

腎炎時のサイトカイン産生に及ぼす摂取大豆たん白質レベル およびアミノ酸補足の影響

矢ヶ崎一三*・永田順子・三浦 豊

東京農工大学農学部

Effects of Dietary Soy Protein Levels and Amino Acid Supplement on Cytokine Productivity in Macrophages from Nephritic Rats

Kazumi YAGASAKI, Junko NAGATA and Yutaka MIURA

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509

ABSTRACT

The effect of dietary soy protein isolate (SPI) on cytokine productivity in macrophages was studied using nephritic rats. Nephritis was induced in rats by injecting nephrotoxic serum into tail vein. The animals showed proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia 3, 7 and 14 days after the injection. Under these conditions, the productivity of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in resident peritoneal macrophages was found to be higher in nephritic rats than in normal ones, indicating a stimulation of TNF- α productivity in the nephritic state. To examine the effects of SPI on the stimulated productivity of TNF- α , nephritic rats were fed either a 20% casein diet (20C), 20% SPI diet (20S), 8.5% SPI diet (8.5S), or 8.5S supplemented with 0.3% L-methionine (8.5SM) for 5 or 10 days. The feeding of 20S for 10 days, as compared with that of 20C, was demonstrated to significantly suppress the stimulation of TNF- α productivity by 73%, suggesting an anti-inflammatory action of SPI in the nephritic state. *Soy Protein Research, Japan* 2, 106-111, 1999.

Key words : cytokine, macrophage, nephritis, soy protein isolate, tumor necrosis factor- α

腫瘍壊死因子- α (TNF- α) やインターロイキン-1 (IL-1) は、主に活性化マクロファージ (M ϕ) によって産生されるサイトカインであり、免疫応答や炎症反応において重要な役割を演じている。これらのサイトカインの産生が低下している状況下ではその産生能を高めて免疫賦活作用を有する食品因子^{1,2)}の摂取が望

ましい。一方、その産生が過剰の場合は生体にとって逆に不利に働くことが知られており、この場合には過剰産生を沈静化する必要がある。例えば肝がん移植ラットの腹腔 M ϕ では、TNF- α 産生能が亢進している³⁾。カゼイン食に比べ小麦グルテン食³⁾あるいは大豆たん白質食⁴⁾が肝がん移植ラットにおけるこのサイトカインの産生亢進を沈静化させることを見いだした。そこで本研究では、(1) 炎症の一つである糸球体腎炎

* 〒 183-8509 府中市幸町 3-5-8

の発症時にMφのTNF- α 産生能が変化するのかどうか、

(2) 腎炎時のTNF- α 産生能の変化に対し分離大豆たん白質(SPI)は量的質的に影響するのかどうかを検討するのが目的である。

方 法

動物、飼料および腎炎惹起法

ウィスター系雄ラットを3週齢で購入し、固型飼料(CE-2)で1週間および20%カゼイン食(20C, Table 1)で1週間予備飼育したのち、実験に供した。抗ラット糸球体基底膜ウサギ抗血清をラットの尾静脈に注射し、翌日ウサギ γ -グロブリンを後肢フットパッドに皮下注射することにより、糸球体腎炎ラットを作製した^{5,6)}。なお、抗血清注射2日前から代謝ケージに移し、必要に応じ24時間尿を採取した。

実験1

腎炎惹起後、20Cを3日(実験1A)、7日(実験1B)あるいは14日(実験1C)間自由摂取させ、最終日の午前9時に飼料をはずし午後1時から屠殺した。抗血清を投与しない正常ラットも同様に処置した。屠殺後、直ちに腹腔Mφを採取してリポ多糖(LPS)と培養後、培地中へ分泌されるTNF- α の活性をL929細胞を標的細胞とするバイオアッセイ法^{1,3)}で測定した。尿たん白質排泄量および血清アルブミン濃度を既報^{5,6)}に準じて測定した。担がん時と同様腎炎時も原疾患に付随して内因性高脂血症^{7,8)}を伴うことから、血清さらには肝臓の総コレステロール(T-Ch)、トリグリセリド(TG)およびリン脂質(PL)濃度も既報^{5,6)}に準じて測定した。

実験2

腎炎惹起後、20C, 20S, 8.5S および8.5SM食(C, casein; S, soy protein isolate; Table 1参照)を5日間(実験2A)または20Cおよび20S食を10日間(実験2B)自由摂取させ、最終日の午前9時に飼料をはずし午後1時から屠殺し、実験1と同様の項目を測定した。

結果と考察

まず、糸球体腎炎の発症に伴い、腹腔MφのTNF- α 産生能が変化するかどうかを検討するために実験1を行った。その結果をTable 2およびFigs. 1~3に示す。腎炎惹起により、食下量と成長は抑制されるかその傾向を示し、肝臓および腎臓相対重量は逆に増加するかその傾向を示した。肝臓脂質含量はTGのわずかな低下(実験1B)がみられた以外に大きな変化は認められなかった(Table 2)。しかし、腎炎惹起の3, 7および

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient (%)	20C	20S	8.5S	8.5SM
Casein	20.0	—	—	—
Soy protein isolate	—	20.0	8.5	8.5
Corn oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose powder	2.0	2.0	2.0	2.0
α -Corn starch	68.3	68.3	79.8	79.5
L-Methionine	—	—	—	0.3

Table 2. Food intake, body weight gain, liver and kidney weights and liver lipid contents in normal (Nor) and nephritic (Nep) rats (Exp. 1)

Measurement	3 days (Exp. 1A)		7 days (Exp. 1B)		14 days (Exp. 1C)	
	Nor	Nep	Nor	Nep	Nor	Nep
Food intake (g/3, 7 or 14 days)	65.8 $\pm$ 2.1	46.2 $\pm$ 1.6*	149.2 $\pm$ 3.4	118.9 $\pm$ 6.9*	275.3 $\pm$ 10.0	258.0 $\pm$ 2.0
Body weight gain (g/3, 7 or 14 days)	24.4 $\pm$ 2.0	7.1 $\pm$ 2.3*	55.0 $\pm$ 2.1	35.7 $\pm$ 5.4*	107.6 $\pm$ 7.0	90.9 $\pm$ 4.8
Liver weight (g/100 g body weight)	5.02 $\pm$ 0.13	5.46 $\pm$ 0.14	4.97 $\pm$ 0.19	5.96 $\pm$ 0.27*	4.38 $\pm$ 0.16	5.53 $\pm$ 0.20*
Kidney weight (g/100 g body weight)	1.02 $\pm$ 0.03	1.31 $\pm$ 0.08*	0.95 $\pm$ 0.03	1.49 $\pm$ 0.05*	0.88 $\pm$ 0.01	1.34 $\pm$ 0.11*
Liver lipid (μ mol/g liver)						
Cholesterol	4.44 $\pm$ 0.24	5.02 $\pm$ 0.18	3.99 $\pm$ 0.21	4.31 $\pm$ 0.20	3.85 $\pm$ 0.12	3.76 $\pm$ 0.19
Triglyceride	3.89 $\pm$ 0.47	2.92 $\pm$ 0.35	4.44 $\pm$ 0.44	3.32 $\pm$ 0.14*	6.90 $\pm$ 0.51	5.84 $\pm$ 0.45
Phospholipids	34.8 $\pm$ 1.4	37.0 $\pm$ 0.8	33.3 $\pm$ 1.1	33.1 $\pm$ 1.0	33.3 $\pm$ 1.0	31.7 $\pm$ 1.2

Each value represents the mean $\pm$ SEM for 5 rats. *Significantly different from the corresponding normal groups at $P < 0.05$ by Student's t -test.

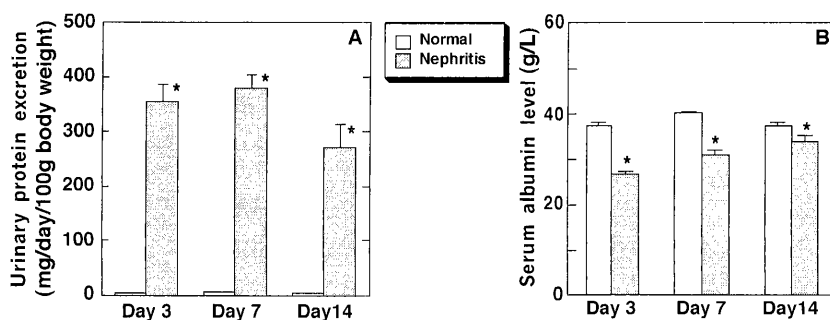


Fig. 1. Urinary protein excretion (A) and serum albumin level (B) in normal and nephritic rats. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 5 rats. * Significantly different from the corresponding normal groups at $P < 0.05$ by Student's t -test.

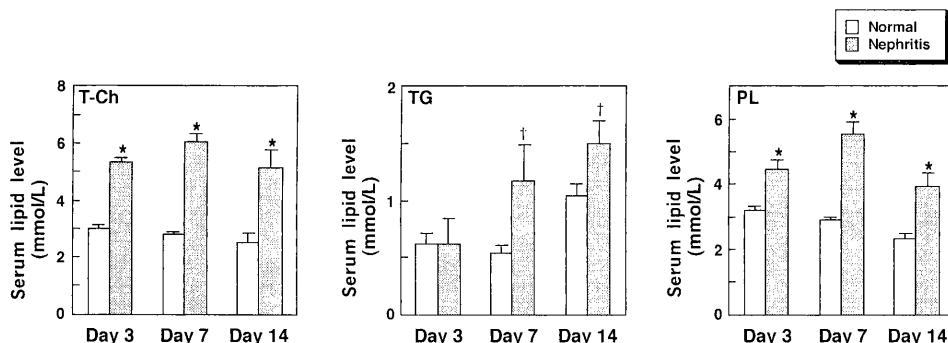


Fig. 2. Serum lipid levels in nephritic rats. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 5 rats. **Significantly different from the corresponding normal groups at $*P < 0.05$ and $^+P < 0.1$ by Student's t -test.

14日目のいずれにおいても、重度のたん白質尿症 (Fig. 1A) と低アルブミン血症 (Fig. 1B) が認められた。このとき、3日目のTGを除き血清T-ChおよびPL濃度は有意な上昇とその傾向を示し、高脂血症も発症していた (Fig. 2)。このときのTNF- α 産生能をFig. 3に示した。正常時に比べ、腎炎時には腹腔M ϕ のTNF- α 産生能が2.7倍 (3日目)、2.1倍 (7日目) あるいは1.9倍 (14日目) に有意に上昇するかその傾向を示した。なお、ここには示していないが、抗ラット糸球体基底膜ウサギ抗血清のかわりに正常ウサギ血清をラットの尾静脈内に注射し翌日ウサギ γ -グロブリンを後肢フットパッドに皮下注射して尾静脈注射から5日後に無処置の正常ラットと比較検討したが、たん白質尿症、低アルブミン血症および高脂血症の発生は認められず、また腹腔M ϕ のTNF- α 産生能にも変化は認められなかった。したがって、実験上の措置が腎機能や免疫機能に影響することはないものと考えられた。

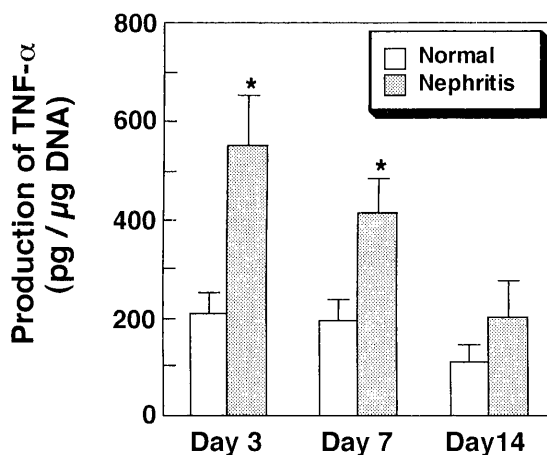


Fig. 3. TNF- α productivity in macrophages from normal and nephritic rats. Each value represents the mean $\pm$ SEM for 5 rats. *Significantly different from the corresponding normal groups at $P < 0.05$ by Student's t -test.

このように、糸球体腎炎ラットの腹腔MφのTNF- α 産生能は正常時より亢進していることが認められたので、これに対する分離大豆たん白質(SPI)の量的質的影響の有無を検討した。まず、腎炎惹起5日後の変化の有無を検討した(実験2A, Table 3)。5日間の食下量は20C, 20S, 8.5Sおよび8.5SMの4群間で有意差は認められなかったのに対し、成長は20Cや20Sに比べ8.5Sでは阻害され、8.5Sにメチオニオンを補足した8.5SMでは20Sのレベルまで回復した。尿たん白質排泄量は20Cや20Sに比べ8.5Sと8.5SMでは有意に低く、腎疾患時の低たん白質食の有効性が確認された。腎臓

相対重量は20Cに比べ20S, 8.5Sおよび8.5SMで有意な低下またはその傾向を示した。肝臓相対重量は4飼料群間で有意な差は認められなかった。血清脂質濃度は8.5S群が最も低い値を示した。このときのTNF- α 産生能は、20Cに比べ20S, 8.5S, 8.5SM摂取により、有意差はないもののそれぞれ51%, 34%, 18%抑制された。20Sは8.5Sより抑制度が強かったので、20S食には糸球体腎炎時に亢進するTNF- α 産生を沈静化する作用のあることが示唆された。

そこで次に、20Sに焦点を絞り、飼育期間を2倍の10日間としてTNF- α 産生能に対する影響をさらに検

Table 3. Effects of soy protein diets on food intake, growth, urinary protein excretion, liver and kidney weights, serum lipid levels and TNF- α productivity in nephritic rats fed the diets for 5 days (Exp. 2A)

Measurement	20C	20S	8.5S	8.5SM
Food intake (g/5 days)	77.2 $\pm$ 4.8	70.4 $\pm$ 9.3	51.8 $\pm$ 6.3	79.2 $\pm$ 6.5
Body weight gain (g/5 days)	28.0 $\pm$ 3.2 ^a	14.4 $\pm$ 7.2 ^a	-13.4 $\pm$ 4.7 ^b	16.4 $\pm$ 4.7 ^a
Urinary protein excretion (days 4-5) (mg/day/100 g body weight)	349 $\pm$ 36 ^a	282 $\pm$ 42 ^a	75 $\pm$ 23 ^b	148 $\pm$ 27 ^b
Liver weight (g/100 g body weight)	5.62 $\pm$ 0.25	4.96 $\pm$ 0.23	5.42 $\pm$ 0.51	5.56 $\pm$ 0.39
Kidney weight (g/100 g body weight)	1.44 $\pm$ 0.04 ^a	1.19 $\pm$ 0.05 ^b	1.25 $\pm$ 0.07 ^{ab}	1.09 $\pm$ 0.07 ^b
Serum lipid (mmol/L)				
Cholesterol	4.72 $\pm$ 0.17 ^a	5.00 $\pm$ 0.24 ^a	3.48 $\pm$ 0.33 ^b	4.70 $\pm$ 0.30 ^a
Triglyceride	1.85 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.60 $\pm$ 0.25 ^{ab}	0.75 $\pm$ 0.23 ^a	2.73 $\pm$ 0.73 ^b
Phospholipids	4.00 $\pm$ 0.24 ^{ab}	4.13 $\pm$ 0.13 ^{ab}	3.03 $\pm$ 0.43 ^a	4.61 $\pm$ 0.43 ^b
TNF- α production (pg/ μ g DNA)	174 $\pm$ 47	86 $\pm$ 20	115 $\pm$ 38	142 $\pm$ 21

Each value represents the mean $\pm$ SEM for 5 rats. Data were analyzed by a one-way ANOVA. When *F* values were significant (*P* < 0.05), differences among the groups were inspected by the Tukey-Kramer multiple-comparisons test; values not sharing a common superscript letter are significantly different.

Table 4. Effect of a 20% soy protein diet on food intake, growth, urinary protein excretion, liver and kidney weights, serum lipid levels in nephritic rats fed the diets for 10 days (Exp. 2B)

Measurement	20C	20S
Food intake (g/10 days)	129.1 $\pm$ 7.4	70.8 $\pm$ 1.9*
Body weight gain (g/10 days)	31.8 $\pm$ 5.5	5.0 $\pm$ 4.6*
Urinary protein excretion (days 9-10) (mg/day/100 g body weight)	463 $\pm$ 25	341 $\pm$ 14*
Liver weight (g/100 g body weight)	5.86 $\pm$ 0.23	5.06 $\pm$ 0.33
Kidney weight (g/100 g body weight)	1.48 $\pm$ 0.07	1.22 $\pm$ 0.08*
Serum lipid (mmol/L)		
Cholesterol	11.21 $\pm$ 1.90	8.48 $\pm$ 1.72
Triglyceride	15.93 $\pm$ 5.89	10.72 $\pm$ 4.06
Phospholipids	4.27 $\pm$ 1.02	2.39 $\pm$ 0.61

Each value represents the mean $\pm$ SEM for 6 rats. *Significantly different from the 20% casein diet group at *P* < 0.05 by Student's *t*-test.

討した(実験 2B)。その概要を Table 4 に示した。成長、食下量、尿たん白質排泄量、肝相対重量および腎相対重量に対する 20C と比べた 20S の影響は、5 日間投与時と同様に低下させる傾向を示した。血清脂質濃度は有意ではないものの、T-Ch, TG, PL のいずれの値も 20C に比べ 20S で低下傾向を示した。このときの腎炎は重度の高脂血症を伴っていたため、20S の有効性が発現しにくかった可能性がある。一方、20S 群の TNF- α 産生能は、20C 群の 27% にまで有意に低下していた (Fig. 4)。

以上の成績から、担がん時と同じく糸球体腎炎時にも腹腔 M ϕ の TNF- α 産生能が亢進していること (Fig. 3)、SPI はこの亢進を抑制 (沈静化) すること (Fig. 4) が判明した。8.5S や 8.5SM はたん白質尿症を軽減化しているにもかかわらず TNF- α 産生能をあまり低下させていないこと (Table 3)、8.5S より 20S のほうが TNF- α 産生抑制作用が強く SPI の摂取量が高いほど抑制効果が強いこと (Table 3) から、SPI に含まれるたん白質・アミノ酸以外の因子が TNF- α 産生に影響しているものと考えられる。今後、解明されるべき興味深い課題である。

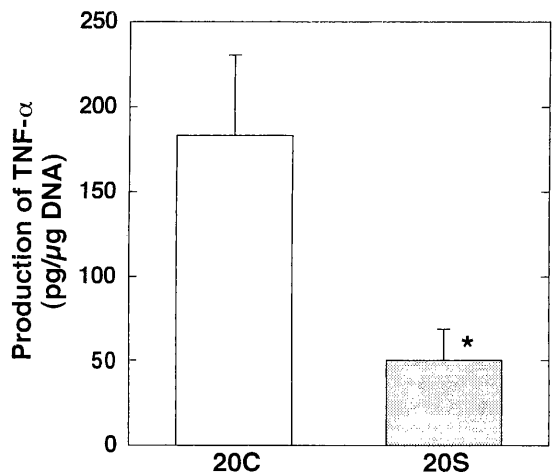


Fig. 4. Effect of a 20% soy protein diet on TNF- α productivity in macrophages from nephritic rats fed the diet for 10 days (Exp. 2B). Each value and bar represents the mean and standard error for 6 rats. *Significantly different from the 20% casein diet group at $P < 0.05$ by Student's t -test.

要 約

我々は、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) 産生能の亢進している肝がん移植ラットでは、カゼイン (C) 食に比べ大豆たん白質 (S) 食がこのサイトカインの産生亢進を沈静化させることを見いだした。そこで本研究では、(1) 炎症の一つである糸球体腎炎の発症時に M ϕ の TNF- α 産生能が変化するかどうか、(2) 腎炎時の TNF- α 産生能の変化に対し食餌大豆たん白質は量的質的に影響するかどうかを検討するのが目的である。糸球体腎炎は、ウィスター系雄ラットへ抗ラット腎糸球体基底膜ウサギ抗血清の静脈注射とウサギ γ -グロブリンの皮下注射によって惹起した。種々の処置後、腹腔 M ϕ を採取後リボ多糖存在下で培養し、その培養上清中の TNF- α 活性を L929 細胞を標的細胞とするバイオアッセイ法にて測定した。また、尿中たん白質排泄量、血清の脂質・アルブミン濃度を測定し、腎炎の進展状態を追跡した。まず、正常または腎炎ラットに 20%C 食 (20C) を摂取させ、腎炎惹起後 3 日目、7 日目、14 日目に腹腔より M ϕ を採取した。抗血清注射 3 日後から低アルブミン血症、たん白質尿症および高脂血症が認められ、これらは 14 日目まで持続した。このように腎炎の発症が確認された状態で腹腔 M ϕ の TNF- α 産生能を測定すると、注射 3 日目、7 日目、14 日目のいずれにおいても正常に比べて有意な上昇または上昇傾向を示した。そこで、この上昇に対する食餌の影響を比較的短期間で検討するために、20C、20%S 食 (20S)、8.5%S 食 (8.5S)、0.3% L-メチオニン補足 8.5%S 食 (8.5SM) を腎炎ラットに 5 日間摂取させ、腹腔 M ϕ の TNF- α 産生能を測定した。その結果、20C に比べ 20S、8.5S、8.5SM 摂取により、有意差はないものの TNF- α 産生能がそれぞれ 51%、34%、18% 抑制され、20S 食には糸球体腎炎時に亢進する TNF- α 産生を沈静化する作用のあることが示唆された。そこで、20C および 20S を腎炎ラットに 10 日間摂取させて TNF- α 産生能を測定したところ、20C 摂取に比べ 20S 摂取により 73% の有意な抑制効果が認められ、SPI の抗炎症作用が示唆された。

文 献

- 1) Komatsu W, Yagasaki K, Miura Y and Funabiki R (1997) : Stimulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 productivity by the oral administration of cabbage juice to rats. *Biosci Biotech Biochem*, **61**, 1937-1938.
- 2) Komatsu W, Miura Y and Yagasaki K (1999) : In vitro stimulation of tumor necrosis factor production from rat splenocytes by cabbage extract. *In : Animal Cell Technology : Basic & Applied Aspects*. Vol. 10, Kitagawa Y, Matsuda T and Iijima S, eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 131-134.
- 3) Komatsu W, Yagasaki K, Miura Y and Funabiki R (1996) : Modification of tumor necrosis factor and interleukin-1 productivity in macrophages from hepatoma-bearing rats by dietary proteins. *Nutr Res*, **16**, 1699-1707.
- 4) 矢ヶ崎一三, 小松 渡, 三浦 豊 (1998) : サイトカイン産生に対する大豆たん白質の作用解析. 大豆たん白質研究, **1**, 106-110.
- 5) Fujisawa K, Yagasaki K and Funabiki R (1995) : Reduction of hyperlipidemia and proteinuria without growth retardation in nephritic rats by a methionine-supplemented, low-soy-protein diet. *Am J Clin Nutr*, **61**, 603-606.
- 6) Fujisawa K, Yagasaki K, Ishizuka S, Miura Y and Funabiki R (1997) : Reduction of renal transforming growth factor- β activity without aggravation of growth retardation in nephritic rats by a methionine-threonine-supplemented low-casein diet. *Biosci Biotech Biochem*, **61**, 230-232.
- 7) Yagasaki K (1998) : Dietary control of abnormal lipid metabolism secondary to hypothyroidism, cancer and inflammatory diseases. *In : Recent Research Developments in Lipids Research*. Vol. 2, Pandalai SG, ed., Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 21-28.
- 8) Yagasaki K and Miura Y (1999) : Food factors with potential to suppress proliferation and invasion of cancer cells and cancerous hyperlipidemia. *In : Recent Research Developments in Agricultural & Biological Chemistry*. Pandalai SG, ed., Research Signpost, Trivandrum, in press.