

高リン血症治療薬クエン酸第二鉄の新規生理学的機序の解明

2020 年

飯田 聡夫

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

生命・食料科学専攻

略 語

Al (Aluminum : アルミニウム)

CKD (Chronic Kidney Disease : 慢性腎臓病)

DMT1 (Divalent metal transporter 1 : 二価金属イオントランスポーター1)

Dcytb (Duodenal cytochrome b : 十二指腸シトクローム b)

ESA (Erythropoiesis stimulating agents : 血球造血刺激因子製剤)

FDA (Food and Drug Administration : (米国) 食品医薬品局)

FGF23 (Fibroblast growth factor23 : 線維芽細胞成長因子 23)

HD (Hemodialysis : 血液透析)

IDA (Iron deficiency anemia : 鉄欠乏性貧血)

IRPs (Intracellular iron regulatory proteins : 細胞内鉄調節タンパク質)

La (Lanthanum : ランタン)

MDA (Malondialdehyde : マロンジアルデヒド)

ND (Non-dialysis : 非透析)

PTH (Parathyroid hormone : 副甲状腺ホルモン)

RBC (Red blood cell : 赤血球)

TBARS (2-Thiobarbituric acid reactive substances : 2-チオバルビツール酸反応性物質)

TIBC (Total Iron Binding Capacity : 総鉄結合能)

TSAT (Trasnferrin saturation : トランスフェリン飽和度)

UIBC (Unsaturated iron binding capacity : 不飽和鉄結合能)

目 次

第1章 緒 論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

第2章 クエン酸第二鉄の鉄代謝及びリン代謝に与える影響（無処置ラット試験）・・・・・・・・
12

 第1節 緒 言

 第2節 材料および方法

 第3節 結 果

 第4節 考 察

 第5節 要 約

第3章 クエン酸第二鉄の鉄代謝及びリン代謝に与える影響（鉄欠乏性貧血ラット試
験）・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26

 第1節 緒 言

 第2節 材料および方法

 第3節 結 果

 第4節 考 察

 第5節 要 約

第4章 クエン酸第二鉄の酸化ストレスマーカーに対する影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・37

 第1節 緒 言

 第2節 材料および方法

 第3節 結 果

 第4節 考 察

 第5節 要 約

第5章 総 括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・51

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・52

SUMMARY · · · · · 56

第1章 緒論

クエン酸第二鉄は、本邦では1957年から食品添加物として用いられ、米国においてもFDAにより、「一般に安全と認められる物質」(Substances Generally Recognized as Safe、GRAS物質)と認定されている

(<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=184.1298>)。また、鉄自体は生体内に多く存在し、ヘモグロビンの構成成分などとして生理的に働く金属元素であり、古くからリン酸と結合することが知られている。一方、金属含有リン吸着剤の吸着能の観点から、各種金属のリン酸塩の溶解度積から算出される飽和液中のリン酸イオン濃度の低さは、その金属のリン酸との沈殿形成能に反映されると考えられる。リン酸第二鉄の飽和液中のリン酸イオン濃度は、生理的に体内に存在する金属の中でも特に低値を示し、同じ鉄塩であるリン酸第一鉄(2価鉄)よりも低く、リン酸ランタンやリン酸アルミニウムと同等である。したがって、第二鉄のリン酸との沈殿形成能が既存のリン吸着剤の構成成分であるLaやAlと同等に高いことが示唆される(表1)。すなわち、第二鉄(3価鉄)はリン吸着剤の成分として含まれることにより、食事由来のリン酸と消化管内で結合して難溶性の沈殿物を形成し、リンの体内吸収を抑えることが想定される。本邦においては、食品添加物のクエン酸第二鉄とは異なる製造法を用いることにより、比表面積が大きく溶解速度が速い特性を有するクエン酸第二鉄水和物(リオナ[®]錠250mg)が開発された。このクエン酸第二鉄水和物について、無処置ラットや腎不全モデルラットを用いた非臨床試験において、リン吸収抑制作用と血清リン濃度低下作用が示されている(図1、Iida et al., 2013)。また、各種臨床試験においてその有効性が示され(図2、Ganz et al., 2019; Yokoyama et al., 2012; Fishbane et al., 2017; Block et al., 2019; Yokoyama, Akiba et al., 2014)、保存期のCKD患者も含めた「慢性腎臓病患者における高リン血症」の効能・効果で承認され、リン吸着薬として医療現場で用いられている。

クエン酸第二鉄がその吸収を抑制する対象であるリンは、骨や歯の発達には必須の成分であり、カルシウムと共にヒドロキシアパタイトとして、その構成成分となっている。また、細胞中のリン酸化を必要とするエネルギー代謝にも必須な成分であることから、生体にとって必要不可欠な成分であり、その85%が骨組織、14%が軟組織、1%が細胞内、細胞外液及び細胞膜に存在している。生体内では血清リン濃度は比較的一定に維持されており、その調節因子は主に食事性リン、副甲状腺ホルモン(PTH)、ビタミンD、fibroblast growth factor 23(FGF23)が挙げられ、主要な臓器として、腎臓、副甲状腺、骨、腸管などが関与している(Kraft, 2015)。中でも重要な恒常性維持の機構として、過剰なリンを摂取した場

合、速やかに腎尿細管からのリン排泄を促進させることで顕著な変動なく血清リン濃度を維持する機能が生体内に備わっている (Segawa et al., 2007)。

このリンの恒常性維持に腎臓は中心的な役割を担っており、腎臓の機能が低下している CKD 患者においては余剰のリンを生体外に排泄する能力が低下していることを意味する。このリンの体内貯留は、CKD における有害な合併症であり、異所性石灰化や、心血管イベント及び死亡といった重大なリスクに繋がる。また、高リン血症とビタミン D 濃度低下によって誘発される二次性副甲状腺機能亢進症は、副甲状腺過形成と PTH の過剰な合成及び分泌を伴い、骨代謝異常を引き起こす (Block et al., 2013; Vervloet et al., 2017; Kestenbaum et al., 2005; Bellasi et al., 2011; Zoccali et al., 2011; Isakova, 2013; Vervloet and van Ballegooijen, 2018)。したがって、高リン血症とそれに続く重篤な合併症の進行を予防するために、高リン血症を有する CKD 患者は食事療法に加えてリン吸着薬を服薬する必要があり、リン吸着剤の選択肢の一つとして、クエン酸第二鉄が用いられている。

一方で、CKD において、貧血はその主要な合併症の一つに挙げられる。貧血自体は世界の 3 分の 1 の人が罹患していると言われ、その貧血の原因のおよそ半数は鉄欠乏によるものとされることから、妊婦や小児の生存率にも影響する深刻な健康問題である (DeLoughery, 2017)。鉄欠乏には、生体内の鉄の貯蔵量が絶対的に減少・枯渇している絶対的鉄欠乏状態と、機能的に鉄の利用と供給が抑制されている機能的鉄欠乏状態があるとされている

(Lopez et al., 2016)。CKD 患者においても多くの患者が鉄欠乏性貧血 (IDA) を合併しており、その治療として Erythropoiesis stimulating agents (ESA 製剤)、静注や経口の鉄剤が投与されている。鉄剤投与の観点からクエン酸第二鉄の作用を見たところ、先の CKD 患者での臨床試験において、クエン酸第二鉄水和物は高リン血症を改善するだけでなく、ヘモグロビン値、トランスフェリン飽和度 (TSAT, transferrin saturation)、及び血清フェリチン値の上昇を示した (図 3、Yokoyama, Akiba et al., 2014)。すなわち、クエン酸第二鉄は高リン血症に対する血清リン濃度低下作用だけでなく、貧血改善作用も併せ持つ可能性が考えられる。ただし、この血清リン濃度低下作用と貧血改善作用は CKD 患者においては望ましいものである一方、正常な腎機能を持ち、生体内リン量が貯留していない IDA 患者においては、貧血改善作用のみが望ましい作用である。クエン酸第二鉄が IDA 患者においてリン代謝と鉄代謝に対してどのような作用を示すのかは明らかとなっていない。また一方で、鉄剤投与においては、過剰な鉄がトランスフェリン等に結合しない不安定鉄として生体内に存在することにより、酸化ストレスを誘導し、臓器障害を引き起こすと考えられており

(Vaziri, 2013)、CKD 患者においても静注鉄剤投与による酸化ストレスマーカーの上昇が報告されている (Agarwal et al., 2004)。クエン酸第二鉄が酸化ストレスに対してどのよ

うな作用を有するのかは不明である。

本博士論文では、まず第2章において、無処置ラット用いて、クエン酸第二鉄の鉄代謝に対する作用とリン代謝に対する作用を同時に検討し、用量ごとのリン代謝と鉄代謝に対する影響を検討した。続いて第3章において、第2章の検討結果を参考にした用量を用いて、鉄欠乏性貧血ラットを用いて同様の検討を行い、クエン酸第二鉄がリン代謝に影響することなく、貧血改善作用を有する可能性を示した。また、第4章において、無処置ラットを用いて、クエン酸第二鉄の酸化ストレスに対する影響を静注鉄剤と同時に評価することにより検討し、クエン酸第二鉄水和物服薬時には鉄は生理的な吸収制御過程を経ることで、酸化ストレスの上昇を引き起こさない可能性が示唆された。これらの結果から、クエン酸第二鉄は正常な腎機能を有する鉄欠乏性貧血ラットにおいて、リン代謝に影響することなく貧血改善作用を示し、酸化ストレスの上昇懸念も少ないことが示唆された。

表 1. 金属リン酸塩の飽和水溶液中での理論リン酸イオン濃度

価数	金属	リン酸塩	飽和溶液中のリン酸イオン濃度 (mol/L PO ₄)	溶解度積 ¹⁾ K _{sp}	溶解度 ^{1), 2)} (wt%)
3価	クロム(緑)	CrPO ₄ (green)	4.90X10 ⁻¹²	2.40X10 ⁻²³	
	ランタン	LaPO ₄	6.08X10 ⁻¹²	3.70X10 ⁻²³	
	鉄(Ⅲ)	FePO ₄	1.14X10 ⁻¹¹	1.30X10 ⁻²²	
	アルミニウム	AlPO ₄	1.14X10 ⁻¹⁰	1.30X10 ⁻²⁰	
2価	鉛	Pb ₃ (PO ₄) ₂	2.99X10 ⁻⁹	8.00X10 ⁻⁴³	
	銅	Cu ₃ (PO ₄) ₂	3.29X10 ⁻⁸	1.30X10 ⁻³⁷	
	鉄(Ⅱ)	Fe ₃ (PO ₄) ₂	4.95X10 ⁻⁸	1.00X10 ^{-36 3)}	
	カルシウム	Ca ₃ (PO ₄) ₂	2.28X10 ⁻⁷	2.07X10 ^{-33 4)}	
	カドミウム	Cd ₃ (PO ₄) ₂	2.37X10 ⁻⁷	2.50X10 ⁻³³	
	ニッケル	Ni ₃ (PO ₄) ₂	6.83X10 ⁻⁷	5.00X10 ⁻³¹	
	マグネシウム	Mg ₃ (PO ₄) ₂	3.59X10 ⁻⁶	2.00X10 ⁻²⁷	
	バリウム	Ba ₃ (PO ₄) ₂	2.52X10 ⁻⁵	3.40X10 ⁻²³	
1価	ナトリウム	Na ₃ PO ₄ ⁵⁾	1.03		31.6
	カリウム	K ₃ PO ₄	2.42		51.42

宮崎 章他、2014 より転載

¹⁾ 改訂4版 化学便覧 基礎編Ⅱ (1993) より

²⁾ 飽和溶液 100g 中に含まれる化合物の質量/g

³⁾ 改訂六版 分析化学便覧 (2011) より

⁴⁾ CRC Handbook of Chemistry and Physics, 84th Edition (2004) より

⁵⁾ Na₂O : P₂O₅ = 3 : 1 の溶液について

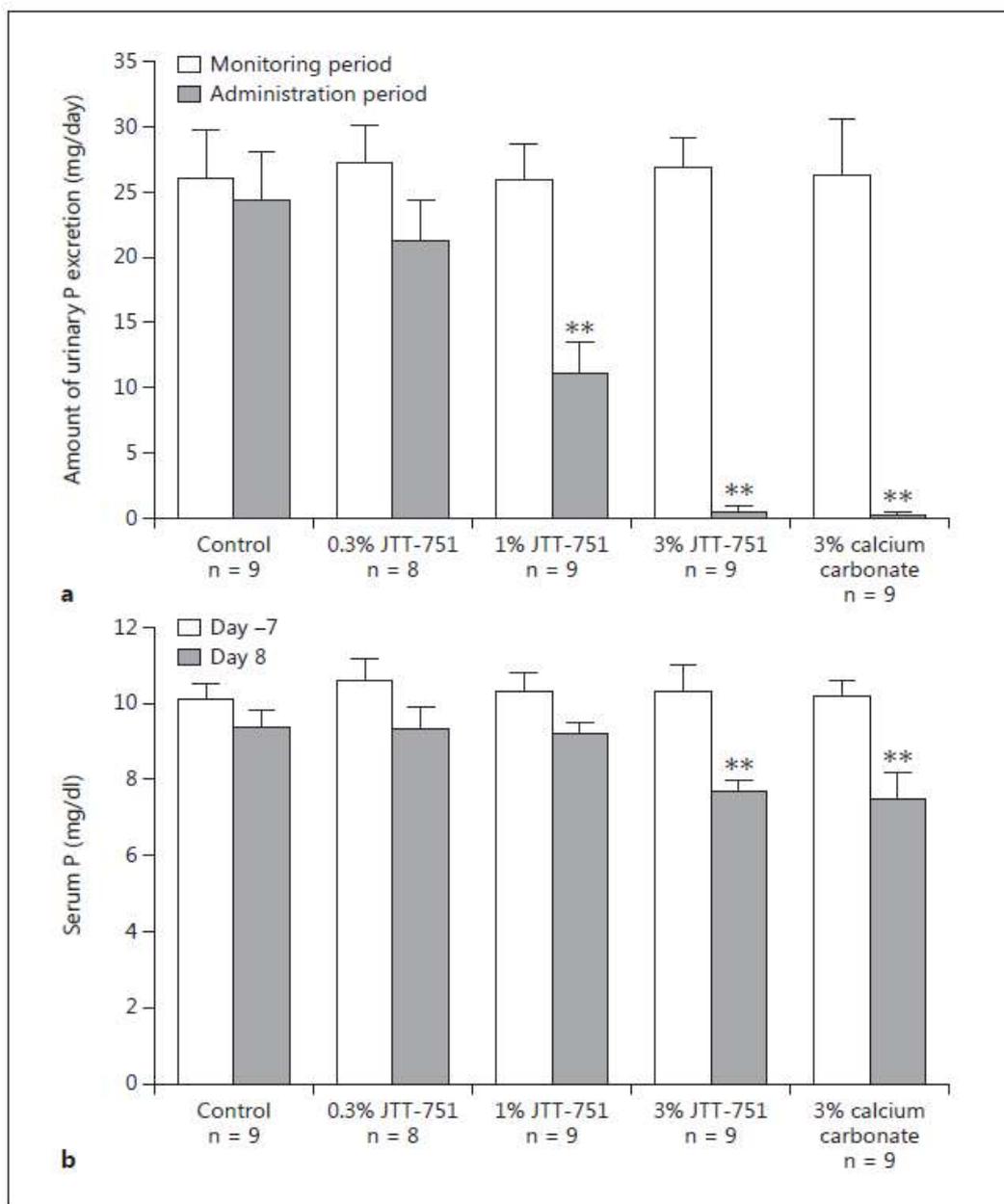


図1. クエン酸第二鉄の尿中リン排泄量及び血清リン濃度に対する作用（無処置ラット）
Iida et al., 2013 より転載.

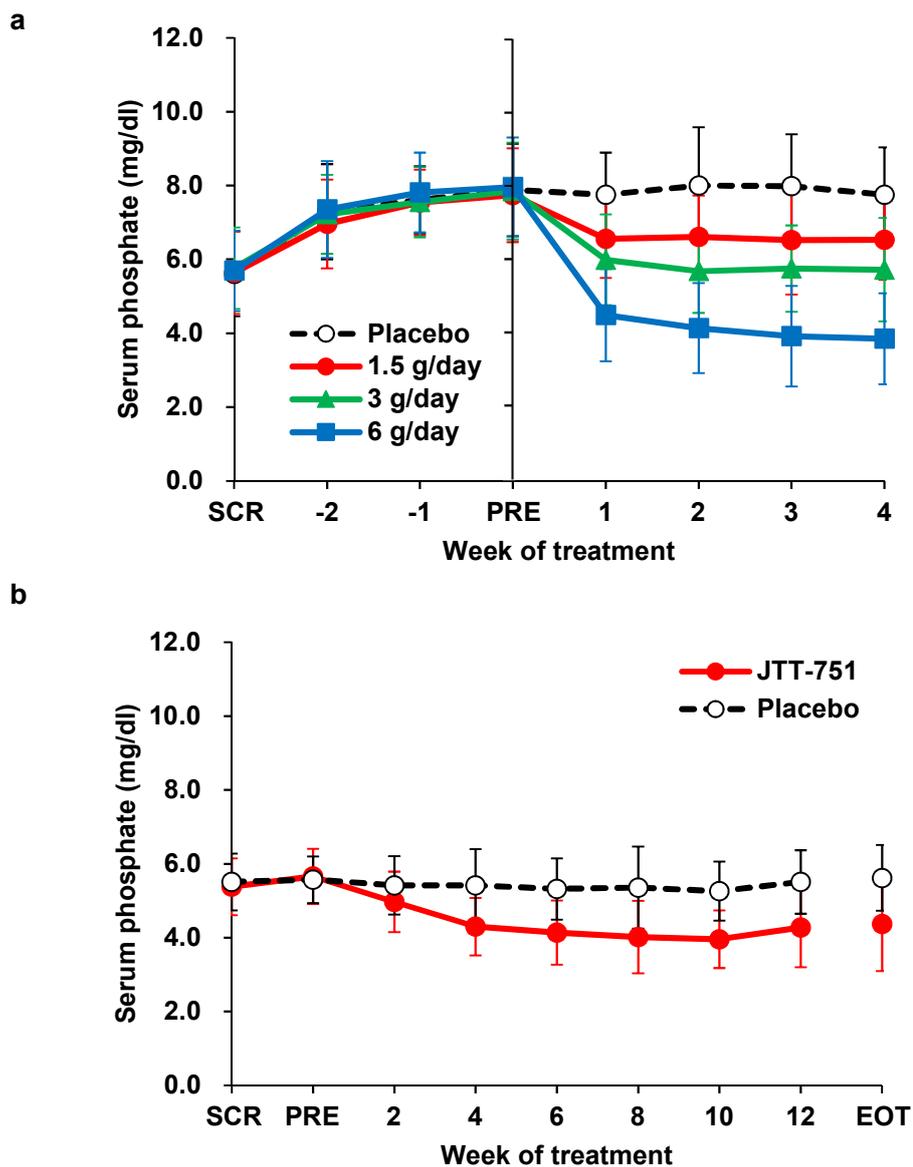


図 2. 血清リン濃度の経時的変化

a ; 血液透析患者対象 第 II 相用量反応試験 (Yokoyama et al., 2012 より転載)

b ; 保存期 CKD 患者対象試験 (Yokoyama, Hirakata et al., 2014 より転載)

平均値±標準偏差. SCR : 観察 (washout) 開始日、PRE : 投与開始日、EOT : 投与終了時.

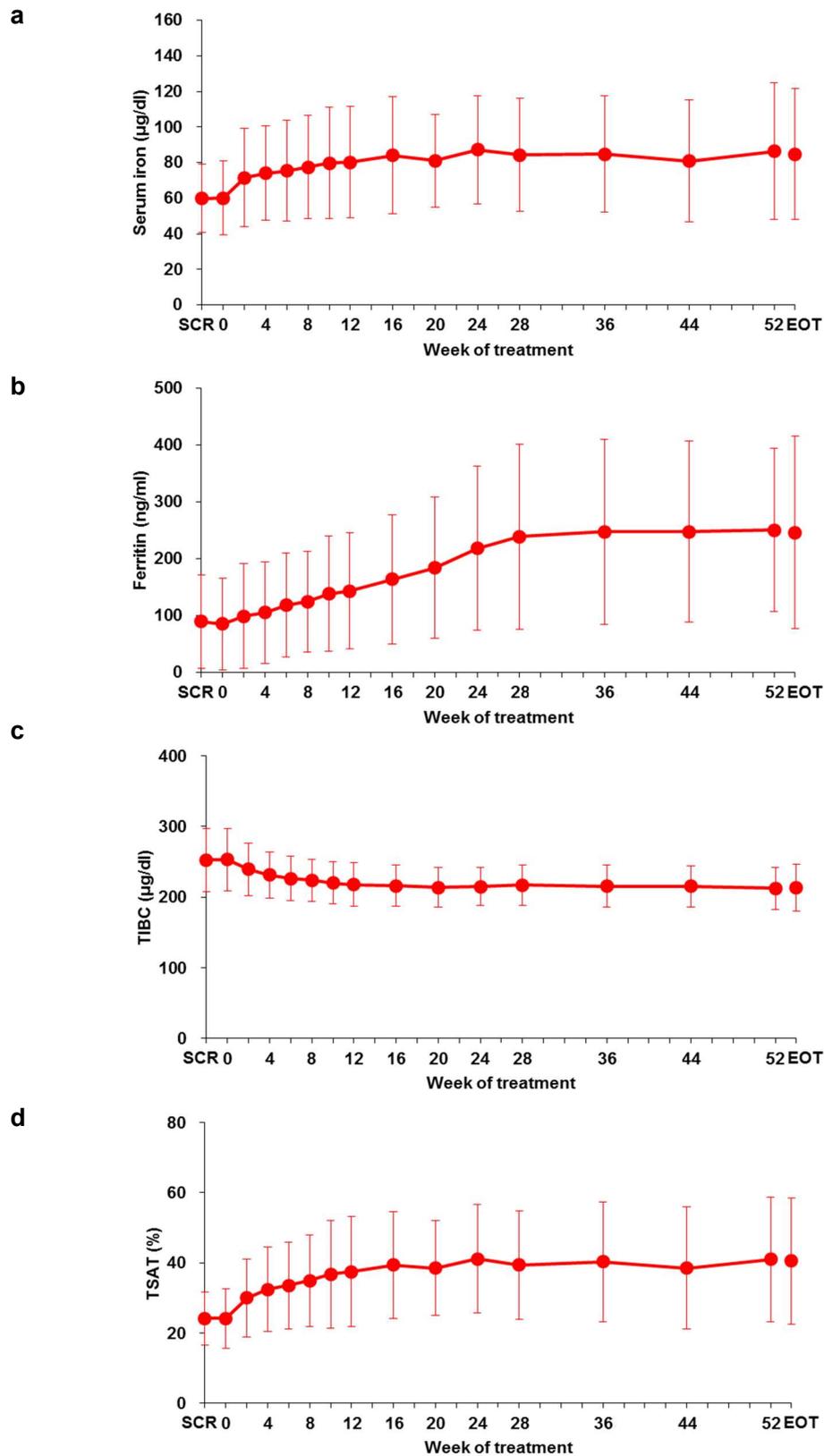


図3. 鉄関連検査値の経時的推移（血液透析患者対象 長期投与試験）
 a ; 血清鉄 (µg/dL)、b ; 血清フェリチン (ng/mL)、c ; TIBC (µg/dL)、d ; TSAT (%)
 平均値±標準偏差. SCR : 観察開始日、PRE : 投与開始日、EOT : 投与終了時. (Yokoyama, Akiba et al., 2014 より改変転載)

第2章 クエン酸第二鉄の鉄代謝及びリン代謝に与える影響

(無処置ラット試験)

第1節 緒言

ラットを用いたクエン酸第二鉄のリン吸収抑制作用については、すでに検討されており、クエン酸第二鉄投与による糞中リン排泄量の増加に伴ったリン吸収量の減少、尿中リン排泄量が確認されていることから、リン吸収抑制作用を有することが確認されている (Iida et al., 2013)。一方で、そのリン代謝の検討の際に、鉄剤であるクエン酸第二鉄が鉄代謝に対してどのように影響しているかは検討されていない。そこで、本試験では上記既報の用量を参考に、無処置ラット用いて、クエン酸第二鉄の鉄代謝に対する作用とリン代謝に対する作用を同時に検討し、用量ごとのリン代謝と鉄代謝に対する影響を検討した。

第2節 材料及び方法

実験には雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (日本チャールスリーバー株) を用いた。6週齢で入荷し、検疫・馴化の後、7週齢において検討を開始した。動物は紫外線照射された水道水及び CRF-1 粉末飼料 (オリエンタル酵母株、13.8 mg 鉄、1220 mg リン、810 mg カルシウム/100 g 飼料) を自由摂取させ、12時間の明暗周期 (明期: 8~20 時、暗期: 20~8 時)、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。飼育は 3 匹/ケージにてブラケットケージで行った。

Day 1 (混餌投与開始日) に体重を基に 1 群 6 匹の 3 群に群分けし、Control 群、0.3% ferric citrate 群 (0.3%FC 群)、3% ferric citrate 群 (3%FC 群) を設定した。なお、0.3% 及び 3% クエン酸第二鉄混合飼料はそれぞれ飼料 100 g あたり鉄量として 65.1 mg 及び 526.8 mg を含んでいる。CRF-1 粉末飼料、0.3 又は 3% のクエン酸第二鉄を含有する CRF-1 粉末飼料にて給餌を開始し、Day 12 まで 11 日間、混餌にて投与を継続した。Day 7 から 8 において代謝ケージにて個別飼育し、採尿することにより尿サンプルを得た。Day 1、8、12 に尾静脈より採血し、血液サンプルを得た。血液中のヘモグロビン濃度、RBC 数を全自動血球数測定装置 KX-21 (シスメックス株) を用いて測定した。また、血液サンプルより $10,000 \times g$ 、5 分間遠心分離することにより血清を採取し、生化学自動分析器 (Model 7180、日立製作所) により、血清/尿中リン濃度、血清/尿中カルシウム濃度、血清/尿中クレアチニ

ン濃度、血清中の鉄濃度、unsaturated iron binding capacity (UIBC)を測定した。血清 intact fibroblast growth factor23 (iFGF23)については、ELISA 法により測定キットを用いて測定した (カイノス社)。Transferrin saturation (TSAT)については、血清鉄濃度と UIBC から以下の式を用いて算出した。

$$\text{TSAT}(\%) = \text{血清鉄濃度} \div (\text{血清鉄濃度} + \text{UIBC}) \times 100$$

統計学的解析は、各パラメータについて、Control 群、0.3%FC 群、3%FC 群の 3 群について多群での検定を行った。すなわち、Bartlett' s test により等分散性を確認し、等分散性が確認された場合には Dunnett' s multiple comparison test を行い、等分散性が確認されなかった場合には、Steel' s multiple comparison test を行った。p 値 < 0.05 を有意とした。

第3節 結果

無処置ラットを用いて、クエン酸第二鉄のリン代謝関連パラメータ及び鉄代謝関連パラメータに対する影響を検討した。結果、3%FC群において、血清リン濃度及び尿中リン排泄量の有意な低下、血清カルシウム濃度の有意な上昇が確認された(図4)。また、血清iFGF23濃度も3%FC群において有意に低下していた。さらに、3%FC群において、尿中カルシウム排泄量の有意な増加が認められた(表2)。0.3%FC群においては、血清リン濃度、尿中リン排泄量、血清カルシウム濃度、血清iFGF23濃度のいずれのパラメータでも明らかな変化は認められなかった。また、体重に関してはいずれの群においても顕著な変化は認められなかった。

鉄代謝関連パラメータについて、いずれのクエン酸第二鉄投与群においても、赤血球数及びヘモグロビン値に明らかな変化は認められなかった(図5-1)。一方で、3%FC群において、血清鉄濃度及びTSATの有意な上昇、UIBCの有意な低下が認められたが、0.3%FC群においてはそれらのパラメータに明らかな変化は認められなかった(図5-2)。

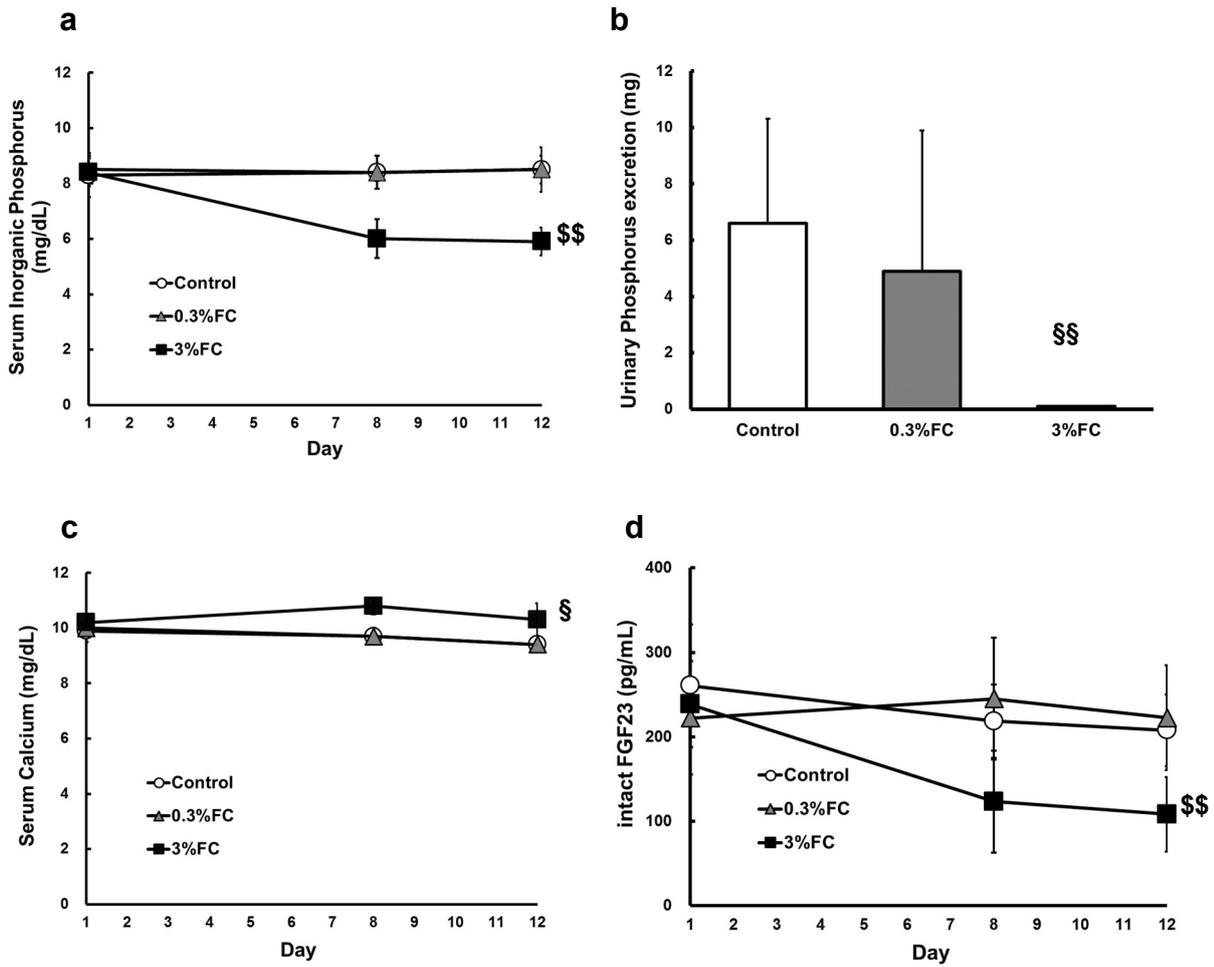


図4. クエン酸第二鉄のリン代謝関連パラメータに与える影響（無処置ラット試験）
a; Serum inorganic phosphorus, b; urinary phosphorus excretion, c; serum calcium,
d; serum iFGF23.
Data are the mean \pm standard deviation.
iFGF23, intact fibroblast growth factor.
 $$$$p < 0.01$ (Dunnett's multiple comparison test), vs. Control group.
 $\$p < 0.05$, $$$p < 0.01$ (Steel's multiple comparison test), vs. Control group.
Iida et al., 2020 より改変転載

表 2. 体重、尿中カルシウム排泄量（無処置ラット試験）

	Body weight (g)	Urinary excretion (Day7 - 8)	
		Calcium (mg)	
Day 1			
Control	319.8 ± 12.7	-	
0.3%FC	321.2 ± 8.6	-	
3%FC	320.8 ± 8.0	-	
Day 8			
Control	358.5 ± 13.0	1.0 ± 0.5	
0.3%FC	360.7 ± 16.2	0.9 ± 0.5	
3%FC	354.5 ± 14.5	2.7 ± 0.4	\$\$
Day 12			
Control	374.1 ± 10.7	-	
0.3%FC	380.4 ± 17.7	-	
3%FC	369.7 ± 16.0	-	

FC, Ferric citrate. -, not examined. Data are the mean ± standard deviation.

\$\$p < 0.01 (Dunnett's multiple comparison test), vs. Control group.

Iida et al., 2020 より改変転載

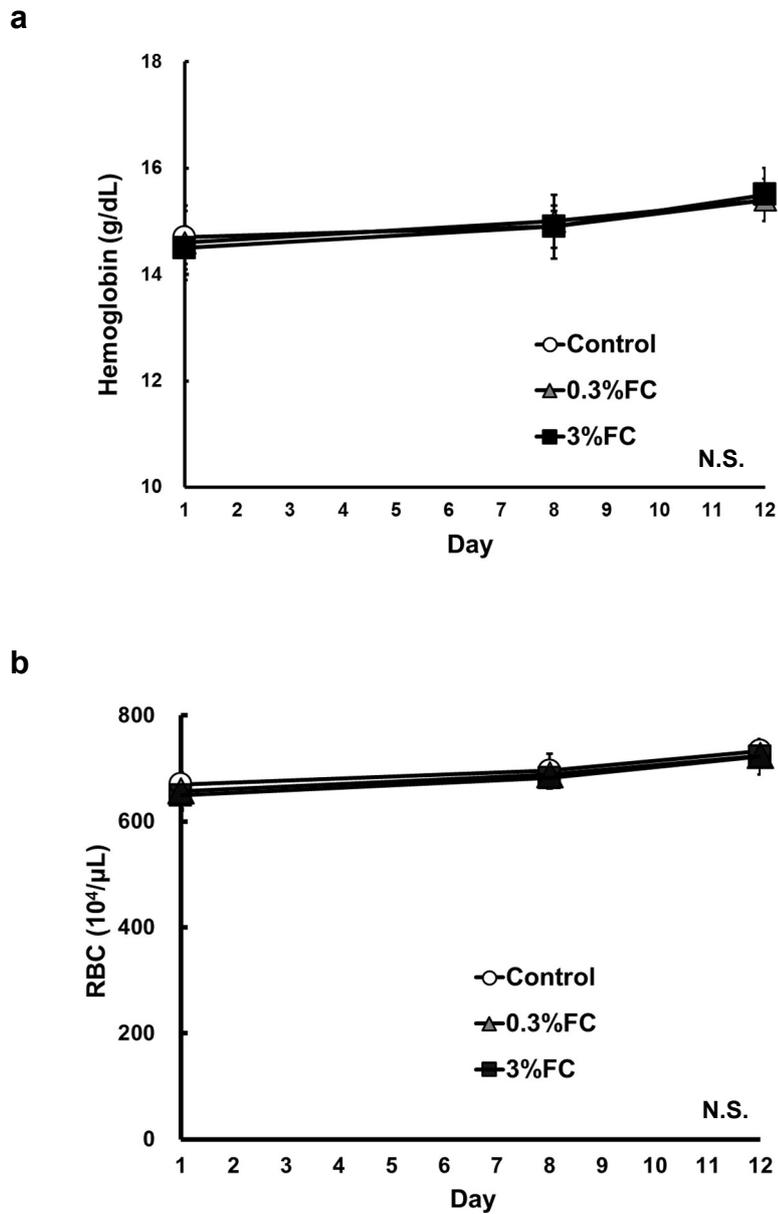


図 5-1. クエン酸第二鉄の鉄代謝関連パラメータに与える影響（無処置ラット試験）

a; Hemoglobin, b; RBC.

Data are the mean \pm standard deviation. N.S. means not significant.

RBC, red blood cell.

Iida et al., 2020 より改変転載

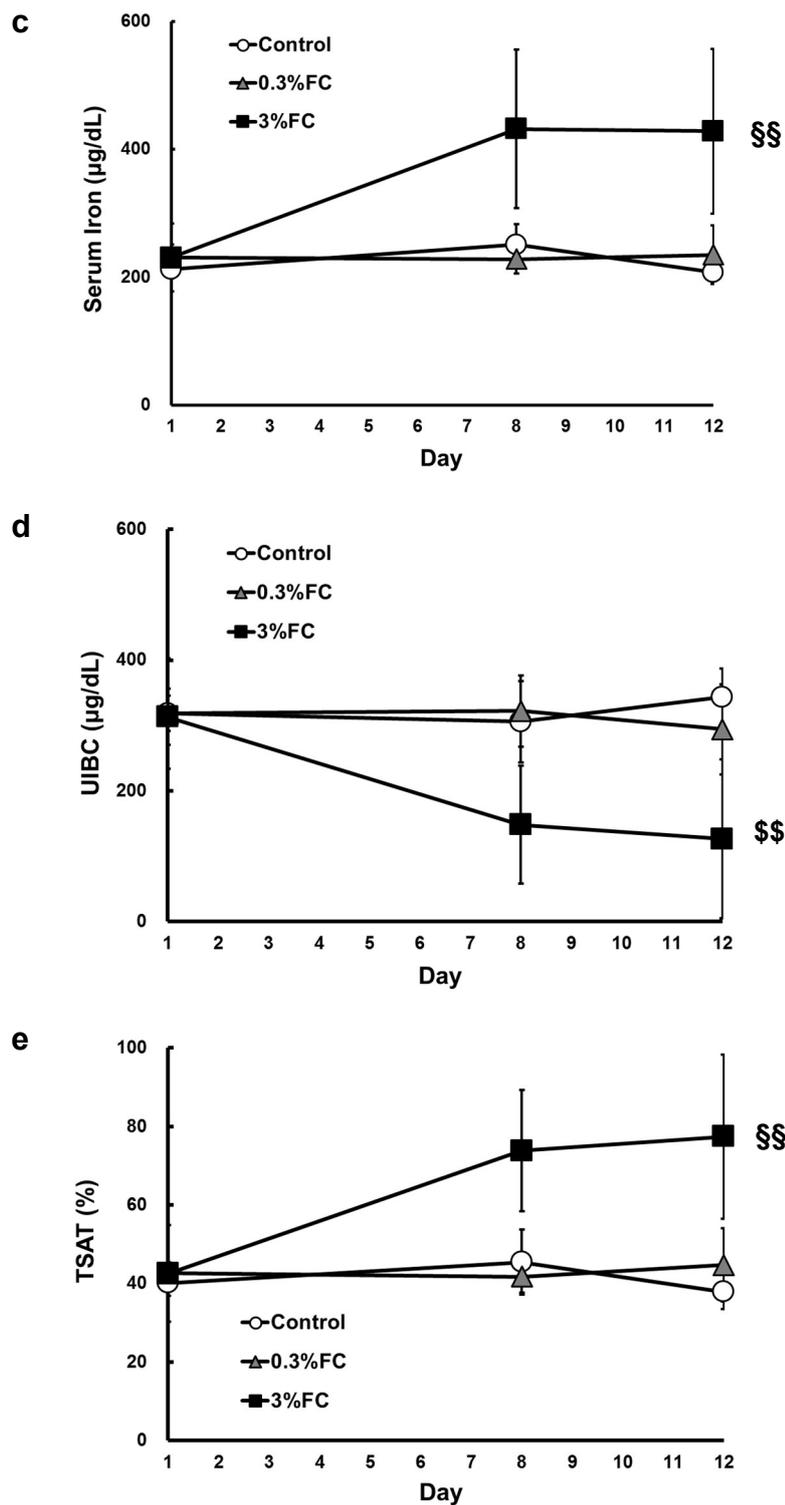


図 5-2. クエン酸第二鉄の鉄代謝関連パラメータに与える影響（無処置ラット試験）
c; serum iron, d; UIBC, e; TSAT.

Data are the mean \pm standard deviation. N.S. means not significant.

UIBC, unsaturated iron binding capacity; TSAT, transferrin saturation.

\$\$p < 0.01 (Dunnett's multiple comparison test); \$\$\$p < 0.01 (Steel's multiple comparison test), vs. Control group. Iida et al., 2020 より改変転載

第4節 考察

無処置ラット試験において、3%のクエン酸第二鉄の投与により、血清リン濃度及び尿中リン排泄量の有意な低下、血清カルシウム濃度の有意な上昇が確認され、これらの変化は既報のクエン酸第二鉄を用いた検討と同様であった (Iida et al., 2013)。リンとカルシウムは、その恒常性を厳密に維持されており、主として腎臓、骨、小腸、副甲状腺が担っている (Kraft, 2015)。それらリン代謝に関与する臓器のうち、恒常性を維持するのに最も重要な臓器は腎臓であり、1日約 6,000 mg のリンが糸球体で濾過され、約 90%が尿細管で再吸収される。再吸収のうち、約 75%は近位曲尿細管で、約 10%が近位直尿細管で、遠位尿細管で約 5~10%、集合管で 2~3%のリンが再吸収される。腸管からのリン摂取の低下は腎臓でのリン再吸収を増加させ、リン摂取の増加は再吸収を抑制する (Yokoyama, 2016)。また、リンの恒常性維持に関して、血中のリン濃度の上昇は、血中のイオン化されたカルシウム濃度を低下させ、このイオン化カルシウム濃度の低下は副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌を促進する。PTH はリンとカルシウムの骨からの吸収、腎臓でのカルシウム再吸収とリン排泄を促進する。すなわち、生体にとってのリン吸収量が増加した際には、一時的な血中リン濃度の上昇を介して、腎臓からのリン排泄量が増加し、リン吸収量が減少した際には腎臓からのリン排泄量が減少することとなる (Kraft, 2015)。本検討結果においては、腎臓からのリン排泄量に相当する尿中リン排泄量が減少しており、リン吸収量が減少した結果を反映したものと考えられる。また、血中の iFGF23 濃度も 3%FC 群において低下していた。FGF23 は骨細胞から分泌されて、尿中へのリンの排泄を促す因子であり、PTH と同様に非常に強力なリン利尿因子である (図 6)。すなわち、FGF23 は腎尿細管再吸収と、活性型ビタミン D3 活性抑制を介した腸管吸収の抑制という、主として 2 つの機序で血清リン濃度を低下させる (Quarles, 2012)。リン排泄促進因子である FGF23 が低下したことは、リン吸収量の減少を示唆するものであり、クエン酸第二鉄水和物の臨床試験でも確認されている (図 7、Yokoyama, Hirakata et al., 2014)。同時に、体重に顕著な差が認められなかったことから、摂餌量の減少などによるものではないと考えられる。これらのことから、3%のクエン酸第二鉄の投与により、リン吸収量が減少し、それを反映したミネラル代謝の変動が認められたものと示唆された。0.3%クエン酸投与時にはいずれのパラメータにも変化が認められず、同用量は無処置ラットにおいてはリン吸収に対する明確な影響は無い用量であると考えられる。

一方、鉄代謝関連パラメータについて、0.3%と 3%いずれのクエン酸第二鉄投与群においても、赤血球数及びヘモグロビン値に明らかな変化は認められなかったが、3%の用量におい

て、血清鉄濃度やTSATの上昇、UIBCの低下が認められた。このことから、3%の用量では無処置ラットにおいても生体内にある一定度の鉄が吸収されているものと考えられるが、造血に十分な量の鉄が吸収されていない可能性がある。また、3%のクエン酸第二鉄投与により上昇した血清鉄濃度、TSATはDay 8で定常化しており、鉄結合蛋白であるトランスフェリンの飽和度を示すTSATが定常化する理由としては、生体には能動的な鉄の排泄機構は備わっていないことが考えられる。すなわち、クエン酸第二鉄の鉄が一部吸収されたことにより体内の鉄量が充足し、鉄の吸収におけるフィードバック機構において、体内への鉄吸収量が低下したためと考えられる。これらフィードバック機構を含めた腸管細胞における鉄の吸収機構において、腸管細胞への鉄の取り込みに関してIRPsとhepcidinが重要な役割を果たしている。すなわち、IRPsは、腸管細胞内の鉄レベルが上昇したときに二価金属イオントランスポーター1(DMT1)や十二指腸シトクロームb(Dcytb)の発現を減少させ、腸管細胞への鉄の取り込みを抑制する(図8-1、Pantopoulos et al., 2012; Frazer et al., 2003)。一方、hepcidinは、血液中の鉄レベルが上昇したときにその発現が増加し、ferroportin 1やhephaestinを介した腸管細胞から血液への鉄の汲み出しを抑制することにより鉄吸収に対して抑制的に作用する(図8-2、Ganz, 2007; Ganz et al., 2019; Pantopoulos et al., 2012)。

以上のことから、無処置ラットにおいて、クエン酸第二鉄の3%の用量はリン吸収に対する抑制作用と同時に鉄の吸収を示す一方で、0.3%の用量はリン代謝と鉄代謝に明確な作用は示さないものと示唆された。

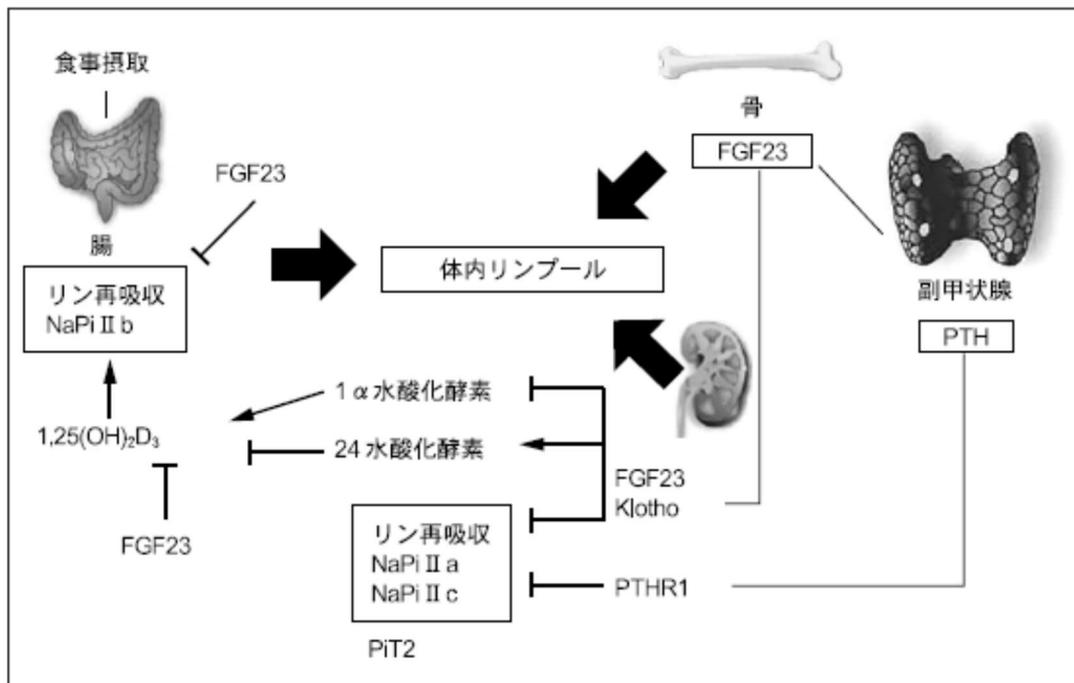


図2 FGF23 はリン代謝で中心的役割を演じている

リンの輸送を担うナトリウム依存性トランスポーター (sodium-dependent phosphate transporter: NaPi) はその構造から type I, II, III に分類され、その中でも type II (NaPi II a および II c) が腎再吸収に重要な役割を担っている。尿細管でのリン再吸収を正確に反映するのは尿細管リン再吸収閾値 (TmP/GFR) である。この中でも PTH と FGF23 は非常に強力なリン利尿因子である。FGF23 はビタミン D の活性化を抑制する。

FGF23: 線維芽細胞増殖因子 23, NaPi: リンの輸送を担うナトリウム依存性トランスポーター, PTH: 副甲状腺ホルモン, PTHR1: PTH 受容体 1

(文献 21 より改変)

図 6. FGF23 は骨細胞から分泌されるリン利尿因子である
Yokoyama, 2016 より転載

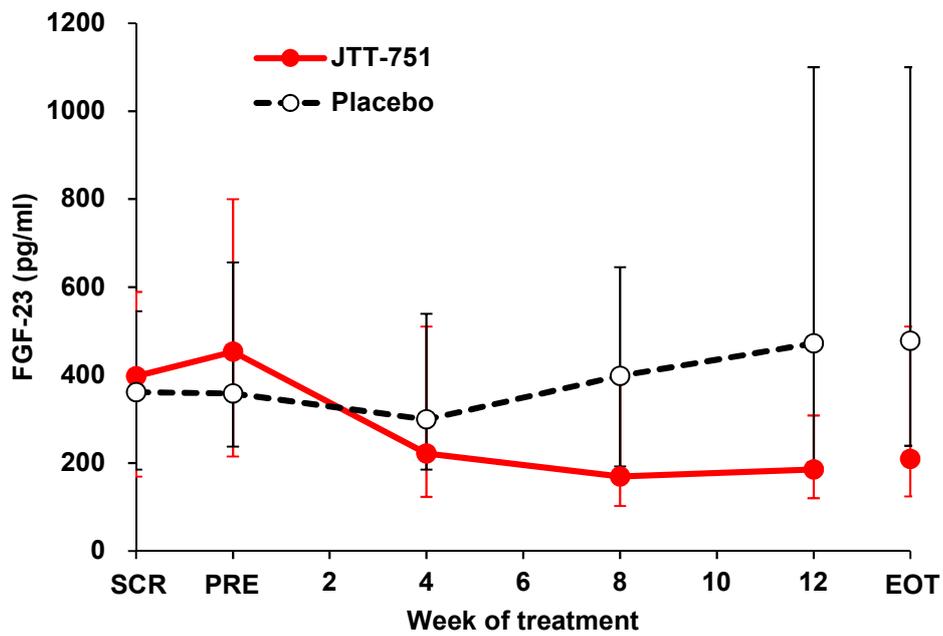


図 7. FGF-23 の経時的推移 (保存期 CKD 患者対象試験)

中央値、IQR. SCR : 観察 (washout) 開始日、PRE : 投与開始日、EOT : 投与終了時.
Yokoyama, Hirakata et al., 2014 より改変転載。

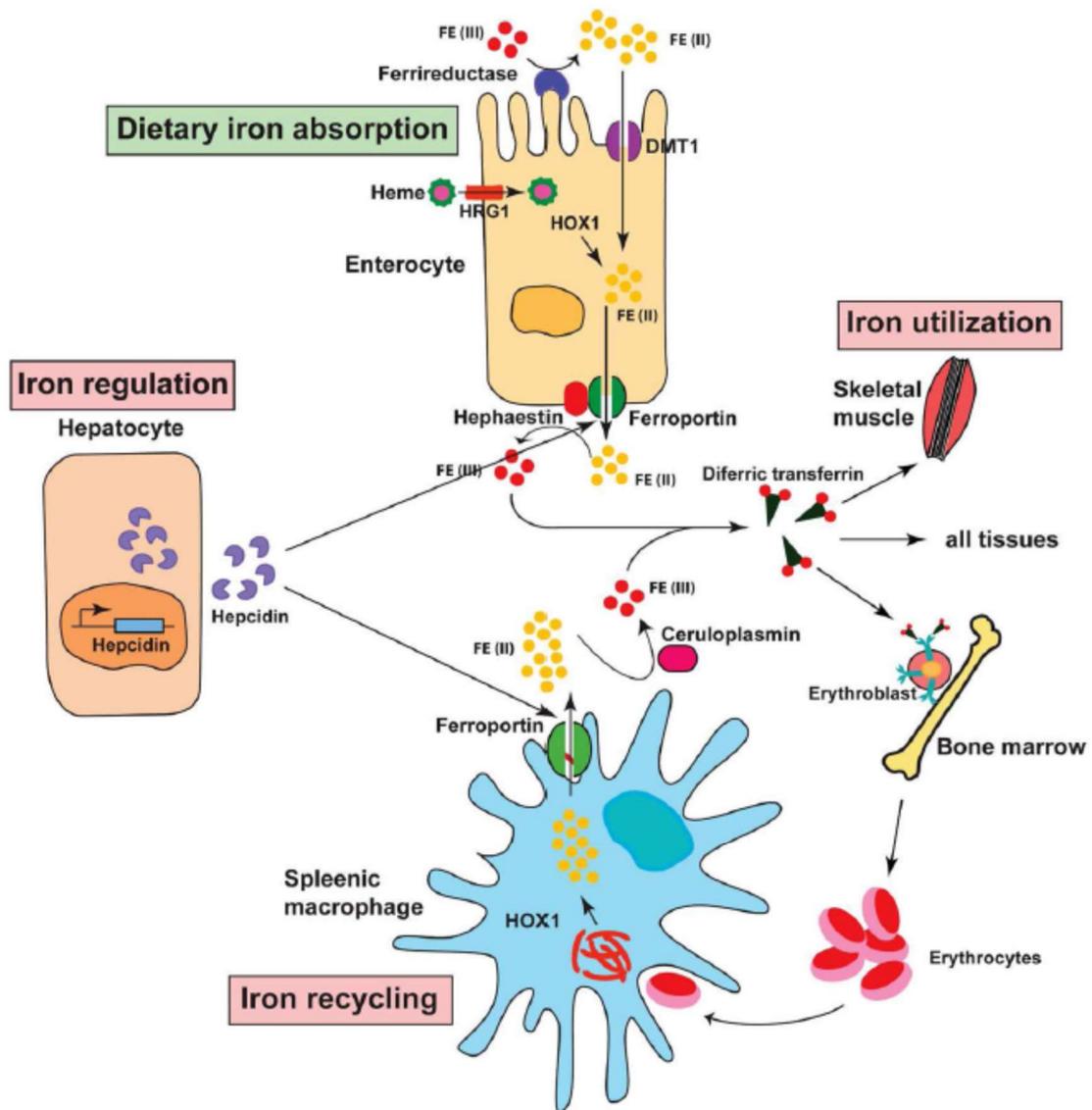


図 8-1. 鉄代謝の調節機構

Dcytb により Fe^{2+} に還元された鉄は、十二指腸細胞にある DMT1 を介して、吸収される。吸収された鉄は ferroportin を通って hephaestin により酸化された形で、トランスフェリンに結合し、全身を循環する。

Pantopoulos et al., 2012 より転載.

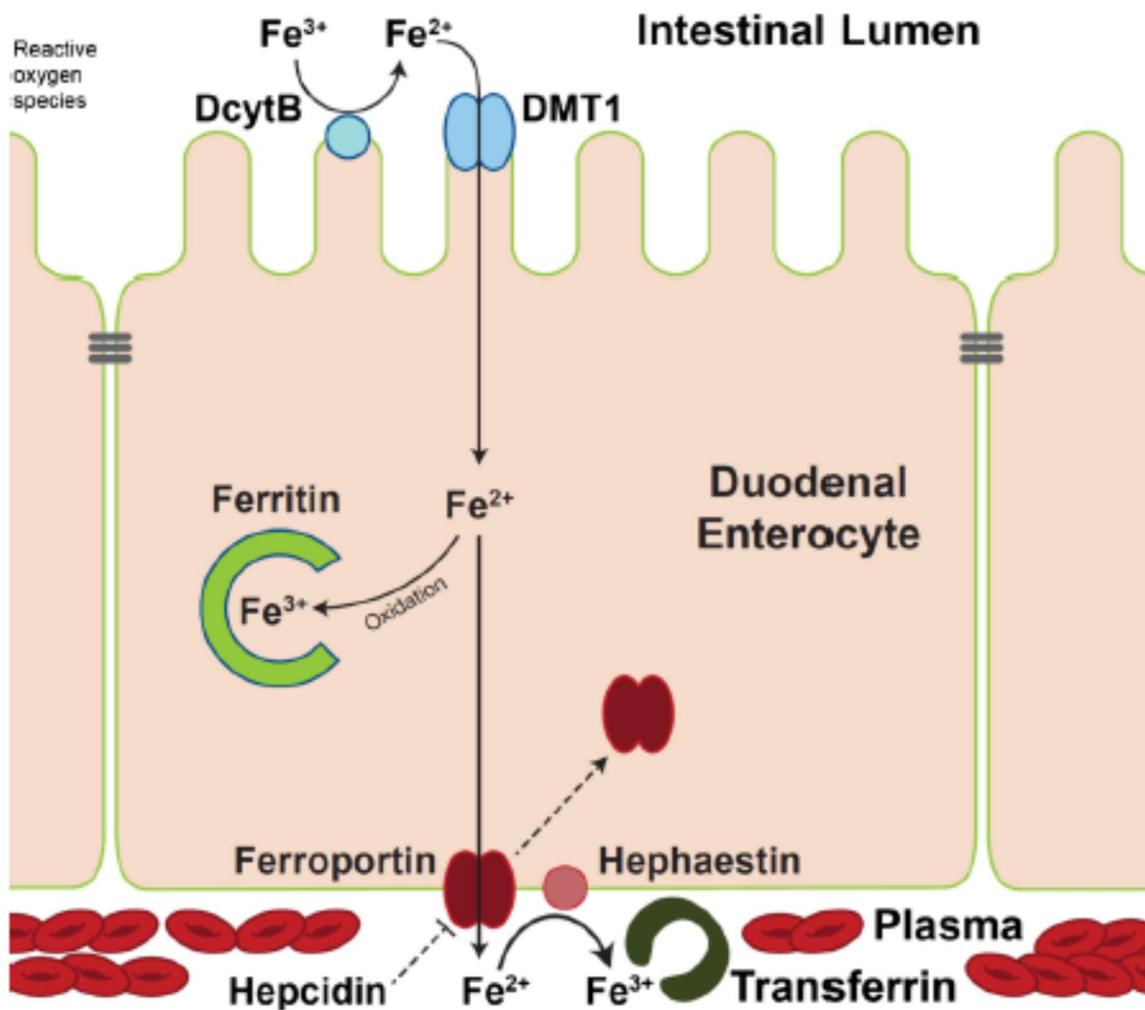


図 8-2. 鉄吸収機構

Dcytb により Fe^{2+} に還元された鉄は、十二指腸細胞にある DMT1 を介して、吸収される。吸収された鉄の一部は十二指腸細胞内の ferritin と結合する形で貯蔵される。生体内に吸収される場合には、ferroportin を通って hephaestin により酸化された形で、トランスフェリンに結合し、全身を循環する。一方で、hepcidin は ferroportin 抑制することで、鉄の吸収に抑制的に作用する。

Ganz et al., 2019 より転載。

第5節 要約

無処置ラット試験において、3%のクエン酸第二鉄の投与により、血清リン濃度及び尿中リン排泄量の有意な低下、血清カルシウム濃度の有意な上昇が確認され、リン排泄促進因子である FGF23 も低下したことから、クエン酸第二鉄の 3%の用量はリン吸収抑制作用を示す用量であると示唆された。また、0.3%クエン酸投与時にはリン代謝のいずれのパラメータにも変化が認められず、無処置ラットにおいてはリン吸収に対する明確な作用を示さない用量であると考えられた。

一方、鉄代謝関連パラメータについて、いずれのクエン酸第二鉄投与群においても、赤血球数及びヘモグロビン値に明らかな変化は認められなかったが、3%の用量においてのみ血清鉄濃度や TSAT の上昇、UIBC の低下が認められたことから、3%の用量においては、生体内にある一定度の鉄が吸収されているものと考えられた。

以上のことから、無処置ラットにおいて、クエン酸第二鉄の 3%の用量はリン吸収に対する抑制作用と同時に鉄の吸収を示す一方で、0.3%の用量はリン代謝と鉄代謝に明確な作用は示さないものと示唆された。

第3章 クエン酸第二鉄の鉄代謝及びリン代謝に与える影響 (鉄欠乏性貧血ラット試験)

第1節 緒言

第2章での検討結果から、無処置ラットにおいて、クエン酸第二鉄の3%の用量はリン吸収に対する抑制作用と同時に鉄の吸収を示す一方で、0.3%の用量はリン代謝と鉄代謝に明確な作用は示さないものと示唆された。鉄の吸収においては、hepcidinが血液中の鉄レベルが上昇したときにその発現が増加し、腸管細胞から血液への鉄の汲み出しを抑制することにより鉄吸収に対して抑制的に作用することが知られている(図8-1、8-2、Ganz, 2007; Pantopoulos et al., 2012; Ganz et al., 2019)。また、鉄が過剰でないにもかかわらず、炎症時には炎症性サイトカインによる hepcidin 発現の増加を介した鉄の吸収と利用の抑制が知られており、炎症性疾患時の貧血の可能性のひとつと考えられる(図9、Fraenkel, 2017)。これらのことから、炎症を伴わない鉄欠乏状態においては、そうした鉄の吸収抑制機構が解除されていると考えられる。

無処置ラット試験の結果と上述の鉄吸収調節機構を合わせて考えると、クエン酸第二鉄の0.3%の用量は、無処置ラットにおいては鉄代謝に影響を示さなかったが、鉄欠乏性貧血状態においては鉄吸収に対する抑制機構が解除されることにより、鉄が吸収され、鉄代謝に影響を与える可能性があると考えた。そこで、本検討においては、鉄欠乏状態における0.3%の用量でのクエン酸第二鉄投与が鉄代謝に与える影響をリン代謝に与える影響と同時に検討した。

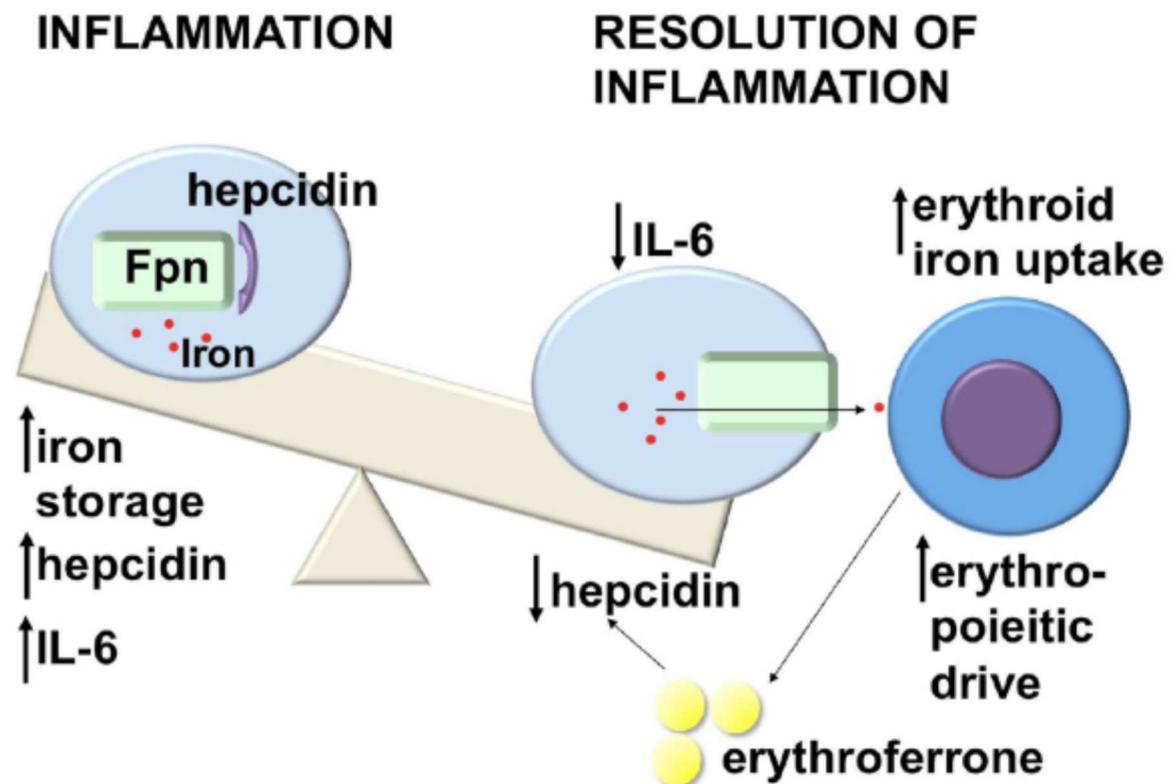


Figure 1.

Inflammation stimulates increased production of the iron-regulatory peptide, hepcidin, by hepatocytes and the pro-inflammatory cytokine, IL-6, which suppresses erythropoiesis. Hepcidin binds the iron exporter, ferroportin (fpn), causing internalization and degradation of both proteins and decreasing delivery of iron from macrophages to developing erythrocytes. This impairs erythroid development and leads to anemia. Increased erythropoietic drive stimulates erythroid progenitors to release erythroferrone, a hormone that suppresses hepcidin expression. When inflammation resolves, hepcidin and IL-6 levels decline, allowing iron to be exported to from macrophages to erythrocytes and promoting erythropoiesis.

図 9. 炎症による hepcidin の増加を介した造血抑制機構

Fraenkel, 2017 より転載.

第2節 材料及び方法

実験には雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (日本チャールスリーバー株) を用いた。6 週齢で入荷し、検疫・馴化の後、7 週齢において検討を開始した。動物は紫外線照射された水道水及び AIN-93G 粉末飼料 (オリエンタル酵母株、3.5 mg 鉄、160 mg リン、500 mg カルシウム/100 g 飼料) を自由摂取させ、12 時間の明暗周期 (明期: 8~20 時、暗期: 20~8 時)、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。飼育は 3 匹/ケージにてブラケットケージで行った。

Day 1 に体重を基に 6 匹の Normal 群 (AIN-93G 粉末飼料を給餌) を設定し、残りの動物に鉄欠乏食 (AIN-93G (Fe-) 粉末飼料) を給餌した (図 10)。鉄欠乏食給餌開始 7 日後の Day 8 に、ヘモグロビン値を指標に 1 群あたり 6 匹の 2 群に群分けし、Control 群と 0.3% ferric citrate 群 (0.3% FC 群) を設定した。Normal 群には引き続き AIN-93G 粉末飼料を給餌し、Control 群と 0.3% FC 群にはそれぞれ AIN-93G (Fe-) 粉末飼料、クエン酸第二鉄を 0.3% で混合した AIN-93G (Fe-) 粉末飼料を Day 8 から 15 までの 7 日間給餌した。なお、0.3% クエン酸第二鉄混合 AIN-93G (Fe-) 粉末飼料は飼料 100 g あたり鉄量として 51.3 mg を含んでいる。Day 1、8、15 に尾静脈より採血し、血液サンプルを得た。また、Day 14 から 15 において代謝ケージにて個別飼育し、採尿することにより尿サンプルを得た。第 2 章-第 2 節と同様に血液中のヘモグロビン濃度、RBC 数を測定し、血清サンプル及び尿サンプルについては生化学自動分析器により、血清/尿中リン濃度、血清/尿中カルシウム濃度、血清/尿中クレアチニン濃度、血清中の鉄濃度、UIBC、血清 iFGF23 濃度を測定し、TSAT について算出した。

統計学的解析は、各パラメータについて、Normal 群と Control 群、Control 群と 0.3% FC 群それぞれにおいて、2 群間の検定を実施し、 p 値 < 0.05 を有意とした。

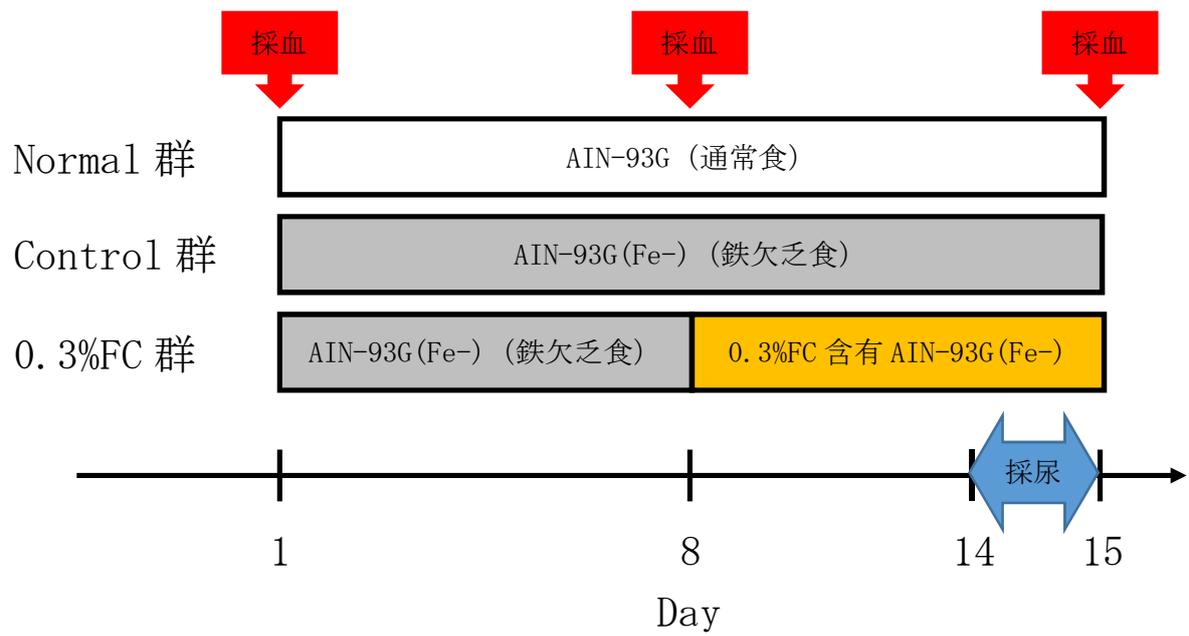


図 10. 試験概要

第3節 結果

鉄欠乏食を給餌することにより、ラットを鉄欠乏性貧血状態にした上で、クエン酸第二鉄のリン代謝関連パラメータ及び鉄代謝関連パラメータに対する影響を検討した。鉄欠乏食を7日間与えることにより、Normal群に比べてControl群のヘモグロビン値が有意に減少し、RBC数は減少傾向を示した(図11-1)。鉄欠乏食給餌7日後より7日間(Day 8から15)、クエン酸第二鉄を0.3%の用量にて混餌投与したところ、ヘモグロビン値はControl群に比べて有意に増加し、Normal群と同程度にまで回復した。RBC数、血清鉄濃度、TSATにおいて同様の増加が認められ、UIBCにおいては低下が認められた(図11-2)。

一方、リン代謝関連の血清パラメータに関して、0.3%FC群において顕著な変化は認められなかった(血清リン濃度、血清カルシウム濃度、血清iFGF23濃度、表3)。尿パラメータにおいても、リン排泄量、カルシウム排泄量に明らかな変化は無く、血清クレアチニン濃度及び尿中クレアチニン排泄量、体重においてもクエン酸第二鉄による明らかな影響は認められなかった(表4)。

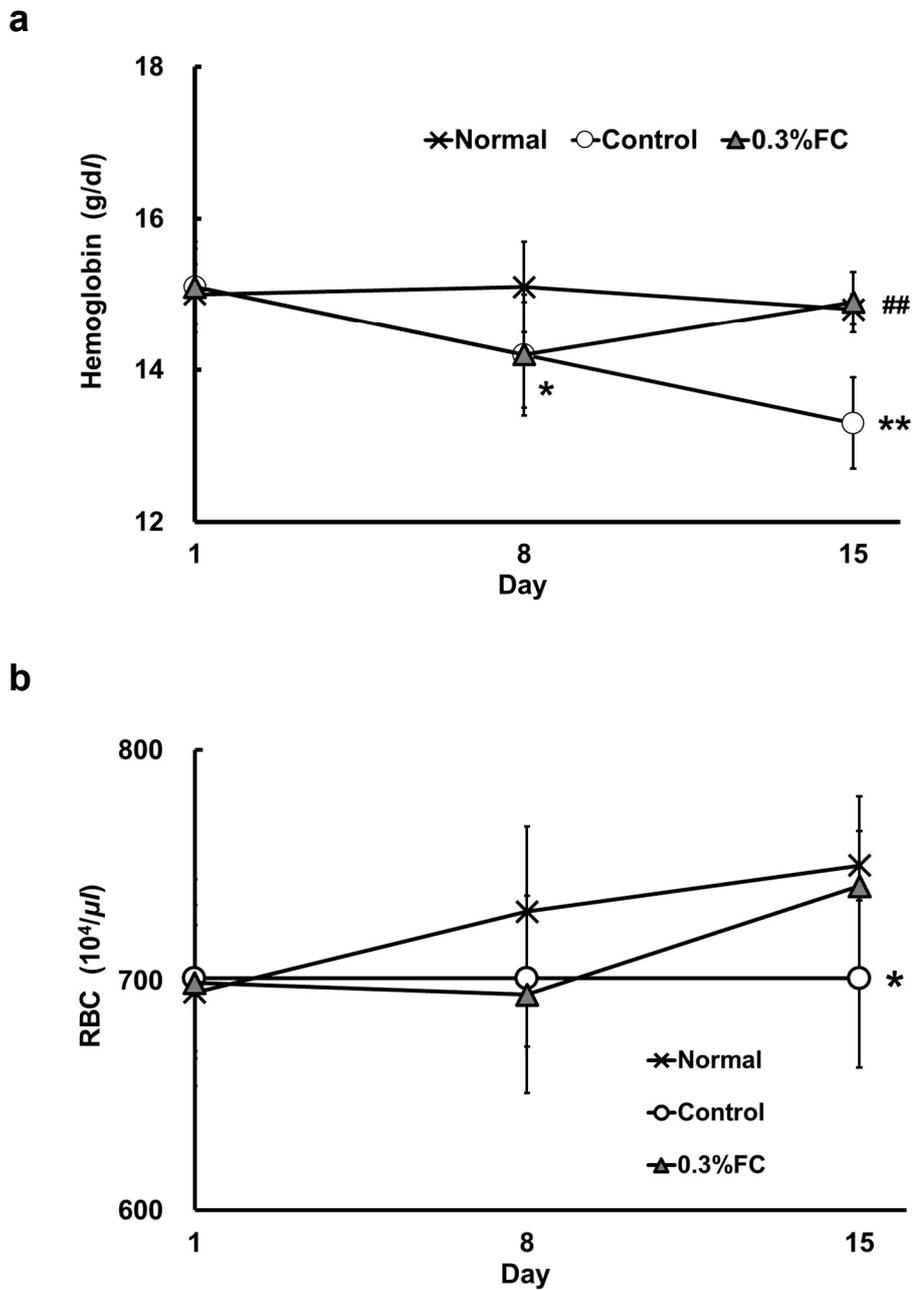


図 11-1. クエン酸第二鉄の貧血関連パラメータに対する影響（鉄欠乏性貧血ラット試験）

a; Hemoglobin, b; RBC. Data are the mean \pm standard deviation.

RBC, red blood cell.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. Normal group.

$p < 0.01$ vs. Control group.

Iida et al., 2020 より改変転載

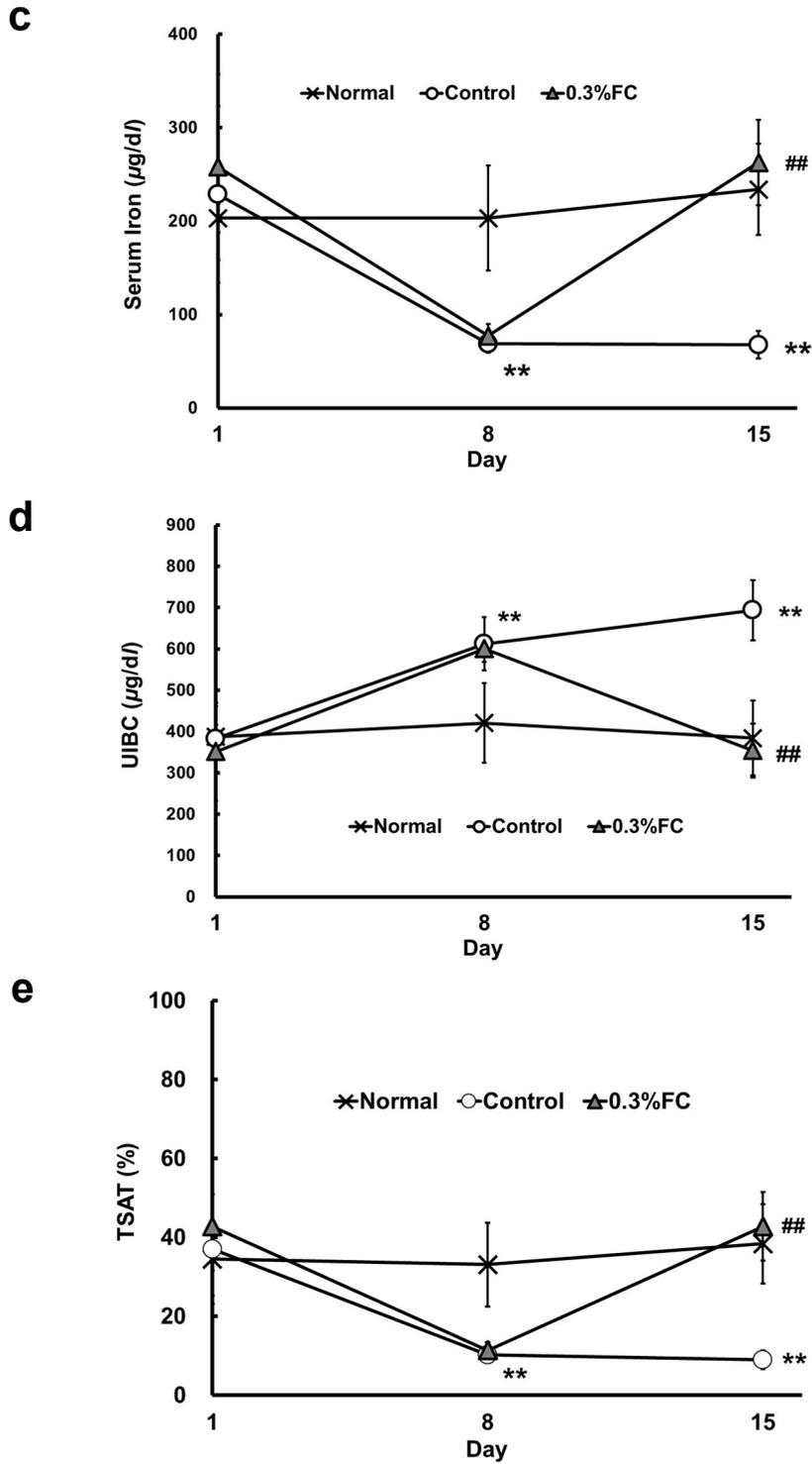


図 11-2. クエン酸第二鉄の貧血関連パラメータに対する影響（鉄欠乏性貧血ラット試験）

c; Serum iron, d; UIBC, e; TSAT. Data are the mean \pm standard deviation.

UIBC, unsaturated iron binding capacity; TSAT, transferrin saturation.

**p<0.01, vs. Normal group.

##p<0.01 vs. Control group.

Iida et al., 2020 より改変転載

表 3. クエン酸第二鉄の血清パラメータに対する影響 (鉄欠乏性貧血ラット試験)

	Serum parameters			
	Inorganic Phosphorus	Calcium	iFGF23	Creatinine
	(mg/dl)	(mg/dl)	(pg/ml)	(mg/dl)
Day 1				
Normal	9.7 ± 0.4	9.9 ± 0.1	248.1 ± 70.3	0.42 ± 0.13
Control	10.1 ± 0.5	9.9 ± 0.2	250.2 ± 88.0	0.43 ± 0.11
0.3%FC	10.0 ± 0.7	10.3 ± 0.1 ##	248.8 ± 57.2	0.44 ± 0.14
Day 8				
Normal	8.5 ± 0.7	9.9 ± 0.2	262.9 ± 48.7	0.78 ± 0.56
Control	8.1 ± 0.9	9.8 ± 0.6	220.5 ± 29.0	0.55 ± 0.20
0.3%FC	7.8 ± 0.6	9.8 ± 0.2	254.0 ± 83.1	0.35 ± 0.08
Day 15				
Normal	7.9 ± 0.3	9.3 ± 1.0	266.0 ± 53.7	0.43 ± 0.12
Control	7.9 ± 0.6	10.0 ± 0.3	303.1 ± 110.6	0.59 ± 0.35
0.3%FC	7.6 ± 0.6	9.8 ± 0.2	336.5 ± 78.3	0.41 ± 0.06

FC, Ferric citrate; iFGF23, intact fibroblast growth factor 23.

Data are the mean ± standard deviation.

##p < 0.01 vs. Control group.

Iida et al., 2020 より改変転載

表 4. クエン酸第二鉄の体重及び尿パラメータに対する影響（鉄欠乏性貧血ラット試験）

	Body weight (g)	Urinary excretion (Day 14 - 15)		
		Inorganic Phosphorus (mg/day)	Calcium (mg/day)	Creatinine (mg/day)
Day 1				
Normal	339.5 ± 14.7	-	-	-
Control	355.6 ± 16.8	-	-	-
0.3%FC	349.7 ± 25.3	-	-	-
Day 8				
Normal	367.1 ± 21.6	-	-	-
Control	390.4 ± 23.6	-	-	-
0.3%FC	384.6 ± 36.7	-	-	-
Day 15				
Normal	398.0 ± 25.7	5.7 ± 2.2	0.88 ± 0.38	9.7 ± 2.4
Control	417.3 ± 35.7	6.6 ± 4.8	1.0 ± 0.28	10.9 ± 2.3
0.3%FC	418.0 ± 39.0	4.0 ± 2.0	1.0 ± 0.38	11.2 ± 2.0

FC, Ferric citrate. -, not examined.

Data are the mean ± standard deviation.

Iida et al., 2020 より改変転載

第4節 考察

鉄欠乏性貧血状態のラットを作製し、クエン酸第二鉄の同ラットにおける鉄代謝とリン代謝に対する影響を検討するにあたって、本試験においてはAIN-93G粉末飼料を使用した。鉄欠乏食であるAIN-93G(Fe-)粉末飼料との比較のためにAIN-93G粉末飼料を使用しており、無処置ラット試験において使用したCRF-1粉末飼料とは成分が異なる。通常の飼育条件下において、両飼料飼育下のラットのリン代謝関連パラメータ及び鉄関連パラメータに明らかな差は無いことから、CRF-1粉末飼料を使用した無処置ラット試験を本試験のパイロット試験と考えることに大きな問題は無いと考えた。

本試験のまず最初に、鉄欠乏食を給餌することにより、ヘモグロビン値、RBC数、血清鉄濃度、TSATが減少し、UIBCが増加したことから、鉄欠乏性貧血状態となっていることが示唆された。同状態に0.3%クエン酸第二鉄を投与したところ、鉄欠乏食により減少したヘモグロビン値などの鉄関連パラメータがいずれも増加したことから、0.3%クエン酸第二鉄が造血を促進したことが示唆された。無処置ラットにおいては、同用量は鉄関連パラメータに明らかな影響を与えなかったことから、鉄過剰若しくは充足時には鉄の吸収に抑制的に働く機構が鉄欠乏状態では解除されており、鉄吸収能が上昇していることが考えられる

(Pantopoulos et al., 2012; Frazer et al., 2003; Ganz, 2007; Anderson and Frazer, 2017)。

一方で、鉄欠乏性貧血状態である本試験において、0.3%クエン酸第二鉄投与がリン代謝関連のいずれのパラメータに対しても顕著な作用を示さなかったことは無処置ラット試験と同様であった。また、動物の一般状態や腎機能の指標となる体重、血清クレアチニン濃度、尿中クレアチニン濃度のいずれにも影響を示さなかったことから、通常飼育と同様にリンが充足した状態では、0.3%クエン酸第二鉄はリン代謝に影響しないものと考えられた。すなわち、0.3%の用量でのクエン酸第二鉄投与は、鉄欠乏性貧血状態のラットに対して、リン代謝に影響することなく、鉄代謝に作用し、造血作用を示したものと考えられた。

第5節 要約

鉄欠乏食を給餌することにより、ヘモグロビン値、RBC数、血清鉄濃度、TSATが減少し、UIBCが増加したことから、鉄欠乏性貧血状態となっていることが示唆された。同状態に0.3%クエン酸第二鉄を投与したところ、鉄欠乏食により減少したヘモグロビン値などの鉄関連パラメータがいずれも増加したことから、0.3%クエン酸第二鉄が造血を促進したことが示唆された。

一方で、本試験において0.3%クエン酸第二鉄は、リン代謝関連のいずれのパラメータに対しても顕著に変化させなかったことから、0.3%の用量でのクエン酸第二鉄投与は、鉄欠乏性貧血状態において、リン代謝に影響することなく、造血作用を示す可能性が示唆された。

第4章 クエン酸第二鉄の酸化ストレスマーカーに対する影響

第1節 緒言

静注鉄剤投与により亢進した酸化ストレスは、透析患者の動脈硬化病変の進展に関与する可能性があり、長期的な検討では、年間の静注鉄剤総投与量が多いほど内膜中膜肥厚度でみた動脈硬化の進展が高まることが報告されている (Weiss and Goodnough, 2005)。また、保存期 CKD 患者において、静注鉄剤投与により酸化ストレスマーカーの 1 つである血清中マロンジアルデヒド (MDA) 濃度が増加することが知られている (Agarwal et al., 2004)。

本試験では、無処置ラットを用いて、静注鉄剤 (含糖酸化鉄) を静脈内投与、あるいはクエン酸第二鉄水和物を経口投与した後の血清中 MDA 濃度をチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) 濃度として測定し、その変動を検討した。また、同時に血清鉄、不飽和鉄結合能 (UIBC) の変動を検討した。

第2節 材料及び方法

実験には雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (日本チャールスリーバー(株)) を用いた。7 週齢で入荷し、検疫・馴化の後、11 週齢において検討を開始した。動物は紫外線照射された水道水及び CRF-1 固形飼料 (オリエンタル酵母(株)、13.8 mg 鉄、1220 mg リン、810 mg カルシウム/100 g 飼料) を自由摂取させ、12 時間の明暗周期 (明期: 8~20 時、暗期: 20~8 時)、温度 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ に環境統御された飼育室で維持した。飼育は 3 匹/ケージにてブラケットケージで行った。

1 群あたり 5 匹の 4 群に無作為に群分けし、経口媒体群、クエン酸第二鉄群、静注媒体群、含糖酸化鉄群を設定した。経口媒体として 0.5%メチルセルロース水溶液 (MC、メトローズ® SM-1500、信越化学工業(株))、クエン酸第二鉄としてクエン酸第二鉄水和物 (リオナ®錠 250mg、日本たばこ産業(株)) を、静注媒体として 5%ブドウ糖注射液 (大塚糖液 5%、大塚製薬(株))、静注鉄剤として含糖酸化鉄 (フェジン®静注 40 mg、日医工(株))、それぞれ用いた。

また、各鉄剤の投与用量に関しては、以下のように設定した。すなわち、リオナ®錠 250mg (日本たばこ産業(株))、フェジン®静注 40mg (日医工(株)) の各医薬品インタビューフォーム記

載の臨床における1日最大用量を参考に、成人体重(60 kg)で除して算出した。

※クエン酸第二鉄水和物(リオナ®錠 250mg)の臨床用量及び用法:

「通常、成人にクエン酸第二鉄として1,500 mg~6,000 mgを1日3回食直後経口投与」より、

クエン酸第二鉄水和物として、 $6,000 \text{ mg} / 60 \text{ kg} = 100 \text{ mg/kg}$

※含糖酸化鉄(フェジン®静注 40mg)の臨床用量及び用法:

「鉄として、通常成人1日40~120 mgを2分以上かけて徐々に静脈内注射」より、
鉄として、 $120 \text{ mg} / 60 \text{ kg} = 2 \text{ mg/kg}$

上記設定用量に従い、各鉄剤投与液を以下のように調製した。すなわち、クエン酸第二鉄水和物については、メノウ乳鉢及び乳棒を用いて0.5%MC水溶液で20 mg/mLとなるように懸濁した(5 mL/kg、100 mg クエン酸第二鉄水和物/kg)。また、含糖酸化鉄については、フェジン®静注 40mgを大塚糖液5%で希釈し、鉄として2 mg/mLとなるように調製した(1 mL/kg、2 mg 鉄/kg)。

クエン酸第二鉄水和物を経口投与、若しくは含糖酸化鉄を静脈内投与したラットの尾静脈より、経時的(投与前、投与5分、30分、1時間、2時間、4時間、24時間後)に採血した。遠心分離処理により血清を分離して血清中TBARS濃度を、TBARS assay kit (Cayman Chemical Company)を用いて、MDAをStandardとして測定した。

また、鉄関連パラメータ測定のため、上記4群とは別に、サテライト群としてクエン酸第二鉄水和物群と静注鉄群の2群(各群4匹)を追加し、上記と同様にクエン酸第二鉄水和物と含糖酸化鉄を投与して経時的(投与前、投与5分、30分、1時間、2時間、4時間、24時間後)に採血した。遠心分離処理により得られた血清サンプルについて、生化学自動分析器(Model 7180、日立製作所)により、血清中の鉄濃度、UIBCを測定した。

統計学的解析について、各鉄剤投与群とそれぞれの媒体群との比較について、経時的変化を検討するために、各測定データについて経時型分散分析により、投与群の効果、測定時点の効果及び投与群と測定時点の交互作用の解析を実施した。投与群の効果が有意であり、投与群と測定時点の交互作用も有意であった場合には、各時点においてF検定の結果に応じてStudentのt検定、若しくはAspin-Welchのt検定を用いて各投与群間の比較をした。なお、投与群の効果で有意差が認められなかった場合には、投与群間に有意差なしとした。有意水準は5%とした。

第3節 結果

含糖酸化鉄群と静注媒体群を比較した結果、投与5分～1時間後において、血清中TBARS濃度の有意な増加が認められた（図12）。これに対して、クエン酸第二鉄群と経口媒体群を比較した結果では、投与5分～24時間後のすべてにおいて血清中TBARS濃度に有意な変動は認められなかった。

次にサテライト群について、血清鉄濃度及びUIBCを測定した結果、含糖酸化鉄投与群では投与5分後より急激な血清鉄濃度の上昇が認められ、この上昇は時間経過とともに消失し、2時間後にはほぼ投与前のレベルまで減少した（図13-1）。UIBCでは投与5分～24時間後においてほとんど変動が認められなかった。これに対して、クエン酸第二鉄群では、投与30分後より血清鉄濃度の上昇が認められ、この上昇は4時間後まで持続し24時間後にはほぼ投与前のレベルまで低下した。UIBCでは投与30分後より低下が認められ、この低下は4時間後まで持続し24時間後にはほぼ投与前のレベルまで回復した。

次に、各時点における血清鉄濃度（平均値）とUIBC（平均値）の積み上げ棒グラフで示す（図13-2）。クエン酸第二鉄経口投与時には、「血清鉄+UIBC」にほとんど変動がなかったが、含糖酸化鉄の静脈内投与時には、血清鉄濃度の顕著な増加が認められている投与5分後～1時間後において、「血清鉄+UIBC」の増加が認められた。

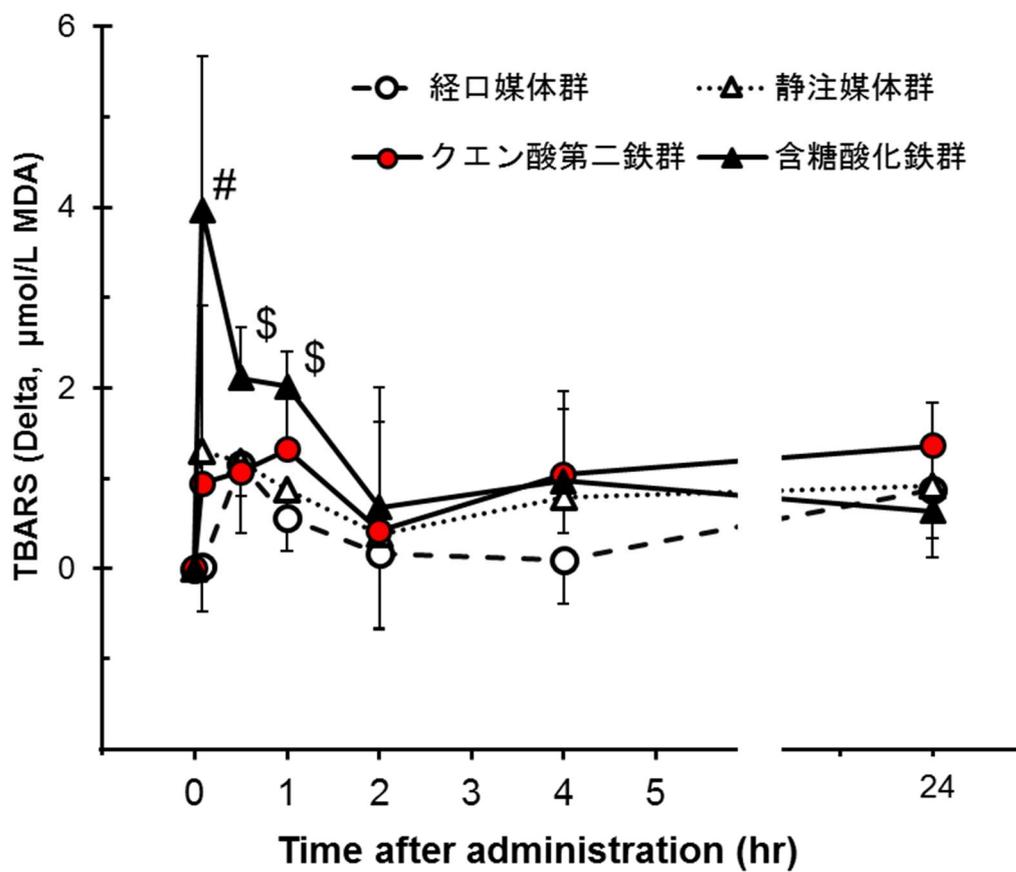


図 12. クエン酸第二鉄及び含糖酸化鉄の酸化ストレスマーカーに対する作用
 血清マロンジアルデヒド (MDA) 濃度の変化量。
 平均値±標準偏差. 媒体対照群と比較して、#, \$ $p < 0.05$.
 MDA 濃度をチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) 濃度として測定した
 宮崎 章他、2014 より改変転載.

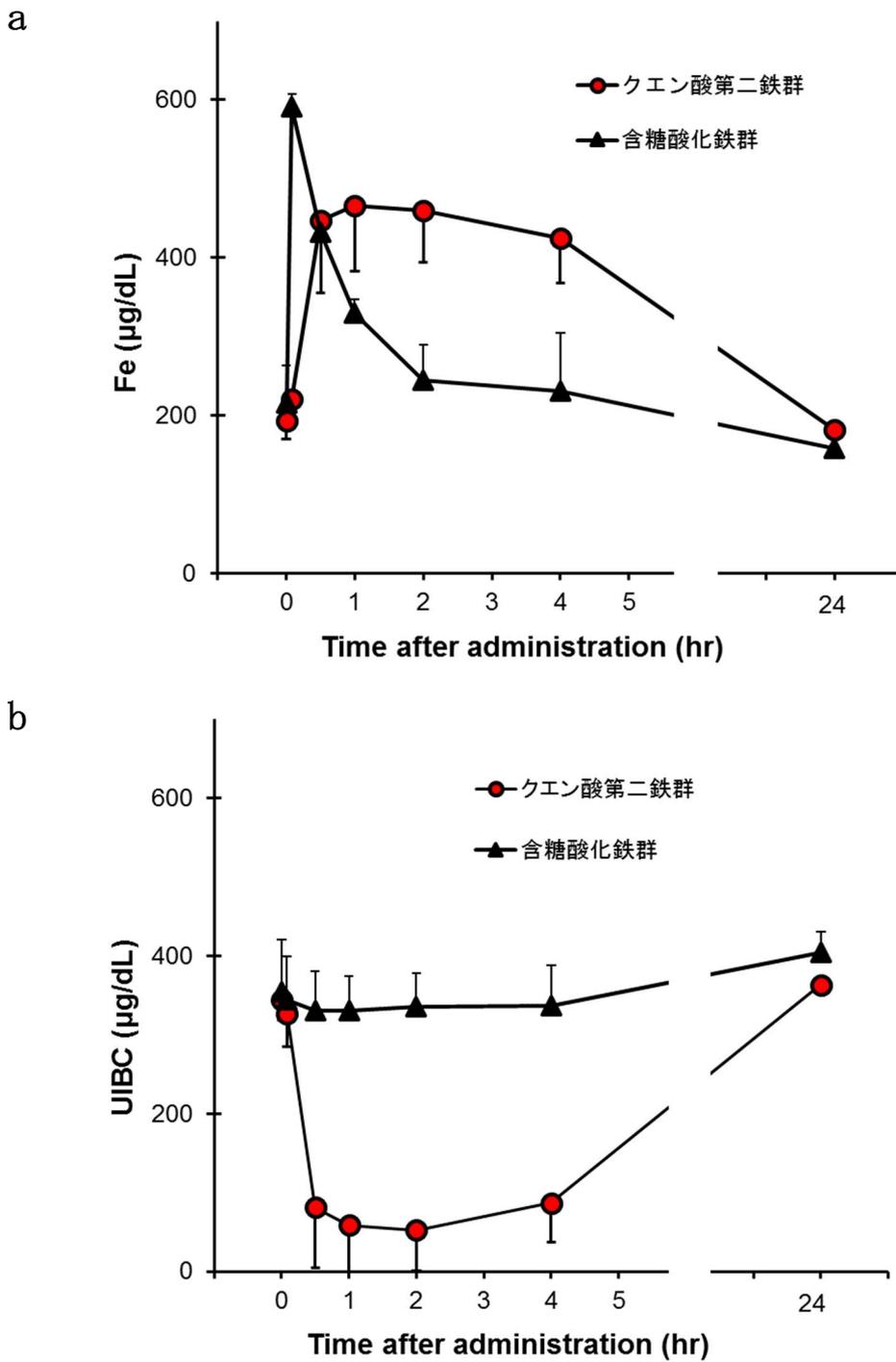


図 13-1. クエン酸第二鉄及び含糖酸化鉄の鉄代謝パラメータに対する作用
 a; 血清鉄濃度の経時変化、 b; UIBC の経時変化。
 平均値±標準偏差。媒体対照群と比較して、 #, \$p<0.05。
 宮崎 章他、2014 より改変転載。

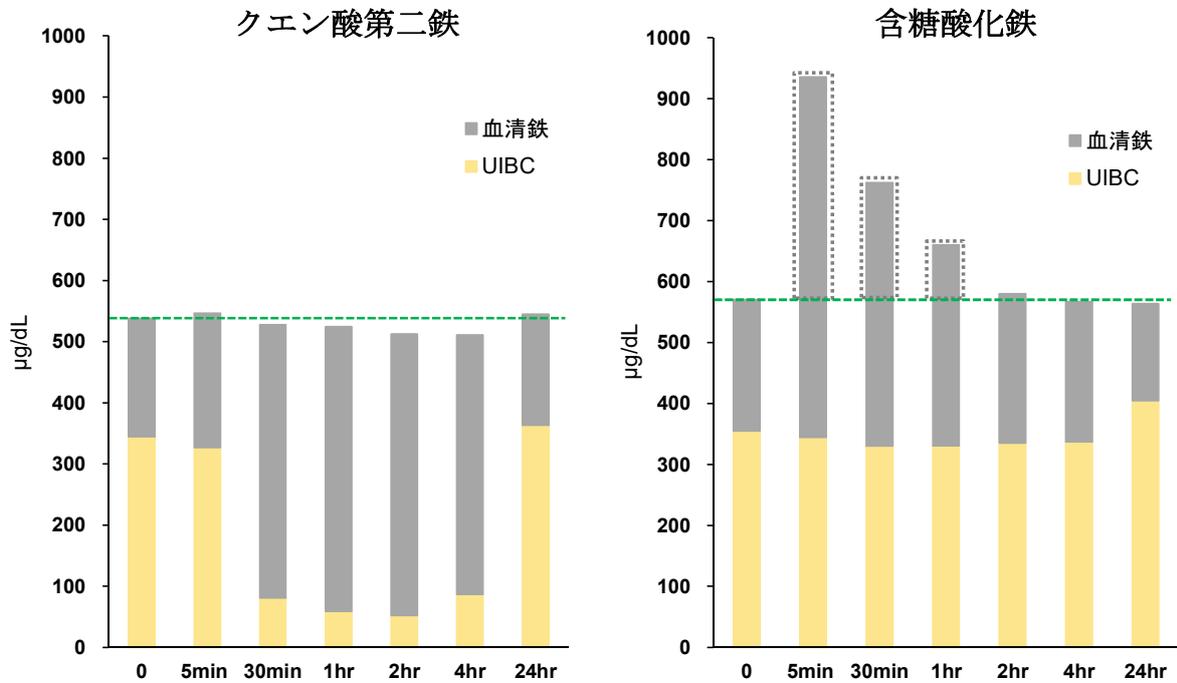


図 13-2. クエン酸第二鉄及び含糖酸化鉄の鉄代謝パラメータに対する作用
 b ; クエン酸第二鉄投与時の「血清鉄+UIBC」の平均値.
 c ; 含糖酸化鉄投与時の「血清鉄+UIBC」の平均値.
 破線は、投与前（横軸0時点）の「血清鉄+UIBC」(TIBC)を示している.
 破線で囲んだ部分は、非 Tf 結合鉄を表している.
 宮崎 章他、2014 より改変転載.

第4節 考 察

含糖酸化鉄の静脈内投与により投与5分～1時間後において血清中TBARS濃度の有意な上昇が認められた。この上昇の推移は保存期CKD患者において静注鉄剤の投与により血清中MDA濃度の上昇が認められている報告(Agarwal et al., 2004)とほぼ同様であった。含糖酸化鉄の静脈内投与では、血清鉄濃度が急激に上昇したにも関わらずUIBCの変動はほとんど認められなかった(図13-1)。通常、血清中では鉄のほとんどがトランスフェリンと結合して無毒化されており、クエン酸第二鉄経口投与時のように血清鉄濃度が上昇するとその分だけUIBCが低下する(「血清鉄+UIBC」は、ほとんど変動しない)(図13-2)。含糖酸化鉄の静脈内投与では、投与5分～1時間後においてトランスフェリンと結合していない鉄が(非トランスフェリン結合鉄として)血液中に存在しているものと考えられた。このようなトランスフェリンと結合していない鉄は血管内で徐々に不安定鉄に変化する可能性がある。不安定鉄はフェントン反応を介してヒドロキシラジカルを生成することがよく知られており、これが酸化ストレスの増大原因の1つであると考えられている(Koskenkorva-Frank et al., 2013)。したがって、このようなヒドロキシラジカルにより脂質が過酸化された結果、含糖酸化鉄の静脈内投与による血清中MDA濃度の増加が認められたのではないかと考えられた。

以上のことから、血清中MDA濃度を酸化ストレスの指標として、静注鉄剤は投与後短時間ではあるが酸化ストレスを亢進させることが本試験においても確認できたものと考えられる。また、少なくとも単回投与の条件では、クエン酸第二鉄水和物服薬時には鉄は図8-2で示したような生理的な吸収制御過程を経ることで、酸化ストレスの上昇を引き起こさない可能性が示唆された。また、本剤の血液透析患者対象の長期投与試験において、ヘモグロビン濃度が維持された中で静注鉄剤の使用量が減少してい

ることから（図 14）、静注鉄剤の投与による酸化ストレスの減少に繋がるものと考えられる。

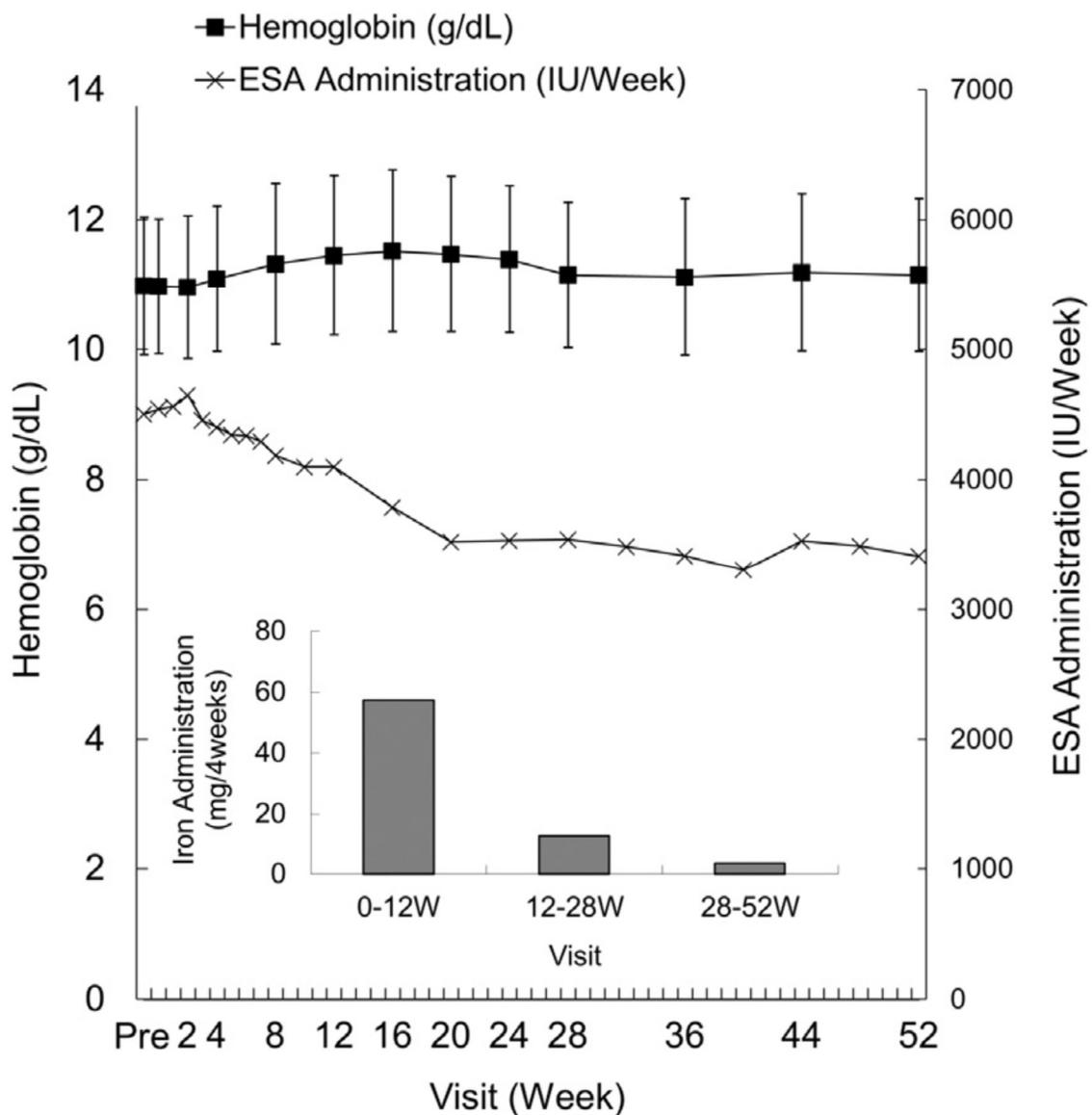


図 14. 血液透析患者対象 長期投与試験：ヘモグロビン、ESA 投与量及び静注鉄剤投与量の経時的推移

ヘモグロビン：平均値±標準偏差

ESA 投与量及び静注鉄剤投与量：平均値

ESA 換算量：遺伝子組み換えヒトエリスロポエチン：ダルベポエチン アルファ：エポエチンベータ ペゴル=1：200：200

Pre：投与開始日、W：weeks.

Yokoyama, Akiba et al., 2014 より転載.

第5節 要約

無処置ラットに、静注鉄剤である含糖酸化鉄を静脈内投与、あるいはクエン酸第二鉄水和物を経口投与した後、酸化ストレスマーカーの1つである血清中 MDA 濃度を TBARS 濃度として測定し、その変動を検討した。また、それぞれ投与時の血清鉄濃度、UIBC の変動を検討した。

血清中 TBARS 濃度については、含糖酸化鉄（鉄として 2 mg/kg）の静脈内投与により投与 5 分～1 時間後において有意な上昇が認められた。これに対して、クエン酸第二鉄水和物（100 mg/kg、鉄として 20.3 mg/kg）経口投与時には投与 5 分～24 時間後のすべてにおいて有意な変動は認められなかった。

また、含糖酸化鉄投与 5 分後より急激な血清鉄濃度の上昇が認められ、2 時間後にはほぼ投与前のレベルまで減少した。UIBC は投与 5 分～24 時間後においてほとんど変動が認められなかった。これに対して、クエン酸第二鉄水和物経口投与時には投与 30 分後より血清鉄濃度の上昇が認められ 24 時間後にはほぼ投与前のレベルまで低下した。UIBC は投与 30 分後より減少が認められ 24 時間後にはほぼ投与前のレベルまで回復した。この時、血清鉄濃度の上昇分と UIBC の低下分とはほぼ同等であった。

以上の結果より、血清中 MDA 濃度を酸化ストレスの指標として、静注鉄剤は投与後に酸化ストレスを亢進させることが本試験においても確認でき、クエン酸第二鉄水和物経口投与にはこのような酸化ストレスリスクは低い可能性が考えられた。また、クエン酸第二鉄水和物経口投与時に増加する血清鉄はそのほとんどがトランスフェリンに結合して安定な状態であるのに対し、静注鉄剤投与時に増加する血清鉄はそのほとんどがトランスフェリンに結合していない状態で（非トランスフェリン結合鉄として）存在しており、結果、一部の不安定鉄が酸化ストレスを引き起こす可能性が考えられた。

第5章 総括

鉄は生体内に多く存在し、ヘモグロビンの構成成分などとして生理的に働く金属元素であり、生体に必須の元素である。鉄含有化合物のうち、クエン酸第二鉄は食品添加物としての利用がある一方で、そのリン酸との結合能から、リン吸着剤としての可能性が見出された (Hsu et al., 1999)。さらに、食品添加物のクエン酸第二鉄とは異なる製造法を用いることにより、比表面積が大きく溶解速度が速い特性を有するクエン酸第二鉄水和物 (リオナ®錠 250mg) が開発された。非臨床試験 (Iida et al., 2013) のみならず、臨床試験において血清リン濃度低下作用が示され (Ganz et al., 2019; Yokoyama et al., 2012; Fishbane et al., 2017; Block et al., 2019; Yokoyama, Akiba et al., 2014)、保存期のCKD 患者も含め「慢性腎臓病患者における高リン血症」の効能・効果で承認され、リン吸着薬として医療現場で用いられている。

クエン酸第二鉄が適応症としているCKDにおいては、リンの体内貯留に伴う、異所性石灰化や、二次性副甲状腺機能亢進症、心血管イベント及び死亡といった重大なリスクに繋がるさまざまな合併症が引き起こされる (Block et al., 2013; Vervloet et al., 2017; Kestenbaum et al., 2005; Bellasi et al., 2011; Zoccali et al., 2011; Isakova, 2013; Vervloet and van Ballegooijen, 2018)。そうした重篤な合併症の進行を予防するためのリン吸着剤の選択肢の一つとして、クエン酸第二鉄が用いられている。

一方で、CKDの主要な合併症の一つに貧血が挙げられる。CKD患者のうち多くの患者が鉄欠乏性貧血を合併しており、その治療としてESA製剤や静注や経口の鉄剤が投与されている。鉄剤投与の観点からクエン酸第二鉄の作用を見たところ、先のCKD患者での臨床試験において、クエン酸第二鉄水和物は高リン血症を改善するだけでなく、

ヘモグロビン値や血清フェリチン値といった鉄代謝関連パラメータを上昇させた

(Yokoyama, Akiba et al., 2014)。すなわち、クエン酸第二鉄は高リン血症に対する血清リン濃度低下作用だけでなく、貧血改善作用も併せ持つ可能性が考えられる。CKD患者において、これら血清リン濃度低下作用と貧血改善作用の2つを併せ持つことは望ましいものであり、CKD患者においては、ESA製剤や静注・経口鉄剤の投与回数の減少による医療費軽減の経済的な面において、ある一定度の貢献につながるものと考えられる。一方で、CKDに罹患していない正常な腎機能を持つIDA患者においては、リンは生体に必要な元素であり、鉄補充の観点から貧血改善作用のみが望ましい。

本研究では、無処置ラット試験において、クエン酸第二鉄の3%の用量は、リン吸収抑制作用と同時に鉄代謝パラメータにも影響していたが、0.3%の用量ではリン代謝と鉄代謝のどちらにも影響は認められず、クエン酸第二鉄がリン代謝にのみ、あるいは鉄代謝にのみ作用しうるか否かは不明であった。そこで、鉄吸収調節機構の観点から、以下のような仮説を考えた。すなわち、クエン酸第二鉄の0.3%の用量は、無処置ラットにおいては鉄代謝に影響を示さなかったが、鉄欠乏性貧血状態においては鉄吸収抑制機構が解除されることにより、鉄が吸収され、鉄代謝に影響を与える可能性があると考えた。そこで続いての鉄欠乏性ラットを用いた検討では、クエン酸第二鉄の用量として0.3%の用量を設定し検討したところ、貧血関連パラメータの改善作用を示す一方で、リン代謝には影響を示さなかった。すなわち、同一の用量であっても生体の状態（鉄の充足状態）によってその作用発現が異なっており、0.3%の用量での投与は、無処置ラットにおいては鉄過剰とならないように鉄吸収抑制機構が発揮するため鉄代謝に影響を示さないが、鉄欠乏時には鉄吸収抑制機構が解除され、必要に応じて鉄吸収能が上昇していることが考えられた。以上より、クエン酸第二鉄は鉄欠乏性貧血状態においてリン代謝に影響することなく、造血作用を引き起こす可能性が示唆された。

今回、鉄欠乏食を給餌することにより鉄欠乏性貧血状態を再現し、クエン酸第二鉄の造血作用を確認した。一方で、鉄欠乏性貧血患者は炎症性疾患を伴っている場合がある。炎症時には hepcidin の発現誘導を介した、鉄の吸収と利用の抑制も起こっていることが考えられ (Fraenkel, 2017)、その場合、クエン酸第二鉄投与においても腸管からの鉄の吸収抑制が起こり、造血作用が起こりにくい可能性が考えられる。今回は実施していない炎症を伴った貧血モデルで検討することにより、その可能性を検討できるものと思われ、今後の検討課題である。

また、本検討では、鉄剤で懸念される酸化ストレスについても無処置ラットを用いて検討した。静注鉄剤である含糖酸化鉄では酸化ストレスマーカーの1つである血清中 MDA 濃度の上昇が認められたが、クエン酸第二鉄水和物を経口投与した後では変動は認められなかった。鉄関連パラメータの変動を合わせて考えると、クエン酸第二鉄の経口投与時に増加する血清鉄はそのほとんどがトランスフェリンと結合して安定な状態であると考えられる。一方で、今回は単回投与での検討結果であり、より長期投与での検討も必要と考える。Yokoyama らの血液透析患者対象とした長期投与試験の報告 (Yokoyama, Akiba et al., 2014) によれば、1年間の長期連投において鉄関連パラメータが定常状態になっており、鉄の吸収抑制機構が働いていると思われる。ただ、対象患者は血液透析患者であり、腎機能が正常の鉄欠乏性貧血患者とは鉄代謝の状態が異なる可能性も否定できない。今後、鉄欠乏性貧血患者での精査が必要であると共に、非臨床面からもクエン酸第二鉄の長期連投時のリン代謝と鉄代謝を検討することで、その特性をより深く把握することにつながるものと考えられる。

以上、クエン酸第二鉄の鉄代謝に対する作用とリン代謝に対する作用を同時に検討し、鉄欠乏性貧血モデルラットを用いて、クエン酸第二鉄がリン代謝に影響することなく、貧血改善作用を有する可能性を示した。また、クエン酸第二鉄の酸化ストレスに対する影響を静注鉄剤と同時に評価することにより検討し、クエン酸第二鉄は酸化

ストレスの上昇を引き起こさない可能性が示された。今後、さらなる別の貧血モデルでの検討や、より長期間の連投試験などを実施することにより、一人でも多くの患者への恩恵となるように、クエン酸第二鉄の作用及び疾患の理解を深めたい。

謝辞

本研究を取りまとめるにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました本学山田宜永教授に心より感謝致します。

また本論文をご精読頂き、貴重なご意見を頂戴しました本学 高田良三教授、杉山稔恵教授、中野優教授、板野志郎准教授、山城秀昭准教授、吉田智佳子助教、京都大学大学院農学研究科 太田毅教授、放送大学新潟学習センター 新村末雄所長に深謝致します。

最後に博士号取得に向けて支えてくれた同僚、家族に深く感謝します。

引用文献

- Agarwal, R., Vasavada, N., Sachs, N. G., Chase, S. (2004). Oxidative stress and renal injury with intravenous iron in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* **65**, 2279-2289.
- Anderson, G. J., Frazer, D. M. (2017). Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr* **106**, 1559S-1566S.
- Bellasi, A., Mandreoli, M., Baldrati, L., Corradini, M., Di Nicolò, P., Malmusi, G., Santoro, A. (2011). Chronic kidney disease progression and outcome according to serum phosphorus in mild-to-moderate kidney dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol* **6**, 883-891.
- Block, G. A., Ix, J. H., Ketteler, M., Martin, K. J., Thadhani, R. I., Tonelli, M., Wolf, M., Jüppner, H., Hruska, K., Wheeler, D. C. (2013). Phosphate homeostasis in CKD: report of a scientific symposium sponsored by the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* **62**, 457-473.
- Block, G. A., Pergola, P. E., Fishbane, S., Martins, J. G., LeWinter, R. D., Uhlig, K., Neylan, J. F., Chertow, G. M. (2019). Effect of ferric citrate on serum phosphate and fibroblast growth factor 23 among patients with nondialysis-dependent chronic kidney disease: path analyses. *Nephrol Dial Transplant* **34**, 1115-1124.
- DeLoughery, T. G. (2017). Iron Deficiency Anemia. *Med Clin North Am* **101**, 319-332.
- Fishbane, S., Block, G. A., Loram, L., Neylan, J., Pergola, P. E., Uhlig, K., Chertow, G. M. (2017). Effects of ferric citrate in patients with

- nondialysis-dependent CKD and iron deficiency anemia. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1851-1858.
- Fraenkel, P. G. (2017). Anemia of Inflammation: A Review. *Med Clin North Am* **101**, 285-296.
- Frazer, D. M., Wilkins, S. J., Becker, E. M., Murphy, T. L., Vulpe, C. D., McKie, A. T., Anderson, G. J. (2003). A rapid decrease in the expression of DMT1 and Dcytb but not Iregl or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut* **52**, 340-346.
- Ganz, T. (2007). Molecular control of iron transport. *J Am Soc Nephrol* **18**, 394-400.
- Ganz, T., Bino, A., Salusky, I. B. (2019). Mechanism of Action and Clinical Attributes of Auryxia[®] (Ferric Citrate). *Drugs* **79**, 957-996.
- Hsu, C. H., Patel, S. R., Young, E. W. (1999). New phosphate binding agents: ferric compounds. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1274-80.
- Iida, A., Kemmochi, Y., Kakimoto, K., Tanimoto, M., Mimura, T., Shinozaki, Y., Uemura, A., Matsuo, A., Matsushita, M., Miyamoto, K. (2013). Ferric citrate hydrate, a new phosphate binder, prevents the complications of secondary hyperparathyroidism and vascular calcification. *Am J Nephrol* **37**, 346-358.
- Iida, A., Matsushita, M., Ohta, T., Yamada, T. (2020). Conventional and novel impacts of ferric citrate on iron deficiency anemia and phosphorus metabolism in rats. *J Vet Med Sci.* in Press.
- Isakova, T. (2013). Comparison of mineral metabolites as risk factors for adverse clinical outcomes in CKD. *Semin Nephrol* **33**, 106-117.

- Kestenbaum, B., Sampson, J. N., Rudser, K. D., Patterson, D. J., Seliger, S. L., Young, B., Sherrard, D. J., Andress, D. L. (2005). Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **16**, 520-528.
- Kraft, M. D. (2015). Phosphorus and calcium: a review for the adult nutrition support clinician. *Nutr Clin Pract* **30**, 21-33.
- Lopez, A., Cacoub, P., Macdougall, I. C., Peyrin-Biroulet, L. (2016). Iron deficiency anaemia. *Lancet* **387**, 907-916.
- Pantopoulos, K., Porwal, S. K., Tartakoff, A., Devireddy, L. (2012). Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry* **51**, 5705-5724.
- Quarles, L. D. (2012). Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nat Rev Endocrinol* **8**, 276-286.
- Segawa, H., Yamanaka, S., Onitsuka, A., Tomoe, Y., Kuwahata, M., Ito, M., Taketani, Y., Miyamoto, K. (2007). Parathyroid hormone-dependent endocytosis of renal type IIc Na-Pi cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F395-403.
- Vaziri, N. D. (2013). Understanding iron: promoting its safe use in patients with chronic kidney failure treated by hemodialysis. *Am J Kidney Dis* **61**, 992-1000.
- Vervloet, M. G., Sezer, S., Massy, Z. A., Johansson, L., Cozzolino, M., Fouque, D.; ERA-EDTA Working Group on Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders and the European Renal Nutrition Working Group. (2017). The role of phosphate in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **13**, 27-38.
- Vervloet, M. G., van Ballegooijen, A. J. (2018). Prevention and treatment of

- hyperphosphatemia in chronic kidney disease. *Kidney Int* **93**, 1060-1072.
- Weiss, G., Goodnough, L. T. (2005). Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* **352**, 1011-23.
- Yokoyama, K. (2016). Phosphate metabolism and iron deficiency. *Clin Calcium* **26**, 241-249.
- Yokoyama, K., Akiba, T., Fukagawa, M., Nakayama, M., Sawada, K., Kumagai, Y., Chertow, G. M., Hirakata, H. (2014). Long-term safety and efficacy of a novel iron-containing phosphate binder, JTT-751, in patients receiving hemodialysis. *J Ren Nutr* **24**, 261-267.
- Yokoyama, K., Hirakata, H., Akiba, T., Fukagawa, M., Nakayama, M., Sawada, K., Kumagai, Y., Block, G. A. (2014). Ferric citrate hydrate for the treatment of hyperphosphatemia in nondialysis-dependent CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* **9**, 543-552.
- Yokoyama, K., Hirakata, H., Akiba, T., Sawada, K., Kumagai, Y. (2012). Effect of oral JTT-751 (ferric citrate) on hyperphosphatemia in hemodialysis patients: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Nephrol* **36**, 478-487.
- Zoccali, C., Ruggenenti, P., Perna, A., Leonardis, D., Tripepi, R., Tripepi, G., Mallamaci, F., Remuzzi, G.; REIN Study Group. (2011). Phosphate may promote CKD progression and attenuate renoprotective effect of ACE inhibition. *J Am Soc Nephrol* **22**, 1923-1930.
- 宮崎 章, 松尾 明, 飯田聡夫, 西野範昭, 前田和男, 松本 裕, 大類 諭 (2014). 新規高リン血症治療薬クエン酸第二鉄水和物 (リオナ®錠 250 mg) の薬理学的特性と臨床試験成績. *日薬理誌* **144**, 294-304.

Summary

Anemia is present in about a third of the world's population, and has been a serious and global public health problem that affects maternal and child mortality, and physical performance. About half of the cases are due to iron deficiency. Thus, iron deficiency anemia (IDA) is the most common, and fortunately also the most treatable of all anemias. There is an evolving understanding that iron deficiency can lead to symptoms independent of anemia and can be associated with a variety of diseases. For example, iron deficiency and iron deficiency anemia (IDA) are important signs of gastrointestinal hemorrhage. Two main mechanisms are known to exist in induction of iron deficiency. One involves absolute deficiency, and the other pertains to functional deficiency. Absolute iron deficiency means that total body iron stores are low or exhausted, and functional iron deficiency is a status of functional failure in iron supply. Functional iron deficiency can be induced in several chronic inflammatory diseases, including chronic kidney disease (CKD).

Patients with CKD frequently develop many complications, including hyperphosphatemia, ectopic calcification, secondary hyperparathyroidism, and anemia. Among them, CKD mineral bone disorders (CKD-MBD), including hyperphosphatemia, are associated with an increased risk of fracture, cardiovascular disease, and death. Therefore, CKD patients with hyperphosphatemia require treatment with phosphate binders to restore phosphate balance, in addition to treatment for anemia.

In such a treatment environment for CKD, iron-containing phosphate binders are used for hyperphosphatemia. Among them, ferric citrate is an iron-based compound with distinctive chemical characteristics and a mechanism of action that render it

dually effective as a therapy in patients with CKD; it has been approved as a phosphate binder for the control of serum phosphate levels in adult CKD patients treated with dialysis and as an iron replacement product for the treatment of IDA in adult CKD patients not treated with dialysis. It has been reported that ferric citrate improved hyperphosphatemia, and increased in hemoglobin, transferrin saturation (TSAT), and ferritin. Based on the clinical results of studies in patients with nondialysis-dependent CKD, ferric citrate could be a safe and efficacious treatment for IDA. From these clinical results, there is a possibility that ferric citrate could exert not only phosphate reducing effect, but also hematopoietic effect in advanced CKD patients. It is expected that, in theory, successful treatment of hyperphosphatemia and anemia in patients with CKD could help avoid adverse clinical outcomes; however, with the exception of renal replacement, no interventions have yet been proven to improve outcomes.

As mentioned above, IDA is common not only in CKD patients, but also in patients with other diseases. In such IDA patients with normal renal function, although it is possible that treatment with ferric citrate could improve iron deficiency anemia, ferric citrate might also reduce serum phosphorus level by inhibiting phosphorus absorption. However, actual clinical usage of ferric citrate for IDA patients has not been reported yet. Therefore, whether ferric citrate can improve iron deficiency anemia without affecting phosphorus metabolism in IDA patients with normal renal function remains unknown.

On the other hand, from the viewpoint of iron repletion, it is possible that ferric citrate might induce oxidative stress via excess absorption of iron. In general, it is thought that administration of iron agents can result in excessive

iron existing in the body as unstable iron that does not bind to transferrin, etc., leading to oxidative stress and organ damage. In addition, administration of intravenous iron has also been reported to increase oxidative stress markers. Thus, the overall effects of ferric citrate on oxidative stress also remain unclear.

To further understand the potential of ferric citrate as treatment for iron deficiency anemia, we examined the effects on anemia- and phosphorus metabolism-related parameters and oxidative stress in non-treated and iron-insufficient rats.

[Non-treated rat study]

In this study, we examined the effects of ferric citrate on both anemia-related parameters and phosphorus metabolism-related parameters in non-treated rats. Non-treated rats were fed a diet containing 0.3 or 3% ferric citrate for 11 days. The effects of ferric citrate on iron status- and phosphorus metabolism-related parameters were evaluated using blood and urine samples. Regarding anemia-related parameters, serum iron concentration and TSAT were increased by 3% ferric citrate treatment, although no changes were seen in hemoglobin or red blood cell (RBC) levels. Therefore, it was considered that a portion of the administered iron was absorbed into the body, and that 3% ferric citrate treatment could affect iron status. Regarding phosphorus metabolism parameters, serum phosphorus concentration and urinary phosphorus excretion in 3% Ferric citrate group were significantly decreased. As an additional investigation regarding phosphorus metabolism, it was shown that 3% ferric citrate treatment significantly decreased intact fibroblast growth factor 23 (iFGF23) level. These results suggested that 3% ferric citrate treatment exerted phosphorus-reducing effects and supplemented iron into the body.

On the other hand, 0.3% ferric citrate treatment did not induce any significant changes in serum iron concentration, TSAT, hemoglobin or RBC level, indicating that little iron would be absorbed due to the homeostasis of iron in this normal condition (Non-treated rat study). Furthermore, 0.3% ferric citrate treatment did not show significant decrease in serum phosphorus level or urinary phosphorus excretion. Taken together, it is possible that 0.3% ferric citrate treatment would not affect phosphorus metabolism in non-treated rats with normal renal function.

[Iron deficiency anemia rat study]

Next, we examined the effects of 0.3% ferric citrate treatment on iron status and phosphorus metabolism in rats with an iron-insufficient condition. Iron deficiency anemia was induced by feeding iron-depleted diet to rats (Day 1). Seven days after starting the iron-depleted diet (Day 8), 0.3% ferric citrate was administered for 7 days by dietary admixture (~Day 15). Iron status- and phosphorus metabolism-related parameters were evaluated using blood and urine samples. The results showed that first, iron-depleted diet induced reduction in serum iron concentration, TSAT, and hemoglobin level, leading to anemic condition; next, 0.3% ferric citrate treatment increased parameters related to iron status and improved anemia (serum iron level, TSAT and hemoglobin), but did not show any apparent changes in phosphorus metabolism-related parameters (serum phosphorus level, iFGF23 level, and urinary excretion of phosphorus). It was thus shown that 0.3% ferric citrate treatment could exert hematopoietic effects without inhibiting phosphorus absorption in iron deficiency anemia rats with normal renal function.

[Effects on an oxidative stress marker]

To examine effects on oxidative stress, rats were given intravenous administration of saccharated ferric oxide or oral administration of ferric citrate, and blood samples were collected via tail vein to measure serum malondialdehyde (MDA) concentration, an oxidative stress marker, as thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration. In addition, serum iron concentration and unsaturated iron-binding capacity (UIBC) were measured at each time point. Serum TBARS concentration was significantly increased from 5 minutes to 1 hour after intravenous administration of saccharated ferric oxide (2 mg / kg as iron). On the other hand, no significant change was observed from 5 minutes to 1 hour after oral administration of ferric citrate hydrate (100 mg / kg, 20.3 mg / kg as iron). In addition, serum iron concentration was increased rapidly 5 minutes after administration of saccharated ferric oxide, and it decreased to the level before administration 2 hours later. UIBC was not changed significantly throughout the experimental period. In contrast, when ferric citrate hydrate was administered orally, the serum iron concentration was increased 30 minutes after administration, and decreased to the level before administration 24 hours later. UIBC was decreased from 30 minutes after administration, and recovered to the level before administration after 24 hours. The above results obtained using serum MDA concentration as an index of oxidative stress confirmed that an intravenous iron agent could induce oxidative stress. Most of the serum iron increased by oral administration of ferric citrate hydrate would bind to transferrin and would be stable, whereas most of the serum iron increased by intravenous iron administration would not bind to transferrin, resulting in induction of non transferrin-bound

iron (unstable iron). As a result, some unstable iron might cause oxidative stress.

In conclusion, ferric citrate could have hematopoietic effects without affecting phosphorus metabolism and oxidative stress, and could be a potential option for the treatment of IDA in patients without CKD.