4. 小腸粘膜の蛋白質吸収*

村 地 孝**

はじめに

蛋白質が成熟哺乳動物の小腸粘膜面に接触した際、その微量の1部が、そのままの形で生体内に取り込まれることがあるという実験事実を、10年程前われわれ¹⁻³⁾が発表した当時は、そんなことはありえないという印象を多くの人に与えたようであった。

しかし、その後のわれわれの研究や、また他の研究者の独立した研究によって、この事実は、徐々に、しかし確実に、信じうべき事実として定着してきたように見受けられる。^{4,5)}

Isselbacher ら⁶⁾は、成熟ラットの十二指腸内に挿入したゾンデを通じて、ウシ血清 alb を投与し、約3時間の間に、その2%相当量が、門脈並びに胸管リンパ道を介して吸収されることを報告している。

そこで研究課題は、もはや吸収の有無ではなくて、その微量な吸収の仕組みが何であるか、また、その生理的病態的意義は何か、ということに向かいつつあるといえよう。われわれは家兎を用いた *in situ* の系で、ニワトリ卵白リゾチームと、微生物起源リパーゼの1種につき、とくに吸収の仕組みの解明に向けて実験を行ない、得られた結果をここに紹介する。

実験方法

1. 腸管標品

体重2.5~3kgの雄性家兎を用い、先にわれわれの開発報告⁷⁾した *in situ* 実験系を採用した。すなわち、家兎を麻酔下に開腹し、Fig. 1のように空腸部に約10cmのループを作成して、その両端にガラス管を接続する。耳静脈よりヘパリンナトリウムの注射下に、さきにループを作成した腸管部分に由来する静脈枝の基幹部にカニューレを挿入し、ただちに手術部を腹腔内に納め、腸管に接続したガラス管及び静脈カニューレを体外に出し、縫合により腹腔を閉じる。腸管内腔液には、0.1%ブドウ糖含有 Krebs-Ringer 重炭酸液(以下 KRBG 液と

いう)を用いた。カニューレから流出する静脈血は5~20分間隔で分画採取し、遠心分離して得られた血漿を試料とした。

上記の *in situ* 方式は、体外に切り出した反転腸管実験 (*in vitro* 方式) に比して、はるかに腸管の保生性 (viability) においてすぐれていることを、われわれはすでに報告している。⁷⁾ いまその証拠の一端を Fig. 2 に示す。

図から明らかなように、粘膜上皮の最表層である微絨毛に局在するアルカリフォスファターゼですら *in situ* 方式では、その腸管内腔液中への逸脱が、*in vitro* 方式のそれに比して極めて少ない。粘膜上皮細胞のミトコンドリア局在とみなされるグルタミン酸脱水素酵素について同様の実験を行なうと、この差はさらに顕著で、*in vitro* 方式ではなお酵素の逸脱(従って、上皮細胞の剥離)が

Fig. 1. Schematic diagram of *in situ* experiment. The upper part shows anatomical position of intestinal segment used. The lower part is a diagrammatic illustration of the experiment during the collection of blood samples.

* Absorption of proteins by intestinal mucosa.

** Takashi Murachi, 京都大学医学部病態学教室, 同付属病院検査部.

Table 1. Properties and methods for specific determination of sample proteins used in the present experiments.

Properties and method	Enzyme	
	Lysozyme	Lipase GA-56
Origin	Hen egg-white	<i>Pseudomonas</i> species, extracellular enzyme
(Source)	(Seikagaku Kogyo Co., Tokyo)	(Amano Pharmaceutical Co., Nagoya)
Molecular weight	14,307	approx. 30,000
Isoelectric point	11	4.2
Carbohydrate content	None	None
pH optimum	7	7
Specificity	Glycosidase with relatively strict specificity	Lipase with broad specificity
Specific determination	By using specific antisera ⁹⁾	By using relative heat-stability of the enzyme*

* Lipase GA-56 is stable at 60° for 15 min., while the lipase activity of rabbit plasma is almost completely lost by such heating.

Fig. 2. Release of alkaline phosphatase from jejunal segments into mucosal fluid *in situ*. Roman numerals indicate the location of the segment in a whole jejunum as numbered from the proximal end.⁷⁾

みられるのに、*in situ* 方式ではまったくみられない。⁷⁾

2. 被検蛋白質

とくに物性の面からも、また、生物活性の面からも異なった2種類の酵素蛋白質を選んでこの研究に供した (Table 1). 被検蛋白質はKRBG液に0.001~0.2%の

Fig. 3. Intestinal absorption of hen egg-white lysozyme into the blood vessel by rabbit *in situ*.⁹⁾

濃度に溶解して、その約10 mlを Fig. 1 の腸管内腔に入れた。静脈血中出现すべき被検蛋白質の量は、もっぱらその酵素活性によって定量したが、家兎血液中に本来存在する当該酵素活性との分別には、Table 1 に示すように、それぞれ特別な操作によって、外来性の酵素活性のみを特異的に計測する方法を考案した。

3. 吸収量

吸収量は用いた腸管の乾燥重量当りで示した。⁷⁾

実験結果

1. ニワトリ卵白リゾチームの吸収⁹⁾

腸管内腔に0.05%のリゾチーム溶液を入れた場合、カニューレより流出する静脈血中出现する外来性リゾチーム活性の経時的变化を、Fig. 3 に示す。図の0分とは、手術を終えた実験動物の腸管内腔に被検蛋白質液を入れた時刻をさす。血流量は各時間帯で変動するが、全体としてみると、約1時間後には顕著に減少し、実験動

Table 2. Intestinal absorption of hen egg-white lysozyme by rabbits *in situ*.⁸⁾

Lysozyme administered		Lysozyme absorbed			
Concentration in the lumen (%)	Amount (mg)	For 30 min.		For 60 min.	
		Amount (μ g)	Recovery (%)	Amount (μ g)	Recovery (%)
0.2	13.6	9.5	0.07	28.6	0.21
	12.2	12.2	0.10	26.9	0.22
0.05	2.47	11.1	0.45	25.2	1.02
	4.12	9.1	0.22	15.3	0.37
0.03	2.18	4.6	0.20	10.5	0.49
	2.19	3.9	0.18	12.2	0.54
0.01	0.94	1.7	0.18	5.0	0.53
	0.79	2.5	0.33	5.2	0.66

物は通常失血のため実験開始後約2時間で死亡する。従って、最初の1時間以内が比較的生理的な条件下での実験といえよう。

Fig. 3 から一見してわかるように、リゾチームは粘膜上皮に接触後10数分後には、すでに顕著に（ただし、絶対量としては微量）健常と信じられる小腸壁を通じて吸収され、腸間膜静脈血流中出现する。各時分での吸収速度には測定上の変動が激しいが、これを積算した吸収総量についてみると、かなりなめらかに吸収されていることがわかる。

別の実験で腸管内腔に KRBG 液のみを入れて実験してみると、免疫抗体を用いた外来性リゾチームの特異的測定法によって捕捉される蛋白質の吸収は事実上0であった。一方、腸管内腔のリゾチーム濃度を0.05%の上下に変動させた場合には、それぞれに吸収量の変化があらわれた。得られた結果を Table 2 にまとめて示す。

Table 2 の結果ではつぎの2点が注目に価しよう。

- (1) 全体として腸管内腔に投与したリゾチームの0.2～1.0%程度の蛋白質が1時間以内に吸収される。
- (2) 初期(30分間)の吸収量は、腸管内腔に投与したリゾチームの濃度に応じて増すが、内腔の濃度があがる程度に達すると、吸収量はそれ以上増加しなくなる。

上記(1)項は観察している現象が、全体としていかに微量の吸収を取扱っているかを物語っている。事実、この実験中の腸管内腔液に検出される投与リゾチーム濃度は、実験前後でほとんど変化しない。

また、上記(2)項は、投与量への応答曲線がある種の飽和値をもった形式であることを意味している。この点はずぎのリパーゼ GA-56 を用いた実験結果と合わせて、後で論議する。

2. リパーゼ GA-56 の吸収

Fig. 4 には 0.05 % リパーゼ GA-56 を被検蛋白質と

Fig. 4. Intestinal absorption of lipase GA-56 into the blood vessel by rabbit *in situ*.

Fig. 5. Dependence of the rate of absorption on the concentration of protein in the intestinal lumen of rabbits *in situ*.

The rate of absorption is an averaged rate for the initial 30 minutes.

したときの1典型例を示す。全体のパターンは、Fig. 3 のリゾチームの吸収パターンと酷似している。しかし、縦軸のスケールの違いをみてわかるように、全体としてリパーゼ GA-56 の場合の方が、リゾチームの場合よりも吸収量が多い。

このことは、リパーゼ GA-56 の濃度を0.05%よりさげて実験した結果から、さらに明確となった。すなわち

リパーゼ GA-56 の場合は、すでに 0.005 % の内腔投与で、リゾチームの 0.03 % 投与をやや上回る程度の吸収量が観察された。Fig. 5 には、各種のリパーゼ濃度における実験結果を、最初の 30 分間の平均吸収速度で表示し、同様に計算したリゾチームの場合の結果と比較して掲げた。

考 察

蛋白質がその生物活性を保持したまま微量ながら腸管から吸収される事実は、すでに反転腸管標品を用いた研究^{1,2)} 及び腸間膜動静脈カニューレによる灌流実験²⁾ によって繰返し実証してきたが、これらの *in vitro* 方式では、主として局所に対する酸素供給の不足から腸粘膜上皮のかなり広範な損傷を避けることはできない。腸管標品の保生性という面からみて *in situ* 方式がすぐれていることは、すでにわれわれが詳細に検討して報告している。⁷⁾ この *in situ* 方式を用いて、われわれはつぎの事実を明らかにすることができた (Fig. 5 参照)。

- (1) 蛋白質の腸管吸収速度は、用いた蛋白質の分子量の大小に比例しない。
- (2) 腸管吸収速度の蛋白質濃度依存性は 1 種の飽和曲線型を示す。

以上の 2 点は、観察された吸収現象がいわゆる単純拡散 (simple diffusion) ではないことを明確に示している。いうまでもなく、単純拡散であればその速度は吸収される分子のサイズに正の相関を持つはずであり、またその濃度依存性も比較的広範囲に直線性を示すはずである。

それではわれわれの観察している吸収現象が、能動輸送 (active transport) によるものであろうか。Fig. 5 の飽和型曲線は能動輸送を示唆しているともいえそうである。そこで、われわれは 0.05 % リゾチームを用いた実験を $1 \times 10^{-4} M$ ウワバイン存在下で繰返してみたが、吸収は依然として観察され、その吸収速度も、Table 2 に示したウワバイン非存在下の実験結果の範囲内にあった。⁸⁾ 従って、観察された吸収現象は通常能動輸送といわれる形式によるものとは考えがたい。もちろん、能動輸送の定義に照らして、この吸収が濃度勾配に抗しておこるかおこらないか実験的に確かめる研究が今後の課題として残されている。

単純拡散でもなく、能動輸送でもない物質輸送の方式としては、粘膜表層内に回転自由度をもった担体 (蛋白質?) が存在して粘膜表層外面に接触した被検蛋白質がその担体に結合しつつ、自由回転のチャンスをとらえて表層内面に取り込まれるという方式が仮説的に考えられ

よう。この仮説が正しいかどうかの研究も、これまた将来に残された課題である。

さらに、われわれの実験条件下では、血管系経由の吸収に加えて、リンパ管系経由の吸収がどのくらいあるのかも、つぎに明らかにしなければならない。また、このような異種蛋白質の吸収に伴う生体側の反応、とくに抗体産生の可能性やその危険性など、解明を急がねばならない問題が山積している。そして、それらの問題の解決には、必ずや緊密な学際的協力が要請されるであろうことを最後に強調しておきたい。

本研究の大部分は名古屋市立大学医学部生化学教室においてなされた。とくに木村 滋、戸谷誠之、石原良三、野崎 茂の各氏の協力をえた。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) 村地 孝: 最新医学 20, 2971 (1965).
- 2) 種田光成, 立花章男, 村地 孝: 生化学, 37, 742 (1965) [学会抄録].
- 3) Kimura, S., Oida, M. and Murachi, T.: 7th International Congress of Biochemistry, Aug. 1967, Tokyo, Abstracts, p. 919.
- 4) Katayama, K. and Fujita, T.: Biochim. Biophys. Acta 288, 181 (1972).
- 5) Walker, W.A., Cornell, R. and Devenport, L.M.: J. Cell. Biol. 54, 195 (1972).
- 6) Warshaw, A.L., Walker, W.A. and Isselbacher, K.J.: Gastroenterology 66, 987 (1974).
- 7) Kimura, S., Totani, M. and Murachi, T.: Japan. J. Exptl. Med. 43, 163 (1973).
- 8) 石原良三, 村地 孝: 生化学 44, 720 (1972) [学会抄録].

[質問] Macromolecule が腸管から直接そのまま吸収されたとき生じると考えられる免疫反応についてはどんなことが検討されているか。

(北大・医・第 1 生化学 小林邦彦)

[答] 自分で検討を行っていないが、経口的に与えられる酵素製剤などに関連して、practical に重要な問題を含んでおり、製薬会社において、かなり検討が行なわれているときいている。その結果によると、アナフィラキシーを起こすようなことはないと言われているようである。

[質問] Macromolecule の吸収のメカニズムとしてはウワバインによる阻害がないことから、active transport でなく carrier protein のようなものによる吸収を想定していると考えてよいか。

(司会 奥田邦雄)

〔答〕 吸収のメカニズムを単純に考えることは困難であるが、膜の構造はそれほど方向性が rigid なものでなく、表面に巨大分子を吸着した膜がそのまま他の面に移るという流動的なメカニズムを考えるのが適當である。この場合、全系のエネルギー変化は大きくなく、いわば

蛋白分子の conformation の変化に相当するような現象を生じているという意味で energy coupling を要する現象というよりは、むしろ facilitated diffusion と解するべきであると考えている。