研究ノート

貧血ラットに対するクエン酸第一鉄 ナトリウムおよび酵素処理ヘム鉄 投与による貧血改善効果の比較

藤森浩行*, 高本和雄*

笠井正義*, 吉野芳夫**

* 三生製薬株式会社研究開発所

** 昭和女子大学大学院食物栄養学

Therapeutic Comparison between Sodium Ferrous Citrate and a Heme Iron Preparation for Treatment of Rats with Iron Deficiency Anemia

Hiroyuki FUJIMORI,* Kazuo TAKAMOTO,*
Masayoshi KASAI* and Yoshio YOSHINO**

* Research & Development Laboratory,
Sansho Co., Ltd., Honjo 367

** Showa Women's University, Setagaya-ku,
Tokyo 154

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn.
Soc. Nutr. Food Sci.*) 46, 503~506 (1993)

A comparison was made between the effect of sodium ferrous citrate (SFC) and a heme iron preparation (HIP) for treatment of rats with iron deficiency anemia (Hb 4.5~4.9 g/dl) induced by repeated bloodletting. HIP was prepared by proteinase treatment of livestock hemoglobin. During 16 days of treatment, the anemic rats received either of the iron sources at 1 or 5 mg/kg body weight daily through a stomach catheter, or were fed on iron-poor diets with no iron supplement for the same period. At the end of iron administration, the best recovery score was observed in the group given SFC at 5 mg Fe/kg, as recognized by gains in Hb (47.2 ± 0.3 g/dl) and Ht ($423.9 \pm 1.1\%$), and HRE (hemoglobin regeneration efficiency, $25.98 \pm 4.51\%$), transferrin saturation ($25.0 \pm 4.0\%$) and liver nonheme iron (391 ± 65 μ g/head). These values were significantly higher than those in both the controls and the group given HIP at 5 mg Fe/kg. The values in the latter group were Δ Hb 1.6 g/dl, Δ Ht 9.0%, HRE 5.28%, transferrin saturation

6% and liver nonheme iron 184 μ g/head, which were similar to the values in the group given SFC at 1 mg Fe/kg. We observed that SFC iron was better utilized than HIP iron for recovery of anemia in iron-deficient rats.

Key Words sodium ferrous citrate, heme iron preparation, hemoglobin regeneration efficiency, iron-deficient rats.

(Received June 3, 1993)

近年、潜在性鉄欠乏症および鉄欠乏性貧血の問題が注目され、鉄強化食品の開発が行われつつある。現在、鉄強化用の鉄化合物としてはクエン酸第一鉄ナトリウムなどの非ヘム鉄とヘモグロビン中の鉄の含有量を増した酵素処理ヘム鉄の2種類がおもに用いられている。一般にヘム鉄は天然物由来で、高吸収性を示すという報告¹⁾²⁾と、非ヘム鉄のほうが吸収がよい³⁾⁴⁾という両報告とがあり、未だにはっきりとした結果が得られていないのが現状である。そこで、鉄欠乏性貧血モデル動物である貧血ラットを用いて鉄要求量の高い状態で、これらの鉄化合物を強制経口投与することにより貧血改善効果に差があるか否かについての検討を行った。

実験方法および材料

1. 使用動物

SD 系雄性ラットを(株)クリーン実験動物センターより3週齢で購入し、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の動物飼育室にて予備飼育をしたのち、体重約 100 g 前後のものを実験に用いた。飼育期間および実験期間中は食餌としてラット用鉄欠乏食を与え、蒸留水を自由に摂取させた条件下で実験を行った。

2. 使用薬物

クエン酸第一鉄ナトリウムは自家合成品⁵⁾(以下、SFC 鉄含有量として 10.3%)を、また、酵素処理ヘム鉄はブタヘモグロビンをアルカラゼで処理し、限外濾過したもの(以下 HIP, 鉄含有量として 1.03%)を用いた。SFC および HIP は 0.5% カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液に懸濁または溶解して投与した。

3. 測定試薬

ヘモグロビン(以下 Hb)値は SLS ヘモグロビン法⁶⁾により測定した。ヘマトクリット(以下 Ht)値についてはヘマトクリット用毛细管を用いて測定を行った。吸収された鉄のヘモグロビンへの再生効率(以下 HRE)は Zhang らの方法⁷⁾に従い、以下のように計算した。

$$\text{hemoglobin-Fe(mg)} \\ = \{\text{body-weight (g)}\}$$

* 〒367 本庄市西富田 262-1

** 〒154 東京都世田谷区太子堂 1-7

$$\begin{aligned} & \times \{ \text{ml blood/g body-weight (assumed to be} \\ & \quad 0.067 \text{ ml)} \} \times \{ \text{g hemoglobin/ml blood} \} \\ & \times \{ \text{mg Fe/g hemoglobin (assumed to be} \\ & \quad 3.35 \text{ mg)} \} \\ \text{HRE} = & \frac{\text{mg hemoglobin-Fe (final)} - \text{mg hemoglobin-Fe (initial)}}{\text{mg Fe consumed}} \end{aligned}$$

血清鉄（以下 SI）値および不飽和鉄結合能（以下 UIBC）については Nitroso-PSAP 直接法⁸⁾により測定した。総鉄結合能（以下 TIBC）およびトランスフェリン飽和率（以下 TS）については SI 値および UIBC の値より算出した。

4. 実験方法

1) 貧血ラットの作成 ラットの尾静脈より、1日1回約 1.5 ml の血液を4日間連続して瀉血し、貧血ラットを作成した。貧血状態を確認するため瀉血した血液より Hb 値、Ht 値、SI 値および UIBC を測定した。

2) 群分け 瀉血終了から2日後、貧血状態を確認し、Hb 値がほぼ同じ値になるように群分けを行った。各投与群は、SFC10, 50 mg/kg 各投与群（鉄として 1, 5mg/kg）、HIP100, 500 mg/kg 各投与群（鉄として 1, 5 mg/kg）および対照群の5群とした。投与容量は体重 100 g 当り 0.5 ml となるように調製し、経口ゾンデにより 16 日間の強制連続経口投与を行った。

3) 採血 瀉血した血液および被験物質投与前、被験物質投与開始後 4, 7, 11, 14 日には尾静脈より血液を採取した。また、実験終了時にはエーテル麻酔下にて下行大動脈より採血致死させ、ラットの肝臓を採取し、肝臓重量の測定を行い、肝臓中の非ヘム鉄の定量を Bothwell らの方法⁹⁾に準じて行った。

4) 測定結果の統計処理 得られた測定結果のうち群内の投与前後の比較は paired *t*-test、各群間比較は一元配置分散分析により検定を行った。

実験結果

Hb 値、Ht 値および SI 値では瀉血操作後に有意な低下を示し、UIBC は有意に上昇した（Table 1）。これらの値より、頻回瀉血により重症な貧血となることが認められた。瀉血期間中の体重は増加がみられず、経口投与開始時までほぼ同じ値を示した。各投与群のうち SFC 50 mg/kg 投与群では経口投与開始後より体重の増加を認め、投与開始後 10 日目以降は他のすべての投与群に対し有意に増加が認められた（Table 1, $p < 0.01$ ）。

Hb 値は SFC 50 mg/kg 投与群において経口投与開始後 4 日目には他の群に比べ有意な増加を示し、試験終了時にはすでに実験開始時より高い値を示した（Table

1, $p < 0.001$ ）。Hb 増加率についても SFC 50 mg/kg 投与群が他の群に比べ有意に増加を示した（Table 1, $p < 0.01$ ）。

Ht 値においても Hb 値とはほぼ同様な推移を示し、Ht 増加率でも同様に SFC 50 mg/kg 投与群が他の群に比べ、有意に増加を示した（Table 1, $p < 0.01$ ）。

SI 値はすべての群において瀉血終了後と実験終了時の間に有意に増加が認められたが、SFC 50 mg/kg 投与群のみ実験開始時の値よりも高値を示し、また、HIP 500 mg/kg 投与群に対して、有意に増加が認められた（ $p < 0.001$ ）。他の群の実験終了時の値は対照群に対しての差は認められなかった（Table 1）。

UIBC および TIBC の変化では、頻回瀉血により値は上昇したが、SFC 50 mg/kg 投与群のみ実験終了時に比べ有意に低下を示した（ $p < 0.001$ ）のに対し、他の群では瀉血終了時とはほぼ同じ値を示した（Table 1）。

TS も瀉血により有意に低値を示したが、実験終了時には SFC 50 mg/kg 投与群にのみ有意な上昇を示した（ $p < 0.001$ ）。他の群については若干の上昇傾向が認められた程度であった（Table 1）。

経口投与終了後に各群の肝臓中の非ヘム鉄の定量を行った結果を Fig.1 に示した。この結果から、SFC 50 mg/kg 投与群は他の群に比べ有意に肝臓中の非ヘム鉄の量が多いことが認められた（ $p < 0.05$ ）。

実験終了時の HRE の値を Table 1 に、また、試験期間中の HRE の推移を Fig.2 に示した。実験終了時の HRE の値が高いのは SFC 投与群で、HIP 投与群では両群とも低値を示した。また、HRE の推移では、SFC 50 mg/kg 投与群が急激に上昇したのちほぼ同じ値で推移するのに対し、SFC 10 mg/kg 投与群では一度低下したのち、急激に上昇し、実験終了時ではまだ徐々に上昇する傾向であった。一方、HIP 500 mg/kg 投与群では徐々に上昇傾向を示し、HIP 100 mg/kg 投与群においては一度低下し、上昇傾向ではあるが、実験終了時においても投与開始時の値とほぼ同じ値であった。

考 察

近年食品の鉄強化剤として酵素処理ヘム鉄が用いられつつある。しかし、ヘム鉄の吸収がよいといわれている文献は、ラットにおいては絶対的な鉄の投与量が非ヘム鉄のほう为数倍多く¹²⁾、鉄の吸収過程から考えると、非ヘム鉄のほう吸収率は落ちる可能性がある。また、鉄欠乏性貧血の研究は古くから多くの研究者により行われており、とりわけラットによる研究が多い。そのため、鉄としての絶対量を同一にし、確実な投与方法として経口ゾンデを用いての経口投与による HIP と SFC との貧血ラットでの鉄吸収比較実験を行った。

Table 1. Changes of several parameter in rats by bloodletting and after oral administration.

		SFC 50 mg/kg (n=25)	SFC 10 mg/kg (n=17)	HIP 500 mg/kg (n=23)	HIP 100 mg/kg (n=15)	Control (n=23)
Hb (g/dl)	Start	10.8±0.4	11.1±0.5	11.1±0.3	11.5±0.4	11.6±0.3
	End of bloodletting	4.8±0.2 ^a	4.5±0.2 ^a	4.7±0.2 ^a	4.8±0.2 ^a	4.9±0.2 ^a
	End of experiment	12.0±0.3 ^{c,d}	6.6±0.2 ^c	6.2±0.5 ^c	4.8±0.3	3.4±0.1
	ΔHb	7.2±0.3 ^{c,d}	1.5±0.3	1.6±0.4	-0.4±0.2	-1.5±0.2
Ht (%)	Start	35.8±1.2	36.5±1.4	36.9±1.1	37.3±2.0	37.9±1.4
	End of bloodletting	16.1±0.8 ^a	14.9±0.6 ^a	15.8±0.5 ^a	16.3±0.5 ^a	16.4±0.5 ^a
	End of experiment	40.0±0.9 ^{c,d}	25.9±0.8 ^c	24.7±1.4 ^c	20.0±1.2	13.9±0.5
	ΔHt	23.9±1.1 ^{c,d}	10.3±1.0	9.0±1.5	3.7±1.1	-2.5±0.4
SI (μg/dl)	Start	77.3±16.7	95.3±18.9	63.7±9.3	96.7±18.5	77.2±11.6
	End of bloodletting	32.5±2.3 ^a	27.7±1.4 ^b	27.0±2.4 ^a	33.4±4.2 ^b	28.0±2.1 ^a
	End of experiment	148.4±20.7 ^{c,d}	49.1±6.1	41.1±6.5	75.7±7.9	46.7±5.5
UIBC (μg/dl)	Start	546±34	502±31	548±26	524±34	524±27
	End of bloodletting	800±24 ^a	801±24 ^a	753±27 ^a	786±30 ^a	790±23 ^a
	End of experiment	453±17 ^{c,d}	767±22	771±20	814±18	823±21
TIBC (μg/dl)	Start	623±25	598±30	612±28	621±28	602±22
	End of bloodletting	833±24 ^a	828±24 ^a	780±28 ^a	820±31 ^a	818±24 ^a
	End of experiment	601±13 ^{c,d}	816±20	812±17	890±22	869±18
Transferrin saturation (%)	Start	13.7±3.3	15.6±2.8	10.7±1.5	16.0±3.1	13.6±2.1
	End of bloodletting	4.0±0.3 ^a	3.4±0.2 ^c	3.5±0.4 ^a	4.1±0.5 ^a	3.4±0.2 ^a
	End of experiment	25.2±3.5 ^{c,d}	6.1±0.8	5.3±0.9	8.7±1.1	5.6±0.8
Body weight (g)	Start	99.7±2.7	100.5±2.4	103.1±2.0	104.8±1.7	99.7±2.8
	End of bloodletting	107.0±3.3	102.2±3.2	99.8±3.4	104.0±3.2	103.7±3.1
	End of experiment	193.0±7.3 ^{c,d}	165.2±7.1 ^c	161.4±6.5 ^c	134.0±7.5	116.7±4.4
	ΔBW	71.5±6.1 ^{c,d}	59.8±6.2 ^c	46.2±3.0 ^c	22.7±8.1	6.7±2.6
HRE (%)		26.0±4.5 ^d	25.8±4.5 ^{c,d}	5.3±1.4	-0.8±2.8	—
ΔHb-Fe (mg)		3.1±0.2 ^{c,d}	0.54±0.1	0.57±0.2	-0.03±0.06	-0.36±0.04

Hb : hemoglobin, Ht : hematocrit, SI : serum iron concentration, UIBC : unsaturated iron binding capacity, TIBC : total iron binding capacity, HRE : hemoglobin regeneration efficiency, Start : start of experiment, Mean±SE, ^a $p<0.001$ vs Start, ^b $p<0.01$; ^c $p<0.001$ vs Control, ^d $p<0.001$ vs HIP 500 mg/kg.

鉄としての同一投与量で比較した場合、SFC 50 mg/kg 投与群では測定項目のすべてにおいて投与開始後約 2 週間で良好な結果が得られ、同一鉄投与量である HIP 500 mg/kg に対し、有意な貧血の改善効果が認められた。また、肝臓中の非ヘム鉄の量は SFC 50 mg/kg 投与群のみ上昇し、他の群は対照群とほぼ同じ値を示した。このことは吸収された鉄が Hb 合成および、含鉄酵素等に利用され、肝臓中に貯蔵するまで吸収されなかつ

たためと考えられる。

HRE の値は SFC 投与群が HIP 投与群に比べ有意に高値を示した。また、Zhang らの報告⁷⁾によると、実験条件が異なるものの、重篤な貧血ラットの場合、HRE の値はヘム鉄投与に比べ硫酸第一鉄投与のほうが高く、今回の実験と同様に非ヘム鉄投与群のほうがより良い吸収効率を示している結果を得ている。

以上の結果より、貧血ラットにおいて、SFC に高吸収

Fig. 1. Contents of liver nonheme iron of rats after oral administration.

5-10 rats in each group were tested. * $p < 0.05$ vs other groups.

性および速い貧血改善効果があることを示唆しており、この実験系においては必ずしも HIP の鉄としての利用能が高いとはいえないと考えられる。

これまでに、ラットでは無機鉄の吸収がよく³⁾、ヒトではむしろヘム鉄の吸収がよいという報告¹⁰⁾もある。しかし、この吸収機構の違いについては明確でなく、吸収機構に本質的な相違があるのかについてはなお、不明である。一般に、鉄の吸収機構は非ヘム鉄では鉄イオンの形またはキレート形で吸収されるといわれ¹¹⁾、一方、ヘム鉄においては、その大部分は消化管粘膜細胞内で無機鉄に分解され、門脈血に出現する際にはヘムの形よりも無機の鉄イオンの形で現れると考えられている¹²⁾。重度の貧血の場合、SFC はキレート化合物の状態のまま輸送され、鉄吸収における吸収抑制機構があまり働かないと考えられるが、HIP の場合、生体の生理活性度の低下¹³⁾等により、ヘムの消化管内での分解能の低下が起こり、鉄吸収総量の低下が起こるのではないかと考えられる。

要 約

頻回瀉血により作成した貧血ラットを用いて SFC (鉄として 1, 5 mg/kg) および HIP (鉄として 1, 5 mg/kg) 投与による貧血改善効果の比較試験を行った。

貧血ラットにおいて同一鉄投与量で比較した場合、SFC 投与群のほうが HIP 投与群に比し、有意な貧血改善効果を示した。肝臓中の非ヘム鉄の量においても SFC 50 mg/kg 投与群が他の群に比べ、有意に増加を示した。

ヘモグロビン再生効率 (HRE) の推移では SFC 50 mg/kg 投与群が経口投与開始後急激に上昇し、その後

Fig. 2. Changes of HRE value on iron deficient rats.

15-25 rats in each group were tested. ** $p < 0.01$ vs HIP 500 mg/kg.

平衡状態であったのに対し、SFC 10 mg/kg 投与群ではラグタイムを有したのち、急激に上昇した。HIP 投与群では若干の上昇を認めたのみであった。

以上の結果より貧血状態における SFC 投与は HIP 投与に比べ、貧血改善効果にすぐれていると示唆された。

文 献

- 1) Bjorn-Rasmussen, E., Hallberg, L., Isaksson, B. and Arridsson, B.: *J. Clin. Invest.*, **53**, 247 (1974)
- 2) Hallberg, L., Bjorn-Rasmussen, E., Howard, L. and Rossander, L.: *Scand. J. Gastroent.*, **14**, 769 (1979)
- 3) Wheby, M.S., Suttle, G.E. and Ford, K.T., III: *Gastroent.*, **58**, 647 (1970)
- 4) Gordon, D.T. and Godber, J.S.: *J. Nutr.*, **119**, 446 (1989)
- 5) 石館守三, 鈴木郁生, 谷村顯雄: 食品添加物公定書解説書 (第六版), D-294 (1992), 廣川書店 (東京)
- 6) 大城 巖, 前田次郎: 臨床病理, **29**, 203 (1981)
- 7) Zhang, D., Hendricks, D.G. and Mahoney, A.W.: *Br. J. Nutr.*, **61**, 331 (1989)
- 8) 斎藤幹彦, 堀口大吉, 喜納兼勇: 分析化学, **30**, 635 (1981)
- 9) Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D. and Finch, C.A.: *Iron Metabolism in man* (1979), Blackwell Scientific Publication (London)
- 10) Johnson, P.E., Lukaski, H.C. and Bowman, T.D.: *Am. Inst. Nutr.*, **117**, 501 (1987)
- 11) Terato, K., Fujita, T. and Yoshino, Y.: *Am. J. Dig. Dis.*, **18**, 121 (1973)
- 12) Conrad, M.E., Benjamin, B.I., Williams, H.L. and Foy, A.L.: *Gastroenterology*, **53**, 5 (1967)
- 13) 鈴木和春, 菅家祐輔, 五島孜郎: 栄養と食糧, **35**, 397 (1982)

(1993年6月3日受理)