

大豆たん白質摂取がエネルギー代謝に与える効果： 小動物を用いた呼吸商の経時的測定

石原健吾・小柳津新一・伏木 亨*

京都大学大学院農学研究科

Effect of Soybean Protein Intake on Energy Metabolism : Measurement of Respiratory Quotient Using Small Laboratory Animals

Kengo ISHIHARA, Shinnichi OYAIZU and Tohru FUSHIKI

Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

The effect of amino acid mixture simulating soybean peptide on oxygen consumption and respiratory quotient of Std ddY mice was investigated for the purpose of examining the anti-obesity effect of soybean protein. The author developed an apparatus to measure the respiratory gas of 6 mice, independently. A gas sampler adjusted the flow line and, in turn, led the respiratory gas from chambers into a mass spectrometry gas analyzer. When flow meters were installed in each line of the sampler, the errors of measured flow rate by each flow meter were nearly 50%. In case a shared flow meter was installed in a shared part of each line, the errors were less than 10%, and there were no effect of the line number on measured oxygen consumption and respiratory quotient. Std ddY male mice fasted for 18 h and were orally administered 500 μ L of 5% amino acid solution simulating soybean peptide. Oxygen consumption was temporarily increased in all groups after administration, and rapidly declined to the value before administration in control, but the acute increase tended to last longer in mice administered soybean amino acid mixture. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 115-121, 2000.

Key words : oxygen consumption, respiratory quotient, energy expenditure

大豆たん白質の摂取は、エネルギー代謝を活性化し、脂肪の蓄積に対して抑制的に作用することが知られている。我々は過去の研究において、マウスに飲料水の代わりに大豆たん白質加水分解ペプチドを摂取させ、週に3回の水泳運動を継続して行うことによって脂肪組織の蓄積量が有意に減少するという結果を得た。こ

の効果は大豆ペプチドを同組成のアミノ酸 (Table 1) に置き換えても失われなかった¹⁾。大豆ペプチドは、コレステロールの再吸収を抑制し²⁾、血中コレステロール濃度を低下させる³⁾作用も知られており、アミノ酸混合物にも同様の効果がある⁴⁾ことから、大豆たん白質組成のアミノ酸水溶液は何らかの作用機序を経てエネルギー代謝に作用すると考えられる。

エネルギー代謝を非侵襲的に測定する方法の 1 つ

*〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町

Table 1. Amino acid composition (%)

	SBAA	Casein
Val	6.25	9.30
Leu	10.58	13.08
Met	1.70	3.77
Trp	1.49	2.15
Arg	12.38	5.13
Gln	34.81	30.32
Ile	6.18	7.41
Lys	10.01	11.18
Phe	7.16	7.14
Thr	5.63	6.47
His	3.81	4.05
Total AA	100	100

に、呼気ガスの分析がある。呼気中の酸素ガス濃度、炭酸ガス濃度、および換気量から、酸素摂取量、呼吸商を算出することによって、体内で酸化された脂質や炭水化物の量が推定できる。実験用小動物の呼気ガス量は僅少であり、精度の高い測定装置が必要である。我々はこれまでにガス分析部に質量分析法を用いた呼気ガス分析装置 (RL-600, アルコシステム社製) で安静時および運動時のマウスの酸素消費量および二酸化炭素産生量が測定できることを明らかにしたが、この装置では同時に1検体の動物しか測定できなかった。

本研究では大豆たん白質のアミノ酸組成が動物のエネルギー代謝に及ぼす影響を測定するために、最大6匹のマウスの呼気ガスを測定できるように装置に改良を加え、大豆たん白質組成のアミノ酸水溶液をマウスに経口投与し呼気ガス成分に対する影響を分析した。

方 法

呼気ガス分析装置の改良

呼気ガス分析装置 (RL-600, アルコシステム製) はガス濃度の測定に質量分析を使用しており、装置は、質量分析部及び導入部、制御用コンピューターから構成される。チャンバーはマウスが入る大室とガスを攪拌するための小室の2室よりなり、前者内部のガスは後者にて攪拌され均一化された後、内径約5 mmのゴムホースを経由して質量分析部に導入される。質量分析部は1日1回、CO₂ 3%; O₂ 15%; N₂ バランス、O₂ 18%; N₂ バランスの2種の校正ガス (住友ガス製) を

用い、校正を行った後使用した。

同時に測定できる検体数を増やすために、チャンバーと導入部の経路上に回路切り替え機 (サンプラー, アルコシステム製) を設けた。サンプラーに6個のチャンバーおよび大気導入用のホースを接続し、各チャンバーとサンプラーを接続するホースの長さは全て等しくした。サンプラーは制御用コンピューターによってRL-600と協調的に制御され、各回路を流れるガスの流量を測定すると共に質量分析機に導入するガスを順次切り替えた。ラインの切り替えは、大気、ライン1, ライン2...ライン6と順次1分間毎に行い、最後の1秒間の酸素、二酸化炭素濃度を各ラインのデータとして取得した。

酸素消費量 (VO₂), 二酸化炭素産生量 (VCO₂), 呼吸商 (RQ) は以下の式により算出した。

$$VO_2 = ((F_{E}N_2/F_{I}N_2) \times F_{I}O_2 - F_{E}O_2) \times V_T \times 10$$

$$VCO_2 = (F_{E}CO_2 - F_{I}CO_2) \times V_T \times 10$$

$$RQ = VCO_2/VO_2$$

F_EN₂, F_EO₂, F_ECO₂ はそれぞれ、ラインの窒素濃度、酸素濃度、二酸化炭素濃度であり、F_IN₂, F_IO₂, F_ICO₂ はそれぞれ大気の窒素濃度、酸素濃度、二酸化炭素濃度、V_T はSTPDに補正した流量である。

以上の装置を用い、6匹の検体を同時に測定するための基礎実験として、サンプラーによる各ラインの流量測定精度を確認した。実験は以下の2つの場合について検討した。(1) 各流路に流量計を設けた場合、(2) 流路の共通部分に1つ流量計を設けた場合 (Fig. 1)。市販のガス流量計 (SEF-51, 井内盛栄堂より購入) をチャンバーの代りに、すなわち内蔵流量計と直列に接続し、両方の流量計を流れるガスの量が等量の条件下で測定値を比較した。測定は、SEF-51での測定値が0.6, 1.0, 1.6 L/minのそれぞれの場合について各ラインの流量を2回ずつ測定した。各ラインについて2つの流量計での測定値の比を算出した。

また流量以外の要因が酸素消費量および二酸化炭素産生量のライン間の誤差を生じている可能性もあるため、(2) の場合は、6個のチャンバーに1匹ずつマウスを入れて酸素消費量を測定した。マウスの個体差の影響を除去するため、2分間毎にサンプラーとチャンバー間のホースの接続を変更して、マウスの呼気ガスを全てのラインで測定し、測定ラインの測定値に対する影響について検討した。

アミノ酸水溶液の投与

7週齢のStd-ddY系雄マウス (清水実験材料より購入) を使用し、固形飼料MF (清水実験材料より購入) と水を自由摂取させ1週間予備飼育した。測定の前日

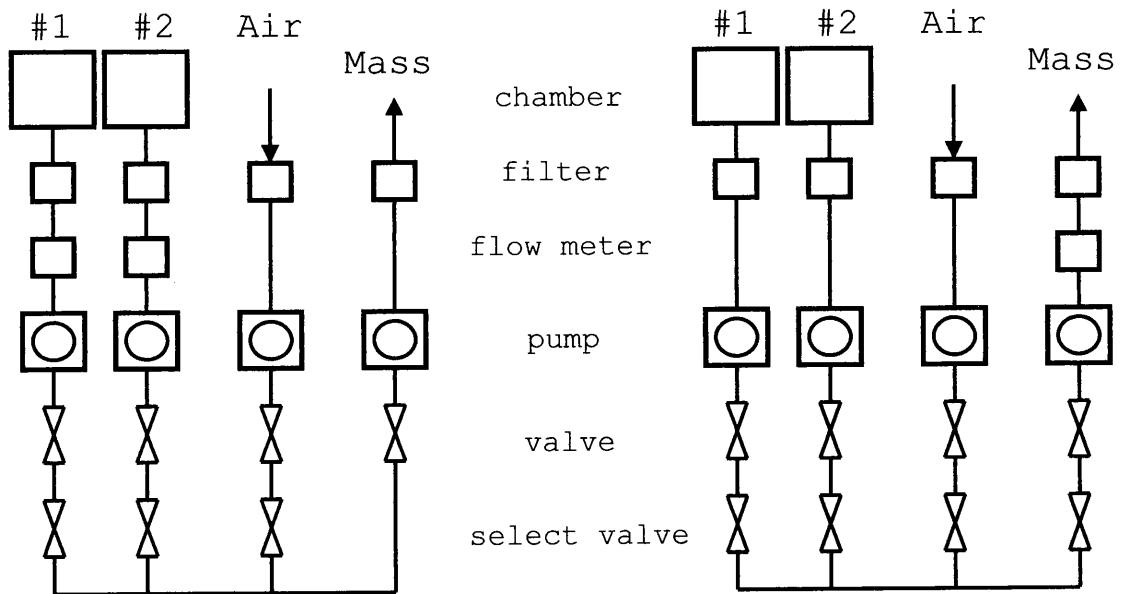


Fig. 1. Block chart of 6-line gas sampler. Flow meters in each line (left) and a shared flow meter (right). Lines #3 to #6 were omitted.

の19時から飼料を抜き、測定当日の12時からマウスを測定用チャンバーにいれ、安静状態にてベースラインを60分間測定した後、500 μ Lの5%大豆ペプチド組成 (SBAA) またはカゼイン組成 (casein) のアミノ酸水溶液、コントロール群 (control) には等量の蒸留水を経口投与した。投与後、直ちにマウスをチャンバーに戻し、18時までの5時間の酸素消費量および二酸化炭素産生量を測定した。

結 果

呼吸ガス分析装置の改良

Fig. 2に示すように (1) 各流路に流量計を設けた場合には、外付けと内蔵の流量の比が0.5から0.9の範囲内でラインにより異なった。一方、(2) 共通流量計を設けた場合には、その比はラインにより異なるが0.45から0.6の範囲内であった。共通流量計を設けた場合には、各流路に流量計を設けた場合に比べ、流量の測定値のラインによる差が明らかに減少した。

Fig. 3に示すように、6匹のマウスの呼吸ガスを測定した場合にはラインにより酸素消費量の測定値が異なったが、特定のラインで測定した場合には全てのマウスの酸素消費量が高いまたは低い現象は観察されなかった。

アミノ酸水溶液の投与

Figs. 4, 5にアミノ酸水溶液を投与した時の呼吸商と

酸素消費量の変化を示した。呼吸商は投与前の60分間は約0.9であったが、投与の直後に一過性に大きく増加した後は測定終了まで0.85付近を推移した。呼吸商に群間の差は見られなかった。酸素消費量はチャンバーに入れた直後から投与前まで徐々に減少し、投与後は一過性に上昇したが、投与50分後には投与前の状態に戻り、その後は同じ量で測定終了まで推移した。投与直後から約50分間はコントロールに比べ、SBAA群とcasein群の酸素消費量がわずかに高い傾向が見られたが有意な差ではなかった。

考 察

本研究では大豆たん白質の抗肥満作用について、特にそのアミノ酸組成がエネルギー代謝に及ぼす影響を呼吸ガス分析装置を用いて調べた。小動物、特にマウスの安静時の呼吸量は微少であり、正確な測定には精度の高い装置が必要である。小動物に限らず呼吸ガスの測定において換気量の測定はガス濃度の測定と並び重要である。人での測定ではマスクに装着した差圧積分型の流量計により換気量を、流量計付近に装着したプローブにより呼吸中のガス濃度を経時的に測定し呼吸商を算出することが可能である。しかし換気量の測定精度が十分ではないためにダグラスバッグに全呼吸を回収して容積から換気量を測定する方法がよく行われる⁵⁾。動物の場合、犬より小さいサイズの動物、す

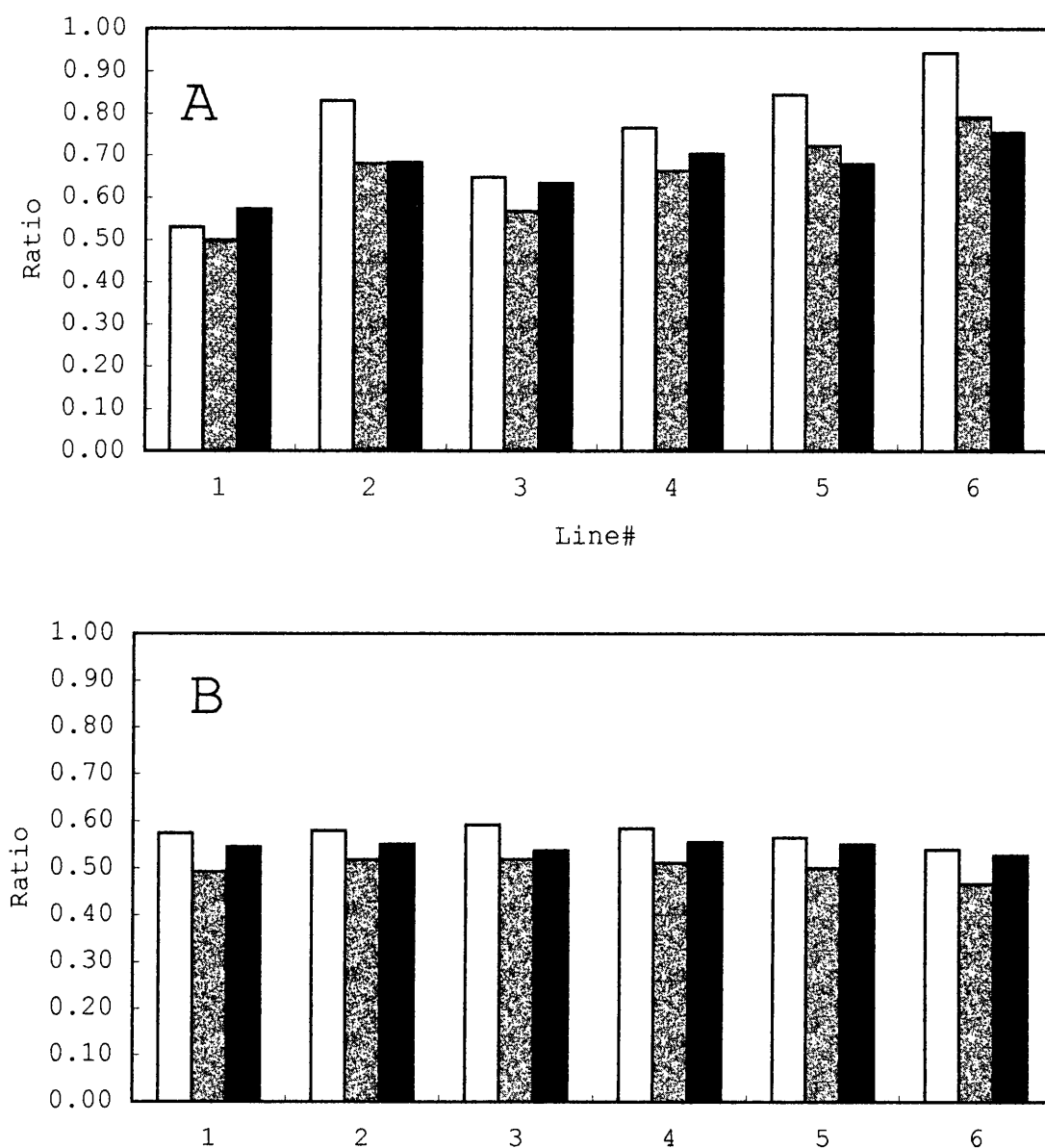


Fig. 2. Confirmation of flow rate in case flow meters were independently installed in each line (A) and a flow meter was installed in a shared part of lines (B). Open bars, 0.6 L/min ; dashed bars, 1.0 L/min and closed bars, 1.6 L/min.

なわちラットやマウスにはマスクを装着して呼気を自然に回収することが困難であるため、open-circuit と呼ばれるチャンバーの中に実験動物を入れ、チャンバー内のガス濃度の変化を測定する方法が採られる⁶⁾。古くはドラム缶などの中で呼吸させ、ガス濃度と体積の変化により算出されてきたが⁷⁾、装置が巨大になることや時間の経過に従う変化の追跡が困難であることや、吸気ガス濃度中の二酸化炭素濃度が徐々に上昇するな

どの理由で、現在はほとんど行われていない。現在市販されている多くの小動物代謝測定装置は、連続的にチャンバー内に大気を導入し、動物の呼気と大気がミキシングされたガスを濃度測定部に導入する方法が採られており、ガス流量の測定誤差は直接酸素消費量の測定誤差となるため流量の測定精度は重要である。なお呼吸商に関しては濃度変化の商であるため流量とは無関係である。

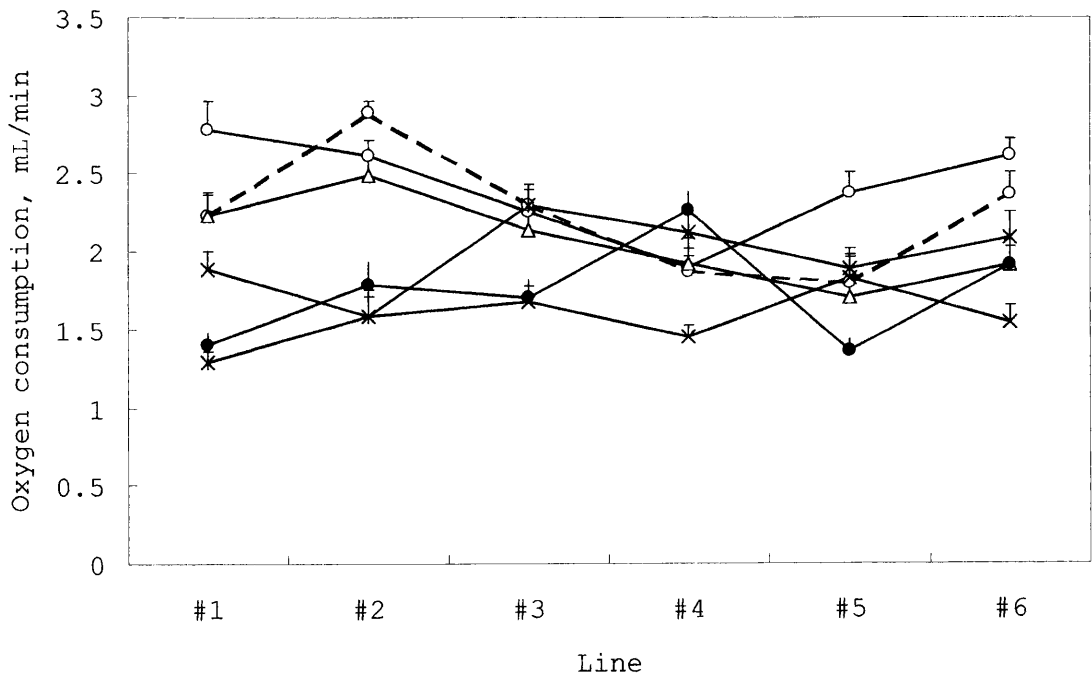


Fig. 3. Confirmation of oxygen consumption in case a flow meter was installed in a shared part of lines. Each line indicates same mice, n=7-11.

これまでに著者らはRL-600により1匹のマウスの呼気ガス成分を分析できることを確認したが、本研究では同時に6検体を測定するためにガス導入部にライン切り替え装置を設けた。市販の装置にも複数検体を測定できる装置はあるが、各ラインに個別にサーマルマスフロー式の流量計が設置されている。著者らも同様の方式の装置を作成したが、個々の流量計は工業規格上、最大測定値の5%までの測定誤差が認められており、マウスの呼気ガスを分析する際には最大測定値の約半分の流量で測定するために流量計間の測定誤差によって正確な測定が行われなかった (Fig. 2)。市販の装置ではこれらの測定誤差に対してソフトウェア上で補正を加えていると考えられるが、著者らは流量計を1つにすることにより原理的な解決を試みた。流量計はサーマルマスフロー式ではなく、応答性に優れている差圧積分型の流量計を採用し、ラインの切り替えから流量値の安定までに必要な時間を短縮した。複数

ラインで測定する際の問題の1つとして、測定頻度の減少 (あるいは測定間隔の増加) があり、食品・薬物の投与や運動など測定値の変化を測定する際にはサーマルマスフロー式のように流量の測定値に時間がかかる流量計よりも差圧積分型が適していると考えられる。以上のように本研究では大豆たん白質組成のアミノ酸混合物のエネルギー代謝に対する効果を呼気ガス成分から検討するために装置の整備を行った。5%のアミノ酸水溶液を投与したマウスは投与後の酸素消費量の上昇が持続する傾向が観察されたが有意な差ではなかった。今回整備した呼気ガス測定装置は、ガス測定部に質量分析装置を使用しているために安定同位体の測定が可能である。安定同位体を測定するための条件を整備し、大豆たん白質あるいはアミノ酸混合物と同時に摂取した糖や脂肪酸などの酸化量などのより精度の高い分析が必要と考えられる。

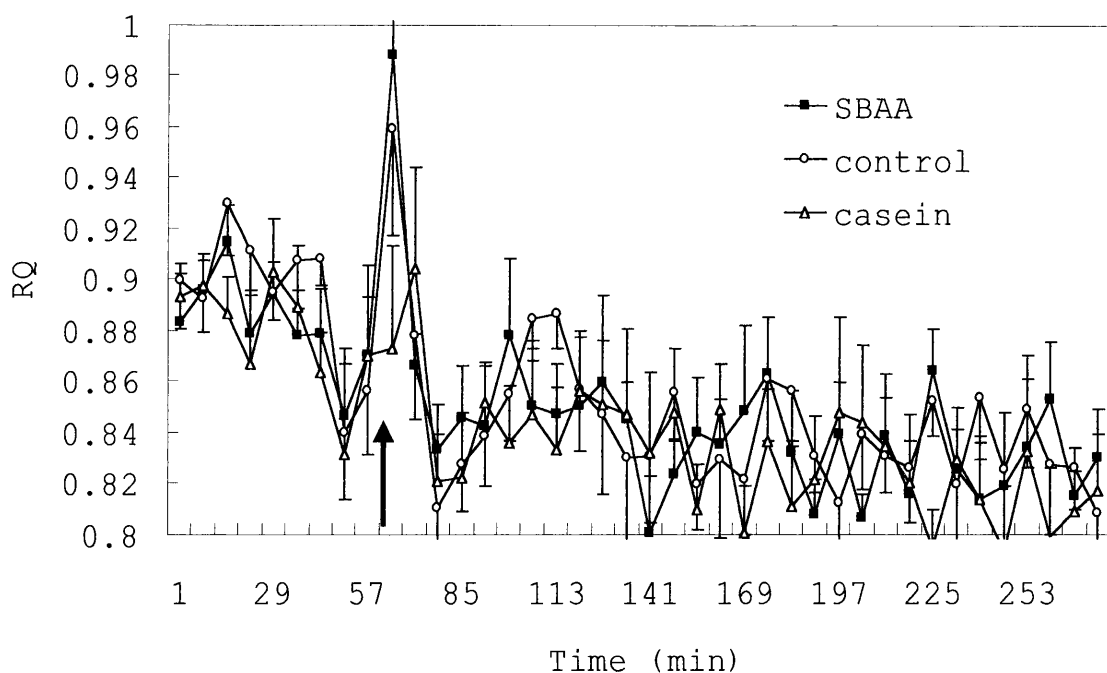


Fig. 4. Respiratory quotient in mice orally administered 500 μ L of 5% soybean or casein amino acid mixture or water, n=6-8.

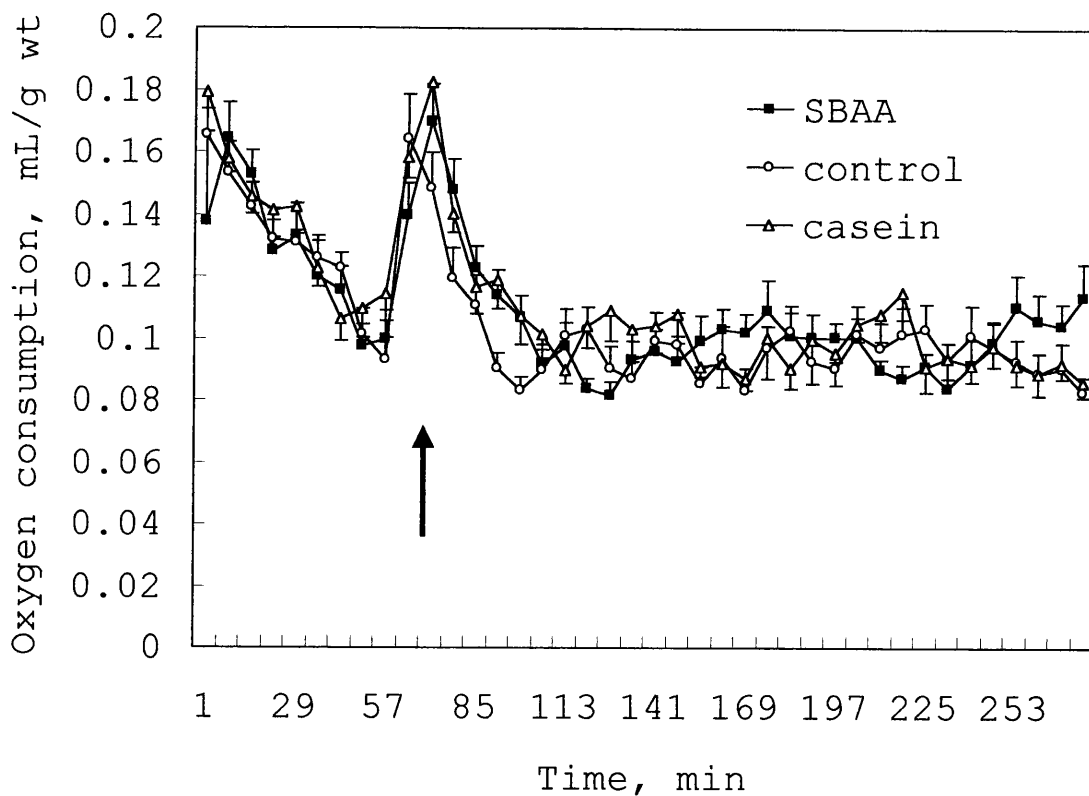


Fig. 5. Oxygen consumption in mice orally administered 500 μ L of 5% soybean or casein amino acid mixture or water, n=6-8.

要 約

大豆たん白質の抗肥満効果の機序を検討する目的で、大豆ペプチド組成のアミノ酸水溶液の Std ddY マウスの酸素消費量と呼吸商に対する効果を測定した。マウスの呼気ガスは僅少であり、同時に6匹の呼気ガス成分を測定するために実験系を整備した。6ラインの呼気ガスを順次切り替えて質量分析機に導入するためにサンプラーを設置した。酸素消費量はラインの流量とガス濃度の変化の積により算出されるが、サンプラーの各ラインで流量を測定するために流量計を設置した場合には、流量計個々の測定誤差が約50%あり、測定値のばらつきの原因となることが示唆された。ラインの共通部分に流量計を設置した場合には流量の誤差は10%以内であった。また共通流量計を設置した場合に同じマウスの酸素消費量と呼吸商を6本のラインで測定したが、測定ラインで測定結果にバイアスがかかることはなかった。共通流量計を使用することにより最大6匹のマウスの呼気ガスの測定精度が大きく向上した。本装置を使用して大豆ペプチド組成の5%アミノ酸水溶液(SBAA) 500 μ Lを一夜絶食した Std ddY マウスに経口投与し、呼気ガス成分への影響を評価した。投与後の酸素消費量はSBAA やカゼイン組成のアミノ酸水溶液、蒸留水を投与されたいずれのマウスにおいても一過性に上昇し、水投与群は投与前の値にまで速やかに回復したがSBAA 投与群の回復は遅く、この期間内におけるエネルギー消費量がわずかに高かったことが推察されたが有意な差ではなかった。

文 献

- 1) 石原健吾, 松元圭太郎, 魚橋良平, 伏木 亨 (1996): 大豆たん白質分解ペプチドの体脂肪蓄積抑制効果に関する研究. 大豆たん白質研究会会誌, **17**, 94-97.
- 2) Tanaka K, Aso B, and Sugano M (1984): Biliary steroid excretion in rats fed soybean protein and casein or their amino acid mixtures. *J Nutr*, **114**, 26-32.
- 3) Nagata N, Imaizumi K and Sugano M (1980): Effects of soya-bean protein and casein on serum cholesterol levels in rats. *Br J Nutr*, **44**, 113-121.
- 4) Iritani N, Nagashima K and Fukuda H (1986): Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J Nutr*, **116**, 190-197.
- 5) Jones PJH, Pencharz PB and Clandinin MT (1985): Whole body oxidation of dietary fatty acids: implications for energy utilization. *Am J Clin Nutr*, **42**, 769-777.
- 6) Dulloo AG and Miller DS (1985) : Increased body fat due to elevated energetic efficiency following chronic administration of inhibitors of sympathetic nervous system activity. *Metabolism*, **34**, 1061-1065.
- 7) Flatt JP (1991): Assessment of daily and cumulative carbohydrate and fat balances in mice. *J Nutr Biochem*, **2**, 193-202.