

分離大豆たん白質摂取時のビタミンB₆栄養状態の検討

伊佐保香^{*1}・三嶋智之²・山本紘平³・早川享志³

¹岐阜女子大学家政学部健康栄養学科

²岐阜医療科学大学保健科学部臨床検査学科

³岐阜大学大学院連合農学研究科

Vitamin B₆ Status in Rats Fed Soybean Protein Isolate

Yasuka ISA^{*1}, Tomoyuki MISHIMA², Kohei YAMAMOTO³ and Takashi HAYAKAWA³

¹Faculty of Home Economics, Gifu Women's University, Gifu 501-2592

²School of Health Sciences, Gifu University of Medical Science, Seki 501-3892

³United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Gifu 501-1193

ABSTRACT

The aim of this study was to a comparison Vitamin B₆ (B₆) nutritional status of rats fed casein or Soy Protein Isolate (SPI). Wistar/ST male rats were fed 20% casein (C group), 60% casein (HC group), 20% SPI (S group) and 60% SPI (HS group) diets for 4 weeks. At weekly intervals, 24 h urine samples were collected for measurement of xanthurenic acid. There was no significant difference in urinary xanthurenic acid excretion among the four groups. At the end of the experiment, blood and liver were obtained. Plasma total B₆ concentration in C group and the HC groups was significantly higher than that in the S group and HS groups ($p<0.05$). Content of hepatic B₆ in the high protein diet group was significantly higher than in the low protein diet group ($p<0.05$). Erythrocyte aspartate and alanine aminotransferase activity (EAST, EALT) with and without PLP showed no significant difference among the four groups. These results suggest that SPI would be needed for B₆ in the diet more than casein. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 127-132, 2013.

Key words : vitamin B₆, nutritional status, plant protein, soybean

ビタミンB₆ (B₆) の主な生理作用は、リン酸エステル型であるPLPやPMPの形で多くの酵素の補酵素として作用することであり、現在B₆が補酵素として作用する酵素は140種類以上知られている。その触媒する反応は、アミノ酸代謝における各種アミノ酸のアミノ

基転移反応、脱炭酸反応、グリコーゲンの加リン酸分解反応、ラセミ化反応、縮合反応など多岐にわたる¹⁾。このようにアミノ酸代謝の補酵素として作用することから、たん白質代謝には必須のビタミンとなっている。

たん白質の栄養価は、構成するアミノ酸に依存し、動物性たん白質はそのバランスが良いことから栄養価が高く、良質のたん白質であると評価されることが多

*〒501-2592 岐阜市太郎丸80

い。一方、植物性のたん白質は一般的にアミノ酸バランスが悪いこと、また消化吸収率が低いことから、動物性たん白質より栄養価が低いとされている。しかしながら大豆たん白質は、アミノ酸スコアが100と評価され²⁾、動物性たん白質と同等の評価がなされている。これまでに動物性たん白質を用いた実験では、たん白質摂取量の増加にともないB₆必要量も増加することが報告されており^{3, 4)}、日本人の食事摂取基準の策定においてもB₆必要量にはたん白質摂取量が考慮されている⁵⁾。しかしヒトのたん白質源は、アミノ酸組成の異なる動物および植物の両方に由来しているため、B₆必要量を算定するに当たっては各たん白質の種類を考慮する必要があると考えられる。これまでたん白質源として、植物性たん白質を摂取した時のB₆必要量に関する実験報告は少なく、また体内のB₆濃度の測定などは行われていない。さらに動物性たん白質で求められているようなたん白質摂取量とB₆必要量との関連についても不明である。そこで本研究では、植物性たん白質源として分離大豆たん白質 (Soy Protein Isolate: SPI) を摂取した時の体内のB₆栄養状態について、動物性たん白質 (カゼイン) 摂取時とB₆栄養状態の比較を行い、植物性たん白質摂取時のB₆必要量の検討を行った。

方 法

動物実験

動物はWistar/ST系4週齢オスラットを用い、各群7匹ずつ、体重が等しくなるように4群に分けた。たん白質源には、動物性たん白質としてカゼイン、植物性たん白質としてSPI (フジプロフ) を用いた。飼料組成はAIN-93Gを基に、カゼイン20%食 (C)、カゼイン60%食 (HC)、SPI20%食 (S)、SPI60%食 (HS) とした (Table 1)。なお、SPIのたん白質含量が90.3%であることから補正を行った。飼育期間中は飼料、飲料水とも自由摂取させ、4週間飼育を行った。飼育期間中は7日ごとに24時間尿を回収し、B₆栄養状態の指標となる尿中キサンthren酸排泄量の測定をWachsteinとGudaitisの方法⁶⁾に従って行った。

本飼育開始28日目にエーテル麻酔下で、腹部大動脈より採血後、臓器の摘出を行った。血漿サンプルおよび摘出臓器は分析に供するまで-20℃にて凍結保存した。

血漿および肝臓中B₆濃度の測定

血漿および肝臓中のPLPおよびB₆ピタマー濃度の測定は、HPLC法⁷⁾を用いて測定した。血漿サンプル0.5 mLは3 N過塩素酸 (PCA) 0.25 mLで除たん白質処理

を行った。この上清に1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) を0.2 mL加え、5 N KOHでpH 3.5に調整したものをPCA抽出液とした。PLPの検出はPCA抽出液をpH 7.5に調整してからシアン化カリウムで処理を行い、再びpH 3.5に調整してからHPLC分析に供した。また、他のB₆ピタマーは、PCA抽出液を0.45 μMのメンブランフィルターに通した後、HPLC分析に供した。

肝臓サンプルは1 gに対して20 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を4 mL加えてホモジナイズし、30分間遠心分離後 (27,000 × g, 0℃)、得られた上清を臓器抽出液とした。この臓器抽出液を血漿サンプルと同様の方法にて調整し、PLPおよびB₆ピタマーの分析に供した。HPLC分析の条件は以下の通りである。

HPLC分析条件: <PLP>

励起波長320 nm, 蛍光波長420 nm

<PLP以外のB₆ピタマー>

励起波長305 nm, 蛍光波長390 nm

流速: 0.5 mL/min, カラム温度: 30℃

移動相: CH₃CN/0.1M KHPO₄-0.1M NaClO₄ (pH 3.5)=1:99 (v/v)

カラム: TOSOH TSKgel ODS-120A (4.6 mm I.D., 25 cm)

赤血球サンプルのASTおよびALT活性の測定

赤血球サンプルのAST (EAST) およびALT (EALT) 活性化率は、血漿を除去した後の赤血球を生理食塩水にて洗浄後、純水にて溶血させたものを遠心分離し、得られた上清を赤血球サンプルとして測定を行った。赤血球サンプルにはPLPを添加したものおよび無添加のものを作成し、トランスアミナーゼCⅡテストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて活性の測定を行った。PLP添加による活性化率の算出は以下の式に

Table 1. Composition of the experimental diets (%)

Ingredients	C	HC	S	HS
Casein	20	60	—	—
Soy Protein Isolate	—	—	22.1*	66.4*
L-Cysteine	0.3	0.9	0.3	0.9
Corn Starch	39.74	9.14	37.64	2.74
<i>a</i> -Corn Starch	13.2	3.2	13.2	3.2
Sucrose	10	10	10	10
Soybean Oil	7	7	7	7
Powdered Cellulose	5	5	5	5
Mineral Mixture (AIN-93)	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin Mixture (AIN-93)	1	1	1	1
Choline Bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>t</i> -Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014

*Protein concentrations were made iso-nitrogenous.

従った。

活性化率=PLP添加活性値/PLP無添加活性値

血漿ホモシステイン濃度の測定

血漿ホモシステイン濃度の測定は、蛍光検出器を備えたHPLCを用いた山口らの方法⁸⁾に従った。

統計処理

得られたデータは平均値±標準誤差で表した。結果は二元配置分散分析およびTukeyの多重比較により統計処理を行い危険率5% ($p<0.05$) にて有意性を判定した。なお検定にはExcel統計2010を用いた。

結果と考察

飼育期間中の最終体重、飼料摂取量をTable 2に示した。終体重はHS群で有意に低値を示したが、これは摂取量が少なかったためであると考えられる。これに伴い、体重増加量もHS群で有意に低値であった。たん白質摂取量を算出すると、HC群とHS群は高たん白質食であるためC群およびS群よりも有意に高値であったが、カゼインとSPIとの差は見られなかった (Table 2)。食品のたん白質は種類により栄養価が異なり、またその評価方法もいくつか存在する。たん白質の栄養価は、動物の成長、窒素出納、アミノ酸組成などを基準にして評価される。今回は動物の体重増加量から求める、たん白質効率を算出した。たん白質効率は、20%食群は60%食群よりも有意に高値を示したが、たん白質の種類による有意な差は見られなかった

(Table 2)。一般的には動物性たん白質は植物性たん白質よりもアミノ酸バランスに優れ、栄養価が高いと言われる。しかし植物性たん白質でも大豆たん白質は、アミノ酸スコアが100とされ良質なたん白質であるといわれる²⁾。そのため、カゼイン食とSPI食のたん白質効率に有意な差が見られなかったと推察される。

解剖時の肝臓・脾臓・腎臓・胸腺の体重100 gあたりに換算した重量をTable 3に示した。肝臓重量はS群で有意に低値を示しており、HC群とHS群で高値を示した。腎臓はHC群とHS群で有意に高値を示し、高たん白質摂取により重量が増加した。高たん白質食群では尿量が有意に高値を示しており (データは示していない)、これは窒素の摂取量増加に伴う排泄量の増加であると考えられる。そのため高たん白質食群では腎臓重量の増大が見られたと考えられる。

尿中キサンツレン酸排泄量は、B₆の欠乏によりその排泄量が増加するため、一般的にB₆欠乏の指標として用いられている。今回は7日ごとに測定を行ったが、各群間に有意差はみられず、またどの群もB₆が欠乏した状態であると判断できるほど排泄はされていなかった。

血漿PLP濃度および総B₆濃度はFig. 1に示した。血漿PLP濃度は、C群で有意に高値を示したがその他の群間には有意な差は見られなかった。総血漿B₆濃度はS群よりC群で、さらにHS群よりもHC群で有意に高値であり、SPI食群間においてはS群とHS群に有意な差は見られなかった。もともとSPIにはカゼインよりも

Table 2. Growth parameters of the experimental rats

Group	C	HC	S	HS
Final body weight (g)	289.1±6.2 ^a	286.6±14.4 ^{ab}	272.5±13.7 ^{ab}	234.9±13.0 ^b
Body weight gain (g)	187.4±6.7 ^a	168.3±13.3 ^{ab}	172.5±12.2 ^{ab}	134.9±13.8 ^b
Total food intake (g)	564.1±12.3 ^a	498.0±28.1 ^{ab}	540.8±31.6 ^a	424.5±31.2 ^b
Protein intake (g)	112.8±2.6 ^b	298.8±16.9 ^a	108.2±6.3 ^b	254.7±18.7 ^a
Protein efficiency ratio*	1.66±0.03 ^a	0.56±0.02 ^b	1.59±0.05 ^a	0.52±0.03 ^b

Values are means ± SEM for seven rats.

Values in the same row without common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

*Protein efficiency ratio=Body weight gain (g)/Protein intake (g).

Table 3. Tissue weight of the experimental rats

	C	HC	S	HS
Tissue weight (g/100g body weight)				
Liver	3.87±0.12 ^{ac}	4.61±0.12 ^{ab}	3.47±0.10 ^c	4.21±0.17 ^b
Kidney	0.72±0.08 ^b	1.04±0.02 ^a	0.75±0.02 ^b	1.04±0.06 ^a
Spleen	0.19±0.01 ^b	0.21±0.01 ^a	0.18±0.01 ^b	0.19±0.01 ^b
Thymus	0.31±0.02	0.31±0.01	0.30±0.02	0.28±0.02

Values are means ± SEM for seven rats.

Values in the same row without common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

多くのB₆（ピリドキシン換算で0.06 mg/100g SPI. カゼイン中のB₆含量は0.019 mg/100gカゼイン；オリエンタル酵母社製）が含まれておりB₆摂取量としてはSPI食群の方がカゼイン食群よりも多くなったが、血漿中の濃度で比較するとSPI食群の方がたん白質量に関係なく低値を示した。一方肝臓中のPMP含量はたん白質の種類に関係なく、HC群とHS群において有意に高値を示した（Fig. 2）。また総B₆含量はC群よりもHC群で、さらにS群よりもHS群で有意に高値であった。肝臓はたん白質代謝の主要な臓器であるため多量のたん白質を摂取した場合、より多くのB₆が必要となるため肝臓内のB₆含量が上昇したのかもしれない。同じたん白質含量においてカゼインとSPIとで比較すると、SPI群の方が肝臓内のB₆含量は低くなる傾向にあり、血漿中の総B₆濃度と合わせて考えても、体内のB₆濃度はカゼイン食群よりもSPI食群の方が低く

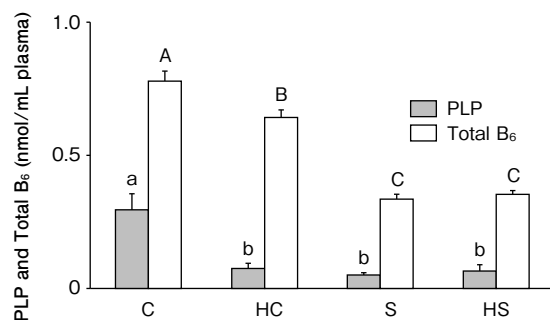


Fig. 1. PLP and total B₆ concentration in plasma. Plasma PLP and total B₆ concentrations were measured by HPLC. Values are means $\pm$ SEM for seven rats. Values without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

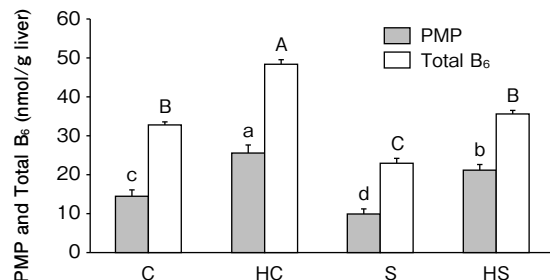


Fig. 2. Contents of PMP and total B₆ in liver. Contents of PMP and total B₆ in liver were measured by HPLC. Values are means $\pm$ SEM for seven rats. Values without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

なる傾向にある。摂取量から考慮するとSPI食群の方がより多くのB₆を摂取しているにもかかわらず、体内のB₆濃度が低くなる傾向であることから、SPI食を摂取する場合にはより多くのB₆が必要となることが推察される。Shao-Chun Luら⁹⁾はラットを用いSPI食を摂取したときのB₆栄養状態を、トリプトファン負荷試験とEASTおよびEALTの活性で評価している。トリプトファン負荷試験では、SPI食によりキサンツレン酸排泄量が増加することを報告している。またEASTおよびEALTの活性もSPI食により増加することが報告されており、今回の結果と同様に、たん白質源の違いによりB₆栄養状態に影響を与えることが推察されている。

EASTおよびEALT活性化率は、赤血球サンプルへのPLP添加と無添加における活性化率で比較を行った。EASTおよびEALTともに各群間に有意差は見ら

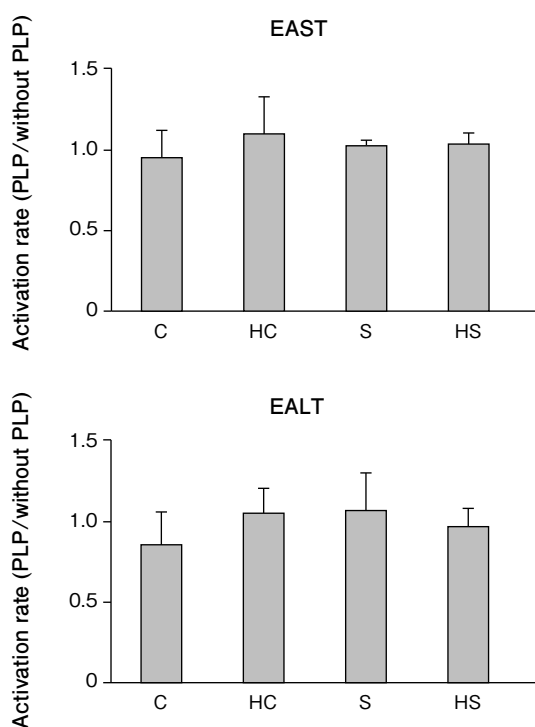


Fig. 3. Activation rate of EAST and EALT. Activation rate of AST (EAST) and ALT (EALT) in erythrocyte was measured by the activation of pyruvate oxidase. Activation rate was obtained by dividing the activity of AST or ALT with PLP by the activity of AST or ALT without PLP. Values are means $\pm$ SEM for seven rats.

れなかった (Fig. 3).

血漿中のホモシステイン濃度の上昇は、血管傷害を惹き起こすリスクファクターとしてや、アルツハイマー病や神経管形成不全など神経疾患にも関与することが報告されている¹⁰⁾。そのため血漿中ホモシステイン濃度の上昇を抑えることは血管疾患などの予防に大変重要であるが、これまでにB₆欠乏ラットにおいて血漿ホモシステイン濃度が上昇することが報告されている^{11, 12)}。血漿ホモシステイン濃度はたん白質濃度に関係なくSPI群において有意に低く、摂取たん白質量には依存していなかった (Fig. 4)。今回の結果からSPI食による血漿ホモシステイン濃度上昇抑制の可能性が示唆されたことにより、SPI摂取によるホモシステイン代謝系の変化が考えられる。

以上より、今回の実験条件下で、動物性たん白質と植物性たん白質では動物の成育に影響を及ぼすほどの栄養的な差は見られなかったが、植物性たん白質であるSPIの摂取により血漿および肝臓中の総B₆濃度は、カゼイン群と比べると低くなったことから代謝に必要とされるB₆量はSPIの方が高い可能性が示唆された。

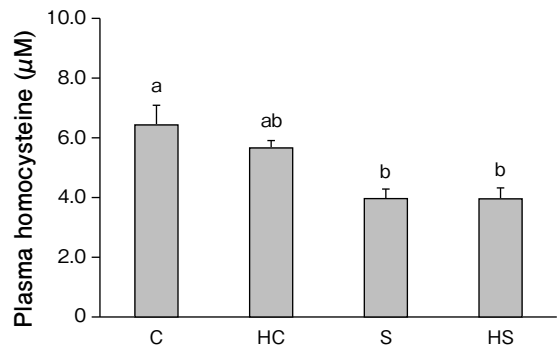


Fig. 4. Concentration of plasma homocysteine. Plasma homocysteine was measured by HPLC. Values are means $\pm$ SEM for seven rats. Values without common superscript letter are significantly different at $p < 0.05$.

要 約

本研究は植物性たん白質のB₆必要量を算定するため、動物性たん白質摂取時と体内B₆栄養状態の比較検討を行った。動物はWistar/ST系4週齢オスラットを用い、20%カゼイン食群 (C)、60%カゼイン食群 (HC)、20%SPI食群 (S)、60%SPI食群 (HS) に分け、4週間飼育した。7日ごとに24時間尿を回収し、尿中キサンthren酸の排泄量を測定したが各群間に有意差は見られなかった。解剖時には、血液と肝臓サンプルを回収し、血漿および肝臓中のB₆濃度の測定を行った。血漿中PLP濃度は、C群において他の群と比べると有意に高値であったが、そのほかの群間には有意差はなかった。血漿総B₆濃度はC群とHC群がS群とHS群よりも有意に高値であり、SPI食により血漿中のB₆濃度が低くなる傾向にあった。肝臓中のPMP含量はHC群とHS群でC群とS群より有意に高値であり、肝臓総B₆含量も同様であった。これらより肝臓中のB₆含量はSPI食の方がカゼイン食よりも低くなる傾向にあり、特にたん白質含量の影響を受けていた。赤血球サンプルのASTおよびALT活性化率は各群間に有意差は見られなかった。血漿ホモシステイン濃度はSPI食群により低値を示す傾向にあり、たん白質含量よりもたん白質の種類に影響を受ける可能性が示唆された。以上の結果より、今回の実験条件において、SPIの代謝にはカゼインよりも多くのB₆が必要とされ、B₆必要量はたん白質源の違いにより影響を受ける可能性が示唆された。

文 献

- 1) 生城浩子, 林秀行 (2010): ビタミンB₆, ビタミン学事典, 日本ビタミン学会編, 朝倉書店, 東京, pp.212-213.
- 2) 文部科学省 (2009): 第2表アミノ酸組成, 食品成分表2010, 香川芳子監, 女子栄養大学出版部, 東京, pp.138-139.
- 3) Baker EM, Canham JE, Nunes WT, Sauberlich HE and McDowell ME (1964): Vitamin B₆ requirement for adult men. *Am J Clin Nutr*, **15**, 59-66.
- 4) Hansen CM, Leklem JE and Miller LT (1996): Vitamin B-6 status of women with a constant intake of vitamin B-6 changes with three levels of dietary protein. *J Nutr*, **126**, 1891-1901.
- 5) 柴田克己ら (2009): ビタミンB₆, 日本人の食事摂取基準2010年版 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書, 「日本人の食事摂取基準」策定検討会編第一出版, 東京, pp.157-158.
- 6) Wachstein M and Gudaitis A (1952): Detection of vitamin B₆ deficiency. Utilization of an improved method for rapid determination of xanthurenic acid in urine. *Am J Clin Pathol*, **22**, 652-655.
- 7) Tsuge H (1997): Determination of vitamin B₆ vitamers and metabolites in a biological sample. *Methods Enzymol*, **280**, 3-12.
- 8) Yamaguchi A, Fukushi M, Mizushima Y, Sato M, Shimizu Y, Kikuchi Y and Takasugi N (1989): High-performance liquid chromatographic measurement of total homocysteine and total cysteine in blood. *Rinsho Shoni Igaku*, **37**, 109-113.
- 9) Lu SH and Huang PC (1997): Effect of casein and soy protein isolate on vitamin B₆ nutritional status in rats. *J Biomed Sci*, **4**, 120-124.
- 10) Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y, Sun N, Liu L and Xu X (2007): Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet*, **369**, 1876-1882.
- 11) Smolin LA and Benevenga NJ (1984): Factors affecting the accumulation of homocyst(e)ine in rats deficient in vitamin B-6. *J Nutr*, **114**, 103-111.
- 12) Martinez M, Cuskelly GJ, Williamson J, Toth JP and Gregory JF III (2000): Vitamin B-6 deficiency in rats reduces hepatic serine hydroxymethyltransferase and cystathionine β -synthase activities and rates of *in vivo* protein turnover, homocysteine remethylation and transsulfuration. *J Nutr*, **130**, 1115-1123.