

コレシストキニンA受容体を欠損し、肥満とインスリン非依存性糖尿病を自然発症するラットにおける大豆たん白質および大豆トリプシンインヒビターの改善効果

宮坂京子*・金井節子・太田 稔・関目綾子

東京都老人総合研究所生体機能調節と加齢研究グループ

Beneficial Effects of a Soy Protein Diet and a Soybean Trypsin Inhibitor in Genetically Obese and Diabetic Rats Lacking Cholecystokinin-A Receptor

Kyoko MIYASAKA, Setsuko KANAI, Minoru OHTA and Ayako SEKIME

Department of Clinical Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology,
Tokyo 173-0015

ABSTRACT

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats were developed as a model for noninsulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). OLETF rats are characterized by late onset of hyperglycemia at 18 weeks of age, followed by insulin-dependent diabetes mellitus at 65 weeks of age. Soybeans and their products are classical Japanese food and are generally believed to be good for health. In this study, we compared the effect of a special diet, consisting of soy protein, on energy metabolism of normal LETO rats and genetically diabetic OLETF rats. Twelve-week-old male rats of LETO and OLETF strains were fed this experimental diet in parallel with CRF-1 (control) and examined for respiratory quotient (RQ) and the blood or plasma parameters associated with diabetes mellitus. We also examined whether abnormal intestinal triglyceride metabolism in OLETF rats with NIDDM could be improved by soy protein and/or soy peptides diet. A mesenteric lymph node fistula was prepared. Administration of a soy protein diet increased daily food intake but did not change daily energy expenditure in LETO rats, resulting in increased body weight. In diabetic OLETF rats, administration of a soy protein diet increased daily energy expenditure, but daily food intake did not change therefore, the body weight slightly decreased. Moreover, glucose tolerance test was slightly improved by administration of a soy protein diet. The intestinal fat absorption was not influenced by long-term administration of a soy protein diet. However, simultaneous infusion of a soy peptide with fat into the small intestinal lumen, decreased the intestinal fat absorption. Thus, ingestion of soy protein and/or peptide might prevent fat absorption and

*〒173-0015 板橋区栄町35-2

hyperlipidemia as well as obesity. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 102-107, 2004.

Key words: soy-protein diet, energy expenditure, non-insulin dependent diabetes mellitus, aging, health

日本人の生活様式と食生活の変化に伴い、生活習慣病の発生頻度も増加し、医療費の増大などの社会問題となっている。糖尿病の発生増加は、食生活の欧米化が主たる原因とされ、日本古来の食生活への回帰がのぞまれるようになった。大豆は、古くから日本人の貴重なたん白質源である。

中等度の肥満と生後18週齢よりインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) を発症し、60週齢以降にIDDMとなる系のラット (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty; OLETFラット) は、肥満-NIDDM-IDDMという病態の進行形態がヒトと類似する¹⁾。そこでこのラットを用いて大豆たん白質がNIDDMの効率的な予防または治療法となるかを検討した。OLETFラットは、in bred strainであり、複数の遺伝子異常の存在が示唆されている。しかし、クローニングできたのは、第14番染色体上のコレシストキニン (CCK)-A受容体欠損のみである²⁾。Fisherラットとかけ合わせを行うと、CCK-A受容体欠損のみでは、約20%に耐糖能異常が認められる。X染色体に位置するODB-1遺伝子の存在によっても20%弱が耐糖能異常を示し、両方の異常が存在すると35%の頻度で耐糖能異常が出現する³⁾。すなわちCCK-A受容体欠損は、糖尿病発症の増悪因子となっていると考えられる。その原因のひとつとして、満腹効果を仲介するCCK-A受容体が欠損していることから、摂食量が多いということが考えられる⁴⁾。

大豆たん白質飼料と通常のCRF-1食を投与し、エネルギー出納、血圧、血中パラメーター、腸管からの脂肪吸収効率の変化を、OLETFラットおよび対照となるLong Evans Tokushima (LETO) ラットにおいて、検討した。

方 法

動物および飼育条件、飼料

飼料として、普通食はオリエンタル酵母社製CRF-1 (Table 1) を用い、その成分中のたん白質を植物 (大豆) 由来に変更し、総カロリーは同じに調整した大豆たん白質飼料を用いた。

雄性OLETFラットは、大塚研究所 (徳島) より、生後4週齢で搬入し、12時間明暗サイクル (8:00～20:00) で、室温21℃±10%の条件下で飼育した。ラッ

トは生後12週齢まで、普通食 (CRF-1) で飼育し、12週齢から個別ケージで1匹飼いとし、同時に大豆たん白質飼料投与を開始し、摂食量と体重変化を随時測定した。対照群はCRF-1をそのまま投与した。またNIDDMを発症しないLETOラットを、それぞれの対照群とした。

エネルギー出納の測定

摂食量は、1週間に消費された餌の量から、1日当たりの平均を算出した。24週齢で、呼気ガス代謝によるエネルギー代謝を測定した。エネルギー代謝は、既報の方法⁵⁻⁷⁾で個別代謝ケージにラットをいれ (Fig. 1)、24時間当たりの変化と呼吸商 (RQ) を測定した。

血圧測定

血圧は、17～19週齢で、ラット・マウス用非観血式血圧計BP MONITOR FOR MICE&RATS (MUROMACHI KIKAI CO. LTD. Model MK-2000, Tokyo, Japan) を用いて、尾の付け根の血圧を測定した。測定は最高血圧のみ、3回の測定値の平均の値をとった。

耐糖能テスト (OGTT)

OGTTは23週齢で1昼夜絶食後に行い、既報¹⁾に基き、

Table 1. Compositions of CRF-1

kcal/100g	359
Protein (g)	22.3
Water (g)	7.8
Fat (g)	5.7
Minerals (g)	6.6
Fibers (g)	3.1
Carbohydrate (g)	54.5

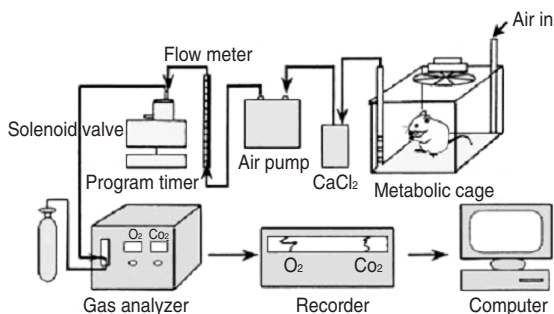


Fig. 1. Schema of the system for measuring energy metabolism.

2 g/kgのブドウ糖溶液を胃ゾンデで経口投与し、30, 60, 120分後に、尾の先端から採血して、簡易血糖測定器で測定した。ピーク時の血糖値が16.8 mmol/L以上、120分値が11.2 mmol/L以上を糖尿病型、どちらか一方にあてはまる場合を、耐糖能異常、いずれにもあてはまらない場合を正常型と判定した¹⁾。

血中パラメーター、臓器重量

エネルギー代謝測定終了後、絶食はせず、午前9:00～10:00にエーテル麻酔下に開腹し、腹部大動脈より採血し、血中コレステロール、中性脂肪を測定した⁵⁾。さらに、肝臓、脾臓、腹部内臓脂肪を摘出し、重量を測定した。

脂肪の腸管吸収に対する大豆たん白質、ペプチドの効果

18～19週齢時、エトレンの吸入麻酔下に開腹し、十二指腸ループを露出し、腸間膜リンパ管にビニールチューブを挿入固定し、さらに十二指腸内にカテーテルを1本挿入した。閉腹後、ラットはボルマンケージにいれ、1晩絶食とし、かわりに栄養維持目的として、十二指腸カテーテルから5%ブドウ糖加生食液(145 mM NaCl, 4 mM KCl)を3 mL/hで持続注入した。翌日の実験は持続注入を継続したまま1～2時間リンパ液を採液した後5%ブドウ糖加生食液持続注入を中止し、34 mg/hで十二指腸カテーテルからオリーブ油を注入開始し、ひき続き7時間持続注入しながら1時間毎に採液し、リンパ液中の中性脂肪濃度を経時的に測定した⁶⁾。さらに分離大豆たん白質とオリーブ油混合液の投与を行い、脂肪吸収が抑制されるかどうかをしらべた。

統 計

結果は、one-way analysis of variance (ANOVA)またはmultiple analysis of variance (MANOVA) with repeated measuresにて有意差を検討し、Fisher's Protected Least Significant Differenceで解析した。

結 果

体重変化と摂食量

体重、摂食量とも、一貫して、OLETFラットがLETOラットよりも有意に多かった。CRF-1投与時の摂食量は、8～24週齢で、LETO: 20～23 g/日、OLETF: 28～32 g/日である⁹⁾。OLETFラットはCRF-1と同様、28～32 gの大豆たん白質飼料を消費したが、LETOラットは、18週齢をすぎると1日25 gを消費するようになった。その結果、12週齢から24週齢にかけての体重は増加、OLETFラットは大豆たん白質群が平均196 g、CRF-1群が199 gでほとんどかわらなかったが、LETOラットは、大豆たん白質群が141 g、CRF-1群が101 g

と、大豆たん白質群で顕著だった。

エネルギー代謝

1日当たりのエネルギー消費量は、OLETFラットでは、大豆たん白質群で有意に増加していた (Table 2)。LETOラットでは、大豆たん白質群のエネルギー消費量が高い傾向にはあるが、有意の増加ではなかった。OLETFラットは、CRF-1投与群ですでにRQ値が低下しているが、OLETF、LETOラットとも、有意の変動はみられなかった。

血 圧

血圧は、OLETF、LETOラットともに、食餌内容によって影響をうけなかった (Table 3)。

OGTT

OLETFラットでのOGTTの結果をrepeated measures MANOVAで解析すると、CRF-1群と大豆たん白質群の間には、有意の差がみられなかった (Fig. 2)。しかし、空腹時血糖と120分値のみを比較すると、大豆たん白質群で有意の低下がみられた。一方、LETOラットは、もともと耐糖能異常はみとめられない種であるが、大豆たん白質群で、30分値のみCRF-1群よりも有意に高値を示していた。しかし、いずれも耐糖能異常は認められなかった。

屠殺時 (非絶食後) 血中パラメーターと臓器重量

屠殺時の中性脂肪、コレステロールともにOLETF

Table 2. Energy expenditure and respiratory quotient (RQ)

	CRF-1 (8)	Soy-protein diet (7)
OLETF rat		
Body weight (g)	676.0±7.7	591.8±6.4*
kJ/rat/day	231.4±10.0	295.3±24.0*
kJ/kg body weight	346.1±9.6	499.7±40.6*
RQ	0.95±0.01	0.95±0.02
LETO rat		
Body weight (g)	494.2±11.5	472.1±9.8
kJ/rat/day	204.3±7.5	224.2±20.3
kJ/kg body weight	410.9±18.0	475.0±42.8
RQ	0.98±0.01	0.96±0.02

The number in the parentheses is the number of animals, *; significantly different from the value of CRF-1 ($P<0.05$).

Table 3. Blood pressure at 17-19 wk of age

	CRF-1 (6)	Soy-protein diet (7)
OLETF rat		
mmHg	151.9±6.6	144.7±2.1
LETO rat		
mmHg	139.6±13.6	135.4±6.9

The number in the parentheses is the number of animals examined.

ラットがLETOラットより高値であった。OLETFラットでは、大豆たん白質群では血中中性脂肪が有意に低下していたが、コレステロールは有意に増加していた。一方LETOラットでは変化はみられなかった (Fig. 3)。

OLETFラットの大豆たん白質群では屠殺時体重はCRF-1より低く、逆にLETOラットでは大豆たん白質

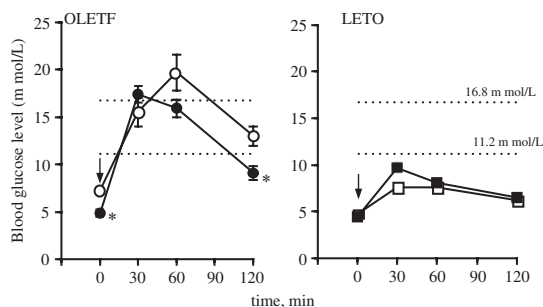


Fig. 2. Oral glucose tolerance test in OLETF (left panel) and LETO rats (right panel) of 23 wk age fed both control and soy-protein diets. Each symbol and bar represents the mean $\pm$ SE. The numbers of animals are shown in Table 2. An arrow indicates glucose ingestion. Open circles and squares represent the results of CRF-1 and closed ones do those of soy-protein diet. *; significantly different from the value of CRF-1.

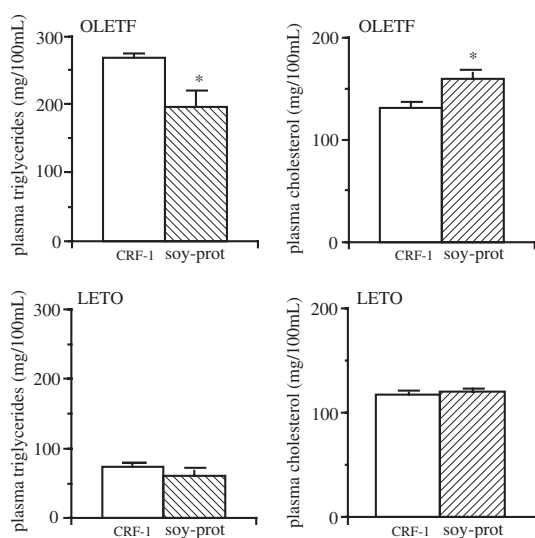


Fig. 3. Plasma levels of triglycerides and cholesterol in OLETF (upper panels) and LETO rats (lower panels). The mean $\pm$ SE, the numbers of animals are shown in Table 2. Open columns represent the results of CRF-1 and closed ones do those of soy-protein (soy-prot) diet. *; significantly different from the value of CRF-1.

群の方が重く、この変化は内臓脂肪重量の増減を伴っていた (Table 4)。

腸管からの脂肪吸収

CRF-1投与時のOLETFラットにおける脂肪吸収の結果 ($n=4$) と比較して、大豆たん白質群はとくに抑制効果を示さなかった。一方、脂肪と同時に分離大豆たん白質を注入すると、脂肪吸収が抑制された。しかし、いずれも、まだ1匹のみの結果なので、追加検討が必要である (Fig. 4)。

考 案

大豆たん白質飼料の長期投与の効果は、OLETF、LETOラット間で若干の相違がみられた。LETOラットでは、大豆たん白質飼料の方が後半で摂食量が増加し、一方エネルギー消費量は影響をうけず、結果的に体重は増加した。しかし、OLETFラットでは、摂食量は

Table 4. Body weight and tissue weight

	CRF-1	Soy-protein diet
OLETF rat	(8)	(7)
Body weight (g)	695.4 $\pm$ 7.7	657.1 $\pm$ 17.8
Liver (g/kg body weight)	24.9 $\pm$ 0.7	24.1 $\pm$ 1.7
Pancreas (g/kg body weight)	1.07 $\pm$ 0.08	1.05 $\pm$ 0.05
Visceral fat (g/kg body weight)	63.8 $\pm$ 2.9	56.6 $\pm$ 2.2
LETO rat	(8)	(7)
Body weight (g)	504.0 $\pm$ 10.0	560.1 $\pm$ 13.3*
Liver (g/kg body weight)	14.4 $\pm$ 0.5	17.3 $\pm$ 0.6
Pancreas (g/kg body weight)	1.15 $\pm$ 0.04	1.36 $\pm$ 0.43
Visceral fat (g/kg body weight)	20.5 $\pm$ 1.3	28.7 $\pm$ 1.7*

The number in the parentheses is the number of animals, *; significantly different from the value of CRF-1 ($P<0.05$).

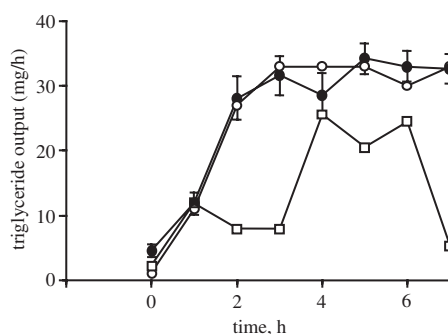


Fig. 4. Lymphatic triglyceride transport in OLETF rats at 18-19 wk of age. Open circles represent the results of CRF-1 ($n=4$, the mean $\pm$ SE), and closed ones do those of soy-protein diet. Open squares represent the results of simultaneous infusion of fat and soy-protein isolate.

CRF-1と同じであったが、大豆たん白質飼料によりエネルギー消費量が増加しており、耐糖能検査の結果も、大豆たん白質群では空腹時血糖と120分の血糖値が有意に低下していた。OLETFラットでは、肥満の度合いがNIDDMの発症に深い関わりを持っている。運動負荷や摂餌制限により、体重増加を抑制すると、NIDDMの発症を遅延または抑制できる⁸⁻¹¹⁾。一方、PPAR γ agonistを持続投与することにより、血中TNF- α などのインスリン抵抗性の物質を低下させることができると、体重増加は抑制できなくても、NIDDMの病態を改善することができる¹²⁾。今回はまだTNF- α の測定を行っていないことから、耐糖能の改善効果の機序を確定することはできないが、大豆たん白質群で、内臓脂肪重量が減少傾向にあることと関係しているかもしれない。

大豆たん白質飼料の投与がエネルギー消費を増加させる機序は、現時点では不明である。エネルギー代謝

を測定した時期のOLETFラットは、NIDDMの発症によりRQ値が低下傾向を示す^{7, 10)}。大豆たん白質には交感神経系の緊張を高めるという報告¹³⁾もあり、今回の結果では、RQ値が有意に変動してはいないが、自律神経機能に変化している可能性があるかもしれない。OLETFラットにみられた血中コレステロールの増加の原因はわからない。

OLETFラットは、NIDDMを発症する18週齢から、脂肪の腸管吸収が増加する⁸⁾。この増加もまた、体重制限やPPAR γ agonistを持続投与してNIDDMの発症を遅延させることで正常化することができる^{8, 11)}。今回、大豆たん白質を持続的に投与することで、NIDDMの病態をわずかに改善することができたが、今のところ、脂肪の吸収亢進を正常化するにはいたっていない。しかし分離大豆たん白質を脂肪と一緒に投与すると、脂肪の吸収を阻害することができそうである。

要 約

飼料中のたん白質を大豆由来にした餌の投与は、肥満糖尿病モデル (OLETF) ラットにおいて一日当たりのエネルギー代謝を亢進させ、NIDDMの病態を改善することができた。しかし、NIDDMの発症を阻止することはできなかった。血圧、肝臓、脾臓重量は、OLETF、LETOラットともに、食餌内容によって影響をうけなかった。内臓脂肪重量は、体重の増減に伴って、大豆たん白質飼料の投与により、OLETFラットでは減少傾向、LETOラットでは増加した。大豆たん白質飼料を慢性的にOLETFラットに投与しても、腸管内からリンパ管への脂肪吸収効率は影響をうけなかった。しかし、脂肪と分離大豆たん白質の混合液を腸管に投与すると、腸管内腔から腸間膜リンパ管への脂肪の吸収が抑制されることが示唆された。さらに検討を継続する予定である。

文 献

- 1) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M and Natori T (1992): Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, **41**, 1422-1428.
- 2) Takiguchi S, Takata Y, Funakoshi A, Miyasaka K, Kataoka K, Fujimura Y, Goto T and Kono A (1997): Disrupted cholecystokinin type-A receptor (CCK-AR) gene in OLETF rats. *Gene*, **197**, 169-175.
- 3) Takiguchi S, Takata Y, Takahashi N, Kataoka K, Hirashima T, Kawano K, Miyasaka K, Funakoshi A and Kono A (1998): A disrupted cholecystokinin A receptor gene induces diabetes in obese rats synergistically with ODB-1 gene. *Am J Physiol*, **274**, E265-270.
- 4) Miyasaka K, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, Kono A and Funakoshi A (1994): Lack of satiety effect of cholecystokinin (CCK) in a new rat model not expressing the CCK-A receptor gene. *Neurosci Lett*, **180**, 143-146.
- 5) Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Takano S, Ueoka T, Takahashi T, Kimoto K, Funakoshi A and Miyasaka K (2003): Bitter melon-malt vinegar increases daily energy turnover in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, **49**, 428-433.
- 6) Ichikawa M, Miyasaka K, Fujita Y, Shimazoe T and Funakoshi A (1998): Disappearance of diurnal rhythm of energy expenditure in genetically diabetic obese rats. *Jpn J Physiol*, **48**, 211-214.
- 7) Ichikawa M, Kanai S, Ichimaru Y, Funakoshi A and Miyasaka K (2000): The diurnal rhythm of energy expenditure differs between obese and

- glucose-intolerant rats and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr*, **130**, 2562-2567.
- 8) Hayashi H, Sato Y, Kanai S, Ichikawa M, Funakoshi A and Miyasaka K (2002): Increased lymphatic lipid transport in genetically diabetic obese rats. *Am J Physiol*, **282**, G69-76.
 - 9) 宮坂京子, 市川みね子, 太田 稔, 吉田由紀, 金井節子, 船越顕博 (2002): インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 発症モデルラット (OLETF) に対するPPAR γ アゴニスト (ピオグリタゾン) および α -glucosidase inhibitor (ペイスン) の長期 (24週) 投与の効果. 臨床と研究, **79**, 167-172.
 - 10) Miyasaka K, Ichikawa M, Kawanami T, Kanai S, Ohta M, Sato N, Ebisawa H and Funakoshi A (2003): Physical activity prevented age-related decline in energy metabolism in genetically obese and diabetic rats, but not in control rats. *Mech Ageing Dev*, **124**, 183-190.
 - 11) 佐藤裕子, 宮坂京子, 林 洋, 船越顕博 (1999): NIDDM自然発症 (OLETF) ラットの脂質の腸管リンパへの輸送の増加とそれに対する食餌制限, 運動の効果. 消化と吸収, **22**, 99-103.
 - 12) Yoshida Y, Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Kobayashi M, Ichimaru Y, Shimazoe T, Watanabe S, Funakoshi A and Miyasaka K (2002): A peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist influenced daily profile of energy expenditure in genetically obese diabetic rats. *Jpn J Pharm*, **88**, 279-284.
 - 13) 斉藤昌之 (1990): 交感神経活動に及ぼす大豆たん白質ペプチドの影響. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 95-97.