

大豆たん白質の交感神経系刺激作用 —二重標識水法によるエネルギー代謝促進効果の検討—

林 伸一^{*1}・滝沢浩子¹・松藤千弥¹・岩城隆昌²

¹東京慈恵会医科大学大学生化学第二 ²東京慈恵会医科大学実験動物施設

Stimulation of Sympathetic Nervous System by Soy Protein : An Examination of Energy Expenditure of Rats with Doubly Labeled Water Method

Shin-ichi HAYASHI¹, Hiroko TAKIZAWA¹, Senya MATSUFUJI¹ and Takamasa IWAKI²

¹Second Department of Biochemistry, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105

²Laboratory Animal Facilities, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105

ABSTRACT

We tried to examine possible effect of soy protein to stimulate energy expenditure of rats by using the doubly labeled water method, in which the rate of loss of body water labeled with either deuterium or ¹⁸O is determined and the difference in the rate (KO-KD) indicates the rate of CO₂ production. SD rats fed either casein or soy protein isolate (SPI) diet were injected i. p. with 0.5 g each of D₂O and H₂¹⁸O. After either 30 min or 4 days, blood was obtained from cervical artery under anesthesia, and contents of both stable isotopes were measured with mass spectrometer. We obtained results indicating that, in contrast to our expectation, nearly twice amounts of CO₂ were produced by rats fed casein, compared to rats fed SPI. The validity of this result needs to be evaluated under further refined conditions. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 101-104, 1997.

Key words : doubly labeled water method, energy expenditure, soy protein, stable isotopes, rat, mass spectrometry

大豆たん白質の多様な生理効果の中には、抗肥満効果など、交感神経系を介すると考えると理解しやすいものが多い^{1,2)}。エネルギー代謝は交感神経によって促進される。したがって、大豆たん白質摂取がエネルギー代謝を促進するなら、それは交感神経活性化を介してなされる可能性が高い。そこで、ラットのエネルギー代謝に及ぼす大豆たん白質の効果をカゼインのそれ

と比較検討した、エネルギー代謝の測定は二重標識水法を用いて行った^{3,4)}。

材料および方法

H₂¹⁸O は純度100%の標品をユーリテック LTD からヤマグチ商会(東京)を通じて購入した。D₂O はアルドリッチの純度100%の標品を岩井化学薬品(東京)を通じて購入した。実験動物は日本クレアから購入し

*〒105 東京都港区西新橋3-25-8

た SD 系の雄性ラットを用いた。

二重標識水法は生体の二酸化炭素排出量の測定法として比較的古くから用いられている方法である。D₂O の D は水の形でのみ排出されるが、H₂¹⁸O の ¹⁸O は水のほか CO₂ の形でも排出される。したがって D₂O と ¹⁸O の排出速度の差は二酸化炭素排出速度に相当する。5 週齢の SD 系雄性ラットを 25% のカゼインまたは分離大豆たん白質 (SPI) を含む低脂肪実験飼料で 2 週間飼育した後、実験当日は朝から 4 時間絶食ののち、1 匹あたりそれぞれ 0.5 g の H₂¹⁸O と D₂O を腹腔内投与し、30 分後と 4 日後、麻酔下で頸動脈より採血して失血死させた。血液凝固後に遠心分離した血清の ¹⁸O と D の分析を三菱マテリアルに依頼した。試料の同位体比は次式で表される δD 値ならびに δO 値として報告をうけた。たとえば

$$\delta D = \{ (RA/RS) - 1 \} \times 1000 (\text{‰}) \quad (1)$$

ただし、RA、RS はそれぞれ試料と標準水の同位体比である。

(1) を変形して

$$RA = RS \times (\delta D / 1000 + 1) \quad (2)$$

RA 値に 100 を乗じた値が atom percent であり、これ

より標準水のそれを差し引いた値が atom percent excess である。

結 果

両安定同位元素の減少速度の差から二酸化炭素排出速度を以下のようにして求めた。従来の報告と異なるのは濃度ではなく個体内総量の減衰速度を指標として用いたことである。これは 4 日間の期間中にラットの体重が 10 ないし 20% も増加したからである。その結果を Table 1 に示す。同位体投与 30 分後の値を I₀ (初値)、4 日後の値を I としてそれぞれの同位体個体内総量の減衰速度定数 K_D と K_O を次式によってもとめた：

$$K_d = \log I_0 / I \quad (t_2 - t_1) \quad (3)$$

さらに次式：

$$rCO_2 = N' / 2 (K_O - K_D) \quad (4)$$

によって CO₂ 排出速度を計算した (Table 2)。ただし N' は実験期間中の平均体重に 0.6 を乗じて得た体内総水分量である。2 で除しているのは CO₂ 分子がふたつの酸素原子を含むためである。

Table 1. Loss of water doubly labelled with deuterium and ¹⁸oxygen in rats

	N*	Serum D atom % excess (a)	Total D (a×N)	Serum O ¹⁸ atom % excess (b)	Total ¹⁸ O (b×N)
	g				
Casein 30 min	122±3	0.316±0.008	38.6±0.2	0.297±0.05	36.3±0.5
Casein 4 days	146±5	0.102±0.043	15.0±6.1	0.028±0.007	3.97±0.95
SPI 4 days	144±7	0.092±0.011	13.1±0.2	0.046±0.004	6.59±0.46

*N, total amount of body water in grams calculated on the assumption that water represents 60 percent of body weight (body weight×0.6). Four rats were used in each group except for rats fed SPI for 4 days in which five rats were used. Other experimental conditions were described in the text.

Table 2. Determination of the rate of carbon dioxide formation by doubly labelled water method

Dietary protein	K _D	K _O	K _O −K _D	N'*	rCO ₂
				mol	mmol/h
Casein	0.0101	0.0231	0.0130	7.40	42.6
SPI	0.0117	0.0178	0.0061	7.33	22.4

*N', total amount of body water in mols calculated on the assumption that water represents 60 percent of body weight (mean value during the experimental period of 4 days) in the rats used. rCO₂, the rate of CO₂ formation calculated by the equation: rCO₂ = N'/2 (K_O − K_D).

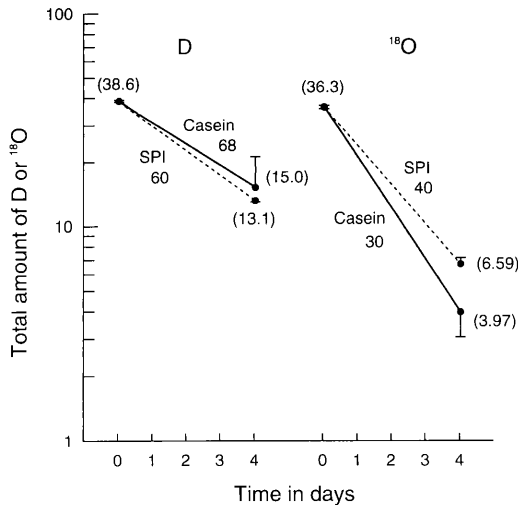


Fig. 1. The rates of loss of water labeled with D or ¹⁸O from rats fed either casein or SPI. Figures without parenthesis indicate half lives (h) measured on the graph.

Fig. 1 は Table 1 のデータを図示したものである。図内の数値は図上で計測した半減期 (h) である。実験結果は予想に反し Table 2 のように casein 群の CO₂ 排出速度が SPI 群のそれに比して 2 倍近い高値であった。

二重標識水法はどのような環境下においても非侵襲的に採取した試料の分析によってエネルギー代謝量を測定できることが大きな利点とされている。とくに日常のライフスタイルのなかで乳幼児や実験動物のエネルギー代謝を測るには有用と思われる。ただし安定同位体の濃度を同位体比質量分析計で測定する必要がある。

問題は本法の精度と再現性である。Table 1 のデータで見る限り、質量分析の精度はかなり高いと思われる。天然の同位体比が 0.2% と高い ¹⁸O の場合、4 日後試料の同位体比は天然のそれを 0.02~0.05% 上まわるにすぎなかったが、データの分散は驚くほど少なかった。今回の委託分析ではすべての血清試料は 100 倍希釈して分析されたが、希釈率を下げれば精度はさらに高まると考えられる。また、本法では KD と KO の差を測るので誤差が増幅する可能性がある。なお、今回はゼロタイムとして腹腔内投与 30 分後を選んだが、この時点での値から体内水分量 (Dilution space) を計算すると体重の 65.9% に相当し、私達の採用した体重の 60% という仮定とほぼ一致した。確認の必要はあるが、投与後 30 分で同位体濃度の平衡化は完了したものと推定される。

いずれにせよ、今回の予備実験の結果はエネルギー代謝測定法として二重標識水法は条件をリファインすれば充分有望であることを示しているが、食餌たん白質の効果に関する予想外の結果の信憑性については今後の検討にまたなければならない。

要 約

大豆たん白質がラットのエネルギー代謝を促進する可能性を二重標識水法を用いて検証しようとした。D₂O と H₂¹⁸O 各 0.5 g を腹腔内に注射し、30 分後とその 4 日後に採血して血清の各同位体濃度を委託測定した。D は水としてのみ排出されるが ¹⁸O は CO₂ としても排出されるので両同位体の排出速度の差として CO₂ 排出速度を求めうる。その結果、予想とは逆にカゼイン食ラットの CO₂ 排出速度が SPI 食ラットのそれより 2 倍近く高値であった。

文 献

- 1) 齊藤昌之(1991)：肥満モデル動物におけるエネルギー代謝と大豆たん白質ペプチド。大豆たん白質栄養研究会会誌, 12, 91-94.
- 2) 原 映子, 志水康武, 浜井盟子, 嶋津 孝(1996)：

高蔗糖食または高脂肪食の長期投与ラットに及ぼす分離大豆たん白質の効果。大豆たん白質研究会誌, **17**, 103-107.

- 3) Lifson N, Gordon GB and McClintock R (1955) : Measurement of total carbon dioxide production by means of D₂O. *J Appl Physiol*, **7**, 704-710.
- 4) Roberts SB, Coward WA, Schlingenseipen K-H,

Nohria V and Lucas A (1986) : Comparison of the doubly labeled water method with indirect calorimetry and a nutrient-balance study for simultaneous determination of energy expenditure, water intake, and metabolizable energy intake in preterm infants. *Am J Clin Nutr*, **44**, 315-322.