

ラクトフェリンの鉄可溶化能とその応用

川上 浩

共立女子大学大学院家政学研究科 教授

腸溶性ラクトフェリン研究会 理事

1. はじめに

鉄は赤血球に含まれる血色素（ヘモグロビン）の構成成分として、体内における酸素の運搬にかかわる重要なミネラルである。何らかの原因で体内の鉄が欠乏し、赤血球のもとになる赤芽球への鉄の供給が不足すると、赤血球の産生が抑制されて貧血になる¹⁾。特に女性の場合は、月経による出血量が60mlを超えると、1日あたり平均0.63mgの鉄を損失することになり、月経外損失量と合わせると総鉄損失量は1.35mg/日となる。体外へ失った鉄は食事から補充しなくてはならないが、鉄欠乏性の貧血症は、食生活の偏りなどもあって世界各国で共通の問題となっており、日本においても成人女性の約半数が、顕在性および潜在性の鉄欠乏性貧血であるといわれている²⁾。こうした鉄欠乏性貧血を予防するためには、日常的に無理なく食品から鉄を摂取することが重要である。経口的に摂取する鉄の吸収率は、消化管における可溶化状態に依存することから、鉄の溶解性を高めることが、吸収率を上げる要因の一つであると考えられている。しかしながら、通常食品に含まれる鉄は、pHが低い胃内では可溶化状態を保つことができるが、吸収部位である腸管に移行すると、膵臓から分泌される重炭酸イオンの影響で、水酸化第二鉄となって不溶化し、吸収率はわずか10%程度に留まる³⁾。このように、鉄の生体利用率は非常に低いことから、わが国の鉄の食事摂取基準²⁾における推奨量は、男性が5.0～11.5 mg/日、女性が5.0～9.0 mg/日（月経なし）、10.5～13.5 mg/日（月経あり）であり、必要量に比べて過剰量を摂取しなくてはならない。また、一般的に使用されている食品用鉄素材は、鉄味に代表されるような不快な風味を生じ、食品本来の美味しさを損ねることがある。さらに、過剰に摂取した場合には、胃あれや下痢などの副作用が生じることもあるので、食品への使用量を制限しなくては

ならない。

このような食品用鉄素材の課題を解決するために、乳中の鉄結合性タンパク質であるラクトフェリンに着目した研究が行われている。ラクトフェリンは、哺乳類の乳汁や分泌液中に存在する分子量約 80,000 の糖タンパク質であり、1 分子あたり 2 分子の鉄をキレート結合することが知られている。しかしながら、ラクトフェリンが 2 分子を大きく上回る量の鉄を、中性水溶液中で可溶化状態に保つことが明らかにされている⁴⁾。さらに、天然の鉄可溶化素材としての有用性を確かめるために、鉄の生体利用性、安全性および風味に与えるラクトフェリンの効果についても検討されている。

2. ラクトフェリンの鉄可溶化特性

鉄は胃液のような酸性溶液中では可溶化状態にあるが、鉄吸収部位である小腸管腔内のような中性領域では、不溶性の沈殿を形成してしまう。そこで、ラクトフェリンとキレート結合できる飽和量（2 分子）以上の鉄が、ラクトフェリンが共存した場合に、中性溶液中で沈殿を形成せずに可溶化状態を保てるかどうかを調べた⁴⁾。その結果、重炭酸ナトリウム溶液やリン酸ナトリウム緩衝液で調製した中性溶液（pH6.5～7.4）中で、ラクトフェリンは 1 分子あたり 70 分子以上の鉄を可溶化できることが明らかとなった（図 1）。一方、カルシウムや鉄を可溶化することが知られているカゼイン由来のリン酸化ペプチド（CPP）の鉄可溶化能は、ラクトフェリンの 10 分の 1 程度であった。さらに、ラクトフェリンはペプシンおよびトリプシンで酵素分解しても、未分解のラクトフェリンと同等の鉄可溶化能を維持していることが明らかとなった。こうしたラクトフェリンの鉄可溶化メカニズムに関しては、示差走査熱量計（DSC）、遠紫外円偏光二色性スペクトル分析計（CD）、原子間力顕微鏡（AFM）、分析用超遠心機、電子スピン共鳴装置（ESR）、核磁気共鳴装置（NMR）などを駆使して、ミセル様構造などが推定されている⁵⁾。

3. ラクトフェリン鉄の調製

脱脂乳を陽イオン交換樹脂スルホン化キトパール（富士紡績㈱）に

通液し、吸着したタンパク質を 10%食塩水でグラジエント溶出して純度 95%のラクトフェリンを調製した⁶⁾。このラクトフェリンを 1%濃度で水に溶解した後、重炭酸ナトリウムと塩化第二鉄を添加して 3 種混合液を調製した。過剰な重炭酸イオン、ナトリウムイオン、鉄イオン、塩素イオン等を透析で十分排除した後、透析内液を凍結乾燥した。乾燥物 1 g あたりの鉄含量は 112mg であり、これを再度還元した水溶液中では、ラクトフェリン 1 分子あたり 200 分子の鉄が可溶化されていた。こうしてラクトフェリンにより可溶化状態になった鉄を、ラクトフェリン鉄 (FeLF) とした。

4. ラクトフェリン鉄の生体利用性

ラクトフェリンは 1 分子あたり 2 分子の第二鉄イオンをキレート結合できることから、従来は鉄 2 分子結合型 (Diferric type) と鉄非結合型 (Apoferric type) のラクトフェリンを用いて鉄吸収調節作用などが検討されてきた。たとえば、2 分子の鉄がキレート結合したラクトフェリンは、通常の無機鉄では貧血改善効果がみられない限界レベルの鉄投与量において、良好な鉄欠乏性貧血改善効果をもつことが確認されている⁷⁾。その後、ラクトフェリン 1 分子あたり 200 分子の鉄を可溶化できることが明らかとなったことから、このラクトフェリン鉄の生体利用性について検討した⁸⁾。生体利用性が最も高いとされている硫酸第一鉄を対照とし、ラクトフェリン鉄を鉄量として 1.5mg/kg 体重ずつ、鉄欠乏性貧血状態のラット (4 週齢) に 14 日間毎日経口投与した。その結果、ラクトフェリン鉄投与群では、摂取 14 日目のヘモグロビン値 (図 2) や、ヘモグロビン再生効率 (図 3) が、硫酸第一鉄投与群に比べて有意に高いことが明らかになった。食品やサプリメントで一般的に使用されている鉄素材としては、硫酸第一鉄やピロリン酸第二鉄などが知られている。硫酸第一鉄は無機鉄の中でも生体利用性が最も高く、鉄味が少ないといわれているピロリン酸第二鉄に比べ、2 倍以上の生体利用性をもつ⁹⁾。しかしながら、ラクトフェリン鉄の生体利用性は、その硫酸第一鉄よりもさらに優れていることが明らかとなった。

貧血治療には、医薬品として処方される鉄剤があり、貧血患者を対象

にした製剤の臨床試験結果が、数多く報告されている。これに対して、ラクトフェリン鉄は食品素材であることから、対象者は貧血患者ではなく、貧血気味の健常者である。そこで、WHO の診断基準には該当しないが、貧血傾向のみられる成人女性（ヘモグロビン値 13.0g/dl 未満、あるいはフェリチン値 45 ng/dl 以下）に、ラクトフェリン鉄を含有したサプリメントを 12 週間にわたり摂取してもらい、貧血指標の変化を測定した¹⁰⁾。後観察期間も含めた 18 週間にわたる血中ヘモグロビン変動量を、図 4 に示す。このように、ヘモグロビンだけではなく、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、およびフェリチン量も有意に上昇することが確認された。また、臨床所見および血液生化学的検査においては、何ら臨床上的問題は認められず、貧血治療剤にみられるような胃部不快感、胃痛、腹痛、嘔吐、黒色便などの副作用はみられなかった。

5. ラクトフェリン鉄の安全性

一般的な鉄剤の場合は、過剰量を経口摂取すると様々な副作用が生じることから、ラクトフェリン鉄が、ラットの胃粘膜組織に与える影響について調べた⁸⁾。胃粘膜表面を観察したところ、同じ鉄投与量 (60 mg) の硫酸第一鉄でみられた胃粘膜の充血や損傷が、ラクトフェリン鉄ではまったく認められなかった (図 5)。さらに、胃粘膜の病理組織切片を作製して粘膜上皮細胞の構造を観察したところ、硫酸第一鉄の投与でみられる上皮細胞の破壊が、ラクトフェリン鉄ではまったく観察されず、正常な細胞組織を維持していることが確認された (図 6)。

様々な食品への応用を想定した安全性を確保するために、厚生労働省の GLP 基準に則った安全性試験として、ラクトフェリン鉄の反復経口投与試験を、ラット (雌雄, 4 週齢, 1 群 10 匹) を用いて行った⁸⁾。ラクトフェリン鉄の投与量は、体重 1 kg あたり固形換算で 500mg および 1,000mg (鉄投与量として 56mg および 112mg) とし、経口ゾンデを用いて 28 日間毎日投与した。その結果、体重、摂食量、血液学的検査、尿検査、生化学的検査、剖検、器官重量および病理組織学的検査のいずれにおいても何ら特筆すべき所見は認められず、安全性に関してまったく問題がないことが確かめられた。

6. ラクトフェリン鉄の呈味性

食品で鉄素材を使用する場合，その使用量や用途が制限される問題点の一つに風味に与える影響がある．日常の食生活において貧血を予防あるいは改善するためには，十分量の鉄を毎日無理なく摂取することが有効であるが，様々な副作用だけではなく，食品がもつ本来のおいしさを鉄味で損ねてしまうという課題があった．そこで，20名のパネラー（男女各10名ずつ）を用いて，食品に一般的に使用されている鉄素材であるピロリン酸第二鉄，塩化第二鉄，硫酸第一鉄を対照に，ラクトフェリン鉄の風味検査を行った¹¹⁾．鉄濃度7mg%に調製した各鉄素材溶液を盲検試料として飲用してもらい，鉄味に関して4段階（とても感じる，やや感じる，わずかに感じる，感じない）で評価した．その結果，ラクトフェリン鉄については，パネラーの75%が鉄味を感じないと評価し，その割合が他の鉄素材に比べて有意に高かった．特に，ラクトフェリン鉄は，鉄味が少ないことで食品によく使用されているピロリン酸第二鉄よりも，風味の点で優れていることが明らかとなった．したがって，ラクトフェリン鉄は食品本来の風味を損ねないということで，様々な食品に応用が可能であるということだけではなく，鉄味が気になる人でも，十分量の鉄を無理なく毎日摂取できるという利点も備えていると考えられた．

7. おわりに

消化管における鉄の吸収メカニズムとしては，レセプターやメディエーターを介した能動的機構と，腸管内の可溶化鉄濃度に依存する受動的機構の両方が存在すると考えられている．いずれの場合であっても，消化管内における鉄の可溶化状態が，鉄の生体利用性に大きな影響を及ぼしていることは確かである．今回，ラクトフェリンが中性領域で高い鉄可溶化能をもつことが確認されたことから，ラクトフェリンが食品用鉄可溶化素材として，有効に利用できる可能性が明らかとなった．鉄素材を食品に利用するための重要なポイントとしては，溶解性や生体利用性だけではなく，安全性や風味に与える影響なども無視することはできない．ラクトフェリン鉄は，従来の鉄剤に比べて溶解性や生体利用性が高

いだけではなく、安全性にも何ら問題がないことが確認された。また、風味についても鉄特有の収斂味がほとんど感じられなかった。さらに、ラクトフェリン鉄は、食品加工に必須である加熱殺菌に対して耐性をもつことが知られている。ラクトフェリンは加熱によって変性しやすいタンパク質であるが、鉄が共存することによりラクトフェリンの耐熱性が高まり、ラクトフェリンの加工条件や用途を拡大することができる。したがって、ラクトフェリン鉄は天然由来の有効な乳素材として、様々な食品に応用されるものと期待されている。

参考文献

- 1) Baynes, R. D., Iron deficiency. Annu. Rev. Nutr., 10, 133-148 (1990).
- 2) 厚生労働省策定「日本人の食事摂取基準（2005年版）」国立健康・栄養研究所監修，第一出版，（2005）.
- 3) Hallberg, L., Bioavailability of dietary iron in man. Annu. Rev. Nutr., 1, 123-147 (1981).
- 4) Kawakami, H., Dosako, S. and Nakajima, I. Effect of lactoferrin on iron solubility under neutral conditions. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1376-1377 (1993).
- 5) Hu, F., Pan, F., Sawano, Y., Makino, T., Kakehi, Y., Komiyama, M., Kawakami, H. and Tanokura, M., Studies of the structure of multiferric ion-bound lactoferrin: a new antianemic edible material. Intern. Dairy J., 18, 1051-1056 (2008).
- 6) Uchida, T., Dosako, S., Sato, K. and Kawakami, H., Sequential separation of lactoferrin, lactoperoxidase, and secretory component by sulfate-linked ion-exchange chromatography. Milchwissenschaft, 58, 482-486 (2003).
- 7) Kawakami, H., Hiratsuka, M. and Dosako, S., Effect of iron-saturated lactoferrin on iron absorption. Agric. Biol. Chem., 52, 903-908 (1988).

- 8) Uchida T., Oda, T., Kakehi, Y., Sato, K. and Kawakami, H., Availability of lactoferrin as a natural solubilizer of iron for food products. Intern. Dairy J., 16, 95-101 (2006).
- 9) Fritz, J. C., Pla, G. W., Roberts, T., Boehne, J. W. and Hove, E. L., Bioavailability in animals of iron from common dietary sources. J. Agr. Food Chem., 18, 647-651 (1970).
- 10) 元売睦美, 吉瀬蘭エミリー, 松山博昭, 細谷知広, 門岡幸男, 浅田千鶴, 内田俊昭, 川上 浩, ラクトフェリン可溶化鉄が成人女性の貧血指標に及ぼす影響, 日本食品科学工学会誌, 54, 442-446 (2007) .
- 11) 川上 浩, 新しい鉄可溶化素材としてのラクトフェリンの有用性, 日本食品科学工学会誌, 51, 641-644 (2004) .

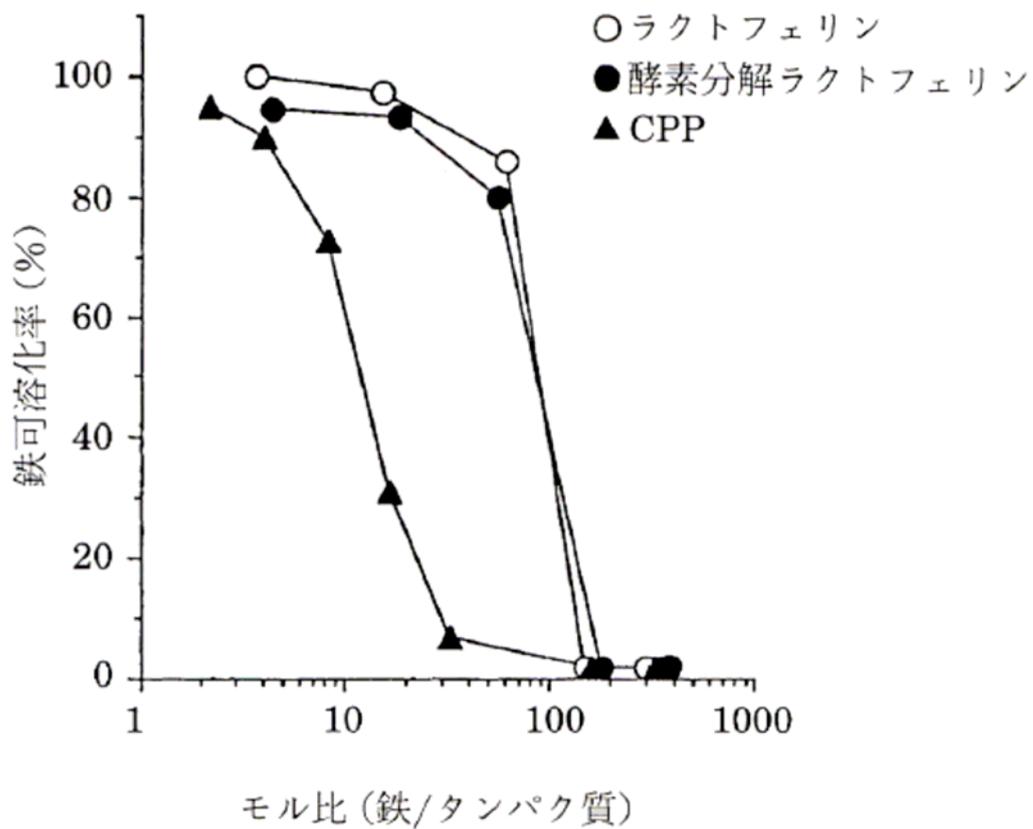


図1 中性溶液中における鉄の可溶化に及ぼすラクトフェリンの効果

リン酸ナトリウム緩衝液中で、ラクトフェリンは酵素分解の有無にかかわらず鉄を可溶化した。

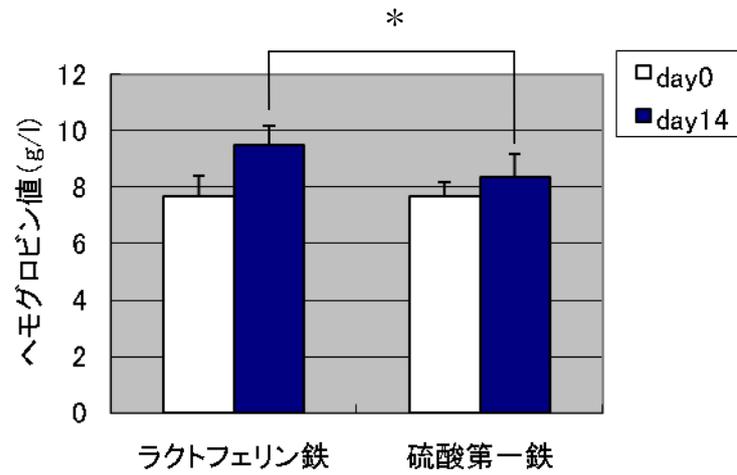


図 2 ラクトフェリン鉄のヘモグロビン改善効果

ラクトフェリン鉄では，貧血ラットにおけるヘモグロビン値の回復が硫酸第一鉄を上回った．* : $p < 0.05$

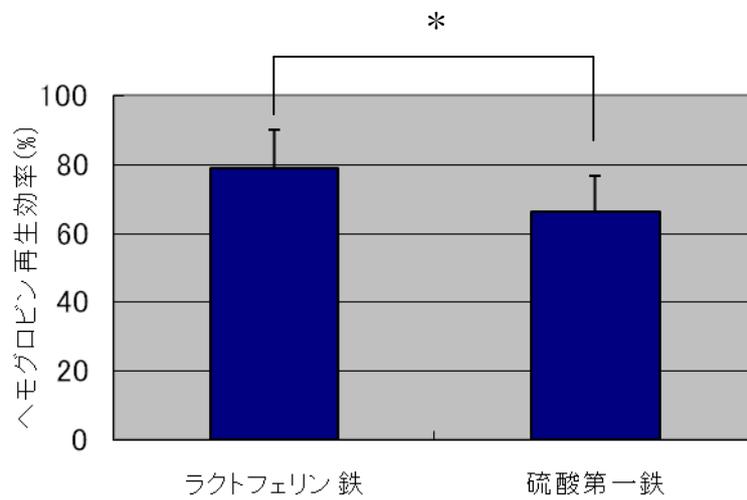


図 3 ラクトフェリン鉄のヘモグロビン再生効率

ラクトフェリン鉄では，貧血ラットにおけるヘモグロビン再生効率が硫酸第一鉄を上回った．* : $p < 0.05$

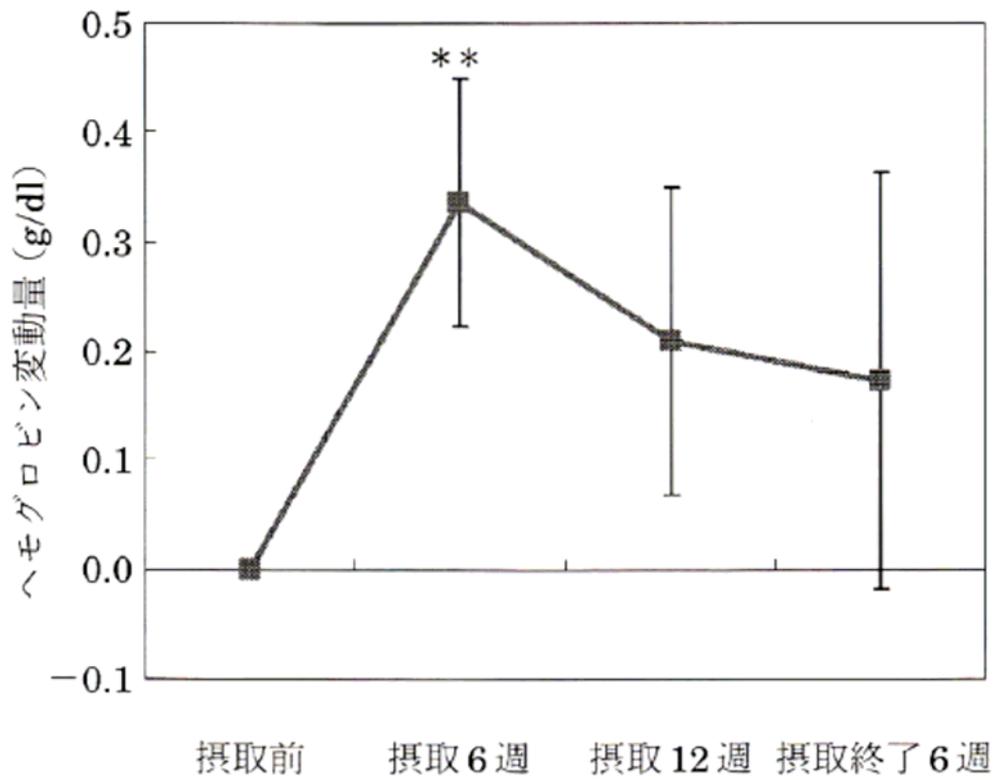
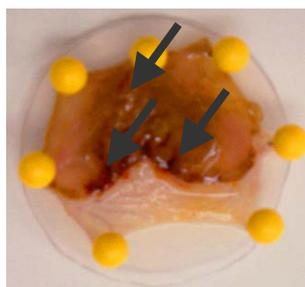


図4 血中ヘモグロビン変動量

貧血傾向のみられる成人女性に，ラクトフェリン鉄（鉄量 7.5 mg/日）を 12 週間摂取してもらった後，6 週間の後観察期間を設けた．摂取 6 週間目に，血中ヘモグロビン値が有意に上昇した．表示値は平均値±標準誤差（n=11）．**：摂取前との有意差あり（ $p < 0.01$ ）．



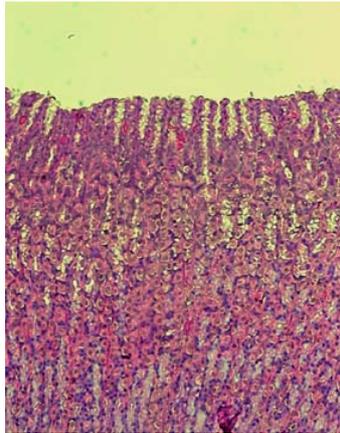
ラクトフェリン鉄



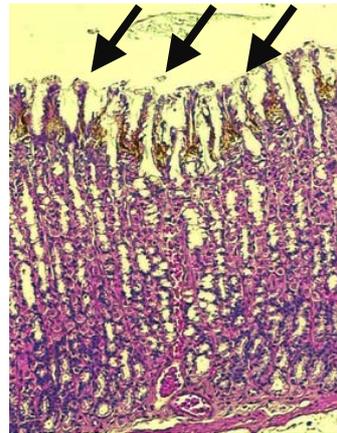
硫酸第一鉄

図 5 胃粘膜表面に及ぼす鉄素材の影響

硫酸第一鉄では矢印部分などに充血や傷害が観察されたが、ラクトフェリン鉄では異常はみられなかった。



ラクトフェリン鉄



硫酸第一鉄

図 6 胃粘膜上皮細胞に及ぼす鉄素材の影響

硫酸第一鉄では矢印部分などに組織傷害が観察されたが，ラクトフェリン鉄では異常はみられなかった。