綜 説

蛋白質の栄養価測定法について

On the Estimation of Nutritive value of Protein

神 立 誠
(Makoto Kandatsu)

I は し が き

蛋白質の栄養上の役割は熱量としては20%以下であるから、エネルギーを供給する栄養素ではなく、その構成成分であるアミノ酸が体組織蛋白質の材料として、また特有な組織成分、例えばクレアチン、ポーフリン、プリン、ある種のホルモン等の材料として用いられるためである。体の組織のアミノ酸要求量は、その組織によつて異なる筈であり、生理的状态が変ればその組織の合成能力も変つてくると考えられるから、動物全体として見た場合には蛋白質の要求量も変つてくる筈である。その著しい例は生長中の動物と、成長してしまつた動物の蛋白質要求量が異なる事であつて、妊娠、泌乳、産卵等の場合に就ても同様である。また組織の蛋白質代謝は変り易いという点からあるアミノ酸が不足した場合には窒素出納は0であり、体重は維持している場合でも、ある特定の組織のアミノ酸含量が低下することがあり、¹⁾ 各組織間にはそのアミノ酸に対する競合 (competition) がある。即ち代謝回転の極めておそい組織に欠乏の症状が現われるまでには長い期間を必要とすることになり、短期間では前に述べたように窒素平衡を保つているからといつてその蛋白質が栄養上完全であるとは断定できない。換言すると、一つの方法だけでは蛋白質の栄養価の評価は不十分な場合があると考えられる。

また蛋白質の評価には例えばビタミンの評価等とは本質上異なつた点がある。ビタミンでは一時に、多くの場合一つのビタミンを問題にして評価することができるけれども、蛋白質の場合には少なくとも必須である9~10種のアミノ酸の含量を問題にしなければならないし、又アミノ酸相互のバランスの問題がある。

近時蛋白質栄養に関する研究が進んできたために、従来の評価法は再検討され、またいくつかの新しい方法も提唱されてきている。これらの方法で評価された蛋白質の栄養価は測定方法が異なるから当然その価も異つてくる。

従つて、数種の方法を比較検討するためには標準蛋白質を決める必要も生じてくると考えられる。

II 蛋白質の評価法——旧法

(a) 生長試験及び Protein Efficiency Ratio

幼白鼠に種々の蛋白質を与えてその成長に及ぼす影響を見ることは、蛋白質の栄養価判定法としては広く古くから用いられている Osborne 及び Mendel によつて創始された方法であつて、この方法は更に発展させられて Protein efficiency ratio (P.E.R.) という概念にまとめあげられた。²⁾ Protein efficiency ratio = 摂取蛋白質 1g 当りの体重増加 g。

P.E.R. は食物中の蛋白質含量によつてその値が変るので——例えばカゼインでは12%、ラクトアルブミンでは7.9%で最大の値をとる——10%の含量で習慣上その値を求めている。蛋白質の栄養価が高ければ高い程、食物中の蛋白質含量は低い点で P.E.R. は最高値をとる。

この事実は最適の効率を示すために、蛋白質中のアミノ酸は適当なバランスが必要であることを意味しているもので、後に Barnes ³⁾ によつて二十日鼠を用いるように改良されている。

P.E.R. そのものの内容に就ては Hegsted ⁴⁾ は多数の実験をして体重の増加割合に殆んど完全に平行な値であるから、別に体重増加そのものを比較する以上の内容は持ち得ないことを述べ、従つて毎日の飼料摂取量は測る必要がないといつている。

(b) 窒素出納法

(i) 生物価

蛋白質の評価法として古く(1909) Thomas により成人に関して唱えられ、後 Mitchell により改良され、生長中の白鼠に就て成長と維持に対する要求量を含むようになった周知の方法で窒素の出納から求める方法である。

$$\begin{aligned} \text{生物価} &= \frac{\text{体内に保留された窒素量}}{\text{吸収された窒素量}} \times 100 \\ &= \frac{\text{吸収された窒素量} - (\text{蛋白給与時の尿中窒素量} - \text{摂取窒素量} - (\text{糞中窒素量} - \text{metabolic} \\ &\quad - \text{無蛋白時の尿中窒素量}))}{\text{fecal nitrogen}} \times 100 \end{aligned}$$

この生物価という概念のもつている意味は吸収された

蛋白質 100 部に対する動物体内での体蛋白質の消耗を補う割合であつて、P. E. R. よりはその内容がより正確に規定されていると考えられる。測定の実際に当つては動物飼育、糞尿の分離、窒素の定量等に可成の困難があり、また理論上では後述する endogenous nitrogen の問題と metabolic fecal nitrogen (M. F. N.) の量の問題、即ち無蛋白食のときの M. F. N. 量と供試食の場合の量とが等しいか否かという点が疑問のまま残されている。この点は高濃度の重窒素化合物が得られるようになってきたから実験的に解決できるように思われる。

蛋白質の生物価には消化吸収率は無関係であるが、これでは利用する場合に不便なので、消化率更に食品中の蛋白質含量までを考慮した Net protein value を用いることがある。

$$\text{Net protein value} = \text{蛋白質含量}(\%) \times \text{消化吸収率}(\%) \times \text{生物価}(\%)$$

(ii) 内生窒素 (Endogenous nitrogen)

O. Folin⁵⁾ が多数の人間を用いて食物中の窒素及び尿中の窒素化合物を分別定量した結果をまとめて蛋白質の代謝型式に二つ (Endogenous 及び Exogenous) あることを提唱したのは 1905 年で、その後長い間この説が充分検討されたか否かは余り明らかではないが、實際上の説明には大した破綻をみせずにより用いられてきた。Folin の説は蛋白質代謝には二つ型式があつて、一つは食物中の蛋白質の供給割合によつて直接左右され、異化される型式で Exogenous と呼び、尿中の尿素量によつて代表される。他の一つは Endogenous と名づけられたもので、第一義的には種々の生理的活性によつて左右されるもので、蛋白質の供給割合によつては全くではないが、影響されること少い型式であつて、尿中のクレアチニン及び尿酸含量によつて代表されるものである。尿中尿素量が蛋白質の供給割合によつて激しく変動すること及び尿中クレアチニン及び尿酸含量が殆んど一定であることは Folin の後多数の研究者によつて確認されている。1942 年になつて R. Schönheimer⁶⁾ は重窒素アミノ酸を窒素平衡の状態にある白鼠に与えて、その重窒素が体蛋白質にも incorporate された事実を基にして蛋白質代謝は Folin の説のように二つの型式に分れているものではなく、一つの pool があつて、そこに食物からの蛋白質も入つていき体組織の蛋白質は pool から材料をとつて蛋白質中の窒素を交換 (生成及び分解) しているという “Dynamic state” にあるという説を唱え、現在圧倒的の多くの支持を得ており、特に生化学関係の研究者は滔々としてこの説を支持しているといつても過言ではないであろう。

然し後者の説に反対するものも絶無ではない。その著しい例は蛋白質の生物価を今日まで発展させた Block

や Michell^{7,8)} の反対である。その要点は白鼠及び豚の単位表面積当り尿中窒素排泄量は食物中の蛋白質含量がある範囲で変化しても単位表面積当り吸収量をとれば直線関係になり、この範囲は蛋白質の生物価によつてきまる。例えば卵蛋白では 55mgN/100cm² であり、牛肉蛋白では 85mgN/100cm² である。またこの直線が尿中窒素排泄量の軸をきる点は蛋白質 0 とした時に尿中排泄量の軸をきる点と同一であるから Endogenous nitrogen は略一定であるということを考えないでは説明し難いという点である。

又数人の同位元素を用いた実験結果からも、絶食中の動物にはアミノ酸プールに関係のある二つの貯蔵所があつて、その一つは組織のアミノ酸と速かに反応するが、他の一つは不可逆的に水解を受けるようなものであつて、同位元素を用いての実験結果も endogenous metabolism の性質を明らかにしたものであると述べている。

昨年の酵素化学シンポジウムに於ても R. J. Block は同様の意見を発表している。

蛋白質の栄養価を評定するという事それ自身は、吾々のためにする主として技術的な問題である。

然しそれもその根底にある理論なしには正確さを望み得ない状態にまで立ち到つていることをこの論争が示しているように思われる。

一方に Dynamic state の見解は多くの生化学者に受け入れられ、栄養を基点とした研究者には二元説を主張していることは、ここに同一の現象を研究する二つの立場の者の吻合点の一つを見出したともいえよう。将来の研究に期待したい点であり、Endogenous nitrogen は蛋白質の最少必要量を決定するためにも一層の研究が必要と思われる。蛋白質栄養に関する諸説に就ては他日稿を改めて述べてみたいと考えている。

(iii) Nitrogen balance index

Allison らによると成犬は管理をよくすると所謂 Endogenous nitrogen 量は可成よく一定となるから窒素出納に対して吸収窒素量を画くと直線となり、この線は窒素出納が (-) から僅かに (+) の処で直線性が強い。従つて窒素出納 0 附近の値は信頼し得る値とみなされる。

窒素出納: y , 吸収窒素量: x とすると直線は

$y = a + bx$ となる。 b は直線の傾斜角の tangent に相当するもので、生物価 100 のものであれば 1g 吸収すれば窒素出納は 1g 増加し、 b は 1 となり、傾斜角は 45° となる。生物価が 100 より小さければ b は 1 より小さくなる。この b を nitrogen balance index といつて蛋白質の価値判定の一つに用いられ 100 をかけると生物価になる。これは前述の生物価の場合のように無蛋白食の時の窒素排泄量を求めなくてもよいので、この難点

はさけられるが、出納試験であることは変りがないので長期に亘る点、及び endogenous nitrogen にその根底をおいているから、これが仲々に一定になり難いために結局直線になり難いという欠点がある。

以上の二方法の改良法¹⁰⁾ともいうべきものに、全卵蛋白質は殆んど 100 に近い生物価をもっている事は多数の実験で確認されているので、全卵蛋白質を低レベルで用いて endogenous nitrogen 量測つて、この値を用いて他の蛋白質の生物価を求めるという方法も考案されている。

Ⅲ 蛋白質再生法

成長した動物を一定期間無蛋白食で飼うと体蛋白質は分解されるが、その時に動き易い肝臓や血漿蛋白質は減少量が多い。この様な状態にしておいて供試動物に蛋白質を与え、肝臓や血漿蛋白質が増加する量で蛋白質の栄養価を判定しようとする方法で、必須アミノ酸要求量の検討に用いられたが、有名なアミノ酸混合物を用いた Rose の実験結果とよく一致した結果が得られた。そのまとめたものを第1表¹¹⁾に掲げる。

第1表 白鼠の生長、再生、維持に対する必要量

	再 生	比	体重維持	比	生長	比
	mg/四/日		mg/100cm ² /日		%	
トリプトファン	14.5	1	2.2	1	0.2	1
フェニールアラニン	45	3.1	6.0	2.7	0.7	3.5
ロイシン	72.5	5	8.0	3.6	0.8	4
イソロイシン	61	4.2	13.7	6.2	0.5	2.5
メチオニン	39	2.7	7.3	3.3	0.6	3
スレオニン	43	3.0	5.3	2.4	0.5	2.5
リジン	58	4.0	4.5	2.0	1.0	5
ヒスチジン	21.5	1.4	2.2	1.0	0.4	2
バリン	51	3.5	10.0	4.5	0.7	3.5

これら9種の必須アミノ酸相互の比は全卵蛋白質中の比によく似ている。また Rose の生長試験の結果とを対比すると著しく異るのはリジンであつて、再生法には近いが体重維持の場合よりは可成大きい。

これはリジンの生理作用の一面をはつきり現わしたものと興味深く感じられる。

本法に対しては無蛋白食飼育の期間、次いで蛋白食給与の方法、蛋白質のレベル等に就て詳細な検討が行われており、その条件下で実験を行う必要がある。以上の実験動物は白鼠であるが、肝臓の窒素量の増減では判定は困難であるという報告¹²⁾が出されている。

Ⅳ アミノ酸含量比較法

全卵蛋白質の生物価は 100 に近いことから Block 及

び Mitchell¹³⁾ らはアミノ酸含量の点で制限因子となっているある蛋白質のアミノ酸含量を全卵蛋白質のそのアミノ酸含量に対する%として現わすとその蛋白質の生物価との間には第1図のような強い相関のあることを見出した。

第 1 図

その式は y : 生物価, x : 必須アミノ酸の必要量と比較した不足の%

$$y = 102 - 0.634x$$

となる。この式によりある蛋白質の必須アミノ酸含量を知れば、そのうちの x に最大の値を代入すると生物価が求められる。

第1図からも分るように、こうして求めた値は少し高くでる、その理由は全卵蛋白質の生物価は 96 であるのを 100 としたためであるから、十数種の蛋白質の必須アミノ酸含量に 100/生物価 を乗じてアミノ酸含量を算出し、それを比較して最低量を集めて、ideal protein を考え、これを全卵蛋白質の代りにすると、その直線より求められる値は前の直線よりもよく当てはまるようになる。第2表に ideal protein の求め方をあげる。

第2表

蛋白質源	全卵	牛乳	白米	牛心臓	カゼイン	落花生	ideal protein
生物価	90	90	75	74	69	58	100
Arg	6.7	4.7	9.6	9.9	5.1	15.8	4.7
Hist	2.2	2.9	2.0	3.6	4.4	3.6	2.0
Lys	7.6	8.3	4.3	9.9	11.4	5.1	4.3
Trypt	1.6	1.8	1.7	1.9	1.7	1.7	1.6
Tyr	4.7	5.8	7.5	5.9	10.0	7.5	4.7
PhAl	6.6	6.3	8.9	6.8	8.1	9.1	6.3
計	11.3	12.1	16.4	12.7	18.1	16.6	11.3

Cyst	2.5	1.1	1.9	1.6	0.4	2.6	0.4
Meth	4.3	3.7	4.5	4.3	2.0	5.1	2.0
計	6.8	4.8	6.4	5.9	5.5	4.6	4.6
Threo	5.1	5.0	5.5	6.3	6.0	2.6	2.6
Lenc	9.6	12.4	12.0	11.2	11.1	11.9	9.6
Isolenc	8.3	9.4	7.1	6.9	9.4	5.1	5.1
Val	7.6	9.2	8.4	8.4	9.7	11.4	7.6

本法は蛋白質中のアミノ酸の定量法が急速に正確になつてきている点及び各種の動物に対するアミノ酸の要求量も、次第に正確になつて行く点から信頼性を増して行くと考えられる。一方、前にも述べたように蛋白質栄養に関する基礎知識は、この方法によつて得た結果をそのまま信頼できる程にはまだ進歩していないと認められるから、動物による検定はなお続けて行く必要があるであらう。

V 酵素活性による方法

前の組織再生法の項で述べたように、肝臓の重量は蛋白質栄養の状態によつて大きく変化するが、更にその中に含まれる酵素の活性も亦大きな影響を受ける。肝臓は酵素の集団そのもののようなものであつて、多数の酵素を含んでいるが、蛋白質栄養に敏感なものとしてでないものがある。前者には Xanthin oxidase, Arginase 等が代表的なもので、就中前者は非常に食物中の蛋白質（必須アミノ酸含量）に敏感に反応するので、この活性を測定し蛋白質の栄養価を比較しようとする方法である。¹⁴⁾ その方法の概略は白鼠数匹を一群として、一種の蛋白質に就てはその含量のレベルを上げて給与するか、一定の含量で各種の蛋白質を与えるかして9~10日飼育後、屠殺、肝臓をとりだし秤量、一部に就て窒素含量を測定し、他方そのホモジネートについてワールブルグ検圧計を用いて、ヒポキサンチンを加えてこれがキサンチンに酸化される際の酸素の吸収量を求め、酵素活性を $\text{mlO}_2/\text{時間}/\text{新鮮肝g}$ で比較する。同様な実験は生長中の白鼠でも行うことができる。本法は蛋白質の評価法としては酵素活性が酵素量に、即ち特定の蛋白質の生成量に比例すると凡そ考えて差支えないから、体重変化等よりも特異性の強いもので、蛋白質の質のわずかな差も認めることができる。

例えば¹⁵⁾必須アミノ酸(E.A.A.)と不欠アミノ酸(N.E.A.)との関係を追究した実験では

N.E.A. 混合物	Glycine 2	DL-Alanine 8.9
	DL-Serine 5	L-Cystine 4.5
	L-Tyrosine 13.4	L-Glutamic acid 66.5

の混合物をつくり、これを E.A.A. 混合物¹⁶⁾に加えて他の栄養素に完全に与えて白鼠を飼育し、次の実験を行った。

第 3 表

区 分	体重変化	xanthin oxidase 活性	
		g	ml/O ₂
I N.E.A. 7.3%	-2.4	23	
II E.A.A. 8%	+5.1	48	
III E.A.A. 8%	+9.2	120	
+ N.E.A. Nとして0.743 同上			
IV E.A.A. 8%+尿素 同上	+9.9	98	
V E.A.A. 8%+枸橼酸アンモニウム 同上	+8.9	87	

この結果は E.A.A. に N.E.A. 枸橼酸アンモニウム、尿素等を加えると明らかに生長がよくなること示しており、又 N.E.A. 添加の方が尿素添加の場合より、体重増加とは反対に xanthin oxidase 活性が高いのは N. E. A. 中に Cyst. が含まれているためであると説明されている。

蛋白質の評価と関連し、蛋白質栄養の研究に体内酵素活性の増減を指標とする研究は漸く盛んになり、本邦でも芦田教授¹⁷⁾らの一連の研究がある。生化学における蛋白質生成の研究が盛んに行われていることを考えれば、この方向は蛋白質栄養研究の一つの新しい分野といえるだろう。この点も栄養と生化学とをつなぐ一つの交叉点として、一つの境界領域の開拓として今後に期待したい。

引 用 文 献

- 1) R. B. Fischer: Protein metabolism, 166 (1954)
- 2) T. B. Osborne, L. B. Mendel et al: J. Biol. Chem., 37, 223 (1919)
- 3) D. K. Bosshendt, L. C. Ydse et al: J. Nutrition, 31, 23 (1946)
- 4) D. M. Hegsted, J. Warcester: J. Nutrition, 33, 685 (1947)
- 5) O. Folin: Am.J. Physiol, 13, 117 (1905)
- 6) R. Schönheimer: The dynamic state of body constituents (1942)
- 7) R. J. Block, H. H. Mitchell: Nutrition absts & Rev., 16, 249 (1946-47)
- 8) H. H. Mitchell: J. Nutrition, 55, 193(1955)
- 9) J. B. Allison, J. A. Anderson: J. Nutrition, 29, 413 (1945)
- 10) E. E. Sumner, H. B. Pierce et al: J. Nutri-

- tion, 16, 37 (1938)
- 11) A. A. Albanese: Protein & amino acid requiremets of mammals, 45 (1950)
- 12) 森本宏・林弥太郎: 農技研報 G., 6, 131 (1953)
- 13) R. J. Block, H. H. Mitchell: Nutrition absts. & Rev., 16, 249 (1946-47)
- 14) G. Litwack, J. N. Williams et al: J. Nutrition, 47, 299 (1952)
- 15) 同上: J. Biol. Chem., 201, 261 (1953)
- 16) H. A. Lardy, G. Feldolt: J. Boil. Chem., 186, 85 (1956)
- 17) 村松敬一郎・芦田淳等: 日農化誌, 28, 984 (1954), 同上, 29, 725 (1955) 同上 31 603, 607, (1957)
- (東京大学農学部農芸化学科)

グルコースオキシダーゼによるビールの安定化

ビール中に溶存する酵素によつてビールの品質低下が起るので各種の対策がなされているが、どれも現在の所十分とは言えない。この目的にグルコースオキシダーゼーカタラーゼ系を使用すると添加直後から、消費されるまで良好な結果を得ることができた。すなわち、この酵素系による反応は

であり、滅菌したビールに於ても、普通用いられる滅菌温度(60°C)では、酵素活性の減少は僅少であり、酵素処理したビールは、数カ月間新鮮さを保つことができ又滅菌しない生ビールの場合にも、低温保存しなくとも数週間保存することできた。

Use of Glucose Oxidase to stabilize Beer
by D. W. Ohlmeyer: Food Technology, 11,
503-507 (1957) (福岡)

家兎筋肉中のミオキナーゼの精製と諸性質

この研究は、酵素の SH 基の諸性質と加熱に対する安定性についてなされた。

用いた酵素は、家兎の筋肉を冷却して、挽いた後、3時間流水中にて、更に20倍量の水にて6時間透析し、この透析抽出物は、NaHCO₃水溶液にて、pH 6.5 とし、プロパノールを漸次加え、40%にする。沈澱を遠心分離し、pH 7.49 0.033M 磷酸緩衝液に suspend して、3時間透析、沈澱を冷水に suspend し、2N-HCl にて pH 2 とし、5M-NaCl にて処理後、2N-NaOH にて pH 6.5 とすると酵素は上澄液中に安定化する。これを磷酸カルシウム: 粉末濾紙 (1:4) のカラムにて、クロマトを行い、酵素活性部を集め、(NH₄)₂SO₄ にて分別し、0.65~0.85 飽和で沈澱する部分を 25,000 g にて遠心分離し、0.2M-NaCl に溶かし、ポリエチレン容器に貯える。

かくして得たミオキナーゼの性質は次の如くである。

用いた酵素液は、電気泳動から見て単一であり、超遠心分離によつても単一と認められ、等電点は pH 4.3 である。又酵素の最大活性は、pH 7.5 にあり、分子量は超遠心により 21,600 で、1 分子中に SH 基 2 コを含むこ

とが、滴定により測定された。沈降係数 S₂₀ (水溶液) は 1.7×10⁻¹³ である。又超遠心によつて SH 基の可逆的酸化は分子量に変化を与えないことが認められた。

反応は pH 7~8 に於ては、pH が低いほど 2ADP ⇌ ATP+AMP の右へ傾く。

ミオキナーゼは、酸化されると活性を失うが、システインを与えると復活する。酸中で加熱すると、活性を低下せしめるがシステインを添加すると、活性は相当に現われる。

これはまず SH 基の酸化(可逆的)次いで酸素の不可逆的不活性化又は変性を引き起すと思われる。又酸素はガラス容器に保存すると失活し、セロファンで透析しても失活する。この失活はシステインによつても完全には復活せず、ガラスの場合に特にひどい。

The purification and properties of rabbit muscle myokinase.

O. H. Callaghan: Biochem. J., 67, 651 (1957)
(五十嵐)