

肝障害ラットの栄養状態改善に及ぼす分離大豆たん白質の効果

EFFECT OF SOY PROTEIN ISOLATE ON AMELIORATION OF NUTRITIONAL STATUS IN PORTACAVAL SHUNTED RATS

木戸康博・多田文子・志塚ふじ子・稲井玲子・井上五郎・
岸 恭一（徳島大学医学部）

Yasuhiro KIDO, Fumiko TADA, Fujiko SHIZUKA, Reiko INAI, Goro INOUE and Kyoichi KISHI

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770

ABSTRACT

The effect of soy protein isolate (SPI) on amelioration of nutritional status was examined in adult rats with portacaval shunt (PCS) using sham-operated rats as controls. Animals were fed a diet containing 10, 20 or 40% protein for 2 weeks. Protein sources were SPI and 1.5% methionine supplemented casein. Food intake and body weight gain of PCS rats were lower than those of controls in 40% protein diet group. Liver weight was decreased by PCS, but the decrease was not affected by dietary protein level and source. The plasma BCAA/AAA ratio was significantly reduced by PCS, but there was no difference between the rats fed SPI and casein diets. With an increase in dietary protein, the plasma and brain methionine concentrations increased in PCS rats fed casein diet as compared with the control, but not in rats fed SPI diets. These results suggest that the use of SPI as a protein source in the nutritional treatment of liver cirrhosis may be useful for improving abnormal methionine metabolism. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **10**, 106-112, 1989.

肝硬変時には血漿遊離アミノ酸濃度の異常が見られ、分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）が低下し、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、チロシン）、トプトファン、メチオニンが上昇する¹⁾。このような血漿アミノ酸濃度異常時に高たん白質食を与えると、アミノ酸不均衡、高アンモニア血症を助長し、肝性脳症を誘発する。したがって、重篤な肝疾患において、食事中のたん白質の質と量は予後を大きく左右する。植物たん白質である分離大豆たん白質（以下SPI）は、カゼインに比べ、チロシン及びメチオニンが少ないことから肝性脳症時の血中アミノ酸の異常を改善する効果が期待できる。

そこで、SPIを肝疾患時のたん白質源として用いる

ことの有用性を検討するため、門脈・下大静脈吻合ラットにたん白質レベルを変化させた飼料を与え、栄養状態の改善に及ぼすSPIの効果を検討した。

実験方法

体重約200gのWistar系雄ラットをエーテル麻酔下に開腹し、ボタン法により門脈・下大静脈吻合(portacaval shunt: PCS)を施した。開腹後門脈及び下大静脈の剝離と血流遮断のみを行ったラット(sham)を対照とした。手術翌日より、たん白質源としてSPIあるいはカゼインを用いて作成した10, 20あるいは40% (N × 6.25) たん白質食 (Table 1) 及び水を自由に与え2週間飼育した。カゼインには、たん白質当た

Table 1. Composition of experimental diets

	SPI			Casein		
	10%	20%	40%	10%	20%	40%
	<i>g/kg diet</i>					
SPI	118	235	470	—	—	—
Casein	—	—	—	118	236	471
L-Met	—	—	—	1.5	3.0	6.0
Starch	512	433	277	510	431	272
Sucrose	256	217	138	255	215	136
Corn oil			50			
Mineral mix.(AIN-76)			35			
Vitamin mix.			10			
Cellulose			20			

り1.5%のメチオニンを添加した。

体重及び摂食量を毎日測定した。PCS手術前、手術後1及び2週末のそれぞれ3日間窒素出納を観察した。

飼育終了日、非絶食の条件で断頭にて血液を採取した。断頭後脳及び肝臓をすばやく取り出し、液体窒素にて凍結し、 -80°C に保存した。血漿及び脳内遊離アミノ酸濃度をアミノ酸自動分析機（医理化工業，A-3300）を用い測定した。また、肝臓たん白質量及びDNA量をそれぞれLowry法²⁾及びdiphenylamine法³⁾にて測定した。

結 果

摂食量及び体重の経日変化をFig. 1に、実験期2

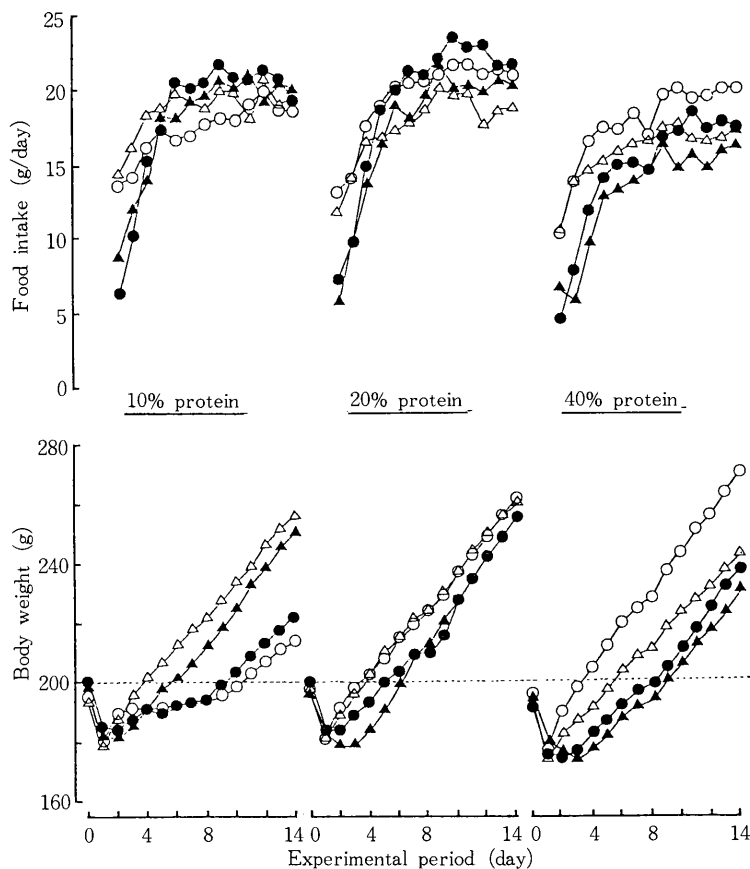


Fig. 1. Changes in food intake and body weight. Rats were subjected to portacaval shunt (PCS, closed symbols) or sham operation (control, open symbols) and fed a 10, 20 or 40% soy protein isolate (SPI, circle) or casein (triangle) diet as described in the method section. Reported values are mean for 4 to 6 rats per group.

週間の摂食量、体重増加量及び飼料効率の平均をFig. 2に示した。PCS手術後摂食量は減少したが、SPI食、カゼイン食のいずれにおいても術後7日目には正常レベルにまで回復し、それ以後はほぼ一定値を示した。SPI食の平均摂食量は、たん白質レベルを40%に増加させるとPCS群でのみ12.5 g/日に減少した。一方、カゼイン食の摂食量は、40%たん白質の時、対照群でも13.7 g/日に減少し、PCS群では11.2 g/日とさらに

低値となった。体重は、術後経日的に増加した。1日当りの平均体重増加量は、SPI食において、たん白質レベルを20%から10%に減少させると、対照群と同様PCS群でも減少した。一方、たん白質レベルを40%に増加させると、対照群では5.3 g/日に増加したが、PCS群では20%たん白質食とほぼ同程度であった。これに対しカゼイン食群の体重増加量は、40%たん白質食において対照群3.6 g/日、PCS群2.6 g/日となり、

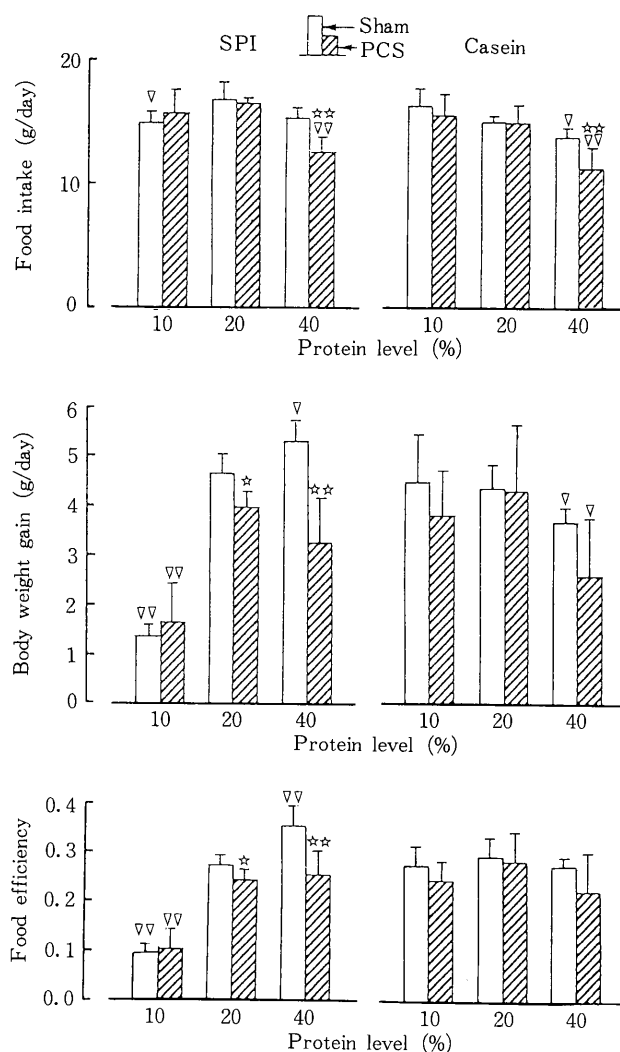


Fig. 2. Effect of SPI on food intake, body weight gain and food efficiency in portacaval-shunted (PCS, ) rats and sham-operated (sham, ) controls fed 10, 20 or 40% diet. Reported values are mean±SD with the numbers of animals shown in Table 2. Results are significantly different from sham (☆ p <0.05, ☆☆ p <0.01) at each protein level or respective 20% diet group (∇ p <0.05, ∇∇ p <0.01).

20%たん白質食群よりも減少した。同様の変化が飼料効率においても見られ、40%たん白質レベルでは、SPI 食の場合対照群の飼料効率が上昇したが、PCS 群では差がなく、カゼイン食の場合には、対照群では差がなかったが、PCS 群では低下する傾向にあった。

実験期の窒素出納を Fig. 3 に示した。20%たん白質レベルでは、PCS 群の窒素出納も対照群と同程度であり、また、実験期を通じ食事たん白質源の違いによる差もみられなかった。しかし、たん白質レベルを10%に減少させると、カゼイン食に比べ SPI 食にお

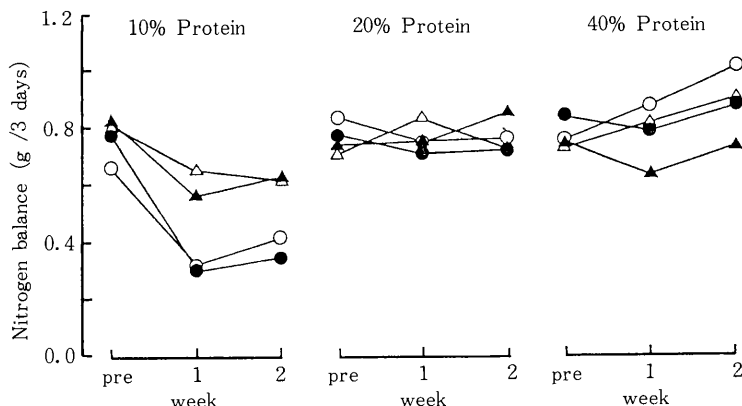


Fig. 3. Effect of SPI on nitrogen balance in portacaval-shunted (PCS, closed symbols) rats and sham-operated (sham, open symbols) controls fed a 10, 20 or 40% SPI (circle) or casein (triangle) diet. Reported values are mean for 4 to 6 rats per group.

Table 2. The effect of portacaval shunt and dietary protein on liver weight, protein and DNA

Group	Liver weight	Protein	DNA	Protein/DNA
	<i>g</i>	<i>mg/g tissue</i>	<i>mg/g tissue</i>	
10% SPI diet				
Sham (6)	7.97±0.81 ^{#**}	124.2±15.1	2.81±0.24 [#]	44.4±5.9
PCS (4)	5.11±0.78 ^{**}	125.0±10.2	3.42±0.32 ^{**#}	36.6±1.3 ^{**}
10% Casein diet				
Sham (6)	9.79±1.19	135.7±16.1	3.32±0.33	41.1±4.6
PCS (6)	6.90±0.68 ^{**}	132.0±10.0	2.93±0.31	45.5±5.6
20% SPI diet				
Sham (6)	10.14±1.24	156.8±15.9	2.47±0.24	63.8±7.8
PCS (6)	6.22±1.35 ^{**}	172.7±25.4	2.81±0.29	63.0±16.9
20% Casein diet				
Sham (6)	9.49±1.78	160.0±19.5	2.62±0.29	61.7±10.1
PCS (5)	6.61±1.00 [*]	177.0±15.4	2.98±0.17 [*]	59.5±5.1
40% SPI diet				
Sham (5)	10.11±0.79	183.8±18.3	2.23±0.29	84.3±19.0
PCS (6)	6.05±0.88 ^{**}	175.4±14.6	2.29±0.55	81.5±26.6
40% Casein diet				
Sham (5)	9.14±0.68	192.9±19.2	2.08±0.19	93.1±13.0
PCS (6)	6.87±0.72 ^{**}	184.6±19.3	2.42±0.28 [*]	77.5±14.2

The results are expressed as mean±SD with the numbers of animals shown in parentheses. Results are significantly different from sham (*p<0.05, **p<0.01) or casein diet (#p<0.05) at each protein level.

いて対照群, PCS 群共に窒素出納が低値となった。一方, たん白質レベルを40%に増加させた場合, SPI 食では対照群, PCS 群共に窒素出納値の低下はみられなかったのに対し, カゼイン食では PCS 群で窒素出納値の低下傾向が認められた。

肝臓重量, 肝たん白質量及び DNA 量を Table 2 に示した。肝臓重量は, PCS 群で対照群の60~70%に減少したが, 減少の程度は食事たん白質源および濃度によって影響を受けなかった。肝臓のたん白質濃度は, 食事たん白質レベルを20%から10%に減少させると, PCS 群で対照群と同様の減少を示した。一方, たん白質レベルを40%に増加させても, PCS 群の肝たん白質量は20%たん白質レベルの時と同じであった。肝臓の DNA 濃度は, 20%たん白質食において, SPI 群, カゼイン群共に PCS 群で対照群よりも高値を示した。

血漿遊離アミノ酸濃度を Table 3 に示した。たん白質レベルが20%の時, SPI 食においてもカゼイン食と同様対照群に比べ PCS 群で血漿分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 濃度が低下し, 血漿芳香族アミノ酸 (AAA) 濃度は上昇した。その結果, 血漿 BCAA/AAA 比は,

対照群に比べ PCS 群で有意に低下した。たん白質レベルを10%に減少させても同様の傾向にあった。しかし, たん白質レベルを40%に増加させると PCS 群の血漿 BCAA/AAA 比は, SPI 食では AAA 濃度が変化せず BCAA 濃度が上昇したため, また, カゼイン食では AAA 濃度の上昇よりも BCAA 濃度の上昇が大きかったために, 両食事群共20%たん白質レベルに比べ上昇した。血漿メチオニン濃度は, SPI 食の場合, PCS 群と対照群の間でいずれのたん白質レベルでも差が認められなかったが, カゼイン食の場合, PCS 群で対照群に比べ上昇し, 特に40%たん白質レベルにおける上昇は著しかった。

脳内遊離アミノ酸濃度を Table 4 に示した。PCS 群の脳内 AAA濃度は, SPI 食の場合, たん白質レベルを10%に減少させると有意に低下したが, カゼイン食では高値を維持した。また, たん白質レベルを40%に増加させてもカゼイン食と同様 SPI 食においても脳内 AAA濃度は20%たん白質食の場合と同程度であった。PCS 群の脳内メチオニン濃度は, SPI 食ではいずれのたん白質レベルでも対照群との間に有意な差は認められなかったのに対し, カゼイン食では, 20

Table 3. The effect of portacaval shunt and dietary protein on plasma amino acid concentration

Group	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	Cys	Met	BCAA	AAA	BCAA/AAA
<i>nmole/ml</i>										
10% SPI diet										
Sham(6)	126± 55	64±17	101±29	73±18	46±12	23± 7#	20±6*#	291± 97	120±27	2.47±0.73
PCS (4)	92± 36*	45±12	74±22	87±21	63±24	17± 5#	22±4*#	211± 70	150±43#	1.41±0.21*#
10% Casein diet										
Sham(6)	145± 47	66±24	99±38	85±34	39±10	46±16	33±9	310±108	124±41	2.50±0.39
PCS (6)	98± 17	48±10	70±15	174±42	77±14	31± 9	57±7**	315± 39	251±52**	0.90±0.26**
20% SPI diet										
Sham(6)	166± 27	79±17	114±22	78±21	46±10	39± 8	31±7*	359± 64	124± 7	2.95±0.59
PCS (6)	116± 36*	58±16	89±24	115±30*	87±32*	27±10	28±5*#	263± 74	202± 1*	1.32±0.13*
20% Casein diet										
Sham(6)	200± 52	89±20	136±30	97±26	58±14	47±12	41±7	425±101	156± 8	2.83±0.73
PCS (5)	97± 57*	54± 8**	80±14**	120±25	77±15	33± 8	41±7	231± 72	196± 8	1.16±0.18*
40% SPI diet										
Sham(5)	177± 52	81±22	136±40	64±15	44± 9	40± 8	28±6	394±112	108±24	3.61±0.47
PCS (6)	156± 23#	69± 5	115±12	91± 9**	91±21**	35± 7	27±1*#	328± 25	185±29**	1.79±0.19**
40% Casein diet										
Sham(5)	253±111	101±38	161±57	88±30	51±19	44±16	60±49	515±204	138±46	3.67±0.65
PCS (6)	217± 63	93±29	119±61	141±49*	103±34*	50±18	469±230**	430±121	244±81*	1.83±0.36**

The results are expressed as mean±SD with the numbers of animals shown in parentheses. Results are significantly different from sham (*p<0.05, **p<0.01) or casein diet (#p<0.05, ##p<0.01) at each protein level. Abbreviations: BCAA, branched-chain amino acid; AAA, aromatic amino acid.

Table 4. The effect of portacaval shunt and dietary protein on brain amino acid concentration

Group	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe	Cys	Met	BCAA	AAA	BCAA/AAA
<i>nmole/ml</i>										
10% SPI diet										
Sham(6)	101±62	48±14	90±28	116±46	68±22	16±2	30±14	240±100	168±69	1.48±0.40
PCS (4)	82±35	59±30	73±14	132±30	70±13	9±0**	25±5#	214±61	202±40	1.70±0.28#
10% Casein diet										
Sham(6)	81±70	49±17	85±40	100±47	58±24	14±2	33±27	216±114	158±69	1.35±0.21
PCS (6)	94±21	43±18	70±26	272±127*	110±36*	15±9	48±17	206±39	382±150**	0.61±0.25**
20% SPI diet										
Sham(6)	123±66	98±36	201±74#	142±69	173±90	44±28	66±15#	422±170#	315±158#	1.41±0.34
PCS (6)	157±53	68±10#	173±48#	224±57*	200±70#	40±14##	78±23	399±98#	424±123	0.96±0.17*
20% Casein diet										
Sham(6)	86±27	56±20	80±12	86±23	58±38	21±4	35±5	222±40	144±52	1.65±0.44
PCS (5)	97±40	42±10	85±20	179±49**	103±26	13±5*	55±18*	223±66	282±73**	0.79±0.07**
40% SPI diet										
Sham(5)	120±37	59±16	149±40	82±19	101±33	18±11	66±19	328±75	183±48	1.82±0.19
PCS (6)	155±45	91±21*	210±45*	215±58**	240±54**	16±6	95±27#	456±105*	455±96**	1.00±0.09**
40% Casein diet										
Sham(5)	140±70	82±24	170±27	104±29	112±26	15±8	78±28	392±140	278±49	1.78±0.37
PCS (6)	128±38	81±47	167±64	189±57*	176±76	21±11	423±133**	376±144	364±144	1.05±0.19**

The results are expressed as mean±SD with the numbers of animals shown in parentheses. Results are significantly different from sham (*p<0.05, **p<0.01) or casein diet (#p<0.05, ##p<0.01) at each protein level.

Abbreviations: BCAA, branched-chain amino acid; AAA, aromatic amino acid.

%レベルで上昇し、40%レベルでは著明に上昇した。

考 察

肝性脳症の病態，治療の研究モデルとして PCS ラットが用いられており，PCS ラットの血漿遊離アミノ酸濃度の変化は，肝硬変患者のそれと類似している^{1,4,5)}。そこで本研究では，PCS ラットの栄養状態改善に及ぼす SPI の効果について，摂食量，体重，窒素出納の面から調べると共に，血漿及び脳内遊離アミノ酸濃度に注目して検討した。

肝疾患の食事療法の基本は，高エネルギー・高たん白質・高ビタミン食である。しかし，血漿アミノ酸濃度異常を伴う患者では，高たん白質食摂取により肝性脳症を誘発することから，食事中のたん白質の質と量について特に考慮する必要がある。

まず，たん白質の量について考えてみると，肝障害時にみられる負の窒素出納は，肝障害それ自身に起因するものではなく，たん白質摂取量を増加すれば是正できる。しかし，肝硬変患者では，一般に食欲が減退しており，それに伴い摂取たん白質量も低下する。今回 PCS ラットの摂食量は，たん白質レベルを40%に増

加させると減少したが，カゼイン食に比べ SPI 食では減少の程度が小さかった。また，体重増加率，窒素出納から見ても，SPI 食のほうがカゼイン食よりも肝障害時のたん白質源として優れていた。

一方，たん白質の質に関しては，肝性脳症時の血漿アミノ酸不均衡を是正する目的で，分岐鎖アミノ酸の多いアミノ酸製剤が栄養補給に利用されている⁶⁾。また，植物性たん白質は肝硬変時の窒素代謝及び肝性脳症を改善することが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。植物性たん白質により血漿 BCAA/AAA 比の改善効果は認められていない¹¹⁻¹⁴⁾ が，血漿メチオニン濃度は改善されることが報告されている¹⁴⁾。今回の検討でも，PCS ラットの血漿 BCAA/AAA 比は，カゼイン食と同様 SPI 食においても，対照ラットのそれに比べ有意に低値であり，改善効果は認められなかった。一方，血漿及び脳内メチオニン濃度は，カゼイン食では上昇し，特に，40%たん白質レベルでは著明に上昇したのに対し，SPI 食では PCS ラットにおいても対照ラットのそれと変わらなかった。

以上のことから，植物性たん白質である SPI は，肝性脳症惹起因子の一つとされているメチオニン代謝

異常に対し有用であると考えられる。植物たん白質のメチオニン代謝改善効果と肝性脳症との関係については、さらに検討を加える必要がある。

文 献

- 1) Fischer, J. E., Rosen, H. M., Ebeid, A. M., James, J. H., Keane, J. M. and Soeters, P. B. (1976) : The effect of normalization of plasma amino acids on hepatic encephalopathy in man. *Surgery*, **80**, 77-91.
- 2) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- 3) Richards, G. M. (1974) : Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal. Biochem.*, **57**, 369-376.
- 4) Fischer, J. E., Funovics, J. M., Aguirre, A., James, J. H., Keane, J. M., Wesdorp, R. I. C., Yoshimura, N. and Westman, T. (1975) : The role of plasma amino acids in hepatic encephalopathy. *Surgery*, **78**, 276-290.
- 5) 木戸康博, 杉山光太, 中尾誠仁, 檜山英二, 須田武雄, 宮本剛八郎, 清水剛文, 新谷成之, 郡 英明 (1986) : 肝不全用経腸栄養剤 (SF-1008C) の肝性脳症改善効果に関する研究. *日薬理誌*, **88**, 47-56.
- 6) Okita, M., Watanabe, A. and Nagashima, H. (1985) : Nutritional treatment of liver cirrhosis by branched-chain amino acid-enriched nutrient mixture. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **31**, 291-303.
- 7) Greenberger, N. J., Carley, J., Schenker, S., Bettinger, I., Stamnes, C. and Beyer, P. (1977) : Effect of vegetable and animal protein diets in chronic hepatic encephalopathy. *Dig. Dis.*, **22**, 845-855.
- 8) Uribe, M., Marquez, M. A., Ramos, G. G., Ramos-Uribe, M. H., Vargas, F., Villalobos, A. and Ramos, C. (1982) : Treatment of chronic portal-systemic encephalopathy with vegetable and animal protein diets. *Dig. Dis. Sci.*, **27**, 1109-1116.
- 9) Uribe, M., Dibildox, M., Malpica, S., Guillermo, E., Villalobos, A., Nieto, L., Vargas, F. and Ramos, G. G. (1985) : Beneficial effect of vegetable protein diet supplemented with psyllium plantago in patients with hepatic encephalopathy and diabetes mellitus. *Gastroenterology*, **88**, 901-907.
- 10) Weber, F. L. Jr., Minco, D., Fresard, K. M. and Banwell, J. G. (1985) : Effects of vegetable diets on nitrogen metabolism in cirrhotic subjects. *Gastroenterology*, **89**, 538-544.
- 11) Shaw, S., Worner, T. M. and Lieber, C. S. (1983) : Comparison of animal and vegetable protein sources in the dietary management of hepatic encephalopathy. *Am. J. Clin. Nutr.*, **38**, 59-63.
- 12) 武藤泰敏, 吉田 貴 (1986) : 肝硬変患者に対する大豆たん白質食の効果. *大豆たん白質栄養研究会会誌*, **7**, 100-104.
- 13) 長縄 聡, 伊藤陽一郎, 山藤正広, 吉田 貴, 武藤泰敏 (1988) : 肝硬変患者に対する大豆たん白質食の効果. *大豆たん白質栄養研究会会誌*, **9**, 101-113.
- 14) Okita, M., Watanabe, A. and Nagashima, H. (1985) : A vegetable protein-rich diet for the treatment of liver cirrhosis. *Acta Med. Okayama*, **39**, 59-65.