

# プロテアーゼ処理豆腐の単回投与による腸管吸収性

飯田 綾香<sup>1),2)</sup>・舟木 淳子<sup>1)</sup>・中村 強<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 福岡女子大学大学院人間環境科学研究科

<sup>2)</sup> 神奈川県立保健福祉大学保健福祉学部

## Intestinal Absorption of a Single Dose of Protease-treated Soybean Curd

Ayaka IIDA<sup>1),2)</sup>, Junko FUNAKI<sup>1)</sup> and Tsuyoshi NAKAMURA<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 〒813-8529 福岡県福岡市東区香住ヶ丘1-1-1

<sup>2)</sup> 〒238-8522 神奈川県横須賀市平成町1-10-1

(平成30年12月6日受理)

## 緒 言

日本の高齢者人口は2016年には総人口の27.3%を占めており、50年後には38.4%にも達すると推定されている<sup>1)</sup>。すなわち、今後迎えるさらなる状況において、高齢者の健康の維持増進は重要な課題であり、高齢者の健康的な生活の基盤である食と栄養についての対策が、今まで以上に必要とされるであろうことは容易に想像できる。

加齢に伴い高齢者の生理機能は変化する。その中でも食生活に関わる大きな変化として、消化液の分泌能、消化酵素の活性、咀嚼機能および嚥下反射機能の低下など、消化吸収に関わる変化があげられている<sup>2-5)</sup>。加齢に伴う生理的变化や食欲低下は高齢者の低栄養リスクとされている<sup>6)</sup>。さらに、低栄養はサルコペニアに繋がりが、ひいてはフレイルの要因となる<sup>7)</sup>。要介護状態に陥らないためにも、低栄養の予防ならびに改善は自立した生活を可能にすることにも繋がりが、重要な社会的課題である。

低栄養、特にタンパク質の摂取不足による低栄養の予防および改善には、高齢者の生理機能に適応したタンパク源、すなわち消化吸収性に優れたタンパク質食品が、なお望ましいと考えられる。今回の検討に使用したモルシン処理豆腐<sup>8)</sup>は豆腐をプロテアーゼ処理し、タンパク質加水分解物(ペプチド)を含む食品であり、また鎖長により異なるものの、一般的にペプチドはタンパク質に比べて消化吸収性に優れているという報告<sup>9)</sup>もある。したがって、高齢者のように消化吸収能が低下した場合であっても、比較的高い栄養価を有することは明らかであり、また高齢者のサルコペニアやフレイルに起因する低栄養を予防もしくは改善するタンパク質補給源となるこ

とが期待される。

そこで本研究では、高齢者を想定して消化吸収能を障害したモデルとして、従来から消化吸収障害モデルとして使用されている総胆管を結紮したラット<sup>10)</sup>を作製し、モルシン処理豆腐の経胃単回投与による腸管吸収性について検討した。

## 実験方法

### 1. モルシン処理豆腐<sup>8)</sup>の作製

今回の試験は絹ごし豆腐(京風絹ごし:さとの雪食品株式会社)を用いた。モルシン処理豆腐は絹ごし豆腐をプロテアーゼ製剤であるモルシン(モルシンF:キッコーマン株式会社)にて酵素処理して作製した。製造方法の詳細はNishinoakiらの既報<sup>8)</sup>に従い、その概要は絹ごし豆腐を2.5%モルシン溶液に浸し、4°Cで96時間保存したのち、これをモルシン処理豆腐とした。一方、対照はモルシン溶液の代わりに蒸留水を用いて上記と同様に処理し、これを対照として使用した。また、モルシン溶液および蒸留水に、腐敗を防ぐ目的で、5%食塩を添加した。

### 2. モルシン処理豆腐のタンパク質分解度

対照およびモルシン処理豆腐のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った。

また、中村らの方法<sup>11)</sup>を改変してモルシン処理豆腐の平均ペプチド鎖長(Average Peptide Length: APL)を測定した。すなわち、モルシン処理豆腐をタンパク質重量4 mg/mLになるように蒸留水で希釈した(A液)。この

溶液1.0 mLに蒸留水4.0 mLおよび12N HCl 5.0 mLを加え、ブロックヒーターで110°C、24時間加水分解を行った。次いで、ロータリーエバポレーターで塩酸を除去し、蒸留水を用い100 mL容のメスフラスコでメスアップした。この溶液1.0 mLに0.1M ホウ酸緩衝液 (pH 9.2) 6.0 mLを加え、恒温槽中で50°Cに加温した。次いで、0.03 M 亜硫酸ナトリウム溶液1.0 mLおよび0.1% TNBS (0.1% TNBSを含む0.1 M ホウ酸緩衝液) 2.0 mLを加え、25分静置した。その後、氷水中で急冷し、20分間静置した後、425 nmで吸光度を測定し、加水分解後の吸光度とした。一方、A液を100倍に蒸留水で希釈し、その1.0 mLを上記と同様の方法で発色させて吸光度を測定し、加水分解前の吸光度とした。APLは以下の式より算出した。

$$APL = \text{加水分解後の吸光度} / \text{加水分解前の吸光度}$$

### 3. 動物実験

動物実験は6週齢のSprague-Dawley系雄性ラット(日本チャールズリバー株式会社)を使用した。予備飼育は温度23±2°C、湿度50±10%、午前7時から午後7時までを明期とした12時間の明暗サイクルとし、ステンレス製5連ケージによる個別飼育とした。また、市販飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)および水を自由摂取させ、1週間以上の予備飼育を経たラットを以下に示す吸収実験に使用した。

実験動物は実験日の前日より絶食させ、実験日当日にペントバルビタール麻酔下(1 mL/kg)にて開腹後、総胆管(膵管および胆管)を結紮し、消化管内に膵液胆汁が分泌しない実験モデルを作製<sup>10)</sup>し、これを消化吸収障害モデルラットとして試験に使用した。

対照およびモルシン処理豆腐は、投与直前に物質全体が均一となるように磨砕し、それぞれヒトのほぼ1日摂取タンパク質量に相当する0.96 g/kg<sup>12)</sup>を基準として、同一量のタンパク質である対照12 mL/kgあるいはモルシン処理豆腐13 mL/kgを20Gの注射針を付したシリンジにて胃内に単回投与した。また、実験群は対照を投与した群(Control群:C群)、およびモルシン処理豆腐を投与した群(Molsin群:M群)の計2群とし、それぞれ6匹、5匹の動物を使用した。動物実験は「福岡女子大学における動物実験指針」に従い、動物実験委員会の承認を得たうえで実験を実施した。

### 4. 血中遊離アミノ酸の測定

#### 1) 採血

総胆管を結紮して作製した消化吸収障害ラットは直ちに門脈内に内径0.6 mm程度の採血用カテーテルを挿入し、外科用アロンアルファにて留置固定した。なお、採血用カテーテルはカテーテル内での血液凝固を防止する

目的で、ヘパリン溶液(1.2 U/mL)を常時充填させた。

次いで、均一磨砕して溶液とした対照あるいはモルシン処理豆腐の投与直前(0分)および投与後15、30、45、60、90分に門脈血を留置したカテーテルから0.3 mLずつ、経時的に採取した。採取した血液は12,000 rpmで10分間遠心分離し、上清を採取した。除タンパク処理は、上清に等量の3%スルホサリチル酸溶液を加え、攪拌し、1時間放置後12,000 rpmで15分間遠心分離にて行った。上清はアミノ酸分析に供するまで-30°Cで凍結保存した。

#### 2) 門脈血中のアミノ酸定量

門脈血中の遊離アミノ酸濃度は、除タンパク処理した上清をポアサイズ0.45 μm水系用のフィルターにて濾過した後、生体分析用カラムを装着したアミノ酸自動分析装置(JLC-500/V2, 日本電子(株))を用いて定量した。また、分析結果は投与0分を100とした場合の百分率を測定時間ごとに算出し、吸収率で表した。

#### 3) アミノ酸吸収量

対照およびモルシン処理豆腐の胃内投与後のアミノ酸総吸収量は曲線下面積として台形法により算出した。

### 5. 統計解析

群ごとに平均値および標準誤差を求め、群間の有意差検定はF検定にて分散が等しいことを確認したのち、平均値の差の検定(Student's t-test)を行った。有意水準は危険率5%以下とした。

## 実験結果

#### 1. モルシン処理豆腐の外観

対照およびモルシン処理豆腐の外観を図1に示した。両者の外観に相違は認められなかった。

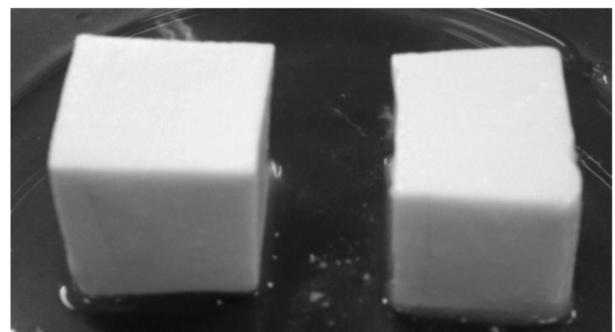


図1 外観

(左) 対照, (右) モルシン処理豆腐

#### 2. モルシン処理豆腐のタンパク質分解度

対照およびモルシン処理豆腐のSDS-PAGEの結果を図

2に示した。モルシン処理豆腐では $\beta$ -コングリシニン由来の68 kDaおよび52 kDaのバンド、グリシニン由来の35 kDaおよび20 kDaのバンドが対照に比べ薄く、さらに低分子のバンドの増加が認められた。

モルシン処理豆腐のAPLを分析した結果を表1に示した。モルシン処理豆腐のAPLは11.8であった。

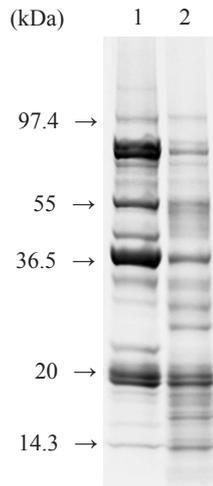


図2 豆腐のタンパク質のSDS-PAGE  
lane 1 対照, lane 2 モルシン処理豆腐

表1 平均ペプチド鎖長 (APL)

	APL	平均分子量
対照	—	約360,000 <sup>*1</sup>
モルシン処理豆腐	11.8	約1,400 <sup>*2</sup>

<sup>\*1</sup>文献値 [大豆タンパク質 (グリシニン)]<sup>13)</sup>

<sup>\*2</sup>算出値 [APL × 120 (平均アミノ酸分子量)]

### 3. 吸収アミノ酸の経時変化

対照投与群 (C群) およびモルシン処理豆腐投与群 (M群) の投与後の門脈血中の必須アミノ酸濃度、総アミノ酸濃度について、経時的な変化率をそれぞれ図3, 図4に示した。必須アミノ酸および総アミノ酸濃度の経時的な変化率において、M群はC群に比べいずれの測定時間とも高値を推移する傾向にあった。特に、必須アミノ酸濃度の変化率において、M群はC群に比べ投与30分および90分で有意な高値を示した。また、Glnは水溶液では不安定であるため、正確な測定が難しいと判断し、これを除くアミノ酸を総アミノ酸として算出した。その結果、総アミノ酸濃度の変化率においては、M群はC群に比べ投与後30分以降90分までの測定値で有意な高値を示した。

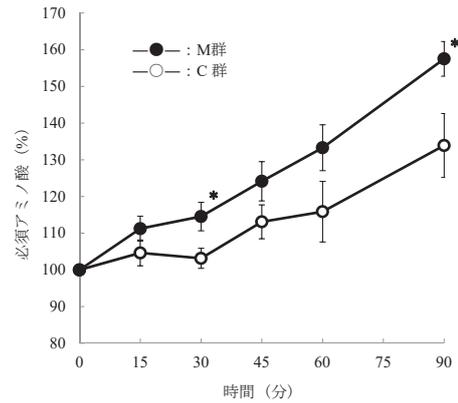


図3 門脈血中必須アミノ酸濃度の経時変化率  
mean ± SEM, 有意差: \* <0.05

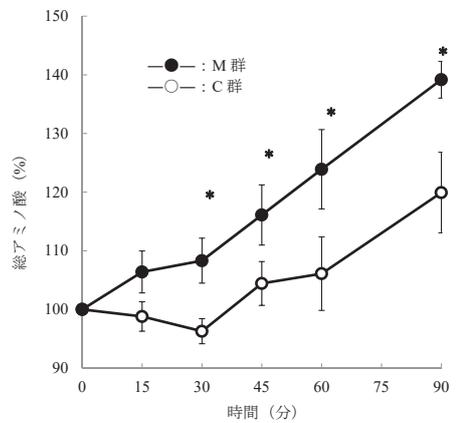


図4 門脈血中総アミノ酸濃度の経時変化率  
mean ± SEM, 有意差: \* <0.05

### 4. アミノ酸の吸収量

対照およびモルシン処理豆腐投与後90分間における総吸収量を図5に、総アミノ酸の総吸収量を図6に示した。吸収アミノ酸の経時変化と同様に、Glnを除くアミノ酸を総アミノ酸として算出した。必須アミノ酸および総アミノ酸ともにM群はC群と比べ、有意差は認められないものの高値を示す傾向にあった。

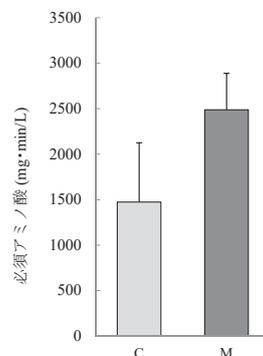


図5 必須アミノ酸吸収量 (0-90分)  
mean ± SEM

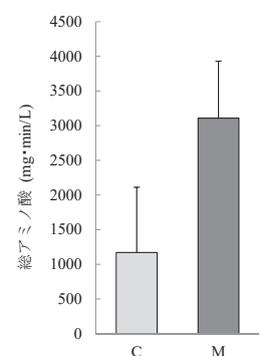


図6 総アミノ酸吸収量 (0-90分)  
mean ± SEM

## 考 察

近年、高齢者人口の増加に伴い、高齢者を取り巻く課題はますます大きくなっている。その中でも高齢者の低栄養はサルコペニアやフレイルに関連し、要介護状態に導く可能性を有する<sup>6,7)</sup>。低栄養を予防・改善するためにはタンパク源の十分な摂取が重要であるものの、高齢者では消化酵素の活性の低下<sup>2)</sup>や消化管機能の低下<sup>3)</sup>を伴い、消化吸収能が低下するとされる。すなわち、高齢者の低栄養を予防・改善する対策の1つとして、消化吸収性の優れたタンパク質の補給が重要である。

モルシン処理豆腐は対照に比べ、図1に示す通り外観的には大きな相違はないものの、モルシン処理豆腐は、図2のSDS-PAGEの結果より高分子のタンパク質が分解されていること、さらにAPLが11.8であったことから、大部分のタンパク質は低分子化されていることが明らかとなった。

また、本実験ではタンパク質の消化吸収能が抑制されたモデルとして総胆管（膵管および胆管）を結紮したラット<sup>10)</sup>を用い、消化吸収が障害された高齢者を想定してモデルとして試験した。なお、著者<sup>14)</sup>らは消化管に胆汁膵液が分泌しないモデルとして、術式は異なるものの、長期間飼育可能なモデルとしてMann-Williamsonラットを作製し、このラットでのタンパク質の消化吸収能を測定している。その結果、胆汁膵液が消化管内に存在しない場合のタンパク質の消化吸収能は出納法にて算出した結果、術後3日目から5日目までの3日間での見かけの消化吸収率は85%であった。一方、先の試験では術後3日以上が経過しており、代償的にタンパク質の消化吸収率は高まっていると推定される。また、正常ラットではタンパク質の消化吸収率はほぼ100%に近いことを示している。加えて、本モデルでは術直後に単回投与しており、その消化吸収率は先の試験での85%に比べて極めて低いことが予想される。すなわち、本モデルはたんぱく質の消化吸収能が抑制されたモデルであるといえる。本実験では、以上に示した消化吸収障害モデルを用いて、モルシン処理豆腐の腸管吸収性を対照と比較検討した。

各窒素源の違いが吸収速度に対する影響を観察するため、投与直後の門脈血アミノ酸濃度の上昇を指標として測定した。その結果、必須アミノ酸および総アミノ酸濃度の経時変化率において、M群はC群と比べ投与後早期から高値を推移し、モルシン処理豆腐の吸収が速い結果となった。さらに、90分間におけるアミノ酸吸収量についても必須アミノ酸および総アミノ酸ともに両群間に有意差は認められないものの、M群がC群と比べ高値を示した。

食餌中のタンパク質は胃でペプシンによる加水分解を

受けた後、膵酵素による分解を受け、小腸管腔内で遊離アミノ酸あるいはジ、トリペプチドとなりそれぞれ独立した機構で吸収される<sup>15)</sup>。対照はモルシン処理豆腐に比べ高分子であることから、腸管吸収可能なペプチドあるいはアミノ酸に分解される時間が長く、吸収速度が小さいことが考えられる。中埜ら<sup>9)</sup>は人工消化試験においてタンパク質よりもAPLが約9の乳性タンパク質加水分解ペプチドの消化が速やかであること、さらに健常ラットによる消化吸収試験においても消化吸収が速やかであることを報告している。本実験で認められた窒素源の違いによる吸収速度の差は、胃内あるいは小腸管腔内における消化速度の差が吸収速度に影響していることが考えられた。

従来アミノ酸やジ、トリペプチドあるいはオリゴペプチドの消化吸収性についての報告<sup>9,12,16,17)</sup>は多数みられるものの、食品の原型を保持したタンパク質加水分解物の消化吸収性に関する報告はほとんどなされていない。さらに、一般的にアミノ酸やジ、トリペプチドといった低分子ペプチドは易吸収性の栄養素であるものの、呈味性が損なわれており、経口摂取する食品素材としては極めて苦味が強く、摂取し難いという問題がある。また、咀嚼や嚥下機能が低下した高齢者は誤嚥による肺炎や窒息のリスクを有しているため、高齢者施設においては咀嚼しやすいようにあらかじめ食事を細かく裁断したきざみ食やミキサー食などの工夫した対応がなされている<sup>18)</sup>。これらの食事は食材本来の形状や色調を失い、食欲を掻き立てるとは言い難い。さらに、食事の経口摂取は栄養補給という生理的欲求ばかりでなく、食欲や味わう喜びといったQOLへの影響が極めて大きい<sup>19)</sup>。一方、今回用いたモルシン処理豆腐は、外観は通常の豆腐と変わらないものの、大豆たんぱく質であるグリシニンが分子量約360,000<sup>13)</sup>であるのに対し、分子量約1,400、APLは11.8と極めて低分子化されていることが判明した。しかし、先に示したように極端に低分子化されたペプチド（APLが2もしくは3程度）は腸管吸収性に優れるものの、かなり強い苦味を有しているといわれており、経口摂取には明らかに適さない。一方、モルシン処理豆腐は官能的になんら問題なく経口摂取できる点で優位性を有している。また、モルシン処理豆腐の作製法を考案した舟木ら<sup>8)</sup>は対照およびモルシン処理豆腐の物性検討を実施しており、破断強度解析により得られたモルシン処理豆腐の応力-歪曲線は、全体的に対照より応力が小さく、明確な破断点がみられないなめらかな波形であったことを示している。すなわち、モルシン処理により、豆腐のテクスチャーがやわらかく改変されていることの優位性も示している。

以上のように、消化吸収性に優れているという点で高

高齢者の健康維持増進に極めて有用であることのみならず、通常豆腐と同様の外観並びにテクスチャーの優位性を有していることから、モルシン処理豆腐は高齢者の健康の維持増進などに極めて有用なタンパク質補給用の食品になり得ることが期待された。

## 要 約

高齢者の低栄養はサルコペニアやフレイルの要因となる。要介護状態に陥らないためにも、低栄養の予防ならびに改善には特にタンパク質の摂取が重要である。しかし、加齢に伴い消化吸収能は低下することから、消化吸収性が優れているタンパク質食品が求められる。そこで、本研究ではタンパク質加水分解物であるモルシン処理豆腐を用いて、その消化吸収性を評価した。

モルシン処理豆腐はモルシンで処理しない豆腐（対照）に対して、ゲル電気泳動法により低分子化されているのを確認するとともに、Tri-nitrobenzene sulfonic acid (TNBS) を用いて平均ペプチド鎖長を測定した。次いで、7週齢SD系雄性ラットを用い、ペントバルビタール麻酔下にて開腹後、総胆管を結紮することで高齢者を想定して消化吸収能を障害させたラットを作製した。その後、モルシン処理豆腐（M群）あるいは対照豆腐（C群）を胃内に投与し、90分間経時的に門脈血を採取し、血清中遊離アミノ酸分析を行った。

モルシン処理豆腐はSDS-PAGEにて低分子化されているのが確認された。また、平均ペプチド鎖長は11.8であり、平均アミノ酸分子量から算出したモルシン処理豆腐の平均分子量は約1,400であった。M群における血中遊離アミノ酸濃度はC群と比較して、必須アミノ酸（EAA）及び総アミノ酸（TAA）が投与後早期から上昇した。さらに、90分間におけるアミノ酸吸収量においてもEAAとTAAは高い傾向が認められた。

以上の結果から、モルシン処理豆腐は高齢者を想定して作製した消化吸収障害ラットにおいて優れた消化吸収性を示し、高齢者のタンパク質補給源に有用であることが期待された。

## Summary

Digestive and absorptive function in elderly people decrease with aging. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of protease-treated soybean curd, which is protein hydrolysate, as food for elderly people. We assayed degree of hydrolysis using SDS-PAGE, and average peptide length (APL) using tri-nitrobenzene sulfonic acid (TNBS). We made rat model, which is decreased digestive and absorptive function, by ligating the common bile duct. After administering protease-treated soybean curd or the control

into the stomach, we chronologically (0, 15, 30, 45, and 90 minutes) evaluated the absorption rate of amino acids into the portal blood using an amino acid analyzer. Protease-treated soybean curd was brought to a low molecule, and APL was 11.8. Absorption rate of protease-treated soybean curd was faster than these of the control. Additionally, total absorbed amount of protease-treated soybean curd was higher than these of the control. We believe that the protease-treated soybean curd will be useful as food for elderly people, which is decreased digestive and absorptive function.

## 謝 辞

アミノ酸分析においてご協力いただいた福岡県工業技術センター黒田理恵子様、上田京子様へ深く感謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 厚生労働統計協会：第2編 衛生の主要指標。厚生指針増刊 国民衛生の動向2017/2018。東京，49-94，2017。
- 2) 日本栄養食糧学会：第8章 高齢者でみられる栄養障害の背景。高齢者の食と栄養管理。建白社，東京，151-190，2001。
- 3) 千葉勉。高齢者の消化器疾患。日老医誌，37：353-359，2000。
- 4) 齋藤真由。咀嚼・嚥下障害に関する研究。日本調理科学会誌，43：281-285，2010。
- 5) 谷口裕重，真柄仁，井上誠。高齢者の嚥下障害。静脈経腸栄養，28：1069-1074，2013。
- 6) 葛谷雅文。高齢者における栄養管理上の問題。外科と代謝・栄養，52：11-16，2018。
- 7) Xue QL, Bandeen-Roche K, Varadhan R, Zhou J, Fried LP. Initial manifestations of frailty criteria and the development of frailty phenotype in the Women's Health and Aging Study II. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 63: 984-90, 2008.
- 8) Nishinoaki M, Asakura T, Watanabe T, Kunizaki E, Matsumoto M, Eto W, Tamura T, Minami M, Obata A, Abe K, Funaki J., Application of an *Aspergillus saitoi* Protease Preparation to Soybean Curd to Modify Its Functional and Rheological Properties. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72: 587-590, 2008.
- 9) 中埜拓，島谷雅治，村上雄二，佐藤則文，井戸田正。乳清タンパク質酵素分解物の消化吸収性。日本栄養・食糧学会誌，47：195-201，1994。
- 10) 加嶋敬。中鎖脂肪と長鎖脂肪の消化吸収の比較検討。日本消化器学会雑誌，67：1082-1100，1970。
- 11) 中村哲郎，宿野部幸孝，土岐良一，平野賢一，伊藤浩史。乳カゼインの酵素加水分解によるペプチド混合物の製造。日本食品工業学会誌，38：377-383，1991。
- 12) 吉原大二，中村強，柳井稔，竹下保義。窒素源の吸収に及ぼすペプチドとアミノ酸の共存効果。日本栄養・食糧学会誌，50：411-416，1997。
- 13) Utsumi S, Inaba H, Mori T., Heterogeneity of soybean glycinin. Phytochemistry, 20: 585-589, 1981.
- 14) 中村強，栗林稔，吉原大二，竹下保義。乳タンパク質およ

- び乳タンパク質加水分解物の消化吸収障害ラットにおける栄養学的影響. 日本栄養・食糧学会誌, 49:355-361, 1997.
- 15) 岸恭一, 木戸康博編: 第4章 タンパク質の消化と吸収. タンパク質・アミノ酸の新栄養学. 講談社, 東京, 2007.
- 16) 吉原大二, 中村強, 林直樹, 柳井稔, 川西悟生. ジ及びトリペプチドと遊離アミノ酸が共存する窒素源の吸収性. 薬理と臨床, 1:305-316, 1991.
- 17) 青山敏明, 福井健介, 山本孝史. ラットに強制投与された窒素源の違いが胃内通過時間に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌, 49:46-51, 1996.
- 18) 鈴野弘子, 鈴木恵子, 石田裕, 笹田陽子. 要介護高齢者施設における食物形態の実態とその物性評価. 日本家政学会誌, 63:469-480, 2012.
- 19) 山中英治: 栄養管理とQOL. 静脈経腸栄養, 29:799-803, 2014.