

分離大豆たん白質のラット血清 コレステロール濃度低下作用……(III)

HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECT OF SOY PROTEIN
ISOLATE IN RATS

菅野道廣・田中一成・井手 隆・今泉勝己（九州大学農学部）

Michihiro SUGANO, Kazunari TANAKA, Takashi IDE and Katsumi IMAIZUMI

Department of Food Science and Technology, Kyushu University

ABSTRACT

Male Wistar rats were fed diets containing proteins or their amino acid mixtures for 24 to 32 days. The livers were isolated and perfused for 4 hours with Krebs-Henseleit buffer containing 0.15% glucose and 25% washed human red blood cells. Feeding soybean protein as compared with casein resulted in a significant reduction of the secretion of cholesterol, triglyceride and apoA-I. The results agreed well with the responses of serum counterparts reported previously. When amino acid mixture diets were fed, however, no such difference could be demonstrated, though the soy-type amino acid mixture had also been shown to decrease serum cholesterol and apoA-I. The production rate of total ketone bodies was the same, but the ratio of β -hydroxybutyrate: acetoacetate was significantly higher on soybean protein. The perfusate glucose tended to be higher on soybean protein. These differences were less clear on feeding amino acid mixtures. Neither the rate of bile flow nor the concentration of biliary bile acids and cholesterol were influenced by the type of dietary protein. These observations led us to conclude that soybean protein exerts the cholesterol-lowering action primarily through the regulation of hepatic contribution. The data also suggested that the protein-dependent difference in the concentration of serum cholesterol and apoA-I might not be explained thoroughly by the difference in the amino acid profile alone. In this context, the effect of the difference in the sequence of digestion and absorption of different nitrogen sources should be taken into account.

各種実験動物において、大豆たん白質はカゼインに比べ血清コレステロール（CHOL）濃度低下作用を発揮する。大豆たん白質の降 CHOL 作用は、CHOL 代謝系の諸相の変化により発現すると推察される。すなわち、大豆たん白質は、腸管からの CHOL や胆汁酸の吸収を低下させ¹⁻³⁾、その結果、肝臓での CHOL 合成は亢進する⁴⁾。しかし、肝臓および血清の CHOL 濃度は依然低いことから、この合成活性の上昇によって完全に

は補償されていないようである。

肝臓は CHOL 代謝上、中枢的な役割を果たしているが、食餌たん白質による血清 CHOL 濃度の変化⁵⁻⁷⁾に対して、肝臓がどのような影響を及ぼしているかについてはほとんど知られていない。本研究では分離大豆たん白質とカゼインあるいはこれらに類似のアミノ酸混合を食餌窒素源として用い、単離したラット肝臓を灌流して、脂質および apoA-I 放出能に及ぼす影響を検討

した。

実験方法

Wistar 系雄ラットを用い、たん白質あるいはアミノ酸混合を含む無 CHOL・半合成食を与え、3～4 週間自由摂食法で飼育した。

基本飼料はたん白質またはアミノ酸混合 20%，脂肪（コーン油）1%，水溶性ビタミン 1%，塩混合 4%，塩化コリン 0.15%，セルロース粉末 2% を含み、ショ糖で 100% とした⁷⁾。たん白質は、分離大豆たん白質（フジプロ R，不二製油^株）およびカゼイン（vitamin free，ICN Pharmaceuticals, Inc., Cleveland, Ohio）を用いた。塩混合はたん白質食では Harper 混合⁸⁾（オリエンタル酵母工業^株）を、アミノ酸混合食では Ebihara ら

の配合⁹⁾を使用した。また、アミノ酸混合は L-アミノ酸で調製した。

ラットをネンブタール（5 mg / 100 g 体重）で麻酔した後、胆管と門脈にカニューレーションし、胆汁を採取した。次に下大静脈を結紮し、上大静脈にカニューレーションして肝臓を灌流した¹⁰⁾。灌流は 0.15% グルコースおよび 25% の洗浄したヒト赤血球を含む 95% O₂ - 5% CO₂ で平衡化した Krebs-Henseleit 緩衝液を用い、流速 20ml / min, 37°C で合計 4 時間行った。1 時間ごとに灌流液約 15ml を取り、その分だけ新鮮な灌流液を補った。採取した灌流液を 10,000 g で 15 分間遠心して赤血球を沈殿させ、上澄を分析に供した。上澄を Folch ら¹¹⁾ の方法に準じて抽出し、CHOL¹²⁾ およびトリグリセライド (TG) を¹⁰⁾ 酵素法により定量した。apo

Table 1. Effects of different dietary nitrogen sources on growth, food intake and liver weight of rats

Dietary nitrogen sources ¹	Body-wt gain(g)	Food intake (g/day)	Liver-wt ² (% body-wt)
Protein diets			
Soybean protein	213±10 ³	21.7±0.3	4.69±0.28
Casein	211± 5	20.6±0.6	4.71±0.05
Amino acid mixture diets			
Soybean protein	151± 9	19.1±0.4	4.90±0.15
Casein	147± 9	19.3±0.9	5.09±0.07

1 : Rats weighing about 110g were fed protein and amino acid mixture diets for 28~33 days and 24~32 days, respectively.

2 : Liver weight after perfusion.

3 : Mean±SEM of 6 rats per group.

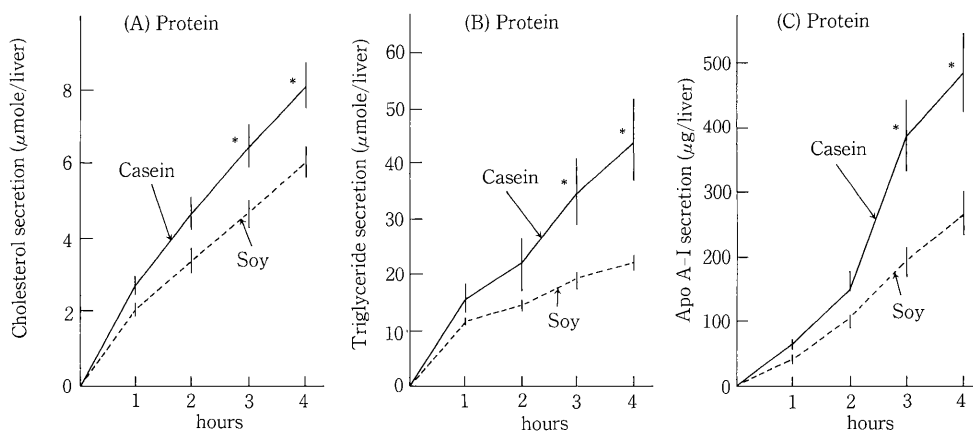


Fig. 1 Effects of dietary proteins on the secretion of cholesterol(A), triglyceride(B) and apo A-I(C) by the isolated rat liver.

Mean±SEM of 6 rats.

-----, soybean protein; —, casein.

* Significant difference at $p < 0.05$.

A-I の定量は、上澄を充分透析し凍結乾燥した後、ロケット免疫電気泳動法によった¹³⁾。また、除たん白質灌流液¹⁴⁾について、ケトン体^{15,16)}およびグルコース¹⁷⁾を酵素法により定量した。胆汁中の胆汁酸はタウロコール酸ナトリウムを標準として酵素法¹⁸⁾で、CHOL は 5 α -コレスタン を標準として用いガスクロマトグラフィー¹⁹⁾で分析した。灌流後の肝臓脂質の定量は前報告²⁰⁾に従った。

結 果

1. たん白質食

Table 1 に示すように、体重増加量、摂食量および灌流後の肝臓重量に両群間で差はなかった。

Fig. 1 に CHOL, TG および apoA-I の分泌量を示す。これらの成分の分泌速度はケトン体 (Fig. 2) におけると同様に、ほぼ直線的であるので、肝臓は 4

時間灌流の間、正常に機能していると判断できる。カゼイン群では大豆たん白質群に比べ、CHOL, TG および apoA-I の分泌量は有意に高かった。

Fig. 2 に示すように、ケトン体産生には両群間で明確な差は観察されなかったが、 β -ヒドロキシ酪酸：アセト酢酸の比は大豆たん白質群で有意に高かった。グルコース濃度は大豆群で高い傾向にあり、その差は灌流終了時に有意であった。

胆汁の流量および胆汁酸、CHOL の含量に両群間で差は認められなかった (Table 2)。

灌流後の肝臓 CHOL および TG 濃度はカゼイン群で高い値を示した (Table 3)。

2. アミノ酸混合食

たん白質食と同様に、体重増加量、摂食量および肝臓重量に差はなかった (Table 1)。Fig. 3 に示すように、CHOL, TG および apoA-I の分泌量はたん白

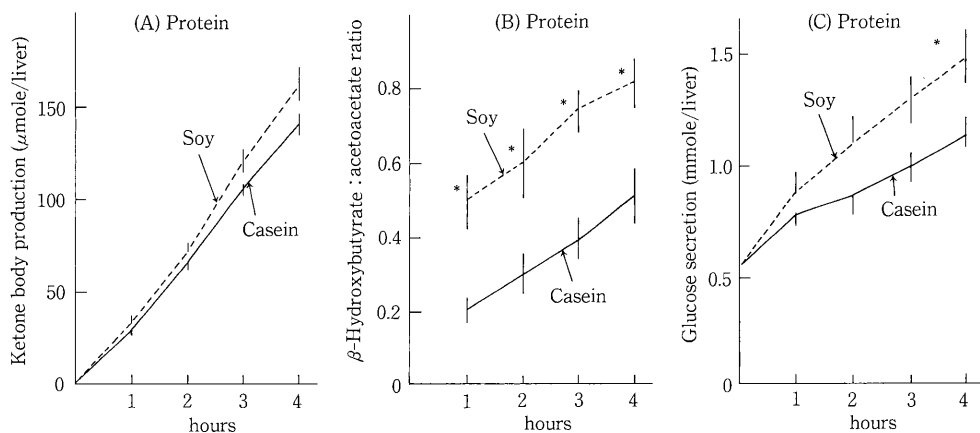


Fig. 2 Effects of dietary proteins on the secretion of total ketone bodies (A), individual ketone bodies (B) and glucose (C).

Mean $\pm$ SEM of 6 rats.

-----, soybean protein ; —, casein.

* Significant difference at $p < 0.05$.

Table 2. Effects of different dietary nitrogen sources on bile flow and biliary bile acid and cholesterol

Dietary nitrogen sources ¹	Bile flow (ml/hr)	Biliary bile acid ($\mu\text{mole/ml}$)	Biliary cholesterol (nmole/ml)
Protein diets			
Soybean protein	0.28 $\pm$ 0.08 ²	3.31 $\pm$ 0.68	54.9 $\pm$ 14.1
Casein	0.34 $\pm$ 0.07	2.92 $\pm$ 0.55	46.9 $\pm$ 9.1
Amino acid mixture diets			
Soybean protein	0.28	5.63 $\pm$ 2.55	36.4 $\pm$ 5.7
Casein	0.16	5.56 $\pm$ 1.92	47.2 $\pm$ 14.8

1: See footnote of table 1.

2: Mean $\pm$ SEM of 6 rats for protein diets and 2~4 rats for amino acid mixture diets.

Table 3. Effects of different dietary nitrogen sources on liver lipids

Dietary nitrogen sources ¹	Cholesterol	Triglyceride ($\mu\text{mole/g}$)	Phospholipid
Protein diets			
Soybean protein	5.38 ± 0.26^{2a}	10.4 ± 1.0^a	25.7 ± 1.8
Casein	6.17 ± 0.17	17.9 ± 2.0	26.7 ± 0.5
Amino acid mixture diet			
Soybean protein	6.49 ± 0.32	17.2 ± 2.1	26.5 ± 0.5
Casein	6.54 ± 0.31	28.1 ± 5.6	26.4 ± 1.5

1: See footnote of table 1.

2: Mean $\pm$ SEM of 6 rats.a: Significantly different from the corresponding casein group at $p < 0.05$.

質食におけると同程度であったが、アミノ酸混合の違いによる差異は明確でなかった。

ケトン体産生速度には両群間で差はなかったが(Fig. 4), β -ヒドロキシ酪酸:アセト酢酸の比はたん白質食と同様に大豆型混合群で高く、灌流3時間目で差は有意であった。グルコース濃度には差はなかった。

胆汁の流量および胆汁酸, CHOL の濃度 (Table 2) および肝臓脂質濃度 (Table 3) には差は認められなかった。

考 察

たん白質食での結果は、肝臓からの CHOL, TG および apoA-I の分泌がたん白質の質的差異に依存していること示唆した。大豆たん白質食でのこれら血清リ

ポたん白質構成成分の肝臓からの放出低下が、血清での濃度を低下させる一因と考えられる。

大豆たん白質食ラットでは、カゼイン食ラットに比べ、腸管からの CHOL 吸収が阻害され、肝臓への CHOL 流入が減少することにより、肝臓の HMG-CoA reductase 活性 (CHOL 合成系の律速酵素) が上昇する⁴⁾。しかし、糞中へのステロイド排泄の増加は、肝臓での合成亢進によって完全には補償されていないと考えられる。大豆たん白質群で肝臓からの CHOL 放出がカゼイン群より低いという本研究の結果は、上記の仮説を積極的に支持する。さらに、CHOL の代謝回転を2プールモデルにより解析してみると、代謝回転の速いプール (プールA) のサイズが減少しており、これはこのプールの CHOL 産生率の減少によるものではなく、除

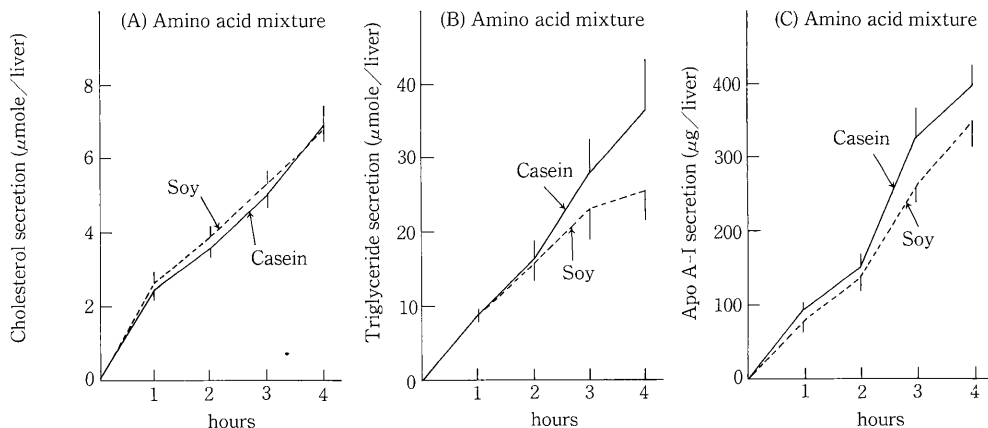


Fig. 3 Effects of dietary amino acid mixtures simulating soybean protein and casein on the secretion of cholesterol (A), triglyceride (B) and apo A-I (C) by the isolated rat liver. Mean $\pm$ SEM of 6 rats.

-----, soybean protein-type amino acid mixture;

——, casein-type amino acid mixture.

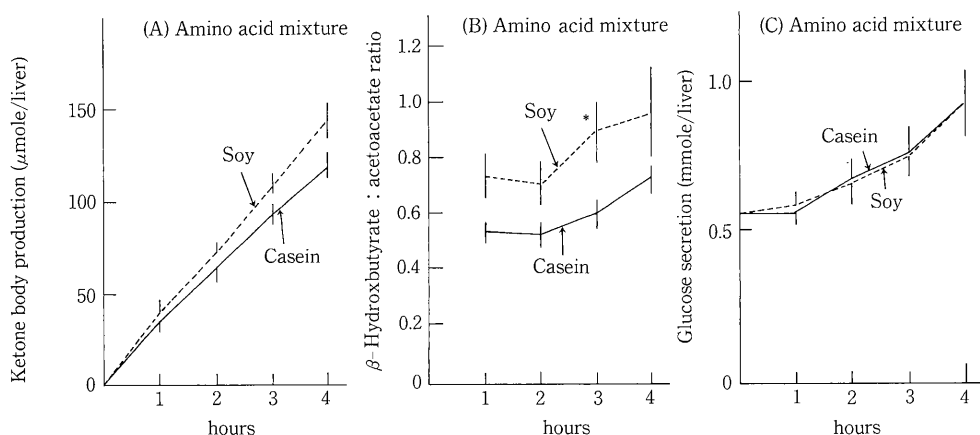


Fig. 4 Effects of dietary amino acid mixtures simulating soybean protein and casein on the secretion of total ketone bodies (A), individual ketone bodies (B) and glucose (C).

Mean $\pm$ SEM of 6 rats.

-----, soybean protein-type amino acid mixture ;

—, casein-type amino acid mixture.

* Significant difference at $p < 0.05$.

去率の亢進によるものであることが示された²¹⁾。Huff と Carroll³⁾ も無 CHOL・半合成食をウサギに与えた場合に同様のことを観察している。

大豆たん白質摂取ラットは肝臓からのグルコース放出を上昇させる傾向にあったが、この応答はグリコーゲン分解あるいは糖新生の亢進によるものと推測される。大豆たん白質はカゼインに比べ、ラット血清インスリン濃度を低下させ²²⁾、また、ヒト血漿グルカゴンレベルを上昇させる²³⁾ ことから、肝臓のグリコーゲン濃度は低いと考えられる。したがって、グルコース濃度の差が生じた原因は不明の点が多い。全ケトン体濃度は両群間で同じであったが、 β -ヒドロキシ酪酸：アセト酢酸の比は大豆たん白質群で明らかに高いことから、還元型ピリジヌクレオチドがより多く生産されることが示唆される。つまり、少なくとも食餌たん白質は還元型ピリジヌクレオチドの産生やアデニンヌクレオチドのリン酸化の維持に関係する代謝過程に影響していると推察される。しかし、Brunengraber ら²⁴⁾ は肝灌流実験で、 β -ヒドロキシ酪酸：アセト酢酸の比が大きく変動しても、肝臓の ATP 濃度は変わらないことを観察しており、今回の結果の解釈にはさらに検討が必要である。

著者らはこれまでに、たん白質の代わりにそれに類似するアミノ酸混合物をラットに与えた時、大豆型ア

ミノ酸混合は血清 CHOL および apoA-I 濃度を低下させることを観察した²⁾。本実験で、これら成分の肝臓での生成速度に明確な差がなかったのは、おそらく、降 CHOL 作用がアミノ酸混合とたん白質とは異なる機構によって発現することによると考えられる。事実、アミノ酸混合食では、ラット腸管からの CHOL 吸収に差はないが、肝臓の HMG-CoA reductase 活性がカゼイン型混合で高いことを確認している²¹⁾。したがって、血清リポたん白質成分の分泌速度の差はアミノ酸組成の差異のみによっては充分説明できない。当然、たん白質とアミノ酸混合との間での消化・吸収の様相の違い²⁵⁾ を考慮に入れなければならないであろう。

たん白質とそれに類似のアミノ酸混合物での応答の違いは、大豆たん白質の血清 CHOL 低下作用がアミノ酸組成の差異にのみ起因しないことを示唆している。しかし、大豆たん白質の降 CHOL 効果は糞中へのステロイド排泄の促進と、さらに重要な因子として肝臓からの CHOL 放出低下の共同作用により引き起こされていることは明白である。一方、カゼイン摂取は、CHOL の代謝回転速度を低下させると共に、肝臓からの CHOL の分泌を増加させることによって、大豆たん白質に比べ高 CHOL 血症を誘起していると推察される。肝臓からの CHOL 放出はエネルギー代謝、したがってホルモン、特にインスリンやグルカゴンによって調節されて

いる可能性があり、今後の検討が必要である。

要 約

1. 分離大豆たん白質とカゼインあるいはそれらに類似のアミノ酸混合物の肝臓機能に及ぼす影響を検討するために、単離したラット肝臓を灌流した。

2. 大豆たん白質は、肝臓からの CHOL, TG および apoA-I の放出を有意に低下させ、この応答は血清濃度の差と一致した。アミノ酸混合食では、大豆群で血清 CHOL および apoA-I 濃度が低いにもかかわらず、肝臓からの放出には差はなかった。たん白質食では全ケトン体生成速度に両群間で差はなかったが、 β -ヒドロキシ酪酸：アセト酢酸の比は大豆たん白質群で有意に高く、グルコース濃度も上昇する傾向にあった。アミノ酸混合食ではこれらの結果に明確な差はなかった。

3. 胆汁の流量および胆汁酸、CHOL の濃度に両群間で差異は観察されなかった。

4. 以上の結果から、肝臓が大豆たん白質の降 CHOL 作用に重要な役割を果たすことが推察される。血清 CHOL および apoA-I 濃度の変化はアミノ酸組成の差異のみによっては十分に説明できないようである。

文 献

- 1) FUMAGALLI, R., PAOLETTI, R., and HOWARD, A.N. (1978) : Hypocholesterolemic effect of soya. *Life Sci.*, **22**, 947-952.
- 2) NAGATA, Y., TANAKA, K., and SUGANO, M. (1981) : Further studies on the hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in rats. *Brit. J. Nutr.*, **45**, 233-241.
- 3) HUFF, M.W., and CARROLL, K.K. (1980) : Effects of dietary protein on turnover, oxidation, and absorption of cholesterol, and on steroid excretion in rabbits. *J. Lipid Res.*, **21**, 546-558.
- 4) REISER, R., HENDERSON, G.R., O'BRIEN, B.C., and THOMAS, J. (1977) : Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase of rats fed semipurified and stock diets. *J. Nutr.*, **107**, 453-457.
- 5) KRITCHEVSKY, D. (1979) : Vegetable protein and atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 135-140.
- 6) CARROLL, K.K. (1981) : Soy protein and atherosclerosis. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 416-418.
- 7) NAGATA, Y., IMAIZUMI, K., and SUGANO, M. (1980) : Effects of soya-bean protein and casein on serum cholesterol levels in rats. *Brit. J. Nutr.*, **44**, 113-121.
- 8) HARPER, A.E. (1959) : Amino acid balance and imbalance. Part I. Dietary level of protein and amino acid imbalance. *J. Nutr.*, **68**, 405-424.
- 9) EBIHARA, K., IMAMURA, Y., and KIRIYAMA, S. (1979) : Effect of dietary mineral composition on nutritional equivalency of amino acid mixtures and casein in rats. *J. Nutr.*, **109**, 2109-2116.
- 10) IDE, T., and ONTKO, J.A. (1981) : Increased secretion of very low density lipoprotein triglyceride following inhibition of long chain fatty acid oxidation in isolated rat liver. *J. Biol. Chem.*, **256**, 10247-10255.
- 11) FOLCH, J., LEES, M., and SLOANE-STANLEY, G.H. (1957) : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 12) ALLAIN, C.C., POON, L.S., CHAN, C.S.G., RICHMOND, W., and FU, P.C. (1974) : Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, 470-475.
- 13) IMAIZUMI, K., MURATA, M., and SUGANO, M. (1982) : Effect of dietary polyunsaturated phospholipid on the chemical composition of serum lipoproteins in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **28**, 281-294.
- 14) OTTO, D.A., and ONTKO, J.A. (1974) : Regulation of mitochondrial oxidation-reduction state in intact hepatocytes by calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 743-750.
- 15) MELLANBY, J., and WILLIAMSON, D.H. (1974) : Acetoacetate. In "Methods of Enzymatic Analysis," 2nd ed. by Bergmeyer, H.U., ed., Academic Press, New York, pp. 1840-1843.
- 16) WILLIAMSON, D.H., and MELLANBY, J. (1974) : D-(-)-3-hydroxybutyrate. In "Methods of Enzymatic Analysis," 2nd ed. by Bergmeyer, H.U., ed., Academic Press, New York, pp. 1836-1839.
- 17) BERGMAYER, H.U., BERNT, E., SCHMIDT, F., and STORK, H. (1974) : D-Glucose, determina-

- tion with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In "Methods of Enzymatic Analysis," 2nd ed. by Bergmeyer, H.U., ed., Academic Press, New York, pp. 1196-1201.
- 18) EATON, D.L., and KLAASSEN, C.D. (1976) : Effect of acute administration of taurocholic and taurochenodeoxycholic acid on biliary lipid excretion in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 198-202.
 - 19) SUGANO, M., MORIOKA, H., and IKEDA, I. (1977) : A comparison of hypocholesterolemic activity of β -sitosterol and β -sitostanol in rats. *J. Nutr.*, **107**, 2011-2019.
 - 20) 菅野道廣, 永田保夫 (1981) : 分離大豆たん白質のラット血清コレステロール濃度低下作用(II). 大豆たん白質栄養研究会会誌, **2**, 45-51.
 - 21) NAGATA, Y., ISHIWAKI, N., and SUGANO, M. (1982) : Studies on the mechanism of anti-hypercholesterolemic action of soy protein and soy protein-type amino acid mixture in relation to the casein counterparts in rats. *J. Nutr.*, **112**, 1614-1625.
 - 22) SUGANO, M., ISHIWAKI, N., NAGATA, Y., and IMAIZUMI, K. (1982) : Effect of arginine and lysine addition to casein and soya-bean protein on serum lipids, apolipoproteins, insulin, and glucagon in rats. *Brit. J. Nutr.*, in press.
 - 23) NOSEDA, G., and FRAGIACOMO, C. (1980) : Effects of soybean protein diet on serum lipids, plasma glucagon, and insulin. In "Diet and Drugs in Atherosclerosis, ed. by Nosedo, G., Lewis, B., and Paoletti, R., Raven Press, New York, pp. 61-65.
 - 24) BRUNENGRABER, H., BOUTRY, M., and LOWENSTEIN, J.M. (1973) : Fatty acid and 3- β -hydroxysterol synthesis in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.*, **248**, 2656-2669.
 - 25) SLEISENGER, M.H., and KIM, Y.S. (1979) : Protein digestion and absorption. *New Eng. J. Med.*, **300**, 659-663.