

ラットのたん白尿症の発症及び生理的機能の加齢変化に対する SPI 食の長期投与の影響 (第1報)

EFFECTS OF LONG-TERM FEEDING OF SOY PROTEIN ISOLATE ON PROTEINURIA AND AGE-RELATED CHANGES IN SOME PHYSIOLOGICAL VARIABLES IN ADULT RATS (AN INTERIM REPORT)

海老沢秀道・藤田美明 (東京都老人総合研究所)

Hidemichi EBISAWA and Yoshiaki FUJITA

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

ABSTRACT

Effect of long-term feeding of soy protein isolate (SPI) on age-related proteinuria and some physiological variables was examined in rats receiving different amount of food. Four-month-old rats (Wistar strain, male) were divided into 4 groups of 12 rats each. Two of four groups were fed 20% casein diet (group CA) or SPI diet (group SA) *ad libitum* and other two (groups CR and SR) received restricted amount (10 g/day) of the same diets, until 800 days of age. This is an interim report of an 800-day examination. Results showed that until 300 days of age, 1) SPI was comparable to casein in criteria of nitrogen balance, true protein digestibility and net protein utilization (NPU), 2) SPI resulted in nonspecific influences on prevention and development of proteinuria, as well as in casein. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* 9, 44-48, 1988.

食事たん白質の栄養学的価値は、個体の体内窒素保留率を基準にして評価されている^{1,2)}。しかし、たん白質を構成しているアミノ酸には、たん白質合成の基質としての役割以外に、神経や内分泌機能に関与する様々な物質の基質として³⁾、また代謝性疾患の発症に係わる物質の基質として^{4,5)}の作用などが報告されている。とくに生体機能の低下や様々な疾患が発現・進行し始める成熟期以降の個体にとって、食たん白質の栄養価は、窒素保留率も含めて、より総合的に評価することが必要と思われる。

さらに従来、食たん白質の栄養評価に関する研究の多くは、1ヶ月以下の短い実験食投与期間で観察されてきた⁶⁾。我々は、成熟ラットの加齢に伴うたん白尿症の発症に対する大豆たん白質食の影響を観察し、実験食投与期間により異なる所見が得られることを経験した^{7,8)}。このような、食たん白質の持つ生理的作用の解

明には、長期の観察が必要と思われる。

本研究では、ラットの加齢に伴うたん白尿症の発症及び総体たん白質代謝に対する分離大豆たん白質食の長期投与の影響を縦断的に観察すると共に、血液性状、体組成、組織形態学的加齢変化等への影響を明らかにし、大豆たん白質の栄養学的価値を総合的に評価することを目的とした。

実験方法

実験1

Wistar系の雄ラット(80日齢)を20%カゼイン食で120日齢まで飼育し、その後12匹を1群として4群に分けた。この内2群には、Table 1に示した20%カゼイン食(CA群)または20% SPI食(SA群)を自由に与えた。他の2群には同じ飼料を各々1日10gの制限量(CR群及びSR群)で与えた。そして、実験開始

時(120日齢)及びその後200日齢から100日毎に3日間の代謝実験を実施し、尿中たん白質排泄量、尿及び糞便中N成分、N出納値及びたん白質消化吸収率の加齢変化を800日齢まで縦断的に観察する。また、実験食期終了後ラットを採血屠殺し、血液の生理・生化学的成分及び体組成等を測定すると共に、いくつかの組織について組織学的検索を実施する。

実験2

正味たん白質利用率(NPU)及び真の消化吸収率を算出するため、90,300及び600日齢のWistar系雄ラット(1群6匹)に無たん白質食(Table 1)を4週間与え、期末3日間の内因性窒素排泄量を測定した。

結果と考察

本研究では、800日齢までの長期間SPI食を投与し、生体に対するSPIの影響を総合的に明らかにするものであるが、本報告は今までに得られた300日齢までの中間報告である。

内因性窒素排泄量

真のたん白質消化吸収率及びNPUを算出するため、内因性窒素排泄量の加齢変化を測定した(Table 2)。その結果、内因性尿窒素量は90日齢および300日齢ではほぼ同様の値を示したが、600日齢ではこれらに比べて有意に低下した。また内因性糞窒素量は加齢と共に減少した。本実験で得られた内因性尿窒素量は、成長期ラットで報告されている値(230~270 mg N/kg BW)^{6,9)}と比べ大幅な低値となった。一般に、無たん白質飼料に対する0.3%メチオニン及びスレオニンの添加は、内因性尿N排泄量を非添加時の約60%まで低下させることが報告されている⁹⁾。本実験で用いた無たん白質飼料には0.3%のメチオニンが含まれており、このことが、低い内因性尿N排泄量をもたらした原因の1つと思われる。

摂食量と体重変化

摂食量と体重の変化をTable 3に示した。自由摂食ラットは両群とも1日当り15~16gの飼料を摂取し、体重は300日齢までCA群とSA群間に有意の差は観察されなかった。一方、制限食ラットは与えられた飼料の全てを摂取したが、体重は制限食の開始により150日齢頃までは減少し、その後は維持した。そして制限食群でもSR群とCR群の間に体重の差は認められなかった。

窒素出納値

N出納試験の結果をTable 4に示した。N出納値は、食餌制限の有無、たん白質源の相違及び日齢に拘らず、正の値を示した。しかしその出納値は、120日齢

に比べ200および300日齢では1/2以下に低下し、その低下はSPI群よりカゼイン群で著しかった(自由摂食群300日齢、制限食群200日齢で有意の差)。

消化吸収率及びNPU

消化吸収率及びNPU値を算出し、Table 5に示した。自由摂食群の真のたん白質消化吸収率は、たん白質源に拘らず120日齢に比べ300日齢でやや低値となる傾向にあったが、CA群とSA群の間に差は見られなかった。一方、制限食群では、SR群の消化吸収率は加齢にともなって低下し、日齢に拘らずCR群より低値となる傾向を示した。これはCR群に比べてSR群では、糞便重量は低かったにもかかわらず、糞中窒素濃度が高いためであった。

Table 1. Composition of experimental diet (g/100 g)

Ingredients	20% Casein	20% SPI	PFD ⁵
SPI ¹		20.0	
Casein ²	20.0		
DL-Methionine	0.3		0.3
Sucrose ³	20.9	21.0	27.3
α -Corn starch ²	41.8	42.0	55.4
Vitamin mixture ²	2.0	2.0	2.0
Mineral mixture			
Macro-elements ²	4.8	4.8	4.8
Micro-elements ³	0.2	0.2	0.2
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0
Corn oil ⁴	5.0	5.0	5.0

¹Soy protein isolate from Fuji Oil Co. LTD., Osaka. (Protein content: 85.2%)

²From Oriental Yeast Co., Tokyo. (Protein content: 82.2%)

³Composition as reported by Ebihara et al. (*J. Nutr.*, **109**, 2106-2116, 1979)

⁴From Ajinomoto Co., Tokyo.

⁵Protein free diet

Table 2. Age-related changes in endogenous urinary and fecal nitrogen excretions

Age	Body weight	Urinary N	Fecal N
(day)	(g)	(mg/kg BW)	(mg/kg BW)
90 (6)	250±10	103.8±11.2	72.5± 7.9
300 (6)	385±18 ^a	105.4± 9.4	43.8± 8.5 ^a
600 (6)	373±25 ^a	70.2±18.7 ^a	38.5±10.6 ^a

Values are mean±SD. Figures in parentheses are number of rats.

a: Significantly different from the value of 90 days of age at p<0.05.

自由摂食群の NPU は、たん白質源に拘らず、120日齢に比べて200日齢で有意に低い値となり、300日齢でやや改善された。これに対して制限食群では、NPU の加齢に伴う低下は少なかった。また、食餌制限の有無及び日齢に拘らず、SPI 群の NPU はカゼイン群に比べてやや高値となる傾向を示した（200日齢で有意）。

この様に、300日齢の成熟ラットでは、SPI 群の消化吸収率、NPU、N 出納値等は、カゼイン群と同等の値を示した。

尿クレアチニン及びアンモニア排泄量

結果を Table 6 に示した。自由摂食群の尿中クレアチニン排泄量は、体重当りでは、200日齢で有意に増加し、300日齢でやや減少したが、ラット当り(mg/day)では、200と300日齢の間で同様の値が維持されていた。このことは、200日齢以降の体重増加が主に体脂肪の蓄積によることを示している。

一方、制限食群の尿中クレアチニン排泄量は、120日齢に比べ200日齢で有意に増加し、以降この値を維持した。そして300日齢では SR 群は CR 群より有意に高い値を示した。

尿中アンモニア排泄量は、食餌制限の有無に拘らず、120日齢に比べて200及び300日齢で、カゼイン食群では約2倍に増加し、SPI 群では約1/2に減少した(何れも有意の変化)。大豆たん白質食を摂取しているラットでの尿中アンモニア排泄量の減少は既に報告されている⁷⁾が、その原因については明らかにされていない。尿中アンモニアは腎臓からの酸性物質排泄の代償として出現するが、アミノ酸の中で含硫アミノ酸は、その

代謝産物として硫酸塩の排泄を増加させる^{10,11)}。大豆たん白質は含硫アミノ酸含量が低く、カゼインの2/3、全卵たん白質の1/3である¹²⁾。このことが尿中硫酸塩の排泄が減少している原因の1つであるかも知れない。

尿たん白質排泄量

標準飼料を自由摂取しているラットでは、約3か月から尿へのたん白質（主にアルブミン）排泄量が増加し、加齢によってさらに促進される^{13,14)}。本実験でも自由摂食群の尿中たん白質排泄量は、120または200日

Table 3. Effect of SPI on food intake and body weight in aging rats

Age (day)	Group	Food intake (g/day)	Body weight (g)
120	(48)	15.6±1.8	356.5±17.8
<i>Ad libitum feeding</i>			
200	CA (12)	14.5±0.8 ^a	422.6±31.8 ^a
	SA (12)	15.3±2.5	439.8±22.7 ^a
300	CA (11)	15.7±1.7	487.6±34.1 ^a
	SA (12)	16.2±1.7	505.3±28.3 ^a
<i>Restricted feeding</i>			
200	CR (12)	10.0±0.0	312.1±10.8 ^a
	SR (12)	10.0±0.0	316.9±10.8 ^a
300	CR (12)	10.0±0.0	358.9±19.6
	SR (12)	10.0±0.0	350.8±16.1

Values are mean±SD. Figures in parentheses are number of rats.

a : Significantly different from the value of 120 days of age at p<0.05.

Table 4. Effect of SPI on nitrogen balance in aging rats

Age (day)	Group	Intake N (mg/kg BW)	Urinary N (mg/kg BW)	Fecal N (mg/kg BW)	N balance (mg/kg BW)
120	(48)	1281.6±154.7	929.9±131.0	85.1±17.5	266.6±160.9
<i>Ad libitum feeding</i>					
200	CA (12)	991.2± 65.0 ^a	840.6± 89.5 ^a	87.7±17.1	62.9± 74.3 ^a
	SA (12)	1032.3±139.4 ^a	841.6± 61.8 ^a	88.6±13.2	102.1±172.6 ^a
300	CA (11)	929.5± 94.0 ^a	759.0±106.6 ^a	79.9±15.4	90.6± 74.0 ^a
	SA (12)	955.2±105.6 ^a	734.0± 70.7 ^a	77.3±11.2	143.9± 42.8 ^{a*}
<i>Restricted feeding</i>					
200	CR (12)	922.9± 31.8 ^a	763.7± 59.3 ^a	73.3±12.8 ^a	86.0± 51.8 ^a
	SR (12)	942.0± 32.8 ^a	711.6± 46.2 ^{a*}	92.2± 8.7 [*]	138.1± 30.7 ^{a*}
300	CR (12)	912.6± 29.9 ^a	740.1± 35.4 ^a	68.2± 6.7	104.3± 21.1 ^a
	SR (12)	924.3± 23.5 ^a	729.6± 36.1 ^a	77.5±10.8 [*]	117.2± 25.4 ^a

Values are mean±SD. Figures in parentheses are number of rats.

a : Significantly different from the value of 120 days of age at p<0.05.

* : Significantly different from the value of group CA or CR in each age at p<0.05.

Table 5. Effect of SPI on true protein digestibility and net protein utilization in aging rats

Age (day)	Group	Digestibility (%)	NPU
120	(48)	99.1±1.4	34.2±11.7
<i>Ad libitum</i> feeding			
200	CA (12)	97.2±1.7 ^a	23.1± 7.6 ^a
	SA (12)	97.2±1.2 ^a	23.9±17.8 ^a
300	CA (11)	96.1±1.7 ^a	25.9± 9.5 ^a
	SA (12)	96.5±1.0 ^a	30.6± 3.1
Restricted feeding			
200	CR (12)	98.6±1.4	27.3± 5.5
	SR (12)	96.6±0.9 ^{a*}	32.3± 3.6 [*]
300	CR (12)	97.3±0.7 ^a	27.7± 2.4
	SR (12)	96.3±1.2 ^{a*}	28.7± 2.7

Values are mean±SD. Figures in parentheses are number of rats. NPU: net protein utilization.

Values of endogenous urinary and fecal N used for calculation of the true digestibility and NPU in each age were estimated by proportional allotment method on the basis of the values measured in experiment 2.

a : Significantly different from the value of 120 days of age at $p<0.05$.

* : Significantly different from the value of group CA or CR in each age at $p<0.05$.

齢に比べて300日齢で CA 群及び SA 群それぞれ 100 mg/kg BW 及び 115 mg/kg BW まで有意に増加し、軽度のたん白尿症を呈した。これに対して制限食群では、ラットの尿たん白質排泄量は加齢と共に有意に減少し、300日齢の値は両群ともに120日齢の値(78.3 mg/kg BW) の約1/2まで低下した (Table 7)。

本実験では SPI 群の尿たん白排泄量は、カゼイン群に比べて全体にやや高い値を示す傾向にあった。この結果は、尿中たん白排泄量と食餌たん白質源の関係を食餌エネルギー条件をかえて 6 ヶ月間観察した先の報告とほぼ同様であった⁷⁾。しかし、食餌中たん白質量の増加に伴う尿中たん白質排泄量の増加は、ラクトアルブミン食に比べて SPI 食で抑制される傾向にあった前回の所見とは幾分違っていた。この様な相違をもたらした原因の 1 つとして、実験食投与期間の違い (前回 : 8 週間) が考えられ、本実験を今後さらに継続することにより明らかになるかも知れない。

要 約

以上、300日齢までの体重増加量、N 出納値、NPU、消化吸収率及び尿中クレアチニン排泄量等からたん白質の栄養学的価値を評価すると、SPI はカゼインに匹敵する良質たん白質であることが示された。しかし、たん白尿症発症の指標としての尿たん白排泄量は、実験食投与期間により異なり、継続したより長期の観察が必要である。

Table 6. Effect of SPI on urinary creatinine and ammonia excretions in aging rats

Age (day)	Group	Creatinine		NH ₃ -N
		(mg/kg BW)	(mg/day)	(mg/kg BW)
120	(48)	20.3±2.4	7.2±0.9	52.5± 6.8
<i>Ad libitum</i> feeding				
200	CA (12)	24.3±1.8 ^a	10.2±0.5 ^a	77.9± 8.9 ^a
	SA (12)	28.0±1.5 ^a	12.3±0.8 ^{a*}	28.0± 2.8 ^{a*}
300	CA (11)	22.9±1.9 ^a	11.1±0.8 ^{a*}	69.8±10.2 ^a
	SA (12)	24.3±1.3 ^a	12.2±0.6 ^{a*}	29.3± 2.6 ^{a*}
Restricted feeding				
200	CR (12)	30.2±2.0 ^a	9.4±0.6 ^a	76.2± 4.6 ^a
	SR (12)	31.9±2.4 ^a	10.1±0.8 ^{a*}	29.4± 2.9 ^{a*}
300	CR (12)	29.5±1.2 ^a	9.3±0.4 ^a	77.9± 4.7 ^a
	SR (12)	33.4±2.3 ^a	10.7±0.6 ^{a*}	31.9± 2.3 ^{a*}

Values are mean±SD. Figures in parentheses are number of rats.

a : Significantly different from the value of 120 days of age at $p<0.05$.

* : Significantly different from the value of group CA or CR in each age at $p<0.05$.

Table 7. Effect of SPI on urinary protein excretion in aging rats

Age (day)	Group	Urinary protein (mg/kg BW)
120	(48)	78.3±14.8
<i>Ad libitum feeding</i>		
200	CA (12)	62.9± 6.1 ^a
	SA (12)	79.0±16.9*
300	CA (11)	100.4±26.6 ^a
	SA (12)	115.0±23.3 ^a
<i>Restricted feeding</i>		
200	CR (12)	41.2±13.5 ^a
	SR (12)	46.1±14.9 ^a
300	CR (12)	37.1± 6.5 ^a
	SR (12)	40.5±13.4 ^a

Values are mean±SD. Figures in parentheses are number of rats.

a : Significantly different from the value of 120 days of age at p<0.05.

* : Significantly different from the value of group CA or CR in each age at p<0.05.

文 献

- 1) Pellet, P. L. and Young, V. R. (1980) : 蛋白質の品質評価(蛋白質食品の栄養評価のために), Pellet, P. L. and Young, V. R. 編, 国際連合大学
- 2) Komatsu, T., Kishi, K., Yamamoto, T. and Inoue, G. (1983) : Nitrogen requirement of amino acid mixture with maintenance energy in young men. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 169-185.
- 3) Harper, H. A. (1975) : タンパク質とアミノ酸代謝, ハーパー・生化学 (15版), Harper, H. A. 編, 丸善株式会社, 東京 pp. 355-416.
- 4) Newburgh, H. L. and Marsh, P. L. (1925) : Renal injuries by amino-acids. *Arch. Intern. Med.*, **36**, 682-711.
- 5) Klavins, V. J. (1963) : Pathology of amino acid excess. I. Effects of administration of excessive amounts of sulphur containing amino acids: Homocystine. *Br. J. Pathol.*, **64**, 507-515.
- 6) 井上五郎, 岸恭一, 八木郁子(1981) : Slope ratio assay 法による分離大豆たん白質の栄養効果, 大豆たん白質栄養研究会会誌, **1**, 62-66.
- 7) 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.
- 8) 海老沢秀道, 大関知子, 藤田美明 (1987) : 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. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 64-69.
- 9) Yokogoshi, H., Hayase, K. and Yoshida, A. (1977) : Effect of supplementation of methionine and threonine to a protein free diet on urinary excretion of nitrogen and tissue free amino acids in rats. *J. Nutr.*, **107**, 783-791.
- 10) Ganong, W. F. (1977) IV. 内分泌と代謝, 医科生理学展望 (7 版), Ganong, W. F. 編, 丸善株式会社, 東京 pp. 207-364.
- 11) Schuette, S., Hegsted, M., Zemel, M. B. and Linkswiler, H. M. (1981) : Renal acid, urinary cyclic AMP and hydroxyproline excretion as affected by level of protein, sulfur amino acid and phosphorus intake. *J. Nutr.*, **111**, 2106-2116.
- 12) 改訂 日本食品アミノ酸組成表(1986), 科学技術庁資源調査会・資源調査所編 大蔵省印刷局, 東京.
- 13) 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.
- 14) 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.