

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20700610  
 研究課題名 (和文) 小腸傷害ラットにおけるペプチド栄養の栄養改善効果を反映する指標の網羅的探索  
 研究課題名 (英文) Nutritional improvement and change of plasma biological markers by dietary oligopeptides in rats with intestinal injury by 5-fluorouracil  
 研究代表者  
 白神 俊幸 (SHIRAGA TOSHIYUKI)  
 ノートルダム清心女子大学・人間生活学部・准教授  
 研究者番号： 70363596

研究成果の概要 (和文)： 5-フルオロウラシル投与により実験的に小腸を傷害したラットにおいて、小腸オリゴペプチド吸収は比較的維持されることが知られている。これまでに、本傷害ラットに分離大豆たん白質、特に大豆オリゴペプチドを含有する食餌を与えると、血漿アルブミン値やアルブミン/グロブリン比が改善されることを明らかにした。本研究では、この栄養改善効果を反映するサイトカイン等の血漿指標を調べた。その結果、種々の指標が変動したが、カゼイン食を摂取させた傷害ラットにおいて上昇した炎症性インターロイキン-6 および抗炎症性インターロイキン-10 が大豆オリゴペプチド食摂取群で正常レベルに低下する傾向がみられた。以上より、ペプチド食摂取による腸管傷害の抑制とペプチドによる窒素源の効率的補給により、血漿アルブミン値等の上昇に反映される栄養状態の改善がみられたと考えられた。

研究成果の概要 (英文)： It is known that small intestinal oligopeptide absorption is maintained in rats with intestinal injury by 5-fluorouracil. Recent study showed that plasma albumin and albumin/globulin ratio were improved in intestinal injured rats fed diets containing 14% soy protein isolates and especially oligopeptides. The aim of this study was to investigate plasma biological markers associated with a nutritional improvement in these rats. As a result, several plasma markers such as cytokines were changed among intestinal injured rats fed test diets. The interleukin-6 and -10 tended to decrease in rats fed soy oligopeptide diet compared with those fed casein diet. It is, therefore, suggested suppression of an intestinal injury by oligopeptide diet and maintenance of an intestinal peptide absorption caused an improvement of nutritional status in injured rats.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 3,100,000 | 930,000   | 4,030,000 |
| 2009 年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 生活科学・食生活学

キーワード： 食と栄養、ペプチド栄養

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、抗がん剤 5-フルオロウラシル (5-FU) 投与により実験的に小腸粘膜を傷害したラットにおいて、小腸のペプチド輸送能および H<sup>+</sup>依存性ペプチド輸送担体 PEPT1 の発現が維持され、一方遊離アミノ酸や糖の吸収やそれらの輸送担体の発現は低下することを明らかにしており、栄養障害を改善するための効果的な栄養補給法や食事療法を考えるうえで重要な知見が得られている。また、小腸傷害ラットと正常ラットにミルクカゼイン含有食を与えて血漿生化学指標を比較すると、小腸傷害ラットでは栄養障害に陥っていることが観察された。これらのことから、消化吸收能の低下による栄養障害を改善するにはペプチドを主体とした栄養補給が有効であると考えられる。さらに、食品たん白質由来のペプチドの中で、特に大豆由来のペプチドの機能性については、糖質や脂質の代謝における改善効果に始まり、多岐にわたる生理効果のエビデンスが蓄積されてきている。そこで、低栄養改善に及ぼす大豆ペプチド摂取の効果を検討するため、小腸傷害ラットにたん白質源としてミルクカゼイン、分離大豆たん白質、大豆オリゴペプチドあるいは遊離アミノ酸を 14%含有する食餌を 1 週間摂取させたところ、分離大豆たん白質食、特に大豆オリゴペプチド食摂取群において、ミルクカゼイン食や遊離アミノ酸食摂取群に比べ、たん白質および脂質代謝を反映する各種血漿指標に改善効果が現れることが明らかとなった。

## 2. 研究の目的

小腸傷害ラットにおいて、栄養障害に対して栄養改善効果を反映した各種血液生化学値がどのような指標とリンクしているか検討する必要がある。分離大豆たん白質食や大豆オリゴペプチド食摂取によって栄養状態を反映する各種血漿指標に改善効果が現れたが、その中で特にたん白質栄養状態を反映する血漿アルブミン値およびアルブミン/グロブリン (A/G) 比はミルクカゼイン食摂取群で低下し、分離大豆たん白質食、特に大豆オリゴペプチド食摂取群において上昇する現象に着目した。一般に血漿アルブミン値と炎症反応は逆相関関係があることが知られている。そこで、たん白質栄養指標の改善効果を反映する指標を明らかにするために、炎症・組織傷害に関わるサイトカイン類等の血漿濃度の変動を定量抗体アレイにより解析し、それらの関連性を検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 試験飼料の調整

飼料組成は AIN-93M に準じ、たん白質源としてミルクカゼイン、分離大豆たん白質 (フジプロ、不二製油 (株))、大豆オリゴペプチド (ハイニュート AM、不二製油 (株)) あるいは大豆オリゴペプチドと同組成の遊離アミノ酸を 14%含有する飼料を調整し、それぞれ AIN-93M-MC (MC 食)、AIN-93M-SPI (SPI 食)、AIN-93M-PEP (PEP 食) および AIN-93M-AA (AA 食) とした。

### (2) 動物飼育

Wistar 系雄性ラット (日本チャールス・リバー、7 週齢、約 230g) に MC 食を 1 週間自由摂取させ馴化飼育した後、生理食塩水あるいは 5-FU (300mg/kg body wt) を胃内投与し、それぞれ MC 食、SPI 食、PEP 食あるいは AA 食に切り替えてさらに 1 週間自由摂取させた。5-FU 投与 MC 食群のラットの採餌量は毎日計測し、前日の採餌量分に相当する MC 食をコントロールの生理食塩水投与群のラットに与えた。試験食摂取開始 1 週間後、16 時間の絶食を行い、ジエチルエーテルによる麻酔下にて、後大静脈より全採血し、安楽死を施した。なお、本実験はノートルダム清心女子大学動物実験委員会の承認を得て動物実験指針に則り実施した。

### (3) 血液生化学検査および血漿各種サイトカイン類の抗体アレイ解析

血液は EDTA (1mg/mL of blood) およびアプロチニン (0.6TIU/mL of blood) 入り採血管にて血漿分離し、凍結保存した。血液生化学検査は、オリエンタル酵母工業 (株) 長浜 LSL に依頼した。また、サイトカイン類の定量については、フィルジェン (株) のマルチプレックスサスペンションアレイ (R&D 社 Fluorokine MAP Multiplex Rat Cytokine Panel) にて行い、栄養改善および病態改善の観点から興味深い指標について、改善のみられるサイトカイン類を絞り込んだ。

## 4. 研究成果

### (1) 脂質代謝を反映する血液生化学指標に与える大豆ペプチド食の影響

脂質代謝の指標として、血漿 LDL-コレステロール、HDL-コレステロールおよび中性脂肪の値が、PEP 食摂取群において良好な結果を示した。

LDL-コレステロール値は、コントロール群に対して傷害 MC 食群、傷害 SPI 食群および傷害 AA 食群において高い値となったが、傷

害 PEP 食群においては、コントロール群の程度まで低下した。一方、HDL-コレステロール値は、他の群に比べ傷害 PEP 食群において上昇した。中性脂肪値は、コントロール群に比べ、特に傷害 SPI 食群および傷害 PEP 食群で低下した。

#### (2) 糖質代謝を反映する血液生化学指標に与える大豆ペプチド食の影響

血漿グルコースの値においても、コントロール群に比べ、特に SPI 食群および PEP 食群で低下した。なお、低下後の値は Wistar 系雄性ラットの血液生化学データの基準範囲内であった。

#### (3) たん白質代謝を反映する血液生化学指標に与える大豆ペプチド食の影響

血漿アルブミン値は、コントロール群に対して、MC 食群や AA 食群で有意に低下したが、SPI 食群において上昇し改善された。PEP 食群においては、コントロール群より有意に高くなった。

また、アルブミン/グロブリン (A/G) 比は、血漿アルブミン値の上昇を反映し、MC 食群で有意に低下したものの、SPI 食群において上昇し、PEP 食群においては、コントロール群より高くなる傾向が観察された。

#### (4) 炎症および組織傷害に関与するサイトカイン類の血漿濃度に与える大豆ペプチド食の影響

一般に血漿アルブミン値と炎症反応は逆相関関係があることが知られている。そこで、炎症および組織傷害に関わる 17 種類のサイトカイン類の血漿濃度を Fluorokine MAP Multiplex Rat Cytokine Panel を用いた抗体アレイ解析により解析した結果、5-FU 投与による小腸傷害後に MC 食や AA 食を摂取した群に比較して、SPI 食および PEP 食摂取群において、コントロール群の値に改善される興味深い指標分子群を同定することができた。種々のマーカー分子が変動していたが、全ての群において検出できたもののうち食餌中窒素源の差異によって特に興味深い変動を示した主なマーカーは、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-10 (IL-10)、細胞接着分子 ICAM-1、プロテアーゼインヒビター-TIMP-1 であった。

炎症性 IL-6、抗炎症性 IL-10 および TIMP-1 は、MC および AA 食群において上昇したが、PEP 食群において低下した (図 1 および 2)。特に IL-10 は、MC および SPI 食群において、コントロール群に比べて有意に上昇していたが、PEP 食群でコントロール群レベルに低下した (図 2)。一方、ICAM-1 は MC 食群においてコントロール群に比べて有意に低下したが、SPI および PEP 食群ではコントロール

群のレベルまで上昇した。

以上より、特に PEP 食摂取により腸管の組織傷害が抑えられたこととペプチドとして窒素源が効率よく吸収されたことにより、血漿アルブミン値や A/G 比の上昇に代表される栄養状態の改善がみられたのではないかと考えられた。

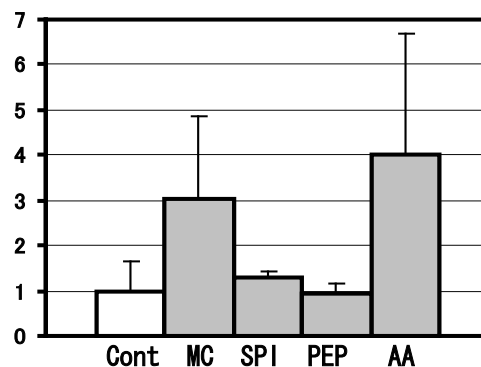


図 1 血漿 IL-6 濃度の変化 (Fold increase)

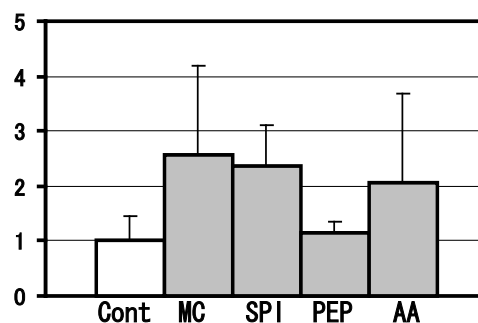


図 2 血漿 IL-10 濃度の変化 (Fold increase)

#### (5) 血漿アルブミン値の上昇メカニズムの検討

小腸傷害後に PEP 食を摂取したラットにおいて肝臓アルブミン合成が促進されているのではないかと考え、現在そのメカニズムを調べるため、肝臓組織を用いて肝アルブミン合成、アルブミン遺伝子発現について検討を開始したところである。今後詳細な調節メカニズムについて上記のサイトカイン等との関連性を含めてラット肝細胞初代培養系等を用いて検討していくとともに、脂質代謝の改善における PEP 食摂取の効果の面から脂質代謝酵素の発現についても検討を加えていく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① 白神俊幸 小腸ペプチド吸収を担う輸送

担体 PEPT1 に関する研究の進捗状況—  
PEPT1 を利用した腸疾患の病態改善と新  
規治療法の開発に向けて— 社団法人岡  
山県栄養士会機関誌「なかま」 第 108  
号:12-13, 2009 年, 査読無

[その他]

ホームページ等

[http://www.ndsu.ac.jp/1000\\_guid/1600\\_teac/1600\\_teac.html](http://www.ndsu.ac.jp/1000_guid/1600_teac/1600_teac.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白神 俊幸 (SHIRAGA TOSHIYUKI)

ノートルダム清心女子大学・人間生活学  
部・准教授

研究者番号 : 70363596