

自然発症糖尿病 WBN/Kob ラットにおける大豆たん白 質の腎糸球体病変に及ぼす効果

EFFECT OF SOY PROTEIN ON RENAL GLOMERULAR LESIONS IN
SPONTANEOUSLY DEVELOPED DIABETIC WBN/Kob RATS

池田義雄(東京慈恵会医科大学 健康医学センター 健康医学科)
森 豊(東京慈恵会医科大学第三内科)

Yoshio IKEDA¹ and Yutaka MORI²

¹Department of Preventive Medicine, Center for General Health Care, Jikei
University School of Medicine, Tokyo 105

²Third Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medi-
cine, Tokyo 105

ABSTRACT

To evaluate the effects of chronic protein loading on renal glomerular lesions, 45 diabetic WBN/Kob rats aged 8 months were given 15 g per day of 5, 20 and 40% protein diets from different sources for 18 weeks. Codfish, pork and soybean were used as protein source and 9 kinds of diets were used. Urinary albumin excretion (UAE) decreased significantly in all of 5 % protein diet-fed groups. UAE in all of 40% protein diet-fed groups increased and the increase in UAE was remarkable in soy protein and fish protein groups. Urinary NAG excretion decreased significantly in all of 5 % protein diet-fed groups. In 40% protein diet-fed groups, urinary NAG excretion increased significantly in fish protein and pork protein groups. Morphometrical analysis of renal glomerular lesions showed the average mesangial area increased significantly in all of 40% protein diet-fed groups. These results suggest that an important factor in prevention of development of diabetic nephropathy might be the quantity rather than the quality of dietary proteins. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 14, 65-69, 1993.

糖尿病, とくにインスリン依存型糖尿病(IDDM)では, 発症早期にしばしば腎糸球体濾過率(glomerular filtration rate: GFR)の亢進が認められ, 腎糸球体過剰濾過(hyperfiltration)の状態にあることが報告されている¹⁾。このGFRの上昇は, おもに腎糸球体の血行動態の異常によるとする説が提唱されており, この仮説により腎症におけるアルブミン尿や糸球体硬化症の成因が説明されている。一方, 糖尿病でたん白質摂取量を増加させるとGFRが増加し, 逆に制限すると, 正常あるいは高値を示したGFRは低下する。さらに, ヒトに急速なたん白質負荷を行った際のGFRの反応

はそのたん白質の質, すなわちアミノ酸組成の差により異なった変化が認められ, 一般に植物性たん白質は動物性たん白質と比較してGFRの上昇を誘発しにくいことが報告されている²⁾。そこで今回は, 長期間のたん白質の摂取量や組成の質的な変化により糖尿病での腎障害が影響されるかについて, 尿中アルブミン排泄並びに腎糸球体の形態学的変化の面より検討した。

方 法

実験計画

離乳直後より特殊繁殖用飼料, MB3 (27.9%たん白

質含有、船橋農場)にて飼育した生後8カ月齢雄性 WBN/Kob ラット^{3,4)}を1群5匹として9群に分け、これらのラットにたん白質の種類及びレベルを変えた飼料、すなわち5、20および40%たん白質含有飼料を1日15gの一定量与え18週間飼育した。これらの飼料は、たん白質レベルの差を可溶性無窒素物で調整し、単位重量当りの脂肪含有量、カロリーは同じになるように作製した。たん白質源として、スケソウダラ、ブタ肉より精製したたん白質並びに大豆たん白質の3種類を用い計9種類の精製飼料を実験に用いた。なお、

これらの精製たん白質のアミノ酸分析の結果は、Table 1のとおりであった。

測定

3週間毎に体重を測定するとともに、非絶食時に眼窩静脈叢より採血を行い、血糖、血漿尿素窒素、クレアチニン、総たん白質の値を測定した。また、代謝ケージを用いて16時間蓄尿を行い、尿中アルブミン、NAG 排泄量を測定するとともに GFR の指標としてクレアチニン・クリアランスを算出した。さらに18週後、全群屠殺し腎重量を測定するとともに、病理組織

Table 1. Amino acid composition of the three kinds of protein

Protein source	Codfish	Pork	Soybean
Aspartic acid	9.11	8.44	9.78
Threonine	4.92	4.86	3.27
Serine	4.55	4.21	4.62
Glutamic acid	17.97	17.03	15.98
Proline	3.06	3.94	4.56
Glycine	3.67	4.67	3.48
Alanine	5.67	6.05	3.59
Valine	5.35	5.44	4.57
Cystine	0.52	0.76	0.89
Methionine	3.60	3.17	1.08
Isoleucine	5.19	5.23	4.15
Leucine	8.47	8.57	7.62
Tyrosine	4.14	3.87	3.34
Phenylalanine	4.18	4.35	4.54
Lysine	9.59	8.81	5.68
Histidine	2.07	2.52	2.44
Arginine	6.68	6.84	6.67

(%)

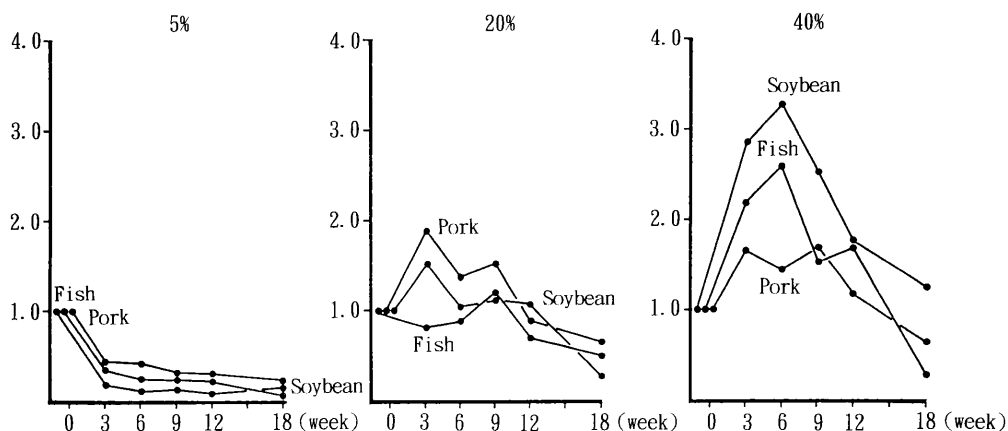


Fig. 1. Changes of urinary albumin excretion.
〈Ratio to the value of Ow〉

標本を作製，腎糸球体の定量形態学的検討⁵⁾を行った。
すなわち10%緩衝ホルマリン固定後 PAM 染色を施した腎光顕標本を用いて，1 標本につき無作為に選択した50個の糸球体について糸球体面積，メサンギウム領域面積を自動解析装置 SP-500を用いて測定し，平均糸球体面積： $\bar{A}(G)$ より糸球体を球とした際の平均糸球体体積： $\bar{V}(G)$

$$\bar{V}(G) = \frac{\beta}{K} \times [\bar{A}(G)]^{\frac{3}{2}}, \quad (\beta=1.38, K=1.10)$$

を，さらに平均糸球体面積： $\bar{A}(G)$ と平均メサンギウム領域面積： $\bar{A}(M)$ より平均メサンギウム領域・糸球体面積比

$$M \text{ ratio} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n \frac{A(M_i)}{A(G_i)}, \quad (n=50)$$

を算出した。

統計処理

実験 data は mean±SD で表し，統計処理は paired t-test を用いた。また群間比較は unpaired t-test を用いた。

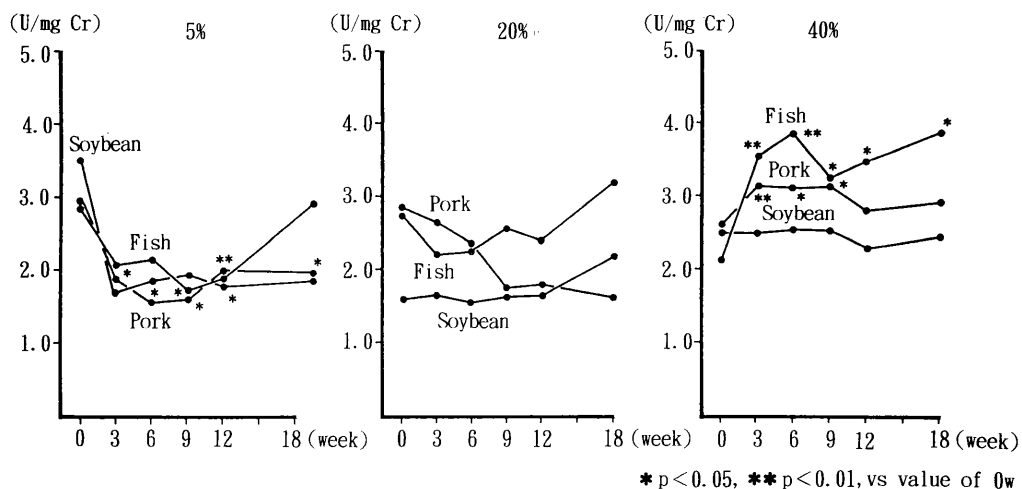


Fig. 2. Changes of urinary NAG excretion.

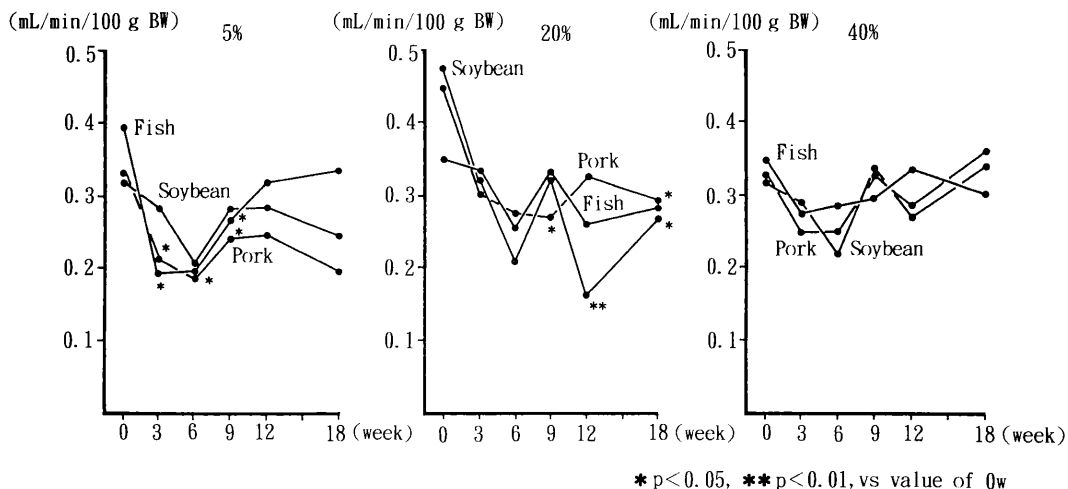


Fig. 3. Changes of creatinine clearance rate.

Table 2. Morphometric analysis of glomerular lesions

Average glomerular area (μm^2)				Average glomerular volume ($\times 10^3 \mu\text{m}^3$)			
	5%	20%	40%		5%	20%	40%
Fish	5182.0 ± 111.4	4951.6 ± 194.8	5148.7 ± 171.6	Fish	468.1 ± 15.0	441.2 ± 30.9	463.6 ± 23.2
Pork	5282.7 ± 141.6	5140.0 ± 194.9	5321.0 ± 215.6	Pork	481.8 ± 19.5	462.5 ± 26.3	487.2 ± 29.6
Soybean	5133.4 ± 185.6	5040.0 ± 207.4	5300.4 ± 223.6	Soybean	461.6 ± 25.1	449.1 ± 27.7	484.4 ± 30.6

Average mesangial area (μm^2)				Average mesangial area ratio			
	5%	20%	40%		5%	20%	40%
Fish	528.0 ± 20.8	551.1 ± 17.5	619.9** ± 34.4	Fish	0.102 ± 0.004	0.111 ± 0.002	0.121** ± 0.008
Pork	521.8 ± 32.7	530.6 ± 33.0	593.2* ± 31.2	Pork	0.099 ± 0.007	0.103 ± 0.004	0.112* ± 0.004
Soybean	542.0 ± 25.1	531.5 ± 42.0	597.8* ± 36.7	Soybean	0.106 ± 0.007	0.105 ± 0.004	0.113* ± 0.005

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs value of 20%

結 果

実験期間中の各群の随時血糖値は全群ともに200~400 mg/dL であった。血漿総たん白値の推移は、20、40%たん白質含有飼料摂取群ではほぼ変化を認めなかったが、5%たん白質含有飼料摂取群では、スケソウダラ、ブタ肉、大豆ともに低下傾向を認めた。一方、血漿尿素窒素値の推移は、5%たん白質含有飼料摂取群においては有意な低下を、40%たん白質含有飼料摂取群においては有意な増加を認めたが、スケソウダラ、ブタ肉、大豆間のたん白の質的な違いによる差は認められなかった。血漿クレアチニン値は全群とも有意な変動を示さなかった。

尿アルブミン排泄の推移(Fig. 1)は、5、20%たん白質含有飼料摂取群で、経過とともに低下傾向を認めた。一方40%たん白質含有飼料摂取群では、経過とともに増加したが9週以後は漸減した。また40%レベルでの比較では大豆、スケソウダラ、ブタ肉の順で尿アルブミンを増加させやすい傾向であった。一方、尿NAG排泄の推移(Fig. 2)では、5%たん白質含有飼料摂取群において有意な減少を認めた。また40%たん白質含有飼料摂取群においては、スケソウダラ、ブタ肉のみ有意な上昇を認めた。クレアチニン・クリアランスの推移(Fig. 3)は5%たん白質含有飼料摂取群でいずれの群も有意な減少を、また20%たん白質含有飼料摂取群では減少傾向を認めたが、40%たん白質含有飼料摂取群

でも増加傾向は観察されなかった。

腎重量(体重比)の比較検討では、摂取たん白質のレベルに比例して腎重量の増加が観察されたが、たん白質の質の違いによる差は認められなかった。

腎糸球体定量形態学的検討(Table 2)では、平均糸球体面積、平均糸球体体積は各群間で有意差を認めなかったが、平均メサンギウム面積、平均メサンギウム面積比は、40%たん白質含有飼料摂取群で有意に増加していた。しかしながら、40%レベルたん白質含有飼料間の比較では、スケソウダラ、ブタ肉、大豆間のたん白の質的な差は観察されなかった。すなわち、糸球体の定量形態学的検討では、高たん白食によるメサンギウム領域の拡大が観察された。

考 察

以上、低たん白食はクレアチニン・クリアランス、尿アルブミン排泄を有意に減少させ腎症の進展を制御する可能性が示唆された。一方、高たん白食は尿アルブミン排泄を増加させ、形態学的にも腎糸球体メサンギウム領域を拡大させるなど腎症の進展に促進的に働くものと考えられた。しかしながら、40%たん白質含有飼料摂取群間の比較では、たん白質の質的な違いによる腎症進展の差は、大豆たん白質飼料群で特に他のたん白質飼料群と比較して尿アルブミン排泄の増加傾向を認めたが、形態学的には差は観察されなかった。

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おり⁶⁾、高トリプトファン食も単独で糖尿病ラットの尿アルブミン排泄を増加させることが報告されている⁷⁾。またラットの加齢に伴うたん白尿と飼料中の摂取たん白質の種類、すなわちアミノ酸摂取量の関係について、海老沢ら⁸⁾はCys摂取量は尿たん白質排泄量と正の相関を、メチオニン(Met)摂取量は尿たん白質排泄量と負の相関を示すことを報告している。さらに、グリシン、アラニン、アルギニンなどのアミノ酸はGFRの上昇を誘発することから腎症の進展に影響を及ぼす可能性が指摘されている⁹⁾。今回の実験に用いた3種類のたん白質のアミノ酸組成を比較するとTable 1に示すように、腎毒性を示すCysは大豆>ブタ肉>スケソウダラの順で多く、逆に腎保護作用を示すMetはスケソウダラ>ブタ肉>大豆の順に多いことがわかる。40%たん白質含有飼料摂取群の尿アルブミン排泄量の比較において、大豆たん白質群で特に増加傾向が強く認められた理由として、これらCysやMet含有量の差による可能性も考えられる。さらに、この3種類のたん白質間で最も顕著な差はリン含有量であり(スケソウダラ: 83.2 mg/100 g<ブタ肉: 169 mg/100 g<大豆: 800 mg/100 g)、大豆たん白質で他のたん白質の5~10倍含有量が多いことから、リン摂取量の差も尿アルブミン排泄に影響した可能性も考えられる。これに対し40%たん白質含有飼料摂取群間の尿NAG排泄量の比較では、尿アルブミン排泄の成績と異なり、スケソウダラ群、ブタ肉群で有意な増加を認めたのに対し、大豆群では全経過を通じて有意な変動は認めなかった。海老沢ら⁸⁾は飼料へのCys添加によってラットの尿NAG排泄量が増加することを報告しているが、大豆たん白質のCys含有量は他のたん白質よりもむしろやや高めであり、この成績はCys摂取量の差からは説明できないと考えられた。いずれにしても、大豆たん白質は尿NAG排泄の増加を明らかに抑制することより、尿細管障害に保護的に働く可能性が示唆された。

しかしながら、これらのたん白質の質的な差による腎症の進展に及ぼす影響は、たん白質摂取量の差による影響と比較すると明らかに軽度であり、糖尿病性腎症の食事療法においてたん白質摂取量が最も重要な因子であり、たん白質の質的な問題はさほど考慮しなく

てもよいのではないかと考えられた。

文 献

- 1) Viberti GC (1979): Early function of morphological changes in diabetic nephropathy. *Clin Nephrol*, **12**, 47-53.
- 2) 中村宏志, 山崎雅俊, 千葉泰子, 田村紀子, 笠原紳, 谷 長行, 津田晶子, 百都 健, 伊藤正毅, 柴田 昭(1990): 糖尿病性腎症に対する蛋白急性負荷(第2報). 糖尿病, **33**; 539-543.
- 3) Mori Y, Yokoyama J, Nishimura M, Kurata H, Miura J and Ikeda Y (1990): Diabetic strain (WBN/Kob) of rat characterized by endocrine-exocrine pancreatic impairment due to distinct fibrosis. *Pancreas*, **5**, 452-459.
- 4) Mori Y, Yokoyama J, Nishimura M, Oka H, Mochio S and Ikeda Y (1992): Development of diabetic complications in a new diabetic strain of rat (WBN/Kob). *Pancreas*, **7**, 569-577.
- 5) 吉沢祥子, 宇都宮一典, 太田英樹, 蔵田英明, 野村幸史, 池田義雄(1993): ストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラットにおける運動の腎病変進展抑制効果について. 糖尿病の運動療法'93, プラクティス(Supple), 69-74.
- 6) Curtis AC and Newburgh LH (1927): The toxic action of cystine on the kidney. *Arch Int Med*, **39**, 817-827.
- 7) 五十嵐一雅(1990): 食事中的のアミノ酸組成と蛋白質の差の糖尿病性腎症に及ぼす影響. 医学のあゆみ, **153**, 197-198.
- 8) 海老沢秀道, 市川みね子, 大関知子, 藤田美明(1991): 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. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **12**, 107-113.
- 9) 中村宏志, 荒川直子, 田中 拓, 中川 理, 千葉泰子, 百都 健, 伊藤正毅, 柴田 昭(1991): 健康人および糖尿病患者に対する蛋白急性負荷—蛋白の種類により hyperfiltration を誘発する程度に差があることの原因は何か—. 糖尿病, **54**, 1063-1069.