

ステロイド排泄に及ぼす食餌たん白質の効果とその動物種差

SPECIES DIFFERENCE IN THE EFFECT OF DIETARY PROTEINS ON STEROID EXCRETION

林 伸一・上村美和子・内藤真理子・山下洵子・山崎孝一（東京慈恵会医科大学）

Shin-ichi HAYASHI, Miwako KAMIMURA, Mariko NAITO, Junko YAMASHITA and Koichi YAMAZAKI

Department of Nutrition, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105

ABSTRACT

Rate of fecal steroid excretion was determined in rats and mice by infusing $[4-^{14}\text{C}]$ cholesterol into stomach and then measuring radioactivity in total, neutral and acidic steroids extracted from feces collected for up to 4 days after infusion. In male Sprague-Dawley rats feeding casein diet for 3 weeks caused an increase in plasma cholesterol level and a decrease in the rate of fecal steroid excretion compared with SPI diet. On the contrary, in both male and female ICR mice feeding casein or SPI diet resulted in similar plasma cholesterol level and similar rate of fecal steroid excretion. Thus, as far as the effects of dietary proteins concerned, there was a good correlation between their effects on lowering plasma cholesterol level and on stimulating fecal steroid excretion, suggesting that the hypocholesterolemic effect of soy protein observed in various animals including rabbits, pigs and rats is due to its effect to stimulate fecal steroid excretion. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **11**, 74-77, 1990.

大豆たん白質の降コレステロール効果の機序として糞へのステロイド排泄促進効果によるものとする考えが有力視されている¹⁻³⁾。私達はこれまでの研究で、カゼインに比して SPI はラットでは降コレステロール効果とともにステロイド排泄促進効果を示すのに対し、マウスではいずれの効果をもほとんど示さないことをみいだした⁴⁻⁸⁾。これを更に確かめるため、今回は $[^{14}\text{C}]$ コレステロール経口投与後の $[^{14}\text{C}]$ ステロイド排泄速度を指標として用い、ラットとマウスにおける食餌たん白質の効果と比較した。

実験方法

実験動物は日本生物材料センターから購入した

Sprague-Dawley 系の雄ラットと日本クレアから購入した ICR 系の雌および雄マウスを用いた。最初オリエンタル酵母社製の固型飼料 MF (chow) で予備飼育したのち、ラットは9週齢より、マウスは5週齢よりそれぞれ3週間実験飼料で飼育した。実験飼料の組成は既報⁹⁾の通りであり、ラットには低脂肪食を、マウスには高脂肪食を用いた。いずれもコレステロール非含有である。糞ステロイド排泄速度の測定はおおむね Borgström の方法⁹⁾に従った。すなわち、4時間絶食後、 $[4-^{14}\text{C}]$ コレステロール (NEN) を含むトリオレイン-脱脂粉乳濁液をラットには1.5 ml (0.75 μCi , 3.5 mg コレステロール)、マウスには0.2 ml (0.1 μCi , 0.5 mg コレステロール) エーテル麻酔下に胃内

注入し、その後個別ケージ内で1日あるいは2日間の糞を反復採集した。乾燥させた糞1g(不足の場合は全量)よりクロロホルム-メタノール等量混液で総ステロイドを抽出し、さらに中性および酸性ステロイドをUchidaらの方法¹⁰⁾に従って分画したのち、各画分の放射活性を測定した。総ステロイド画分の放射活性に対し、中性ならびに酸性ステロイド画分の放射活性の和、すなわち回収率はおおむね90~110%であった。血漿コレステロール濃度は既報⁴⁾に準じ、和光純薬の酵素測定試薬を用いて測定した。有意差検定はStudentのtテストによった。

結 果

まず、ラットの放射性ステロイド排泄速度に対する飼料たん白質の効果を検討した。[4-¹⁴C]コレステロール胃内注入後4日間の糞への放射性総ステロイド排泄量はFig.1のように分離大豆たん白質(SPI)飼料群では投与量の28±6%で市販固型飼料(chow)群と同程度であったが、カゼイン飼料群では11±4%と顕著に低値であった。カゼイン群はとくに中性ステロイド画分が少なかった。血漿コレステロール濃度は、カゼイン群はSPI群に比して有意に高値であった。Fig.2はラットにおける放射性ステロイド排泄の時間経過を示す。固型飼料群では1日目が最高で日を追って減少したが、半合成飼料群ではいずれも2日目が排泄のピークであって、やや遅延がみとめられた。また中性ステロイドの相対比はいずれの群においても1日目が最高で日を追って減少する傾向がみとめられ、3群のなかではカゼイン群において最低であった。いずれにせよ、カゼイン群のステロイド排泄速度は終始3群のなかで最低であった。以上の実験結果により、ラットではカゼインがSPIに比し糞ステロイド排泄速度を低下させることが確かめられた。

つぎに、ICR系雌マウスの糞ステロイド排泄速度と血漿コレステロール濃度に対する飼料たん白質の効果を検討した。放射性コレステロール経口投与後4日間の放射性ステロイド排泄量はカゼイン群ではSPI群との間に有意の差がなく固型飼料群よりも高値であって、ラットにおける結果と対照的であった。中酸性ステロイド分画比もカゼイン群とSPI群との間で差はなかった。また、血漿コレステロール濃度にも3群間で有意の差がなかった(Fig.3)。Fig.4はマウスにおける糞ステロイド排泄の時間経過を示す。いずれも1日目が最高で日を追って減少したが、カゼイン群とSPI群との間にまったく差がなく、いずれも固型飼料群に比べると初期においてとくに高値であった。

以上の実験では雄ラットと雌マウスを使用したもので、つぎに雄のICR系マウスを用いて検討した。Fig.5に示すように、雌の場合と本質的に同様であって、ステロイド排泄速度と血漿コレステロール濃度とのいずれにおいてもカゼイン群とSPI群との間に有意の差がみられなかった。したがって、問題は雌雄差ではなく動物種差であると考えられた。

考 察

今回は糞ステロイド排泄の指標として、放射性コレステロール経口投与後の放射性糞ステロイド排泄速度を用いた。糞の中性ステロイド/酸性ステロイドの放射活性比は投与後1日目にやや高いが、その後は一定

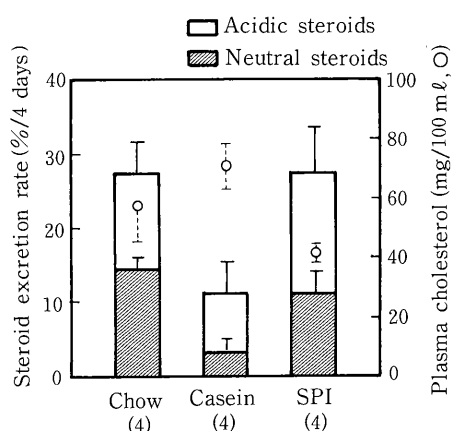


Fig. 1. Dietary effects on steroid excretion rates and plasma cholesterol level of rats. Values are means±SD for the number of animals shown in parentheses.

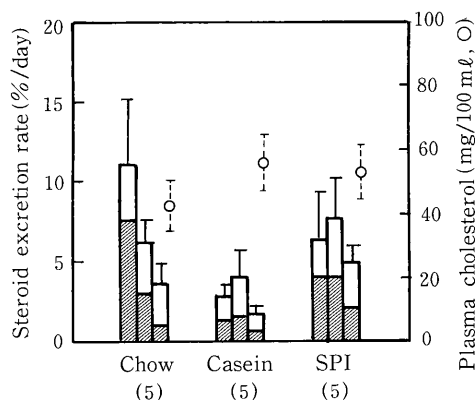


Fig. 2. Time course of steroid excretion from rats fed various diets. Values are means±SD for the number of animals shown in parentheses.

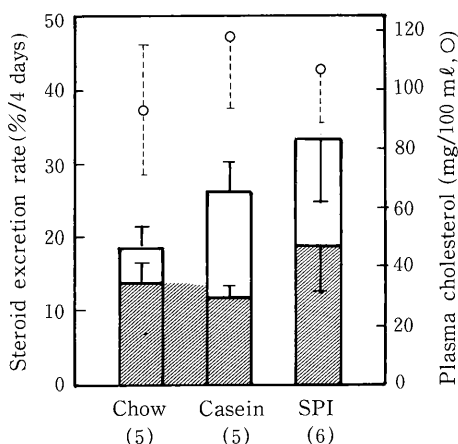


Fig. 3. Dietary effects on steroid excretion rates and plasma cholesterol level of mice. Values are means $\pm$ SD for the number of animals shown in parentheses.

であったことから、コレステロールの吸収は迅速で、さらに胆汁酸への変化と胆汁酸あるいはコレステロールとしての胆汁への分泌も迅速であることがわかった。したがって、本法は単なるコレステロール未吸収率ではなく、胆汁酸への変化と腸肝循環をふくめたトータルのコレステロール排泄率を表わすものと考えられる。

従来の糞ステロイド分析では、ガスクロマトグラフによる中性ステロイド分析、HPLC-固定化酵素カラム法による酸性ステロイド分析、酵素法による酸性ステロイド総量測定などを用いたが、いずれも内因性ステロイドの全量を把握することができず、また食餌由来ステロイドとの区別も不完全であった。今回用いた方法では、腸管内で生ずるすべての誘導体をふくめたトータルの排泄速度を把握できる点が特徴であり、私共の目的からみて信頼性の高い方法といえる。従来の結果では固型飼料群のステロイド排泄量は SPI 飼料群に比して高値であったが、今回の成績ではほぼ同程度(ラット)ないし低値(マウス)であることから、従来の固型飼料群の値には食餌由来のステロイドがかなり含まれていたのではないかと推測される。

今回の方法で測定したステロイド排泄率もラットでは SPI 飼料群がカゼイン群に比して顕著に高いのに対し、マウスでは差がみられなかった。一方、SPI の降コレステロール効果はラットで発現するがマウスでは発現しなかった。このように糞ステロイド排泄促進効果と降コレステロール効果がよく相関することは両者の間の因果関係の存在を強く示唆するものである。すなわちウサギ¹⁾、ブタ²⁾、ラット³⁾などでみられる大豆たん白質の降コレステロール効果は糞へのステロイド

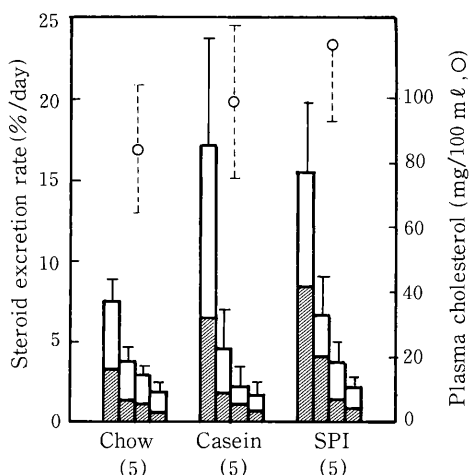


Fig. 4. Time course of steroid excretion from mice fed various diets. Values are means $\pm$ SD for the number of mice shown in parentheses.

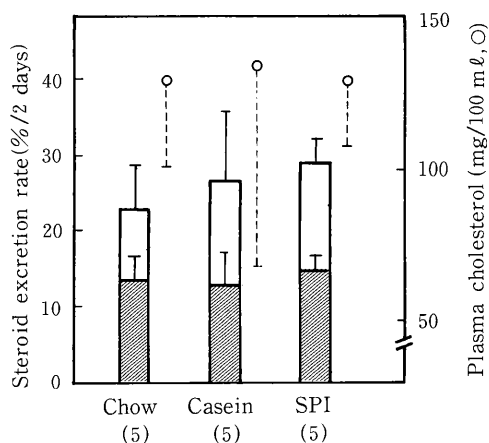


Fig. 5. Dietary effects on steroid excretion rates and plasma cholesterol level of male mice. Values are means $\pm$ SD for the number of animals shown in parentheses.

排泄促進にもとづくものであり、マウスで大豆たん白質群とカゼイン群で血漿コレステロール濃度に差がないのは糞ステロイド排泄に差がないためと考えられる。

マウスのなかでも系統による差がある可能性がある。従来、大豆たん白質の降コレステロール効果はマウスではまったく、あるいはわずかしきみられないという報告が多いが¹¹⁻¹³⁾、Nagata らは ddy マウスを用い比較的若い時期にはこれを見とめている¹⁴⁾。この時期の ddy マウスでは大豆たん白質がステロイド排泄を促進するのかもしれない。ddy をふくめ他系統のマウスについても検討をすすめる予定である。

文 献

- 1) 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.
- 2) Kim, D. N., Lee, K. T., Reiner, J. M. and Thomas, W. A. (1980) : Increased steroid excretion in swine fed high-fat, high-cholesterol diet with soy protein. *Exp. Mol. Pathol.*, **33**, 25-35.
- 3) Nagata, Y., Tanaka, K. and Sugano, M. (1981) : Further studies on the hypocholesterolaemic effect of soya-bean protein in the rats. *Br. J. Nutr.*, **45**, 233-241.
- 4) 山下洵子, 上村美和子, 林 伸一 (1987) : ステロール排泄に対する大豆たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 89-92.
- 5) 山下洵子, 上村美和子, 林 伸一 (1988) : マウスの血漿コレステロール濃度に対する食餌たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **9**, 82-85.
- 6) 山下洵子, 藤多淑子, 上村美和子, 林 伸一 (1989) : コレステロール代謝の動物種差と食餌たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **10**, 49-52.
- 7) Hayashi, S. (1988) : Effect of soy protein on fecal sterol excretion, in *Proceedings of the International Symposium on Soy Protein in Human Nutrition*, ed. by Inoue, G., The Research Committee of Soy Protein Nutrition (Japan), Osaka, pp. 165-172.
- 8) Yamashita, J., Fujita, Y., Kamimura, K. and Hayashi, S. (1990) : Different effects of soy protein on cholesterol metabolism in rats and mice, in *Monographs on Atherosclerosis Vol. 16 : Dietary Protein, Cholesterol Metabolism and Atherosclerosis*, ed. by Sugano, M. and Beynen, A. C., Karger, Basel. (in press)
- 9) Borgström, B. (1968) : Quantitative aspects of the intestinal absorption and metabolism of cholesterol and β -sitosterol in the rat. *J. Lipid Res.*, **9**, 473-481.
- 10) Uchida, K., Nomura, Y., Kadowaki, M., Takeuchi, N. and Yamamura, Y. (1977) : Effect of dietary cholesterol on cholesterol and bile acid metabolism. *Jpn. J. Pharmacol.*, **27**, 193-204.
- 11) Raheja, K. L. and Linscheer, W. G. (1982) : Comparative effects of soy and casein protein on plasma cholesterol concentrations. *Ann. Nutr. Metab.*, **26**, 44-49.
- 12) Weinaus, G. J. B. and Beynen, A. C. (1983) : Plasma cholesterol concentrations in mice fed cholesterol-rich, semipurified diets containing casein or soybean protein. *Nutr. Rep. Int.*, **28**, 1017-1027.
- 13) Roy, D. M. and Schneeman, B. O. (1981) : Effect of soy protein, casein and trypsin inhibitor on cholesterol, bile acids and pancreatic enzymes in mice. *J. Nutr.*, **111**, 878-885.
- 14) Nagata, Y., Tanaka, K. and Sugano, M. (1981) : Serum and liver cholesterol levels of rats and mice fed soy-bean protein or casein. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 583-593.