

## 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 (II)

### SPECIES DIFFERENCE IN THE EFFECT OF DIETARY PROTEINS ON STEROID EXCRETION (II)

林 伸一・上村美和子・高田真理子・山下洵子 (東京慈恵会医科大学)

Shin-ichi HAYASHI, Miwako KAMIMURA, Mariko TAKADA and Junko YAMASHITA

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

#### ABSTRACT

In continuation from last year's study, we compared the effects of soy protein isolate (SPI) and casein in cholesterol-enriched semisynthetic diets on fecal steroid excretion rates and plasma cholesterol level of rats, mice, and Syrian hamsters. In rats, compared with casein, SPI stimulated fecal steroid excretion rates, whereas no significant difference was observed between plasma cholesterol levels of SPI-fed and casein-fed groups. In male and female ICR, male *ddy* and male C57BL/J6 mice, compared with casein, SPI did not show any definite differential effect either on steroid excretion rates or plasma cholesterol level. In male Syrian hamsters, SPI clearly stimulated fecal steroid excretion rates and increased the amount of radioactivity remaining in the liver and blood plasma, although it did not exert any clear effect on plasma cholesterol level, indicating that dietary proteins markedly affect cholesterol metabolism in hamsters. In conclusion, fecal steroid excretion appears to be one of important factors that determine plasma cholesterol level and that the hypocholesterolemic effect of SPI in rats, and possibly hamsters, is due, at least in part, to its stimulatory effect on fecal steroid excretion. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 12, 44-47, 1991.

大豆たん白質を始めとする植物性たん白質はカゼインなどの動物性たん白質と比較して血漿コレステロール濃度を低下させる作用を有するが、その主要な機序として糞へのステロイド排泄促進作用が注目されている<sup>1-5)</sup>。昨年度研究で私達は糞へのステロイド排泄率の有効な指標として放射性コレステロール経口投与方法を用い、カゼインと比較して分離大豆たん白質 (SPI) がラットではステロイド排泄を促進するがマウスでは促進しないことを示し、SPI の降コレステロール効果はラットでは発現するがマウスでは発現しないことからステロイド排泄率が血漿コレステロール濃度を決定

する重要な因子であることをうらづけるものとして報告した<sup>6)</sup>。このような動物種差をさらに確かめる目的で、本年度は系を異にするマウスのほかハムスターをも用い、またコレステロール含有飼料を用いて検討した。

#### 実験方法

実験動物としては三協ラボサービスから購入したSD系の雄ラットと雄シリアンハムスター、および日本クレアから購入したICR系の雌および雄、*ddy*系の雄、およびC57BL/J6系の雄マウスを用いた。動物

はいずれも4週齢で購入し、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、5または7週齢より3-5週間実験飼料を自由摂食させ、ステロイド排泄率の測定を行ったのち屠殺した。実験飼料は既報<sup>7)</sup>の低脂肪 (LF) または高脂肪 (HF) 半合成飼料に1%コレステロール (C) または0.5%コレステロールと0.125%コール酸 (CC) を添加したものをを用いた。血漿コレステロール濃度<sup>7)</sup>と糞ステロイド排泄率<sup>8)</sup>はいずれも既報の方法で測定した。肝臓脂質の放射活性は肝1gを水でホモゲナイズしたのち60℃で乾燥し、クロロホルム-メタノール (1:1) で抽出した脂質分画について測定した。有意差検定は Student の t テストを行った。

## 結果と考察

昨年度研究ではコレステロール非含有飼料を用いたので、今年度はコレステロール含有飼料を用いて糞ステロイド排泄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。

まずラットでの成績を Table 1 に示す。低脂肪 (Exp. 1) と高脂肪 (Exp. 2) の半合成飼料に0.5%コレステロールと0.125%コール酸を加えたものをを用いた。いずれの場合にも、SPI 群ではカゼイン群に比して糞ステロイド排泄率が中性ステロイド、酸性ステロイドともに顕著に高値であり、昨年度研究結果と同様であった。一方、血漿コレステロール濃度はコレステロール添加飼料であるため市販固型食群に比して約2倍の高値を示したが、SPI 群とカゼイン群との間には有意の差がみられなかった。したがって、この条件下では

糞ステロイド排泄率以外の要因の方が血漿コレステロール濃度の決定に貢献したものと考えられる。

次にマウスについて検討した。昨年度研究では主として ICR 系の雌マウスを用いたので、今年度はその他に ICR 系の雄、および他の2系統の雄マウスを用いた。実験飼料としては、高脂肪飼料 (HF) に1%コレステロール (C)、あるいは0.5%コレステロールと0.125%コール酸 (CC) を添加したものをを用いた。結果をまとめて Table 2 に示す。

マウスではラットと異なり、コレステロール添加飼料の場合はステロイド排泄率が増加し、内訳をみるととくに中性ステロイド排泄率が高値であった。これは添加コレステロールのうち吸収されずに排泄される部分が大きいためと推定される。

SPI とカゼインの効果を比較すると、ICR 系雌 (Exp. 1) と ddy 系雄 (Exp. 3) では、いずれも糞ステロイド排泄率、血漿コレステロール濃度ともに差がなく、昨年度研究結果と同様であった。C57BL/J6 系雄マウス (Exp. 4) の場合は SPI 群のステロイド排泄率はわずかながら有意に低値を示し、血漿コレステロール濃度には差がなかった。一方、ICR 系雄マウス (Exp. 2) の場合は SPI 群の糞ステロイド排泄率はむしろ高値を示し、血漿コレステロール濃度も高値を示した。この実験では SPI 群の糞ステロイドのうち、とくに酸性ステロイド排泄率が高く、他の実験結果と矛盾しており、再験が必要と考えている。なお、ICR 系雄マウスでも、コレステロール非含有飼料の場合は SPI とカゼインとの間にステロイド排泄率、血漿コレステロールとも有意差はなかった (昨年度研究)。

Table 1. Effects of dietary proteins on plasma cholesterol level and fecal steroid excretion rates in rats fed cholesterol-containing diets

| Diet            | Plasma<br>cholesterol | Fecal steroid excretion rates |                     |                    |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|
|                 |                       | Total<br>steroids             | Neutral<br>steroids | Acidic<br>steroids |
| (Exp. 1, n=4-5) | mg/100 mL             |                               | percent/2 days      |                    |
| Chow            | 58±8                  | 19.1±5.4                      | 13.9±0.2            | 5.6±1.8            |
| LF-CC-casein    | 129±34                | 7.1±0.6                       | 3.0±1.3             | 3.7±0.9            |
| LF-CC-SPI       | 94±14                 | 15.2±4.5**                    | 6.1±3.4             | 8.3±3.1*           |
| (Exp. 2, n=6)   |                       |                               | percent/3 days      |                    |
| HF-CC-casein    | 113±36                | 7.1±0.5                       | 2.8±0.4             | 4.8±0.7            |
| HF-CC-SPI       | 106±14                | 16.9±3.6**                    | 7.1±2.3**           | 10.7±3.4**         |

In Exp. 1, male SD rats were fed experimental diets for 3 weeks before sacrifice at the age of 12 weeks. In Exp. 2, male SD rats were fed experimental diets for 5 weeks before sacrifice at the age of 12 weeks. Values are means±SD \*Significantly different from casein ( $p<0.025$ ). \*\*Significantly different from casein ( $p<0.005$ ).

Table 2. Effects of dietary proteins on plasma cholesterol level and steroid excretion rates of various strains of mice fed cholesterol-containing diets

| Diet            | Plasma<br>cholesterol | Fecal steroid excretion rates |                       |                 |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------|
|                 |                       | Total steroids                | Neutral steroids      | Acidic steroids |
| (Exp. 1, n=5)   | <i>mg/100 mL</i>      |                               | <i>percent/2 days</i> |                 |
| Chow            | 89± 8                 | 17.2± 4.4                     | 7.8±0.9               | 9.0±2.4         |
| HF-C-casein     | 156±34                | 44.8±10.5                     | 34.6±8.9              | 11.8±1.8        |
| HF-C-SPI        | 147±32                | 50.9± 6.0                     | 32.7±8.2              | 13.8±1.8        |
| (Exp. 2, n=4-5) |                       |                               | <i>percent/3 days</i> |                 |
| HF-CC-casein    | 127±12                | 32.1± 9.8                     | 20.8±7.5              | 13.9±3.4        |
| HF-CC-SPI       | 151±15*               | 52.3±14.4*                    | 24.0±5.0              | 32.5±9.2**      |
| (Exp. 3, n=5-6) |                       |                               | <i>percent/2 days</i> |                 |
| Chow            | 122±32                | 17.7± 3.6                     | 7.4±2.0               | 9.4±3.4         |
| HF-CC-casein    | 157±19                | 32.6± 6.8                     | 23.6±8.4              | 9.5±3.9         |
| HF-CC-SPI       | 181±30                | 40.9±10.2                     | 27.4±7.2              | 13.6±7.0        |
| (Exp. 4, n=5-6) |                       |                               | <i>percent/2 days</i> |                 |
| Chow            | 82±13                 | 25.7± 3.5                     | 18.9±3.3              | 7.4±1.7         |
| HF-CC-casein    | 114± 6                | 55.1±10.2                     | 44.4±9.6              | 9.3±3.6         |
| HF-CC-SPI       | 122±36                | 37.6±10.4*                    | 27.6±9.7*             | 10.2±9.9        |

Mice were fed experimental diet for 3 weeks before sacrifice at the age of 8 weeks, except for Exp. 2 in which mice were fed experimental diet for 5 weeks before sacrifice at the age of 12 weeks. Exp. 1, female ICR; Exp. 2, male ICR; Exp. 3, male ddy; Exp. 4, male C57BL/J6. Values are means±SD  
 \*Significantly different from casein ( $p<0.05$ ). \*\*Significantly different from casein ( $p<0.005$ ).

Table 3. Effects of dietary proteins on the growth and cholesterol metabolism in male Syrian hamsters fed cholesterol-containing high-fat semisynthetic diets

|                                        | HF-CC-casein | HF-CC-SPI   |
|----------------------------------------|--------------|-------------|
| Body weight,                           | 108±6        | 129±4**     |
| Liver weight, <i>g</i>                 | 6.4±0.4      | 7.6±0.5**   |
| Feces dried, <i>g/3 days</i>           | 1.02±0.16    | 1.31±0.13** |
| Plasma cholesterol, <i>mg/100 mL</i>   | 264±65       | 298±46      |
| Plasma RA, <i>dpm/mL</i>               | 106±29       | 248±55**    |
| Liver lipid RA, <i>percent of dose</i> | 12.2±2.5     | 28.9±8.9**  |
| Fecal steroids, <i>percent/3 days</i>  |              |             |
| Total steroids                         | 6.9±1.2      | 14.9±5.2**  |
| Neutral steroids                       | 3.7±1.1      | 9.4±3.4**   |
| Acidic steroids                        | 3.4±0.6      | 5.9±2.0*    |

Male Syrian hamsters were fed experimental diets for 5 weeks before sacrifice at the age of 12 weeks. Values are means±SD for 6 animals. RA, radioactivity. \* Significantly different from casein ( $p<0.01$ ). \*\*Significantly different from casein ( $p<0.005$ ).

以上、一、二の例外を除き、マウスではコレステロール添加の有無、性差、系統差にかかわらず、SPI とカゼインはステロイド排泄率に対して異なる効果を示さず、また血漿コレステロール濃度に対しても同様であった。これはラットとの大きな相違であり、糞ステロイド排泄率が血漿コレステロールの重要な要因のひとつ

であることを示唆するものと考えている。

次にシリアンハムスターについて検討した。7週齢の時点から5週間にわたってコレステロール(0.5%)とコール酸(0.125%)を含む高脂肪飼料を自由に摂取させたのち、実験に供した。Table 3 に示すように、カゼイン飼料群は SPI 飼料群に比べて成長抑制が顕

著であった。また、いずれの場合も低脂肪飼料群（未発表）に比較すると著しく成長が抑制されていた。糞へのステロイド排泄率は中性ステロイド、酸性ステロイドとも SPI 群の方が顕著に高く、ラットと同様であった。一方、血漿コレステロール濃度は両群とも非常に高値を示したが両群の間には有意の差がなかった。ハムスターについては、最近低脂肪飼料を用いコレステロール添加の有無にかかわらず SPI はカゼインに比して降コレステロール効果を示すことが報告された<sup>8)</sup>。低脂肪の条件下に糞ステロイド排泄に与える効果を現在検討中である。Table 3 に示すように、血漿中の放射活性および肝臓脂肪中の放射活性ともに SPI 群は 2 倍以上の高値を示した。このことは血漿や肝臓におけるコレステロールの入れ替わり（ターンオーバー）が SPI 群では抑制されていることを示唆する。糞へのステロイド排泄率が SPI 群で促進されていることと考えあわせると、肝臓から全身組織へのコレステロール移行が SPI 群で抑制されているのではないかと推測される。いずれにせよ、ハムスターでは飼料たん白質がコレステロール代謝に顕著な影響を及ぼすことが判ったので、今後その実態と機序の解析をすすめたい。

## 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 hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in the rats. *Br. J. Nutr.*, **45**, 233-241.
- 4) Yamashita, J., Fujita, Y., Kamimura, M. and Hayashi, S. (1990): Different effects of soy protein on cholesterol metabolism in rats and mice. in *Dietary Proteins, Cholesterol Metabolism and Atherosclerosis*. Monogr. Atheroscler., ed. by Sugano, M. and Beynen, A. C., Karger, Basel, pp. 36-43.
- 5) Yamashita, J. and Hayashi, S. (1990): The effect of dietary protein source on plasma cholesterol level and fecal steroid excretion in obese mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **36**, 545-558.
- 6) 林 伸一, 上村美和子, 内藤真理子, 山下洵子, 山崎孝一 (1990): 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. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 74-77.
- 7) 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.
- 8) Terpstra, A. H. M., Holmes, J. C. and Nicolosi, R. J. (1991): The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. *J. Nutr.*, **121**, 944-947.