

<平成25年度助成>

水産物摂取によるリンの過剰摂取抑制効果

福永 健治、細見 亮太、吉田 宗弘

(関西大学 化学生命工学部 食品栄養化学研究室)

リン(P)は全ての生物に必須の元素で、エネルギー代謝をはじめ様々な代謝課程において重要な役割を担っている。しかし、現代の食生活を見ると、加工食品を中心に各種リン酸塩が広く使用されている。国民栄養調査では加工食品に添加されているPは加算されていないため、実際にはこれ以上のPが摂取されている²⁾。長期にわたりPを過剰摂取すると、カルシウム(Ca)の吸収抑制、腎機能の低下、副甲状腺機能亢進などの健康被害を引き起こす可能性が高くなる³⁾。Pの過剰摂取によって吸収が抑制されるCaは、飽食の時代と言われて久しい現在でも推奨量に達していない唯一の栄養素でもある¹⁾。一方、日本の伝統的食品であるかまぼこなどの水産練り製品の原料として用いられる冷凍すり身には、保存時の変性防止や製品の食感向上を目的に重合リン酸塩が添加されている。消費者の食品添加物への関心の高まりから、重合リン酸塩を使用した練り製品は忌避される傾向にある。この影響を受け、無リンすり身が開発されたが、形成される加熱ゲルの物性において劣ることは否めない⁴⁾。

練り製品中の魚肉タンパク質(FP)がPおよびCaの吸収に及ぼす影響について、報告は皆無である。また、一般的にミネラルの吸収利用性は小腸内腔での可溶化が必要条件となることが知られている⁸⁾。そこで、本研究では、FP給餌による生体でのPおよびCa吸収に及ぼす影響を検討するに先立ち、リン酸塩及び重合リン酸塩過剰存在下において、FPがCaの可溶性に及ぼす影響を人工消化試験により評価し、さらにラットを用いた

動物実験によってFPのPおよびCa代謝におよぼす影響について明らかにすることを目的とした。

実験方法

1. タンパク質の調製

FPはスケトウダラ(*Theragra chalcogramma*)から精製し、スケトウダラと脂質含量やタンパク質含量が近いニワトリささ身を対照タンパク質とした。スケトウダラ可食部およびトリささみをミンサーで細切し、冷蒸留水で十分に水洗いした。次いでアセトンによる脱水・脱脂、*n*-ヘキサンによる脱脂を行い、凍結乾燥したものをそれぞれFPおよびCPとした。なお、FPおよびCPの収率はそれぞれ10.5% (wt/wt) および9.1% (wt/wt) であった。

2. 分析方法

粗タンパク質量はミクロケルダール法により求めた。各タンパク質を硫酸および過酸化水素による湿式灰化後、Pはモリブデンブルー法⁹⁾、Caは原子吸光光度計(AA-6200, 島津製作所社製)で測定した。

タンパク質のアミノ酸組成は、常法に従って6M塩酸で110℃、24時間条件で酸加水分解後、フェニルイソチオシアネートによるプレカラム誘導体化後に逆相HPLC法により分析した。

タンパク質の分子量はLaemmliの方法に従い、ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)にて測定した¹⁰⁾。

3. 試料調製

Table 1に人工消化試験に用いた試料の組成を

示した。AIN-93G組成¹¹⁾をもとに、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) でP量を全体の0.3% (通常リン餌料)、 KH_2PO_4 でP量を1.5% (高リン餌料)、ポリリン酸ナトリウム (重合度、3および4) でP量を1.5% (高ポリリン酸餌料) を含む試料を調製した。各餌料のタンパク質源はFPまたはCPとした。またタンパク質をカゼインに100%とした餌料、タンパク質をコーンスターチに100%置換した無タンパク質餌料も同様に調製した。各餌料のFPとCP餌料のPおよびCa濃度は同等となるように調製した。動物実験では、本項で調製方法を示した餌料を試験餌料として用いることとした。

4. 人工消化試験

人工消化試験はHosomiらの方法を一部改変して行った¹²⁾。すなわち各餌料を100mL容三角フラスコに2.5g秤量し、蒸留水50mLを加え、塩酸でpH 2.0に調整し、豚由来ペプシン50mgを加え反応を開始した。37℃、100rpmで振盪し、120分間消化を行った。その後炭酸水素ナトリウ

ム溶液でpH 7.4に調整後、豚由来パンクレアチン40mgを加え同様に120分間消化した。ペプシン消化ではpH 2.0、パンクレアチン消化ではpH 7.4になるように経時的に確認し調整した。

消化開始から240分後まで経時的に人工消化液を1.5mL容ポリチューブに0.2mL採取し、600×g、20秒間遠心分離した上清を分析試料とした。上清のP濃度はモリブデンブルー法⁹⁾、Ca濃度はカルシウムE-テストワコー (和光純薬工業社製) により測定した。なお、高重合リン餌料のPについては、硫酸を添加し90℃で80分間加熱しオルトリン酸に加水分解後測定した¹³⁾。また、上清のアミノ酸量はトリニトロベンゼンスルホン酸吸光度法を用いて加水分解率を求めた¹⁴⁾。

5. 統計処理

得られた測定値は、平均値±標準誤差で示した。統計解析には、Stat View J-5.0 (ヒューリンクス社製) を用い、反復測定による二元配置分散分析を行った。なお、有意水準は $p < 0.05$ とした。

Table 1 Composition of experimental diets.

	Normal-phosphorus diet (P = 0.3%, Ca = 0.5%)		High-phosphorus diet (P = 1.5%, Ca = 0.5%)		High-polyphosphate diet (P = 1.5%, Ca = 0.5%)	
	FP	CP	FP	CP	FP	CP
	g/100 g					
Fish protein (FP群)	19.77	-	19.77	-	19.77	-
Chicken breast protein (CP群)	-	20	-	20	-	20
Dextrinized corn starch	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2
Corn starch	38.759	38.801	33.482	33.529	34.809	34.799
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
AIN-93G mineral mix [†]	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Potassium dihydrogenphosphate	1.221	0.949	6.498	6.221	-	-
Sodium polyphosphate [§]	-	-	-	-	5.171	4.951
AIN-93 vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Soybean oil	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0

Diets were prepared based on the AIN-93G formula.

[†] Excluding KH_2PO_4 .

[§] Containing 28.6% phosphorus (wt/wt).

実験結果および考察

1. FPおよびCPの一般成分組成およびタンパク質性状

Table 2に粗タンパク質、PおよびCa量を示した。FPに含まれるP量はCPと比べ低値であった。CP調製の際にはFPと同様に十分な水洗いを行ったが、P量に差が出たことから、ささ身に含まれるP化合物は遊離しにくい特徴があると推測される。Fig. 1にFPおよびCPのSDS-PAGEの結果を示した。各タンパク質ともに十分に水洗を

Table 2 Chemical composition of FP and CP.

	FP	CP
	g/100 g	
Crude protein	94.2	93.1
Phosphorus	0.11	0.42
Calcium	0.04	0.04

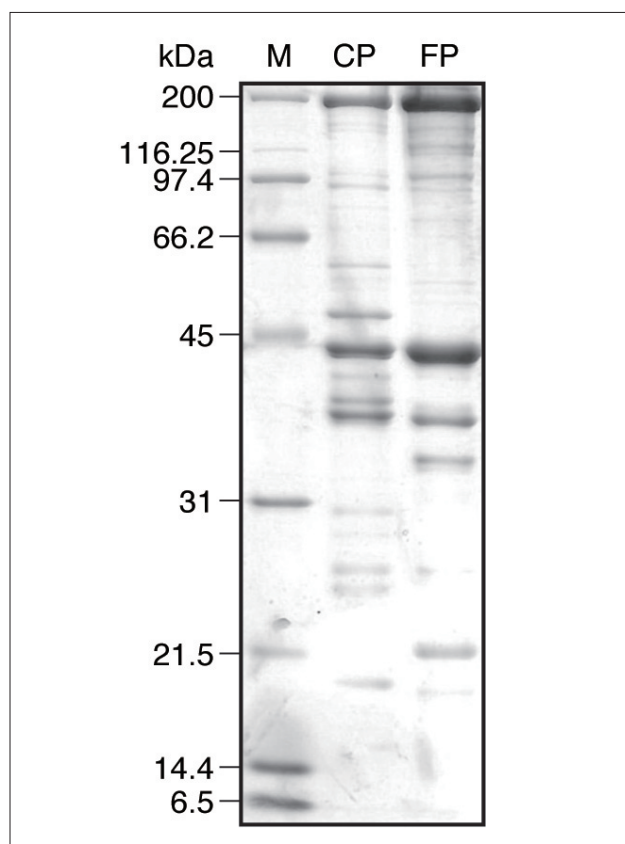


Fig. 1 SDS-PAGE patterns of FP and CP. SDS-PAGE was performed using 15.0% polyacrylamide separation gel; Lane (M), molecular weight marker; Lane (FP), fish protein; Lane (CP), chicken breast protein.

おこなっているために、筋基質および筋形質タンパク質は見られず、筋原繊維タンパク質であるミオシン重鎖（約200 kDa）とアクチン（約45 kDa）のバンドが濃くみられた。またFPおよびCPの主要なタンパク質のバンドに大きな違いはみられなかった。Table 3にFPおよびCPのアミノ酸組成を示した。FPおよびCPのアミノ酸組成についても大きな相違はみられなかった。

Table 3 Amino acid composition of FP and CP.

	FP	CP
	% (wt/wt total amino acids)	
Alanine	6.10	6.10
Arginine	7.03	7.16
Aspartic acid [†]	12.63	11.72
Glutamic acid [§]	18.06	17.63
Glycine	3.82	3.82
Histidine	2.10	2.77
Isoleucine	4.71	5.17
Leucine	8.52	8.76
Lysine	9.70	9.66
Methionine	2.95	2.72
Phenylalanine	3.33	3.79
Proline	2.95	2.65
Serine	4.44	3.93
Threonine	4.68	4.96
Tyrosine	3.92	4.13
Valine	5.06	5.03

[†] Aspartic acid + asparagine.

[§] Glutamic acid + glutamine.

2. 通常リン餌料

Fig. 2Aに通常リン餌料の人工消化過程におけるタンパク質加水分解率を示した。FP餌料はCP餌料と比較し、パンクレアチン消化過程の加水分解率が有意に高かった ($p = 0.01$)。

Fig. 3Aおよび3Bに通常リン餌料の人工消化過程における遊離PおよびCa濃度を示した。CP餌料と比較すると、FP餌料の遊離P濃度はペプシ

ン及びパンクレアチン消化過程で有意に高い値を示した ($p = 0.02$)。しかし、FPはCPよりもタンパク質中に含まれているP量が少ないため、餌料中に含まれるPの化学形態の違いが影響していることが考えられる (Table 2)。またペプシン消化過程では餌料中Pのほとんどが遊離しており、パンクレアチン消化過程では約50%のPが遊離していた。ペプシン消化過程におけるFPおよびCP餌料の遊離Ca濃度は $4.63 \pm 0.17 \text{ mg/g}$ 、 $4.26 \pm 0.11 \text{ mg/g}$ (mean $\pm$ SEM, $n = 3$) であった。しかし、パンクレアチン消化過程ではタンパク質の加水分解率が高くなるにつれて (Fig. 2A)、遊離Ca濃度の低下する傾向がみられ、240分ではFPおよびCP餌料それぞれ、 $0.75 \pm 0.19 \text{ mg/g}$ 、 $0.92 \pm 0.14 \text{ mg/g}$ (mean $\pm$ SEM, $n = 3$) まで低下した (Fig. 3B)。以上から遊離Ca濃度の低下、タンパク質加水分解率とは無関係に餌料中の他の成分が消化されることに起因していると考えられる。しかし、高リンおよび高ポリリン酸餌料でパンクレアチン消化過程における遊離Caの減少はみられなかった (Fig. 3D, 3F)。またカゼイン餌料では、パンクレアチン消化過程の遊離Ca濃度は $2.80 \pm 0.13 \text{ mg/g}$ (mean $\pm$ SEM, $n = 3$) と高値を示したが、これは消化過程に生成したカゼインホスホペプチドにCaが結合し、可溶化されたためであると考えられる¹⁵⁾。

3. 高リン餌料

Fig. 2Bに高リン餌料の人工消化過程におけるタンパク質加水分解率を示した。FP餌料はCP餌料と比較し、ペプシンおよびパンクレアチン消化過程の加水分解率が有意に高かった ($p = 0.03$)。

Fig. 3Cおよび3Dに高リン餌料の人工消化過程における遊離PおよびCa濃度を示した。通常リン餌料と比較し、高リン餌料の人工消化過程における遊離P濃度は、餌料P濃度と同様に約5倍高値を示した。またFP餌料の遊離P濃度は、CP餌料と比較してペプシンおよびパンクレアチン消化過程で高い傾向にあった ($p = 0.10$)。

高リン餌料は通常リン餌料と比較し、ペプシン消化過程の遊離Ca濃度はほぼ同等であったが、パンクレアチン消化過程ではより低値を示す傾向にあった。このことから、高リン餌料中のCaは、オルトリン酸と結合することで可溶化を阻害されていると考えられる。パンクレアチン消化過程におけるFPおよびCP餌料の遊離Ca濃度は $0.47 \pm 0.11 \text{ mg/g}$ 、 $0.39 \pm 0.16 \text{ mg/g}$ (mean $\pm$ SEM, $n = 3$) であった。FP餌料では遊離P濃度が高値な傾向があり ($p = 0.10$)、Caとの不溶化を抑制していることが期待されたが、遊離Ca濃度との関連は確認されなかった。カゼイン餌料のパンクレアチン消化過程における遊離Ca濃度は $3.20 \pm 0.23 \text{ mg/g}$ (mean $\pm$ SEM, $n = 3$) であり、高リン

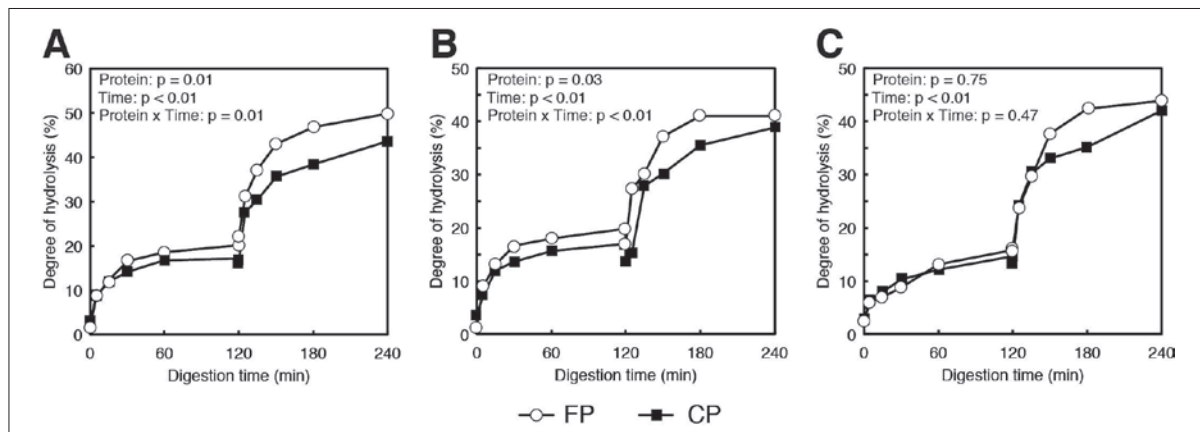


Fig. 2 Course of protein digestibility of FP and CP diets prepared using pepsin (added at time 0 min) and pancreatin (added at time 120 min) digestion. Each point represents means $\pm$ SEM ($n = 3$). Degree of hydrolysis = Amino acid content of supernatant / Amount of protein $\times 100$ (A) Normal-phosphorus diet, (B) High-phosphorus diet, (C) High-polyphosphate diet.

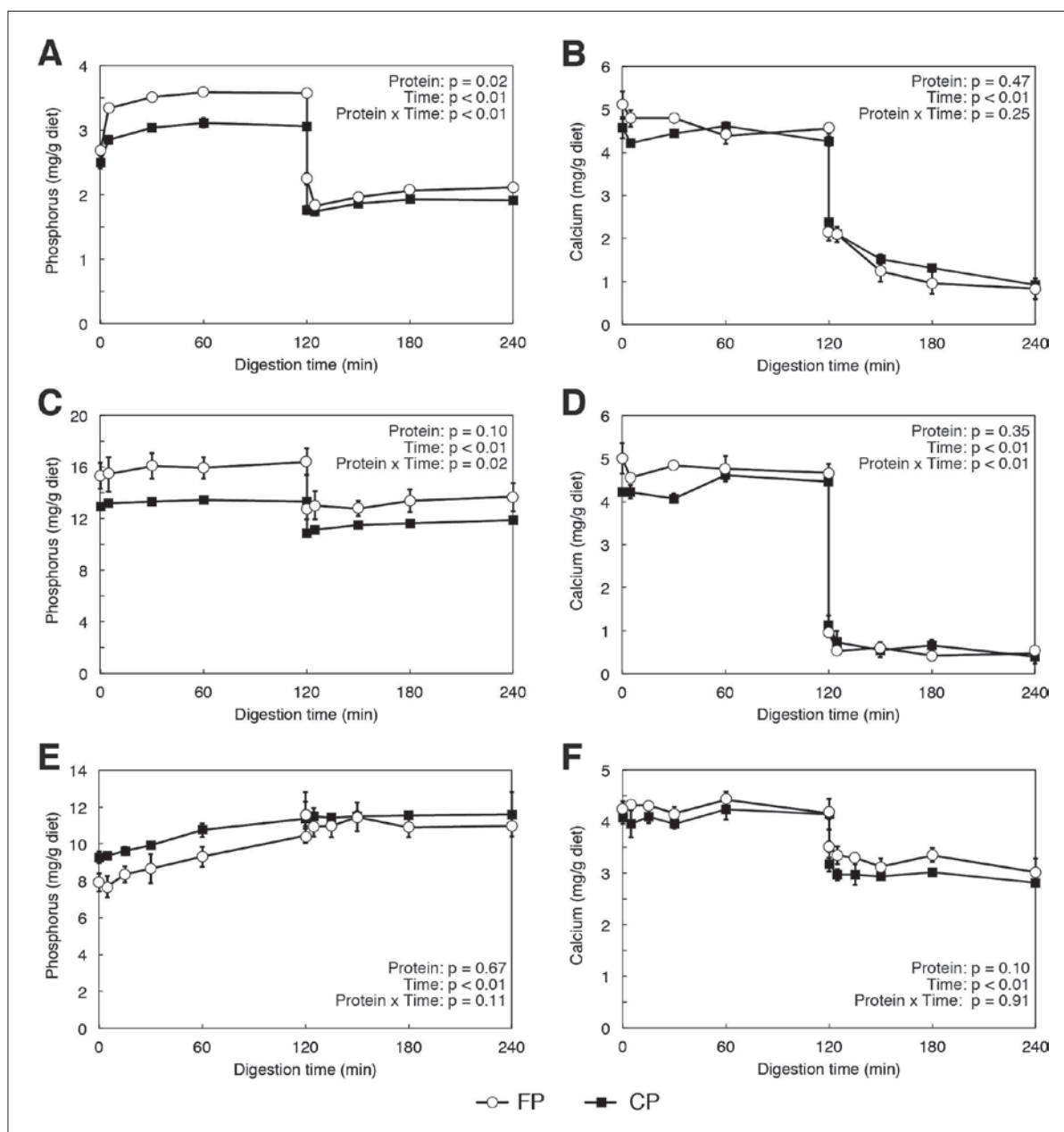


Fig. 3 Course of soluble phosphorus and calcium concentration prepared using pepsin (added at time 0min) and pancreatin (added at time 120 min) digestion.

Each point represents means $\pm$ SEM ($n = 3$).

(A) Soluble phosphorus content of normal-phosphorus diet, (B) soluble calcium content of normal-phosphorus diet, (C) soluble phosphorus content of high-phosphorus diet, (D) soluble calcium content of high-phosphorus diet, (E) soluble phosphorus content of high-polyphosphate diet, (F) soluble calcium content of high-polyphosphate diet.

餌料においても通常リン食と同様に高値を示した（データ未掲載）。一方、無タンパク質餌料の遊離P濃度はほぼ0 mg/gであったことから（データ未掲載）、FPおよびCPはカゼインより微弱であるが高リン条件下でCaを可溶化させていると予測される。

4. 高ポリリン酸餌料

Fig. 2Cに高ポリリン酸餌料の人工消化過程におけるタンパク質加水分解率を示した。FP餌料はCP餌料と間で有意な差はみられなかった。

Fig. 3Eおよび3Fに高ポリリン酸餌料の人工消化過程における遊離PおよびCa濃度を示した。

遊離P濃度は、通常リンおよび高リン餌料とは異なり、パンクレアチン消化に移行する際のpH変化では大きな影響を受けなかった。高リン餌料と比較し、各餌料ともに遊離P濃度が低値を示す傾向にあったことから、重合リン酸は可溶化しにくいことが考えられる。各餌料で遊離P濃度の有意な上昇がみられたが($p < 0.01$)、ペプシン消化過程で含まれる塩酸によるポリリン酸の加水分解が起き、可溶性が高くなったと考えられる。パンクレアチン消化過程の遊離Ca濃度は、通常リン食・高リン食と比較し高値を示す傾向にあった。この結果から、ポリリン酸餌料ではpHの変化によって遊離P濃度の溶解性が変わらないため、遊離Ca濃度はPの影響を受けずにpHの変化のみが影響していると予測される。またポリリン酸はオルトリン酸よりCaと結合しにくく、高ポリリン酸条件下では逆にCaの可溶化を促進している可能性もある。今後詳細なメカニズムについて検討していく必要があると考えられる。一方、FP餌料の遊離Ca濃度は、CP餌料と比較し高い傾向にあった($p = 0.10$)。食品から摂取したCaは、小腸上部では活性型ビタミンDによる調節を受けるCaトランスポーターから能動輸送で吸収され、小腸下部では濃度差による受動輸送で吸収される¹⁶⁾。EDTAキレート態の利用性で論じられているように、可溶性がただちに生体内での利用性を反映するとは限らない。しかし、ミネラルの吸収は可溶化が必要条件となる¹⁷⁾。そのためパンクレアチン消化過程は小腸内を想定しているため、FP餌料における遊離Ca濃度の上昇傾向はCa吸収を促す可能性があると考えられる。

人工消化試験の結果からは、Ca可溶化に及ぼす重合リン酸塩の影響はオルトリン酸塩よりも小さく、またFPはカゼインと比較し、Caの可溶化を促す傾向があることが確認された。本研究の最終目的は、魚肉タンパク質の摂取が高リン酸食の影響、すなわち動脈硬化や腎機能、骨粗鬆症に対

して抑制的に作用するかを評価することにある。しかし、ポリリン酸は小腸刷子縁膜に存在するホスファターゼによって加水分解を受けるが、人工消化試験ではホスファターゼを含まないために加水分解が起きていない¹⁸⁾。

現在、高ポリリン酸およびオルトリン酸餌料におけるFPのPおよびCa吸収、排泄に与える影響についてラットを用いた動物実験を実施し、解剖を経て試料を得ている。血清および糞のPおよびCa量、大腿骨Ca量の定量を行い、さらに腹部大動脈を摘出して血管内壁の病理切片解析、各種Ca依存性酵素活性の評価を実施中である。ホスファターゼの影響については、本動物実験の結果から判断せざるを得ない。

これまでにアミノ酸組成の違いがCa吸収に影響を与えることが報告されており、ヒスチジン、グリシン、アルギニンは促進、スレオニン、グルタミン酸、アスパラギン酸は抑制する¹⁹⁾。本研究に用いたFPおよびCPのアミノ酸組成を比較すると、Ca吸収に影響を与える各アミノ酸濃度に大きな差はみられなかった(Table 3)。しかし、通常リン餌料・高リン餌料において、人工消化過程での消化率はFP餌料で有意に高い値を示した(Fig. 2)。以上から高ポリリン酸餌料で確認されたパンクレアチン消化過程におけるCa可溶性の増大は、消化過程で生成されるペプチド相違が影響している可能性がある。タンパク質加水分解物に含まれるペプチドにCaと複合体を形成し可溶化を促す効果が報告されているが^{6,7)}、実際に経口摂取した場合については、脂肪などの消化産物、界面活性作用を有する胆汁酸の影響があるため、Ca可溶性のみで評価できないと考えるのが妥当である。これらについては、現在、解析中の生体試料を用いた結果と人工消化試験の結果とを比較検討して、高P摂取時に魚肉タンパク質が及ぼす影響について総合的に判断したい。

謝 辞

本研究の実施にあたり、多大な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者の皆様に心より感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 厚生労働省 (2014) 平成24年国民健康・栄養調査報告. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/h24-houkoku.html>: pp. 54–65, 2014年8月9日アクセス.
- 2) 厚生労働省 (2009) 日本人の食事摂取基準 [2010年版], 第一出版, 東京: pp. 201–217.
- 3) 鈴木和春 (2003) リン. ミネラルの辞典 (糸川嘉則編), 朝倉書店, 東京: pp. 184–195.
- 4) 山口敦子, 阿部洋一, 石下真人, 鮫島邦彦, 新井健一 (2000) 凍結貯蔵中のスケトウダラ冷凍すり身のゲル形成能に及ぼす重合リン酸塩の効果. 日本水産学会誌, 66: 481–488.
- 5) Heaney RP, Recker RR, Weaver CM (1990) Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. *Calcif Tissue Int* 46: 300–304.
- 6) Bao XL, Lv Y, Yang BC, Ren CG, Guo ST (2008) A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. *J Food Sci* 73: C117–C121.
- 7) Liu FR, Wang L, Wang R, Chen ZX (2013) Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of Peptide-calcium complex. *J Agric Food Chem* 61: 7537–7544.
- 8) Sato R, Noguchi T, Naito H (1986) Casein phosphopeptide (CPP) enhances calcium absorption from the ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 32: 67–76.
- 9) 松本和子, 酒井健 (1987) モリブデン・ブルーの発色とリン定量への応用 (化学への招待). *化学と教育* 35: 420–423.
- 10) Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- 11) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939–1951.
- 12) Hosomi R, Fukunaga K, Arai H, Kanda S, Nishiyama T, Yoshida M (2011) Fish protein decreases serum cholesterol in rats by inhibition of cholesterol and bile acid absorption. *J Food Sci* 76: H116–H121.
- 13) 青木隆子, 國崎直道 (1989) 水産ねり製品中のオルトおよび重合りん酸塩含量について. *日本水産学会誌* 55: 2167–2171.
- 14) Adler-Nissen J (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem* 27: 1256–1262.
- 15) 内藤博 (1986) カゼインの消化時生成するホスホペプチドのカルシウム吸収促進機構. *日本栄養・食糧学会誌* 39: 433–439.
- 16) Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR (2002) Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 82: 1755–1764.
- 17) Wasserman RH, Taylor AN (1976) *Handbook of Physiology* 7, Endocrinology ed. by GD Auerbach, American Physiological Society, Washington, D.C.: pp. 137–155.
- 18) Goldstein DJ, Rogers CE, Harris H (1980) Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2857–2860.
- 19) 南勝一 (1970) カルシウムの腸管吸収について. *中国短期大学紀要*, 1, 51–61

Effect of fish protein on excessive intake of the phosphorus

Kenji Fukunaga, Ryota Hosomi and Munehiro Yoshida

Laboratory of Food and Nutritional Science

Faculty of Chemistry Materials and Bioengineering, Kansai University

Summary

Phosphorus (P) is an essential nutrient that is required for all organisms. On the other hands P is used as phosphates in a variety of processed food, such as Surimi (*Kamaboko*), processed meat, cheese, frozen bakery products and carbonated beverages. Additives used in processed foods frequently are high in inorganic phosphorus, which is readily absorbed. P intake in excess of the nutrient needs of healthy subject thought to disrupt hormonal regulation of P, calcium (Ca), and vitamin D, contributing to impaired peak bone mass, bone resorption, various negatively affects and greater risk of fracture. Phosphates are added to surimi to improve water retention and prevent alteration during freezing. Attention is given to phosphorus intake from processed foods rich in phosphorus additives, which significantly contribute to phosphorus intake. There is a tendency for consumers to avoid surimi because of the added phosphates. Currently, no information is available concerning the P and Ca solubility effect of fish protein (FP), which is contained in surimi. Therefore, at first we investigated the effect of FP on P and Ca solubility in vitro experiment. Experimental diets were formulated as follows: normal-P (0.3% P wt/wt, potassium dihydrogenphosphate) diet, high-P (1.5% P wt/wt, potassium dihydrogenphosphate) diet and high-polyphosphate (1.5% P wt/wt, sodium polyphosphate) diet. The protein source of each experimental diet was FP or chicken breast protein (CP). The experimental diets were exposed to simulated gastric digestion including HCl and pepsin for 120 min (pH 2.0) and then small intestinal digestion including NaHCO₃ and pancreatin for 120 min (pH 7.4). When the high-polyphosphate diets were digested, the FP diet tended to be higher Ca solubility than the CP diet ($p = 0.10$). When the normal-P and high-P diets were digested, there were no significant differences in the Ca solubility between the FP and CP diets. These results show that FP might enhance Ca solubility under excess polyphosphate conditions. Further, now we examine the effect of fish protein on excessive intake of the phosphorus in rats using high-dihydrogenphosphate and high-polyphosphate diets mentioned above.