

## 食事鉄の化学形態の違いがラットの鉄栄養状態に及ぼす影響

植村佳奈<sup>1)</sup>, 細見亮太<sup>1)</sup>, 福永健治<sup>1)</sup>, 西山利正<sup>2)</sup>, 吉田宗弘<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>関西大学化学生命工学部食品工学研究室\*, (<sup>2)</sup>関西医科大学公衆衛生学教室\*\*)

### Effect of Difference in Chemical Species of Dietary Iron on Iron Status in Rats

Kana UEMURA<sup>1)</sup>, Ryôta HOSOMI<sup>1)</sup>, Kenji FUKUNAGA<sup>1)</sup>, Toshimasa NISHIYAMA<sup>2)</sup>, Munehiro YOSHIDA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Yamate 3-3-35, Suita, Osaka 564-8680, Japan,

<sup>2)</sup>Department of Public Health, Kansai Medical University, Fumizono 10-15, Moriguchi, Osaka 570-8506, Japan

#### Summary

Four-week-old male Wistar rats were fed a AIN93G-based diet containing iron at a level of 20 µg/g as ferrous sulfate, ferric citrate, pig hemoglobin or a processed low-molecular-weight (LMW) heme iron for 4 weeks and effect of the difference in dietary iron source on iron nutritional status was examined. The highest iron contents in liver, kidney, small intestine, spleen and femur were observed in rats fed the diet containing ferrous sulfate. In the hemoglobin, hematocrit and serum iron, the highest values were also observed in the rats given ferrous sulfate, while the lowest values were observed in the rats given the LMW heme iron. Apparent iron absorption of the rats given ferrous sulfate or hemoglobin were 52 to 60 %, whereas that of the rats given ferric citrate or the LMW heme iron were 20 to 26 %. These results indicate that iron bioavailability of hemoglobin is lower than ferrous sulfate in rats and that of the processed LMW heme iron is lower than intact hemoglobin or ferric citrate.

鉄は、ヘモグロビンや各種酵素の構成成分であるため、鉄欠乏下では貧血や運動機能<sup>1)</sup>, 認知機能<sup>2)</sup>などの低下が生じる。また、経血損失と妊娠による需要の増大が必要量に及ぼす影響は大きい。平成18年度国民健康・栄養調査によれば、成人女性の鉄摂取量の中央値は6.5～7.0 mg/日であり<sup>3)</sup>, 食事摂取基準2010年版が定める月経のある成人女性の鉄の推定平均必要量である8.5～9.0 mg/日を大きく下回っている。実際、わが国の成人女性の貧血有病率は20%を上回っている<sup>4)</sup>。

貧血有病率を低下させるためには鉄の摂取を増やすことが必要と考えられる。しかし、鉄濃度の高いレバーや赤身の摂取を増やすことは、動物性脂質の摂取を増やすことにつながり、三大栄養素の摂取バランスの観点からは好ましくない。食事鉄の吸収率は平均で約15%と見積もられているが<sup>5)</sup>, 鉄の化学形態や食事中共存成分によって変動することが知られている。このため、食事鉄の吸収に影響を及ぼす要因を明らかにして、鉄の吸収率の高い食品の組み合わせを明らかにすれば、摂取量を増やすことなく吸収量を増やすことが可能であり、鉄栄養状態の改善につながると期待される。

多くの栄養学の教科書には、食事鉄はヘム鉄と無機鉄に

分類され、ヒトでは動物性食品に多いヘム鉄の吸収性が高いと記載されている<sup>6)</sup>。しかし、動物栄養試験で多用されるラットでは、ヘム鉄の無機鉄に対する優位性は確認できない。むしろ、無機鉄が二価の硫酸鉄である場合には、無機鉄がヘム鉄よりも利用性が大きいという報告の方が容易に見いだされる<sup>7)</sup>。このことの原因として、2つのことが考えられる。1つ目として、ヘム鉄吸収の律速段階はヘム鉄の分解であるが<sup>8)</sup>, ラットでは、この反応を触媒して無機鉄を遊離させる小腸粘膜中のヘムオキシゲナーゼの活性がヘム鉄を与えても増加しないため<sup>9)</sup>, ヘム鉄を十分に利用できないことがあげられる。そして、2つ目として、動物実験で使用されるヘム鉄標品の品質が劣化していることが考えられる。市販のヘム鉄標品の多くは、家畜の赤血球抽出物を酵素処理後、限外濾過したものであり、ヘモグロビンが低分子化した「低分子ヘム鉄」というべきものであるが、その製造過程においてヘムの変性や不溶化が生じる可能性がある。かりにラットにおけるヘム鉄の無機鉄に対する非優位性の理由に後者が関わっているとすると、「低分子ヘム鉄」を用いた実験の結果はきわめて人為的なものといえ、その解釈には慎重さが要求されることになる。

本研究では、硫酸第一鉄、クエン酸第二鉄、ヘモグロビ

\*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

\*\*所在地：守口市文園町10-15 (〒570-8506)

ン、およびヘモグロビンを酵素加水分解処理して得られた低分子ヘム鉄をラットに投与し、鉄の給源の違いがラットの鉄栄養に及ぼす影響を検討した。

## 実験方法

### 1. 実験動物と飼料

4週齢のWistar系雄ラット24匹を6匹ずつ4群に分け、それぞれに、AIN93G飼料<sup>10)</sup>から鉄塩を除いたものに鉄給源として硫酸第一鉄、クエン酸第二鉄、ヘモグロビン粉末、または低分子ヘム鉄粉末をそれぞれ鉄濃度20 µg/g添加した飼料を与え、樹脂製のケージを用いて4週間個別飼育した。飼育期間終了後、ネンブータル麻酔下で、腹部大動脈より血液を採取するとともに、肝臓、腎臓、小腸、脾臓および大腿骨を採取した。また、飼育終了前4日間にわたってケージ内の糞を回収した。なお、ヘモグロビン粉末はILS株式会社、低分子ヘム鉄は日本バイオコン株式会社から供与されたもの（いずれもブタ血液由来）を用いた。それぞれの鉄含有量は、ヘモグロビン粉末が0.31%、低分子ヘム鉄が1.6%だった。

### 2. 分析

採取した臓器は生理食塩水で十分に洗浄後、濃硝酸を用いて灰化し、フレーム式原子吸光光度計を用いて鉄を定量した。糞についても凍結乾燥後、細粉化し、その一部を濃硝酸で灰化し、同様に鉄を定量した。また、全血と血清に

ついては、血球計算と血清生化学検査（タンパク質状態、鉄関連、脂質関連、肝機能、および腎機能指標）を日本医学研究所に委託した。

### 3. 統計解析

得られた結果は一元配置分散分析で解析し、食事鉄の化学形態の影響を検討した。有意水準は危険率5%とした。分散分析において有意であった場合には、Turkey-Kramerの多重比較を用いて群間の差を検討した。

## 結果

Table 1に、各群ラットの体重と臓器重量をまとめた。体重については群間の差を認めなかったが、腎臓および小腸重量においてはヘモグロビン投与群、肝臓においてはヘモグロビン投与群と低分子ヘム鉄投与群が高値を示した。

Table 2に、採取した臓器中の鉄濃度をまとめた。いずれの臓器においても、硫酸鉄投与群が顕著に高い鉄濃度を示した。残りの3群間については有意差を認めなかったが、いずれの臓器においても低分子ヘム鉄投与群が低値を示す傾向があった。

Table 3に、各群ラットのヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血清鉄濃度、血清総鉄結合能（TIBC）および血清不飽和鉄結合能（UIBC）をまとめた。ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、血清鉄濃度については、硫酸鉄投与群が最高値を示し、低分子ヘム鉄投与群が最低値を示

Table 1 Body and tissue weights of rats fed experimental diets

Dietary iron	Whole body (g)	Liver (g/100 g BW)	Kidney (g/100 g BW)	Small intestine (g/100 g BW)	Spleen (g/100 g BW)
Ferrous sulfate	298 ± 9 <sup>a</sup>	4.00 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.70 ± 0.02 <sup>ab</sup>	2.96 ± 0.18 <sup>ab</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>
Ferric citrate	277 ± 6 <sup>a</sup>	3.69 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.02 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>a</sup>
Hemoglobin	283 ± 4 <sup>a</sup>	4.18 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.74 ± 0.01 <sup>b</sup>	3.32 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>
LMW heme iron*	287 ± 5 <sup>a</sup>	4.26 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.01 <sup>a</sup>	2.91 ± 0.16 <sup>ab</sup>	0.20 ± 0.01 <sup>a</sup>

\* Low-molecular weight heme iron.

Values are means ± SEM (n=6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 2 Tissue iron contents of rats fed experimental diets

Dietary iron	Liver (µg/g)	Kidney (µg/g)	Small intestine (µg/g)	Spleen (µg/g)	Femur (µg/g)
Ferrous sulfate	75.7 ± 5.2 <sup>b</sup>	51.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	10.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	130.1 ± 5.7 <sup>b</sup>	31.3 ± 3.6 <sup>b</sup>
Ferric citrate	31.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	42.4 ± 4.9 <sup>ab</sup>	8.7 ± 0.2 <sup>a</sup>	98.3 ± 9.6 <sup>a</sup>	14.7 ± 2.5 <sup>a</sup>
Hemoglobin	29.7 ± 2.7 <sup>a</sup>	41.6 ± 3.3 <sup>ab</sup>	8.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	84.3 ± 5.2 <sup>a</sup>	15.8 ± 1.4 <sup>a</sup>
LMW heme iron	25.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	36.4 ± 2.3 <sup>b</sup>	8.2 ± 1.2 <sup>a</sup>	80.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	10.8 ± 0.5 <sup>a</sup>

Values are means ± SEM (n=6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 3 Hemoglobin, hematocrit and serum iron, total iron-binding capacities (TIBC) and unsaturated iron-binding capacities (UIBC) of rats fed experimental diets

Dietary iron	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	Serum iron (µg/dL)	Serum TIBC (µg/dL)	Serum UIBC (µg/dL)
Ferrous sulfate	14.4 ± 0.2 <sup>c</sup>	40.9 ± 0.7 <sup>c</sup>	259 ± 8 <sup>c</sup>	577 ± 25 <sup>a</sup>	318 ± 22 <sup>a</sup>
Ferric citrate	10.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	30.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	97 ± 16 <sup>ab</sup>	737 ± 23 <sup>b</sup>	640 ± 37 <sup>b</sup>
Hemoglobin	11.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	32.3 ± 2.0 <sup>b</sup>	144 ± 31 <sup>b</sup>	753 ± 33 <sup>bc</sup>	609 ± 55 <sup>b</sup>
LMW heme iron	7.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	21.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	53 ± 5 <sup>a</sup>	901 ± 55 <sup>c</sup>	831 ± 55 <sup>a</sup>

Values are means ± SEM (n=6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

した。逆に、TIBCとUIBCにおいては、低分子ヘム鉄投与群が最高値、硫酸鉄投与群が最低値を示した。クエン酸鉄投与群とヘモグロビン投与群の間では、血清鉄においてヘモグロビン投与群が高値を示す傾向があったが、いずれも有意差は認められなかった。

糞中の鉄濃度の測定結果、総糞排泄量、飼料摂取量、飼料中鉄濃度を用いて、各群における鉄の見かけの吸収率を算出し、Table 4にまとめた。硫酸鉄とヘモグロビンに含まれる鉄の見かけの吸収率はいずれも52~60%の範囲にあったのに対して、クエン酸鉄と低分子ヘム鉄に含まれる鉄の見かけの吸収率は20~26%の範囲であり、明らかな差が認められた。

**Table 4** Apparent iron absorption of rats fed experimental diets

Dietary iron	Apparent absorption (%)
Ferrous sulfate	58.3 ± 3.6 <sup>b</sup>
Ferric citrate	21.0 ± 0.2 <sup>a</sup>
Hemoglobin	52.8 ± 0.2 <sup>b</sup>
LMW heme iron	25.6 ± 0.3 <sup>a</sup>

Values are means ± SEM (n=6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ )

**Table 5** Serum triglyceride, total cholesterol and total lipid contents of rats fed experimental diets

Dietary iron	Triglycerides (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Total lipids (mg/dL)
Ferrous sulfate	39 ± 3 <sup>b</sup>	78 ± 4 <sup>b</sup>	240 ± 9 <sup>b</sup>
Ferric citrate	26 ± 4 <sup>ab</sup>	65 ± 8 <sup>ab</sup>	191 ± 21 <sup>ab</sup>
Hemoglobin	21 ± 3 <sup>a</sup>	48 ± 1 <sup>a</sup>	143 ± 5 <sup>a</sup>
LMW heme iron	31 ± 3 <sup>ab</sup>	62 ± 3 <sup>ab</sup>	190 ± 10 <sup>ab</sup>

Values are means ± SEM (n=6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ ).

Table 5に、各群の血清脂質関連指標をまとめた。いずれの指標においても、ヘモグロビン投与群が低値を示した。なお、血清タンパク質および肝・腎機能指標については、群間の差をまったく認めなかった。

## 考 察

鉄の給源が異なる4種の飼料でラットを飼育したところ、ヘモグロビン投与群において、血清脂質濃度の低下が認められた。なお、データとしては示さないが、各ラットの糞中総脂質を測定し、ヘモグロビン投与群において脂質排泄量が多いことを確認している。これらのことは、ヘモグロビタンパク質の消化性が低いため、未消化分が消化管内容物中の脂質成分を吸着し、その吸収を阻害したことを示すと考えられる。ヘモグロビン投与群の小腸重量が他群よりも大きかったことと併せると、ヘモグロビタンパク質は一種の難消化性タンパク質として食物繊維様の作用<sup>11)</sup>をもつといえるだろう。

低分子ヘム鉄が開発された背景には、このようにヘモグロビタンパク質の難消化性があるといえる。しかし、Table 3に示した血球と血清鉄関連指標の測定結果は、4

群中で低分子ヘム鉄投与群の鉄栄養状態がもっとも低いことを示していた。ヘモグロビン投与群に比較しても明らかに鉄状態が悪かったということは、低分子化処理によって、ヘモグロビン中の鉄の利用性が低下したことを意味している。

低分子ヘム鉄は、豚などの家畜血液から遠心分離によって赤血球を回収し、これにプロテアーゼを加えてヘモグロビンのタンパク質部分を加水分解後、限外濾過によって低分子化したものだけを集め、濃縮後、乾燥させたものである。低分子ヘム鉄中の鉄の利用性が低かったことは、このプロセスにおいて、ヘムの変性・劣化が生じていることを意味する。ヘムの溶解性にはタンパク質部分が重要であり、タンパク質からヘムを遊離させると、不溶性になるために利用性が低くなることを指摘する研究者もいる<sup>12)</sup>。たしかに、今回用いた低分子ヘム鉄は水に対して不溶性であった。しかし限外濾過の段階では水溶性であったはずであるから、不溶化の原因は、ヘモグロビンをプロテアーゼ処理したことではなく、濃縮・乾燥段階にあると考えるのが自然である。この濃縮・乾燥操作は公表されていないが、おそらく噴霧乾燥などの加熱操作が含まれていると推定され、これによってヘムの化学変化と不溶化が生じたと思われる。低分子ヘム鉄については、可溶性をうたうものも市販されているが、今回用いた不溶性の標品については、鉄の栄養価が低下しており、これを動物実験における鉄の給源、あるいは、サプリメントや貧血治療用鉄補給剤の素材に用いるのは不適切といわざるを得ない。したがって過去の研究において、低分子ヘム鉄を用いているものについては、その標品を確認し、再評価する必要があると思われる

一方、ヘモグロビン中の鉄の利用率は、クエン酸鉄とはほぼ同等であったが、硫酸鉄には及ばなかった。今回の20 µg/gという鉄の投与水準は一般のAIN93G飼料の鉄濃度35 µg/g<sup>7)</sup>には及ばない。しかし、AIN93Gに含有されている鉄がクエン酸鉄であること、およびAIN93G飼料は微量栄養素を十二分に含有するように設計されていること、さらに硫酸鉄投与群のヘモグロビン濃度を考えると、硫酸鉄で20 µg/gという鉄の投与水準はラットの最少必要量に近いと判断する。ゆえに、硫酸鉄由来の鉄の利用性が最大であったのは、鉄投与水準が低くて無機鉄(二価鉄)の吸収性が通常よりも高まっていたということではなく、ラットではもともとヘム鉄よりも二価鉄の方が利用性が高いためと考えられる。

なお、食事鉄の栄養有効性検定法として、AOAC (American Official Analytical Chemists)は鉄欠乏食を用いて貧血ラットを作成し、これに被験鉄物質と対照物質である硫酸鉄を段階的に投与してヘモグロビン濃度の回復度を比較することを推奨している<sup>13,14)</sup>。しかし、強度の鉄欠乏下においては、小腸粘膜の2価鉄輸送担体のmRNAやヘム鉄吸収において律速となるヘムオキシゲナーゼのmRNAの発現量が増加していることが確認されている<sup>15,16)</sup>。このことは、貧血からの回復度を指標とするAOAC法は、一般

の食事を摂取している場合と異なる条件で食事鉄の有効性を検討していることを意味する。ゆえに今回は、実際の日本人の食生活に近い条件、すなわちラットの鉄の最少必要量に近い 20 µg/g という投与水準で食事鉄の有効性を比較した。

以上述べたように、ラットではヘム鉄の利用性が低いことは明らかである。しかし、糞中鉄排泄を測定して鉄の見かけの吸収率を算定したところ、ヘモグロビン鉄の見かけの吸収率はクエン酸鉄を大幅に上回り、硫酸鉄に匹敵するものであった。この矛盾の理由は不明である。ただし、今回の糞の回収法では糞食を防ぐことができないので、糞食の見かけの吸収率に及ぼす影響を否定できない。すなわち、ヘモグロビン投与群では、消化不良便が排泄されるため他群よりも糞食の程度が大きく、多くの鉄が消化管内容物中に残存していたのかもしれない。より精密な実験条件の設定、消化管内容物の分析などを行い、再検討する予定である。

### 参考文献

- 1) Lukaski HC (2004) Vitamin and mineral status: effects on physical performance. *Nutrition* 20: 632-644.
- 2) Murray-Kolb LE, Beard JL (2007) Iron treatment normalizes cognitive functioning in young women. *Am J Clin Nutr* 85: 778-787.
- 3) 健康・栄養情報研究会編 (2009) 国民健康・栄養の現状—平成 18 年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より—, 第一出版, 東京.
- 4) Takimoto H, Yoshiike N, Katagiri A, Ishida H, Abe S (2003) Nutritional status of pregnant and lactating women in Japan: A comparison with non-pregnant/non-lactating controls in the National Nutrition Survey. *J Obstet Gynaecol Res* 29: 96-103.
- 5) Food and Agriculture Organization/World Health Organization (1988) Requirements of Vitamin A, Iron, Folate and Vitamin B<sub>12</sub> (FAO Food and Nutrition Series No. 23), Rome: pp. 33-50.
- 6) 吉田宗弘 (2004) 無機質 (ミネラル) の栄養と水の役割. 基礎栄養学, 伏木 亨編 光生館, 東京: pp. 131-148.
- 7) Matsumoto J, Mori N, Doi M, Kishida T, Ebihara K (2003) Evaluation of iron bioavailability from bonito dark muscle using anemic rats. *J Agric Food Chem* 51: 4478-4482.
- 8) Raffin SB, Woo CH, Roost KT, Price DC, Schmid R (1974) Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. *J Clin Invest* 54: 1344-1352.
- 9) 村上亜由美, 岸本三香子, 川口真規子, 松浦寿喜, 市川富夫 (1997) 雌ラットにおける酵素処理ヘム鉄の生体利用性に及ぼす因子について. 武庫川女子大学紀要. 自然科学編 45: 113-118.
- 10) Reeves PG, Nielsen, FH Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
- 11) Matsuo M (2005) Serum cholesterol reduction by quinoa tempe, Quinoa fermented *Rhizopus oligosporus*, in rats fed with a cholesterol-free diet. *J Hom Econ Jpn* 56: 791-795.
- 12) Martinez-Torres C, Layrisse M (1971) Iron absorption from veal muscle. *Am J Clin Nutr* 24: 531-540.
- 13) AOAC (2000) AOAC Official Method 974.31: Bioavailability of Iron. Rat Hemoglobin Repletion Bioassay. In: Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed (ed by Horwitz W), AOAC International, Maryland, Chapter 45: pp. 67-68.
- 14) Wienk KJH, Marx JJM, Beynen AC (1999) The concept of iron bioavailability and its assessment. *Eur J Nutr* 38: 51-75.
- 15) Collins JF, Franck CA, Kowdley KV, Ghishan FK (2005) Identification of differentially expressed genes in response to dietary iron deprivation in rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288: G964-G971.
- 16) Collins JF (2006) Gene chip analyses reveal differential genetic responses to iron deficiency in rat duodenum and jejunum. *Biol Res* 39: 25-37.