

SPI食を摂取したシロネズミの小腸内容物に見い 出された尿素合成促進物質に関する研究

UREOGENESIS-ENHANCING ACTIVITY OF SMALL INTESTINAL
CONTENTS OF RATS FED SPI DIET

内藤 博・関 泰一郎・野口 忠 (東京大学農学部)

Hiroshi NAITO, Tai-ichiro SEKI and Tadashi NOGUCHI

Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Tokyo 113

ABSTRACT

The acid-soluble fraction of small intestinal contents of rats, which were fed 20% SPI diet, was prepared. The fraction was partially purified by Dowex 50 W×4 chromatography and Sephadex G-25 gel filtration. The preparation obtained by this procedure showed an activity to enhance ureogenesis of primary cultured hepatocytes of rats in the presence or absence of glucagon in the medium. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn* 6, 11-14, 1985.

食物を摂取すると、一般に、短時間のうちに、血糖値の上昇、血中インスリンレベルの上昇、血中遊離アミノ酸濃度の上昇、血中尿素濃度の上昇、血中トリアシルグリセロールの上昇などが認められ、食後時間が経過するにしたがって、食前の水準に復する。この間、肝グリコーゲンの合成、肝臓および脂肪組織におけるトリアシルグリセロールの合成、アミノ酸の末梢器官への輸送、肝臓における尿素合成などが活発に行われる。

これらの諸反応の調節に重要な働きをするホルモンとしては、インスリンとグルカゴンが挙げられる。インスリンの分泌を促す食事成分は、第一にグルコース（デンプン）であり、ついでアミノ酸（特にアルギニン、ロイシンなど）であるとされている。一方、グルカゴンの分泌にはアミノ酸が大きな役割をはたす。

これらの過程で、食餌たん白質は、そのアミノ酸組成や、摂取量に応じて複雑な生理作用をもたらすと考えられる。特に植物たん白質は一般にアミノ酸組成が動物の必要量のアミノ酸パターンと異なり、過剰もしくは欠乏アミノ酸がある場合が多く、欠乏アミノ酸を補うか補わないかによって、栄養価は大きく異なり、このことは、食後の生理的影響がアミノ酸補足によ

て大きく影響される可能性を示している。しかし、実際にどのような影響が出るかについては不明な点が多い。

本研究では、たん白質摂取が生体に及ぼす影響を種々の側面から解析することを試みる研究の一端として、たん白質摂取後の腸管内に、代謝調節を行う可能性のある物質が存在するか否かを検索した。検索系としては、肝初代培養細胞の尿素合成系を用いた^{1,2)}。初代培養細胞による尿素合成は、インスリンによって抑制され、一方グルカゴンによって促進されることが知られているほか³⁾、定量の簡便さなど、代謝調節物質の検索系として、いくつかの特質を備えている。

方 法

肝細胞の分離・培養は中村らの方法に従った^{1,2)}。尿素合成活性を測定する時の培地は、アルギニンを除いた Eagle's MEM を用いた。尿素合成の測定は、ジアセチルモノオキシム法³⁾を用い、必要に応じて、ウレアーゼインドフェノール法⁴⁾を併用して定量の信頼性を確認した。

SPI 摂取後の腸管内容物は次のように調製した。体重 150 g 前後の Wistar 系シロネズミにミールフィー

ディング訓練をして、1日の食餌を4時間以内に摂取するようにし、SPI 20%を含む食餌を与え、摂食開始後、2.5時間後にシロネズミを屠殺し、直ちに氷冷した生理的食塩水で小腸内容物を洗い出した。氷冷した10% (w/v) スルフォサリチル酸を加えて終濃度2%になるように調整し、沈殿を遠心分離して除き、上清をDowex 50 W×4のH型カラムにかけ、吸着された物質を3 N アンモニア水で溶出して出発物質とした。この試料をSephadex G-25 (2.6×40 cm)のカラムにかけ、溶出液を分画して、3画分を得、各画分の尿素合成促進、もしくは抑制活性を初代培養肝細胞を用いて調べた。

結 果

Fig. 1は、今回の系での尿素合成量の時間経過ともなつての推移を示し、さらにその過程に及ぼすグルカゴンおよびインスリンの効果を示したものである。尿素は単位時間あたり一定量が合成され、グルカゴンは尿素合成を約2.5倍促進し、インスリンは逆に抑制した。

Fig. 2は、SPIを摂取したシロネズミの小腸内容物の酸可溶性画分を脱塩して得た標品のSephadex G-25ゲル透過の結果を示したものである。Fig. 3に示した無たん白質食を摂取したシロネズミのものに比べて、溶出パターンに明確な差が認められた。

Fig. 2に示した画分1～3の尿素合成促進能を調べた結果がFig. 4である。画分2、3には明らかな尿

素合成促進能が認められ、これはグルカゴン存在下での亢進した尿素合成量をさらに上廻る結果であった。

一方、無たん白食摂取ラットの腸内容物の画分1～3には全く活性は認められなかった。

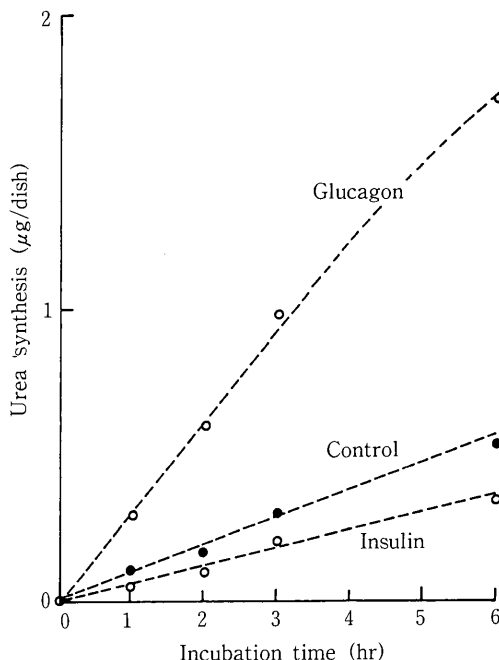


Fig. 1. Effect of insulin and glucagon on ureogenesis of primary cultured hepatocytes of rats.

Hepatocytes of rats were isolated and cultured as described in Methods. Insulin (10^{-9} M) or glucagon (10^{-9} M) was added to the medium and the rate of ureogenesis was measured.

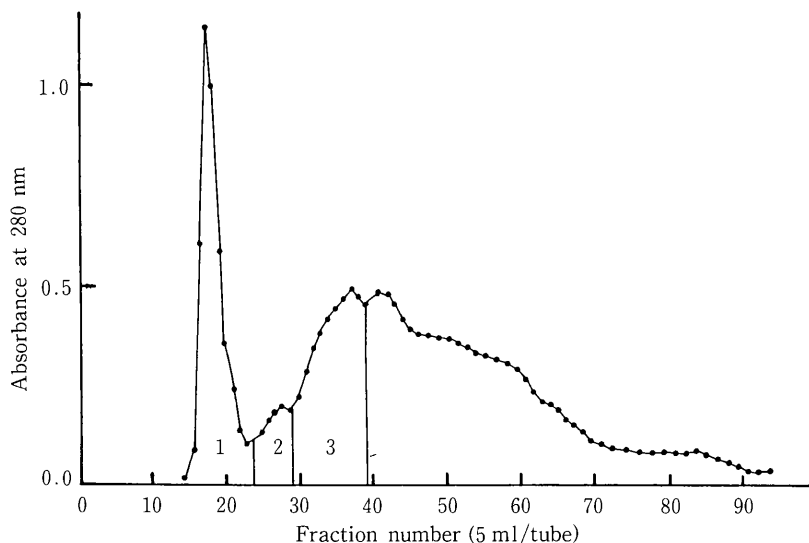


Fig. 2. Sephadex G-25 gel filtration of the acid soluble fraction of the small intestinal contents of rats fed 20% SPI diet.

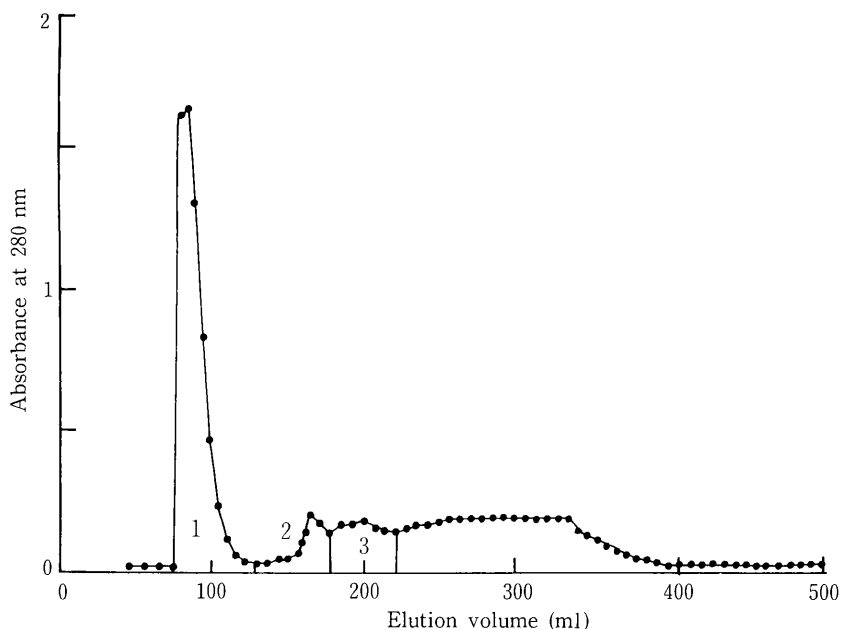


Fig. 3. Sephadex G-25 gel filtration of the acid soluble fraction of the small intestinal contents of rats fed protein-free diet.

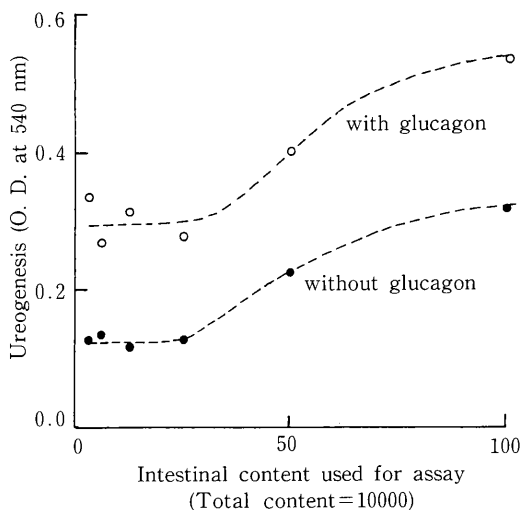


Fig. 4. Ureogenesis-enhancing activity of the small intestinal contents of rats fed 20% SPI diet. The fractions 2 and 3 were combined and the effect of this preparation on the ureogenesis of primary cultured hepatocytes of rats was studied. The total content of the preparation in the small intestine was supposed to be 10,000. The concentration of glucagon was 10^{-9} M.

考 察

今回の検索系で、SPI を摂取したラットの小腸内に、酸可溶性でかつ陽イオン性の、尿素合成促進物質が見い出された。類似の活性は、他の食餌たん白質摂取の場合にも、活性の程度に差はあるが、いずれも認められたので、たん白質摂取にともなう一般的な現象と考えられる。SPI 摂取時に認められる活性は、今回の実験条件で見るとカゼイン摂取時に近く、他の植物たん白質摂取時と比べると、むしろ低い方であった。

この物質の起源は、食餌たん白質である可能性も否定できないが、内因性物質である可能性も大きい。食餌性、内因性いずれであれ、たん白質摂取後に、ある種の生理活性物質が小腸内に存在し、それが、*in vitro*での肝細胞の尿素合成を促進することは興味深い。

今回小腸内に認められたこの尿素合成促進物質の本体は、現在まだ明らかになっていない。この化合物が、実際に *in vivo* で尿素合成を調節するの否か、今回の *in vitro* の結果からは判断し得ない。

今後さらに研究を進め、これらの点を明らかにしていきたいと考えている。

文 献

- 1) Tanaka, T., Sato, M., Tomita, Y. and Ichihara, A. (1978): Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. *J. Biochem.*, **84**, 937-946.
- 2) 中村敏一, 青山和司, 市原 明(1981): 分離肝細胞の調製と初代培養法, 緒方規矩雄監修, 図説動物実験の手技手法, 共立出版, pp. 55~76.
- 3) Geyer, G. and Davich, A. (1971): Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenate. *Anal. Biochem.*, **39**, 412-417.
- 4) 松本一彦(1981): 臨床生化学検査法, 緒方規矩雄監修, 図説動物実験の手技手法, 共立出版, pp. 83~86.