

アミノ酸のカルシウム吸収利用性に関する研究

共立女子大学家政学部 教授 内 藤 博

緒 言

カルシウム（以下 Ca）の吸収に及ぼす各種の食品成分の効果について種々の報告がなされている。その中で、アミノ酸の効果については、リジン（以下 Lys）の促進性について広く引用され、そのほかのアミノ酸については付随的に述べられているに過ぎない。

また Lys そのものについても、教科書的に引用されてはいるが、その根拠については殆ど Wasserman ら（1956, 1957）が報告したラットの一連の実験報告によるものである。

すなわち、若いラットの放射性 Ca の大腿骨への取り込み量から推定した骨の形成能が、Lys の胃ゾンデ経口投与により高まり、他のアミノ酸では Arg のみが効果的であり、やや効果が現れたものは、Trp, Ile、Asp であったという。

その後いくつかの報告が散見されるが、決定的な内容のものは見られない。ただし Wasserman らの観察では、Lys の Ca 吸収促進性は、対 Ca 比が14（モル/モル）程度の単独投与の条件のみで発現し、通常の食餌への添加では認められないと述べている。

これは、20種類のアミノ酸中 Ca の吸収に阻害的な性質のものがあるため、食餌タンパク質全体としては、プラスとマイナスの効果により相殺されていると説明している。

Wasserman らの報告以後、文献検索の結果、直接 Lys と Ca 吸収の関係をみた信頼できる報告は見当たらない。

一方、近年食餌摂取時における物質の吸収は、その小腸管腔内濃度が高く、上皮細胞間隙を通るパラ細胞輸送による可能性が主張されていることから、Lys と Ca 輸送との関連をこの点から検討することにした。

第1章 ラットのカルシウム吸収率におよぼすリジンの効果

（目的）：上に述べたように、Lys の効果は、食餌中のレベルでは見られず、単独投与の条件のみで観察された。しかし、Lys 欠乏時、Ca の吸収にどのような影響を及ぼすか明らかな報告は見当たらないので、タンパク質源をアミノ酸混合で添加した半合成食餌を、成長雄ラットに自由に摂取させ、Lys のみを除いた欠乏群との Ca バランスを比較した。

（方法）：Sprague-Dawley 系雄ラット 4 週齢（120g）を Ca0.1 または 0.3% 含むアミノ酸混合食（12%）を自由摂取させ、14 日間のうち 7 日間の Ca バランスを測定した（表1、図1）。

（結果）：Lys 欠乏群では、Ca の見かけの吸収率が低下したが、P の吸収率の低下については、明瞭には観察されなかった（図2）。

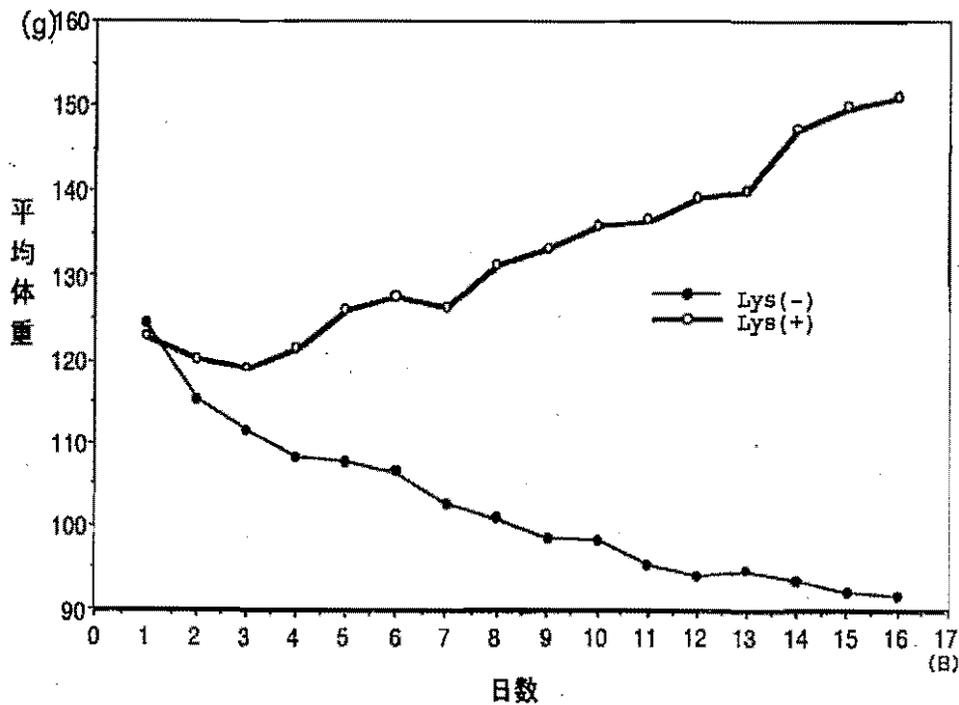
いっぽう、Lys 欠乏 8 日間では逆に Lys 欠乏群のほうが高い吸収率を示した（図3）。これは Lys

欠乏の初期には適応的にCa吸収の促進が起きているのか、あるいは内因性Caの腸管内への排泄が減少していることによるものであろう。

表1 アミノ酸混合飼料組成

	(%)					
	L-Lys (+)	L-Lys(-)	L-Lys(-) D-Lys(+)	L-Lys(-) L-Arg(++)	L-Lys(-) CPP(+)	L-Lys(+) CPP(+)
L-Arg·HCl	0.28	0.28	0.28	0.56	0.28	0.28
L-His·HCl	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
L-Trp	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
L-Ile	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
L-Val	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
L-Leu	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70	0.70
L-Thr	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
L-Met	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
L-(Cys) ²	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
L-Phe	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42
L-Tyr	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
L-Lys	0.60	—	—	—	—	0.60
D-Lys	—	—	—	—	0.60	—
その他のアミノ酸	7.40	8.00	7.40	7.72	7.40	7.35
L-Glu	41.60	41.60	41.60	41.60	41.60	41.60
L-Asp	12.70	12.70	12.70	12.70	12.70	12.70
L-Ser	12.30	12.30	12.30	12.30	12.30	12.30
L-Ala	5.90	5.90	5.90	5.90	5.90	5.90
L-Pro	23.70	23.70	23.70	23.70	23.70	23.70
L-Gly	3.80	3.80	3.80	3.80	3.80	3.80
	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
CPP	—	—	—	—	0.05	0.05
ミネラル混合	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
ビタミン混合	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
燐化コリン	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
セルロース	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
シュクロース	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
大豆油	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
コーンスターチ	63.74	63.74	63.74	63.74	63.74	63.74
合計	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

図1 成長曲線



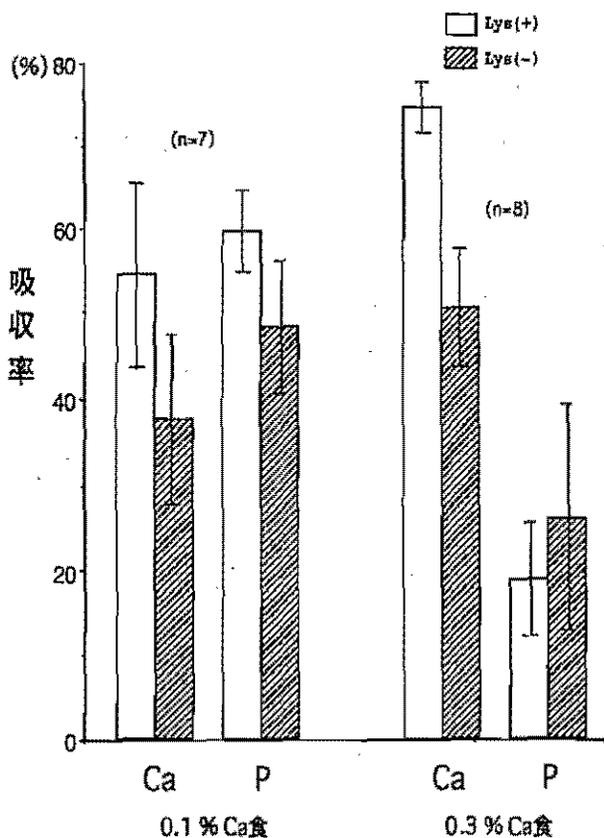


図2 Lys欠14日間(7d-Balance)におけるみかけのCa吸収率

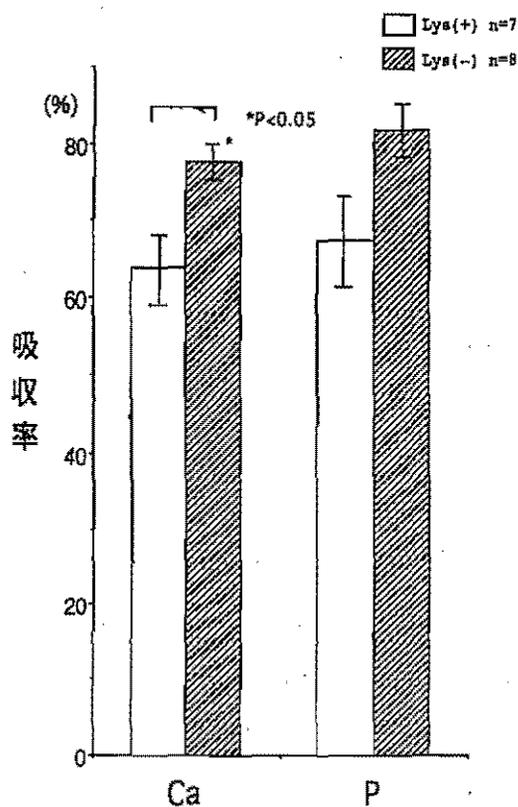


図3 Lys欠8日間(4d-Balance)におけるみかけのCa吸収率

また、Lys欠乏食へのD-Lysやアルギニン添加は効果がなかった。また小腸管腔内のCa溶解性を高めるカゼインホスホペプチド(CPP)の添加は、わずかに効果を示したが、LysのCa溶解性が高いことを説明できるほどではなかった(図4)。

以上の結果、Lys欠乏ではCaの吸収が低下するが、この効果は短期間では発現しないことが明らかであり、おそらく体内からのLysの再利用により、Ca輸送が確保されているものと予想される。また、Pの吸収と比較してもCaの吸収のほうがより顕著に低下しており、Lysが何らかのCa輸送に特異的に影響していることが予想される。

(考察): Lysは本来必須アミノ酸として体タンパク質の構成材料に用いられているので、その欠乏試料の摂取により、窒素出納はマイナスとなる。このようなタンパク質代謝が、Caの吸収利用性にどのような影響を及ぼすかについては、明らかな知見がない。

志村ら(1975)はビタミンD、Lysの両者を欠いた食餌をラットに投与して、骨のCa含量を測定した結果、Lysそのものによる影響を認めることはできなかった(図4)。

食餌タンパク質の種類によるCa利用性については、黒田(1955)は、Ca吸収をよくするものとして、血清アルブミン、ゼラチン、牛肉蛋白質などを挙げている。南(1969)は少なくとも、Gly, His, Argを多く含む蛋白質はCa吸収に有利に作用するものとした。

しかし、これらの報告は実験条件が異なる上に、統計処理による検定が行われておらず、同時に比較評価するのは難しい。

速水ら (1968) は幼若ラットを用いて、グルテンを蛋白質源として塩類を 4% に調製し、Lys を添加したところ、骨の形成における効果を認めた。この飼育ではペアフィーディングで摂取量を Lys 無添加群と等しくしているのに、Ca の摂取量が同じであるが、大腿骨・脛骨中の Ca 量は Lys 群で高い成績であった。

小林ら (1973) は、ラットに摂取させた必須アミノ酸混合食 9 種のパターン中 Lys を 40, 100 および 160% として Ca ; 0.59%, P ; 0.39% の含量で 14 日後の大腿骨中への Ca 蓄積量を測定した結果、Lys の添加によりもっとも良好な結果を得たが、投与量を増やしても効果はあまりなかった。

これらの実験の欠陥は、必須アミノ酸としての Lys による体タンパク質の増加に伴う改善が最初の引き金となって、骨の成長も良くなるということで説明され、Lys そのものによる効果があるか否かは証明できないことである。

今回の一連の実験においても、Lys 以外の必須アミノ酸では、それを除いた食餌に対してラットは摂食を拒否する行動をとるために、Lys 欠乏以外の実験は事実上不可能である。また、食餌を変えたり、欠乏食摂取が短期間では体内から腸管腔内への、いわゆる内因性 Ca の排泄が増えて、見かけの吸収率が逆に高い値となる可能性も生じる。それ故に、この種の実験では Lys と Ca 吸収との関連性は明らかにし得ないものと結論される。

結局は、Lys の栄養効果に付随する Ca の利用効率の促進性を見ているのか、あるいは Lys の直接効果を観察するかの二者いずれかの識別が必要である。

タンパク質の Ca 利用性については、最近摂取量が多いと Ca の尿中排泄を増すことにより、Ca のバランスを悪くすることが警告されており、消化性の低いタンパク質やフィチン酸などの付随物質と、Ca の結合による利用性の低下が注目されている。

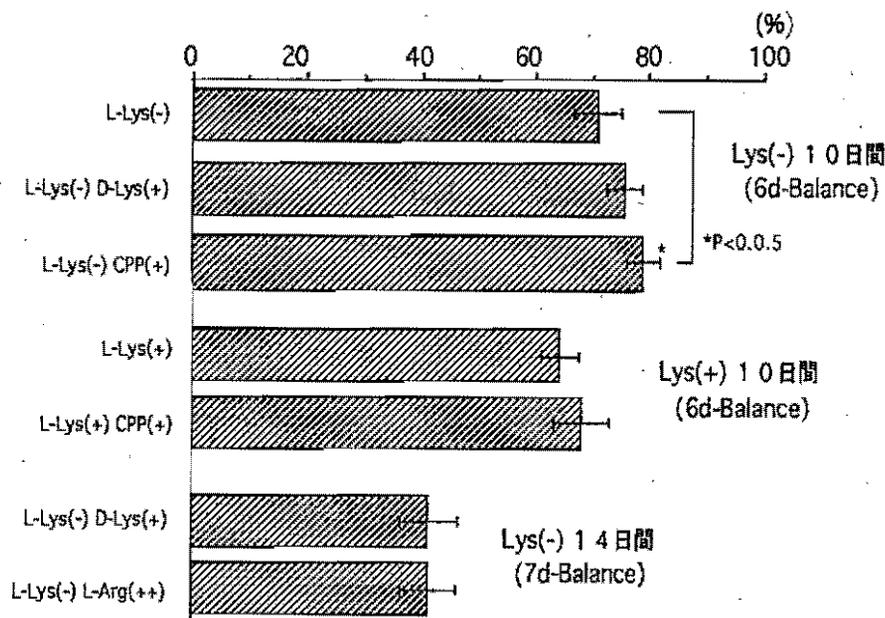


図4 Lys 欠の Ca 吸収率に対する各種アミノ酸の添加効果

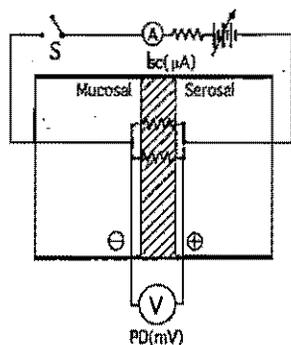
第2章 Ussing の短絡電流法による Ca 輸送の測定：実験法の検討

以上の In vivo による見かけの消化率測定では、Lys の効果が明確に検証できなかった。この原因としては、内因性 Ca の腸管腔内への分泌、Lys の再利用による効果などが挙げられる。そこで、摘出小腸膜による In vitro の Ca 輸送実験法を検討することにした。

Ussing 法は溶質の上皮細胞通過経路と細胞間隙通過経路（パラ細胞輸送）を区別する唯一の方法である。しかし、日本では小腸切片を用いる研究例が殆どなく、基本的な実験条件の確立から始めることを余義なくされた。

（方法）：体重200g 前後の雄ラットの通常の固形飼料で飼育しているものを使用した。エーテル麻酔下開腹し、各小腸部位を約 2 cm 切断し、酸素-炭酸ガス混合で KH-緩衝液 (pH7.4) 中通気しながら、縦に開き、内容物を十分に洗い流したのち、Ussing 装置隔壁（径80mm 孔）に貼り付けた（図5, 6）。

図5 Ussing's Short-Circuit Current Apparatus



電流発生装置は日本光電(株) 2チャンネル型短絡電流発生装置 (DEZ-100) を用い、アクリル樹脂製チャンパー 2 台をそれぞれにつなぎ、チャンパーに摘出した小腸切片の隣接部位を貼り付けた。

チャンパー両側に等量の KH-緩衝液各 5 ml を入れ、両側電位を短絡によりゼロとした状態で電流値の経時変化を測定する。その間15分おきにパルスで開放して、そのときの電位値からコンダクタンス (Gt) を算出する。

$$Gt = \frac{1}{R} = \frac{Isc}{PD} \quad R: \text{抵抗}, \quad Isc: \text{短絡回路電流 } (\mu A/cm^2), \quad PD: \text{膜電位 (mV)}$$

ここで、Isc は能動輸送による電流、PD は粘膜側 (M 側)、漿膜側 (S 側) 間の電位差を示す。通常細胞内に対して漿膜側は+の電荷を持つ。

また、Gt は膜の電導度すなわち溶質の透過性の目安となり、パラ細胞輸送が盛んなほど高い傾向を示す。細胞内通過輸送は多くの場合能動輸送により、この場合は Isc が上昇するが、PD も高くなり結果として、Gt は変化しないか、または低下の傾向となる。このようにして、輸送のタイプが定

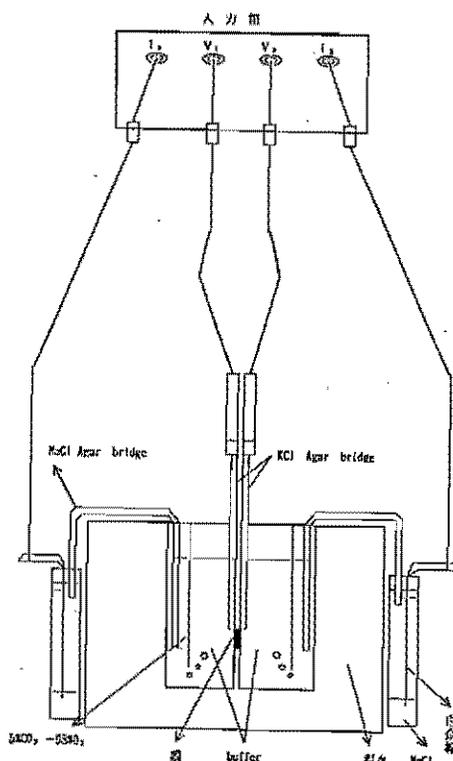


図6 Ussing 装置の構成

性的に区別できる。

実験開始後1時間ほどでPD値が1.0mV以下となり、Viabilityに疑問が生じるおそれがあるので、この時間内の測定値を採用した。

緩衝液組成 (mmol/L)			
NaCl	119	NaHCO ₃	25
KCl	4.5	D-Glucose	11
CaCl ₂	1.25*		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.2	*一部の実験では5.0mmol	

試料液は原則として緩衝液の交換によった。

(結果)

1) グルコース輸送の Kinetics ;

用いた膜も健全性 (viability) を確認する意味で Asano (1964) にならい実施した。

D-Glucose (0~200mg/100ml) を粘膜側に加えて、Isc値の変化をプロットすると、Micheris-Menten 型の曲線を得、Km値は15mMであった(図7)。したがって、本実験条件は、PD値がやや不安定ではあるが、開始60分間の間は正常な膜の条件として扱いうるものと思われる(図7)。Glucose濃度を11.2mMから0mMまで段階的に下げていくと、Iscも比例的に減少するが、PD値も同様に低下するのでコンダクタンスには変化がみられない(図8)。

能動輸送はコンダクタンスで表現される膜の透過性には関与しないとする Asano の説 (1964) は本実験結果からも証明された。

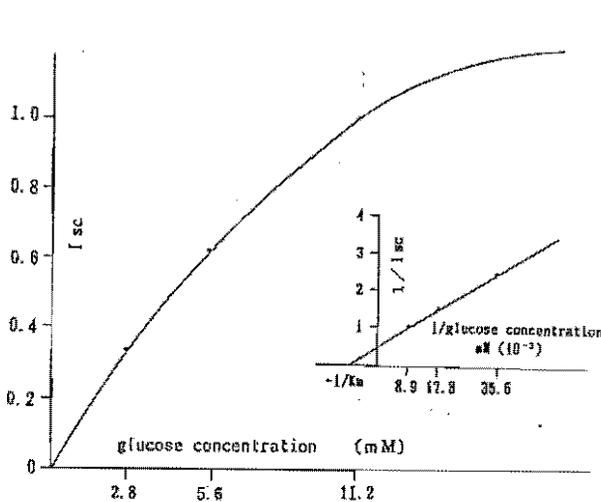


図7 グルコース濃度とIscの相対値の関係

2) Ca 輸送量の測定

Caの輸送は $\text{flux} = \text{mol}/\text{cm}^2/\text{hr}$ で表現される。実際は粘膜から漿膜への流入 $M \rightarrow S$ の flux (J_{ms}) と、漿膜から粘膜への流出(分泌) $S \rightarrow M$ の flux (J_{sm}) か

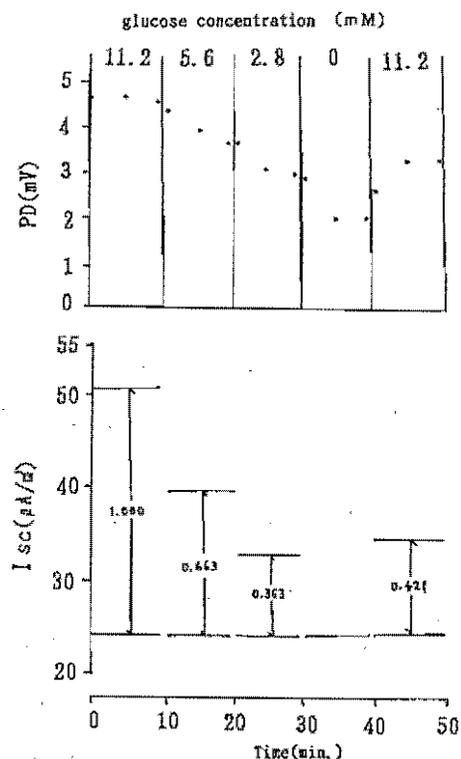


図8 グルコース濃度変化に伴うPD及びIscの相対値の変化

らなり、それぞれ、放射性 Ca を M 側あるいは S 側に添加して、反対側に出現する放射能から各 flux を算出するのが定法であるが、本学では放射能実験室の設備がないので、正味の flux ; $J_{net}=J_{ms}-J_{sm}$ を、Ca 実量測定から算出する以外に方法がない。

しかし、1 時間で輸送される Ca 量は非常に微量であり、通常の定量可能域のほぼ限界の量である。当初は 1.25mM Ca の通常の KH 緩衝液濃度で定量を試みたが、Kimberg らは 10mM Ca まで増加させて、 J_{sm} の増加すなわち分泌の増加を観察している。本実験でも Kimberg の報告に準じて、KM-緩衝液中の Ca 濃度を 5 mM に増やして、Ca 輸送量を原子吸光法で定量可能レベルとして実施した。もちろん、この Ca 濃度は生理的に正常なものではないが、予備的に情報を得る手段として行ったものである。

十二指腸部の切片を用いて、60 分後の Ca 濃度を定量したところ、粘膜、漿膜側の Ca 濃度 (ppm/cm²/hr) の 9 例の平均値±SD は、それぞれ 10.0±9.6 および 10.6±7.8 であった (表 2)。

3) ビタミン D による Ca 輸送とコンダクタンス

ビタミン D (V-D) の Ca 吸収促進性については著名な事実であるが、十分な Ca と V-D 摂取下でも、なお活性型 V-D の作用が観察される。すなわち、V-D の効果として、Ca 結合タンパク質 (Calbindin) ないしは核内レセプターを通ずる遺伝子制御作用の他、生体膜の流動性に関連するステロイドとしての効果があるとする二元論があり、未だに明らかではない。Ussing の実験系でも、V-D の添加効果を検討した報告があるが、本実験でも実施した。

通常の市販固形飼料摂取のラットに活性型 V-D (1, 25dihydroxy-D₃)、250ng/kg 体重相当量を 95% エタノール : propandiol = 50 : 50 に溶かしたものを、3 日間毎日皮下注射した。十二指腸を摘出して、Ussing 法で定法どおりの電気的パラメーターと Ca 輸送量を測定した。

V-D により I_{sc} 、PD、Gt 共に変化は認められなかったが、Ca 輸送量は有意ではないが、V-D 投与群で分泌量が低くなり、相対的に吸収の方向に傾くことが推定された (表 3)。

Kimberg らは、十二指腸部は正味の Ca 吸収を示す一方、回腸部では分泌の傾向を示すと述べて

表 2 Ca 濃度 1.25mM と 5mM における結果の比較

Ca 濃度	1.25mM	5mM
部位	十二指腸	回腸
n	9	8
I_{sc} (0min.)	22.9±9.7 $\mu A/d$	42.6±10.3 $\mu A/d$
I_{sc} (60min.)	7.8±4.0 $\mu A/d$	23.9±12.1 $\mu A/d$
PD (0min.)	-4.2±0.6 mV	-2.2±0.5 mV
PD (60min.)	-1.6±0.6 mV	-1.0±0.4 mV
コンダクタンス (0min.)	5.5±2.2 mS/d	20.0±3.8 mS/d
コンダクタンス (60min.)	4.8±1.5 mS/d	24.7±5.9 mS/d
Ca 輸送量 (ppm/d/hr)	10.6±7.8	-37.2±19.7
Ca 輸送量 (nmoles/d/hr)	266.1±195.7	-930.0±493.7

表3 電気的パラメーター及びCa輸送量の比較

	V.D 漿膜	粘膜
n	11	11
Isc (0min.)	35.0±10.0 μ A/d	34.4±16.5 μ A/d
Isc (60min.)	18.0±16.4 μ A/d	14.1±14.5 μ A/d
PD(0min.)	3.9±1.6mV	3.5±1.1mV
PD(60min.)	1.3±0.5mV	1.1±0.7mV
Gt(0min.)	10.4±4.3mS/d	10.2±5.5mS/d
Gt(60min.)	13.1±7.8mS/d	10.9±5.9mS/d
Ca輸送量 (ppm/d/hr)	13.00±9.4	7.29±12.7
Ca輸送量 (nmoles/d/hr)	324.9±234.1	182.3±317.8

ターを測定した。

TDC 添加によりコンダクタンスは上昇の傾向を示した。また60分後のCa分泌量は減少した。回腸の正味のCa輸送は分泌の傾向を示すので、Ca吸収が増加していることが予想された。この結果は報告された内容に一致している(図9)。

5) リジンによるCa輸送性

Lysの粘膜側添加により、電位PDが低下し、Lys濃度を72mMまで増やすと、ついには電流値の逆転がみられた。これは粘膜の過分極を意味し、粘膜側に対して漿膜側がマイナスとなっていることを示す(図10)。

この原因は明らかでないが、Caのような+イオンが流入しやすい条件である。しかし、膜の両側は短絡により正味の電位差はゼロとなっているので、Caイオンが電位勾配で輸送されているとは考えられない。同様な電位の逆転現象は乳糖の添加時にも観察される(Favusら1983)。すなわち、粘膜側から漿膜側へのCa輸送は、粘膜側に添加した160mM乳糖により促進されるが、この現象は乳糖によるNa⁺の能動輸送の妨害に原因するものと説明された。Lysは乳糖と異なり、自身輸送されるので、同じ作用機構によるか否か明らかでない。

膜両側のCa濃度を5mMにした状態で、Caの移動実量を原子吸光法で測定してみると、等量のAsp添加群に比べて粘膜側から漿膜側への60分間のCa正味移動量が有意に高かった(図11)。この

いるが、十二指腸の切片は筋層が厚く貼付しにくいことと、パラ細胞輸送はむしろ小腸下部で顕著に観察されるということから、以後の実験では回腸部を用いることにした。

4) 胆汁酸による膜透過性の増大

胆汁酸による膜の透過性の増大；コンダクタンスが膜の透過性の指標となるとのことであるが、実際にこのためにCaの輸送が促進されるか否かの確認を得る目的で行った。胆汁酸は常に小腸下部に分泌されて、脂質の吸収に寄与するが、膜の透過性にも影響することが報告されている(Freelら1989)。Leeら(1993)はタウロデオキシコール酸(TDC)がCaの輸送を促進すると報告しているので、その検討を行った。

Ussingチャンバー粘膜側に最終濃度2mMのTDCを添加し、漿膜側には等量の生理食塩水を加えて、定法どおり電気的パラメー

結果、Lys は Ca の小腸粘膜での輸送に関する可能性が明らかとなった。

この条件下では、Lys:Ca (mol/mol)=14:1で、実量70mMの濃度となるが、この程度のアミノ酸濃度は、食餌摂取直後では異常な数量ではない。

本実験での Ca 濃度は、血液中濃度1.5mM を大きく上回り、生理的条件ではないことに問題があるが、Lys により正味の Ca 輸送が高まることが示され、等濃度の Asp ではその効果がないことから、浸透圧の増加によるものとは思われない。

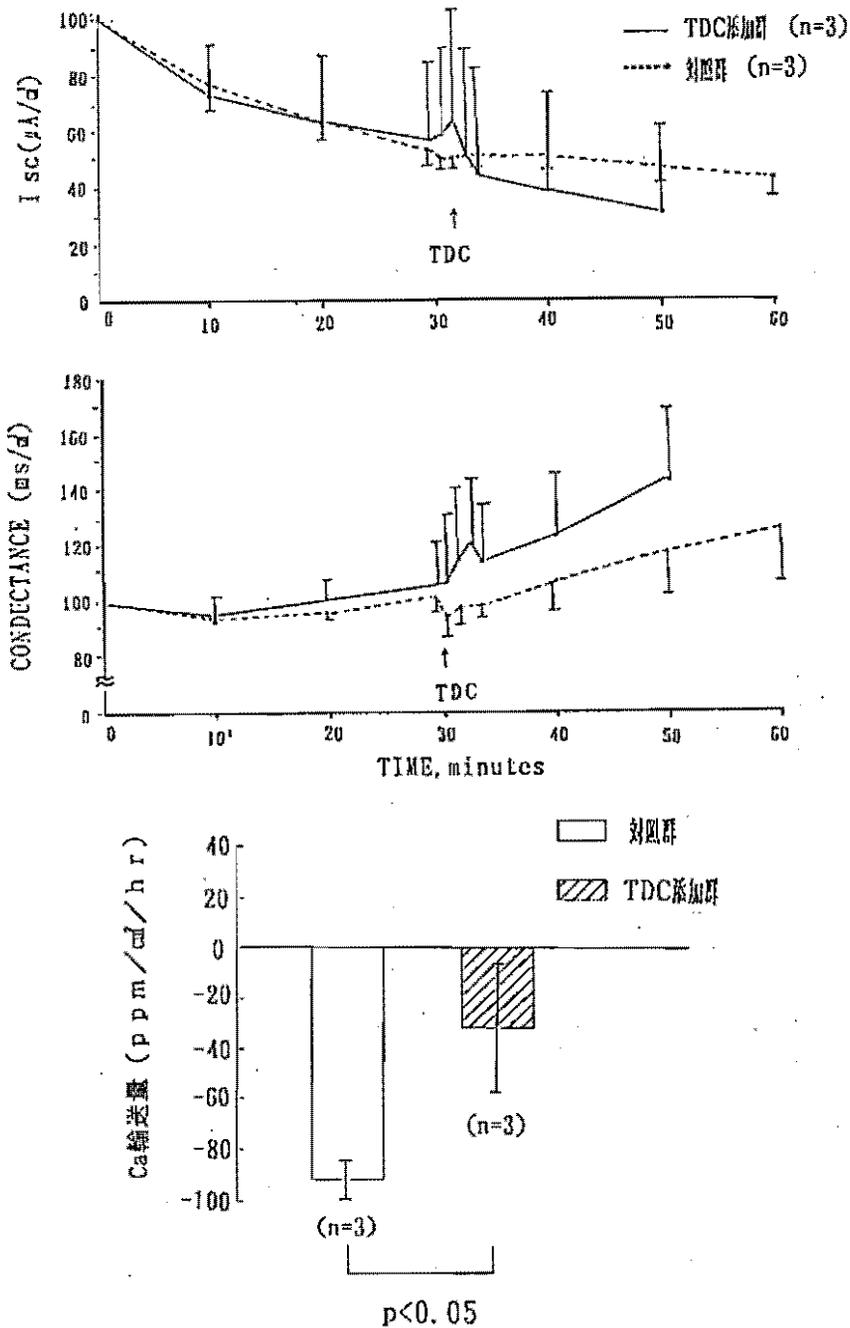


図9 Ussing 短絡回路法によるラット回腸の Ca 輸送に対するデオキシコール酸 (TDC) の効果

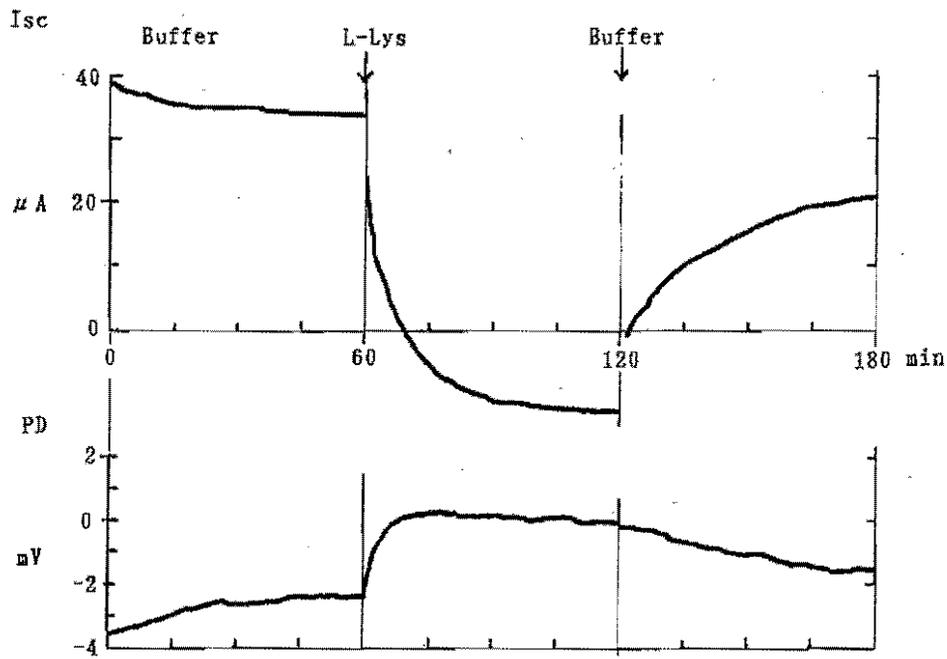


図10 72mM L-リジンによる Isc, PD 値

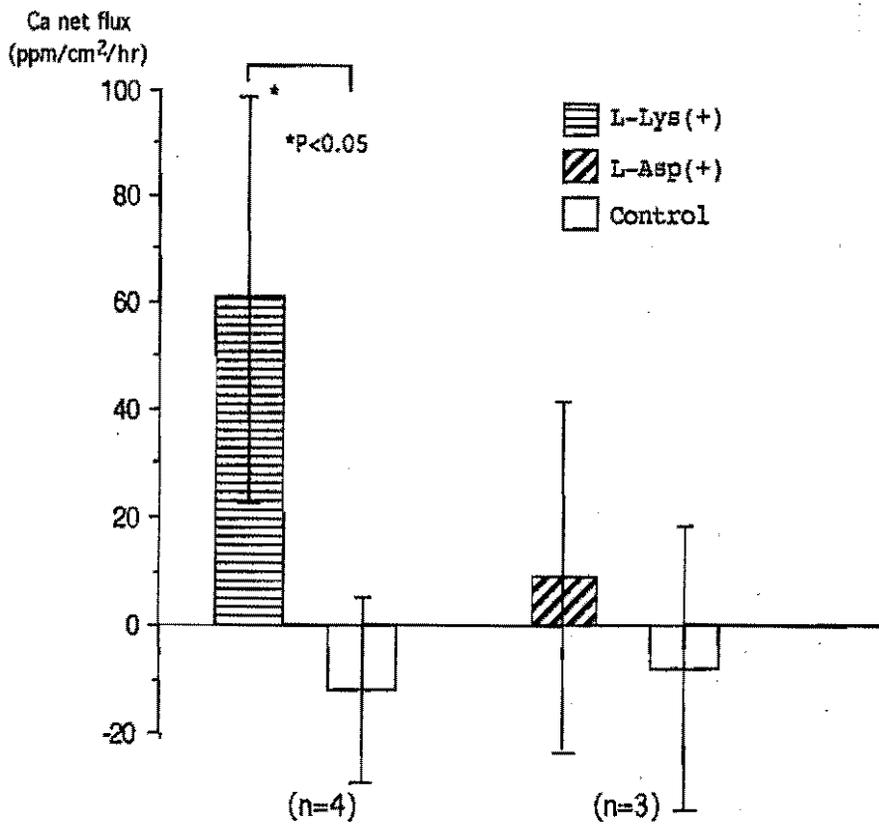


図11 L-Lys, L-Asp 添加 (Ca 比1:14) における Ca 輸送量の比較

6) 乳糖

乳糖の Ca 吸収促進性については古くから知られているが、その機構に関しては必ずしも明確に説明されていない。Favus ら (1983) は Ussing 法でラット回腸からの Ca 輸送に対して、粘膜側に

加えた160mM 乳糖はCaの能動輸送を促進することを認めている。

そこで、本実験でもその追試を行った。

乳糖の粘膜側添加により、PDは低下して逆転した。これに伴いIscもマイナスとなった。この傾向はFavusのデータと一致した。またCaの正味のフラックス(Jnet)は、ブランクと同様マイナスであったが、その値は減少した。回腸部では本来Caの輸送は分泌であるといわれる。これが減少したことは、乳糖効果がCaの吸収増加の方向に働くことを意味する。ただしこのデータはバラツキが多く統計的には有意でなかった(図12)。

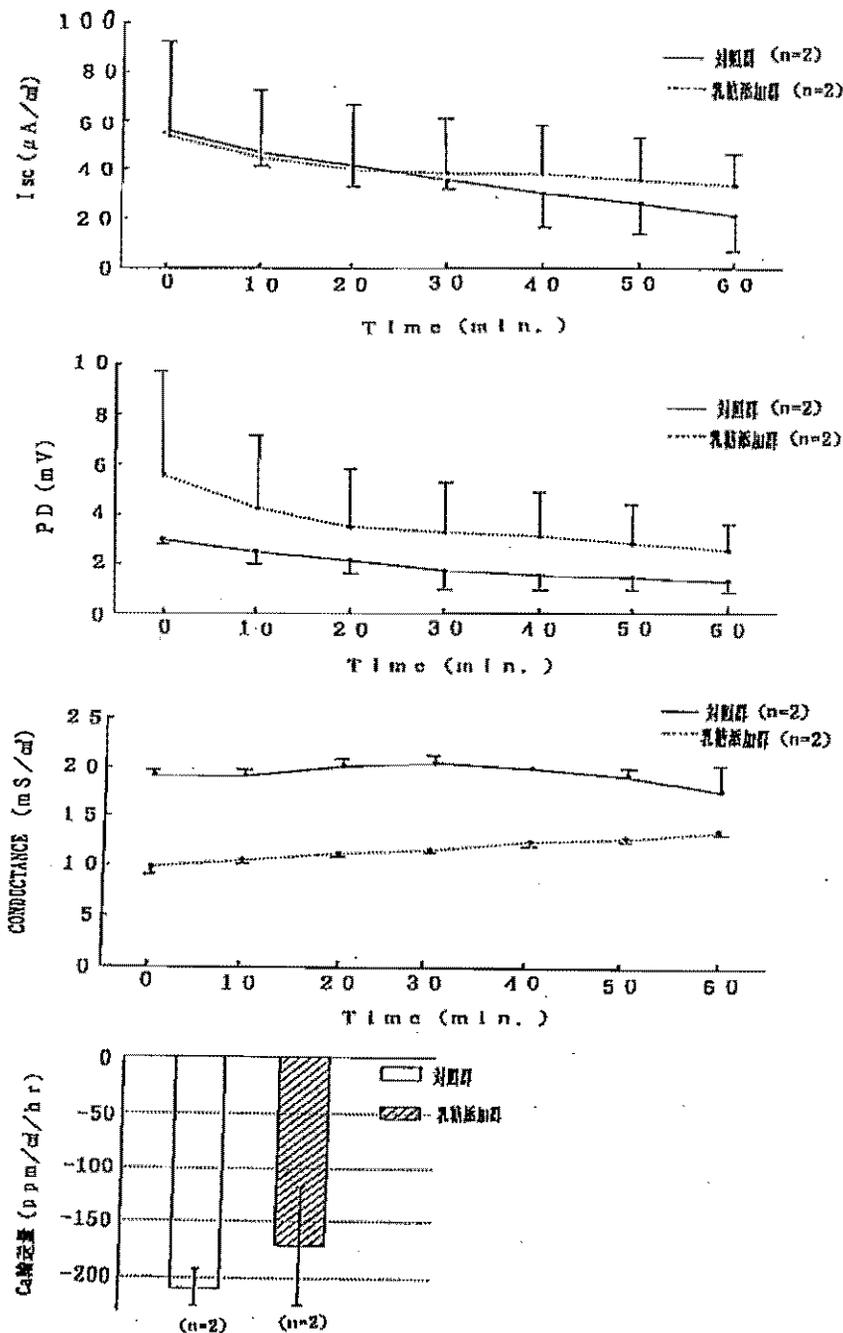


図12 電氣的パラメーター及びCa輸送量に対する乳糖の効果

(考察)

Nellans ら (1978) および Walling ら (1973) によれば、粘膜側の Ca 濃度を通常の KM 緩衝液中の 1.25mM から 10mM まで増やしていくと、回腸部の J_{ms} , J_{sm} ともに増加していくが、 $J_{sm} > J_{ms}$ となるため、正味の輸送は分泌となることを観察している。

しかし、本実験では膜電位が低く、かつ 60 分にはさらに膜電位が低下してしまい、膜の Viability に問題がありそうである。すなわち本実験では、古くから報告されている実験例と同じく、摘出小腸切片をそのまま使用しているために、酸素の供給が不十分なことにより、組織が正常でなくなった可能性がある。そこで事後の実験では漿膜筋肉層を剥ぎ撮る操作を行った。

第 3 章 Ussing 改良法によるアミノ酸の小腸膜透過効果の検討

上述の結果は、膜の Viability に問題があり、またバラツキも大きいので、確実なデータとして扱うには十分とはいえない。そこで酸素供給下で、漿膜筋層を注意して剥ぎ取り、Mucosal-Submucosal 層だけにした回腸切片を用いて Ussing 法を実施したところ、3 時間程度までに安定した測定値を得ることに成功した。

また、微量の Ca 輸送量を Ca 定量値によって推定するのは、困難であることから、将来放射性 Ca の測定によって実施することにして、まず膜の透過性、すなわちコンダクタンスに対する各種アミノ酸の効果を比較することにした。

(方法)：原則的に前回と同様であるが、回腸末端部約 4 cm 長を麻酔下摘出し、縦に切開し、内容物を洗い流したのち、酸素補給下、粘膜を傷つけないように注意しながら、顕微鏡下漿膜筋肉層から剥がし、二つのシート部分をそれぞれ Ussing チャンバーの隔壁に貼り付けて電流を流した*。ゼロ時間に回路を短絡して、Isc を連続記録し、15 分ごとにパルスで回路を開き、電位差を計測して G_t を計算することは、前回のとおりであるが、膜の処理により、電流値はきわめて良好に安定したので、原則として下記のような順序でアミノ酸の添加効果を観察した。方法は従来と同様、ゼロ時間にクランプにより膜両側の電位差をゼロにし、3 時間の間電流値 (Isc) の変化を記録した。この間前回と同様に 15 分おきにパルスに回路を開いて、PD 値をチェックし、 G_t を計算した。緩衝液で 30 分クランプしたのち、粘膜側を 17M になるようにアミノ酸含有緩衝液と交換し、30 分後の G_t 値を測定した。なお 150 分後に別のアミノ酸液と交換して、2 種の異なったアミノ酸を同一浸透圧で比較するようにした。
*以上の操作は静岡県立大学鈴木祐一教授の指導によった。

Ussing の短絡回路装置による実験のタイムテーブル

時間(分):	0	60	90	150	180
	Buffer	+アミノ酸A	Buffer	+アミノ酸B	buffer

また G_t 値が平均値の $\pm 30\%$ 以上になった測定値は棄却した。

(結果)

1) 乳糖の効果

前回の予備試験の結果と同様な結果を得た。すなわち、Isc, PDが増加して膜の極性が逆転したのを改めて確認した。浸透圧によるコントロールとして、グルコース：フルクトース=1：1混合物でも一過性であるが同様な変化を示した。また Gt は低下の傾向を示した (図13)。

乳糖の Ca 吸収促進性については、その機構は必ずしも明らかでないが、周知のこととして取り扱われている。また Favus ら (1983) により Ussing 法を用いて Ca の吸収促進効果が認められ、乳糖自体粘膜を通過できないが、おそらく粘膜の Na^+ と相互作用することにより、 Ca^{2+} の能動輸送を促進することを明らかにした。

すなわち、乳糖の添加は Isc と PD の上昇を伴うが、コンダクタンスは低下する。これは能動輸送の特徴であり、パラ細胞輸送を示す膜の透過性、Gt の上昇とは逆であると説明している。本実験でも粘膜側に加えた 160mM 乳糖は膜電位の逆転、Gt の低下など、Favus と全く同様な結果が得られているので、今回の Ussing 実験の信頼性が確認できた。

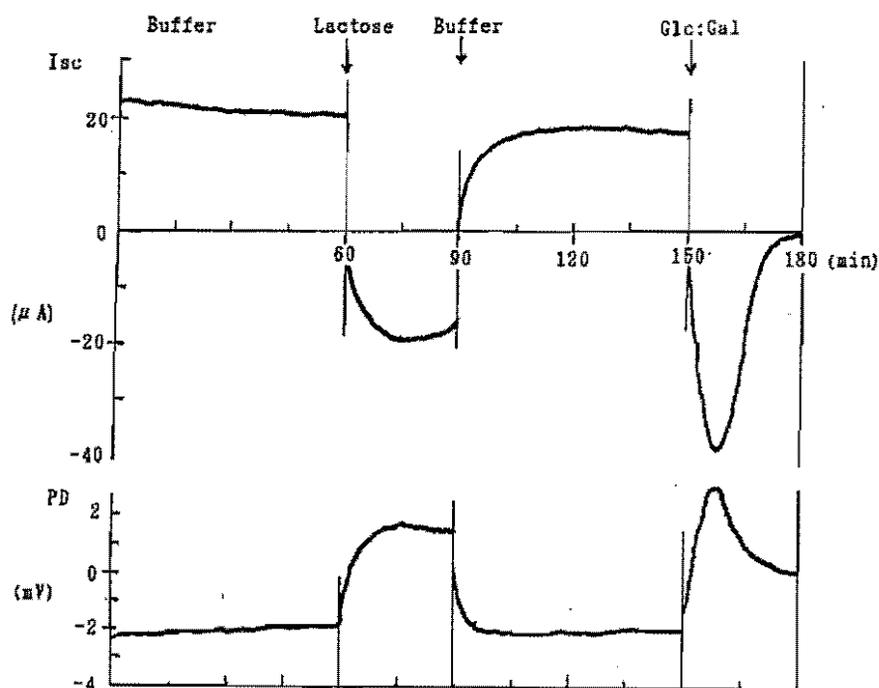
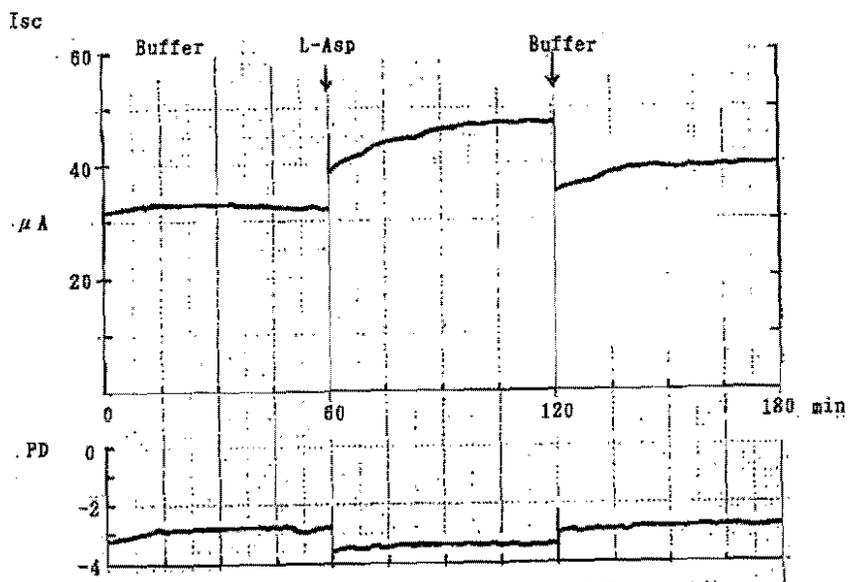


図13 160mM 乳糖、グルコース-ガラクトースによる Isc, PD 値

2) 膜の透過性に対する各種アミノ酸の効果：対 Ca モル比14:1の濃度で粘膜側に添加して上に述べた条件で測定した。

・Lys；上に述べたように、予備試験における 5 mM Ca に対する14倍濃度、70mM の L-Lys 添加では、膜の極性が逆転した。今回の条件は14mM であり、そのような結果はえられなかったが、Isc, PD いずれも低下の傾向を示したので、Lys は膜の極性を脱分極の方向に向かわせる性質があることを改めて確認した。同じような性質は D-Lys および L-Arg でも観察された。

- ・中性、酸性アミノ酸：Ala は Isc, PD を増加させたが、Gt は変化しなかった。また Gly によっても全く電気的パラメーターに影響を与えなかった。Asp も同様であった。
- ・タウリンは Gt を高める傾向があった (図14)。
- ・Trp は、やや塩基性アミノ酸に近い Gt を高める結果を示した (図15、表4)。



17.5mM L-アスパラギン酸による Isc, PD 値

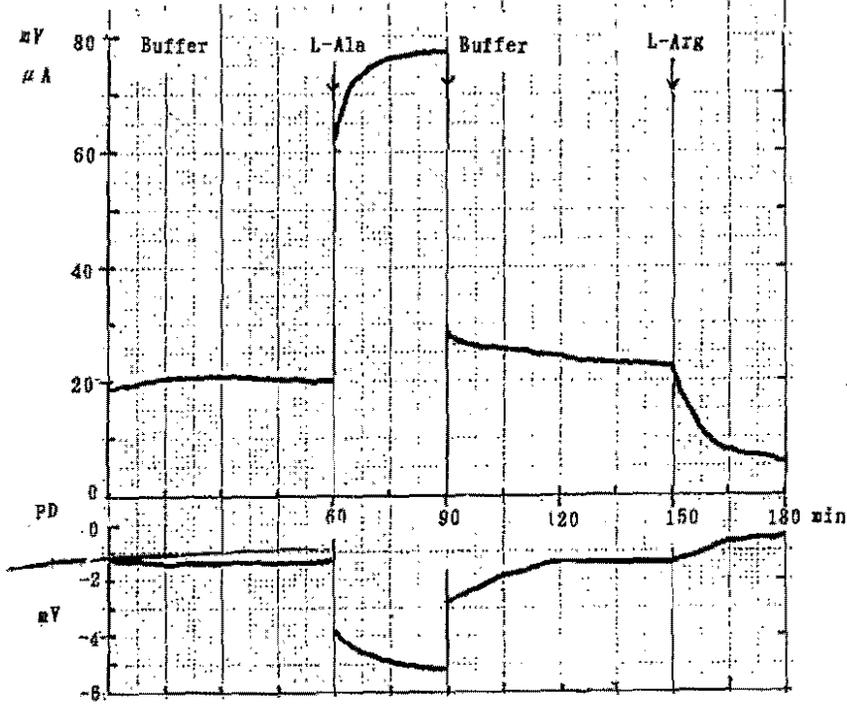


図14 17.5mM L-アラニン、L-アルギニンによる Isc, PD 値

図15 各アミノ酸及び糖におけるコンダクタンスの変化

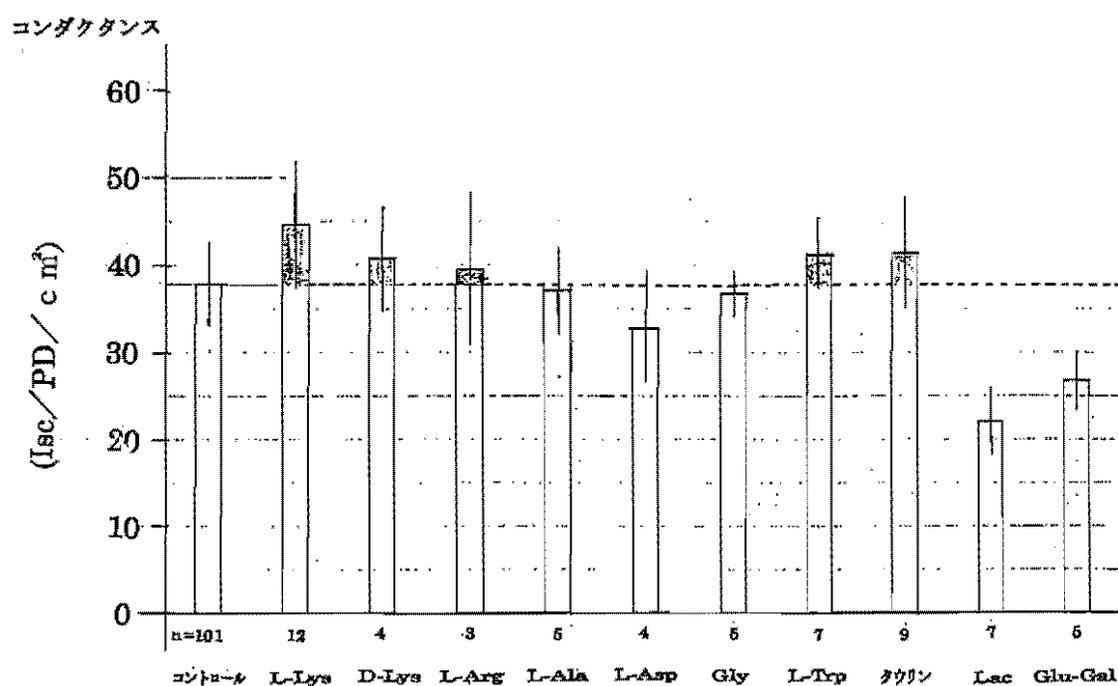


表4 Changes in Conductance (Gt) of Ileum on Mucosal Addition of 17.5mM-Amino acid or 160mM-Lactose

Addition	n	Conductance	
		(mS/cm ² /30min)	
None	28	29.5 ± 5.5	
L-Lysine	8	39.4 ± 7.5	>P 0.01
D-Lysine	5	44.4 ± 9.8	>P 0.025
L-Arginine	6	33.6 ± 7.9	>P 0.05
L-Aspartic acid	4	32.7 ± 6.0	n.s.
L-Alanine	6	31.1 ± 4.3	n.s.
L-Lactose.	8	25.3 ± 6.0	>P 0.05

総合考察

以上の結果、Ca その他の溶質の小腸における吸収がアミノ酸によって実際にどの程度影響されるか現在のところ確認するには至らなかったが、コンダクタンス値の比較からある程度パラ細部輸送性について推定することが可能である。

まず In vivo における Lys の Ca 吸収促進性については、Lys 欠乏食摂取ラットで Ca の見かけの吸収率が低下したことから、Lys と Ca 吸収性になんらかの関連性が存在することが分かったが、明らかにこの効果が認められるには、少なくとも2週間ほど必要とした。また食餌中に Lys を含む塩基性アミノ酸の添加量を増やしても、Ca 吸収率は回復せず、CPP のような Ca の可溶性増大効果も認められなかった。

Wasserman ら (1956) は、胃管により、Lys をラットに単独投与して、同時に投与した放射性 Ca の大腿骨中への取り込みが促進されることを認めた。また Arg も Lys 同様効果を示したことから、これら陽イオン性アミノ酸による特異的效果であることが推定された。またアミノ酸そのものの輸送性と直接関連する証拠は得られない。

このようなカチオン性のために Ca^{2+} と結合して輸送されるという可能性は考えられない。いっぽう、Lys の Ca 輸送性として、粘膜上皮のリン酸化に対する Lys の阻害性説がある (Depuis ら1981) が、この説は、膜のリン酸化と Lys のリン酸化が競合することにより、膜のリン酸化が低下して、結果的に Ca の透過性が増大するという考え方に立脚している。すなわち、細胞膜のリン酸化は Ca の輸送を阻止する傾向があるが、Lys のリン酸化にリンの供給が必要であり、その結果細胞膜のリン酸化が不十分となることにより、Ca 吸収への阻止作用は軽減するという考え方である。しかし、Lys のリン酸化が本当に起こるか否か明らかでないことから現在のところ仮説の域を出ない。Raven ら (1960) は、Lys 効果は結紮した回腸部でのみ顕著に認められ、基礎飼料に Lys を添加しても効果はなく、他のアミノ酸 (e.g., Asp, Glu など) の減少作用との総合的效果によるものと説明している。

これらの知見から、Lys による Ca 吸収促進性は、食餌による栄養的效果に原因するものよりは、むしろ、一過性のものと解釈したほうが説明しやすい。

Wasserman らによれば、大腿骨中への放射性 Ca の取り込み促進は、Lys 以外に Trp, Leu など多少の効果があると述べている (1956)。本実験からも Trp が透過性を高める傾向をしめしたことは興味深い。

本実験から明らかなことは、D-Lys は L 型と同様に Gt を上昇させる効果を示した。D-Lys は L 型の輸送の50%程度小腸から吸収されるといわれているが、Gt の増加性はむしろ L-型よりもすぐれており、溶質の透過輸送性は、アミノ酸の輸送とはあまり関連性がなく、細胞間隙のタイトジャンクション (Tight junction, TJ) などのジャンクション類の開閉に作用していることが考えられる。

いずれにしても、Ca の生体膜輸送に対する Lys の特異的效果は否定されるものでなく、最近ヒトの正常繊維芽細胞の培地から Lys を除くと、細胞内の Ca^{2+} 蓄積量が低下することが報告されている (Civilitelli ら1989)。

乳糖の電気的パラメーターに及ぼす効果については、Gtを低下させることから、物質の能動輸送を高めている可能性を示したが、Favusら（1983）放射性Caの粘膜輸送増加と電位の逆転を観察した。後者については本実験でも認めた。

われわれは以前ラット回腸粘膜のベシクル系におけるCaの取り込みを乳糖が促進することを報告しているが（Gunshinら1991）、乳糖はCaの上皮細胞通過能動輸送の経路中粘膜への取り込みを促進していることは一致した結果であり、その機構は粘膜面でのNa⁺との拮抗性によるものとするFavusら（1983）の説明を支持するものである。

食餌摂取後の小腸管腔内の栄養素の濃度は、従来一般生体膜の物質輸送の研究で用いられている数mMのレベルよりもはるかに高く、このようなレベルでは、能動輸送では対応しきれなく、パラ細胞輸送で大半が吸収されることが次第に明らかにされてきたが、TJ類の開閉に関する物質類の関連性も検討されている。そのなかで、カチオン性物質がTJの開口を促進することが報告されており、Lys, Arg等のカチオン性アミノ酸も同様な効果を示す可能性が考えられる。

このようなパラ細胞輸送は、マンニトールのような生体膜通過できない非イオン性物質の輸送量によって測定しているが、ポリエチレングリコールのようなかなりの高分子の通過も、条件によっては可能と考えられる。

このようなパラ細胞輸送の特性を明らかにすることによって、生体に必要な物質の供給法について新しい技術の開発を可能にすることが予想される。

なお、今回の一連の研究においてもっとも重要な問題が残されている。

第一に、得られた電位的パラメーター、特にコンダクタンスの変化を種々のイオンや非イオン性物質の透過性に関する指標として考察してきたが、添加したアミノ酸自体の輸送についてどの程度の関連性があるかという問題である。実際に種々のアミノ酸を添加しても、Iscの変化はAla以外に見られなかった。また予備的であるが、アミノ酸添加実験終了時の漿膜側液のアミノ酸濃度を測定したところ、LysやTau添加によっても、ほとんど検出できなかった。このことは、クランプによって膜の分極が阻止されている状況下では、アミノ酸の輸送が停止していると説明せざるを得ない。

現在までUssingの条件でのアミノ酸輸送に関する知見は全くないので、さらに検討することが必要である。

第二に、Caの輸送についての知見を明確に得ることができなかった点である。この種の実験には放射性のCaとマンニトールの使用が不可欠であり、宇都宮大学の放射性同位元素施設を利用することになり、実験を開始し、ある程度の予備的結果を得たが、まだ充分とはいえず、今回の結果から除いたが、追加の形で本年中には発表できる予定であることを付記する。

参考文献

- Asano, T, *Am. J. Physiol.* 207 : 415-22 (1964)
- Civiteelli, R et al, *Calcif. Tissue Int.* 45 : 193-5, (1989)
- Dupuis, Y et al, *Int. J. Biochem.* 13 : 1163-70 (1981)
- Favus, MJ, Angaid-Backman, E. *Am. J. Physiol.* 246 : G281-85 (1984)
- Freel, K et al, *Am. J. Physiol.* 245 : G816-23 (1983)
- Gordon, TA et al, *Biochim. Biophys. Acta* 1148 : 51 (1993)
- Gunshin, H et al, *Agric. Biol. Chem.* 55 : 1919-21 (1991)
- 速水 洪ら、*栄研報* (昭41) 34 (1968)
- Hu, M-S et al, *Am. J. Physiol.* 264 : G319-324 (1993)
- Karbach, U., *Gastroenterol.* 100 : 47-58 (1991)
- Karbach, U., *J. Nutr.* 122 : 672-77 (1992)
- Karbach, U. Feldmeier, *Dig. Dis. Sci.* 38 : 1815-24 (1993)
- 黒田 嘉一郎, *生化学*, 27 : 99 (1955)
- 小林隆明ら、*農化関東支部発表* (1973)
- Lengemann, FW et al, *J. Nutr.* 62 : 367 (1957)
- Marcus, CS, Lengemann, FW, *J. Nutr.* 77 : 155-60 (1962)
- 南 勝一 ; *中国短期大学紀要*, 51 : (1969)
- 中西智恵美ら ; *共立女子大学家政学部紀要* (43) 9-16 (1997)
- Nellans, HN, Kimberg, DV. *Am. J. Physiol.* 236 : E726-37 (1978)
- Raven, AM et al, *J. Nutr.* 72 : 29-36 (1960)
- 志村二三夫ら、*栄養誌* 28 : 159-63 (1975)
- Walling, MW, Kimberg, DV. *Am. J. Physiol.* 225 : 415-22 (1973)
- Wasserman, RH et al, *J. Nutr.* 59 : 371-83 (1956)
- Wasserman, RH et al, *J. Nutr.* 62 : 367-76 (1957)