カルシウムの腸管吸収に対する リジンならびにビタミンDの影響

志村 二三夫, 森内 幸子, 細谷 憲政

東京大学医学部保健学科保健栄養学教室

The Effect of Lysine and Vitamin D on the Intestinal Absorption of Calcium

Fumio SHIMURA, Sachiko MORIUCHI, Norimasa HOSOYA

*Nutritional Laboratory, School of Health Sciences, Faculty of Medicine,
The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo*

The effect of lysine and vitamin D₃ on the rat intestinal Ca absorption was observed. Rats were raised on vitamin D deficient diet which protein was replaced with amino acid mixtures. Lysine content of the diet was either 1.35% or 0.45%. These two lysine groups were further divided into vitamin D deficient and vitamin D₃ dosed group.

1.35% lysine-vitamin D₃ dosed group showed the best growth, followed by 1.35% lysine-vitamin D deficient group. The growth of 0.45% lysine group was extremely retarded and was not influenced by vitamin D status.

Intestinal ⁴⁵Ca transport in the everted sac obtained from vitamin D deficient group was not influenced by lysine content in the diet, but the response of ⁴⁵Ca transport by vitamin D₃ was greater in 1.35% lysine group than in 0.45% lysine group. The same tendency was observed in CaBP content in the duodenal mucosa.

These results suggest that the stimulatory effect of lysine on the intestinal calcium transport would be visualized by vitamin D.

(Received January 22, 1975)

小腸におけるCaの吸収はビタミンD（以下Dと略す）によって促進されるが、この場合、小腸粘膜にCaと特異的に結合するたん白質がDによって増大することが観察されている^{1)~3)}。このCa結合たん白質（CaBP）は現在単離同定され⁴⁾⁵⁾、ニトリヒナの十二指腸に見いだされるCaBPはリジンを11%も含み、他のたん白質に比べて、リジンの含有量が比較的多い。

一方、Wassermanら^{6)~8)}は小腸における⁴⁵Ca吸収に対するアミノ酸の影響を観察し、L-リジン、D-リジン、L-アルギニンなどはCa吸収に促進的に作用することを報告している。

しかしながら、Ca吸収に対するリジンの作用機構はいまだ解明されていない。そこで、著者らは小腸におけるCa吸収に対するリジンの影響を、Dによって誘導されるCaBPとの関連において検討してみた。

実験方法

1. 実験動物

D欠乏白ネズミを作製するためのD欠乏飼料 No. 11⁹⁾中のたん白質含量を、Rogersら¹⁰⁾のアミノ酸混合物で置き換えたものを用い（Table 1）、体重約60gのWistar系雌白ネズミ（各群5匹）を暗所で30日間飼育した。リジンの含有量については、1.35%あるいは0.45%の2種の飼料を作成した*。Dを投与する場合には、結晶ビタミンD₃**をプロピレングリコールに溶解し、100 I.U./0.1 mlを週2回胃内に投与した。この場合、D欠乏群には、0.1 mlのプロピレングリコールのみを投与した。飲料水はイオン交換水を用い、飼料ならびに水は自由に摂取させた。最後のD₃投与24時間後に屠殺し、

* 飼料は味の素株式会社中央研究所の弓狩康三博士のご好意により配合していただいた。

** 結晶ビタミンD₃はエーザイ株式会社、勝井五一郎博士のご好意により国際単位を検定したものを分与していただいた。

Table 1. Composition of diets.

	0.45% Lys	1.35% Lys
	%	
Glucose monohydrate	64.5	63.6
Cotton seed oil	10.0	10.0
Celluloflour	3.0	3.0
Choline chloride	0.2	0.2
Salt mixture	2.4	2.4
Amino acid mixture	16.7	16.7
Vitamin mixture (-D)	0.1	0.1
CaCO ₃	1.17	1.17
KH ₂ PO ₄	0.06	0.06
K ₂ HPO ₄	0.84	0.84
Lysine chloride	0.45	1.35

Vitamin D deficient diets were prepared by use of amino acid mixture instead of casein. Calcium and phosphorus were contained as 0.45% and 0.30% respectively.

以下の実験を行ったが、屠殺前 18 時間は絶食させ水のみを与えた。

2. 反転腸管を用いる ⁴⁵Ca 輸送能の測定

反転腸管による ⁴⁵Ca 輸送能の測定は、Martin ら¹¹⁾の方法に従って行った。約 5.5 cm の反転十二指腸に、⁴⁵Ca を 2×10^4 cpm/ml に含むトリス塩酸緩衝液 (30 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2), 125 mM NaCl, 10 mM フルクトース, 0.25 mM CaCl₂) を 0.6 ml 注入する。これを、同じ組成のトリス塩酸緩衝液 10 ml を入れた 30 ml の三角フラスコに移し、O₂ ガスを通気しながら 2 時間、37°C に温置する。⁴⁵Ca の輸送能は 2 時間後の漿膜側の ⁴⁵Ca の放射能と粘膜側のそれとの比 (S/M 比) によって表現した。

3. カルシウム結合たん白質の測定

CaBP は Wasserman らの方法¹²⁾に従って十二指腸より抽出し、⁴⁵Ca との結合能の測定は、Chelex-100 を用いる Hitchman らの方法¹³⁾に準じて行った。剔出した十二指腸を縦に切開し、氷冷生理的食塩水で洗浄したのち、粘膜を剝離し、トリス塩酸緩衝液 (13.7 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2), 120 mM NaCl, 4.74 mM KCl) を用いて、20% のホモジネートを作成する。28,000 × g 20 分間の遠心で得られる上澄を、60°C に 5 分間熱処理し、変性したたん白質を濾別する。濾液 1.8 ml に Chelex-100 (トリス塩酸緩衝液に 50% (v/v) に懸濁したもの) 0.3 ml を加えて、1 分間攪拌する。1,500 × g 5 分間の遠沈ののち、上澄 0.5 ml を試験管に取り、⁴⁵Ca を 10⁵ cpm/ml に含む 5×10^{-5} M CaCl₂ を 50 μl 加え混和する。10 分間、室温に放置したのち、Chelex-

100 の懸濁液 0.1 ml を加え、攪拌したのち、1,500 × g 5 分間の遠心を行い、上澄画分の放射能を CaBP と結合した ⁴⁵Ca とした。対照としてトリス塩酸緩衝液 0.5 ml に ⁴⁵Ca を 10⁵ cpm/ml に含む 5×10^{-5} M CaCl₂, 0.1 ml を加えたものを取り、対照の ⁴⁵Ca の放射能に対する Chelex 処理した上澄の ⁴⁵Ca の値の%をもって ⁴⁵Ca の結合能とし、たん白質 1 mg 当りの値 (%/mg protein) として表現した。

4. 放射能の測定

試料 50 μl をグラスファイバーフィルター (W&R Balston 社製) に取り、乾燥後 10 ml のトルエン系シンチレーター (POP 5 g および POPOP 0.1 g をトルエンに溶かして 1 l としたもの) を入れたバイアルに移し、Packard Tri-Carb 3380 型液体シンチレーションカウンタを用いて測定した。

5. 血清 Ca 濃度の測定

血清 Ca 濃度は、原子吸光分析法によって測定した。断頭時に血液を遠心管に採取し、Willis¹²⁾の方法にしたがって、血清を 0.5% La₂O₃ の 25% 塩酸 (v/v) 溶液で希釈し、島津 AA-610 S 型の原子吸光分析機を用いて測定した。

6. たん白質の定量

たん白質は、ウシ血清アルブミンを標準として Lowry らの方法¹³⁾によって測定した。

実験結果

1. リジンならびに D₃ の白ネズミの成長に対する影響

白ネズミの成長曲線を Fig. 1 に示す。比較的良好な結果を示したものは、リジン含有量の適切なリジン 1.35

Fig. 1. The effect of lysine and vitamin D₃ on the rat growth.

About 60 g rats were fed by the diet of 1.35% and 0.45% lysine content with the addition of vitamin D₃ or not. 100 I.U. vitamin D₃ was administered orally twice a week.

Data presented as the mean of 5 rats.

% 投与群である。リジン 1.35% 投与・D₃ 投与群においては、体重増加率は 2.77 g/day であり、標準固型飼料の 3 g/day に比べるとやや低いが、ほぼ正常の発育をしているものと思われる。リジン 1.35%・D 欠乏群においては、D 欠乏による成長の抑制が観察された ($p < 0.05$) が、リジン 0.45% 投与群に比べると、はるかに良い成長を示していた。

一方、リジン欠乏と考えられるリジン 0.45% 投与群においては、白ネズミの成長は著しく抑制されていた。D は白ネズミの成長に不可欠の因子の一つであるが¹⁴⁾、リジン欠乏の場合には、D 欠乏群と D₃ 投与群との間に有意差はなかった (Fig. 2)。

2. 反転腸管を用いる ⁴⁵Ca の輸送能に対するリジンならびに D₃ の影響

D は小腸における ⁴⁵Ca の吸収を促進することが知られている。リジンもまた ⁴⁵Ca の吸収を促進することが観察されている。それゆえ、反転腸管を用いて、⁴⁵Ca 輸送に対する作用をリジン 1.35% 投与ならびにリジン 0.45% 投与の白ネズミについて観察してみた (Fig. 3)。

反転腸管における ⁴⁵Ca 輸送は、D 欠乏状態では食餌中のリジン含有量に関係なく、リジン 1.35% 投与では S/M 比 3.18、リジン 0.45% 投与群でも 3.07 であり、これらの間に有意差は認められなかった。しかしながら、たん白源をカゼインとする D 欠乏飼料で飼育した場合の S/M 比 1.0~1.5¹¹⁾ と比べてみると、高い値を示していた。

一方、D₃ 投与群の ⁴⁵Ca 輸送能は、D 欠乏群に比べると明らかに増大していた。さらに、D₃ の効果は、食餌中のリジンの含有量に強く依存することが観察され

Fig. 2. The effect of lysine and vitamin D₃ on the rat weight gain.

About 60 g rats were fed for 30 days by the diet of 1.35% and 0.45% lysine content with the addition of vitamin D₃ or not. 100 I.U. vitamin D₃ was administered orally twice a week. Data presented as the mean of 5 determinations $\pm$ S.D.

Fig. 3. The effect of lysine and vitamin D₃ on the calcium transport in the rat duodenum.

Calcium transport was assayed by the technique of everted gut sac as described in the method. Data presented as the mean of 5 determinations $\pm$ S.D.

た。D₃ による S/M 比の増大はリジン 1.35% 投与群において 80%、リジン 0.45% 投与群においても 40% の増大を示し、いずれの場合も D₃ 投与により有意の増大を示していた。

3. 十二指腸粘膜の CaBP に対するリジンならびに D₃ の影響

D₃ による小腸における ⁴⁵Ca 輸送能の増大は、食餌中のリジン含有量に依存することが観察された。一方、Ca 吸収に関与すると考えられる CaBP は、リジンを 11% も含んでいる。それゆえ、これらの間には、なんらかの関連があるのではないかと考えられる。そこで、十二指腸粘膜の CaBP に対するリジンならびに D₃ の影響を観察してみた (Fig. 4)。

Fig. 4. The effect of lysine and vitamin D₃ on the rat duodenal CaBP.

CaBP was assayed by use of Chelex-100 as described in the method. Data presented as the mean of 5 determinations $\pm$ S.D.

D欠乏の場合には、反転腸管を用いる ^{45}Ca 輸送の場合と同様に、CaBP はリジン 1.35% 投与群において 3.13%/mg protein であり、リジン 0.45% 投与群においても 2.85%/mg protein であって、これら両者の間には有意差は認められなかった。たん白源をカゼインとするD欠乏飼料で飼育した場合の CaBP は、約 2.5%/mg protein¹⁵⁾ であることが報告されている。それゆえ、D欠乏の場合には、CaBP は食餌中のリジン含有量とは直接に関連しているものとは思われない。

D₃を投与した場合には、リジン 1.35% 投与群においては 140% の増大を示し、リジン 0.45% 投与群においても 110% の増大を示した。いずれの白ネズミにおいても D₃の投与により CaBP の増大が観察されたが、D₃投与の効果は、リジン 1.35% 投与の場合はリジン 0.45%投与に比べて高かった。このことは、反転腸管を用いる ^{45}Ca 輸送能に対する D₃の効果と類似している。

4. 血清 Ca 濃度への影響

血清の Ca 濃度を飼育 30 日後の各群について観察したが、いずれの場合も正常値の範囲を示していた (Table 2)。リジン 1.35% ならびにリジン 0.45% 投与のいずれにおいても、D欠乏の場合には血清 Ca 濃度はわずかに低下の傾向を示していた。一方、D₃を投与した場合には、血清 Ca 濃度は増加の傾向を示していた。この場合、リジン 1.35% 投与の場合には、リジン 0.45% 投与の場合に比して、D₃による血清 Ca の増大は、少し大きい傾向を示していた。

考 察

小腸における Ca の吸収に対するリジンならびに D₃の影響を観察した。たん白質量をアミノ酸混合物で置き換えたD欠乏飼料を用いて飼育した白ネズミについて、CaBP と関連させて、リジンならびに D₃の効果を観察した。

リジン 0.45% 投与の白ネズミの体重増加は、リジン 1.35% 投与の白ネズミに比して、およそ 40~50% に抑

制されていた。この結果は Rogers ら¹⁰⁾の結果と一致している。リジン 1.35% 投与群ではD欠乏により体重増加が抑制されたが、リジン 0.45% 投与群においては、D欠乏により体重増加が抑制される傾向にはあったが、有意の低下は観察されなかった。これと同様の結果は、反転腸管を用いる ^{45}Ca 輸送能についても、十二指腸粘膜の CaBP ならびに血清の Ca 濃度についても観察された。

リジンは小腸における ^{45}Ca 吸収を促進する^{6)~8)}。しかしながら、D欠乏状態では、反転十二指腸管を用いる ^{45}Ca 輸送能ならびに十二指腸粘膜の CaBP のいずれについても、食餌中のリジン含有量による影響は、それほど観察されなかった。このことは、リジンが Ca 吸収の過程に直接作用するためというよりも、むしろDを介して作用しているものと考えられる。D₃投与による ^{45}Ca の輸送能の増大は、リジンを適当量に含むといわれているリジン 1.35% 投与群では高かったが、リジン欠乏状態と考えられるリジン 0.45% 投与群では、D₃投与の効果はそれほど観察されなかった。小腸粘膜の CaBP は、 ^{45}Ca の輸送においてみられた場合と同様に、D₃の効果はリジン 1.35%投与群において高く、リジン 0.45%投与群ではわずかしかな観察されなかった。小腸における Ca の吸収機構には CaBP が主要な役割を果たしていると考えられており、この CaBP はリジンを比較的多く含んでいる⁴⁾⁵⁾。それゆえ、小腸における Ca の吸収に対するリジンの効果は、D による CaBP の合成の過程を介して現われると考えられる。

一方、本実験において、D欠乏群の血清 Ca 濃度が低下することなくほぼ正常の範囲内にあったこと、ならびに反転腸管を用いる ^{45}Ca の輸送能も比較的高いレベルの値を示していたことは、なんらかの他の要因に起因しているものと思われる。おそらくは、D欠乏飼料中のたん白源をアミノ酸混合物に置き換えたためであると考えられる。D欠乏群においてはD欠乏飼料中のたん白質をアミノ酸混合物に置き換えた場合に、リジン 0.45% 投与群の十二指腸における CaBP は、カゼイン投与の場合とほぼ同レベルの値を示していたが、Ca 輸送能はおよそ 2 倍のレベルに増大していた。それゆえ、アミノ酸を単独に投与することは、たん白質を構成するアミノ酸という以外に、アミノ酸それ自身にも Ca 輸送能を増大する作用の可能性も考えられる。しかしながら、この増大効果はレベルの比較的小さいものと考えられる。

小腸における Ca 吸収は、D の投与によって増大するが、この場合、小腸粘膜に CaBP が増大する。CaBP は構成アミノ酸としてリジンを比較的多量に含有しているので、リジンが欠乏すると CaBP の生合成は比較的に低下し、その結果、小腸における Ca の吸収も低下すると

Table 2. The effect of lysine and vitamin D₃ on the rat serum.

		Serum Ca (mg/dl)	
1.35% Lysine	D (-)	9.7 ± 0.3	<i>p</i> < .01
	D (+)	10.4 ± 0.4	
0.45% Lysine	D (-)	9.8 ± 0.3	<i>p</i> < .05
	D (+)	10.2 ± 0.3	

Date presented as the mean of 5 determinations ± S.D.

考えられる。

要 約

小腸の Ca 吸収に対するリジンならびに D₃ の影響を観察した。白ネズミはたん白質をアミノ酸混合物に置き換えた D 欠乏飼料を用いて飼育した。

白ネズミ体重の増加はリジン 1.35%・D₃ 投与群が比較的良く、これに続いてリジン 1.35%・D 欠乏群であり、リジン 0.45% 投与群の体重増加は比較的悪く、さらに D 投与による差異は、ほとんどみられなかった。

反転腸管を用いる ⁴⁵Ca 輸送能は、D 欠乏状態ではリジンの含有量による差異はみられなかったが、D₃ 投与による増大効果は、リジン 1.35% 投与群はリジン 0.45% 投与群に比して大きかった。十二指腸粘膜の CaBP にも、同様の傾向が認められた。

小腸の ⁴⁵Ca 吸収に対するリジンの促進効果は、D を介して発揮されるものと考えられる。

文 献

- 1) Wasserman, R.H. and Taylor, A.N.: *Science*, 152, 791 (1966)
- 2) Ooizumi, K., Moriuchi, S. and Hosoya, N.:

- J. Vitaminol.*, 16, 228 (1970)
- 3) Hitchman, A.J.W. and Harrison, J.F.: *Can. J. Biochem.*, 50, 758 (1972)
- 4) Wasserman, R.H., Corradino, R.A. and Taylor, A.N.: *J. Biol. Chem.*, 243, 3978 (1968)
- 5) Bredderman, P.J. and Wasserman, R.H.: *Biochemistry*, 13, 1687 (1974)
- 6) Wasserman, R.H., Comar, C.L. and Nold, M.M.: *J. Nutr.*, 59, 371 (1956)
- 7) Wasserman, R.H., Comar, C.L., Schooley, J.C. and Lengemann, F.W.: *J. Nutr.*, 62, 367 (1957)
- 8) Raven, A.M., Lengemann, F.W. and Wasserman, R.H.: *J. Nutr.*, 72, 29 (1960)
- 9) Guroff, G., DeLuca, H.F. and Steenbock, H.: *Am. J. Physiol.*, 204, 833 (1963)
- 10) Rogers, Q.R., Chen, D.M.Y. and Harper, A.E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 134, 517 (1970)
- 11) Martin, D.L. and DeLuca, H.F.: *Am. J. Physiol.*, 216, 1351 (1969)
- 12) Willis, J.B.: *Anal. Chem.*, 33, 556 (1961)
- 13) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randed, R.J.: *J. Biol. Chem.*, 133, 265 (1951)
- 14) Kramer, B. and Gribetz, D.: *The Vitamins*, Vol. 3, 290 (1971), Academic Press
- 15) Krawitt, E.L. and Kunin, A.S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136, 530 (1971)

(昭和 50 年 1 月 22 日受理)