

称号及び氏名	博士（獣医学） 松嶋 周一
学位授与の日付	平成 18 年 2 月 20 日
論文名	「Pathological Studies on Toxicity Induced by Iron Lactate-Overloaded Rats: Investigation into the Pathogenesis of Eosinophilic Gastroenteritis and Osteopenia」 (ラットにおける乳酸鉄の毒性に関する病理学的研究：好酸球性胃腸炎および骨減少症の病理発生の解明)
論文審査委員	主査 小谷 猛夫 副査 松尾 三郎 副査 馬場 栄一郎 副査 山手 丈至

## 論文要旨

鉄はミネラルとして必須であり，成人で 1 日当たり 8~16mg を必要とする．妊婦，授乳婦，幼児では更に多くの量が必要である．このため乳酸鉄は 1957 年食品添加物に指定され，栄養強化剤として用いられている．主に調整粉乳用の鉄剤として 6mg/100g 程度添加されているほか，小麦粉，ビスケット，パンなどに 2~3mg/100g 添加されている．このように，乳酸鉄は栄養強化剤として汎用されているが，その安全性評価はこれまで全く行なわれていなかった．

実験動物を用いた栄養強化剤や化学物質などの毒性評価は，それらの摂取量の安全域を把握する上で重要であり，毒性病理学的知見は，適切な摂取量の決定の根拠と成り得る．そこで，今回乳酸鉄のラットに及ぼす毒性を明らかにするため，予備的に乳酸鉄の食品添加濃度のおよそ 1,000 倍 (5.0%，50,000ppm) を 13 週間混餌投与したところ，いくつかの興味ある毒性病理学的変化が現れることを見出した．骨，肝細胞，尿細管上皮及び細網内皮系のマクロファージ（肝臓，脾臓，骨髄，リンパ節）に鉄が沈着したことに加え，好酸球性胃腸炎と骨量減少が特徴的に

認められることを明らかにした。

乳酸鉄過剰摂取ラットにおいて、これらの病変が初めて見出されたことから、本研究は、ラットにおける乳酸鉄誘発性の好酸球性胃腸炎及び骨病変の病理発生機序を解明することを目的とした。

## 第1章 乳酸鉄過剰投与ラットにおける好酸球性胃腸炎の病理学的解析

乳酸鉄を 6,250ppm, 12,500ppm, 25,000ppm, 50,000ppm の濃度でラットに 13 週間混餌投与したところ、25,000ppm 及び 50,000ppm 投与群で好酸球増加症を伴う好酸球性胃腸炎が認められた。病理組織学的には、胃腸の粘膜及び粘膜下組織に好酸球浸潤が認められ、被蓋上皮細胞が粘液細胞に置換されていた。さらに、これら 2 群では胃粘膜の腺頸部でのアポトーシスの増加が、50,000ppm 群では胃腸の粘膜上皮間に globule leukocyte の増加が認められた。Globule leukocyte は細胞質内に明瞭なエオジン好性顆粒を包含し、免疫組織学的に肥満細胞プロテアーゼ II に陽性で CD8 に陰性であったことから、この細胞は肥満細胞に由来することが示された。病変部での血管透過性の亢進や血漿中 IgE 値の上昇もなかったことから、この消化管の変化は I 型アレルギーとは関連しない病変であると考察される。

## 第2章 ラットにおける乳酸鉄誘発性骨病変の病理学的解析

### 第1節 ラットにおける乳酸鉄誘発性骨減少症

乳酸鉄 50,000ppm をラットに 2 あるいは 4 週間混餌投与したところ骨減少症が誘発された。病理組織学的に脛骨の海綿骨梁は菲薄化し、形態計測の対象とした脛骨の二次海面骨領域において、破骨細胞数、破骨細胞面、骨吸収面の骨吸収パラメーターが増加し、それに伴い骨量、骨梁幅及び骨梁数は減少し、骨梁間隙は増加していた。しかし、骨形成パラメーターの骨芽細胞面は増加し、骨石灰化率は正常であった。また、血液生化学検査及び尿検査では、骨形成パラメーターの血中アルカリフォスファターゼ(ALP)値、骨吸収パラメーターの尿中ピリジノリン(PYR)値及びデオキシピリジノリン(D-PYR)値は増加したが、上皮小体ホルモン(PTH)値は減少していた。これらの所見は骨形成と骨吸収が共に亢進するが、骨形成を上回る骨吸収のため骨量が減少することを示唆しており、この病態が骨粗鬆症のそれと類似する骨病変であることを明らかにした。

### 第2節 ラットにおける乳酸鉄誘発性骨軟化症

乳酸鉄 50,000ppm をラットに 13 週間混餌投与したところ、脛骨の二次海面骨領域の骨梁は著しく減少し、骨梁には類骨が層板状に増加していた。形態計測により骨芽細胞面、類骨量及び類骨面などの骨形成パラメーターの増加が認められたことから、骨芽細胞の動員が亢進していることが示された。血液生化学検査では骨形成マーカーのオステオカルシン値やカルシウム値が増加し、PTH 値及び無機リン値が減少していた。これらの所見より、乳酸鉄誘発性の骨病変は、海綿骨領域の骨量減少と層板状類骨の増加を特徴とする低回転型骨軟化症に類似すると考えられた。また、石灰化骨と類骨の間に鉄沈着が認められ、骨石灰化遅延時間が延長したことから沈着した鉄がカルシウムの骨梁への沈着を抑制したものと推測された。

### 第 3 章 乳酸鉄静脈内投与ラットにおける骨毒性と上皮小体の微細構造学的解析

乳酸鉄過剰投与による骨毒性発症と PTH の変動との関連を明らかにする目的で、乳酸鉄 10 mg/kg を単回、3 日間、または 6 日間反復静脈内投与した。PTH 値は単回及び 3 日間投与で増加し、6 日間投与では減少傾向を示した。また、6 日間投与では鉄値や無機リン値が減少し、カルシウム値も減少傾向を示した。脛骨の一次海綿骨領域の破骨細胞数は 3 日間投与から増加し、6 日間投与で最も増加した。電顕的に、上皮小体主細胞間の解離が 3 日間投与から認められ、主細胞は極く軽度に萎縮していた。6 日間投与では上皮小体主細胞間が中等度に解離し、主細胞は軽度に萎縮して粗面小胞体は減少していた。主細胞の分泌顆粒面積は投与期間を通じて減少した。乳酸鉄は投与直後に PTH 分泌を亢進させて破骨細胞の活性化を誘発させる。しかし、投与を反復すると上皮小体主細胞の分泌顆粒の減少とともに PTH 合成も抑制させると考えられた。

### 総括

乳酸鉄による毒性変化、特に好酸球性胃腸炎、骨軟化症及び骨減少症の病理発生を明らかにする目的で、ラットに乳酸鉄の投与実験を行い以下の成績を得た。

1. 乳酸鉄 25,000ppm 及び 50,000ppm の 3 ヶ月投与により、好酸球性胃腸炎が誘発されることを明らかにした。胃腸管の粘膜及び粘膜下組織に好酸球浸潤が特徴的に見られた他に、globule leukocyte が増加していた。この細胞は、肥満細胞プロテアーゼ II に免疫染色陽性を示したことから、肥満細胞に由来することが明らかとなった。また、病変の特性から I 型アレルギー反応の関与は否定された。
2. 乳酸鉄 50,000ppm の 2 あるいは 4 週間投与により、骨減少症が誘発されることを明らかに

した。この骨減少症は骨形成と骨吸収が共に亢進するが、骨形成を上回る骨吸収のため骨量が減少する骨粗鬆症と同様の骨病変を示すことを明らかにした。

3. 乳酸鉄 50,000ppm の 3 ヶ月投与により、骨軟化症が誘発されることを明らかにした。この骨軟化症は骨梁に層板状の類骨を形成し、PTH 値及び無機リン値の低下から低回転型骨軟化症に類似することを明らかにした。また、この病変形成には石灰骨と類骨の間に沈着する鉄により誘発される可能性を示した。
4. 乳酸鉄 10mg/kg を静脈内に投与すると、投与直後に PTH 分泌の増加が起こり、投与を反復すると上皮小体主細胞の分泌顆粒の減少とともに PTH 分泌が徐々に抑制された。PTH 値の減少と反比例して破骨細胞数は投与 3 日から増加することを明らかにした。
5. これらの一連の研究により、乳酸鉄の毒性を明らかにするとともに、特徴的に形成される好酸球性の胃腸炎や骨病変の病理発生機序の一端を解明した。これら研究成果は乳酸鉄の毒性を把握する上で有用な情報を提示するとともに、この乳酸鉄誘発ラット病変はヒトや動物における類似病変を解析する上で有用な疾患モデル動物になると考えられる。

## 審査結果の要旨

鉄はミネラルとして必須であり、成人で 1 日当たり 8~16mg を必要とする。妊婦、授乳婦、幼児では更に多くの量が必要である。このため乳酸鉄は 1957 年食品添加物に指定され、主に調整粉乳用の鉄剤として 6mg/100g 程度添加されているほか、小麦粉、ビスケット、パンなどに 2~3 mg/100g 添加されている。このように、乳酸鉄は栄養強化剤として汎用されているが、その安全性評価はこれまで全く行なわれていなかった。

実験動物を用いた栄養強化剤や化学物質などの毒性評価は、それらの摂取量の安全域を把握する上で重要であり、毒性病理学的知見は、適切な摂取量の決定の根拠と成り得る。そこで、今回乳酸鉄のラットに及ぼす毒性を明らかにするため、予備的に乳酸鉄の食品添加濃度のおよそ 1,000 倍（5.0%，50,000ppm）を 13 週間混餌投与したところ、骨、肝細胞、尿細管上皮及び細網内皮系のマクロファージ（肝臓、脾臓、骨髄、リンパ節）に鉄が沈着したことに加え、好酸球性胃腸炎と骨量減少が特徴的に認

められた。

乳酸鉄過剰摂取ラットにおいて、これらの病変が初めて見いだされたことから、本研究は、ラットにおける乳酸鉄誘発性の好酸球性胃腸炎及び骨病変の病理発生機序を解明することを目的として行い、以下の成績を得た。

1) 乳酸鉄 25,000ppm 及び 50,000ppm の 3 ヶ月投与により、好酸球性胃腸炎が誘発されることを明らかにした。胃腸管の粘膜及び粘膜下組織に好酸球浸潤が特徴的に見られた他に、globule leukocyte が増加していた。この細胞は、肥満細胞プロテアーゼ II に免疫染色陽性を示したことから、肥満細胞に由来することが明らかとなった。また、病変の特性から I 型アレルギー反応の関与は否定された。

2) 乳酸鉄 50,000ppm の 2 あるいは 4 週間投与により、骨減少症が誘発されることを明らかにした。この骨減少症は骨形成と骨吸収が共に亢進するが、骨形成を上回る骨吸収のため骨量が減少する骨粗鬆症と同様の骨病変を示すことを明らかにした。

3) 乳酸鉄 50,000ppm の 3 ヶ月投与により、骨軟化症が誘発されることを明らかにした。この骨軟化症は骨梁に層板状の類骨を形成し、上皮小体ホルモン (PTH) 値及び無機リン値の低下から低回転型骨軟化症に類似することを明らかにした。また、この病変形成には石灰骨と類骨の間に沈着する鉄により誘発される可能性を示した。

4) 乳酸鉄 10 mg/kg を静脈内に投与すると、投与直後に PTH 分泌の増加が起こり、投与を反復すると上皮小体主細胞の分泌顆粒の減少とともに PTH 分泌が徐々に抑制された。PTH 値の減少と反比例して破骨細胞数は投与 3 日から増加することを明らかにした。

以上のように本研究では、乳酸鉄の毒性変化、特に好酸球性胃腸炎や骨病変の病理発生機序の一端を解明した。これら研究成果は乳酸鉄の毒性を把握する上で有用な情報を提示するとともに、この乳酸鉄誘発ラット病変はヒトや動物における類似病変を解析する上で有用な疾患モデル動物になると考えられ、毒性病理学や実験動物医学の発展に大きく貢献するものである。本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、申請者に対し、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。