フェニルケトン尿症用食事素材としての 低フェニルアラニンペプチドの栄養特性

荒井 綜一*, 前田 明子*, 渡辺 道子*
河村 晴次**, 光岡 知足**

* 東京大学農学部農芸化学科

** 東京大学農学部畜産獣医学科

Nutritional Properties of Low-Phenylalanine Peptide as a Foodstuff for Use in Phenylketonuria

Soichi ARAI,* Akiko MAEDA,* Michiko WATANABE,*
Seiji KAWAMURA** and Tomotari MITSUOKA**

* *Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113*

** *Department of Biomedical Science, The University of Tokyo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113*

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) **41**, 147~151 (1988)

A low-phenylalanine peptide mixture (LPP) was produced through enzymatic modification of a milk whey protein concentrate to examine its nutritional properties using normal rats in comparison with those of a simulated amino acid mixture (AAM). Time course changes in portal amino acid levels after meal-feeding, body weight gain, biochemical parameters of blood, weights of certain organs and intestinal flora showed no significant differences between the LPP and AAM diet groups, although the average food intake during meal-feeding was significantly larger in the LPP diet group than in the AAM diet group. The hair of AAM-group rats looked abnormal in comparison with that of LPP-group rats. Collating these results, we concluded that LPP was mostly similar to or sometimes better than AAM with regard to nutritional properties, as far as could be determined in the present experiment with normal rats.

(Received October 16, 1987)

フェニルケトン尿症 (PKU) は先天性アミノ酸代謝異常症の代表例である¹⁾²⁾。PKU 患者は中枢神経障害を回避するために、フェニルアラニン制限食事を摂り続けなければならない³⁾。著者らは、現行の低フェニルアラニンミルク素材である遊離アミノ酸混合物に代わって、呈味性に優れた低フェニルアラニンペプチド混合物を大規模に生産するプロセスを開発し⁴⁾⁵⁾、このプロセスの妥当性⁶⁾と製品の物理化学的性質⁷⁾について明らかにした。このプロセスは実用化され、製品は臨床試験に供されて、概して良好な成績が報告されている⁸⁾。

本報はラットにおける低フェニルアラニンペプチドの栄養特性に関するものであり、初めに吸収特性、第2に

血液およびその他の器官の生物学的および生化学的パラメータに与える効果、第3に腸内細菌に与える影響について報告する。

材 料 と 方 法

1. 低フェニルアラニンペプチド混合物 (LPP) およびアミノ酸混合物 (AAM) の作成

LPP は前報⁴⁾の方法で作成した。AAM は LPP と同等のアミノ酸組成になるように市販アミノ酸を混合して作成した⁶⁾。LPP および AAM は両者ともフェニルアラニンレベルは 0.45% であった。

2. 飼 料

窒素源として LPP を用いて P₀ および P_f 飼料を、AAM を用いて A₀ および A_f 飼料を調製した。P₀ お

*,** 〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

Table 1. Diet composition.^{a)}

Ingredient	Diet			
	P ₀	P _f	A ₀	A _f
LPP	13.6 ^{b)}	13.6 ^{b)}		
AAM			11.0 ^{b)}	11.0 ^{b)}
Phenylalanine		0.6		0.6
Tyrosine	0.8	0.2	0.8	0.2
Tryptophan	0.1	0.1	0.1	0.1
α -Corn starch	64.85	64.85	67.45	67.45
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0
Soybean oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture ^{c)}	4.0	4.0	4.0	4.0
Cellulose powder	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride	0.15	0.15	0.15	0.15
Vitamin mixture ^{d)}	0.5	0.5	0.5	0.5

^{a)} Weight %. ^{b)} 1.5 g as nitrogen/100 g diet.

^{c)} Na, 190 mg%; K, 450 mg%; Ca, 360 mg%; Mg, 41 mg%; P, 290 mg%; Cl, 370 mg%; Fe, 6.8 mg%; Cu, 0.2 mg%; Zn, 2.2 mg%; As, <0.1 ppm; and heavy metals, <1.5 ppm.

^{d)} A, 1,420 IU; B₁, 0.4 mg%; B₂, 0.6 mg%; B₆, 0.4 mg%; B₁₂, 0.015 mg%; D, 310 IU; E, 4.4 mg%; niacin, 5.3 mg%; pantothenic acid 2.1 mg%; and folic acid, 2.8 mg%.

よび A₀ 飼料はフェニルアラニンを補足せず、チロシン (0.8 g/100 g 飼料) およびトリプトファン (0.1 g/100 g 飼料) を補足した飼料であり、P_f および A_f 飼料はフェニルアラニン (0.6 g/100 g 飼料), チロシン (0.2 g/100 g 飼料) およびトリプトファン (0.1 g/100 g 飼料) を補足した飼料である。各飼料の組成は Table 1 に示したとおりである。対照として、乳清タンパク質 (雪印乳業, 商品名; アスプロ LA) およびカゼイン (Merck, Hammarsten カゼイン) を窒素源として用いた飼料を調製した。乳清タンパク質飼料とカゼイン飼料の組成は、それぞれのタンパク質 10.0%, α -コーンスターチ 69.35%, スクロース 10.0%, 大豆油 5.0%, ミネラル混合 (Table 1 脚注参照) 4.0%, セルロース 1.0%, 塩化コリン 0.15%, ビタミン混合 (Table 1 脚注参照) 0.5% である。すべての飼料粉末は同重量の水と混合してラットに与えた。

3. 飼育

初体重 160~180 g の Wistar 系雄ラットを固形飼料 (オリエンタル酵母) で 7 日間、さらに乳清タンパク質飼料で 3 日間ミールフィーディングした。このミールフィーディングは毎日午前 11 時から始めて、10 日間かけて摂食時間を 10 時間から 1 時間にまで短縮した。このよう

に訓練したラットを 1 群 20 匹ずつの 4 群に分け、試験飼料 (P₀, P_f, A₀ または A_f) を 30 分間与え、門脈血中アミノ酸の分析に供した。

一方、初体重 80~90 g の Wistar 系雄ラットを固形飼料で 7 日間飼育してから、1 群 6 匹ずつの 3 群に分けた。各群のラットには P₀ 飼料, A₀ 飼料または固形飼料 (対照) を 20 日間与えてから、生物学的および生化学的試験に供した。これとは別に、初体重 80~90 g の Wistar 系雄ラットを最初の 7 日間固形飼料で飼育し、さらに 20 日間 P₀ 飼料, A₀ 飼料またはカゼイン飼料 (対照) を与え、腸内菌叢の試験に供した。すべての飼育試験中、水は自由摂取させた。

4. 門脈血中アミノ酸の分析

ミールフィーディング開始前および開始後 1, 2, 3 時間の時点で各群 5 匹ずつのラットをペントバルビタールナトリウムで麻酔して、ヘパリン処理した注射器で 0.6~0.7 ml の門脈血を直接採取した。血液を 45,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離して血清を採り、血清 0.2 ml あたり 0.1 ml の 15% スルホサリチル酸を加えてから遠心分離 (8,000 $\times$ g, 5 分間) することによって除タンパクした。この除タンパク血清 (0.6 ml) に 0.75 N 水酸化リチウム (0.6 ml) を加えて、アミノ酸自動分析計 (日立 835 型) で遊離アミノ酸を定量した。

5. 生物学的および生化学的試験

20 日間試験飼料で飼育したラットの血液をペントバルビタール麻酔下でヘパリン処理した注射器で大動脈から採取した。採取した血液は 2 分割し、その一部は 3,400 $\times$ g で 10 分間遠心分離して上澄液について血清 glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT) と glutamate-pyruvate transaminase (GPT) の活性を Karmen⁹⁾ の方法で測定した。他の一部は Drabkin¹⁰⁾ の方法でヘモグロビン量を測定した。また、肝臓、腎臓および脾臓を採り、重量を測定した。

6. 腸内菌叢の分析

試験飼料を 20 日間与えたラット (1 群 18 匹) をペントバルビタール麻酔して小腸下部 (盲腸の上 30 cm) と盲腸を別々に採った。それぞれの内容物 (約 1 g) をすばやく嫌気性希釈液に移し、重量増加から内容物の量を精秤した。嫌気性希釈液の組成は KH₂PO₄ 4.5 g, Na₂HPO₄ 6.0 g, L-システイン塩酸塩 1 水和物 0.5 g, Tween-80 0.5 g, 寒天 1 g および水 1,000 ml である。微生物の測定は光岡¹¹⁾ の方法に従った。培養条件は Table 2 のとおりである。培養後、各選択培地に生育したコロニーを数えた。紡錘菌はグラム染色して菌数を計数した。

7. 測定値の処理

測定値について *t* 検定を行い、データは平均値に標準

Table 2. Culture media and conditions.

Medium	Principal flora enumerated	Atmosphere	Duration of culture
Selective			
NBGT agar	<i>Bacteroidaceae</i>	100% CO ₂	2 days
LBS agar	<i>Lactobacillus</i>	100% CO ₂	2 days
DHL agar	<i>Enterobacteriaceae</i>	Air	1 day
TATAC agar	<i>Streptococcus</i>	Air	2 days
PEES agar	<i>Staphylococcus</i>	Air	2 days
Neomycin Nagler agar	<i>Clostridia</i> ^{a)}	100% CO ₂	2 days
Potato dextrose agar	Yeast	Air	2 days
Non-selective			
BL agar	Anaerobes	100% CO ₂	2 days
Tryptycase soy blood agar	Aerobes	Air	2 days

^{a)} Lecithinase-positive.

Fig. 1. Mean values and their standard deviations of the levels of total free amino acid (a), free tyrosine (b) and free phenylalanine (c) in the portal vein at various times after the start of the 30-min meal-feeding with four kinds of diets.

Five rats were sacrificed for each measurement. In Fig. 1, data on standard deviations are omitted, because any of them was of a value of 0.1 mg/ml or some more.

偏差をつけて表わした。

結果および考察

最初に、門脈血の遊離アミノ酸を測定することによって LPP の吸収特性をしらべた。4 群のラットの門脈血中の全アミノ酸レベルの経時的变化を Fig. 1 a に示した。全アミノ酸レベルは P₀, P_f および A_f 群では 1 時間後に最大に達したが、A₀ 群では 1 時間後よりも 2 時間後のほうが幾分高いようであった。ミールフィーディング後の時間が同じものではどの組合せの 2 群間においても全アミノ酸レベルに有意差がなかった。このことは LPP が正常に吸収されることを示唆している。門脈血

中チロシンはミールフィーディングの 1 時間後に最大レベルに達し、そのレベルはチロシンの補足の有無によって有意に異なっていた (Fig. 1 b)。フェニルアラニンのレベルには二つの型が見られた (Fig. 1 c)。フェニルアラニンを補足した P_f と A_f 群ではチロシンの場合と同じ経時変化を示したが、フェニルアラニンを補足しない P₀ と A₀ 群では、飼料摂取後のフェニルアラニンのレベルは飼料摂取前のそれよりも低下した。これは、おそらく、絶食状態からの快復期に体内アミノ酸プール由来のフェニルアラニンを使ってタンパク質の生成が促進されるからであろう。

ミールフィーディング中の P₀ および P_f 飼料の摂取

量は A_0 および A_f 飼料の摂取量よりも有意に多かった (Table 3)。 P_0 群で飼料を多く摂取したにもかかわらず A_0 群より門脈血のフェニルアラニンレベルが高くならなかった理由については不明である。

第二に、初体重約 140 g のラットに P_0 , A_0 および固形飼料(対照)を与え、体重、血液、臓器および毛の生物学的および生化学的パラメータについてしらべた。結果は Table 4 に示した。体重は P_0 および A_0 群で 110 g にまで減少し、対照群で 320 g にまで増加した。体重に対する肝臓重量と腎臓重量の割合は対照群と P_0 群、対照群と A_0 群の両者で有意差があったが、 P_0 群と A_0 群では有意差はなかった。臓器および血液で得られたその他のパラメータに関しては 3 群間で有意差はなかった。最も異なっていたのは毛の状態であった。 A_0 飼料を与えたラットの毛は粗になり、少し赤味があった。これに比べて、 P_0 飼料を与えたラットでは毛の状態は正常であった。その理由の詳細は未検討であるが、毛の状態は栄養状態に強く依存するという Nielsen¹²⁾ の見解に従う

Table 3. Diet and nitrogen intakes^{a)} during 30-min meal-feeding.

Group ^{b)}	Nitrogen source	Diet intake (g/rat)	Nitrogen intake (mg/rat)
P_0	LPP	5.10±1.50	76.5±22.5
P_f	LPP	5.06±1.64	76.0±24.5 ^{c)}
A_0	AAM	4.16±1.05	62.4±15.7 ^{c)}
A_f	AAM	4.12±1.31	61.8±19.6

^{a)} Mean±standard deviation. ^{b)} Twenty rats for each group. ^{c)} Significantly different ($p<0.05$) between P_f and A_0 .

Table 4. Effects of a 20-day feeding test with rats^{a)} on biological and biochemical parameters.^{b)}

Parameter	Diet		
	P_0	A_0	Reference ^{c)}
Food intake (g/day)	4.64±0.31	4.84±0.42	—
Body weight gain (g/day)	-1.55±0.15	-1.45±0.19	9.31±0.75
Body weight ratio (%)			
Liver	3.66±0.28	3.78±0.16	5.63±0.37
Kidney	0.97±0.04	0.98±0.05	0.79±0.06
Spleen	0.24±0.02	0.24±0.03	0.22±0.03
Blood			
Hemoglobin (g/dl)	16.51±1.36	15.98±2.46	14.59±0.91
GOT (Karmen unit)	62.17±17.0	66.50±17.7	59.17±3.54
GPT (Karmen unit)	17.00±4.47	19.33±6.65	21.50±2.26
Hair	normal	abnormal	normal

^{a)} Six rats for each group. ^{b)} Mean±standard deviation. ^{c)} Laboratory chows.

と、 P_0 のほうが A_0 よりも栄養学的に好ましい飼料であるといえよう。

第三に、腸内菌叢に与える LPP の影響をしらべた。小腸および盲腸内容物の菌数を Table 5 に示した。小腸内容物の総菌数はカゼイン飼料(対照)群で P_0 および A_0 群よりも有意に多く、とくに、*Bacteroidaceae*, *Lactobacillus* および *Streptococcus* に大きな差異が認められ、盲腸内容物についても同様の結果が得られた。 P_0 群と A_0 群間では小腸内容物でも盲腸内容物でも菌数に有意差はなく、また、*Staphylococcus* や *Clostridium* などの有害菌の繁殖が P_0 飼料で飼育したラットの腸管内で認められなかったということを特記する。

本研究で得られた結果を総合すると、正常ラットを使用した実験に関する限り、LPP は AAM と比較して栄養学的に等価あるいは場合によってはそれ以上に良好な性質を有していると考えられる。

要 約

フェニルケトン尿症用食料素材として作成した低フェニルアラニンペプチド (LPP) およびそれと同等のアミノ酸組成をもつ遊離アミノ酸混合物 (AAM) につき、正常ラットを用いて栄養特性を比較して次の結果を得た。

1) ミールフィーディング中の摂食量は LPP 飼料群のほうが AAM 飼料群よりも有意に多かったにもかかわらず、ミールフィーディング後の門脈血中のアミノ酸レベルの経時変化は両群間で有意差はなく、LPP の投与は血中フェニルアラニンレベルの低下に有効であることがわかった。

2) LPP と AAM を長期摂取したラットの体重変化、血液性状および体重あたりの肝臓重量、腎臓重量、脾臓

Table 5. Small-intestinal and cecal floras of rats fed different diets for 20 days.^{a)}

Flora	Diet ^{b)}			Significance ^{c)}		
	P ₀	A ₀	Reference	P ₀ vs. A ₀	P ₀ vs. R ^{d)}	A ₀ vs. R ^{d)}
Small-intestinal flora						
Total bacteria ^{e)}	7.12±0.55 ^{f)}	6.98±0.35	8.67±0.84		**	**
Bacteroidaceae	6.89±0.51	6.69±0.34	8.16±0.43		***	***
<i>Lactobacillus</i>	5.49±0.74	5.69±0.79	7.96±1.20		**	**
Enterobacteriaceae	6.03±1.08	5.96±0.79	5.84±0.72			
<i>Streptococcus</i>	5.64±1.01	5.96±0.40	8.01±1.24		**	**
<i>Staphylococcus</i>	3.91±0.55	3.14±0.34	4.24±1.08	†		†
<i>Clostridium perfringens</i>	— ^{g)}	—	—			
Yeast	—	—	—			
Fusiform bacteria	8.30±0.16	9.12±0.10	8.13±0.29	**		***
Cecal flora						
Total bacteria ^{e)}	9.08±0.24	9.05±0.53	9.52±0.43		†	
Bacteroidaceae	9.01±0.31	9.01±0.52	8.98±0.53			
<i>Lactobacillus</i>	6.39±1.15	5.86±0.60	9.07±0.61		***	***
Enterobacteriaceae	6.63±1.06	6.92±1.21	6.82±0.20			
<i>Streptococcus</i>	6.66±0.90	6.01±0.32	8.27±1.15		*	***
<i>Staphylococcus</i>	2.85±0.53	2.54±0.27	4.22±0.88			*
<i>Clostridium perfringens</i>	—	—	—			
Yeast	—	—	—			
Fusiform bacteria	9.76±0.44	9.84±0.47	10.15±0.35			

^{a)} Eighteen rats for each group.

^{b)} P₀, a low-phenylalanine peptide mixture; A₀, an amino acid mixture; and reference, casein.

^{c)} *t*-test analysis, *** *p*<0.001, ** *p*<0.01, * *p*<0.05, † *p*<0.1.

^{d)} Reference diet.

^{e)} Total bacteria except fusiform bacteria.

^{f)} Mean±standard deviation of log bacterial counts/g small-intestinal or cecal content.

^{g)} Not detected.

重量には飼料間で有意差がなかったが、ラットの毛の状態は AAM で異常であったのに対して、LPP では正常であった。

3) 小腸および盲腸の菌叢に関しては LPP 飼料群と AAM 飼料群の間で有意差はなく、LPP の投与が特定菌とくに有害菌の異常繁殖をもたらすことはなかった。

文 献

- 1) Wong, P.W.-K. and Hsia, D.Y.-Y.: Modern Nutrition in Health and Disease, 5th ed. (Goodhart, R.S. and Shils, M.E., eds.), 1012 (1973), Lea and Fabiger (Philadelphia)
- 2) Föllung, A.: *Z. Physiol. Chem.*, **227**, 169 (1934)
- 3) Hsia, D. Y.-Y.: *Pediatrics*, **38**, 173 (1966)
- 4) Arai, S., Maeda, A., Matsumura, M., Hirao, N. and Watanabe, M.: *Agric. Biol. Chem.*,

50, 2929 (1986)

- 5) Owada, M., Kitagawa, T., Aoki, K., Arai, S., Oura, T. and Matsuda, I.: Advances in Neonatal Screening (Therrell, B.L., Jr., ed.), 205 (1987), Elsevier Science Publishers, Biomedical Division (Amsterdam)
- 6) Maeda, A., Abe, K., Watanabe, M. and Arai, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1501 (1987)
- 7) Arai, S., Maeda, A. and Watanabe, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 287 (1988)
- 8) 北川照男: 特殊ミルク情報, **12**, 29 (1986)
- 9) Karmen, A.: *J. Clin. Invest.*, **34**, 131 (1955)
- 10) Drabkin, D.L.: *Med. Phys.*, **2**, 1072 (1950)
- 11) 光岡知足: 腸内菌の世界 (1980), 養文社 (東京)
- 12) Nielsen, S.W.: Pathology of Laboratory Animals, Vol. 1 (Benirschke, K., Garner, F.M. and Jones, T.C., eds.), 581 (1978), Springer-Verlag (New York)

(1987年10月16日受理)