

食品たん白質（SPI, グルテン, オボアルブミン, カゼイン）及びその消化産物の胆汁酸再吸収に及ぼす影響

EFFECTS OF FOOD PROTEINS (SPI, GLUTEN, OVALBUMIN AND CASEIN) AND THEIR PROTEOLYTIC PRODUCTS ON BILE ACID REABSORPTION IN RAT SMALL INTESTINE IN RELATION TO PLASMA CHOLESTEROL-LOWERING EFFECT

伊吹文男・岩見公和（京都府立大学農学部）

Fumio IBUKI and Kimikazu IWAMI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

Male Wistar rats weighing 110~120 g were divided into (A) casein, (B) ovalbumin, (C) SPI and (D) gluten groups (n=6~8), which were fed *ad libitum* the corresponding diets for 3 weeks. The diets of C and D groups were supplemented with the limiting amino acids, respectively, so that no significant difference was observed in growth among the four groups. During the feeding period, the daily faeces were collected and stored at -20°C until use. At the 3rd week, all rats were sacrificed to collect blood to excise tissues. The plasma cholesterol was C<D<B<A in order of concentration, although being not significantly different. When the stock diet was replaced by the experimental ones, the faecal excretion of neutral and acidic steroids decreased gradually, but that in the C group was held at the highest level, followed by that in the D group. Thus, the effect of plant protein feeding on plasma cholesterol may be accounted for by an increased excretion of steroids into the faeces relative to the case of casein feeding. In this connection, the intestinal absorption of bile acid (taurocholate) in the presence of proteolytic products from the four food proteins was investigated with everted sacs. As a result, the bile acid reabsorption was observed to be raised by casein digests rather than by SPI digests. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 7, 68-75, 1986.

カゼインを摂取した場合に比べ、SPI や小麦グルテンのような植物たん白質を摂取すると血漿コレステロール値が低下する現象はよく知られている¹⁻³⁾。その作用機作に関しては諸説があり⁴⁾、必ずしも統一的な見解に達していない。コレステロール代謝の生体内フィードバックを考慮すると、食餌にコレステロールを加えた場合と加えない場合の血漿コレステロール低下作用は同一に論じられない。コレステロールを負荷しない場合の植物たん白質の効果については、やはり胆汁酸や中性ステロイド排泄量増加に起因するところが大

きいと考えの方が妥当と思われる。

本報告は、SPI を始めとする代表的な4種の食品たん白質の摂取に伴う糞中の酸、中性ステロイド排泄量変化と血漿コレステロール低下作用との因果関係並びに胆汁酸吸収に及ぼすたん白質消化産物の影響について検討を加えたものである。

実験方法

実験には、あらかじめ固形飼料で予備飼育し（初体重 50~60 g）、体重 110~120 g 前後に達したウィスタ

一系雄ラットを用い、〔A〕20% カゼイン食投与群、〔B〕20% オボアルブミン食投与群、〔C〕19.4% SPI (+0.6% Met) 食投与群、〔D〕19.2% 小麦グルテン (+0.6% Lys, 0.2% Thr) 食投与群の4群に分け (n=6~8), 上記飼料 (組成: α -でんぷん 65%, たん白質 20%, 油混合 5%, セルロース粉末 4%, ミネラル混合 5%, ビタミン混合 1%) で3週間飼育した。この間、毎日飼料摂取量と体重増加量を測定すると共に、糞を集めステロイド分析まで凍結保存した。所定期間飼育後、全ラットから頸動脈切断によって血液を採取し、直ちに臓器 (肝、小腸) の摘出を行った。採取した血液 (ヘパリンを含む) からは遠心分離によって血漿を分取し、その中に含まれるコレステロール量、トリグリセリド量、グルコース量を市販の試薬キットを用いて測った。HDL-コレステロール量の測定は、ヘパリン-マンガン法⁵⁾に従った。肝及び小腸粘膜中の総脂質はクロロホルム-メタノール (2:1) 抽出法によって求め、臓器中のコレステロール量及びトリグリセリド量は血漿の場合と同様にして求めた。糞中ステロイドの分離は、乾燥した糞の粉末 (0.5 g) をエタノール性苛性ソーダ (1規定) で加温処理後、石油エーテルで抽出される成分を中性ステロイド、水溶液残渣をさらに 120 °C で2~3時間オートクレーブ後、酸性条件でクロロホルム-メタノール (2:1) によって抽出される成分を酸性ステロイド (胆汁酸) とし、両画分に含まれるステロイド量はオのおの比色法⁶⁾及び酵素法⁷⁾によって求めた。酸性ステロイド (胆汁酸) 画分のシリカゲル薄層クロマトグラフィーは、プレートに既製のメルク製品、展開溶媒にシクロヘキサン/イソプロパノール/酢酸 (30:10:1) を用いて行った。中性ステロイド画分のガスクロマトグラフィーは、内部標準に5 α -コレステランを含む TMS 化標品について行った。胆汁酸の腸管吸収実験は [¹⁴C] タウロコール酸と成熟ラットの反転腸管 (長さ約 6 ~ 7 cm) を用い、グルコース含有 Dulbecco 培地中、O₂-CO₂ (95:5) 混合ガスを通気しながら 37°C に60分間実施した。なお、たん白質消化産物の影響をみる実験では、たん白質 1 g を 40 ml 溶液中でペプシン消化 (pH 2, 30°C, 一夜)、パンクレアチン消化 (pH 8, 30°C, 15時間) 後、その Spectra/Por 6 チューブを通過しない分子量1,000以上のペプチド (収量 24~36%) 50 mg を培地20 ml に加えた。

結果及び考察

Fig. 1 は各飼料群ラットの飼育期間中の体重変化を示したものである。血漿コレステロール値は食餌たん白質の違いだけでなく栄養状態によって大きく影響を

うけることがわかっている⁸⁾、実験に用いたたん白質のうち SPI と小麦グルテンにはそれぞれ制限アミノ酸補足によっていずれの飼料群共、順調な成育を示し、飼料摂取量及び飼料効率も B 群がやや低かった以外、A, C, D 群でほとんど違いは認められなかった (Fig. 2)。

Table 1 は3週間飼育後ラットの血漿、肝、小腸におけるコレステロールやトリグリセリド測定の結果をまとめたものである。血漿の総コレステロール値は、C 群で最も低く、次いで D 群、B 群又は A 群の順となったが、HDL-コレステロール値には4群間で有意な差異は認められなかった。肝コレステロール含量も植物たん白質投与 C, D 群でやや低い傾向を示したが、有意な差とは言えなかった。これに対し、小腸コレステロール含量は C 群よりむしろ A 群で低く、また血漿トリグリセリド値は B 群で低い値がえられた。

Fig. 3 は飼育期間中の糞中の酸性ステロイド (胆汁酸) 排泄量の変化を示したものである。市販固形飼料を摂取させた予備期間中、多量に排泄されていた糞中胆汁酸は食餌を所定の実験食に切換えると次第に減少する傾向を示したが、植物たん白質を投与した C, D 群では A 群や B 群に比べて高いレベルに維持されていた。飼育期間を通じてみられる糞中胆汁酸排泄量傾向は C > D > B > A の順であった。Fig. 4 はそのときの胆汁酸画分の TLC 分析パターンの一例である。A 群糞中にはコール酸、ケノデオキシコール酸など痕跡程度しか検出されなかったのに対し、C, D 両群の糞中には両化合物の存在がはっきりと認められた。

次に糞中の中性ステロイド排泄量の測定を試みた (Fig. 5)。飼育期間中の中性ステロイド排泄量の変化も胆汁酸排泄の場合と同じく初めに高く、次第に減少する傾向が示され、植物たん白質投与群で高いレベルに維持されていた。このときの中性ステロイド抽出画分の GLC 分析結果を Fig. 6 に示した。A, B 両群に対して植物たん白質を投与した C, D 群で保持時間40分以降に明らかな分離ピーク高の変化が生じ、コレステロール、コプロスタノール、コプロスタノン及びその他アナログの排泄量増加が認められた。

このようにして求めた糞中の酸・中性ステロイド排泄量とアテロゲニック・インデックスの関係を図示すると (Fig. 7)、糞中へ高いステロイド排泄量を与える食餌群ほど低いインデックスを示し、血漿コレステロール値が糞中ステロイド排泄量増減の影響をうけることが示唆された。我々は、先に、血漿コレステロール低下作用と消化産物中に残存する疎水性ペプチドの間にある種の関連が認められることを報告したが⁹⁾、疎水

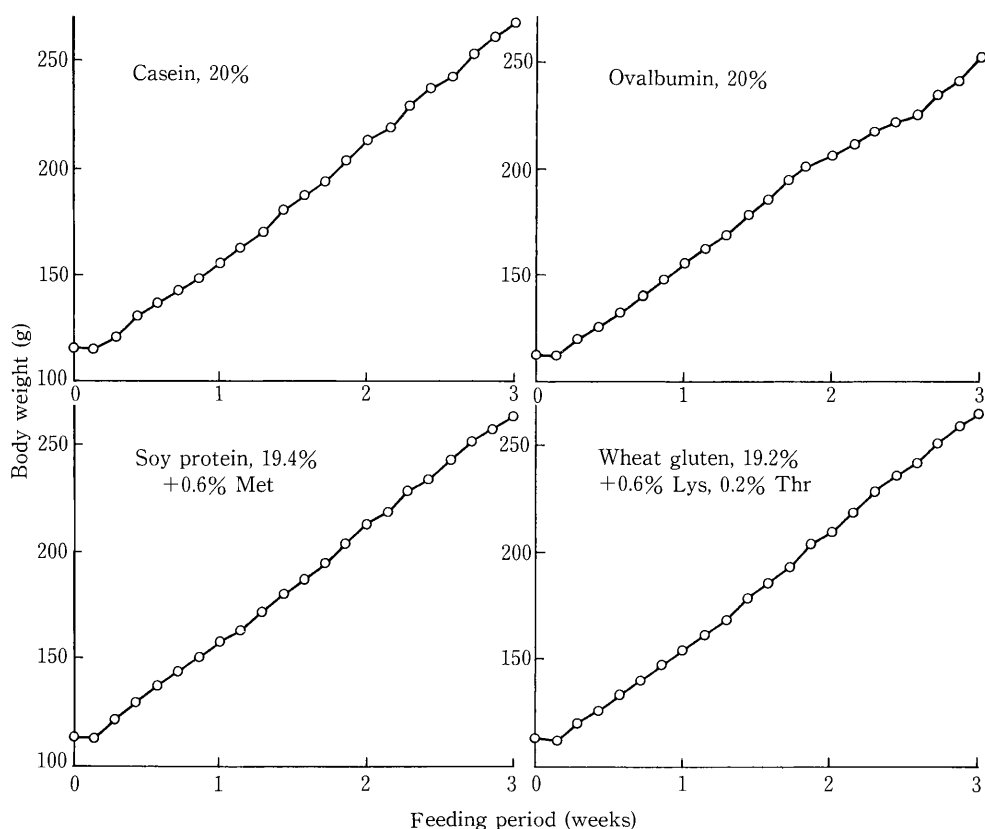


Fig. 1. Growth curves of rats fed various food proteins.

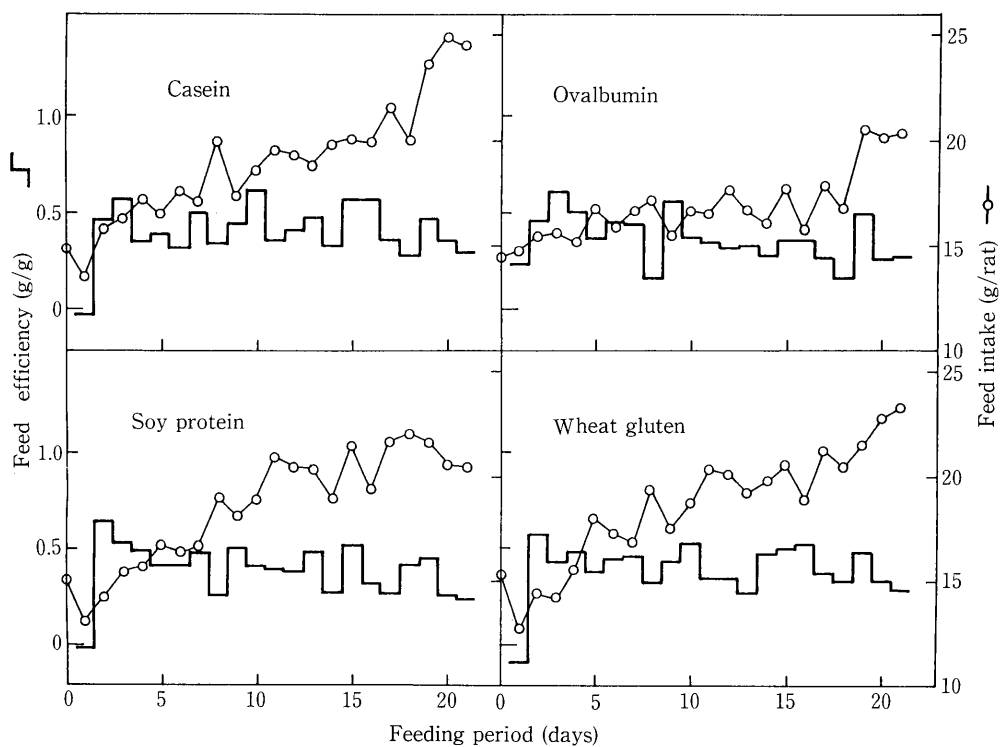


Fig. 2. Daily feed efficiency in rats fed different dietary proteins.

Table 1. Fat levels in plasma, liver and small intestine from rats fed different dietary proteins

	Dietary groups			
	Casein	Ovalbumin	Soy protein	Wheat gluten
Plasma levels (mg/100 ml)				
Glucose	103.1±1.8 ^a	103.4±4.4 ^a	107.3±3.0 ^a	107.7±5.9 ^a
Triglyceride	101.9±8.4 ^a	61.5±1.5 ^b	84.8±1.9 ^a	92.9±3.0 ^a
Cholesterol, total	55.3±3.8 ^a	53.2±2.3 ^a	43.7±2.6 ^b	46.1±3.6 ^{ab}
Cholesterol, HDL	36.1±4.0 ^a	35.5±2.6 ^a	38.5±1.4 ^a	37.4±1.0 ^a
Hepatic levels (mg/g)				
Lipid	76.7±3.9 ^a	62.7±3.0 ^a	72.4±2.6 ^a	86.1±5.9 ^a
Triglyceride	3.87±0.37 ^a	3.29±0.17 ^a	3.59±0.25 ^a	3.31±0.41 ^a
Cholesterol	1.54±0.07 ^a	1.42±0.05 ^a	1.38±0.06 ^a	1.31±0.09 ^a
Intestinal levels (mg/g)				
Lipid	68.7±5.4 ^{ab}	57.1±8.3 ^b	98.3±5.1 ^c	78.8±5.6 ^a
Cholesterol	1.11±0.08 ^a	1.59±0.06 ^b	1.92±0.07 ^c	1.59±0.10 ^b

Values (means±SE for 6~8 animals) not sharing a common superscript in the same row differ significantly at $p < 0.05$.

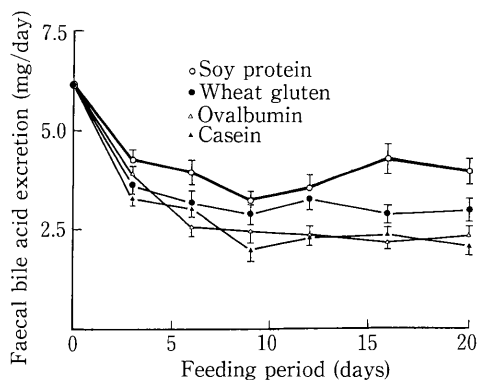


Fig. 3. Changes in faecal bile acid excretion during feeding period.

Bile acid was determined by using 3-hydroxysteroid dehydrogenase and NAD as previously described.⁷⁾

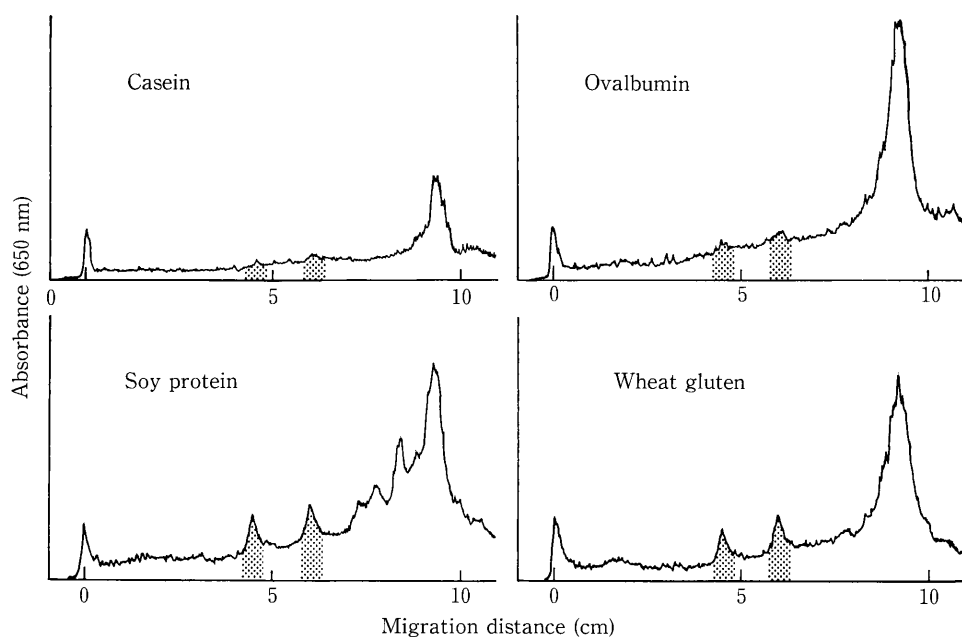


Fig. 4. A typical TLC pattern for bile acid fraction of the faeces. Analysis was carried out for the faeces on the 20th day. Spots on the chromatogram were visualized by spraying 10% molybdate in ethanol and recorded on a chart with a Shimadzu CS-900 apparatus.

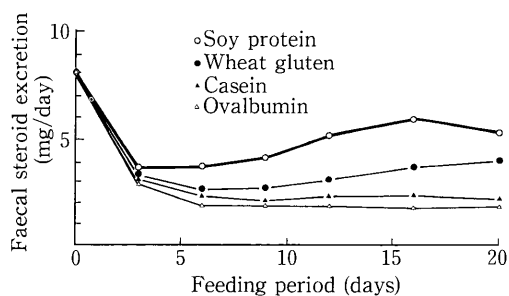


Fig. 5. Change in faecal neutral steroid excretion during feeding period. The amount of steroid excretion was measured by the digitonin- FeCl_3 method.⁶⁾

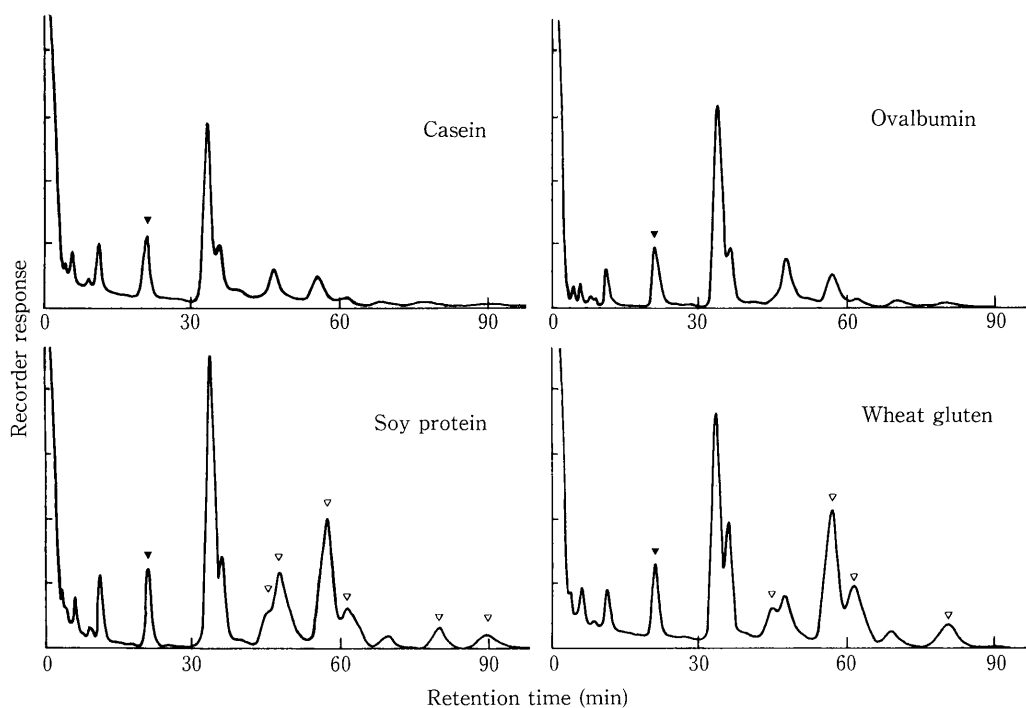


Fig. 6. A typical GLC pattern for neutral steroid fraction of the faeces.
The faeces on the 20th day were used for analysis. Analytical conditions were as follows : model, Shimadzu GC-48 with FID; column, $2.6\phi \times 2$ m glass capillary packed with OV-17/Chromosorb W; temp., 235°C ; ▼, internal standard (5α -cholestane); ▽, increased peaks in the faeces of rats receiving plant proteins.

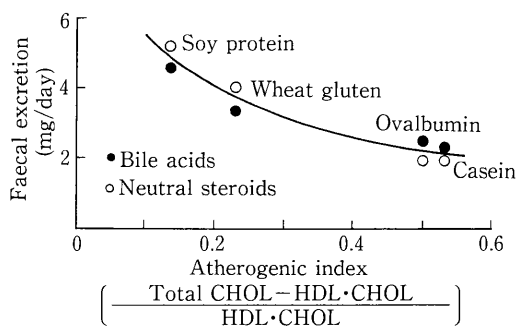


Fig. 7. A relationship between faecal steroid excretion and atherogenic index in rats fed different dietary proteins for 3 weeks.

性ペプチドが腸管内酸，中性ステロイドの再吸収を妨げ，以て糞中排泄量を増加させ，血中コレステロール値の低下の原因となったと解釈すると，前述の観察結果を旨く説明することができる。この仮定を確かめるためには，さらに消化産物が実際腸肝循環に影響を及ぼしているかどうかを示す必要がある。

そこで視点をかえて反転腸管による胆汁酸の吸収実験を行った。Fig. 8 はモデルに用いたタウロコール酸の吸収部位を定めるために行われた実験結果であるが，従来¹⁰⁾から言われている通り盲腸に近い回腸に限られた範囲にタウロコール酸を活発に取り込む部位のあることがわかった。この付近から1匹当たり2個の反転

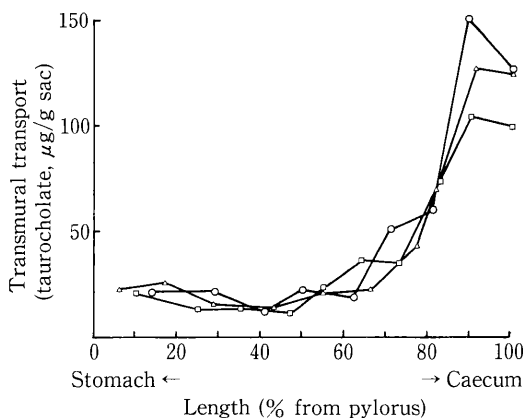


Fig. 8. Taurocholate absorption in every segment of rat small intestine. Each everted sac with length of 6~7 cm was incubated at 37°C for 60 min in the aerated Dulbecco medium containing 0.1% glucose and 1 mg% Na-taurocholate (0.8 μ Ci [14 C] taurocholate in 100 ml). Transmural transport was evaluated by radioactivity measurement of the fluid inside the sac (approximately 0.5 ml).

腸管を作成し，次の実験に供した。Fig. 9 は各種たん白質消化産物共存下で漿膜側に取り込まれた胆汁酸量を比較したものである。測定件数は6~9例，消化産物無添加の対照に比べ，SPI や小麦グルテン消化産物を共存させてもそれほど顕著な吸収阻害はみられなかった。これに対し，カゼイン消化産物共存下では，むしろ吸収促進的に作用する現象がみられた。In vivo 腸管において実際に腸肝循環が機能しているとき消化産物残渣が皆無という状態はありえないわけで，吸収促進か阻害かを相対的な尺度で比較するとカゼインと植物たん白質間の差はいっそう明瞭となる。他方，胆

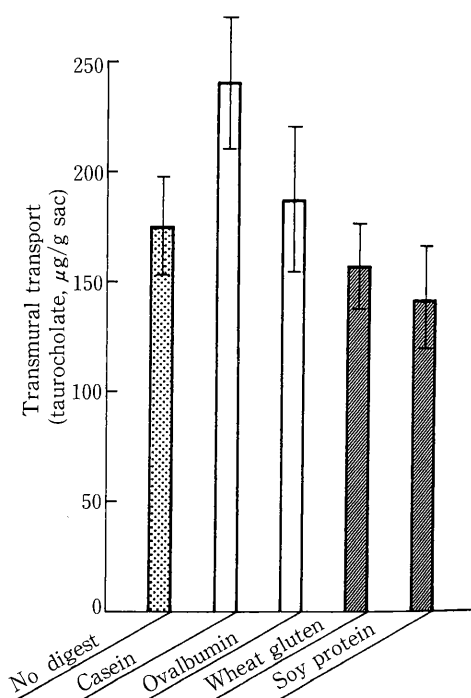


Fig. 9. Effects of protein digests on taurocholate absorption in rat ileum. The experimental conditions were the same as in Fig. 8, except that the everted sac was prepared from the limited part of the ileum near to the caecum and that the medium contained 2.5 mg/ml peptic-pancreatic digest with molecular weight of more than 1,000.

汁成分として分泌された胆汁酸が腸内フローラの作用により様々に変化することはよく知られており¹¹⁾，今後腸肝循環に及ぼす食餌たん白質の影響を論ずるにあたっては，微生物変換の効果も考慮に入れるべきかもしれない。

文 献

- 1) Carroll, K. K. and Hamilton, R. M. G. (1975): Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. *J. Food Sci.*, **40**, 18-23.
- 2) Krichevsky, D. (1979): Vegetable protein and atherosclerosis. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 135-140.
- 3) Terpstra, A.H.M., Tintelen, G. and West, C. E. (1982): The hypocholesterolemic effect of dietary soy protein in rats. *J. Nutr.*, **112**, 810-817.
- 4) Sugano, M. (1983): Hypocholesterolemic effect

- of plant protein in relation to animal protein : mechanism of action, in “ Animal and Vegetable Proteins in Lipid Metabolism and Atherosclerosis ”, ed. by Gibney, M. J. and Krichevsky, D., Alan R. Liss Inc., New York, pp. 51-84.
- 5) Manual of Laboratory Operations (1974): Lipid and lipoprotein analysis, in “ Lipid Research Clinics Program ”, Vol. 1, National Heart and Lung Institute, NIH, Bethesda.
 - 6) 藤野安彦 (1978) : 脂質分析法入門, 学会出版センター, pp. 141-142.
 - 7) Sheltawy, M. J. and Losowsky, M. S. (1975) : Determination of faecal bile acids by an enzymatic method. *Clin. Chim. Acta*, **64**, 127-132.
 - 8) 藤多淑子, 村上安子, 林 伸一 (1983) : 分離大豆たん白質による血漿コレステロール低下作用の機序. 大豆たん白質栄養研究会会誌, 4, 85-88.
 - 9) Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F. (1986) : Involvement of post-digestion ‘ hydrophobic ’ peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217-1222.
 - 10) Lack, L. and Weiner, I. M. (1961) : In vitro absorption of bile salts by small intestine of rats and guinea pig. *Am. J. Physiol.*, **200**, 313-317.
 - 11) Hylemon, P. B. (1985) : Metabolism of bile acids in intestinal microflora, in “ Sterols and Bile Acids ”, ed. by Danielsson, H., and Sjövall, J., Elsevier, Amsterdam, pp. 331-342.