

短報 高タンパク質食におけるグルテン/カゼイン比がラットのカルシウム

出納に及ぼす影響について

前田宜昭* 村松大輝* 矢島克彦* 鈴木 等*

Effects of Gluten/ Casein Ratio on Calcium Balance of Rats Fed High Protein Diet.

Yoshiaki MAEDA* Daiki MURAMATSU* Katsuhiko YAJIMA* Hitoshi Suzuki*

Numerous studies have been done on the effect of protein and/or phosphorus intakes on calcium metabolism. The effect of calcium intake on urinary calcium and calcium balance have provoked a great deal of controversy. An increment in dietary protein has been shown by several publications to increase urinary calcium losses resulting in negative balance of calcium. However, Spencer and co-workers have observed that a high protein diet as red meat has little effect on urinary calcium excretion. This purpose of the following studies was to investigate the effects of dietary gluten / casein ratio on calcium balance in rats fed a high protein diet. The experimental diets were based on AIN-93G diet. The experimental diets composed control diet of 20% protein (casein milk) and high protein diets of 40%. High protein diets contained C30G10 diet of 30% casein and 10% gluten, C20G20 diet of 20% casein and 20% gluten and C10G30 diet of 10% casein and 30% gluten. Rats were fed their respective diet freely for 4 weeks. Food intakes and body weights were recorded daily; urine and fecal samples were collected using metabolic cages to the final week of the study. The measurement of calcium was performed by atomic absorption spectroscopy utilize strontium chloride hexahydrate to suppress phosphate interference without reducing the calcium signal. All data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA); critical level for all statistical analyses was set at $p < 0.05$. The body weight gain and food intake were not significantly affecting by interaction of the high protein diet and gluten/ calcium ratio. An increase of gluten/ casein ratio with a high protein diet showed the decrease in apparent absorption of calcium significantly. The urinary calcium excretion was increased in the high protein groups compared to control group, an increase of gluten/ casein ratio of high protein diet resulted in the significant decrement of urinary calcium excretion. We concluded that an increase in ratio of gluten/ casein with a high protein diet affected apparent calcium absorption and urinary calcium excretion regardless of the phosphorus intake.

(Received ○○ ○, 2013; Accepted ○○ ○, 2013)

Keywords: calcium, protein, casein, gluten, balance rat

* 東京聖栄大学健康栄養学部

諸言

カルシウムの要求量は、タンパク質とリンに影響する。タンパク質摂取の上昇は、食事中カルシウムとリンが一定に保たれるなら、尿中カルシウム排泄量を増加させる¹⁻³⁾ことが数多くの研究によって確立されている。タンパク質摂取量の変化によって影響されるカルシウム出納ならびに尿中カルシウム排泄量の程度は、食事中のリン量にも依存している⁴⁾。AIN-93G 精製飼料は、成長率を最高にすることで、タンパク質源には乳タンパク質であるカゼインが用いられている。食事中タンパク質のアミノ酸は、タンパク質の消化やアミノ酸の吸収が不完全であるため、すべて有効であるということはない。一般に

実験方法

実験動物として4週齢のWistar系雄ラット24匹(日本チャールス・リバー社より購入)を1週間予備飼育したのち、各群の体重が等しくなるように1群6匹の4群に分けて4週間飼育を実施した。予備飼育用に飼料は、AIN93Gを一部改変した20%カゼイン食を自由摂取様式で給餌した。本飼育は、20%カゼイン食を対照群(以下をCont.)とし、残りの3群を高たんぱく食(40%)とした。3群の高たんぱく食は、カゼインとグルテンの比率を変えて、30%カゼイン10%グルテン高たんぱく食群(以下をC30G10)、20%カゼイン20%グルテン高たんぱく食群(以下をC20G20)および10%カゼイン30%グルテン群(以下をC10G30)になるように調整した(表1)。なお、タンパク質源であるカゼインはオリエンタル酵母株より購入し、グルテンはオーサワジャパン株より購入したものをを用いた。

飼育管理は、東京聖栄大学1号館の実験動物飼育室を使用した。1日12時間の明暗は、午前7時~午後7時明期として自動制御した。飼育温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は、 $50\pm 5\%$ に管理した。給餌・給水ならびに体重測定などの作業は、午前10時~11時の間に行うこととした。なお、飼料ならびに蒸留水は、自由摂取様式とした。ラットの通常飼育は、6連の個飼いステンレス網製のゲージを用い、出納試験は、代謝ゲージに馴れるため、3~4

動物性タンパク質のアミノ酸は、約90%が消化吸収されるが、植物性タンパク質は約60~70%のアミノ酸しか遊離されず、吸収されない。カルシウムの利用は、タンパク質とリンの摂取量に依存するが、高たんぱく食で複数のタンパク質の比率の違いによる研究は、四半世紀の間、知る限りでは見当たらない。そこで今回、食事中のタンパク質レベルを高タンパク質食にした際に、動物性タンパク質であるカゼインと植物性タンパク質であるグルテンの比率を変えた時のカルシウム出納ならびに尿中カルシウム排泄量がどのような変動を示すのかをラットを用いて、動物飼育実験を行った。

日間、予備飼育したのち、5日間にわたり糞尿を分離採取した。糞は、毎日採取したものと合わせて恒量となった乾燥重量を測定した後、粉末にした。尿は、全量を200mLに定容して凍結保存した。飼料、糞および尿のサンプリングは、一定量をろつばに採取し、電気マッフル炉(TOKYO RIKAKIKAI TMF-2200)を用いて、 450°C で内容物が白色または灰白色になるまで連続加熱し、0.5M硝酸溶液にて一定量にして試料とした。カルシウムの測定は、原子吸光分析法(原子吸光分光光度計SHIMAZU AA-6800)を用いた。出納試験の結果は、5日間のデータを1日当たりとして、カルシウム摂取量から糞中カルシウム排泄量を差し引いたものを見掛けのカルシウム吸収量とした。さらに見掛けのカルシウム吸収量から尿中カルシウム排泄量を差し引いて体内カルシウム保留量とした。また糞中カルシウム排泄量、見掛けのカルシウム吸収量、尿中カルシウム排泄量および体内カルシウム保留量をカルシウム摂取量で除して百分率にしたものを糞中カルシウム排泄率、見掛けのカルシウム吸収率、尿中カルシウム排泄率および体内カルシウム保留率とした。統計処理は、得られたデータは等分散性を検定した後、一元配置分散分析(One way ANOVA)で処理した。PLSD法ならびにScheffe法にて危険率5%未満を有意差があると判定した。

表1 飼料組成 (%)

群名	Cont.	C30G10	C20G20	C10G30
カゼイン	20.0000	30.0000	20.0000	10.0000
グルテン	0.0000	10.0000	20.0000	30.0000
L-システイン	0.3000	0.3000	0.3000	0.3000
大豆油	7.0000	7.0000	7.0000	7.0000
セルロース	5.0000	5.0000	5.0000	5.0000
AIN-93G ミネラル混合	3.5000	3.5000	3.5000	3.5000
AIN-93G ビタミン混合	1.2500	1.2500	1.2500	1.2500
第3ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
α コーンスターチ	62.9486	42.9486	42.9486	42.9486
総計	100.0000	100.0000	100.0000	100.0000

結果

初体重は、各群間において有意な差が認められなかった。終体重も各群間には有意な差が認められなかった。したがって、終体重から初体重を差し引いた体重増加量は、各群間において有意な差が認められなかった。28日間の飼料摂取量は、各群間には有意な差が認められなかったが、高たんぱく食においてグルテンの比率が高く

なると飼料摂取量が減少傾向を示した。出納時の飼料摂取量は、Cont.群に比べてC20G20群ならびにC10G30群が有意に低値を示した(表2)。

表2 初体重、終体重、体重増加量、飼料摂取量および出納時摂取量

群名	Cont.	C30G10	C20G20	C10G30
初体重(g)	87.73 \pm 1.48	87.57 \pm 1.93	87.33 \pm 0.99	85.66 \pm 1.62
終体重(g)	300.09 \pm 7.86	330.52 \pm 7.42	317.04 \pm 7.44	319.67 \pm 7.96
体重増加量(g)	242.36 \pm 8.63	242.95 \pm 7.68	229.71 \pm 8.06	234.01 \pm 6.48
飼料摂取量(g/28日)	516.77 \pm 10.82	489.41 \pm 6.78	478.78 \pm 14.87	472.97 \pm 10.59
出納時摂取量(g/日)	17.71 \pm 0.59a	17.37 \pm 0.30a	13.58 \pm 0.65b	14.18 \pm 0.75b

注) 数値は、平均値 \pm 標準誤差 (1群6匹)。異なったアルファベット間に有意差あり ($p < 0.05$)。

カルシウム摂取量は、各群間において有意な差が認められなかった。糞中カルシウム排泄量は、各群間には有意な差が認められなかったが、高たんぱく食においてグルテンの比率が高くなるにつれて糞中カルシウム排泄量が高値傾向を示した。また一方、カルシウム吸収量は、各群間には有意な差が認められなかったが、高たんぱく食においてグルテンの比率が高くなるにつれてカルシ

ウム吸収量が低値傾向を示した。尿中カルシウム排泄量は、Cont.群に比べて高たんぱく食3群(C30G10、C20G20およびC10G30)が高値傾向を示し、高たんぱく食においてグルテンの比率が高くなるにつれて尿中カルシウム排泄量が低値傾向を示した。体内カルシウム保留量は、各群間において有意な差が認められなかった(表3)。

表3 カルシウム出納 (mg/日)

群名	Cont.	C30G10	C20G20	C10G30
カルシウム摂取量(mg/日)	85.3±2.9	87.7±2.5	83.3±1.8	86.2±3.8
糞中カルシウム排泄量(mg/日)	33.0±1.1	28.2±2.2	30.8±1.6	32.4±2.1
カルシウム吸収量(mg/日)	52.3±2.8	59.5±2.4	52.5±2.0	53.8±3.9
尿中カルシウム排泄量(mg/日)	0.8±0.1	1.9±0.3	1.6±0.5	1.2±0.3
体内カルシウム保留量(mg/日)	51.5±2.7	56.5±2.2	50.9±1.9	52.6±3.8

注) 数値は、平均値±標準誤差 (1群6匹)。異なったアルファベット間に有意差あり ($p < 0.05$)。

表4は、カルシウム摂取量が生体内でどのように利用されたかを体内カルシウム保留量、糞中ならびに尿中カルシウム排泄量を百分率にして示した。糞中カルシウム排泄率は、Cont.群に比べて高たんぱく食3群が低値傾向を示したが、有意な差が認められなかった。また高たんぱく食においてグルテンの比率が高くなるにつれて高値傾向を示したが、有意な差が認められなかった。カルシウム吸収率は、Cont.群に比べて高たんぱく食3群が高値傾向を示したが、有意な差が認められなかった。

高たんぱく食においてグルテンの比率が高くなるにつれてカルシウム吸収率が低値傾向を示したが、有意な差が認められなかった。尿中カルシウム排泄率は、Cont.群に比べて、高たんぱく食3群は、有意に高値を示した。高たんぱく食においてグルテンの比率が高くなるにつれて尿中カルシウム排泄率が有意に低値を示した。体内カルシウム保留率は、Cont.群に比べてC30G10群が有意に高値を示した。

表4 カルシウム出納 (%)

群名	Cont.	C30G10	C20G20	C10G30
糞中カルシウム排泄率(%)	38.7	32.2	37.0	37.6
カルシウム吸収率(%)	61.3	67.8a	63.0	62.4b
尿中カルシウム排泄率(%)	0.9c	2.2d	1.9d	1.4e
体内カルシウム保留率(%)	60.4f	65.7g	61.1f	61.0f

注) 数値は、平均値±標準誤差 (1群6匹)。異なったアルファベット間に有意差あり ($p < 0.05$)。

考 察

生体内でのタンパク質の利用は、タンパク質の質と食事の量によって影響される。成人の場合、タンパク質摂取の上限は、総エネルギー摂取量の30%を超えないと設定されている⁹⁾が、今回の実験は、40%という高たんぱく食でカゼインとグルテンの比率を変えることによるカルシウムの利用について評価した。また一方で炭水化物が三大栄養素の許容分布範囲の下限である45%以下になり⁹⁾、カルシウム利用が低糖質食にも影響されることが懸念されるので、食物繊維源としてセルロースをすべての高たんぱく食群に均等に配分することでその

影響を低減させよう考慮した。

グルテンは、小麦粒の貯蔵タンパク質でグルアジンとグルテニンが主要部分を構成している。栄養価の面では、グルテンはリンが非常に不足している。それに対してカゼインは、乳タンパク質で主にリン酸カルシウムとともに複合体になり巨大分子のミセルを形成している。カゼインに含まれるリン量は、その上限が8%まで含まれるという¹⁰⁾。生体内でのカルシウム利用は、タンパク質とリン、二つの食事成分の変化に直接関係している。食事時のカルシウムとリンが一定であれば、タンパク質

摂取の増加は、尿中カルシウム排泄量を増加させる^{11, 12, 13, 14}。カルシウムとタンパク質が一定であれば、リン摂取量の増加は、尿中カルシウム排泄量を低下させる^{11, 13, 14}。Hegstedらは、リンとタンパク質の両者の摂取量を増加させるとき、タンパク質摂取量を2倍から3倍に増加させると尿中カルシウム排泄量は、対照群に比べて25%増加したが、カルシウムバランスには影響しないと報告している。我々は、タンパク質摂取量を2倍にし、カゼインとグルテンの比率を変化させたとき、グルテンの比率が増加すると尿中カルシウム排泄量が減少した。このことは、尿中カルシウム排泄量に及ぼす影響は、タンパク質やリンの摂取量の変化だけでなく、高タンパク質の質や実験に用いられる複数のタンパク質の比率の違いにも影響されることを示した。グルテンは、リン酸カルシウムを含むカゼインに対して、高タンパク質食中の比率を高めると尿中カルシウム排泄量を減少させる。これは、腸管での消化によるグルテンの未消化物であるペプチドの一部がほとんど溶解せず、ペプトンやトリプシンによる消化速度が遅い。これが特有な構造を持つ堅固な分子を作り出し、過吸着をもたらし、吸収を阻害する可能性や、体内に吸収した遊離のアミノ酸や未消化された短いペプチドがカルシウムの恒常性維持に関わる調節に直接あるいは間接的に影響した可能性も推察されるが、今回は、現象面だけの検討にとどめた。グルテンを主とする小麦タンパク質には、リジンが不足しているため、タンパク質としての栄養的価値が低い事だけがミネラルとの関係に反映するとは限らない。さらにグルテンの量的な栄養特性がカルシウムをはじめとするミネラル利用に及ぼす影響について検討を重ねるだけでなく、グルテンの物理化学的な機能特性とミネラルとの関係についても合わせて検討する必要があると考えられた。

結 論

高たんぱく食に含まれるカゼインとグルテン比を変化させるとカルシウム吸収率は、グルテン量が高くなるにつれて、有意に低値を示した。また尿中カルシウム排泄率は、対照群に比べて高たんぱく食3群が有意に高値を示し、グルテン量が高くなるにつれて、尿中カルシウム排泄率が低値を示した。したがってグルテンには、カルシウムの吸収抑制ならびに尿中カルシウム排泄低下に作用することが示唆された。

文 献

- 1) Hegsted, M., Schuette, S. A., Zemel, M. B. and Linkswiler, H. M. : Urinary Calcium and Calcium Balance in Young Men as Affected by Level of Protein and Phosphorus Intake. *J. Nutr.* 111, 553-562 (1981)
- 2) Margen, S., Chu, J.-Y., Kaufmann, N.A. and Calloway, D. H. : Studies in Calcium Metabolism. I. The Calciuretic Effect of Dietary Protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 27, 584-589 (1974)
- 3) Allen, L. H., Bartlett R. S. and Block, G. D. : Reduction of Renal Calcium Reabsorption in Man by Consumption of Dietary Protein. *J. Nutr.* 109, 1345-1350 (1979)
- 4) Schuette, S., A Zemel, M. B. and Linkswiler, H. M. : Studies on the Metabolism of Protein-Induced Hypercalciuria in Older Men and Women. *J. Nutr.* 110, 305-315 (1980)
- 5) Linkswiler, H. M., Joyce, C. L. and Anand, C. R. : Calcium Retention of Young Adult Males as Affected by Level of Protein and of Calcium Intake. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 36, 333-340 (1974)
- 6) McCance, R. A., Widdowson, E.M. and Lehmann, H. : The Effect of Protein Intake on the Absorption of Calcium and Magnesium. *Biochem. J.* 36, 686-691 (1942)
- 7) Chu, J.-Y., Margen, S. and Costa, F. M. : Studies in Calcium Metabolism. II. Effects of Low Calcium and Variable Protein Intake on Human Calcium Metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 1028-1035 (1975)
- 8) Licata, A. A., Bou, E., Bartter, F. C. and Cox, J. : Effects of Dietary Protein on Urinary Calcium in Normal Subjects and in Patients with Nephrolithiasis. *Metabolism* 28, 895-900 (1979)
- 9) Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intake for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids (Macronutrients). Washington, DC National Academies Press (2006)
- 10) Cheftel, J. C., Cuq, J. L. and Lorient, D. : *Proteines alimentaires*, Marcel Dekker, New York (1988)

- 11) Magen, S., Chu, J-Y, Kaufmann, N. A. and Calloway, D. H. : Studies in Calcium Metabolism. I. The Calciuretic Effect Pf Dietary Protein. Am. J. Clin. Nutr. 27, 584-589 (1974)
- 12) Allen, L. H., Bartlett R. S. and Block, G. D. : Reduction of Renal Calcium Reabsorption in Man by Consumption of Dietary Protein., J. Nutr. 109, 1345-1350 (1979)
- 13) Goldsmith, R.S., Jowsey, J., Dube, W. J. Riggs, B. L., Amaud C. D. and Kelly, P. J. : Effects of Phosphurus Supplementation on Serum Parathyroid Hormone and Bone Morphology in Osteoporosis. J. Clin. Endocrinol. Metab. 43, 523-532 (1976)
- 14) Spencer, H., Kramer, L. Osis, D. and Norris, C. : Effect of phosphorus on the Absorption of Calcium and the Calcium Balance in Man., J. Nutr., 108, 447-457 (1978)