鉛投与ラットの身体発育におよぼす食餌たん白質の影響

早川 徳子*, 高野 由美*,
鈴江 緑衣郎*, 上野 洋子**

* 国立栄養研究所, ** 北海道教育大学函館分校

Effect of Dietary Protein on the Physical Development in Rats Poisoned with Lead

Tokuko HAYAKAWA,* Yumi TAKANO,*

Ryokuero SUZUE,* Yoko UENO**

* National Institute of Nutrition, Shinjuku-ku, Tokyo

** Hakodate College, Hokkaido University of Education, Hakodate

Studies were conducted to clarify the effect of dietary protein on the development in rats poisoned with lead, and the following results were obtained.

(1) The amounts of exogenous lead in the whole brain and blood of low protein group were higher than those of high protein group.

(2) Body weight gain per gram of dietary protein in the control group was higher than that in the lead-administered group.

To elucidate these mechanisms, the transferred amount of both lead and amino acids were measured. The rat small intestine, to which 1 ml of casein solution, 1 ml of lead nitrate solution and trypsin were packed, was incubated for 60 minutes. The amount of lead transferred from intestinal mucosa to medium was markedly reduced by increasing amounts of protein added, and that of amino acid transferred was also inversely related to the lead concentration used. The activity of proteolytic enzyme was inhibited non-competitively by *in vitro* addition of lead, which K_i value was obtained to be $0.0015 M$.

(Received August 8, 1977)

鉛、水銀、ヒ素、カドミウム、クロム等の重金属化合物の害が大きな社会問題となっているが^{1)~4)}、その予防として食品の汚染をくい止めることが第一条件である。しかし現実にはそれらの早急な解決が困難なため、生体側よりの防衛手段が講じられなければならない。栄養状態が異なれば重金属に対する生体のレスポンスもかなり異なることが想像されるので⁵⁾、毒性と栄養条件との相互関係を明らかにすることが必要である。すなわち、重金属の腸管からの吸収を阻害したり、または吸収蓄積された有害物質をできるだけ速かに代謝排泄させることを研究することによって国民の食生活の指針をつくり、国民の健康保持に役立てることである。

このような視点から、われわれは、鉛投与と実験を行ないたん白量の多いほど、鉛の体内取り込み量が少ないことを見いだした。またその機構を解明するため、腸管を用いた鉛の取り込み実験およびたん白分解酵素におよぼす鉛の阻害効果について実験を行ない、興味ある結果を

得たので報告する。

実験方法

1. 実験動物

実験動物として初体重 50 g 前後の SD 系雄白ネズミ 24匹を1回の実験に用い、2回実験をくり返した。

飼育方法としては、室温 22°C、湿度 60% の12時間明暗交替の恒温動物室で、10週間にわたって飼育した。

2. 飼料組成

飼料は Table 1 の組成に従って調製した。

飼料および水は自由摂取させ、対照群には蒸留水、鉛摂取群には鉛濃度 1,500 ppm の硝酸鉛溶液をあたえた。

3. 鉛定量法

脳および血液中の鉛定量法は、組織を硫酸、硝酸によって湿式灰化したのち、ジチゾン、四塩化炭素で抽出し、さらに希硝酸で逆抽出した。分離した鉛は原子吸光度計 (VARIAN-TECHTRON AA-5) で測定した⁶⁾。

4. 鉛吸収実験

鉛吸収実験にはラット小腸およびセロファンチューブ

* 〒 162 東京都新宿区戸山町 1

** 〒 040 函館市八幡町 1-2

Table 1. Composition of diet.

	18% Casein group	9% Casein group
Corn starch	72	81
Casein	18	9
Oil ^{*1}	5	5
Salt mixture ^{*2}	4	4
Vitamin mixture ^{*3}	1	1

^{*1} Soybean oil (80%) + liver oil (20%)

^{*2} According to A.E. Harper (*J. Nutr.*, 68, 405 (1959))

^{*3} Tanabe Amino Acid Research Foundation's Vit-X + choline chloride

(Visking 透析用セロファンチューブ Type 27/32) を用いて行なった。ラット頰動脈切断後開腹し、十二指腸起始部、回腸下部に小切開を加え、0.9% 食塩水で小腸内容を洗浄排出させた。回腸下部を切断し、全小腸を注意深く腸間膜から剝離した。小腸を 20 cm の長さに切断し、一端を結紮し、試薬を入れて閉じた⁷⁾。内に封入する試薬は、(E. Merck) カゼイン 10 mg ならびに硝酸鉛 1.6 mg は 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、総量 2 ml として用いた。カゼイン濃度や鉛濃度は実験の目的により変化させた。また 50 μ g のトリプシンを 0.1 M トリス緩衝液 pH 7.4 にとかしたものを加えた場合もあった。

試薬を封入した小腸は、他端も同様に結紮し、クレブスリンガー重炭酸緩衝液 (0.2% グルコース 添加) 100 ml を三角フラスコに入れた。上部の気相を 95% 酸素 5% 炭酸ガスの混合気体で置換し、密栓をしたのち、毎分 80 振盪の大洋科学、振盪培養器 37°C に保温し、20 分ごとに外液中に出てきた鉛またはアミノ酸を測定した。

アミノ酸の定量には 280 nm による吸光度測定と、Folin のフェノール試薬を用いた呈色法による 660 nm の吸光度測定の両者を併用した。

セロファン膜を用いた透析実験も、腸管の場合と同様に行なった。

5. 酵素実験

酵素実験は次の方法によって行なった⁸⁾。たん白質は、酵素により分解されアミノ酸となり腸管から吸収されて栄養となるわけだが、鉛がたん白質の利用度を低下させるという実験結果をもとに、たん白質を分解する酵素への鉛の阻害作用について調べた。

酵素としては Difco 1 : 250 のトリプシンを用い、基質として、E. Merck (Darmstadt) 製の Hammarsten カゼインを用いた。基質は 10 mg カゼインを 0.1 M

Table 2. Amount of lead.

	Brain ^{*1} (μ g/g)	Blood ^{*2} (μ g/10 g)
Casein 9%	1.31 $\pm$ 0.1	7.14 $\pm$ 0.5
Casein 9% + PB	8.62 ^{a)} $\pm$ 0.7	93.59 ^{c)} $\pm$ 5.7
Casein 18%	1.10 $\pm$ 0.1	4.30 $\pm$ 0.4
Casein 18% + Pb	3.70 ^{b)} $\pm$ 0.2	19.18 ^{d)} $\pm$ 0.1

Amounts were expressed as μ g/g in brain and μ g/10 g in blood.

Mean $\pm$ S.E. for 6 rats per each group.

^{*1} Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

^{*2} Means with different superscripts are significantly different ($p < 0.01$).

Sörensen phosphate buffer (pH 7.6) にとかしたもの 1 ml、酵素は 50 μ g トリプシンを 0.1 M Sörensen phosphate buffer (pH 7.6) にとかしたものを、さらに各種濃度の鉛溶液または 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.6 を加え、総量を 3 ml とし 20 分間 37°C 恒温槽で振盪反応させる。基質、酵素、鉛濃度は実験の目的により各種濃度に調整して用いた。

20 分後 5% トリクロル酢酸を 3 ml 加え反応を停止させ、遠心分離を取り、280 nm の吸光度測定を行ない、酵素活性の測定を行なった。

実験結果

1. 鉛の体内とりこみ量

体内にとりこまれた鉛量は Table 2 に示した。すなわち 9% カゼイン食をあたえた群と 18% カゼイン食をあたえた群と比較した場合、脳および血液中の鉛量は、18% カゼイン食群のほうが低くなっていた。その理由はたん白質の一部が鉛と不溶性の Complex をつくり、腸管からの吸収を妨げているのではないかと考えられる。

2. 鉛の腸管吸収実験

作用時間による鉛吸収量との関係を示したのが Fig. 1 である。2 時間の実験を行なったが、この図で示されたように、2 時間目までの増加は直線性を示しているの で 1 時間目の値をとり透過量とした。

腸管を用いて行なった鉛の吸収実験は Fig. 2 に示した。その結果カゼイン量が多いほど透過されて出てくる鉛量が少ないことが示された。

3. 鉛のセロファンチューブ透析実験

セロファンチューブを用いて行なった鉛の透析実験は Fig. 3 に示されている。この実験の目的は鉛により腸管壁の変化が起こる危険性を考え、この考えを除去するために行なった実験である。その結果は、やはり同様に添加したカゼイン量が多いほど、外液中に出てきた鉛量も

Fig. 1. Amount of lead transferred from rat intestine during 150 minutes. The external fluid was 100 ml of Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 0.2% glucose. The internal fluid was 2 ml of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1.6 mg of lead nitrate and 10 mg of casein.

Fig. 2. Amount of lead transferred from rat intestine. The initial amount of lead in rat intestine was 1.6 mg in each experiment. The initial casein concentration varied from 0 to 2.0% as indicated. The incubation was carried out for 60 minutes. Other conditions were the same as described in Figure 1.

少なくなっていた。このことから鉛はたん白質と不溶性の Complex をつくり、腸管外へ出ていかない可能性がさらに強く考えられる。

4. 鉛のたん白効率に及ぼす影響

第2の実験として、動物実験において、鉛投与がたん白効率におよぼす影響をみた。Table 3 に示されたよう

Fig. 3. Amount of lead dialyzed from cellophane tube. Conditions were same as described in Figure 2, with the exception of the cellophane tube used.

Table 3. Body weight gain per g of dietary protein.

	Weight gain (A) (g)	Protein intake (B) (g)	(A)/(B)
9% Casein	18.1±1.0 ^{a)}	8.3±0.5 ^{a)}	2.2 ^{a)}
9% Casein+Pb	12.3±0.8 ^{b)}	6.5±0.4 ^{b)}	1.9 ^{b)}
18% Casein	29.8±3.1	20.7±1.6	1.4
18% Casein+Pb	26.3±2.0	19.9±1.0	1.3

Values represent means (±S.E.) for 6 rats.

a) b) Within comparisons, values not sharing a common superscript are significantly different ($p < 0.05$).

に鉛を投与した場合食餌たん白g当たりの体重増加量は9%カゼイン群においてことに低くなっていた。その理由としては鉛による全身の代謝機能の抑制が最も大きな原因だと思われるが、たん白質の吸収が悪いのもその一つと考えられる。

5. アミノ酸吸収におよぼす鉛の影響

前の実験と同様にラット腸管を用い、鉛濃度を变化させてたん白質の消化吸収におよぼす影響をみた。この場合 10 mg カゼイン、50 µg トリプシンおよび終濃度 100~1,500 ppm の鉛を pH 7.4 の 0.1 M トリス緩衝液に加え、総量を 2 ml として腸管内に入れ、1時間吸収実験を行なった。その結果は Fig. 4 に示すように鉛濃度が高いほど外液中に出てきたアミノ酸量が低下していた。

次にセロファンチューブを用いて同様な実験を行なった。その理由は鉛が直接腸管に作用し、腸管壁の変化が

Fig. 4. Amount of amino acid transferred from intestine. The reaction mixture contained 200 μ moles of Tris-HCl buffer at pH 7.4, 50 μ g of trypsin, various amounts of Pb (NO_3)₂ and 10 mg of casein in a final volume of 2.0 ml. Incubation time, 60 minutes. Other details were described in "Experimental Procedure."

Fig. 5. Amount of amino acid dialyzed from cellophane tube. Conditions were same as described in Figure 4, with the exception of the cellophane tube used.

起こったという可能性を否定するためである。その結果は Fig. 5 に示してあるが、やはり鉛濃度が高いほど外液に出てきたアミノ酸量も少なくなっていた。このことから鉛がたん白質のアミノ酸への分解を阻害し、したがって腸管からのアミノ酸の吸収が低下しているのではないかと考えられる。

6. たん白質分解酵素におよぼす鉛の影響

たん白質分解酵素におよぼす鉛の影響について Fig. 6 に示した。この場合基質として 100 mg カゼイン、酵素

Fig. 6. Kinetics of trypsin inhibition by lead. The incubation mixture contained 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6; 50 μ g of trypsin, various amounts of lead 10 mg of casein in a final volume of 3.0 ml. Tubes were incubated for 20 minutes at 37°C.

として 50 μ g のトリプシンを用いた。鉛濃度は終濃度で、0.00125 M, 0.0025 M, 0.005 M について行なった。その結果、鉛濃度の高いほど酵素活性は阻害されていた。この阻害は Fig. 6 に示されたように non-competitive inhibition で K_i 値 0.0015 M であった。このことから鉛による腸管からのたん白質吸収阻害は鉛によるたん白質からアミノ酸への分解の阻害がその原因の一つではないかと考えられる。

考 察

本実験で得られた実験結果は、従来 *in vivo* で考えられていた各種重金属の毒性に対するたん白質の保護作用⁵⁾機構の一部を鉛を用いて *in vitro* で明らかにしたものである。

もちろんその作用機構は単純なものではなく、たん白質量が多いと体の代謝機能が向上し、鉛の排出量も増大することも考えられる。

鉛はたん白質と不溶性 Complex をつくり、そのため腸管から吸収されにくくなると考えることがこの実験結果なのであるが、どのような Complex をつくるのか、それは今後 Sephadex のような分子篩を用いて行なわれなければならないことであろう。そのことにより、たん白質の質と解毒との関係も解明されてくるものと思われる。

この実験においては、セロファンチューブよりも腸管においてアミノ酸の透過量が多い。その理由はいろい

ろ考えられるが、腸管において能動輸送が行なわれることや、固有のたん白質分解酵素の存在、腸管自体より遊離した可能性のあるアミノ酸の存在などが考えられるが、これについては放射性アミノ酸を用いて実験を追試すべきだと考える。

結 論

鉛中毒による身体発育障害に対するたん白質の影響をみる目的で、SD 系幼若白ネズミを用いて実験を行なった結果次の事実がわかった。

1) 食餌たん白質レベル 18% 群が、9% 群に比して血液、脳中にとりこまれた鉛量が少なかった。

2) 鉛投与群のほうが非投与群にくらべて食餌たん白質 g 当たりの体重増加量が低かった。

以上の事実を解明するために腸管およびセロファンチューブを用いた透析実験およびたん白分解酵素におよぼす鉛の影響の実験を行ない、たん白濃度が高いほど腸管外に出る鉛量が少ないこと。すなわち鉛はたん白質と Complex をつくる可能性の高いこと。また鉛濃度が高いほど腸管外に出るアミノ酸量が少ないこと。これらの原因の一つは、鉛がたん白質分解酵素活性を抑えるため

であることを示した。また鉛はたん白質分解酵素を非競合的に抑制し、その $K_i=0.0015\text{ M}$ であることを明らかにした。

なお、この研究は環境庁国立機関公害防止等試験研究費によって行ないました。

文 献

- 1) 和田 攻：内科，27，892 (1971)
- 2) 丸茂義輝，及川智正，丹羽口徹吉：衛生化学，20，24 (1974)
- 3) 能川浩二：日衛誌，24，343 (1969)
- 4) 山田幸孝：食品中の微量元素，日本食品衛生協会刊 (1970)
- 5) 武藤泰敏，四童子好広，鈴木庄亮：栄養と食糧，28，1 (1975)
- 6) 堀口俊一，堀内一弥：臨床化学（医化学実験法講座，3-B 巻），p. 393 (1973)，中山書店
- 7) Parson, D.S.: Handbook of Physiology, Section 6, Vol. III, Intestinal Absorption, p. 1177 (1968), The Williams & Wikins Co., Baltimore, Maryland
- 8) Laskowski, M.: Methods in Enzymology, Vol. II, p. 32 (1955), Academic Press Inc., New York

(昭和 52 年 8 月 8 日受理)