

高蛋白質食摂取ラットのCa代謝と骨形成について

舟場正幸・川島知之・矢野秀雄・川島良治
(京都大学農学部畜産学科*)

Calcium Metabolism and Bone Formation in Rats Fed a High Protein Diet

Masayuki FUNABA, Tomoyuki KAWASHIMA, Hideo YANO and Ryoji KAWASHIMA
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kyoto University

The effects of a high protein diet on Ca metabolism and bone formation were evaluated in growing rats. Urinary Ca excretion was increased 3 days after the ingestion of the high protein diet and apparent Ca absorption tended to be decreased in rats fed the high protein diet. As the result, decreased serum Ca concentration was observed in the high protein diet group. Bone formation was examined by endochondral bone forming system using demineralized bone powder. Fourteen days after the implantation of demineralized bone powder, it was observed that an active bone remodeling was induced by osteoblasts and osteoclasts in the control group. By contrast, a greater part of cartilage was found in the high protein diet group, which indicated the inhibition or the retardation of bone formation, without affecting the values of biochemical parameters. A reduced Ca availability at the site of cartilage calcification might be thought to impair bone formation.

高蛋白質食摂取時に尿中Ca排泄量が増加することはヒト、ラットではよく知られている。しかし過剰に排泄されたCa源について盛んに研究が進められているが必ずしも判然としない点が多い^{1,2)}。本試験は、比較的若い成長中ラットに対する高蛋白質食の給与がCa代謝および脱灰骨粉末を用いた異所性の骨形成に及ぼす影響を検討した。

実験方法

1) 実験動物および飼料

50日齢のWistar系雄ラット32頭に対し、対照食を5日間給与した後(day0)、対照食あるいは高蛋白質食を給与した(Table 1)。

*所在地：京都市左京区北白川追分町(〒606)

Table 1. Diet composition

	Control	High Protein
	(g/kg diet)	
Casein	180	180
Lactalbumin	—	201
Dextrose	555	359
Lard	150	150
Corn Oil	50	50
Cellulose	25	25
Vitamin mix ^a	6.0	6.0
Mineral Mix ^b	14.7	14.7
CaCO ₃	12.1	10.2
Ca (H ₂ PO ₄) ₂ H ₂ O	6.8	3.8

^aOne gram of vitamin mixture contains 500IU of vitamin A, 100IU of vitamin D₃, 5mg of vitamin E acetate, 5.2mg of vitamin K, 1.2mg of vitamin B₁ HCl, 4mg of vitamin B₂, 0.8mg of vitamin B₆ HCl, 500ng of vitamin B₁₂, 30mg of vitamin C, 20 μg of D-biotin, 200 μg of folic acid, 5mg of Ca-pantothenate, 5mg of *p*-aminobenzoic acid, 6mg of nicotinic acid, 6mg of inositol and 200mg of choline chloride.

^bSupplying (mg/kg diet) : MgCO₃, 6900 ; ZnCO₃, 96 ; FeSO₄7H₂O, 124 ; CuSO₄5H₂O, 20 ; MnSO₄xH₂O, 150 ; KI, 1.3 ; NaCl, 2300 ; Na₂CO₃, 1300 ; K₂CO₃, 3530 ; Na₂SeO₃, 0.22.

2) 試験 1. 高蛋白質食摂取がラットの Ca 代謝に及ぼす影響

day0,1,3,5,7,9 に排泄された尿と糞を採取し, Ca を原子吸光法で, 尿中正味酸を Chan の方法³⁾で測定した。

3) 試験 2. 高蛋白質食摂取がラットの骨形成に及ぼす影響

Reddi と Huggins による方法⁴⁾に従ってエチルアルコール, エチルエーテルで脱水, 脱脂し, さらに 0.5N 塩酸で脱灰した 74-420 μm の粉末を 10mg ずつ腹筋中 3ヶ所に埋め込んだ。その後, day24 (埋め込み14日後) に腹部大動脈からの採血により屠殺し, 移植物を取り出した。これらの移植物について, H-E 染色による組織像と Ca 含量およびアルカリ性あるいは酸性ホスファターゼ (Alp, Acp) 活性^{5,6)}から骨形成を評価した。また, 血液は血清にし, Ca 濃度を測定した。

4) 統計処理

SAS の GLM procedure により最小自乗分散分析により高蛋白質食摂取の効果が検討された。

実 験 結 果

1) Ca 代謝

Fig. 1 は 1 日当たりの尿中排泄量を示している。高蛋白質食摂取により尿量は day1 より速やかに増加し, 試験期間中継続した。尿中 Ca 排泄量は day3 以降に高蛋白質食区で有意に増加した。比較的大

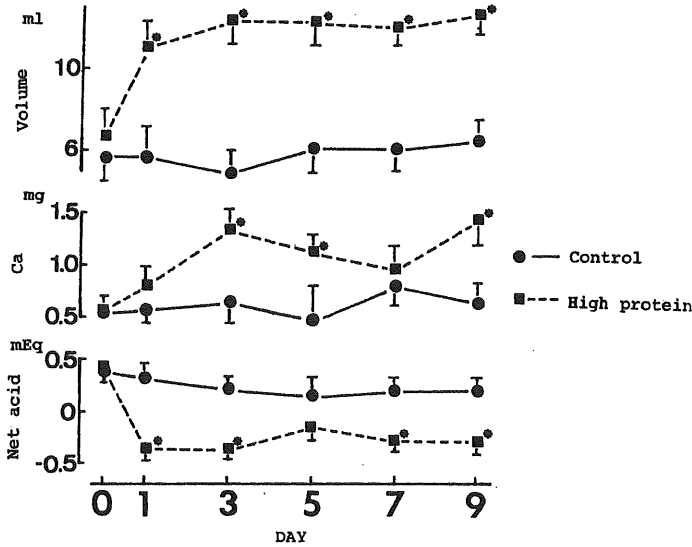


Fig. 1. Changes of daily urinary volume, urinary Ca excretion and net acid excretion in rats. Results are expressed as means \pm S.E.

* : $p < 0.05$, as compared to the values in the control diet group.

Table 2. Effects of a high protein diet on Ca balance and serum Ca concentrations

	Control	High protein
Intake	100	100
Feces	54.3 \pm 9.2	61.2 \pm 9.2
Urine	0.81 \pm 0.13	1.93 \pm 0.13**
Absorbed	45.7 \pm 9.2	38.8 \pm 9.2
Retained	44.9 \pm 9.1	36.8 \pm 9.1
	mg/100ml	
Serum Ca	10.00 \pm 0.09	9.70* \pm 0.09

Values are least squares mean \pm S.E.

*, ** : Significantly differ from control group ($p < 0.05, 0.01$, respectively).

きな日間変動により、day7では両区間で差は見られなくなったが、試験期間全体での尿中Ca排泄量は高蛋白質食区で多くなった。尿中正味酸排泄量は対照食摂取時には正の値を示していたが、高蛋白質食の摂取により速やかに減少し、負の排泄量を示すようになった。

試験1の後半部分、すなわち、day5,7,9のCa摂取量を100とした際の出納および血清Ca濃度をTable 2に示した。高蛋白質食の摂取により尿中Ca排泄量は全体からみればわずかではあるが有意に増加し、見かけのCa吸収は抑制される傾向を示した。その結果、Caの体内保有量は高蛋白質食区で減

少する傾向を示した。また、高蛋白質食区では血清 Ca 濃度の減少が認められた。

2) 骨形成

Table 3 は day24 (移植14日後) で取り出した脱炭骨粉末の生化学成分を示している。Ca 含量, Alp および Acp 活性はいずれも個体毎の変動が大きく有意な差を示さなかった。H-E 染色像は, 対照食区では骨基質を分泌している骨芽細胞, 骨細胞と多核の破骨細胞の存在を示しているが, 高蛋白質食区では骨芽細胞, 破骨細胞はほとんど見られず, 軟骨細胞が優勢な状態が観察された。このことは対照食区と比較して高蛋白質食区では軟骨内骨化の軟骨石灰化以前の段階が遅延あるいは抑制されたことを示している。

Table 3. Effects of a high protein diet on Ca contents and enzyme activities in demineralized bone powder collected 14 days after the implantation

	Control	High protein
	$\mu\text{g}/\text{mg}$ wet tissue	
Ca	8.84 \pm 1.03	12.06 \pm 1.89
	mM	
Alp ^a	1.407 \pm 0.250	1.134 \pm 0.261
Acp ^a	1.503 \pm 0.276	1.392 \pm 0.206

Values are least squares mean \pm S.E.

^a: mM substrate utilized per mg soluble protein per an hour at 37°C .

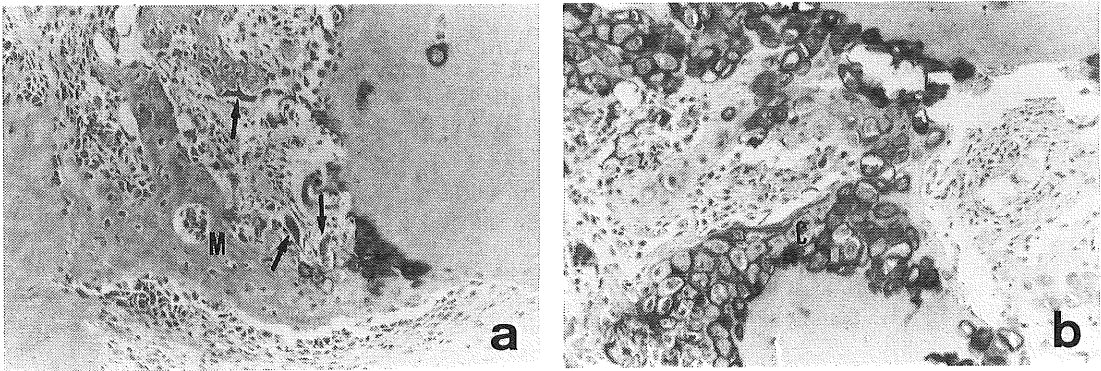


Fig. 2. Histological observation of the implanted demineralized bone powder in rats on day14. ($\times 100$)

Paraffin sections stained with hematoxylin and eosin.

- (a): rats fed the control diet. Note bone matrix (M) and multinucleated osteoclasts (arrows).
- (b): rats fed the high protein diet. Note prominent chondrocytes (C) and the absence of bone formation.

考 察

成ラットが高蛋白質食を摂取した際尿中 Ca 排泄量が増加することはよく知られており^{2,8)}、本試験で用いた比較的若い成長中のラットでも同様の現象が認められた。ヒトの高蛋白質食摂取誘導性高 Ca 尿の機構に関して、過剰のアミノ酸の酸化作用によって、酸産生量が増加し、緩やかな代謝性アシドーシスが誘発され、そのことが直接あるいは間接的に尿細管での Ca の再吸収を抑制する結果、尿中 Ca 排泄量の増加が引き起こされると示唆されている¹⁾。しかし本試験では、尿中正味酸排泄量は高蛋白質食の摂取により逆に減少することを認めており、尿中 Ca 排泄量の増加は代謝性アシドーシスが原因ではないと考えられた。また、腸管での見かけの Ca 吸収が高蛋白質食摂取により促進された結果、尿中 Ca 排泄量が増加したのでもないことが明らかにされた。見かけの吸収量は高蛋白質食摂取により逆に減少する傾向を示したが、このことと尿中正味酸排泄量の減少とは関係があるのかも知れない。消化管内容物中の pH の上昇に伴い、Ca の溶解性が減少し、不溶性分画が増大することにより Ca の腸管吸収が抑制されることがめん羊で示唆されている⁹⁾。また、Ca の尿中排泄促進あるいは腸管吸収抑制によって血清 Ca 濃度は減少した可能性が考えられる。

Reddi と Anderson¹⁰⁾は、脱灰骨粉末をラットへ移植した際の経時的な軟骨内骨化の様相を報告している。それによると、移植 3 日目に間葉細胞が増殖し、5～7 日目に軟骨が形成され、9 日目に軟骨石灰化が起こり、それ以降骨芽細胞と破骨細胞により骨形成およびリモデリングがなされ、20 日目以降に活発な骨髄の形成を認めている。本試験で検討した移植 14 日目は彼らの観察ではリモデリングが最も盛んに行われている時期に当たる。

対照食区の脱灰骨粉末の H-E 染色像は骨のリモデリングが活発に行われていることを示しており、彼らの観察と一致したものであった。一方、高蛋白質食区では、骨基質がほとんど見られず、軟骨が優勢な状態であり、軟骨内骨化の軟骨石灰化より以前の段階が抑制あるいは遅延したことを示している。Weiss ら¹¹⁾は、本試験で用いた高蛋白質水準よりも著しく多量の蛋白質食 (80% カゼイン) 給与したラットにおいて骨形成量の減少を認めており、軟骨石灰化の段階での Ca の利用性の低下に起因する可能性を示唆している。本試験で観察された高蛋白質食区での血清 Ca 濃度の減少は軟骨石灰化の部位での利用可能な Ca 量の減少を意味するのかも知れない。あるいは、脱灰骨粉末中の Ca 含量に関して両区間で差が見られなかったことから、Ca の利用性の低下により骨形成は抑制あるいは遅延した可能性も考えられる。

文 献

1. SCHUETTE, S. A., M. B. ZEMEL and H. M. LINKSWILER (1980) *J. Nutr.* 110 : 305
2. WHITING, S. J. and H. H. DRAPER (1980) *J. Nutr.* 110 : 212
3. CHAN, J. C. M. (1972) *Clin. Biochem.* 5 : 94
4. REDDI, A. H. and C. B. HUGGINS (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69 : 1601
5. BESSEY, O. A., O. H. LOWRY and M. J. BROCK (1946) *J. Biol. Chem.* 164 : 321
6. LOWRY, O. H., N. R. ROBERTS, M-L. WU, W. S. HIXON and E. J. CRAWFORD (1954) *J. Biol. Chem.* 207 :

19

7. SAS (1985) : User's guide., SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
8. CALVO, M. S., R. R. BELL and R. M. FORBES (1982) J. Nutr. 112 : 1401
9. YANO, H., H. MATSUI and R. KAWASHIMA (1979) J. Anim. Sci. 48 : 954
10. REDDI, A. H., W. A. ANDERSON (1976) J. Cell. Biol. 69 : 557
11. WEISS, R. E., A. GORN, S. DUX and M. E. NIMNI (1981) J. Nutr. 111 : 804