

# 大豆たん白質がマウスのコレステロール胆石形成に及ぼす影響

EFFECT OF DIETARY SOY PROTEIN ISOLATE ON THE FORMATION OF CHOLESTEROL GALLSTONE IN MICE

辻 啓介(国立健康・栄養研究所)

Keisuke TSUJI

National Institute of Health and Nutrition, Tokyo 162

## ABSTRACT

The interrelationship between dietary protein and cholesterol gallstone formation was studied in ICR-mice. Male mice were fed one of the 10~20% protein diets containing 0.5% cholesterol and 0.25% cholate for 4-5 weeks. Animals fed 20% casein diet induced the high incidence of cholesterol gallstone than those fed 10% casein diet. Soy protein isolate (SPI) could not show any changes in gallstone formation. However, SPI suppressed the increment of serum (LDL+VLDL) cholesterol levels and atherogenic index. Fecal excretion of bile acids was increased by SPI feeding. Milk whey isolate showed a significant repress against the increments of total cholesterol concentration in serum and liver, and lithogenic effect by the casein and cholesterol feeding. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **14**, 53-59, 1993.

既に種々の動物を用いて実験的にコレステロール(Chl)胆石を形成させる研究が行われているが、人と同様の胆汁濃縮機能を有する胆嚢を持つ点でマウスはモデル動物としての利点を有している。Teppermanら<sup>1)</sup>はマウスにChlと胆汁酸を負荷した飼料でChl胆石を高率に形成する方法を見出した。しかしこの方法は特殊な薬物が用いられており、栄養実験に不可欠な半純化飼料での報告例はなかった。辻ら<sup>2)</sup>はラットにChlとコール酸を負荷して高Chl血症を惹起するのとはほぼ同条件で、マウスに胆石を高率に誘発する飼料を開発し、詳細な栄養条件の検討を可能にした。この実験方法で、マウスの系統差<sup>3)</sup>、飼料中の油脂の重要性<sup>2)</sup>、あるいはメチオニン<sup>3)</sup>やタウリン<sup>4-7)</sup>の抗胆石作用が見い出され、人胆石生成との栄養的類似性が高いことも明らかとなってきた。

一方、食事たん白質の種類は血清Chlレベルへの影響に関する研究は既に多数あり、動物性たん白質よりは植物性たん白質での血清Chl値の低値がよく知られている<sup>8)</sup>が、Chl胆石への影響についての研究はほと

んど報告されていない<sup>9)</sup>。

そこで本研究では、乳カゼインを対照として分離大豆たん白質(SPI)並びに乳ホエー、卵、小麦グルテンの各たん白質を栄養源としたときの、マウスの血清、肝臓、胆嚢のChl含量や胆石形成に及ぼす影響を調べた。

## 実験方法

実験動物としては日本クレア(株)から購入したICR系の4~5週齢の雄性マウスを1群10匹として用いた。基本飼料としては、カゼイン10~20%、大豆油あるいはコーン油10%、AIN-76<sup>TM</sup>組成のミネラル混合3.5%、同じくビタミン混合1%、酒石酸コリン0.2%とし、これにChl0.5%とコール酸ナトリウム(CA)0.25%を添加したものを対照のChl飼料とした。被験飼料の各たん白質源はTable 1に示したメーカーから入手したもので、たん白質レベルが76.3~90.0%の範囲であった。これらを10~20%レベルとし、一部は20%カゼインを5~20%SPIで置換した飼料を調製した。

飼料および飲料水は自由摂取とし、4～5週間飼育した。飼料摂取量は週1回、体重は週3回測定した。飼育終了前2日間は糞を採取した。解剖時に胆石の有無を観察し塩尻の指標で分類後、胆嚢を摘出し分析した。

血清、肝臓および胆嚢の脂質と胆汁酸の定量は酵素法で定量した。

## 実験結果

### 実験1, 2

#### 各種たん白質の10%と20%レベルにおける胆石形成の比較

ICR系雄マウス4週齢を用い、各実験とも6群で各群10匹とした。たん白質源としては、カゼイン、SPI、SPI+Met、全卵たん白、大麦グルテンの5種類を用いた。これらを10%と20%になるよう半純化飼料に加えて5週間自由に摂取させた。

20%たん白群では10%群と比べて胆石形成率は著しく高かった。20%群ではカゼイン(85%), SPI+Met(60%), SPI(40%), 全卵(30%), グルテン(20%)の順に胆石形成率が低下した。10%群では全卵(30%), カゼイン(10%), SPI(10%), グルテン(10%)群に胆石が認められた。全胆嚢Chl量もほぼこれらの順に推移した(Figs. 1, 2)。血清総Chl量は逆に10%群で20%群よりも高値を示し、胆石形成率と逆相関を示した。一

Table 1. Composition of basal diets (%)

Constituents	Exps. 1 and 2	Exp. 3
Soybean oil	10	0
Corn oil	0	10
Salt mixture <sup>1</sup>	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>1</sup>	1.2	1.2
Choline chloride	0.15	0.15
Cellulose	3	3
Cholesterol	0.5	0.5
Na-cholate	0.25	0.25
Casein <sup>2</sup>	0~20	5~20
SPI <sup>3</sup>	10~20	5~20
Other protein <sup>4</sup>	10~20	10
Sucrose	to make 100	

<sup>1</sup>AIN-76™ (1977) <sup>2</sup>Oriental Yeast Ind. Co. Ltd.  
<sup>3</sup>Fuji Oil Co. With or without 0.3% Met.  
<sup>4</sup>Purified whole egg protein (Taiyo Chem. Co. Ltd.), wheat gluten (Tokyo Kasei Ind. Co. Ltd.), whey protein: milk whey protein isolate (Morinaga Milk Co. Ltd.).

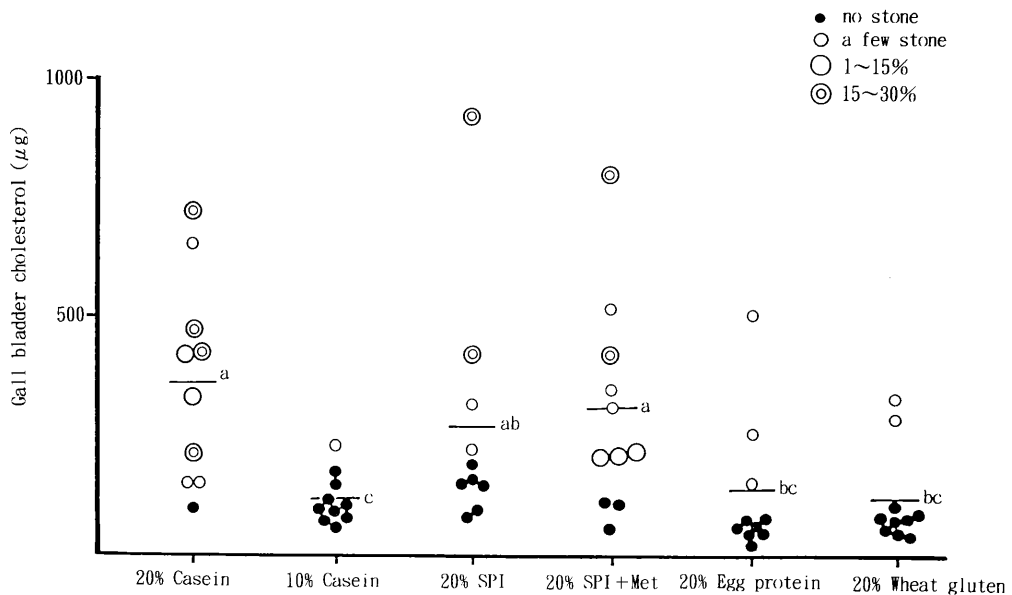


Fig. 1. Interrelationships between gall bladder cholesterol concentration and dietary protein sources (Exp. 1).

方, HDL-Chl は胆石形成率と正相関を示した。また肝 Chl 量は濃度, 総量共に10%群が20%群よりも高値であった。

以上のようにマウスへの Chl 負荷は組織によりレ

スポンズが異なり, 20%レベルで胆石形成が高率であった。

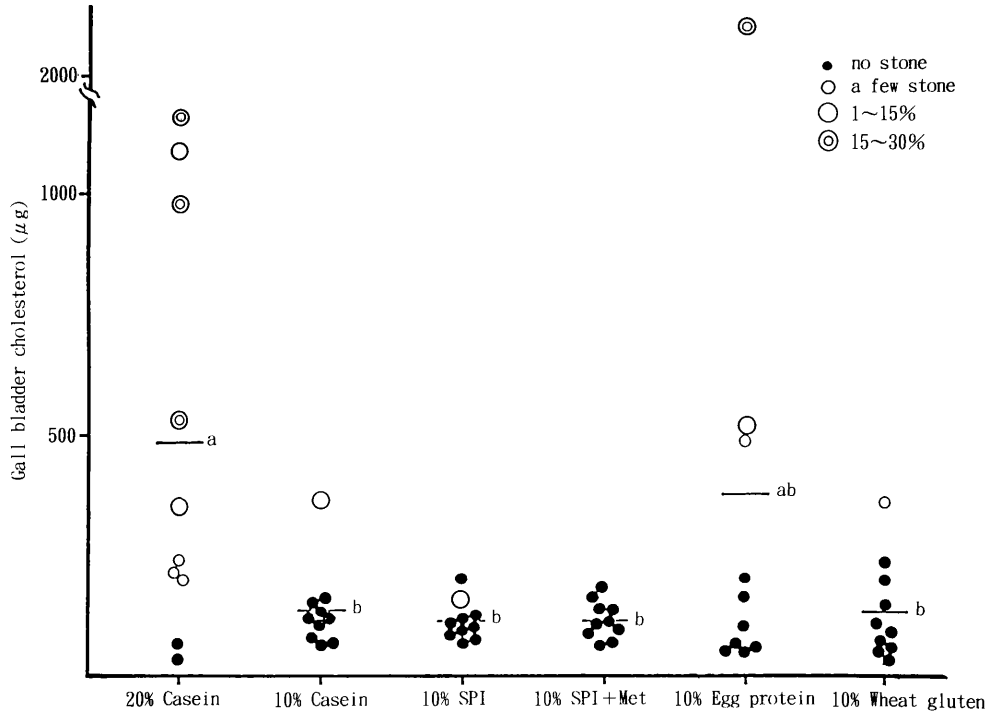


Fig. 2. Interrelationships between gall bladder cholesterol concentration and dietary protein sources (Exp. 2).

Table 2. Effects of dietary protein on serum lipid levels in cholesterol fed mice

Dietary group	Cholesterol				Triglyceride	Phospholipid
	Total	HDL	VLDL+LDL	A. I. <sup>2</sup>		
20% Casein	196 ± 9 <sup>b1</sup>	114 ± 3 <sup>d</sup>	82.2 ± 11.8 <sup>a</sup>	0.747 ± 0.126 <sup>a</sup>	66.1 ± 6.3 <sup>b</sup>	244 ± 7.66 <sup>bc</sup>
5% SPI	199 ± 11 <sup>b</sup>	134 ± 5 <sup>bc</sup>	64.6 ± 9.8 <sup>a</sup>	0.489 ± 0.082 <sup>b</sup>	63.5 ± 4.8 <sup>b</sup>	249 ± 9.98 <sup>ab</sup>
10% SPI	164 ± 9 <sup>c</sup>	127 ± 11 <sup>bcd</sup>	37.8 ± 11.2 <sup>b</sup>	0.720 ± 0.310 <sup>ab</sup>	54.0 ± 4.1 <sup>c</sup>	264 ± 21.44 <sup>ab</sup>
15% SPI	222 ± 12 <sup>a</sup>	154 ± 5 <sup>a</sup>	68.9 ± 11.2 <sup>a</sup>	0.455 ± 0.073 <sup>b</sup>	46.3 ± 5.0 <sup>d</sup>	265 ± 9.50 <sup>a</sup>
20% SPI	212 ± 11 <sup>ab</sup>	143 ± 5 <sup>b</sup>	68.5 ± 8.1 <sup>a</sup>	0.480 ± 0.060 <sup>b</sup>	43.8 ± 2.0 <sup>d</sup>	259 ± 9.63 <sup>ab</sup>
10% Whey	154 ± 6 <sup>c</sup>	125 ± 5 <sup>c</sup>	28.2 ± 4.6 <sup>b</sup>	0.232 ± 0.041 <sup>c</sup>	95.5 ± 12.2 <sup>a</sup>	233 ± 3.12 <sup>c</sup>

- 1) Mean ± SE of 10 mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).
- 2) Atherogenic index: Cholesterol ratio of (VLDL+LDL)/HDL

### 実験 3

#### 分離大豆たん白質とカゼインとの摂取比率がマウスの Chl 胆石形成率に及ぼす影響

ICR 系の雄マウス60匹を6群に分け、カゼインとSPIの組成を合計20%になるように構成した5種の飼料あるいは10%カゼイン+10%乳ホエー分離たん白質(以下ホエー)飼料を与え、4週間飼育した。

飼料摂取量は、20%群 SPI 群が最高値を示し、対照の20%カゼイン群がもっとも低値を示した。しかし、体重増加量はホエー群が最高値を示し、もっとも飼料を多く摂取した20% SPI 群が有意に低値を示した。

血清脂質の結果を Table 2 に掲げた。血清総 Chl 値は15% SPI 群が222 mg/dL ともっとも高値を示し、対照のカゼイン群に対して有意差がみられた。一方、10% SPI 群とホエー群は対照群に対して有意に低値を示した。また(VLDL+LDL)-Chl 値もほぼ同様の傾向を示した。血清 HDL-Chl 値では、15% SPI 群がもっとも高値で、対照群に対して有意に高値を示した。動脈硬化指数(AI)では、対照群がもっとも高値を示し、10% SPI 以外は有意に低値を示し、とくにホエー群に改善がみられた。中性脂肪値は、SPI 群で飼料への SPI 添加量が増すにつれて低下したが、ホエー群では有意に高値を示した。

Table 3 では肝臓の湿重量や肝脂質含量を示した。肝臓は明らかに腫大し、色調も白色を呈していた。対体重肝臓重量比は、対照群がもっとも高値を示し、ホエー群が有意に低値を示した。肝臓の Chl 量はカゼイン群がもっとも高値を示し、SPI が増すにつれて低値となり、20%群で有意差がみられ、またホエー群も有意に増加が抑制された。しかし、肝臓の中性脂質とリン脂質は互いに逆の傾向を示した。

Chl 胆石を形成したマウスはカゼインと SPI の5群で高率で50~60%であった。しかしホエー群は0%であった。全胆嚢の Chl 量はほぼ胆石形成率と比例し、ホエー群のみが有意に低値を示した。また、その量と胆嚢中に胆石が占める割合を示す胆石形成指数との関連(Fig. 3)は、Chl 量の多い個体では胆石形成指数が高くなった。しかし、胆嚢胆汁酸量は Chl と比例しなかった。両者の比率(Chl/BA 比)は20% SPI 群で高値であった。

代謝ケージに収容して採取した糞の重量、Chl 量、胆汁酸量を Table 4 に掲げた。1日あたりの乾燥糞重量は、0.30~0.36 g の範囲であった。1日あたりの糞中総 Chl 排泄量と摂取量に対する排泄率は、20% SPI 群がもっとも高値を示した。1日あたりの糞中胆汁酸の排泄量と排泄率は、ホエー群と20% SPI 群とが他群

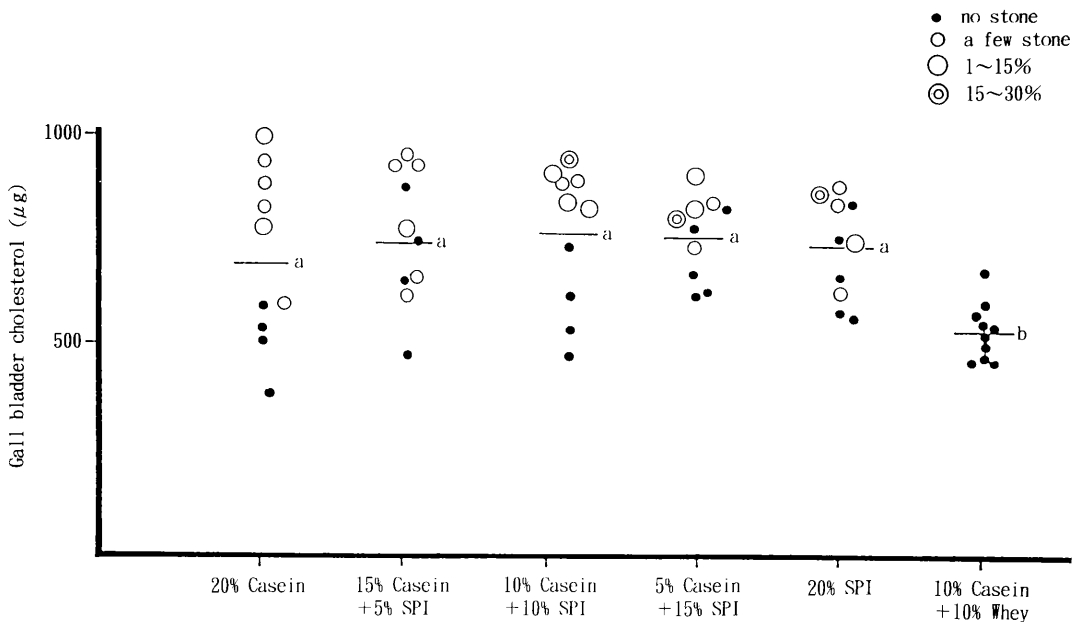


Fig. 3. Interrelationships between gall bladder cholesterol concentration and dietary protein composition (Exp. 3).

Table 3. Effects of dietary protein on liver weight and liver lipids in cholesterol fed mice

Dietary group		Liver weight		Cholesterol		Triglyceride		Phospholipid	
		<i>g</i>	<i>% of BW</i>	<i>mg/g</i>	<i>mg/liver</i>	<i>mg/g</i>	<i>mg/liver</i>	<i>mg/g</i>	<i>mg/liver</i>
20%	Casein	3.16±0.18 <sup>a1</sup>	8.50±0.60 <sup>a</sup>	38.8±1.4 <sup>a</sup>	122.3±7.9 <sup>a</sup>	16.62±0.97 <sup>c</sup>	52.1±3.7 <sup>c</sup>	34.4±0.2 <sup>d</sup>	108.7±6.3 <sup>b</sup>
5%	SPI	3.16±0.24 <sup>a</sup>	8.37±0.56 <sup>a</sup>	36.5±1.0 <sup>bc</sup>	115.4±9.3 <sup>ab</sup>	14.20±0.61 <sup>d</sup>	44.9±4.0 <sup>c</sup>	34.5±1.0 <sup>cd</sup>	108.0±7.0 <sup>b</sup>
10%	SPI	2.99±0.13 <sup>a</sup>	7.91±0.25 <sup>a</sup>	38.7±0.7 <sup>a</sup>	115.8±5.8 <sup>a</sup>	16.13±1.29 <sup>d</sup>	48.1±4.3 <sup>c</sup>	35.4±0.8 <sup>cd</sup>	105.0±3.4 <sup>b</sup>
15%	SPI	3.08±0.11 <sup>a</sup>	8.19±0.23 <sup>a</sup>	36.5±1.0 <sup>bc</sup>	112.1±4.0 <sup>ab</sup>	20.13±1.13 <sup>b</sup>	62.0±4.0 <sup>b</sup>	35.9±0.6 <sup>c</sup>	110.2±4.1 <sup>b</sup>
20%	SPI	3.01±0.11 <sup>a</sup>	8.38±0.41 <sup>a</sup>	35.4±0.9 <sup>c</sup>	105.8±3.5 <sup>b</sup>	20.81±1.25 <sup>b</sup>	63.0±4.9 <sup>b</sup>	45.1±1.3 <sup>b</sup>	136.4±7.9 <sup>a</sup>
10%	Whey	2.65±0.08 <sup>b</sup>	6.88±0.14 <sup>b</sup>	37.2±0.8 <sup>b</sup>	98.7±3.3 <sup>c</sup>	35.05±2.32 <sup>a</sup>	93.2±7.1 <sup>a</sup>	54.6±0.6 <sup>a</sup>	145.0±4.9 <sup>a</sup>

1) Mean±SE of 10 mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 4. Effects of dietary protein on food intake, fecal weight and sterol concentrations in cholesterol fed mice

Dietary group		Intake			Feces				
		Food	Chl	Na-choleate	Dry wt	Chl	BA		
		<i>g/day</i>	<i>mg/day</i>	<i>mg/day</i>	<i>g/day</i>	<i>mg/day</i>	<i>% of intake</i>	<i>μmol/day</i>	<i>% of intake</i>
20%	Casein	3.88	19.4±0.8 <sup>c1</sup>	22.5±0.9 <sup>c</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	13.6±0.6 <sup>b</sup>	70.5±2.5 <sup>ab</sup>	6.07±0.32 <sup>c</sup>	27.2±1.3 <sup>bc</sup>
5%	SPI	4.01	20.1±0.4 <sup>bc</sup>	23.3±0.5 <sup>bc</sup>	0.32±0.01 <sup>b</sup>	13.2±0.4 <sup>b</sup>	65.9±1.4 <sup>c</sup>	5.82±0.23 <sup>c</sup>	25.0±0.8 <sup>c</sup>
10%	SPI	4.10	22.0±0.4 <sup>a</sup>	25.5±0.5 <sup>a</sup>	0.35±0.02 <sup>a</sup>	14.3±0.9 <sup>ab</sup>	65.1±3.7 <sup>bc</sup>	6.99±0.32 <sup>b</sup>	24.9±2.7 <sup>c</sup>
15%	SPI	4.11	20.5±0.5 <sup>bc</sup>	23.9±0.6 <sup>bc</sup>	0.32±0.01 <sup>b</sup>	11.6±0.5 <sup>c</sup>	56.7±2.0 <sup>d</sup>	7.07±0.32 <sup>b</sup>	29.5±0.8 <sup>b</sup>
20%	SPI	3.88	20.9±0.6 <sup>b</sup>	24.3±0.6 <sup>b</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>	15.6±1.2 <sup>a</sup>	74.5±5.0 <sup>a</sup>	10.68±0.80 <sup>a</sup>	43.6±2.5 <sup>a</sup>
10%	Whey	4.11	20.3±0.1 <sup>bc</sup>	23.6±0.1 <sup>bc</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	13.2±0.4 <sup>b</sup>	64.8±2.0 <sup>c</sup>	10.77±0.24 <sup>a</sup>	45.6±1.0 <sup>a</sup>

1) Mean±SE of 10 mice. Values given in each column not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

に比し有意に高値であった。

## 考 察

植物たん白質がハムスターの Chl 胆石形成の抑制効果を持つことは既に報告されている<sup>9)</sup>が、この条件は肝臓 Chl の合成抑制によるものとされている。マウスの Chl 吸収促進による Chl 胆石は血清 Chl 代謝との相関が高く、従来の著者らの多数の実験結果では Chl 胆石形成への影響に好都合な条件と考えられた。

実験 1, 2 で飼料たん白質レベルが10%よりも20%で高率に胆石を形成することが明らかとなった。

実験 3 では20%たん白質レベルで、カゼインに対する SPI と乳ホエーの比較検討を行なった。SPI では添加量の違いによって血清 Chl 値の低下作用は徐々に強くなり、20% SPI 群で動脈硬化指数の改善が認められた。また血清総 Chl 量、(VLDL+LDL)-Chl 量はホエー群が対照群に対して有意に低値を示したが、HDL-Chl 量では有意な高値を示さなかった。肝臓 Chl 量は20% SPI 群とホエー群とが低値を示した。これより、ホエーには強い Chl 改善作用があることが既報<sup>10)</sup>のとおり確かめられ、しかも胆石形成にも有意な阻止作用が観察された。その理由の一端として、糞へのステロール排泄促進が推定された。しかし糞中総 Chl 量と排泄率は20% SPI が高値を示し、ホエーは中間値を示したが、糞中総胆汁酸値と排泄率においてはホエーが一番高値を示した。これらの成績からホエーの Chl 胆石形成抑制作用は、全体的な Chl 代謝改善によるものであり、そのメカニズムの一部は難消化性ペプチドの糞への胆汁酸排泄促進によることが支持された。一方、SPI はラットやウサギでの成績とは異なり、マウスでの血清 Chl 低下作用があまり明白ではなく、動物の種差<sup>11)</sup>の重要性が示唆された。

本研究で明らかとなった Chl 胆石形成に及ぼす食餌たん白質の効果は、たん白質のアミノ酸組成の面から考えてみると、カゼインや SPI に共通して不足するアミノ酸として含硫アミノ酸がある。カゼインでは Met 添加によって胆石形成が抑制された<sup>3)</sup>が、SPI への添加では今回効果が認められなかった。

このように、たん白質に含まれる含硫アミノ酸が Chl 胆石形成に重要であることはかなり理解される。しかし、ホエーでは含硫アミノ酸はカゼインよりは若干多いが、充分量ではなく、今回の結果を含硫アミノ酸だけでは全般的に説明しきれない。

以上、マウスにおける食餌たん白質の Chl 胆石形成への影響は、必ずしも血清 Chl レベルと密接な相関は示さなかった。その理由は血清 Chl レベルに及ぼす

Chl 代謝の主な機構には少なくとも数種類あり、さらに胆汁酸代謝を介しての複雑な相互作用があり、Chl 胆石形成との間には必ずしも同様なメカニズムで関与しているとは限らないためと推定される。しかし、飼料たん白質から生じる難消化性ペプチドと構成アミノ酸の含硫アミノ酸が重要であることは本研究を通じてかなりはっきりしてきた。今後食餌たん白質の種類や量あるいは構成アミノ酸との関係について、さらに詳しく検討することが望まれる。

## 文 献

- 1) Tepperman J, Caldwell FT and Tepperman HM (1964): Induction of gallstones in mice by feeding a cholesterol-cholic acid containing diet. *Am J Physiol*, **206**, 628-634.
- 2) 辻 啓介, 山中優美子, 市川富夫, 中川靖枝, 松浦裕子, 河村雅子(1983): マウスの Cholesterol 胆石形成に及ぼす食餌 Taurine の影響. 含硫アミノ酸, **6**, 249-255.
- 3) 中川靖枝, 辻 啓介, 河村雅子, 猪俣美知子, 市川富夫(1986): マウスの Cholesterol 胆石形成に及ぼす Methionine の抑制作用. 含硫アミノ酸, **9**, 227-232.
- 4) 中川靖枝, 河村雅子, 辻 啓介, 山中優美子, 市川富夫(1984): マウスの Cholesterol 胆石形成に及ぼす食餌 Taurine レベルの影響. 含硫アミノ酸, **7**, 265-271.
- 5) Yamanaka Y, Tsuji K, Ichikawa T, Nakagawa Y and Kawamura M (1985): Effect of dietary taurine on cholesterol gallstone formation and tissue cholesterol contents in mice. *J Nutr Sci Vitaminol*, **31**, 225-232.
- 6) Yamanaka Y, Tsuji K and Ichikawa T (1986): Stimulation of chenodeoxycholic acid excretion in hypercholesterolemic mice by dietary taurine. *J Nutr Sci Vitaminol*, **32**, 287-296.
- 7) Nakamura-Yamanaka Y, Tsuji K and Ichikawa T (1987): Effect of dietary taurine on cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase activity in the liver of mice fed a lithogenic diet. *J Nutr Sci Vitaminol*, **33**, 239-243.
- 8) Carroll KK and Hamilton RMG (1975): Effects of dietary protein and carbohydrate on plasma cholesterol levels in relation to atherosclerosis. *J Food Sci*, **40**, 18-23.
- 9) Kritchevsky D and Klurfeld DM (1979):

- Influence of vegetable protein on gallstone formation in hamsters. *Am J Clin Nutr*, **32**, 2174-2176.
- 10) 長岡光徳, 金丸義敬, 葛谷泰雄(1993): 乳清タンパク質の血清コレステロール低下作用. 牛乳成分の特性と健康, 日本栄養・食糧学会監修, 光生館, 東京 pp.57-84.
- 11) 林 伸一, 中川美和子, 寺崎早苗, 滝沢浩子, 宮崎陽一(1992): 各種動物の血漿コレステロール濃度とステロイド排泄率に及ぼす食餌たん白質の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **13**, 101-104.