研究ノート

抗酸化剤 (BHT)* を与えたラットの発育障害に及ぼす 大豆食品及びメチオニンの添加効果

小柳達男, 中原経子, 上原敦子
常磐学園短期大学

Effect of Soybean Foods and Methionine on the Growth in Rats Fed with the Antioxidant (BHT)*

Tatsuo Koyanagi, Kyoko Nakahara, and Atsuko Uehara
Tokiwa Junior College

Effect of soybean foods on growth in rats dosed with 0.3% BHT was investigated. Among rats fed with congealed soybean protein, natto or fortified natto, the depression of growth was smallest in rats fed with fortified natto, followed by those fed with unfortified natto. Owing to a high content of riboflavin and pantothenic acid in natto, the amount of these vitamins was higher in the liver of rats fed with natto and fortified natto. So the beneficial effect of the two kinds of natto on the growth might be ascribed to their high content of the vitamins. The concentration of the vitamins in the liver was lowered and activity of aminopyrinedemethylase in the liver was elevated by the administration of BHT. In the preparation of natto, addition of 1% of methionine to soybean at the time of soaking in water did not give rise to any disagreeable flavor of natto, so the fortification of methionine at this level seems to be a practical means to improve the nutritional value of natto.

Jap. J. Nutr., 39 (4) 165~170 (1981)

BHA (Butylated hydroxyanisole) 及び BHT は酸化防止剤として一般に食用油脂, バター, 魚介加工品に用いられ, 他の酸化防止剤に比べて安定性が高く, 加熱加工への効果がよいということが認められている。しかし少し毒性があることがわかりその検討がなされ始めている。

Johnson ら¹⁾ は幼若ラットの飼料に BHT を混入した場合, 0.2%では肝臓や副腎の肥大, 及び血清コレステロールの上昇が起こり, 0.3%以上では発育の抑制があることを認めている。

BHA について Gilbert ら²⁾ は体重 kg 当たり 0.5g をラットに与えると肝臓肥大を起こしたが, 肝臓の薬物代謝酵素には変化がなく, これに対し BHT では肥大とともに薬物代謝酵素活性も強まることを報告している。野中ら³⁾ はラットで澱粉にカゼインを配合した飼料に0.1%の BHA を添加した場合にわずかに発育が無添加群に比べ劣ることを認めている。

先にわれわれ⁴⁾ は強化米, 味噌, キャベツからなる基礎飼料に0.2%の BHA を添加してラットを飼育したところ発育障害がみられたが, これに納豆, あるいは納豆とメチオニンを添加すると, 無添加群との差がほとんどみられないくらいまで回復することを認めた。

* BHT: Butylated hydroxytoluene

表 1 飼料配合 (乾物)

群及び飼料の特徴	I, V 基礎飼料 (%)	II, VI 凍豆腐 (%)	III, VII 納 豆 (%)	IV, VIII メチオニン入り納豆 (%)
強 化 白 米	77.0	77.0	77.0	77.0
大 豆 油	5.0	5.0	5.0	5.0
味 噌	6.0	6.0	6.0	6.0
キ ャ ベ ツ	2.0	2.0	2.0	2.0
澱 粉	10.0	3.3	—	—
凍 豆 腐	—	6.7	—	—
納 豆	—	—	10.0	—
メチオニン入り納豆	—	—	—	10.0

飼料には上記のほかビタミンA2,000 I. U., サイアミン 2 mg/飼料100 g を配合した。

V, VI, VII, VIII群には BHT を飼料の0.3%添加した。

今回 BHT 添加飼料に対する凍豆腐、納豆及びメチオニン入り納豆の効果を検討したので報告する。

BHT は食品に kg 当たり 0.2 g 以下の割合で添加することが認められているが、われわれの実験ではその15倍に相当する0.3%添加を行った。

実 験 方 法

体重 50 g 前後の Wistar 系雄ラットを各群6匹ずつ8群に分け、表1に示すように4種類の飼料を用いて試験した。すなわち基礎飼料として強化白米に味噌、キャベツ、大豆油を配合したものをI群に与え、これに凍豆腐をII群に、納豆をIII群に、メチオニン入り納豆をIV群に加えた。凍豆腐と納豆は等室素量で配合し、これら添加による重量の差は澱粉で補正した。

強化白米は水洗して炊いたのち70°Cで乾燥して粉末にした。味噌及び納豆も70°Cで乾燥して粉末にして用いた。

メチオニン入り納豆を作るには原料大豆がおおわれる程度の水に、大豆 100 g に対し1%の割合に L-メチオニンを溶かしておいてこれに大豆を1夜浸漬してメチオニンを大豆にしみこませた。蒸煮後納豆菌を植えて40°Cで18時間保ち納豆にした。これを15分、100°Cに蒸して殺菌し、70°Cで乾燥後粉末にした。

大豆及び納豆中のメチオニンはアルカリ加水分解後アミノ酸をイオン交換樹脂に吸着させ、水洗して不純物と分け、アミノ酸を樹脂から溶出した⁵⁾。溶出液中のメチオニンは McCarthy ら⁶⁾の方法により比色定量した。分析の結果納豆及びメチオニン入り納豆中のメチオニン量は、たん白 100 g 中それぞれ1.1 g 及び 1.9 g であった。

飼料にはそのほかにラットの発育を考慮してビタミン A2000 I. U. をパルミチン酸エステル、サイアミン 2 mg を塩酸塩で飼料 100 g につき加えた。その他のビタミンについては飼料の効果を明らかにするために加えなかった。

BHT は V, VI, VII, VIII 群に2日間無添加飼育ののち0.3%配合し28日間飼育した。

ラットは金網かごに1匹ずつ飼い、飲み水は自由とし、室温は23°Cに保った。飼育終了後はエーテル麻酔下に解剖して臓器の重量を測定し、肝臓は冷凍保存後解凍して薬物代謝酵素活性の指標としてアミノピリン脱メチル酵素 (APDM) を Gilbert ら²⁾の方法、リボフラビンをルミフラビン法、パントテン酸を Skeggs ら⁷⁾の方法、尿中アスコルビン酸を Howard ら⁸⁾の方法で測定した。

表 2 各種大豆食品を与えたラットの体重増加と飼料効率に及ぼす BHT の影響

群	BHT	体重増加 (28日) (g)	抑 制 率 (A) - (B)	摂取飼料 (g/日)	飼料効率 ¹⁾
			(A)		
基 礎 飼 料 ²⁾	-	(A) 26.4 ± 7.6 ³⁾		8.3	11.4
	+	(B) 13.8 ± 2.9 ^a	47.7	9.9	5.0
凍 豆 腐	-	60.8 ± 11.1		12.6	17.2
	+	23.7 ± 9.6 ^b	61.0	10.8	7.8
納 豆	-	55.8 ± 9.6		13.5	14.8
	+	25.3 ± 8.2 ^b	54.7	10.8	8.3
メチオニン入り納豆	-	54.5 ± 8.9		12.0	16.3
	+	37.0 ± 7.3	32.1	11.1	11.9

1) 飼料効率 = [体重増加 (28日) (g) / 摂取飼料 (28日) (g)] × 100

2) 強化白米, 大豆油, 味噌, キャベツ

3) 平均値 ± S. D.

a : P < 0.02 b : P < 0.01

表 3 各種大豆食品を与えたラット臓器重量 (体重100 g につき) に及ぼす BHT の影響

群	BHT	肝 臓 (g)	副 腎 (mg)	腎 臓 (g)
基 礎 飼 料	-	4.4 ± 0.3*	18.6 ± 3.7	0.97 ± 0.04
	+	6.5 ± 0.7 ^a	19.6 ± 3.4	1.01 ± 0.08
凍 豆 腐	-	4.1 ± 0.4	14.9 ± 3.1	0.86 ± 0.03
	+	6.3 ± 0.3 ^a	20.3 ± 5.2 ^b	1.01 ± 0.09 ^b
納 豆	-	3.9 ± 0.3	16.8 ± 3.6	0.89 ± 0.04
	+	6.1 ± 0.3 ^a	18.6 ± 3.2	0.94 ± 0.07
メチオニン入り納豆	-	3.8 ± 0.3	14.4 ± 2.6	0.93 ± 0.06
	+	5.9 ± 0.4 ^a	18.4 ± 2.6 ^c	0.89 ± 0.08

*: 平均値 ± S. D.

a : P < 0.001

b : P < 0.01

c : P < 0.02

実 験 結 果

28日間飼育したラットの体重増加は表2に示した。飼料に0.3%のBHTを加えるとすべての群で著しい発育障害がみられ、基礎飼料群、凍豆腐群、納豆群ではそれぞれの無添加群に比べ半分以下の体重増加に減ったがメチオニン入り納豆群ではその減少が緩和されていた。BHT添加によって抑制された体重、すなわち無添加時の体重増加と添加時の体重増加の差を、無添加時の体重増加量で割った発育抑制率をみると、凍豆腐では61.0%、納豆では54.7%、メチオニン入り納豆では32.1%でありメチオニン入り納豆の効果が優れていた。

体重100gに対する各臓器重量は表3に示したようで、肝臓はBHTを添加したすべての群で無添加群に比べて明らかに肥大がみられた。副腎はやや肥大の傾向、腎臓は基礎飼料群、凍豆腐群で肥大していた。

各群におけるラット肝臓中のAPDM、リボフラビン、パントテン酸及び尿中アスコルビン酸は表4に示した。アスコルビン酸は3匹の平均である。

肝臓中のAPDMは無添加群に対しBHT添加群ですべて酵素活性が上昇していた。肝臓100gに対するリボフラビン量はBHT無添加の場合、納豆及びメチオニン入り納豆群で高い値を示しており、全般に無添加群に対し添加群でそれぞれ含量が低下していた。パントテン酸量もリボフラビンと同じ傾向を示していた。

すなわち BHT 無添加群では納豆及びメチオニン入り納豆群で高い値を示し、これも BHT 添加で全般に単位体重当たりの含量は低下していた。しかし BHT 添加群でいずれも肝臓重量が対照群より肥大しているため、体重 100 g 当たりの肝臓重量当たりのリボフラビン、パントテン酸については対照群と比較すると、むしろ添加群の方が高いか又はほぼ等しい結果が得られた。

考 察

白米、味噌、キャベツ、大豆油、ビタミン A、サイアミンを基礎飼料としたものに各種大豆食品を加え、BHT を 0.3% 添加して 28 日間飼育したところ著しい体重増加の抑制がみられた。それぞれの群で無添加時に対する添加時の抑制割合をみると凍豆腐では著しく大きく、納豆ではやや減少し、メチオニン入り納豆では更に減少した。基礎飼料群ではたん白質含量が他の 3 群に比し低いため、無添加時の発育も悪く、添加時の抑制も少なかった。この試験で納豆は乾燥して用いたが、Standal ら⁹⁾は納豆が乾燥によりたん白の栄養価が低下することを認めている。このように栄養低下があるにもかかわらず、納豆を与えることにより、凍豆腐に比べ各種ビタミン類の供給が増し、メチオニン入り納豆ではさらに大豆に少ないメチオニンも供給されるため BHT 添加による体重増加の抑制も少なくなったものと考えられる。

Astill ら¹⁰⁾によれば、BHA 及び BHT の解毒はおもに肝臓でなされ、そのまま糞に排泄されるか、あるいはグルクロン酸や硫酸に結合して尿に排泄される。BHA ではその水酸基にグルクロン酸及び硫酸が結合し、BHT ではメチル基が酸にまで酸化されてグルクロン酸に結合するが、この酸化や結合にはリボフラビンやニコチン酸酵素が関与する。そしてこのような解毒を行うに必要なエネルギーの供給源であるクエン酸サイクルの回転にはパントテン酸の供給も十分でなければならない。メチオニンはとくに薬物代謝酵素の合成や結合に使うメチル供与体

表 4 各種大豆食品を与えたラット肝臓中の APDM, リボフラビン, パントテン酸及び尿中アスコルビン酸に及ぼす BHT の影響

群	BHT	肝臓中 APDM*	肝臓 100 g 中		全 肝		$\mu\text{g}/\text{肝臓}/100\text{ g 体重}$		尿中アスコルビン酸 (mg)/100 g 体重
			リボフラビン (mg)	パントテン酸 (mg)	リボフラビン (μg)	パントテン酸 (μg)	リボフラビン	パントテン酸	
基 礎 飼 料	-	0.101 $\pm$ 0.001	1.19 $\pm$ 0.09	⑤5.32 $\pm$ 0.50	49.2	0.19	52.4	234.1	0.80 $\pm$ 0.57
	+	0.122 $\pm$ 0.003 ^a	1.08 $\pm$ 0.11	4.42 $\pm$ 0.68	50.6	0.22	70.2	287.3	4.38 $\pm$ 0.27
凍 豆 腐	-	0.118 $\pm$ 0.002	¹⁾ 1.14 $\pm$ 0.06	⑥6.61 $\pm$ 0.87	63.9	0.33	46.7	271.0	/
	+	0.137 $\pm$ 0.010 ^c	1.03 $\pm$ 0.07	4.65 $\pm$ 0.44	62.1	0.28	64.9	293.0	3.48 $\pm$ 0.74
納 豆	-	0.109 $\pm$ 0.008	²⁾ 1.69 $\pm$ 0.13	③7.12 $\pm$ 0.78	77.8	0.31	65.9	277.7	/
	+	0.134 $\pm$ 0.012 ^b	1.15 $\pm$ 0.12 ^c	5.04 $\pm$ 0.22	58.8	0.28	70.2	307.4	4.34 $\pm$ 1.17
メチオニン入り納豆	-	0.107 $\pm$ 0.004	³⁾ 1.69 $\pm$ 0.13	④7.38 $\pm$ 0.77	71.5	0.33	64.2	280.4	/
	+	0.136 $\pm$ 0.007 ^b	1.21 $\pm$ 0.18 ^d	6.32 $\pm$ 0.43	61.4	0.37	71.4	372.9	3.00 $\pm$ 0.42

*: 脱メチル生産物 4-アミノアンチピリン $\mu\text{M}/\text{時}/\text{g 肝臓}$

それぞれの対照群に対する有意差 a: $P < 0.001$ b: $P < 0.01$ c: $P < 0.02$ d: $P < 0.05$

2) 及び 3) の 1) に対する有意差: $P < 0.001$

②の①に対する有意差: $P < 0.05$, ③④の①に対する有意差: $P < 0.01$

及び硫酸の供給源としても重要である。したがって、凍豆腐に比べて納豆が効果があったのは納豆に含まれるパントテン酸の影響を無視できないであろう。納豆にパントテン酸の多いことは石黒¹¹⁾が報告している。また納豆を加えたものに比べ、メチオニン入り納豆を配合したものがラットの発育を改良したのはメチオニンの効果と考えてよいであろう。

肝臓中のリボフラビンとパントテン酸含量は納豆を配合したものでは凍豆腐を配合して与えたものより多く、これらビタミンが納豆により、凍豆腐よりも多く供給されたことを示した。また抗酸化剤添加群ではこれらビタミンの含量が単位重量当たり減っているのは解毒のために消耗されたためと考えられるが体重当たりの含量からみればそれほど減少はなかった。抗酸化剤を加えると肝臓が肥大したが、これは抗酸化剤の解毒のため肝臓中の薬物代謝酵素を包蔵する滑面小胞体が増加したためであり、副腎が肥大したのは副腎皮質ホルモンの過度の生産のためであろう。

肝臓で解毒を行う酵素の1つである脱メチル酵素は、凍豆腐や納豆によりたん白質が飼料中に増加するとわずかに増し、BHTの添加により肝臓が肥大するとともに著しく増加した。これはBHTを解毒するために酵素が増したためと考えられる。この酵素活性はBHT添加飼料でも凍豆腐や納豆を配合した飼料を与えたほうが高まったのは飼料中たん白質レベルの上昇とアミノ酸パターンの改善やビタミン類の補足の結果、肝臓の解毒力を高めるのに役立ったためであろう。

Gauntら¹²⁾は毒物がラットに与えられ肝臓肥大を起こすようなとき、尿中アスコルビン酸の排泄が増すことを認め、これを肝臓機能の亢進度を示すよい目安としているが、われわれの実験でもBHTが与えられた時に、尿中アスコルビン酸の排泄が高まった。

われわれが今回はじめて試作したメチオニン入り納豆は大豆たん白の栄養価を改善しているので、これを副食として用いれば白米食の栄養価をより高めることができると思われる。原料大豆にメチオニンを1%添加しても出来上がった納豆は無添加のものと風味、香りにおいて差がないから実際化出来よう。小柳ら¹³⁾は日本人の食物にパントテン酸とメチオニンが不足しやすいことを報告したが、メチオニン入り納豆はこれらの不足を軽減するのに役立つと考えられる。

要 約

- (1) 白米、大豆油、味噌、キャベツを主体とするラットの飼料にBHTを0.3%添加して28日間飼育したところ、体重増加は対照群の約半分以下となったが、納豆及びメチオニン入り納豆を与えたとこの発育障害は緩和された。
- (2) BHT添加で肝臓肥大とともに肝臓の脱メチル酵素活性が高められていることを認めた。
- (3) 肝臓単位重量当たりのリボフラビンとパントテン酸含量は納豆及びメチオニン入り納豆を与えたラットで高い値を示し、BHTを添加すると低下する傾向を示した。
- (4) BHT添加試験で納豆及びメチオニン入り納豆の効果が認められたので、これら食品の解毒における効果を考察した。

凍豆腐は旭松凍豆腐株式会社（飯田市）、メチオニンは日本化薬株式会社の寄贈によるものである。パントテン酸定量その他について助力をいただいた武藤通子嬢に感謝する。

文 献

- 1) Johnson, A.R. and Hewgill, F.R. : *Aust. J. Exp. Biol. Med. Soc.*, **39**, 353 (1961)
- 2) Gilbert, D. and Goldberg, L. : *Food Cosmet. Toxicol.*, **3**, 417 (1965)
- 3) 野中 修, 細野道子 : 栄養と食糧, **23**, 161 (1970)
- 4) 小柳達男, 中原経子 : 常磐短大報, **2**, 35 (1973)
- 5) Mueller, G.C., Bowman, G. and Herranen, A. : *Anal. Chem.*, **27**, 1357 (1955)
- 6) McCarthy T.E. and Sullivan, M.X. : *J. Biol. Chem.*, **141**, 871 (1941)
- 7) Skeggs, H.R. and Wright, L.D. : *J. Biol. Chem.*, **156**, 21 (1944)
- 8) Howard, A.N. and Constable, B.J. : *Proceed. Nutr. Soc.*, **24**, 110~11(1965)
- 9) Standal, B.R. : *J. Nutr.*, **81**, 279 (1963)
- 10) Astill, B.D. et al. : *Biochem. J.*, **75**, 543 (1960)
- 11) Ishiguro, K. : *Tohoku, J. Exp. Med.*, **78**, 375 (1963)
- 12) Gaunt, I.F. et al. : *Food Cosmet. Toxicol.*, **3**, 433 (1965)
- 13) 小柳達男, 中原経子, 鷹鷲テル, 及川桂子, 赤沢典子 : 栄養と食糧, **27**, 211 (1974)

(受付 : 昭和55年 9 月 4 日)