

# 鉄静注療法と不安定鉄

友杉直久 柴田央恵

金沢医科大学総合医学研究所先端医療研究領域加齢制御研究分野/腎臓内科

key words : 不安定鉄, 活性酸素, ヘプシジン, トランスフェリン受容体 2, DMT1

## 要 旨

静注用鉄剤には、コロイド鉄と遊離鉄が含まれている。注射後、コロイド鉄はマクロファージに貪食され細胞内の LIP に移行する。Tfn と結合した遊離鉄は TfR1 を介して、また Tfn と結合できない過剰の遊離鉄は  $\text{Fe}^{2+}$  に還元され、DMT1 を介して細胞内の LIP に移行する。このような過程で LIP が急速に上昇すると、細胞質に共存する  $\text{O}_2^-$  や  $\text{H}_2\text{O}_2$  が  $\text{Fe}^{2+}$  と反応して  $\cdot\text{OH}$  を発生させ、組織に傷害を与えることになる。同時にヘプシジン 25 産生が亢進し、鉄の回転利用が低下する。

## 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、鉄静注療法は鉄補充療法として臨床現場では広く行われている。しかしながら、鉄総量がわずか 3~4 mg 程度の血液中に、40 mg もの静注用鉄剤が突然投与されれば、鉄代謝系が攪乱されることは容易に想像がつく。静注用鉄剤の有効性ばかりが目され、急速な鉄補給に伴う酸化ストレス、動脈硬化の促進などの副作用に関しては、注意が払われていないのが現状である。鉄代謝制御機構が分子レベルで明らかになってくるにつれ、その問題点が徐々に明らかになっていく。体内では、個体レベル、細胞レベル、肝細胞レベルで鉄濃度をセンシングし、鉄は非常に厳

密に制御されている。それは、鉄が元来危険なものであるからであろう。本稿では、鉄の危険性を理解し、安全な領域での鉄利用を考えたい。

## 1 静注用鉄剤に含まれる不安定な鉄

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、安定化剤に基づいて、一般的にデキストラン（デキストリン）鉄、スクロース鉄、グルコン酸鉄に分類される（表 1）<sup>1,2)</sup>。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認められる。

遊離鉄の含有量は、*in vitro* 実験では、鉄と結合していないアポ・トランスフェリン（Tfn）と製剤を反応させることにより検出できる。アポ Tfn と遊離鉄が結合すると、1 個または 2 個の遊離鉄  $\text{Fe}^{3+}$  が結合した  $\text{Fe}^{3+}$ -Tfn や  $2\text{Fe}^{3+}$ -Tfn が形成される。Urea-PAGE 法は、この 3 種類の Tfn を電気泳動で分類することができる。Tfn と各種製剤の反応を、Urea-PAGE 法で解析した報告では<sup>3)</sup>、デキストラン鉄は Tfn に結合する遊離鉄はほとんど検出されていないが、グルクロン酸鉄では飽和 Tfn が増加しており、多量の遊離鉄の存在が示されている（図 1-A）。

われわれも Urea-PAGE 法を用いて、各種製剤（デキストラン鉄；インフェド、クエン酸加デキストリン鉄；シデフェロン、スクロース鉄；ペノファ、含糖酸

表1 静注用鉄剤の性状

型	一般名	商品名	分子量 (kDa)	安定度	不安定鉄	アナフィラキシー (頻度, %)	組成 (化学式)
type I	デキストラン鉄	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	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	スクロース鉄	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	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	グルコン酸鉄	フェレシット	289~440	不安定	+++	0.04	$[\text{NaFe}_2\text{O}_3(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)(\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11})_5]_n$

(文献1,2より改編)

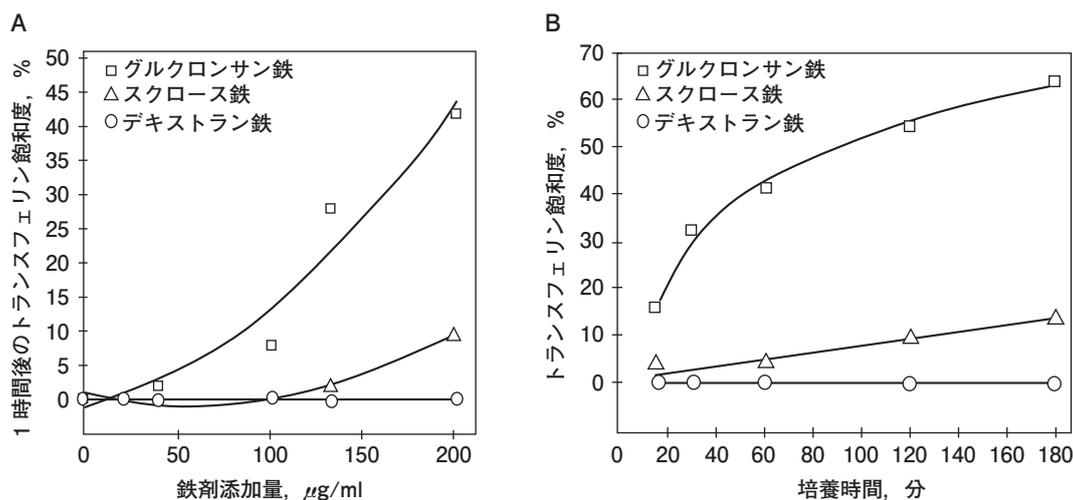


図1 Urea-PAGE 解析法を用いた、鉄静注剤に含まれる遊離鉄とトランスフェリン (Tfn) との結合反応飽和度の検討

グルクロン酸鉄、スクロース鉄は、添加量を増やすにつれ (A)、また反応時間依存性に (B)、Tfn との結合量 (飽和率) が増加する。デキストラン鉄では、Tfn との結合はない (文献1より引用)。

化鉄; フェジン, グルクロン酸鉄; フェリシット) を解析し, 同様の結果を得ている。現在, 日本で使用できる唯一の含糖酸化鉄は, スクロース鉄と同等の遊離鉄を含有していた。以前に販売されていたシデフェロンには, デキストラン鉄と同様に, 遊離鉄はほとんど検出されなかった (日本透析学会発表, 2011)。

## 2 静注用鉄剤の細胞内への取り込み

### 2-1 コロイド鉄の取り込み

生理的には存在しない多量のコロイド鉄と遊離鉄  $\text{Fe}^{3+}$  は, 注射後どのように処理されているのだろうか。コロイド粒子は異物として, 主に肝臓, 脾臓, 骨髄, リンパ, 単球などの網内系細胞で貪食され<sup>4)</sup>, 細胞内に取り込まれる。endosome 内で水酸化第2鉄と安定化剤の結合が切れ,  $\text{Fe}^{3+}$  が Steap 3 で還元され  $\text{Fe}^{2+}$  となり<sup>5)</sup>, divalent metal transporter 1 (DMT1) を介して細胞内に放出され<sup>6)</sup>, 不安定鉄 (labile iron

pool; LIP) を経由して, 一部はフェリチンに貯蔵鉄として蓄えられ, また鉄輸送膜蛋白質フェロポルチン (Fpn) を介して血中に放出される (図2の①)。つまり, コロイド鉄はプロドラッグといえる。

### 2-2 遊離鉄に対する2経路

一方, 多量の遊離鉄は二つの生理的経路で細胞内に取り込まれる。遊離鉄  $\text{Fe}^{3+}$  は Tfn と結合して  $2\text{Fe}^{3+}$ -Tfn となり, トランスフェリン受容体 (TfR1) を介して細胞内に取り込まれ (図2の②), 酸性の lysosome 内で Tfn から解離し, Steap 3 で  $\text{Fe}^{2+}$  となり, DMT1 を介して細胞質内に放出され, LIP に移行する。Tfn-TfR1 は再度膜上にリクルートされる<sup>7)</sup>。

製剤中の遊離鉄の量が, すべて Tfn と結合できると仮定しても, それには時間がかかる (図1-B)。さらに, Tfn 飽和能を超えて投与されれば, 血中には長時間遊離鉄が存在することになる。Tfn に結合できない

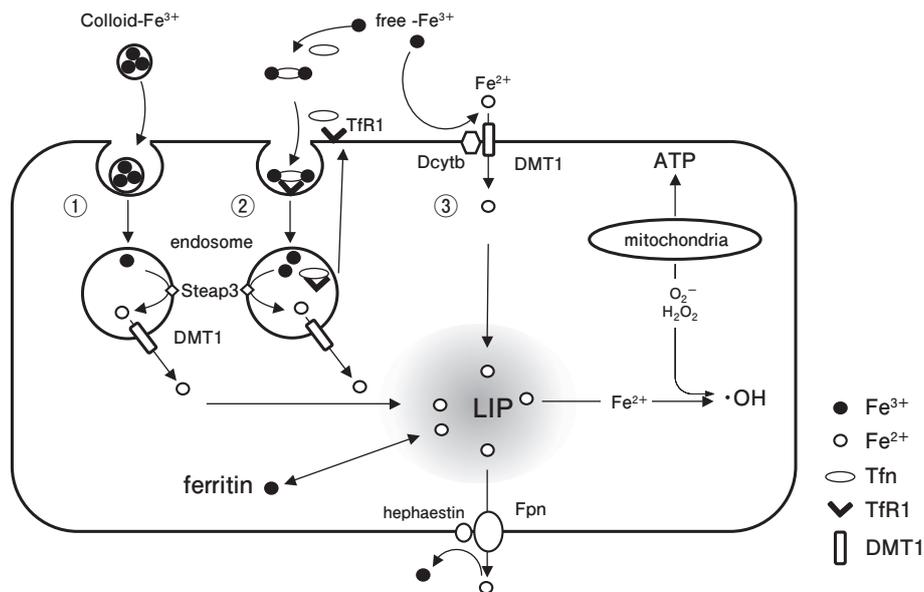


図2 コロイド鉄と遊離鉄の細胞内への移行系路

コロイド鉄はファゴサイトーシス（食食）で①、遊離鉄はTfnと結合しTfR1から②、また遊離鉄はDcytbで $\text{Fe}^{2+}$ に還元されDMT1を介して③、細胞内に取り込まれる。コロイド鉄はendosome内で安定剤が分解され $\text{Fe}^{3+}$ が遊離し、またendosome内の酸性環境でTfR1で運ばれたTfn鉄から $\text{Fe}^{3+}$ が遊離し、いずれもSteap3で $\text{Fe}^{2+}$ に還元され、DMT1を介して細胞質に放出され、LIPに移行する。過剰の鉄はferritinとして貯蔵され、必要に応じてFpnを介して血中に放出される。LIPが増大すると、ミトコンドリア由来の活性酸素（スーパーオキシドや過酸化水素）と反応し、傷害性の強いヒドロキシラジカルが発生する（文献5, 6, 7より改編）。

過剰の遊離鉄はnon-transferrin binding iron (NTBI) と呼ばれ、クエン酸やアルブミンと結合しているが、細胞膜上の $\text{Fe}^{3+}$ 還元酵素であるduodenal cytochrome B (Dcytb)により $\text{Fe}^{2+}$ に還元され<sup>4)</sup>、肝細胞ではDMT1やZIP14を介して<sup>8)</sup>、心筋細胞ではL-type voltage dependent calcium channel<sup>9)</sup>を介して細胞内に取り込まれ（図2の③）、直接LIPに移行する。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いる<sup>10)</sup>。

### 3 静注用鉄剤に対する生体の監視機構 — 血清鉄濃度のセンサー TfR2

脊椎動物の進化の過程において、急速に多量の鉄が血液の中に入ってくることはありえないことであり、また、むしろ脊椎動物は、鉄を補給することが困難な環境で進化してきた経緯もあり、鉄に対する排泄系を持たずに、血清鉄濃度を一定の範囲に維持するため、少量の鉄を回転させながら再利用する特異な鉄代謝系を作り上げたと思われる。このような状況で、想定外の多量の鉄が血中に投与されると、まず血清鉄濃度に対するセンサーTfR2が異常高値であることを感知し、

緊急情報としてヘプシジン25を分泌し、血中には鉄の供給が必要ではないことを徹底させる。生理的な鉄代謝制御機構を確認しておく。

鉄はヘム鉄としてヘモグロビンに取り込まれ酸素を運搬し続け、通常4カ月程度で老化赤血球はマクロファージで貪食され、ヘム鉄はHO-1で分解されフリーの鉄に戻り、血中への新たな鉄の供給源となる。つまり、古い赤血球の鉄が、新たな赤血球を作るための材料として回転再利用されており、赤血球内に多量の鉄が貯蔵されていると捉えることができる。この貯蔵鉄を回転再利用するために、様々な機能分子が準備されている（図3）。

#### 3-1 トランスフェリン受容体からの鉄の取込み、 フェロポルチンから鉄を供給

骨髄赤芽球は、TfR1を介して血清鉄を時間あたり0.8~1mg取り込み、新規にヘムを合成している。血液中の鉄の総量は3~4mgときわめて少なく、これを補うために、老化赤血球を処理したマクロファージから血清中へ鉄が供給されている。食物中の鉄を吸収した十二指腸上皮細胞や、鉄を貯蔵している肝細胞から

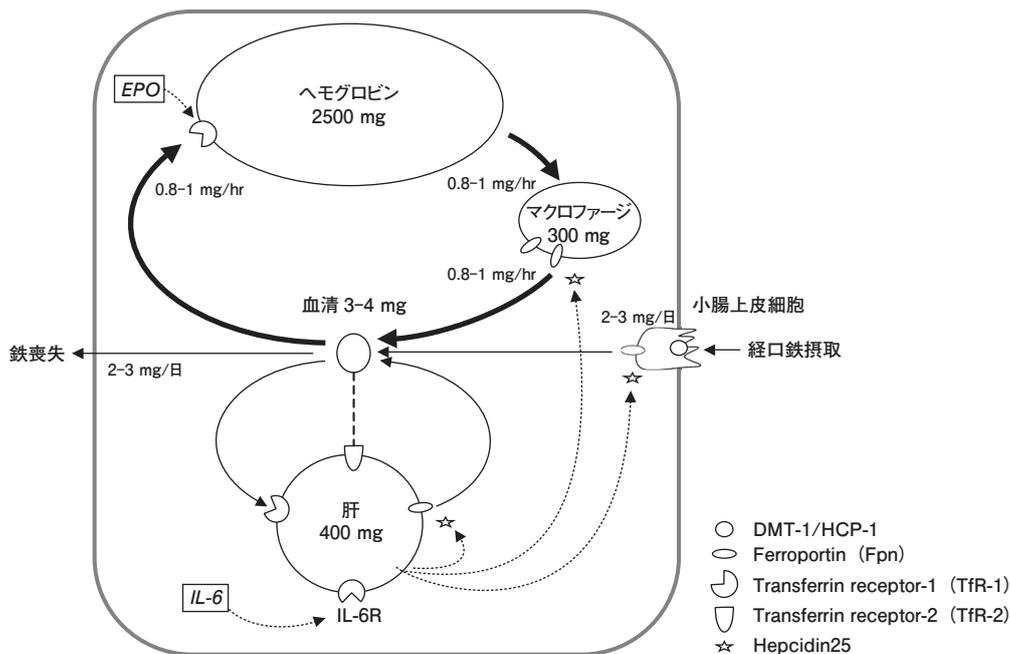


図3 鉄の回転利用：血清鉄濃度を一定に保つフィードバック機構

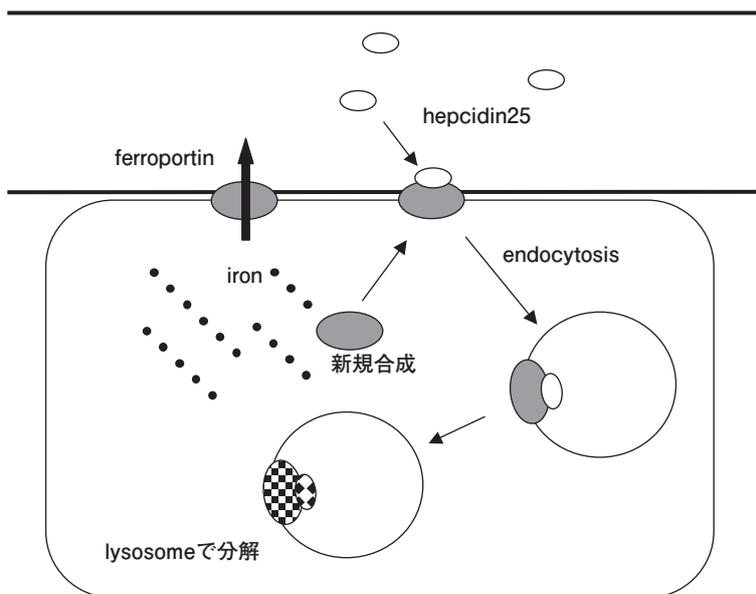


図4 ヘプシジン 25 の作用機序

も血清中には鉄が供給されるが、主たる供給源はマクロファージである。血中への鉄の供給は、いずれの細胞からも鉄輸送膜蛋白である Fpn を介して、細胞質内にプールされている LIP から効率よく  $Fe^{2+}$  が血中に放出され、細胞膜上の鉄酸化酵素ヘファスチンで直ぐに  $Fe^{3+}$  に酸化され Tfn と結合する。

Fpn の鉄輸送量はヘプシジン 25 により制御されている<sup>11)</sup>。Fpn はヘプシジン 25 と結合し、細胞内部に移行しライソゾームで分解される。そのさいヘプシジン 25 と共に Fpn 自体も分解されるため、Fpn が新規

に合成されるまでの 2~3 日間はその膜分布密度が低下し、細胞からの鉄放出量が減少することになる<sup>12)</sup>。つまり、ヘプシジン 25 の発現量により Fpn の膜分布密度が制御され、それに応じて血中へ鉄が供給されるのである (図 4)。

### 3-2 血清鉄のセンサー TfR2 とヘプシジン 25 によるフィードバック機構

それでは、血清ヘプシジン 25 の発現はどのように制御されているのであろうか。肝細胞膜上の TfR2 は、

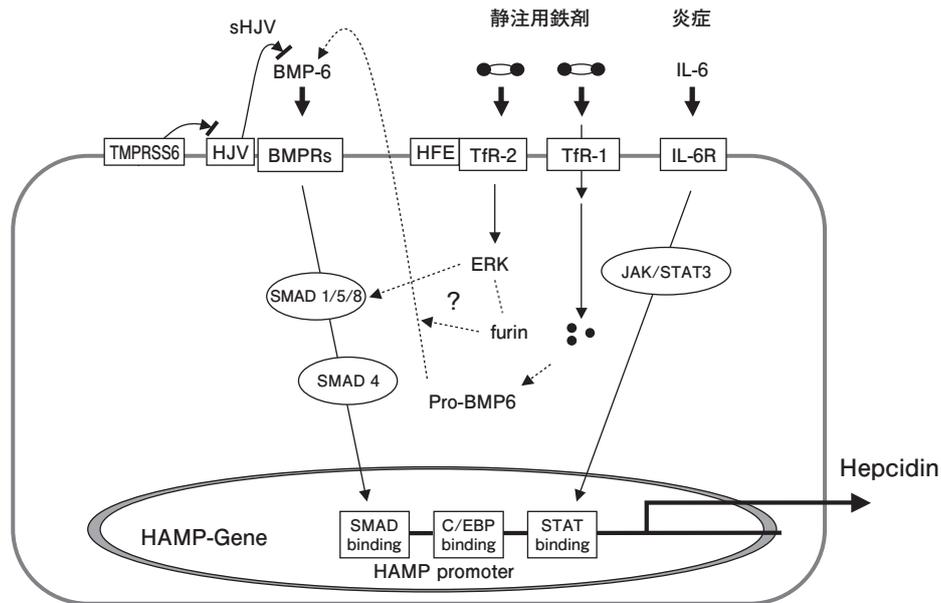


図5 血清鉄のセンサー TfR2 とヘプシジン 25

細胞膜上で HFE と複合体を形成して、血清鉄濃度を感知するセンサーとして機能している<sup>13)</sup>。HFE-TfR2 複合体の下流には hemojuvelin と bone morphogenetic protein 受容体の複合体があり、SMAD 系を介してヘプシジンのプロモーターへのシグナルを伝え、ヘプシジン産生を制御している (図 5)。血清鉄濃度が上昇すれば TfR2 を介してヘプシジン 25 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れば、TfR2 を介してヘプシジン 25 産生量は抑制され、Fpn を介する鉄供給量が上昇し、血中への鉄供給量が増加する。つまり、この TfR2-ヘプシジン系は、血清鉄濃度を一定に保つためのフィードバック機構なのである。

このフィードバック機構の中に、製剤が投与され血中鉄濃度が上昇すると、TfR2 を介して著明なヘプシジン 25 の上昇を引き起こし、Fpn の密度を低下させ、血中への鉄の放出を抑制し、鉄の回転を 2~3 日間止めてしまうのである。このヘプシジン 25 の上昇は、遊離鉄を多く含む製剤ほど著明である (日本透析学会発表, 2011)。

#### 4 危険な鉄

静注用鉄剤のリスクに関しては、多くの報告がなされている。従来の研究では、分子量の大きな製剤は、アナフィラキシーなどのショックが多く、低分子の製剤は臓器障害が多いとされている<sup>14, 15)</sup>。透析症例にお

いても、静注用鉄剤投与により酸化ストレスが増大することが報告されている<sup>16)</sup>。

NTBI の多い遺伝性ヘモクロマトーシスの患者血清は、内皮細胞に対する単球の接着性を増大させ<sup>17)</sup>、炎症を引き起こし、血管壁のリモデリングに至ることが推測されている。また、ヒトボランティアでは、注射後に内皮細胞機能を示す FMD が低下することも報告されている<sup>18)</sup>。Sullivan は、心血管系の病変に対する鉄過剰のリスクを、1981 年に「鉄仮説」として初めて提唱した<sup>19)</sup>。この説を支持する研究として、1997 年には心筋梗塞に対する献血の有効性が報告されたが<sup>20)</sup>、賛否両論があり未だ結論が出ていない。問題は、心血管病変の進展には時間がかかることであり、鉄過剰の影響は臨床的に捉えにくいことを、絶えず考慮しておく必要がある。

#### 5 エネルギー戦略の落とし穴

—危険な要素はどこにあるのか

注射で多量の鉄が血中に投入された場合に、このような鉄代謝機能のどこで問題が起こるのであろうか (表 2)。脊椎動物の進化過程での重要な戦略は、ATP を産生するエネルギー戦略の一環として、造血系で酸素を運ぶ機構を作り、その運搬役に鉄を選んだことである。

脊椎動物は、ATP 産生のため体外から酸素を取り込み、各構成細胞に酸素を供給する機構、つまりヘム

表2 静注用鉄剤の注意事項

1. 製剤にはコロイド鉄と遊離鉄が含まれている。
2. 3つのコロイド鉄と遊離鉄の細胞内取り込み系路
  - コロイド鉄はマクロファージに貪食され LIP に移行する。
  - 遊離鉄は Tf<sub>n</sub> と結合して TfR1 を介して LIP に移行する。
  - Tf<sub>n</sub> と結合できない過剰の遊離鉄は、Fe<sup>2+</sup> に還元され DMT1 を介して LIP に移行する。
3. 血清鉄の監視センサー TfR2
  - 多量の遊離鉄は、Tf<sub>n</sub> と結合して TfR2 鉄センサーに感知され、hepcidin25 産生を亢進し、鉄の回転再利用を抑制する。
4. 危険な鉄の注射の結果
  - ヘモグロビンが改善し、過剰鉄が ferritin に貯蔵される。
  - LIP の急激な上昇により活性酸素が発生し、組織に傷害を与える。
5. 安全性の考慮
  - LIP の変動を極力小さくする。
  - 鉄の回転利用を妨げない。
  - 1 回投与量は少なく (5 mg 程度か)、持続的に投与する。

鉄で酸素を運ぶヘモグロビンを利用した循環システムを持っている。ヘモグロビンは、1日 200~250 L もの酸素を肺から取り入れミトコンドリアへ運び、電子伝達系の 1 対の電子とプロトン (還元当量) が酸化され、その過程で ATP が産生される。

ミトコンドリア内膜の電子伝達系では<sup>21)</sup>、供給された酸素分子の大部分は還元され水分子になるが、複合体 I や III から漏れ出た 1% 程度の電子は、酸素分子に渡されスーパーオキシド (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) が生成される (図 2)。これは SOD ですぐに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> になり細胞質に拡散していき、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はカタラーゼやグルタチオン・ペルオキシダーゼで水になる。また、活性酸素はミトコンドリア以外でも、大腸上皮、血管平滑筋、血管内皮、遠位尿管上皮、甲状腺上皮細胞などの細胞膜に存在する NADPH オキシダーゼ (Nox, Duox) を介しても生成されているが<sup>22, 23)</sup>、同様に上記酵素で処理されている。このように生成した O<sub>2</sub><sup>-</sup> や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は毒性は強くはないが、その場に Fe<sup>2+</sup> が存在すると、Haber-Weiss-Fenton 反応のため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。

ここで注目すべきことは、すべての細胞がミトコンドリアを持ち ATP を獲得しており、個々の細胞の中では活性酸素と LIP が共存していることである。そのため、このエネルギー戦略を利用し始めた生命体は、少量の鉄を効率よく回転再利用することで LIP を最小限にして、この危険性を避けているものと考えられる。

このような代謝系の中に静注用鉄剤を投与することは、強制的に細胞内 LIP を増加させることを意味して

おり、ヒドロキシラジカルを発生させる危険性を絶えず意識しておく必要がある。酸素と鉄は、いずれも生命体にとっては危険な物質であり、その安全域を守ることが重要なのである。活性酸素は、単なる有害物質ではなく、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は生理的なシグナル伝達機能を發揮していることも報告されているが<sup>24)</sup>、少なくとも、活性酸素と反応する LIP の不要な拡大は避けるべきである。

#### おわりに

鉄製剤の投与は、確かにヘモグロビンの改善には有効である。しかし、一気に生体内に鉄を投与することが、臨床的に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、評価指標が十分ではなく明らかになっていない。活性酸素は、感染、炎症、がん、動脈硬化、糖尿病、アルツハイマーなど、さまざまな疾患の病因となることも報告されているが、直接的な証明はなかなか困難である。これらの知見は、酸素と鉄を利用したエネルギー戦略に潜む、すぐには見えない落とし穴のように思われる。

透析医療は鉄を扱う機会の多い領域であり、LIP で・OH を産生させない、現時点で考えうる細心の注意を払う必要がある。そのためには、腎性貧血の治療として、静注用鉄剤でヘモグロビンを増やす方法は避けるべきであろう。まず、必要十分量の ESA を投与することにより、ヘモグロビン鉄量を増やし、ヘプシジン 25 を低く設定することができれば、フェリチン鉄量や LIP が少なくても、鉄の回転再利用は保つことができる。鉄は、赤血球内で確保するのが一番安全であ

る。

## 文 献

- 1) Silverstein SB, Rodgers GM : Parenteral iron therapy options. *Am J Hematol*, 76; 74-78, 2004.
- 2) Muñoz M, Gómez-Ramírez S, García-Erce JA : Intravenous iron in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 15; 4666-4674, 2009.
- 3) Agarwal R : Transferrin saturation with intravenous irons: an in vitro study. *Kidney Int*, 66; 1139-1144, 2004.
- 4) Sohn YS, Ghoti H, Breuer W, et al. : The role of endocytic pathways in cellular uptake of plasma non-transferrin iron. *Haematologica*, 97; 670-678, 2012.
- 5) Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, et al. : Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet*, 37; 1264-1269, 2005.
- 6) Shindo M, Torimoto Y, Saito H, et al. : Functional role of DMT 1 in transferrin-independent iron uptake by human hepatocyte and hepatocellular carcinoma cell, HLF. *Hepatol Res*, 35; 152-162, 2006.
- 7) Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF : pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80; 2258-2262, 1983.
- 8) Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H et al. : Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103; 13612-13617, 2006.
- 9) Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, et al. : L-type  $Ca^{2+}$  channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat Med*, 9; 1187-1194, 2003.
- 10) Sturm B, Goldenberg H, Scheiber-Mojdehkar B : Transient increase of the labile iron pool in HepG2 cells by intravenous iron preparations. *Eur J Biochem*, 270; 3731-3738, 2003.
- 11) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. : Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*, 306; 2090-2093, 2004.
- 12) De Domenico I, Lo E, Ward DM, et al. : Heparin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106; 3800-3805, 2009.
- 13) Robb A, Wessling-Resnick M : Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood*, 104; 4294-4299, 2004.
- 14) Faich G, Strobos J : Sodium ferric gluconate complex in sucrose : safer intravenous iron therapy than iron dextrans. *Am J Kidney Dis*, 33; 464-470, 1999.
- 15) Zager RA, Johnson AC, Hanson SY, et al. : Parenteral iron formulations : a comparative toxicologic analysis and mechanisms of cell injury. *Am J Kidney Dis*, 40; 90-103, 2002.
- 16) Lim PS, Wei YH, Yu YL, et al. : Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant*, 14; 2680-2687, 1999.
- 17) Kartikasari AE, Georgiou NA, Visseren FL, et al. : Endothelial activation and induction of monocyte adhesion by nontransferrin-bound iron present in human sera. *FASEB J*, 20; 353-355, 2006.
- 18) Rooyakkers TM, Stroes ES, Kooistra MP, et al. : Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction in vivo. *Eur J Clin Invest*, 32(Suppl 1); 9-16, 2002.
- 19) Sullivan JL : Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet*, 1; 1293-1294, 1981.
- 20) Tuomainen TP, Salonen R, Nyyssönen K, et al. : Cohort study of relation between donating blood and risk of myocardial infarction in 2682 men in eastern Finland. *BMJ*, 314; 793-794, 1997.
- 21) Grivennikova VG, Vinogradov AD : Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta*, 1757; 553-561, 2006.
- 22) Rokutan K, Kawahara T, Kuwano Y, et al. : Nox enzymes and oxidative stress in the immunopathology of the gastrointestinal tract. *Semin Immunopathol*, 30; 315-327, 2008.
- 23) Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, et al. : Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation*, 109; 227-233, 2004.
- 24) Miller EW, Tulyathan O, Isacoff EY, et al. : Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling. *Nat Chem Biol*, 3; 263-267, 2007.