

静注用鉄剤に含まれる遊離鉄が生体に与える影響 —遊離鉄の危険性—

柴田 央恵¹⁾, 小西 貴子²⁾, 芝山 洋二²⁾, 友杉 直久¹⁾

要約:【目的】腎性貧血に対する鉄補充療法として、日常的に静注用鉄剤が利用されている。しかし、血漿鉄総量3~4 mgの正常血液中に多量の鉄剤が投与されると、鉄代謝制御系に大きな影響を与えるものと推測されるが、その詳細は不明である。本研究では、静注用鉄剤の鉄代謝制御系に与える影響を、hepcidinの反応様式から検討する。

【対象と方法】静注用鉄剤の5種類、デキストラン鉄 (FeD)、クエン酸加デキストリン鉄 (FeDC)、スクロース鉄 (FeS)、含糖酸化鉄 (SFeO) およびグルコン酸鉄Na (FeG) を検討した。8週令のSD雄ラットに、製剤5 mg/kgを静脈投与したのち、経時的に1, 5, 10, 20, 30分, 1, 3, 6, 12, 24時間に屠殺採血し(各群5匹)、血漿鉄、TSAT、製剤鉄、hepcidin、IL-6を測定した。

【結果】血漿鉄とTSATは、製剤投与1分後に最大値に至り、その後半減期6時間で12時間後には、正常域に戻った。Hepcidinは、FeDCでは投与24時以内で有意な上昇はなかった(最大値129 ng/ml)が、FeDでは6時間後に最大値185 ng/ml、またSFeO、FeSおよびFeGでは12時間後にそれぞれ最大値235, 250, および272 ng/mlを示した。これらは24時間後には正常レベルに戻った。IL-6には変動は見られなかった。血漿鉄の12時間の発現量の総和(AUC₀₋₁₂)は、hepcidinの24時間AUC₀₋₂₄と強い相関を示した($r^2 = 0.86$, $p = 0.008$)。

【結論】遊離鉄を多く含む静注用鉄剤を投与すると、hepcidin発現を促進させ鉄代謝制御系を乱すことが明らかになった。静注用鉄剤の投与には、血中に遊離鉄が過剰に増えるリスクに加え、hepcidinの発現が誘導されることにより、その後の細胞内に蓄えられた鉄の回転利用が低下し、血中への鉄供給が抑制されるリスクがある。腎性貧血治療においても、静注用鉄剤による鉄補充は避けるべきであると思われる。

キーワード: 静注用鉄剤, hepcidin, トランスフェリン受容体2 (TfR2), 不安定鉄 (LIP)

はじめに

腎不全患者の鉄貯蔵量を適切に維持し、鉄欠乏性貧血を防ぐために、静注用鉄剤は鉄補充療法として臨床現場では広く行われており、その効果も確認されている。しかしながら、鉄総量がわずか3~4 mg程度の血液中に、40-120 mgもの静注用鉄剤が突然投与されれば、鉄代謝制御系が攪乱されることは容易に想像が付き、鉄代謝制御機構は、前世紀末のHFE (hemochromatosis gene) の発見以来、Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), ferroportin (Fpn), hepcidin, transferrin receptor 1/2 (TfR 1/2), hephaestin, sixtransmembrane epithelial antigen of the prostate 3 (Steap3), hemojuvelin (HJV), iron responsive element /iron

regulatory protein, transferrin (Tfn)などの分子レベルで理解されるようになっており (1, 2), 個体レベル, 細胞レベル, 肝細胞レベルで鉄濃度を感知し、非常に厳密に鉄を制御していることが明らかになってきた。このような厳密な機構の構築は、鉄が元来生体に危険なものであるからであろうと推測される。

このような鉄代謝制御分子系の中で、分泌因子として臨床的に測定できるのは血中hepcidinのみであり (3), 鉄の回転利用の指標として臨床応用されつつある。hepcidinは、主に肝臓で合成され分泌されるペプチドホルモンである (4)。血漿鉄濃度のセンサーであるTfR2は血漿鉄 (Tfn鉄) と結合し (5), 肝細胞膜上でHFEと複合体を形成する。その下流にはHJVとbone morphogenetic protein (BMP) 受容体の複合体があり、BMP/Smad系を介してhepcidinのプロモーターにシグナルを伝え、hepcidin産生を制御している (6)。血清鉄濃度が上昇するとTfR2を介してhepcidin産生量を亢進させ、Fpn機能を抑制して血中への鉄供給量を減少させる。一方、血清鉄濃度が低下すると、TfR2を介してhepcidin産生量は抑制され、Fpnを介する鉄

¹⁾ 金沢医科大学大学院医学研究科先進医療学

²⁾ 日本臓器製薬株式会社

石川県河北郡内灘町大学1-1

平成27年2月9日受理

表1. 静注用鉄剤の性状 (文献7,8より改編)

型	一般名	商品	分子量 (kDa)	安定度	遊離鉄	アナフィラキシー (頻度, %)	組成 (化学式)
type I (多糖類)	デキストラン鉄 (FeD)	インフェド	165-267	強健	-	0.6-0.7	$[\text{Fe}(\text{OH})_3]_m(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$
	デキストリン鉄 (FeDC)	シデフェロン	230	強健	-	?	$([\text{Fe}(\text{OH})_3]_m(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7)_n(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_x$
type II (非多糖類)	スクロース鉄 (FeS)	ベノファ	34-60	中等度	+	0.002	$[\text{Na}_2\text{Fe}_5\text{O}_8(\text{OH}) \cdot 3(\text{H}_2\text{O})]_n \cdot m(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})$
	含糖酸化鉄 (SFeO)	フェジン	?	中等度	+	?	$[\text{Fe}(\text{OH})_3]_m(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})_n$
type III (非多糖類)	グルコン酸鉄 (FeG)	フェレシット	289-440	不安定	+++	0.04	$[\text{NaFe}_2\text{O}_3(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})_5]_n$

供給量が上昇し、血中への鉄供給量が増加する。つまり、この Tfr2-hepcidin-Fpn 系は、血清鉄濃度を一定に保つためのフィードバック機構であり、この間、鉄は血漿鉄-ヘモグロビン鉄-マクロファージ貯蔵鉄-血漿鉄と、時間当たり 0.8-1.0 mg の率で回転利用されているのである。

このように、Tfr2-hepcidin-Fpn で緻密に制御されている鉄代謝系に、生理的な腸管からの鉄吸収ではなく、血管内に直接鉄が非生理的に負荷された場合、生体はどのように反応するのであろうか。静注用鉄剤は、高分子化合物を安定化剤とする水酸化第2鉄ゾルであり、安定化剤に基づき、一般的にI型：デキストラン (デキストリン) 鉄, II型：スクロース鉄, III型：グルコン酸鉄に分類される (表1)(7, 8)。製剤の主体はコロイド鉄であるが、遊離鉄も含まれており、安定化剤の違いにより、鉄イオンの遊離性にはかなりの差異があると考えられているが、具体的に経静脈的に投与された静注用鉄剤に対して生体がどのような反応するかは明らかになっていない。

そこで、本研究では、現在臨床の場で使用されている静注用鉄剤には多量の遊離鉄が含まれていること、かつ生体の鉄代謝系に大きな影響を与えていることを、hepcidin の反応様式から明らかにした。

実験方法

1. 静注用鉄剤

世界で使用されている5種類の静注用鉄剤, FeD: デキストラン鉄 (INFeD, 50 mg/ml, 2 mlバイアル; Watson Pharmaceuticals Inc., Corona, CA, USA), FeDC: クエン酸加デキストリン鉄 (シデフェロン, 25 mg/ml, 2 mlアンプル; Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan), FeS: シュクロース鉄 (ベノファ, 20 mg/ml, 5 mlバイアル; American Reagent, Inc., Shirley, NY, USA), SFeO: 含糖酸化鉄 (フェジン, 20 mg/ml, 2 mlアンプル; Nichi-iko Pharmaceutical Co., Ltd., Toyama, Japan), および FeG:

グルコン酸鉄Na (フェリシット, 12.5 mg/ml, 5 mlバイアル; Watson Pharmaceuticals Inc., Corona, CA, USA) を検討した。

2. 動物実験

8週令のSD雄ラットを、SLC Inc. (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) より購入した。各種静注用鉄剤は、いずれも5%ブドウ糖液に鉄5 mg/mlで用時調製した。各群ラット5匹に鉄5 mg/kgを1分間かけて投与し、その後経時的に1, 5, 10, 20, 30分, 1, 3, 6, 12, 24時間の各時点で、腹部大動脈よりヘパリン採血し、血漿を調整した。コントロール群には、同量の5%ブドウ糖液を投与した。検体は-80度で凍結保存し、融解後に血漿 hepcidin, トランスフェリン飽和度 (TSAT), 血清鉄, IL-6等を測定し、鉄代謝への影響を評価した。Hepcidin 発現の日内変動による影響を避けるため、鉄剤投与は午前9時と一定時間に行った。なお、本実験は動物実験委員会から実験許可を受けて行った。

3. Urea-PAGE 法

遊離鉄の含有量は、鉄と結合していないアポ・トランスフェリン (Tfn) と製剤を反応させ、Urea-PAGE法で検出した。アポTfnと遊離鉄が結合すると、1個の遊離鉄 Fe^{3+} が結合した Fe^{3+} Tfn (モノ体, mono), または2個結合した 2Fe^{3+} Tfn (ホロ体, holo) が形成され、この3種類のTfnを電気泳動で分離することができる。Urea-PAGE法は、Evansら (9) の方法に従い実施した。

In vitro 実験では、Tfnを含むラット血漿200 μl と製剤鉄60 μg を37度で1時間インキュベートし、製剤に含まれる遊離鉄をTfnと結合させ、Urea-PAGE法を用いて、電気泳動の移動順にホロ体, モノ体, アポ体を分画することにより、製剤からTfnへの鉄の移行量を評価した。

静注用鉄剤投与後のラット血漿は、血漿蛋白質からTfnを分離するために血漿20 μl を0.6%リバノール60 μl と混合し、遠心した後上清15 μl を電気泳動ゲルに負荷した。電気泳動は、60 mol/l尿素含有6.5%アクリルアミドゲルを用い、100 mmol/l

静注用鉄剤に含まれる遊離鉄が生体に与える影響

Tris, 10 mmol/l boric acid, 1.6 mmol/l Na₂EDTA, pH8.4の泳動バッファで150 V (定電圧), 4時間泳動し, ゲルをクマシーブルー染色した。アポ, モノ, ホロ Tfn の染色強度を NIH イメージソフトにより数値化し, 下記の式によりトランスフェリン飽和度 (TSAT) を求めた。

$$\text{トランスフェリン飽和度 (TSAT) \%} = \frac{\text{mono-\%} + \text{holo-\%} \times 2}{\text{apo-\%} + \text{mono-\%} + \text{holo-\%} \times 2} \times 100$$

4. 血漿 hepcidin の定量

ラット hepcidin は, 以前に報告されている質量解析計による絶対定量法で測定した (10)。血漿サンプルは, 一部同位体置換したラット hepcidin (Peptide Institute, Osaka, Japan) を内部標準として各サンプルに加え, 4% trichloroacetic acid (TCA) で処理したのち, 液体クロマトカラム (a PLRP-S column, 5 mm, 300 Å, 150 × 2.1 mm; Varian, Inc, Palo Alto, CA, USA) に注入し, 質量解析計 (4000 QTRAP LC-MS/MS, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた絶対定量法で測定した。測定下限は2.0 ng/mlである。

5. 血漿鉄および血漿中製剤鉄の定量

血漿鉄は, Nitroso-PSAP直接法による Fe C-Test kit (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて血漿中鉄イオンを定量して求めた。測定は添付マニュアルに従い, 血漿サンプルに還元剤 (thioglycolic acid, C₂H₄O₂S) を含む使用緩衝液を加え, 血清蛋白と結合していた鉄を遊離させ, 遊離した鉄のうち Fe³⁺ はチオグリコール酸により Fe²⁺ に還元し, 発色試液に含まれる Nitroso-PSAP と結合して 750 nm に極大吸収をもつキレート化合物を生成させ, 吸光度から鉄濃度を測定した。

血漿中製剤鉄は, 血漿に 0.04 mol/l HNO₃ 及び 1 mol/l HCl (いずれも終濃度) を添加し, 5分間沸騰水中での加熱による酸加水分解後の全鉄値から, 血漿鉄値を差し引いて求めた。

6. 血中動態評価

血漿 hepcidin 濃度の投与後24時間までの AUC (総和量) および血漿鉄と Tfn 飽和度の投与後12時間までの AUC, 並びに製剤鉄の血中半減期は, WinNonLin ソフトウェア (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA) により求め, それぞれ AUC は 1 コンパートメントモデル及び血中半減期はノンコンパートメントモデルで計算した。

7. IL-6 の定量

血漿中の IL-6 レベルは, Rat IL-6 Quantikine Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) キット (R6000B; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて, 添付マニュアルに従い定量した。測定域は 62.5 - 4,000 pg/ml, および検出感度は 36 pg/ml であった。

8. 統計処理

結果は, いずれも平均 ± 標準偏差で示した。群間の比較において SAS システムプログラム (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) の ANOVA と Student の t 検定で p 値 < 0.05 のとき有意差ありとした。

結 果

A 静注用鉄剤に含まれる遊離鉄 in vitro 実験

臨床で使用されている静注用鉄剤には, 様々な量の遊離鉄が含まれていることが, Urea-PAGE 法で確認された (図1)。SFeO, FeG, FeS では, アポ体がほとんど見られず, ホロ体, モノ体に移行していたことから, Tfn に結合する遊離鉄の含有量が多いものと考えられた。一方 FeD, FeDC はアポ体が残っておりホロ体, モノ体も少なく, 遊離鉄の含有量は少ないものと思われた。現在日本で使用できる唯一の SFeO は, FeS と同等の遊離鉄を含有していた。以前に日本で販売されていた FeDC には, FeD と同様に, 遊離鉄はほとんど検出されなかった。

B 動物実験 in vivo 実験

いずれの静注用鉄剤投与後も, ラットの異常行動や死亡は見られず, 一般症状に変化は見られなかった。

1. 血漿 hepcidin

正常ラット無処置の血漿 hepcidin 濃度は 100 ± 22 ng/ml であった (図2)。コントロールの5%ブドウ糖投与では, 投与1分後の若干の上昇から, 1時間以内の低下がみられたが, 24時間まで最大値 102 ng/ml と大きな変化はなかった。1時間までの変化は鉄剤投与群でも同様にみられた。FeDC は投与24時以内で有意な上昇はなかった (最大値 129 ng/ml)。他の4剤は, いずれもブドウ糖群に対して有意な上昇を示し, FeD では6時間後に最大値 185 ng/ml を, SFeO, FeS および FeG はいずれも12時間後に最大値, 235, 250, および 272 ng/ml を示した。これらは24時間後には正常レベルに戻りいずれも一過性の誘導であった。

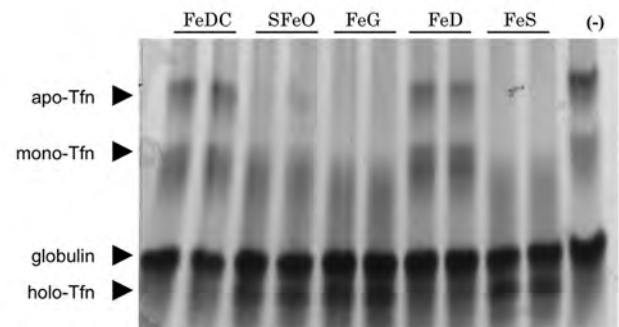


図1. 静注用鉄剤に含まれる遊離鉄

製剤中の遊離鉄は, Urea-PAGE 法を用いて検出した。Tfn を含むラット血漿 200 μl と製剤鉄 60 μg を 37度で1時間インキュベートし, 製剤に含まれる遊離鉄を Tfn と結合させ, 電気泳動でホロ体, モノ体, アポ体を分画することにより, 製剤から Tfn への鉄の移行量を評価した。
FeDC: クエン酸加デキストリン鉄 (シデフェロン)
SFeO: 含糖酸化鉄 (フェジン)
FeG: グルコン酸鉄 Na (フェリシット)
FeD: デキストラン鉄 (INFeD)
FeS: スクロース鉄 (ペノファ)

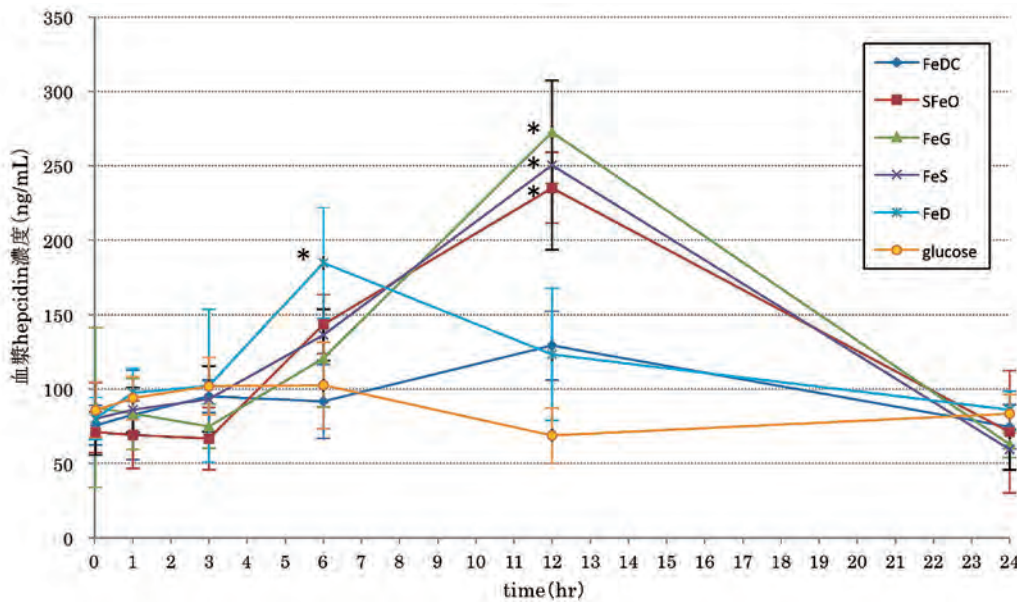


図2. 静注用鉄剤投与後の hepcidin の反応

血漿 hepcidin 濃度は、血漿サンプルに同位体置換したラット hepcidin を内部標準として加え、4% trichloroacetic acid (TCA) で処理したのち、液体クロマトカラムに注入し、質量解析計を用いた絶対定量法で測定した。測定下限は2.0 ng/mlである。静注用鉄剤を投与後、1分、1、3、6、12、24時間後の値を示した。値は平均±標準偏差で示した。

* : 5%ブドウ糖対照群に対する有意差, $p < 0.05$

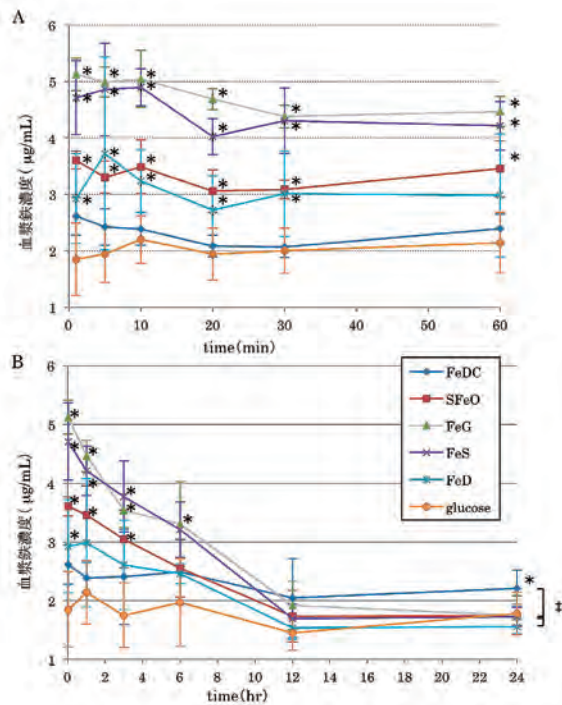


図3. 静注用鉄剤投与後の血漿鉄の推移

血漿鉄は、Nitroso-PSAP直接法により血漿中鉄イオンを定量して求めた。静注用鉄剤投与後、1分から60分の初期変化をAに、また1分後から1、3、6、12、24時間の推移をBに示す。

* : 5%ブドウ糖対照群に対する有意差, $p < 0.05$

† : FeDCの他製剤に対する有意差, $p < 0.05$

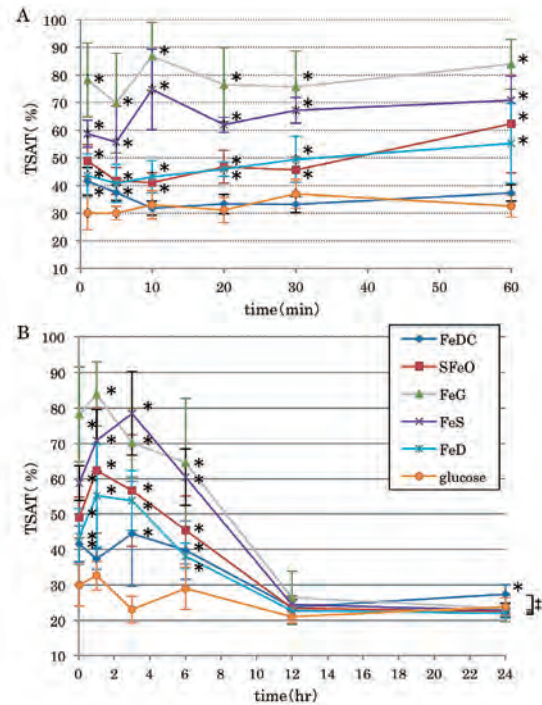


図4. 静注用鉄剤投与後のトランスフェリン飽和度 (TSAT) の推移

TSATは、静注用鉄剤投与後のラット血漿は、血漿蛋白質からTfnを分離するために血漿20µlを0.6%リパノール60µlと混合し、遠心した後上清15mlをUrea-PAGE法にかけて求めた。静注用鉄剤投与後、1分から60分のTSAT初期変化をAに、また1分後から1、3、6、12、24時間の推移をBに示す。

* : 5%ブドウ糖対照群に対する有意差, $p < 0.05$

† : FeDCの他製剤に対する有意差, $p < 0.05$

静注用鉄剤に含まれる遊離鉄が生体に与える影響

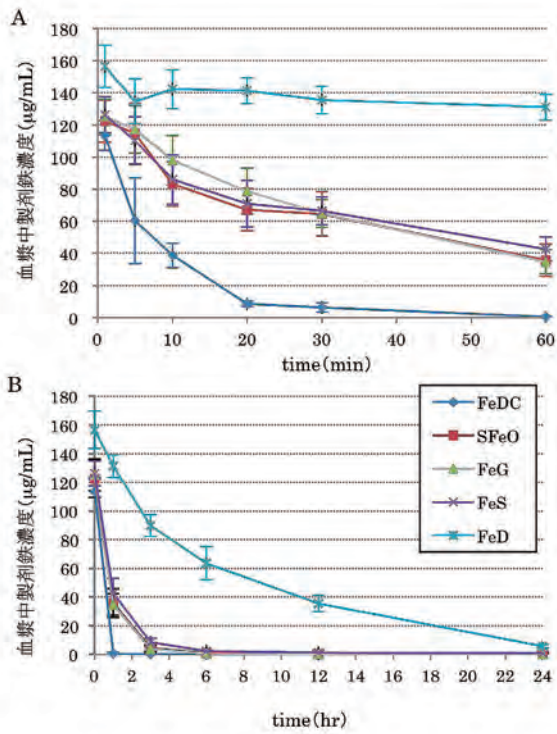


図5. 静注用鉄剤投与後の製剤鉄濃度の推移
 血漿中製剤鉄は、血漿に0.04 mol/l HNO₃及び1 mol/l HClを添加し、5分間沸騰水中での加熱による酸加水分解後の全鉄値から、血漿鉄値を差し引いて求めた。静注用鉄剤投与後、1分から60分の初期変化をAに、また1分後から1, 3, 6, 12, 24時間の推移をBに示す。

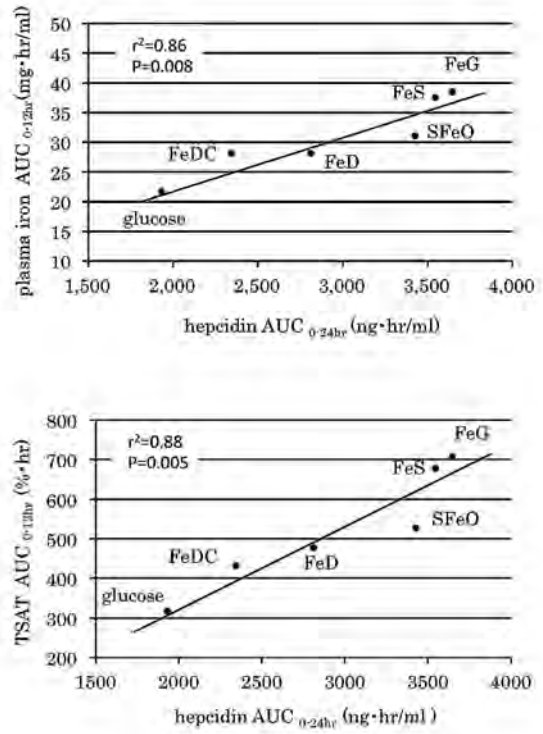


図7. hepcidinと血漿鉄およびTSATのAUCの相関
 血漿 hepcidin 発現の刺激因子を検討するために、静注用鉄剤投与後の hepcidin 濃度の AUC_{0-24hr} と、血漿鉄及び Tfn 飽和度の AUC_{0-12hr} との相関を検討した。血漿 hepcidin 発現量の異なる各静注用鉄剤間の、 hepcidin と血漿鉄および TSAT の AUC には強い相関がみられ、それぞれ $r^2 = 0.86$ ($p = 0.008$), $r^2 = 0.88$ ($p = 0.005$) であった。

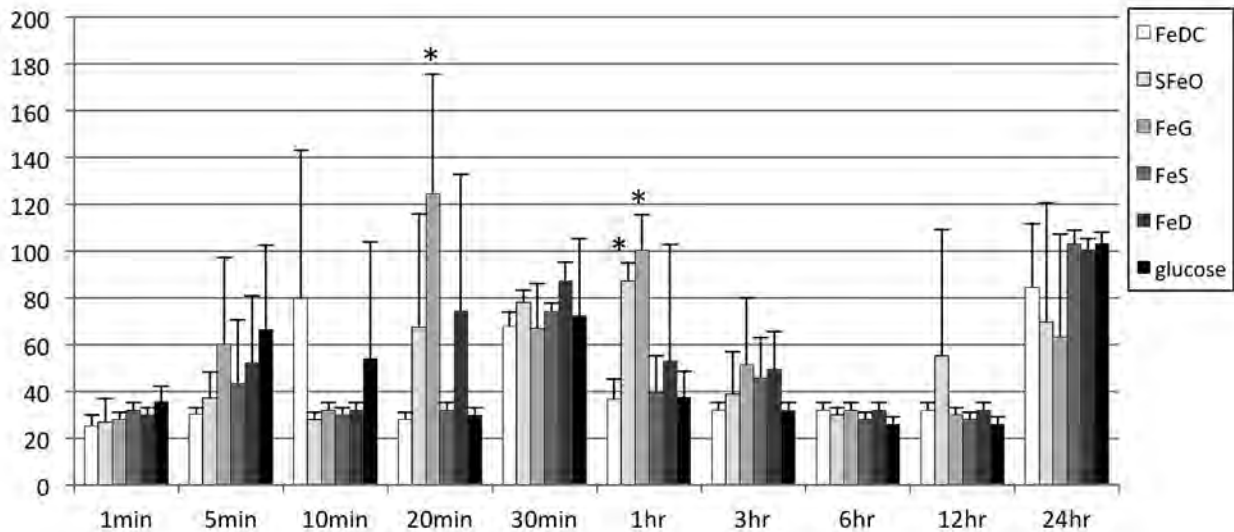


図6. 静注用鉄剤投与後のIL-6の反応
 血漿中のIL-6レベルは、Rat IL-6抗体を用いたELISAで定量した。測定域は62.5~4,000 pg/ml、および検出感度は36 pg/mlであった。正常ラットは112.3 ± 9.5 pg/mlであった。静注用鉄剤投与後1分から24時間までの血漿中IL-6濃度を示した。

2. 血漿鉄

正常ラット無処置の血漿鉄は、 $1.71 \pm 0.42 \mu\text{g/ml}$ であった。投与直後1分採血から、血漿鉄はFeG $5.12 \pm 0.29 \mu\text{g/ml}$ と高く、次いでFeS $4.71 \pm 0.66 \mu\text{g/ml}$, SFeO $3.61 \pm 0.16 \mu\text{g/ml}$, FeD $2.93 \pm 0.79 \mu\text{g/ml}$, FeDC $2.61 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$ であった。FeDCの上昇幅は最も小さかったが、いずれも5%ブドウ糖の1.8~2.2 $\mu\text{g/ml}$ の変動幅に比べて有意に高い値であった(図3)。いずれの静注用鉄剤においても、上昇した血漿鉄の半減期はほぼ6時間であり、12時間後には正常レベルに戻った。FeDCの変動幅は小さく、24時間後には $2.21 \pm 0.31 \mu\text{g/ml}$ (glucose 1.78 ± 0.36 , FeG 1.75 ± 0.33 , FeS 1.72 ± 0.16 , SFeO 1.74 ± 0.19 , FeD $1.56 \pm 0.12 \mu\text{g/ml}$)と5%ブドウ糖及び他製剤に対して有意に高値を示した。

3. トランスフェリン飽和度 (TSAT)

正常ラット無処置のTSATは、 $25.1 \pm 2.3\%$ であった(図4)。投与直後からTSATは、FeG $78.3 \pm 13.4\%$ と高く、次いでFeS $58.7 \pm 4.9\%$, SFeO $49.0 \pm 5.7\%$, FeD $43.6 \pm 7.9\%$, FeDC $41.6 \pm 5.1\%$ の順で、いずれも5%ブドウ糖 $30.1 \pm 6.1\%$ に比べて有意に高い値であった。各静注用鉄剤ともにTSATのピークは1-3時間であり、投与6時間後までは40%を超える高い飽和度で推移し、12時間後には正常レベルに戻った。24時間後にはFeDCのみ $27.4 \pm 2.6\%$ (glucose 23.8 ± 3.0 , FeG 23.3 ± 3.7 , FeS 22.8 ± 2.0 , SFeO 22.5 ± 1.1 , FeD $22.0 \pm 1.4\%$)と、5%ブドウ糖および他製剤に対して有意に高値を示した。

4. 血中製剤鉄

血中製剤鉄濃度の1分から24時間までの経時変化を図5に示した。FeSとSFeO(II型製剤)、およびFeG(III型製剤)は同様の時間的推移を示したが、I型(FeDおよびFeDC)の2剤では、FeDで消失速度が著しく遅いのに対し、FeDCはII, III型製剤に比べても早い消失を示し、全く異なる動態を示した。1分から6時間までの値を基にして算出した半減期は、FeDC 5.3分、SFeO 29.7分、FeG 30.5分、FeS 34.2分、FeD 295分であった。

5. 血漿IL-6濃度

静注用鉄剤後1分から24時間までの血漿中IL-6濃度の経時変化を図6に示した。正常ラット(無処置)は $112.3 \pm 9.5 \text{ pg/ml}$ であり、5%ブドウ糖投与群の24時間の最高IL-6濃度は 142.8 pg/ml であった。いずれの静注用鉄剤投与群においても、20分から1時間で上昇傾向にあり、FeG 20分では $124.6 \pm 51.0 \text{ pg/ml}$ と5%ブドウ糖投与群に対して有意な上昇を認めた。しかし、正常ラットに対して有意な上昇を示すことはなく、正常範囲での変動と考えられた。

6. 血漿hepcidin濃度への影響

血漿hepcidin濃度への影響を検討するために、静注用鉄剤投与後24時間までのhepcidin濃度の総和を曲線下面積値(AUC)で求め、血漿鉄とTfn飽和度の投与後12時間までのAUCとの相関を検討した。血漿hepcidin濃度曲線のAUCは、非多糖類鉄剤であるII型とIII型製剤(SFeO, FeS及びFeG)でより高く、発現量が多かった(表2)。一方血漿鉄やTSATは、12時間後には前値に戻っていたため、静注用鉄剤投与後12時間までのAUCを求めたところ、非多糖類鉄剤で高値を呈していた。血漿hepcidin濃度の異なる各静注用鉄剤間の、hepcidinと血漿鉄およびTSATのAUCには強い相関がみられ、それぞれ $r^2 = 0.86$ ($p = 0.008$), $r^2 = 0.88$ ($p = 0.005$)であった(図7)。

考 察

鉄欠乏性貧血に対しては、鉄を静注投与することは、不足の鉄を補充する手段として臨床の場では推奨されており(11)、ヘモグロビン値から計算した不足鉄量を、静注で投与することが目安になっている。投与された鉄は、肝臓、脾臓に集積し、徐々に骨髄に移行し(12)、有効に造血に利用されていることが分かっている。しかし、鉄欠乏性貧血治療のエンドポイントをヘモグロビンの改善に求めると、確かに静注用鉄剤は有効であるが、実際に静注用鉄剤を投与した後に、鉄代謝系にどのような影響を及ぼしているのか、その詳細はまだまだ明らかにはなっていない。

表2. 各静注用鉄剤の曲線下面積値(AUC)

	hepcidin	血漿鉄	TSAT	製剤鉄
	0-24hr AUC ng·hr/ml	0-12hr AUC $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$	0-12hr AUC %·hr	0-12hr AUC $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$
FeD	2811	28.1	477.5	886.3
FeDC	2343	28.1	433.1	21.3
FeS	3544	37.5	678.8	148.3
SFeO	3426	31.1	527.9	118.4
FeG	3644	38.5	707.1	120.6
glucose	1930	21.7	317.1	n.d.

静注用鉄剤に含まれる遊離鉄が生体に与える影響

本研究では、近年見出された鉄代謝制御因子であるホルモン hepcidin を指標として、世界で使用されている様々な種類の静注用鉄剤による影響を調べた結果、I型多糖類製剤である FeDC 以外の製剤では、 hepcidin 発現が著明に亢進することが判明した。現在、日本で利用できる唯一の静注用鉄剤 SFeO の反応性は大きく、以前使用されていた FeDC (現在は発売中止) は hepcidin 発現には影響が少なかった。なぜ鉄剤の種類により hepcidin 発現に差異がみられたのであろうか。

今回の実験では、各種静注用鉄剤を投与してから、24時間のラット血中 hepcidin の総和量である AUC 値と、投与後12時間の血漿鉄や TSAT の総和である AUC 値の間に高い相関を認めており、 hepcidin 発現の亢進が血漿鉄の上昇により誘発されていることを示唆する結果であった。血漿鉄の上昇は、製剤中に直接 Tfn と結合しうる遊離鉄の量が多いことを意味しており、この *in vivo* における製剤間の差は *in vitro* でみられた遊離鉄の結果 (図1) と一致していた。血漿鉄 (Tfn 鉄) の上昇は、その受

容体である TfR1 と結合し細胞内に取り込まれ、鉄の供給源になっており、また、一方では血漿鉄濃度を感知するセンサーである TfR2 を介して TfR2-hepcidin-Fpn 系を活性化し、血漿鉄濃度を一定に保つためのフィードバック機構を作動させている (図8) (6, 13, 16)。おそらく、製剤に含まれる遊離鉄の多くは、注射後1分以内に急速に Tfn と結合し Tfn 鉄となり、6時間の半減期の中で、TfR2 で感知され hepcidin 産生につながったものと思われる。

一方、コロイド鉄として網内系に取り込まれた鉄が、血中に放出され血漿鉄濃度を上昇させる可能性は、製剤鉄の血中半減期の短い FeDC で TSAT の上昇がみられないこと、さらに、各製剤の血漿鉄の減衰曲線が12時間までほぼ直線であり再上昇がないことから、否定的であった。また、細胞内に取り込まれた鉄の影響については、取り込まれて24時間以内では hepcidin mRNA 発現に影響しないとの報告がある (14)。Ramos らは (15)、正常マウスに鉄欠乏食を与えて貧血にした後に、正常食に戻す

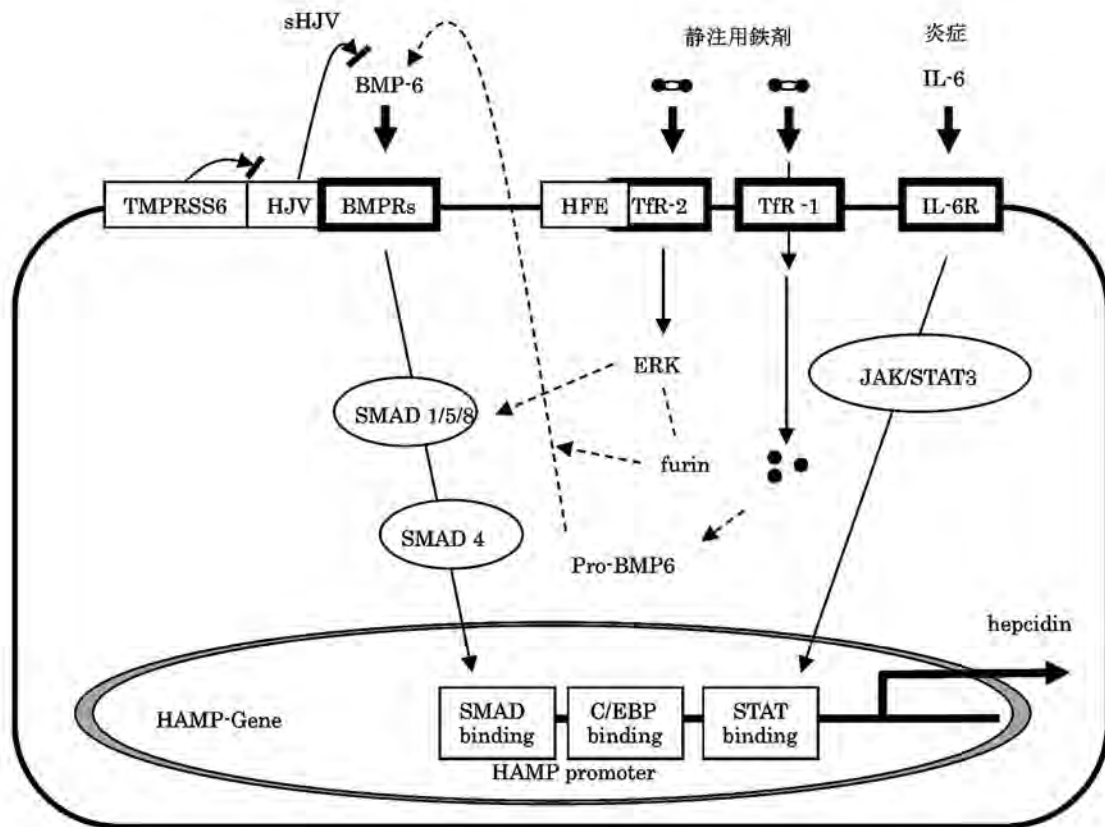


図8. hepcidin の制御機構 (6,13,16より改編)

Tfn と結合した血清鉄は、TfR1 を介して細胞内に取り込まれるが、同じファミリーの TfR2 は細胞膜上で HFE と複合体を形成して、Tfn 鉄のセンサーとして反応している。Tfn 鉄が TfR2 と結合すると、ERK をリン酸化して細胞内にシグナルを入れる。ERK は furin 発現を増加させ、pro-BMP6 を活性化し細胞外に分泌させる。BMP6 は受容体 BMPR と HJV の複合体にと結合し、SMAD 1/5/8 をリン酸化し、SMAD 4 と複合体を形成して核内に入り、hepcidin 遺伝子 HAMP の promoter に結合し、hepcidin 発現を促す。HJV は TMPRSS6 で分解され、その発現量が制御されている。炎症時に産生されるインターロイキン 6 (IL-6) 刺激によっても hepcidin 産生は刺激される。IL-6 による hepcidin 発現はシグナル伝達系 STAT に依存している。

と直ちにTfR2を介してhepcidinが上昇し、さらに正常食を与え続けると貯蔵鉄が慢性的に増えBMP6/HJVを介してhepcidinが上昇することを観察している。従って、今回の鉄剤の単回投与によるhepcidinの上昇はTfR2を介した急性期の上昇であり、貯蔵鉄や網内系に取り込まれた鉄によるものではないと考えられた。

Hepcidin産生制御因子としては、血清鉄とTfR2の結合以外にIL-6によるIL-6R刺激がある(16)。静注用鉄剤による炎症惹起については、ヒトでは100 mgのFeSの注射によりmonocyte chemoattractant protein-1の発現が上昇することは知られており(17)、またラットでは70 mg/kgの大量のSFeO注射の前処理により、IL-6発現は増強しないが、LPS投与によるIL-6誘導を増強する補助作用があることが報告されている(18)。今回我々は、欧米でのCKD患者に対して用いられている静注用鉄剤の最高量が500-1000mg(日本では50-100mg)であることから、ラットへの投与量を5 mg/kgに設定したが、IL-6の上昇は見られなかった。培養ラット肝臓細胞のhepcidin mRNA発現は、1 ng/ml以上のIL-6による刺激が必要であると報告されている(19)。今回の結果からは、5 mg/kgの単回投与にていずれの鉄剤でもIL-6レベルは< 200 pg/mlで5%ブドウ糖投与と同じレベルであり、観察されたhepcidin産生はIL-6を介した誘導ではないものと考えられた。

今回、I, II, III型に属する静注用鉄剤を検討したが、I型の2種の反応は大きく異なっていた。血中半減期はFeD製剤が最長であり、FeDCが最短であった。また、FeDでは血清鉄の上昇はII, III型に比べ少なかったが、II, III型が12時間後にhepcidinレベルのピークを示したのと異なり、6時間後に最も高値であった。このような反応性の違いは、予想に反する結果であった。静注用鉄剤はミセルを形成しており、その平均粒子径は小さい順にFeG 7~17 nm, FeS 13~31 nm, FeD 25~45 nm, FeDC 50~80 nm (SFedは不明)であり、非多糖類鉄剤(II, III型)に比べて多糖類鉄剤(I型)は大きい(20)。平均粒子径が大きいほど単位鉄分子当たりの表面積は小さくなりTfnと反応する割合も小さく、また強固に鉄分子を保持するため遊離鉄が少ないものと推測される(21)。一方、USPIO (ultra small superparamagnetic particles of iron oxide, リンパ節特異性造影剤)として知られる低分子デキストランで被覆された酸化鉄コロイド粒子は粒子径が20~30 nmで、FeDの粒子径に相当するが、静脈内投与による血中半減期は3~4時間で血管壁から間質に漏出することでリンパ節に運搬されると理解されている(22)。FeDCの粒子径に相当するSPIO (粒子径60~150 nm)は、血中半減期が6分と極めて短くすぐさま肝臓、脾臓に取り込まれるためリンパ節に移行しないことが知られている(23)。FeDとFeDCの血中半減期はそれぞれ205分、5.3分であり、FeDの血管からの取り込まれ方の違いがhepcidin上昇に関連するのかもしれない。実際、GdCl₃処理によりクッパー細胞を除いたマウスにデキストラン鉄を静注するとhepcidin mRNAの発現が誘導されるという報告

(24)や、血管内皮細胞と肝臓細胞を共培養すると肝細胞のhepcidin mRNAやTfn mRNAの発現レベルを2倍以上亢進したとの報告があり(25)、リンパ節や血管内皮のhepcidin発現に与える影響も今後の検討課題である。

一過性に上昇した血漿hepcidinは、細胞膜表面のFpnと結合し、endocytosisで細胞内に取り込まれ、lysosomeで分解されてしまう(26)。今回のラット実験では、肝細胞のFpn分布密度は測定していないが、Nemethら(27)は、培養肝細胞にhepcidinを添加すると、6時間後には肝細胞膜表面のFpnが消失することを報告している。さらに、マウスに外因性に50 μgのヒトhepcidinを単回投与すると1時間後に血漿鉄濃度が低下し、正常レベルに戻るには48時間以上を要することも報告されている(28)。これは、一過性にしる血漿中のhepcidinが増加してFpnが消失すると、Fpnが再度合成されて回復するのに2-3日を要するための現象であると理解されており、この間は鉄の供給が著しく抑制されることを意味している。hepcidinが上昇した静注用鉄剤4種では、投与24時間後の血漿鉄やTSATがFeDCに比べ有意に低下しており、血中への鉄の供給が抑制されていたことが推測される。hepcidinの増加は、鉄の回転利用が抑制され、貯蔵鉄が有効に供給されないことを意味している。

遊離鉄と結合したTfn鉄は、TfR2-hepcidin系の刺激になるばかりでなく、TfR1を介して細胞内に取り込まれる。TfR1と結合したTfn鉄は、酸性のlysosome内でTfnから解離し、Steap3で還元されFe²⁺となり、DMT1を介して細胞質内に放出され、不安定な鉄プール(labile iron pool, LIP)に移行する(29)。また、製剤中のコロイド鉄はマクロファージに貪食され、同じく細胞内のLIPに移行する。さらに、Tfnに結合できない過剰の遊離鉄はnon-transferrin binding iron (NTBI)と呼ばれ、血中ではクエン酸やアルブミンと結合しているが、細胞膜上のFe³⁺還元酵素であるDuodenal cytochrome b (Dcytb)によりFe²⁺に還元され(30)、肝細胞ではDMT1やZIP14を介して(31)、心筋細胞ではL-type voltage dependent calcium channel(32)を介して細胞内に取り込まれ、直接LIPに移行することが知られている。さらに、前述のhepcidin産生の亢進状態では、Fpnを介した鉄の供給が抑制されるため、鉄の回転利用が低下し、細胞内のLIPが増大する。

いずれの経路にしる、静注用鉄剤により増大したLIPが、同じ細胞内に存在するミトコンドリアの内膜電子伝達系で発生するスーパーオキシド(O₂⁻)やH₂O₂と反応すると、容易に障害性の強いヒドロキシラジカル(・OH)が生じ遺伝子、脂質、蛋白質が障害されると考えられている(33)。LIPはFe²⁺が主体であるが、特異的にFe²⁺を検出することが技術的に難しく、今回LIPや・OHは検討できなかった。培養実験ではあるが、製剤の添加により、細胞内のLIPが容易に急上昇することが確認されており(34)、細胞内での・OH発生の原因となる静注用鉄剤投与は今後注意すべき課題になるものと思われる。また、本研究では、TSATのピークが1-3時間であったことから、静注用

静注用鉄剤に含まれる遊離鉄が生体に与える影響

鉄剤由来の遊離鉄と Tfn との結合様式は、初期反応は大きいですが、その後徐々に上昇する S 字状カーブを描くことが判明した。その間、血中には NTBI が持続的に存在しているものと推測される。NTBI は活性酸素発生の一因であり (35)、現時点では、血中の NTBI を正確に測定する技術はないが、その開発が期待される。

静注用鉄剤の投与は、確かにヘモグロビンの改善には有効である。しかし、静注用鉄剤に含まれるコロイド鉄や遊離鉄に対して、生体がどのように反応しているかは不明な点が多い。本研究では、経静脈的に生体内に鉄を投与することが、非生理的であり、hepcidin 発現を促進させ、結果的に鉄代謝制御系を乱す可能性があることを示した。しかし、LIP の増大が臨床的どの程度活性酸素を発生させるのか、どの程度の傷害性を短期・長期に有するのか、現時点では評価指標が十分ではなく本研究では明らかにできず、直接的証明はこれからの解決すべき問題として残った。

利益相反の開示

日本臓器製薬株式会社は、現在静注用鉄剤の製造販売は行っていない。著者の友杉直久は株式会社エムシープロット・バイオテクノロジーの代表取締役社長である。その他の著者の利益相反はない。

文 献

- Andrews NC: Molecular control of iron metabolism. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; **18**: 159-69.
- Fleming RE: Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; **21**: 201-6.
- Tomosugi N, Kawabata H, Wakatabe R et al: Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. *Blood* 2006; **108**: 1381-7.
- Park CH, Valore EV, Waring AJ et al: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; **276**: 7806-10.
- Robb A, Wessling-Resnick M: Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood* 2004; **104**: 4294-9.
- Kautz L, Meynard D, Monnier A et al: Iron regulates phosphorylation of Smad1/5/8 and gene expression of Bmp6, Smad7, Id1, and Atoh8 in the mouse liver. *Blood* 2008; **112**: 1503-9.
- Silverstein SB, Rodgers GM: Parenteral iron therapy options. *Am J Hematol* 2004; **76**: 74-8.
- Muñoz M, Gómez-Ramírez S, García-Erce JA: Intravenous iron in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 4666-74.
- Evans RW, Williams J: The electrophoresis of transferrins in urea/polyacrylamide gels. *Biochem J* 1980; **189**: 541-6.
- Murao N, Ishigai M, Yasuno H et al: Simple and sensitive quantification of bioactive peptides in biological matrices using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry coupled with trichloroacetic acid clean-up. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007; **21**: 4033-8.
- Auerbach M, Ballard H: Clinical use of intravenous iron: administration, efficacy, and safety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; **2010**: 338-47.
- Beshara S, Lundqvist H, Sundin J et al: Pharmacokinetics and red cell utilization of iron(III) hydroxide-sucrose complex in anaemic patients: a study using positron emission tomography. *Br J Haematol* 1999; **104**: 296-302.
- Poli M, Lusciati S, Gandini V et al: Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica* 2010; **95**: 1832-40.
- Lin L, Valore EV, Nemeth E et al: Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. *Blood* 2007; **110**: 2182-9.
- Ramos E, Kautz L, Rodriguez R et al: Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. *Hepatology* 2011; **53**: 1333-41.
- Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R et al: STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* 2007; **109**: 353-8.
- Agarwal R: Proinflammatory effects of iron sucrose in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2006; **69**: 1259-63.
- Hida AI, Kawabata T, Minamiyama Y et al: Saccharated colloidal iron enhances lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in vivo. *Free Radic Biol Med* 2003; **34**: 1426-34.
- Sheikh N, Batusic DS, Dudas J et al: Hepcidin and hemojuvelin gene expression in rat liver damage: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **291**: G482-90.
- Danielson BG: Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15** Suppl 2: S93-8.
- Kudasheva DS, Lai J, Ulman A et al: Structure of carbohydrate-bound polynuclear iron oxyhydroxide nanoparticles in parenteral formulations. *J Inorg Biochem* 2004; **98**: 1757-69.
- Tsuchiya K, Nitta N, Sonoda A et al: Histological study of the biodynamics of iron oxide nanoparticles with different diameters. *Int J Nanomedicine* 2011; **6**: 1587-94.
- Réty F, Clément O, Siauve N et al: MR lymphography using iron oxide nanoparticles in rats: pharmacokinetics in the lymphatic system after intravenous injection. *J Magn Reson Imaging* 2000; **12**: 734-9.
- Montosi G, Corradini E, Garuti C et al: Kupffer cells and macrophages are not required for hepatic hepcidin activation during iron overload. *Hepatology* 2005; **41**: 545-52.
- Takayama G, Taniguchi A, Okano T: Identification of differentially expressed genes in hepatocyte/endothelial cell co-culture system. *Tissue Eng* 2007; **13**: 159-66.
- De Domenico I, Ward DM, Langelier C et al: The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 2569-78.
- Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al: Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; **306**: 2090-3.
- Rivera S, Nemeth E, Gabayan V et al: Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferrremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 2005; **106**: 2196-9.
- Graham RM, Chua AC, Herbison CE et al: Liver iron transport. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 4725-36.
- Sohn YS, Ghoti H, Breuer W et al: The role of endocytic pathways in cellular uptake of plasma non-transferrin iron. *Haematologica* 2012; **97**: 670-8.
- Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H et al: Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 13612-7.
- Oudit GY, Sun H, Trivieri MG et al: L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med* 2003; **9**: 1187-94.
- Kruszewski M: Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* 2003; **531**: 81-92.
- Sturm B, Goldenberg H, Scheiber-Mojdehkar B: Transient increase of the labile iron pool in HepG2 cells by intravenous iron preparations. *Eur J Biochem* 2003; **270**: 3731-8.
- Pai AB, Conner T, McQuade CR et al: Non-transferrin bound iron, cytokine activation and intracellular reactive oxygen species generation in hemodialysis patients receiving intravenous iron dextran or iron sucrose. *Biomaterials* 2011; **24**: 603-13.

Biological Actions of Free Iron in Intravenous Iron Preparations

Hisae Shibata¹⁾, Takako Konishi²⁾, Yoji Shibayama²⁾, Naohisa Tomosugi¹⁾

¹⁾ *Department of Advanced Medicine, Kanazawa Medical University Graduate School of Medical Science, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan*

²⁾ *Nippon Zoki Pharmaceutical Co., Ltd.*

Background: Intravenous iron preparations, used for the treatment of renal anemia and other diseases, represent a possible source of free iron into the circulation. In this study we examined the effect of different sources of intravenous iron preparation on hepcidin expression, which is a major regulator of iron metabolism.

Methods: After 5mg of iron injection into SD rats, hepcidin, plasma iron, TSAT, plasma drug iron and IL-6 were measured. The amounts of free iron in intravenous iron preparations were measured by Urea-PAGE.

Result: Much more free iron was detected in Type II (iron sucrose, Fesin) and III (ferric gluconate) preparations compared with Type I preparations (Iron Dextran, Iron Dextrin) by Urea-PAGE. The amounts of free iron included in preparations were correlated with the expression of plasma

hepcidin in vivo. We showed that steady state hepcidin levels (100 ± 22 ng/ml) in plasma were increased transiently at 12 hours, up to 250 ng/ml, as an adaptive response to rapid free iron exposure. After injection, TSAT was gradually increased up to 1 or 3 hours and levels over 40 % were maintained for six hours. IL-6 concentrations were below 200 ng/ml.

Conclusion: Such findings in the regulation of iron metabolism may have important implications regarding the generation of the adverse effects of intravenous iron preparations reported in dialysis and /or predialysis patients with renal anemia. Attention should be focused on the fact that after iron injection, increased hepcidin expression inhibits the iron circuit and free iron may prepare the steady state of non transferrin binding protein which is implicated in oxidative stress and cell injury.

Key Words: Intravenous iron preparations, hepcidin, transferrin receptor 2, labile iron pool