

ラットのたん白尿症の発症及び生理的機能の加齢変化 に対する自由摂食条件下での SPI 食の長期投与の影響

EFFECTS OF LONG-TERM FEEDING OF SOY PROTEIN ISOLATE
ON PROTEINURIA AND AGE-RELATED CHANGES IN SOME
PHYSIOLOGICAL VARIABLES IN ADULT RATS UNDER *AD LIB-*
ITUM FEEDING CONDITION

海老沢秀道・市川みね子・大関知子・藤田美明（東京都老人総合研
究所）

Hidemichi EBISAWA, Mineko ICHIKAWA, Tomoko OZEKI and Yoshi-
aki FUJITA

Nutrition Research Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Geron-
tology, Tokyo 173

ABSTRACT

Effect of long-term feeding of SPI on age-related proteinuria and some physiological variables was examined in adult rats under *ad libitum* feeding condition. Four-month-old rats (Wistar strain, male) were divided into two groups of 12 rats each. Groups CA and SA were fed 20% casein diet and 20% SPI diet *ad libitum*, respectively, until 600 days of age. SPI was comparable to casein in criteria of nitrogen balance and protein digestibility. But on day 600 of age, group SA excreted more urinary protein than that in group CA ($p < 0.05$). Moreover, group SA showed rather higher values for serum cholesterol and triglyceride than those in group CA. Results suggest that effect of SPI on the development of age related diseases and lipid metabolism changes with the age of subjects examined. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **10**, 31-35, 1989.

食事たん白質の栄養学的価値は、従来、その体内窒素保留率の優劣で評価されてきた。しかし最近、たん白質の栄養学的価値を、そのたん白質を構成している個々のアミノ酸の生理的、代謝的機能や疾病予防等の側面にも注目して評価されるようになってきた。その一例として、SPIの血清コレステロール低下作用に関する実験動物やヒトを対象とした多くの報告があり^{1,2)}、そのメカニズムの一端も解明されつつある^{2,3)}。しかし、従来の研究の多くは、実験動物やヒトにSPI食を数週間から一ヶ月の比較的短期間投与して調べたものであり、1年以上の長期投与での報告は殆んど見あたらない。

一方、食事たん白質の量や種類が、ラットの加齢性

疾病の発症に影響を及ぼすことが報告されている⁴⁾。我々^{5,6)}は、ラットの加齢に伴うたん白尿症の発症に対するSPIの影響は、エネルギー摂取量や実験食投与期間で異なり、長期投与実験の必要性を示唆してきた。

そこで本研究では、約1ヶ年半以上の長期にわたってラットにSPI食を投与し、その総体たん白質代謝、いくつかの血清生化学的指標並びに加齢に伴うたん白尿症の発症に対するSPIの影響を明らかにし、SPIの栄養学的価値を総合的に評価しようと試みた。

実 験 方 法

Wistar 系雄ラット（80日齢）を20%カゼイン食で120日齢まで飼育し、その後12匹を一群として2群に

分けた。対照群（CA 群）には20%カゼイン食を、他の1群には20% SPI 食（SA 群）をそれぞれ自由に与えた（Table 1）なお、代謝実験での尿への飼料混入を避けるため、実験を通して飼料はすべてゲル状にして投与した。水は自由に与え、10日間毎に体重およびその間の摂食量を測定した。

実験食投与開始時（120日齢）及びその後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、尿中及び糞中の窒素成分、窒素出納値及びたん白質の見かけの消化吸収率の加齢変化を600日齢まで縦断的に観察した。実験期間終了後、ラットを12時間絶食させ、麻酔下に採血、屠殺し臓器重量を測定した。そして、血清中の総たん白質（TP）、総コレステロール（T-Chol）、中性脂肪（TG）、尿素窒素（BUN）、クレアチニン、及びアンモニア濃度等を測定した。

結果と考察

摂食量と体重変化

摂食量と体重変化を Fig. 1 に示した。摂食量は、CA 群及び SA 群ともに加齢に伴い500日齢までは増加し、その後600日齢には低下した。その結果、体重は摂食量の変化に対応し、両群ともに500日齢までは増加し600日齢には低下した。しかし、摂食量及び体重は、何れの日齢でも CA 群と SA 群の間に有意の差はみられなかった。

窒素出納値とたん白質消化吸収率

窒素(N)出納値及びたん白質消化吸収率の結果を

Table 2 に示した。N 出納値は、実験期間を通じて両群とも正の値を維持しながら加齢に伴って不規則に低下したが、何れの日齢でも、SA 群は CA 群より高値を示した。

食事たん白質の見かけの消化吸収率は、両群ともに120日齢に比べて200日齢以降は有意に低下した。しかし何れの日齢でも、CA 群と SA 群の間には有意の差はなく、たん白質消化吸収率は90%以上の値を維持した。

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

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

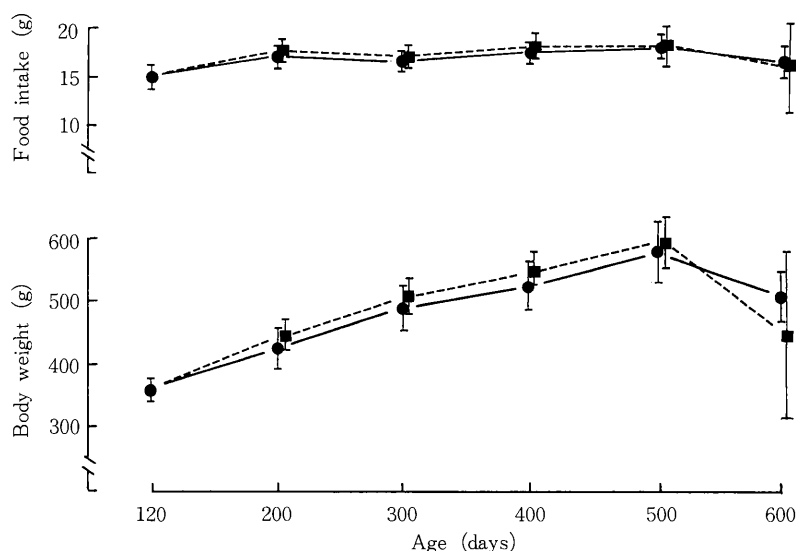


Fig. 1. Age-related changes in food intake and body weight. Values are mean $\pm$ SD. ● : 20% casein diet. ■ : 20% SPI diet.

尿クレアチニン排泄

尿中クレアチニン排泄量の変化を Fig. 2 に示した。1 日当り尿中クレアチニン排泄量は、CA 群、SA 群ともに実験期間を通じて一定の変化傾向を示さず、約 7–12 mg の変動範囲で周期的に変化した。尿中クレアチニン排泄量で観察されたこの様な周期的加齢変化は、先に我々⁷⁾が N 出納値の加齢変化で観察した所見と同様であり興味深い。

尿中たん白質排泄量

標準飼料を自由摂取しているラットでは、加齢に伴い腎組織に退行性病変が発現し、多量のたん白質が尿中に排泄される^{8,9)}。先に我々は⁵⁾、成熟ラットに 1 日当り 16 g の 20% カゼイン食または 20% SPI 食を 6 ヶ月間投与した時、SPI 群の尿中たん白質排泄量はカゼイン群に比べやや高い傾向を示したが、両者の間に有意の差のないことを認めた。しかし一方、成熟ラットにエネルギー摂取制限下（8 g/日）で、たん白質レベルの異なる食事を投与した時、食たん白質レベルの増加に伴う尿中たん白質排泄量の増加は、カゼイン群より SPI 群で有意に抑制されていた⁶⁾。

本実験の尿中たん白質排泄量の加齢変化を Table 3 に示した。600 日齢での腎組織学的検索では、SA 群と CA 群の何れでも高度の腎障害が観察された。尿中

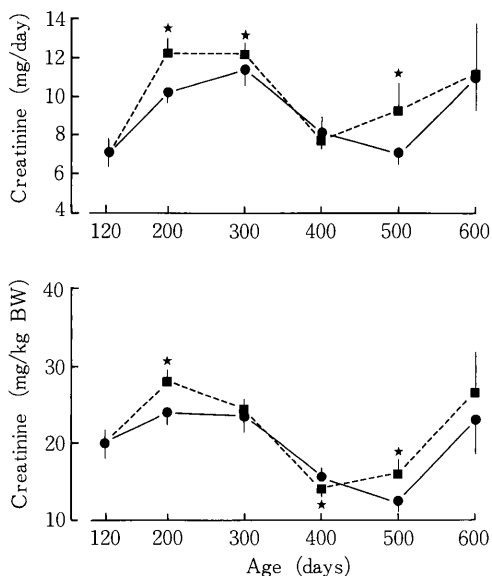


Fig. 2. Age-related changes in urinary creatinine excretion. Values are mean±SD. ● : 20% casein diet. ■ : 20% SPI diet. ★ : Significantly different from values of 20% casein diet.

Table 2. Effect of SPI on nitrogen balance and protein digestibility in aging rats

Age	Group (n) ¹	N balance	Digestibility
days		mg N/kg BW	%
120	(24)	+223.0±129.0	93.1±1.1
200	CA (12)	+ 62.9±74.3 ^a	91.4±1.7 ^a
	SA (12)	+102.1±172.6 ^a	91.3±1.3 ^a
300	CA (11)	+ 90.6±74.0 ^a	91.3±1.6 ^a
	SA (12)	+143.9±42.8 ^{a*}	91.9±0.8 ^a
400	CA (11)	+ 97.6±87.9 ^a	91.7±1.3 ^a
	SA (12)	+111.2±71.8 ^a	91.1±1.2 ^a
500	CA (11)	+ 73.8±60.5 ^a	91.8±0.9 ^a
	SA (11)	+ 84.0±109.3 ^a	90.6±3.3 ^a
600	CA (10)	+ 24.2±149.9 ^a	91.0±2.5 ^a
	SA (10)	+176.5±199.4	92.0±1.8 ^a

Values are mean±SD. ¹Figures in parentheses are number of rats. CA : 20% casein diet group. SA : 20% SPI diet group. ^a : Significantly different from the value of 120 days of age at p<0.05. * : Significantly different from the values of group CA in each age at p<0.05.

Table 3. Effect of SPI on urinary protein excretion in aging rats

Age	Group (n) ¹	Urinary protein
days		mg/day
120	(24)	27.5± 6.1
200	CA (12)	26.5± 2.9
	SA (12)	34.8± 8.3 ^{a*}
300	CA (11)	49.1±14.1 ^a
	SA (12)	58.3±13.3 ^a
400	CA (11)	65.1±13.8 ^a
	SA (12)	73.1±12.2 ^a
500	CA (11)	135.8±39.6 ^a
	SA (11)	148.3±34.9 ^a
600	CA (10)	142.5±63.8 ^a
	SA (10)	208.5±57.2 ^a

Values are mean±SD. ¹Figures in parentheses are number of rats. CA : 20% casein diet group. SA : 20% SPI diet group. ^a : Significantly different from the value of 120 days of age at p<0.05. * : Significantly different from the values of group CA in each age at p<0.05.

たん白質排泄量は、実験食開始時（120日齢）の27.5 ± 6.1 mg/日から、CA 群と SA 群ともに、加齢に伴い増加した。そして600日齢には、CA 群では142.5 ± 63.8 mg/日、SA 群では208.5 ± 57.2 mg/日まで達し、この両群の差は有意であった。一方この時、腎及び肝重量はCA 群と SA 群の間に差を示さなかった(Table 4)。

しかし最近、Iwasaki ら¹⁰⁾ は、SPI を自由摂食しているラットの生存日数及び加齢性疾病の発症について詳細な病理組織学的観察を行い、カゼインに比べてSPI は腎疾患を発症しないたん白質源であると結論した。この所見は、本研究における結果とは対立する。彼らの研究と我々の研究での大きな相違点は、彼らの用いた SPI 食にはメチオニンが添加されていたが、本実験の SPI 食には添加されていないことである。

腎疾患に対する個々のアミノ酸の作用に関する報告は必ずしも一致しない。しかし飼料中の含硫アミノ酸含量が加齢に伴う腎症の発症と関係していることを示唆する報告は比較的多い。Cys がラットの腎出血を促進し、Met やベタインは抑制的に作用することが報告されている¹¹⁾。また犬や家兎に対する Cys や Tyr の静脈内投与が腎障害をもたらすことも古くから知られている^{12,13)}。我々も⁶⁾、Cys, Tyr, Arg がたん白尿症の発症に促進的に働くことを示唆する成績を得ている。今後、加齢に伴うたん白尿症の発症に対する含硫アミノ酸の影響についての検討が必要である。

血液性状

実験期間終了時（600日齢）の血清中総たん白質、尿素およびクレアチニン濃度を Table 5 に示した。総たん白質濃度は、CA 群、SA 群ともに低値を示したが、有意に高い尿中たん白質排泄量を示した SA 群の値は、CA 群に比べてより低くなる傾向を示した。一方、BUN 及びクレアチニン濃度は、両群とも正常範囲を越す著しい高値を示し、高度の腎不全像を呈した。しかし、CA 群に比べて SA 群の値はやや低い傾向にあった。

中性脂肪 (TG) 及び総コレステロール (T-Chol) 濃度を Table 6 に示した。SPI の血清 T-Chol 低下作用については、成長期ラットでの短期投与実験で確認されている¹⁾。我々も⁵⁾、成熟ラット（3ヶ月齢）を用いた中期（6ヶ月間）投与実験で同様の結果を観察した。しかし120日齢から600日齢まで長期投与した時、SA 群の血清 T-Chol 及び TG 濃度は、CA 群と有意の差を示さず、むしろ SA 群で高値を示す傾向にあった。

長期飼育ラットでは SPI による血清 T-Chol 及び TG 濃度低下作用は観察されなかった。たん白尿症ラットで、血清 T-Chol 濃度と尿中たん白質排泄量の間に有意の正の相関関係があることを先に報告した⁵⁾。そこで、既に報告した9ヶ月齢ラットでの血清 T-Chol 濃度と尿中たん白質排泄量に関する数値⁵⁾ と本実験で得られた同様の数値をプールし、その相関を調

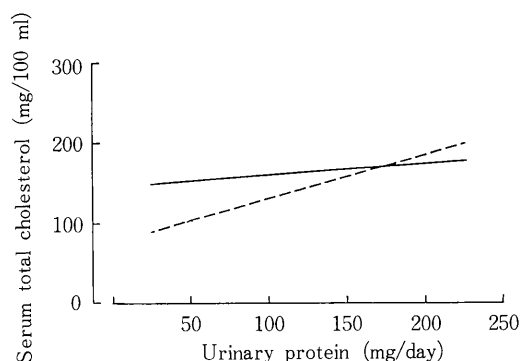


Fig. 3. Relationship between urinary protein excretion and serum total cholesterol. Three month old rats were fed 20% casein diet (CA) or 20% SPI diet (SA) *ad libitum* until 270 days of age (cited from our previous report⁵⁾) or 600 days of age. The regression equations were estimated as : solid line, with CA $Y=0.117X+147.98$ ($n=15$, $r=0.189$), dashed line, with SA $Y=0.538X+73.51$ ($n=13$, $r=0.514$, $p<0.05$).

Table 4. Effect of SPI on liver and kidney weight in rats at 600 days of age

Group (n) ¹	Liver		Kidney	
	g	g/kg BW	g	g/kg BW
CA (7)	16.09 ± 5.35	36.72 ± 12.03	4.35 ± 0.90	10.10 ± 2.80
SA (7)	14.74 ± 3.28	37.21 ± 8.26	4.24 ± 0.62	10.86 ± 2.29

Values are mean ± SD. ¹Figures in parentheses are number of rats.
CA : 20% casein diet. SA : 20% SPI diet.

Table 5. Effect of SPI on serum protein concentration, creatinine and blood urea nitrogen in rats at 600 days of age

Group (n) ¹	Total protein	Creatinine	BUN ²
	g/100 ml	mg/100 ml	mg/100 ml
CA (7)	6.08±0.49	1.71±1.20	55.8±34.0
SA (5)	5.79±0.75	1.44±0.58	39.0±21.7

Values are mean±SD. ¹Figures in parentheses are number of rats. ²Blood urea nitrogen. CA : 20% casein diet. SA : 20% SPI diet.

Table 6. Effect of SPI on serum total cholesterol and triglyceride concentrations in rats at 600 days of age

Group (n) ¹	T-chol ²	TG ³
	mg/100 ml	mg/100 ml
CA (7)	177.4±55.9	217.8±110.8
SA (5)	202.0±82.3	287.6±185.4

Values are mean±SD. ¹Figures in parentheses are number of rats. ²Total cholesterol. ³Triglyceride. CA : 20% casein diet. SA : 20% SPI diet.

べた (Fig. 3)。

その結果、カゼイン食では尿中たん白質排泄量の増加に伴う血清 T-Chol 値の有意の増加は観察されなかった。一方 SPI 食では、尿中たん白質排泄量の低い時には、血清 T-Chol 値はカゼイン食より有意に低い値を示した。しかし尿中たん白質排泄量の増加に伴って、血清 T-Chol 値は急激に上昇し、尿中たん白質排泄量が約180 mg/日以上では血清 T-Chol 値はカゼイン群を上回った。SPI 食群での血清 T-Chol 値のこのような変化が、加齢による影響なのか或は尿中たん白質排泄量の増加に対応した変化なのかは不明である。この点を明らかにするためには、たん白質尿症を発症していないラットでの長期観察が必要である。

文 献

- 1) Nagata, Y., Tanaka, K. and Sugano, M. (1981) : Further studies on the hypocholesterolemic effect of soya-bean protein in rats. *Br. J. Nutr.*, **45**, 233-241.
- 2) 奥田豊子, 三好弘子, 山本由美子, 浅田敏江, 上田真弓, 早川奈津美, 小石秀夫 (1987) : ヒトの

分離大豆たん白質摂取時におけるステロール排泄及び血漿コレステロール濃度. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 93-97.

- 3) 菅野道廣, 山田幸男, 吉田克子 (1987) : 分離大豆たん白質のラット血清コレステロール濃度低下作用 (VIII) : 大豆たん白質人工消化物の効果. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **8**, 104-107.
- 4) Ramsfield, H. W. Jr, (1956) : Role of dietary protein in normal rat proteinuria. *Am. J. Physiol.*, **184**, 473-478.
- 5) 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.
- 6) 海老沢秀道, 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.
- 7) Fujita, Y. and Ichikawa, M. (1986) : Age-related changes in nitrogen balance and related variables in later life of aging male Wistar rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 381-387.
- 8) Hirokawa, K. (1975) : Characterization of age-associated kidney disease in Wistar rats. *Mech. Ageing Dev.*, **4**, 301-316.
- 9) 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.
- 10) Iwasaki, K., Gleiser, C. A., Masaro, E., Mc Mahan, C. A., Seo, E. J. and Yu, B. P. (1988) : The influence of dietary protein source on longevity and age-related disease processes of Fischer rats. *J. Gerontol.*, **43**, B5-12.
- 11) Gliffith, M. W. (1941) : Editorial review. The nutritional importance of choline. *J. Nutr.*, **22**, 239-253.
- 12) Newburgh, H. L. and Marsh, P. L. (1925) : Renal injuries by amino acids. *Arch. Int. Med.*, **36**, 682-711.
- 13) Hardy, R. V. F., Tantengco, V. O. and Baumann, C. A. (1960) : Effects of amino acids on the excretion of various proteins by the rat. *J. Nutr.*, **70**, 438-446.