

食事と同時に摂取された大豆たん白質加水分解物が食品成分を 燃焼させる効果：安定同位体を用いた基質酸化量の経時的測定

石原健吾^{*1}・小柳津新一²・福智喜子¹・水野谷 航²・伏木 亨²・安本教傳¹

¹ 梶山女学園大学生生活科学部 ² 京都大学大学院農学研究科

Effect of Dietary Soybean Protein Isolate Hydrolysate on Oxidation of Food Components : Measurements of Substrate Oxidation Using Stable Isotope

Kengo ISHIHARA¹, Shinnichi OYAIZU², Yoshiko FUKUCHI¹,
Wataru MIZUNOYA², Tohru FUSHIKI² and Kyoden YASUMOTO¹

¹ School of Life Studies, Sugiyama Jogakuen University, Nagoya 464-8662

² Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502

ABSTRACT

The effects of a long-term feeding of soy protein isolate hydrolysate (SPI-H) on the expiration of ¹³CO₂ from dietary ¹³C-glucose or ¹³C-triolein in a type II diabetic mice, KK-A^y strain were investigated. The mice of 6 wk old were provided free access to a high fat diet (30% of energy from fat) for the initial 4 wk to induce diabetes. The animals were divided into two groups and during the subsequent 4 wk each group of animals was fed a diet containing 35% SPI-H or casein, 10% sucrose, and 5% soybean oil on energy intake restricted regimen to 60% of that given during the preceding high fat diet. For the last 3 days on the restricted dietary regimen, the animals were housed in the respiratory metabolic chambers. For the middle 24 h of the metabolic measurement, half of animals in each group fed a diet that sucrose was replaced by ¹³C-glucose and the remaining half fed another diet that soybean oil was replaced by ¹³C-triolein. The expiration rate of ¹³CO₂ from ¹³C-glucose during the period of initial 12 h was higher in the animals fed the SPI-H diet than those fed the casein diet. To the contrary, the expiration from ¹³C-triolein was lower in SPI-H group during the period of 7 to 22 h after the diets. Diabetic renal hypertrophy was alleviated in the SPI-H diet group compared with the casein diet group. These results are consistent with the notion that the mice on the SPI-H diet can utilize exogenous glucose more readily than those on the casein diet. It thus appears that SPI-H feeding for a prolonged period ameliorates glucose tolerance in type II diabetic mice. *Soy Protein Research, Japan* 4, 87-96, 2001.

*〒 464-8662 名古屋市千種区星が丘元町 17-3

糖尿病の食餌療法の基本的はカロリー制限であるが、摂食量を減少させると脂肪組織量のみならず筋量が減少するという負の側面がある¹⁾。筋はインスリン非依存的に糖取り込みを行いうる唯一の器官であるので²⁾、インスリン非依存性糖尿病においては筋の維持は極めて重要である。筋はまた、基礎代謝の維持にも極めて重要な組織である。筋量の低下は体脂肪量の増大を招く。近年、肥大した脂肪細胞から様々な耐糖能低下因子が分泌されている事が明らかにされつつあり³⁾、筋の重要性はI型糖尿病においてもやはり大きい。それゆえに糖尿病の予防・治療に有効な食品には、エネルギー制限下で摂取しても筋量・エネルギー消費量を減少させないという面が求められる。

エネルギー制限食摂取下では生体は異化的状態にある。老化⁴⁾や絶食⁵⁾など異化的状態での筋たん白質分解を抑制するためにはたん白質栄養が極めて重要であることが指摘されている。ここでは糖尿病の食餌療法に望ましかったん白質の種類を探索するという観点から¹⁾、大豆たん白質とカゼインのエネルギー代謝に対する作用について、遺伝的II型糖尿病モデルマウスであるKK-A^yマウスを用い、呼吸商・酸素消費量を指標として検討した。

動物の耐糖能負荷試験として、カニューレション手術を施す、麻酔下で採血するなどの方法が用いられてきた⁶⁾。これらの方法は血糖値やインスリン濃度を直接評価できる優れた方法であるが、いずれも侵襲的な方法であるため、簡便性に欠けている、手術や麻酔の影響が無視できるのかという問題があった。我々は経口的に投与した糖質に対する生体の利用能力を耐糖能の指標とすることを考えた²⁾。安定同位体である¹³C-グルコースおよび¹³C-トリオレインを経口投与し、呼気中に排出される¹³CO₂と¹²CO₂の比(R13/12)を指標として、大豆たん白質とカゼインの耐糖能に対する作用について検討した。

方 法

飼料組成

実験に使用した高脂肪食、SPI-H食およびカゼイン食の飼料組成をTable 1に示す。

動物

6週齢KK-A^y雄マウス32匹(日本クレア)を個別ケージで8週間飼育した。6週齢から10週齢までの最初の4週間は、肥満および糖尿病を誘発するために、

Table 1. Composition of experimental diets

	High-fat	Casein	SPI-H
Commercial chow	60		
Casein		39.1	
SPI-H			40.4
Corn starch		36.2	34.9
Sucrose		10	10
Shortening	25		
Condensed milk	15		
Soybean oil		5	5
Cellulose powder		5	5
Mineral mixture		3.5	3.5
Vitamin mixture		1	1
Choline bitartrate		0.2	0.2
	100	100	100

高脂肪(エネルギー比30%)食と水を自由摂取させた。体重が平均値から比較的大きく外れていた8匹のマウス(リファレンス群)は下大静脈からの採血により屠殺した後、後述するように解剖した。残りの24匹のマウスは、体重が均等になるようにマウスを2群に分け、11から14週齢までの4週間は、SPI-Hまたはカゼインを窒素源とする高たん白質低脂肪(5%)食をpair feedingさせた。飼料摂取量は、高脂肪食摂取期間の全てのマウスの平均エネルギー摂取量の約60%になるように、一律4.5gを毎日17時に与えた。水は自由摂取させた。飼育期間最終週の3日間(53日目15:00から56日目15:00まで)は呼気ガス測定用のチャンバー内で飼育し、酸素消費量・二酸化炭素排出量・呼吸商・R13/12(¹³CO₂と¹²CO₂の比)を連続的に測定した。測定中に3回給餌する機会があり、最初と最後の給餌ではpair feeding期間と同じ飼料を摂取させたが、2回目の給餌では、各群の半数のマウスには飼料中のスクロースを全て¹³Cグルコースに置換した飼料を与え、残りの半数のマウスは飼料中の大豆油の60%を¹³Cトリオレインで置換した飼料を摂取させた。測定期間は毎日、チャンバー内の糞を回収した。測定終了翌日(57日目)にエーテル麻酔下で下大静脈採血により屠殺した後、腓腹筋・四頭筋・腎周囲脂肪組織・副精巣周囲脂肪組織・鼠蹊部脂肪組織・褐色脂肪組織・肝臓・心臓・腎臓・脾臓を摘出し、秤量後すばやく液体窒素で凍結し、血清と共に-150℃で保存した。体重および飼料摂取量は週に2回測定した。

呼気ガスの測定にはRL-600および増設ユニット(アルコシステム製)を用いた。この装置は、質量分

析機を内蔵したヒト・動物兼用可能な呼気ガス測定装置である。昨年度の報告で詳述した通り、増設ユニットの構造を大幅に見直すことによって、動物を対象にする際には12ラインを並列して順次ローテーション的に正確な測定を行うことが可能になった。測定はライン切り替え間隔 30 sec, サンプル間隔 10 sec で行ったため、各マウスの呼気ガスデータは7分に1回の頻度で取得した。ガス濃度の校正は毎日1回行った。

保存した血清は市販のキットを使用して、血糖 (Glucose CII-テストワコー), トリグリセリド (トリグリライド G-テストワコー), 総コレステロール (コレステロール CII-テストワコー), 遊離脂肪酸 (NEFA C-テストワコー), インスリン (レビスインスリンキット, シバヤギ), 総ケトン体 (ケトンテスト三和), 血中尿素窒素 (尿素窒素 B-テストワコー), クレアチニン (クレアチニン-テストワコー) を測定した。

データはすべて平均値±標準偏差で表し、呼気ガスパラメータに関しては7分毎に取得した測定値を1時間毎の値に平均した後、同一時間内で Student's *t*-test によって SPI-H 食群とカゼイン食群の間の有意差を検定した。血液成分および組織重量に関してはイニシャル群, SPI-H 食群, カゼイン食群の3群間で ANOVA を行った後、危険率が5%以下の場合には Tukey の post-hoc test によって有意に異なる組み合わせを明らかにした。

結 果

飼育期間中の体重増加および飼料摂取量に2群間に差は認められなかった (Table 2)。臓器重量に関しては腎重量が SPI-H 食群がカゼイン食群よりも有意に小さかったが、その他の臓器については有意差が認められなかった (Table 3)。

呼気ガス測定期間の酸素摂取量・呼吸商は、3日間とも同じパターンが繰り返されることが明らかであった。酸素消費量に関しては、飼料摂取開始後2時間以内に75から90 mL/kg 体重まで増加し、6時間後から減少を始め飼料摂取開始12時間後からは50 mL/kg 体重でほぼ安定した推移を示した。酸素消費量の推移は明暗サイクルとはほぼ同調しており、マウスの活動期である暗期に酸素摂取量が上昇していた。安静時のマウスの酸素消費量は50 mL/kg 体重以下と非常に僅少であるが、本装置はマウスの酸素消費量の変化を経時的・定量的に測定するのに十分な精度を有していると考えられた (Fig. 1)。

呼吸商は飼料摂取開始後1時間以内にベースラインから0.1から0.15程度増加し、この増加は6時間後から減少を始め飼料摂取開始16時間後からは0.78付近でほぼ安定した推移を示した。飼料摂取後増加時の呼吸商は12時間以上にわたって SPI-H 食群の方がカゼイン食群よりも有意に高い値を示した (Fig. 2)。

次に呼気中の R13 について、食餌中のスクロース

Table 2. Total food intake and final body weight

	Reference	Casein	SPI-H
Food intake (g/mice)	43.9 ± 4.5	36.5 ± 1.8	35.9 ± 3.0
Calorie intake (kJ/mice)	1010.3 ± 103.5	627.6 ± 31.7	617.2 ± 51.2
Final body wt (g)	40.1 ± 1.9	40.3 ± 1.7	42.3 ± 4.7

Table 3. Organ weight (mg)

	Reference	Casein	SPI-H
M. gastrocnemius	258.5 ± 14.9	274.2 ± 16.2	272.0 ± 26.8
M. quadriceps	407.3 ± 29.5	390.0 ± 37.9	395.3 ± 23.4
BAT	239.6 ± 72.0	385.9 ± 64.9	414.6 ± 69.3
Perirenal fat	680.1 ± 218.8	700.7 ± 194.3	831.7 ± 214.6
Epididymal fat	1464.6 ± 256.7	1009.7 ± 240.4	1072.7 ± 198.3
Inguinal fat	280.5 ± 173.2	197.5 ± 31.8	192.9 ± 55.4
Liver	2825.5 ± 633.3	1867.7 ± 436.9	1840.5 ± 203.1
Heart	146.4 ± 11.2	150.9 ± 12.8	142.4 ± 12.6
Kidney	545.4 ± 60.8	501.5 ± 34.0	465.9 ± 35.0*
Spleen	178.6 ± 101.2	111.7 ± 25.7	104.6 ± 25.6

BAT : brown adipose tissue **P* < 0.05 vs. casein.

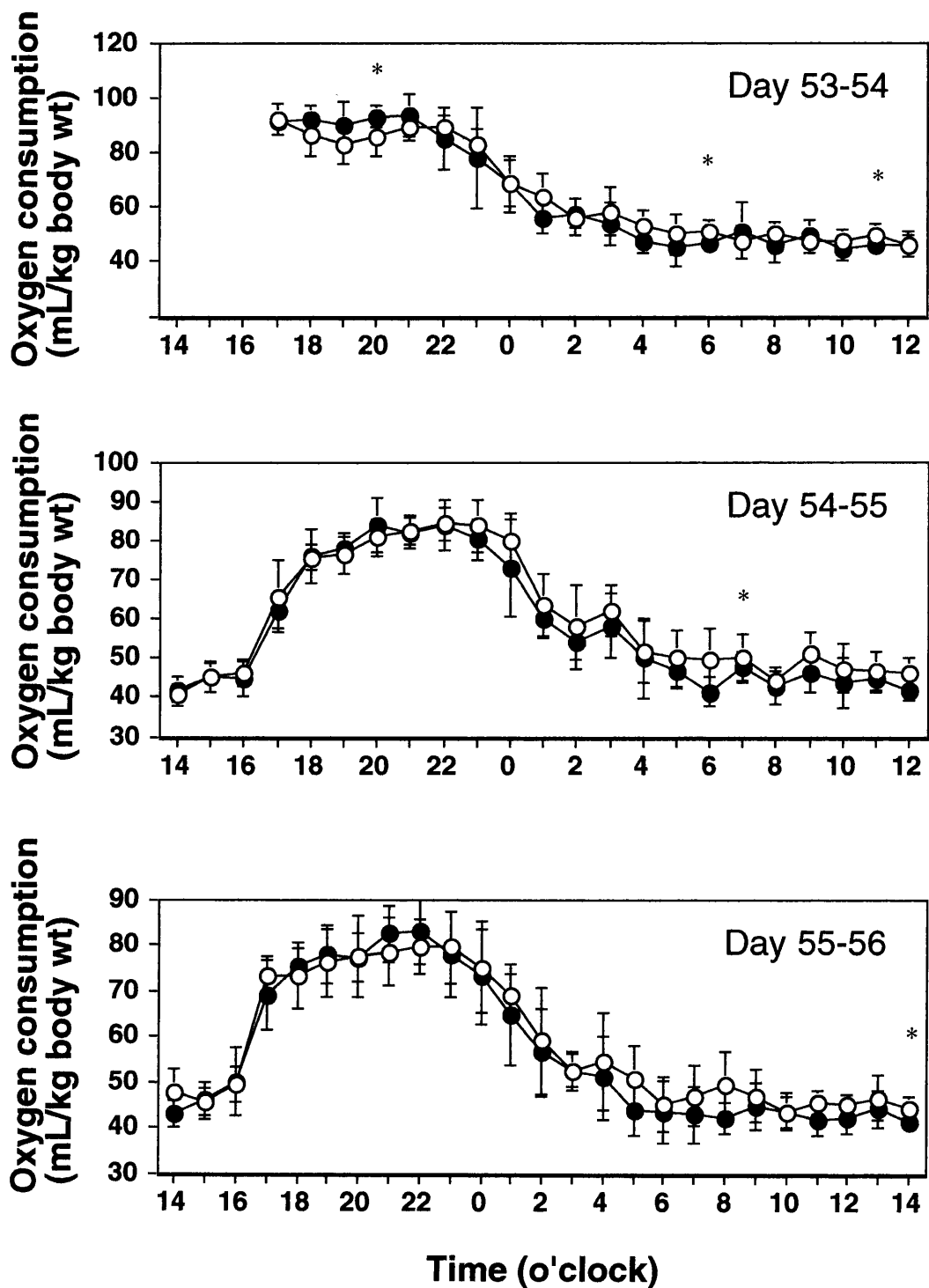


Fig. 1. Oxygen consumption for the last 3 days on the restricted dietary regimen. Mice were given SPI-H (closed circle) or casein (open circle) diet at 17:00. * $P < 0.05$ between SPI-H and casein.

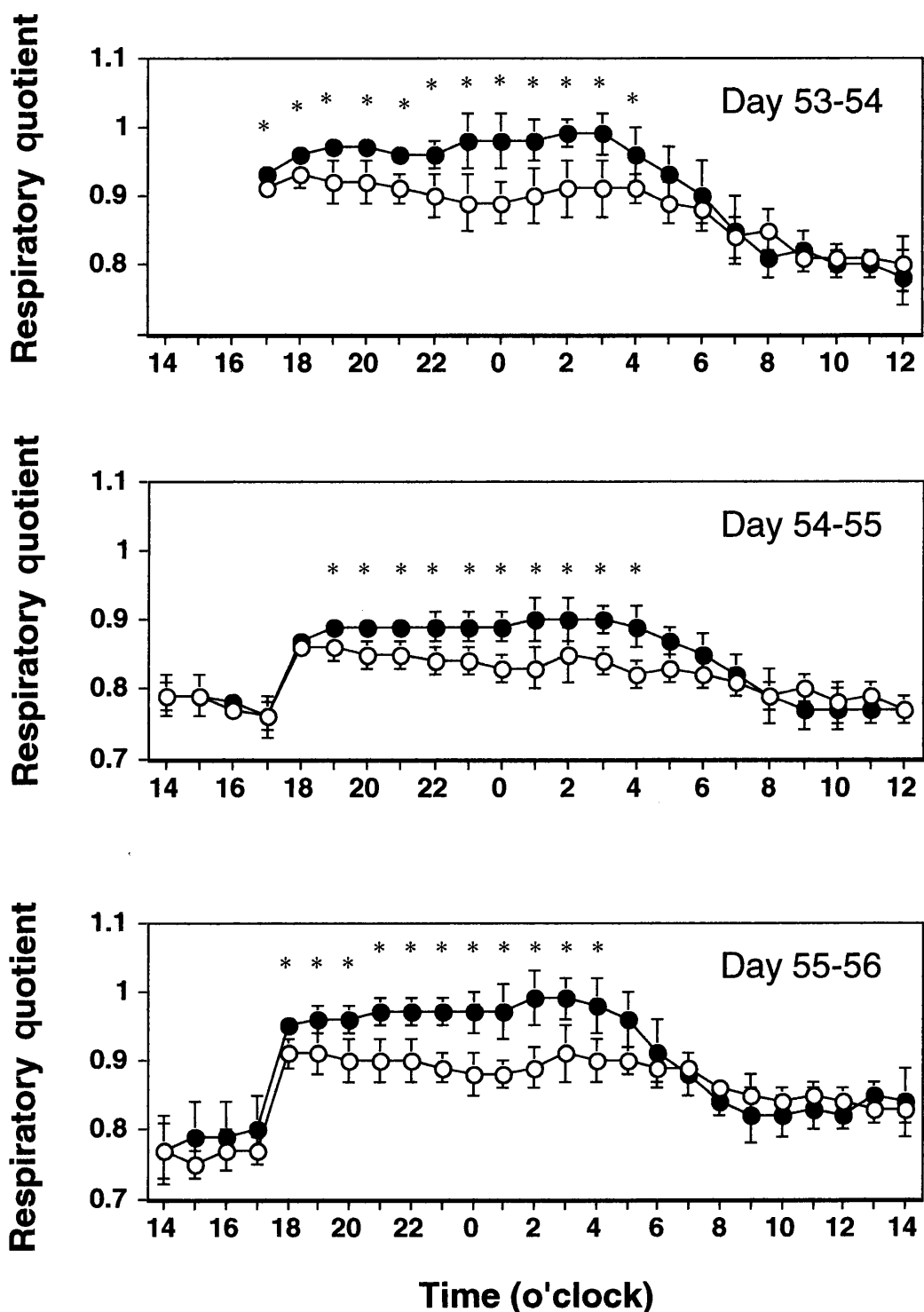


Fig. 2. Respiratory quotient for the last 3 days on the restricted dietary regimen. Mice were given SPI-H (closed circle) or casein (open circle) diet at 17:00. * $P < 0.05$ between SPI-H and casein.

を ^{13}C -グルコースに置換した群と、大豆油を ^{13}C -トリオレインに一部置換した群について順に述べる。 ^{13}C -グルコース群では、最初の給餌後は ^{13}C を含む飼料を摂取しなかったために1.1付近で推移していた。2回目の給餌の際に ^{13}C -グルコースを摂取した直後から7以上に上昇し、この増加は12時間近く維持され、その後緩やかに減少し、3度目の給餌の直前まで緩やかな減少が続いた。3度目の給餌では ^{13}C を含む飼料を摂取しなかったために給餌直後に急激なR13/12の低下が認められた。その後は最初の給餌後と同様に1.1付近で約10時間に渡って推移した。その後、測定終了時までわずかな上昇が見られた。2度目の給餌後と3度目の給餌の10時間後以降で、SPI-H食群がカゼイン群よりも有意に高いR13/12値を示した (Fig. 3)。

^{13}C -トリオレイン群では、最初の給餌後は ^{13}C を含む飼料を摂取しなかったために1.1付近で推移していた。2度目の給餌から約5時間経過してから徐々にR13/12が増加し、3度目の給餌後に急激に減少した。3度目の給餌後にはR13/12はほとんど変化がなかった。2度目の給餌後にR13/12が増加、SPI-H食群がカゼイン群よりも有意に高いR13/12値を示した (Fig. 4)。

血中成分についてSPI-H群とカゼイン食の間に有意差は認められなかった (Table 4)。

考 察

本研究では糖尿病の食餌療法に適切なたん白質の探索を目的として、エネルギー制限下で摂取されたSPI-Hとカゼインの作用について検討した。遺伝的II型糖尿病モデルマウスであるKK-A^yマウスにSPI-H食を4週間摂取させたところ、同期間カゼイン食を摂取したマウスよりも呼吸商および ^{13}C -グルコースの酸化能力が高いことが明らかとなった。

大豆たん白質は抗肥満作用があると報告されている⁷⁾。そのため呼吸商はSPI-H食群の方が低いと予想していたが、得られた結果は全く逆であった。大豆たん白質を摂取させたときの呼吸商の変化については報告がないが、脂質の酸化を促進し抗肥満作用を有するカプサイシン⁸⁾やヒドロキシクエン酸⁹⁾では摂取後の呼吸商が低下すると報告されている。今回得られた予想外の結果に関して、試験に使用したマウスに原因があったと考えている。

試験に使用したマウスは肥満に伴って糖尿病の症状を呈するKK-A^yマウスであり、インスリン作用の低下、すなわちII型の糖尿病を発症している。本マウスは複

数遺伝子の変異により耐糖能低下をきたしており、比較的ヒトのII型糖尿病のモデル動物としてよく用いられていることから使用した。

糖尿病患者は糖質の利用能力が低下しているため、健康人よりも呼吸商が低い^{10,11)}。すなわち糖尿病の症状が改善された場合には呼吸商の低下は少なくなると考えられる。本研究で呼吸商に差が認められたのは、給餌後の時間帯であり空腹時には呼吸商には差が認められなかった。本研究のプロトコルではAoyamaらのプロトコル⁷⁾に従い、エネルギー制限食を摂取させたため、多量の糖質が血液中に供給されない時間帯すなわち空腹時には差が見られなかったと考えられる。

また外因性の ^{13}C -グルコースを投与した結果からも、SPI-H群では食後の糖質の酸化能力が高いと考えられた。2度目の給餌後のR13/12の増加だけでなく、3度目の給餌から10時間後以降で再びR13/12に有意差が見られたことに関しては、肝グリコーゲンの酸化によるものと考えられる。2度目の給餌の際に摂取した ^{13}C -グルコースが肝臓に多く蓄えられ、3度目の給餌後の空腹時に酸化されたと思われる。

経口的に摂取した ^{13}C -グルコースの呼気中への排出を耐糖能の指標とする方法はこれまで行われたことがなかったのは、結果の解釈に何通りかの可能性が考えられるからだと思われる。第一に腸管での吸収の影響が結果に大きく影響することが予想される。しかし、カゼインが糖の吸収を阻害する、逆に大豆が糖の吸収を促進するという報告はない。また大豆が食餌中脂質の吸収を阻害したためにSPI-H群の呼吸商が上昇した可能性に関しては、 ^{13}C トリオレインが呼気中に排出され始めた時間帯が呼吸商や ^{13}C グルコース酸化量に差が見られた時間帯よりも5時間以上遅かったことから否定される。すなわち投与された脂質は呼気に排出される以前に呼吸商に影響を与えることは出来ない。第二に腸管で吸収されなかった糖質は糞中に排出されることが考えられるが、Aoyamaらは本研究と同一の条件でマウスを飼育し糞中の成分を分析し、カゼインとSPI-H間に差が見られなかったと報告している⁷⁾。第三に吸収されたグルコースがカゼイン群で多く尿中に排出された可能性については、このこと自体がカゼイン群では糖尿病の症状が極めて悪化していることを示す。

結論として、本研究では4週間のSPI-H食の摂取によって遺伝性II型糖尿病マウスにおいて糖質利用能力の改善がもたらされた可能性を示すと考えられる。しかしグルコース負荷試験などの一般的な耐糖能の指標に加え、膵や筋、脂肪組織での糖代謝に関連するた

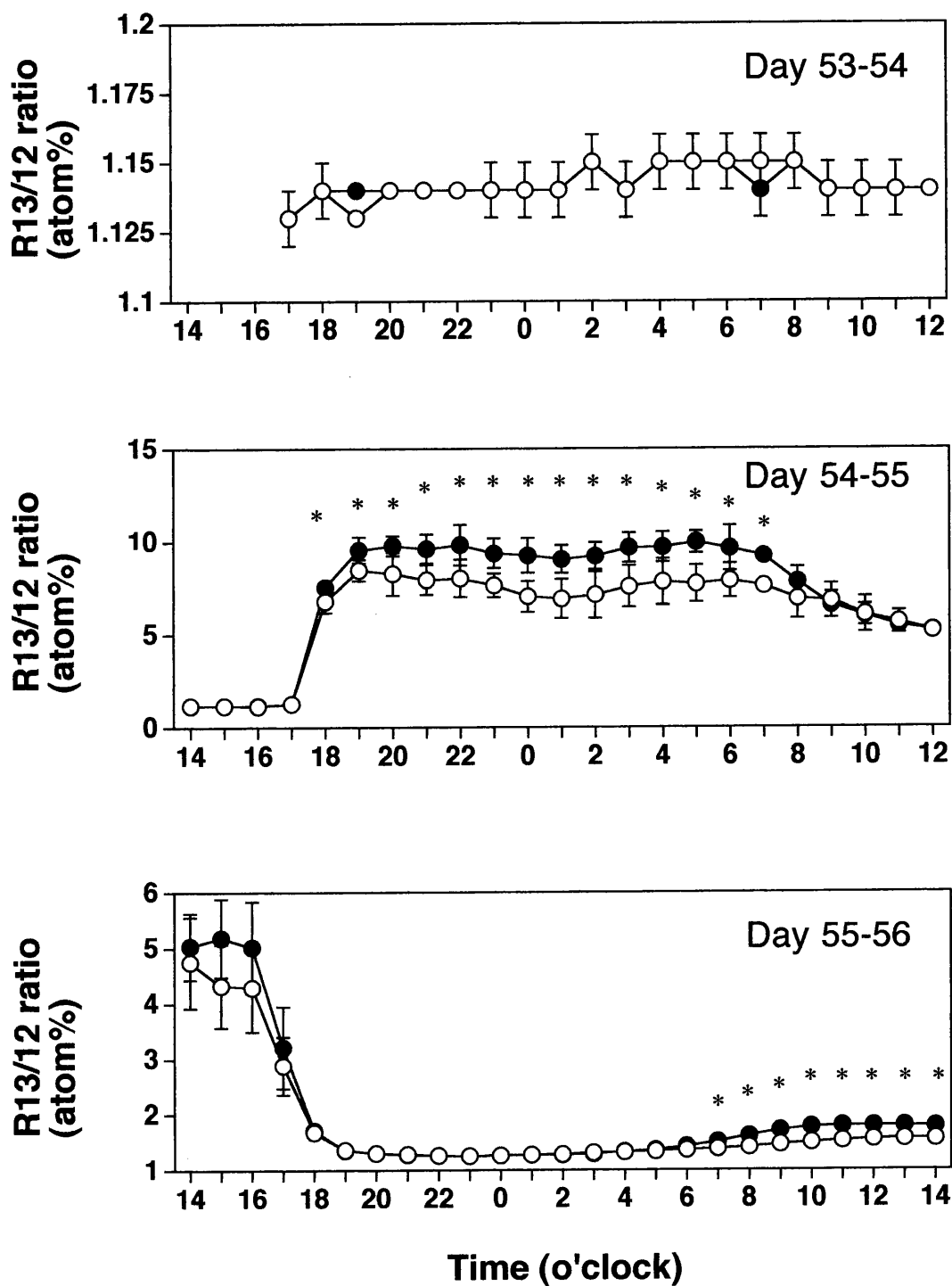


Fig. 3. The ratio of ^{13}C to ^{12}C oxidation for the last 3 days on the restricted dietary regimen. Mice were given SPI-H (closed circle) or casein (open circle) diet at 17:00. They were fed diet containing ^{13}C labeled glucose at 17:00 on day 54. * $P < 0.05$ between SPI-H and casein.

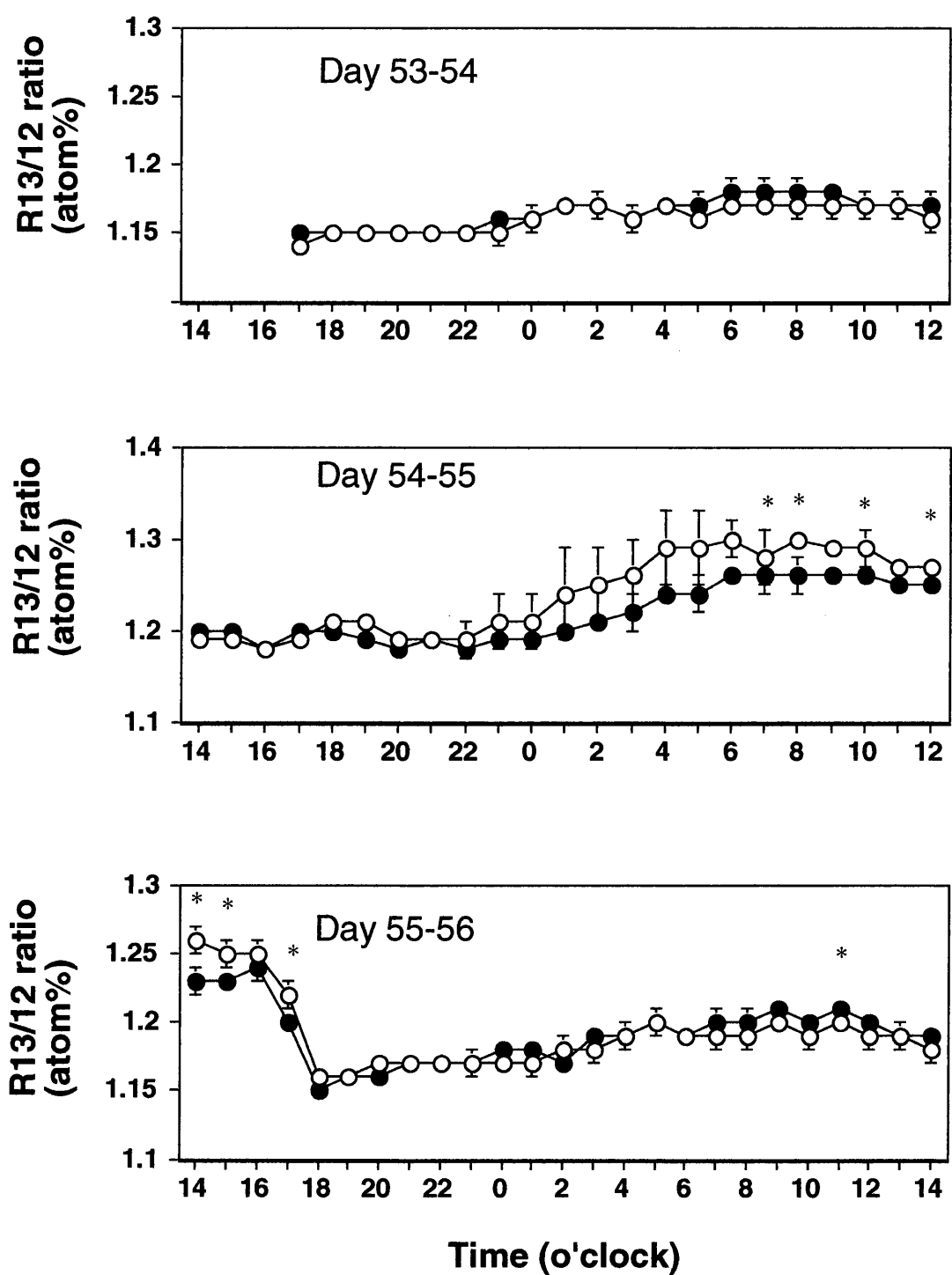


Fig. 4. The ratio of ^{13}C to ^{12}C oxidation for the last 3 days on the restricted dietary regimen. Mice were given SPI-H (closed circle) or casein (open circle) diet at 17:00. They were fed diet containing ^{13}C labeled triolein at 17:00 on day 54. * $P < 0.05$ between SPI-H and casein.

Table 4. Serum parameters

	Reference	casein	SPI-H
Insulin (pg/mL)	4525 ± 2285	7083 ± 3021	5957 ± 1620
Creatinine (mg/100 mL)		1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2
B/C		32.9 ± 4.6	30.4 ± 4.2
BUN (mg/100 mL)	23.0 ± 7.1	31.5 ± 2.8	28.8 ± 3.7
FFA (mEq/L)	0.53 ± 0.35	0.27 ± 0.03	0.28 ± 0.06
Triglycerides (mg/100 mL)	916.6 ± 688.4	222.7 ± 46.4	225.1 ± 41.5
Glucose (mg/100 mL)	795.8 ± 198.4	335.0 ± 68.0	373.2 ± 37.5
Total cholesterol (mg/100 mL)	200.6 ± 72.4	161.6 ± 41.7	188.5 ± 31.2

ん白質レベルで検討する必要がある、現在検討を行っている。

要 約

II 型糖尿病モデルマウスである KK-A^y に高脂肪食を 4 週間摂取させた後、2 群に分けて 20% の SPI またはカゼインを含む高たん白質低脂肪食を 4 週間摂取させた。この期間中の摂取カロリーは高脂肪食摂取期間中の 60% となるようにした。4 週目にマウスを代謝チャンバーに入れ、72 時間の酸素消費量、呼吸商、安定同位体 ¹³C 排出率を測定した。測定期間中の 3 回の給餌機会のうち 2 回目の給餌では、飼料中の糖質を ¹³C グルコースに置換した SPI-H 食またはカゼイン食を摂取させたところ、SPI-H 食群では呼気中により多くの ¹³CO₂ が排出された。呼吸商も SPI-H 食群がカゼイン食群よりも有意に高かった。以上から糖尿病モデルマウスに SPI 食を摂取させることにより糖質の利用能力が向上したことが示され、耐糖能が向上した可能性が示唆された。

文 献

- 1) Fricker J, Rozen R, Melchior JC and Apfelbaum M (1991): Energy-metabolism adaptation in obese adults on a very-low-calorie diet. *Am J Clin Nutr*, **53**, 826-830.
- 2) Richter EA, Ploug T and Galbo H (1985): Increased muscle glucose uptake after exercise. No need for insulin during exercise. *Diabetes*, **34**, 1041-1048.
- 3) Bradley RL, Cleveland KA and Cheatham B (2001): The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. *Recent Prog Horm Res*, **56**, 329-58.
- 4) Prothro J (1989): Protein and amino acid requirements of the elderly. *Ann N Y Acad Sci*, **561**, 143-156.
- 5) Baliga R and Shah SV (1991): Effects of dietary protein intake on muscle protein synthesis and degradation in rats with gentamicin-induced acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, **1**, 1230-1235.
- 6) Tokuyama K and Suzuki M (1998): Intravenous glucose tolerance test-derived glucose effectiveness in endurance-trained rats. *Metabolism*, **47**, 190-194.
- 7) Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y and Yamamoto T (2000): Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK). *Nutrition*, **16**, 349-354.
- 8) Kawada T, Watanabe T, Takaishi T, Tanaka T and Iwai K (1986): Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proc Soc Exp Biol Med*, **183**, 250-256.
- 9) Ishihara K, Oyaizu S, Onuki K, Lim K and

- Fushiki T (2000): Chronic (-)-hydroxycitrate administration spares carbohydrate utilization and promotes lipid oxidation during exercise in mice. *J Nutr*, **130**, 2990-2995.
- 10) Astrup A and Raben A (1995): Carbohydrate and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **19** Suppl 5, S27-S37.
- 11) Schutz Y (2000): Role of substrate utilization and thermogenesis on body-weight control with particular reference to alcohol. *Proc Nutr Soc*, **59**, 511-517.