ラット十二指腸部結紮ループでの ^{65}Zn 吸収に及ぼすCa量の影響

軍神 宏美¹⁾, 内藤 博²⁾, 野口 忠²⁾, 等々力英美¹⁾, 赤松 隆¹⁾

1) 琉球大学医学部医学科保健医学講座

2) 東京大学農学部農芸化学科栄養化学研究室

Effect of Ca Level on ^{65}Zn Absorption at the Ligated Duodenal Loop of Rat

Hiromi GUNSHIN¹⁾, Hiroshi NAITO²⁾, Tadashi NOGUCHI²⁾, Hidemi TODORIKI¹⁾ and Takashi AKAMATSU¹⁾

1) Department of Preventive Medicine, School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa 903-01, Japan

2) Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

Effect of calcium concentration on Zn absorption was studied in rats. Administration of Zn solution with calcium through gastric tracts depressed markedly the levels of Zn in serum taken from portal vein. Dependency on calcium concentrations of the absorption and distribution of Ca in the body was determined using in situ administration of Zn into ligated duodenal loop of rats. Administration of Zn with high calcium solution decreased significantly the levels of Zn in serum and all the tissues compared with the administration with low and medium calcium solutions. A considerable decrease in the level of Zn was observed in the liver and kidney compared with the rats administered with medium and low calcium solutions.

Key words: Zn absorption, Ca level, Duodenum, Ligated loop

従来までの、人工栄養による哺乳形態では、微量元素の欠乏をきたすおそれのあることが、植地ら(1980)によって指摘され、現在では、食品添加物としてZn及びCuの育児用粉乳への添加が認可されている。特に、人工栄養児の離乳期に、Zn欠乏疾患である腸性肢端皮膚炎(acrodermatitis enteropathica)が発症しやすいが、その原因として、人乳、牛乳中のZnの存在状態の違いが挙げられている。その違いとしてまず第一に、牛乳中のZnは、高分子量画分であるタンパク質(カゼイン)と結合しているが、人乳中では低分子量画分に結合していると報告している(Eckhert, et al., 1977)。人乳中のZnのligandとしては、Evansら(1982)は、Prostaglandin E₂, picolinateを挙げている。一方、Hurleyら(1982)は、citrateがZn binding ligand(ZBL)であると報告しているが、citrateについては小腸での一般的なZn吸収に果たす役割は定かではなく、Menardら(1983)の小腸刷子縁膜における実験では、むしろ否定的な結果を与えている。このように、

ZBLからの説明は難しい。第二の違いとしては、牛乳が人乳に比べかなり量的にCaが多いことが挙げられ、事実、Ca/Zn比は牛乳で高い事が示されている(山内, 1979; Gunshin, et al., 1985)。一般に、Ca摂取の増大は、微量元素の腸管からの吸収低下をきたすことが知られており、Ca摂取がZnの吸収を抑制することが考えられる。また、Feについても同様のことが言え(Lönnerdal, et al., 1981; Barton, et al., 1983; Gunshin, et al., 1985)。Cuも含め一般に牛乳中の微量元素の吸収利用性の低さは、人乳に比べて量的に多いことCaに起因すると考えられる。

したがって、現在のところ、乳成分におけるligand binding説と粘膜輸送系におけるCaと微量元素間の競合性を重視する説があるが、いずれも決定的な証明はない。そこで、われわれは微量元素の中でも現在最も注目されているZnを選び、特に、その吸収に及ぼす管腔内のCaの影響に関し、管腔内で特異的なligand結合を形成しない条件下で、直接粘膜輸送における

Ca²⁺濃度の影響を検討した。

方 法

a. 実験 I (*in vivo* 法)

Wistar 系雄ラット (体重110~120g, 静岡県実験動物農業協同組合) を用い, 22±1℃, 相対湿度60%, 照明時間午前8時から午後8時に設定した動物室で飼育した。約1週間, 固形飼料(MF, オリエンタル酵母社製) と脱イオン水を自由摂取させ予備飼育した。実験前日から24時間, 腸管内残留物による⁶⁵Zn の比活性の変動を可能な限り同一にするために絶食させ, その間, 脱イオン水は自由摂取させた。

実験当日, ラットを5匹ずつの A, B 2 群に分け, 以下のように A 群には A 液, B 群には B 液の試験溶液をそれぞれ200μl ずつ, ストマックチューブを用いて, 強制経口投与した。

A 液: 最終濃度0.3mM ⁶⁵ZnCl₂ (0.2μCi) と500 mM CaCl₂ が混和された溶液

B 液: 最終濃度0.3mM ⁶⁵ZnCl₂ (0.2μCi) 単一の溶液

(A, B 両液とも pH7.0, HCl, NaOH で調整)

投与1時間後に, ネンブタール (0.1ml/100g 体重, pentobarbital, 大日本製薬社製) 麻酔下で開腹し, 門脈及び頸動脈より, それぞれ約0.5ml ずつ採血し, 4℃下で3,000r.p.m.×15分間の遠心分離後, 血清を得た。血清は200μl 中の⁶⁵Zn 量を, 解剖終了後直ちにγ-カウンター (Aloka, Auto Well Gamma System, ARC-500) にて, 計測した (⁵⁹Fe range, 計数効率, 約10%)。

b. 実験 II (*in situ* 法)

実験 I を, 更に詳細に検討する目的で, 試験液を直接結紮ループ内に注入して吸収を測定した。ラットは, 実験 I に示したのと同じ条件のものを, 1 群5匹ずつ, Ca レベルを, Low(L), Normal(N), High(H) の3群に分けた。実験 I と同様に, 約1週間, 固形飼料と脱イオン水を自由摂取させ, 実験前日から24時間絶食させた。

実験当日, ネンブタール麻酔下で開腹し, 幽門直下からその下方, Treitz 靱帯部位前までの十二指腸を探り, 腸間膜を破損することのないように注意しながら軽くつまみ外へ引き出した。その長さ, 約5~6 cm の

十二指腸の両端に, 解剖バサミで小さな切れ目を入れ, 胃と空腸からの消化管残留物が散乱しないように絹糸で結紮した。さらに, 37℃に加温した生理食塩水(0.9% NaCl) 1 ml を, ストマックチューブを用いて上端の切れ目から注入し, 小腸内残留物を洗い流した。綿棒で小腸管を適度に圧迫して中に残った生理食塩水を十分押し出した後, 切れ目の内側を絹糸で結紮し, これを十二指腸結紮ループとした。ループ内に, 下記の LCa, NCa, HCa の3種の試験溶液200μl を, 1/6 皮下注射を用いて注入した。

LCa: 最終濃度0.3mM ⁶⁵ZnCl₂ (0.2μCi), 及び10 mM CaCl₂ 溶液

NCa: 最終濃度0.3mM ⁶⁵ZnCl₂ (0.2μCi), 及び50 mM CaCl₂ 溶液

HCa: 最終濃度0.3mM ⁶⁵ZnCl₂ (0.2μCi), 及び500 mM CaCl₂ 溶液

(3 液とも, pH7.0)

各々上記の⁶⁵ZnCl₂ 試験液を, 十二指腸結紮ループ内に注入した後, 直ちに腹腔内に戻し, 依然麻酔下で1時間放置した。ラットの体温保持の目的で, 市販の電気カーペット上に仰向けにおき, 結紮手術により開腹した上を, ガーゼで覆った。

1時間放置後, 門脈及び頸動脈から, 実験 I と同様にそれぞれ約0.5ml ずつ採血し, 遠心分離にて血清を得た。更に, ループ内容物, ループ自体, 肝臓, 腎臓, 心臓, 脾臓, 睪丸, 及び右大腿骨を採取した。十二指腸ループ内容物, 及び血清, 各種臓器, 十二指腸ループ自体の⁶⁵Zn を, 解剖終了後直ちにγ-カウンターにて測定した。

結 果

本来, *in situ* の吸収実験法は, 結紮部位からの目的物質の消失及び血液中への移行から吸収量を評価するものであるが, 今回は, 目的物質である⁶⁵Zn が各種臓器へ一定時間に累積する量を観察した。

血中 Zn の66%はアルブミンと結合しており, 残り44%はグロブリンと結合していることから, 各臓器中への累積値として評価するために臓器は灌流せず, そのままの状態での計測を行った。

実験 I (Table 1.) と実験 II (Table 2.) は, 共に⁶⁵Zn を等濃度投与してから, 1時間経過した後の門脈血中, 頸動脈血中に出現した⁶⁵Zn のカウント数である。

Table 1 In vivo effects of Ca on ^{65}Zn absorption from small intestine for 1 hour (Experiment. I).

Total cpm (200 μl plasma)	+ Ca ¹⁾ (Mean $\pm$ S.D.) ³⁾	-Ca ²⁾ (Mean $\pm$ S.D.)
Portal vein	62 $\pm$ 12	526 $\pm$ 163**
Artery	98 $\pm$ 86	116 $\pm$ 75

1) +Ca : 0.3mM $^{65}\text{ZnCl}_2$, 500mM CaCl_2 2) -Ca : 0.3mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ only3) Values represent mean $\pm$ S.D. of five rats.

4) Significantly different from NCa group.(p < 0.01)

Table 2 In situ effect of Ca level on ^{65}Zn absorption from ligated duodenum loop for 1 hour (Experiment II).

Tissue	L Ca ¹⁾ (Mean $\pm$ S.D.) ⁴⁾	N Ca ²⁾ (Mean $\pm$ S.D.)	H Ca ³⁾ (Mean $\pm$ S.D.)
Liver	6961 $\pm$ 1094	5836 $\pm$ 1492	1618 $\pm$ 709 **
Kidney	1543 $\pm$ 282	1239 $\pm$ 261	321 $\pm$ 118 *
Heart	177 $\pm$ 25	149 $\pm$ 14	77 $\pm$ 8 *
Spleen	255 $\pm$ 37	211 $\pm$ 34	146 $\pm$ 53 *
Testis	159 $\pm$ 23	141 $\pm$ 16	102 $\pm$ 24 *
Femur(right)	253 $\pm$ 33	191 $\pm$ 26	107 $\pm$ 16 *
★Portal vein	174 $\pm$ 30	190 $\pm$ 35	85 $\pm$ 17 *
★Artery	139 $\pm$ 20	142 $\pm$ 26	70 $\pm$ 9 *

(Total cpm / whole tissue, ★ : total cpm / 200 μl serum)1) L Ca : 10mM CaCl_2 , 0.3mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ 2) N Ca : 50mM CaCl_2 , 0.3mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ 3) H Ca : 500mM CaCl_2 , 0.3mM $^{65}\text{ZnCl}_2$ 4) Values represent mean $\pm$ S.D. of five rats.

5) Significantly different from NCa group.(p < 0.01)

実験 I の門脈及び頸動脈それぞれの血清200 μl 中 ^{65}Zn の総カウントの結果を、Table 1. に示した。500mM CaCl_2 共存下で、門脈血清中の ^{65}Zn の値が、 CaCl_2 非共存下のものと比べ、有意に低下していた (Table 1.)。これとほぼ同様の傾向が、実験 II から得られた (Table 2.)。すなわち、管腔内 Ca 濃度が HCa 群 (CaCl_2 500mM) のとき、血清中及び測定した全ての臓器中の ^{65}Zn の取り込みが有意に低下し、十二指腸で Ca が Zn の吸収を阻害していることが強く示唆される。NCa と LCa 群間では有意差はみられなかったが、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、睪丸、大腿骨については、Ca による Zn 吸収阻害の傾向は観察できた。なお、結紮ループ内容物及び結紮ループ自体の総カウント量については大きな差がなかったので示していない。

Table 3. は、Table 2. の HCa について NCa と LCa とを比較したものである。その結果、肝臓と腎臓における NCa/HCa 比及び LCa/HCa 比が、他の臓器の 2

Table 3 Relative ratio of Zevels between LCa or NCa groups and HCa group in variable tissue or serum.

Tissue	LCa/HCa	NCa/HCa
Liver	4.3	3.6
Kidney	4.8	3.9
Heart	2.3	1.9
Spleen	1.7	1.4
Testis	1.6	1.4
Femur	2.3	1.8
Portal vein	2.0	2.2
Cerv.artery	2.0	2.0

～ 3 倍という高い数値を示した。

考 察

Ca 摂取が増加すると、 Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} などの吸収が抑制されるという報告がある (Chapman, et al., 1957; Heth, et al., 1965; Dick, 1954; Toothill, 1963; Palmer, et al., 1964; Leeuman, et al., 1971; Hamilton, et al., 1978; Quartermann, 1981; Adham, et al., 1980)。とりわけ、1950年代半ばから1960年において、豚に Ca を大量に投与すると Zn 欠乏が発症する例がいくつか報告されており (Tucker, et al., 1955; Stevenson, et al., 1956; Lewis, et al., 1956, 1957; Luecke, et al., 1956, 1957; Bellis, et al., 1957; Forbes, 1960)、その多くは Zn 欠乏による体重減少やとりわけパラケラトシス (parakeratosis) という深刻な皮膚疾患誘起の例である。

これまでに、著者らは、微量元素の代謝に及ぼす食餌乳糖による各種組織への微量元素増大効果は、低 Ca 食で顕著になる傾向を報告した (Gunshin, et al., 1988)。このように、Ca が他の元素の吸収を抑制するとすれば、乳糖による微量元素の吸収促進効果は、多量の Ca の摂取によって抑制される可能性が考えられる。逆に、食餌 Ca が低い場合は、他の元素の吸収に対する抑制の要因が軽減されるので、乳糖による吸収促進効果が増強されることも予想される。

Ca と Zn をはじめとする微量元素間の拮抗作用は、本来体細胞輸送系に固有の性質であるのか、あるいは微量元素の吸収や排泄の局面において特有の現象であるのか、更には一般的に輸送機構をこれらのイオンが共有するのか、明確な議論はまだ為されていないが、上述の事実から、一般的に微量元素の代謝に Ca が抑

制的に関与していることが示唆される。

Znの消化管吸収に対する仮説には以下のようなものがある (Solomons, et al., 1984)。まず、膵臓から低分子量のZn結合因子が小腸管内に分泌される。食物中のZnは消化の段階で解離してこの膵臓由来の低分子に小腸管内で結合し、この結合した錯体は上皮細胞表面から細胞内に運ばれる。上皮細胞内のZnは側底膜外側の結合部位に移り、金属の結合していないアルブミンが反応して側底膜からZnを引き離す、というモデルである。小腸におけるZnの吸収機構は、主として輸送担体によるとされているが、主要な吸収部位が上部であるのか、下部であるのか判然としていない。しかし、十二指腸を用いた本実験において、Caにより顕著なZn吸収阻害効果が示され、少なくとも十二指腸部位でCaが吸収される際、Znの吸収の阻害が同時に起こっていることが強く示唆される。

今回、基準としたNCa群のCa濃度50mMは、基礎飼料を摂取した際のラット小腸管腔内Ca濃度64-72mM (Sato, et al., 1983) に近似した数値に設定したものである。又、Zn濃度0.3mMについては、基礎飼料中のCa濃度をもとに、概算した値である。すなわち、Ca、Zn両者とも、ここで用いた濃度は、実際の小腸管腔内濃度に極めて近い値となっていると考えられる。

実験IとII両方ともCaレベル500mMというのは、Zn濃度0.3mMに対してかなり高い濃度ではある。しかし、ラットを用いた実験において、通常レベルのCa食(0.6%)摂取時の小腸管腔内可溶態Ca濃度は、前述のように100mM弱の濃度である。日常の食生活の中で、Ca不足を補うためにことさらCa強化を考える際、500mMというのは非現実的な濃度ではないだけに、Ca摂取量について十分考慮すべきことを示唆する結果である。

以上のように、CaがZnの吸収を阻害していることが示され、人乳におけるZnの有効な吸収利用性の問題に、Caが大きく関わっていることが推測される。Feについても、人乳では45~75%が吸収利用されるのに対して、牛乳からは10%前後吸収されるに過ぎないことが、Lönnerdalら(1981)により報告されており、この原因についてもCaが関与していることが推測される。すなわち、FeもZnと同様に牛乳中Ca/Fe比は人乳中のそれと比べ高くなっており(山内, 1979 ;

Gunshin, et al., 1985)、この説明としてBartonら(1983)は、牛乳中に多く含有されるCaがFeの吸収利用性を低めていることを報告している。但し、彼らは、Ca/Feの相対比がFe吸収阻害の因子ではなく、Ca絶対量が問題である、と指摘している。

しかし、今回のような*in vivo*あるいは*in situ*の実験から得られる情報のみでは、小腸におけるZn吸収のメカニズムについて詳細に検討することはできない。今後、これら吸収生理を解明するための、新たな方法論を導入する必要があると考えられる。

文 献

- Adham, N.F. and Song, M.K., 1980: Effect of calcium and copper on zinc absorption in the rat. *Nutr. Metab.*, 24: 281-290.
- Barton, J.C., Conrad, M.E. and Permley, R.T., 1983: *Gastroenterol.*, 84: 90-101.
- Bellis, D.B. and Philp, J.M., 1957: Effect of zinc, calcium, and phosphorus on the skin and growth of pigs. *J. Sci. Fd Agric.*, 8: 119-127.
- Chapman, D.G. and Campbell, J.A., 1957: Effect of calcium and phosphorus salts on the utilization of iron by anaemic rats. *Br. J. Nutr.*, 11: 127-133.
- Dick, A.T., 1954: Preliminary observations on the effect of high intakes of molybdenum and of inorganic sulphate on blood copper and on fleece character in crossbred sheep. *Aust. Vet. J.*, 30: 196-202.
- Eckhert, C.D., Sloan, M.V., Duncan, J.R. and Hurley, L.S., 1977: Zinc Binding: a difference between human and bovine milk. *Sciense*, 195: 789-790.
- Evans, G.W. and Johnson, P.F., 1980: Characterization and quantitation of a zinc-binding ligand in human milk. *Pediatr. Res.*, 14, 876-880.
- Forbes, R.M., 1960: Nutritional interactions of zinc and calcium. *Fed. Proc.*, 19: 643-647.
- Gunshin, H., Yohikawa, M., Doudou, T., Kato, N., 1985: Trace elements in human milk, cow's milk and infant formula. *Agric. Biol. Chem.*, 49(1): 21-26.
- Gunshin, H., Ouchi, H. and Kato, N., 1988: Effects of dietary lactose and calcium level on tissue

- levels of trace elements, molybdenum, nickel, cobalt and chromium in rats. *Nutr. Rep. Int.*, 37(5): 1021-1026.
- Hamilton, D.L. and Smith, M.W., 1978: Inhibition of intestinal calcium uptake by cadmium and the effect of a low calcium diet on cadmium retention. *Environ. Res.*, 15: 175-184.
- Heth, D.A. and Hoekstra, W.G., 1965: Zinc-65 absorption and turnover in rats. I. A procedure to determine zinc-65 absorption and the antagonistic effect of calcium in a practical diet. *J. Nutr.*, 85: 367-374.
- Hurley, L.S. Keen, C.L., Young, H.M. and Lonnerdal, B., 1982: Effect of chelates on zinc concentration in rat maternal and pup tissues. *Fed. Proc.*, 41, 2982.
- Leeuman, J.M. and Kluijve, J.J., 1971: The influence of different Ca and P supplies on the vitamin A, Cu and Mn status of young cattle with additional effects of growth and season, *Neth. J. Agric. Sci.*, 19: 189-194.
- Lewis, P.K.Jr., Hoekstra, W.G., Grammer, R.H. and Hillips, P.H., 1956: The effect of certain nutritional factors including calcium, phosphorus and zinc on parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.*, 15: 741-751.
- Lewis, P.K.Jr., Hoekstra, W.G. and Grammer, R.H., 1957: Restricted calcium feeding versus zinc supplementation for the control of parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.*, 16: 578-588.
- Lonnerdal, B., Keen, C.L. and Hurley, L.S., 1981: Iron, copper, zinc, and manganese in milk. *Ann. Rev. Nutr.*, 1: 149-174.
- Luecke, R.W., Hoefer, J.A., Brammell, W.S. and Thorp, F.Jr., 1956: Mineral inter-relationships in parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.*, 15: 347-351.
- Luecke, R.W., Hoefer, J.A., Brammell, W.S. and Schmidt, D.A., 1957: Calcium and zinc in parakeratosis of swine. *J. Anim. Sci.*, 16: 3-11.
- Menard, M.P. and Cousins, R.J., 1983: Effect of citrate, glutathione and picolinate on zinc transport by brush border membrane vesicles from rat intestine. *J. Nutr.*, 113: 1653-1656.
- Palmer, R.F. and Thompson, R.C., 1964: Strontium-calcium inter-relationships in the growing rat. *Am. J. Physiol.*, 207(3): 561-566.
- Quarterman, J., 1981: Handbook of nutritional requirements in a functional context. Vol. II, Rechcigl, M., CRC press, pp.325-360.
- Sato, R., Noguchi, T. and Naito, H., 1983: Effect of lactose on calcium absorption from the rat small intestine with a non-flushed ligated loop. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 29: 365-373.
- Solomons, N.W. and Cousins, R.J., 1984: Zinc. Inabsorption and malabsorption of mineral nutrients. N.Y. Alan. R. Liss., p125.
- Stevenson, J.W. and Earle, I.P., 1956: Studies on parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.*, 15: 1036-1045.
- Toothill, J., 1963: The effect of certain dietary factors on the apparent absorption of magnesium by the rat. *Br. J. Nutr.*, 17: 125-134.
- Tucker, H.F. and Salmon, W.D., 1955: Parakeratosis of zinc deficiency disease in the pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 88: 613-616.
- 植地 正文, 池沢 芳江, 兵頭 行夫, 北山 徹, 1980: 母乳中微量元素 (trace element) の経時的変化について. *小児科臨床*, 33: 2330-2248.
- 山内邦男, 1979: 人乳成分の化学—牛乳成分とどう違うかII. 脂質, 糖質, 無機質及びビタミン. *日本農芸化学会誌*, 53: R49-R60.

(1989年 4 月14日受付)