

肝障害ラットの血中アンモニア及び遊離アミノ酸に及ぼす大豆たん白質の効果

EFFECT OF SOY PROTEIN DIET ON PLASMA AMMONIA AND FREE AMINO ACIDS IN PORTACAVAL SHUNTED RATS

木戸康博・多田文子・志塚ふじ子・岸 恭一 (徳島大学医学部)

Yasuhiro KIDO, Fumiko TADA, Fujiko SHIZUKA and Kyoichi KISHI
Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

ABSTRACT

In the previous report (1989) we showed that soy protein isolate (SPI) was superior to casein supplemented with 1.5% methionine (relative to crude protein) at 40 (N×6.25)% protein level in adult rats with portacaval anastomosis (PCA rats). Furthermore, free methionine concentration in plasma and brain of PCA rats remarkably increased in casein group but not in SPI group. In the present study, therefore, the effects of dietary methionine and cystine on tissue free amino acids (experiment 1) and brain monoamine metabolites (experiment 2) were studied in PCA rats fed 40% protein diets. Supplementation of methionine to SPI did not increase tissue methionine concentration even though dietary methionine level was similar to 1.5% methionine supplemented casein. Supplementation of cystine to methionine supplemented casein maintained tissue sulfur amino acid concentrations within normal range. It was suggested that abnormally high ratio of methionine to cystine (about 9) resulted in marked increase of tissue methionine concentration. In the second experiment, the metabolites of dopamine and serotonin in dialysates of the striatum in the brain were not influenced by hyperammonemia or hypermethioninemia in PCA rats. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn. 12*, 114-120, 1991.

肝炎の急性期や脂肪肝などの例外を除いて、一般に肝疾患に対する食事療法の基本は、古くから高エネルギー・高ビタミン・高たん白質食とされている¹⁾。しかし、肝硬変のような門脈・大静脈短絡のある患者では、高たん白質食、とくに肉たん白質食は肝性脳症を惹起する危険性が高く²⁾、十分にたん白質を与えることが困難である。肝硬変症の食事療法において、植物性たん白質の有用性が報告されている³⁾。その理由としていくつか考えられているが、その一つは肝硬変症時の血漿アミノ酸パターンの異常を是正することによるものである。肝硬変患者では、分枝鎖アミノ酸濃度の低

下、芳香族アミノ酸やメチオニン濃度の上昇といった血漿遊離アミノ酸パターンの異常が見られるので⁴⁾、食事たん白質としては分枝鎖アミノ酸/芳香族アミノ酸比が高く、メチオニン量は少ないものが望ましい。植物性たん白質、なかでも大豆たん白質はメチオニンが少なく、またアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸などのアンモニア産生能の低いアミノ酸⁵⁾が多く、これが肝性脳症の発現の低下に寄与していると考えられる。

一昨年の本研究会において我々は⁶⁾、高アンモニア血症を呈し、肝硬変症のモデルとなっている門脈・下

大静脈吻合 (PCA) ラットを用いて⁷⁾, 分離大豆たん白質 (SPI) の栄養効果を1.5% メチオニン添加カゼインを対照として比較した。その結果, 体重増加および窒素出納よりみた肝障害ラットに対する SPI の栄養価は, 10% たん白質レベルではカゼインに劣るが, 20% レベルでは同等であり, 40% になるとカゼインよりも優れていた。このように, 従来報告されていた肝障害における SPI の有用性が高たん白質レベルにおいて確かめられたわけである。その他の特異的な所見として, 血漿メチオニン濃度の変化があった。SPI の場合は, いずれのたん白質レベルにおいても, PCA 群と偽手術群の間に血漿メチオニン濃度の差はなかったのに対し, カゼイン群においては, 20% たん白質レベルでは偽手術群との間に差が見られなかったものの, 40% に上げると PCA ラットの血漿メチオニン濃度は偽手術群の約8倍と異常に高値を示した。また脳においても, SPI 群では PCA ラットと偽手術ラットの間にメチオニン濃度の差はなかったが, カゼイン群では偽手術ラットの5倍以上に上昇していた。高カゼイン食にみられたこのような組織メチオニン濃度の著明な上昇は, 飼料中のメチオニン濃度が高いことが一因であると考えられる。しかしカゼインに加えたメチオニンの量は通常の補足量の1.5% (N×6.25に対し)に過ぎず, 実際 PCA ラットでも10% および20% たん白質食では著しい高値を示さず偽手術ラットでは40%たん白質レベルでも正常範囲内にあった。

そこで今回はたん白質レベルを40%のみとし, SPI にもメチオニンを添加して飼料中のメチオニン量をカゼイン食とそろえた。そうすることにより, PCA ラット組織の含硫アミノ酸濃度と摂取メチオニン量, メチオニン/シスチン比の関係について検討した(実験1)。また, 実験2では脳微小透析法 (microdialysis) を用いて, アンモニア負荷により脳症を惹起した PCA ラ

ットの脳内モノアミン代謝に及ぼす高メチオニン血症の影響について観察した。

実験方法

実験1

高メチオニン血症と飼料中のメチオニン及びシスチン量の関係

体重約200 g の Wistar 系雄性ラットに, 小島らのボタン改良法⁸⁾により PCA 手術を施した。飼料のたん白質源として SPI, 全卵及びカゼインを使用し, たん白質レベルは40% (N×6.25)とした。Table 1に示すように, SPI には全卵あるいは前回高メチオニン血症を示した1.5% メチオニン添加カゼインと等しくなるように, それぞれたん白質 (N×6.25)当たり2.1% あるいは3.2% L-メチオニンを添加した。また, 1.5% メチオニン添加カゼインには2.7% のシスチンを加え, 全卵のシスチン含量となるようにした。飼料及び水は自由に与え, 2週間飼育した。

PCA 手術前, 実験食期1及び2週末のそれぞれ3日間窒素出納を観察し, また窒素出納観察の最終日にエーテル麻酔下に外頸静脈より採血し, 血中アンモニア濃度を測定した⁹⁾。実験食期終了後断頭にて屠殺し, 採血ならびに脳摘出を行った。血漿及び脳の遊離アミノ酸をアミノ酸自動分析機(医理化機器)で分析した。

実験2

肝性脳症発現と脳内モノアミン代謝

実験1と同様の PCA ラットに, メチオニン含量の等しい3.2% メチオニン添加 SPI と1.5% メチオニン添加カゼインをたん白質源とした40% たん白質食を自由に与えた。PCA 手術後8日目に脳微小透析用ガイドカニューレを線条体¹⁰⁾に植え込んだ。カニューレ挿入後8日目から2日間, 9:00から14:00の5時間絶食条件下で, リンゲル液を2 μ L/min の速度で流し透

Table 1. Sulfur amino acid content of experimental diet

Diet	Methionine	Cystine	SAA ¹	Met/Cys
		<i>mg/g protein</i>		
Egg	39	32	71	1.2
SPI ² +2.1% Met	35	14	49	2.5
Casein+1.5% Met	46	5	51	9.2
SPI+3.2% Met	46	14	60	3.3
Casein+1.5% Met+2.7% Cys	46	32	78	1.4

¹ Sulfur amino acids. ² Soy protein isolate.

析した。透析開始60分後の10:00に10%酢酸アンモニウムを体重1 kg あたり1.0 mL (1.3 mmole)あるいは2.0 mL (2.6 mmole)を腹腔内に投与した。2.6 mmole 投与で脳症を起こしたが、1.3 mmole では外見上変化は見られなかった。透析液中のモノアミン代謝産物量を高速液体クロマトグラフィーで分離し、電気化学検出器 (amperometric detector E-501, 医理化機器)により分析した。

結 果

実験 1

2 週末の窒素出納値は、SPI 食群がカゼイン群及び全卵群よりも高い傾向にあった。血中アンモニア濃度は、PCA 手術前は約100 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ であった (Fig. 1)。術後8日目には、SPI 食の2群及び全卵群で250 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 前後にまで、カゼイン食の2群で約170 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ にまでそれぞれ上昇した。術後15日目には各群200 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ 前後となり、群間に差は見られなかった。

血漿遊離アミノ酸濃度についてみると、PCA 手術によりいずれのたん白質群においても分枝鎖アミノ酸 (BCAA) は低下し、芳香族アミノ酸 (AAA) は増加した。その結果 BCAA/AAA 比は2.0以下に低下したが、食餌たん白質源による差はなかった (Fig. 2)。血漿メチオニン濃度は、食餌中のメチオニン含量の等しい全卵群と2.1% メチオニン添加 SPI 群では差がなく、正常値であった。しかし、1.5% メチオニン添加カゼ

イン群では525 nmole/mL と著しく上昇していた。これに対して、1.5% メチオニン添加カゼイン食と等しいメチオニン含量の3.2% メチオニン添加 SPI 食群では全くメチオニン濃度の上昇はみられなかった。さらに、1.5% メチオニン添加カゼインにシスチンを2.7% 加えて全卵のシスチン量に等しくすると、血漿メチオニン濃度は上昇せず、正常範囲内にあった。血漿シスチン濃度は、群により食餌中のシスチン量に数倍の差があるにもかかわらず各群はほぼ等しかった。血漿グルタミン濃度はいずれの PCA ラットにおいても高値を示した。脳の遊離アミノ酸は血漿と同様の動きを示し、1.5% メチオニン添加カゼイン食群のみメチオニン濃度が異常に上昇した (Fig. 3)。

実験 2

血中アンモニア濃度は SPI 群、カゼイン群ともに約200 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ と正常の2倍の高値であった。実験1の結果と同様に、血漿及び脳内のメチオニン濃度はカゼイン群で著明に上昇したが、SPI 群では正常値を維持した。

アンモニア投与量が1.3 mmole/kg の時は明かな行動上の変化は認められなかったが、2.6 mmole/kg に増加すると投与5分後から約15分間昏睡状態を呈し、投与30分後にはほぼ回復した。回収された透析液中のモノアミン代謝産物量について、アンモニア負荷後の経時の変化を Fig. 4に示した。アンモニア投与量にかかわらず、SPI 群、カゼイン群ともにドーバミン代謝産物である3, 4-ジヒドロキシフェニル酢酸

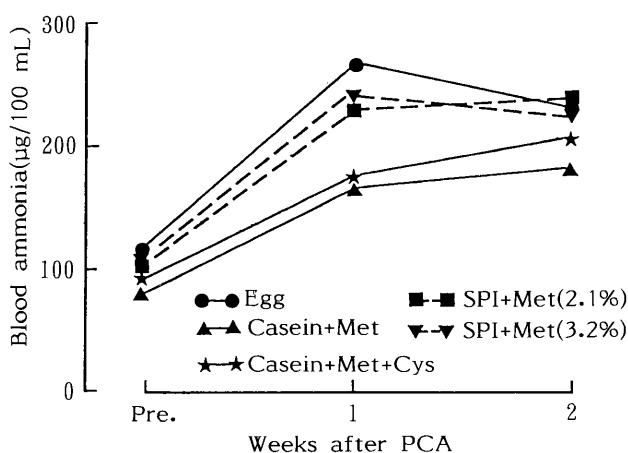


Fig. 1. Effect of dietary protein on blood ammonia concentration in portacaval anastomosis rats fed 40% protein diets. Values are expressed as mean for 4 to 6 rats per group.

(DOPAC) は低下傾向を示した。カゼイン群でセロトニン代謝産物の 5-ハイドロキシインドール酢酸(5-HIAA) に増加傾向が認められた。しかし、もう 1 つのドーパミン代謝産物のホモバニリン酸 (HVA) には変化がみられず、全般的にこれら代謝産物に飼料たん白質の差および昏睡の有無による明かな影響は観察されなかった。

考 察

肝不全患者に対して、脳症を起こさせずに十分なたん白質を補給するには、アミノ酸代謝異常を是正するような組成の食たん白質が望ましい。これまで主に分枝鎖アミノ酸の減少と芳香族アミノ酸の増加の改善の

みが強調されてきた傾向があり⁴⁾、食事中的メチオニンの影響については十分に明らかにされていない。そこで本研究では、肝疾患モデル動物として PCA ラットを用い、飼料中の含硫アミノ酸と栄養効果ならびに肝性脳症発現の関係について検討した。

これまでの報告^{3,11)}と同様、今回の PCA ラットの結果でも、40% たん白質食投与において、SPI 食は全卵やメチオニン添加カゼイン食よりも体重増加や窒素出納値からみた栄養的価値は優れていた。また、Okita らは肝硬変患者に植物性たん白質を摂取させると、血漿 BCAA/AAA 比は改善されないが、血漿メチオニン濃度は低下すると報告している¹²⁾。今回のラットにおける結果でも、1.5% メチオニン添加カゼインでは血漿

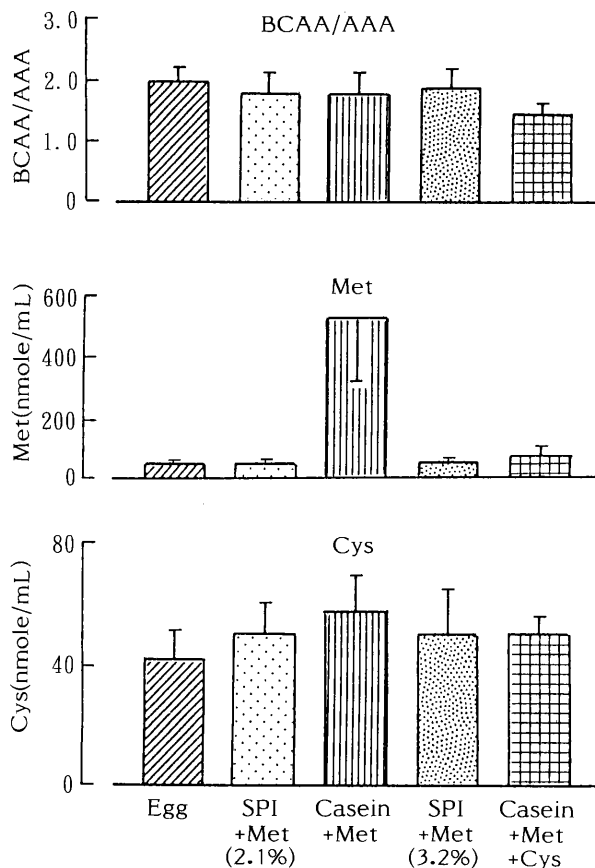


Fig. 2. Effect of dietary protein on plasma BCAA/AAA molar ratio, free methionine and cystine concentration in rats with portacaval anastomosis fed 40% protein diets. Values are expressed as mean $\pm$ SD for 4 to 6 rats per group.

および脳内のメチオニン濃度は著明に上昇したのに対して、メチオニン量が等しくても SPI の場合には正常範囲内にとどまった。今回カゼインに添加したたん白質当たり1.5% という量はいわゆる補足量であって、実際偽手術群では血漿メチオニンの増加はみられていない。SPI のメチオニン量をカゼインと等しくしても高メチオニン血症が起こらないことから、飼料中のメチオニンそのものの量だけではなく、シスチンとの比がアンバランスなためであろうと考えた。実際、シスチンを全卵程度添加すると、メチオニン摂取量が変わらないにもかかわらず血漿および脳内のメチオニン濃度の上昇は阻止された。SPI に3.2% のメチオニンを添加してもメチオニン/シスチン比は約3であるのに対

して、1.5% メチオニン添加カゼインでは9と大きい。すなわちシスチン量がメチオニン量に対して少なすぎるのが原因であると考えられた。なぜ補足量のメチオニン添加で高メチオニン血症を呈するのかという理由は不明であるが、PCA ラットでは含硫アミノ酸代謝が変化しており^{13,14)}、含硫アミノ酸のアンバランスとが重なって起こるのであろう。血中シスチン濃度の低下は観察されてはいないが、メチオニンからシスチンへの転換が障害されており¹⁵⁾、シスチン不足を起こし、たん白質合成が障害されてメチオニンが余ったのかもしれない。

今回、血中アンモニア濃度の上昇に対しては、SPI の抑制効果は認められず、また血漿メチオニン濃度と血

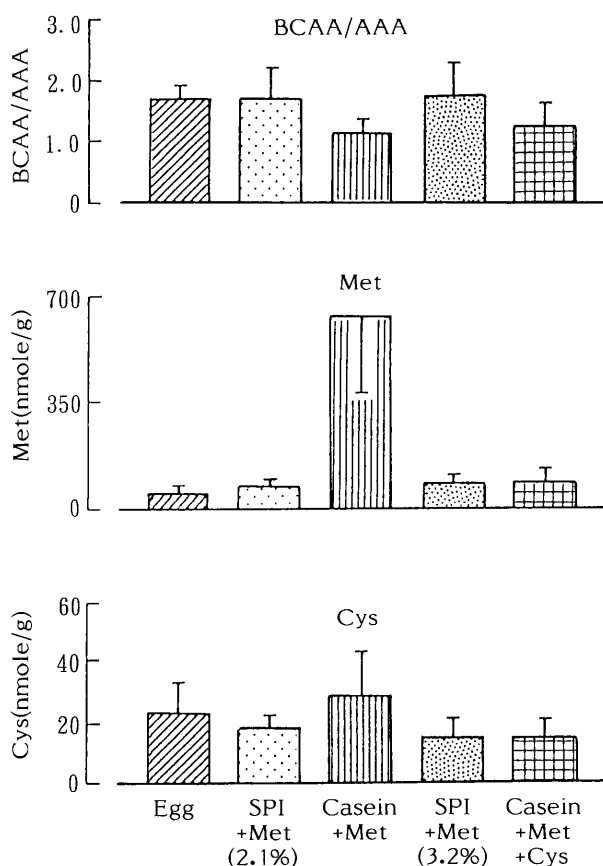


Fig. 3. Effect of dietary protein on brain BCAA/AAA molar ratio, free methionine and cystine concentration in rats with portacaval anastomosis fed to 40% protein diets. Values are expressed as mean $\pm$ SD for 4 to 6 rats per group.

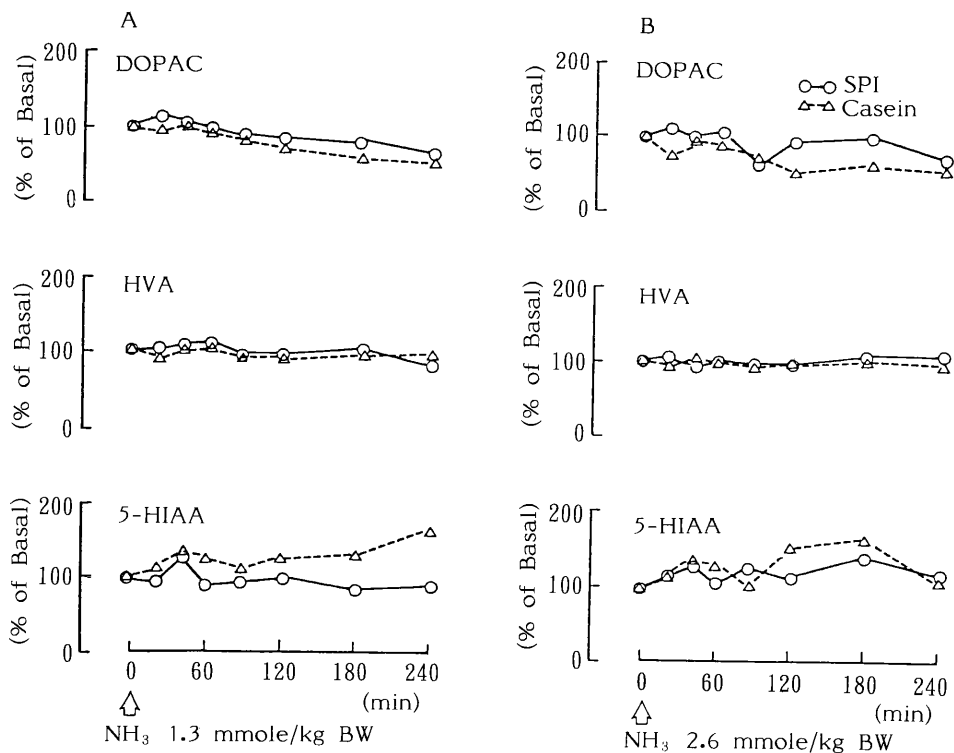


Fig. 4. Changes in monoamine metabolite release from striatum into dialysate following intraperitoneal injection of 10% ammonium acetate (A, 1.3 mmole/kg BW; B, 2.6 mmole/kg BW) in rats with portacaval anastomosis fed 40% protein diets. Values are expressed as mean $\pm$ SD for 3 or 4 rats per group.

中アンモニア濃度との間にも相関関係は認められなかった。植物性たん白質がアンモニアを低下させる理由の一つとして、植物性食品は繊維含量が高いことが挙げられているが、本実験ではSPIを用いており、その消化吸収率は高く、繊維の効果は期待できない。Uribeら¹¹⁾も肝硬変患者に植物性食品を組み合わせさせて与えているが、空腹時血中アンモニアは動物性食品摂取時にも低く、両群に差を認めていない。

肝性脳症発現に及ぼす高メチオニン血症の影響を調べるために、脳微小透析法により線条体のモノアミン代謝産物の動きを調べた。使用した化学検出器の感度が低く、本研究ではモノアミンそのものを分析することができなかった。今回の結果では、全般的に見て、モノアミン代謝産物に対する飼料たん白質の差、高メチオニン血症、昏睡の有無などによる明らかな影響は観察されなかったが、DOPACが減少傾向、5-HIAAが増加傾向を示した。線条体は動作、行動に関係する

部位である。また、セロトニンが睡眠に関係しており、ノルエピネフリンは覚醒に関与していると考えられている。もし、今回の結果がカテコールアミン代謝の低下とセロトニン代謝の亢進を表しているとするれば、脳症発現との関係でさらに詳細に検討する価値があろう。いずれにしても、神経伝達物質そのものも測定するとともに、種々の脳部位について調べてみないことには結論をだすことはできない。

文 献

- 1) Patek, A. J. Jr., Post, J., Ratnoff, O. D., Mankin, H. and Hillman, R. W. (1948): Dietary treatment of cirrhosis of the liver: results in one hundred and twenty-four patients observed during a ten year period. *J. Am. Med. Assoc.*, **138**, 543-549.
- 2) Phillips, G. B., Schwartz, R. and Gabuzda, G. J.

- Jr. (1952): The syndrome of impending hepatic coma in patients with cirrhosis of the liver given certain nitrogenous substances. *New Eng. J. Med.*, **247**, 239-246.
- 3) Greenberger, N. J., Carley, J., Schenker, S., Bettinger, I., Stamnes, C. and Beyer, P. (1977): Effect of vegetable and animal protein diets in chronic hepatic encephalopathy. *Digest. Dis. Sci.*, **22**, 845-855.
 - 4) Fischer, J. E., Rosen, H. M., Ebeid, A. M., James, J. H., Keane, J. M. and Soeters, P. B. (1976): The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery*, **80**, 77-91.
 - 5) Rudman, D., Galambos, J. T., Smith III, R. B., Salam, A. A. and Warren, W. D. (1973): Comparison of the effect of various amino acids upon the blood ammonia concentration of patients with liver disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, **26**, 916-925.
 - 6) 木戸康博, 多田文子, 志塚ふじ子, 稲井玲子, 井上五郎, 岸 恭一 (1981): 肝障害ラットの栄養状態改善に及ぼす分離大豆たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **10**, 106-112.
 - 7) Funovics, J. M., Cummings, M. G., Shuman, L., James, E. J. H. and Fischer, J. E. (1975): An improved nonsuture method for portacaval anastomosis. *Surgery*, **77**, 661-664.
 - 8) 小嶋正夫, 中村俊之, 坂田義一, 富田栄一, 橋本修, 川出靖彦 (1979): ラットにおける portacaval shunt の作製. 医学の歩み, **110**, 45-48.
 - 9) 奥田拓道, 藤井節郎 (1966): 血中アンモニア直接比色定量法. 最新医学, **21**, 622-627.
 - 10) Paxinos, G. and Watson, C. (1982): The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.
 - 11) Uribe, M., Marquez, M. A., Ramos, G. G., Ramos-Uribe, M. H., Vargas, F., Villalobos, A. and Ramos, C. (1982): Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with vegetable and animal protein diets. *Dig. Dis. Sci.*, **27**, 1109-1116.
 - 12) Okita, M., Watanabe, A. and Nagashima, H. (1985): A vegetable protein-rich diet for the treatment of liver cirrhosis. *Acta Med. Okayama*, **39**, 59-65.
 - 13) Benjamin, L. E. and Steele, R. D. (1981): Effect of portacaval shunt on sulfur amino acid metabolism in rats. *Am. J. Physiol.*, **241**, G503-G508.
 - 14) Benjamin, L. E. and Steele, R. D. (1986): The effect of dietary protein on nitrogen and sulfur metabolism in portacaval-shunted rats. *J. Nutr.*, **116**, 59-69.
 - 15) Horowitz, J. H., Rypins, E. B., Henderson, J. M., Ceymsfield, S. B., Moffitt, S. S., Bain, R. P., Chawla, R. K., Bleier, J. C. and Rudman, D. (1981): Evidence for impairment of transsulfuration pathway in cirrhosis. *Gastroenterology*, **81**, 668-675.