— 原 著 —

ラット消化液トランスフェリンの存在ならびに 2Fe トランスフェリンの腸管吸収について*

麦谷 圭一郎

日本医科大学第2生化学教室 (主任: 吉野芳夫教授)

Detection of transferrin in the digestive juices of rat and its possible role in iron absorption from the small intestine

Keiichiro Mugitani

Department of Biochemistry (Chief: Prof. Yoshio Yoshino), Nippon Medical School

Presence of transferrin in digestive juices and its possible role in iron absorption of rats were examined.

Transferrin concentrations in saliva, bile, pancreas juice and intestinal fluid obtained from adult rats of the Wistar strain were measured by Rocket immunoelectrophoretic assay. Transferrin concentration in pancreas juice was the highest (approximately 0.28 mg/ml) in the collected digestive juices and the concentration in iron deficient rats was 4 times higher than that of normal rats. The iron saturation rate of transferrin in pancreas juice was approximately 40%.

The participation of transferrin in iron absorption was investigated by the absorption through the intestinal segment of rats, into which ^{59}Fe labeled diferric transferrin was injected. The rate of iron absorption was more efficient in duodenal and proximal segments compared to the distal segment of the small intestine. The value was approximately 20% in the duodenal segment but less than 2% in the ileal segment. Iron absorption from diferric transferrin in the duodenal segment was inhibited by 1 mM monodansylcadaverine, the inhibitor of endocytosis, or addition of 20 times the normal amounts of nonradioactive transferrin in the test material. These data indicated that the process of iron absorption through diferric transferrin was not a passive phenomenon. Furthermore, one hour after the absorption of diferric ^{125}I -labeled transferrin in the proximal segment of the small intestine, ^{125}I -labeled transferrin was detected from the mucosal tissue of the segment, the luminal surface of which had been treated by 0.25% pronase E before the mucosal scraping.

These results suggested a possibility that transferrin in digestive juices was able to combine with dietary iron and the iron was internalized into mucosal cells of the small intestine through the receptor mediated transport of diferric transferrin.

Key words: iron absorption, rat small intestine, transferrin, digestive juice

緒 言

トランスフェリン (Tf) は血漿中に存在する鉄結合蛋白質であり、主な生理機能は造血細胞や増殖過程の組織細胞等への鉄の運搬である。鉄を必要とする細胞内への鉄の取り込みは、細胞表面に存在する Tf レセプターを介して行われる。これまでに、網状赤血球や

種々の培養細胞の Tf レセプターについて、その機能や構造が数多く研究されている¹⁻⁴⁾。一方、鉄の腸管吸収の第一段階は、小腸粘膜細胞への鉄取り込みであるが、この機構に Tf および Tf レセプターが関与するかどうかは、いまだ議論の多いところである。

Tf はラット、ウサギの乳汁中にも存在する⁵⁾。ヒトの場合、乳汁に Tf は含まれず、代わりに Tf と同様に鉄に対する親和性の高いラクトフェリン (Lf) が存在する。Lf は、また乳汁以外にも脾液、唾液等の外分泌液にも含まれる⁶⁾が、ラット、ウサギでは、乳汁以外の外分泌液に Tf の存在することを証明した報告はない。

Correspondence to Keiichiro Mugitani, Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

*本論文は学位論文である。

外分泌液中のLfは強い鉄親和性を有することから、その主な生理機能は抗菌作用であり、腸管内感染防御物質といわれている⁷⁾。また、最近では、マウスの小腸粘膜刷子縁にLfレセプターの存在が報告され、鉄の腸管吸収にLfの関与することが示唆されている^{8,9)}。ラットではTfが乳汁中に認められているものの、その生理機能は不明である。

著者は、ラットの鉄腸管吸収機構にTfおよびTfレセプターが関与するか、その可能性を検討する目的で、まず乳汁以外の外分泌液中にTfが含まるか否かを調べた。さらに、ラットの小腸に結紮腸管を作製し、Tf-鉄のin vivo吸収実験を実施した。その結果、脾液、胆汁、唾液に免疫学的に検出可能なTfが確認された。また、Tf-鉄がレセプターを介して粘膜細胞に取り込まれることを示唆する結果を得た。

研究材料および方法

(1) 材料

1) 動物

体重200~300gのWistar系雄ラット、雌ラット、および雄ラットに鉄欠乏食(5.5 μg Fe/g, オリエンタル酵母製)を4週間与えたものを用いた。

2) 試薬

Sephadex G-25, G-150, DEAE Sephadex A-50はPharmacia Fine Chemicals社、Bio-Gel P-300はBio-Rad Laboratories社、Freund's complete adjuvantはDifco社、 $^{59}\text{FeCl}_3$ 、 Na^{125}I はNew England Nuclear社、aprotinin, monodansylcadaverineはSigma Chemical社、pronase EはMerck社、NembutalはAbbott Laboratories社、agarose CはHoechst社のものを使用した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

(2) 方法

1) ラット消化液の採取

正常雄、雌ラット、鉄欠乏雄ラットより、Nembutal麻酔下に唾液、胆汁、脾液、腸液を採取した。唾液は約30mgの脱脂綿を口腔内に挿入、2時間後に取り出し、直ちに100 kunits/ml aprotininを含む生理食塩水1mlにて抽出する。胆汁は総胆管分岐末梢側0.5cmのところで結紮、その中枢側にImamura No. 2 tubeを挿入し、採取した。総胆管結紮20分後に、総胆管が腸管壁を貫く直前で切開、Imamura No. 2 tubeを挿入して脾液を採取し、直ちにaprotininを含む生理食塩水で20倍希釈とした。また、腸液は総胆管開口部よ

り肛側で10cmの結紮腸管を作製し、その中に1mlのaprotininを含む生理食塩水を注入し、その後直ちに抜き取って採取した。また、分娩後2日目の雌ラットよりパスツール・ピペットにより乳汁を採取した。

2) Rocket免疫電気拡散法

Laurellの方法¹⁰⁾に従い1.2% agarose Cに抗トランスフェリン血清0.8%を含む平板ゲルを作製し、このゲルに直径2mmの穴を作り、その中に検体を入れ、泳動用緩衝液として、50 mM Veronal buffer pH 8.6を用い、4℃、26 mAの定電流で3時間30分泳動した。検体と同時に、既知の蛋白質濃度をもつ精製トランスフェリンを泳動し、得られた標準曲線により各検体の蛋白質濃度を定量した。なお、使用した検体は唾液、胆汁、脾液、腸液、血清、乳汁である。

3) 放射活性の測定

^{59}Fe と ^{125}I の放射活性は、 γ 線シンチレーション・カウンタ(Aloka Autowell Gamma System ARC 221型)にて計測した。

4) 蛋白質濃度の測定

蛋白質濃度は280nmの吸光度、あるいはLowryらの方法¹¹⁾に従い、bovine serum albuminを基準として測定した。

5) 脾液トランスフェリンの放射性鉄標識と分離

採取した脾液900 μl と、2 μCi の ^{59}Fe を含む鉄溶液(0.2 mM FeCl_3 , 0.5 mM NaHCO_3 , 0.5 mM Na-citrate)100 μl とを混和し、2時間室温で放置した後、0.15 M NaCl , 0.1 M Tris buffer pH 8.0で平衡化したSephadex G-150 column (2.1 $\times$ 50 cm)にてゲルろ過した。

6) 免疫沈降反応

精製されたラット血清トランスフェリンを抗原として、ウサギに感作させて作った抗トランスフェリン血清を用いてYoshinoらの方法¹²⁾に従って実施した。

7) 脾液および胆汁の含鉄量測定

WHOの血清鉄測定法に従い、鉄量の基準曲線を作製し、各々の鉄量を測定した。

8) 結紮腸管による鉄の吸収実験

エーテル麻酔下のラットに、十二指腸は総胆管開口部より肛側に5cm、空腸および回腸はトライツ靱帯より1cm離れたところより10cmの長さの結紮腸管を9カ所作製し、その各々に ^{59}Fe -2 Fe-Tf溶液(1.2 mg/ml ^{259}Fe -Tf, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl , 1 mM PMSF, 100 kunits/ml aprotinin), 2価鉄溶液(1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{59}Fe , 20 $\mu\text{g/ml}$ Fe^{++} (FeSO_4) 0.375 mM

Na-ascorbate pH 4.3), および 3 価鉄溶液 ($1 \mu\text{Ci/ml}$ ^{59}Fe , $20 \mu\text{g/ml}$ Fe^{+++} (FeCl_3) 10 mM HCl pH 2.1) を, 0.5 または 1 ml ずつ注入した. 1 時間後に結紮部位を切り出して, 全放射活性を測定し, 投与量から差し引いて吸収量を求め, 通り抜け吸収率 (transferred) とした. また, 各結紮腸管を縦に切開し, 粘膜を削り取って粘膜中の放射活性を測定し, 粘膜残存率 (mucosal uptake) とした. なお, 両者の合計を総吸収率 (total absorption) とした.

エンドサイトーシスの阻害剤である monodansylcadaverine (以下 MDC と略す) の影響を調べる実験では 1 mM MDC を 2 Fe-Tf 溶液, 2 価鉄溶液, 3 価鉄溶液に加え, 各々の溶液を十二指腸 (5 cm) および空腸上部 (10 cm) に作製した結紮腸管に 0.5 または 1.0 ml ずつ注入して, 上記と同様吸収実験を行った. さらに, ^{59}Fe - 2Fe-Tf 溶液に 20 倍過剰の cold 2Fe-Tf を添加した溶液についても吸収実験を行い, ^{59}Fe - 2 Fe-Tf 溶液のみの場合と比較した.

9) $2 \text{ Fe-}^{125}\text{I-Tf}$ の腸管腔内消化に対する抵抗性

エーテル麻酔下のラットに総胆管開口部より肛側に 25 cm の結紮腸管を作製し $2 \text{ Fe-}^{125}\text{I-Tf}$ 溶液を 2.5 ml 注入し, 1 時間後に結紮腸管を取り出し, その管腔内溶液を 750 g , 5 分間遠心した時の上清液を Bio-Gel P-300 ($3.2 \times 40 \text{ cm}$) のカラムにてゲルろ過した. 各分画について ^{125}I の放射活性と Tf 濃度を Rocket 免疫電気拡散法で測定した.

10) ^{59}Fe , ^{125}I 標識 Tf の作製

Roop ら¹³⁾ および山田¹⁴⁾ の方法に従って精製したラット血清 Tf を Aisen の方法¹⁵⁾ で, apo-Tf とし, Roop らの方法で放射性鉄を Tf に添加し ^{59}Fe 標識 Tf

を作製した. また, Tf の ^{125}I 標識はエンザイモビーズ (Bio-Rad 製) 法によった.

11) 単離粘膜細胞の作製

9) と同様の操作を行った 1 時間後の結紮腸管を反転し, 直ちに 0.25% pronase E を含む 0.15 M NaCl , 0.1 M Tris buffer pH 8.0 溶液中で, 4°C , 1 時間インキュベートした後, Peppriell らの方法¹⁶⁾ により単離粘膜細胞を調整した. 得られた単離細胞中の ^{125}I の放射活性を測定した後, ホモジェナイズし, 750 g , 5 分間遠心した後の上清液, 沈殿物の放射活性をそれぞれ測定し, さらに上清液について免疫沈降反応を行った.

12) DNA の測定

Kissane and Robins の方法¹⁷⁾ に従い, 基準曲線を作製し単離粘膜細胞のホモジェネートについて DNA を測定した.

結 果

1. ラット消化液中の Tf 濃度と鉄結合能

ラット消化液, 血清および乳汁中の Tf 濃度の測定結果を Fig. 1 と Table 1 に示した.

(1) 正常雄ラットと鉄欠乏雄ラットの Tf 濃度の比較

血液 Hb 値が約 16.2 g/dl の正常雄ラットと, 約 10.0 g/dl の鉄欠乏雄ラットとを比較すると, 血清 Tf 濃度は, 正常が約 6.5 mg/ml , 鉄欠乏が約 8.8 mg/ml で有意の差で鉄欠乏ラットのほうが高い. 脾液では正常が約 0.28 mg/ml に対し鉄欠乏が約 1.19 mg/ml と約 4 倍もの上昇を示した. すなわち, 正常の場合, 脾液 Tf 濃度は血清 Tf 濃度の 4.3% で, 鉄欠乏の場合には, その比が 13.5% となり, 鉄欠乏で特に Tf が増加

Table 1 Transferrin concentration in digestive juices

	male rats normal	male rats iron deficient	female rats normal	
sample	Hb : $16.2 \pm 1.1(11)^a$	Hb : $10.0 \pm 1.2(6)^a$	Hb : $16.9 \pm 1.8(10)$	g/dl
plasma	$6.50 \pm 1.60(10)^b$	$8.80 \pm 1.30(6)^b$	$5.60 \pm 1.40(8)$	mg/ml
pancreas juice	$0.28 \pm 0.10(10)^{c,d}$	$1.19 \pm 0.97(6)^c$	$0.94 \pm 0.52(10)^d$	mg/ml
bile	$0.03 \pm 0.01(11)^e$	$0.03 \pm 0.01(6)$	$0.05 \pm 0.01(7)^e$	mg/ml
intestinal fluid	$6.60 \pm 3.60(13)$	$5.80 \pm 3.70(6)$	$10.20 \pm 6.30(6)$	$\mu\text{g/mg}^*$
saliva	$113.1 \pm 64.2(12)^f$	$129.2 \pm 39.5(6)$	$197.2 \pm 93.5(7)^f$	$\mu\text{g/mg}^*$
milk			$1.70 \pm 0.30(3)$	mg/ml

1 () : number of rats

2 * : mg of total protein

3 Values were means $\pm$ SD, measured by Rocket immunoelectrophoretic assay.

4 Significant difference ($p < 0.05$) was shown by Student's t-test between the values having the same alphabetic superscript.

Fig. 1 Rocket immunoelectrophoretic assay of the transferrin concentration in digestive juices, plasma, and milk
1~4: purified transferrin (60, 90, 120, 150 ng), 5: intestinal fluid, 6: pancreas juice ($\times 5$), 7: bile, 8: saliva, 9: milk ($\times 100$) and 10: plasma ($\times 200$).
1.2% agarose C containing 0.8% anti transferrin rabbit serum.
A sample ($3 \mu l$) was applied on a hole (diameter 2 mm).

Table 2 Ratio of the iron and transferrin concentration (nmol/ml) in pancreas juice and bile obtained from normal rats

	Tf	iron	ratio
pancreas juice	3.6	2.9	1 : 0.8
bile	0.4	20.7	1 : 51.8

することが分かった。これに対し、胆汁の Tf 濃度は脾液の約 1/10 で、しかも鉄欠乏時でも生理的変動はない。

(2) 正常雄ラットと正常雌ラットの Tf 濃度の比較

血液 Hb 値、血清 Tf 濃度に関し特に変化はなかったが、脾液、胆汁、唾液では有意の差をもって雌のほうが Tf 濃度は高く、また腸液においても高い傾向を示した。なお、乳汁の Tf 濃度は約 1.7 mg/ml もあり、血清 Tf 濃度 5.6 mg/ml の約 30% にも相当する高い Tf を含むことが確認された。

(3) 脾液、胆汁の鉄含有量の比較

脾液および胆汁中の鉄含有量を定量したところ、脾液中の鉄は 2.9 nmol/ml、胆汁では 20.7 nmol/ml と測定された (Table 2)。なお、前述の脾液と胆汁の Tf 濃度をモル濃度に換算すると、それぞれ 3.6 nmol/ml、0.4 nmol/ml である。したがって、脾液における Tf と鉄のモル比は 1 : 0.8 となることより、その鉄飽和率は約 40% である。一方、胆汁のモル比は 1 : 51.8 となり Tf 結合体以外の形態の鉄が多数存在すること

Fig. 2 Gel filtration pattern on Sephadex G-150 column of ^{59}Fe labeled pancreas juice (a) and serum Tf (b)

が示された。

(4) 脾液 Tf の鉄結合能

採取した脾液と ^{59}Fe 標識鉄溶液とを混和して、脾液中の Tf に鉄を添加し、その混合液を Sephadex G-150 でゲルろ過した (Fig. 2)。 ^{59}Fe の放射活性は二峰性となり、最初の peak の位置は精製 Tf の溶出曲線で見られる peak の位置と一致した。2 番目の peak は精製 Tf の溶出曲線ではみられず、推定分子量 1,000 の ^{59}Fe の peak と考えられた。また、分画ごとに抗ラット血清 Tf 抗血清を用いる免疫沈降反応を施行した結果では最初の peak の位置に免疫的に反応した ^{59}Fe が認められた。さらに、各分画について Rocket 免疫電気拡散法を施行した結果でも最初の peak に一致して Tf が検出された。

Table 3 The rate of iron absorption in the form of ^{59}Fe -2 Fe-transferrin in different parts of the small intestine in normal rats (n=3)

	duodenum		jejunum					ileum		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
total absorption (%)	18.3	17.5	22.6	8.0	2.9	5.0	3.9	2.1	1.7	1.1
transferred (%)	14.0	9.3	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
mucosal uptake (%)	4.3	8.2	11.6	8.0	2.9	5.0	3.9	2.1	1.7	1.1

Ligated segments of the intestine were prepared for in vivo experiment of the iron absorption, and the numbers on the table denote the location of the segments, namely No. 1 was 5 cm length of duodenal segment and No. 2~9 were 10 cm length of jejunal and ileal segments, which started from 1 cm below Treitz's ligament.

The results were expressed by the percentage for the given dose.

2. 結紮腸管よりの Tf-鉄の吸収

(1) 小腸各部位よりの Tf-鉄の吸収

小腸全域にわたって Tf-鉄の吸収の有無を調べた (Table 3). Tf-鉄の通り抜け吸収 (transferred) は十二指腸および空腸上部でのみみられ、空腸下部および回腸では吸収されなかった。粘膜への取り込み (mucosal uptake) では Tf-鉄は小腸の各部分で認められるが、回腸では低い。これらを合わせた総吸収率 (total absorption) でみると十二指腸、空腸上部での吸収が高い。したがって、以後の吸収実験には十二指腸、空腸上部を用いるのが最適と考えた。

(2) Tf-鉄, 2 価鉄および 3 価鉄の吸収と monodansylcadaverine (MDC) の影響

十二指腸および空腸上部の in vivo 結紮腸管を用いて、Tf-鉄, 2 価鉄, 3 価鉄の吸収およびエンドサイトーシスの阻害剤である MDC の影響を調べた (Table 4, 5).

1) 十二指腸における吸収

MDC 負荷なしの control 群における 2 Fe-Tf からの鉄吸収率 27.7% は 2 価鉄, 3 価鉄の吸収率 37.4%, 52.5% と比べて低値ではあるが、少なくとも Tf-鉄の吸収が鉄の腸管吸収の一部を担っていることを示唆する結果となった。

MDC 負荷なしの control 群と MDC 群とを比較すると、総吸収率では Tf-鉄, 2 価鉄, 3 価鉄いずれも有意の差 ($p < 0.05$) で MDC 群が低値を示し、どの鉄形態でもその吸収は MDC で阻害されることが証明された。通り抜け吸収率および粘膜残存率でも同様の傾向が認められた。

2) 空腸上部における吸収

空腸上部では MDC 負荷なしの control 群の総吸収率において Tf-鉄の吸収は十二指腸の場合とほとんど

Table 4 Effect of monodansylcadaverine on the duodenal iron absorption in the forms of 2 Fe-transferrin, Fe^{2+} and Fe^{3+} ions

A) Total absorption

	control group	MDC group
2 Fe-transferrin (%)	27.7±11.3(9) ^{a)}	11.8±4.8(7) ^{a)}
Fe^{2+} (%)	37.4±10.8(9) ^{b)}	25.9±8.3(9) ^{b)}
Fe^{3+} (%)	52.5±17.0(9) ^{c)}	25.5±18.6(8) ^{c)}

B) Transferred absorption

	control group	MDC group
2 Fe-transferrin (%)	17.2±9.3(9) ^{a)}	6.8±5.0(7) ^{a)}
Fe^{2+} (%)	23.1±12.6(9)	14.6±8.9(9)
Fe^{3+} (%)	40.1±20.1(9) ^{a)}	17.9±17.3(8) ^{a)}

C) Mucosal uptake

	control group	MDC group
2 Fe-transferrin (%)	10.5±3.5(9) ^{a)}	5.0±1.0(7) ^{a)}
Fe^{2+} (%)	14.4±3.8(9) ^{a)}	9.2±5.4(9) ^{a)}
Fe^{3+} (%)	12.4±3.8(9) ^{b)}	7.6±2.2(8) ^{b)}

1 () : number of rats

2 Values were means±SD.

3 Significant difference ($p < 0.05$) was shown by Student's t-test between the values having the same alphabetic superscript.

4 Components of iron solution

Tf solution: 1.2 mg/ml ^{59}Fe -Tf, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1 mM PMSF, 100 kunits/ml aprotinin

Fe^{2+} solution: 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{59}Fe , 20 $\mu\text{g/ml}$ Fe^{2+} (FeSO_4) 0.375 mM Na-ascorbate pH 4.3

Fe^{3+} solution: 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{59}Fe , 20 $\mu\text{g/ml}$ Fe^{3+} (FeCl_3) 10 mM HCl pH 2.1

Monodansylcadaverine solution: 1 mM monodansylcadaverine/each solution

Table 5 Effect of monodansylcadaverine on the jejunal iron absorption in the forms of 2 Fe-transferrin, Fe²⁺ and Fe³⁺ ions

A) Total absorption

	control group	MDC group
2 Fe-transferrin (%)	27.7±13.3(9)	18.5±11.6(7)
Fe ²⁺ (%)	18.0±7.9(9)	15.7±5.5(7)
Fe ³⁺ (%)	30.1±16.0(9) ^{a)}	15.3±9.4(8) ^{a)}

B) Transferred absorption

	control group	MDC group
2 Fe-transferrin (%)	11.7±8.7(9)	6.6±4.8(7)
Fe ²⁺ (%)	3.7±3.8(9)	3.3±3.8(9)
Fe ³⁺ (%)	10.3±8.4(9) ^{b)}	5.6±7.7(8) ^{b)}

C) Mucosal uptake

	control group	MDC group
2 Fe-transferrin (%)	16.0±7.0(9)	11.9±7.7(7)
Fe ²⁺ (%)	12.4±5.1(9)	12.4±4.4(9)
Fe ³⁺ (%)	21.2±11.3(9) ^{c)}	9.6±2.5(8) ^{c)}

1 () : number of rats

2 Values were means±SD.

3 Significant difference (p<0.05) was shown by Student's t-test between the values having the same alphabetic superscript.

4 Components of iron solution

Tf solution: 1.2 mg/ml ⁵⁹Fe-Tf, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1 mM PMSF, 100 kunits/ml aprotininFe²⁺ solution: 1 μCi/ml ⁵⁹Fe, 20 μg/ml Fe²⁺ (FeSO₄) 0.375 mM Na-ascorbate pH 4.3Fe³⁺ solution: 1 μCi/ml ⁵⁹Fe, 20 μg/ml Fe³⁺ (FeCl₃) 10 mM HCl pH 2.1

Monodansylcadaverine solution: 1 mM monodansylcadaverine/each solution

同程度であるが、2価鉄、3価鉄では明らかに十二指腸からの吸収のほうが良い。また、十二指腸とは逆に空腸上部では通り抜け吸収率は低く、粘膜残存率のほうが高い。空腸上部の総吸収率に対するMDCの影響は、3価鉄では有意差が認められ、MDCが吸収を阻害することが証明された。Tf-鉄の場合も阻害する傾向を認めた。

(3) 過剰量の非放射性2 Fe-Tf共存下での⁵⁹Fe-2 Fe-Tfの腸管吸収

2 Fe-Tfの鉄吸収機構にTfに特異的なレセプターが関与するか否かを検討する目的で、試料の⁵⁹Fe-2Fe-TfのもつTf絶対量(2.6 mg/ml)の20倍量の非標識Tfを試料に添加したものをTf過剰試料(52 mg/

Table 6 Radioiron absorption in the form of ⁵⁹Fe-2 Fe-transferrin infused in ligated duodenum with or without the addition of 20 fold nonradioactive transferrin (NRT)

	without NRT	with NRT
total absorption (%)	26.8±15.5(5) ^{a)}	5.0±3.6(4) ^{a)}
transferred (%)	20.5±11.2(5) ^{b)}	1.7±3.5(4) ^{b)}
mucosal uptake (%)	6.3±4.8(5)	3.3±0.3(4)

1 () : number of rats

2 Values were means±SD.

3 Significant difference (p<0.05) was shown by Student's t-test between the values having the same alphabetic superscript.

ml) として、それを吸収実験に用い、通常の⁵⁹Fe-2 Fe-Tf試料の場合と比較した(Table 6)。⁵⁹Fe-2 Fe-Tfのみの場合、放射性鉄の総吸収率は26.8%であるが、20倍過剰のcold 2 Fe-Tfが共存すると有意に低下する(p<0.05)。この現象は通り抜け吸収率で特に顕著であった。

(4) 2 Fe-¹²⁵I-Tfの腸管腔内消化に対する抵抗性

2 Fe-¹²⁵I-Tfを十二指腸in vivo結紮腸管に注入し、1時間後に腸管内残存溶液をBio-Gel P-300でゲルろ過した。Fig. 3はその溶出曲線である。残存溶液中の放射活性は三つのpeakに分かれ、2 Fe-¹²⁵I-Tfが腸管内で消化を受けることが示された。ゲルろ過による溶出順にpeak 1, 2, 3と名付けるとpeak 1はTfの溶出位置と一致し、しかも抗Tf血清と反応した。peak 2は分子量の減少を来しているが、なお、抗Tf血清に反応性をもち、peak 3は推定分子量1,200で抗Tf血清への反応性を失った。したがって、2 Fe-¹²⁵I-Tfは十二指腸管腔内で一部はintactなまま存在するが、しかし、徐々に消化されると認められた。

(5) 単離粘膜細胞への2 Fe-¹²⁵I-Tfの取り込み

2 Fe-¹²⁵I-Tf溶液を注入して1時間後の結紮腸管から調製した単離粘膜細胞には¹²⁵Iの放射活性が認められた。その値は6,860 cpm/μg DNAであった。また、そのホモジェネートの上清液の免疫沈降反応を行ったところ、上清液の放射活性の12.6%が沈殿物に検出され(Table 7)。これにより¹²⁵I-Tfが検出されたと考えられる。単離粘膜細胞はpronase E処理により細胞表面の2 Fe-¹²⁵I-Tfを除去したので、この放射活性は粘膜細胞内に取り込まれたTfに由来すると考えられる。

Fig. 3 Gel filtration pattern on Bio-Gel P-300 column of $2\text{Fe-}^{125}\text{I-Tf}$ (a) and its digested material by incubation within duodeno-jejunal loop of rat for 1 hour (b)

Peak 1, 2 and 3, indicated by arrows, showed the peaks of ^{125}I activity and the bars at fractions 35 to 55 were the sign of Tf concentration detected by Rocket immunoelectrophoretic assay.

The column ($3.2 \times 40\text{ cm}$) was eluted with $0.1\text{ M Tris-HCl pH } 8.0$ (containing 0.15 M NaCl , 1 mM PMSF).

考 察

ヒトをはじめ各種哺乳動物の乳汁および消化液（唾液、膵液など）に含まれる鉄結合蛋白質としてはラクトフェリン（Lf）がよく知られている⁶⁾。しかし、ラット、ウサギ、イヌの乳汁にはLfがなく、トランスフェリン（Tf）が検出される⁶⁾。したがって、これらの動物の消化液中にもTfの存在が予測されるが、それに関

Table 7 Net counts of ^{125}I incorporated into mucosal homogenate of upper small intestine after $2\text{Fe-}^{125}\text{I-Tf}$ absorption

mucosal homogenate	supernatant of 10,000 g centrifuge	immune precipitate by anti-Tf
1,125 cpm	819 cpm	100 cpm

する定性的、定量的な報告は現在までほとんどみられない。著者は本研究においてラットの乳汁、唾液、胆汁、膵液中のTfの有無および濃度とその生理的変動を免疫学的手法により検討した。正常ラットにおいて、それぞれの外分泌液中には免疫学的に定量可能な量のTfが存在していたが、特に膵液には乳汁に次ぐ濃度のTfが含まれており、かつ鉄欠乏時にその濃度は有意に上昇した。これに対し、正常ラットの胆汁中のTf濃度は膵液の約1/10に過ぎず、鉄欠乏状態においても増加しなかった。Schümannら¹⁸⁾は胆汁中にTfが存在し、その濃度は鉄欠乏で上昇すると報告しているが、膵液のTfに関しては全く触れていない。著者は胆汁と膵液を別個に採取したのに対して、Schümannらの報告には胆汁採取に関する詳細な記載がない。膵液Tfの鉄飽和率（約40%）は血清Tfの値とほぼ一致した。膵液Tfが、単なる血清Tf漏出物か、血清Tfが選択的に膵臓に摂取され外分泌されたものか、または、膵臓で合成され外分泌されたものかを明らかにすることは考慮に値する課題である。しかし、鉄欠乏時のTf濃度の上昇率が血清では正常時の約1.35倍であるのに対して膵液では約4.25倍となり、血清値よりも有意の上昇を示した。この結果は膵液Tfが血清からの単なる漏出ではないことを暗示している。

外分泌液のTfの生理的機能はいまだ不明であるが、膵液Tfが鉄欠乏状態で著明に増加するという事実は、このTfが鉄代謝に関与することを強く示唆するものである。近年、Tfを介する鉄の腸管吸収機構が存在するかどうか注目されている。鉄需要の多い網状赤血球や胎盤組織においては、細胞表面にTfに特異的なレセプターが局在し、そのレセプターを介する鉄の受け渡し機構が詳細に解明されている¹⁹⁻²¹⁾。小腸管腔から粘膜細胞への鉄の取り込みにおいても同様の経路による可能性は十分に考えられる。Huebersら²²⁾はラット十二指腸および空腸の結紮腸管からTf-鉄が吸収されることを証明しTfを担体とする鉄吸収のモデルを提唱した。しかし、Heubersらの報告ではその小腸粘膜における 2Fe-Tf とTfレセプターとの間の

相互作用を証明するまでには至っていない。久安ら²³⁾はラット小腸粘膜から単離した刷子縁膜小胞を用いてレセプター・アッセイを行い、刷子縁膜表面に Tf に特異的なレセプターの存在するのを確認した。この Tf レセプターが鉄の腸管吸収に寄与するためには小腸管腔内に、ある量の Tf の存在が必要である。著者は本研究において、ラットの腸液には外分泌液由来の Tf が含まれることを明らかにした。特に膵液 Tf はその濃度も高く鉄飽和率は約 40% と推定され、採取した膵液中の Tf に放射性鉄が取り込まれることも確認した。さらに¹²⁵I で標識した Tf を in vivo 結紮腸管内でインキュベートした結果では、膵液 Tf は腸管内である程度消化を受けるが、少なくとも一部は intact なまま存在した。これらの結果はラット小腸管腔内には鉄結合能力をもつ Tf が一定時間存在しうことを示しており、Tf の生理機能の一つとして鉄吸収における輸送担体となると考えられる。

Tf-鉄の吸収は主に十二指腸と空腸上部において認められ、この結果は Heubers らの報告²²⁾とよく一致する。さらに、ラット小腸における Tf-鉄の吸収が monodansylcadaverine (MDC) により抑制されたことにより粘膜細胞内への取り込みがエンドサイトーシスによることが示唆された。また⁵⁹Fe-2 Fe-Tf 試料と、その試料に 20 倍過剰濃度の非放射性 2 Fe-Tf を添加した試料を負荷した結紮腸管吸収実験では、放射性鉄の吸収率が⁵⁹Fe-2 Fe-Tf のみの場合に比べて有意に低下したことにより、Tf-鉄の吸収が単なる拡散現象でないことも証明された。以上の結果は Tf-鉄が小腸刷子縁の Tf レセプターを介するエンドサイトーシスにより粘膜細胞に取り込まれる可能性を強く支持するものである。

現在、鉄の腸管吸収には複数の経路が、それぞれの実験上の根拠に基づき提唱されている。その中で Tf レセプターを介する吸収経路がどの程度貢献するかはさらに検討を要する。Muir ら²⁴⁾や Marx ら²⁵⁾は小腸刷子縁小胞を用いる鉄の取り込み研究から、少なくとも 2 価鉄は刷子縁膜に局在する運搬担体を利用し膜を横切り、細胞内に取り込まれると報告している。著者も 2 価鉄、3 価鉄のいずれの吸収も MDC により抑制されるという興味ある結果を得た。これらの各種の化学形態の鉄の腸管吸収機構相互作用を検討することは今後に残された課題である。

結 論

1) ラットの外分泌液(唾液、膵液、胆汁、腸液、乳汁)中のトランスフェリン (Tf) を免疫学的手法により検出定量した。さらに、この Tf の鉄吸収への関与を検討する目的でラット血清 2 Fe-Tf を用いて結紮腸管による鉄吸収実験を実施した。

2) ラット消化液中には免疫学的に検出可能な Tf が存在し、特に膵液の Tf は鉄欠乏時に有意に上昇した。

3) 膵液 Tf の鉄飽和率は約 40% で、鉄結合能のあることが証明された。

4) 2 Fe-Tf からの鉄吸収は十二指腸および空腸に特に明瞭に認められた。

5) 2 Fe-Tf の鉄吸収は MDC の負荷、または過剰量の非放射性 2 Fe-Tf 添加により阻害された。

6) 吸収実験後の pronase 処理単離小腸粘膜細胞中に¹²⁵I-Tf が検出された。

7) 以上の結果より、ラット小腸における 2 Fe-Tf からの鉄吸収は Tf レセプターを介するエンドサイトーシスにより小腸粘膜細胞に取り込まれることが示唆された。

稿を終るに際し、本研究に多大なるご協力を頂いた第 2 生化学教室久安早苗博士ならびに教室員各位に深く感謝いたします。

なお、本論文の内容の一部は第 60 回日本生化学会大会(1987 年 10 月)、第 18 回日本消化吸収学会総会(1987 年 7 月)および第 49 回日本血液学会総会(1987 年 4 月)において発表した。

文 献

- 1) Jandl, J.H. and Kats, J.H.: The plasma-to-cell cycle of transferrin. *J. Clin. Invest.*, 42, 314, 1963.
- 2) van Bockxmeer, F.M., Yates, G.K. and Morgan, E.H.: Interaction of transferrin with solubilized receptors from reticulocytes. *Eur. J. Biochem.*, 92, 147~154, 1978.
- 3) Hamilton, T.A., Wada, H.G. and Sussman, H.H.: Identification of transferrin receptors on the surface of human cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 6406, 1979.
- 4) Lamb, J.E., Ray, J.H., Kushner, P. and Kaplan, J.: Internalization and subcellular localization of transferrin and transferrin receptors in HeLa cells. *J. Biol. Chem.*, 258, 8751~8758, 1983.
- 5) Masson, P.L. and Heremans, J.F.: Lactoferrin in milk from different species. *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 39, 119~129, 1971.
- 6) Masson, P.L., Heremans, J.F. and Dive, C.H.: An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta*, 14, 735~739, 1966.
- 7) Bullen, J.J., Rogers, H.J. and Leigh, L.: Iron-binding proteins in milk and resistance to *Escherichia coli* infec-

- tion in infants. *Br. Med. J. [Clin. Res.]*, 1, 69~75, 1972.
- 8) Hu, W.-L., Mazurier, J., Sawatzki, G., Montreuil, J. and Spik, G.: Lactotransferrin receptor of mouse small-intestinal brush border binding characteristics of membrane-bound and Triton X-100 solubilized forms. *Biochem. J.*, 249, 435~441, 1988.
 - 9) Cox, T.M., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J. and Peters, T.J.: Iron binding proteins and influx of iron across the duodenal brush border; Evidence for specific lactotransferrin receptors in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, 588, 120~128, 1979.
 - 10) Laurell, C.B.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 15, 45~52, 1966.
 - 11) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275, 1951.
 - 12) Yoshino, Y., Mains, J.G. and Shacter, D.: Regulation of ferritin synthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.*, 243, 2911~2917, 1968.
 - 13) Roop, W.E. and Putnam, F.W.: Purification and properties of human transferrin C and a slow moving genetic variant. *J. Biol. Chem.*, 242, 2507~2513, 1967.
 - 14) 山田和人: ラット血清 transferrin の精製とその性質. *日医大誌*, 48, 224~247, 1981.
 - 15) Aisen, P.: Studies on the binding of iron to transferrin and coalbumin. *J. Biol. Chem.*, 241, 1666~1671, 1966.
 - 16) Peppriell, J.E., Edwards, J.A. and Bannerman, R.M.: The kinetics of iron uptake by isolated intestinal cells from normal mice with sex-linked anamia. *Blood*, 60, 635~641, 1982.
 - 17) Kissane, J.M. and Robins, E.: The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 233, 184~188, 1958.
 - 18) Schümann, K., Schäcter, S.G. and Forth, W.: Iron absorption and biliary excretion of transferrin in rats. *Res. Exp. Med. (Berl.)*, 186, 215~219, 1986.
 - 19) Iacopetta, B.J. and Morgan, E.H.: The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.*, 258, 9108~9115, 1983.
 - 20) Wada, H.G., Hass, P.H. and Sussman, H.H.: Transferrin receptor in human placental brush border membrane. *J. Biol. Chem.*, 254, 12629~12635, 1979.
 - 21) 漆崎一朗, 高後裕: トランスフェリン・レセプター. *代謝*, 23, 187~193, 1986.
 - 22) Heubers, H.A., Heubers, E., Csiba, E., Rummel, W. and Finch, C.A.: The significance of transferrin for intestinal absorption. *Blood*, 61, 283~290, 1983.
 - 23) 久安早苗, 折茂英生, 麦谷圭一郎, 吉野芳夫: ラット小腸粘膜刷子縁のトランスフェリン・レセプターと鉄の腸管吸収. *日血会誌*, 46, 451, 1983.
 - 24) Muir, W.A., Hopfer, U. and King, M.: Iron transport across brush-border membranes from normal and iron-deficient mouse upper small intestine. *J. Biol. Chem.*, 259, 4896~4903, 1984.
 - 25) Marx, J.J.M. and Aisen, P.: Iron uptake by rabbit intestinal mucosal membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, 649, 297~304, 1981.

(受付: 1988年 8月18日)