

鉄欠乏性貧血の成因に関する研究

第 2 編

鉄過剰排泄による実験的貧血

岡山大学医学部第2内科教室（主任：木村郁郎教授）

大学院生 宮 田 明

（昭和53年3月29日受稿）

目 次

緒 言

実験方法

1. desferrioxamine 投与による一般的観察
2. 尿中排泄鉄の観察
3. 鉄代謝の観察
 - (1) 血清鉄及び総鉄結合能測定法
 - (2) 肝臓器鉄量測定法
 - (3) 骨髓 sideroblast 観察法
 - (4) 骨髓貯蔵鉄検査法

実験成績

1. desferrioxamine 投与による一般的観察
 - (1) 体重
 - (2) 赤血球数
 - (3) ヘモグロビン値
 - (4) mean corpuscular hemoglobin
2. 尿中排泄鉄の観察
3. 鉄代謝の観察
 - (1) 血清鉄及び総鉄結合能
 - (2) 肝臓器鉄量
 - (3) 骨髓 sideroblast
 - (4) 骨髓貯蔵鉄

考 察

結 語

緒 言

鉄欠乏性貧血の原因には幾多の因子があげられているが、多くの研究にもかかわらずいまだに原因のすべてが究明されたとは言いがたい。著者は第1編において、その原因の判然としないう本態性低色素性貧

血と呼ばれるグループの中で、特に治療の実施にもかかわらず再発をくり返す例において、生体からの鉄排泄亢進を想定し、鉄剤静脈内負荷による鉄排泄試験を考案した。そして血清鉄および尿中排泄鉄量の変動につき検討し、鉄排泄状況の指標となるべき鉄排泄指数を案出した。その結果、このような再発をくり返す本態性低色素性貧血患者においては、鉄排泄指数が有意の高値を示して尿中鉄排泄の亢進を見る事が判明し、本貧血の病因としての可能性が示唆された。

では実際に出血以外の非ヘミン鉄の体内からの喪失により鉄欠乏状態、さらに鉄欠乏性貧血が惹起されるであろうか。ヘモクロマトーシスなどの鉄過剰状態においては、ある程度は腸管などよりの非ヘミン鉄排泄が増加して代償するという報告¹⁾はある。しかし、健康人の鉄排泄量は一定して男性および生理のない女性では1日0.6~1.6mgとされている²⁾。そこで著者は実験的に非ヘミン鉄を体内から喪失せしめて、果して鉄欠乏状態、さらに鉄欠乏性貧血を惹起させることができるかという点を解明せんとした。すなわち本編においては、強力な鉄キレート剤である desferrioxamine を投与することにより、ラットに実験的非ヘミン鉄の排泄亢進状態を誘導し、その血液像並びに貯蔵鉄の状態を検討した。

実験方法

1. desferrioxamine 投与による一般的観察

実験動物は体重50~60gのWistar系ラット20匹で、飼料は鉄含量0.02g/100gの普通固形飼料（オリエンタル酵母株式会社製MF）を用いた。desferrioxamine (DFO) は、desferrioxamine mesy-

late (CIBA 社製, Desferal®) を用いた。

対象動物を4群に分け、A群、B群、C群および対象群各5匹ずつとした。A群には DFO 50mg/kg, B群には 100mg/kg, C群には 150mg/kg を毎日5週間連続で筋注した。対照群には DFO 投与群と等量の生理的食塩水を毎日5週間筋注した。なお鉄代謝の観察を目的とした実験では、同じく体重50~60gの Wistar 系ラットを8匹ずつ2群に分け、一方に DFO 150mg/kg を、他方を対照として等量の生理的食塩水を、同様に5週間連続筋注した。

各ラットにつき体重、赤血球数、ヘモグロビン値、1日総尿中排泄鉄量を、それぞれ1週間ごとに5週目まで観察した。赤血球数、ヘモグロビン値は、尾静脈に小切開を加えて出血した血液を用い、赤血球数は Thoma-Zeiss 型メランジュールおよび Bürker-Turk 型計算板を用いて算定、ヘモグロビン値はシアンメトヘモグロビン法にて測定した。

2. 尿中排泄鉄の観察

尿採取には代謝ケージ (トキワ科学器械株式会社製, T-241) を使用した。この代謝ケージは耐酸アルマイト製で、ステンレス製簞子と尿受漏斗の組み合わせで尿を分離採取する装置を有し、採尿能率良好で鉄汚染も極少であると考えられる。尿中鉄濃度測定は、Losowsky の方法³⁾ に準じた。すなわち尿 1ml に再蒸留水 2ml を加え、それに80%チオグリコール酸 6滴を加え十分振盪した後、光電分光光度計にて 520m μ の吸光度を測定した。次に、N/2 硫酸溶 1g/dl α 'ジピリジル溶液 6滴を加えよく振盪して、10分後に同じ波長で吸光度を測定した。前者と後者の差を求め、あらかじめ作成しておいた検量線より尿中鉄濃度を求めた。以上のようにして求めた尿中鉄濃度を1日尿量とかけあわせて、1日総尿中排泄鉄量を算出した。なお用具はすべて一般化学器具清掃法により洗滌後、稀塩酸溶液中に1昼夜浸し、再び再蒸留水にて十分に洗浄し、注意深く乾燥した後使用した。また保存には同様にして脱鉄したポリエチレン容器を用いた。

3. 鉄代謝の観察

実験ラット16匹を前回と同様に5週後に体重を測定した後、各ラットをエーテル麻酔下で開腹、開胸し、心臓直接穿刺により採血した後肝臓を剔出した。また大腿骨髄を剔出して、塗沫標本並びに圧搾標本を作成した。この血液を用いて血清鉄、総鉄結合能を、肝臓を用いて肝臓器鉄量を測定した。また骨髄塗沫標本を用いて sideroblast を、圧搾標本を用い

て骨髄貯蔵鉄量を観察した。なお本実験においても用具は前回実験と同様の方法にてすべて脱鉄後使用した。

(1) 血清鉄及び総鉄結合能測定法

血清鉄は松原による国際標準法改良法⁴⁾ により測定した。すなわち、血清 1ml にトリクロル酢酸を 7.5g/dl, 塩酸を 0.5N, チオグリコール酸を 1.5% 含む試薬 2ml を加え遠沈除蛋白した上澄液 2ml に、30g/dl 酢酸ナトリウム \cdot 3H₂O 溶 30mg/dl batho-phenanthroline sulfonate 2ml を加え発色させた。3分後、再蒸留水を対照として分光光度計にて 535 m μ にて比色した。血清のかわりに再蒸留水、鉄標準液を同様処理して、盲検並びに標準用として検量線を作成し、それを用いて鉄濃度を求めた。

総鉄結合能は Ramsay 法⁵⁾ に準じた松原の変法⁴⁾ を用いた。すなわち血清 1.0ml に、硫酸第二鉄アンモニウムを N/200 塩酸に溶かして 5 μ g/ml の鉄濃度とした添加鉄液を加え、混和した後5分間静置した。これに軟質塩基性炭酸マグネシウム 0.2g を加え10秒間強く混和し、45分間室温放置後遠沈した。その上澄液 2.0ml にトリクロル酢酸を 15.0g/dl, 塩酸を 1N, チオグリコール酸を 3.0% 含む試薬 1.0ml を加えて混和、遠沈除蛋白して上清 2.0ml をとり、30g/dl 酢酸ナトリウム \cdot 3H₂O 溶 30mg/dl batho-phenanthroline sulfonate 2ml を加えて発色させ、血清鉄と同様に比色した。そして血清鉄と同様に検量線を作成し、総鉄結合能を求めた。

(2) 肝臓器鉄量測定法

Brückmann and Zondek 氏加温ピロリン酸法⁶⁾ によって抽出した非ヘミン鉄を、アスコルビン酸を用いて還元し、O-phenanthroline を用いて発色し比色定量した⁷⁾。

剔出した肝を即座にヘパリン加生理的食塩水中で洗滌し、できるだけ血液を取り除いたあとこれを十分に細砕した。この細砕した組織 1g を正確に計量し、飽和ピロリン酸ソーダ水溶液 1容と 20g/dl 三塩素酢酸水溶液 2容を使用前に混合した混合液 (ピロリン酸 TCA) 10ml を加えて、十分ホモゲナイズした。これを15~24時間放置したのち沸騰水中に10分間加温し、放冷後遠心分離して上清をとり、さらに残った沈渣に10ml のピロリン酸 TCA を加えて、沸騰水中で再び10分間加温し、同じく遠心分離した上清を集加して25ml に定量した。その4ml に飽和酢酸ソーダ 0.5ml を加え、ついで新調した 4g/dl アスコルビン酸 0.3ml を加えた。さらに 1g/dl O-phen-

anthroline メチルアルコール溶液 1ml を加え、37°C 1時間放置し発色させた後、分光光度計を用いて 510m μ にて再蒸留水を対照として比色した。盲検液としては、再蒸留水 2ml にピロリン酸 TCA 2ml を加えたものを使用し、標準液とともに同様に処理して検量線を作成し、それを用いて鉄濃度を求め、さらに肝 1g 中の非ヘミン鉄量を算出した。

(3) 骨髄 sideroblast 観察法

Kaplan の方法⁸⁾に準じた木村の改良法⁹⁾に従った塗沫乾燥した標本をホルマリン蒸気中に約 1 時間放置し固定後、2% 塩酸と 2g/dl 黄血塩溶液を染色直前に等量混合した液中にて約 2 時間染色した。この時、1 時間目に新しい混合液と交換した。水洗後、塩基性フクシン 1g を純エタノール 10ml に溶解し 5g/dl 石炭酸水 90ml を加えた貯蔵液 6ml を、蒸留水 100ml で希釈した希釈液中で約 1 分間後染色した。その後純エタノール中で数秒間脱色、水洗し、軽度に赤味を帯びた程度の標本を鏡検した。

赤芽球は、胞体が色素を含有し橙黄色を呈する正染性及び多染性のものを観察した。胞体内の鉄顆粒の数により sideroblast を I~III 型に分類した⁹⁾すなわち I 型は 1~2 コ、II 型は 3~5 コ、III 型は 6 コ以上とし、鉄顆粒のないものは O 型とした。以上の分類で、赤芽球 100 コを観察し各型の百分率を求めた。

(4) 骨髄貯蔵鉄検査法

Rath and Finch の方法¹⁰⁾に準じた原田の方法¹¹⁾により染色した。すなわち骨髄組織を、スライドガラス上で 2 枚のガラスを合わせてひきつぶし圧縮標本を作成した。乾燥後メタノールで約 10 分間固定した。20% 黄血塩水溶液を作り、それに振っても白濁が消えなくなるまで濃塩酸を加え、それをろ紙 (Whatman No. 5) でろ過して標本にかけ約 30 分放置した。その後水染して乾燥し鏡検した。後染色は行なわなかった。

貯蔵鉄は Rath and Finch の原法¹⁰⁾に原田の定義¹¹⁾を加味して Grade 0~6+までで分類した。全く鉄顆粒の認められないものを Grade 0、1000 倍の

拡大で初めて観察しうる場合、その顆粒の多少により Grade 1+~3+とし、100 倍の拡大にても観察しうる場合を同様に 4+~6+に分類した。

実験成績

1. desferrioxamine 投与による一般的観察

(1) 体重

体重は A 群、B 群においては対照群に比し、ほとんど差はなかった (表 1)。C 群においては対照群よりやや減少の傾向がうかがわれるが、有意の差ではなく、まず成長の障害はないものと思われた (表 1、図 1)。

(2) 赤血球数

赤血球数は A 群、B 群、C 群とも対照群に比し減少傾向にあり、特に B 群の減少が目立ち、有意 ($P < 0.05$) の減少を認めた (表 2、図 2)。

(3) ヘモグロビン値

ヘモグロビン値は、A 群 ($P < 0.005$)、B 群 ($P < 0.001$)、C 群 ($P < 0.001$) とも対照群に比し有意の減少を示した (表 3)。

特に C 群では 2 週目より低下傾向が見られ、4 週後より明らかに有意の低下が見られた (表 3、図 3)。

(4) mean corpuscular hemoglobin mean corpuscular hemoglobin (MCH) について

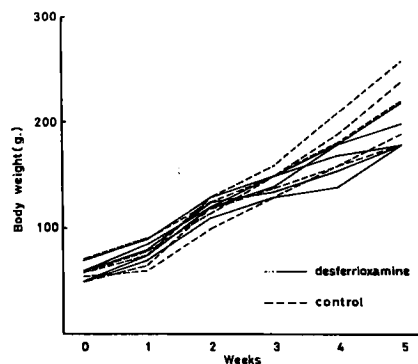


図 1. desferrioxamine 150mg/kg 投与ラットの体重の変動

表 1. DFO 投与ラットの体重変化 (g)

	0 week	1st week	2nd week	3rd week	4th week	5th week
Group A	55 ± 4	—	142 ± 8	159 ± 9	198 ± 22	220 ± 37
B	59 ± 5	91 ± 14	129 ± 21	168 ± 18	194 ± 18	214 ± 18
C	58 ± 8	80 ± 8	121 ± 7	141 ± 9	167 ± 14	192 ± 18
Control Group	59 ± 7	74 ± 12	118 ± 12	146 ± 11	180 ± 21	218 ± 33

表2. DFO 投与ラットの赤血球数の変化 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)

	0 week	1st week	2nd week	3rd week	4th week	5th week
Group A	644 \pm 35	—	577 \pm 69	727 \pm 53	709 \pm 31	725 \pm 67
B	594 \pm 67	654 \pm 43	556 \pm 39	646 \pm 63	644 \pm 142	710 \pm 114
C	606 \pm 37	640 \pm 29	725 \pm 61	775 \pm 35	796 \pm 57	778 \pm 42
Control Group	602 \pm 65	659 \pm 60	727 \pm 24	815 \pm 29	858 \pm 110	839 \pm 51

表3. DFO 投与ラットのヘモグロビン値の変化 (g/dl)

	0 week	1st week	2nd week	3rd week	4th week	5th week
Group A	7.8 \pm 0.5	—	8.6 \pm 1.0	10.5 \pm 0.8	11.5 \pm 0.4	11.6 \pm 0.9
B	8.6 \pm 1.1	9.7 \pm 1.4	9.8 \pm 1.5	9.7 \pm 1.1	11.0 \pm 0.7	11.2 \pm 0.7
C	8.2 \pm 0.4	9.4 \pm 1.1	9.4 \pm 1.1	9.5 \pm 0.5	9.5 \pm 0.6	10.6 \pm 0.7
Control Group	8.4 \pm 0.7	9.6 \pm 0.4	10.8 \pm 0.8	11.6 \pm 1.4	12.4 \pm 0.5	13.4 \pm 0.6

表4. DFO 投与ラットのMCHの変化 (pg)

	0 week	1st week	2nd week	3rd week	4th week	5th week
Group A	12.2 \pm 0.9	—	14.9 \pm 0.5	14.5 \pm 1.9	16.3 \pm 1.0	16.0 \pm 1.6
B	14.4 \pm 1.3	14.9 \pm 2.2	17.5 \pm 2.4	15.0 \pm 1.3	17.7 \pm 4.0	16.0 \pm 2.6
C	13.6 \pm 0.6	14.5 \pm 1.8	13.0 \pm 1.3	12.4 \pm 1.1	12.0 \pm 0.5	13.7 \pm 1.0
Control Group	14.2 \pm 1.7	14.3 \pm 1.8	14.9 \pm 1.0	14.3 \pm 1.9	14.6 \pm 1.6	16.0 \pm 0.7

表5. DFO 投与ラットの1日総尿中排泄鉄量の変化 (μg)

	0 week	1st week	2nd week	3rd week	4th week	5th week
Group A	7.6 \pm 1.6	—	3.7 \pm 3.8	18.8 \pm 9.5	21.1 \pm 12.9	50.6 \pm 40.3
B	2.5 \pm 1.7	7.0 \pm 3.3	11.0 \pm 2.5	37.3 \pm 9.0	35.0 \pm 17.2	76.2 \pm 41.9
C	2.0 \pm 1.3	10.8 \pm 3.4	18.1 \pm 1.6	36.7 \pm 23.4	48.6 \pm 20.7	100.8 \pm 35.2
Control Group	3.1 \pm 1.8	2.4 \pm 1.6	4.0 \pm 1.9	7.2 \pm 5.1	11.5 \pm 4.6	20.0 \pm 11.5

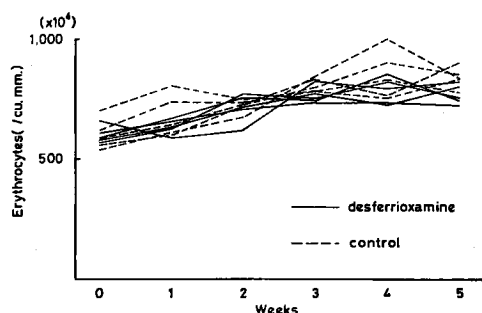


図2. desferrioxamine 150mg/kg 投与ラットの赤血球数の変動

比較した結果、A群は全経過を通じ対照群とほとんど差を示さなかった。B群は時期により対照群よりむしろ高値をとることもあり、最終的には対照群と差を示さなかった。C群では2週目より低下傾向を示し、4週目には有意 ($P < 0.005$) の低下を示し低色素性の像を呈した(表4)。

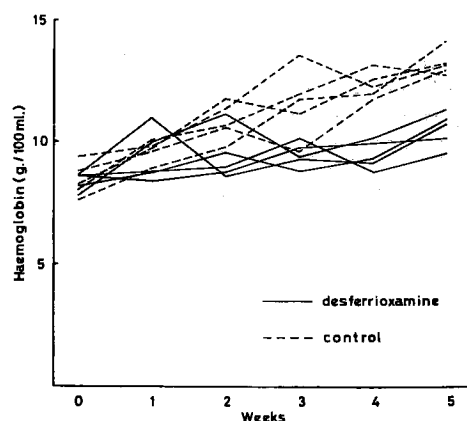


図3. desferrioxamine 150mg/kg 投与ラットのヘモグロビン値の変動

2. 尿中排泄鉄の観察

1日総尿中排泄鉄量は、A群では3週目以降において対照群に比し軽度の増加を示した。B群ではや

はり3週目以降で有意の増加を示した(表5)。C群では対照群に比し1週目より増加傾向を示し、2週目以降は明らかな増加を示した(表5, 図4)。

3. 鉄代謝の観察

(1) 血清鉄及び総鉄結合能

血清鉄はDFO投与群において、対照群に比し増加を認めた(表6, 表7)。

また総鉄結合能は血清鉄値に反比例せず、むしろDFO投与群に軽度の増加を認めたが、有意ではなかった(表6, 表7)。

トランスフェリン飽和度は、血清鉄高値を示したDFO投与群で高値を示した(表6, 表7)。

(2) 肝臓器鉄量

肝1gあたり(wet weight)の鉄含量は、DFO投与群では対照群の1/2近くに減少し、明らかな有意

差(P<0.001)を示した(表6, 表7)。

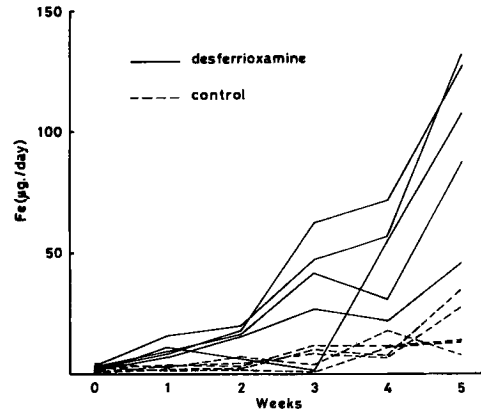


図4. desferrioxamine 150mg/kg 投与ラットの1日総尿中排泄鉄量の変動

表6. DFO 投与ラットの貯蔵鉄

Rat No.	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean ± SD
Liver non-hemin iron (µg/g)	28.3	20.0	27.4	18.6	23.2	18.0	17.3	20.7	21.7 ±4.2
Sideroblastogram (%) type I-II-III	13-1-0	2-0-0	1-0-0	2-0-0	9-0-0	3-0-0	2-0-0	3-0-0	
Bone marrow iron store	1+	2+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	
SI (µg/dl)	324	283	208	237	211	275	200	151	236 ±55
TIBC (µg/dl)	625	532	740	608	707	805	777	701	687 ±92
TS (%)	51.8	53.2	28.1	38.5	29.8	34.2	25.7	21.5	35.4 ±11.8

SI=serum iron, TIBC=total iron binding capacity, TS=transferrin saturation

表7. 対照ラットの貯蔵鉄

Rat No.	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean ± SD
Liver non-hemin iron (µg/g)	30.0	31.1	37.6	35.2	32.7	40.3	47.9	56.4	38.9 ±9.1
Sideroblastogram (%) type I-II-III	13-0-0	15-0-0	7-0-0	9-0-0	13-0-0	5-0-0	9-0-0	13-2-0	
Bone marrow iron store	2+	1+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	
SI (µg/dl)	78	242	196	104	172	114	181	101	148 ±57
TIBC (µg/dl)	746	571	703	668	671	668	604	642	659 ±55
TS (%)	10.5	42.4	27.9	15.6	25.6	17.1	30.0	15.7	23.1 ±10.4

SI=serum iron, TIBC=total iron binding capacity, TS=transferrin saturation

(3) 骨髄 sideroblast

DFO 投与群では1~13%の sideroblast の出現を見、対照群では5~13%の出現を見た。両群ともこれの存在しない例は認められなかったが、DFO 投与群において明らかに出現率が低下している。また両群とも、II型の出現したのは1例ずつで、III型は全く出現を見なかった(表6, 表7)。

(4) 骨髄貯蔵鉄

骨髄貯蔵鉄は両群とも100倍で鏡検して鉄顆粒のみられる例は1例もなく、また反対に1000倍で鏡検して鉄顆粒の認められない例も全くなく、すべてが1+または2+に分類された。そしてDFO 投与群では2+は1例のみで他はすべて1+, 反対に対照群では1+が1例のみで他はすべて2+, DFO 投与群に明瞭な低下を示した(表6, 表7)。

考 察

desferrioxamine (DFO) は最も強力な鉄キレート剤で、1分子中に3価鉄を強く結合し、理論的には100mgのdesferrioxamine mesylate (Desferal®) は8.5mgの鉄を結合すると言われている。また3価鉄に対して特異的で、2価鉄や他の金属に対する親和性は低い¹²⁾しかし、鉄キレートの行なわれる主たる部位については多くの研究があるが、いまだにその詳細は不明である。今のところ、肝実質細胞中に入りferritinの鉄を奪うと考えられ¹³⁾またin vitroではferritinおよびhemosiderinの鉄がキレートされるという事がわかっている¹⁴⁾DFOに鉄の結合したferrioxamineは主として腎糸球体濾過により排泄され、血中濃度が高い場合は尿細管分泌で排泄される。また胆汁からもかなりの量が排泄され、糞便中の鉄量が増加すると言われている¹⁵⁾

人におけるDFOの使用量は、急性鉄中毒の場合には筋注および静注にて1日6gまで使用可能であるが¹²⁾慢性の鉄過剰症では500mg¹⁴⁾~1g¹²⁾を長期に用いる事が多い。副作用としては静注時の熱感、低血圧、蕁麻疹などの軽いアナフィラキシー、筋注時の局所の炎症、さらに長期使用ではまれに白内障、肝障害などの報告もあるが、血小板減少の1例を除いて血液障害の報告はない。静注時のラットのLD₅₀は329mg/kgである¹²⁾また20および100mgのDFOを30日間ラットに筋注して異常を生じなかったという報告はあるが、本実験のような大量を長期に使用した報告は見当たらない。

DFOによる尿中鉄排泄は正常人では貯蔵鉄量に

比例し¹⁶⁾、¹⁷⁾鉄過剰症では網内系の鉄よりも、肝実質細胞中の鉄量に関係すると言われている^{18~21)}500mgのDFOで6時間中に排泄される鉄量は、鉄過剰症の6~13mgに対し正常人では0.5mg以下であり²²⁾他の報告でも600mgのDFOで正常人では1日2mg以下²³⁾あるいは1gのDFOで2.2mg以下で、正常人ではごく少量の鉄排泄しか起こし得ない様である。その反面、鉄欠乏状態でも正常の上限の貯蔵鉄を有した状態とあまり変わらぬ鉄排泄を示す¹⁷⁾そして貯蔵鉄が枯渇した状態でも少量(0.2~0.6mg)の鉄は排泄され¹⁹⁾、¹⁸⁾それらはヘモグロビン分解時の鉄に由来するのではないかとされている¹⁷⁾またDFOによる臓器鉄減少の程度は、鉄過剰よりも正常ラットにおいて著明であるという報告²⁴⁾さえあるくらいで、DFOにより正常あるいは鉄欠乏状態においても十分鉄排泄を惹起しうるものと考えられる。

すなわち、以上は本研究においても、DFO使用により少量ではあるが着実に鉄の排泄が進行し貧血に至るといふ過程をたどる事を推測させる。事実本実験ではDFO投与群の臓器鉄量が対照群の1/2近く減少しており、また、鉄欠乏型の低色素性貧血が惹起されたが、この結果は、第1編においてすでに詳述した木村の粘膜平衡²⁵⁾、²⁶⁾という考え方からすれば、DFOによる鉄排泄亢進とともにこの鉄過剰排泄時期には成長期ラットの鉄吸収は当然抑制される、ということに起因する鉄欠乏状態と解することができる。また、DFO投与を開始したラットの生後1カ月弱という時期は、ラットの貯蔵鉄量が急激な増加を示す前の最低を示す時期であり²⁷⁾成長につれて増大するヘモグロビン量に見合うだけの鉄が吸収で補い切れなかったことも関係し、本研究にて惹起し得た貧血は、DFOの作用と、ラットの成長期の鉄代謝への影響との総和による鉄欠乏に帰すべきものと考えられる。

低色素性貧血を呈したのはDFO 150mg/kg投与したC群のみであったが、それより少量を投与したA群、B群においても正色素性ではあるが軽度の貧血が起きているようである。後者(A群、B群)のグループについては貯蔵鉄の状態の評価を行っていないが、この軽い貧血が軽度の鉄欠乏の影響によるものなのか、DFO自体の毒性によるものなのか、あるいは後にふれるDFOの1つの作用なのかは本実験のみでは定かでない。ただ骨髄sideroblastがDFO投与群でむしろ鉄欠乏型を示した事から造血障害のないこと、また体重が対照群と有意差なく、

外観、運動状態、内臓肉眼所見にも対照群と差を認め得なかった事から栄養障害のないこと、は確実であろう。

次に、血清鉄が臓器鉄の動きに反して DFO 投与群に高値を示したことについて検討してみたい。DFO 投与群においては絶えず大量の DFO による鉄排泄亢進状態が存在するため、臓器間の鉄の動きは活発となり、その反映として血清鉄高値をとった可能性が考えられる。今一つは desferrioxamine が鉄分子と結合した形である ferrioxamine は血中で分解されにくく、本実験のようなラットに対する大量長期投与においては、DFO の蓄積はかなり生じている可能性があるため、その ferrioxamine と結合した形の鉄を加えて測定している可能性も考えられる。

肝臓器非ヘミン鉄量は DFO 投与群で対照群の1/2近い減少を示した。鉄欠乏性貧血時の肝臓器鉄量については、教室の中塚は瀉血貧血犬において $34\mu\text{g}/\text{g}$ ²⁹⁾、瀉血家兎において $40\mu\text{g}/\text{g}$ ²⁹⁾という値を出している。同じく教室の上塚³⁰⁾は慢性瀉血家兎において $25\mu\text{g}/\text{g}$ という値を出している。また吉野³¹⁾は体重40~60gのドンリュウラットに除鉄食を2カ月与えることにより、鉄欠乏性貧血を作成しており、貧血ラットの肝臓器鉄量は貧血の程度に関係なく約 $12\sim 15\mu\text{g}/\text{g}$ となっている。これらの値と比較して、本実験の DFO 投与群の平均値 $21.7\mu\text{g}/\text{g}$ という値は鉄欠乏性貧血時の値としてまず妥当と考えられる。

ラットの骨髄 sideroblast 出現率は人に比して低かった。DFO 投与群では対照群に比してさらに少なく、多少のばらつきはあるが全体に鉄欠乏を示していた。この成績は、DFO による造血障害を否定するものとして重要である。

骨髄貯蔵鉄は骨髄網内系の貯蔵鉄量を示すもので、DFO 投与群では1例の2+を除き1+、対照群では1例の1+を除き2+と、DFO 投与群にやや減少傾向を示した。この減少の軽度な点は、DFO が主として肝実質細胞より鉄をキレートし、網内系には働かないという報告^{19) 20)}にある程度相応するものかもしれない。本法は組織化学的定量とかなりの相関を持つ³²⁾と言われているものの、半定量的であるための限界を加味して考えておく必要があろう。

さて、本実験で招来し得た貧血は以上検討して来たごとく、DFO による鉄過剰排泄と、それに伴う成長による鉄需要増大に対する鉄吸収障害に起因する鉄欠乏性貧血と考えるべきであろう。ただ一つ問

題点としてはDFO自身の作用である。DFOの安定恒数は $30.7^{34)}$ で、transferrinの $36^{35)}$ に比して低値であり、in vivoではtransferrinの鉄を奪えない、しかし、in vitroではtransferrinの鉄を奪う場合があるという報告³⁴⁾もあり、最近クエン酸塩、nitriolo-triacetic acid (NTA)などの低分子量のキレート剤が、transferrinよりDFOへの鉄の移送を促進するという報告³⁵⁾もある。さらにDFOが網内系へのtransferrinからの鉄のとり込みを抑制するという報告^{36) 37)} ferrioxamineの鉄がヘモグロビン合成に利用される事もあるという報告³⁸⁾もあるが、赤芽球へのtransferrin鉄のとり込みとDFOとの関係を見た報告はないようである。本実験の結果は、一部にDFOがtransferrinの赤芽球への鉄供給を抑制したという可能性も考えられないでもないが、やはり前述のごとく主因は鉄排泄増加による鉄欠乏と思われる。

著者は第1編において鉄負荷後の尿中鉄排泄を検討する鉄排泄試験を、鉄欠乏性貧血患者を中心に実施することにより、再発をくり返す本態性低色素性貧血患者において鉄排泄亢進の起きている可能性を示唆した。そして本編の結果は、実際に非ヘミン鉄の排泄増加が貧血を招来しうる事を示すもので、鉄過剰排泄に起因する貧血、すなわち木村³⁹⁾の提唱する“鉄漏出性貧血 Iron-losing anemia”の存在の可能性を示す一つの実験的裏づけと考えられる。

結 語

鉄の排泄増加が貧血を招来しうるか否かについて、成長途上のラットを用いて desferrioxamine 投与による影響を検討し、以下に記す結果を得た。

1. desferrioxamine の投与により尿中排泄鉄量は初期より著明に増加し、ヘモグロビン値は本剤 $150\text{mg}/\text{kg}$ 毎日5週間筋注群において対照群に比し、2週目頃から低下傾向を示し5週目では明瞭な低下を認めた。しかし赤血球数には有意の変化を認めず、低色素性の所見を示した。また、体重減少など成長障害は認められなかった。

2. 血清鉄は desferrioxamine 投与群に増加を示したが、総鉄結合能は対照群と差がなかった。肝臓器鉄量は desferrioxamine 投与群で、対照群の1/2近い著明な減少を示した。骨髄 sideroblast 及び骨髄貯蔵鉄はいずれも desferrioxamine 投与群で減少傾向を示した。

以上の結果は、desferrioxamine による非ヘミン

鉄の過剰排泄により鉄欠乏性貧血が招来されたものと考えられ、木村の提唱する鉄漏出性貧血 (Iron-losing anemia) の存在を支持する実験的成績と考えられる。

稿を終わるにあたり、御指導御校閲を賜った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表わすとともに、終始御懇切なる御指導、御助言を頂いた杉山元治学士に篤く感謝の意を表する。

なお本論文の要旨は第19回日本臨床血液学会総会 (昭和52年名古屋) において発表した。

文 献

- 1) Crosby, W. H., Conrad, M. E. Jr. and Wheby, M. S.: The rate of iron accumulation in iron storage disease. *Blood*, **22** : 429~440, 1963.
- 2) Green, R., Charlton, R., Seftel, H., Bothwell, T., Mayet, F., Adams, B., Finch, C. and Layrisse, M.: Body iron excretion in man: A collaborative study. *Am. J. Med.*, **45** : 336~353, 1968.
- 3) Losowsky, M. S.: Effects of desferrioxamine in patients with iron-loading with a simple method for estimating urinary iron. *J. Clin. Path.*, **19** : 165~169, 1966.
- 4) 松原高賢: 血清鉄および鉄結合能, 臨床と研究, **50** : 1297~1301, 1973.
- 5) Ramsay, W. N. M.: The determination of the total iron-binding capacity of serum. *Clinica Chimica Acta*, **2** : 221~226, 1957.
- 6) Brückmann, G. and Zondek, S. G.: Improved method for determination of non-hemin iron. *J. Biol. Chem.*, **135** : 23~30, 1940.
- 7) 増田正典, 滝野辰郎, 高田洋, 大前典俊, 入江和夫, 大川原康夫, 辻俊三, 島田恒弘, 西村二郎, 藤田圭吾, 野島豊, 河谷貞佳: 放射性鉄を用いた組織非ヘミン鉄代謝の研究: 実験術式とその検討, *日新医学*, **47** : 765~775, 1960.
- 8) Kaplan, E., Zuelzer, W. W. and Mouriquand, C.: Sideroblast.: A study of stainable nonhemoglobin iron in marrow normoblasts. *Blood*, **9** : 203~213, 1954.
- 9) 木村郁郎: Sideroblast に関する研究, *岡山医学会誌*, **69** : 1773~1825, 1957.
- 10) Rath, C. and Finch, C. A.: Sternal marrow hemosiderin: A method for the determination of available iron stores in man. *J. Labor. Clin. Med.*, **33** : 81~86, 1948.
- 11) 原田契一: 骨髓貯蔵鉄の検査法とその鉄欠乏性貧血診断法としての意義, *臨床血液*, **17** : 737~741, 1976.
- 12) Ciba Pharmaceutical Company: Desferrioxamine mesylate (Desferal mesylate) : A specific iron-chelating agent for treating acute iron intoxication. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **10** : 595~596, 1969.
- 13) Hershko, C., Cook, J. D. and Finch, C. A.: Storage iron kinetics. III. Study of desferrioxamine action by selective radioiron labels of RE and parenchymal cells. *J. Labor. Clin. Med.*, **81** : 876~886, 1973.
- 14) Wöhler, F.: The treatment of haemochromatosis with desferrioxamine. *Acta Haemat.*, **30** : 65~87, 1963.
- 15) Cumming, R. L. C., Millar, J. A., Smith, J. A. and Goldberg, A.: Clinical and laboratory studies on the action of desferrioxamine. *Brit. J. Haemat.*, **17** : 257~263, 1969.
- 16) Balcerzak, S. P., Westerman, M. P., Heinle, E. W. and Taylor, F. H.: Measurement of iron stores using desferrioxamine. *Ann. Int. Med.*, **68** : 518~525, 1968.
- 17) Ollson, K. S.: Iron stores in normal men and male blood donors. *Acta Med. Scand.*, **192** : 401~407, 1972.

- 18) Hallberg, L., Hedenberg, L. and Weinfeld, A.: Liver iron and desferrioxamine-induced urinary iron excretion. *Scand. J. Haemat.*, **3**: 85~98, 1966.
- 19) Harker, L. A., Funk, D. D. and Finch, C. A.: Evaluation of storage iron by chelates. *Am. J. Med.*, **45**: 105~115, 1968.
- 20) Ploem, J. E., de Wael, J., Verloop, M. C. and Punt, K.: Sideruria following a single dose of desferrioxamine-B as a diagnostic test in iron overload. *Brit. J. Haemat.*, **12**: 396~408, 1966.
- 21) Walsh, J. R., Mass, R. E., Smith, F. W. and Lange, V.: Desferrioxamine effect on iron excretion in hemochromatosis. *Arch. Int. Med.*, **113**: 435~441, 1964.
- 22) Schmid, V. J. R., Oechslin, R. J., Schnider, T. und Moeschlin, S.: Ein einfacher 6 stündiger i. m. Test mit Desferrioxamine-B (Desferal) zur Diagnose der Hämochromatose. *Schweiz. Med. Wschr.*, **94**: 1652~1655, 1964.
- 23) Bannerman, R. M., Callender, S. T. and Williams, D. C.: Effect of desferrioxamine and DPTA in iron overload. *Brit. Med. J.*, **2**: 1573~1577, 1963.
- 24) Bobeck-Rutsaert, M. M. J. C., op den kelder, A. M., Wiltink, W. F., van Eijk, H. G. and Leijnse, B.: Site of action of desferrioxamine in removing iron in normal and pathological conditions. *Acta Haemat.*, **51**: 151~158, 1974.
- 25) 木村郁郎, 山名正俊, 西下明: 胃粘膜の鉄排泄における粘膜平衡, *医学と生物学*, **79**: 247~252, 1969.
- 26) 木村郁郎: 消化管粘膜と鉄代謝—胃粘膜からの鉄の吸収と排泄—, *血液と脈管*, **1**: 233~239, 1970.
- 27) Leslie, A. J. and Kaldor, I.: Liver and spleen nonheme iron and ferritin composition in the neonatal rat. *Am. J. Physiol.*, **220**: 1000~1004, 1971.
- 28) 中塚銀太: 鉤虫症の鉄代謝に関する研究, 第1編 鉤虫症の臓器非ヘミン鉄量に関する実験的研究, *岡山医学会誌*, **70**: 2259~2266, 1958.
- 29) 中塚銀太: 鉤虫症の鉄代謝に関する研究, 第2編 鉤虫症血清注射時及び各種実験的貧血に於ける臓器非ヘミン鉄量, *岡山医学会誌*, **70**: 2267~2276, 1958.
- 30) 上塚香: 放射性鉄による鉤虫症の鉄代謝に関する研究, 第2編 鉤虫乳剤注射の鉄代謝に及ぼす影響について, *岡山医学会誌*, **71**: 1949~1958, 1959.
- 31) 吉野芳夫, 平松芳子, 柳下晃, 寺戸国昭: 貧血ラットにみられる鉄吸収の亢進について, *栄養と食糧*, **24**: 206~210, 1971.
- 32) Gale, E., Torrance, J. and Bothwell, T.: The quantitative estimation of total iron stores in human bone marrow. *J. Clin. Invest.*, **42**: 1076~1082, 1963.
- 33) Assa, R., Malmstöm, B. G., Saltman, P. and Vänngård, T.: The specific binding of iron (III) and copper (II) to transferrin and conalbumin. *Biochim. Biophys. Acta*, **75**: 203~222, 1963.
- 34) Wöhler, F.: Erfahrungen mit Desferrioxamin bei pathologischen Eisenablagerungen. *Schweiz. Med. Wschr.*, **92**: 1295~1306, 1962.
- 35) Pollack, S., Aisen, P., Lasky, F. D. and Vanderhoff, G.: Chelate mediated transfer of iron from transferrin to desferrioxamine. *Brit. J. Haemat.*, **34**: 231~235, 1976.
- 36) MacSween, R. N. M. and MacDonald, R. A.: Iron metabolism by reticuloendothelial cells.: In vitro uptake of transferrin bound iron by rat and rabbit cells. *Labor. Invest.*, **21**: 230~235, 1969.
- 37) MacDonald, R. A., MacSween, R. N. M. and Pechet, G.: Iron metabolism by reticuloendothelial cells in vitro: Physical and chemical condition, lipotrope deficiency, and acute inflammation. *Labor. Invest.*, **21**: 236~245, 1969.
- 38) Hallberg, L. and Hedenberg, L.: The effect of desferrioxamine on iron metabolism in man I. *Scand. J. Haemat.*, **2**: 67~79, 1965.
- 39) 木村郁郎, 山名正俊, 大塚泰亮, 西崎良知: 胃液の鉄量について——本態性低色素性貧血の成因に関連し

て——, 日血会誌, 31 : 199~203, 1968.

Studies on the cause of iron deficiency anemia
Part 2. Induction of experimental anemia by excess iron excretion
by
Akira MIYATA

Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Ikuro Kimura)

It was studied experimentally whether excess iron excretion can cause anemia in growing rats given desferrioxamine (DFO) intramuscularly.

In the group injected with 150 mg/kg DFO daily for five weeks, urinary iron excretion started to increase after one week, and then hemoglobin concentration decreased after two weeks of treatment. The difference in hemoglobin concentration between the experimental and control groups was significant when treatment was continued for four weeks, although no significant differences were observed in erythrocyte counts. Thus, hypochromic anemia was induced. However, DFO at this dose did not retard growth in rats.

In the second step, iron metabolism was examined. The same dose of DFO was administered to another group of rats every day for the same period. Compared to the control group, serum iron levels were higher in the rats injected with DFO. On the contrary, there were no differences in the total iron binding capacity. Liver nonhemin iron content in DFO-injected rats showed a marked decrease, which was nearly half of that in the controls. Diminution of bone marrow sideroblasts and bone marrow stainable iron was found at almost every case treated with DFO.

It was demonstrated in these experiments that excess iron excretion induced by DFO resulted in iron deficiency anemia. These results give an experimental support to the concept of "Iron-losing anemia", anemia caused by the loss of nonhemin iron.