

## SPT-5（大豆たん白質ペプチド）投与時の血漿中遊離及びペプチド態アミノ酸について

CHANGES IN FREE AND PEPTIDE-FORM AMINO ACIDS IN PLASMA AFTER ADMINISTRATION OF SPI HYDROLYZATE (SPT-5)

新山喜昭・真鍋祐之（徳島大学医学部）

Yoshiaki NIIYAMA and Sachinobu MANABE

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

### ABSTRACT

Changes in levels of free and peptide-form amino acids in plasma were investigated in SPT-5 bolus-fed rats and compared with the previous results in meal-fed rats. Male Sprague-Dawley young adult rats (about 270 g) were starved for 11 hours and then were bolus-fed a liquid diet containing 2 g of SPT-5 at 10 : 00. After feeding, concentration of free amino acids increased immediately with a peak at 1 hour and decreased to fasting level within 3 to 5 hours. This finding was similar to the result in meal-feeding. On the other hand, concentrations of peptide-form amino acids, particularly of Asp, Glu and Ala, were decreased significantly for 2 to 5 hours after feeding and then restored to fasting level. Changes in amino acid patterns of free and peptide-form amino acids after feeding did not reflect the composition of dietary SPT-5. Average peptide chain length decreased significantly 1 hour after the feeding and kept small for 5 hours. These results indicated that a large amount of ingested oligopeptides entered into blood stream as free form of amino acids, not peptide form of amino acids. Present and previous results also showed that comparable amounts of endogenous oligopeptide to amounts of free amino acids existed constantly in plasma and various tissues. Further studies are required to elucidate origin, fates and significance of oligopeptides in plasma. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **12**, 95-98, 1991.

昨年度我々は、大豆たん白質由来のペプチド（SPT-5）を窒素源とした食餌を meal-fed したラットの血中遊離及びペプチド態アミノ酸の経時的变化を検討し、オリゴペプチドが空腹時にもかなり存在し、かつ食餌に影響されず、濃度がほぼ一定であることを明らかにした<sup>1)</sup>。

そこで今回は、血中オリゴペプチドの常在性を確認し、さらに SPT-5 を含む食餌を bolus-fed した動物の血中遊離及びペプチド態アミノ酸濃度の経時变化を

24時間にわたり検討した。

### 実 験 方 法

#### 実験 1

実験動物における SPT-5 投与時の血中遊離及びペプチド態アミノ酸の経時变化

体重約270 g の SD 系雄ラット（日本 SLC）を約11時間絶食後、SPT-5 2 g（meal-fed 時の摂取量とほぼ同量） と他の栄養素を含む液状飼料（約5 mL）を

bolus-fed した (10:00)。食餌投与前空腹時 (9:00) 及び bolus-feeding 終了 1, 2, 3, 5, 8, 12 及び 24 時間後に尾静脈より採血した (約 300  $\mu$ L/回)。遠心分離 (10,000 rpm, 5 分) 後、得られた血漿 100  $\mu$ L に除たん白剤として 10% スルホサリチル酸 (SSA) 溶液 50  $\mu$ L を加えて混和し、4  $^{\circ}$ C で一晚放置した。これを遠心分離 (15,000 rpm, 10 分) し、得られた除たん白上清について、遊離及び総アミノ酸 (6 N HCl, 110  $^{\circ}$ C, 24 時間加水分解試料) 及び平均ペプチド鎖長の測定を行った。

## 実験 2

### ヒトにおける食事摂取後の血中遊離及びペプチド態アミノ酸の経時変化

平均年齢 22 歳の男子学生 3 名 (平均体重 65.7 kg) に、6 時間の絶食後、エネルギー 992 kcal, たん白質 36.6 g, 脂肪 51.1 g を含む食事を与えた。食事摂取 1 時間前、及び摂取 1, 2, 3, 5, 8, 12, 18 及び 24 時間後に採血した (約 4 mL/回)。遠心分離 (3,000 rpm, 10 分) 後、得られた血漿を実験 1 と同様に処理して分析試料とした。

なお遊離及び総アミノ酸は、アミノ酸自動分析計 (IRICA A-8700) を用いて定量し、総アミノ酸と遊離アミノ酸の差をペプチド態アミノ酸 (オリゴペプチド

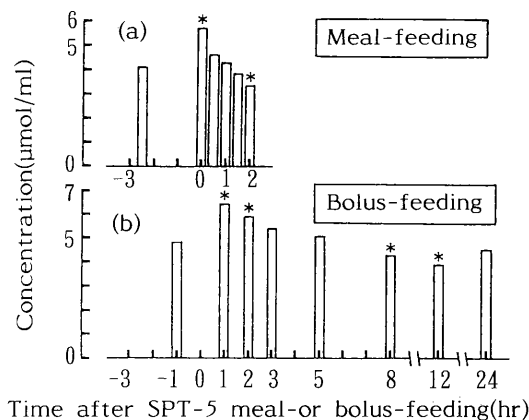


Fig. 1. Change in free amino acids in plasma after SPT-5 administration. \*:  $p < 0.05$  to free AAs in plasma sample from 22 (a) or 11 (b) hr-starved rats.

由来アミノ酸) とした。また除たん白上清中に存在するペプチドの平均鎖長は、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法<sup>2)</sup>により求めた。

## 結 果

### 実験 1

#### ラットにおける SPT-5 摂取後の血中遊離及びペプチド態アミノ酸の経時変化

SPT-5 食を bolus-fed した後の血清遊離アミノ酸濃度の経時変化を、昨年度の meal-fed の結果と併せて Fig. 1 に示した。meal-feeding (a) あるいは bolus-feeding (b) のどちらの食餌投与法においてもほぼ同様の経時変化を示した。即ち、空腹時に比し食餌投与後

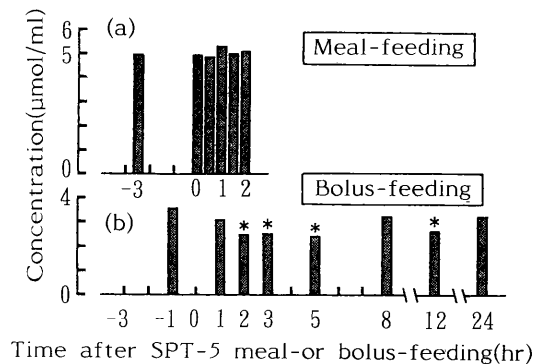


Fig. 2. Change in peptide-form amino acids in plasma after SPT-5 administration. \*:  $p < 0.05$  to peptide-form AAs in plasma sample from 22 (a) or 11 (b) hr-starved rats.

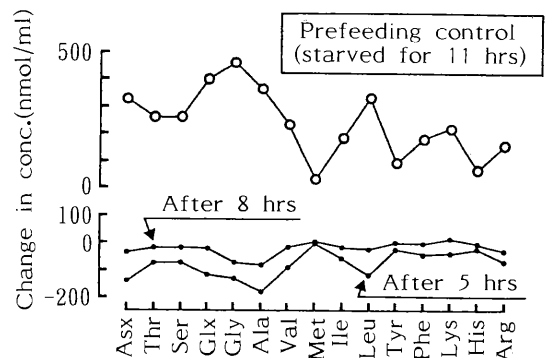


Fig. 3. Change in peptide-form amino acids after SPT-5 bolus-feeding.

に有意に上昇して約1時間でピークに達し、以後経時的に低下して投与後3～5時間で空腹時レベルあるいはそれ以下にまで低下した。しかしその変化は、食餌中ペプチドのアミノ酸組成を反映していなかった。

一方ペプチド態アミノ酸は、Fig. 2 に示したように、どちらの投与法によっても前述の遊離アミノ酸でみられたような投与後の濃度上昇はなかった。即ち meal-feeding では、Fig. 2(a)に示したように空腹時レベルを維持し、一方 bolus-feeding では、Fig. 2(b)に示したように投与後2～5時間で低下がみられた。SPT-5 食投与 (bolus-fed) 前空腹時のペプチド態各アミノ酸濃度

(Fig. 3 の上) とそれに対する投与後5 (濃度変化最大) 及び8時間 (最小) 後の濃度変化 (Fig. 3 の下) をそれぞれ図示した。投与5時間目では比較的大きな変化を示し、特に Asp 及び Asn, Glu 及び Gln, Gly 及び Ala の変化は大であった。しかしこれらの変化は投与オリゴペプチドの組成を反映してはおらず、またその変化は時間経過とともに小さくなった。この間の血漿中オリゴペプチドの平均鎖長を Table 1 に示した。SPT-5 (平均鎖長3.3) を摂取した結果、ペプチド平均鎖長は空腹時の2.8から食後3～5時間まで1.6～2.1と有意に低下し、以後再び空腹時レベルに戻った。こ

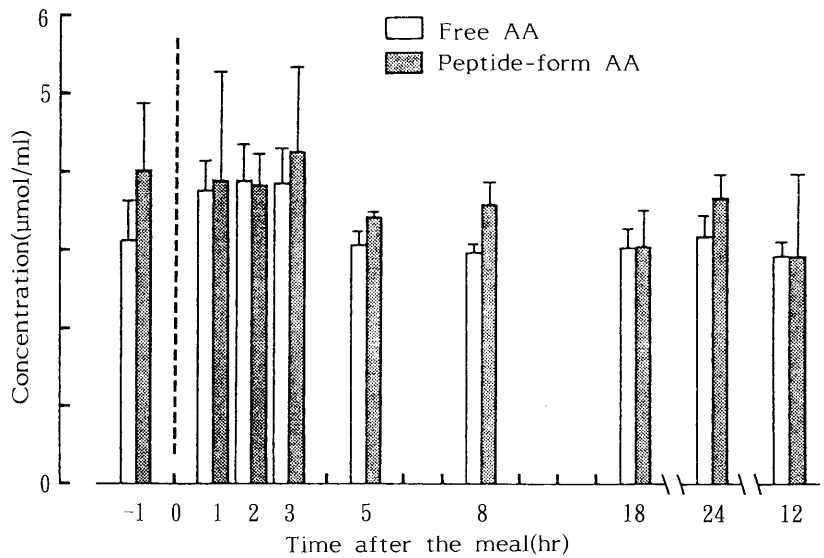


Fig. 4. Changes in free and peptide-form amino acids in plasma after the meal (human).

| Table 1. Peptide chain length <sup>1</sup> |            |
|--------------------------------------------|------------|
| Time                                       | Av. length |
| -1                                         | 2.8±0.5    |
| 1                                          | 1.7±0.7*   |
| 2                                          | 1.6±0.5*   |
| 3                                          | 1.8±0.3*   |
| 5                                          | 2.1±0.2*   |
| 8                                          | 3.5±1.1    |
| 12                                         | 2.8±0.6    |
| 24                                         | 2.8±0.7    |

n=6 to 7. <sup>1</sup>: Measured by TNBS method. \*: p<0.05 to value from starved rats.

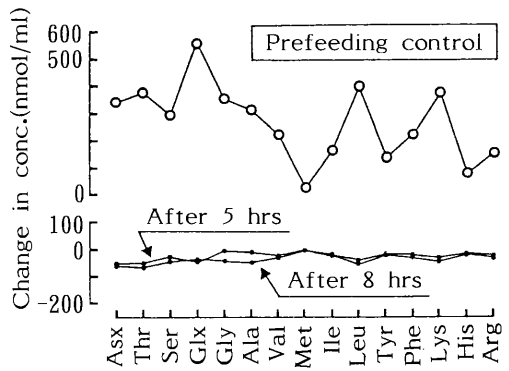


Fig. 5. Change in peptide-form amino acids after the meal (human).

Table 2. Peptide chain length<sup>1</sup> (human)

| Time | Av. length |
|------|------------|
| -1   | 4.1±1.5    |
| 1    | 2.7±0.9    |
| 2    | 2.5±0.1    |
| 3    | 2.5±0.4    |
| 5    | 2.8±0.1    |
| 8    | 3.3±0.8    |
| 12   | 2.7±0.1    |
| 18   | 3.3±0.3    |
| 24   | 2.6±0.5    |

n=2 to 3. <sup>1</sup>: Measured by TNBS method.

のようにオリゴペプチド摂取により鎖長の低下傾向がみられたものの、ペプチド鎖長が2以下になることは理論的に考えられないので、この点については今後十分検討を加える必要があると考えている。

## 実験2

### ヒトにおける食事後の血中遊離及びペプチド態アミノ酸の経時変化

食後の血漿遊離及びペプチド態アミノ酸濃度の経時変化を Fig. 4 に示した。遊離アミノ酸は食後2時間目をピークとし、以後減少するという変化を示したものの、空腹時に対する変化は有意ではなかった。一方ペプチド態アミノ酸は、実験1の meal-fed したラットの場合と同様はば一定の濃度を維持していた。

またペプチド態各アミノ酸の空腹時濃度とそれに対する食後5及び8時間目の濃度変化を Fig. 5 に示したが、bolus-fed したラットの場合と異なりその変動は比較的小さかった。この時の平均ペプチド鎖長も、Table 2 に示したように、空腹時の4.1から食後数時間は2.5~2.8と低下傾向があるものの、24時間にわたり有意な変化は示さなかった。

## 考 察

今回我々は、bolus-feeding 法による食餌投与前後の

血中遊離及びペプチド態アミノ酸の経時変化を検討し、昨年の meal-feeding 法との比較を行った。その結果、Figs. 1 及び 2 に示したように、遊離アミノ酸濃度は食餌投与法に関係なく食後数時間目をピークとする有意な変化を示したが、ペプチド態アミノ酸は時間に関係なくほぼ一定濃度を示し、また常時、血中にかなりの量存在することが明らかとなった。このことは、比較的大量に摂取されたオリゴペプチドが血流に入る前に消化管腔内あるいは小腸上皮細胞内で速やかにアミノ酸にまで分解された結果と考えられる。一方ペプチド態アミノ酸が遊離アミノ酸に匹敵する濃度で存在することについての解釈は難しいが、TNBS 法によるペプチド鎖長測定結果から推察すると、血清の除たん白操作中に大きなペプチドが、除たん白上清中に紛れ込んで contamination をおこしたためという可能性は除外される。本来存在する内因性ペプチドと食餌由来のペプチドとがバランスよく入れ替わり、その結果血中濃度が一定に維持されているのか、さらに turnover time の非常に短いオリゴペプチドが、一定量かつ多量に存在している機構やその意義はなにかについて今後明らかにしたい。また今回、ヒトを用いた同種実験を行ったが、動物の場合とは異なり、Fig. 4 に示したように遊離及びペプチド態アミノ酸ともに有意な変化はみられなかった。これは食事組成の違いによるとも考えられるが、例数が少なく個体差も大きいので、今後例数を多くしてさらに十分な検討を加えたいと考えている。

## 文 献

- 1) 新山喜昭, 真鍋祐之 (1990): 経腸及び中心静脈栄養への SPT-5 (大豆ペプチド) の利用. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 104-107.
- 2) Habeeb, A, F, S, A. (1966): Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal. Biochem.*, **14**, 328-336.