

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23700912

研究課題名（和文）卵黄の鉄吸収阻害能の評価と除鉄治療への応用可能性の探索

研究課題名（英文）Assessment of Iron absorption inhibitory ability and Search of the Application potentiality for Iron-removal medical treatment on Egg yolk.

研究代表者

小林 ゆき子 (Yukiko Kobayashi)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：10381930

研究成果の概要（和文）：

鉄欠乏性貧血回復抑制能を有する卵黄由来栄養成分の分画方法を確立し、卵黄の鉄吸収阻害能を評価した。卵黄のグラニューール画分を容易に得る方法を確立したのち、自己等電点電気泳動法によるさらなる分画を試みた結果、鉄結合タンパクのひとつ、ホスビチンサンプルの収集に成功した。ラットを用いた鉄出納試験の結果、卵黄タンパクの鉄吸収阻害能が示され、ペプチド態ではその機能は認められなかったことから、レジスタントプロテインであるホスビチンの鉄吸収への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the fractional method of egg yolk origin nutritional composition was established and the iron absorption prevention ability of its composition was evaluated in order to use the iron deficiency anemia recovery inhibiting effect of egg yolk. The easily method of obtaining egg yolk granule fraction was established. As a result of trying the further fractionation by the autofocusing electrophoresis, it succeeded in collection of crude phosvitin sample, which is one of protein with high unity with iron. In iron balance test, it was shown that egg yolk protein inhibits iron absorption, but its function was not observed in egg yolk peptide. These results suggested that phosvitin, which is one of resistant protein, was involved in inhibition of iron absorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と健康、臨床栄養学

1. 研究開始当初の背景

鉄は、酸素を運搬するヘモグロビンの合成、各種細胞内の酸化還元反応、細胞の増殖やアポトーシスに関与し、生体を維持するために必要不可欠な栄養素である。一方で、Fenton 反応や Harber-Weiss 反応によって生体に有害なラジカル産生を引き起こす。つまり、鉄は生体にとって必要不可欠である一方、過

剰に存在すると細胞に対し毒性を示す、諸刃の剣のような特徴を持つ。特に、C 型慢性肝炎では、鉄代謝ホルモンヘプシジンの分泌異常などの鉄代謝異常によって肝細胞内での鉄の過剰沈着が起こる結果、酸化ストレスが高まり、細胞壊死、繊維化、肝硬変または肝細胞がんなどに進展することが知られている。ここ十数年において、肝臓に蓄積された

鉄を除去する目的で実施される瀉血療法や鉄制限食などの除鉄治療が肝炎進展抑制に有効であることが明らかとなり、広く普及されるようになった。また、最近の研究において、糖尿病や非アルコール性脂肪性肝炎

(NASH)をはじめとする生活習慣病においても体内での鉄貯留の可能性が示唆され、鉄制限食摂取によって病状が改善するとの報告もあり、鉄制限食事療法の重要性が指摘されつつある。

現在、食事による鉄制限は、鉄含有量が低い食材を選択した上で栄養バランスを考慮する手法がとられている。もし食事の際に、経口的に鉄吸収を阻害できる成分を同時に投与できれば、鉄制限食事療法と併用することでより効果的な治療が実施可能である。さらに、鉄吸収阻害成分を薬剤依存的なものではなく、食事由来の成分から見いだすことができれば、副作用等の不安材料が少ない除鉄剤の開発が可能となり、鉄制限を余儀なくされている患者の負担軽減につながる事が期待できる。

一方、研究代表者は鉄欠乏性貧血を改善・予防できる食事療法を開発する基礎研究を実施する中で(平成 19・20 年度および平成 21・22 年度科学研究補助金(若手研究(B)採択)、鉄吸収に対して最も影響を持つとされている食事タンパク質について検討してきた。それ以前の先行研究において卵白タンパク質は鉄吸収を促進するという結果が得られたため、卵全体としての生物学的利用能を調べるため、卵黄と卵白と卵白構成タンパク質であるオボアルブミンをタンパク源とした食事を鉄欠乏性貧血ラットに与えて貧血回復期における影響について比較した。その結果、卵白とオボアルブミンは対照のカゼインよりも高い貧血回復効果を示し、先行研究を裏付ける結果を示した。その一方で、卵黄を与えた群では鉄欠乏性貧血の回復が遅延されるという結果が見いだされた。これらの結果から、卵黄中には鉄吸収阻害成分が存在するために鉄欠乏性貧血の回復が遅延するのではないかと考察した。

2. 研究の目的

卵黄にはタンパク質、脂質をはじめ、多種類のミネラルやビタミンが含まれている。卵黄中のタンパク質は、低密度リポタンパク質、高密度リポタンパク質、リベチン、ホスピチンおよびリポフラビン結合タンパク質の5種類が知られている。特にホスピチンは鉄との結合性が高く、卵黄中の鉄の90%以上がホスピチンと安定的に結合しており、鉄イオンを触媒とする自動酸化を防止する役割を担っているとされる。実際に、卵自体は鉄含有量が多い食品であるにも関わらず、鉄吸収を阻害する食品として挙げられることが

多く、その理由としてよく挙げられるのがこのホスピチンの存在である。これまで、卵黄中の栄養成分の分画が困難であったため、卵黄中における個々の栄養物質の鉄吸収能に対する検討はほとんど行われてこなかった。

もし卵黄由来栄養成分における鉄吸収阻害成分を特定できれば、鉄過剰症候群のような鉄吸収を阻害することが望ましいとされる病態に有効な食事成分として期待できるため、本研究では、卵黄中の栄養成分の分画方法を確立し、卵黄由来栄養成分の鉄吸収能を評価することで、除鉄療法に有効な食事成分を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生体に投与可能な卵黄中栄養成分の分画方法の確立(平成23年度)

鶏卵を購入し、卵黄分離器を用いて卵黄と卵白に分けた。卵黄はペーパータオル上で卵黄膜を除去したのち回収した。卵黄300mLに蒸留水300mLを加えて30分間攪拌し、卵黄液を作成したのち、8000rpmで12分間遠心分離した。卵黄液はプラズマ層とグラニュール層の2層に分かれた。これら画分についてSDS-PAGEおよびCBB染色したところ、グラニュール画分でホスピチンと同じ36kDa付近にバンドを検出した。そこで、グラニュール画分にターゲットを絞り、自己等電点電気泳動(Autofocusing)法での分画を試みた。

グラニュール層液100mLを攪拌させながら蒸留水を加え、全量を1Lとし作成したサンプルをAutofocusing法にて分画した。24時間後、各画分を回収し、pHを測定して分画の成功を確認した。次に、鉄量を測定したところ、全10画分のうち、画分5~7でのみ検出された。また、各画分をSDS-PAGEおよびCBB染色したところ、弱塩基画分5の上清においてホスピチンと同じ36kDa付近にバンドが最も強く検出された。ホスピチンであるかを特定するために、画分5の上清をウエスタンブロッティングの後、標的のバンドをプロテインシーケンサーにて分析した。アミノ酸配列がホスピチンの配列と一致したことから、画分5の上清はホスピチン含有していると判断した。画分5の上清を回収し、凍結乾燥したところ、粗ホスピチンサンプルの収集に成功した。

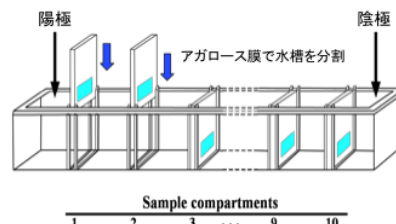


図1. Autofocusing 装置
アガロース膜で水槽を分割し、通電することで水溶性物質を分画する
参考文献 J. Agric. Food. Chem. 53, 3801 (2005)

(2) 卵黄由来成分とその分画における鉄吸収阻害能の評価 (平成 24 年度)

SD 系雄性ラット 8 週齢 25 匹を購入し、ランダムに 4 群に分け、鉄出納試験を実施した。ラットに実験食を 2 週間給餌し、5~7 日目および 12~14 日目の糞尿を全量採取した。実験群は、標準食 (20%カゼイン食) 群、標準食+ホスピチン経口投与群、8%卵黄添加食群および 8%卵黄ペプチド添加食群の 4 群とした。食事は自由摂食とし、標準食+ホスピチン経口投与群は 5~7 日目および 12~14 日目の暗期開始 1 時間前にホスピチン液を 6~7mg/100gBW/回ゾンデで強制経口投与した。体重と摂食量は毎日同じ時間帯に測定し、飲料水は蒸留水を自由に与えた。実験期間終了時に解剖し、血液を採取し自動分析装置にて血球性状および血清鉄を分析した。採取した糞および食事を湿式灰化したのち、生化学自動分析装置を用いて鉄含有量を測定し、みかけの鉄吸収率を算出した。

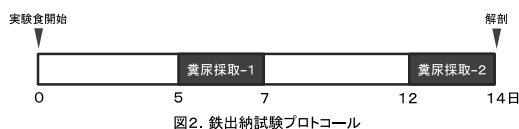


図 2. 鉄出納試験プロトコール

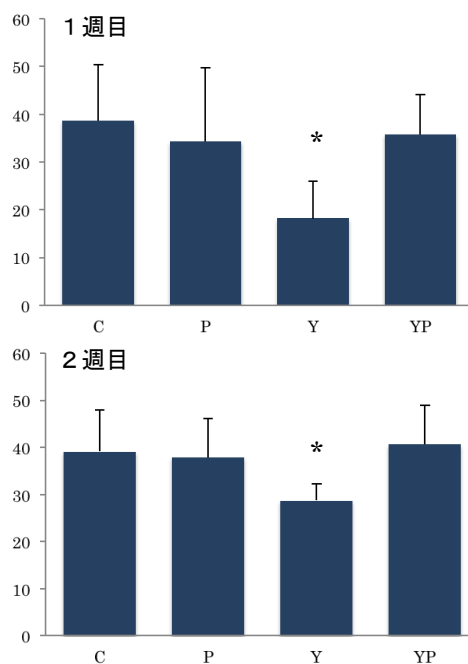
4. 研究成果

卵黄はプラズマ画分とグラニュール画分に分けられる。鉄との結合性が高いホスピチンは卵黄グラニュール画分含まれていることから、まず容易に大量のグラニュール画分を得られる方法を検討した。従来は超遠心法を用いることにより画分を得るが、本研究では卵黄を当量の蒸留水と混合・攪拌の後、遠心分離することでプラズマ画分とグラニュール画分を容易に得る方法を確立した。次に、タンパク質分解物中から活性分画を分離する手段として、逆相カラムを用いた高性能液体クロマトグラフィーが汎用されているが、分離にはメタノールやアセトニトリルなどの溶媒を用いるため、最終的に食品として使用する場合には実用化に問題が残る。本研究では生体に投与可能な画分の大量分離に実績のある Autofocusing 法を採用し、グラニュール画分の更なる分離を試みた。その結果、全 10 画分のうち弱塩基画分 5 の上清にホスピチンが検出された。そこで画分 5 を凍結乾燥したところ、粗ホスピチンの収集に成功した。サンプル回収量は、卵黄 300mL につき 0.5g であった。本研究で得られるサンプルは精製度が高くないと推察されるが、食品として摂取可能な有用成分が容易に得られることが重要であり、本研究方法で粗ホスピチンを得られたことは大変有意義な結果であると言

える。

次に、SD 系雄性ラット 8 週齢を用い、標準食群、標準食+ホスピチン経口投与群、8%卵黄添加食群および 8%卵黄ペプチド添加食群に分け、生理学的に検討した。2 週間実験食を与えたところ、みかけの鉄吸収率は、1 週目は標準食群を 1 としたとき卵黄添加食群だけが低値を示し 0.48 であった。2 週目も同様の傾向であり、卵黄添加食群だけが低値を示し 0.74 であった。したがって、1 週目、2 週目ともに 8%卵黄添加食群のみかけの鉄吸収率は他の食事群に比べ有意に低値を示したが、ホスピチン投与群および卵黄ペプチド投与群では標準食と同程度であった。またこの 2 週間ではどの群も貧血には至らなかった。したがって、卵黄タンパクは鉄の吸収を阻害することが示され、ペプチド態ではその機能は認められなかったことから、レジスタントプロテインであるホスピチンが関与していることが示唆された。本研究で投与したホスピチン量ではミネラル吸収に影響を及ぼさなかったため、適応量や投与方法については今後の検討課題である。

図 3. みかけの鉄吸収率 (%)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 ゆき子 (Yukiko Kobayashi)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究
科・助教

研究者番号：10381930