静脈注射用コンドロイチン硫酸鉄コロイドについて (第4報¹⁾) ⁵⁹Fe 標識コンドロイチン硫酸鉄コロイドのマウス投与後における ⁵⁹Fe の体内分布
(2) 体内分布および臓器内鉄分画の投与量依存性

中西 豊, 貴志昌高

大日本製薬株式会社中央研究所²⁾

Studies on Iron-Chondroitinsulfate Colloid for Intravenous Injection. IV.¹⁾
Distribution of ⁵⁹Fe in the Mice followed by the Injection of ⁵⁹Fe
Labeled Iron-Chondroitinsulfate Colloid. (2). Dose Dependence
of the Distribution and the Fractionation of ⁵⁹Fe in Organs

YUTAKA NAKANISHI and MASATAKA KISHI

Research Laboratory, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.²⁾

(Received June 30, 1969)

In order to examine the course of intravenously injected iron chondroitinsulfate phagocytized in the reticuloendothelial system and the iron in it utilized as hemoglobin iron, iron chondroitinsulfate labeled with ⁵⁹Fe was injected intravenously in normal mice, in three different doses, and examinations were made on its systemic distribution, separation of ⁵⁹Fe into hemin iron and non-hemin iron in liver and spleen, and periodical changes in non-hemin ⁵⁹Fe in the fraction separated by the Yoneyama-Konno method from the liver and small intestine, and the following points were revealed.

1) Disappearance of ⁵⁹Fe from blood immediately after intravenous injection of iron (⁵⁹Fe) chondroitinsulfate, its incorporation into the liver, followed by its disappearance from the liver, and incorporation of ⁵⁹Fe into erythrocytes all become rapid with decreased amount administered.

2) Introduction of ⁵⁹Fe into hemin iron is not observed in the liver but the peak of ⁵⁹Fe in the spleen during 8—96 hours after the intravenous injection is clearly due to the incorporation of ⁵⁹Fe into hemin iron.

3) Formation of ferritin in the liver requires a certain time lag and there is a good correspondence between that and incorporation of ⁵⁹Fe into erythrocytes.

4) ⁵⁹Fe that has collected in the small intestine is partly excreted and its excretion rate is dependent on the dose administered but follows the first-order formula.

前報¹⁾において ⁵⁹Fe 標識コンドロイチン硫酸鉄コロイド (以下「コ鉄」または「CSA-Fe」と略す) をマウスに静注後の ⁵⁹Fe の体内分布の時間的変化を解剖後計数による方法および全身オートラジオグラフィの方法を併用して検討した結果を報告した。「コ鉄」の作用機序の解明にはさらにこの ⁵⁹Fe が静注後網内系に貪食されコンドロイチン硫酸鉄コロイドから生理鉄に変わり、さらにこの鉄が血色素鉄として赤血球中にとり込まれていく過程を追跡する必要がある。そこで本報では「コ鉄」を3種の投与量で静注した場合の ⁵⁹Fe の主要臓器への分布および臓器内の ⁵⁹Fe のヘミン鉄と非ヘミン鉄の分離ならびに米山, 紺野法による非ヘミン鉄の分画の時間的変化を検討した結果を報告する。

実 験 の 部

- ⁵⁹Fe 標識「コ鉄」の合成 塩化第2鉄 (⁵⁹Fe) を用い第1報³⁾の方法により合成した。
- 体内分布実験 使用した動物, 実験法, 放射能測定等はすべて前報と同一なるも, 注射液は Table I の

1) 第3報: 中西 豊, 貴志昌高, 宮崎 亀, 鹿島正俊, 松岡 理, 薬誌, 89, 984 (1969).

2) Location: Ebie-Kami-2-chome, Fukushima-ku, Osaka.

3) 中西 豊, 倉田邦夫, 吉村嘉男, 於勢真輔, 薬誌, 86, 46 (1966).

TABLE I. Compositions of ^{59}Fe labeled Iron-Chondroitinsulfate Colloids

Iron-chondroitin-sulfate colloids	Compositions (amounts per ml)		
	Radioactivity of ^{59}Fe (μCi)	Fe (mg)	Sodium chondroitin-sulfate (mg)
L	5	4.0	20.0
M	5	1.3	6.7
S	5	0.4	2.0

L and S are same as A and B in the previous paper respectively.

3 種を用い, いずれもマウスの体重 20 g に対し 0.1 ml の割合で尾静脈内に投与した. したがって投与鉄量はマウスの体重 20 g に対し L 投与群では 0.40 mg, M 投与群では 0.13 mg, S 投与群では 0.04 mg となる.

測定値は主として吸収率 (absorption ratio; AR) であらわした.

$$AR = \frac{\text{臓器中の放射エネルギー}}{\text{投与した全放射エネルギー}} \times 100$$

3. 非ヘミン鉄とヘミン鉄の分離 Brückmann and Zondeck の方法⁴⁾ により行なった. すなわち細切した臓器検体 0.1—0.8 g を正しく秤量し, Potter のホモジナイザーに入れ 2 ml の 4% ピロリン酸ソーダ水溶液とともにホモジナイズする. これを Chart 1 のごとく分画する

Chart 1. Extraction of Non-Hemin Iron by Brückmann-Zondeck Method

Chart 2. Fractionation of Non-Hemin Iron by Yoneyama-Konno Method

4) G. Brückmann, S.G. Zondeck, *J. Biol. Chem.*, **135**, 23 (1940).

I, II, III の分画を合わせたものが非ヘミン鉄で, IV の分画がヘミン鉄である.

肝臓および脾臓についてこれらの分画の時間的変化を追跡した.

4. 非ヘミン鉄の分画 米山, 紺野の方法⁵⁾ により行なった. すなわち細切した臓器検体 0.5—1.5 g を正しく秤量し, Potter のホモジナイザーに入れ 5 ml の生理食塩水とともにホモジナイズする. これを Chart 2 のごとく分画する.

I がヘモシデリン (hemosiderin), II がフェリチン (ferritin), III が核蛋白や他の高分子に結合した鉄, IV が遊離の鉄の分画といわれる. 肝臓および小腸についてこれらの分画の時間的変化を追跡した.

結果および考察

1. 血液

血液中の ^{59}Fe 分布の時間的変化を Fig. 1 に示す. 投与量による差は血中からの消失過程にまず明瞭にあらわれ, 血中の量が最低に達する時間は投与量の大きいものから順に約 4 時間, 1 時間, 15 分以下となっている. 一方血液中の量が最低に達した以後再び上昇するのは赤血球中への ^{59}Fe のとり込みであることは前報¹⁾ に報告したが, このとり込み過程においても投与量が小さいほどとり込まれる割合は大きくなり, S 投与群では 2 週間で投与量の約半分が赤血球中へとり込まれている.

Fig. 1. ^{59}Fe Contents (AR) in Blood after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

Fig. 2. ^{59}Fe Contents (AR) in Liver after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

2. 肝 臓

肝臓中の ^{59}Fe 分布の時間的変化を Fig. 2 に, 肝臓中の ^{59}Fe の中ヘミン鉄の占める割合の時間的変化を Fig. 3 に, また肝臓中の ^{59}Fe のうちフェリチン分画の占める割合およびフェリチン分画の投与量に対する AR の時間的変化をそれぞれ Fig. 4, 5 に示す.

まず ^{59}Fe の分布では最初のとり込みの過程に投与量による差が明瞭にあらわれ, 最高値に達する時間は投与量

Fig. 3. Ratio of Hemin Fraction of ^{59}Fe Contents (AR) in Liver after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

Fig. 4. Ratio of Ferritin Fraction of ^{59}Fe Contents (AR) in Liver after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

5) Y. Yoneyama, K. Konno, *J. Biochem.*, **40**, 377 (1953).

Fig. 5. ^{59}Fe Contents (AR) in Liver as Ferritin after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

Fig. 6. Elimination of ^{59}Fe from Liver after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

の大きいものから順に 4—8 時間, 1—4 時間, 15—30 分となり, 血中からの消失によく対応している. また肝臓からの消失過程では L と M 投与群では大差ないも, S 投与群では他の群より速やかで, 2 週間で残存率が 7% 位になる. さらに消失過程を定量的に比較するため AR の対数と時間の関係を求めたものが Fig. 6 である. この図より消失過程は最高値から 1—2 日目へかけての急激な減少と, それ以後の緩やかな減少の 2 直線からなることがわかる. この 2 本の直線より求まる 2 つの一次の消失速度定数および 2 直線の交点の時刻を求めた結果を Table II に示す. これらの消失速度定数は投与量が小さくなるとともに大きくなり, また 2 直線の交点も短時間側へ移ることがわかる.

TABLE II. Apparent First-Order Rate Constants of ^{59}Fe Elimination from Liver

^{59}Fe -CSA	K_{E1} (day $^{-1}$)	K_{E2} (day $^{-1}$)	Time of Intersection (day)
L	0.086	0.031	2
M	0.115	0.041	2
S	0.223	0.065	1

次に Fig. 3 に示すヘミン鉄であるが, 時間とともにその割合は単調に増大し, しかも投与量が小さくなるほどその割合は大きくなる. これは血液中のデータと考えあわせれば肝臓中に存在する血液のためと考えられ, 特に肝臓において ^{59}Fe がヘミン鉄に転入されるとは考えられない. 一方このヘミン鉄が肝臓中に存在する血液であれば, 肝臓中の ^{59}Fe の分布はそれだけ高く出ているわけであるが, S 投与群の 2 週間目を除けば長時間後でもヘミン鉄は 10% 以下であるので, 肝臓中の分布に対し特に大きな影響はないと考えられる.

最後に Fig. 4, 5 のフェリチン分画であるが, 投与量に関係なく肝臓中に存在する全 ^{59}Fe に対する割合では 4—7 日目に, また投与量に対する AR では 2 日目にピークを生ずる. 一方フェリチンはアポフェリチンという蛋白質と第 2 鉄イオンとの結合体であるが, このアポフェリチンの生合成に関し, Drysdale ら⁶⁾ は鉄投与ラットに leucine- ^{14}C を静注し肝臓のフェリチン分画への ^{14}C のとり込みを測定したところ, 静注後 72 時間以上の長時間にわたりとり込みがおこなわれていることを報告しているが, 本報の ^{59}Fe のフェリチン分画へのとり込みの結果も Drysdale らの結果と同じ傾向を示している. このことは肝臓で貪食されたコンドロイチン硫酸鉄が造血組織へ運ばれそこでヘミン鉄に転入される前段階として, まず肝臓でフェリチンに変わるにはある程度の時間が必要なことを示し, また赤血球中への ^{59}Fe の出現と肝臓中のフェリチンの消長とはよく対応している.

3. 脾 臓

脾臓中の ^{59}Fe 分布の時間的变化を Fig. 7 に, 脾臓中の ^{59}Fe の中のヘミン鉄の割合の時間的变化を Fig. 8 に, またそれを投与量に対する AR に換算したものを Fig. 9 に示す.

6) J.W. Drysdale, H.N. Munro, *J. Biol. Chem.*, **241**, 3630 (1966).

Fig. 7. ^{59}Fe Contents (AR) in Spleen after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

Fig. 9. ^{59}Fe Contents (AR) in Spleen as Hemin Iron after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

与量に対する AR でもピークとなる。それ以後の時間においてもヘミン鉄の割合はかなり大きく、これらの事実は第 2 の大きなピークが造血に関係したものであることを示すと同時に、マウスにおいては脾臓が肝臓と異なり造血作用を営むことを明瞭に示すものである。

なお血液中の分布が脾臓の短時間側のピークに対応する時間では減少中または減少し終ったところであり、長時間側のピークに対応する時間では増加中であるということもこれを立証する 1 つの事実である。

4. 小 腸

小腸中の ^{59}Fe 分布の時間的变化を Fig. 10 に、また L, M 投与群の米山, 紺野法による非ヘミン鉄の分画の第 III, IV 分画の和の占める割合の時間的变化を肝臓のそれと比較したのが Fig. 11 である。

Fig. 10. ^{59}Fe Contents (AR) in Small Intestine after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

Fig. 8. Ratio of Hemin Fraction of ^{59}Fe Contents (AR) in Spleen after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —×—:S

Fig. 7 より明らかなように投与量を変えても脾臓への分布はほとんど変らない。そして前報¹⁾の結果ほど明瞭ではないが、投与直後から 4 時間までの間と 8 時間から 96 時間までの間の 2 箇所ピークを示す。前報では先のピークを脾臓網内系細胞による鉄コロイドの貪食、後の大きなピークを造血に関係したピークと推定したが、本報ではこれを確かめるためヘミン鉄と非ヘミン鉄の分離を行なった。Fig. 8, 9 に明瞭に示されるように投与直後から 4 時間までの間ではヘミン鉄の割合がごくわずかであるが、8 時間から 96 時間までの間では脾臓中の ^{59}Fe の 50% 以上がヘミン鉄であり、それは投

Fig. 11. Ratio of Fractions 3 plus 4 of ^{59}Fe Contents (AR) in Small Intestine and Liver after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

small intestine liver
L: —○— —○—
M: —×— —×—

Fig. 10 からわかるように小腸でも AR の時間的变化は投与量により余り変らないが, L 投与群のみ著しく短時間側にピークを生じている. これは肝臓, 脾臓などの網内系細胞で貧食しきれなかった ^{59}Fe 標識「コ鉄」が小腸の網内系細胞に貧食されたためと考えられ, ピークが長くつづくのはこの上にさらに M, S 投与群のピークに対応するピークが重なってきたためと考えられる.

この小腸に集まった鉄が排泄のためか貯蔵のためかという問題であるが, M, S 投与群のピークの時間は脾臓, 骨髄などの造血器官のピークと一致するので, 単に排泄のためにのみ小腸に集まっている⁷⁾とは考えられない. そこで小腸の非ヘミン鉄の分画を米山, 紺野法で行なった. この分画法による非ヘミン鉄の分画のうちヘモシデリンといわれる第 I 分画とフェリチンといわれる第 II 分画が生理鉄であり, 核蛋白鉄といわれる第 III 分画と遊離の鉄といわれる第 IV 分画が非生理鉄である. 一方小腸中には他の臓器に比べて多量の DNA が存在することより⁸⁾ 非生理鉄の一部は分画操作中に分画液中に存在する核蛋白と結合して核蛋白鉄となり第 III 分画として沈殿すると考えられるので, 小腸の場合第 III, IV 分画の和は排泄さるべき ^{59}Fe の傾向を示す量と考えてよい. そこで第 III, IV 分画の和を肝臓のそれと比較したのが Fig. 11 である. そしてこの割合が肝臓と異なりかなり高い値を示していることは, 小腸中には明らかに排泄さるべき ^{59}Fe が存在している証拠である. しかし L, M 投与群ともこの値は 2 週間目まで 20—30% の割合でほとんど一定であり, 残りの 70—80% が生理鉄であることを考えあわせると, 小腸中の鉄は前報で述べたごとく生体の鉄の調節機構の 1 つとして過剰時の排泄と欠乏時の再利用のための貯蔵鉄であると考えられる.

5. 糞中排泄

前報で述べたように ^{59}Fe 標識「コ鉄」投与後 ^{59}Fe はほとんど尿中に排泄されず, また ^{59}Fe の体外排泄は他に皮膚からの脱落などもあるが量的には無視できると考えられるので, 糞中排泄と等しいとみてよい. そこで糞中排泄量より ^{59}Fe の体内貯留率を求め, その対数を時間に対して目盛ったのが Fig. 12 である. 排泄はほぼ一次式にしたがっていることがわかり, これより求めた排泄の速度定数および生物学的半減期を Table III に示す. 前報の whole body counter による測定結果との一致は良く, また投与量が少ないほど排泄速度が大きくなっている.

なお前報同様に使用した動物はいずれも正常マウスであるので, 体内に鉄欠乏がある場合には排泄の速度はこれらの結果より小さくなるものと考えられる.

Fig. 12. Retention of ^{59}Fe in Whole Body after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—:L —●—:M —x—:S

TABLE III. Rate Constants and Biological Half-Lives of ^{59}Fe Elimination from Whole Body

^{59}Fe -CSA	K_E (day ⁻¹)	$T_{1/2}$ (days)
L	0.014 0.0134 ^{a)}	49 52 ^{a)}
M	0.020	35
S	0.020	35

a) Calculated from the data by the whole body counting in the previous paper.

結

論

3 種の投与量で ^{59}Fe 標識「コ鉄」を正常雄マウスに静注した場合の主要臓器中の ^{59}Fe の分布およびヘミン鉄と非ヘミン鉄の分離, 非ヘミン鉄の米山, 紺野法による分画の時間的变化を検討し, 前報でも報告した投与量によ

7) W.H. Crosby, *Blood*, **22**, 441 (1963).

8) E. Chargaff, J.N. Davidson, "The Nucleic Acids," Vol. II, Academic Press, New York, N.Y., 1955, p. 8.

る分布, 排泄の差をより明確にすると同時に, 臓器内鉄の分画により, 投与された ^{59}Fe の肝臓における生理鉄特にフェリチンへの移行, 脾臓におけるヘミン鉄の生成, 小腸における鉄の調節機構などに関する前報の推論を裏付ける結果を得た.

謝辞 本研究を行なうにあたり種々御教示賜った岡山大学医学部 妹尾左知丸教授, 粟井通泰博士, ならびに京都大学医学部 刈米重夫博士に深謝します. また終始御鞭撻賜った当社研究開発部長 於勢真輔博士, 中央研究所長 高松秀二博士, 研究第4部長 中村 清博士, 実験に協力された三奈木康夫氏に感謝します.