

成熟ラットのたん白尿症に対する分離大豆たん白質の影響

EFFECT OF SOY PROTEIN ISOLATE ON PROTEINURIA IN ADULT RATS

海老沢秀道・大関知子・藤田美明（東京都老人総合研究所）

Hidemichi EBISAWA, Tomoko OZEKI and Yoshiaki FUJITA

Nutrition Research Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology,
Tokyo 173

ABSTRACT

Effect of soy protein isolate on proteinuria in male adult rats was examined in relation to dietary protein levels and changes in free amino acids in serum and kidney. In experiment 1, animals were fed 8 g/day of 5, 10, 15, 40 and 60% protein diets containing lactalbumin (LA; control group) or soy protein isolate (SPI) for 8 weeks from 90 days of age. In experiment 2, two groups (proteinuria group) received 16 g/day of 20% protein diet containing LA or SPI and other two groups (normal group) 8 g/day of 40% protein diet instead of 20% protein diet for 6 months from 3 months of age, respectively. Results showed that 1) under restricted dietary energy, urinary protein excretion increased with dietary protein levels, irrespective of dietary protein sources, but the increasing rate was lower in SPI group than LA group, 2) the appearance of proteinuria was related to significant increase in threonine, cystine, tyrosine and arginine in serum and methionine and histidine in kidney. *Nutr.Sci.Soy Protein, Jpn.8,64-69,1987.*

たん白質の栄養学的価値は、従来は主に成長期個体での体内窒素保留率を指標として評価されてきた。しかし、最近、体内窒素利用率のみならず、疾病の発症防止等の他の付加的効果も含めて総合的に評価されるようになってきた。この様な点から、植物性たん白質の中でも大豆たん白質は、その高い体内利用率と同時に血清コレステロール低下作用をもつことから注目されている¹⁾。我々は成熟ラットを用いエネルギー摂取量の異なる条件下で、同様の所見を観察した²⁾。

一方、ラットに標準飼料を自由摂食させた時、加齢に伴い腎症を発症し尿中に多量のたん白質が排泄される（たん白尿症）。そしてこの疾病は、飼料の制限給餌、とくにエネルギー制限食の投与により防止される^{3,4)}。しかし尿たん白排泄量は、エネルギー制限条件下においても食たん白質摂取量の増大により増加する^{3,5)}。そしてこれと同様の所見は幼若ラットにおいて

も観察されている⁶⁾。これらのことは、摂取たん白質のアミノ酸組成やその体内代謝の違いが、たん白尿症の発症と関係しているかも知れないことを示唆している。

そこで本研究では、たん白尿症抑制効果が認められているエネルギー制限条件下で、食事中たん白質量を様々に変えて尿たん白排泄に対する大豆たん白質の影響を調べた（実験1）。また、尿たん白排泄に対する特定のアミノ酸の関与を、血清および腎遊離アミノ酸の動態から明らかにしようと試みた。

方 法

実験1

ウイスター系の成熟雄ラット（90日齢）6匹を1群として11群に分けた。この内の5群には、分離大豆たん白質（SPI）をたん白質源とし、その食事中の正味たん白質レベルを5、10、15、40及び60%とした飼料を8

g/日投与した (SP 5, SP10, SP15, SP40及びSP60群)。そして対照群には、分離大豆たん白質の代わりにラクトアルブミン (LA) を用いた同様の飼料を投与した (LA 5, LA10, LA15, LA40及びLA60群)。またこれらとは別に、無たん白質食を投与する群を設けてPFD群とした。これらの飼料を8週間投与し、尿中たん白質排泄量を隔週に測定した。実験に用いた飼料の基本組成はTable 1に示した。実験期間終了後、ラットを麻酔下に屠殺し、血清脂質 (総コレステロール、およびTG等) を測定した。

実験2

90日齢のウィスター系雄ラット8匹を1群として4群に分けた。このうち2群には、たん白尿症発症モデル食として20% LA または SPI 食を16g/日 (P-LA群およびP-SP群) を、たん白尿症抑制正常モデル食として40% LA または SPI 食の8g/日 (N-LA群およびN-SP群) を、それぞれ6カ月間投与した。飼育期間の最後の3日間について尿を採取し、尿中たん白質排泄量を測定した。その後ラットを麻酔下に屠殺し、腎臓及び血清中遊離アミノ酸濃度を測定した。

結果と考察

実験1

成長期ラットでのSPIの体内利用効率、そのMet含量の低さからLAに比べやや劣ると言われてきた。しかし最近、SPIのMet含量は成人ではその必要量を満たしており、N出納試験の結果でも他の良質たん白質と同様の高い体内利用効率をもつことが示されている⁷⁾。我々もすでに成熟ラットを用いて同様の所見を観察した²⁾。本実験においても、SPI摂取ラットの体重変化、窒素出納値、血清総たん白濃度等の体たん白質代謝のパラメーターはLA摂取ラットのそれと大差なく、成熟動物にとってSPIはLAと同様に優れたたん白質であることが確認された (Table 2)。

ラットに加齢に伴う尿たん白質排泄量は、食餌エネルギー摂取量の増加に伴って増加し、制限給餌によって抑制される³⁾。本実験でも、90日齢において自由摂食からエネルギー制限食に切り換えた時、尿たん白質排泄は急激に低下し、そして8週間後には何れの群でも50mg/kg BW以下となった (Fig 1)。一方ラットの尿たん白質排泄量は、エネルギー制限条件下でも食事中たん白質摂取量の量によって影響を受ける^{3,5)}。そこで実験食8週間後の尿たん白排泄量と食たん白質摂取量との関係をFig. 2に示した。対照群では食たん白質レベルの15%までは急増し (37.01±5.57mg/kg BW)、それ以上の摂取レベルではほぼ同様の値を維持した。一

方SPI群でも、食餌たん白質レベルの増加に伴って尿たん白排泄量は増加した。しかしその増加率はLA群に比べて抑制されており、SP60群での尿たん白排泄量はLA15群のそれと同様であった。腎症に対する食たん白質源の相違の影響が報告されている^{8,9)}。本実験でも、食たん白質レベルの増加に伴う尿たん白質排泄量の増加は、対照群に比べてSPI群で抑制されていた。

大豆たん白質の血清脂質低下作用はよく知られている¹⁾。Table 3に本実験での血清脂質濃度に関する結果を示した。血清総コレステロール濃度は、LAおよびSPI群いずれでも、摂取エネルギーの制限下では食たん白質レベルの増加と共に低下した。これに対して血清TG濃度は、LAおよびSPI群ともに食たん白質レベルの影響を示さなかった。しかし全体にLA群に比べてSPI群では低値となる傾向にあった。血清脂質に対する大豆たん白質摂取の影響は、摂取エネルギー制限条件下では、血清コレステロール値よりもTG値で大きかった。

一方、過剰エネルギーを摂っている自由摂食ラットでは、尿たん白排泄量と血清コレステロール濃度の間に正の相関関係が観察される²⁾。しかしエネルギー制限ラットでは、食たん白質レベルの増加に伴って尿たん白排泄量は増加したにも拘らず血清コレステロール濃度は逆に低下していた。このことは、実験1で観察された食たん白質摂取量の増加に伴う尿たん白排泄量の増加は、食事エネルギーではなく食たん白質の量と質そのものにより影響されたことを支持する。

Table 1. Composition of 40% protein diet (g/100g)

Ingredient	Lactalbumin	SPI
Lactalbumin ¹	48.5	
SPI ²		47.0
Sucrose ³	11.5	12.0
α -Corn starch ³	23.0	24.0
Vitamin mixture ³	2.0	2.0
Mineral mixture		
Macro-elements ³	4.8	4.8
Micro-elements ⁴	0.2	0.2
Cellulose powder	5.0	5.0
Corn oil ³	5.0	5.0

¹From Sigma Chemical Co., USA. ²Soy protein isolate from Fuji Oil Co. LTD., Osaka. ³From Oriental Yeast Co., Tokyo. ⁴Composition as reported by Ebihara et al. (*J. Nutr.*, **109**, 2106-2116, 1979)

Table 2. Effects of dietary protein levels and sources on body weight, N balance and serum protein in adult rats fed energy restricted diet

Protein level(%)	Body weight(n=6)		N balance(n=5)	Serum protein(n=6)
	Initial	Final		
LA ¹	g	g	mg N/day	g/100 ml
5	321±10 ²	227±15	-24.6±11.4	6.1±0.2
10	321±9	227±11	-14.9±5.5	6.4±0.2
15	320±9	234±10	-7.0±8.5	6.5±0.2
40	308±7	236±8	-3.2±17.0	6.8±0.5
60	308±7	226±8	+67.4±34.1	6.4±0.1
SPI ³				
5	321±9	214±12	-22.9±5.6	5.8±0.1**
10	321±9	224±10	-18.0±5.7	6.2±0.2
15	322±9	226±12	-10.9±6.4	6.1±0.1*
40	308±7	224±15	+8.7±13.8	6.3±0.4
60	308±7	211±10	+22.4±19.0*	6.5±0.2
PFD ⁴	307±8	192±7	(50.6±7.0) ⁵	4.9±0.3

¹Lactalbumin. ²Values are mean±SD. ³Soy protein isolate. ⁴Protein free diet. ⁵Value in the parenthesis is sum of urinary and fecal nitrogen output.

* and ** ; Significantly different from values for respective LA groups at p<0.05 and p<0.01, respectively.

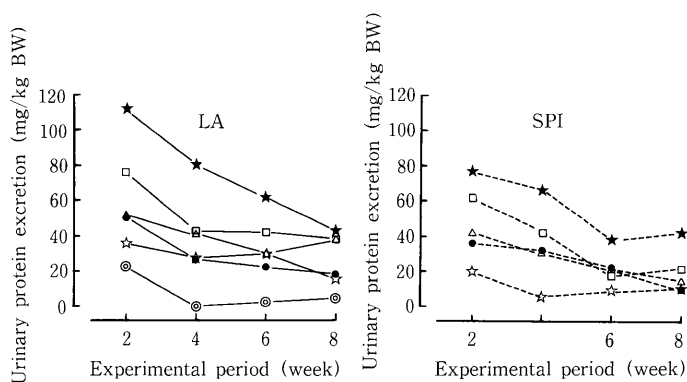


Fig. 1. Changes of urinary protein excretion during experimental period.

LA ; Lactalbumin group. SPI ; Soy protein isolate group. ☆ ; 5% protein diet.

● ; 10% protein diet. △ ; 15% protein diet. □ ; 40% protein diet.

★ ; 60% protein diet. ◎ ; Protein free diet.

エネルギー制限条件下での食たん白質の尿たん白排泄促進効果は、摂取たん白質源により異なることが観察された。一方、単一アミノ酸の大量投与により腎疾患が誘起され、その影響は投与アミノ酸の種類により異なることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。このことは、本実験で観察された食たん白質源の相違による尿たん白排泄促進効果の違いの原因の一つは、食たん白質の構成アミノ酸組成やその体内代謝の違いと関係しているものと思われる。

実験 2

実験 2 での尿たん白排泄量の結果を Fig. 3 に示した。たん白尿症モデルの P-LA および P-SP 群は、夫々 127±75 および 198±86 mg/kg BW のたん白質を尿中に排泄し、中等度のたん白尿症を呈した。これに対して正常対照モデルの N-LA および N-SP 群のそれは、予想した通り夫々 76±14 および 91±15 mg/kg BW と抑制されていた。

血清および腎遊離アミノ酸濃度の結果を Table 4 に

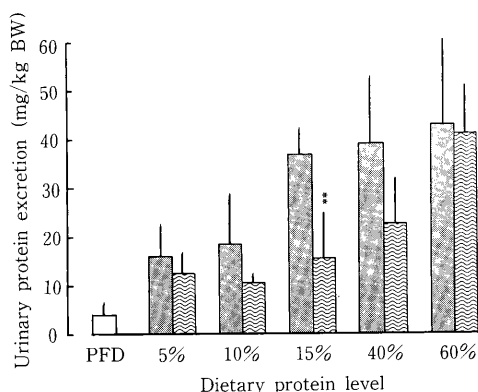


Fig. 2. Effects of dietary protein levels and sources on the urinary protein excretion in adult rats. Values are mean $\pm$ SD of 5 rats fed experimental diet for 8 weeks. ; Lactalbumin. ; Soy protein isolate. * ; Significantly different from values for lactalbumin group at $p<0.01$.

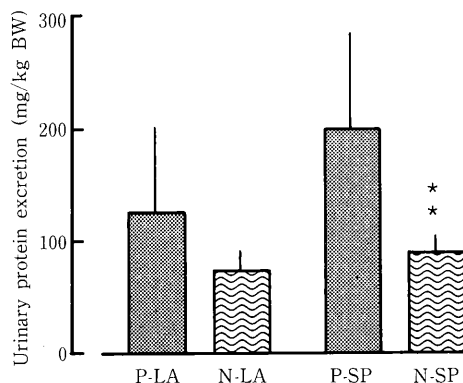


Fig. 3. Urinary protein excretion in normal and proteinuria rats. Abbreviation ; P-Proteinuria group receiving 16 g/day of 20% protein diet. N-Normal group receiving 8 g/day of 40% protein diet. LA-Lactalbumin. SPI-Soy protein isolate. * ; Significantly different from values for proteinuria rats at $p<0.01$.

Table 3. Effects of dietary protein levels and sources on total cholesterol and triglyceride in serum

Protein level(%)	T-chol ¹		TG ²	
	LA ³	SPI ⁴	LA	SPI
	mg/100 ml	mg/100 ml	mg/100 ml	mg/100 ml
5	137.3 $\pm$ 6.8 ⁵	122.8 $\pm$ 7.6**	60.3 $\pm$ 11.9	43.2 $\pm$ 7.3
10	143.8 $\pm$ 18.1	128.0 $\pm$ 8.0	53.2 $\pm$ 4.8	58.3 $\pm$ 9.2
15	128.0 $\pm$ 8.9	131.5 $\pm$ 12.1	43.7 $\pm$ 4.6	42.7 $\pm$ 4.5
40	106.5 $\pm$ 7.9	101.2 $\pm$ 12.2	68.8 $\pm$ 27.9	47.2 $\pm$ 8.8
60	90.0 $\pm$ 12.2	88.2 $\pm$ 6.3	52.2 $\pm$ 10.7	33.3 $\pm$ 7.4**
PFD ⁶	89.0 $\pm$ 9.5		31.3 $\pm$ 2.3	

¹Total cholesterol. ²Triglyceride. ³Lactalbumin. ⁴Soy protein isolate. ⁵Values are mean $\pm$ SD of 6 rats. ⁶Protein free diet. ** ; Significantly different from values for LA group at $p<0.01$.

示した。正常対照群(N群)に比べてたん白尿症群(P群)では、血清遊離アミノ酸濃度は全体に増加傾向にあった。しかし、食たん白質源の如何に拘らずたん白尿症群で有意に増加したアミノ酸は、Thr, Cys, Tyr および Arg だけであった。一方腎遊離アミノ酸では、Met と His だけが食たん白質源の違いに拘らずP群で有意に上昇した。腎症の発症に対する単一アミノ酸大量投与効果を調べた報告によると、含硫アミノ酸、芳香族アミノ酸、塩基性アミノ酸と腎症の関係を示唆している⁸⁻¹⁰⁾。本実験のたん白尿症発症ラットにおいて、Cys は血清で、Met は腎でそれぞれ増加した。また、

血清では Thr, Tyr および Arg, 腎では His がそれぞれ特徴的に増加していた。

以上の結果から、ラットのたん白尿症は、エネルギー制限下でも食餌たん白質レベルの上昇によって促進され、そしてこの時、ラクトアルブミンに比べて大豆たん白質ではその上昇が抑制されていた。また、大豆たん白質を特徴づけている Arg や含硫アミノ酸は、Tyr, His および Thr などと共に、成熟ラットの食事性たん白尿症の発現に何等かの関係を有していることが示唆された。

Table 4. Effects of proteinuria on free amino acids in serum and kidney of adult rats

Serum ($\mu\text{mol/liter}$)				
	N-LA	P-LA	N-SP	P-SP
Thr	271.3 $\pm$ 72.1	412.8 $\pm$ 148.0*	159.7 $\pm$ 38.4	487.8 $\pm$ 180.5**
Cys	31.7 $\pm$ 6.3	54.4 $\pm$ 10.8**	30.3 $\pm$ 7.3	45.6 $\pm$ 5.9**
Met	36.1 $\pm$ 8.0	29.2 $\pm$ 10.5**	33.9 $\pm$ 11.4	34.4 $\pm$ 12.8
Val	174.3 $\pm$ 48.9	267.8 $\pm$ 28.9	182.5 $\pm$ 51.8	257.6 $\pm$ 102.1
Ile	60.0 $\pm$ 10.9	117.9 $\pm$ 16.5**	87.5 $\pm$ 46.4	91.9 $\pm$ 16.5
Leu	105.6 $\pm$ 25.8	191.4 $\pm$ 24.5**	139.4 $\pm$ 61.8	139.5 $\pm$ 42.8
Tyr	63.0 $\pm$ 14.1	107.7 $\pm$ 12.7**	70.0 $\pm$ 31.1	101.9 $\pm$ 14.0*
Phe	46.8 $\pm$ 10.4	76.7 $\pm$ 7.1**	65.7 $\pm$ 24.0	63.4 $\pm$ 6.3
Lys	362.1 $\pm$ 106.1	421.7 $\pm$ 73.6	402.5 $\pm$ 46.4	427.7 $\pm$ 51.7
His	51.9 $\pm$ 16.2	81.2 $\pm$ 15.7**	56.2 $\pm$ 9.2	64.6 $\pm$ 11.5
Arg	68.5 $\pm$ 25.2	141.2 $\pm$ 26.3**	86.5 $\pm$ 31.1	125.5 $\pm$ 23.0*
Kidney ($\mu\text{mol/kg tissue}$)				
Thr	414.6 $\pm$ 112.2	495.3 $\pm$ 94.3	257.8 $\pm$ 33.9	500.7 $\pm$ 61.5**
Cys	159.3 $\pm$ 36.9	102.0 $\pm$ 25.2*	111.2 $\pm$ 21.0	134.4 $\pm$ 29.8
Met	24.5 $\pm$ 12.9	47.0 $\pm$ 11.1*	24.0 $\pm$ 7.0	39.2 $\pm$ 8.2**
Val	333.2 $\pm$ 93.8	344.3 $\pm$ 74.7	208.3 $\pm$ 38.2	343.6 $\pm$ 37.1**
Ile	181.7 $\pm$ 47.2	202.1 $\pm$ 43.5	127.4 $\pm$ 19.0	196.2 $\pm$ 34.2**
Leu	335.8 $\pm$ 89.6	392.4 $\pm$ 79.9	244.8 $\pm$ 35.9	348.2 $\pm$ 72.6**
Tyr	251.4 $\pm$ 73.1	248.7 $\pm$ 54.4	145.3 $\pm$ 22.8	233.2 $\pm$ 37.2**
Phe	158.5 $\pm$ 58.7	147.5 $\pm$ 34.3	89.2 $\pm$ 28.1	155.9 $\pm$ 22.7**
Lys	637.3 $\pm$ 215.3	636.5 $\pm$ 136.7	524.7 $\pm$ 35.8	769.8 $\pm$ 207.2**
His	184.2 $\pm$ 43.4	235.8 $\pm$ 24.8*	177.4 $\pm$ 15.9	223.4 $\pm$ 25.0**
Arg	118.1 $\pm$ 25.1	309.5 $\pm$ 373.1	159.0 $\pm$ 25.6	182.4 $\pm$ 27.8

Abbreviation ; P-proteinuria group receiving 16 g/day of 20% protein diet. N-Normal group receiving 8 g/day of 40% protein diet. LA-Lactalbumin. SP-Soy protein isolate. Values are mean $\pm$ SD of 8 rats.

* and ** ; Significantly different from values for normal rat group at $p<0.05$ and $p<0.01$, respectively.

文 献

- 菅野道廣 (1987) : 分離大豆たん白質—その特異的コレステロール低下作用. “大豆たん白質の栄養” (大豆たん白質栄養研究会編), 大阪, 47-70.
- 藤田美明, 大関知子 (1986) : 成熟ラットでの分離大豆たん白質の栄養学的再評価 : たん白尿症への影響. 大豆たん白質栄養研究会会誌, 7, 30-34.
- Everitt, A. V., Porter, B. D. and Wyndham, J. R. (1982) : Effects of caloric intake and dietary composition on the development of proteinuria, age-associated renal disease and longevity in the male rat. *Gerontology*, 28, 168-175.
- Fujita, Y., Ichikawa, M., Kurimoto, F. and Rikimaru, T. (1984) : Effects of feed restriction and switching the diet on proteinuria in male Wistar rats. *J. Gerontol.*, 39, 531-537.
- Rumsfeld, H. W. (1956) : Role of dietary protein in normal rat proteinuria. *Am. J. Physiol.*, 184, 473-478.
- Friedman, A. L. and Pityer, R. (1986) : Beneficial effect of moderate protein restriction on growth, renal function and survival in young rats with chronic renal failure. *J. Nutr.*, 116, 2466-2478.
- 井上五郎 (1987) : 人における分離大豆たん白質の栄養価. “大豆たん白質の栄養” (大豆たん白質栄養研究会編), 大阪, 31-46.
- Moise, T. S. and Smith, A. H. (1927) : The effect of high protein diet on the kidneys : An experimental study. *Arch Pathol.*, 4, 530-542.

- 9) Kaunitz, H. and Johnson, R. E. (1976) : Dietary protein, fat, and minerals in nephrocalcinosis in female rats. *Metabolism*, **25**, 69-77.
- 10) Marsh, P. L. and Newburgh, L. H. (1925) : Renal injuries by amino acid. *Arch. Intl. Med.*, **36**, 682-711.
- 11) Klavins, J. V. and Peacocke, I. L. (1964) : Pathology of amino acid excess. III. Effects of administration of excessive amounts of sulphur-containing amino acids: Methionine with equimolar amounts of glycine and arginine. *Br. J. Exp. Path.*, **45**, 533-547.
- 12) Klavins, J. V. (1967) : Pathology of amino acid excess. VII. Phenylalanine and tyrosine. *Arch. Path.*, **84**, 238-250.