

ラットのたん白尿症発症に対するシスチン及びメチオニン摂取量の影響

EFFECT OF CYSTINE AND METHIONINE INTAKE ON INCIDENCE OF PROTEINURIA IN ADULT RATS

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 Yoshiaki FUJITA

Department of Nutrition, Division of Physiological Aging Research, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173

ABSTRACT

Effects of dietary cystine and methionine levels on the incidence of proteinuria were examined in terms of urinary protein excretion, N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity in urine and cathepsin B activity in glomeruli. Six male Wistar rats (120 days of age) were given 13 g of 20% casein diet supplemented with 0.43% or 0.94% L-cystine, or 20% SPI diet supplemented with 1.18% of L-methionine until 280 days of age. Increase in cystine intake resulted in increase of urinary protein excretion. But methionine had a trend to decrease it. NAG activity in urine was measured to examine the relationships between cystine or methionine intake and injury of proximal tubules. A significant correlation between cystine intake and NAG activity in urine was observed. Activity of cathepsin B in glomeruli was measured to examine the possibility that dietary cystine affects the permeability of glomerular basement membrane. Activity of cathepsin B in glomeruli increased with elevation of cystine intake. Increase in methionine intake had no significant effect on NAG activity in urine and cathepsin B activity in glomeruli. These results suggest that increased urinary protein excretion in rats fed cystine supplemented diet may result from injuries in glomerular basement membrane and proximal tubules by dietary cystine. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **12**, 107-113, 1991.

自由食投与ラットでは、加齢にともない尿中に大量のたん白質が排泄され、たん白尿症を呈する。我々は、ラットにおけるたん白尿症の発症と食餌中たん白質の量及び種類の関係について観察してきた。分離大豆たん白質 (SPI) 或いはカゼインを600日齢まで自由に摂取したラットでは、何れも明らかにたん白尿症を認めたが、尿中たん白質排泄量は SPI で有意に高い値となった¹⁾。これに対して、Iwasaki ら²⁾は、メチオニン (Met) 添加した SPI 食を自由に摂取したラットでは、

カゼイン食ラットより腎疾患発症率が低いことを観察している。我々の結果と Iwasaki らの報告における食餌上の大きな相違は、飼料への Met 添加の有無であった。このことは、飼料中 Met 量が腎疾患発症に影響を及ぼしているかも知れないことを示唆している。一方また、単一アミノ酸の大量投与実験において、シスチン (Cys) は腎毒性を示すアミノ酸であることが古くから知られている³⁾。以上の成績はたん白尿症の発症は、飼料中 Met と Cys 量の両者によって影響を受け

ることを示唆している。

そこで本研究では、SPI 食に Met を、またカゼイン食に Cys をそれぞれ添加し、たん白尿症発症に対するこれらアミノ酸摂取量の影響及びそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

実験方法

120日齢の Wistar 系雄ラット30匹(体重305±22 g)を1群6匹として5群に分けた。これらのラットに基礎食として、20%カゼイン食(CA 群)或いは20% SPI 食(SP 群)を与えた。尿中たん白質排泄量に対する Cys 摂取量の影響を観察するために20%カゼイン食に0.43% L-Cys (CA-LC 群)或は0.94% L-Cys (CA-HC 群)を、また Met 摂取量の影響を観察するために20% SPI 食に1.18% L-Met (SP-HM 群)を添加し、この何れかを280日齢まで投与した。尿中たん白質排泄量はエネルギー摂取量により大きく影響されるため⁴⁾、本実験では、1日13 g の食餌制限条件で飼料を与えた。実験食組成は Table 1 に、飼料13 g 中の Cys 及

び Met 含量は Table 2 に示した。

実験食期間終了前に尿中たん白排泄量を測定した。また、尿中たん白質排泄量に対する Cys 或いは Met 摂取量の影響を近位尿細管の損傷との関係から明らかにするために、新鮮尿を採取し、尿中 N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) 活性を測定した⁵⁾。280日齢においてラットを採血屠殺し、血清中の総たん白質及びアルブミン濃度を測定した。一方また、たん白尿症の発症に対する糸球体カテプシン B 活性の影響が示唆されている⁶⁾。そこで、Baricos ら⁷⁾の方法により腎臓から糸球体を分離し、糸球体中カテプシン B 活性を測定した⁸⁾。

結果と考察

実験食期間中の摂食量と体重変化

Fig. 1 に摂食量と体重変化を示した。摂食量は170日齢頃から低下する傾向を示したが、全期間を通しての平均摂食量は各群間に全く差がなかった(12.1–12.4 g/day)。また体重は CA-LC 群で低値傾向を示したが、

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

Ingredients	CA	CA-LC	CA-HC	SP	SP-HM
SPI ¹				23.3	23.3
Casein ²	23.5	23.5	23.5		
L-Methionine					1.18
L-Cystine		0.43	0.94		
Sucrose ²	19.8	19.7	19.5	19.5	19.5
α -Corn starch ²	39.7	39.4	39.0	39.8	39.0
Vitamin mixture ²	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Mineral mixture					
Macro-elements	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8
Micro-elements ³	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose powder	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Corn oil ⁴	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

¹Soy protein isolate from Fuji Oil Co. LTD., Osaka (protein content : 85.1 %).

²From Oriental Yeast Co. LTD., Tokyo (protein content of casein : 85.9 %).

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

⁴From Ajinomoto Co., Tokyo.

Table 2. Cystine and methionine contents in experimental diet

	Cys content	Met content	Met/Cys ratio
	mg/13 g diet	mg/13 g diet	
CA	10.4	72.8	7.00
CA-LC	66.2	72.8	1.10
CA-HC	132.6	72.8	0.55
SP	26.0	28.6	1.10
SP-HM	26.0	182.0	7.00

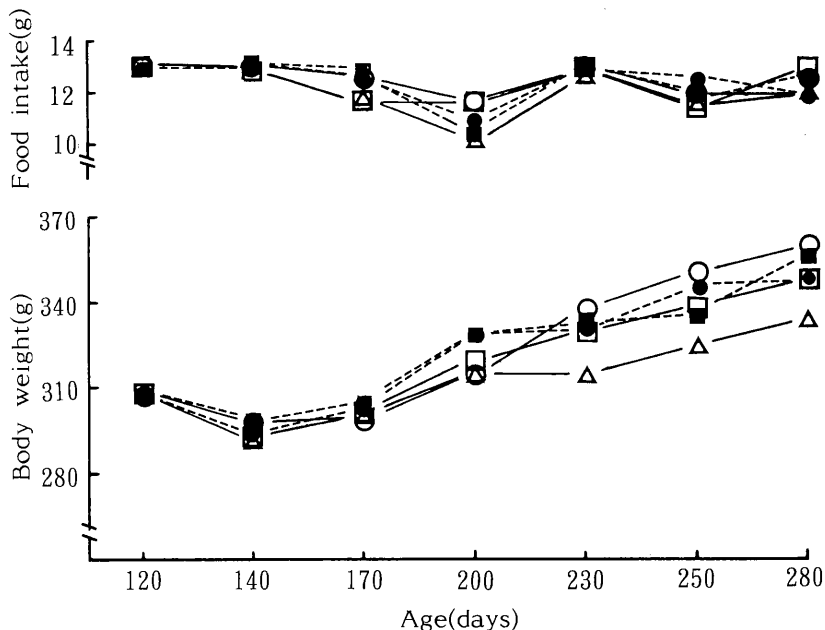


Fig. 1. Changes in food intake and body weight.
Each point is mean value of six rats.
○ : Group CA. △ : Group CA-LC. □ : Group CA-HC.
● : Group SP. ■ : Group SP-HM.

Table 3. Effect of cystine and methionine intake on urinary protein excretion

	(n)	Urinary protein excretion	
		mg/day	mg/kg BW
CA	(6)	19.5±3.2 ¹	55.4±8.5
CA-LC	(6)	19.3±2.8	59.0±6.2
CA-HC	(6)	21.3±3.8	63.0±10.5
SP	(6)	18.6±3.3	53.8±8.4
SP-HM	(6)	15.1±3.1	45.2±9.2

¹Values are mean±SD.

何れの群も、140日齢以降280日齢まで増加傾向を示した。

尿中たん白質排泄量

たん白尿症発症に対する食餌たん白質の影響を、構成アミノ酸との関係から明らかにする目的で、ラットの尿中たん白質排泄量に対する Cys 或は Met 摂取量の影響を観察した。

尿中たん白質排泄量の結果を Table 3 に示した。尿中たん白質排泄量は食餌制限によって抑制される⁹⁾。1日13gの食餌制限条件下で実施した本実験でも、尿

中たん白質排泄量は全体に低値を示した。しかし、CA群 (55.4±8.5 mg/kg BW) に比べ、Cys を添加した CA-HC 群 (63.0±10.5 mg/kg BW) で高値を示す傾向にあり、また SP 群 (53.8±8.4 mg/kg BW) に比べ Met を添加した SP-HM 群 (45.2±9.2 mg/kg BW) で低値を示す傾向にあった。食餌制限条件においても、尿中たん白質排泄量は Cys 及び Met 摂取量に影響されることが示唆された。

そこで、全ラットについて Cys 及び Met 摂取量を計算し、これらアミノ酸摂取量と尿中たん白質排泄量との相関関係を調べた。その結果、Fig. 2 に示すように、両者の間に有意な正の相関が得られ、Cys 摂取量の増加に伴って尿中たん白質排泄量は増加した。つぎに Met 摂取量と尿中たん白質排泄量との相関関係を Fig. 3 に示した。その結果、尿中たん白質排泄量は Met 摂取量の増加に伴って減少する傾向を示し、両者の間には負の相関関係が認められた。以上の結果は、Iwasaki ら²⁾が観察した SPI での低い腎疾患の発症は、SPI への Met 添加によってもたらされた可能性を示した。

血清総たん白質及びアルブミン濃度

たん白尿症ラットではアルブミンが尿中に排泄される結果、血清アルブミン濃度が低下する。血清総たん白質及びアルブミン濃度に対する飼料への Cys 及び Met 添加の影響を Table 4 に示した。血清総たん白質及びアルブミン濃度は、Cys 或は Met 添加の有無にかかわらず、何れも正常範囲内の値を示した。

尿中 NAG 活性

NAG は、近位尿細管が損傷を受けると尿中に現れ

る逸脱酵素としての臨床的意義が報告されており⁵⁾、ネフローゼ、腎不全、腎動脈狭窄及び癌などで尿中活性が上昇する。そこで、たん白尿症発症に対する Cys 或は Met 摂取量の影響を近位尿細管傷害の側面から観察するために、尿中 NAG 活性を測定した。

Table 5 に尿中 NAG 活性に対する Cys 或いは Met 摂取量の影響を示した。尿中 NAG 活性は、CA 群 (147 ± 16 mU/day) に比べ CA-HC 群 (259 ± 80 mU/day) で有意に高く、飼料への Cys 添加によって本酵素活性

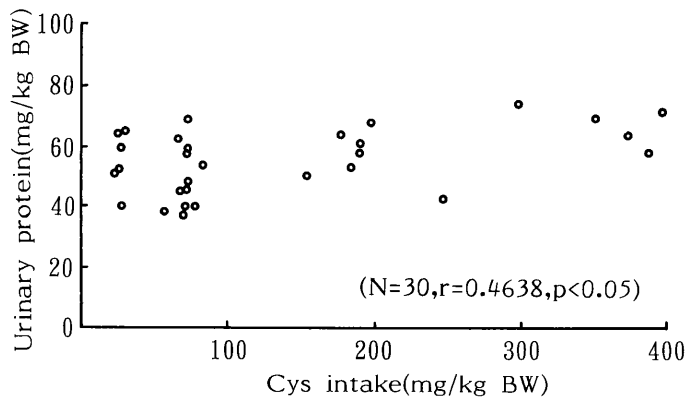


Fig. 2. Correlation between cystine intake and urinary protein excretion. Three months old rats were fed experimental diets presented in Table 1 until 280 days of age. The correlation was significant.

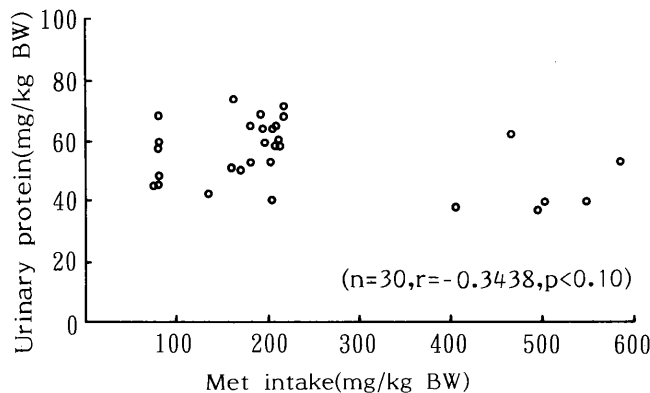


Fig. 3. Correlation between methionine intake and urinary protein excretion. Three months old rats were fed experimental diets presented in Table 1 until 280 days of age. The negative, but insignificant correlation was observed.

が上昇した。一方、SP 群 (64 ± 41 mU/day) と SP-HM 群 (99 ± 33 mU/day) の尿中 NAG 活性は Met 添加の有無にかかわらず全体に低値を示す傾向にあり、両者の間に有意の差を認めなかった。

本実験では、飼料への Cys 添加によって尿中 NAG 活性が上昇した。そこで、全ラットの Cys 摂取量を算出し、Cys 摂取量と尿中 NAG 活性との相関関係を Fig. 4 に示した。尿中 NAG 活性は Cys 摂取量と有意な正の相関関係を示し、Cys 摂取量の増加によって尿細管の損傷が高まることが示唆された³⁾。

糸球体カテプシンB活性

たん白尿症発症の原因の一つに、糸球体基底膜の透過性の亢進が考えられる¹⁰⁾。カテプシンBは腎糸球体ライソゾームに存在するたん白質分解酵素で、Cys などの SH 基供与体によって活性化する Cys プロテ

ナーゼの1つである^{11,12)}。カテプシンBはアルブミンやインスリン等の他に、糸球体基底膜のコラーゲンも分解することが報告されている⁷⁾。一方、Baricos らは、IgG 抗体による糸球体性ネフローゼラットの糸球体カテプシンB活性を阻害したとき、尿中たん白質排泄量の減少を観察し⁹⁾、糸球体カテプシンBとたん白尿症発症との関係を示唆している。

Table 6 に糸球体のカテプシンB活性に対する Cys 及び Met 摂取量の影響を示した。本実験でのカテプシンB活性値は、Baricos ら⁷⁾の成長期ラットでの報告値に比べ高いが、この酵素活性に対する食餌制限或いは加齢の影響については明らかにされていない。

カテプシンB活性は、CA 群 (2.38 ± 0.83 mU/min・mg prot.) に比べ CA-HC 群 (3.57 ± 0.29 mU/min・mg prot.) で有意に高い値を示し、飼料への Cys 添加

Table 4. Effect of cystine and methionine intake on total protein and albumin in serum

	(n)	Total protein	Albumin
		g/100 mL	g/100 mL
CA	(6)	6.0 ± 0.2^1	2.8 ± 0.1
CA-LC	(6)	6.1 ± 0.4	2.8 ± 0.2
CA-HC	(6)	$6.4 \pm 0.2^*$	2.9 ± 0.1
SP	(6)	6.0 ± 0.3	2.9 ± 0.2
SP-HM	(6)	5.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1

¹Values are mean $\pm$ SD. *Significantly different from group CA at $p < 0.01$.

Table 5. Effect of cystine and methionine intake on activity of NAG in urine

	(n)	NAG activity
		mU/day
CA	(6)	147.5 ± 16.5^1
CA-LC	(6)	185.9 ± 12.7
CA-HC	(6)	$258.9 \pm 80.4^*$
SP	(6)	64.3 ± 41.5
SP-HM	(6)	99.5 ± 32.7

¹Values are mean $\pm$ SD. *Significantly different from group CA at $p < 0.01$.

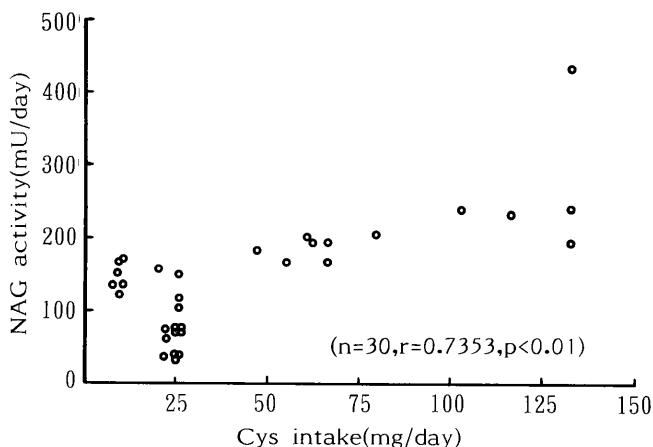


Fig. 4. Correlation between cystine intake and activity of NAG in urine. Three months old rats were fed experimental diets presented in Table 1 until 280 days of age. The correlation was significant.

Table 6. Effect of cystine and methionine intake on activity of cathepsin B in glomeruli

	(n)	Cathepsin B activity <i>mU/min·mg prot.</i>
CA	(5)	2.38±0.83 ¹
CA-LC	(6)	3.11±0.25
CA-HC	(6)	3.57±0.29*
SP	(5)	6.41±1.36
SP-HM	(6)	7.08±0.80

¹Values are mean±SD. *Significantly different from group CA at p<0.01.

によって本酵素活性が誘導された¹²⁾。このような糸球体カテプシンB活性と尿中たん白質排泄量の結果は(Fig. 2), 本実験で観察されたCysによる尿中たん白質排泄量の上昇は糸球体基底膜の透過性の変化と関係している可能性を示唆した。Cys摂取による糸球体カテプシンB活性の上昇と糸球体基底膜損傷の関係を明らかにすることは今後の課題である。

一方, SP群(6.41±1.36 mU/min·mg prot.)とSP-HM群(7.08±0.80 mU/min·mg prot.)の糸球体カテプシンB活性には有意差はみられず, 飼料へのMet添加の影響は観察されなかった。しかし, SP群及びSP-HM群のカテプシンB活性は, Cys摂取量が約5倍多いCA-HC群(Table 2)より高い活性値を示した。カテプシンB活性はCysやグルタチオン等のSH基供与体によって活性上昇するが, 一方でアルギニン誘導体による活性上昇が報告されている¹²⁾。SP群及びSP-HM群でのこのような高いカテプシンB活性は, SPIにおける高いアルギニン含量と関係しているかも知れない。

要 約

ラットの尿中たん白質排泄量に対するCys及びMet摂取量の影響を観察した。その結果, 1)ラットの尿中たん白質排泄量はCys摂取量と有意な正相関, Met摂取量とは負の相関を示す傾向にあった。2)また, 尿中NAG活性はCys摂取量と有意な正相関を示しCys摂取量の増加によって尿細管損傷が高まることが示唆された。3)糸球体カテプシンB活性は, 飼料へのCys添加によって上昇傾向を示した。

以上から, Cys摂取量の増加による尿中たん白質排泄量の上昇は, 近位尿細管及び糸球体基底膜損傷と関係していることが示唆された。

文 献

- 1) 海老沢秀道, 市川みね子, 大関知子, 藤田美明 (1989): ラットのたん白尿症の発症に対する自由摂食条件下でのSPI食の長期投与の影響。大豆たん白質栄養研究会会誌, **10**, 31-35.
- 2) Iwasaki, K., Gleiser, C. A., Masoro, E., Macmahon, C. A., Seo, E. 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-B12.
- 3) Curtis, A. C. and Newburgh, L. H. (1927): The toxic action of cystine on the kidney. *Arch. Intern. Med.*, **39**, 817-827.
- 4) 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 rat. *Gerontology*, **28**, 168-175.
- 5) 浅見 直 (1983): 尿中酵素と腎組織障害の関連: 腎尿細管組織障害と機能障害の相違。日本小児科学会雑誌, **87**, 241-251.
- 6) Baricos, W. H., O'Connors, S. E., Cortez, S. L., Wu, L. T. and Shah, S. V. (1988): The cysteine proteinase inhibitor, E-64, reduces proteinuria in an experimental model of glomerulonephritis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **155**, 1318-1323.
- 7) Baricos, W. H., Cortez, S. L., Zhou, Y., Dicarlo, R. M., O'Connors, S. E. and Shah, S. V. (1990): Glomerular basement membrane degradation by endogenous cysteine proteinases in isolated rat glomeruli. *Kidney Int.*, **38**, 395-401.
- 8) Barrett, A. J. and Kirschke, H. (1981): Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. *Meth. Enzymol.*, **80**, 535-561.
- 9) 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.
- 10) Novoa, J. M. N. and Montanes, I. (1987): Changes in renal function and morphology in aging laboratory animals, in *Renal Function and Disease in the Elderly*, ed. by Macias, N. J. and Cameron, J. S. Butterworth & Co. LTD., England, pp. 162-183.

- 11) Barrett, A. J. (1977) : Cathepsin B and other thiol proteinases, in Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, ed. by Barrett, A. J. North Holland, Inc., Amsterdam, pp. 181-207.
- 12) Greenbaum, L. M. and Fruton, J. S. (1956) : Purification and properties of beef spleen cathepsin B. *J. Biol. Chem.*, **226**, 173-180.