

蛋白質源としてグルテンを与えて飼育した ラットの生育と膵酵素活性に及ぼす米糠 トリプシンインヒビターの影響

田代 操・牧 善 輔

Effects of Rice Bran Trypsin Inhibitor on Growth and Pancreatic Enzyme Activities of Rats Fed Gluten as a Protein Source

MISAO TASHIRO and ZENSUKE MAKI

Male weanling rats were fed 20% gluten diets containing rice bran trypsin inhibitor (RBTI) at levels of 0, 1.0, and 4.0 g/kg. The body-weight gain, food intake, and protein efficiency ratio (PER) were determined 28 days after the start of the trial and then rats were killed for measuring pancreatic trypsin and chymotrypsin activities. During the trial apparent nitrogen digestibility and nitrogen balance were also determined. The results obtained were as follows: 1. There was no significant difference in body-weight gain, food intake, and PER between rats fed the RBTI-free diet and the diets containing RBTI. 2. Apparent nitrogen digestibilities of both basal and RBTI diets were similar at approximately 90%. 3. Pancreatic trypsin and chymotrypsin levels were nearly the same in all groups but pancreatic hypertrophy was observed in rats receiving the diet containing RBTI at a level of 4.0 g/kg.

These results suggest that RBTI does not show nutritionally serious effects on rats when they were fed gluten as a protein source.

(Received August 14, 1987)

I 緒 言

植物界には、動物小腸内の蛋白質消化に主要な役割を演ずるプロテアーゼ、特にトリプシンを強く阻害する蛋白質性物質の広く存在することが知られている¹⁾。これらはトリプシンインヒビター、または広くプロテアーゼインヒビターと呼ばれているが、食品中の一成分として動物に摂取された場合、何らかの悪影響を及ぼすことが想定されるため、食品中の有害成分あるい

は抗栄養因子の一群としても分類され²⁾、栄養学上の興味ある題材ともなっている。

植物起源トリプシンインヒビターの動物に及ぼす影響については主に大豆に存在するトリプシンインヒビター (STI) で広く研究されている。1946年 Kunitz は大豆より STI を単離し³⁾、以後本物質はインヒビターの代表的モデルとして動物実験に使用された。その結果、STI を摂取したラットは成長抑制や膵臓肥大を生じ、これは小腸内への膵液過剰分泌に対応する膵分

泌蛋白質の過剰合成に起因しているものと考えられた⁴⁻⁶⁾。しかしながら、未だこのメカニズムに関しては検討の余地があり、また STI 以外のインヒビターの動物に与える影響についてもほとんど知られていないのが現状である。

ところで、未利用蛋白質資源として注目を集めている米糠には多量のトリプシンインヒビターが存在している⁷⁾。このインヒビター (RBTI) に関しては、すでに我々が単離精製し⁸⁾、最近一次構造も解明している⁹⁾。RBTI は分子量15,000、133 残基より成る塩基性単純蛋白質であるが、米糠蛋白質の有効的利用のためにも本インヒビターの動物に与える影響を明らかにすることが必要である。実際、我々は米糠よりインヒビター活性を有する蛋白濃縮物を調製しラットに与えたところ、若干の生育抑制の生じることを見出し¹⁰⁾、また、RBTI の安定性を調べた結果、このインヒビターは動物に摂取された場合も充分活性を保持したまま小腸内へ到達できることが示唆された¹¹⁾。

本論文では、米糠より RBTI を高度に精製し、それをグルテンを蛋白質源とする飼料に添加し、幼ラットに供し、主として RBTI のラット成長と膵酵素活性に及ぼす影響を検討した結果を報告する。

II 実験材料及び方法

1) 米糠トリプシンインヒビターの調製

米糠トリプシンインヒビター (RBTI) は既報⁸⁾に従い調製したが、最終精製段階でのクロマトグラフィーを2ヶ所省略した。すなわち、アセトンで脱脂した米糠 (日本晴) を5倍量の1%食塩水で2回抽出し、抽出液を熱処理 (80°C, 10分間) した後、濾過した。つづいて濾液を硫酸で90%飽和し、生じた沈殿を水さらに0.05 M リン酸緩衝液 (pH 5.7) に対して透析し、透析液の遠心分離 (10,000 g, 15分間) 後、上清を上述のリン酸緩衝液で平衡化した CM-Sephadex C-25 のカラムに添加しイオン交換クロマトグラフィーをおこなった。食塩グラジエント溶出 (0~0.5 M) で得られたインヒビター画分を集め、脱塩、凍結乾燥し、さらにエーテル・アルコール混液で洗浄、乾燥粉末化して試料とした。本法により米糠 20 kg より約 11 g の RBTI を得た。また、本品 1 g はウシ・トリプシン 1.3 g の完全阻害に相当するインヒビター活性を有していた。

2) 動物実験

生後4週、平均体重約 50 g のウイスター系、雄ラットを5日間市販の固型飼料で予備飼育した後、1日

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredients (%)	Basal	I	II
Gluten ^a	20.0	20.0	20.0
RBTI ^b	0	0.1	0.4
α -Corn starch	10.0	10.0	10.0
β -Corn starch	47.0	46.9	46.6
Sucrose	5.0	5.0	5.0
Cellulose powder	4.0	4.0	4.0
Soybean oil	6.0	6.0	6.0
Mineral mixture	6.0	6.0	6.0
Vitamin mixture	2.0	2.0	2.0

^a Contains 81% protein. ^b Contains 86% protein.

間絶食させ、つづいて Table 1 に示す飼料を与えて28日間の成長実験をおこなった。各飼料区については8頭のラットを無作為に割り当てたが、それぞれの区のラットの平均初体重は、基本飼料区 (Basal) 69.5 g、0.1% RBTI 添加飼料区 (I) 68.6 g、0.4% RBTI 添加飼料区 (II) 67.7 g であった。なお、飼料に用いたトウモロコシデンプン、大豆油、ミネラルおよびビタミン混合物 (オリエンタル配合) はオリエンタル酵母工業 KK より、グルテン、濾紙粉末は半井化学薬品 KK より購入した。

上記飼料を1日1回、一定時間 (10:00~11:00) に水とともに更新して自由摂取させ、1日の飼料摂取量および体重増加量も同時に測定した。ラットは1頭ずつ代謝ケージに入れ、温度22~25°C、湿度50~70%、12時間ごとに明暗 (明8:00~20:00) に保たれた動物実験室で飼育した。飼育期間中3回にわたり2日ずつ (3~4日目、14~15日目、24~25日目) 各区のラットの糞と尿を採取し窒素量を分析した。飼育終了後、ラットを断首し、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓を摘出し重量を測定した。膵臓は重量測定後ドライアイス・アセトン中で急速凍結させ、酵素活性測定まで -20°C で保存した。

3) 膵酵素の活性化

各ラットの膵臓を2 ml の0.02 M 塩化カルシウムを含む1 mM 塩酸溶液と共にポッター型テフロンホモジナイザーでホモジナイズした。遠心分離 (10,000 g, 15分間) 後、上清を集め、沈殿に同様の操作を加え、2回の操作で得た上清を合わせ、さらに上述の塩酸溶液で10 ml に定容した。トリプシノーゲン及びキモトリプシノーゲンの活性化は膵臓抽出液5 ml に5 ml のエンテロキナーゼ溶液 (ブタ小腸粘膜よりの部分精製品, Sigma 社, 10 μ g/ml 0.2 M 塩化カル

シウムを含む 0.05 M トリス・塩酸緩衝液, pH 7.5) を加え, 5°C で18時間 放置することによりおこなった。

4) 分析方法

窒素の定量は A. O. A. C. のマイクロケルダール法¹²⁾ によっておこない, 蛋白質は窒素×6.25により計算した。

トリプシン及びキモトリプシン活性は, 基質としてそれぞれ 4 mM TAME (Tosyl-L-arginine methyl-ester HCl) 及び 10 mM ATEE (Acetyl-L-tyrosine ethylester) を用い, pH-スタット装置 (RTS 622 型, Radiometer 社) で測定した。酵素活性の1単位 (Unit) は1分間に 1 μ mole の基質を分解する酵素量として定義した。

トリプシンインヒビター活性はインヒビターが存在する時のウシ・トリプシン活性の減少率から計算した。

5) 統計処理

データは平均値±標準誤差 (mean ± SEM) で表示し, 平均値間の有意差は一元配置の分散分析と Duncan の検定法¹³⁾で分析した。

III 実験結果

1) 体重増加量, 飼料摂取量, 及び PER

20% グルテン 飼料 (Basal), 及びそれにそれぞれ 0.1%と0.4%の米糠トリプシンインヒビター (RBTI) を添加した 飼料 (I 及び II) を与えて28日間 飼育したラットの 体重増加量, 飼料摂取量, 及び PER を Table 2 に示す。3区ともそれぞれの項目に関してほぼ同じ平均値を示し, 統計上の有意差も認められなかった。このようにグルテンを蛋白質源としてラットに与えた場合, RBTI はラットの成長と飼料摂取量には何の影響も及ぼさなかった。

2) 見かけの窒素消化率, 窒素平衡

Table 3 に Basal 区, I 区, II 区の3~4日目, 14~15日目, 及び24~25日目での見かけの窒素消化率と窒素平衡を示す。すべての期間において3区とも消化率はほぼ90%の値を示し, 有意差は認められなかった。また, 窒素平衡に関しても, 若干 Basal 区に比較し II 区で値が低い傾向が認められるものの統計的には有意差は無く, ほぼ同様の値を示した。これらの結果から RBTI はラット腸内での蛋白質消化を妨害せず, 体内に蓄積される窒素量にもほとんど影響を与えないことが示された。

3) 臓器重量

28日間の飼育後, 各区のラットを解剖して得た膵臓,

Table 2. Body weight gain, food intake, and protein efficiency ratio (PER) of rats fed experimental diets for 28 days.

Group	Body weight gain (g)	Food intake (g)	PER
Basal	26.5 ± 1.7 ¹	215 ± 6.6	0.759 ± 0.034
I	28.4 ± 3.8	214 ± 13.3	0.791 ± 0.063
II	25.8 ± 1.8	207 ± 8.8	0.749 ± 0.036

¹ Values represent mean ± SEM of 8 rats per group.

Table 3. Apparent nitrogen digestibility and nitrogen balance for rats fed experimental diets.

Period	Group	Apparent nitrogen digestibility (%)	Nitrogen balance (mg N/day)
3-4day	Basal	90.1 ± 1.1 ¹	50.4 ± 6.3
	I	90.8 ± 1.0	50.1 ± 10.2
	II	89.7 ± 1.2	38.7 ± 6.3
14-15day	Basal	91.1 ± 0.6	35.3 ± 4.5
	I	89.5 ± 1.1	30.1 ± 4.8
	II	91.7 ± 0.6	32.4 ± 4.2
24-25day	Basal	91.2 ± 0.7	48.8 ± 6.0
	I	92.4 ± 0.6	41.9 ± 4.6
	II	91.1 ± 0.5	35.9 ± 3.4

¹ Values represent mean ± SEM of 8 rats per group.

膵臓, 肝臓, 腎臓のラット体重 100 g 当りの湿重量を Table 4 に示す。結果に示されるように膵臓重量において Basal 区, I 区, II 区の順に重量が増加していた。特に, Basal 区と II 区の間には $p < 0.05$ で有意差が認められた。したがって RBTI を摂取したラットは膵臓肥大の傾向を有し, その程度はインヒビター摂取量に対応すると言える。また, RBTI を摂取したラットはそうでないものと生育に差が無いことから, たとえインヒビター摂取により膵臓肥大が生じてもこれが直接ラットの成長抑制と結びつくものではないことを示している。一方, 膵臓, 肝臓, 腎臓に関しては各区に差は認められず, RBTI の摂取はこれらの臓器に対しては何の影響も与えなかったと考えられる。

4) 膵臓トリプシン, キモトリプシン活性

Table 5 に各区のラットより得た膵臓のトリプシン, キモトリプシン活性を示す。前述したようにラット体重 100 g 当りの膵臓湿重量においては, Basal 区, I 区, II 区の順に重量が増加していたが, これと同様

Table 4. Organ weights of rats fed experimental diets for 28 days.

Group	Pancreas	Spleen	Liver	Kidney
	g/100g body weight			
Basal	0.45±0.03 ^{a,1,2}	0.24±0.02	3.94±0.14	1.00±0.04
I	0.49±0.03 ^{a,b}	0.22±0.01	3.89±0.11	1.00±0.03
II	0.56±0.03 ^b	0.24±0.02	4.02±0.12	1.00±0.03

¹ Values represent mean±SEM of 8 rats per group.

² Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

Table 5. Enzyme activities of the pancreas of rats fed experimental diets for 28 days.

Group	Trypsin activity		Chymotrypsin activity	
	units/pancreas weight	units/body weight	units/pancreas weight	units/body weight
Basal	600±64 ¹	2.72±0.37	1400±163	6.30±0.79
I	533±59	2.52±0.28	1360±119	6.46±0.55
II	603±97	3.23±0.36	1380±172	7.51±0.78

¹ Values represent mean±SEM of 8 rats per group.

の傾向がラット体重当りの酵素活性にも認められた。しかしながらデータのばらつきのために統計上の有意差は認められなかった。一方、膵臓湿重量当りの酵素活性は、トリプシン、キモトリプシン両者とも、各区において同様の値を示し有意差も認められなかった。このことは、RBTI の摂取にかかわらず単位膵臓重量当りのチモーゲン合成量は変わらないということを示唆する。しかしながら本実験の場合ラットは自由摂取法で給餌されており、また解剖の前に特に絶食の期間も設定しなかった。このような場合、膵臓におけるチモーゲンの合成が明確なリズムを形成していないことが考えられ、またチモーゲンの蓄積も一定していない可能性が高いと思われる。したがって、RBTI 摂取による膵酵素合成への影響に関しては、本実験結果のみからは簡単に言及できず、今後さらに種々条件設定を変え検討することが必要と思われる。

IV 考 察

植物界に広く存在する蛋白質性トリプシンインヒビターは、それ自身が蛋白質でありながら蛋白質分解酵素であるトリプシンと強固な複合体を形成し、酵素を不活性化させるという性質を有する。したがって、このトリプシンインヒビターが動物に摂取された場合も *in vitro* と同様に小腸内でトリプシンと結合し酵素を不活性化させることが考えられる。そして結果として

動物に種々の影響を与えるであろう。しかしながら、この推定が成立するためには少なくとも以下の前提が必要である。すなわち、インヒビターを摂取した動物のトリプシンが当該インヒビターにより阻害されるタイプの酵素であること。つまりあるトリプシンインヒビターがウシのトリプシンを阻害できるとしてもラットのトリプシンを阻害しなければ、このインヒビターはラットにとって栄養上問題とはなり得ない。次に、インヒビターは小腸内で活性な状態で存在している必要がある。すなわち、少なくとも胃内における酸性条件下やペプシン消化に対して安定でなければならない。以上が最小限の前提であるが、実際に動物に悪影響を及ぼすか否かは、さらに摂取されたインヒビターの量や共存する他の物質、特に蛋白質の量と質の違いにもよるであろう。米糠トリプシンインヒビター、RBTI は我々の研究¹¹⁾により、ウシ、ブタ、ラット、ヒトのトリプシンを阻害すること、また胃内条件下でも充分安定であることが確かめられており、前記の最小限の前提をクリアーしている。そこで本研究では、飼料中における RBTI の含量を変え、蛋白質源としてはグルテンを用いてラットへの影響を調べてみた。しかしながら実験結果で示されたように、RBTI を摂取したラットは、その成長において摂取しないものと差異が無く、見かけの窒素消化率や膵臓酵素活性においても変りがなかった。ただ膵臓重量においてのみ RBTI

摂取ラットに増大の傾向が認められた。このことは、今回の実験条件下では、RBTI はラットに対し栄養的に重大な悪影響を及ぼすものではないということを示している。しかし、RBTI 摂取ラットに膵臓肥大が生じており、その傾向は摂取量と対応することから、RBTI はラットに対し何らかの影響を与えてはいるものと考えられる。

我々は先の研究¹⁰⁾で、インヒビター活性を有する米糠蛋白濃縮物を与えたラットに膵臓肥大の傾向が生じ、その成長も熱処理してインヒビター活性を失活させた米糠蛋白濃縮物を与えたラットのそれよりも劣ることを報告している。この場合、飼料中のトリプシンインヒビター活性は今回の実験で用いた0.1% RBTI 添加飼料のそれに相当するものであった。もちろん米糠蛋白濃縮物中には他の未知の抗栄養因子の存在も考えられ、今回の結果と一概には比較できないが、今回0.4% RBTI 添加飼料区においても成長抑制が見られなかったのは一つには蛋白質源としてグルテンを用いたためではなかったのかと思われる。すなわち、質的にはグルテンは熱処理した米糠蛋白濃縮物より劣り(20%グルテン飼料で幼ラットの2週間の体重増加量は約14g、一方、10%蛋白質レベルの熱処理米糠蛋白濃縮物飼料で約29g)、この蛋白質の栄養価の低さがRBTI によるラット成長への影響を目立たないものにしたと考えられる。

ラットに対するトリプシンインヒビターの悪効果に関しては大豆トリプシンインヒビター(STI)で研究されており、腸内におけるインヒビターの存在が蛋白質消化阻害を引き起こすのではなく、いわゆる膵臓酵素分泌のフィードバック制御を解除し¹⁴⁾、結果として膵酵素過剰分泌、膵酵素過剰合成、さらには内的窒素損失をもたらす成長抑制を引き起こすと主張されている⁵⁾⁶⁾。この推論は動物実験における飼料の蛋白質源として大豆蛋白質、あるいはカゼインを用いて得られた結果から引き出されている。両蛋白質とも、ラットの成長にとって含硫アミノ酸が制限アミノ酸となっており、膵酵素過剰合成はこの含硫アミノ酸の要求度をさらに増大させているものと考えられる。実際、これらの飼料にメチオニンを添加した場合は、インヒビターの存在により膵臓肥大が生じても成長抑制は生じないことが観察されている⁶⁾。一方、グルテンの場合は制限アミノ酸はリジンであり、たとえインヒビター摂取により膵酵素過剰合成が生じたとしても著しいリジンの要求性増大が生じなければ成長抑制は起こらないであろう。我々が今回得た実験結果はこのような観点

からも説明できるかもしれない。しかしながら、膵酵素前駆体であるトリプシノーゲンやキモトリプシノーゲンのアミノ酸組成は含硫アミノ酸と同様リジンの含量も高く、上記推論は無理があるかもしれない。ただ腸内へ外分泌された膵蛋白質の再吸収においてメチオニン等の含硫アミノ酸が再利用され難いのに対して、リジンは再利用され易い可能性は残っている。今後RBTI の栄養学的意義を明らかにするには飼料中の蛋白質源を変えるなどの試みも必要であろう。また、動物腸内でRBTI は実際どの様な形で存在しているのだろうか。本実験で示されたように、見かけの窒素消化率はRBTI の摂取、未摂取に関係なく一定であるが、このことはラット腸内においてRBTI はトリプシンと結合してはいないということを示すものではない。膵液分泌機構とともに、RBTI の消化管内における動態を知ることは消化吸収の解明の面からも興味あることである。

V 要 約

米糠より高純度のトリプシンインヒビター(RBTI)を調製し、これを20%グルテン基本飼料にそれぞれ0.1%、0.4%となるよう添加し、合計3種の飼料を用意した。これらの飼料を幼ラットに与え、28日間の成長実験により体重増加量、飼料摂取量、PERを測定した。また飼育期間中に見かけの窒素消化率と窒素平衡を測定するとともに、飼育終了後ラットの膵臓を摘出し酵素活性を調べた。その結果、RBTI の摂取、未摂取に関係なくラットの体重増加量、飼料摂取量、PERは同じ値を示し、また見かけの窒素消化率や窒素平衡にも変化は認められず、さらに膵酵素活性にも著しい違いは見られなかった。しかしながら、RBTI を摂取したラットには膵臓肥大の傾向が現れ、その程度は摂取量に対応していた。これらの結果から、グルテンを蛋白質源として与えられたラットにとって、RBTI の摂取は栄養的には重大な問題とはならないと示された。

(1987年8月14日受理)

引用文献

- 1) S. Boisen: *Acta Agric. Scand.*, **33**, 369 (1983).
- 2) I. E. Liener and M. L. Kakade: *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs* (ed. by I. E. Liener), p. 7 (1969), Academic Press, New York.
- 3) M. Kunitz: *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149 (1946).
- 4) E. Kwong and R. H. Barnes: *J. Nutr.*, **81**, 392

- (1963).
- 5) R. H. Barnes and E. Kwong: *J. Nutr.*, **86**, 245 (1965).
- 6) H. Khayambashi and R. L. Lyman: *J. Nutr.*, **89**, 455 (1966).
- 7) M. Tashiro and Z. Maki: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1119 (1978).
- 8) M. Tashiro and Z. Maki: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **25**, 255 (1979).
- 9) M. Tashiro, K. Hashino, M. Shiozaki, F. Ibuki, and Z. Maki: *J. Biochem.*, **102**, 297 (1987).
- 10) Z. Maki and M. Tashiro: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 293 (1983).
- 11) M. Tashiro and Z. Maki: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 591 (1986).
- 12) W. Horwitz: *Official Methods of Analysis of A. O. A. C.*, 11th ed., p. 858 (1970), A.O. A. C., Washington.
- 13) 石居 進: BASIC による統計処理, p. 133(1983), 培風館, 東京.
- 14) G. M. Green and R. L. Lyman: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 6 (1972).