmFe, †††: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe, §§§: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe+β-GPA, and ¶¶¶: $p < 0.01$ vs. control (CE-2) .

Cytochrome oxidase (Soleus)

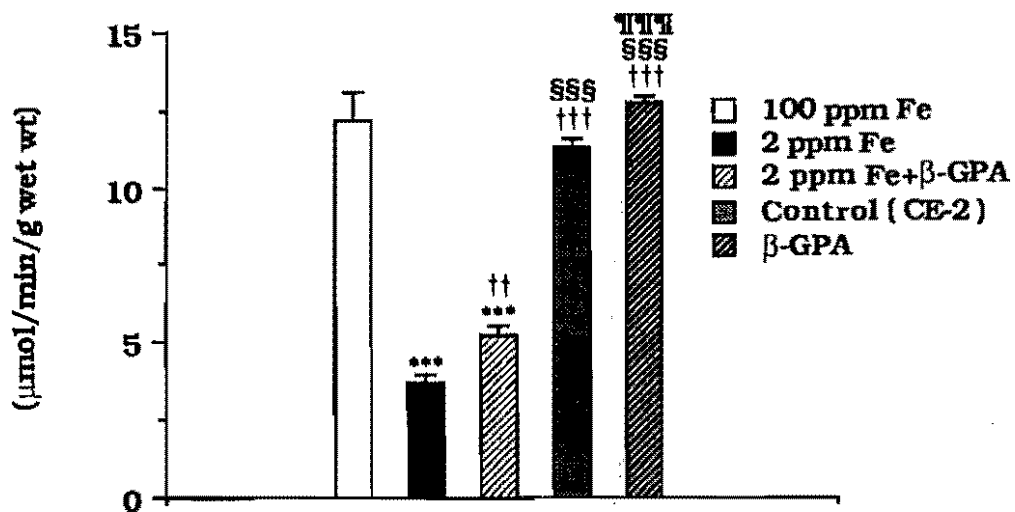


図-4 : ヒラメ筋中cytochrome oxidase活性。平均±SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100 ppm Fe, ††: $p < 0.01$ and †††: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe, §§§: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe+β-GPA, and ¶¶¶: $p < 0.001$ vs. control (CE-2) .

β -Hydroxyacyl CoA dehydrogenase (Soleus)

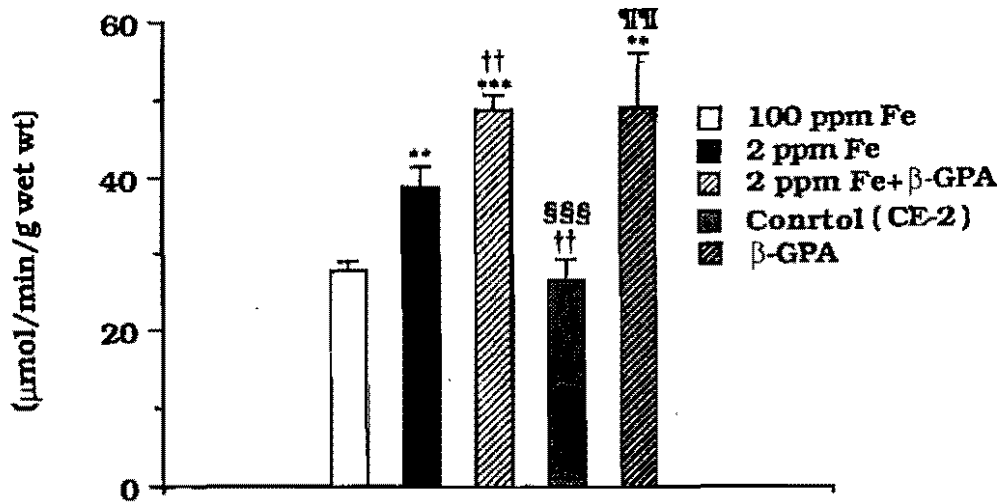


図-5 : ヒラメ筋中 β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase活性。平均 $\pm$ SEM。**: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ vs. 100ppm Fe, ††: $p < 0.01$ vs. 2 ppm Fe, §§§: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe + β -GPA, and †††: $p < 0.01$ vs. control (CE-2).

Citrate synthase (Soleus)

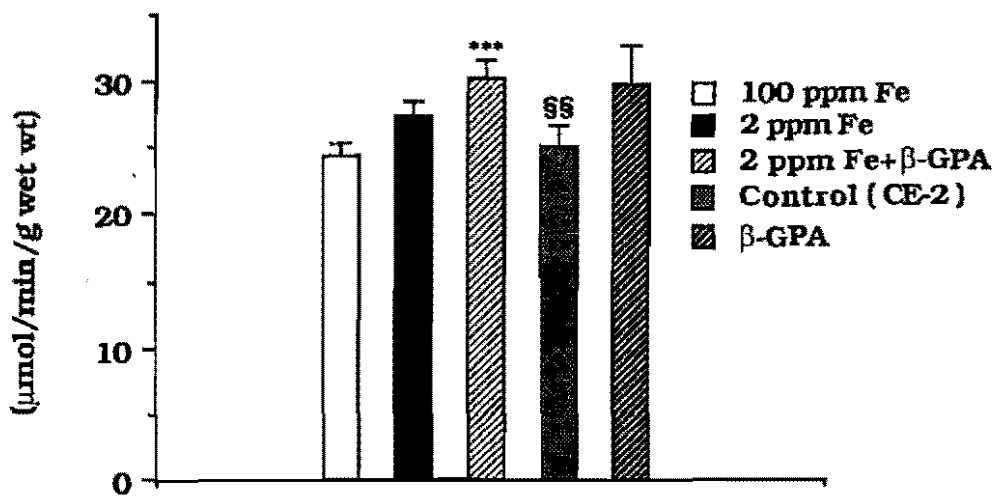


図-6 : ヒラメ筋中citrate synthase活性。平均 $\pm$ SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100ppm Fe and §§: $p < 0.01$ vs. 2ppm Fe + β -GPA.

Lactate dehydrogenase activity (Soleus)

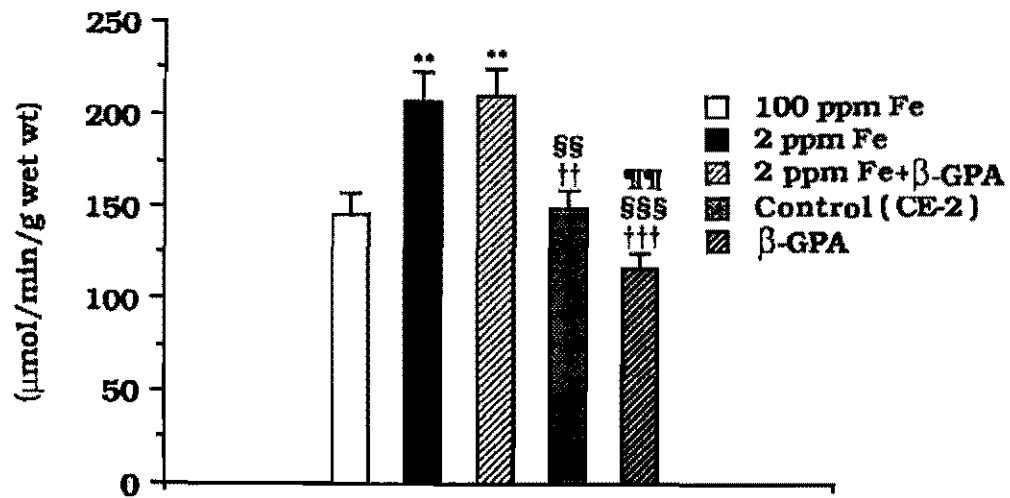


図-7: ヒラメ筋中lactate dehydrogenase活性。平均±SEM。 **: $p < 0.01$ vs. 100 ppm Fe, ††: $p < 0.01$ and †††: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe, §§: $p < 0.01$ and §§§: $p < 0.001$ vs. 2 ppm Fe+β-GPA, and ¶¶: $p < 0.01$ vs. control (CE-2) .