

食糧科学から動物栄養へ

伊 吹 文 男

The stream of research for a decade — from
food science to animal nutrition

FUMIO IBUKI

要旨：本稿は「食糧科学から動物栄養へ」の表題のもと、筆者が講座を担当して以来、ほぼ10年間の研究内容をまとめ、概説したものである。

第I章は「食品中の消化酵素阻害因子」として植物性食品のトリプシンインヒビターとアミラーゼインヒビターについて述べた。ナス果皮およびファバビーン（豆）のトリプシンインヒビターについては主に生化学的な研究であるが、クランベリービーンのアミラーゼインヒビターについては生化学な研究に加えてインヒビターの経口摂取がラット血液の糖やホルモンに及ぼす効果など、栄養学的な研究を行っている。なお第I章では他に熱帯産マメ類の食糧化学的な分析結果を付加してある。

第II章は「食品タンパク質の抗酸化機能」として各種タンパク質が不飽和脂肪酸の酸化に抑制的に作用すること、粉末モデル系で特に有効であることなどを実証した。小麦グリアジンとリノール酸とで作成した噴霧乾燥標品（マイクロカプセルと考えられる）は長期の保存にも十分耐え、栄養的にも食品の立場からも何ら酸化変性を受けていないことを立証している。また、卵白と紅花油やイワシ油などの脂肪との噴霧乾燥標品も長期保存に耐え、これら脂肪に多く含まれている多価不飽和脂肪酸も変化を受けていない。これら噴霧乾燥標品を実際にパンやクッキーに添加してみたが、無添加のものとの間に嗜好の差は認められず、不飽和脂肪酸強化として十分食品に利用できるものと考えている。また酸化と水分活性との関連などについても考察を加えた。

第III章は「食事成分と脂質代謝」と題して主に血清コレステロールの問題、胆汁酸吸収についての研究をまとめた。現在栄養学で最も関心を持たれているものの一つに血清コレステロール濃度の問題がある。植物性タンパク質特にダイズタンパク質の摂取が血清コレステロールを低下させることはよく知られている事実であるが、その理由については統一的な見解はない。筆者らはダイズタンパク質が膵消化酵素の作用を受け、生成したペプチド、特に疎水性の高いペプチドが胆汁酸と結合してその排泄を促進すること、結果として胆汁酸の腸肝循環を抑制すること、さらには肝臓でのコレステロールからの胆汁酸合成を高め、ひいては血清コレステロール濃度の低下を引き起こすことを立証した。次いで食事成分や栄養条件が胆汁酸吸収に及ぼす影響をラット回腸部位の反転腸管や上皮細胞を用いて検討した。また胆汁酸の吸収の他に粘膜への蓄積についても測定した。

第IV章では「新しい展開を求めて」としてタンパク質・糖質・脂質の三大栄養素の中で最も重要と考えられるタンパク質栄養について、その摂取方法とラットの成長を中心に栄養生

京都府立大学農学部栄養化学研究室

Laboratory of Nutritional and Food Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606, Japan.

平成5年8月12日受理

化学的な見地から検討した。結論を急げば1日2度タンパク質を摂取するのが幼ラットの成長を基準にすれば最も望ましい。この研究と並行してラットの二次元での自発的運動量測定装置を自作し、栄養条件と運動量、嗜好問題などについて実際に本装置の有効性を確かめた。最後にラット腸管広範囲切除と機能快復に対するペプチドの効果を検討し、分岐鎖アミノ酸およびグルタミンの経腸栄養剤への添加が効果的であることを確認した。

本稿は既に学術論文として印刷されているものをまとめたものであり、第I～IV章の範疇に入りにくいものや進行中の研究はすべて割愛した。

I 食品中の消化酵素阻害因子

a ナス果皮のトリプシンインヒビター

日常我々が摂取する食品には毒物が含まれているものも多い。野性のイモ類はそのほとんどが有毒であり、イネ科の穀類が元来無毒の植物であったのと大きな相違がある。しかし、人類の知恵はおよそ1万年かけて品種改良を続け、現在イモはほとんどが無毒化されている。しかしイモ類がまだ有毒であった石器時代の頃より、調理や加工の方法によって毒を抜き、食品として利用している。翻って現在の食事情をみると、まさに「飽食の時代」であり、加工や保存のため使用されている数多くの食品添加物の人類に与えている影響が注目されている。しかし、自然毒として知られている多くの毒物が含まれている食品も多い²⁾。フグ毒(テトロドトキシン)や貝毒、毒キノコのムスカリンなどが単離されて、よく知られている。また熱帯産のマメ類にはシアン基を含む化合物が多く含まれ、マメ自体のもつ酵素(グルコシダーゼ)によって青酸(HCN)を生成する。また食品を加熱すれば強い発癌性、あるいは突然変異原性を示す物質が生じる場合もあり、加熱することなく発癌性を示す物質も少なからず含まれている。これらの毒性物質は一般的に低分子性の物質である。

それに対し食品中の一般成分である高分子タンパク質には毒性というより反栄養因子と考えた方がよいものが多く存在する。卵白中のタンパク質アビジンはビタミンのビオチンと強く結合し、ビオチン欠乏症を引き起こす。ダイズ粉水抽出液がトリプシンの活性を阻害することは既に1938年に報告されており、一方生ダイズを飼料としてあたえたラットは、加熱ダイズを与えたものと比較して、成長抑制の生じることは今世紀の初めから知られていた。この熱不安定成長抑制因子は現在、ダイズトリプシンインヒビター(soybean trypsin inhibitor: STI)として良く知られている物質である。このトリプシンインヒビターはその後マメ科植物を中心に広く植物界に存在することが報告され、イネ科、ナス科植物に

も広く分布している。

動物腸腔に膵臓より分泌され、タンパク質消化に重要な作用を示すトリプシンやキモトリプシンのプロテアーゼの作用を阻害するタンパク質性の因子すなわちプロテイン・プロテアーゼインヒビターは上記の通り、成長抑制因子の一種として栄養学の研究対象となっている。またKunitzによってSTIが結晶化されて以来、プロテアーゼインヒビターはタンパク質-タンパク質間の相互作用を研究する上での格好の材料として生化学の題材となり、プロテアーゼとプロテアーゼインヒビター複合体の三次構造の解析も報告されている。しかしプロテアーゼインヒビターの研究は飼料中の動物の成長抑制因子として出発したものであり、[食品と栄養][消化と吸収]など本来の栄養学の研究対象として再検討の時期にある。

現在、各種哺乳動物の膵臓由来プロテアーゼに対するプロテアーゼインヒビターの種特異性も検討されており、インヒビター摂取により観察されている膵肥大はいわゆる負のフィードバック・コントロールの解除によるものと解釈されている。更には、インヒビターと膵酵素分泌に関連する消化管ホルモン、コレシストキニンとの関係も研究の対象となっている。

筆者らは講座を担当する以前よりナス科植物(*Solanaceae*)であるナス(*Solanum melongena* L.)の果皮中のトリプシンインヒビターについて詳細な研究を行ってきた。ナス科植物であるジャガイモ(*Solanum tuberosum*)やトマト(*Lycopersicon esculentum* Mill)にもそれぞれインヒビターは検出されている。マメ科植物以外のものからの詳細なプロテアーゼインヒビターの報告は比較的少なく、「植物性食品のプロテアーゼインヒビターに関する研究」として昭和53年度日本栄養・食糧学会賞の対象となった³⁾。詳細は文献に譲るとして研究の概略を述べる。

ナス果皮トリプシンインヒビターはアミノ酸58残基より成る単純タンパク質であり、糖鎖などは含まれていない。比較的塩基性アミノ酸が多く、リジ

ンを4, アルギニン3残基が含まれている。分子量6203はタンパク質性インヒビターとしては低分子に属し, 以後分子量マーカーとして多くの好評を得たものである。耐熱性であり, ウシトリプシンを化学量論的(モル比1:1)に強く阻害するのに対し, ウシキモトリプシンに対する阻害活性は相対的に弱い。一般にトリプシンを阻害するインヒビターは反応部位にリジンかアルギニンをもつものと考えられている。アミノ酸の化学修飾と阻害活性の相関を求めることにより比較的容易に反応部位に関係するアミノ酸を推測することができる。ナスのインヒビターはアルギニンを反応部位にもつことが判明した。1分子のインヒビターが2種類以上のプロテアーゼを阻害する場合, しばしば問題になるのが, いわゆるsingle headかdouble headかである。インヒビターがトリプシンとキモトリプシンあるいはそれより多くのプロテアーゼを阻害する場合(多価インヒビター), それぞれに反応部位を有するものをdouble headないしはmulti head, 同じ部位で反応する場合をsingle headと呼んでいる。現在多価インヒビターの多くはdouble headであるとの知見が多い。しかし, 筆者は種々検討の結果, ナス果皮トリプシンインヒビターはsingle headであると考えている。

ナスインヒビターの反応に関与する残基はアルギニンであることを化学修飾により明らかにしたが, 一次構造上どの位置に存在するのであろうか。OzawaとLaskowski, Jr.によってダイズ・トリプシンインヒビターが触媒量のトリプシンによって反応部位のペプチド結合のみが水解されるという現象(酵素的修飾, enzymatic modificationという)が見出されたが, この報告はこれ以後のインヒビターの反応機構や構造解明に大きな進歩をもたらすこととなった。後述のファバビーンインヒビターの研究と関連するので, ここで少し詳細に記述しておく。すなわち通常は酸性条件下でトリプシンインヒビターとトリプシンを適当な時間反応させると反応部位のペプチド結合だけが切断を受ける。このmodifiedインヒビターのインヒビター活性は一般にもとのインヒビター(native or virginインヒビターという)と変わらない。しかしペプチド解裂に伴う新規N-末端, C末端の生成のため, 適当なpHを選べばこの2種すなわちnativeインヒビターとmodifiedインヒビターは電気泳動やイオン交換クロマトグラフィーによって分離が可能である。modifiedインヒビターのジスルフィド結合を還元切断することによって2個のペプチドとなる。nativeインヒビターと新規に生成したペプチドのアミ

ノ酸分析と末端分析から切断箇所すなわち反応部位を容易に同定することができる。この方法で決定したナス果皮トリプシンインヒビターのトリプシンとの反応部位はアルギニン[44]-アスパラギン[45]である⁴⁾。[括弧内の数字は以後N末端より数えたアミノ酸の位置を示す]

b 熱帯酸マメ類の食糧化学的研究

1980年頃, 主として製餡用に輸入されている熱帯酸のマメ類を多数入手する機会を得, その分析を試みた⁵⁾。タンパク質の抽出, 分析法として古典的であるが, 同時に多数の試料を分析でき, かつ収率の良いMaesのカラム連続法を使用した。試料マメ類の一般分析値を表1に示す。一般的に熱帯産マメ類は油脂含量は非常に少ない。表2には各種溶媒で抽出されたタンパク質の相対量が示してある。2%食塩水では水溶性タンパク質(アルブミン)と水不溶性(グロブリン)が同時に抽出されるので, 抽出後水に対して透析して, アルブミンとグロブリン画分を分別した。それぞれのタンパク質のアミノ酸組成を分析した後, 必須アミノ酸の組成をFAO/WHOの評点パターンと比較したのが表3である。他のマメ類同様, リジン含量は高く, 含硫アミノ酸が少ない。

更にその後, 大豆油糧株式会社より提供されたマメ類について一般分析と反栄養因子(プロテアーゼインヒビターとレクチン活性)を測定した⁶⁾。それらの結果を表4および表5に示す。分析に供した8種類のマメの中, 3種類にはインヒビター活性も, レクチン活性もほとんど認められなかった。更に19種類のマメ類についてミネラルとフィチン酸含量の測定を行った⁷⁾。

表1 試料マメ類の化学組成(乾物あたり)

Legume	Protein ^a (%)	Fat (%)	Ash (%)	Moisture (%)
Adzuki bean (China) ^b	20.4	0.3	4.0	9.2
Adzuki bean (Thailand)	20.2	0.2	3.9	10.3
Adzuki bean (Taiwan)	22.3	0.2	3.3	12.7
Kafae bean (South Africa)	23.2	1.2	3.3	9.8
Red kafae bean (South Africa)	22.3	1.2	3.3	10.1
Lima bean (Burma)	19.6	0.8	3.2	10.7
Lima bean (South Africa)	19.8	1.2	4.1	10.8
Lima bean (Madagascar)	20.0	0.8	3.8	8.0
Red lima bean (Burma)	19.0	0.8	3.7	9.8
Kidney bean (Burma)	20.2	0.7	3.3	10.1
Kidney bean (Mexico)	20.4	1.1	3.9	9.7
Field bean (China)	27.7	1.0	3.2	11.5

a タンパク質は窒素×6.25

b 試料マメ類は括弧内の国で栽培された。

表2 試料マメ種子粉末からの4種の可溶性タンパク質の相対濃度^a

Legume	2% Sodium chloride sol. (%)	WI ^b (%)	30% Isopropyl alcohol sol. (%)	4% Lactic acid sol. (%)	0.5% Potassium hydroxide sol. (%)	Total (%)
adzuki bean (china)	53.7	(85)	10.9	8.6	11.3	84.5
adzuki bean (Thailand)	51.2	(83)	9.5	8.4	9.9	79.0
adzuki bean (Taiwan)	57.5	(82)	10.6	8.8	8.5	85.4
kafae bean (South Africa)	56.9	(89)	14.2	2.4	9.8	83.3
red kafae bean (South Africa)	60.0	(72)	11.7	6.4	11.2	89.3
lima bean (Burma)	64.0	(94)	10.0	4.8	9.1	87.9
lima bean (South Africa)	74.0	(43)	10.2	2.8	7.0	94.0
lima bean (Madagascar)	81.4	(93)	6.7	3.9	7.1	99.1
red lima bean (Burma)	61.5	(79)	9.2	2.0	8.4	81.1
kidney bean (Burma)	68.9	(75)	8.2	3.6	10.4	91.1
kidney bean (Mexico)	60.2	(46)	9.8	3.6	11.8	85.4
field bean (China)	69.6	(54)	5.6	5.9	5.6	86.7

a 表1同様タンパク質は窒素×6.25

b 2%食塩水抽出の内、水不溶性タンパク質の割合 (WI)

表3 試料マメの種子粉末の必須アミノ酸組成

Legume	Lysine	Threonine	Total S. cont. A.A.	Valine	Iso-leucine	Leucine	Total aromatic A.A.	Tryptophan
adzuki bean (China)	413	188	113	313	256	475	431	44
adzuki bean (Thailand)	513	200	100	325	281	619	606	63
adzuki bean (Taiwan)	381	213	125	313	213	488	406	75
kafae bean (South Africa)	456	219	88	313	244	550	469	50
red kafae bean (South Africa)	475	194	125	281	225	506	425	81
lima bean (Burma)	369	256	100	288	288	575	500	69
lima bean (South Africa)	506	269	131	319	250	550	488	81
lima bean (Madagascar)	350	231	113	306	250	500	481	113
red lima bean (Burma)	444	244	106	281	231	538	400	31
kidney bean (Burma)	356	231	106	294	263	513	481	56
kidney bean (Mexico)	413	213	106	294	231	519	444	38
field bean (China)	388	225	81	275	263	563	394	63
FAO/WHO (1973) pattern	340	250	220	310	250	440	380	60

各アミノ酸は1gN (=6.25g タンパク質) あたりのmgで表示。

表4 熱帯産マメ類の一般組成

Legume	Testa color	Protein ^{a)} (%)	Fat (%)	Ash (%)	Moisture (%)
Adzuki bean (Burma) ^{b)}	Yellow-Brown	18.4	3.3	4.0	12.3
Mung bean (Thailand)	Pea green	23.4	1.8	3.3	11.3
Baby lima bean (U. S. A.)	White	21.0	1.8	3.9	13.6
Lima bean (South Africa)	White	24.1	4.4	4.4	13.8
Light red kidney bean (U. S. A.)	Light red	26.4	1.2	3.7	12.6
White kidney bean (South Africa)	White	19.8	1.2	4.1	10.8
Rose pea (Thailand)	Beige	22.6	2.3	3.6	12.1
Black pea (Thailand)	Black	23.8	1.5	3.1	12.0

a N×6.25

b マメは括弧内の国で栽培された。

表5 熱帯産マメのトリプシンおよびキモトリプシン阻害活性と赤血球凝集活性

Legume	TI activity ^{a)} (unit/mg-protein)	CI activity ^{a)}	Hemagglutinating activity ^{b)} (titer/mg-protein)
Adzuki bean	—	—	—
Mung bean	—	—	—
Baby lima bean	333.0	131.1	406
Lima bean	140.7	70.8	340
Light red kidney bean	73.6	57.6	353
White kidney bean	151.0	82.1	764
Rose pea	—	—	—
Black pea	76.7	—	—

a TI activity ; トリプシン阻害活性, CI activity ; キモトリプシン阻害活性

1 単位は酵素 1 μg を完全に阻害する量

b 赤血球凝集活性はヒト A 型赤血球で測定

表6 沖縄産シカクマメの一般分析

	Winged bean seeds				Parts of winged bean					
	WB 001	WB 002	WB 003	WB 004	m-pod ^b	hm-pod ^c	im-pod ^d	Stalk	Leaf	
Moisture	8.5	8.3	9.7	8.0	55.0	85.7	91.2	79.8	76.3	
Crude protein ^a	27.8	30.8	30.6	36.6	Moisture (%)					
Crude fat	17.9	15.4	14.9	14.8	(% of dry matter)					
Ash	3.9	3.6	3.8	4.0	Crude protein ^e	7.3	11.6	17.5	12.5	33.7
Carbohydrates					Crude fat	0.7	1.0	1.6	n.d.	5.0
Starch	10.0	9.9	8.5	7.9	Ash	8.5	7.5	5.3	5.6	8.4
NDF	14.6	13.2	14.3	12.3	NDF	65.9	52.7	27.7	—	—
ADF	13.5	12.4	12.7	11.6	ADF	45.9	34.2	16.2	—	—
Tannin ^b	0.77	0.87	0.89	0.97						

左の表は種子 (4 種類) の一般分析である。 a N \times 6.25 b タンニン酸等量で示してある。右の表はシカクマメの莢, 茎, 葉などの一般組成分析である。左の WB のいずれに属するかは不明。 m-pod, hm-pod, im-pod はそれぞれ完熟, 半熟, 未熟の意である。

表7 各地のシカクマメのトリプシンおよびキモトリプシン阻害活性

Variety	Trypsin inhibitory activity	Chymotrypsin inhibitory activity
	(units/ mg protein)	
001	0.12	0.24
002	0.10	0.22
003	0.14	0.28
004	0.09	0.21
1014	0.12	0.22
2826	0.11	0.20
2891	0.12	0.23
3154	0.14	0.26
1	0.11	0.20
2	0.12	0.21
3	0.13	0.23
4	0.14	0.28

阻害活性 1 単位は 1 mg の酵素を完全に阻害する量

熱帯産マメ類が一般的に油脂含量の少ないのに対し, パプアニューギニアや東南アジア, その他の熱帯地域で栽培されているシカクマメ (Winged Bean, *Psophocarpus tetragonolobus*) はタンパク質

と共に油脂含量が高く, サイズと比較し得る有用な栽培種である。通常マメ類はその種子が食用や油糧種子として用いられるのに対し, シカクマメは種子は言うに及ばず, 茎, 葉, 莢から根まで食用になる。実際に沖縄ではシカクマメを各家庭で栽培し, 種子がなるまでの若い莢や葉を野菜代わりにしているといわれる。沖縄熱帯園芸試験場で栽培されている 4 種類のシカクマメに加えて, パプアニューギニア (3 種類), インドネシア (4 種類) の試料の分析を行った。沖縄産のシカクマメについては実際に現場で, 種々の成熟段階の莢, 茎, 葉などを採取し持ち帰って分析に供した^{8,9)}。表 6 にシカクマメ各部の一般分析を, 表 7 にプロテアーゼインヒビター活性を示す。どの品種においてもキモトリプシンインヒビター活性がトリプシンインヒビター活性より強いのが特徴的である。筆者らはこれ以上の検討はしなかったが, 現在多種多様のインヒビターがシカクマメより単一のタンパク質として精製されている。

c ファバビーン (Faba Beans, *Vicia faba* L.) のボーマンバーク型プロテアーゼインヒビター
上記の通り多数のマメ類のプロテアーゼインヒビ

表8 ファバビーンからのプロテアーゼインヒビターの精製

Procedure	Total protein (mg)	Total activity (IU)	Specific activity (IU/mg protein)	Yield (%)	Purification ratio
Extraction	12,800	274	0.0214	100	1.00
Salting-out	2,920	225	0.0771	82.1	3.60
CM-Sephadex C-25	270	197	0.730	71.9	34.1
Sephadex G-75	73.6	173	2.35	63.1	110
QAE-Sephadex A-25	44.0	144	3.27	52.6	153

ファバビーン粉末108 g より精製を開始。

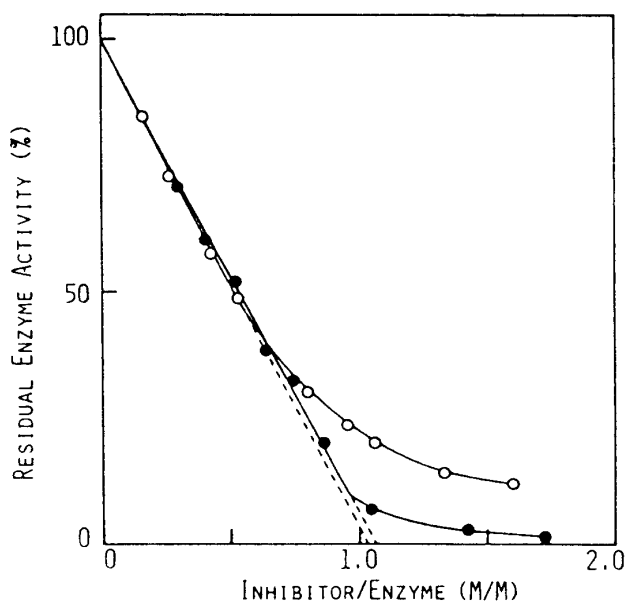


図1 ファバビーン・プロテアーゼインヒビター (FBTI) によるウシトリプシンおよびキモトリプシンの滴定曲線

一定量のトリプシン ($4.0 \times 10^{-7} M$) およびキモトリプシン ($3.7 \times 10^{-7} M$) 濃度でFBTIの濃度を变化させて残存する酵素活性を、Bz-DL-Arg-pNA および Bz-Tyr-pNA を基質として測定した。反応条件は $25^\circ C$, pH 8.0 である。●はトリプシン阻害活性を, ○はキモトリプシン阻害活性を示す。両者とも 1 : 1 阻害形式を表しているが, 詳細は本文参照のこと。

ターの活性測定を行っている際、*Viciaeae* に属するファバビーンに新規なトリプシンインヒビター (faba bean trypsin inhibitor: FBTI) の存在することが判明し, その単離精製を試みた¹⁰⁾。中国産のファバビーンを使用した。ファバビーン粉末の食塩水抽出より出発して CM-セファデックス C-25, セファデックス G-75, QAE-セファデックス A-25 のカラム処理操作を繰り返すことで, 表8に示すように 50% の高収率で電気泳動的に均一なインヒビタータンパク質を得ることができた。本インヒビタ

表9 ファバビーン・プロテアーゼインヒビターのアミノ酸組成

Amino acid	Residues per mole ^a in 24 hr-hydrolyzate	Integer
Aspartic acid	8.2	8
Threonine	4.0	4
Serine	5.5	6
Glutamic acid	3.2	3
Proline	3.7	4
Glycine	2.1	2
Alanine	2.0	2
Half-cystine	13.6 ^b	14
Valine	3.8	4
Methionine	0	0
Isoleucine	0	0
Leucine	1.1	1
Tyrosine	1.7	2
Phenylalanine	1.9	2
Lysine	5.3	5
Histidine	2.9	3
Arginine	2.8	3
Tryptophan	0	0
Total		63

a 分子量を7000として計算。

b シスチンは S-カルボキシメチルシスチンとして測定。

ーはウシトリプシンとウシキモトリプシンの両者を阻害するが, 表8ではトリプシンに対する阻害活性で示してある。両酵素に対して化学量論的に 1 : 1 の阻害を示すが, その阻害定数 K_i はトリプシンに対して $6.1 \times 10^{-9} M$, キモトリプシンに対して $4.4 \times 10^{-8} M$ で, トリプシンに対する阻害活性の方が強かった。このことは図1からも判断することができる。なおこの K_i 値は既に述べたナス果皮のインヒビターに比べると 1桁大きい値 (ナスインヒビターは $1.5 \times 10^{-10} M$) である。

FBTI はアミノ産 63 残基より成り (表9), 1/2 シスチンを 14 残基と非常に多く含む。メチオニン, イソロイシンおよびトリプトファンを欠いている。酸性, 中性では耐熱性を示し, アルカリ性では若干不安定である。分子量 7000, 1/2 シスチン含量より

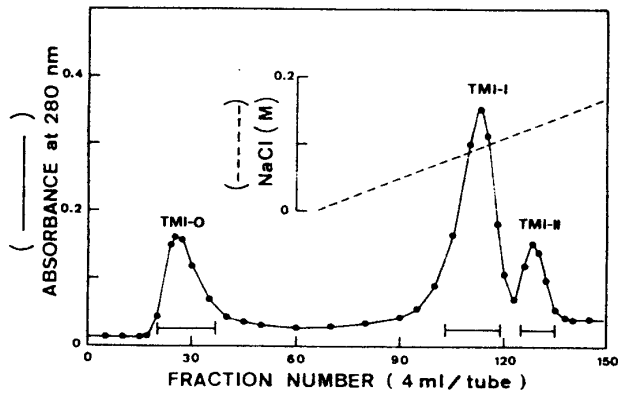


図2 TPCK-トリプシン (pH 3.5) で処理した FBTI の DEAE-セファデックス A-25 クロマトグラフィー

FBTI 試料をジエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH 8.9) で平衡化したカラム (2.6×40cm) に加え, 同緩衝液および食塩の濃度勾配 (0~0.4 M) で溶出した。バーで示した画分を集めた。

表10 T-1およびT-2のアミノ酸組成

Amino acid	T-1	T-2	Cm-FBI
Cm-cysteine	9.1(10)	3.9(4)	14
Aspartic acid	5.3(2)	3.1(3)	8
Asparagine	(3)		
Threonine	2.1(2)	1.9(2)	4
Serine	4.5(5)	1.1(1)	6
Glutamic acid	3.0(2)		3
Glutamine	(1)		
Proline	4.7(4)		4
Glycine	1.3(1)	1.0(1)	2
Alanine	1.2(1)	0.9(1)	2
Valine	3.0(3)	1.1(1)	4
Methionine			0
Isoleucine			0
Leucine		1.0(1)	1
Tyrosine	1.6(2)		2
Phenylalanine	2.0(2)		2
Lysine	3.0(3)	1.9(2)	5
Histidine	3.0(3)		3
Arginine	2.8(3)		3
Tryptophan			0
Total	(47)	(16)	63
Yield(%)	83.2	89.5	

ファバビン・プロテアーゼインヒビターのトリプシンによる限定水解 (酵素修飾) によって生成したペプチド T-1, T-2 のアミノ酸組成で, 括弧内の数字は配列分析後, 決定した (グルタミンとグルタミン酸など)。

考えて, このインヒビターはいわゆる Bowman-Birk Type) に属し, トリプシンとキモトリプシンに対しそれぞれ別個の阻害部位をもつものと推察され, その解析に着手した。

既にナス・トリプシンインヒビターの項で述べた酵素による修飾の手段を用いて FBTI の阻害部位の同定を行った¹¹⁾。精製 FBTI と触媒量のトリプシン (TPCK 処理をして混在するキモトリプシンの活性を完全に押さえたものを使用) を pH 3.5 で反応させた後, DEAE-セファデックス A-25 クロマトグラフィーを行って, トリプシン反応部位ペプチドのみが加水分解されていると考えられるトリプシン修飾化インヒビター (Trypsin Modified Inhibitor) TMI-I, 未反応インヒビター (TMI-0) および 2ヶ所で切断を受けていると思われるインヒビター (TMI-II) を分離した。これらのインヒビターの関係は図2に示す通りである。TMI-I を還元, システインのカルボキシメチル化後, セファデックス G-50 のゲルろ過による 2ヶつのフラグメントを完全に分離, 単離することができた。それぞれのアミノ酸組成は表10に示す通りで, 両ペプチド (T-1, T-2) のアミノ酸組成の和は完全に元のインヒビターと一致している。上記と同じ実験を TLCK 処理をして混在するトリプシン活性を抑えたキモトリプシンを用いて行った。結果の詳細は省略するが, キモトリプシン反応部位の切断を受け, その結果生じた 2ヶつのペプチド, C-1, C-2 を得た。これら 4ヶつのペプチドのアミノ酸分析とアミノ酸配列から FBTI の全一次構造を決定することができた (図3)。なおアミノ酸配列測定に際しては, その頃本学に設置された (文部省公立大学先端技術設備) アプライドバイオシステム社気相型プロテイン

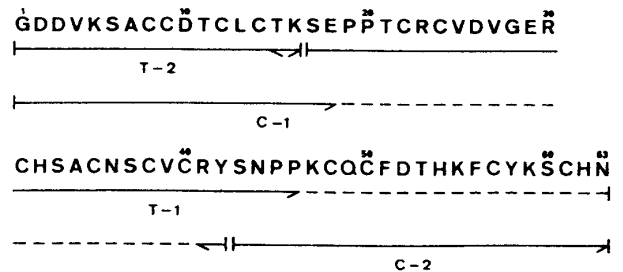


図3 FBTI のアミノ酸配列決定の要約

アミノ酸は一字記号で示してある。T はカルボキシメチル化-TMI-I からのペプチドを, C はカルボキシメチル化-CMI からのペプチドを示す。→ はエドマン分解によるアミノ酸の決定を, ← はカルボキシペプチダーゼ法によるアミノ酸決定を示す。

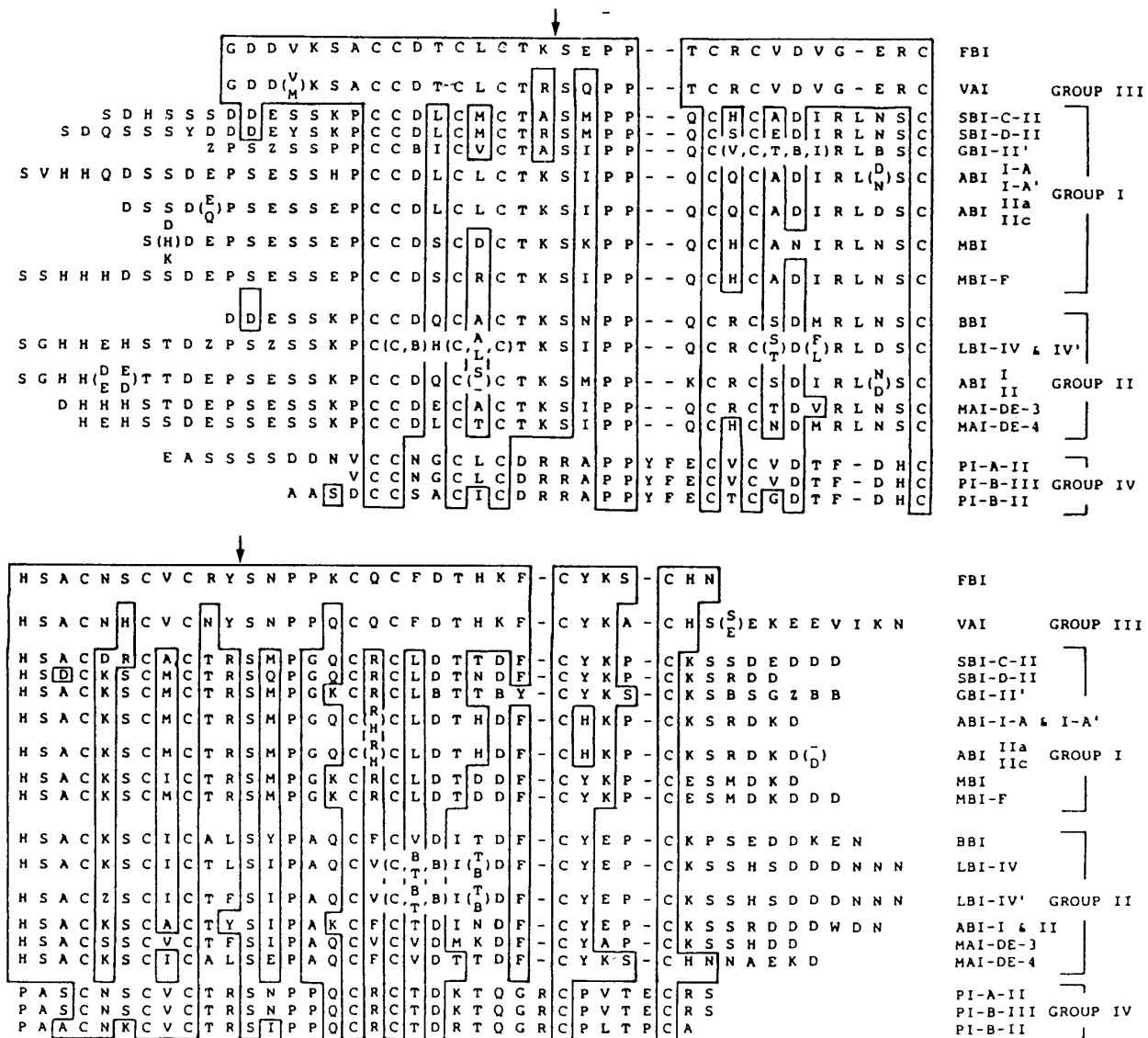


図4 FBTI とマメ・ポーマンバーク型インヒビターとのアミノ酸配列の比較

矢印は反応部位を示す。同じアミノ酸残基をブロックで囲んである。略号は以下の通り。

VAI, *Vicia angustifolia* inhibitor; SBI-C-II and D-II, soybean inhibitor C-II and D-II, GBI-II' garden bean inhibitor II', ABI, azuki bean inhibitors (I, I-A and I-A'; II, IIa and IIc); MBI and MBI-F, mung bean inhibitors; BBI, soybean Bowman-Birk inhibitors; LBI, lima bean inhibitors; MAI, *Macrotyloma axillare* inhibitors; PI, peanut inhibitors (A-II and B-II, B-III).

シーケンサーを十分に活用することができた。図3からも明らかなように本インヒビターのトリプシン反応部位はリジン [16]-セリン [17] であり、キモトリプシン反応部位はチロシン [42]-セリン [43] である。図4にFBTIとマメ類ポーマンバーク型インヒビターのアミノ酸配列との比較を示す。*Vicia angustifolia* Lのインヒビター (VAI) と強い相同性を示している。しかし、トリプシンに対する反応部位がFBTIではリジンであるのに対し、VAIではアルギニルセリンとなっているこ

と (キモトリプシン反応部位は同一)、FBTIはVAIに比較してC-末端側で9ヶのアミノ酸が欠落していることなどが大きな相違点である。このC-末端でのアミノ酸の欠落がFBTIの安定性に影響を与えているのではないかと考えている。トリプシンで修飾したインヒビターはその阻害活性を保持しているのに比較して、キモトリプシンで修飾したインヒビターはキモトリプシンに対する阻害活性を失ってしまう。また、FBTIのトリプシンに対する阻害はキモトリプシンの存在で全く影響を受けない

(反応部位がそれぞれ別個であることの証明であり、一般的にボーマンク型のインヒビターの特徴でもある)のに対して、キモトリプシンに対する阻害はトリプシンの存在によって影響を受けるという実験結果を得ている。この事実はキモトリプシン反応部位がトリプシンによって水解されるのではないかということ推測させるものである。図2でも明らかに本インヒビターをトリプシンと反応させるとTMI-IIが生じていることがわかる。しかもこの物質は反応の時間を長くすればする程多く生成することを確かめている。TMI-IIを多量調製、精製して詳細に検討した。詳細は文献12に譲るが、本インヒビターのキモトリプシン作用部位、チロシン [42]-セリン [43] のペプチド結合はトリプシンによって水解されることを確認した。この異常な切断 (unusual cleavage) は必ずしも初めて報告される現象ではないが、本インヒビターの作用を議論するに際して非常に興味ある現象と考えている。

マメ科植物程ではないがイネ科植物もまたプロテアーゼインヒビターのよい素材である。世界的にみてもインヒビターの研究はマメ種子に集中している感があり、もっと幅広い立場からの研究がもとめられている。米糠のプロテアーゼインヒビターについては田代らによる詳細な報告がなされている¹³⁾。ここでは本節での関連のもと、米糠プロテアーゼインヒビター (rice bran trypsin inhibitor, RBTI) のアミノ酸配列の決定に関して記述する。RBTIはア

ミノ酸133残基より成る単純タンパク質で、1分子で条件によって2分子のトリプシンを別個の部位で阻害するインヒビターである。構造決定に際して、SG-トリプシン (*Streptomyces griseus* trypsin), キモトリプシン, V8プロテアーゼ (*Staphylococcus aureus* V8 protease), カルボキシペプチダーゼなどを用いて、RBTIのペプチド断片を作成し、各ペプチドのアミノ酸配列を決定したのち、ペプチドをつなぎ合わすという古典的な手法で全アミノ酸配列を決定している。その要約を図5に示す。なお、アミノ酸配列決定に関してはすべて手法エドマン法が用いられている。現在タンパク質一次構造の決定にはほとんどすべての研究室で自動シーケンサーが使用されているのを考えると隔世の感がある。

d クランベリービーンのアミラーゼインヒビター

ある種の穀類 (ヒエの一種) のプロテアーゼインヒビターと α -アミラーゼインヒビターが同一の分子種であるとの報告がなされ、インヒビター研究者の間で話題となった。筆者らもたまたま新規研究課題として α -アミラーゼインヒビターに取り組んでいたので、研究室に多数保存されていたマメ類について検討を行った¹⁴⁾。13品種のインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の他、既にプロテアーゼインヒビターの活性が報告されているダイズ (*Glycine max*), ファバビーン (*Vicia faba*), リママメ (*Phaseolus lunatus*) など21品種 (11種) につい

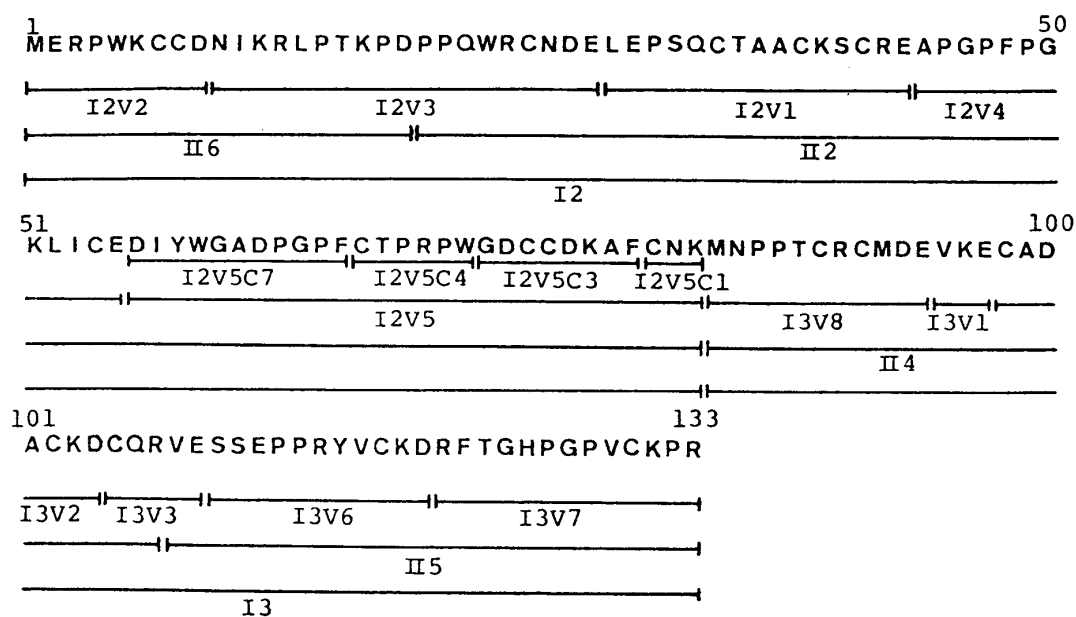


図5 コメ糠トリプシンインヒビター (RBTI) のアミノ酸配列の要約

CはRBTIをキモトリプシン消化して得られたペプチド, Vは*S. aureus* V8酵素処理して得られたペプチドである。それ以外のI~IIはRBTIのトリプシン修飾により得たものである。なおアミノ酸配列は手動エドマン法によって決定された。

表11 クランベリービーンのアミラーゼインヒビターの精製

Step	Total act. (unit×10 ³) ^a	Total protein (mg)	Specific act. (unit/mg)	Recovery (%)
Extract	296	8300	35.7	100
Heat treatment	228	3600	63.3	77
Ethanol fraction	179	868	206	60
DEAE-cellulose	136	510	267	46
Sephacryl S-200	101	290	347	34

a 阻害1単位はアミラーゼ活性測定条件 (37°C, 10分) で50%の活性を阻害する量と規定した。

て分析を行った。ほとんど全てのマメ類にトリプシンやキモトリプシンの活性を阻害するプロテアーゼインヒビターが認められたが、 α -アミラーゼを阻害する α -アミラーゼインヒビターはインゲンマメに属する品種にのみその存在が認められた。入手したインゲンマメ (Kidney beans: *Phaseolus vulgaris*) は以下のものである。White (South Africa), Great northern (USA), Small white (Thailand), Daifuku (Japan), Light red (USA), Dark red (USA), Small red (USA), Pink (USA), Kintoki (Japan), Pinto (Thailand), Cranberry (USA), Tora (Japan), Uzura (Japan) の13品種で、特にクランベリーとウズラに強い α -アミラーゼインヒビター活性が認められた。なお、後述の研究の結果判明することであるが、精製された α -アミラーゼインヒビターにはプロテアーゼインヒビター活性は全く認められず、プロテアーゼインヒビターと α -アミラーゼインヒビターが同一分子種で活性を示すというのは穀類の一部に限定されるようである。

クランベリービーンからの α -アミラーゼインヒビターの単離精製は、一般的タンパク質精製法を応用することにより均一のタンパク質として調製することができる¹⁵⁾。その概略を表11に示すが、現在ではあまり使用されない有機溶媒による分別を加えた。本 α -アミラーゼインヒビターはタンパク質として14%の糖質を含み、分子量は約45,000、等電点は4.68である。アスパラギン酸、セリン、バリンなどのアミノ酸を多く含むが、シスチンは含有していない。他のインゲンマメの α -アミラーゼインヒビターもシスチンは少なく、本インヒビターに特異的なものではない。阻害の特異性は哺乳動物の α -アミラーゼに限られ、植物、微生物起源の α -アミラーゼや β -アミラーゼには作用しない。各種哺乳動物の膵臓 α -アミラーゼについてクランベリービーンのアミラーゼインヒビターの作用を検討したところ、哺乳動物 (ブタ、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ウシ、ウサギ、モルモット、ラット、マウス) の種類によって阻害度に強弱はあるものの試験動物の α -アミラーゼすべてに阻害活性を示した¹⁶⁾。

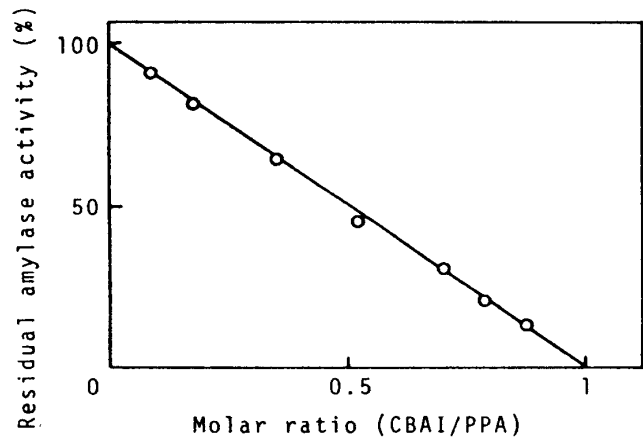


図6 クランベリービーン・アミラーゼインヒビター (CBAI) によるブタ膵臓 α -アミラーゼ (PPA) の化学量論的阻害

PPA ($1.6 \times 10^{-8} \text{M}$) と種々の濃度の CBAI ($1.4 \times 10^{-9} \text{M} \sim 1.4 \times 10^{-8} \text{M}$) を pH 5.5, 37°C, 60 分間反応させた後、残存する PPA の活性を測定した。

阻害活性に対する pH の影響は大きく、一般に pH 5.5 で測定した方が、pH 6.9 で測定するより大きく現われる。これは阻害活性最適の pH とアミラーゼの活性発現の最適 pH が異なるからである。また、クランベリービーン α -アミラーゼインヒビターとブタ膵臓 α -アミラーゼとの複合体形成は通常 (pH 5.5, 37°C) の条件で 30 分から 60 分を必要とし、プロテアーゼインヒビターとプロテアーゼの場合は通常の場合では複合体形成に時間の問題を考慮する必要がないとの大きく異なる。 α -アミラーゼインヒビターとブタ膵臓 α -アミラーゼとの化学量論的結合と阻害との関係を図6に示す。複合体形成に時間を必要とするもののモル比 1 : 1 で完全な阻害を示した。このように α -アミラーゼインヒビターと α -アミラーゼとの結合には時間がかかる場合があり、他の文献値と比較する際、測定 pH や測定条件を十分検討する必要がある。プロテアーゼインヒビターや α -アミラーゼインヒビターなどのタンパク

質性のインヒビターを栄養生理学的に考察する際、一番問題になるのは経口的にタンパク質性インヒビターが摂取された場合、胃や腸でどのような運命をたどるかということである。摂取されたタンパク質は胃のペプシン、腸のトリプシン、キモトリプシンなどタンパク質分解酵素と常に接することになる。クランベリービーン α -アミラーゼインヒビターの哺乳動物プロテアーゼによる消化を *in vitro* で検討した¹⁷⁾ところ、このインヒビターはこれら消化酵素に対して非常に強い抵抗性をもつことが判明した。相当高濃度のペプシン、トリプシンと3時間処理してもその阻害活性は失われなかった。キモトリプシン処理では高濃度で活性の消失が認められた。次いで *in vivo* でクランベリービーン α -アミラーゼインヒビターの小腸での挙動を検討することとした。小腸内を通過していくインヒビターを測定するためには放射性のクランベリービーン α -アミラーゼインヒビター (CBAI) を作成して、その腸管での挙動を放射活性を指標に追跡する方法と、ウサギを用いて CBAI に対する抗血清を作成し免疫学的に測定する方法がある。まず $[^{14}\text{C}]$ でクランベリービーン α -アミラーゼインヒビター (CBAI) を標識することとした。CBAI を $[^{14}\text{C}]$ HCHO と NaBH_4 で処理することによって CBAI 中のリジンの ϵ -アミノ基を還元メチル化するというものである¹⁸⁾。

予備的に CBAI を種々の試薬で化学修飾を試み阻害活性との関係を検討した。TNBS (2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid), NBS (N-bromosuccinimide), CHD (1, 2-cyclohexanedione) で反応させたところ、比較的短時間の処理で阻害活性を失った。これら試薬と反応する CBAI 中のアミノ基やアルギニン、トリプトファン、チロシンなどが影響を受けたものと思われるが、詳細の検討は行っていない。フォルムアルデヒド (HCHO) と NaBH_4 との処理では活性に全く影響はなかった。また、CBAI のこの処理はウサギ抗血清に対する免疫沈降反応にも変化を与えなかった¹⁹⁾。すなわち CBAI のリジン残基を還元メチル化しても、元の CBAI とその挙動は殆ど変化しないものと考えることができる。

なお本インヒビターはジスルフィド架橋を介さない3個のサブユニット構造から成り、前述した糖鎖はその中の1個のみに存在することを付記しておく。160 g の雄ラットの胃に $[^{14}\text{C}]$ -標識 CBAI (非標識 CBAI で希釈したもの) を強制投与し、同時に膵酵素の分泌を促すため CCK-8 を尾静脈より投与した。ラットは30分、1時間および3時間後に胃、小腸および盲腸を摘出した。小腸は3等分した。そ

れぞれの管腔内容物と洗浄液を集め濃縮、凍結乾燥後分析に供した。投与した CBAI の胃腸管内の分布を図示したのが次の2図 (図7, 図8) である。図7は放射活性を、図8は免疫抗原性を示している。 α -アミラーゼインヒビターの大部分は消化、吸収を受けることなく盲腸部分まで到達していることが分かる。

上述の実験では CBAI だけを胃内に強制投与していること、また他の食餌成分を含んでいないので CCK-8 を静脈に投与して膵酵素の分泌を促している。そこでより実際の食餌条件に近い形で、CBAI を摂取させ、ラットの α -アミラーゼに対する影響を検討することとした²⁰⁾。20%カゼイン (α -コンスターチ 59%) を基準にした (胃内食餌通過時間測定のため10%ポリエチレングリコールを含む) 飼料2gに10mgの精製 CBAI (非標識) を添加

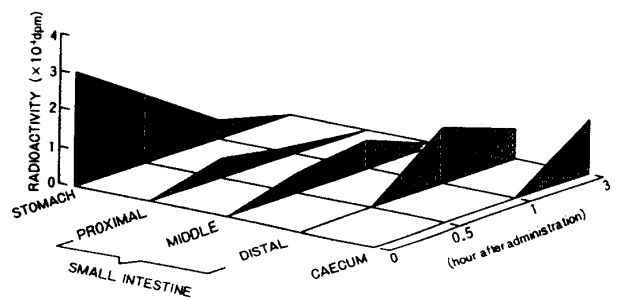


図7 ラット胃に投与した放射活性 CBAI の消化器官における時間的分布

非放射性 CBAI と $[^{14}\text{C}]$ 標識 CBAI の混合物をラット胃内に強制投与した。同時に CCK-8 を尾静脈より注入した。所定の時間にそれぞれ4匹のラットを屠殺、消化器官 (胃、小腸、盲腸) を摘出し、残放射活性を測定した。

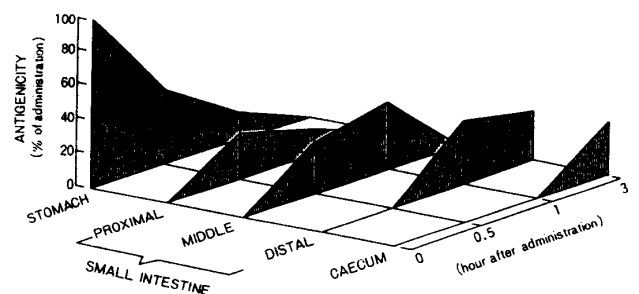


図8 ラット胃に投与した CBAI の消化器官における免疫反応性の時間的分布

この実験に使用したラットは図7と同じである。免疫反応性 CBAI 量、すなわち抗原性レベルはゼロ時間の胃内の量を100%として表してある。

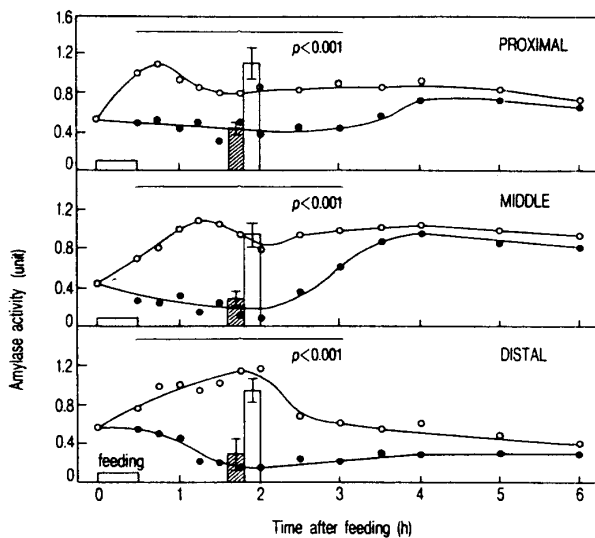


図9 CBAI を実験食に添加した場合および無添加の場合のラット消化管内の α -アミラーゼ活性の食後変化

小腸は所定の時間に摘出、ただちに3等分して残存する α -アミラーゼ活性を3,5-ジニトロサルチル酸を用いる定法で測定した。棒グラフで示した値は食後30分から180分の間で得た9匹のラットの平均値 \pm SEである。□はCBAIを添加した群。○はCBAI無添加の群である。

し、120 gの雄ラットに与えた。ラットは前以て、2 gの飼料を20分以内にすべて摂取するように訓練してある。CBAIを添加した群と無添加の群より1匹ずつのラットを図に示す時間毎に屠殺し、血漿を採取、胃、小腸を摘出した。小腸は3等分し管腔内容物および洗液は測定まで凍結保存した。

ポリエチレングリコールによって測定した食餌成分の胃内通過速度は飼料中のCBAIの存在の有無にかかわらず、全く同じであった。3時間以内に胃はほぼ空の状態になっている。3等分した小腸の α -アミラーゼ活性を測定したのが図9である。なおこの実験では使用したラットの数が少ないので、ラットの処理時間間隔を短くしてある。例えば2時間内では15分間隔でラットを処理している。CBAIを添加した飼料を摂取したラットは小腸上部（胃に近い方）で明らかに α -アミラーゼ活性が、CBAI無添加群のラットより抑制されていることが分かる。小腸中部、下部（盲腸に近い方）でも同様の傾向がみられた。飼料摂取後30分から3時間の間のデータを統計処理して棒グラフで図中に示している。ラットの臍臓より分泌された α -アミラーゼがCBAIにより阻害されていることをしめして

おり、摂取されたデンプンの消化が抑制されていることが推察できる。

デンプンの消化・吸収が抑制されれば、当然血漿中のグルコースやインスリン濃度に影響を及ぼす筈である。図10は血漿グルコース濃度を、図11は血漿インスリン濃度を測定した結果で、明らかにCBAI添加の群で、グルコース、インスリン共に低

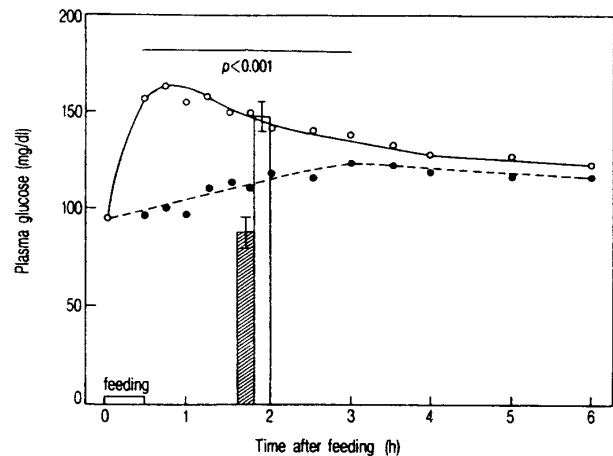


図10 CBAI を実験食に添加した場合および無添加の場合のラット血漿のグルコース濃度の食後変化

図9の実験と同じラットを使用、小腸の代わりに血液を使用した。血漿グルコースは酵素法で測定した。図9と同じく食後30分から180分の間で得た値の平均値 \pm SEを示している。棒グラフのマークは図9と同じ。

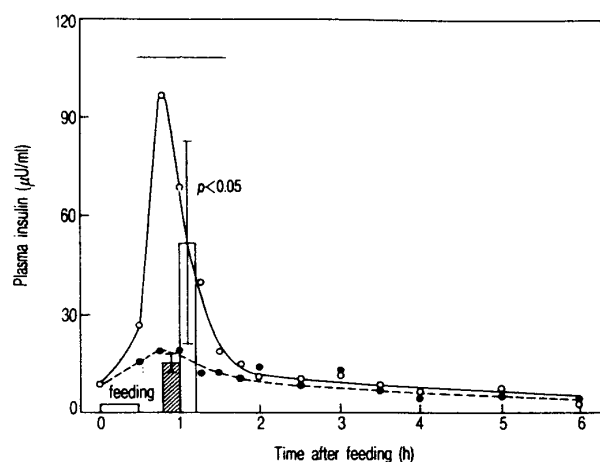


図11 CBAI を実験食に添加した場合および無添加の場合のラット血漿インスリン濃度の食後変化

血漿インスリンは酵素免疫法に基づく市販キットを使用した。食後30分から90分の間で得た5匹のラットの平均値 \pm SEである。棒グラフのマークは図9と同じ。

値に抑えられていることが分かる。なお、これらの実験で小腸内のトリプシンやキモトリプシンの活性はどの部位でも CBAI の影響は受けていなかった。近年シロインゲンマメより単離した α -アミラーゼインヒビターがヒトの α -アミラーゼ活性を抑制したとの報告もあり、血糖値改善への α -アミラーゼインヒビターの利用も考えられる。

II 食品タンパク質の抗酸化機能

a 粉末モデル系各種タンパク質の多価不飽和脂肪酸抗酸化機能

近年、多価不飽和脂肪酸の栄養問題が改めて多くの関心を集めている。多価不飽和脂肪酸それ自体、細胞膜構成成分として、あるいはプロスタグランジンの出発物質として必須のものである。さらに疫学的にも血栓症の予防や血清コレステロール値の改善にも有効であるとされている。しかし、多価不飽和脂肪酸を多く含む食品は、保存中に酸化が進み、食品価値を損うだけでなく、毒性を呈することもある。酸化防止としては密閉系の食品では脱酸素が最も効果的であるが、開放系の食品や密閉系の食品でも開封後は、抗酸化剤の使用に頼らざるを得ない。抗酸化剤の役割は脂質酸化の過程で生成したフリーラジカルやヒドロペルオキシドを補足し、連鎖反応を中断または遅延させることにある。従来よりフェノール系の合成抗酸化剤がよく用いられてきた。しかし、最近では合成抗酸化剤の使用は消費者の要求もあり、その使用を差し控える傾向にある。

一方、食生活の変化や食品製造技術の進歩に伴う加工食品・調理食品の普及により多価不飽和脂肪酸の摂取不均衡が助長される可能性がでてきた。このようなとき、保存中は多価不飽和脂肪酸の酸化を防ぎ、摂取後は消化吸収を受け栄養素として利用されるようなものが開発されれば、加工食品・調理食品の栄養強化も容易になろう。ある種のタンパク質が適当な条件下で多価不飽和脂肪酸酸化に対し、抗酸化性を示すことはよく知られている。この効果はタンパク質の持つ両親媒性に由来するものと考えられる。筆者らは既に安全性の確立している食品素材の中、高水分活性下で小麦グリアジンが特に強い抗酸化性を発揮すること、噴霧乾燥などで多価不飽和脂肪酸をグリアジンなどと共に粉末化すると、乾燥状態でも長期間抗酸化性が保持されることなどを見出した^{21)~23)}。

多価不飽和脂肪酸としてリノール酸を用い、各種タンパク質およびそれらのペプシン消化産物のリノール酸に対する抗酸化性を検討したのが図 12 であ

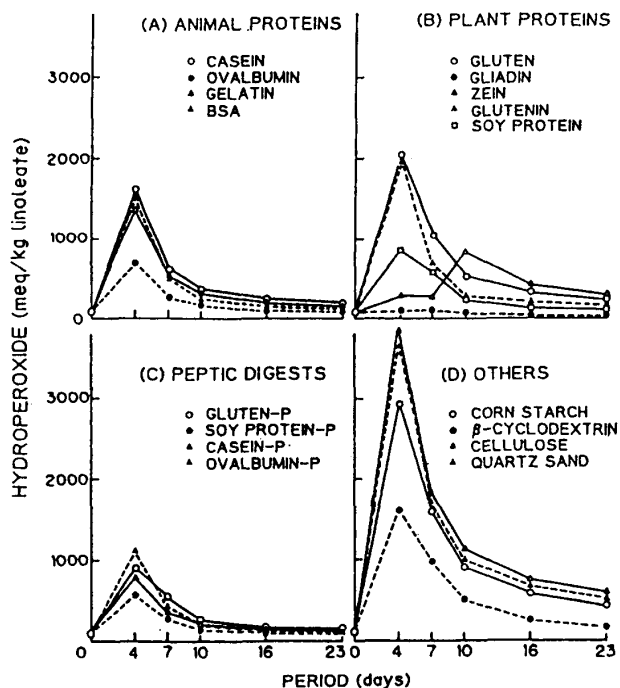


図12 粉末モデル系各種タンパク質の脂肪酸抗酸化能

脂肪酸としてリノール酸を使用、タンパク質として(A)動物性タンパク質、(B)植物性タンパク質、(C)ペプシン消化産物、(D)タンパク質以外の物質を使用した。脂肪酸とタンパク質との混合比は1:9である。40°C、水分活性0.6の条件で保存。なおこの実験では酸素を充填した比較的小型の保存庫を使用した。所定の日に取り出し過酸化物値(POV)を測定した。

る。これらの実験ではリノール酸をヘキサンに溶解した後、各種タンパク質を脂肪酸1に対し9倍量添加して混合しながら、ヘキサンを揮発させて粉末化した。図12の(D)はタンパク質以外の物質である。硫酸を用いて水分活性0.6に調製した温度40°Cの恒温器中に試料を保存し、経時的に試料中の脂肪酸の酸化進展度を過酸化物価で測定した。多くのタンパク質で4日目で過酸化物価の最高値を示した。例外的なタンパク質はグリアジンで、実験期間を通じて過酸化物価は増加せず、ほぼ完全にリノール酸の酸化を抑制した。なおグリアジンは筆者らの研究室で市販グルテンより調製したもので、もとのグルテンおよび同時に調製したグルテニンに抗酸化効果の認められないのは興味ある点である。グリアジンの効果を実証するためにリノール酸をグリアジンと粉末化したものを図12と同じ条件で1ヶ月保存した後、粉末より脂質をヘキサンで抽出、ガスクロマトグラフィーで分析した。図13で明らかなようにグ

リアジンと粉末化したリノール酸がそのまま回収されているのに対し、グルテンやグルテニンと調製した試料ではリノール酸は殆ど回収されていない。

食品の水分が脂質酸化に影響を及ぼすことは一般的に知られている。そこでタンパク質-リノール酸-パルミチン酸 (90 : 7 : 3) から成る粉末系を 40°C の一定温度、種々の水分活性の環境で保存し、

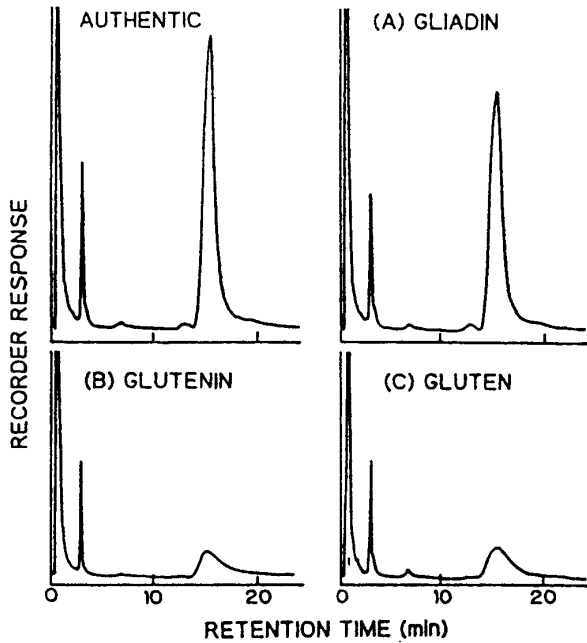


図13 粉末モデル系で1ヶ月保存したときの残存リノール酸のガスクロマトグラフィー

条件は図12と同じ。粉末モデル系からヘキサンで抽出し直接脂肪酸を分析した。本文参照のこと。

過氧化物価と脂肪酸を直接ガスクロマトグラフで測定した。試料にパルミチン酸を加えたのは、ヘキサンによる脂肪酸抽出のばらつきを避けるため、L/P比 (リノール酸/パルミチン酸) として表すためである。図14にグリアジンとカゼインで粉末化したリノール酸の酸化進展度を示してあるが、水分活性0.7と0.9での結果は劇的であり、実験期間中過氧化物価の増加は認められなかった。カゼインタンパク質では水分活性の高低にかかわらず、数日で高い過氧化物価をしめしており、グリアジンとの差は明

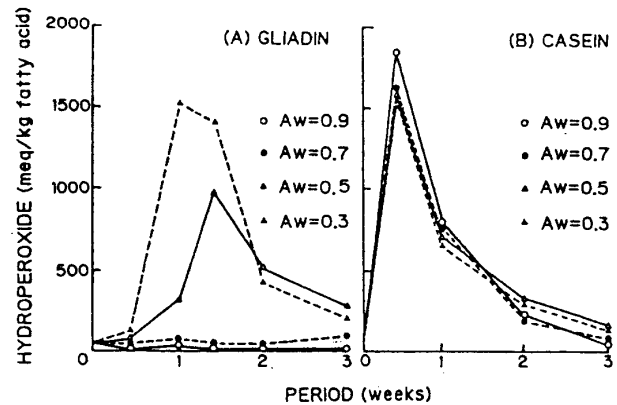


図14 グリアジンおよびカゼインを基とした粉末モデル系での脂肪酸酸化と水分活性の関係

実験条件は図12と同じ。ただしリノール酸以外にパルミチン酸を加えている。タンパク質：リノール酸：パルミチン酸の比は90 : 7 : 3である。パルミチン酸については本文参照のこと。

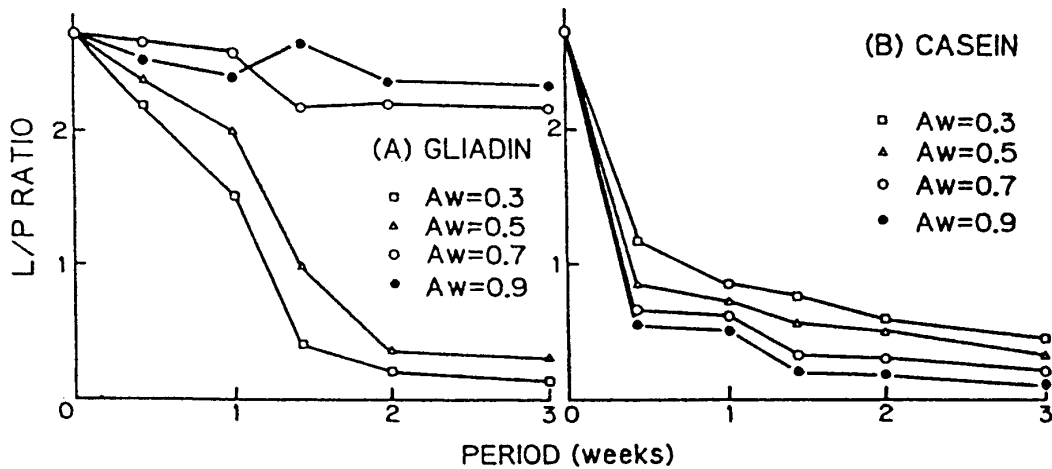


図15 グリアジンおよびカゼインを基とした粉末モデル系で種々の水分活性で保存した脂肪酸の残存比

実験条件は図14と同じである。リノール酸(L)とパルミチン酸(P)はガスクロマトグラフで測定した。グリアジンの場合高水分活性ではリノール酸の酸化が抑制されているので、L/Pは変化しないが、低水分活性ではリノール酸が酸化され酸化を受けない飽和脂肪酸パルミチン酸との比は小さくなる。

白である。同じ実験で実際に脂肪酸を直接測定した結果が図15である。水分活性0.9, 0.7で過酸化物価による結果を裏づけている。

b 多過不飽和脂肪酸のグリアジンによるマイクロカプセル化

グリアジンはその調製法からも解るように70%エタノールに可溶性である。また不飽和脂肪酸も同じ溶液に溶ける。グリアジンとリノール酸を適当な

割合で含んだ溶液から噴霧乾燥によって脂肪酸を粉末化すれば、リノール酸がタンパク質分子の表面に単に付着したのではなく、分子の疎水性領域内部に取り込まれた微粒子の生成が期待できる。その結果リノール酸は外部酸素との接触が妨げられ、高い抗酸化性が期待される。事実、噴霧乾燥によって調製したリノール酸含有グリアジン微粉末を走査型電子顕微鏡で観察すると図16のように数多くの粒状粒子の存在が確認できた。筆者らはこれらの粒状粒子



図16 噴霧乾燥によって調製したリノール酸含有グリアジン微粉末の走査型電子顕微鏡写真 (a)はリノール酸とパルミチン酸混合物 (w/w) 20%を含んでいないグリアジン粉末, (b)は含んでいるものである。

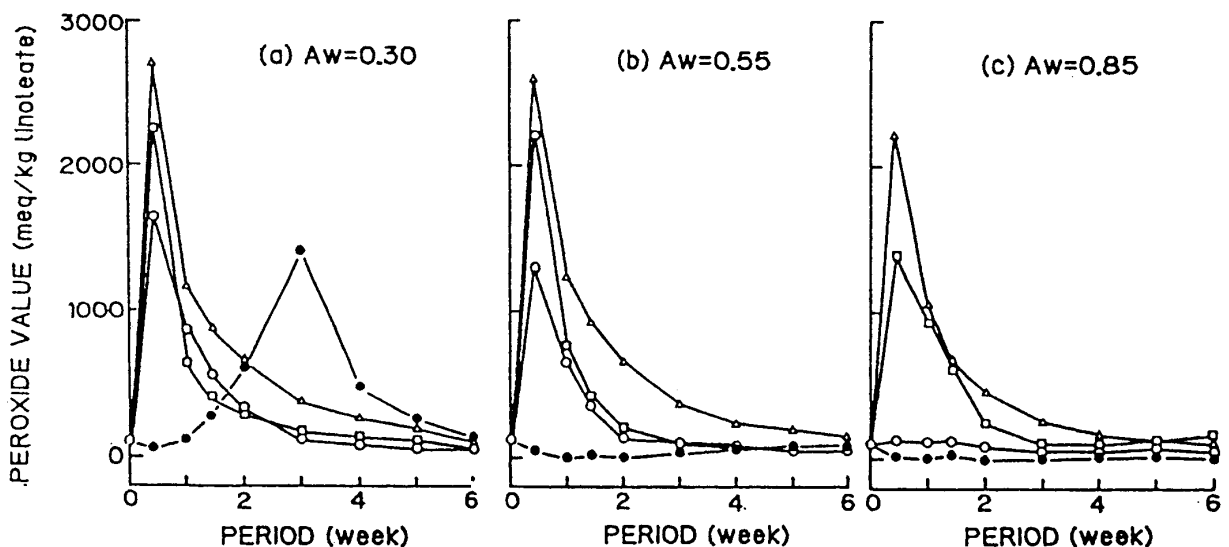


図17 噴霧乾燥粉末と単純混合粉末の保存中の脂肪酸酸化の相違

グリアジンとリノール酸 (パルミチン酸も含む。詳細は本文参照のこと) を噴霧乾燥粉末および単純混合粉末にして高, 中, 低水分活性で保存した場合の過酸化物価の変化を示している。●はグリアジンを基にした噴霧乾燥試料; ○はグリアジンを基にした単純混合粉末; □はゼラチンを基にした単純混合粉末; △はデンプンを基にした単純混合粉末である。保存温度は40°C。

は内部に油滴を包含したマイクロカプセルとみなしている。

そこでマイクロカプセル化粉末と既述の単純混合粉末の相違点を検討した。グリアジン／リノール酸／パルミチン酸（40：7：3）を含む70%エタノール溶液から噴霧乾燥によって調製した粉末と、同じ組成比の単純混合粉末の抗酸化性を比較したのが図17である。水分活性0.55の条件で保存した噴霧

乾燥粉末の過氧化物価は6週間にわたって殆ど上昇しない。単純混合粉末では水分活性0.55では既述の通り効果的ではない。水分活性0.3の条件でも噴霧乾燥粉末にすると過氧化物価上昇の時期を相当遅延させていることが分かる。水分活性0.85の条件ではどちらの粉末標品も抗酸化性を示す。L/Pとして脂肪酸を実際に測定した結果もこのことを裏づけていた。

以上の結果からグリアジン分子中の脂肪酸の存在状態が単純混合試料と噴霧乾燥試料で異なることは観察できるが、試料中の脂肪酸のヘキサンによる抽出の度合いを検討したのが図18の結果である。それぞれの試料を数十秒から数分間ヘキサンと激しく攪拌し、直ちに濾過して抽出された脂肪酸を定量した。単純混合粉末中の脂肪酸（リノール酸とパルミチン酸）は30秒でほぼ完全に抽出されたのに対し、噴霧乾燥粉末では5分間の激しい攪拌でも50%の脂肪酸が抽出されたに過ぎず、脂肪酸はグリアジンと単なる結合をしているのではなく、そのマトリックス中に強く取り組まれているものと推察できる。

筆者ら元来、マイクロカプセル化多価不飽和脂肪酸を食品へ添加することを目的にしている。そのためにも長期間保存した試料の消化・吸収性がどうなるかは興味のあるところである。6週間40°Cで保存（水分活性は0.3, 0.55, 0.85の3通り）した試料について常法通りペプシン（酸性下12時間）－パンクレアチン（中性下12時間）法で経時的に消化率（紫外吸収度）を測定した。図19に示すように

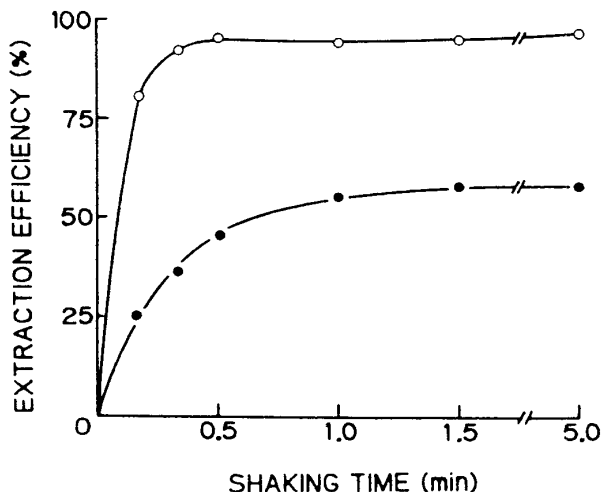


図18 噴霧乾燥と単純混合によって調製した試料の脂肪酸抽出効率

ヘキサンと試料を激しく攪拌することによって抽出効率を検討した。●は噴霧乾燥によって調製した試料；○は単純混合によって調製した試料。

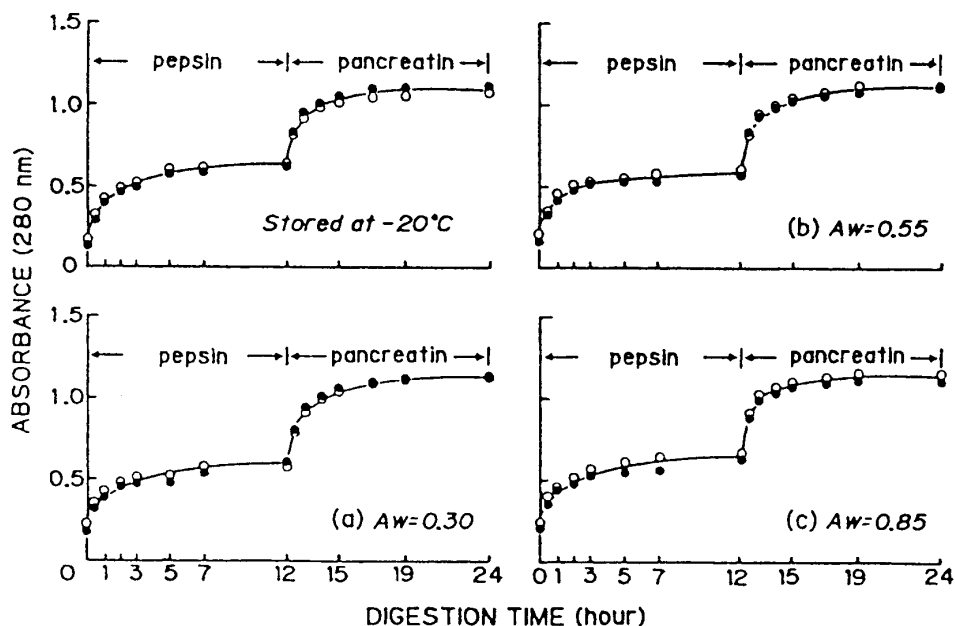


図19 グリアジンを基にした試料の人工酵素消化と保存中の水分活性
6週間40°Cで保存した試料を使用した。詳細は本文参照のこと。●
は噴霧乾燥試料；○は単純混合試料

単純混合試料も噴霧乾燥試料も対象として -20°C に保存した試料と全く同じ消化傾向であった。

c グリアジン-リノール酸マイクロカプセル試料の長期保存

いままで述べてきた結果は長くても6週間程度の保存期間であった。実際の応用を考慮して、より長期の保存実験を行った²⁴⁾。噴霧乾燥試料を 40°C 、3種の水分活性の条件で100日間保存し、経時的に過酸化価と残存リノール酸量を測定した。図20と図21にその結果を示してある。ここで用いた噴霧乾燥試料はタンパク質（グリアジンあるいはゼイン）4に対してリノール酸を1の割合で含んでいる。また噴霧乾燥に際しては防爆型の噴霧乾燥機を使用したものの大量処理の危険性を考慮してエタノール濃度は60%とした。保存中の水分活性の高低を問わずグリアジンおよびゼインを含む試料は100日の保存中過酸化価の上昇を認めなかった。図21でグリアジンを含む試料を水分活性0.85で40日以上保存した時、残存リノール酸量の低下がみられるのは、高水分のため試料が凝集、レジン状となりヘキサンの抽出が十分でなかったためと考えている。グリアジンと同じプロラミン系のタンパク質ゼインが抗酸化性を有することは、既に示したところであるが、噴霧乾燥試料によってその効果は一層増大するようである。

長期保存実験によって噴霧乾燥粉末中の多価不飽和脂肪酸は酸化を受けることなく、十分保存に耐えることが判明したが、次に問題になるのは被膜タンパク質やマトリックス内部の脂肪酸が消化吸收を受けるかどうかである。既述のペプシン-パンクレアチン法で人工的に消化してみると、グリアジンは脂肪酸を含まない場合と同様に消化され、またタンパク質内部に取り込まれていたりリノール酸もタンパク質の消化と並行して殆ど100%遊離することが明らかとなった。これらの結果は図22に示す通りである。

上記の消化実験はさらに動物実験によって確かめられた。その概要は以下の通りである。グルテン20%とリノール酸5%を含む基本試料で1週間予備飼育したラットにグリアジン/リノール酸（4：1）から成るマイクロカプセル25%を含む試料を図23の矢印の点で非吸収性マーカーのクロム酸と共に1日だけ投与した。グルテンがグリアジンに置換した以外は本質的に飼料の性質は変わっていない。翌日から再び基本飼料に代え、さらに数日飼育を続けた。その間、糞中に排泄される脂肪酸を測定したところ、図で分かるようにリノール酸がマイク

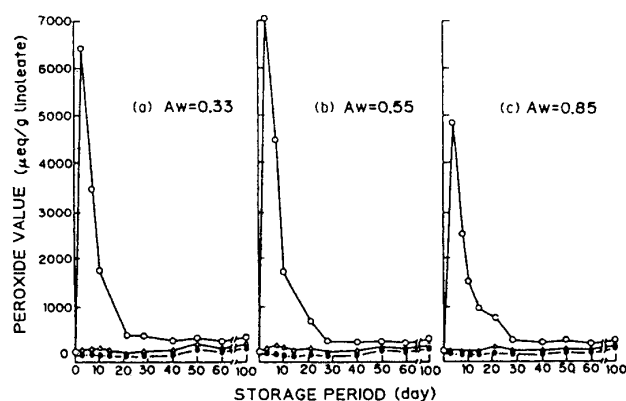


図20 噴霧乾燥試料の長期間保存と過酸化価の変化

低、中、高水分活性で長期間保存した。●はリノール酸とグリアジンを噴霧乾燥した試料；△はリノール酸とゼインを噴霧乾燥した試料；○はデンプンとリノール酸を単に混合した試料。

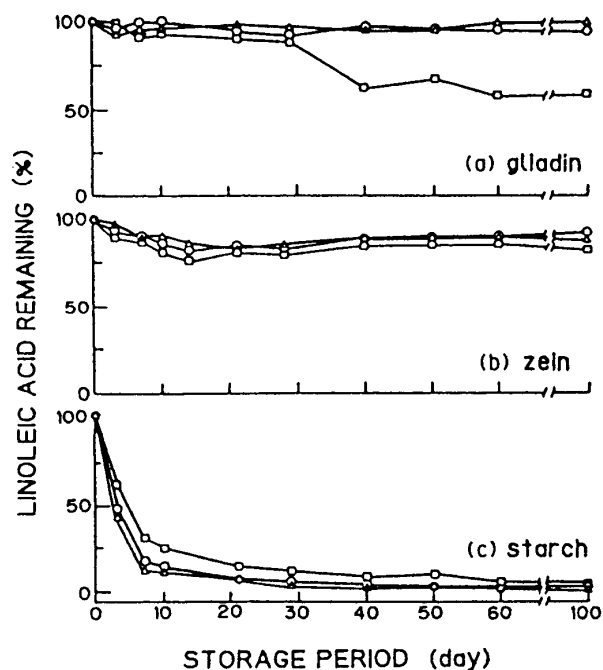


図21 噴霧乾燥試料の長期間保存と残存リノール酸

試料は図20と同じ試料を使用した。リノール酸はガスクロマトグラフで測定した。△は水分活性0.33；○は水分活性0.55；□は水分活性0.85で保存した。

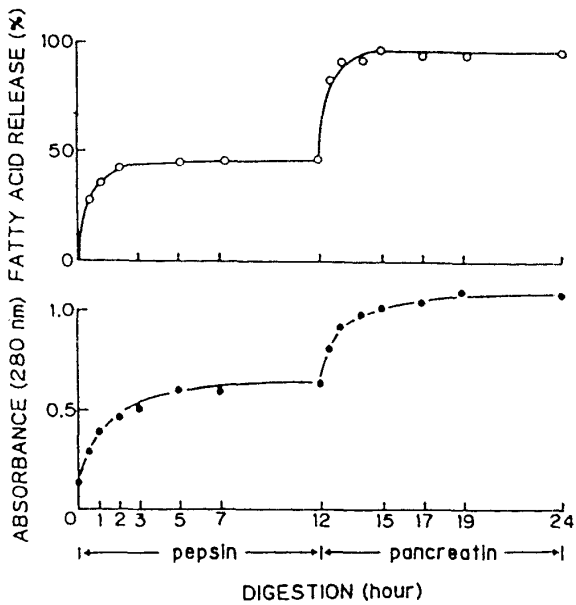


図22 噴霧乾燥試料からの脂肪酸の酵素消化による遊離

グリアジンとリノール酸の噴霧乾燥試料をペプシン-パンクレアチンにより人工的に消化した（詳細は本文参照のこと）。

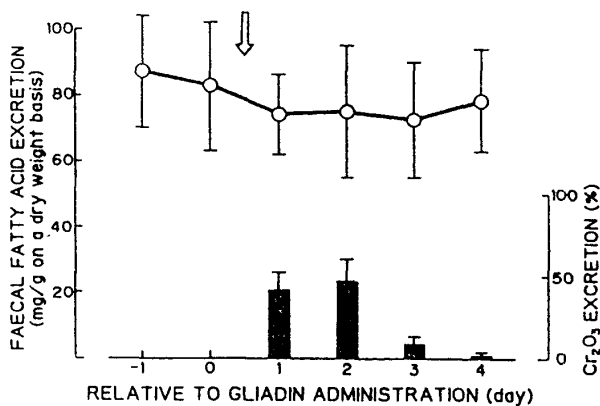


図23 噴霧乾燥グリアジン試料投与前後数日のラット糞中への脂肪酸排泄

○とバーは6匹のラットの平均値±SEである。詳細は本文参照のこと。

ロカプセル化して投与されても、糞中脂肪酸排泄量に著しい変化は起こらなかった。マイクロカプセルが腸管内で消化を受けにくいのであれば、投与後の糞中にやや多量の脂肪酸が検出されてもよい筈であるが、そのような傾向はみられなかった。これらの結果はマイクロカプセル化してもタンパク質も脂肪酸も全く消化吸収に影響を受けず、十分に食品への添加、応用を期待させるものである。

リノール酸含有グリアジンマイクロカプセルを実際に製パン材料に1～10%添加したところ、焼き

上げ後のパン容積を著しく増大させた。5～8%の添加で3倍に膨らんだ。マイクロカプセル（5%）を添加したパンと無添加のパンを焼き上げ、前提条件を示さずにどちらを好むかを問う2点嗜好法によって官能検査を実施した。41名中マイクロカプセル入りを好むとした者15名、無添加を好むとした者26名で統計的に有為な差とはならなかった。パン容積の膨大化はグリアジン（あるいはグルテン）によるネットワークの形成によって二酸化炭素ガスが保持されたものであろう。またこのことはパンのテクスチャーに変化を与え、マイクロカプセル入りのパンを好んだ者の一因になっている。嫌った者の理由には多分グリアジン由来と思われる苦味が舌に残るという点を挙げる者が多かった。このパンでは基本材料以外香辛料、調味料、甘味料などは一切使用していないし、また食する時も水以外の飲み物を与えていないので、グリアジンの苦味が強調されたのであろう。パンとして焼き上げ、実際の賞味期間以上の1週間の間、マイクロカプセル中のリノール酸がどう保存されているかL/P比および過酸化価値を経日的に測定したが、最初の日の値と全く変わらなかった。このことはリノール酸が実際の製品の中で室温に放置しておいても、殆ど酸化を受けずに安定に保たれていることを示唆している。

d 卵白の抗酸化能

上記のように今までは、主としてグリアジンとリノール酸の単純混合、あるいはマイクロカプセル化による脂肪酸の酸化抑制について研究を行ってきたが、我々が日常摂取する食用油脂はリノール酸などで示される脂肪酸ではなく、グリセロールに3種の脂肪酸がエステル結合しているトリアシルグリセロール（一般的には依然としてトリグリセリド、TGと呼ばれているが、学術用語としてはトリアシルグリセロールが正しい）が中心である。そこで以後の実験では脂肪酸でなく、ベニバナ油（safflower oil）とイワシ油（sardine oil）を油脂として使用し、またタンパク質としては既に植物性タンパク質グリアジンに次いで動物性タンパク質として抗酸化能の高かった卵白アルブミンに着目し、卵白（ニワトリ）そのものを使用することとした。黄身を除いた卵白を4倍量の水で希釈し、不溶性物質を遠心操作で除去した後、噴霧乾燥して使用した²⁵⁾。油脂とタンパク質との単純混合粉末は今までに述べてきたように、油脂をヘキサンに溶解した後タンパク質を加え、ヘキサンを蒸散させた。タンパク質と油脂の比は9：1である。37°Cの恒温器に入れ経時的に試料を取り出し、酸化進展度を測定した。過酸化価値

の他に TBA 値（過酸化物が更に酸化された二次生成物の生成を測定する値）を測定した。油脂や脂肪酸の同定には薄層クロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィーを使用した。主な結果を図 24～25 に示す。図 24 はベニバナ油と各種タンパク質の単純混合粉末の保存中の過酸化価と TBA 値を表わしている（保存条件は 37°C，水分活性 0.3～0.5）が，明らかにグリアジンと卵白に効果が認められる。TBA 値の立ち上がりは過酸化価より遅れており，過酸化価より二次生成物が生じていることが分かる。図 25 はイワシ油の結果であるが，過酸化価，TBA 値いずれでもグリアジンと卵白は測定期間中完全にその酸化を抑制している。これらの図でベニバナ油の場合は 1 週間の単位で，イ

ワシ油の場合は日の単位であることに注意していただきたい。なおベニバナ油は必須脂肪酸リノール酸含量の最も高い（75%）油脂で血清コレステロール値の低下や動脈硬化の予防のため用いられているが，最近では一般食用としても使用されている。イワシ油はリノール酸やリノレン酸よりむしろ高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）を多く含んで（10～12%）いる。EPA は血小板凝集能を低めることから，その摂取は心筋梗塞や脳梗塞の発生を抑制すると考えられている。また DHA は大脳皮質などに比較的高い割合で含まれており，最近学習能力などとの関連のもと，話題になっている高度不飽和脂肪酸である。イワシ油以外にニシン，サバ，サンマなどの魚油にも多く含まれるが，非常に酸化されやすいのでその利用が難しい油である。しかし，卵白と単

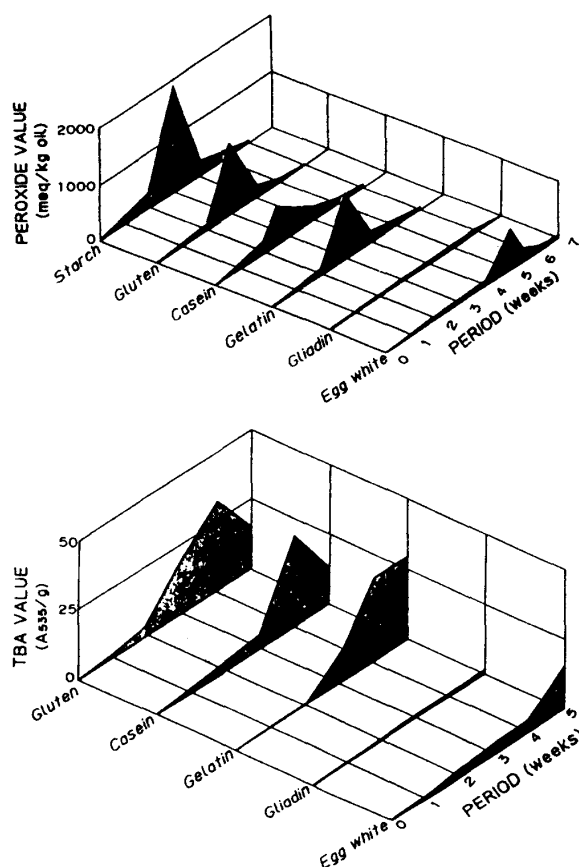


図24 食品タンパク質と混合した紅花油の酸化

紅花油と各種タンパク質とは 1 : 9 の比で単純混合粉末としたものである。保存条件は比較的穏和な 37°C，水分活性 0.3～0.5 である。上段の図は過酸化価を，下段の図は上段と同じ時期の試料の TBA 値を測定したものである。

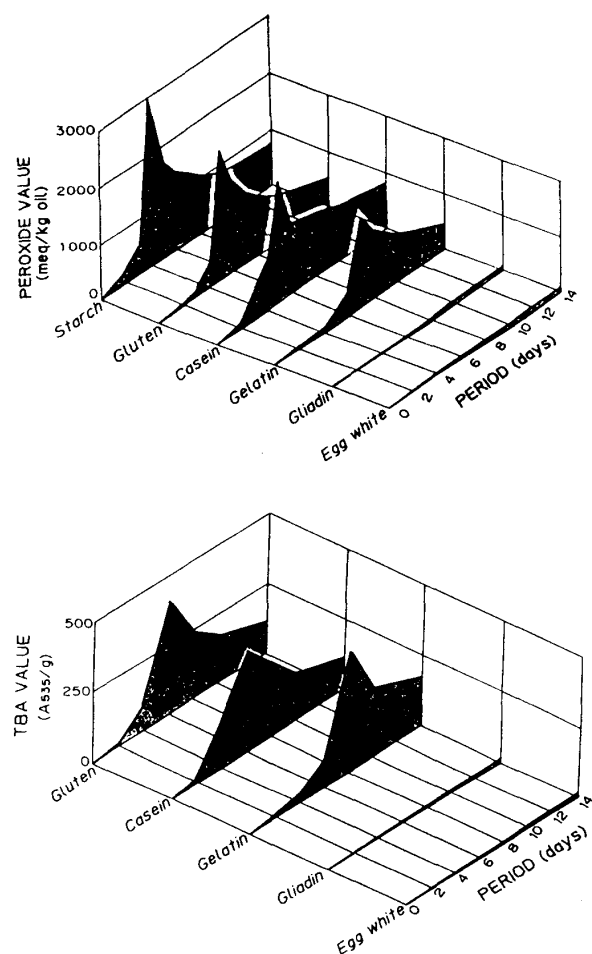


図25 食品タンパク質と混合したイワシ油の酸化

保存条件などは図 24 と同じ。上段は過酸化価を，下段は TBA 値を測定したものである。

純混合粉末化するだけで、相当その酸化を抑制できることが分かる。

過酸化価や TBA 値の測定で確かにベニバナ油やイワシ油の酸化は押さえられるが、実際にそれら油脂がもとのままであるのか、どうかを確認した。ベニバナ油を4週間、イワシ油を10日間保存した後、薄層クロマトグラフィーでトリアシルグリセロール (TG) として検討したのが図 26 と図 27 である。タンパク質としてゼラチンやカゼインを使用した場合は明らかに TG のピークが消失しているのに対し、卵白やグリアジンではピークの存在するのが明らかである。また TG 中の脂肪酸の同定をガスクロマトグラフィーで行っているが、イワシ油の例を図 28 に示す。グルテンやカゼインでは脂肪酸のピークが消失したり、小さくなっているが、卵白とグリアジンの場合は EPA と DHA のピークは標準のものとは変わっていない。

次に卵白とイワシ油との噴霧乾燥試料を調製し、イワシ油の酸化安定性を検討した²⁶⁾。希釈した卵白とイワシ油 (9 : 1) を混ぜ超音波器処理を行って乳化した。乳化液を実験室用小型噴霧乾燥器で粉末化した。一部は凍結乾燥によって粉末とした。また

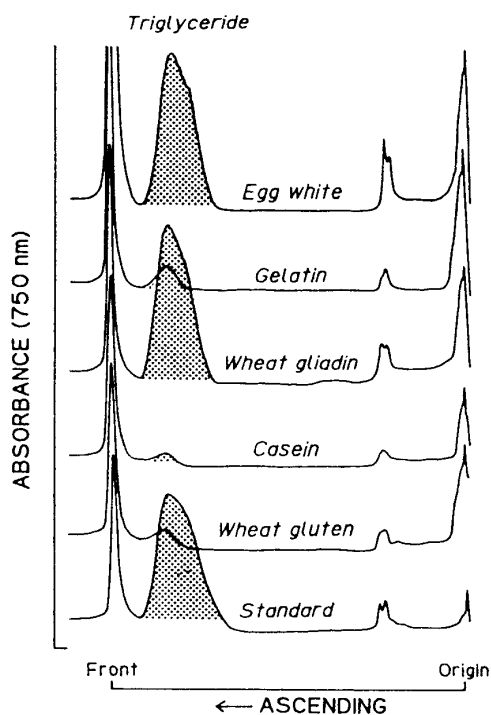


図27 粉末モデル系で10日間保存したイワシ油の薄層クロマトグラフィー
保存条件は図 25 と、分析法は図 26 と同じである。

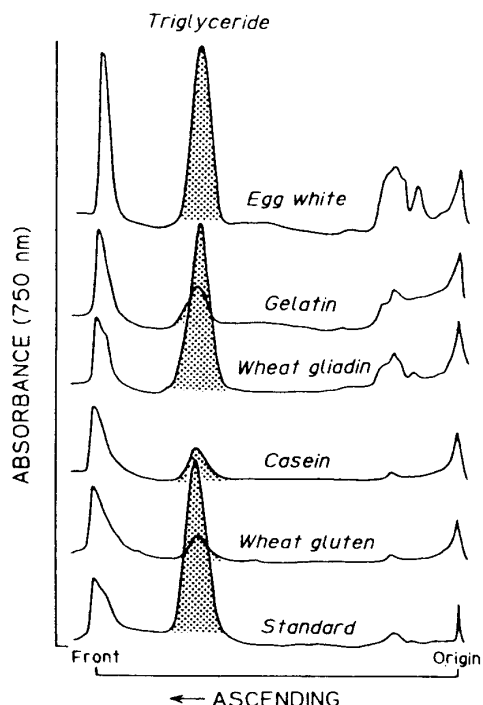


図26 粉末モデル系で4週間保存した紅花油の薄層クロマトグラフィー

保存条件は図 24 と同じ。ヘキサン抽出物を薄層クロマトグラフィーで分析した。網目をかけた部分がトリグリセリド (紅花油) に相当する。

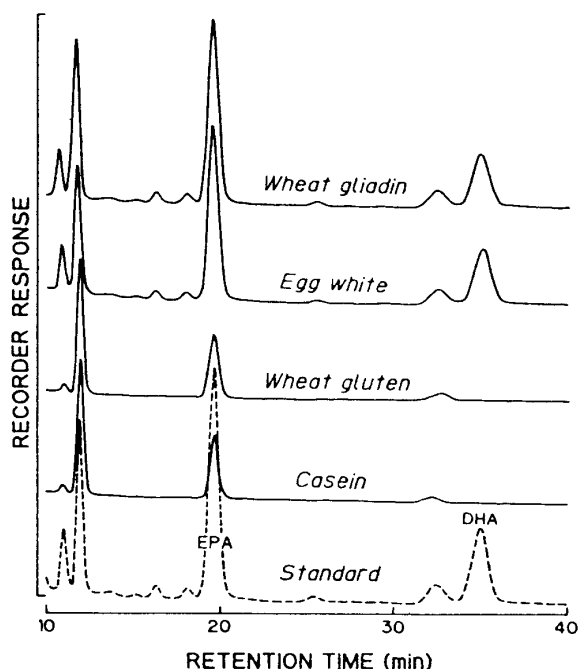


図28 保存中のイワシ油の多価不飽和脂肪酸の同定

小麦グルテンあるいは卵白と粉末化した試料では EPA, DHA がよく保持されている。10 日間の保存期間である。

比較のためコーンスターチとイワシ油をヘキサンを使用して単純混合粉末試料とした。上記3種の標品を40°C、水分活性0.45～0.55の恒温器中に保存し、経時的に過酸化価を測定した。デンプンと単純混合した試料は1週間で高い過酸化価を示し、以後は過酸化物の分解により値は減少している。噴霧乾燥試料、凍結乾燥試料共に過酸化価は3週間あたりまで低値に抑えられていたが、4週間で凍結乾燥試料で過酸化価の立ち上がりが観察された。噴霧乾燥試料はこの期間全く過酸化価の上昇は認められない。実際にガスクロマトグラフィーを用いて4週間保存した試料の脂肪酸組成の含量を測定した結果が表12である。なお、C₂₀:5がEPA、C₂₂:6がDHAである。明らかに凍結乾燥試料では、噴霧乾燥試料に比較してEPA、DHAの破壊が進行していることが分かる。実際に食品に添加してイワシ油の保存度合いを検討してみた。小麦粉、砂糖、バター、卵白粉末、水(5:5:5:1:4)を混ぜてクッキーを焼いてみた。卵白粉末としてイワシ油と噴霧乾燥あるいは凍結乾燥試料したものと同様にイワシ油を含まないものを使用した。嗜好テストを行ったところ、焼き上げた日のクッキーは若干イワシ油独特の香りのため嫌う学生もあったが、翌日には区別ができなくなり、焼き上げた日でも統計的には有為差はでなかった。半年以上室温に放置(ポリエチレン袋に密閉)したクッキーを粉碎、油

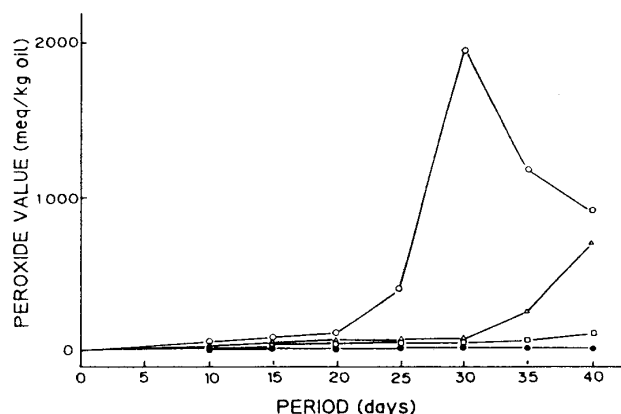


図29 卵白と噴霧乾燥したイワシ油の過酸化物価の変化と卵白前処理の効果

試料は室温(17±3°C)、水分活性はおおよそ0.5の条件で保存した。○, デンプンと油(9:1)の混合物; △, 透析した卵白と噴霧乾燥した試料; □, グルコース酸化酵素で処理した卵白と噴霧乾燥した試料; ●, 未処理卵白(水で希釈してある)と噴霧乾燥した試料。

表12 卵白と凍結乾燥および噴霧乾燥したイワシ油の保存後の多価不飽和脂肪酸組成

Polyunsaturated fatty acid	Content ratio to palmitic acid	
	Freeze-dried	Spray-dried
C ₁₈ :1	0.85	0.88
C ₁₈ :2	0.12	0.15
C ₁₈ :3	0.04	0.06
C ₂₀ :4	0.03	0.06
C ₂₀ :5	0.31	0.86
C ₂₂ :5	0.03	0.11
C ₂₂ :6	0.20	0.76

図29と同じ試料で、4週間保存後、クロロフォルム-メタノールで脂肪酸を抽出、ガスクロマトグラフで分析した。

脂を抽出して測定したところ、EPA および DHA は殆どそのまま保たれていた。

なお、卵白に含まれているグルコースなどからの褐変生成物質が抗酸化能を発現している可能性がある。卵白として一夜水に対し透析したもの、およびグルコース酸化酵素処理を行ったものを使用して検討してみた。図29に示すようにグルコースも含めて、透析性の物質のなんらかの関与が考慮されるが、詳細は不明である。

現在非常に注目を浴びている脂肪酸に α -リノレン酸がある。動物ではリノール酸から α -リノレン酸を合成する代謝系を欠いているので、食物から摂取しなければならない。しかし、その必須性はリノール酸に比較すると低いと考えられている。現在 α -リノレン酸が脂質代謝で問題になっているのは、その必須性よりn-3系の多価不飽和脂肪酸としての生理作用である。しかし α -リノレン酸はリノール酸よりさらに不飽和度の高い脂肪酸であり、非常に酸化を受けやすい。一般に食用植物油での含量は比較的少なく、アマニ油やエゴマ油(シソ油)に含まれている。筆者らは日本油脂株式会社尼崎研究所でアマニ種子から調製された油の提供を頂き使用した²⁷⁾。 α -リノレン酸75%の他に22%のリノール酸と3%のオレイン酸を含んでいる。既に述べた方法で卵白との単純混合試料と噴霧乾燥試料を作成し、保存中(25°C、水分活性0.3、0.5、0.8の3種)の過酸化物価の測定により酸化進展度を検討した。水分活性0.3では単純混合試料で4週間目、噴霧乾燥試料で6週間目で緩やかな過酸化物価の立ち上がりが認められたが、水分活性0.5では殆ど酸化は認められず、0.8の水分活性では保存期間の7週間では全く過酸化物の生成を認めなかった。またガスクロマトグラフィーで実際に脂肪酸の分析を行い、そのままの状態を保たれていることを確認している。

以上述べたように種々のタンパク質が不飽和脂肪酸の空気酸化に対して抗酸化性を示すことを立証した。特に脂肪酸（油脂も同様）とタンパク質を噴霧乾燥の手段によってマイクロカプセル化すると、その効果は驚くべき程のものであった。タンパク質が抗酸化性を有することは多くの食品研究者によって述べられてきたが、その性質を積極的に利用しようとする試みは少なかった。これは主としてタンパク質と脂質の化学反応性に関心の中心があったからであろう。筆者らは水との相関のもとに化学的というより物理的な相互作用による効果を期待している。タンパク質の種類によって、また何種類かのタンパク質を配合することによって予想外の機能をもつものを作り出すことも可能であろう。筆者らは次の章で述べるようにダイズタンパク質について主に脂質代謝との関連性を追求する研究を行っているが、ダイズタンパク質の抗酸化性についても若干の研究を報告している^{28)~30)}。グリアジンなどと同様にマイクロカプセル化することによって抗酸化能が高められることなどを確認しているが、水分活性との相関はグリアジンや卵白の場合と異なりむしろ水分活性の低い方が効果的であるようである。さらに使用したダイズタンパク質（不二製油株式会社製）には抗酸化能を持つビタミンEが含まれているようで、機構解析を困難にしており、実際の利用を含めて今後の問題として残っている。

III 食事成分と脂質代謝

a 大豆タンパク質の血清コレステロール濃度低下作用

飽食の時代の幕開けと共に現在程、血液中のコレステロールの濃度に関心の持たれている時代はない。コレステロールは細胞膜やステロイドホルモンの構成因子あるいは前駆体物質として生体に欠かせない物質であり、通常のヒトでは体内で合成される量の方が、食物より摂取する量より多いのが普通である。ヒトでは全コレステロールの20%以上が脳・神経系に存在し、血液中の量は8~10%である。近年、脳梗塞や特に心筋梗塞など動脈硬化性疾患と血液コレステロール濃度との疫学的関連が問題になり、コレステロールのマイナス面が強調されすぎているようである。

血清コレステロール濃度（血清 serum は血液成分より血球、血小板などの有形成分を除いた血漿 plasma から繊維素など血液凝固成分を更に除いたもので、厳密には血清か血漿か記載する必要があるが、本稿では血清で統一しておく。実際のコレステ

ロールの濃度はmg/100 ml serum or plasma で表される）に対して植物性のタンパク質が低下作用を有することは周知の事実である。実験的には動物性タンパク質であるカゼインと植物性タンパク質としてダイズタンパク質を飼料として用いる研究者が多い。筆者らも主に不二製油株式会社製の分離ダイズタンパク質（以下 soy protein isolate SPI）を使用した。

植物性タンパク質の血清コレステロール低下作用の機構に関しては、必ずしも統一的な見解に達していない。またこれらの実験ではしばしば食餌にコレステロールを添加して、実験的に血清のコレステロール濃度を高めることが行われている。コレステロール代謝の生体内フィードバック機構を考慮すると、食餌にコレステロールを添加した場合と添加しない場合の、血清コレステロール低下作用は同一に論じられない。筆者らは以上の観点より基本的に食餌にコレステロールを添加するということを行っていない。コレステロールを負荷しない場合の植物タンパク質の効果については、やはり胆汁酸や中性ステロイド排泄量増加に起因するところが大きいと考えるのが妥当であろう。以下にラットを用いて各種飼料タンパク質およびそれらの消化酵素分解物の血清コレステロール濃度に与える効果について検討した^{31)~35)}。

食餌として与えたタンパク質が最初に遭遇する消化管は胃であり、次いで十二指腸を含む小腸である。胃ではタンパク質分解酵素のペプシン、小腸では膵臓より分泌されるトリプシンやキモトリプシンによってペプチドやアミノ酸へと分解される。そこで先ずSPIをペプシン（ブタ）と作用させ、凍結乾燥して粉末とした。トリプシン（ウシ）とも同様の処理を行いそれぞれSPI-P、SPI-Tとした。タンパク質として20%の飼料を調製し、離乳ウイスター系雄ラットを（初体重50g）約30日間飼育した。その間の体重増加、飼料摂取量、臓器重量などを表13に示す。体重増加は飼料摂取量を反映した結果となっている。その時の血清コレステロール値（CHOL）とトリアシルグリセロール（TG）値を表14に示す。コレステロールおよびトリグリセリドは酵素法を主として利用する市販キットを使用して測定した。既に多くの研究者によって報告されているように、総コレステロール値はSPI食でカゼイン食より低値であった。またTG値とコレステロール値の間には直接的な因果関係はないようである。また動脈硬化指数（atherogenic index）[Total CHOL-HDL CHOL/HDL CHOL]はカゼイン、SPI、SPI-P、SPI-Tでそれぞれ0.56、0.46、0.28、0.53であった。HDL-CHOL (hige density

表13 分離ダイズタンパク質およびその消化産物のラット生育、飼料摂取、組織重量に及ぼす効果

Dietary groups	Body weight gain (g/month)	Feed intake (g/day)	Liver (g/100 g BW)	Small intestine (g/100 g BW)	Caecum (g/100 g BW)
Casein	167.9±3.1 ^a	15.4±0.2 ^a	4.4±0.1 ^a	4.1±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a
SPI	134.7±3.5 ^b	15.0±0.2 ^{ab}	4.3±0.1 ^a	4.0±0.1 ^a	1.1±0.1 ^a
SPI-P	115.9±3.3 ^c	14.0±0.3 ^b	3.7±0.1 ^b	3.7±0.2 ^a	1.1±0.1 ^a
SPI-T	113.2±3.8 ^c	13.5±0.4 ^b	4.1±0.1 ^{ab}	3.8±0.1 ^a	1.0±0.1 ^a

数値は1群8匹の平均値±SEである。SPI-P, SPI-Tについては本文参照のこと。

表14 ラット血清コレステロールおよびトリアシルグリセリド濃度に及ぼす分離ダイズタンパク質とその消化産物の効果

Dietary groups	Serum level (mg/100 ml)		
	Total CHOL	HDL-CHOL	Triglyceride
Casein	94.6±2.5 ^a	60.7±3.1 ^a	240±14 ^a
SPI	85.4±1.2 ^b	58.3±3.3 ^a	224±15 ^a
SPI-P	68.5±3.0 ^c	53.7±3.7 ^a	130±12 ^b
SPI-T	87.6±2.0 ^{ab}	57.2±1.6 ^a	133±13 ^b

lipoprotein cholesterol) は別名“善玉コレステロール”とも呼ばれ、この値が大きくなれば括弧内の計算式により動脈硬化指数は小さくなる。この数値でみる限り SPI-P は有効であると言える。因に総コレステロール-HDL コレステロールの値は簡単には LDL-コレステロール (low density lipoprotein cholesterol) とみなされ、別名“悪玉コレステロール”と呼ばれているものである。

血清中のある種の酵素レベルの変動は肝臓機能が正常に働いているか否かを調べる手段としてよく用いられている。上記実験のラットの肝機能の指標として GPT (glutamate-pyruvate transaminase), LAP (leucine aminopeptidase), ALP (alkaline phosphatase), Ch-E (choline esterase) の活性を測定した。各群のラット肝に有為差は認められず、投与した食餌タンパク質の違いによって肝機能上に変化が生じたとはみなすことはできなかった。また同様に小腸粘膜局在性酵素として上記 LAP, ALP および γ -GT (γ -glutamyl transferase) を測定したが、ラット各群に有為差はなかった。小腸は肝臓に次ぐアポリポタンパク質生産およびコレステロール吸収の場であり、胆汁の腸肝循環 (後述) によって血清コレステロール値の調節にも重要な役割を果している。SPI や酵素処理した SPI の摂取は粘膜酵素活性でみる限り消化吸収機能に影響を及ぼしていないと考えられる。なおこれらの酵素活性測定は常法に従った。図 30 に示すように飼育期間の体重と血清コレステロール濃度との間には相関関係が認められた。このことは幼ラットの栄養状態を体重増加で判断する現行の栄養学では、血清コレステロール濃度は栄養状態の判断基準になることを示している。実

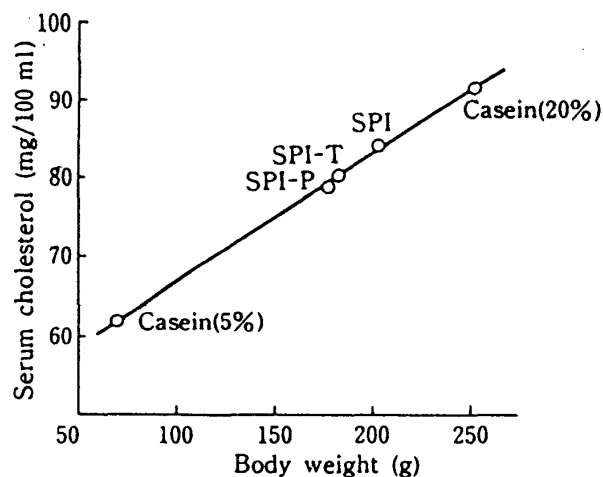


図30 血清コレステロール濃度とラット体重との相関関係

幼ラットをタンパク質としてカゼインまたはダイズタンパク質 (SPI) を基にした飼料で1ヶ月飼育した。SPI-T, SPI-P については本文参照のこと。

際にヒトの場合でも、血清コレステロール濃度が100～120mg/dlの時は栄養状態は不良と判断される。要するに幼ラットを用いて血清コレステロール濃度と飼料タンパク質との関連を研究するに際しては、ラットの体重増加にタンパク質の種類によって差がないように注意する必要がある。次に示す実験では体重110～120gのウイスター系雄ラットを動物性タンパク質としてカゼインと卵白アルブミン、植物性タンパク質としてSPIと小麦グルテンで飼育したが、図31に示すようにSPIにはメチオニンを、小麦グルテンにはリジンとトレオニンを添加した。卵白アルブミンは総合的にやや低い結果を示すものの、他の3種類のタンパク質では体重増加、飼料効率共に一致した。表15は3週間飼育後の結果を示したもので、SPIの血清コレステロール濃度の改善が認められたが、肝脂質に対しては低値を示すものの有為とはならなかった。

先に少し触れたように植物性タンパク質の血清コレステロールレベル低下作用として最も現在の脂質代謝から考えて妥当な考えは、摂取タンパク質そ

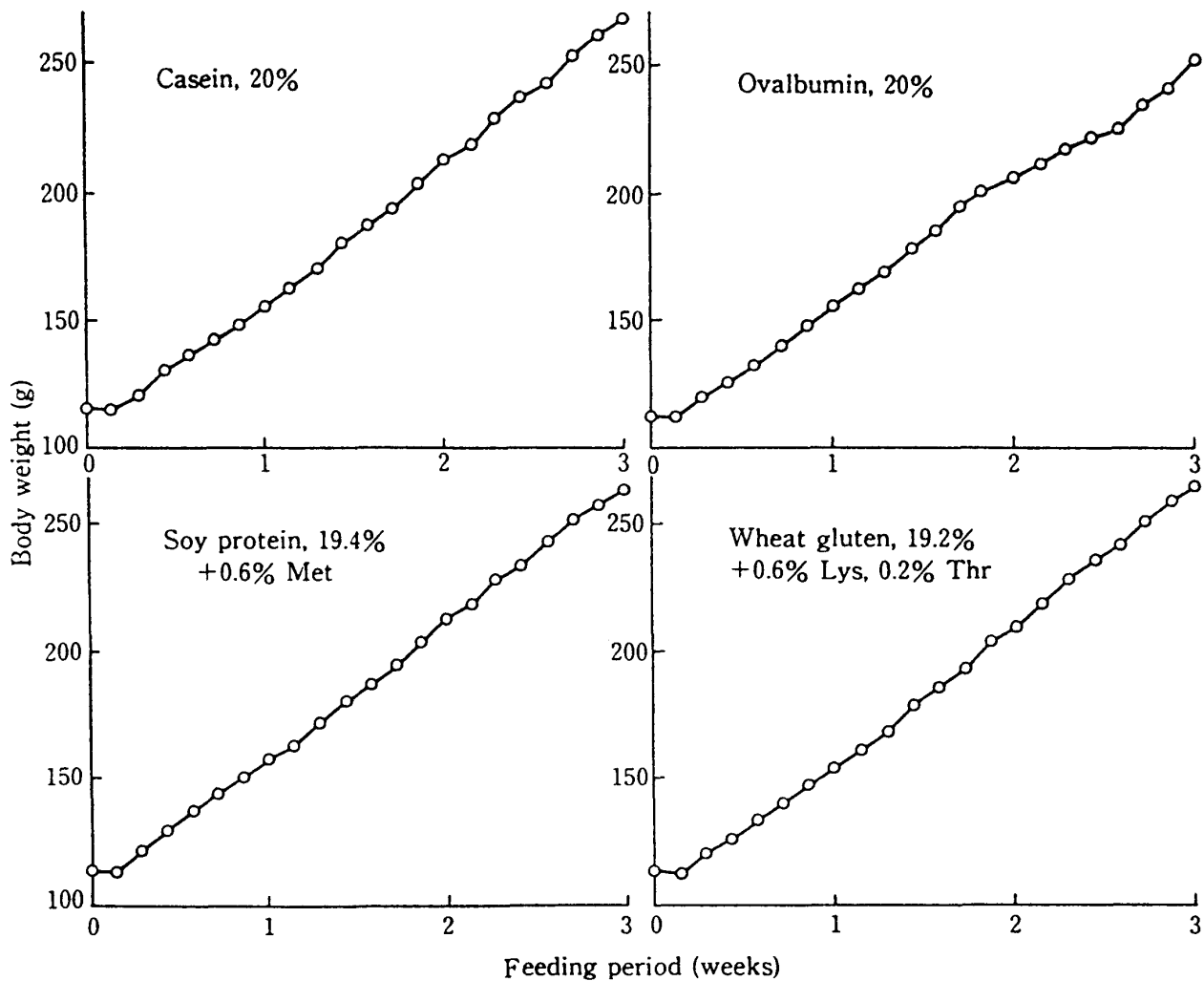


図31 種々の食品タンパク質で飼育したラットの成長曲線

幼ラット（体重 50 g 前後）を市販固形飼料で予備飼育後、体重 110 ~ 120 g のラットを 1 群 6 ~ 8 匹で育成実験を行った。タンパク質以外の食餌組成は α -デンプン 65%、油混合 5%、セルロース粉末 4%、ミネラル混合 5%、ビタミン混合 5% である。栄養的に劣るダイズタンパク質と小麦グルテンにはアミノ酸を補足してある。

表15 異なる飼料タンパク質で飼育したラットの血漿、肝臓および小腸の脂肪レベル

	Dietary groups			
	Casein	Ovalbumin	Soy protein	Wheat gluten
Plasma levels(mg/100 ml)				
Glucose	103.1 \pm 1.8 ^a	103.4 \pm 4.4 ^a	107.3 \pm 3.0 ^a	107.7 \pm 5.9 ^a
Triglyceride	101.9 \pm 8.4 ^a	61.5 \pm 1.5 ^b	84.8 \pm 1.9 ^a	92.9 \pm 3.1 ^a
Cholesterol, total	55.3 \pm 3.8 ^a	53.2 \pm 2.3 ^a	43.7 \pm 2.6 ^b	46.1 \pm 3.6 ^{ab}
Cholesterol, HDL	36.1 \pm 4.0 ^a	35.5 \pm 2.6 ^a	38.5 \pm 1.4 ^a	37.4 \pm 1.0 ^a
Hepatic levels(mg/g)				
Lipid	76.7 \pm 3.9 ^a	62.7 \pm 3.0 ^a	72.4 \pm 2.6 ^a	86.1 \pm 5.9 ^a
Triglyceride	3.87 \pm 0.37 ^a	3.29 \pm 0.17 ^a	3.59 \pm 0.25 ^a	3.31 \pm 0.41 ^a
Cholesterol	1.54 \pm 0.07 ^a	1.42 \pm 0.05 ^a	1.38 \pm 0.06 ^a	1.31 \pm 0.09 ^a
Intestinal levels(mg/g)				
Lipid	68.7 \pm 5.4 ^{ab}	57.1 \pm 8.3 ^b	98.3 \pm 5.1 ^c	78.8 \pm 5.6 ^a
Cholesterol	1.11 \pm 0.08 ^a	1.59 \pm 0.06 ^b	1.92 \pm 0.07 ^c	1.59 \pm 0.10 ^b

6 ~ 8 匹の平均値 \pm SE

のもの、あるいは消化酵素による分解物が胆汁酸（酸性ステロイド）やコレステロール（中性ステロイド）の排泄を促すというものである。胆汁酸は肝臓でコレステロールからつくられ胆嚢（ラットでは胆嚢はないことに注意、後述）、胆管を経て小腸へ放出される。脂溶性成分の消化吸收の役割を果たした胆汁酸は小腸下部すなわち回腸下部で再吸収され肝臓に戻り、肝臓の胆汁酸プールに入る。この現象を胆汁酸の腸肝循環（enterohepatic circulation）と称している。この循環を遮断、すなわち胆汁酸を排泄の方向に向かわすと、肝臓で新たにコレステロールから胆汁酸を生成しなければならなくなる。肝臓でのコレステロールの供給源はアセチル CoA からの全合成か各種リポタンパク質（LDL-および HDL-コレステロール）として肝臓に流入するコレステロールであり、究極的には血清コレステロール濃度を低下させることになる。上記のような考えを立証する手段の一つとして4種のタンパク質で飼育したラットの糞を経時的に採取し、胆汁酸および中性ステロイド（コレステロールや腸内細菌による二次代謝物）を測定した。図32に示すようにダイズ

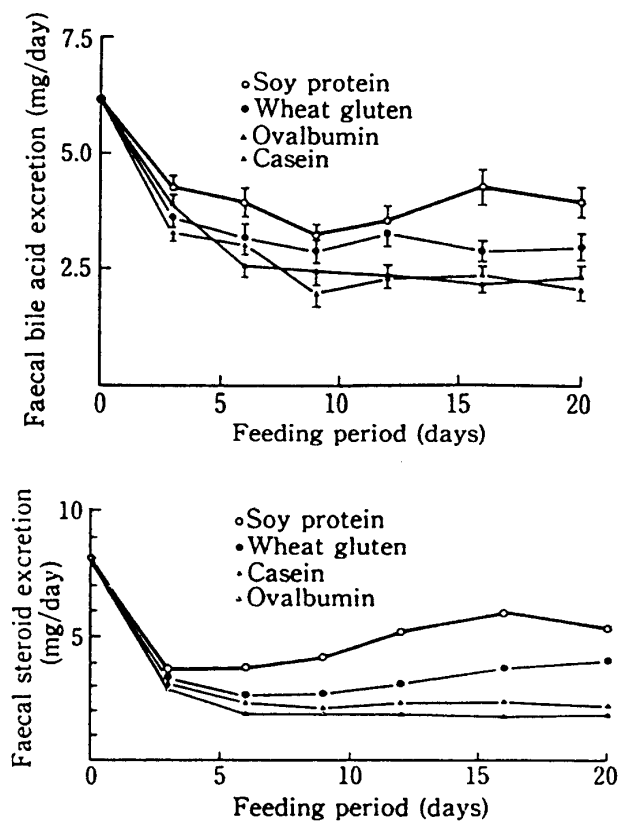


図32 各種タンパク質で飼育したラットの糞中ステロイド排泄

上段の図は糞中の酸性ステロイド（胆汁酸）を、下段の図は中性ステロイド（コレステロールなど）を測定したものである。

タンパク質および小麦グルテン摂取ラットで明瞭なステロイド排泄の増加がみられた。これらステロイドは薄層およびガスクロマトグラフィーでも確認することができた。植物性タンパク質特に SPI がステロイドの排泄を促進していることはあきらかであり、上記仮説の一つを証明できたと考えている。

さらに試験管内で上記4種のタンパク質を酵素分解して生成する分解物の性質とコレステロール代謝との関連性の追求を行った。それぞれのタンパク質を pH 2 でペプシン（ブタ）と 37°C で 1 日反応させ、中和後パンクレアチン（ブタ、膵酵素）と十分に反応させた。ペプシン処理およびペプシン-パンクレアチン処理した後の各食品タンパク質の疎水度（hydrophobicity）を測定した結果を表 16 に示す。カゼインでは処理前と処理後では 1% 以下になっているのに対し、SPI ではペプシン処理で 20%、ペプシン-パンクレアチン処理で 5.7% の減少に留まっている。ペプシン処理ペプチドのタウロコール酸（¹⁴C-標識）に対する結合能を平衡透析法で測定した結果が図 33 である。明らかにペプチドの疎水性と胆汁酸結合能との間には相関関係が認められる。また、ラットを飼育した実験での血清コレステロール濃度と与えたタンパク質の疎水度（ペプシン-パンクレアチン消化産物）の間にも図 34 に示すように相関がみられた。これらの結果は胃や腸管内でのプロテアーゼによって水解され生成するペプチドの内、特に疎水性の強いものが腸管内のステロイドと結合してその再吸収を妨げ、糞中への排泄量を増加させ、血清コレステロール値の低下の原因になったと解釈すると、この現象を総べてうまく説明できる。この仮定を確かめるために、消化産物が実際胆汁酸の腸肝循環に影響を及ぼしているかどうかを確認する必要がある。

そこで反転腸管による胆汁酸の吸収実験を行った。¹⁴C タウロコール酸と成熟ラットの反転腸管（6~7 cm）を用い、グルコース含有ダルベッコ培地中、O₂:CO₂(95:5) 混合ガスを通気しながら

表16 種々の食品タンパク質の消化酵素処理後の疎水度

	Relative fluorescence		
	Intact	Peptic	Peptic-pancreatic
Soy protein	2593	522	161
Wheat gluten	900	168	53
Ovalbumin	1036	46	32
Casein	1496	40	13

疎水度は 8-anilino-1-naphthalene sulfonate を使用する蛍光測定による。

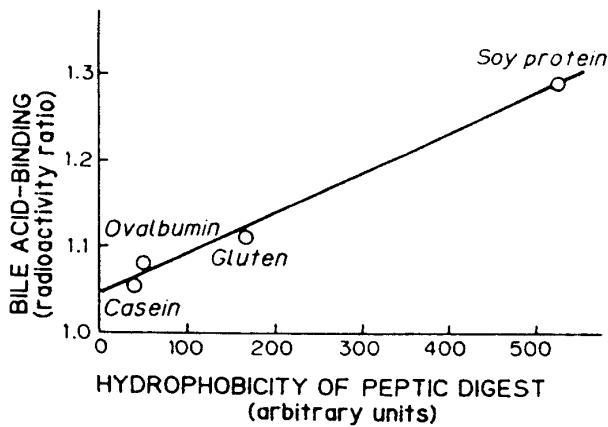


図33 各種タンパク質のペプシン消化により生成したペプチドの疎水度とタウロコール酸結合能との関係

疎水度については表 16 を参照のこと。タウロコール酸との結合能は $[^{14}\text{C}]$ 標識化合物を用い、平衡透析法で測定した。

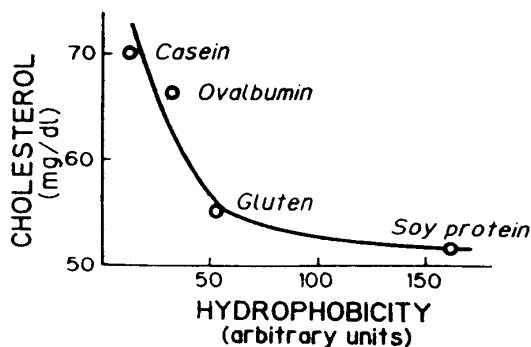


図34 食餌タンパク質の血清コレステロール濃度と与える効果とその消化産物の疎水度との関係

図 30 に示す飼料組成（タンパク質のみ異なる）でラットを 5 週間飼育した後、血清コレステロールを測定した。またそれぞれのタンパク質をペプシン-パンクレアチンで消化し、その消化産物の疎水度を測定した。

37°C, 60 分間吸収実験を実施した。タウロコール酸の吸収部位を定めるために小腸の各部位の吸収能を測定したが、従来から言われているように盲腸に近い回腸の限られた範囲にタウロコール酸を活発に取り込む部位のあることが分かった。図 35 はこの部位の反転腸管を作成して、各種タンパク質消化産物共存下で漿膜側（この実験では内部）に取り込まれた胆汁酸量を比較したものである。消化産物無添加の対照に比べ、SPI や小麦グルテン消化産物を共存させてもそれほど顕著な吸収阻害はみられなかつ

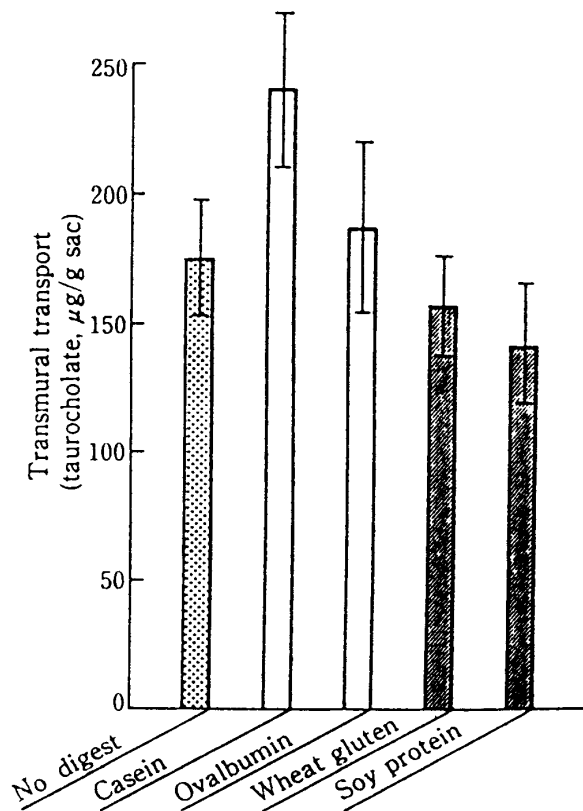


図35 ラット腸反転腸管を用いるタウロコール酸吸収に与えるタンパク質消化産物の影響

腸の盲腸に近い部位の反転腸管を使用した。反転腸管を用いるタウロコール酸吸収測定は本文参照のこと。

た。これに対しカゼインやオボアルブミンではむしろ吸収促進的に作用する現象がみられた。実際の腸管において腸肝循環が機能しているとき消化産物残渣が皆無ということはありません。胆汁酸吸収促進か阻害かを相対的な尺度で比較するとカゼインと植物タンパク質間の差は一層明瞭となる。現在多くの栄養学の実験では入手の容易さということもあり殆どの研究室でタンパク質としてはカゼインが使用されている。上記のようにカゼインは血清コレステロール濃度を上昇させる性質があり、コレステロールと食餌成分との関連性を追求する研究では、あまりよい対照とはならないかも知れない。事実、多くの研究者は市販のラット用固形飼料が最も血清コレステロール濃度を低下させることを経験的に知っている筈であり、今後の検討課題であろう。

b 食事成分と胆汁酸吸収

前項で述べたように脂肪成分の吸収に対する役割を終えた胆汁酸は回腸の下部より吸収を受けて、肝

臓へと戻る。この胆汁酸の腸肝循環を妨げ胆汁酸の糞中への排泄を促進すれば、肝臓でのコレステロールからの胆汁酸合成の促進が起こり、ひいては血清コレステロール濃度の低下に繋がるのが考えられる。本節ではコレステロールよりむしろ胆汁酸そのものに重点をおいて、その吸収機構の解析、吸収能の栄養調節、吸収を阻害する食餌性因子などについて論じる。

改めてラット小腸の各部位から調製した反転腸管系でタウロコール酸の取り込み実験を行った³⁶⁾。

[¹⁴C] タウロコール酸を用いたが、図 36 に示すように単に漿膜側（すなわち内部への取り込み；transmural transport）のみでなく、粘膜への蓄積（mucosal accumulation）も測定した。既に論じてきたように胆汁酸の腸肝循環は回腸の盲腸に接近した部位で起こることが明らかである。そこで回腸下部のセグメントの擦過物よりヒアウロニダーゼ処理によって上皮細胞を調製し、タウロコール酸の取り込みを検討した。なお比較のため空腸よりも同様に上皮細胞を作成した。胆汁酸再吸収には能動輸送の機構が関与していると考えられており、以後の実験でも塩化ナトリウム存在下での吸収能を測定した。図 37 に単離上皮細胞の 60 mM 塩化ナトリウム存在下でのタウロコール酸の取り込み量を迅速ろ過法で測定した結果を示す。空腸上皮細胞の取り込み量は塩化ナトリウムの有無で変化がないのに対し、回腸上皮細胞では塩化ナトリウム存在で非常に迅速な

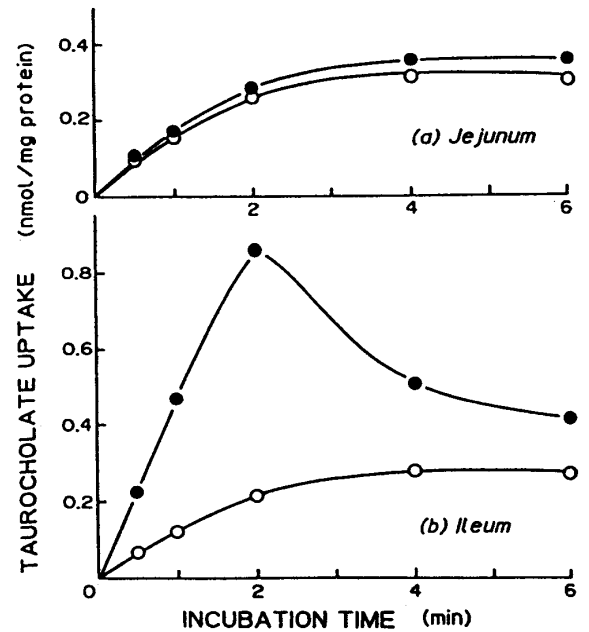


図37 ラット単離上皮細胞へのタウロコール酸の取り込み

空腸 (jejunum) および回腸 (ileum) より kimmich の方法に従って上皮細胞を単離した。回腸では末端に近い部位を使用した。●は塩化ナトリウム 60 mM 存在下での測定、○は 120 mM マニトール存在下での測定である。[¹⁴C] タウロコール酸の取り込みで測定しているが、非特異的結合の量は [¹⁴C] カルボキシイヌリンで補正している。

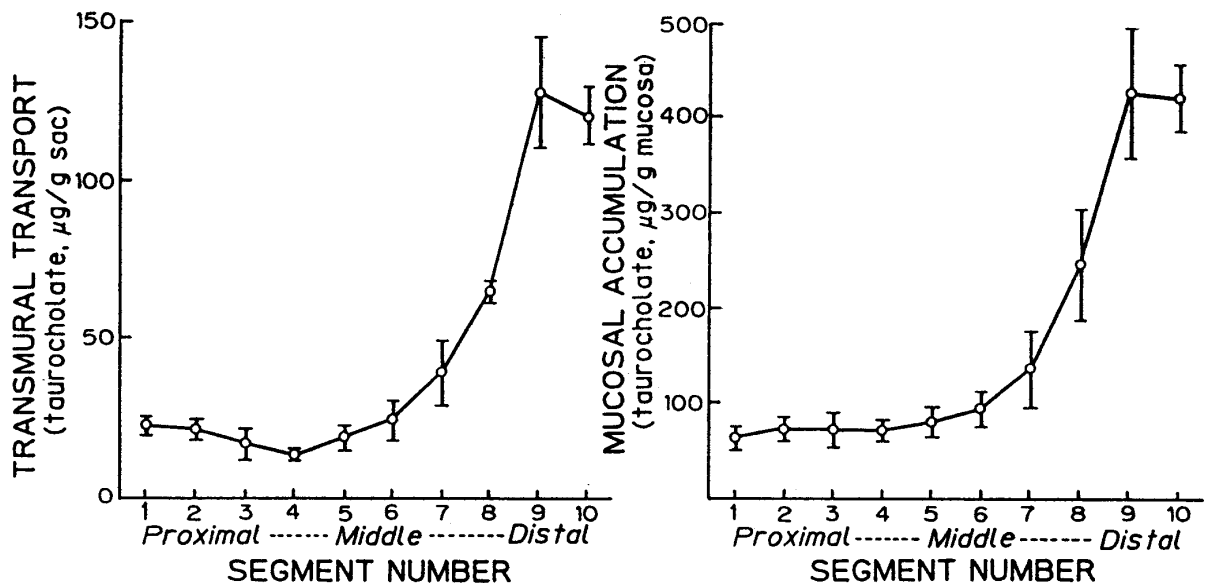


図36 ラット小腸のタウロコール酸取り込み能の測定

小腸をほぼ 10 等分し、各部位反転腸管の 37°C、60 分間の [¹⁴C] タウロコール酸の取り込み能を測定した。左の図は漿膜側への取り込みを、右の図は粘膜へのタウロコール酸の蓄積を示している。

取り込みと所謂オーバーシュートの現象が認められた。他の研究者による報告とは必ずしも一致しない点もあるが上皮細胞の調製法の異なり、刷子縁膜ベジクルの使用などに起因するものであろう。塩化ナトリウムの濃度を 120 mM まで変化させて回腸上皮細胞でのタウロコール酸取り込みを検討したが、60 mM で頭打ちとなった。空腸上皮細胞でのタウロコール酸取り込みは塩化ナトリウム濃度変化と全く無関係であった。栄養状態の変化が上皮細胞のタウロコール酸取り込みに与える影響を検討した結果が次の図 38 である。体重 220 g の成熟ラットを屠殺前 2 日間絶食状態（水は自由摂取）にした。正常および絶食ラットの回腸上皮細胞のタウロコール酸取り込みを塩化ナトリウムの有無の下測定した。図からも分かるようにタウロコール酸の取り込みは Na^+ 依存性でミハリス・メンテン型の反応様式に従うことが示された。正常ラットに比べて絶食ラットで明らかに取り込み量（ V_{max} ）は減少するが、親和性（ K_m ）には変化がなく、胆汁酸輸送担体の量の減少に起因するものと考察される。

上記の実験は成熟ラットを緩やかな絶食状態にして上皮細胞のタウロコール酸取り込み能の変化を検討してみたものであるが、次に述べるのは幼ラット

（初体重 50 g）にタンパク質として栄養価の低いものを与えタンパク質性栄養不良にしてタウロコール酸取り込み能を調べたものである³⁷⁾。図 39 に示す通り市販固形飼料を粉末化したもの(A)、タンパク質としてゼラチン(B)、グルテン(C)、ゼラチンとグルテンを混ぜたもの(D)の 4 種類で 4 週間飼育した。回腸反転腸管のタウロコール酸取り込み量と粘膜蓄積量を体重増加量に対してプロットした。トリプトファンを添加してもあまり体重増加に効果のないゼラチンもグルテンと組み合わせるとお互いに補い合って、栄養価は非常に改善されていることが分かる。興味深いことに栄養価が低く、体重増加が殆ど認められないグルテン食群、あるいはむしろ体重の減少しているゼラチン食群でタウロコール酸の取り込み能の昂進がみられたことである。回腸粘膜のマーカー酵素を測定したが、B、C群、すなわちタンパク質性栄養不良群でシュクラーゼおよび γ -グルタミル転移酵素の活性が有為に昂進していた。要するに粘膜タンパク質量の減少によって拡大化されたものであり、タンパク質性栄養不良の状態でも胆汁酸吸収能は保持されているものと考えられる。

脂肪の消化吸収における胆汁酸の役割を考慮すると高脂肪食は胆汁酸吸収能を高める可能性がある。

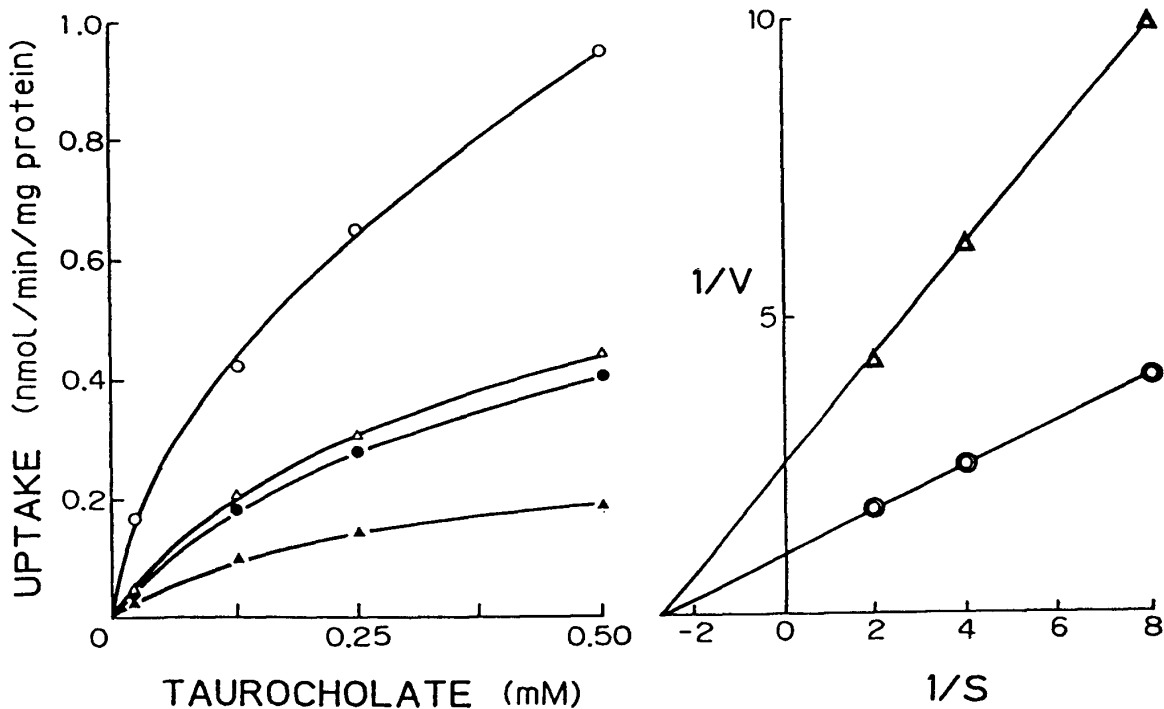


図38 ラット回腸におけるナトリウム依存性タウロコール酸取り込みの絶食の影響

ラット回腸より単離した上皮細胞を使用してタウロコール酸の取り込み能を測定した。ラットは測定前 2 日間絶食させている。△▲は絶食ラットの、○●は飼料を与えているラットの回腸上皮細胞の、△○は 60 mM 塩化ナトリウム存在、▲●は非存在下で取り込み能を測定したものである。右の図は左の図の逆数プロットである。本文参照のこと。

そこで45%ラード食で4週間飼育した幼ラット(初体重50g)の回腸上皮細胞の胆汁酸吸収能を

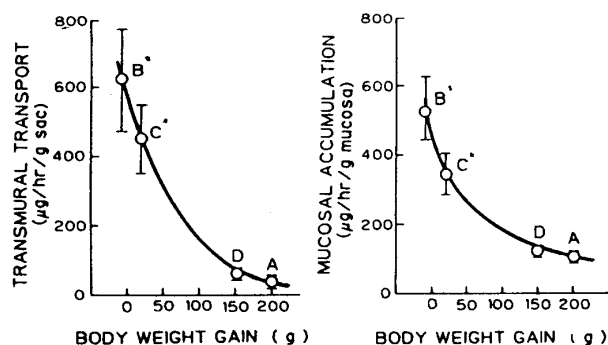


図39 タンパク質性栄養不良状態ラット回腸のタウロコール酸輸送能と体重との関係

50gの体重のラットを図に示すようにA~Dの飼料で4週間飼育した。飼料A~Dについては本文を参照のこと。タウロコール酸の輸送能は回腸反転腸管を使用している。左の図が漿膜への輸送を、右の図は粘膜への蓄積を示している。

調べた^{38)~40)}。A群は高脂肪食(45%ラード, 20% α -デンプン), B群は高デンプン食(0%ラード, 65% α -デンプン)で4週間飼育したもの, C群は最初の2週間は高脂肪食, 後半2週間高デンプン食にしたもの, D群はC群の逆の飼料で飼育した。なおタンパク質としてカゼイン20%, 油脂5%がすべての群の食餌に含まれている。また, 飼料内容の異なりが摂取量に反映するので, この実験ではペアフィーディングを行い飼料摂取量を等しくしている。結果を図40と表17に示す。飼育期間を通して, あるいは飼育期間に途中で高脂肪食を与えたA, C, D群で高デンプン食を続けたB群に比べ高いタウロコール酸の吸収能が認められた。高脂肪食の摂取によって腸肝循環の機能に何らかの変化を生じ, 胆汁酸再吸収能にも食餌性の適応が起きたとも考えられる。このことは高脂肪食, 高デンプン食で4週間ずっと飼育したラットの回腸上皮細胞のタウロコール酸吸収能をタウロコール酸濃度を変えて測定し, 逆数プロットした図41の結果からも首肯できる。親和性には変化がなく, 吸収能が増大していることは, タウロコール酸輸送担体の増加を予想させるもので

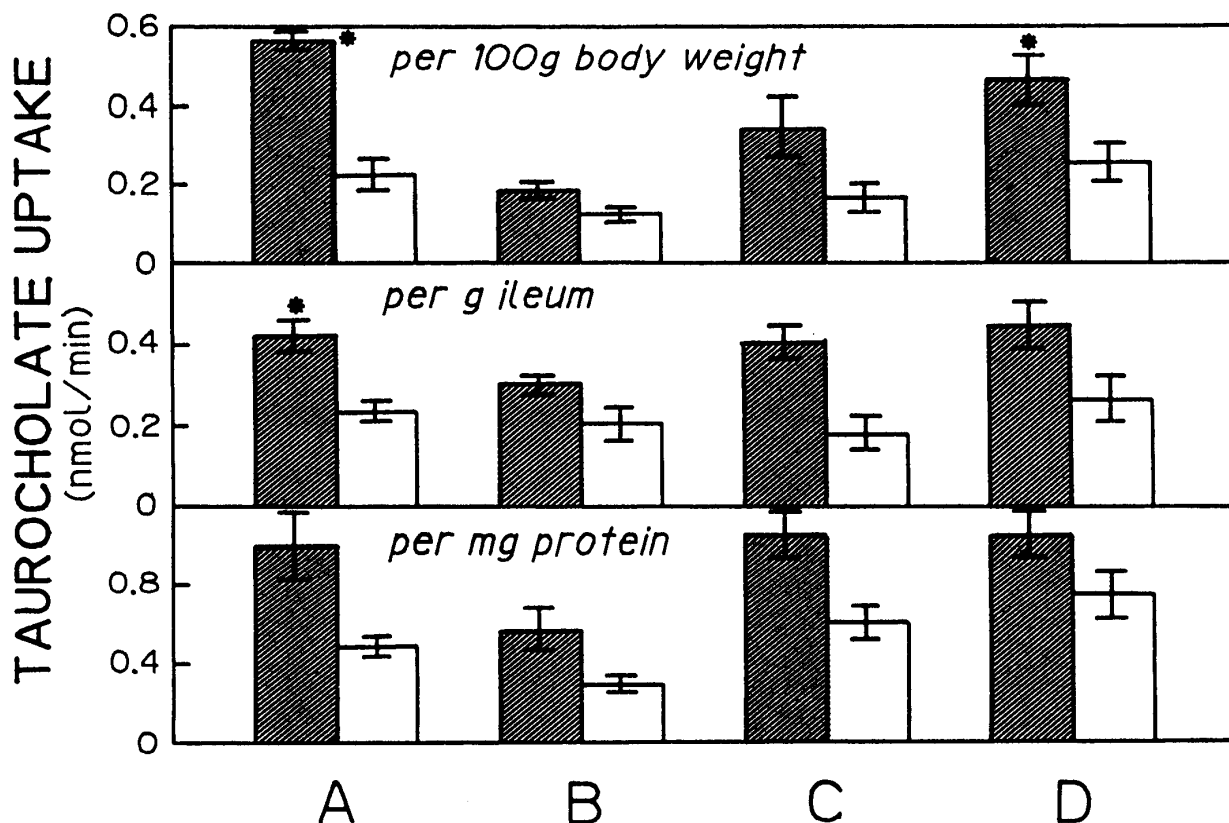


図40 高脂肪食で飼育したラットのタウロコール酸取り込み能

高脂肪や高デンプン食で4週間飼育したラット小腸上皮細胞のタウロコール酸取り込みに対する食事性適応を調べた。食餌組性A~Dについては本文参照のこと。▨は塩化ナトリウム存在下, □は非存在下で測定したものである。

表17 高脂肪食または高デンプン食を投与したラットの血漿および肝臓などの各種パラメーター

Tissue	Items of measurement	Dietary group			
		A	B	C	D
Plasma	Glucose (mg/dl)	86.8 ± 6.2	82.6 ± 3.3	80.6 ± 1.3	76.6 ± 3.3
	T-Cholesterol (mg/dl)	80.4 ± 3.8 ^a	65.3 ± 4.2 ^b	76.4 ± 7.0 ^a	56.3 ± 3.0 ^b
	HDL-Cholesterol (mg/dl)	51.7 ± 1.8 ^a	49.6 ± 3.3 ^a	55.4 ± 6.4 ^a	41.6 ± 1.7 ^b
Liver	Bile acids (mg/g wet weight)	3.3 ± 0.4 ^a	6.3 ± 0.5 ^b	5.5 ± 0.3 ^b	4.2 ± 0.2 ^a
	Cholesterol (mg/g wet weight)	2.2 ± 0.2 ^a	3.2 ± 0.2 ^b	3.3 ± 0.1 ^b	3.1 ± 0.2 ^b
	HMG-CoA reductase (pmol/min/mg protein)	19.6 ± 1.9	15.7 ± 2.2	15.6 ± 1.8	16.4 ± 1.7
	Cholesterol 7 α -hydroxylase (pmol/min/mg protein)	12.7 ± 1.2 ^{ac}	11.1 ± 1.3 ^a	10.1 ± 1.5 ^a	17.3 ± 1.7 ^{bc}
Intestine	Sucrase (μ mol/min/mg protein)	0.09 ± 0.01 ^a	0.33 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.01 ^a
	γ -Glutamyl transferase (μ mol/min/mg protein)	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01
	Alkaline Phosphatase (μ mol/min/mg protein)	1.12 ± 0.12 ^a	1.93 ± 0.13 ^b	1.92 ± 0.10 ^b	1.86 ± 0.14 ^b
Pancreas	Amylase (μ mol/min/mg protein)	63.4 ± 5.9 ^a	158.5 ± 10.0 ^b	113.4 ± 4.6 ^c	79.2 ± 6.8 ^a
	Lipase (μ mol/min/mg protein)	1.1 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.04 ^b	0.4 ± 0.02 ^b
	Trypsin (μ mol/min/mg protein)	18.8 ± 1.7 ^a	17.6 ± 0.9 ^b	19.7 ± 1.9 ^a	28.6 ± 1.9 ^b
Faeces	Acidic steroids (mg/kg/day)	101.8 ± 11.0 ^a	41.0 ± 7.5 ^{bc}	28.2 ± 2.5 ^b	54.3 ± 7.2 ^c
	Neutral steroids (mg/kg/day)	32.8 ± 5.4	22.1 ± 1.3	25.1 ± 2.0	26.1 ± 3.2

肝臓についてはコレステロール代謝の関連項目、小腸は粘膜酵素、膵臓は消化酵素、糞はステロイド排泄を測定している。1群6匹の平均値±SE。A～Dの飼料組成については本文参照のこと。

ある。表17の結果を要約すると、高脂肪食Aで血漿コレステロール濃度の増加、糞中への酸性ステロイド（胆汁酸）の排泄増加が目立つ。胆汁酸の排泄増加は脂肪摂取の増大に起因するものであろう。膵臓酵素では高脂肪食でのリパーゼの増加、高デンプン食でのアミラーゼの増加などが生じている。肝臓で測定している酵素（HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase）はコレステロールの合成および異化（すなわち胆汁酸合成）過程の律速酵素である。なお、これらの実験を通してしばしば実験的糖尿病ラットを作成して、タウロコール酸吸収との関連性を追求したが、インスリン関与の有無を確立するためにはもう少し詳細な検討が必要である。

上述のような緩やかな絶食状態、タンパク質性栄養不良状態、あるいは高脂肪食というような栄養状態の変動に対して回腸末端上皮細胞の胆汁酸吸収能はある程度の恒常性を示しながらも、その折々の栄養状態に適応しているようである。ではもっと短期間での摂食に対応する変化はあるのであろうか。現在糖やアミノ酸の腸管吸収能には摂食時刻に対応した日内リズムのあることが知られている。高タンパク質食と無タンパク質食の交互投与に順応したラッ

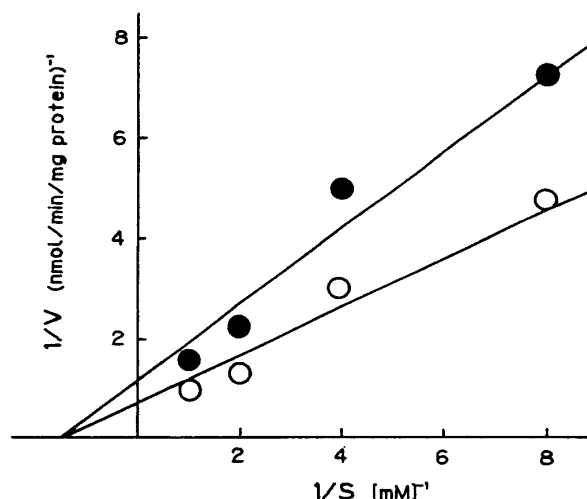


図41 高脂肪食および高デンプン食で飼育したラットのタウロコール酸取り込み能。高脂肪食（○）と高デンプン食（●）で飼育したラットの回腸上皮細胞を用いて測定した。取り込み能はすべて塩化ナトリウムの存在、非存在下で測定し、その差を取り込み能とした。なお、逆数プロットについては図38を参照のこと。

トを用いて、それぞれ高タンパク質食、無タンパク質食を摂取した後、屠殺シタウロコール酸取り込み能には回腸上皮細胞を、アミノ酸（ロイシン）取り込み能測定には空腸上皮細胞を使用した⁴¹⁾。結果は図42に示すように、ロイシンの取り込みは明らかに食餌に対応した変化が観察されたのに対し、タウロコール酸の取り込み能には顕著な変化はみられなかった。一般に小腸粘膜上皮細胞は普通2日以内に腺窩から絨毛先端に移動し、そこで剝落するといわれているが、物質輸送に限らず消化吸収に関与する膜結合酵素の活性変化に比べても、胆汁酸吸収に関与する輸送担体の量的あるいは質的な変動は少ないようである。

本節の最後に胆汁酸吸収に対する食事性阻害因子について述べる。既にカゼイン、オボアルブミン、小麦グルテン、ダイズタンパク質（SPI）の消化酵素産物がタウロコール酸吸収に与える影響について回腸反転腸管を用いて前節に述べたが、新たに動物性タンパク質としてブタゼラチン、植物性タンパク質としてトウモロコシゼインを加え、胆汁酸取り込

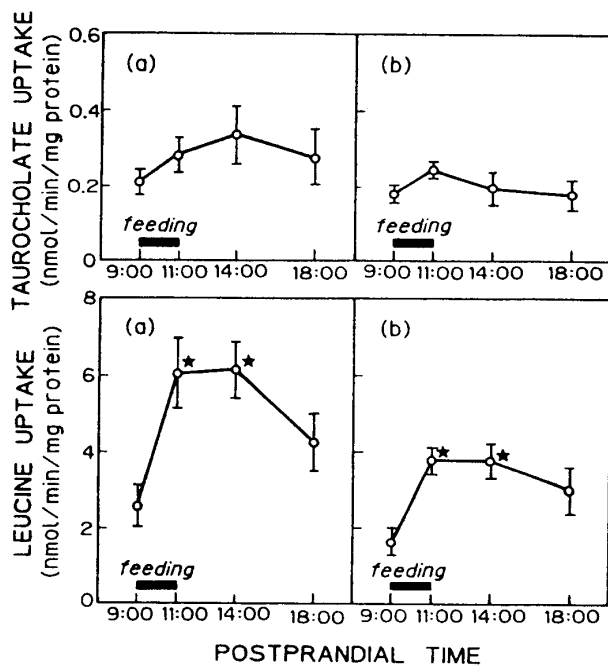


図42 回腸および空腸上皮細胞のタウロコール酸とアミノ酸取り込み能の食後変化
図の(a)群ラット（4匹）には高タンパク質食を、(b)群には無タンパク質食を9:00～11:00の間に与え、所定の時間（9:00, 11:00, 14:00, 18:00）に屠殺した。タウロコール酸の取り込みには回腸上皮細胞を、ロイシンの取り込みには空腸上皮細胞を用いた。

みの阻害という観点から検討した⁴²⁾。結果は図43と図44に示す通りで、平衡透析法でも反転腸管を使用しても同様の傾向がみられた。またその効果は消化産物の疎水性度とほぼ相関関係がみられたことも先に述べた通りである。

一般に抱合性胆汁酸（グリココール酸Gとタウロコール酸T）の構成成分であるグリシンやタウリンを食餌とともにラットに与え続けると、次第に血清コレステロール値が低下することが知られている。タウリンの方がグリシンより血清コレステロール低下作用が強いといわれるが、実際に回腸上皮細胞を用いてタウロコール酸吸収とタウリン、グリシンの効果を検討したところ³⁸⁾、タウリンの方がグリシンより強い阻害効果を示した。その阻害型式は拮抗型であった。実際に経口的に摂取した食餌中のアミノ酸が回腸末端まで到達するかは問題のあるところでもあるが、腸腔を速やかに食塊が通過した際は、影響を及ぼすことも考えられる。一般的にラットの抱合胆汁酸はいままで主としてタウロコール酸であると考えられてきたが、最近、食餌変化で両抱合体の比率が変わると言われている。筆者らも高タンパク質食と無タンパク質食を摂取した後の回腸の抱合胆汁酸を測定し、T/Gの比率の変化することを認めている⁴³⁾。

ダイズタンパク質（SPI）が強い血清コレステロール低下作用を示し、それがSPIの疎水性の高い酵素消化産物（分子量1000以上のペプチド）に起

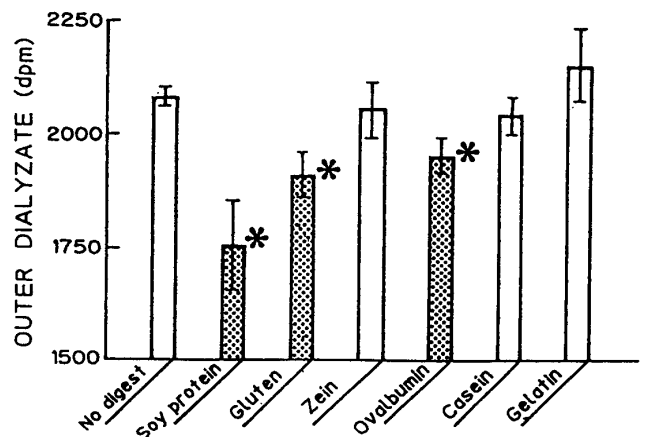


図43 平衡透析法で測定した食品タンパク質消化産物のタウロコール酸結合能
ペプシン-パンクレアチン法でそれぞれのタンパク質を消化した。消化産物と¹⁴C]タウロコール酸を透析バッグに入れ3日間透析して外液の放射活性の測定より結合能を求めた。*の付いているタンパク質は他のタンパク質と有為差のあるものである。

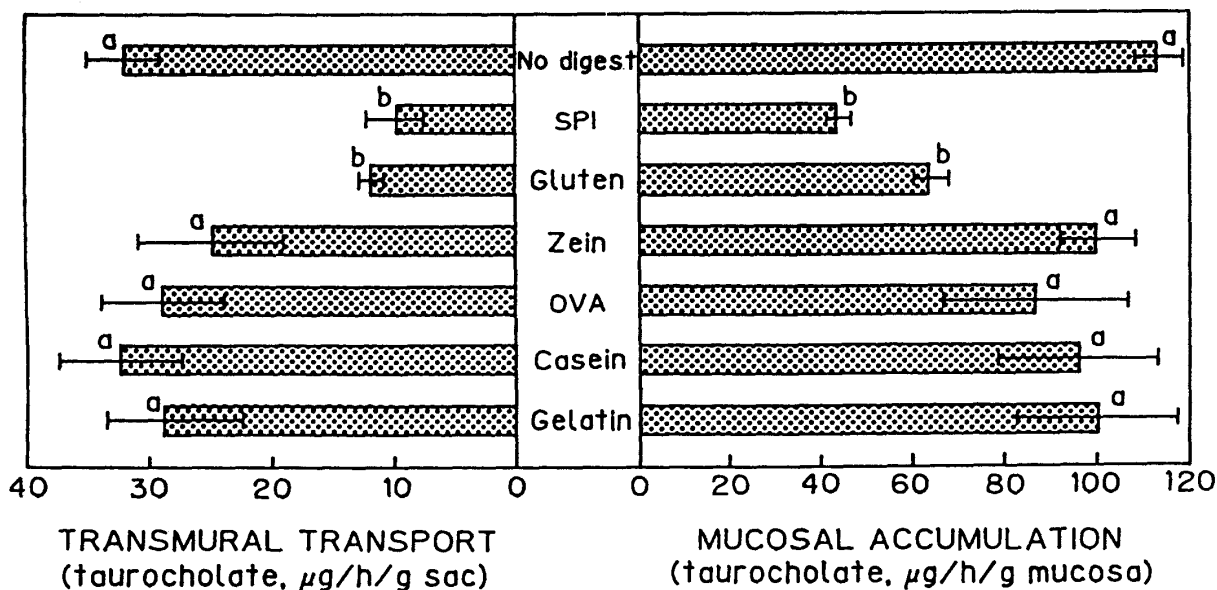


図44 食品タンパク質消化産物タウロコール酸吸収に及ぼす阻害効果
 ラット回腸反転腸管を用いて測定した。左の図が漿膜への輸送，右の図が粘膜への蓄積である。

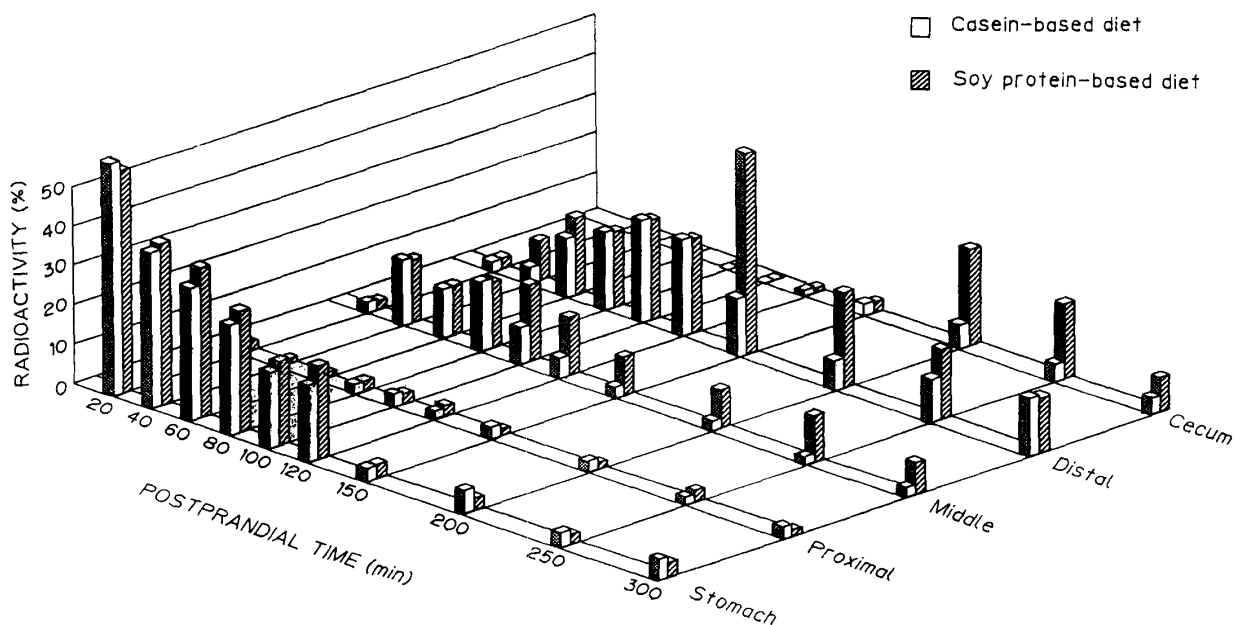


図45 カゼイン食またはダイズタンパク質食と共に与えたタウロコール酸の消化管内通過
 ミールフィーディングに馴らしたラットに $[^{14}C]$ タウロコール酸を含むカゼイン食またはダイズタンパク質食を与え、摂食後各時間の胃腸管内の残存放射活性を測定した。胃からの放射活性の消失速度は□ (カゼイン食) でも、▨ (ダイズタンパク質食) でもあまり変わらないが小腸の下部や盲腸にタウロコール酸の滞留が認められ、吸収阻害が生じていると考えられる。

因することを既に述べてきた。そこでこれらの消化産物ペプチドの存在下で、タウロコール酸の回腸上皮細胞への取り込み実験を計画した。しかし $[^{14}C]$ タウロコール酸の非特異的吸着がろ過膜などにみられ成功しなかった。そこで *in vitro* 系による吸収実験の代わりに $[^{14}C]$ タウロコール酸を飼

料とともにラットに与え、*in vivo* 消化管における胆汁酸吸収の実態を調べることにした^{38,42,44)}。胃内への強制投与は行わず、予めミールフィーディングで順応させたラットを用いた。図45と図46はカゼイン食とSPI食を与えたラットの胃腸管内容物中の $[^{14}C]$ タウロコール酸の動きとレベル変化およ

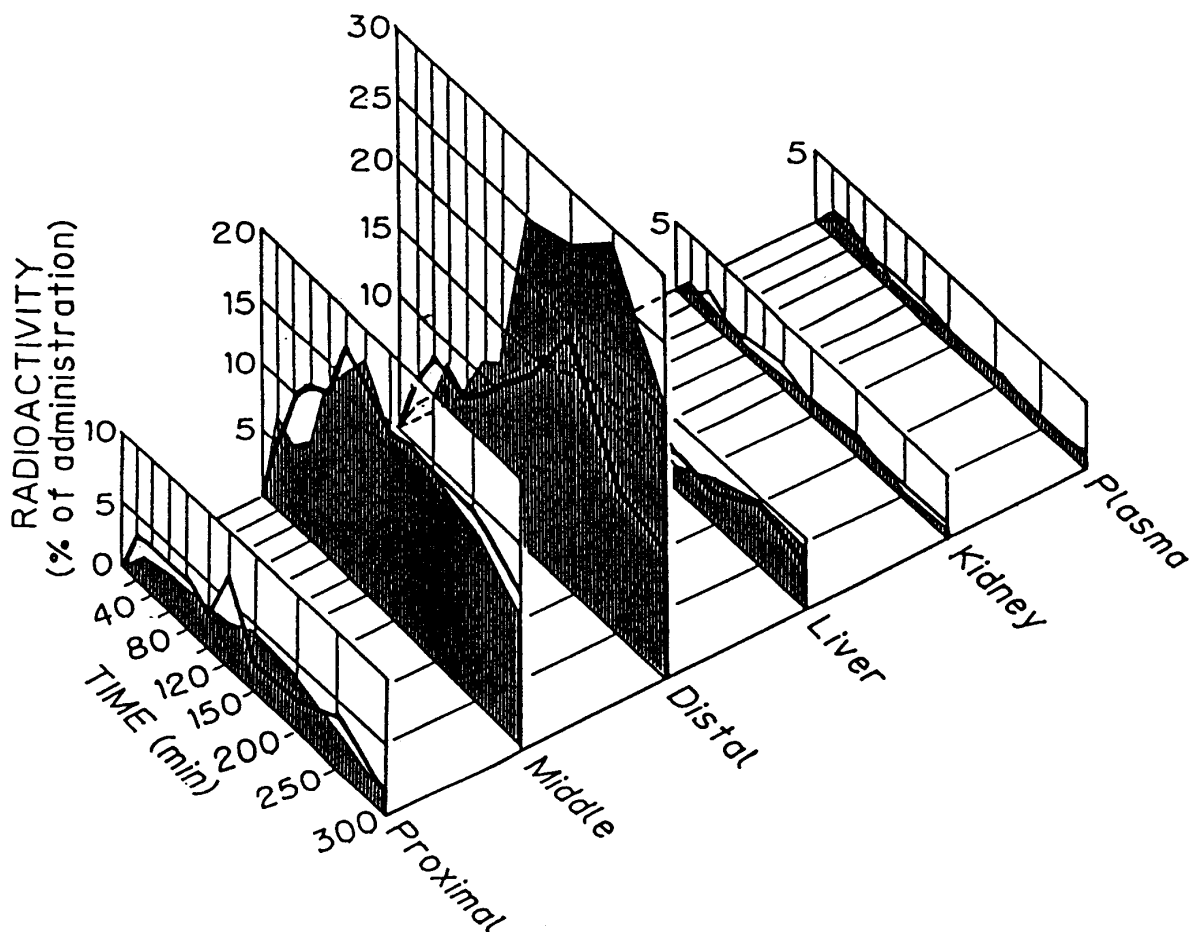


図46 カゼイン食またはダイズタンパク質食と共に与えたタウロコール酸の消化管内と臓器への蓄積

図45の実験と同じラットを使用して、小腸粘膜へのタウロコール酸の蓄積を測定した。また肝臓、腎臓および血漿への蓄積も測定した。本図では細い黒線をいれたものが、カゼイン食を与えたラットで、太い実線がダイズタンパク質食のラットのものである。小腸下部ではその差は明瞭になっている。

び小腸粘膜各部位（上，中，下）へのタウロコール酸取り込みの時間的経過について検討を加えたものである。胃内からの ^{14}C タウロコール酸の消失速度は、カゼイン食、SPI食のいずれの場合もほぼ類似の経過をたどり、投与した食餌タンパク質の種類が異なってもそれほど著しい違いは観察されなかった。一方、食塊の腸腔内の移動速度は両飼料間で若干異なり、カゼイン食投与後100分で小腸下部内容物中に最も高い ^{14}C タウロコール酸の滞留がみられたのに対し、SPI食を与えた場合は、摂食後150分で最大となりそのときの放射活性はカゼイン食の場合より高かった。小腸粘膜への ^{14}C タウロコール酸の取り込み量は、両飼料群共、小腸中、下部で高く、特にカゼイン食投与群においてはSPI食投与群より小腸下部で高くなる傾向がみられた。なお、血漿、腎臓、肝臓への放射活性の取り込みは

予想より少なく、最大の肝臓でも投与放射活性の5%程度であった。SPI食を与えたラットの回腸腸腔内容物中の高い放射活性とカゼイン食を与えたラット回腸粘膜中の高い放射活性（胆嚢を有しないラットでは胆汁酸の貯蔵庫の役割を果しているとも考えられる）を考慮するとSPI消化産物が、カゼイン消化産物より多くの胆汁酸を吸着することによって直接あるいは間接に腸管吸収の段階で、胆汁酸再利用を妨げているものと推察できる。

IV 新しい展開をもとめて

a 偏食の栄養学的研究

近代栄養学は「常に栄養バランスのとれた食餌を摂ること」を標榜し、このような食生活を理想とする食生活論が展開されてきた。しかし生物には環境

の変化に対する順応力があり、特定の栄養素の短期的欠乏が直ちに栄養不良を引き起こすというわけではなく、均一化された食生活は却って生体機能を脆弱化する虞さえある。また飽食の時代とされる今日、栄養バランスの取れた食餌の過食に伴う肥満は大きな問題となっている。そこで栄養学的に最も重要視され、脂肪合成とも関連の深いタンパク質を成長期のラットに間歇的に与え、ラットの成長、生理機能などについて検討した^{45)~48)}。

偏食という概念は栄養学的には栄養素全体のアンバランスという考え方が強く、結局論文では“alternate daily ingestion” “segregated intake” “intermetten protein intake” など具体的に飼料の投与方法を示すこととなった。最初の実験の飼料投与計画は以下の通りである。4週令のウイスター系雄ラット（初体重 50 g）に無タンパク質飼料とタンパク質飼料（20%、40%、60%カゼイン飼料）を1日毎交互に与えた⁴⁵⁾（後述するがタンパク質量の違いは α -コーンデンプンで置き換えているので、飼料によってデンプン量が異なることに注意。なお油脂、ビタミン、ミネラルなどは同一）。対照群として5%、10%、20%カゼイン飼料を自由摂取させた（1群は8匹）。25°Cに空調した飼育室で明暗は12時間周期（明8:00~20:00）とした。ラットの成長曲線は図47の通りで、36日間の飼料摂取量、タンパク質の摂取量、飼料効率などを表18に示す。カゼイン5%、10%、20%飼料の成長曲線は既に度々経験している標準的なものである。一般にカゼインの場合含硫アミノ酸が不足するため、5%カゼイン食では体重維持が限界であり、20%カゼイン食では特に含硫アミノ酸の添加なしに十分な生育を示す。10%のタンパク質量は一般に飼料効率を測定する際に用いられる量で、構成アミノ酸の効果をよく顕すタンパク質濃度とされている。図、表で興味ある点はD群すなわち無タンパク質食と20%カゼイン食を交互投与したラットの生育が3週間あたりか

ら急に悪くなることであった。また無タンパク質食と40%、60%カゼイン食交互投与と群ラット（E、F群）の成長が10%カゼイン食で飼育したB群とほぼ同等で、20%カゼイン食で飼育したC群の成長に遙かに及ばないことである。タンパク質の摂取量はB群よりD群が、C群よりE、F群の方が多い。

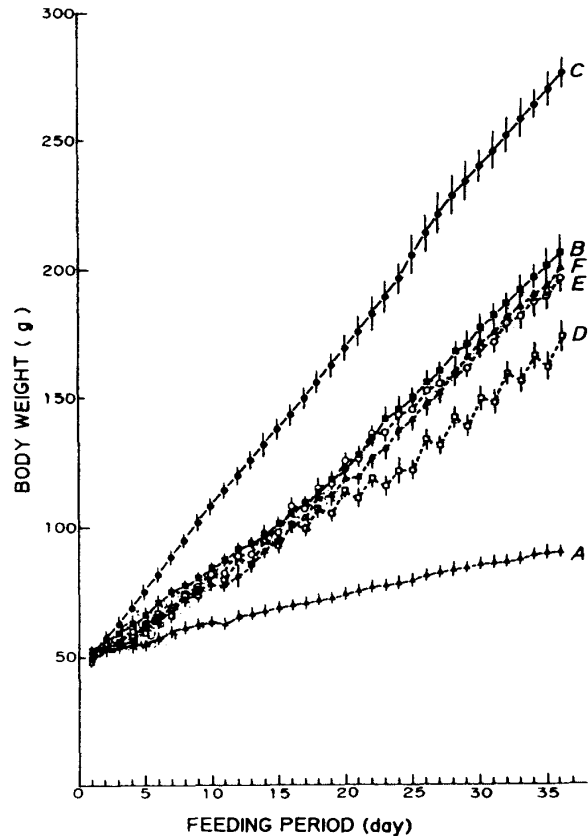


図47 1日交互にタンパク質食と無タンパク質食を与えたラットの成長曲線

比較としてA、B、Cそれぞれ5%、10%、20%カゼイン食を常に自由摂取させた群（1群8匹）である。Dは20%、Eは40%、Fは60%カゼイン食とタンパク質食を1日毎交互に与えた。本文参照のこと。

表18 36日間タンパク質食の連続および交互摂取したラットの摂食量、タンパク質摂取量およびタンパク質効率

Group (n=8)	Food intake (g/day/100 g of BW)		Protein intake (g/day/100 g)	Protein efficiency ratio
A	13.1±0.2 ^a		0.66±0.08 ^a	2.43±0.13 ^a
B	13.4±0.3 ^a		1.33±0.03 ^b	2.91±0.05 ^b
C	11.4±0.1 ^{bc}		2.28±0.02 ^c	1.97±0.02 ^c
	<i>Protein-rich</i>	<i>Protein-free</i>		
D	14.4±0.3 ^d	10.9±0.3 ^b	1.44±0.03 ^b	2.24±0.11 ^a
E	12.8±0.2 ^{ac}	11.1±0.04 ^{bc}	2.57±0.04 ^d	1.57±0.08 ^d
F	11.6±0.3 ^{bc}	12.1±0.3 ^{ce}	3.49±0.09 ^e	1.23±0.03 ^e

A~Fについては本文および図を参照のこと。

また一般にラットはタンパク質を含む飼料を好んで摂取することはよく知られている現象であるが、やはりタンパク質含量に限界があるようで、この実験でもF群すなわち60%カゼイン食と無タンパク質の交互摂取でむしろ無タンパク質食を好んで摂取している。これらの現象の解明のため肝タンパク質および血漿のタンパク質や遊離アミノ酸の分析を行った。同様の分析結果を以後の研究で詳細に示すので、ここでは簡単に結果だけを記述する。無タンパク質と高タンパク質(40%, 60%)を交互に摂取した群の血漿タンパク質, グルコース, 脂肪レベルは20%カゼイン食を連続して摂取した群と類似してい

た。また血液パラメーターはB群とD群と同様であった。肝臓のグルタチオン濃度とセリンデヒドラターゼ活性は高タンパク質食摂取群, 特に60%のF群で高かったが, 血漿遊離アミノ酸の比較では特に目立つことはなかった。

先の実験では1日間隔でタンパク質食と無タンパク質食飼料を交互投与したが, その間隔を短くして1日の範囲内で交互投与することにした⁴⁶⁾。9:00-11:00, 19:00-21:00に給餌時間を設定するミールフィーディングを行った。飼料条件と飼料組成などを表19に示す。4週間までのラットの体重増加は図48の通りで, 先の実験との最大の相違点

表19 ミールフィーディングの実験条件と飼料組成

Group (n=8-10)	Diet supplied at		Ingredient	Composition (%)
	9:00-11:00	19:00-21:00		
A	20% Casein	20% Casein	Casein	(0, 20, 40)
B	20% Casein	Protein-free	α -Corn starch	(85, 65, 45)
C	Protein-free	20% Casein	Oil mixture	5
D	40% Casein	Protein-free	Mineral mixture	5
E	Protein-free	40% Casein	Vitamin mixture	1
			Cellulose powder	4

実験中水は自由摂取とした。なお飼料はすべてオリエンタル配合である。

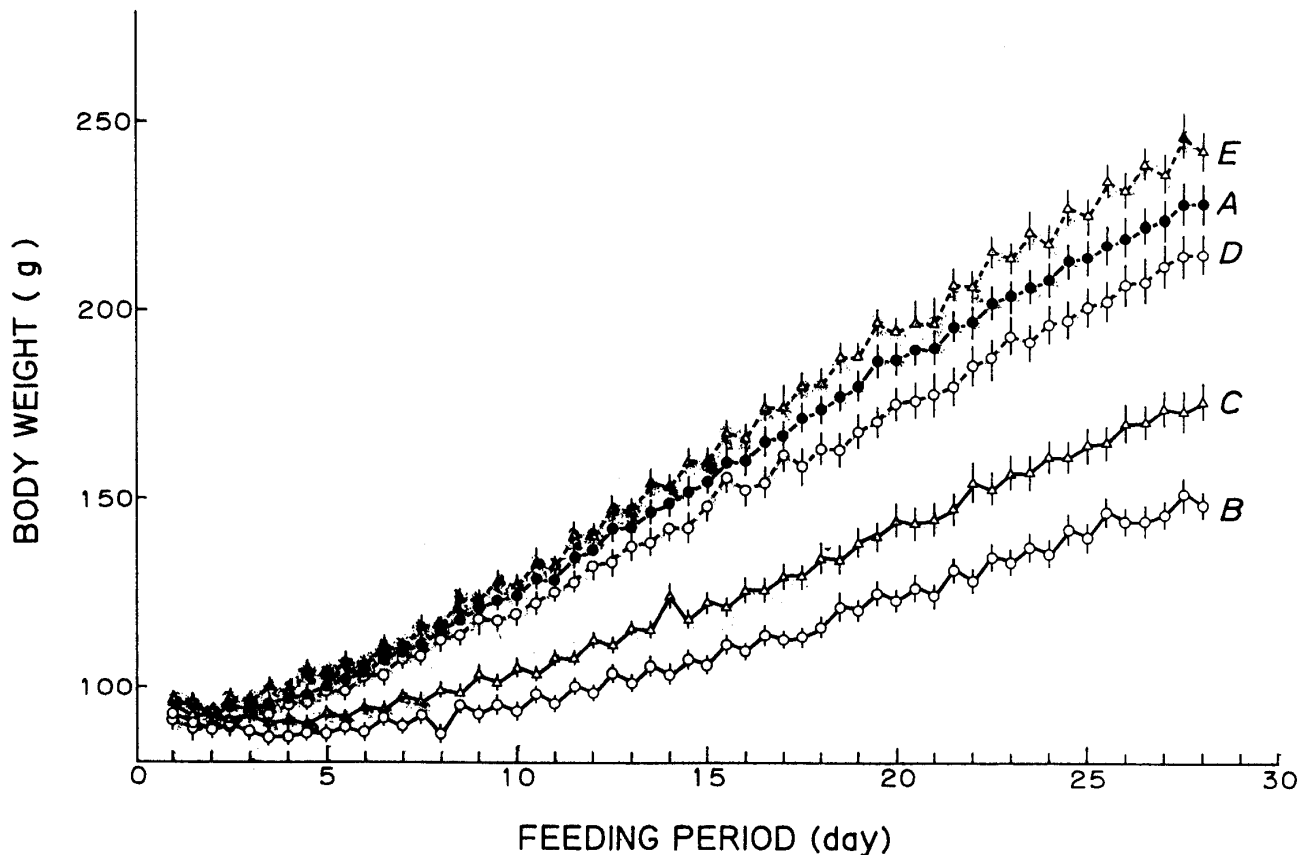


図48 ミールフィーディング方式で4週間タンパク質食と無タンパク質食を交互に投与したラットの成長曲線

ミールフィーディングのスケジュールについては表19を参照のこと。

は40%カゼイン食と無タンパク質食の交互投与群(DとE)と20%カゼイン食連続投与群Aの成長には有為な差は認められなかったことである。明らかに1日以内でのミールフィーディングの効果であろう。表20に4週間に摂取した飼料量やその効率をまとめてある。この表で注目に値するのは昼(9:00-11:00)と夜(19:00-21:00)の飼料摂取量である。A群でみられるように午前も夜も同じ飼料20%カゼイン食が与えられていると、夜行性のラットは夜の方の摂取量が多くなる。既述したように無タンパク質飼料よりタンパク質飼料を多く摂取する傾向にあり、C群のように夜タンパク質飼料が与えられると、昼との摂取量の違いは明白な有為差となって顕れ図でも分かるように体重増加曲線の差となる。また本来は食餌をあまりとらぬ昼でもタンパク質飼料の場合は夜の無タンパク質飼料より多く摂取する傾向にある。

ミールフィーディングによる食餌変化の効果を肝臓タンパク質レベルや酵素活性で検討した結果が表21である。高タンパク質飼料摂取群D、Eで肝臓重量の増大がみられたが、肝タンパク質には特に有為な群はなかった。タンパク質摂取と非常に明白な関係を示したのは含硫アミノ酸システインの主要な貯蔵物である肝グルタチオン量で、屠殺直前にタンパク質飼料を摂取したか、しないかでその量に差が認められている(BとC、DとEの差)。また、アミノ酸代謝に関連し高タンパク質摂取で誘導的にその活性が増加することが知られているアルギナーゼとセリンデヒドラターゼは明らかに高タンパク質摂取群で有意に活性は増強し、特にセリンデヒドラターゼで著しかった。しかしこの酵素のKm値(10⁻²

M)の大きさから考えて生理学的な意義を論議するのは難しい。なお、必須含硫アミノ酸のメチオニンについて、そのエピマーであるL-メチオニン(±)スルフォキシドの栄養有効性に相違点のあることを[³⁵S]標識化合物を用い、ラット成長実験により証明している⁴⁹⁾。上記以外血漿パラメータや遊離アミノ酸の分析も行っているが特記するほどの各群で目立った現象はなかった。

1日交互摂取、1日以内でのミールフィーディングによる交互摂取を行って、タンパク質の摂取とラットの成長や代謝への影響をみてきた。次いでタンパク質飼料としては20%カゼイン食に限定し、間歇的摂取を2日ないし3日に一度と今までより厳しい条件を設定し、ラットの成長と代謝機能に与える影響を調べた⁴⁷⁾。図示(図49)したスケジュールに

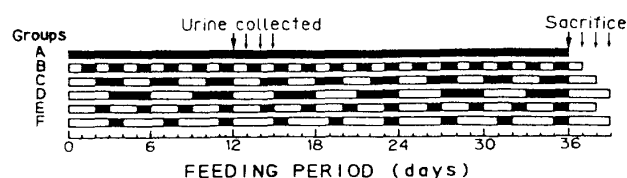


図49 無タンパク質食と20%カゼイン食の交互摂取実験の飼料投与計画

飼料は実験期間を通して、毎日10:00に交換した。飼料はすべて自由摂取とした。■は20%カゼイン食を与える期間、□は無タンパク質食を与える期間である。例えばA群は実験期間を通して20%カゼイン食を自由摂取、C群は2日間無タンパク質食、2日間カゼイン食の繰り返しになる。なお屠殺前日は深夜に飼料を引き上げた。

表20 4週間ミールフィーディングで飼育したラットの飼料摂取、タンパク質摂取およびタンパク質効率

Group (n)	Food intake (g/100 g of BW)		Protein intake (g/day/100 g of BW)	Protein efficiency ratio
	9:00-11:00	19:00-21:00		
A (9)	4.47 ± 0.08 ^a	5.18 ± 0.09 ^a	1.93 ± 0.03 ^a	1.73 ± 0.05 ^a
B (8)	5.16 ± 0.15 ^b	4.22 ± 0.12 ^b	1.03 ± 0.03 ^b	1.92 ± 0.08 ^b
C (10)	3.65 ± 0.12 ^c	6.10 ± 0.22 ^a	1.22 ± 0.05 ^b	2.12 ± 0.05 ^c
D (9)	5.41 ± 0.33 ^b	4.56 ± 0.12 ^b	1.82 ± 0.13 ^a	1.41 ± 0.04 ^d
E (9)	4.15 ± 0.13 ^{ac}	5.88 ± 0.12 ^a	2.35 ± 0.05 ^c	1.86 ± 0.04 ^{ab}

表21 4週間ミールフィーディングで飼育したラットの肝臓タンパク質、グルタチオンおよび酵素活性

Group (n)	Liver weight (g/100 g of BW)	Protein (mg/g of liver)	Glutathione (μmol/g of liver)	Activity, unit/mg DNA	
				Arginase	Serine dehydratase
A (9)	3.25 ± 0.06 ^a	239 ± 6	2.70 ± 0.18 ^a	220 ± 8 ^{ac}	5.78 ± 0.79 ^a
B (8)	2.91 ± 0.07 ^b	233 ± 6	1.58 ± 0.08 ^b	162 ± 8 ^{bd}	1.63 ± 0.10 ^b
C (10)	3.14 ± 0.15 ^a	254 ± 15	2.25 ± 0.11 ^c	193 ± 11 ^{ad}	1.58 ± 0.25 ^b
D (9)	3.61 ± 0.06 ^c	257 ± 9	1.93 ± 0.12 ^{bc}	245 ± 16 ^c	5.61 ± 1.08 ^a
E (9)	3.72 ± 0.08 ^c	242 ± 10	3.90 ± 0.16 ^d	213 ± 11 ^{ac}	7.25 ± 0.29 ^a

したがって1群10匹で飼料は自由摂取とし36日間飼育した。図からも分かるようにAは連続的にカゼイン食を与え続けた群、B、C、Dはそれぞれ無タンパク質食とカゼイン食を1日、2日、3日毎に交互に与えた群でタンパク質の総量は変わらない。そ

れらに対し、E群は2日無タンパク質食、1日カゼイン食、F群は3日無タンパク質食、1日カゼイン食を与えるもので、タンパク質の総量は当然少なくなる。図50と表22にその結果を示す。20%カゼイン食を連続的に与えた群の成長がよいのは当然とし

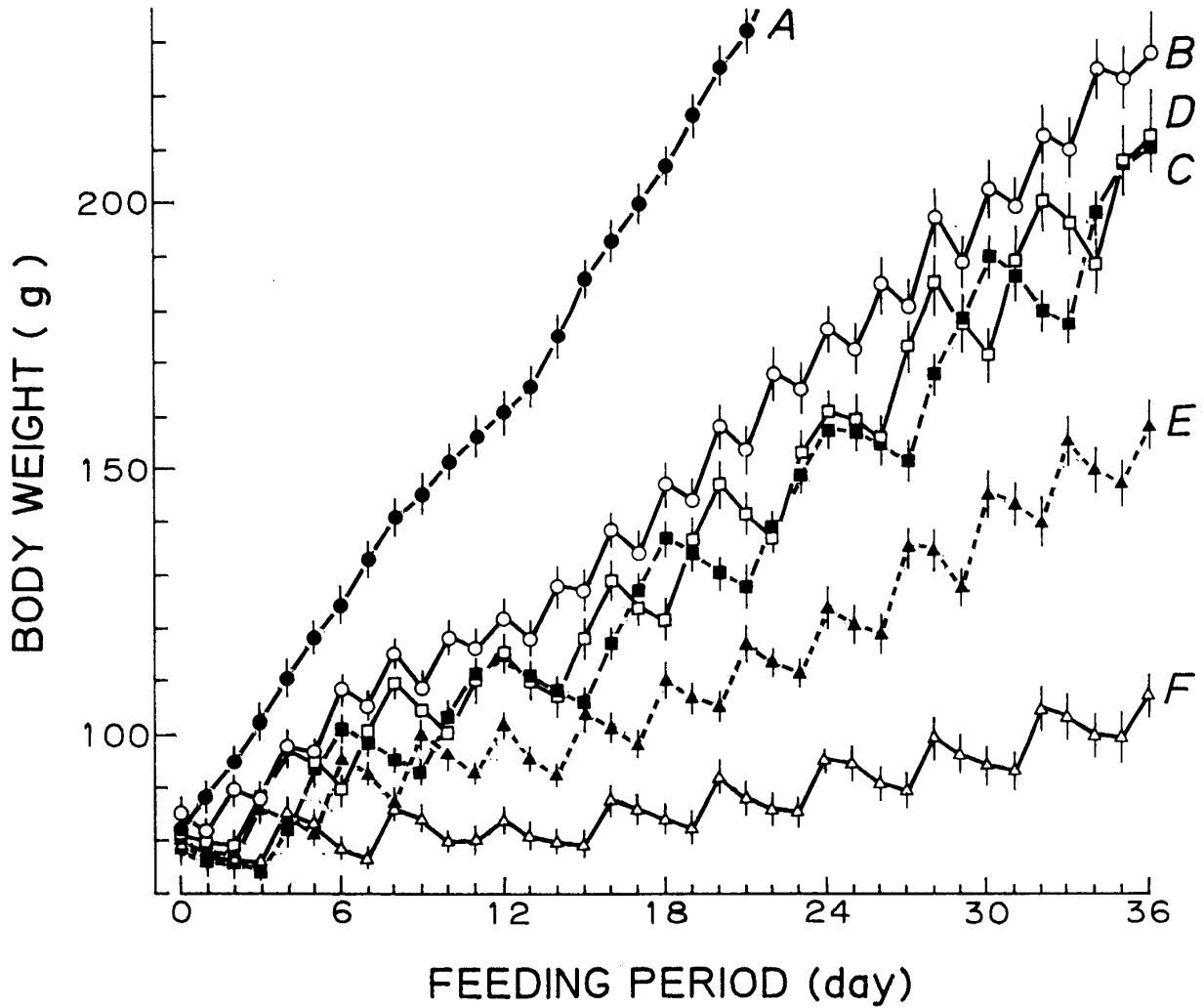


図50 飼料投与期間中のラット成長曲線

図49に示した計画に従って20%カゼイン食と無タンパク質食が交互投与された。

表22 36日間飼育したラットの飼料および窒素摂取量とタンパク質効率

Group (n=10)	Food intake (g/day/kg)		Nitrogen intake (g/day/kg)	Protein efficiency ratio (g/g)
	20% Casein	Protein-free		
A	104 ± 1 ^a	—	3.26 ± 0.03 ^a	1.68 ± 0.02 ^a
B	131 ± 3 ^b	88 ± 3 ^a	2.05 ± 0.05 ^b	2.37 ± 0.05 ^b
C	132 ± 2 ^b	84 ± 3 ^a	2.07 ± 0.03 ^b	2.42 ± 0.10 ^b
D	132 ± 2 ^b	90 ± 3 ^a	2.07 ± 0.03 ^b	2.30 ± 0.03 ^b
E	135 ± 4 ^b	89 ± 2 ^a	1.41 ± 0.04 ^c	2.42 ± 0.06 ^b
F	133 ± 5 ^b	91 ± 3 ^a	1.04 ± 0.04 ^d	1.71 ± 0.16 ^a

飼料摂取量と窒素摂取量は体重の差を考慮して体重kg当たりで示した。
窒素摂取量はカゼイン食と無タンパク質食を総合して計算してある。

て、20%カゼイン食を間歇的に与えた3群(B, C, D)が殆ど同じ成長曲線を示した。1日ないし3日の無タンパク質飼料の間に必ず体重の減少をきたし、続くカゼイン食の間に損失した体重を取り戻しつつ鋸歯状に体重は増加していく。体重増加で栄養条件を判断する限り、ラットは相当厳しい栄養環境に耐えられるとも考えられる。しかし、無タンパク質食の期間がタンパク質食より長いE, F群ではやはり体重の伸びは低い、飼料効率ではE群が最も良好な値を示している。

表23は肝臓重量、タンパク質量、RNA/DNA比を求めたものである。血漿分析でも関連するので記述しておくが、この実験では12日目、24日目、36日目に全ての群でカゼイン食を与えていることになる(図49参照)。ラットを屠殺するに際してA群は別としてB~F群の半数(5匹)にはさらに無タンパク質食を所定の日数与えてから屠殺した。A群を除いて各群の上段の数値が36日目に屠殺したラットの値である。肝重量、タンパク質量にはそれ程、屠殺前の無タンパク質食投与の影響はないが、RNA/DNA比はB~F群すべてで、屠殺前の無タンパク質食摂取の影響が認められている。RNA/DNA比は肝臓でのタンパク質合成能の指標とも考えられるので、この値の低下は肝機能に影響を与えているかもしれない。図49に矢印で示したように実験の中頃に数日に亘って尿を採取し窒素成分の分析を行った。どの群でもクレアチニンの尿中排泄の量に変化はなく、総窒素、尿素、アンモニアなどの尿中排泄はタンパク質食の摂取とともに増加した。クレアチニンは一般に筋肉の異化作用によって生じ、動物全体の筋肉量に比例すると考えられている。この実験で尿中クレアチニン排泄に変化のなかったことは、タンパク質食、無タンパク質食の交互投与がこの実験条件では筋肉タンパク質代謝に

影響をもたらしていないとも考えられる。血漿パラメーターでは総タンパク質、アルブミンに有意な点は認められないが、屠殺前の無タンパク質食摂取が血漿グルコース濃度をすべての群で高めていた。これは無タンパク質食すなわち高デンプン食を意味しており、この影響がでたものであろう。

屠殺前にタンパク質食を摂取している群、無タンパク質食を摂取している群を含め、それぞれ別個に血漿遊離アミノ酸のレベルを測定した結果を図51に示す。血漿遊離アミノ酸はアミノ酸プールとしては限られた意義しか認められないが、特記すべき現象は屠殺前無タンパク質食を投与した群で、タンパク質食摂取群と比較して、セリン、グリシン、アラニンなどの血漿中濃度の高いのが目立つ。これらのアミノ酸は栄養状態の劣る折り血漿中に高まる傾向があるといわれているアミノ酸で、無タンパク質食を数日摂ったラットの栄養状態を反映しているものといえる。

「偏食」の最後に上記のような間歇的タンパク質の投与方法がラットの消化管機能にどのような影響を与えているかということを検討した⁴⁸⁾。今までの研究成果と体験を踏まえて、既に一度実験を行っている40%カゼイン食と無タンパク質食のミールフィーディングを採用、20%カゼイン食の連続投与群を対照とした。ラットの成長曲線、タンパク質効率など図52に示す通りである。A群が9:00-11:00にタンパク質飼料、20:00-22:00に無タンパク質飼料を投与、B群はその逆である。有為差はないものの今までの結果の通り、20%タンパク質連続投与群の成長の良いこと、活動前(夜間)の飼料投与の方が明期投与より摂取量が多いこと、無タンパク質飼料よりタンパク質飼料を好むこと、夜間投与かタンパク質飼料かどちらが優位かと言えば、タンパク質飼料の方が優位であった。また、活動時に無

表23 5週間飼育したラットの肝臓重量、タンパク質量およびRNA/DNA比

Group (n)	Period (days)	Tissue weight (g/kg)	Protein content (mg/g)	RNA/DNA ratio (mg/mg)
A (10)	36	31.9±0.5	194.2±2.6 ^a	2.33±0.08 ^a
B (5)	36	30.8±1.0	186.2±3.8 ^{ab}	2.82±0.08 ^b
(5)	37	27.7±0.5	198.5±3.7 ^a	2.54±0.14 ^a
C (5)	36	29.6±0.7	197.4±3.7 ^a	2.42±0.10 ^a
(5)	38	30.3±0.7	186.4±4.8 ^{ab}	1.61±0.02 ^{cd}
D (5)	36	32.7±1.1	191.4±4.3 ^{ab}	2.40±0.04 ^{ace}
(5)	39	27.6±0.9	179.9±3.7 ^{ab}	1.56±0.05 ^f
E (5)	36	28.1±1.0	183.6±2.4 ^{ab}	2.32±0.14 ^{ade}
(5)	38	28.7±0.9	174.8±4.0 ^b	1.81±0.06 ^{eg}
F (5)	36	29.8±0.7	180.6±3.5 ^{ab}	2.43±0.12 ^a
(5)	39	30.2±0.8	182.1±9.2 ^{ab}	1.57±0.06 ^{fg}

A~F, 括弧内の数字については本文参照のこと。

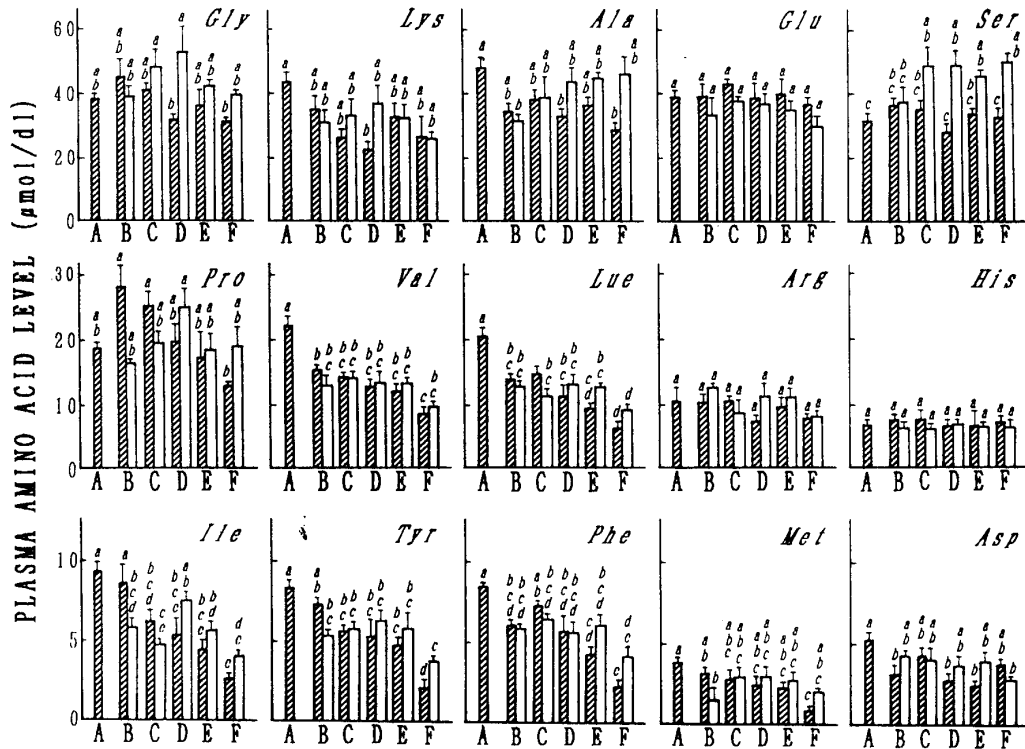


図51 計画通り5週間飼育したラットの血漿遊離アミノ酸濃度

▨は屠殺前20%カゼイン食を摂取している群で、A群では10匹、他の群では5匹である。□は屠殺前1ないし数日間無タンパク質食を摂取している群である。図49と本文を参照のこと。

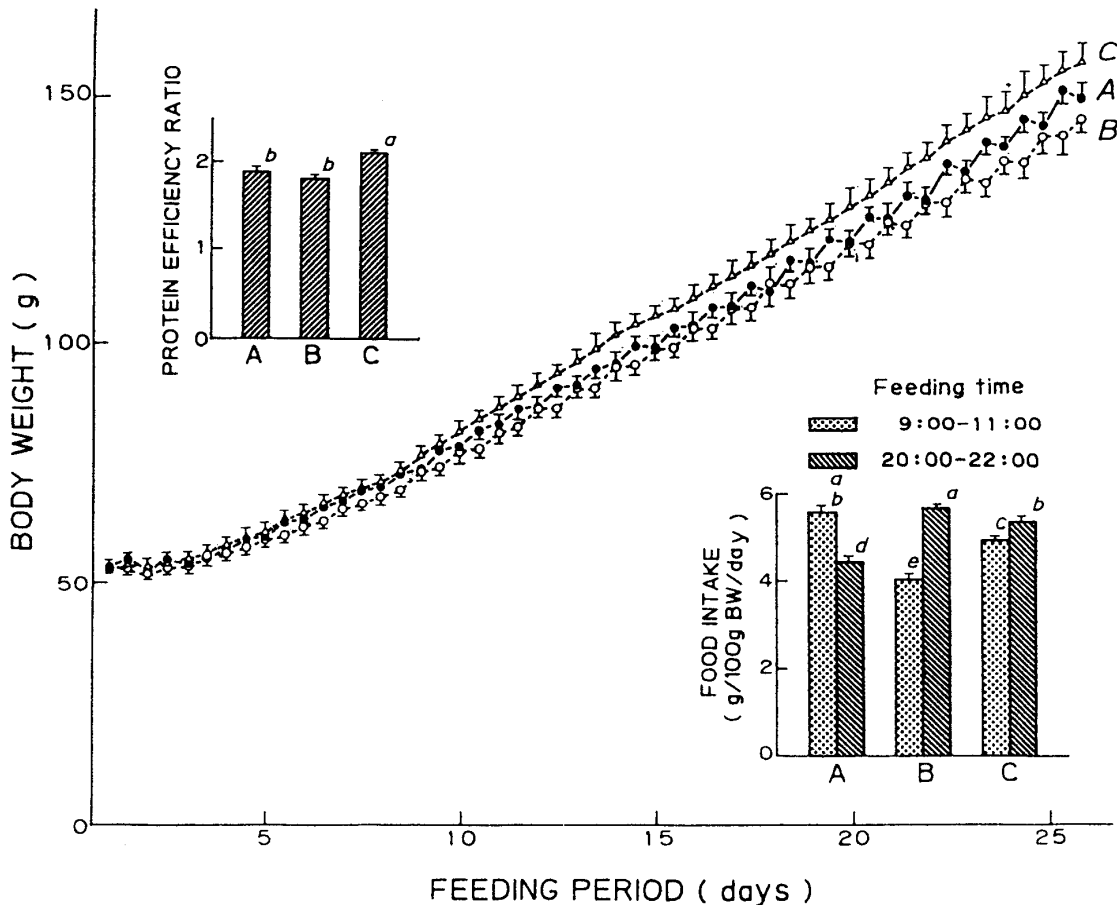


図52 25日間ミールフィーディング・ラットの成長曲線と飼料効率

A, B, C群の飼料投与方法については本文参照のこと。1群はそれぞれ16匹よりなる。

タンパク質飼料を投与した群では成長曲線の鋸歯状の増加が他の群より際立ち、活動時のタンパク質の必要性を暗示している。

図 53 に示すように飼育最終日 (25 日目) の 9 : 00, 11 : 00, 14 : 00 および 18 : 00 に屠殺し小腸と膵臓を摘出した。膵臓酵素は食塩水で抽出後、アミラーゼとリパーゼはそのまま、トリプシンとキモトリプシンについてはエンテロキナーゼで活性化して測定した。食事後のタンパク質/DNA, RNA/DNA は若干の変動はあるもののその範囲は僅かであった。それに比較して膵臓酵素の活性は相当大きい変動を示した。食事前無タンパク質食か 20%カゼイン食の A, B 群のタンパク質分解酵素活性 (トリプシンとキモトリプシン) は比較的 low, 40%カゼイン食の B 群では高かったが、食事後のタンパク質食群で増加, 無タンパク質食群で低下した。アミラーゼ, リパーゼも同様の傾向が認められ, 酵素誘導に素材としてのタンパク質が必要なことを示唆している。常に 20%カゼイン食を摂取している C 群での酵素活性変動は少なかった。また小腸粘膜の水解酵素 (シュクラーゼ, ロイシンアミノペプチダーゼ, アルカリフォスターゼ) の活性は殆ど, 食前, 食後の変動はなかった。

次いで空腸粘膜絨毛を用いてタンパク質への $[^3\text{H}]$ ロイシンの取り込み (タンパク質合成能) と同じくロイシンの上皮細胞への吸収能を測定した。消化酵素の活性増減とは逆にタンパク質食を摂取した後はタンパク質合成, アミノ酸の吸収とともにその活性は低下し, 逆に無タンパク質食の投与後は両活性は共に上昇するという極めて合目的な順応様式が見出された。

以上の「偏食」すなわちラットへの間歇的なタンパク質投与実験の結果を直接ヒトのタンパク質栄養へ演繹するのは冒険ではあるが, 敢えて少々 の独断を交えてまとめてみると以下ようになる。体重の維持にはタンパク質は欠くことのできない重要な栄養因子であること。活動前にはタンパク質を含む食事を定期的に摂ること, すなわち通常的生活をするヒトは朝食を摂る習慣をつけること。食欲増進の面から考えても食事組成には常に一定のタンパク質を含むのがよい。しかし一方では予想している以上に苛酷な栄養状態にも耐える仕組みを生体は保持しており, 少々 の栄養摂取のアンバランスに余り神経を尖らし, 無暗にストレスを高める必要はないように思われる。

b ラットの二次元行動解析装置の作成とその応用
 栄養素の効果を考える際, 成長および生理機能の

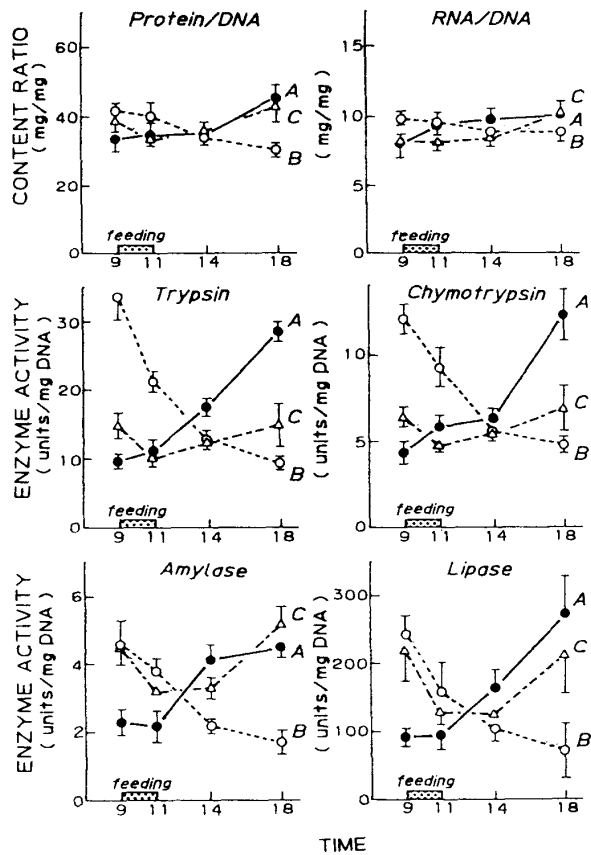


図53 ミールフィーディング・ラットの膵臓消化酵素活性レベル
 飼育最終日の 25 日目に所定の時間に 4 匹ずつ屠殺, 詳細は本文参照のこと。

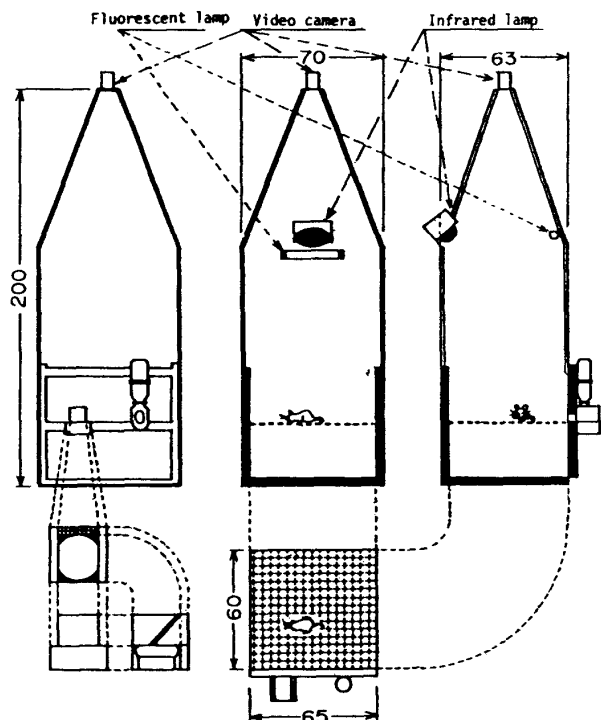


図54 ラット自発運動量測定器のスケッチ装置の左, 中央, 右側面のスケッチで, 左側面にみえるのは水瓶と給餌器である。

面からの評価の他に、学習・運動能力の変動、情動の変化という精神面の評価が必要である。従来用いられてきた輪廻し運動による自発運動量はストレス状態での欲求不満の表出であり、本来の自発運動とは異なるとの見解が一般的になっている。そこでビデオカメラとパーソナルコンピューターを取りつけた装置を自作した^{50)~51)}。

図54は自作の運動量測定器の各面よりのスケッチである。通常のラットの飼育ケージより遙かに広い65×60cmの金属製（一般市販の二段引き出しを利用）ケージを用い、明期は蛍光灯を、暗期は赤外線灯を用いてラット体よりの反射光をビデオカメラに捕らえ数台のパーソナルコンピューターにて解析、フロッピーディスクに保存した。そのフローチャートは図55に示す通りである。ラット体の反射光は数量化（1～5）される（そのイメージスキャンニングの例を図56に示すが、ラットそのままの形態を映している）。その中心は凡そラットの頸椎部にあたり、その位置は1秒毎にX-Y座標軸に記憶される。ラットの動きはそれ程早くないので、1秒毎の記録で十分、移動距離やある場所での存在頻度を求めることができる。

図57は幼ラットに1ヶ月間、タンパク質栄養の異なる3種類の飼料を自由摂取させた後、その運動量を測定したものである。Aは栄養的に満足できる市販固形飼料を粉末にして投与した群、Bは20%グルテン食群、Cはゼラチン20%、(0.08%トリプトファン添加)食群で、B、Cはタンパク質栄養からみて遙かにAに劣る。4週間後の各群(n=6)の体重はAで236g、Bで55g、Cで36gであった。どの群のラットも暗期に行動しているのは夜行性の動物として当然である。一見栄養的に成長の良いA群の動きがB、Cより活発のようにみえるが、体重100gあたりに換算すると、その移動距離はAで0.43km、Bで1.35km、Cで1.82kmとなり、体の小さいラットがその栄養的な障害を乗り越えて活発に動いている様子が窺えるのは興味深い。夜、昼の行動の違いを明確に捕えているのが図58である。ある一匹のラットの行動を2時間毎4回記録したものであるが、20:00-22:00および03:00-05:00の間では給餌器や給水器の周りを活発に動いているが、09:00-11:00ではその動きは鈍くなり、15:00-17:00では給水器の近くで睡眠しているのか、広いケージの他の部分には動きの痕跡すら認

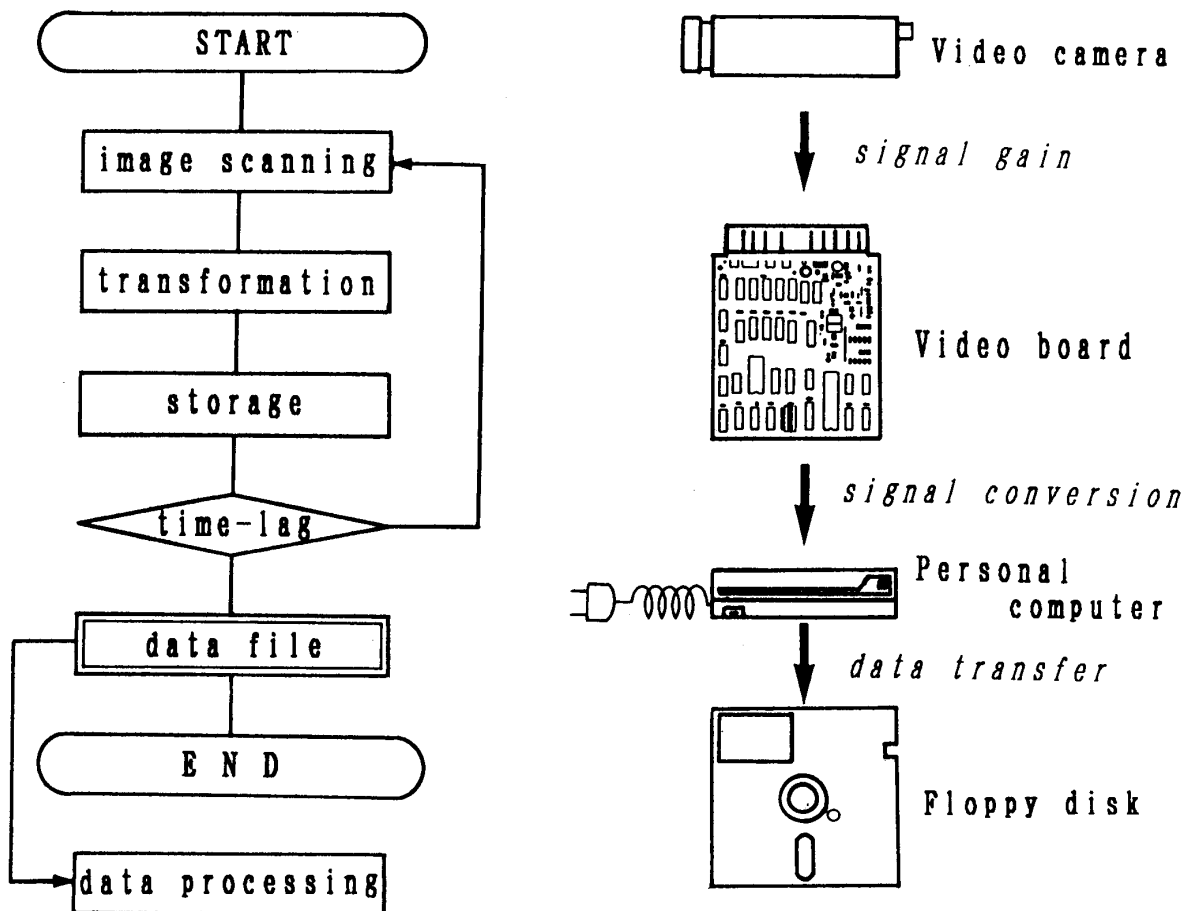


図55 画像解析のフローチャート

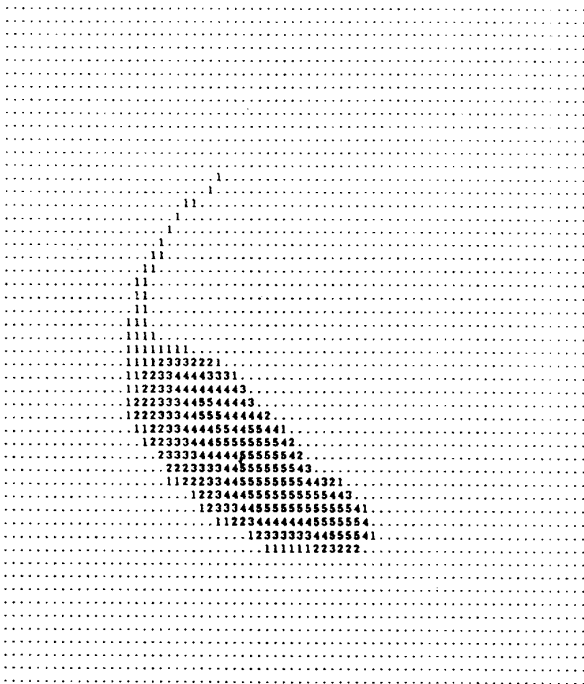


図56 画像解析の一例

ラットからの反射光の強さは1～5の数字でプリントされ、そのままラットの形を映している。

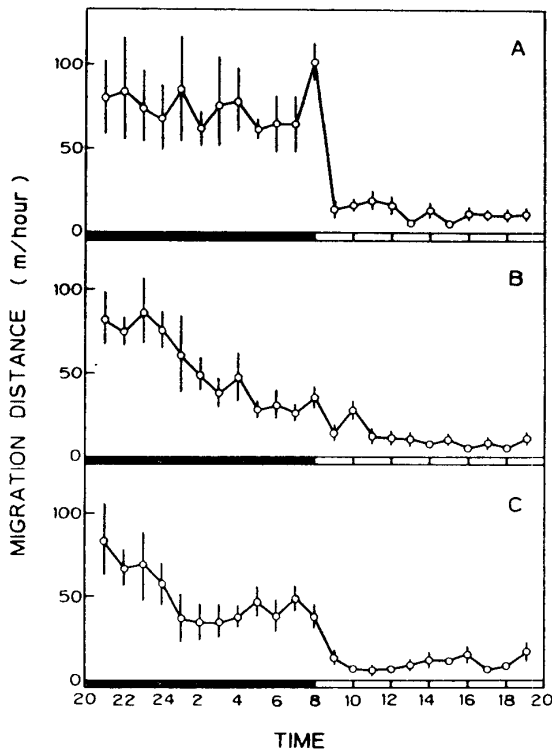


図57 タンパク質栄養の異なる飼料で飼育されたラットの自発運動量の比較

A, B, C各群の飼料組成については本文参照のこと。

められない。

次いでミールフィーディングに慣らしたラットの行動を解析した。1日2回40%カゼイン食と無タンパク質食の投与を行った。給餌時間は夜間が20：00-22：00，昼間が9：00-11：00である。タンパク質食，無タンパク質食を夜昼入れ替えた群と夜昼共に20%タンパク質食を与えた群との3群を比較した。運動量には3群で有意な変化はみられなかった。図59にラットの動きの一例を示しておくが，給餌時には夜昼の区別なく給餌器の周辺を動いている様子がよく分かる。また例え夜間であっても給餌されないときは殆ど運動していないことも判明した。

既にタンパク質の脂肪酸の酸化抑制効果の項で述べたように，現在知能や学習能力との関係が論議されている脂肪酸にn-3系の多価不飽和脂肪酸がある。n-3系脂肪酸を多く含む油脂（ α -リノレン酸を多く含むエゴマ油）をラットに投与すると迷路を用いた装置で給餌器に到達する時間が短縮されるという報告もある。そこで20%カゼイン食を基とし，油脂成分として紅花油（リノール酸に富む）かエゴマ油を10%含む飼料で1日1度2時間のミールフィーディングを1週間行った。その後，3日間自作の装置に入れて運動量を測定した。総運動量はどちらの油脂を摂取していても大きな変化はなかった。またこの実験と並行してラットが給餌器に首を入れている時間を測定する装置とコンピューターを組み込んでみた。要するにミールフィーディングに馴れて給餌時間を記憶していれば，給餌器に首を入れている時間は短くなるとの想定で行ったのである。結果は期待に反して，紅花油とエゴマ油投与群で特に差は認められなかった。むしろ紅花油投与群の方に時間短縮の傾向がみられ，この試作装置と飼育条件では α -リノレン酸に特殊な効果を認めることはできなかった。本装置はおよそ20万円程度で作成することができたが，現在同様の原理の機器が200万円程度で発売されており，経済的な面からも本装置の有効性は明らかである。

筆者らがミールフィーディングでタンパク質食，無タンパク質食をラットに投与している際，必ずしも多いとは言えないが，無タンパク質食の方を好んで摂食しているラットの存在を認めている。この点を自作の自発運動量測定装置で確認することとした。

3週齢のウイスター系雄ラットを20%カゼイン食で数日飼育後，40%カゼイン食と無タンパク質食を別々の給餌器に入れて同時にケージに投与し，10日間自由摂取させた。図60のA群は無タンパク質食を好む無タンパク質食嗜好ラット，B群は両食餌

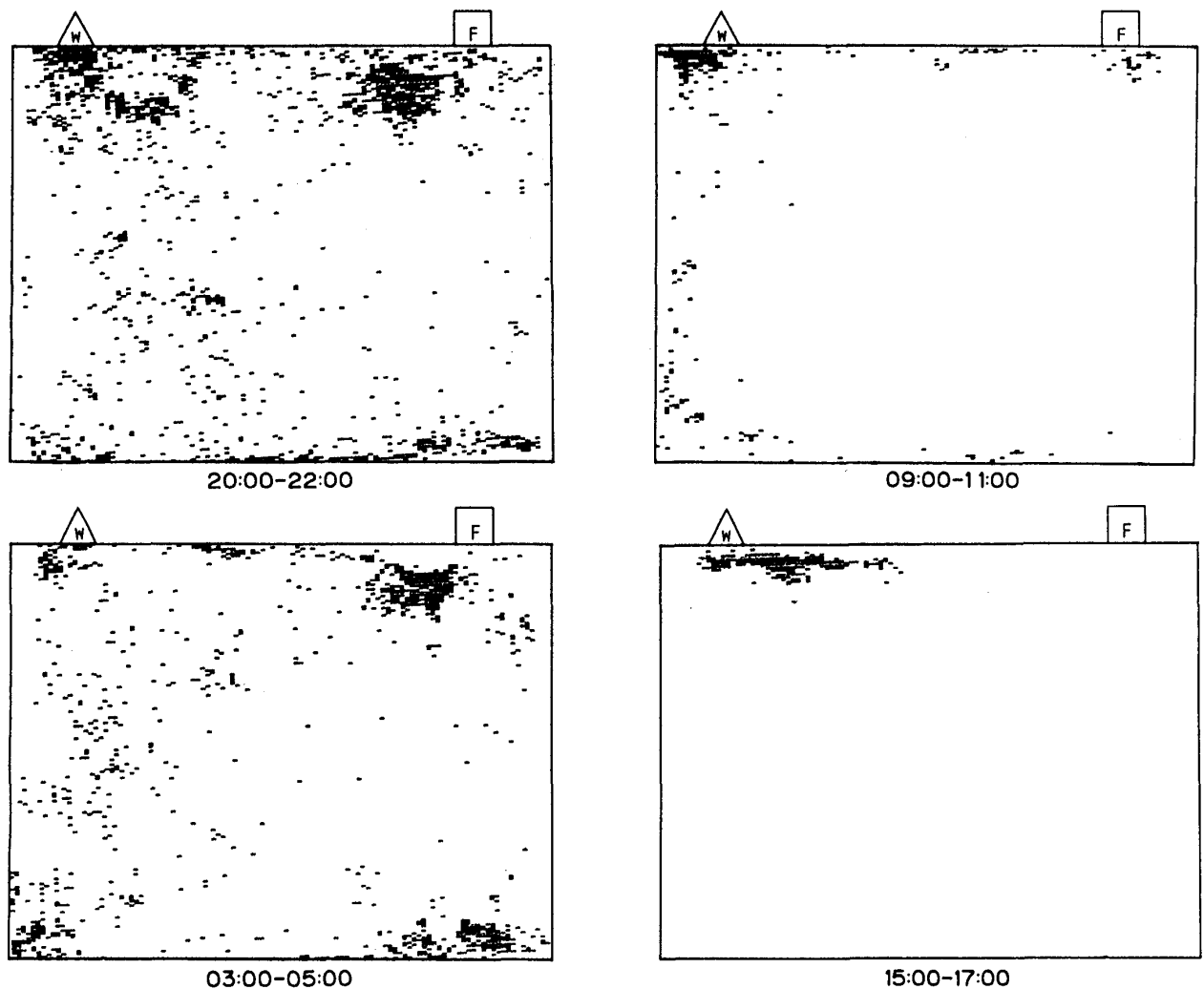


図58 自由摂取ラットの夜間と昼間の行動解析

体重 230 g のラットの行動をドットプロットとして記録した。図に示してある時間帯 2 時間 (4 回) の行動を追跡している。F は給餌器, W は水瓶である。

を等量または 40%カゼイン食を幾分好むラットである。無タンパク質食嗜好ラットはおよそ 40 匹から選抜して 5 匹程で, B 群は任意に選んだ 15 匹の値である。その時のタンパク質摂取量は図 60 に示す通りで, A 群ラットは 10 日経過してもタンパク質を補うという傾向はみられない。その後 4 日間自発運動量測定装置に入れ行動量, 存在分布, 摂取量などを記録した。図 61 は存在分布を示したもので, 試験開始 1, 2 日目と 3, 4 日目で 40%カゼイン食と無タンパク質食の給餌器の位置を変えてある。明らかに B 群のドットは壁面周辺にほぼ満遍に散らばっているのに対し, A 群のラットは概して無タンパク質食給餌器周辺にかたまっている。図 62 に自発運動量測定器による両群の半日毎の積算移動距離を示してある。測定時の体重が A 群で 40 g, B 群で 120 g と明らかに異なるので, 直接の比較はでき

ず, 体重当たりの移動距離で表わしてある。その時の食事量も同じ図中に示してあるが, B 群ラットが 40%カゼイン食と無タンパク質食をほぼ等量摂取しているのに対し, A 群ラットは明らかに無タンパク質食を有為に多量摂取している。通常の栄養学的に考えれば A 群のラットは対照というべき B 群ラットより遙かに劣っているにもかかわらず, 体重当たりの移動距離は長く, 活発に運動していると言える。この実験に使用されたラットは授乳, 離乳期を通じて厳密に管理されており, 母ラットまたは仔ラットが無タンパク質食, 換言すれば高デンプン食に接した履歴はなく, この無タンパク質食嗜好性をどのようにして獲得したのか問題は残されている。

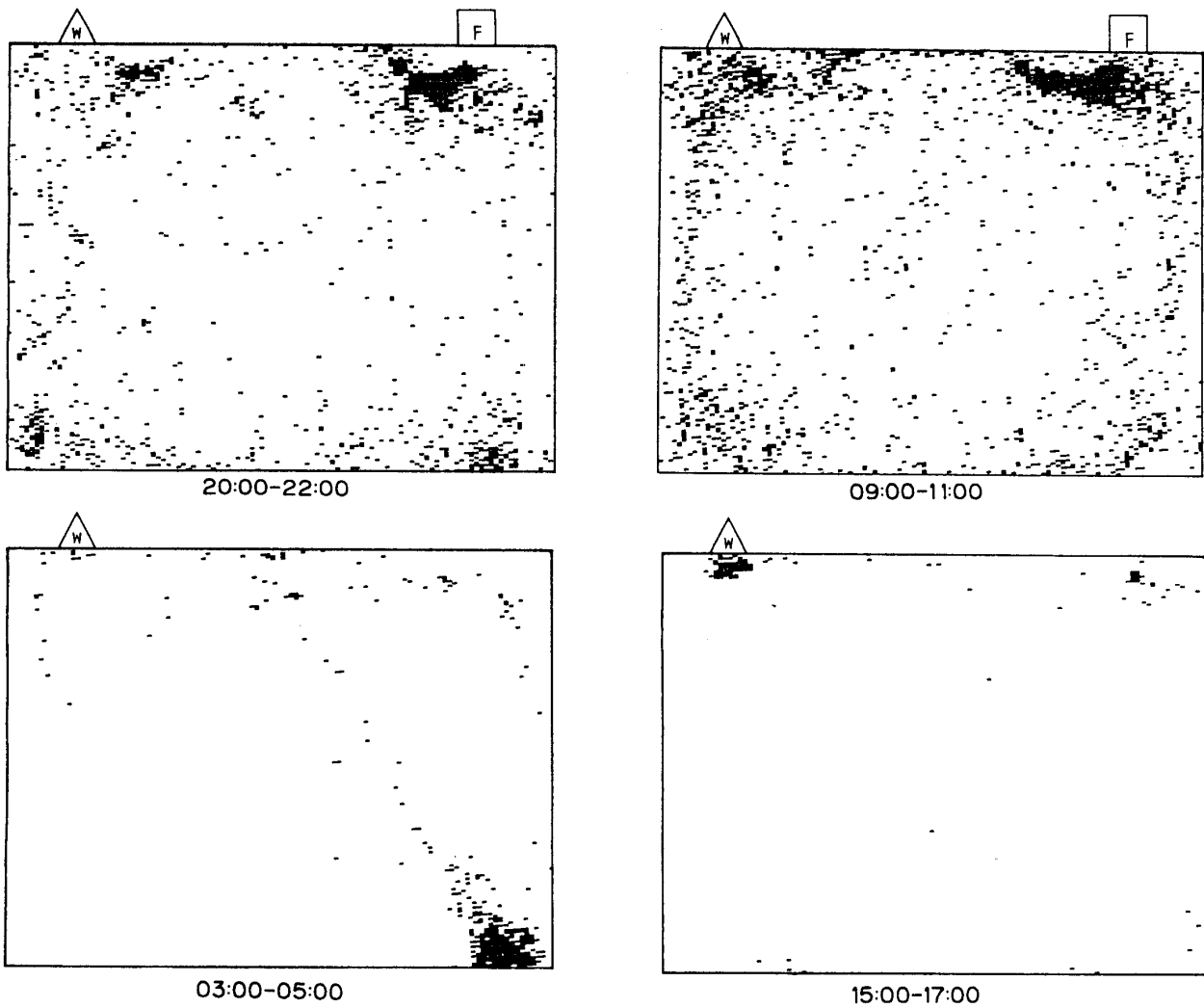


図59 ミールフィーディングに馴らしたラットの夜間と昼間の行動解析

1週間 20:00-22:00 (夜間) と 09:00-11:00 (昼間) に飼料を与えた後、自発運動測定器にに入れて行動を記録した。

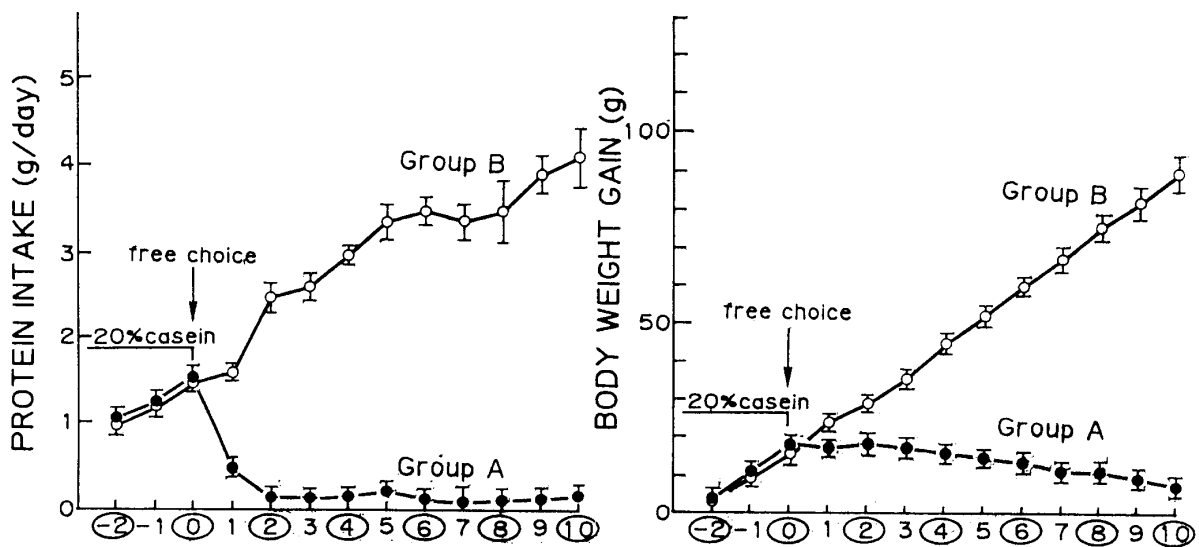


図60 無タンパク質食嗜好ラットの行動解析(1)

50 g の幼ラットを 20% カゼイン食で数日飼育した後、40% カゼイン食と無タンパク質食の給餌器を同時にラットケージに置いて 10 日間飼育し、その間の飼料摂取量、体重などを測定した。明らかに無タンパク質を嗜好する一群のラットの存在することが分かる。

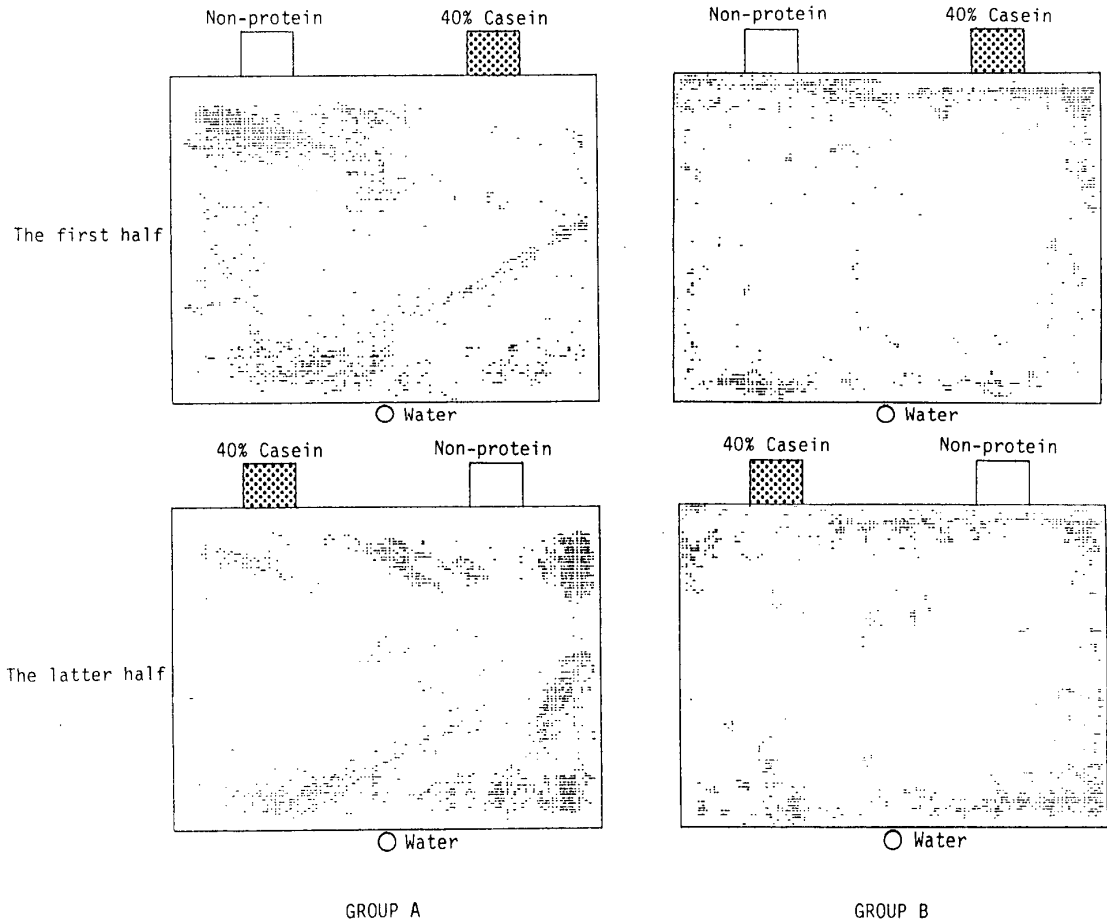


図61 無タンパク質食嗜好ラットの行動解析(2)

図 60 に示すラットのA群（無タンパク質食嗜好ラット）とB群（通常の摂食行動をとるラット）より適当に選択して自作運動量測定器にいて、行動パターンを解析した。4日間の測定期間で前半と後半で給餌器の取り付け場所を変えている。

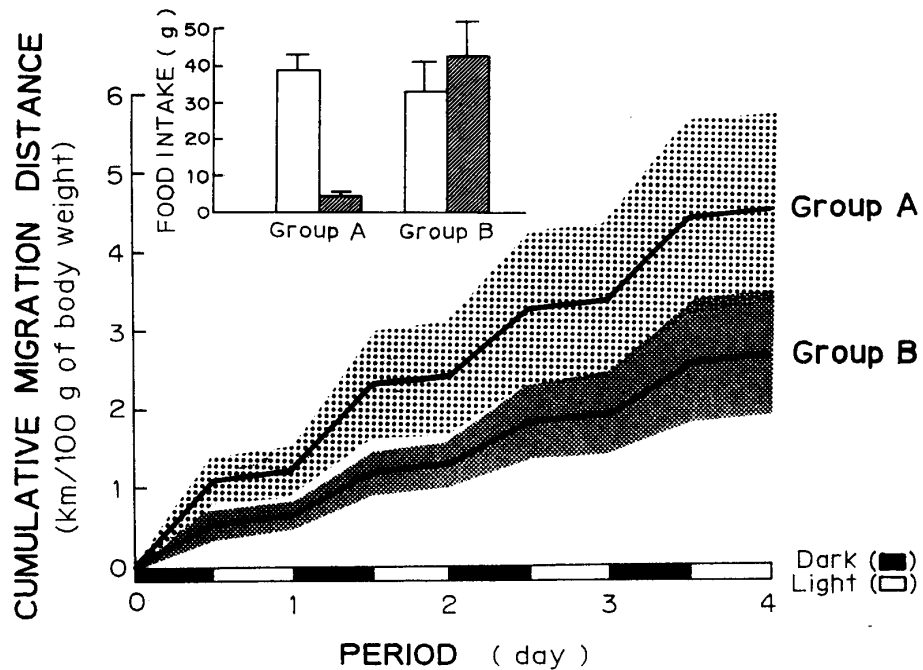


図62 無タンパク質食嗜好ラットの行動解析(3)

A群（無タンパク質食嗜好ラット）とB群の4日間の運動量と食餌選択量を記録した。運動量は体重当りに換算している。5匹のラットを選び5回測定して求めた結果である。図内の食餌摂取量のグラフで■は40%カゼイン食を、□は無タンパク質食を示す。

c ラット腸管広範囲切除と機能回復に対するペプチドの効果

タンパク質の消化吸収についてはアミノ酸まで分解を受けた後、腸管から吸収されるものと長く考えられてきた。その後、タンパク質消化産物中のオリゴ（ジまたはトリ）ペプチドの多くはそのままの形態で小腸粘膜上皮細胞中に取り込まれることが明らかにされた。ペプチド輸送系にはアミノ酸輸送系程の多様性はないが、タンパク質の消化過程で生じたアミノ酸とは競合せず、またある種のアミノ酸輸送系に先天あるいは後天的な欠落がある場合でも、ペプチドとして供給すれば当該アミノ酸の吸収不全が解消されることが知られており、ペプチド吸収のもつ栄養的役割の重要性が再認識されるに至った。

また、小腸切除や潰瘍性疾患時のような吸収能が著しく低下している状況下におけるペプチド吸収の有効性がカゼイン水解ペプチド、卵白水解ペプチド、大豆タンパク質水解ペプチドなどで検討され、臨床的に利用されている。

一方、飢餓や障害など異化的状態におかれた生体では、筋タンパク質分解により生じた、あるいは血中分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）が当該組織において脱アミノ化され、その炭素骨格は直接エネルギー源として、またアミノ酸の一部は小腸・腎を經由してアラニンとなって肝に戻りグルコース新生に利用される（グルコース-アラニン回路）。このような状況下での分岐鎖アミノ酸は、糖に比べインスリン分泌を促さず、エネルギーの供給形態として重要である。外科的侵襲時に分岐鎖アミノ酸の補給は縫合部の良好な回復を促すとされ、実際アミノ酸輸液の分岐鎖アミノ酸の濃度は高い。さらに小腸ではグルタミンがエネルギー源として利用可能なことから、小腸切除や疾患治療時にはグルタミンの補給も有効と言われている。そこで小腸広範囲切除後の経腸栄養で窒素源としてアミノ酸混合やタンパク質（分離大豆タンパク質以下SPI：不二製油株式会社製）に加えて大豆ペプチド（大豆タンパク質部分水解物以下ハイニュートPM：不二製油株式会社製）やアミノ酸補足効果を検討した^{52)~53)}。

最初の実験⁵²⁾では切除部分が大き過ぎたこともあったか、術後の回復が悪く、SPI食、ハイニュートPM食、アミノ酸食の比較では窒素出納でハイニュートPM食が僅かな正（他の2群は負）の値を示した。臓器重量の比較、血漿パラメーターの比較などでは3種の食餌群間に特に有為なものはない。残存小腸粘膜重量では上部（空腸）、下部（回腸）ともにペプチド食群が対照群より高い値を示した。小腸粘膜の増加にペプチド態アミノ酸の補給が有効

との報告もあり、この実験結果もそれを支持している。以上ペプチド食はSPI食やアミノ酸混合食より術後の経腸栄養の窒素源として有効であると思われたので、ペプチドハイニュートPMへのアミノ酸添加効果の検討を行った⁵³⁾。

この実験では最初の実験の体験を活かし切除部分を若干減少した。体重250g前後のウィスター系雄ラットを用い、約12時間絶食後小腸切除を行った（幽門より下方15cmと回盲弁より上方30cmを吻合）。対照としては開腹縫合しただけの偽手術群（sham）を設けた。術後2日間は5%フルクトースのみを与え、続いて試験食に切り換えた。試験食はハイニュートPM20%、デキストリン65%、大豆油5%、オリエンタル配合ミネラル混合5%、オリエンタル配合ビタミン混合1%、セルロース粉末4%を基本としたもの（-AA）と、これにロイシン、イソロイシン、バリンの等量混合物とグルタミンをいずれも2%ずつ加えその増加分をデキストリンで補正した（+AA）の2種類である。なお偽手術ラットには-AA食を投与した。所定期間飼育後、12時間絶食の後屠殺、直ちに幽門から回盲弁に至る小腸を摘出した。手術群で幽門部から順に約5cm（セグメント1）、吻合面まで約10cm（セグメント2）、さらに下方に10cmずつ（セグメント3、4、5）に分け、粘膜上皮細胞を分離してアミノ酸と糖の吸収実験に供した。偽手術群については上記各セグメントに相当する部分をその該当セグメントとした。

図63に試験食投与開始日からの体重変化を示し

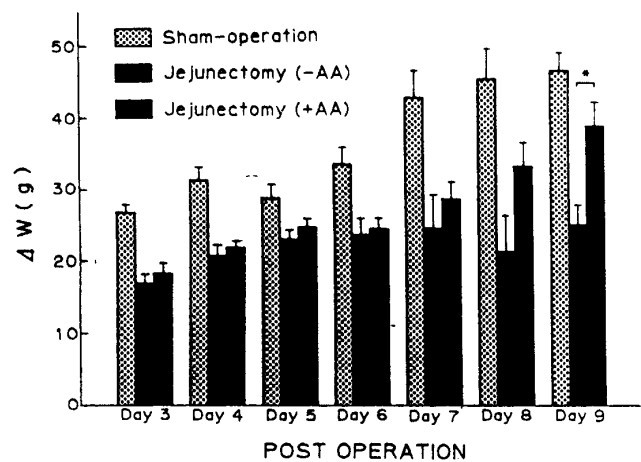


図63 空腸切除ラットの手術後の体重変化

手術後2日間は5%フルクトースだけを与えているので、体重測定は術後3日目より測定した。体重は増加量で示してある。1群4匹のラットを使用。

表24 小腸切除ラットの成長指標

	Sham	-AA	+AA
Body weight gain (g/day)	6.7 ± 0.4 ^a	4.0 ± 0.5 ^b	5.6 ± 0.5 ^a
Food intake (g/100 g BW)	7.4 ± 0.4 ^a	5.9 ± 0.4 ^b	6.7 ± 0.2 ^{ab}
Protein efficiency ratio	1.73 ± 0.04 ^a	1.31 ± 0.09 ^b	1.40 ± 0.10 ^b
Tissue weight (g/100 g BW)			
Liver	2.87 ± 0.06 ^a	2.96 ± 0.18 ^a	2.81 ± 0.10 ^a
Kidney	0.36 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.01 ^a	0.34 ± 0.01 ^a
Spleen	0.23 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.01 ^a	0.19 ± 0.02 ^a

各群ラット 5 匹の平均値 ± SE

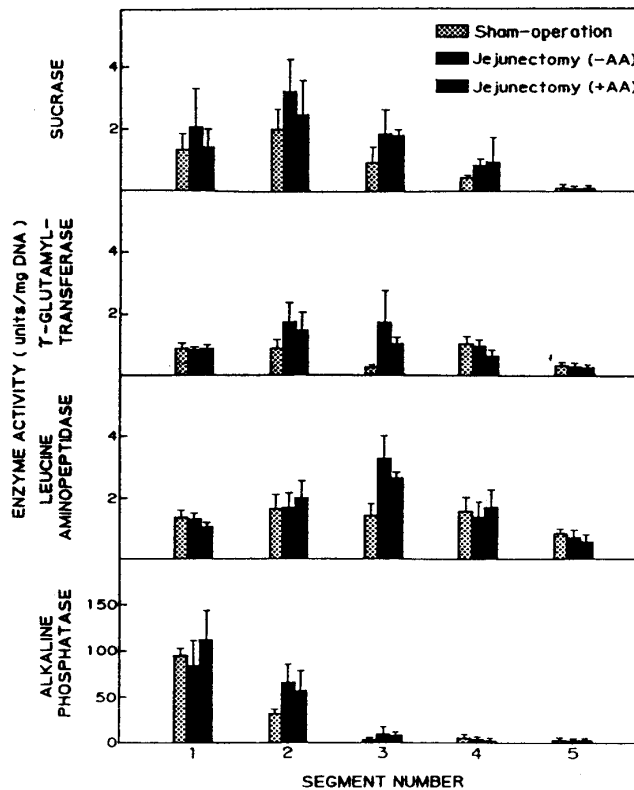


図64 空腸切除ラットの小腸粘膜酵素の活性レベル

摘出した小腸は5フラグメントに分けた。詳細は本文参照のこと。

た。空腸切除の2群は術後6日目までは同じような緩慢な回復しか示さなかったが、7日目からのアミノ酸添加食群(+AA)の体重増加が著しく、術後6日目から9日目までの増加割合は偽手術群のそれに匹敵した。術後3日目から9日目までの各群ラットの体重増加量を比較すると(表24)、空腸切除アミノ酸添加食投与群(+AA)や偽手術群と空腸切除アミノ酸無添加食投与群(-AA)との間に有意差が認められ、その傾向は摂食量を反映したものであった。+AA群に摂食量増加をもたらした背景には術後数日間での消化管機能回復に添加アミノ酸が有効に作用した可能性が考えられる。タンパク質効率率は偽手術群と空腸切除2群との間に有為差は認め

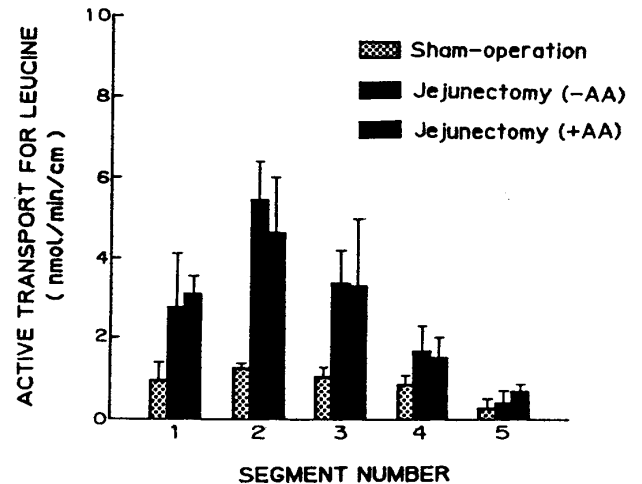


図65 空腸切除が小腸粘膜のロイシン能動輸送に及ぼす影響

ロイシンの能動輸送能の測定には小腸粘膜をヒアルロニダーゼ処理して得た上皮細胞を用いた。[³H]ロイシンの取り込みを37°C、1分間の迅速ろ過法で測定し、塩化ナトリウム存在の有無の差として求めた。

られたが、切除群間でアミノ酸添加による影響は観察されなかった。また各種臓器重量にも差異は認められなかった。血液パラメーターの分析では-AA群でタンパク質濃度が若干低いことがみられたが、アルブミン、グロブリンなどの濃度には群間の差はなかった。図64に示すように空腸切除2群のセグメント3におけるシュクラーゼ、γ-グルタミルトランスフェラーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼ活性の上昇が顕著であり、平常時には回腸では活性の低いこれらの酵素が小腸切除により誘導を受けたことが示唆された。しかし、この誘導は吻合部の近傍に限られていた。アルカリホスファターゼ活性はふつう消化管上部で高く、回腸下部では低いが、空腸切除後も回腸における本酵素の活性は低いままであった。アミノ酸添加の効果は認められなかった。図65と図66に空腸切除残存小腸粘膜より単離した上皮細胞へのアミノ酸(ロイシン)と糖(グルコース)の吸収能を測定した結果を示す。いずれも

Na⁺存在下での能動輸送として示してある。偽手術群に比べ、切除群で高い活性が認められたが、アミノ酸添加有無の差はなかった。図67は3群の血清遊離アミノ酸の分析結果である。偽手術群や+AA群に比較して-AA群でアラニン、グリシン、セリンの濃度がやや高かった。これらのアミノ酸はタン

パク質栄養状態が劣る時に高まる傾向にあり、-AA群で同じような状態にあることが示唆された。他のアミノ酸には特記すべき変化は認められなかった。このことは逆に添加した分岐鎖アミノ酸やグルタミンが血中濃度を高めることなく有効に吸収利用されたことを意味しており、アミノ酸インバランスの観点からも経腸栄養剤へのこれらアミノ酸の補給は問題のないものと思われる。添加量や補足期間などは今後の問題点であり、また術後の栄養生理生化学的な変化は細胞増殖因子や癌遺伝子との絡みから追求される問題であろう（本稿では特に触れなかったが、動物実験では統計処理は欠くことのできない問題である。全章を通して基本的にはStudent's t-testに準じているが、詳細は原報を参照されたい。また、表、図で肩付きの文字が異なる場合に、P<0.05で有意差がある。数値は平均値±SEで表してある）。

本稿は筆者が講座を担当して以来、ほぼ十年間の研究内容をとりまとめたものである。稿をまとめるに際し最初の項目では、一部助教授の折りの研究を付け加えている。本稿内容のほとんどは京都府立大学農学部農芸化学科第3講座栄養化学研究室で遂行されたものであるが、一部は本学生活科学部食物学科の栄養学講座および食品学講座、並びに光華女子短期大学食物学科食品学研究室との共同研究として

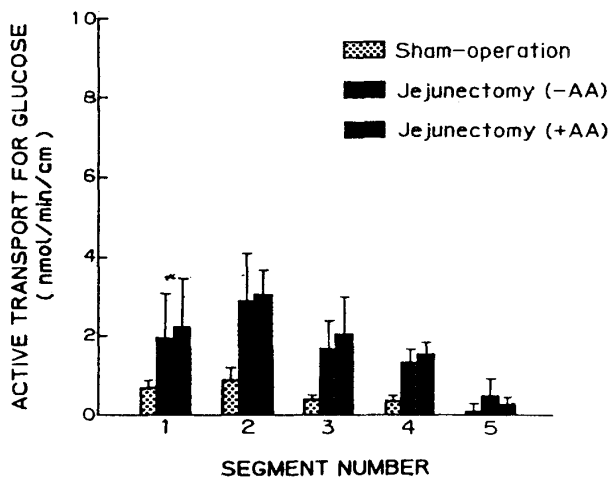


図66 空腸切除が小腸粘膜のグルコース能動輸送に及ぼす影響

グルコースの能動輸送能の測定には図65で示したと同様の上皮細胞を用い、¹⁴Cグルコースの取り込みを測定した。

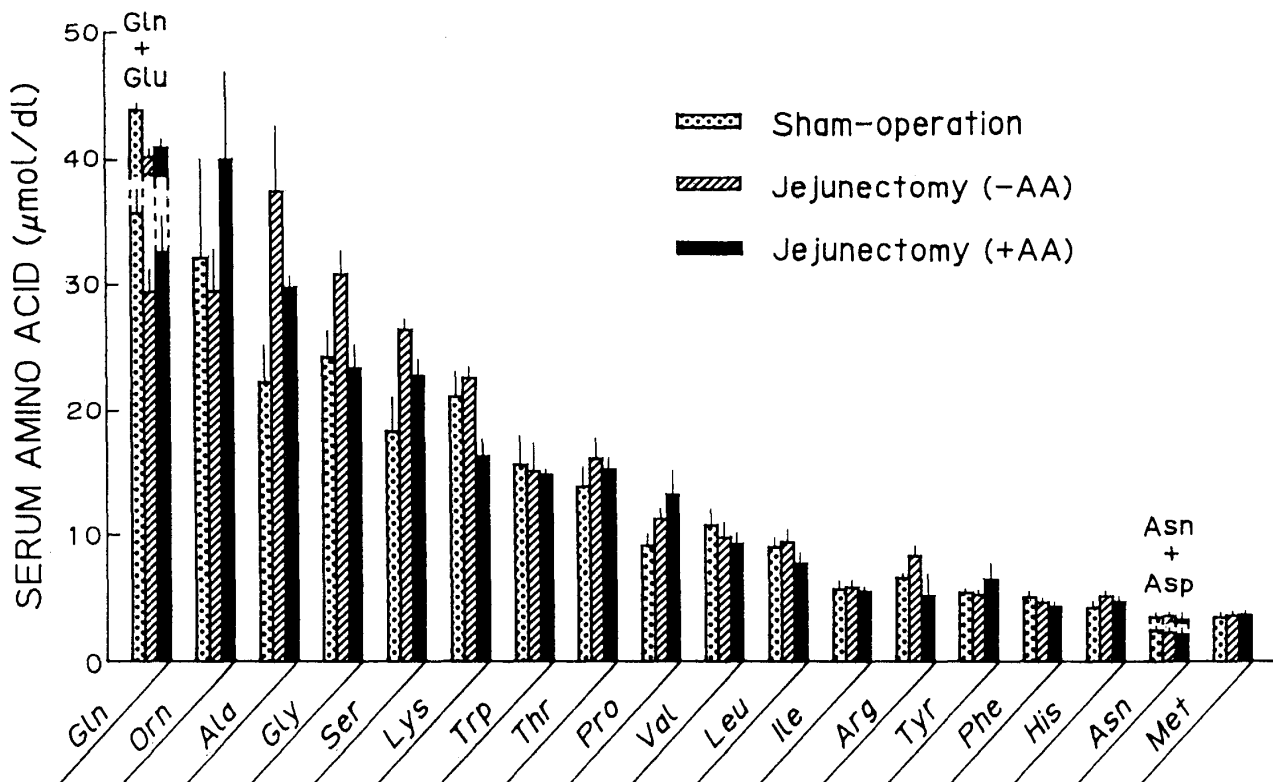


図67 空腸切除ラットの血漿遊離アミノ酸濃度に及ぼすアミノ酸補足の効果

行われたものであり、厚く深甚の謝意を表す。全内容を4項目にまとめたため、その範疇に入りにくい内容のものや、現在進行中の研究や学術論文として取りまとめつつあるものもすべて割愛した。従って本稿に引用されているものは国の内外の学術雑誌と研究会誌に既に学術論文として印刷されているものに限定した。また本稿の性質もあって、第三者の研究を引用論文なしで紹介していることもあるが、原著ではすべて引用論文として挙げているので参照していただきたい。

本研究内容はその大部分が本講座で行われたもので、岩見公和助教授の力に負うところ大なるものがあり、心より深甚の謝意を表す。また杉山 薫助手を始めとして本研究にご協力、ご尽力をいただいた数多くの講座専攻生の諸兄弟姉に感謝の意を捧げた。

稿を終えるにあたり、筆者が講座を担当してからも終始変わらぬご鞭撻とご厚情をいただいている金森正雄京都府立大学名誉教授（現武庫川女子大学教授）に厚く感謝する。また、一時期研究を共にした三好正満奈良女子大学教授、土井裕司武庫川女子大学助教授にはその折りのご協力とご援助に深謝の意を表すものである。

引用文献

- 1) 世界の食べ物 [米とイモの関係], 13-1 ~ 28 (1983) (週間朝日百科 121) 朝日新聞社.
- 2) [食品学 1 (総論)]: 伊吹文男; 99 ~ 101 (1987) (榊培風館).
- 3) 植物性食品のプロテアーゼインヒビターに関する研究: 伊吹文男; 栄養と食糧, 32 (1979) 75-88.
- 4) The Position of the Reactive Site Peptide Bond in Eggplant Trypsin Inhibitor Molecule: Fumio IBUKI, Makoto KOTARU, Akihiko KATSURADA, Toshio ASAO, Misao TASHIRO and Masao KANAMORI; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 26 (1980) 119-126.
- 5) Amino Acid Composition of Protein Fractions Extracted from Phaseolus Beans and the Field Bean (*Vicia faba* L.): Masao KANAMORI, Tsuneo IKEUCHI, Fumio IBUKI, Makoto KOTARU and Kuang Kung KAN.
- 6) 輸入食用マメ種子タンパク質と反栄養因子 (資料): 伊吹文男, 小垂 眞, 吉川秀樹, 池内常郎, 金森正雄; 日本栄養・食糧学会誌, 39, No. 2 (1986) 136-139.
- 7) 輸入食用マメ種子のミネラルとフィチン酸含量 (資料): 小垂 眞, 吉川秀樹, 池内常郎, 伊吹文男, 金森正雄; 日本栄養・食糧学会誌, 39, No. 2 (1986) 140-142.
- 8) Chemical Composition of Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) Varieties: Fumio IBUKI, Makoto KOTARU, Kuang kung KAN, Tsuneo IKEUCHI and Masao KANAMORI; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 29, No. 5 (1983) 621-629.
- 9) Investigation of Antinutritional Factors of the Winged Bean (*Psophocarpus tetragonolobus*): Makoto KOTARU, Tsuneo IKEUCHI, Hideki YOSHIKAWA and Fumio IBUKI; Food Chemistry, 24 (1987) 279-286.
- 10) Purification and Characterization of a Bowman-Birk Type Proteinase Inhibitor from Faba Beans (*Vicia faba* L.): Toshio ASAO, Fumio IMAI, Isamu TSUJI, Misao TASHIRO, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 55, No. 3 (1991) 707-713.
- 11) The Amino Acid Sequence of a Bowman-Birk Type Proteinase Inhibitor from Faba Beans (*Vicia faba* L.): Toshio ASAO, Fumio IMAI, Isamu TSUJI, Misao TASHIRO, Kimikazu IWAMI, and Fumio IBUKI; Journal of Biochemistry, 110 (1991) 951-955.
- 12) Tripsin Hydrolysis of the Tyr (42)-Ser (43) Bond, the Chymotrypsin Reactive-site Peptide Bond, of Faba Bean Bowman-Birk Type Inhibitor: Toshio ASAO, Isamu TSUJI, Misao TASHIRO, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56, No. 3 (1992) 521-522.
- 13) The Complete Amino Acid Sequence of Rice Bran Trypsin Inhibitor: Misao TASHIRO, Kimikazu HASHINO, Masao KANAMORI, Masako SHIOZAKI, Fumio IBUKI and Zensuke MAKI; Journal of Biochemistry, 102, No. 2 (1987) 297-306.
- 14) 加熱時および発芽時におけるインゲンマメの α -アミラーゼインヒビター活性変化: 小垂

- 眞, 木本文喜, 吉川秀樹, 池内常郎; 日本栄養・食糧学会誌, 40, No. 3 (1985) 240-243.
- 15) Purification and Some Properties of an α -Amylase Inhibitor from Cranberry Bean (*Phaseolus vulgaris*): Makoto KOTARU, Koichi SAITO, Hideki YOSHIKAWA, Tsuneo IKEUCHI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 51, No. 2 (1987) 577-578.
- 16) An α -Amylase Inhibitor from Cranberry Bean (*Phaseolus vulgaris*): Its Specificity in Inhibition of Mammalian Pancreatic α -Amylase and Formation of a Complex with the Porcine Enzyme: Makoto KOTARU, Hideki YOSHIKAWA, Tsuneo IKEUCHI, Koichi SAITO, kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 33, No. 5 (1987) 359-367.
- 17) Activity Changes in Cranberry Bean (*Phaseolus vulgaris*) α -Amylase Inhibitor by Chemical Modification and Enzymatic Digestion: Makoto KOTARU, Hung-Yu YEH, Hideki YOSHIKAWA, Tsuneo IKEUCHI, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 35 (1989) 71-80.
- 18) Resistance of Cranberry Bean (*Phaseolus vulgaris*) α -Amylase Inhibitor to Intraluminal Digestion and Its Movement along Rat Gastrointestine: Further Investigation Using a Radioactive Probe and Specific Antiserum: Makoto KOTARU, Kimikazu IWAMI, Hung-Yu YEH and Fumio IBUKI; Food Chemistry, 42 (1991) 29-37.
- 19) Occurrence in Leguminous Seeds, Resistance to Protease Digestion and Antigenicity of an α -Amylase Inhibitor (Research Note): Makoto KOTARU, Kimikazu IWAMI, Hung-Yu YEH and Fumio IBUKI; Food Chemistry, 43 (1991) 47-50.
- 20) In Vivo Action of α -Amylase Inhibitor from Cranberry Bean (*Phaseolus vulgaris*) in Rat Small Intestine: Makoto KOTARU, Kimikazu IWAMI, Hung-Yu YEH and Fumio IBUKI; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 35 (1989) 579-588.
- 21) Prominent Antioxidant Effect of Wheat Gliadin on Linoleate Peroxidation in Powder Model System at High Water Activity: Kimikazu IWAMI, Masahiko HATTORI, and Fumio IBUKI; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35 (1987) 628-631.
- 22) Stability of Gliadin-Encapsulated Unsaturated Fatty Acids against Autoxidation: Kimikazu IWAMI, Masahiko HATTORI, Tomoko YASUMI and Fumio IBUKI; Journal of Agricultural and Food Chemistry, 36 (1988) 160-164.
- 23) マイクロカプセル化による食品タンパク質の酸化機能強化: 伊吹文男, 岩見公和; 杉山産業化学研究所年報 [昭和64年], (1989) 86-102.
- 24) Spray-Dried Gliadin Powders Inclusive of Linelic Acid (Microcapsules): Their Preservability, Digestibility and Application to Bread Making: Kimikazu IWAMI, Masahiko HATTORI, Shin NAKATANI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 51, No. 12 (1987) 3301-3307.
- 25) Antioxidant Effects of Wheat Gliadin and Hen's Egg White in Powder Model Systems: Protection against Oxidative Deterioration of Safflower Oil and Sardine Oil: Kuniko TAGUCHI, Kimikazu IWAMI, Makoto KAWABATA and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 52, No. 2 (1988) 539-545.
- 26) Oxidative Stability of Sardine Oil Embedded in Spray-dried Egg White Powder and its Use for n-3 Unsaturated Fatty Acid Fortification of Cookies: Kuniko TAGUCHI, Kimikazu IWAMI, Fumio IBUKI and Makoto KAWABATA; Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56 No. 4 (1992) 560-563.
- 27) Preservability and Utilization of Powdered α -Linolenic Acid with Egg White: Kuniko TAGUCHI, Kimikazu IWAMI, Fumio IBUKI and Makoto KAWABATA; Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 56 No. 4 (1992) 672-673.
- 28) 大豆たん白質を用いた多価不飽和脂肪酸マイクロカプセル化の試み: 伊吹文男, 中村真理, 岩見公和; 大豆たん白質栄養研究会会誌, 8,

- No. 1 (1987) 20-24.
- 29) 大豆たん白質抗酸化機能の改善とその利用：伊吹文男，島戸はるみ，岩見公和；大豆たん白質栄養研究会会誌，10，No. 1 (1989) 23-27.
- 30) 大豆たん白質を主素材とする不飽和脂質酸化安定剤の開発：伊吹文男，岩見公和；大豆たん白質栄養研究会会誌，11，No. 1 (1990) 17-22.
- 31) ペプシン処理分離大豆たん白質食のラット肝機能および胆汁酸濃度への影響：土井裕司，米林眞，伊吹文男，金森正雄；京都府立大学学術報告・農学，36 (1984) 26-35.
- 32) 酵素処理分離大豆たん白質のラット血清コレステロール濃度および肝・小腸機能への影響：土井裕司，岩見公和，伊吹文男，金森正雄；大豆たん白質栄養研究会会誌，6，No. 1 (1985) 58-62.
- 33) Involvement of Post-digestion 'Hydrophobic' Peptides in Plasma Cholesterol-Lowering Effect of Dietary Plant Proteins: Kimikazu IWAMI, Kiyoshi SAKAKIBARA and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological chemistry, 50 No. 5 (1986) 1217-1222.
- 34) Effect of Feeding Peptic Digest of Soy Protein Isolate on Rat Serum Cholesterol: Hiroshi DOI, kimikazu IWAMI, Fumio IBUKI and Masao KANAMORI; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 32 No. 4 (1986) 373-379.
- 35) 食品たん白質 (SPI, グルテン, オボアルブミン, カゼイン) 及びその消化産物の胆汁酸再吸収に及ぼす影響：伊吹文男，岩見公和；大豆たん白質栄養研究会会誌，7，No. 1 (1986) 68-75.
- 36) Na^+ -Dependent Transport System for Taurocholate in Rat Small Intestine: Its Localization in the Terminal Ileum and Variation by Fasting: Masaru KITAGAWA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological chemistry, 54 No. 3 (1990) 685-689.
- 37) Taurocholate Transport by Everted Ileal Sacs from Rats with Deffering Protein Nutrition: Masaru KITAGAWA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological chemistry, 55 No. 6 (1991) 1647-1648.
- 38) 胆汁酸の腸肝循環と食餌性阻害因子：伊吹文男，北川 優，岩見公和；大豆たん白質栄養研究会誌，9，No. 1 (1988) 37-43.
- 39) Variation of Ileal Taurocholate Transport Capacity in Rats Fed on High-Fat Diets and in Alloxan-Diabetic Rats: Kimikazu IWAMI, Masaru KITAGAWA and Fumio IBUKI; Nutrition research, 11 (1991) 743-752.
- 40) Functional Analysis and Nutritional Regulation of Bile Acid Transport System in Rat Intestine: Masaru KITAGAWA; Doctor Thesis (1991).
- 41) A Difference between Intestinal Taurocholate and L-Leucine Uptake Capacities in Their Postprandial Changes in Rat: Masaru KITAGAWA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 54 No. 5 (1990) 1327-1328.
- 42) Effect of Dietary Proteins and/or Their Digestive Products on Intestinal Taurocholate Absorption: Kimikazu IWAMI, Masaru KITAGAWA and Fumio IBUKI; Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 36, (Supplement II) (1990) S 141-S 146.
- 43) Postprandial Existence Ratio between Taurine- and Glycine-conjugated Bile Acids in Rat Ileal Lumen: Masaru KITAGAWA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 55 No. 6 (1991) 1649-1650.
- 44) Comparison of Intestinal Taurocholate Uptake in Rats Given Soy Protein or Casein-Based Diet: Kimikazu IWAMI, Masaru KITAGAWA, Tohru NAGASAKI and Fumio IBUKI; Nutrition Research, 10 (1990) 547-554.
- 45) Nutritive Effect of Alternate Dairy Ingestion of High- and Non-Protein Diets in Growing Rat: Kaoru SUGIYAMA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 55 No. 11 (1991) 2777-2783.
- 46) Segregated Intake of Protein-rich and free Diets in Two Meals a Day: Its Effect on Growth and Vital Function in Rats: Kaoru SUGIYAMA, kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; Agricultural and Biological Chemistry, 55 No. 12 (1991) 2979-2985.
- 47) Influence of Intermittent Protein Intake

- Every Few Days on Rat Growth and Metabolic Function: Kaoru SUGIYAMA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56 No. 3 (1992) 481-485.
- 48) Postprandial Changes in the Function of Digestive Organs in Rats Mealed Twice a Day with 40% Casein-based and Protein-free Diets: Kaoru SUGIYAMA, Kimikazu IWAMI and Fumio IBUKI; *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57 No. 2 (1993) 185-190.
- 49) Reevaluation of L-Methionine Sulfoxide Bioavailability and A Difference between Its Epimers in Normal Young Rats: Kimikazu IWAMI, Yutaka HIGASHIYAMA and Fumio IBUKI; *Nutrition Research*, 12 (1992) 1155-1166.
- 50) Two-dimensional Analysis of Voluntary Locomotor Activity in Rats; Compact Apparatus and Its Application from Nutritional Aspects: Kimikazu IWAMI, Kaoru SUGIYAMA, Yoshihiro YAMAMOTO, and Fumio IBUKI; *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57 No. 1 (1993) 73-78.
- 51) Some Rats Prefer a Non-Protein Diet to a Protein-rich Diet when Given Free Access to Them: Kimikazu IWAMI, Yoshihiro YAMAMOTO, Kaoru SUGIYAMA, and Fumio IBUKI; *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57 No. 1 (1993) 145-146.
- 52) ラット腸管の部分切除ならびに部分転移と術後の機能変化に対する大豆たん白質部分水解物(ペプチド)の投与効果: 杉山 薫, 岩見公和, 伊吹文男; 大豆たん白質栄養研究会会誌, 12, No.1 (1991) 67-73.
- 53) 小腸部分切除ラットにおける血清遊離アミノ酸の動態と大豆ペプチド(ハイニユートPM)食に対する分岐鎖アミノ酸の補足効果: 杉山 薫, 岡田敏克, 岩見公和, 伊吹文男; 大豆たん白質研究会会誌, 13 (1992) 27-33.