

〔研究ノート〕

# ヒト腸管上皮細胞モデル (Caco-2) における鉄とアルミニウムの透過性に関する基礎的研究

竹山恵美子・黒水梨江・藤村 舞・福島正子

A Basic Study on Permeability of Iron (II) Chloride and Aluminium Chloride Using Human Intestinal Epithelial Cells (Caco-2)

Emiko TAKEYAMA, Rie KUROMIZU, Mai FUJIMURA and Masako FUKUSHIMA

Aluminium is found in large amounts in the Earth's crust, as well as in general food items, food additives and drugs, and is taken into the body orally and via the air on a daily basis. The average daily intake of aluminium in Japan is estimated to be 3 to 4 mg, but it is thought that not all ingested aluminium is absorbed. Akiyama et al.<sup>1)</sup> have reported that they administered aluminium chloride to transgenic mice for long periods of time and found that the accumulation was low. In this study, in order to investigate the bioavailability of aluminium in humans, we performed cell permeability assays of iron (II) chloride and aluminium chloride using the human intestinal epithelial cell line Caco-2.

In the case of iron (II) chloride, 1.3 to 3.2% of iron permeated, and in the case of aluminium chloride, less than 1% of aluminium permeated, thus confirming that the absorption of aluminium is lower than that of iron.

*Key words: intestinal epithelial cell (Caco-2) (腸管上皮細胞モデル (Caco-2)), Iron (II) (鉄), Aluminium (アルミニウム), permeability (透過性)*

## I. 緒 言

2011年6月FAO/WHO合同食品添加物専門家委員会はアルミニウムの暫定的週間摂取許容量を体重1kgあたり2mgとした<sup>2)</sup>。2006年に設定した1mg<sup>3)</sup>の2倍量になったものの、それ以前の体重1kgあたり7mg<sup>4,5)</sup>に比べるとまだアルミニウムの毒性に対する評価は厳しいと言わざるをえない。

アルミニウムは地殻中に多く含まれるほか、一般的食品や食品添加物・医薬品にも含まれており<sup>6)</sup>、日常的に経口摂取および大気を経由して体内に取り込まれている。日本人の平均的摂取量は1日あたり3~4mgと推定されているが、場合によっては許容量をオーバーして摂取されることもある<sup>6)</sup>。しかし

ながら摂取したアルミニウムがすべて吸収されるとは考えられない。秋山ら<sup>1)</sup>はトランスジェニックマウスに長期間、塩化アルミニウムを投与したが、その体内蓄積量は低いものであったと報告している。そこで今回はヒトにおけるアルミニウムの生物学的利用率を調べることを目標に、まずヒト腸管細胞モデルを用いたアルミニウムおよび比較のため鉄(II)の細胞透過に関する基礎実験を行った。

## II. 実験方法

### 1. 試薬

塩化鉄(II)四水和物、塩化アルミニウム、塩化ナトリウムは、いずれも和光純薬工業(株)製の試薬特級を用いた。原子吸光分析の検量線作成には、

鉄、アルミニウムともに、各々1000 ppm (硝酸 0.2 mol/L) の原子吸光分析用標準溶液、測定用の硝酸および硝酸アンモニウムは原子吸光分析用のいずれも関東化学(株)製を用いた。

培地は MEM 培地 (Minimum Essential Medium EAGLE, SIGMA) (10% 子牛血清, 1% GPS 入り), PBS (Phosphate Buffered Saline (pH 7.4)) は GIBCO 製を用いた。トリパンプルーは MERCK 社製, ルシファーイエローは和光純薬(株)製を用いた。

## 2. 細胞

Caco-2 細胞: DS ファーマバイオメディカル(株)から入手した, 56~82 継代のものを用いた。

## 3. 器具および装置

カルチャーインサート (Cell Culture Insert 0.4  $\mu$ m poresize, HD (high pore density) PET track-etched membrane, 6-well, FALCON)

多元素同時分析原子吸光分光光度計 (HITACHI Z-9000, (株)日立製作所製)

ホローカソードランプ HLA-4 S 型 Al・Fe ランプ (日立計測器サービス(株))

## 4. 操作方法

### 1) 細胞培養<sup>7)</sup>

MEM 培地により 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーターで培養した Caco-2 細胞 4×10<sup>5</sup> cell/mL を 2 mL ずつ, 6-well のカルチャーインサートに播種し, 14 日後に透過実験を行った。なお, フラスコおよびプレートの培地交換は 2~3 日に 1 回行い, また, 細胞の単層形成はルシファーイエローの透過率により確認した<sup>8~10)</sup>。

### 2) 細胞の生存率の確認<sup>11)</sup>

試料溶液による細胞への影響を確認するために, トリパンプルーを用いて細胞の生死判定を行った。遠心分離により集めた細胞を試料溶液に 3 時間浸漬したものを, 0.5% トリパンプルー溶液で染色後, 全細胞数と青色に染色した死亡細胞数から細胞の生存率を求めた。

### 3) 鉄とアルミニウムの細胞透過実験および測定

培地を取り除き, 鉄透過実験用には濃度を 4/15 に希釈した PBS (PBS: 純水=4:11), アルミニウム透過実験用には 0.9% 生理食塩水を基本溶液とし, プレートおよびインサートを各々 3 回洗浄後, プレート側に基本溶液を 3 mL ずつ入れた。インサート側には 1×10<sup>-5</sup>, 2×10<sup>-5</sup>, 3×10<sup>-5</sup> mol/L の塩化鉄(II) 溶液もしくは 2×10<sup>-4</sup>, 4×10<sup>-4</sup>, 6×10<sup>-4</sup>, 8×10<sup>-4</sup> mol/L の塩化アルミニウム溶液を各々 2.5 mL 添加し, 3 時間, 37°C, CO<sub>2</sub> インキュベーター中で静置し透過させた。

その後, インサートを静かに取り出し, 各下受けのプレート (well) にピペットで 0.01 mol/L-硝酸水溶液を 2 滴ずつ加え, 沈殿した金属を溶解させた。この溶液を試験管に採取後, 硝酸アンモニウム溶液と 0.01 mol/L-硝酸水溶液を加えたのち, 鉄またはアルミニウム量を原子吸光光度計で測定した。なお, 金属が器具や超純水に残留している可能性を考え, 金属溶液の代わりに基本溶液を用いて同様の操作を行ったものをブランク値とした。これらの値から, 透過液中の鉄とアルミニウムの透過量 (mol) および透過率 (%) を算出した。

金属の測定は Table 1 の条件で行った。

Table 1 Temperature condition for atomic absorption photometry

		Temperature		Time (sec.)
		Start (°C)	End (°C)	
Fe	Dry	80	120	30
	Ash	630	630	30
	Atom	2700	2700	10
	Clean	3000	3000	3
Al	Dry	80	120	30
	Ash	710	710	30
	Atom	3000	3000	10
	Clean	3000	3000	3

Sample: 20  $\mu$ l per occurrence

Carrier gas: 200 ml/min.

Wavelength: Fe 248.3 nm, Al 309.4 nm

なお, 得られた結果は平均値±SD で示し, 有意差検定は SPSS を用い Tukey の多重比較または, t-test により行った。有意水準は 5% とした。

### III. 結果および考察

培養細胞については実験前日にルシファーイエローを用い透過率を測定した。透過率が0.3~2%未満で、単層膜形成が充分であることを確認した<sup>10)</sup>。

Fig. 1にCaco-2単層細胞に塩化鉄(II)を添加したときの透過量を示した。透過量は鉄の生理的濃度5~500 nmolを参考に、 $2.5 \times 10^{-8}$  mol,  $5.0 \times 10^{-8}$  mol,  $7.5 \times 10^{-8}$  molの3段階とした。いずれの濃度の塩化鉄を添加しても細胞が100%生存していることは、トリパンブルーを用いて確認した。鉄(II)の透過量は $2.5 \times 10^{-8}$  molより $5.0 \times 10^{-8}$  molの方が高くなったが、 $7.5 \times 10^{-8}$  molの濃度にして透過量は増加しなかった。なお、塩化鉄は溶解し

にくく、これ以上濃度を上げることはできなかった。

Fig. 2に塩化鉄の透過率を示した。 $2.5 \times 10^{-8}$  molの濃度で3.2%,  $5.0 \times 10^{-8}$  molで2.25%,  $7.5 \times 10^{-8}$  molで1.3%と透過率は低下した。鉄はDMT (divalent metal transporter) 1によって小腸上皮細胞の刷子縁膜から取り込まれる<sup>12,13)</sup>。実際のヒトにおける鉄の吸収には種々の食品成分が存在するため、単純に比較することはできないが、今回の実験範囲では濃度による透過量への影響はほとんど認められなかった。一般に非ヘム鉄の鉄吸収は5%以下と考えられているが、今回の*in vitro*の細胞実験では透過率が1.3~3.2%であり、いずれも5%未満であった。なお、今回は細胞内の金属の測定は行わなかった。

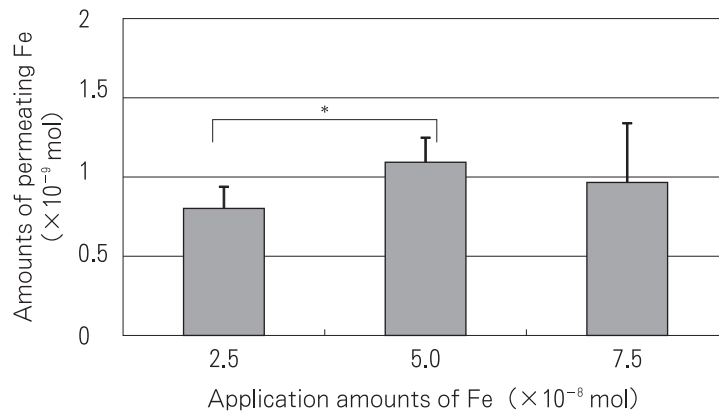


Fig. 1 Amounts of permeating Fe in the human intestinal epithelial cell line Caco-2 after application of iron (II) chloride  
Multiple comparison (Tukey): \* $p < 0.05$

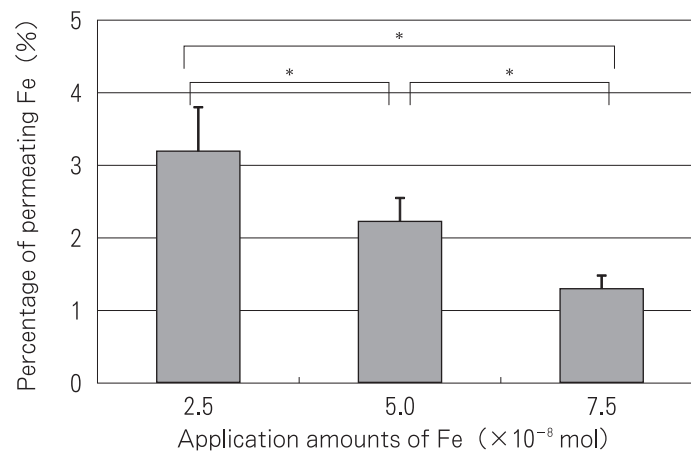


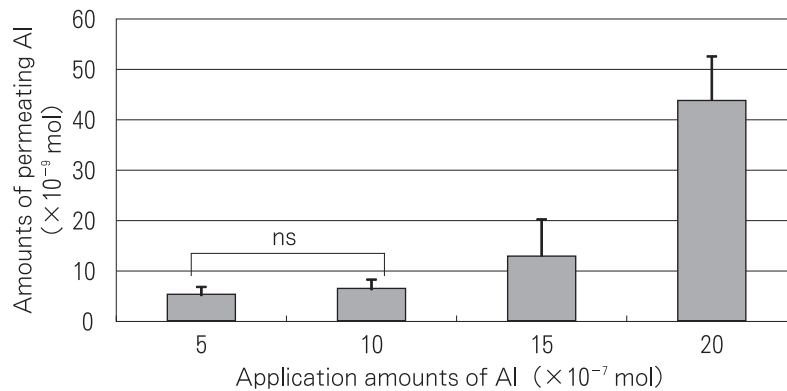
Fig. 2 Percentage of permeating Fe in the human intestinal epithelial cell line Caco-2 after application of iron (II) chloride  
Multiple comparison (Tukey): \* $p < 0.05$

Fig. 3 に塩化アルミニウムの透過量を示した。アルミニウムの添加量は鉄より 1 ケタ高い濃度になっているが、アルミニウムは透過量が少なく、十分な再現性が得られなかったため今回はこの濃度での比較となった。アルミニウムの場合 4 段階の濃度の実験を行ったが、 $15 \times 10^{-7}$  mol,  $20 \times 10^{-7}$  mol の塩化アルミニウムを添加すると細胞の生存率は 80% 以下になった。よって細胞が十分生存できる  $5.0 \times 10^{-7}$  mol,  $10 \times 10^{-7}$  mol の 2 段階のみの比較とした。アルミニウム濃度が 2 倍になっても透過量は微量増加しただけで、両者に有意差は認められなかった。

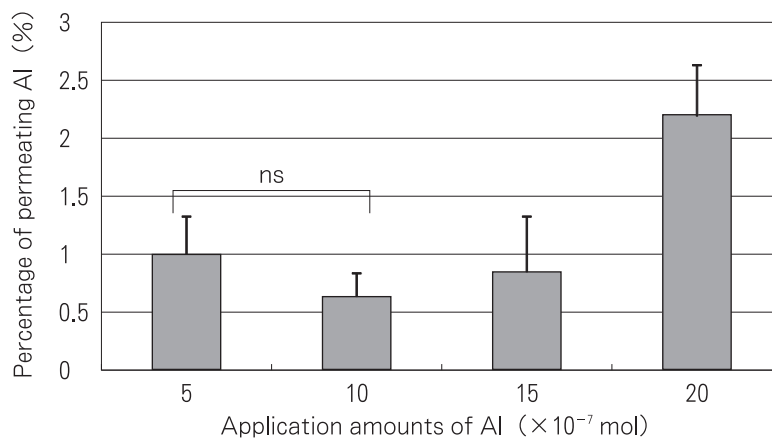
Fig. 4 に Caco-2 細胞への塩化アルミニウムの透過率を示した。 $5.0 \times 10^{-7}$  mol が 1% で、その 2 倍の  $10 \times 10^{-7}$  mol にしても透過率はその半分程度で

あった。両者とも透過率は 1% 未満であり、鉄と同様アルミニウムの吸収も他の食品成分等が共存した場合影響を受けるため<sup>14~16</sup>), 単純な比較はできないが、アルミニウムの吸収率は鉄の 1/3 未満である可能性が示唆された。なお、アルミニウムに関しても細胞内に残存している可能性があるが、その分のアルミニウムは測定しなかった。

鉄の摂取推奨量は 6~10 mg, アルミニウムの平均的摂取量は 3~4 mg で、鉄の約半分量かそれ未満のアルミニウムを毎日摂取していることになる。一方体内での蓄積量は鉄が 4000 mg 前後、アルミニウムは桜井<sup>17)</sup>によると体重 60 kg で 50 mg 程度と推測されている。日々の摂取に対して体内蓄積量が少ないのは、アルミニウムの吸収率が鉄よりかな



**Fig. 3** Amounts of permeating Al in the human intestinal epithelial cell line Caco-2 after application of aluminium chloride  
Significant difference between  $5 \times 10^{-7}$  mol and  $10 \times 10^{-7}$  mol by *t*-test  
ns: not significant



**Fig. 4** Percentage of permeating Al in the human intestinal epithelial cell line Caco-2 after application of aluminium chloride  
Significant difference between  $5 \times 10^{-7}$  mol and  $10 \times 10^{-7}$  mol by *t*-test  
ns: not significant

り低いことが大きな要因のひとつであると考えられる。なおアルミニウムの吸収のメカニズムはまだよくわかっていない。一説によると鉄のトランスポーターを使用していると考えられている<sup>18,19)</sup>。したがって鉄とアルミニウムが共存したとき、互いに吸収率に影響を及ぼす可能性があるが、この件については引き続き検討したい。

今回鉄とアルミニウムを溶解する溶媒を鉄は4/15に希釈したPBS溶液、アルミニウムは0.9%生理食塩水としたが、現在、鉄およびアルミニウムの両方に適した緩衝溶液を見出し、かつ塩化鉄および塩化アルミニウムに代わる化合物を用いて実験を行っている。まだ発表する段階にはないが、透過量および透過率が少し異なるものの、塩化鉄・塩化アルミニウムと類似の傾向を認めている。次回までにまとめて発表したい。

#### IV. 参考文献

- 1) Akiyama H., Hosokawa M., Kametani F., Kondo H., Chiba M., Fukushima M. and Tabira T.: Long-term oral intake of aluminium or zinc does not accelerate Alzheimer pathology in A $\beta$ PP and A $\beta$ PP/tau transgenic mice, *Neuropathology*, **32**(4), 390-397 (2012).
- 2) JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), (2011, 6).
- 3) JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), (2006).
- 4) Evaluation of certain food additives and contaminants, Thirty-third Report of the Organization, WHO Technical Report Series, No. 776 (1989).
- 5) Aluminium. In: Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, Cambridge University Press, 113-153, (WHO Food Additives Series, No. 24) (1989).
- 6) 福島正子: 「食品および食品包装材料から溶出するアルミニウムの食品衛生学的研究」博士論文 (1997).
- 7) 竹山恵美子, 福島正子: ヒト消化管由来のCaco-2細胞によるポリフェノールの腸管吸収モデル実験, 昭和女子大学生生活科学紀要, 学苑 No. 806, 37-39 (2007).
- 8) 上野川修一, 清水誠, 八村敏志, 戸塚護: 生物化学実験法 50, 腸管細胞機能実験法, 学会出版センター (東京), pp. 80-85 (2005).
- 9) BD Biosciences: Protocol for Lucifer Yellow Permeability Assay Using BD Falcon™ HTS 96-Multiwell Insert Systems (2007).
- 10) BD BioCoat HTS Caco-2 アッセイシステム (カタログ番号 354801/354802): 単層膜の評価, Lucifer yellow の透過アッセイ, <http://www.bdj.co.jp/falcon/products/1f3pro00000vw4rk-att/Caco-2-HTS> (2012. 7. 2 アクセス).
- 11) 松谷豊: 生物化学実験法 29, 動物細胞培養法入門, 学会出版センター (東京), pp. 127-129 (1995).
- 12) ZHU L., Glahn R. P., Yeung C. K. and Miller D. D.: Iron uptake by Caco-2 cells from NaFeEDTA and FeSO<sub>4</sub>: Effects of ascorbic acid, pH, and a Fe (II) chelating agent, *J. Agric. Food Chem.*, **54**(20), 7924-7928 (2006).
- 13) 岸文雄: 二価金属イオンの吸収と輸送の分子機構, 細胞, **34**(14), 570-574 (2002).
- 14) Domingo J. L., Gomez M., Sanchez D. J., Llobet J. M. and Corbella J.: Effect of various dietary constituents on gastrointestinal absorption of aluminum from drinking water and diet, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **79**(3), 377-380 (1993).
- 15) Nayak P.: Aluminum: Impacts and disease, *Environ. Res. Sect. A*, **89**(2), 101-115 (2002).
- 16) Glynn A. W., Sparén A., Danielsson L-G., Sundström B. and Jorhem L.: The influence of complexing agents on the solubility and absorption of aluminium in water, *Food Addit. Contam.*, **18**(6), 515-523 (2001).
- 17) 桜井弘: 「金属は人体になぜ必要か」ブルーボックス B-1123, 講談社 (東京), pp. 54 (1996).
- 18) Hemadi M., Miquel G., Kahn P. H. and Chahine J-M. E.: Aluminum exchange between citrate and human serum transferrin and interaction with transferrin receptor I, *Bio. Chem.*, **42**, 3120-3130 (2003).
- 19) Pérez G., Pregi N., Vittori D., Risio C. D., Garbossa G. and Nesse A.: Aluminum exposure affects transferrin-dependent and -independent iron uptake by K562 cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1745**, 124-130 (2005).

(たけやま えみこ 管理栄養学科)

(くろみず りえ グリーンホスピタリティフードサービス株式会社, 平成19年度生活科学科卒業生)

(ふじむら まい ユニバーサル製缶株式会社, 平成19年度生活科学科卒業生)

(ふくしま まさこ 健康デザイン学科)