

ラットの鉄栄養状態に及ぼす硫酸鉄およびヘモグロビン給餌の影響

中澤 知奈美, 柳井 美穂, 細見 亮太[†],
吉田 宗弘, 福永 健治
(関西大学化学生命工学部食品化学・栄養化学研究室*)

Differences in Iron Nutritional Statuses and Gene Expression Related to Iron Availability between Ferrous Sulfate and Hemoglobin in Rats

Chinami NAKAZAWA, Miho YANAI, Ryota HOSOMI, Munehiro YOSHIDA and Kenji FUKUNAGA
*Laboratory of Food and Nutritional Science, Faculty of Chemistry Materials and Bioengineering,
Kansai University*

Summary

This study investigated the effects of differences in ferrous sulfate and hemoglobin on iron nutritional statuses in rats. Male Wistar rats were fed an AIN93G-based diet containing iron at a level of 20 $\mu\text{g/g}$ as ferrous sulfate or porcine hemoglobin for 4 weeks. Iron nutritional statuses were measured through blood hemoglobin levels, organ iron contents, fecal iron excretion, and the intestinal mucosa mRNA expression levels of genes encoding proteins involved in iron and heme absorption. Rats fed a hemoglobin-containing diet had significantly lower blood hemoglobin levels, hematocrits, organ iron contents, and serum iron contents, and a higher serum total iron-binding capacity and serum unsaturated iron-binding capacity than rats fed a ferrous sulfate-containing diet. Apparent iron absorption by rats administered hemoglobin was significantly lower than that by rats given ferrous sulfate. In addition, the mRNA expression levels of the divalent metal transporter 1 and heme oxygenase 1 genes in the duodenal mucosa of the hemoglobin group may be induced by iron deficiency. These results indicate that the iron bioavailability of hemoglobin is lower than of ferrous sulfate in normal rats.

鉄は、赤血球のヘモグロビンの構成成分として酸素の運搬、筋肉のミオグロビンの構成成分として主に筋肉細胞内の酸素の貯蔵に働くとともに、生体内の電子伝達などの酸化還元反応に関わる酵素の成分として役割を担っている。そのため、鉄の摂取不足は貧血を招くことにつながる。日本人の鉄の平均摂取量は、とくに女性において、食事摂取基準の定める推奨量を下回っている¹⁾。生体内の鉄の損失は腸粘膜や皮膚の剥離によって起こるわずかなものであるが、慢性的な鉄摂取不足が続くと、貯蔵鉄が減少し、ヘモグロビン合成に支障をきたして鉄欠乏性貧血に陥る²⁾。とくに若年層女性では、過度なダイエットによる栄養不足から引き起こされる鉄欠乏性貧血もみられている³⁾。そのため、体の成長、月経、妊娠期といった鉄の需要が増す年代における鉄欠乏性貧血が問題となっている。

われわれが摂取する鉄の化学形態は動物性食品に含まれるヘム鉄と植物性食品に含まれる無機鉄（非ヘム鉄）に分けられ、食物から摂取される鉄の約90%はヘム鉄である

と報告されている⁴⁾。鉄の吸収効率は化学形態によって異なり、一般にヘム鉄が高く、無機鉄は低いとされている。これらのことから食事から鉄を有効な形態で摂取することが推奨されている。そのため、鉄不足を補うサプリメントとして、ヘモグロビンを主成分とするヘム鉄が利用されている。われわれが以前行ったラットを用いた栄養試験において、ヘム鉄よりも無機鉄（硫酸鉄）の方が鉄の利用効率が高い結果が得られているが、見かけの吸収率はほぼ同じという矛盾が生じていた⁵⁾。以前の実験において矛盾した結果が得られたことから、本研究では鉄源をヘモグロビンおよび硫酸鉄とした餌料をラットに給餌し、代謝ケージを用いて見かけの吸収率を求め、鉄栄養有効性を再評価した。さらに小腸粘膜の鉄吸収関連遺伝子の mRNA 発現量も併せて検討を行った。

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

[†]連絡先 (Corresponding Author), Tel: 06-6368-1765, E-mail: hryotan@kansai-u.ac.jp

実験方法

1. 餌料調製

ヘモグロビン粉末は東京化成工業株式会社（東京）より購入した（Hemoglobin from Swine, 製品コード：H1293）。AIN-93G 組成⁶⁾ から鉄塩を除いたものに硫酸第一鉄またはヘモグロビン粉末で 20 $\mu\text{g/g}$ になるように調製した（Table 1）。

2. 動物実験

本実験は関西大学化学生命工学部実験動物実験委員会の承認を受けて実施した。実験動物には 4 週齢 Wistar 系雄ラット（日本エスエルシー株式会社、静岡）を用いた。14 匹を 7 匹ずつ 2 群に分け、その各々に調製した餌料を与えた。ラットは室温 22°C \pm 1°C の飼育室内で、明暗 12 時間サイクル（8:00 ~ 20:00）の条件下で飼育した。餌料および水は自由摂取とし、28 日間飼育した。また、飼育終了前 3 日間に出納試験を実施した。出納試験にはステンレス製代謝ケージ（株式会社夏目製作所、東京）を使用し、糞を毎日分離採取した。飼育期間終了後、ソムノベンチル（共立製薬株式会社、東京）による深麻酔下で腹部大動脈より採血し、肝臓、腎臓、脾臓、十二指腸粘膜、空腸粘膜、回腸粘膜および脛骨を採取した。血液は 2,000 \times g、15 分間遠心分離し、血清を得た。肝臓、腎臓、脾臓、十二指腸粘膜、空腸粘膜、回腸粘膜および脛骨は液体窒素にて凍結し、-80°C で分析まで保管した。十二指腸粘膜および空腸粘膜の一部は RNeasy Tissue Storage Reagent（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京）に浸漬して -80°C で分析まで保管した。

Table 1 Compositions of experimental diets

	Groups	
	Ferrous sulfate	Hemoglobin
Dextrinized corn starch	132	132
Corn starch	397.486	397.486
Sucrose	99.904	100
Cellulose	50	50
Casein	200	191.8
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
AIN-93 vitamin mixture	10	10
Iron-free AIN-93G mineral mixture	35	35
Ferrous sulfate [†]	0.096	-
Hemoglobin powder [‡]	-	8.2
Soybean oil	70	70
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.014	0.014

[†] The premixture consisted of 2.0 g of ferrous sulfate mixed with 98.0 g of sucrose.

[‡] The composition of hemoglobin powder was as follows: protein, 86.4 g/100 g and iron, 2.44 mg/g.

AIN, American Institute of Nutrition.

3. 分析方法

血液検査（血清鉄、総鉄結合能（TIBC）、不飽和鉄結合能（UIBC）、ヘモグロビン、ヘマトクリット値）は日本医学株式会社（大阪）に依頼した。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（AA-7000, 株式会社島津製作所、京都）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、同様にフレーム式原子吸光光度計にて鉄を定量した。鉄の摂取量および糞への排泄量をもとに、見かけの吸収率をもとめた。

4. 遺伝子発現量の評価

RNAlater Tissue Storage Reagent に浸漬貯蔵していた十二指腸粘膜および空腸粘膜から TRIzol[®] RNA Isolation Reagents（サーモフィッシュサイエンティフィック株式会社、神奈川）により Total RNA を調製した。調製した Total RNA は GoScript[™] Reverse Transcription System（プロメガ株式会社、東京）を用いた逆転写反応により、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Single 装置（タカラバイオ株式会社、滋賀）と GoTaq[®] qPCR Master Mix（プロメガ株式会社、東京）を用いたリアルタイム PCR により転写産物量の定量を行った。Duodenal cytochrome b (Dcytb), divalent metal transporter (DMT) 1, feline leukemia virus subgroup C cellular receptor (FLVCR) 1, ferroportin (FPN) 1, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), heme carrier protein (HCP) 1, heme oxygenase (HO) 1, HO2, heme responsive gene (HRG) 1 遺伝子に対応する各プライマーは、Table 2 に示す配列のオリゴ DNA を使用した。なおプライマーの配列はウェブツールの Primer3plus (<http://primer3plus.com/>) を用いて作成した。それぞれの遺伝子発現量は、GAPDH の転写産物量に対する相対量として表した。

5. 統計処理

得られた測定値は平均値 \pm 標準誤差で示した。2 群間の差については、Unpaired *t*-test で検定を行った。統計解析は GraphPad Prism6 (GraphPad Software, California, USA) を用いて行った。なお、有意水準は $p < 0.05$ または $p < 0.01$ とした。

結果と考察

Table 3 に飼育期間中の体重変化、餌料摂取量と解剖時の体重 100 g 当たりの臓器重量を示した。飼育期間中の終体重、体重増加量、餌料摂取量と餌料効率について有意差は確認できなかった。ヘモグロビン給餌群で解剖時の体重 100 g 当たりの小腸と腎臓重量の有意な増加および肝臓重量の有意な低下がみられた。私たちのこれまでの研究において、ヘモグロビンの給餌は、肝臓の脂質含量を著しく低

Table 2 Sequences of the specific primers used for reverse transcriptase PCR analysis

Gene name		5'→3' primer sequence	Accession number
Dcytb	Forward	AAGAGGCTAAGACCGCCTTC	NM_001011954.1
	Reverse	CCTCTGGCGAAGAAACTCTG	
DMT1	Forward	CCAAGTACTCAGGGGCATGT	NM_013173.2
	Reverse	GCAGGTACATGTTGTGTGGC	
FLVCR1	Forward	TGGGCTTTGAGTTTGCTGTG	XM_017599010.1
	Reverse	TCCGTTGTGAGCTTTCCTTG	
FPN1	Forward	GGGTGGATAAGAATGCCAGA	NM_133315.2
	Reverse	ATGATCCCGCAGAGAATGAC	
HCP1	Forward	TGGAAGCATGCATTGGTGTG	NM_001013969.1
	Reverse	AACGATCAGCACAGCCAAAG	
HO1	Forward	AAGAGGCTAAGACCGCCTTC	NM_012580.2
	Reverse	CCTCTGGCGAAGAAACTCT	
HO2	Forward	TCCAGGACGTTTGCCATTTG	NM_001277073.1
	Reverse	TTCCACAAAACCTGGGTGTG	
HRG1	Forward	TTCTTCGTGGGTGCTCTCTT	NM_001127456.1
	Reverse	TCGGGTCTTTGAAACTCTGG	
GAPDH	Forward	ATGACTCTACCCACGGCAAG	NM_017008.4
	Reverse	TACTCAGCACCAGCATCACC	

Dcytb, duodenal cytochrome b; DMT1, divalent metal transporter 1; FLVCR, feline leukemia virus subgroup C receptor; FPN1, ferroportin 1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HCP1, heme carrier protein 1; HO1, heme oxygenase 1; HO2, heme oxygenase 2; HRG1, heme responsive gene 1.

Table 3 Growth parameters and organ weights of rats fed experimental diets

	Ferrous sulfate	Hemoglobin
Growth parameters		
Initial BW (g)	82.3 ± 1.6	82.2 ± 1.9
Final BW (g)	297.2 ± 5.5	292.7 ± 5.6
BW gain (g/day)	7.68 ± 0.24	7.52 ± 0.21
Food intake (g/day)	21.3 ± 1.3	20.8 ± 1.2
Food efficiency [†] (g/g)	0.361 ± 0.011	0.362 ± 0.01
Organ weights (g/100g BW)		
Stomach	1.35 ± 0.12	1.46 ± 0.12
Small intestine	2.32 ± 0.06	2.61 ± 0.08*
Large intestine	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.01
Liver	3.85 ± 0.06	3.54 ± 0.04**
Spleen	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.01
Kidney	0.73 ± 0.02	0.81 ± 0.01**

[†] Food efficiency (g/g) = BW gain (g/day) / food intake (g/day)
Data represent means ± SEM (n=7). Values are significantly different from the ferrous sulfate diet at * p < 0.05 and ** p < 0.01 using an unpaired *t*-test.
BW, body weight.

下させることを報告している⁷⁾。そのため本研究で見られたヘモグロビン給餌群の肝臓重量低下は、脂質含量の低下が原因で起きたと考えられる。Li *et al.* は大豆タンパク質と比較して、米かすタンパク質加水分解物の摂取は、小腸の微絨毛の高さと粘膜固有層の深さが増加することが報告している⁸⁾。また、ヘムは細胞の構成成分であるが、活性酸素種の発生源となり、細胞や遺伝子に影響を与える非常に毒性の強い成分であることが知られている⁹⁾。また体内で生成された遊離ヘムは尿管上皮細胞に対して毒性を示

し、尿管の機能障害を引き起こすことが報告されている¹⁰⁾。ヘモグロビン給餌群で見られる小腸や腎臓重量の増大は、ヘモグロビンの毒性によって引き起こされているか、組織学的評価が必要であると考えられる。

Table 4に、各群の血清鉄濃度、血清総鉄結合能 (TIBC)、血清不飽和鉄結合能 (UIBC)、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を示した。どの項目においてもヘモグロビン給餌群で有意な鉄栄養状態の低下が確認された。また Table 5に、採取した臓器中の鉄濃度を示した。いずれの臓器においても、ヘモグロビン給餌群は硫酸鉄投与群と比較し、低い鉄濃度を示した。さらに糞中の鉄濃度の測定結果、総糞排泄量、餌料摂取量、餌料中鉄濃度を用いて、両群における鉄の見かけの吸収率を算出し、Table 6にまとめた。ヘモグロビン給餌群で糞への鉄排出量の有意な増加がみられ、また鉄の見かけの吸収率の有意な低下が観察された。ヘモグロビン給餌群の鉄栄養状態の低下は、鉄の吸収率が低いことが原因であると考えられる。以前のわれわれの研究⁵⁾において、代謝ケージを用いずにケージに残った糞を回収する方法で糞中の鉄含量を求めた場合、硫酸第一鉄給餌群と比べ、ヘモグロビン給餌群で明らかに鉄栄養状態が低いにも関わらず、見かけの吸収率が同等という矛盾が生じていた。本研究結果から、ケージに残っている糞を回収してミネラルの見かけの吸収率を算出する方法は不適當であったことが示唆された。また、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^{11, 12)}。今後、貧血モデル動物を用いて検討する必

要があると考える。

非ヘム鉄とヘム鉄では、腸管における吸収機構が異なることが知られている。硫酸鉄などの非ヘム鉄は、腸管内でイオン解離している必要があり、共存する他の食品成分によって吸収の促進または阻害が起きる。小腸上皮細胞内への吸収には刷子縁膜上に局在しているDMT1により運搬される。一方、ヘモグロビンなどのヘム鉄は小腸粘膜細胞内でHOによるポルフィリン環の開裂を受けることで鉄イオンとなるために、他の成分の影響を受けにくい。食事中にヘモグロビンと無機鉄の放射性同位体を加えた食事をヒトに摂取させた場合、非ヘム鉄の吸収率は5%以下、ヘム鉄では37%と非ヘム鉄とヘム鉄の吸収率にはかなりの違いがある¹³⁾。しかし、栄養組成の明確な合成餌料を与えた動物実験においては、ヘモグロビン鉄は、非ヘム鉄より吸収率が低いと報告されている^{5, 14-16)}。そこで本研究では、鉄投与水準20 µg/gレベルの硫酸第一鉄およびヘモ

Table 4 Serum iron levels, total iron-binding capacities (TIBC), unsaturated iron-binding capacities (UIBC), hemoglobin levels, and hematocrits of rats fed experimental diets

	Ferrous sulfate	Hemoglobin
Serum iron (µg/dL)	245 ± 36	156 ± 11*
Serum TIBC (µg/dL)	530 ± 23	675 ± 12**
Serum UIBC (µg/dL)	285 ± 57	519 ± 17**
Hemoglobin (g/L)	12.8 ± 0.1	10.5 ± 0.2**
Hematocrit (%)	38.2 ± 0.3	31.6 ± 0.5**

Data represent means ± SEM (n=7). Values are significantly different from the ferrous sulfate diet at * p < 0.05 and ** p < 0.01 using an unpaired *t*-test.

TIBC, total iron-binding capacities; UIBC, unsaturated iron-binding capacities.

Table 5 Tissue iron contents of rats fed experimental diets

	Ferrous sulfate	Hemoglobin
	µg/g	
Liver	38.9 ± 5.3	17.1 ± 1.1**
Kidney	38.5 ± 1.8	22.3 ± 1.6**
Spleen	93.6 ± 2.9	65.8 ± 3.4**
Femur	23.3 ± 1.8	14.8 ± 0.8**
Duodenal mucosa	22.0 ± 4.3	4.8 ± 0.5**
Jejunal mucosa	9.1 ± 1.2	4.6 ± 0.3**
Ileal mucosa	7.5 ± 0.5	3.8 ± 0.4**

Data represent means ± SEM (n=7). Values are significantly different from the ferrous sulfate diet at ** p < 0.01 using an unpaired *t*-test.

Table 6 Fecal iron content and apparent iron absorption of rats fed experimental diets

	Ferrous sulfate	Hemoglobin
Fecal iron content (µg/day)	268 ± 22	397 ± 11**
Apparent absorption (%)	63.0 ± 3.9	48.6 ± 2.5**

Data represent means ± SEM (n=7). Values are significantly different from the ferrous sulfate diet at ** p < 0.01 using an unpaired *t*-test.

グロビン鉄給餌が十二指腸および空腸粘膜の無機鉄およびヘム鉄吸収関連遺伝子のmRNA発現量を検討した (Fig. 1)。生体内の鉄栄養状態によって鉄吸収は大きく変化することが知られており¹⁷⁾、生体内の鉄が不足している場合、二価鉄の吸収に関わるDMT1、三価鉄を二価鉄に還元するDcytbや血漿側への鉄放出に関わるFPN1発現量が増加することが報告されている¹⁸⁾。鉄栄養状態の低いヘモグロビン給餌群では、十二指腸および空腸でのDMT1と十二指腸でのDcytb発現量の有意な増加がみられた。しかし、ヘモグロビンはDMT1を介して吸収されるのではなく、他の経路で吸収されると考えられている。ヘム鉄を輸送するトランスポーターとしてHCP1が同定されたが¹⁹⁾、ヘム鉄よりも葉酸に対する親和性が極めて高いことが報告された²⁰⁾。Caco-2細胞を用いた実験ではあるが、HCP-1をshRNAによってノックダウンした場合にヘム鉄の吸収率が低下することが報告されている²¹⁾。ヘム鉄の吸収にどの程度寄与しているかは不明であるが、ヘム鉄の輸送に関わるHCP1発現量は本実験条件では変動しなかった。また小腸上皮細胞内に取り込まれたヘムはHO1およびHO2によりビリベルジン、一酸化炭素および二価鉄に分解される²²⁾。ヘモグロビン給餌群で十二指腸粘膜のHO1 mRNA発現量の有意な増加が確認された。これまでの研究において、鉄欠乏状態ではHO活性やmRNA発現量が上昇することが報告されている^{23, 24)}。またクエン酸鉄または酵素処理ヘム鉄を鉄源とする餌料をラットに給

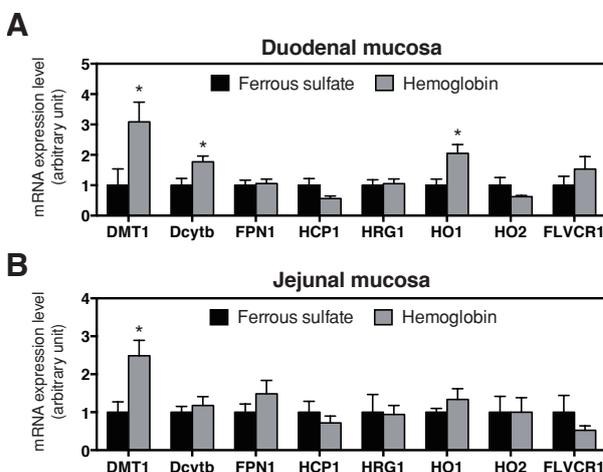


Fig. 1 Relative mRNA expression levels of genes encoding proteins involved in iron metabolism in rats fed experimental diets

Data represent means ± SEM (n = 7). Values are significantly different from the ferrous sulfate diet at * p < 0.05 using an unpaired *t*-test.

mRNA expression levels were measured using a real-time PCR analysis with GAPDH mRNA expression levels for normalization. The mRNA expression levels of genes are shown relative to those from rats fed the ferrous sulfate diet (set at 1.00).

Dcytb, duodenal cytochrome b; DMT1, divalent metal transporter 1; FLVCR, feline leukemia virus subgroup C receptor; FPN1, ferroportin 1; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HCP1, heme carrier protein 1; HO1, heme oxygenase 1; HO2, heme oxygenase 2; HRG1, heme responsive gene 1.

餌した場合、小腸粘膜中のHO活性に変化は見られなかったと報告されている²⁵⁾。一方、HOはヘム代謝のみならず、細胞の酸化ストレスから保護する機能を有している²⁶⁾。そのため本研究で観察されたHO1 mRNA発現上昇は鉄欠乏によって引き起こされたと考えられるが、細胞保護のために誘導された可能性もあるため、今後小腸上皮細胞の酸化ストレス状態を評価する必要がある。また、他にヘム吸収に関与していると考えられているHRG1、HO2およびFLVCRは両群間で差はみられなかった。

以上の結果から、鉄源としてのヘモグロビンの給餌は、正常ラットにおいて非ヘム鉄の硫酸第一鉄よりも鉄栄養利用性が低いことが観察された。ラットにおけるヘム鉄利用の有効性が低い原因として、小腸のヘムオキシゲナーゼ活性が低いと説明されているが、実験動物のラットはドブネズミの飼養変種で食性は雑食性であるため、動物性のものも摂取することを考えると、この説明はやや苦しいように思われる。また、ヒトにおいてヘム鉄は、ある一定濃度以上の投与では鉄吸収量は飽和し、変化しないことが報告されている²⁷⁾。そのため本実験で用いた鉄投与水準20 µg/gでは、ヘモグロビン由来の鉄吸収量が飽和していた可能性も疑われる。さらに、動物試験においては精製飼料を多用することから、無機鉄の吸収に影響を与える食品成分がほとんど含まれていないため、実際にヒトが摂取する鉄含有食品を使用し、栄養利用率の変化を検討する必要がある。今後、ヘム鉄と無機鉄の鉄栄養有効性の違い明らかにするため、ヒトと実験動物の鉄利用性の違い、投与量の検討、また食事に含まれる他の成分との相互作用を追究していく必要があると考えられる。

参考文献

- 1) 厚生労働省 (2016) 平成 26 年国民健康・栄養調査報告, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyuu/h26-houkoku.html> 2016 年 8 月 26 日アクセス
- 2) 刈米重夫 (1981) 病気の生化学 -59- 鉄と貧血. 代謝 18 : 373-384.
- 3) 重田公子, 笹田陽子, 鈴木和春, 櫻村修生 (2008) 若年女性の痩身志向が血液ヘモグロビン値を指標とした貧血に与える影響. 日本食生活学会誌 19 : 155-162.
- 4) Hallberg L, Björn-Rasmussen E, Howard L, Rossander L (1979) Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. Scand J Gastroenterol 14: 769-779.
- 5) 植村佳奈, 細見亮太, 福永健治, 西山利正, 吉田宗弘 (2010) 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. 微量栄養素研究 27 : 13-16.
- 6) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (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.
- 7) Hosomi R, Fukunaga K, Nishiyama T, Yoshida M (2014) Effects of porcine hemoglobin on serum lipid content and fecal lipid excretion in rats. J Med Food 17: 302-309.
- 8) Li X, Xiong H, Yang K, Peng D, Li W, Yin Y, Liu J (2011) Effects of rice dreg protein and its hydrolysate on growth performance and small intestine morphology of early-weaned rats. J Sci Food Agric 15: 687-693.
- 9) Vercellotti GM, Balla G, Balla J, Nath K, Eaton JW, Jacob HS (1994) Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 22: 207-213.
- 10) Nath KA, Vercellotti GM, Grande JP, Miyoshi H, Paya CV, Manivel JC, Haggard JJ, Croatt AJ, Payne WD, Alam J (2001) Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. Kidney Int 59: 106-117.
- 11) 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.
- 12) Wienk KJH, Marx JJM, Beynen AC (1999) The concept of iron bioavailability and its assessment. Eur J Nutr 38: 51-75.
- 13) Björn-Rasmussen E, Hallberg L, Isaksson B, Arvidsson B (1974) Food iron absorption in man. Applications of the two-pool extrinsic tag method to measure heme and nonheme iron absorption from the whole diet. J Clin Invest 53: 247-255.
- 14) Wheby MS, Suttle GE, Ford KT 3rd (1970) Intestinal absorption of hemoglobin iron. Gastroenterology 58: 647-654.
- 15) Weintraub LR, Weinstein MB, Huser HJ, Rafal S (1968) Absorption of hemoglobin iron: the role of a heme-splitting substance in the intestinal mucosa. J Clin Invest 47: 531-539.
- 16) 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.
- 17) Teucher B, Olivares M, Cori H (2004) Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. Int J Vitam Nutr Res 74: 403-419.
- 18) McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, Mudaly M, Richardson C, Barlow

- D, Bomford A, Peters TJ, Raja KB, Shirali S, Hediger MA, Farzaneh F, Simpson RJ (2001) An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755-1759.
- 19) Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789-801.
- 20) Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, Sandoval C, Zhao R, Akabas MH, Goldman ID (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127: 917-928.
- 21) Le Blanc S, Garrick MD, Arredondo M (2012) Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1780-C1785.
- 22) 川端浩 (2010) 鉄代謝の分子機構. 日本内科学会雑誌 99 : 1173-1179.
- 23) 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.
- 24) Collins JF (2006) Gene chip analyses reveal differential genetic responses to iron deficiency in rat duodenum and jejunum. *Biol Res* 39: 25-37.
- 25) 村上亜由美, 岸本三香子, 川口真規子, 松浦寿喜, 市川富夫雌 (1998) 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 45 : 113-118.
- 26) Maines MD (1997) The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.
- 27) Pizarro F, Olivares M, Hertrampf E, Mazariegos DI, Arredondo M (2003) Heme-iron absorption is saturable by heme-iron dose in women. *J Nutr* 133: 2214-2217.