静脈注射用コンドロイチン硫酸鉄コロイドについて (第 5 報¹⁾) ³H 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 ³H の体内分布

中西 豊, 貴志昌高, 三奈木康夫
大日本製薬株式会社中央研究所²⁾

Studies on Iron-Chondroitin Sulfate Colloid for Intravenous Injection. V.¹⁾
Distribution of ³H in the Mice followed by the Injection of
³H Labeled Iron-Chondroitin Sulfate Colloid

YUTAKA NAKANISHI, MASATAKA KISHI and YASUO MINAKI
Research Laboratory, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.²⁾

(Received December 11, 1969)

Following previous experiment on the fate of iron-chondroitin sulfate colloid using ⁵⁹Fe-labeled compound, sodium chondroitin sulfate labeled with tritium was synthesized in order to examine its fate *in vivo*. Using this ³H-labeled compound, tritiated iron chondroitin sulfate was synthesized, this compound was given as an intravenous injection to normal male mice, and distribution and excretion of tritium were examined. The result of this experiment was comparatively examined with the result of administration of ⁵⁹Fe chondroitinsulfate.

Chondroitinsulfuric acid in the parenteral solution used here was present in two kinds; one bound with iron colloid and the other not. By assuming that the former is phagocytized in reticuloendothelial system with the iron colloid but the latter is not phagocytized much in the reticuloendothelial system, biological distribution and excretion of ⁵⁹Fe and ³H were explained well. Quantitative analysis was made on a part of these results.

第 3,³⁾ 4 報において 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) を投与量を変えてマウスに静注した後の ⁵⁹Fe の体内分布および臓器内鉄の分画の時間的变化を検討したが, 安定剤であるコンドロイチン硫酸の生体内運命に関しては未検討であった. しかしこの問題は「コ鉄」の生体内運命, さらにその作用機序の解明に必要であり, われわれはその手がかりとして ³H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムを合成し, さらにこれを用いて ³H 標識「コ鉄」をも合成し, 両者をマウスに静注した場合の ³H の体内分布の研究を行ない, それらの結果に前報で報告した ⁵⁹Fe の体内分布の結果を加えて比較検討した.

実 験 の 部

³H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの合成 数平均分子量 14500 のコンドロイチン硫酸ナトリウム 1.5 g をトリチウムガス 4Ci と 57 日間接触した後, 過剰のトリチウムガスを除き水 100 ml に溶解し, 浴温 40° 以下で注意しながら水を減圧留去する. ふたたび水 100 ml に溶解し, 水を留去した残渣をもう 1 度 30 ml の水に溶解し, 活性炭処理後セライト層をとおして活性炭を除き, 母液をセロファンチューブに移して透析した. 約 20 日間の透析により不安定なトリチウムおよび低分子量分解産物を除去した後, NaOH で pH 7.0 とし, 10 ml までは減圧濃縮し, エタノール 60 ml 中に激しく攪拌しながら少量づつ滴下し, 生じた沈殿を遠心分離しエタノールで洗滌後減圧乾燥した.

このものを水 10 ml に溶解しエタノールから再沈殿したが, その前後において比放射能は変らなかった. 収量 0.9 g, 比放射能 6.1 μ Ci/mg.

本物質は次の 4 種の溶媒系を用いてペーパークロマトグラフィーを行なうも原点以外に放射性物質を認めなかった. *n*-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:2), pyridine-H₂O (4:1), EtOH-H₂O (4:1), phenol-0.1% ammonia (4:1). ま

1) 第 4 報: 中西 豊, 貴志昌高, 薬誌, 90, 120 (1970).

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

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

た再沈殿法により希釈分析を実施すれば、トリチウムの 90% 以上は原料コンドロイチン硫酸ナトリウムと同一挙動を示した。

また 2% 水溶液を沸騰水浴上で 2 時間加熱することにより遊離する不安定トリチウムは 1.2% であり、一方マウスに静注後 24 時間以内に尿中に排泄されたトリチウムの中揮発性成分は全排泄トリチウムの 1.5% 以下であった。

これらの試験結果よりこの ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムはコンドロイチン硫酸ナトリウムのトレーサーとして使用可能であることを確認した。

また ^3H 標識「コ鉄」は本品と塩化第 2 鉄より第 1 報⁴⁾の方法により合成した。

体内分布実験 供試動物、注射後の解剖時間、解剖方法、動物数などは第 3 報³⁾と同様であり、Table I に示す ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムおよび ^3H 標識「コ鉄」を体重 20 g に対し 0.1 ml の割合で尾静脈内に注射し、解剖後 Table II, III に示す被検臓器をとり出し、生理食塩水で洗った後秤量して測定試料とした。

一方「コ鉄」中の他の主成分である鉄の挙動と比較するため同一投与量について前報の ^{59}Fe 標識「コ鉄」を用いた場合の結果¹⁾と比較検討した。

TABLE I. Compositions of ^3H Labeled Iron-Chondroitin Sulfate Colloids and ^3H Labeled Sodium Chondroitin Sulfate

	Compositions (Amounts per ml)		
	Radioactivity of ^3H (μCi)	Fe (mg)	Sodium chondroitin-sulfate (mg)
$^3\text{H-Fe-CSA(L)}$	122	4.0	20.0
(M)	41	1.3	6.7
(S)	12	0.4	2.0
$^3\text{H-CSA-Na}$	122	—	20.0

放射能測定 血液は 0.1 ml を、各臓器は約 0.1 g 以下を精秤し、hydroxide of hyamine 10-X⁵⁾に溶解し、トルエン系シンチレーター 10 ml を添加して測定した。⁶⁾ また尿および小腸内容物はそれらを一定容積に希釈し、その 1 ml を採取し、ジオキサン系シンチレーター 10 ml を添加して測定した。⁷⁾ 測定はいずれも神戸工業 GSL-162 型液体シンチレーションカウンターを用い、測定値のクエンチング補正はチャンネル比法および外部 γ 線法を併用して行なった。

測定値は吸収率 (absorption ratio; AR) および吸収率較差 (differential absorption ratio; DAR)⁸⁾であらわした。

$$\text{AR} = \text{臓器中の放射能} / \text{投与した全放射能} \times 100$$

$$\text{DAR} = \text{臓器単位重量中の放射能} / \text{単位体重当りの投与放射能}$$

結果および考察

1. ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムおよび ^3H 標識「コ鉄」静注後の ^3H の体内分布

^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムおよび ^3H 標識「コ鉄」(L, M, S) を 0.1 ml/20 g マウス の割合で静注した場合の血液、肝臓、脾臓、腎臓、小腸中の ^3H の AR および DAR の時間的变化を一括して Table II, III に示す。以下各臓器について検討する。

血 液 Fig. 1 に結果を図示するが、いずれの場合も急激に減少し、1—2 時間で最小に達し、その時間は ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合^{1,3)}と同様に投与量が小さいほど短い。また ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合に比して減少速度は全体に大きい。これは注射液中にはコンドロイチン硫酸が鉄に比べて過剰に存在するため、鉄コロイド

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

5) Hydroxide of Hyamine 10-X: *p*-(diisobutyl-cresoxy-ethoxyethyl)dimethylbenzylammonium hydroxide (1 molar solution in methanol).

6) R.J. Herberg, *Anal. Chem.*, 32, 42 (1960).

7) G.A. Bray, *Anal. Biochem.*, 1, 278 (1960).

8) T. Fields, L. Seed (ed), "Clinical Use of Radioisotopes," The Year Book Publishers, Inc., Chicago, Illinois, 1957, p. 361.

TABEL II. Distribution of ^3H in Main Organs after a Single Intravenous Dose of ^3H -CSA-Na 0.1 ml/20 g in the Mice

A) AR

Organ	Time after administration (hr)								
	1/4	1/2	1	2	4	8	24	48	96
Blood	4.08 ± 0.16	2.42 ± 0.37	1.78 ± 0.20	0.91 ± 0.11	0.51 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.11 ± 0.02
Liver	12.62 ± 0.63	12.76 ± 0.34	15.63 ± 2.07	12.92 ± 0.87	10.21 ± 0.07	10.41 ± 0.64	8.15 ± 0.52	7.74 ± 0.90	4.23 ± 0.20
Spleen	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.09	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.02
Kidney	1.81 ± 0.05	1.43 ± 0.09	1.22 ± 0.22	0.85 ± 0.01	0.61 ± 0.11	0.68 ± 0.08	0.51 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.22 ± 0.02

B) DAR

Organ	Time after administration (hr)								
	1/4	1/2	1	2	4	8	24	48	96
Blood	0.64 ± 0.03	0.38 ± 0.06	0.28 ± 0.03	0.14 ± 0.07	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Liver	2.43 ± 0.18	2.15 ± 0.09	2.86 ± 0.36	2.23 ± 0.12	1.94 ± 0.11	2.11 ± 0.11	1.30 ± 0.07	1.44 ± 0.34	0.91 ± 0.06
Spleen	0.31 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.36 ± 0.06	0.23 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.18 ± 0.05	0.19 ± 0.05	0.17 ± 0.04
Kidney	1.55 ± 0.05	1.12 ± 0.10	0.94 ± 0.02	0.67 ± 0.01	0.51 ± 0.08	0.57 ± 0.08	0.36 ± 0.02	0.36 ± 0.06	0.17 ± 0.02

に結合していないコンドロイチン硫酸がかなり存在し、その血中からの消失速度が鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体よりも大きいことを示す。このことはまた短時間側で ^3H 標識「コ鉄」(L) 投与群の方が ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウム投与群よりも残存率が大きいという事実とも合致する。

肝臓 Fig. 2 に結果を図示するが、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合^{1,3)} に比して AR の値は全般に小さくなっているが、その時間的变化は 2 時間位でピークに達しそれ以後非常に長時間にわたって徐々に減少しており、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合の変化によく似ている。一方 ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合にはその投与量が同じであるにもかかわらず、 ^3H 標識「コ鉄」(L) の場合に比して肝臓の AR が著しく小さいことは、鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体が選択的に肝臓内系にとり込まれ、鉄コロイドに結合していないコンドロイチン硫酸は肝臓にあまりとり込まれないことを示す。この事実から逆に ^3H 標識「コ鉄」の場合の ^3H は ^{59}Fe

Fig. 1. ^3H Contents (AR) in Blood after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—●—: ^3H -CSA-Na —△—: ^3H -Fe-CSA (M)
—○—: ^3H -Fe-CSA (L) —×—: ^3H -Fe-CSA (S)

Fig. 2. ^3H Contents (AR) in Liver after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—●—: ^3H -CSA-Na —△—: ^3H -Fe-CSA (M)
—○—: ^3H -Fe-CSA (L) —×—: ^3H -Fe-CSA (S)

TABLE III. Distribution of ^3H in Main Organs after a Single Intravenous Dose of ^3H -CSA-Fe 0.1 ml/20 g in the Mice

A) AR

Organ	^3H -CSA-Fe	Time after administration (hr)										
		1/4	1/2	1	2	4	8	24	48	96	168	336
Blood	L	11.60±0.70	8.93±1.53	3.56±0.74	0.80±0.07	0.37±0.02	0.37±0.04	0.40±0.06	0.21±0.03	0.10±0.03	0.08±0.04	0
	M	3.92±0.81	1.11±0.20	0.67±0.04	0.44±0.05	0.40±0.03	0.54±0.03	0.20±0.07	0.21±0.00	0.03±0.02	0	0
	S	3.53±0.41	0.65±0.25	0.95±0.28	1.07±0.21	1.04±0.04	0.83±0.13	0.71±0.16	0.29±0.18	0.14±0.14	0	0
Liver	L	25.06±2.01	26.87±0.24	30.90±1.21	32.01±0.27	29.60±3.86	27.43±1.67	19.48±0.16	15.40±0.42	13.67±1.45	7.07±1.11	1.99±1.51
	M	29.21±1.38	33.28±1.02	27.39±1.45	22.75±4.97	30.14±1.06	26.45±1.81	17.52±0.82	13.29±0.20	9.59±0.40	4.74±0.45	1.71±0.26
	S	31.50±2.97	32.83±6.63	49.57±5.48	43.97±0.95	44.10±0.71	39.35±4.78	26.91±0.27	13.53±1.15	13.10±5.41	6.40±0.09	1.83±0.33
Spleen	L	1.00±0.00	1.28±0.17	0.92±0.21	0.84±0.05	1.08±0.05	0.74±0.08	0.36±0.03	0.51±0.03	0.36±0.02	0.27±0.05	0.06±0.04
	M	0.72±0.12	0.66±0.19	0.55±0.01	0.93±0.05	0.63±0.18	0.74±0.05	0.41±0.08	0.36±0.05	0.22±0.03	0.17±0.04	0.06±0.00
	S	0.78±0.15	0.49±0.04	0.45±0.19	0.46±0.06	0.57±0.13	0.42±0.12	0.51±0.05	0.25±0.12	0.17±0.08	0.11±0.08	0.03±0.01
Kidney	L	3.02±0.63	2.22±0.57	0.87±0.15	0.55±0.18	0.36±0.03	0.34±0.02	0.24±0.05	0.24±0.02	0.18±0.02	0.10±0.02	0.06±0.01
	M	0.76±0.10	0.58±0.09	0.46±0.11	0.35±0.02	0.29±0.03	0.25±0.02	0.21±0.03	0.20±0.02	0.14±0.01	0.14±0.01	0.08±0.00
	S	1.16±0.16	0.40±0.15	0.94±0.19	0.58±0.09	0.56±0.06	0.66±0.16	0.51±0.01	0.49±0.14	0.43±0.17	0.13±0.01	0.05±0.02
Small intestine	L	1.35±0.12	1.60±0.26	1.08±0.14	1.85±0.44	1.33±0.10	1.08±0.27	0.63±0.24	0.30±0.03	0.24±0.02	0.14±0.00	0.07±0.01
	M	1.38±0.16	0.95±0.02	0.70±0.19	0.58±0.05	0.57±0.05	0.51±0.14	0.32±0.04	0.32±0.04	0.22±0.02	0.11±0.06	0.02±0.01
	S	1.43±0.33	0.69±0.04	0.72±0.08	0.56±0.05	0.59±0.06	0.62±0.09	0.60±0.05	0.32±0.07	0.27±0.11	0.13±0.04	0.04±0.02

B) DAR

Organ	^3H -CSA-Fe	Time after administration (hr)										
		1/4	1/2	1	2	4	8	24	48	96	168	336
Blood	L	1.83±0.12	1.40±0.24	0.56±0.12	0.12±0.02	0.06±0.00	0.06±0.01	0.06±0.01	0.03±0.00	0.02±0.01	0.01±0.00	0
	M	0.62±0.13	0.18±0.03	0.11±0.01	0.07±0.01	0.06±0.01	0.09±0.00	0.03±0.01	0.03±0.01	0	0	0
	S	0.55±0.07	0.10±0.04	0.15±0.04	0.17±0.03	0.16±0.01	0.13±0.02	0.11±0.08	0.05±0.02	0.02±0.02	0	0
Liver	L	4.56±0.79	5.00±0.31	5.99±0.04	6.08±0.91	5.55±0.39	4.71±0.07	2.50±0.68	2.47±0.20	1.78±0.24	1.03±0.10	0.29±0.09
	M	8.57±1.31	7.90±0.43	5.11±0.46	4.21±0.68	4.74±0.28	4.33±0.41	3.14±0.15	2.11±0.16	1.65±0.15	0.66±0.07	0.23±0.03
	S	7.13±0.99	6.04±1.33	8.45±0.13	8.11±0.25	9.76±0.53	7.91±0.71	5.30±0.41	1.85±0.39	2.19±0.92	1.17±0.02	0.26±0.07
Spleen	L	1.54±0.07	3.07±1.03	1.79±0.59	1.22±0.52	2.02±0.25	1.13±0.18	0.56±0.21	0.87±0.26	0.41±0.12	0.31±0.09	0.09±0.03
	M	1.33±0.07	1.23±0.52	0.88±0.19	2.12±0.76	1.03±0.43	1.78±0.10	1.08±0.31	0.41±0.11	0.46±0.16	0.29±0.07	0.05±0.01
	S	3.01±1.32	1.07±0.04	0.73±0.32	1.45±0.32	1.08±0.31	0.72±0.15	0.89±0.08	0.24±0.08	0.45±0.20	0.20±0.04	0.02±0.01
Kidney	L	2.09±0.47	1.46±0.29	0.63±0.12	0.34±0.12	0.25±0.03	0.23±0.02	0.16±0.03	0.17±0.01	0.11±0.01	0.08±0.00	0.03±0.01
	M	0.69±0.03	0.49±0.07	0.38±0.07	0.27±0.02	0.23±0.02	0.22±0.01	0.16±0.02	0.14±0.01	0.12±0.01	0.10±0.01	0.04±0.00
	S	1.00±0.14	0.33±0.12	0.81±0.20	0.44±0.07	0.46±0.08	0.48±0.08	0.38±0.02	0.35±0.10	0.26±0.09	0.10±0.01	0.03±0.01
Small intestine	L	0.15±0.01	0.17±0.03	0.12±0.02	0.20±0.04	0.15±0.02	0.10±0.01	0.06±0.02	0.03±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00
	M	0.16±0.02	0.11±0.00	0.09±0.02	0.08±0.01	0.06±0.01	0.06±0.02	0.04±0.01	0.03±0.00	0.02±0.00	0.01±0.00	0
	S	0.16±0.03	0.07±0.01	0.08±0.01	0.06±0.00	0.07±0.01	0.07±0.01	0.05±0.00	0.03±0.01	0.03±0.01	0.01±0.01	0

標識「コ鉄」の場合の ^{59}Fe と同一傾向なるも絶対値が小さいことも説明できる。なおこの点に関し後に若干の定量的考察を試みる。

脾 臓 Fig. 3 に結果を図示する。投与量の差による影響はあまり著しくないが、投与量の大きいものほど AR が大きくなる傾向があり、また ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合には ^3H 標識「コ鉄」の場合に比して AR が著しく小さいことは、肝臓の場合と同様に説明できる。

^3H 標識「コ鉄」の AR の時間的变化を ^{59}Fe 標識「コ鉄」^{1,3)} および ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合と比較する。 ^3H 標識「コ鉄」の場合には 15—30 分と、2—8 時間の間に 2 つのピークが認められる。短時間側のピークは ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合にも 2—8 時間のピークに比して相対的にわずかではあるが認められるので、脾臓中に存在する血液の影響とも考えられる。しかし、 ^3H 標識「コ鉄」の場合血液の AR は脾臓のピークを説明するには小さすぎる。一方 ^3H 標識コンドロイチン硫酸の場合にも 30 分に小さいながらピークが認められるので、このピークは主として鉄コロイドと結合していないコンドロイチン硫酸のとり込みによるものではないかと推定される。また 2—8 時間のピークは ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合にも認められ、 ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合には認められないことから、鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体の脾臓へのとり込みによるものと考えられる。一方、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合に認められた 24—96 時間の大きなピークに対応するピークは ^3H 標識「コ鉄」および ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムでは認められず、この事実は ^{59}Fe 標識「コ鉄」のこのピークは投与された鉄が生理鉄よりヘミン鉄へ転入される過程に対応するものであるという前報の推論を支持する。

Fig. 3. ^3H Contents (AR) in Spleen after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—●—: ^3H -CSA-Na —△—: ^3H -Fe-CSA (M)
—○—: ^3H -Fe-CSA (L) —×—: ^3H -Fe-CSA (S)

Fig. 4. ^3H Contents (AR) in Kidney after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—●—: ^3H -CSA-Na —△—: ^3H -Fe-CSA (M)
—○—: ^3H -Fe-CSA (L) —×—: ^3H -Fe-CSA (S)

腎 臓 Fig. 4 に結果を図示する。AR の時間的变化は血液のそれとほとんど同一の傾向を示すことから、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合と同様にこれは腎臓中に存在する血液が主として影響していると考えられるが、長時間側では血液よりも DAR が大きくなっている。もしも腎臓中の ^3H がその中に存在する血液にのみ由来するものであれば、腎臓の DAR は血液のそれより小さくなるはずである。したがって腎臓中の ^3H は単に血液に由来するもののみならず、腎臓固有のとり込みもあると考えられる。

小 腸 Fig. 5 に結果を図示する。 ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合^{1,3)} と比較してみるとかなり傾向の異なることがわかる。すなわち M, S 投与群では ^3H 標識「コ鉄」の場合ピークは投与後 15 分にあり以後減少するが、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」では 24—96 時間にピークを生ずる。このことより ^3H 標識「コ鉄」の場合にみられるピークは鉄コロイドに結合していないコンドロイチン硫酸の小

Fig. 5. ^3H Contents (AR) in Small Intestine after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—○—: ^3H -Fe-CSA (L) —△—: ^3H -Fe-CSA (M)
—×—: ^3H -Fe-CSA (S)

腸へのとり込みによると考えられ、また ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合にみられるピークは鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体から生理鉄か、あるいはさらに排泄さるべき形に変わった鉄のとり込みによるピークと考えられる。

一方、L 投与群では ^{59}Fe 標識「コ鉄」、 ^3H 標識「コ鉄」の場合ともに 2 時間目にピークを示すが、これは投与量が多過ぎるため肝臓、脾臓などの網内系で貪食しきれなかった鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体を小腸網内系が貪食したためと考えられる。また時間がたてば ^3H 標識「コ鉄」の場合はかなりすみやかに減少するにもかかわらず、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合にはかなり大きな値を保つのは M, S 投与群の場合と同様な理由のためと考えられる。

2. ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムおよび ^3H 標識「コ鉄」静注後の ^3H の体外排泄

各時間の小腸内容物および膀胱尿中の ^3H の AR および 24 時間以後の蓄尿中の累積の ^3H の AR を Table IV に示す。

TABLE IV. Excretion of ^3H (AR) after a Single Intravenous Dose of ^3H -CSA-Na and ^3H -Fe-CSA 0.1 ml/20 g in the Mice

		Time after administration (hr)								
		1/4	1/2	1	2	4	8	24	48	96
Contents of small intestine	^3H -CSA-Na	0.77 ±0.26	0.82 ±0.03	1.25 ±0.05	0.88 ±0.10	0.80 ±0.10	0.72 ±0.11	0.38 ±0.02	0	0
	^3H -Fe-CSA (L)	0.26 ±0.08	0.15 ±0.09	0.34 ±0.02	0.29 ±0.00	0.41 ±0.18	0.22 ±0.08	0.00 ±0.00	0	0
	(M)	0.90 ±0.02	0.96 ±0.08	1.37 ±0.15	1.49 ±0.08	1.88 ±0.13	2.11 ±0.39	1.40 ±0.16	0.85 ±0.08	0.67 ±0.08
	(S)	1.39 ±0.15	1.21 ±0.26	2.11 ±0.67	1.95 ±0.19	2.21 ±0.12	1.48 ±0.10	1.47 ±0.10	1.10 ±0.09	0.73 ±0.16
Urine (in Bladder)	^3H -CSA-Na	37.3 ±17.8	12.7 ±9.80	57.4 ±18.9	18.4 ±15.9	4.12 ±2.56	0.98 ±0.62	0.31 ±0.05	0.06 ±0.04	0.04 ±0.03
	^3H -Fe-CSA (L)	7.95 ±3.36	23.4 ±7.60	21.9 ±10.3	27.6 ±1.69	1.03 ±0.26	1.19 ±0.90	0.25 ±0.12	0.35 ±0.17	0.12 ±0.01
	(M)	18.9 ±9.50	16.9 ±7.30	22.8 ±7.00	23.2 ±11.4	26.5 ±11.2	17.1 ±10.3	1.07 ±0.43	0.31 ±0.13	0.15 ±0.09
	(S)	25.7 ±5.40	30.0 ±14.3	25.9 ±8.40	13.2 ±10.7	4.36 ±2.42	1.85 ±0.46	0.41 ±0.19	0.31 ±0.10	0.12 ±0.05
Urine (Cumulative)	^3H -CSA-Na							65.9 ±1.32	68.2 ±1.11	70.0 ±0.98
	^3H -Fe-CSA (L)							35.6 ±3.34	41.8 ±2.73	50.6 ±3.70
	(M)							40.6 ±2.59	44.0 ±2.18	55.6 ±13.0
	(S)							59.9 ±3.73	60.2 ±0.80	67.3 ±11.8

小腸内容物 Fig. 6 に結果を図示する。M, S 投与群が L 投与群に比してかなり高い AR を示し、しかも L 投与群と同一コンドロイチン硫酸ナトリウム投与量である ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合よりも大きな AR となっている。また ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合には最初急激に増加して 1 時間でピークとなり以後減少するが、 ^3H 標識「コ鉄」では最初の急激な増加は同一傾向なるも、その後も引続いて徐々に増加して 4—8 時間でピークとなっているが、これは最初主として鉄コロイドと結合していないコンドロイチン硫酸が消化管から排泄され、つづいて鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体に由来するコンドロイチン硫酸が徐々に排泄されてくるためと考えられる。

膀胱尿 Fig. 7 の左に結果を図示する。ばらつきが大きいので細かい議論はできないが、 ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合は ^3H 標識「コ鉄」の場合に比べかなりすみやかに膀胱尿中へ現われ、また ^3H 標識「コ鉄」の中では投与量の小さいもののほどすみやかに膀胱尿中へ現われる。

Fig. 6. ^3H Contents (AR) in Contents of Small Intestine after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—●—: ^3H -CSA-Na —△—: ^3H -Fe-CSA (M)
—○—: ^3H -Fe-CSA (L) —×—: ^3H -Fe-CSA (S)

Fig. 7. ^3H Contents (AR) in Urine after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

—●—: ^3H -CSA-Na —△—: ^3H -Fe-CSA (M)
—○—: ^3H -Fe-CSA (L) —×—: ^3H -Fe-CSA (S)

一方, ^3H 標識「コ鉄」(L) の場合の 8 時間までの膀胱尿について $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (4:1:2), $n\text{-BuOH-pyridine-H}_2\text{O}$ (6:4:3), $\text{pyridine-H}_2\text{O}$ (4:1) を展開溶媒にしてペーパークロマトグラフィーを行なうも, 時間とともに原点に存在するスポットがやや広がっていくだけで, 原点以外にとくにスポットを認めなかった. 1 例として Fig. 8 に $n\text{-BuOH-pyridine-H}_2\text{O}$ についてのペーパークロマトグラムを図示するが, このことは尿中に排泄された ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムは分子量の少しの変化の可能性はあるにしても, 単糖類への変化などの著しい変化はまったく起こっていないことを示す.

蓄尿 分離し得ないため蓄尿と糞との合計として測定した結果を Fig. 7 の右に図示する. 小腸内容物, 膀胱尿のデータから推定すれば, 糞に由来するものの占める割合はわずかと考えられる. すべて AR すなわち排泄率は時間とともに増加し, また ^3H 標識「コ鉄」では投与量が大きいくほど排泄率が小さくなり, さらに ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合排泄率をもっとも大きくなっているが, これは以上の各臓器, 小腸内容物, 膀胱尿への分布の結果からみてきわめて妥当な傾向である.

3. ^3H 標識「コ鉄」の場合の ^3H と ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合の ^{59}Fe の体内分布の比較

以上各臓器について ^3H と ^{59}Fe の分布を比較検討してきたが, それらの結果は注射液中のコンドロイチン硫酸に鉄コロイドに結合したものと結合していないものの 2 種類が存在すると考えることにより合理的に説明することができた. 一方, 密度勾配沈降分析の結果によればこの 2 種類のコンドロイチン硫酸の割合はほぼ 1:1 であ

Fig. 8. Paperchromatograms of Urine in Bladder after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice (^3H -CSA-Fe(L))

$n\text{-BuOH-pyridine-H}_2\text{O}$ (6:4:3)
—△—: 1/4 hr —●—: 2
—×—: 1 —○—: 8

Fig. 9. Ratios of AR of ^3H to AR of ^{59}Fe in Liver and Spleen after a Single Intravenous Dose of 0.1 ml/20 g in the Mice

liver L: —○— spleen L: —○—
liver S: —×— spleen S: —×—

る.⁹⁾ そこでこの定量的な結果をも考慮して肝臓、脾臓中の分布について考察を行なう。

まず L, S 投与群の肝臓と脾臓について ^3H と ^{59}Fe の存在量を相対的に検討してみる。 ^3H 標識「コ鉄」、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」投与の場合のおおの AR の時間的变化を両者の比 $^3\text{H}/^{59}\text{Fe}$ の時間的变化に換算した結果が Fig. 9 である。

L 投与群では肝臓、脾臓ともに 15 分ではこの比が大体 1 に近い、このことは注射直後では注射薬はそのままの組成でこれらの臓器にとり込まれていることを示す。それ以後 2 時間目まではこの比が急激に減少するが、これは主として鉄コロイドに結合していないコンドロイチン硫酸の消失によるものと考えられる。一方、S 投与群では 15 分でも肝臓、脾臓ともにかなり低い値を示すが、これは鉄コロイドに結合していないコンドロイチン硫酸の消失がそれ以前に大部分終っていることを示すものと考えられる。この急激な減少以後長時間にわたってこの比が徐々に減少していくことは、鉄が赤血球中のヘミン鉄への転入や排泄のためにこれらの臓器から消失していくよりも速くコンドロイチン硫酸が消失していくことを示す。

また肝臓と脾臓とを比較してみると、とくに S 投与群で著しいが、脾臓の方がかなり小さい値を示す。このことは肝臓が主として静注された鉄のとり込みとその貯蔵の役目をしているのに対し、脾臓はそれ以外にマウスの場合にはその鉄を用いて造血作用を営むという事実によく対応している。¹⁰⁾

さらに密度勾配沈降分析の結果を考慮に入れ、また ^3H 標識「コ鉄」中の鉄コロイドに結合されていない半量の ^3H 標識コンドロイチン硫酸の挙動は ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムと同一であり、また残り半量の鉄コロイドに結合したものの挙動は ^{59}Fe 標識「コ鉄」の ^{59}Fe の挙動と同一であり、さらに両成分は独立に挙動すると仮定すると、両者の注射液中における存在比率は約 1:1 であるから、 ^3H 標識「コ鉄」の場合の AR は ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合と ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合の AR の和の半分として計算できる。L 投与群についてこの計算値を肝臓、脾臓について実測値と比較したのがそれぞれ Fig. 10, 11 である。

まず肝臓の場合は Fig. 10 よりわかるように、投与後 1 時間位までは実測値と計算値とはよく一致している。このことは少なくとも血液から肝臓へのとり込み過程においては上記の仮定が成立し、しかも密度勾配沈降分析の結果も正しいことを示す。一方、時間とともに計算値の方が大きくなっていくのは、鉄コロイドに結合しているコンドロイチン硫酸が肝臓中ではずれていくため、上記の仮定が成立しなくなるためと考えられる。

そこでこの実測値と計算値の差について若干の考察を試みる。時間とともに鉄コロイドに結合したコンドロイチン硫酸がはずれて、結合されていないコンドロイチン硫酸として挙動するためこのような差が生ずると考えられる。したがってこのコンドロイチン硫酸が鉄コロイドからはずれていく速度がわかればそれを考慮に入れた動

Fig. 10. ^3H Contents (AR) in Liver after a Single Intravenous Dose of ^3H -CSA-Fe(L) 0.1 ml/20 g in the Mice

—○— : experimental - - - x - - - : calculated

Fig. 11. ^3H Contents (AR) in Spleen after a Single Intravenous Dose of ^3H -CSA-Fe(L) 0.1 ml/20 g in the Mice

—○— : experimental - - - x - - - : calculated

9) 太田太郎, 大阪大学医学雑誌, 21, 147 (1969).

10) K.P. Hummel, F.L. Richardson, E. Fekete, "Biology of Laboratory Mouse," 2nd ed., ed. by E.L. Green, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, N.Y., 1966, p. 254.

力学的方法により計算値が求まり、平均値をとった Fig. 10, 11 の計算値よりはより実測値に近い曲線が得られるものと考えられる。しかしその速度を求めることは困難であり、またそれが求めたとしてもモデルにかなりの仮定があるので余り实际的ではない。そこで結合がはずれるにしたがい、ほぼ平行して変化するであろうと考えられる値としてつぎのようなコンドロイチン硫酸の鉄コロイドに対する見掛けの結合率を定義して以下の考察を行なう。

同一時間の測定値について ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合と ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合の AR をいかなる比率で平均すると ^3H 標識「コ鉄」の場合の AR に一致せしめることができるかという ^{59}Fe 標識「コ鉄」の方の割合をコンドロイチン硫酸の鉄コロイドに対する見掛けの結合率とする。すなわち

$$\begin{aligned} &^3\text{H} \text{ 標識「コ鉄」の場合の AR} && (\text{AR})_0 \\ &^{59}\text{Fe} \text{ 標識「コ鉄」の場合の AR} && (\text{AR})_1 \\ &^3\text{H} \text{ 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムの場合の AR} && (\text{AR})_2 \\ &\text{コンドロイチン硫酸の鉄コロイドに対する見掛けの結合率} && x (\%) \end{aligned}$$

とすると、 x は以下のごとく計算される。

$$\begin{aligned} x \cdot (\text{AR})_1 + (100 - x) \cdot (\text{AR})_2 &= 100 \cdot (\text{AR})_0 \\ \therefore x &= \frac{100[(\text{AR})_0 - (\text{AR})_2]}{(\text{AR})_1 - (\text{AR})_2} \end{aligned}$$

この値が 50 位であれば投与されたままの組成で、50 以下であれば主として結合していないものか、または結合がはずれていったものが、また 50 以上であれば主として結合されたものか、または結合されたものに由来するものが存在すると推定される。このコンドロイチン硫酸の鉄コロイドに対する見掛けの結合率を求めた結果を Fig. 12 に示す。肝臓の場合この値が最初 50 で以後時間とともに減少していくことは妥当な結果である。

つぎに脾臓の場合は Fig. 11 よりわかるように投与後 1 時間位までは実測値の方が大きくその後逆転している。脾臓では ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムのとり込みによるピークが ^{59}Fe 標識「コ鉄」のとり込みによるピークよりも短時間側にあることより、鉄コロイドに結合していないコンドロイチン硫酸の方が結合したものより速くとり込まれることがわかり、そのため初期では実測値の方が計算値よりも大きくなる。またそれ以後両者が逆転するのは肝臓と同一理由であり、Fig. 12 からわかるように時間とともにコンドロイチン硫酸の鉄コロイドに対する見掛けの結合率が減少するのは肝臓と同一なるも、その減少速度は肝臓よりやや大きい。

Fig. 12. Apparent Ratio of Bounded CSA after a Single Intravenous Dose of ^3H -CSA-Fe(L) 0.1 ml/20 g in the Mice

—○— : liver —×— : spleen

結 論

前報に引続き静脈注射用コンドロイチン硫酸鉄コロイドの生体内運命を調べるため、本報では ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムを合成し、さらにそれを用いて ^3H 標識「コ鉄」を合成し、それらを投与したマウスの体内分布を測定した。実験は ^3H 標識「コ鉄」の 3 種の投与量およびその中の最大の投与量に対応する ^3H 標識コンドロイチン硫酸ナトリウムをマウスに静注した場合の ^3H の主要臓器中への分布および体外排泄の時間的変化を検討し、前報の ^{59}Fe 標識「コ鉄」を静注した場合の ^{59}Fe の分布と比較した。

それらの結果を注射液中のコンドロイチン硫酸には鉄コロイドに結合したものと結合していないものが約 1:1 の比率で存在するという密度勾配沈降分析の結果とあわせて検討したところ、下記のような事実が明らかになった。

血液からの消失速度は鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体よりも結合していないコンドロイチン硫酸の方がすみやかである。

肝臓では最初注射薬のままの組成でとり込まれるが、鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体は主として網内系

細胞にとり込まれるのに反し、結合していないコンドロイチン硫酸は余りとり込まれないため、 ^3H は ^{59}Fe に比して急激に減少する。

脾臓では 15—30 分のピークが主として結合していないコンドロイチン硫酸のとり込みに、2—8 時間のピークは鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体のとり込みによると推定され、また ^{59}Fe の場合に認められた 24—96 時間のピークは投与された鉄のヘミン鉄への転入によることがより確実になった。

小腸では 15 分位のピークが結合していないコンドロイチン硫酸のとり込みに、2 時間位のピークが鉄コロイド-コンドロイチン硫酸複合体のとり込みに、 ^{59}Fe の場合に認められた 24—96 時間のピークは生理鉄か、またはさらに排泄さるべき形に変わった鉄のとり込みによるものと考えられる。

排泄では ^{59}Fe が主として糞中へ排泄されるのに対し ^3H は尿中へ排泄されるが、投与量の差による排泄率の差は体内分布とよく対応する。

以上のように ^3H 標識「コ鉄」を用いた実験より、安定剤であるコンドロイチン硫酸の運命を追跡できると同時に、 ^{59}Fe 標識「コ鉄」の場合の結果と比較することによりさらに多くの知見が得られた。

謝辞 本研究を行なうにあたり種々御教示賜わった岡山大学医学部 妹尾左知丸教授、栗井通泰博士、ならびに京都大学医学部 刈米重夫博士に深謝します。また御鞭撻賜わった当社常務取締役 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 清博士に感謝します。