

ハイニュート PM 投与時の血中遊離アミノ酸及びペプチドの動態

CHANGES IN FREE AMINO ACIDS AND OLIGOPEPTIDES IN SERUM AFTER ADMINISTRATION OF HINUTE-PM

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

Postprandial changes in free amino acids and peptides in portal blood were investigated in rats fed an oligopeptide mixture from SPI (Hinute-PM). After 12 hour fasting, rats (about 300 g) were bolus-fed a liquid diet containing 1.5 g of Hinute-PM (average chain length 7.8), and then blood samples were collected at intervals from a catheter inserted previously into portal vein. For deproteinization one volume of 3% sulfosalicylic acid was added to two volumes of serum and resultant supernate was used for analyses of free amino acids and oligopeptides. Concentrations of free amino acids and peptides in serum increased with a peak at 30 minutes (from 4.1 $\mu\text{mol/mL}$ for fasting level to 7.9 $\mu\text{mol/mL}$ for peak level and from 1.9 $\mu\text{mol/mL}$ to 2.6 $\mu\text{mol/mL}$, respectively) and decreased to fasting level within 2 hours. Average chain length of oligopeptides in serum from fasted rats was about 9.5. However, it decreased slightly at 30 minutes after feeding, and then tended to return to fasting values in almost all rats, suggesting that considerable amount of ingested oligopeptides were absorbed as the forms of original or digested oligopeptides. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 9-13, 1933.

これまで我々は、摂取オリゴペプチドの一部がそのままの形で吸収されるか否かを血中オリゴペプチドの変化を観察することにより明らかにしようとしたが^{1,2)}、そのためにはまず、吸収されて血清中に出現するかもしれない投与ペプチドが血清除たん白操作に際し、沈澱せず上清に残ることを明らかにすることが必要である。そこでラット血清に種々濃度(7~12%)のスルホサリチル酸(SSA)溶液を加え、得られた上清について遊離アミノ酸、ペプチド態アミノ酸及び平均ペプチド鎖長を測定し、SSAの最終濃度3.3%(血清2容に10% SSA 1容添加)が平均鎖長3.3のハイニュート PM 投与時の吸収動態観察に適することを報告した¹⁾。

この研究で、空腹時血清中にかなりの量のオリゴペプチドが存在し、これらオリゴペプチドは除たん白上清に残ることが分ったが、しかし上記の除たん白条件下で、少量の大きなペプチドが上清に残っていないかという疑問が生じた。そこで今回は、この点をまず明らかにしようとした(実験1)。

また、前回までの報告で用いたハイニュート PM は平均ペプチド鎖長3.3ということであったが、この鎖長値はハイニュート PM 中に約20%含まれる遊離アミノ酸をも含め計算された値であり、これを除くと平均鎖長は約7.8であることが分った。そこでこの点を考慮して、再度血清の除たん白に用いる SSA 濃度の検討を行った(実験2)。

なお、前回はハイニュート PM 投与後の血清中ペプチドの変化を尾静脈から採取した体循環血で検討したが、今回は門脈血を用いてその変化を観察した(実験3)。

実験方法

実験1

血漿中ペプチド態アミノ酸濃度

約8時間絶食させた男子大学生3名(平均年齢23歳, 平均体重59 kg)から血液を採取した。遠心分離(3,000 rpm, 10分)後, 得られた血漿3.0 mL に除たん白剤として10%スルホサリチル酸(SSA)溶液1.5 mLを加えて混和し, 4℃で24時間放置した。これを遠心分離(15,000 rpm, 10分)し, 得られた除たん白上清を, Cu-Sephadex カラムを用いた野口らの方法³⁾に従って Fig. 1 のように処理し, ペプチドを分画した。SSA 除去のために除たん白上清2.0 mL を Dowex 50W×4 樹脂を充填したカラム(2.2×17 cm)に通して遊離アミノ酸及びペプチドを吸着させ, このカラムを十分に水洗した。その後, 遊離アミノ酸及びペプチドを 3N NH₄OH 150 mL により溶出した。溶出液を減圧乾固し, 蒸留水 6 mL に再溶解した。この溶解液 5 mL を

Cu-Sephadex カラム(2.2×100 cm)に通し, 以後0.05 M ホウ酸緩衝液(pH 11.0)を用いて連続的に溶出した。大きなペプチドを含む最初の溶出液60 mL を廃棄し, 続いて主に短鎖ペプチドを含む溶出液70 mL をペプチド分画(分画A)として, 次の120 mL をより短鎖のペプチド及び遊離アミノ酸混合分画(分画B)として採集した。分画B採集後, 直ちに0.2 N HCl (400 mL)に

Table 1. Liquid diet composition (100 mL)

Hinute-PM	50 g
Glucose	8.82 g
Soy oil	2.0 g
Na ⁺ 1.23 mEq, K ⁺ 1.05 mEq, Ca ²⁺ 0.32 mEq, Mg ²⁺ 0.24 mEq, Cl ⁻ 1.23 mEq, citrate ⁻ 0.95 mEq, acetate ⁻ 0.21 mEq, SO ₄ ²⁻ 0.24 mEq, ascorbic acid 10.00 mg, pantothenic acid 1.50 mg, nicotinamide 4.00 mg, tocopherol acetate 1.00 mg, pyridoxine 0.40 mg, riboflavin 0.36 mg, thiamin 0.30 mg, phytonadione 0.20 mg, folic acid 40 mg, biotin 6 mg, cyanocobalamin 5 mg, vitamin A 330 IU, cholecalciferol 20 IU	

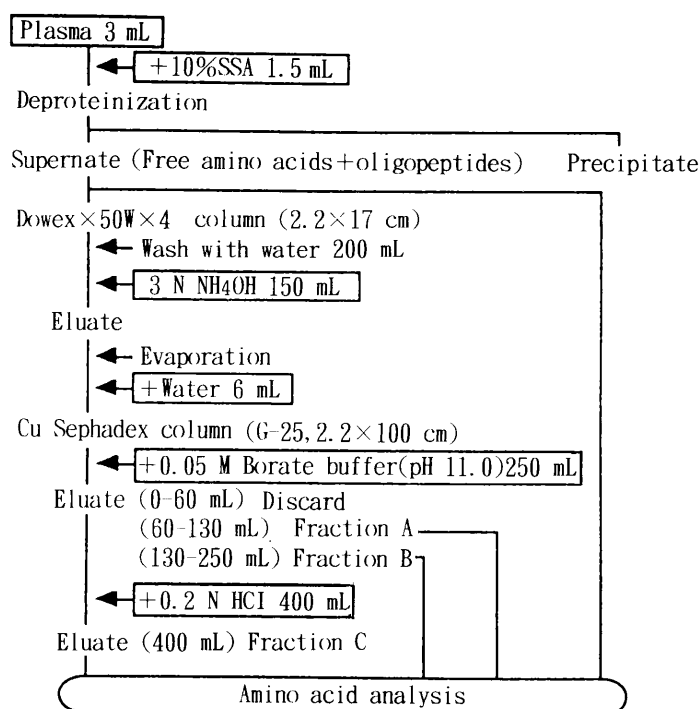


Fig. 1. Procedure for separation of peptides and free amino acids in plasma with Cu-Sephadex column.

かえて溶出を行い、その溶出液を遊離アミノ酸分画(分画C)とした。これら3分画及び元の除たん白上清について、遊離及び総アミノ酸(6 N HCl, 110℃, 24時間加水分解試料)の測定を行った。

実験2

除たん白剤濃度と血漿除たん白上清中ペプチド濃度及び平均鎖長

実験1と同じヒト血漿400 μ L に除たん白剤として3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11あるいは12% SSA 溶液200 μ L を加え(最終濃度1, 1.3, 1.7, 2, 2.3, 2.7, 3, 3.3, 3.7あるいは4%)混和し、4℃で24時間放置した。これら混合液を遠心分離(15,000 rpm, 10分)し、得られた各除たん白上清について、遊離及び総アミノ酸(6 N HCl, 110℃, 24時間加水分解試料)を定量すると共に、除たん白上清中に残存するペプチドの平均鎖長を測定した。

実験3

ハイニュート PM 投与時の門脈血中遊離アミノ酸及びペプチド濃度の経時変化

体重約300 g のSD 系雄ラット(日本 SLC)5匹に門脈カテーテル留置術を行った。術後2日目に、約12時間の絶食後、Table 1 に示した50%ハイニュート PM 食(液状飼料)約3 mL を bolus-fed した(14:00)。食餌投与前空腹時(13:50)及び投与30, 60, 90及び120分後に門脈より採血した(約1 mL/回)。血液を遠心分離(10,000 rpm, 10分)後、得られた血清200 μ L に3% SSA 溶液100 μ L を加えて混和し、以下実験1及び2と同様に処理して除たん白上清を得た。これら除たん白上清について、遊離及び総アミノ酸と平均ペプチド鎖長を測定した。

なお遊離及び総アミノ酸は、アミノ酸自動分析計

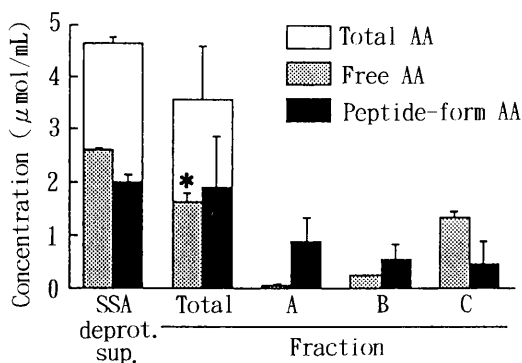


Fig. 2. Concentrations of free and peptide-form amino acids in deproteinized plasma (Cu-Sephadex method). *: $p < 0.05$ to free AAs in deproteinized plasma.

(IRICA A-8700)を用いて定量し、両者の差をペプチド態アミノ酸(オリゴペプチド由来アミノ酸)とした。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⁴⁾により求めた。さらに、ペプチド態アミノ酸濃度を平均ペプチド鎖長で除し得られた値をペプチド濃度とした。

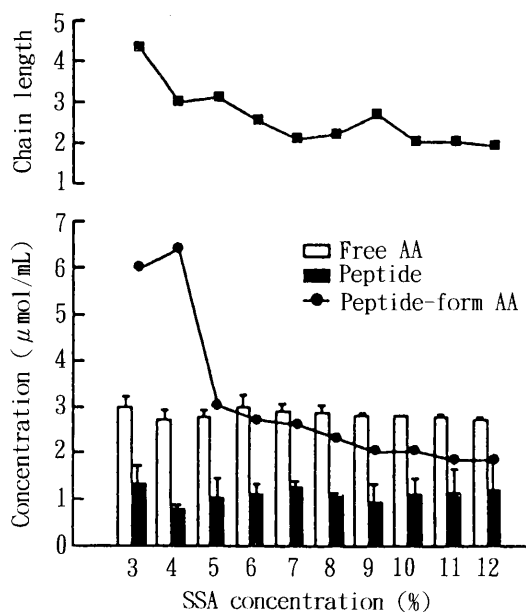


Fig. 3. Effect of SSA concentrations on free amino acids, peptides and their chain length in human plasma.

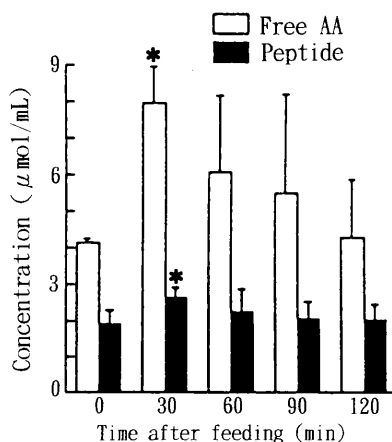


Fig. 4. Changes in free amino acids and peptides in serum after Hinute-PM administration. *: $p < 0.05$ to pre-feeding values.

結果と考察

実験1

血漿中ペプチド態アミノ酸濃度

血漿除たん白上清及び Cu-Sephadex 法により得られた分画A、B及びCの遊離及びペプチド態アミノ酸濃度を Fig. 2 に示した。遊離アミノ酸は主として分画Cに溶出され、ペプチド態アミノ酸は主に分画Aに溶出されるものの、分画B及びCにも溶出された。仮りに除たん白上清中に大きなペプチドが存在しても、この分画法では分画Aよりも早く溶出されると思われる。これら各分画中のペプチド態アミノ酸濃度の合計は約 $2\mu\text{mol/mL}$ で、これは分画前の除たん白試料で得られた濃度とほぼ等しかった。このことは、これまで我々が報告したペプチド態アミノ酸濃度が主としてオリゴペプチド由来であることを示している。また Cu-Sephadex 法をはじめ長時間を要する種々のペプチド分画法を用いなくとも、SSA 濃度を考慮した除たん白操作のみで十分オリゴペプチド態アミノ酸濃度の変化を観察しうることが分った。

実験2

除たん白剤濃度と血漿除たん白上清中ペプチド濃度及び平均鎖長

これまで投与ペプチドの平均鎖長は3.3として実験を行ってきたが、その後この値はペプチド製品(ハイニ

ュート PM)中に約20%存在する遊離アミノ酸を含めた計算値であり、これを除いてペプチドのみの平均鎖長を算定すると約7.8であることが分かった。これでは従来通り10% SSA 溶液を除たん白処理に用いると、血漿中の平均鎖長7.8のペプチドは沈澱部に移行し、たとえハイニュート PM の一部がそのままの形で吸収されたとしてもこれを検出できない。

そこで再度、血漿に加える SSA 溶液の濃度を変えた際の血漿遊離及びペプチド態アミノ酸濃度及び平均ペプチド鎖長の変化を検討した。Fig. 3 に示したように、遊離アミノ酸濃度は SSA 濃度に関係なくほぼ一定であった。一方、ペプチド態アミノ酸(総アミノ酸-遊離アミノ酸)濃度は SSA 濃度の上昇に伴って低下し、その濃度が9%あるいはそれ以上になると一定となった。TNBS 法により求めた各除たん白上清中に残存するペプチドの平均鎖長も、3% SSA の4.3から SSA 濃度の上昇に伴い短くなり、10%以上の濃度ではほぼ一定となった。しかし、各上清のペプチド態アミノ酸濃度を平均ペプチド鎖長で除して得られた値、即ちペプチド濃度は SSA 濃度に関係なくほぼ一定であった。

この結果から、平均ペプチド鎖長7.8のハイニュート PM がそのままオリゴペプチドの形で吸収され血流に入るとすると、3% SSA 溶液を用いて除たん白処理をすることによりこれを検出できる。そこで実験3では、血清の除たん白に用いる SSA 濃度を3%とした。

実験3

ハイニュート PM 投与時の血清遊離アミノ酸及びペプチド濃度の経時変化

ハイニュート PM 食を bolus-fed した後の門脈血清遊離アミノ酸及びペプチド濃度の経時変化を Fig. 4 に示した。食餌投与後、ペプチド濃度は空腹時($1.9\mu\text{mol/mL}$)に比し有意に上昇して約30分でピーク($2.6\mu\text{mol/mL}$)に達し、以後経時的に低下して投与後90~120分で空腹時レベルにまで低下した。一方、遊離アミノ酸濃度もペプチドと同様に空腹時の $4.1\mu\text{mol/mL}$ から食餌投与30分後にピーク($7.9\mu\text{mol/mL}$)をもつ変化を示したが、その変化($3.8\mu\text{mol/mL}$)はペプチドよりも大きかった。この間の平均ペプチド鎖長の経時変化を Fig. 5 に示した。ハイニュート PM 食投与後、ペプチドの平均鎖長は空腹時の9.5から投与30分後に7.8と有意に低下したが、投与60分以降上昇傾向がみられた。このことは摂取オリゴペプチドのかかなりの量がそのまま、あるいはより短鎖のオリゴペプチドとして吸収されたことを示唆している。なお、今回の所見はペプチド投与後もペプチド態アミノ酸濃度及び平

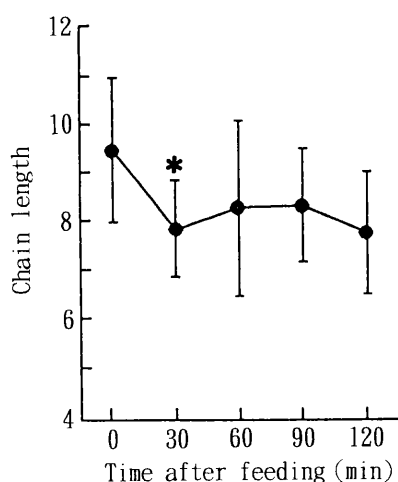


Fig. 5. Change in chain length of peptides in deproteinized serum. *: $p < 0.05$ to pre-feeding values.

均ペプチド鎖長に著しい変化はないとした前回の報告とは異なる。その理由は、これまで投与ペプチドの平均鎖長を3.3と考えて血清を除たん白処理したため、平均鎖長7.8のペプチドの大部分が沈澱部に移行していたことによると思われる。

以上の結果から、比較的大量のペプチドを摂取した場合、そのかなりの部分は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、吸収されるものの、一部はそのままペプチドとして血流に入ると考えた。

今回我々は bolus-feeding 法による食餌投与前後の血中遊離アミノ酸及びペプチドの経時変化を検討し、比較的大量のペプチドを摂取するとその一部はペプチドのままで血流に入ること、また同時にペプチドの平均鎖長も変化することを明らかにした。しかし今回の実験は例数も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) 新山喜昭, 真鍋祐之(1991): 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. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **12**, 95-98.
- 3) Noguchi T, Nishizawa N, Itoh M, Yamaguchi Y, Hareyama S and Naito H (1981): Acid soluble peptides in rat skeletal muscle. *Agric Biol Chem*, **45**, 2265-2272.
- 4) Habeeb AFSA (1966): Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzensulfonic acid. *Anal Biochem*, **14**, 328-336.