

## 学位論文題名

## 食餌タンパク質によるラット消化管機能調節作用

## 学位論文内容の要旨

食物には、消化管機能を調節し自らの消化吸收を促すための情報が内包されている。本研究は食餌成分のなかのタンパク質をとりあげ、その種類による消化管への影響の違い、及びタンパク質による膵外分泌を中心とした消化管機能の調節機構を研究したものである。

本論文では、代表的な食餌タンパク質であるカゼインと分離大豆タンパク質（SPI）を同時に摂取したラットにおいて、難消化性ペプチドであるオリゴメチオニン（OM）の消化吸收が異なるという現象を、より詳細に解析することを出発点として、両タンパク質の持つ消化吸收機構への影響を無麻酔無拘束下で調べた。これらの実験はラットの生理的条件を重視し、独自に考察した手技を用いて行なっている。また、OMをプローブとして、消化吸收能を比較する実験では、難消化性の食餌タンパク質の消化吸收に影響を与える要因の検索にも重要な意義をもつものである。

食餌タンパク質の消化吸收機能への影響として最も大きく、かつ重要なものは膵外分泌亢進能である。本論文では、この点に関しても独自の仮説のもと、新しい生理実験手技を用いて追究している。これらの概要を示すと以下ようになる。

**1) 生理的条件下での低カゼイン食と低 SPI 食餌取時の OM 吸収動態**

門脈と上大静脈に採血用カテーテルを長期的に留置したラットを用いて、OMを添加した低カゼイン食と低 SPI 食を1日絶食後再給餌し、その吸収動態をOM由来のメチオニンの門脈-静脈濃度差を指標として追跡した。その結果、投与初期において明らかにカゼイン食に添加したOM吸収はSPI食に添加したものより速く、<sup>35</sup>SラベルしたOMの消化管よりの消失から求めた、吸収絶対量や吸収効率もカゼイン群でより高かった。またOMの消化吸收速度はタンパク質に比べて非常に遅く、OMが難消化性であることが証明された。これらの結果は、カゼインがSPIに比べて、再給餌初期に消化吸收機能をより強く亢進させていることを示唆している。

**2) カゼインおよび SPI の各種消化管機能への影響**

OMをプローブとした実験で、カゼインとSPIが消化管機能に対し異なった影響を与えるこ

とが示唆されたため、1)と同じ、無麻酔無拘束下での絶食-再給餌という条件を用いて、各種消化吸収機能へのこれら食餌タンパク質の作用を検索した。

食餌中のタンパク質レベルが8%のとき、カゼインはSPIに比べ膵外分泌刺激作用が若干強い傾向が見られたが、16%レベルでは両タンパク質の刺激能に差は見られなくなった。膵外分泌亢進はタンパクレベルに応じて強くなった。

次に、消化管内で実際に発現している膵プロテアーゼ活性のin vivoでの測定を試みた。すなわち、キモトリプシンに特異的な人工基質であるbenzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (BT-PABA)を食餌に添加し、分解産物であるPABAの門脈内への吸収を指標として測定したものである。ここでは、8%SPI食ラットの活性が、摂取1時間後に8%カゼイン食ラットより有意に高いという結果となり、管腔内プロテアーゼ活性は、単純にその分泌量のみで規定されないことが明らかになった。

タンパク質マーカーであるグアニジルカゼインを用いて測定した胃排出速度や、インジゴカーミンやポリエチレングリコールなどの非吸収性マーカーを用いて測定した小腸通過速度への両タンパク質の影響を摂食後経時的に検討した。その結果、SPIが消化管内容物の小腸通過速度を亢進させるという、従来知られていなかった食餌タンパク質の作用が明らかになった。

### 3) 食餌タンパク質による膵外分泌亢進機構は1つか？

2)のBT-PABAを用いた研究より、摂取初期の管腔内の膵プロテアーゼ活性は非常に高いことが示された。このことは、食餌タンパク摂取による膵外分泌亢進機構として従来提唱されてきたネガティブフィードバックによる調節機構以外にも、タンパク質は別の機構で膵外分泌を亢進させていることを示唆している。

ネガティブフィードバック調節機構は管腔内プロテアーゼ活性を介した調節機構で、膵外分泌亢進には食餌タンパク質のプロテアーゼ占有能が重要であるとされている。そこで、食餌タンパク質として、比較的プロテアーゼ占有能が高いと思われる卵白を用い、これを低分子ペプチド化することによりプロテアーゼ占有能を消失させたものと膵外分泌能を比較した。さらに、ラットの胆膵液をネガティブフィードバック調節機構の作動部位である小腸上部から手術により回腸に放出させるようにしたラット(バイパスラット)を用いて、食餌タンパク質に対する膵外分泌反応を検討した。その結果、ネガティブフィードバック調節機構は確かに生理的条件下でも作動していることが示されるとともに、これとは別の、食餌タンパク質ないし、その部分分解物が直接小腸に作用して膵外分泌を亢進させる機構の存在が示唆された。すなわち、先のバイパスラットを用いて、カゼインのペプシン分解物を直接小腸上部に注入した結果、有意な膵外分泌亢進が見

られたことより、食餌タンパク質は、胆膵液を介さない、ネガティブフィードバック調節機構以外の機構でも膵外分泌を亢進していることを証明した。なお胆膵液除去によっても膵外分泌は著明に亢進し、他の刺激には反応しなくなることが報告されている。本実験は、この無反応状態より脱した条件を用いたことがポイントとなっている。

#### 4) カゼイン食に添加した OM の吸収速度が SPI 食餌より速いのはなぜか？

2) で行なった実験では、カゼイン食では SPI より明らかに OM 消化速度が速かった。しかし、カゼイン食摂取時により強く亢進される消化管機能は見いだせなかった。そこで、これまで用いてきた絶食-再給餌系でなく通常の摂食条件下で、合成トリプシンインヒビターにより膵外分泌能を特異的に亢進させたラットにおいて、OM 吸収に対する膵外分泌能の関与を成長を指標にして検討した。その結果、若干の成長改善が見られたことより、膵外分泌が一部関与していることが示唆された。さらに、OM の胃内消化や、カゼインと SPI による管腔内 OM 消化への拮抗作用を *in vitro* で検討した結果、これらの要因も食餌タンパク質による OM 消化の差の一因となっていることを明らかにした。

以上まとめると、各種消化管機能への食餌タンパク質の影響をラットを手術することで、無麻酔無拘束という生理的条件下での実験を可能にする実験系を確立し、検討した。OM をプローブとした実験からは、難消化性のペプチドは共存する食餌タンパク質により、胃内、小腸内消化に影響を受けることが明らかになった。また、食餌タンパク質による膵外分泌機構として従来知られていない、タンパク質の小腸上部への直接作用が存在することを明らかにした。また、SPI には、小腸内容物通過速度を亢進させる作用があることを見いだした。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	桐山修八
副査	教授	水谷純也
副査	教授	千葉誠哉
副査	教授	仁木良哉

主論文は和文151頁で、表15、図57、参考文献116を含み、その構成は序章を含めて全6章からなり、食餌タンパク質のもつ各種消化管機能の調節作用に関する研究をまとめたものである。別

に参考論文25編が添えられている。主論文の内容は、難消化性ペプチドであるオリゴメチオニン (OM) の消化吸收速度が、同時に摂取するタンパク質によって異なる原因を種々の角度から検討すると同時に、食餌タンパク質による膵外分泌亢進の機構について追究したものである。方法には、独自に開発した、施術ラットによる生理的条件下での実験系を用いている。

#### 1) 生理的条件下での低カゼイン食と低分離大豆タンパク質 (SPI) 食摂取時の OM 吸収動態

門脈と上大静脈に採血用カテーテルを長期的に留置したラットを用いて、OM を添加した低カゼイン食と低 SPI 食を 1 日絶食後再給餌し、無麻酔無拘束下で OM の吸収動態を OM 由来のメチオニンの門脈-静脈濃度差を指標として追跡した。その結果、投与初期において明らかにカゼイン食に添加した OM の吸収は SPI 食に添加したものより速く、<sup>35</sup>S ラベルした OM の消化管よりの消失から求めた、吸収絶対量や吸収効率もカゼイン群でより高かった。また OM の消化吸收速度はタンパク質に比べて非常に遅く、OM が難消化性であることを明らかにしている。これらの結果は、カゼインが SPI に比べて、再給餌初期に消化吸收機能をより強く亢進させていることを示唆している。

#### 2) カゼインおよび SPI の各種消化管機能への影響

OM をプローブとした実験で、カゼインと SPI が消化管機能に対し異なった影響を与えることが示唆されたため、1) と同じ、無麻酔無拘束下での絶食-再給餌という条件を用いて、各種消化吸收機能へのこれら食餌タンパク質の作用を検索し、以下のような結論を得た。

食餌中のタンパク質レベルが 8 % のとき、カゼインは SPI に比べ膵外分泌刺激作用が若干強い傾向が見られたが、16% レベルでは両タンパク質の刺激能に差は見られなくなった。膵外分泌亢進はタンパクレベルに応じて強くなった。さらに絶食-再給餌系でなく通常の摂食条件下で、合成トリプシンインヒビターにより膵外分泌能を特異的に亢進させたラットにおいて、OM 吸収に対する膵外分泌能の関与を成長を指標にして検討した。その結果、若干の成長改善が見られたことより、膵外分泌が一部関与していることが示唆された。

Benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (BT-PABA) を両飼料に添加して、遊離した PABA の動態から in vivo 管腔内キモトリプシン活性を測定したところ両飼料群ともこの活性は非常に高かった。

また、インジゴカーミンやポリエチレングリコールなどの非吸収性マーカーを用いて、胃排出速度や小腸通過速度への両タンパク質の影響を摂食後経時的に検討した結果、SPI が消化管内容物の小腸通過速度を亢進するという、従来知られていなかった食餌タンパク質の作用を明らかにした。さらに、OM 胃内消化や、カゼインと SPI による管腔内 OM 消化への拮抗作用を in

vitro で検討した結果、これらの諸要因は食餌タンパク質による OM 消化速度の差と関連すると推定した。

### 3) 食餌タンパク質による膵外分泌亢進機構の存在

2) の BT-PABA を用いた研究より、管腔内の膵プロテアーゼ活性は非常に高かった。このことは、食餌タンパク摂取による膵外分泌亢進機構として従来提唱されてきたネガティブフィードバックによる調節機構以外にも、食餌タンパク質は別の機構で膵外分泌を亢進させていることを示唆している。そこで、ネガティブフィードバック調節機構に必須である胆膵液をその作動部位である小腸上部からバイパスさせ回腸に放出するよう手術したラット(バイパスラット)を用いて、食餌タンパク質に対する膵外分泌反応を検討した。その結果、ネガティブフィードバック調節機構は確かに生理的条件下でも作動していることが示されるとともに、これとは別の、食餌タンパク質なし、その部分水解物が直接小腸に作用して膵外分泌を亢進させる機構の存在が示唆された。すなわち、先のバイパスラットを用いて、カゼインのペプシン分解物を直接小腸上部に注入した結果、有意な膵外分泌亢進が見られたことより、食餌タンパク質は、胆膵液を介さないネガティブフィードバック調節以外の機構でも膵外分泌を亢進していることを明らかにした。

以上のように、本研究は新しい実験系を確立、導入することにより、食餌タンパク質のもつ従来知られていなかった消化管の生理的機能や、作用機序を提示したものである。よって、審査員一同は、別に行なった学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 原 博 は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。