

正常および傷害腸粘膜における大豆ペプチド吸収について — 平均ペプチド鎖長の異なる2種の大豆ペプチドによる検討 —

ABSORPTION OF TWO TYPES OF SOYBEAN PEPTIDES FROM EVERTED SACS OF NORMAL AND INJURED RAT SMALL INTESTINE

馬場忠雄・全 活・佐々木雅也・細田四郎（滋賀医科大学第二内科）

Tadao BAMBA, Hwal CHUN, Masaya SASAKI and Shiro HOSODA
Department of Internal Medicine, Shiga University of Medical Science, Otsu
520-21

ABSTRACT

In this study the difference of absorption of two types of soybean peptides (small peptide, SP and large peptide, LP) was investigated by using sacs of everted rat jejunum. The everted sacs were incubated for 5 and 10 minutes in bicarbonate-saline buffer containing 1% of each soybean peptide. After the incubation, the amounts of free amino acids and peptides which were transported to the serosal fluids and the mucosa were measured by the automatic amino acid analyzer (Hitachi L-8500) both before and after the hydrolysis of the serosal fluids and mucosa. The result of the present experiment indicated that SP was absorbed more rapidly than LP, and the rapid absorption of SP was due to the larger amount of the intact transport of the peptides in SP. When the everted sacs were made from the rat jejunum which was injured with intraperitoneal injection of cyclophosphamide (300 mg/kg), no significant differences were noted between the absorption of SP and that of LP. We also showed the fact that aminopeptidase inhibitor (Bestatin[®]) decreased the aminopeptidase activities of the rat jejunum. In the presence of 1×10^{-4} M of Bestatin in the incubating buffer, SP was absorbed more rapidly than LP, although smaller amount of both soybean peptides tend to be transported into the everted sacs than in the absence of Bestatin. We conclude that SP can be absorbed more rapidly than LP by rat jejunum in injured intestine as well as in normal intestine. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **15**, 63-69, 1994.

摂取されたたん白質は、胃・十二指腸において消化を受けた後、腸内でオリゴペプチドおよびアミノ酸の混合物となる。オリゴペプチドは小腸刷子縁膜のアミノペプチダーゼにより加水分解されてアミノ酸、ジペプチド、トリペプチドとなり、アミノ酸のみならず、ジペプチド、トリペプチドがそのままの形で膜輸送されることが知られている¹⁾。また、ジおよびトリペプチ

ドの吸収の方がアミノ酸の吸収よりも速やかで、しかも高濃度に達することが示されている²⁾。我々はさらに刷子縁膜酵素、輸送担体の点からもペプチド栄養の有効性を確認している^{3,4)}。

今回、我々は、平均ペプチド鎖長の異なる2種類の大豆ペプチドを用いて、ラット小腸反転腸管によるペプチドの吸収を検討した。また、サイクロフォスファ

マイド（以下、CPM）を用いて作成したラット傷害腸管におけるペプチドの吸収を検討した。さらにアミノペプチダーゼインヒビター（ベスタチン）存在下における大豆ペプチドの反転腸管による吸収も検討した。

方 法

実験動物

Wistar 系雄ラット250～300 g を実験動物として使用した。市販固形飼料（CE-2, 日本クレア）および水の自由摂取下にて、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明暗コントロールを8 am より 8 pm までの12時間サイクルの条件にて飼育した。

反転腸管の作成およびペプチド吸収実験

Wilson & Wiseman の方法⁵⁾に従って作成した反転腸管を吸収実験に用いた。反転腸管を small peptide（製品名 ハイニュート PM, 以下 SP, 不二製油（株））、および large peptide（製品名 ハイニュート D3, 以下 LP, 不二製油（株））の、2種類の大豆ペプチド（組成を Table 1 に示す）を各1%含む緩衝液（133 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 3.2 mM CaCl_2 , 16.3 mM NaHCO_3 , 1.8 mM NaH_2PO_4 , 0.21 mM MgCl_2 , 7.7 mM glucose）中において、95% $\text{O}_2 \cdot 5$

% CO_2 下に、 37°C にて、5分間および10分間各々インキュベートした。インキュベーション後直ちに氷冷、等張マンニトール液にて水洗し、漿膜液、腸粘膜を採取した。得られた漿膜液0.4 mL に10 N HCl 0.6 mL を加え、 110°C 24時間にて加水分解した。加水分解にて得られたアミノ酸を、日立 L-8500 型高速自動アミノ酸分析機にて測定し、漿膜側に吸収されたすべてのアミノ酸とペプチドの総量を測定した。腸粘膜は、緩衝液2 mL を加えた後、ホモジェナイズし、10% trichloroacetic acid を加えて、3,000 rpm にて10分間遠心して除たん白した。得られた上清を、漿膜液と同様の方法にて加水分解を行い、粘膜に取り込まれたアミノ酸とペプチドの総量を測定した。加水分解しない漿膜液、腸粘膜のアミノ酸分析も行い、吸収された遊離アミノ酸を測定した。

吸収されたアミノ酸、ペプチド量は、Lowry 法⁶⁾にて測定したたん白質量あたりで計算した。

サイクロフォスファミド投与法

CPM (300 mg/kg) をラットの腹腔内に投与し、3日後の空腸を用いて、同様の実験を行った。正常ラットおよび CPM 投与後のラット空腸のロイシンアミノペプチダーゼ活性を L-leucyl-3-carboxy-4-hydroxy-

Table 1. The composition of the two types of soybean peptides

	SP	LP		SP	LP
Water (%)	4.4	2.3	Thr	3.8	3.6
Crude protein/dry (%)	90.5	88.7	Tyr	3.5	3.2
Crude ash/dry (%)	6.5	5.6	Phe	5.0	4.9
Total sugar/dry (%)	4.8	4.7	Cys	1.3	1.4
pH (10% solution)	6.9	6.3	Met	1.2	1.1
TCA/cp (%)	99.5	99.5	Val	4.4	3.9
FAA ¹ /dry (%)	10.4	1.0	Ile	4.4	4.0
APL ²	3.2	5.2	Leu	7.2	6.9
			Lys	6.4	6.4
			Trp	1.2	1.1
			His	2.4	2.3
			Asp	12.1	12.2
			Ser	5.3	5.5
			Glu	21.0	23.0
			Pro	5.3	5.2
			Gly	4.0	3.9
			Ala	3.9	3.8
			Arg	7.8	7.6

SP: small peptide

LP: large peptide

anilide を基質としたアミノサリチル酸法⁷⁾, アルカリ
フォスファターゼ活性を Kind-King 法⁸⁾にて測定した。
ベスタチン存在下のペプチド吸収

ベスタチンのアミノペプチダーゼ活性への影響を検
討するために, ラット空腸粘膜のホモジェネート中に,
濃度の異なるベスタチンを加え, ロイシニアミノペ
プチダーゼ活性を測定した。吸収実験には 1×10^{-4} M の
ベスタチンを使用した。

統計学的処理

数値は mean $\pm$ SEM で表記した。統計学的処理は
Student's *t*-test により行い, $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

反転腸管によるペプチドの吸収

ラット反転腸管より吸収されたアミノ酸およびペプ
チドの総量を Fig.1 に示す。漿膜側への取り込み
(serosal fluid) に粘膜への取り込み (mucosal up-
take) を加えたものを総量 (total uptake) とした。イ
ンキュベーション5分後において, SP が吸収された
総量は, LP に比べ有意に高値であった。しかし, 10分
後においては SP および LP の吸収された総量に有意
な差は認められなかった。

吸収されたアミノ酸とペプチドの総量より, 遊離ア
ミノ酸として吸収された総量を差し引いた値を,
intact transport として吸収されたペプチドとした。

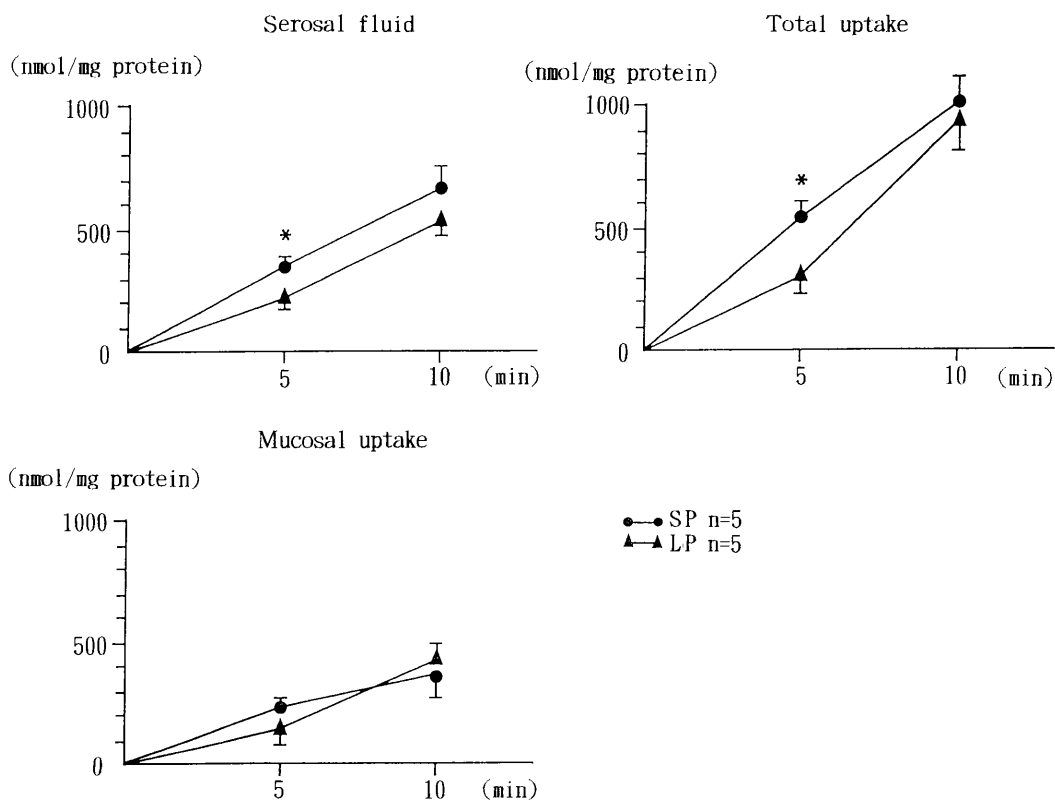


Fig. 1. Time course of absorption of two types of soybean peptides by everted sacs of rat jejunum. SP, small peptide; LP, large peptide. Each point represents mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, significant difference between amount of absorption of SP and LP.

5分後に intact transport により吸収されたペプチドは、SP が LP に比べ有意に高値であった (Fig. 2)。

個々のアミノ酸について検討した結果、いずれも SP において吸収速度が速いという結果であった。

CPM 投与後の腸管の変化

CPM 投与後3日目の空腸粘膜は、control 群に比べて絨毛高の短縮、絨毛の萎縮がみられた。CPM 投与後3日目の体重変化、空腸粘膜のたん白質量、ロイシンアミノペプチダーゼ活性、およびアルカリフォスファターゼ活性を Table 2 に示す。いずれも CPM 投与群で低下していた。

CPM による傷害腸管からのペプチドの吸収

ラットの空腸反転腸管より吸収されたアミノ酸とペプチドの総量および intact transport されたペプチドの総量を Fig. 3 に示す。インキュベート5分後および10分後共に、吸収量は SP と LP との間に有意差は認められなかった。intact transport されたペプチドの総量にも有意差は認められなかった。

ベスタチン存在下のペプチドの吸収

ベスタチン存在下のロイシンアミノペプチダーゼ活性を Fig. 4 に示す。ベスタチンにより、濃度依存性の活性低下が認められた。ベスタチン 1×10^{-4} M を含む緩衝液にて検討したペプチドの吸収は、SP, LP 共に

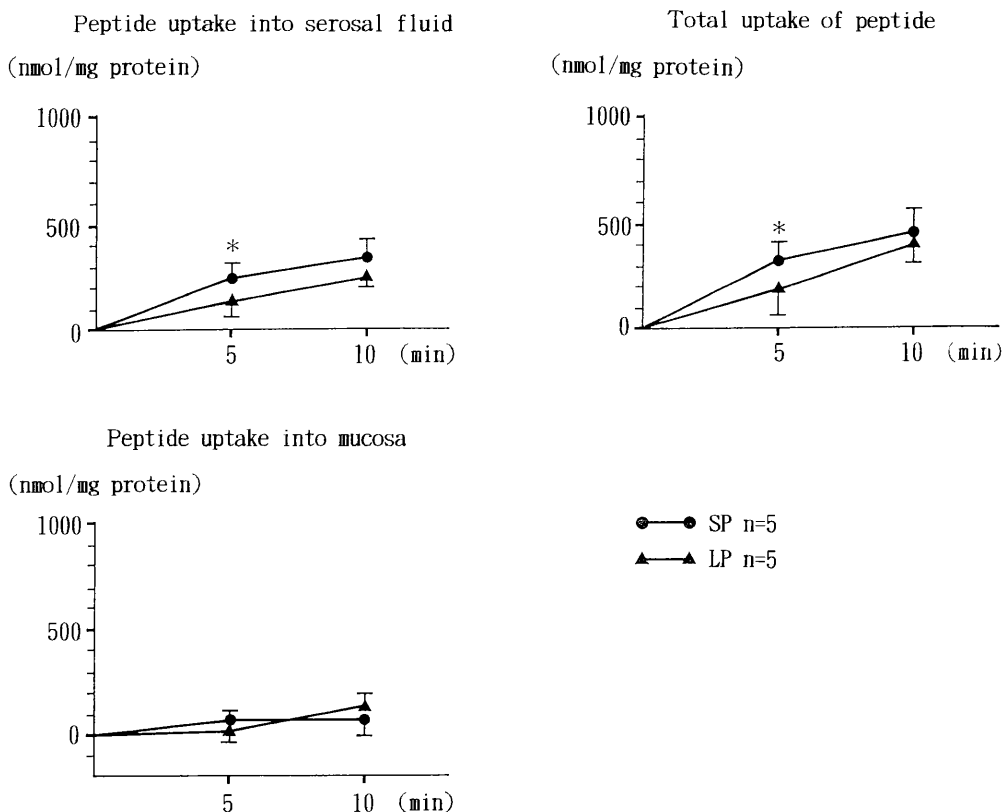


Fig. 2. Intact transport of two types of soybean peptides from everted sacs of rat jejunum. SP, small peptide; LP, large peptide. Each point represents mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, significant difference between amount of absorption of SP and LP.

Table 2. The effect of CPM on body weight and mucosal parameters

Group	Body weight change (g/3 days)	Mucosal wet weight (mg)	Mucosal protein (mg/cm)	Alkaline phosphatase (IU/g protein)	Leucine aminopeptidase (IU/g protein)	Maltase (IU/mg protein)
Control	7.8±1.8	453±49	2.62±0.52	1129±177	86.2±4.0	0.32±0.05
CPM	-35.5±2.6**	362±30**	2.25±0.19	826±111	57.8±9.3*	0.22±0.04**

CPM: cyclophosphamide. The values are expressed as mean ± SEM of five observations. Significant difference between control and CPM group; *p<0.05, **p<0.01.

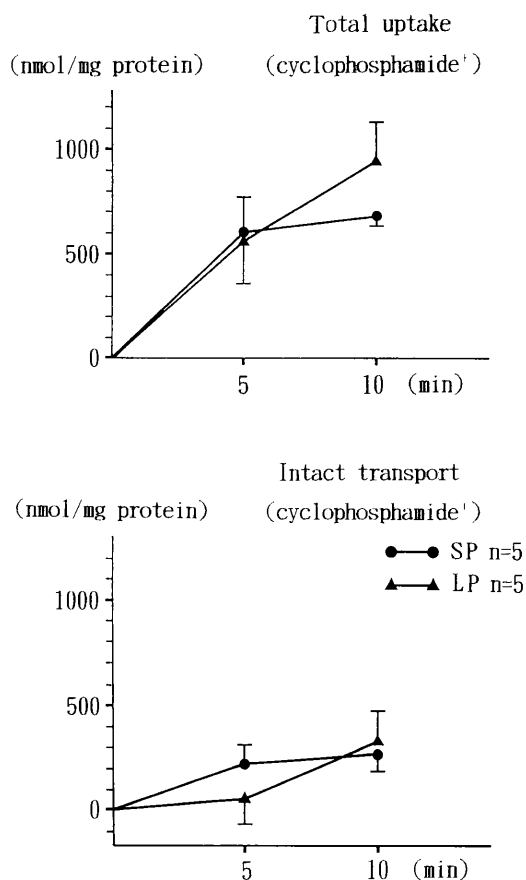


Fig. 3. Time course of absorption of two types of soybean peptides by everted sacs of jejunum of rats 3 days after intraperitoneal injection of CPM. SP, small peptide; LP, large peptide. Each point represents mean ± SEM. *p<0.05, significant difference between amount of absorption of SP and LP.

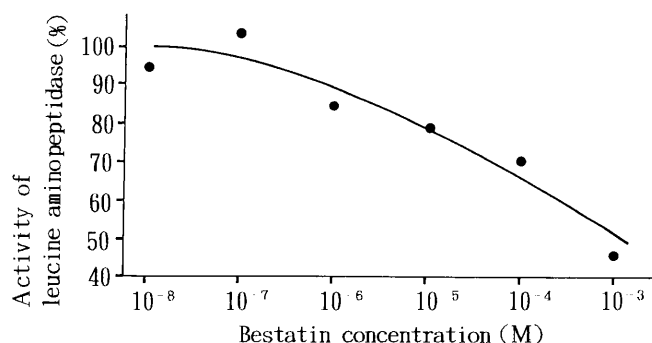


Fig. 4. The effect of Bestatin on leucine aminopeptidase activity of rat jejunum.

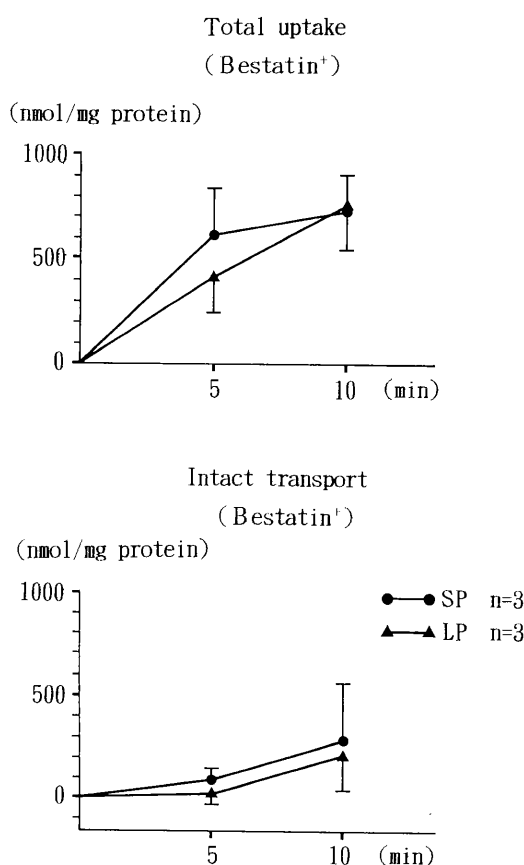


Fig. 5. Time course of absorption of two types of soybean peptides by everted sacs of rat jejunum in the presence of Bestatin (1×10^{-4} M) in the buffer. SP, small peptide; LP, large peptide. Each point represents mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, significant difference between amount of absorption of SP and LP.

正常腸管に比べ少ない傾向が認められた。5分後において SP が速やかに吸収される傾向が認められたが、5分後、10分後共に有意な差はなかった (Fig. 5)。また intact transport されたペプチドの総量にも有意差は認められなかった。

考 察

ラット反転腸管において吸収される大豆ペプチドの吸収速度は LP にくらべ SP で有意に亢進していた。この吸収速度の差は、intact transport により吸収されるペプチドの吸収速度の差に起因すると考えられた。ペプチドでの吸収はアミノ酸のみの吸収よりも速やかに行われることが知られているが²⁾、今回、大豆ペプチドを用いた吸収実験においても、ジペプチド、トリペプチドを主体とした低分子ペプチドの速やかな吸収が確認された。

我々は CPM により傷害を受けた空腸ではペプチド輸送機能は維持されるが、遊離アミノ酸の吸収は低下することを報告している⁹⁾。今回の実験においては、アミノペプチダーゼ活性の低下やアミノ酸輸送系の傷害などにより、SP, LP いずれにおいてもペプチドの吸収が低下したのと考えられ、両群に差はなかった。

ベスタチンは、競合的にジペプチドの加水分解を阻害し、また非競合的にジペプチドの吸収を阻害することが知られている¹⁰⁾。In vitro においてベスタチンは、Gly-L-Leu や Gly-L-Val などのジペプチドの加水分解を阻害することが示されている¹⁰⁾。今回の実験においても、ベスタチン濃度依存性にアミノペプチダーゼ活性の低下が確認された。ベスタチン存在下では SP, LP とともに非存在下に比べ吸収が低下していた。今回有意差は認めないものの、アミノペプチダーゼ活性による膜消化が低下した条件下では、やはり、低分子ペプチ

ドの吸収が速い傾向にあった。

以上、正常粘膜、傷害粘膜のいずれにおいても低分子ペプチドが窒素源として有効であると確認された。

結 論

ラット空腸反転腸管を用いた大豆ペプチドの吸収実験より、以下の結果を得た。

1) SP および LP によるペプチドの吸収は、SP でより速やかな吸収が確認された。これは、intact transport によるペプチドの吸収速度の差によるものと考えられた。

2) CPM 投与後のラット腸管においては、SP と LP の吸収に有意な差はなかった。

3) ペスタチン存在下の吸収実験では、SP 群において吸収が速い傾向にあった。

文 献

- 1) Matthews DM (1975): Intestinal absorption of peptides. *Physiol Rev*, **55**, 537-608.
- 2) Claft IL, Deddes D and Matthews DM (1968): Absorption and malabsorption of glycine and glycine peptides in man. *Gut*, **9**, 425-437.
- 3) Sasaki M, Bamba T and Hosoda S (1989): Intestinal brush border membrane enzyme activities of rats fed chemically defined diets containing oligopeptides or amino acids as the nitrogen source. *J Clin Biochem Nutr*, **7**, 231-241.
- 4) Bamba T, Fuse K, Obata H, Sasaki M and Hosoda S (1993): Effects of small peptides as

intraluminal substrates on transport carriers for amino acids and peptides. *J Clin Biochem Nutr*, **15**, 33-42.

- 5) Wilson TH and Wiseman G (1954): The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J Physiol*, **123**, 116-125.
- 6) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall R (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- 7) Shimamoto M, Takewaki S, Sakuraoka S, Nagasawa T, Kuroiwa K, Kodama O and Akatsuka T (1985): Use of L-leucyl-3-carboxy-4-hydroxyanilide as substrate for determining the activity of microsomal aminopeptidase in serum. *Clin Chem*, **31**, 1636-1639.
- 8) Kind PRN and King EJ (1954): Estimation of plasma phosphatase by hydrolysed phenol with amino-antipyrine. *J Clin Path*, **7**, 322-326.
- 9) 細田友則, 馬場忠雄, 細田四郎 (1991): Cyclophosphamide 投与ラット回腸粘膜における各種アミノ酸およびジペプチドの吸収. *日消誌*, **88**, 2837-2846.
- 10) Yasumoto K and Sugiyama K (1980): Perturbation by bestatin of glycyl-L-leucine absorption in isolated epithelial cells from rat intestine. *Agric Biol Chem*, **44**, 1339-1344.