

小腸部分切除ラットにおける血清遊離アミノ酸の動態と大豆ペプチド（ハイニュート PM）食に対する分岐鎖アミノ酸の補足効果

SUPPLEMENTATION OF SPI PEPTIDE-BASED DIET WITH BRANCHED CHAIN AMINO ACIDS AND GLUTAMINE: THEIR EFFECTS ON INTESTINAL FUNCTION AND SERUM AMINO ACID CONCENTRATION IN JEJUNECTOMIZED RATS IN CONVALESCENCE

杉山 薫・岡田敏克・岩見公和・伊吹文男（京都府立大学農学部）

Kaoru SUGIYAMA, Toshikatsu OKADA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

Wistar rats weighing about 250 g were jejunectomized between 15 cm below the pylorus and 30 cm above the ileocecal valve, and a SPI peptide (Hinute PM)-based diet for convalescence was supplemented with both branched chain amino acids and glutamine. The effect of the supplementation became conspicuous in body weight gain from a week after the jejunal resection. On the 10th day, the rats given the supplemental diets with and without these amino acids were sacrificed by drawing blood to excise small intestine. Then, the activity levels of brush border enzymes and Na⁺-dependent amino acid or sugar uptake capacity were investigated with five segments of the small intestine. Although there was no significant difference in enzyme activity between the jejunectomized rats with or without amino acid supplementation and the sham-operated ones, the active transport capacities for leucine and glucose tended to be somewhat higher in the vicinity of suture in the former than in the latter. It was assumed from the results of amino acid analysis that the supplementation of postoperative food with "emergency" amino acids would be effective in convalescence without risk of causing amino acid imbalance. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **13**, 27-33, 1992.

たん白質の消化吸収はアミノ酸にまで完全に分解されてから吸収されるという考え方が長らく支配的であったが、その消化産物中のスモール（ジ-およびトリ-）ペプチドはそのままの形態で（アミノ酸とは異なる輸送系で）吸収され¹⁻⁴⁾、またある種のアミノ酸輸送系に欠陥がある場合でもペプチドの形態でなら吸収されることが明らかとなり、小腸切除や潰瘍性疾患時のような吸収能が著しく低下している状況下におけるペプチド吸収の有効性が、カゼイン水解ペプチド⁵⁻⁶⁾、卵白水

解ペプチド⁷⁾、大豆たん白質水解ペプチド⁸⁻¹⁰⁾などで検討され、臨床的に利用されている。

一方、飢餓や傷害など異化的状態におかれた生体では、筋たん白質分解により生じた、あるいは血中分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）が当該組織において脱アミノ化され、その炭素骨格は直接エネルギー源として、またアミノ基の一部は小腸・腎を経由してアラニンとなって肝に戻りグルコース新生に利用される（グルコース-アラニン回路）。このよう

な状況下での分岐鎖アミノ酸は、糖に比べインスリン分泌を促さず、エネルギーの供給形態として重要である。外科的侵襲時に分岐鎖アミノ酸の補給は縫合部の良好な回復を促すとされ、実際、アミノ酸輸液の分岐鎖アミノ酸濃度は高い^{11,12)}。さらに小腸ではグルタミンがエネルギー源として利用可能なことから、小腸切除や疾患治療時にはグルタミンの補給も有効との報告がある^{13,14)}。そこで今回、小腸広範囲切除後の経腸栄養で窒素源としてアミノ酸混合やたん白質 (SPI) に比べ良好な回復を促した大豆ペプチド¹⁵⁾に対する分岐鎖アミノ酸およびグルタミン補足効果について検討を加えた。

実験方法

実験動物および食餌条件

体重250 g 前後のウィスター系雄ラットを用い、約12時間絶食後小腸切除手術を行った (幽門より下方15 cm と回盲弁より上方30 cm を吻合)。対照としては開腹縫合しただけの偽手術群を設けた。術後2日間は5%フルクトースのみを与え、続いて試験食に切り換えた。試験食の組成: SPI ペプチド食はハイニュート

PM 20%, デキストリン65%, 大豆油5%, オリエンタル配合ミネラル混合5%, オリエンタル配合ビタミン混合1%, セルロース粉末4%を基本とし (-AA), これにロイシン, イソロイシン, バリンの等量混合物とグルタミンをいずれも2%ずつ加えその増加分をデキストリンで補正した (+AA)。所定期間飼育後, ラットは約12時間絶食の後, ベントバルビタール麻酔下に腹大動脈より失血死させた。屠殺後直ちに幽門から回盲弁に至る小腸を取り出し, 手術群では幽門部から順に約5 cm (セグメント1), 吻合面まで約10 cm (セグメント2), さらに下方に10 cm ずつ (セグメント3, 4, 5) に分け, 粘膜上皮細胞を分離してアミノ酸と糖の吸収実験に供した。偽手術群については上記各セグメントに相当する部分をその該当セグメントとした。また, 採取した血液は一部 (10 μ L) をヘモグロビン測定に用いるほか, 残りを遠心分離 (1000 g, 15分間) により血漿に分離し, 各血清パラメーター測定まで-20°Cで保存した。

アミノ酸 (ロイシン) および糖 (グルコース) 吸収実験

取り出した小腸はヒアルロニダーゼで処理¹⁶⁾, 分離した上皮細胞を, 1.3 mM ロイシン ($[^3\text{H}]$ ロイシン,

Table 1. Growth indexes of small intestine resected rats

	Sham	-AA	+AA
Body weight gain, g/day	6.7 $\pm$ 0.4 ^a	4.0 $\pm$ 0.5 ^b	5.6 $\pm$ 0.5 ^a
Food intake, g/100 g BW	7.4 $\pm$ 0.4 ^a	5.9 $\pm$ 0.4 ^b	6.7 $\pm$ 0.2 ^{ab}
Protein efficiency ratio	1.73 $\pm$ 0.04 ^a	1.31 $\pm$ 0.09 ^b	1.40 $\pm$ 0.10 ^b
Tissue weight, g/100 g BW			
Liver	2.87 $\pm$ 0.06 ^a	2.96 $\pm$ 0.18 ^a	2.81 $\pm$ 0.10 ^a
Kidney	0.36 $\pm$ 0.01 ^a	0.35 $\pm$ 0.01 ^a	0.34 $\pm$ 0.01 ^a
Spleen	0.23 $\pm$ 0.02 ^a	0.21 $\pm$ 0.01 ^a	0.19 $\pm$ 0.02 ^a

The means $\pm$ SE (n=4) not sharing a common superscript in the same rank significantly differ at $\alpha_T < 0.05$.

Table 2. Blood properties in rats with small intestinal resection

	Blood level, g/dL		
	Sham	-AA	+AA
Total protein	5.56 $\pm$ 0.09 ^a	4.80 $\pm$ 0.03 ^b	5.25 $\pm$ 0.22 ^{ab}
Albumin	3.00 $\pm$ 0.06 ^a	2.58 $\pm$ 0.09 ^a	2.88 $\pm$ 0.18 ^a
Globulin	2.56 $\pm$ 0.12 ^a	2.22 $\pm$ 0.08 ^a	2.38 $\pm$ 0.13 ^a
Hemoglobin	14.8 $\pm$ 0.1 ^a	14.4 $\pm$ 0.4 ^a	16.0 $\pm$ 0.7 ^a
Urea, $\times 10^{-3}$	13.0 $\pm$ 0.8 ^a	15.5 $\pm$ 1.2 ^a	16.8 $\pm$ 1.2 ^a
Triacylglycerol, $\times 10^{-3}$	92.4 $\pm$ 2.3 ^{ab}	108.1 $\pm$ 6.9 ^a	88.4 $\pm$ 5.2 ^b
Total cholesterol, $\times 10^{-3}$	76.7 $\pm$ 5.1 ^a	73.7 $\pm$ 7.4 ^a	77.0 $\pm$ 3.0 ^a

The means $\pm$ SE (n=4) not sharing a common superscript in the same rank significantly differ at $\alpha_T < 0.05$.

925 kBq/mL) または 1 mM グルコース ($[^{14}\text{C}]$ グルコース, 18.5 kBq/mL) を含む緩衝液 ($\pm 0.2 \text{ M NaCl}$) 中で 37°C , 1 分間インキュベート, 直ちに冷生理的食塩水で希釈・吸引濾過・洗浄後, 分離上皮細胞に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

血清成分の分析

血清中総たん白質, アルブミン, 尿素濃度は夫々, ビュレット法, ブロムクレゾールグリーン法, ジアセチルモノオキシム法により求めた。ヘモグロビン, トリアシルグリセロール, 総コレステロール値は市販の測定キットを用いて測定した。血清中遊離アミノ酸の分析では, スルホサリチル酸 (1.5%) により除たん白, 遠心分離 (1000 g, 15 分間), メンブランフィルター透過後の血清サンプルを日立 835 型アミノ酸自動分析器に注入した。

小腸粘膜酵素の活性測定

ロイシン, グルコース吸収能測定のために調製した小腸上皮細胞の一部をホモジナイズ後, 生理的食塩水で適宜希釈して酵素標品とした。シュクラゼ, γ -グルタミルトランスフェラーゼ, ロイシンアミノペプチ

ダーゼ, アルカリホスファターゼ活性は常法に従って測定した。

統計処理

各群 4 匹の測定値について F 検定を行い, 危険率 5 % 未満で有意差の認められたものについて, さらに Student-Newman-Keuls test¹⁷⁾ により有意差の程度を判定した。

結果と考察

Fig. 1 に試験食投与開始日からの体重変化を示した。空腸切除 2 群は, 術後 6 日目までは同レベルの緩慢な回復しか示さなかったが, 7 日目からのアミノ酸添加食投与群 (+AA) の体重増加が著しく, 術後 6 日目から 9 日目までの体重増加の割合は偽手術群のそれにほぼ匹敵した。術後 3 日目から 9 日目までの各群ラットの体重増加量を比較すると (Table 1), 空腸切除アミノ酸添加食投与群 (+AA) や偽手術群 (Sham) と空腸切除アミノ酸無添加食投与群 (-AA) との間に有意差が認められ, その傾向は摂食量を反映したものであった。+AA 群に摂食量増加をもたらした背景には術後数日間での消化管の機能回復に添加アミノ酸が有

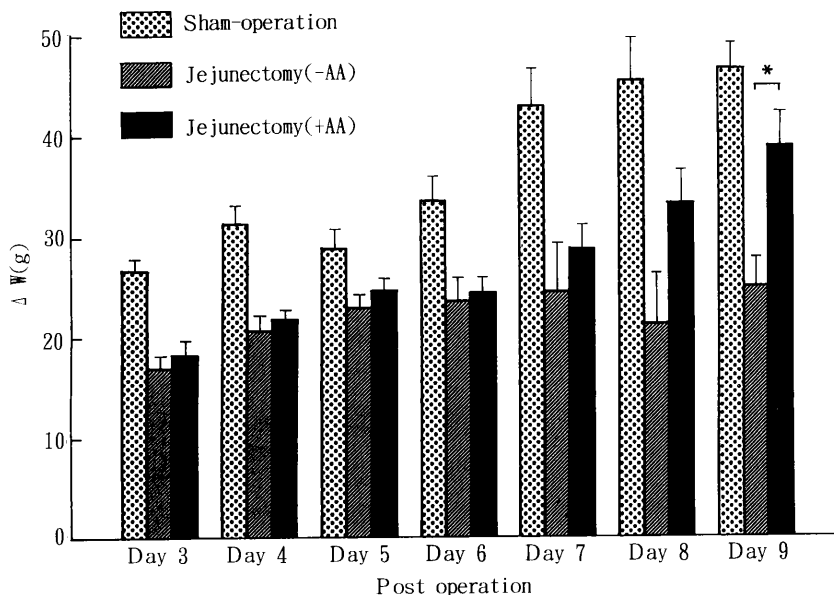


Fig. 1. Postoperative changes in body weight gain in rats with and without jejunal resection. The animals were fed on their corresponding diets from the postoperative 2nd day. Changes in body weight gain were expressed as increase after the beginning of refeeding. The height and bar of each column represent the mean $\pm$ SE for 4 animals; *, significantly different at $p < 0.05$.

効に作用した可能性が考えられる。たん白質効率には空腸切除2群と偽手術群との間に有意な差が認められたが、空腸切除群間にアミノ酸添加による影響は観察されなかった。また、肝臓、腎臓、脾臓重量に有意な

差異は認められなかった。Table 2 に各種血清パラメーターの測定値を示した。-AA 群と Sham 群の総たん白質濃度に有意な差があり、-AA 群の回復が遅いことが示された。アミノ酸添加によりトリアシルグリ

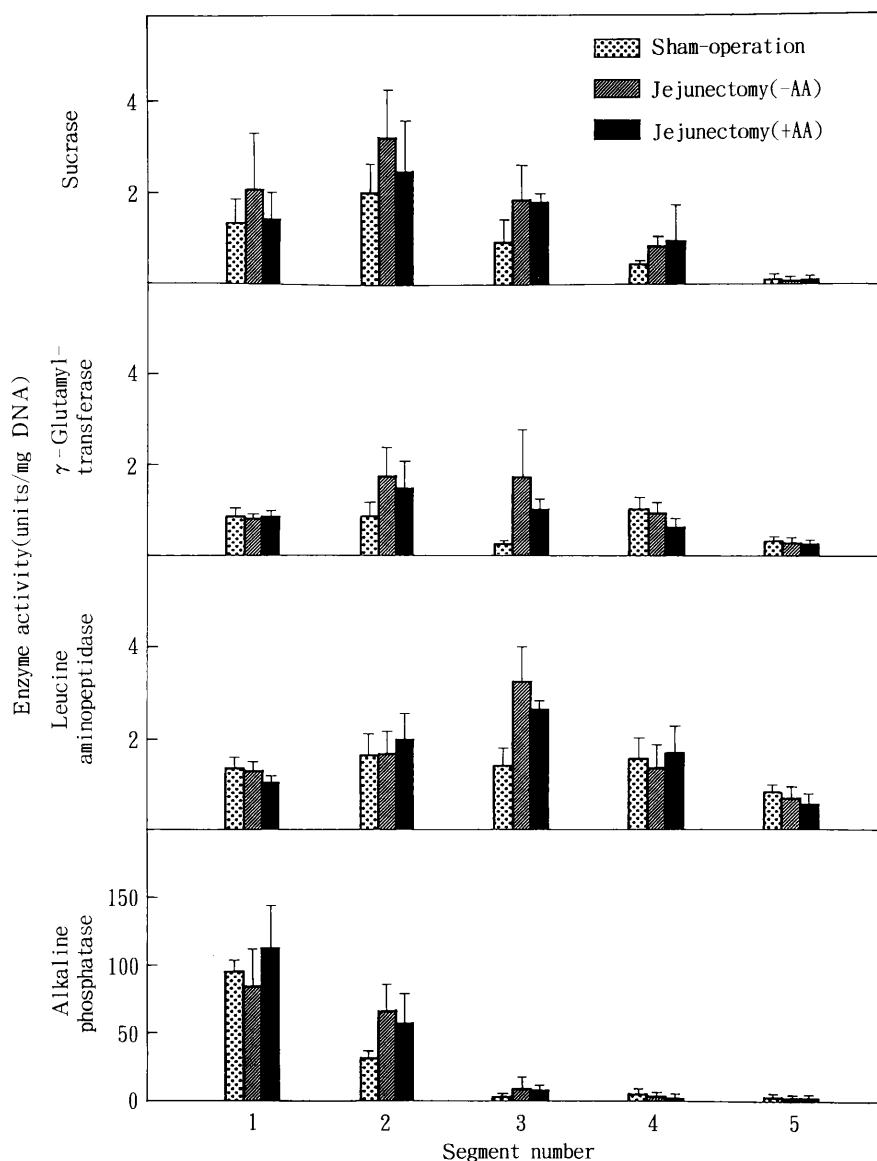


Fig. 2. Activity levels of brush border enzymes in small intestine of rats with and without jejunal resection. The excised small intestine was divided into 5 segments as described in the text. The activities of sucrase, γ -glutamyltransferase, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase were determined in the usual manners, respectively, and expressed as arbitrary unit per mg DNA under the routine assay conditions. Values are the means $\pm$ SE for 4 animals.

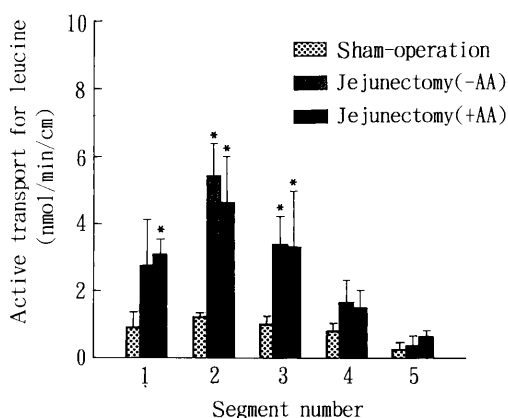


Fig. 3. Active transport capacity for leucine measured with isolated epithelial cells from small intestinal mucosa. The epithelial cells were prepared by the hyaluronidase treatment from the scraped mucosa of each segment, and examined for their [^3H] leucine uptake for 1 min at 37°C according to the flash filtration method. The active transport capacity was defined as difference in the absence and presence of 0.2 M NaCl. Data were obtained as mean $\pm$ SE (n=4).

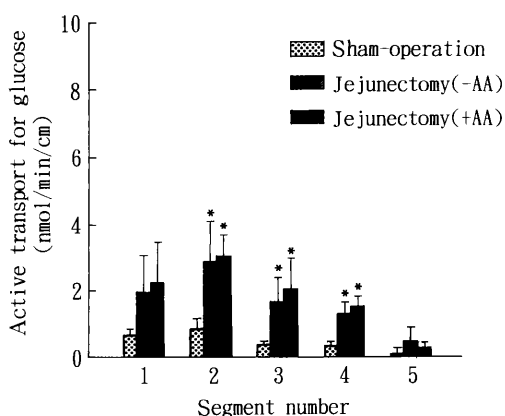


Fig. 4. Active transport capacity for glucose measured with isolated epithelial cells from small intestinal mucosa. The epithelial cells used in this experiment were the same as done in Fig. 3. The assay procedure was also same in many respects except for the use of [^{14}C] glucose instead of [^3H] leucine. Values are the means $\pm$ SE (n=4).

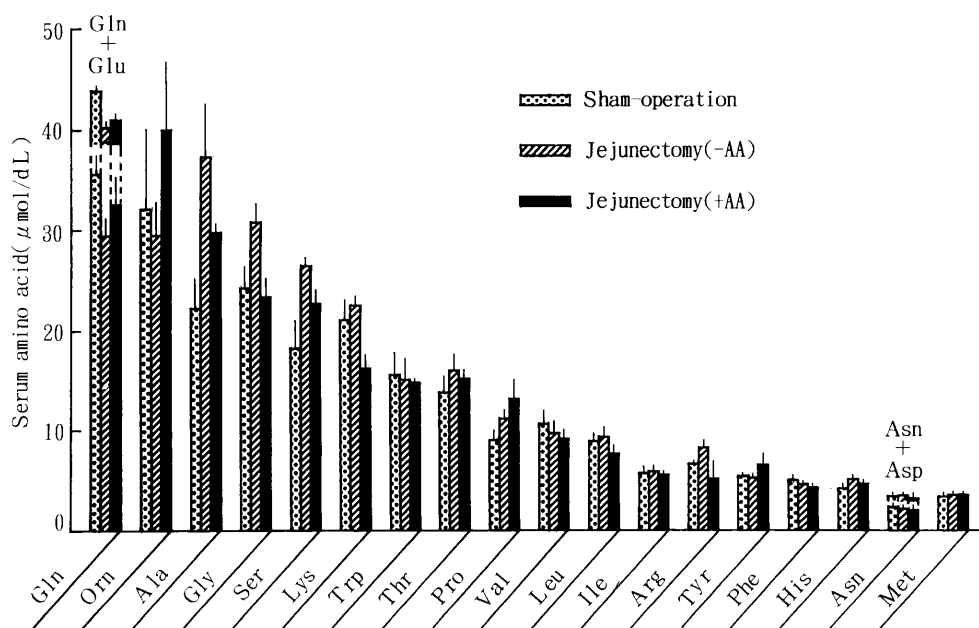


Fig. 5. Serum concentrations of free amino acids in rats given peptide-based diets with and without amino acid supplementation. The rats were the same as used in Figs 2~4. The plasma was separated from the red blood cells by centrifugation, deproteinized by using sulfolalicylic acid, and subjected to automated amino acid analysis. Values are the means $\pm$ SE (n=4).

セロール濃度にも有意な差が認められたが、アルブミン、グロブリン、ヘモグロビン、尿素濃度には群間で有意な差は認められなかった。

空腸切除2群のセグメント3におけるシュクラーゼ、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ活性の上昇が顕著であり (Fig. 2), 平常時には回腸では活性が低いこれらの酵素が小腸切除により誘導を受けたことが示唆された。しかし、この誘導は吻合部の近傍に限られ、離れた部分でのバラクリンの刺激はかなり拡散されるようである。アルカリホスファターゼ活性はふつう消化管上部で高く回腸下部では低いが、空腸切除後も回腸における本酵素の活性は低いままであった。いずれの酵素においてもアミノ酸添加による影響は認められなかった。

Fig. 3 にアミノ酸 (ロイシン), Fig. 4 に糖 (グルコース) の空腸切除による残存小腸粘膜吸収能の変化を示した。吸収能は Na^+ 存在、非存在下における差「能動輸送」として表示した。アミノ酸・糖いずれの場合も空腸切除が全セグメントで高い吸収活性を示した。

Fig. 5 は3群の血清遊離アミノ酸の分析結果である。Sham や +AA 群に比べ -AA 群でアラニン、グリシン、セリン濃度がやや高かった。これらのアミノ酸はたん白質栄養状態が劣るときに高まる傾向にあり¹⁸⁾、-AA 群で同じような状態にあることが示唆された。ただし、本実験においては屠殺前約12時間絶食させているので、その差が拡大して現われたのかもしれない。なお、他のアミノ酸濃度に特筆すべき変化は認められなかった。このことは逆に添加した分岐鎖アミノ酸やグルタミンが血中濃度を高めることなく有効に吸収利用されたことを示唆しており、アミノ酸インバランスの観点からも経腸栄養剤へのこれらアミノ酸の補給は問題ないと思われる。添加量や補足期間については更なる検討を要する。

文 献

- 1) Newey H and Smith DH (1962): Cellular mechanisms in intestinal transfer of amino acids. *J Physiol*, **164**, 527-551.
- 2) Craft IL, Geddes D, Hyde CW, Wise IJ and Matthews DM (1968): Absorption and malabsorption of glycine peptides in man. *Gut*, **9**, 427-437.
- 3) Adibi SA (1971): Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J Clin Invest*, **50**, 2266-2275.
- 4) Adibi SA, Moore EL, Massilamani SS and Amin PM (1975): Evidence for two different modes of tripeptide disappearance in human intestine: uptake by peptide carrier system and hydrolysis by peptide hydrolases. *J Clin Invest*, **56**, 1355-1365.
- 5) Kish T, Iwasawa Y, Itoh H and Chibata, I. (1978): Effect of nitrogen source on nutritional management after small bowel resection in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, **24**, 167-176.
- 6) 中坊幸弘, 山田かよ子, 萩平 博 (1985): 胃全摘あるいは75%小腸切除ラットの窒素代謝におよぼす食餌性窒素源形態の影響. 日本栄養・食糧学会誌, **38**, 57-62.
- 7) 真島吉也 (1990): ペプチドを用いたエレメンタルダイエット. ペプチド栄養, 桐山修八・荒井綜一編, 北海道大学図書刊行会, pp. 167-186.
- 8) 井原美佳, 大中政治, 新山喜昭 (1989): 経腸及び非経腸栄養への SPT-5 の利用. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **10**, 71-79.
- 9) 井原美佳, 宮ノ前朋子, 木戸康博, 岸 恭一 (1990): 消化吸収障害ラットにおける大豆たん白質ペプチドの栄養効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 87-94.
- 10) 中坊幸弘, 鈴木健史, 岡本美由紀, 葛原裕子, 萩平 博 (1990): 分離大豆たん白質由来低分子ペプチド混合物を窒素源とした経腸栄養剤. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 108-112.
- 11) 遠藤昌夫 (1989): アミノ酸輸液剤の種類とアミノ酸組成の特徴. アミノ酸輸液, 武藤輝一編, 医薬ジャーナル社, pp. 37-60.
- 12) 松原要一 (1989): 外科領域～手術前, 後, アミノ酸輸液, 武藤輝一編, 医薬ジャーナル社, pp. 91-106.
- 13) Windmueller HG (1982): Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol*, **53**, 201-232.
- 14) Souba WW (1991): Glutamine: a key substrate for the splanchnic bed. *Ann Rev Nutr*, **11**, 285-308.
- 15) 杉山 薫, 岩見公和, 伊吹文男 (1991): ラット腸管の部分切除ならびに部分転移と術後の機能変化に対する大豆たん白質部分水解物 (ペプチド) の投与効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **12**, 67-73.
- 16) Kimmich GA (1970): Preparation and prop-

- erties of mucosal epithelial cells isolated from small intestine of the chicken. *Biochem*, **9**, 3659-3668.
- 17) Grnatz SA (1987): "Primer of Biostatistics" 2nd. ed., McGraw-Hill, pp. 91-95.
- 18) Sugiyama K, Iwami K and Ibuki F (1992): Influence of intermittent protein intake every few days on rat growth and metabolic function. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 481-485.