

平成 21 年度厚生労働省科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－ 微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明 －

主任研究者 柴田 克己 滋賀県立大学 教授

Ⅲ. 分担研究者の報告書

3. 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

分担研究者 吉田 宗弘 関西大学 教授

研究要旨

硫酸第一鉄，クエン酸第二鉄，ヘモグロビン，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．肝臓，腎臓，小腸，脾臓，および大腿骨の鉄濃度は，硫酸鉄投与群が顕著に高い値を示した．残りの 3 群間については，有意差は認められなかったが，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．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した．逆に，血清総鉄結合能と血清不飽和鉄結合能においては，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．糞中の鉄濃度より算出した鉄の見かけの吸収率は，硫酸鉄とヘモグロビンが 52～60% だったのに対して，クエン酸鉄と低分子ヘム鉄は 20～26% であり，明らかな差が認められた．鉄サプリメントや鉄補給剤の素材として市販されている低分子ヘム鉄の有効性は無機鉄や未処理のヘモグロビンよりも低いと判断される．

A. 目的

鉄は、ヘモグロビンや各種酵素の構成成分であり、欠乏によって貧血や運動機能、認知機能等の低下を招く。また、月経血による損失と妊娠中の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¹⁾、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²⁾。

貧血有病率を低下させるために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肉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³⁾、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を組み合わせれば、摂取量を増やすことなく、吸収量を増やし鉄栄養状態の改善につながると期待される。

多くの教科書には、食事鉄はヘム鉄と無機鉄に分類され、人間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⁴⁾。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⁵⁾。このことの理由として、2 つのことが考えられる。1 つ目として、ラットでは、ヘムを分解して無機鉄を遊離させる小腸粘膜中のヘ

ムオキシゲナーゼ活性が著しく低いため、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、動物実験で利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構造変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。

B. 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、鉄を含まないミネラル配合を用いて調製した AIN93G 飼料を基本食として、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、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て 4 週間飼育した。飼育期間終了後、ネンブタール麻酔下で、血液、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

採取した臓器と糞は濃硝酸を用いて灰化し、フレイム式原子吸光光度計を用いて鉄を定量した。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。

C. 結果

表 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。

表 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、有意差は認められなかったが、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。

表 3 には、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、および血清不飽和鉄結合能をまとめた。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した。逆に、血清総鉄結合能と血清不飽和鉄結合能においては、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、飼料中铁濃度を用いて、各群における鉄の見かけの吸収率を算出し、表 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。

表 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機能指標については、群間の差をまったく認めなかった。

D. 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。ヘモグロビント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、ヘモグロビント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⁶⁾をもつといえるだろう。事実、ヘモグロビン投与群の糞は他群よりも軟らかく、かつ臭気も強かった。

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ントタンパク質の難消化性があるといえる。しかし、表 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⁷⁾。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のではなく、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、水溶性をうたうものも市販されていることから、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/g⁸⁾には及ばない。しかし、AIN93G に含有されている鉄は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においては十分な量であると判断する。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ことを示すといえる。

ラットにおいて、ヘム鉄の利用性が低いのは、小腸粘膜においてヘムを加水分解してヘムから鉄を遊離させるヘムオキシゲナーゼの活性がきわめて微弱であることに起因するといわれている。事実、小腸粘膜中のヘムオキシゲナーゼタンパク質を抗体を用いて測定することを試みたが、検出できなかった。

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。一方、臓器や血清の鉄濃度、ヘモグロビン、血清鉄結合能の測定結果は、ヘモグロビン投与群は硫酸鉄投与群に比較して、体内鉄量が少なく、鉄栄養状態が低いというものであった。したがって、ここで算定したヘモグロビン鉄の見かけの吸収率が、鉄の吸収量を反映しているとはいえない。この「糞に出ていないが、吸収もされていない」という矛盾については、盲腸あるいは大腸を内容物も含めて分析していな

いので、これ以上の考察は無理である。今後の検討課題としたい。ただし、かりに盲腸や腸内細菌などが関わっているとしても、鉄が吸収されているわけではないので、ラットにおいてヘム鉄の利用性が二価鉄よりも低いという事実が変わるわけではないことを強調しておきたい。

E. 健康危機情報

特記する情報なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許予定

なし

2. 実用新案特許

なし

3. その他

なし

H. 引用文献

1. 健康・栄養情報研究会編. 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 (2009).
2. Takimoto H, Yoshiike N, Katagiri A, Ishida H, Abe S. 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* (2003) 29, 96-103.
3. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Requirements of

Vitamin A, Iron, Folate and Vitamin B12 (FAO Food and Nutrition Series No.23).

Rome (1988) 33-50.

4. 吉田宗弘. 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 (2004) 131-148.
5. Matsumoto J, Mori N, Doi M, Kishida T, Ebihara K. Evaluation of iron bioavailability from bonito dark muscle using anemic rats. *J Agric Food Chem* (2003) 51, 4478-82.
6. Matsuo M. Serum cholesterol reduction by quinoa tempe, Quinoa fermented *Rhizopus oligosprouts*, in rats fed with a cholesterol-free diet. *J Hom Econ Jpn* (2005) 56, 791-795.
7. Martinez-Torres C, Layrisse M. Iron absorption from veal muscle. *Am J Clin Nutr* (1971) 24, 531-40.
8. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 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* (1993) 123, 1939-51.

表1 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの体重と器官重量

鉄の給源	体重 (g)	肝臓 (g/100 g 体重)	腎臓 (g/100 g 体重)	小腸 (g/100 g 体重)	脾臓 (g/100 g 体重)
硫酸鉄	298 ± 9 ^a	4.00 ± 0.08 ^{ab}	0.70 ± 0.02 ^{ab}	2.96 ± 0.18 ^{ab}	0.20 ± 0.01 ^a
クエン酸鉄	277 ± 6 ^a	3.69 ± 0.06 ^a	0.67 ± 0.02 ^a	2.80 ± 0.08 ^a	0.19 ± 0.02 ^a
ヘモグロビン	283 ± 4 ^a	4.18 ± 0.03 ^b	0.74 ± 0.01 ^b	3.32 ± 0.06 ^b	0.18 ± 0.01 ^a
低分子ヘム鉄	287 ± 5 ^a	4.26 ± 0.08 ^b	0.65 ± 0.01 ^a	2.91 ± 0.16 ^{ab}	0.20 ± 0.01 ^a

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す。共通の添字のない群間には有意差 ($p < 0.05$) が認められる。

表2 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの臓器中铁濃度

鉄の給源	肝臓 (μg/g)	腎臓 (μg/g)	小腸 (μg/g)	脾臓 (μg/g)	大腿骨 (μg/g)
硫酸鉄	75.7 ± 5.2 ^b	51.7 ± 1.2 ^b	10.7 ± 1.4 ^a	130.1 ± 5.7 ^b	31.3 ± 3.6 ^b
クエン酸鉄	31.8 ± 1.6 ^a	42.4 ± 4.9 ^{ab}	8.7 ± 0.2 ^a	98.3 ± 9.6 ^a	14.7 ± 2.5 ^a
ヘモグロビン	29.7 ± 2.7 ^a	41.6 ± 3.3 ^{ab}	8.7 ± 0.1 ^a	84.3 ± 5.2 ^a	15.8 ± 1.4 ^a
低分子ヘム鉄	25.9 ± 0.9 ^a	36.4 ± 2.3 ^b	8.2 ± 1.2 ^a	80.9 ± 3.2 ^a	10.8 ± 0.5 ^a

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す。共通の添字のない群間には有意差 ($p < 0.05$) が認められる。

表3 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの血球と血清の鉄栄養指標

鉄の給源	ヘモグロビン (g/dL)	ヘマト クリット値 (%)	血清鉄 (μg/dL)	血清総 鉄結合能 (μg/dL)	血清不飽和 鉄結合能 (μg/dL)
硫酸鉄	14.4 ± 0.2 ^c	40.9 ± 0.7 ^c	259 ± 8 ^c	577 ± 25 ^a	318 ± 22 ^a
クエン酸鉄	10.5 ± 0.4 ^b	30.1 ± 1.3 ^b	97 ± 16 ^{ab}	737 ± 23 ^b	640 ± 37 ^b
ヘモグロビン	11.0 ± 0.6 ^b	32.3 ± 2.0 ^b	144 ± 31 ^b	753 ± 33 ^{bc}	609 ± 55 ^b
低分子ヘム鉄	7.9 ± 0.4 ^a	21.4 ± 1.2 ^a	53 ± 5 ^a	901 ± 55 ^c	831 ± 55 ^a

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す。共通の添字のない群間には有意差 ($p < 0.05$) が認められる。

表 4 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの鉄の見かけの吸収率

鉄の給源	鉄の見かけの吸収率 (%)
硫酸鉄	58.3 ± 3.6 ^b
クエン酸鉄	21.0 ± 0.2 ^a
ヘモグロビン	52.8 ± 0.2 ^b
低分子ヘム鉄	25.6 ± 0.3 ^a

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す. 共通の添字のない群間には有意差 ($p < 0.05$) が認められる.

表 5 鉄の給源が異なる実験食を投与したラットの血清脂質濃度

鉄の給源	中性脂肪 (mg/dL)	総コレステロール (mg/dL)	総脂質 (mg/dL)
硫酸鉄	39 ± 3 ^b	78 ± 4 ^b	240 ± 9 ^b
クエン酸鉄	26 ± 4 ^{ab}	65 ± 8 ^{ab}	191 ± 21 ^{ab}
ヘモグロビン	21 ± 3 ^a	48 ± 1 ^a	143 ± 5 ^a
低分子ヘム鉄	31 ± 3 ^{ab}	62 ± 3 ^{ab}	190 ± 10 ^{ab}

値は平均値 ± 標準誤差 (n=6) を示す. 共通の添字のない群間には有意差 ($p < 0.05$) が認められる.