

コレシストキニンA受容体欠損モデル動物の肥満，インスリン非依存性糖尿病，
脂質代謝，胆石形成に対する大豆たん白質およびペプチドの改善効果

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

**Effects of Soy Protein and Peptide on Intestinal Fat Metabolism in Genetically
Obese Diabetic Rats Lacking Cholecystokinin-A Receptor and on Gallstone
Formation in the Receptor Gene Knockout Mice**

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. At this age, lymphatic triglyceride (TG) transport from the intestinal lumen to the lymph was enhanced in the rats. Soybeans and their products are classical Japanese foods and are generally believed to be good for health. We examined whether the effect of a special diet consisting of soy-protein normalizes enhanced lymphatic TG transport in OLETF rats. Male 12-week old rats of OLETF strains were fed this experimental diet in parallel with CRF-1 (control). A mesenteric lymph fistula was prepared. The intestinal fat absorption was not influenced by long-term administration of a soy-protein diet. However, simultaneous infusion of an isolated soy protein (FUJI-PURO) with fat into the small intestinal lumen decreased intestinal fat absorption. Thus, ingestion of soy-protein with fat may prevent fat absorption and hyperlipidemia. On the other hand, gallstones were usually associated with obesity and/or hyperlipidemia. However, the etiology of gallstones is multifactorial, involving interactions between genes and the environment. We generated cholecystokinin (CCK)-A receptor (R)-deficient (KO) mice and found that gallstone formation was significantly higher in CCK-ARKO mice than in wild-type mice. In the present study, we examined whether a soy-protein diet could prevent gallstone formation in CCK-ARKO mice. No gallstone formation was

*〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

observed at 6 month-old regardless genotype. At 12 month of age, gallstone formation appeared in CCK-ARKO mice treated with CRF-1 and in both wild-type and CCK-ARKO mice treated with a soy-protein diet. Taken together, a long-term administration of a soy-protein diet did not show a beneficial effects on hyperlipidemia and gallstone formation, unexpectedly, although an isolated soy-protein, when administered with fat, could inhibit fat absorption. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 108-112, 2005.

Key words : soy-protein diet, gallstone, cholecystokinin, hyperlipidemia, non-insulin dependent diabetes mellitus

生活習慣病なかでも肥満、糖尿病、高脂血症などの増加は、慢性疾患として多額の医療費を消費する。近年、生活習慣病予防は「中年からの老化予防」として不可欠であるという認識が浸透し、「肥満予防」を中心とした運動習慣や食生活の改善の重要性が強調されている。

コレステロール胆石もまた戦後生活習慣病の増加に伴って増加した¹⁾。中年を対象とした健康診断では10%弱に認められ、疫学検討では胆石保有率と肥満度は相関することがわかっている。にもかかわらず、胆石症はサイレントストーンの形として症状を示さない例もあるためか、あるいは、肥満や高脂血症の合併症として生じることが多いためか、胆石そのものの1次予防の必要性はあまり表立っていないのが実情である。胆石の成因についても、人種差があり遺伝的背景が重要であることはわかっているにもかかわらず、胆石症そのものに関する遺伝的素因の解析はあまり行われていない。胆石症は胆嚢炎や膵炎の原因となり、時に致死的になる。死亡率の高い重症急性膵炎の原因として、胆石がもっとも多いという報告もある²⁾。また、胆石は胆嚢がんの発生母地でもあり、胆石症の2~3%に胆嚢がんが合併し、胆嚢がんの50~80%に胆石の合併が認められる。

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³⁾。我々は昨年度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。その結果OLETFラットでは、摂食量は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。耐糖能の改善効果の機序を確定することはできなかった

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と思われた⁴⁾。

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。我々は、第14番染色体上のコレシストキニン(CCK)A受容体遺伝子の構造に異常が生じ、CCK-A受容体が欠損していることを発見した⁵⁾。CCK-A受容体は満腹効果を仲介することから、摂食量が多くなり肥満を生じる原因のひとつと考えられた⁶⁾。CCK-A受容体は胆嚢にも分布し胆嚢収縮をおこす。ラットには胆嚢がないため、CCK-A受容体遺伝子ノックアウトマウス(CCK-ARKO)を作製し⁷⁾検討対象とした。

大豆は、古くから日本人の貴重なたん白源である。本研究では、OLETFラットの脂肪代謝に大豆たん白質およびペプチドが影響するかどうか、CCK-ARKOマウスの胆石形成を抑制するかどうかを検討した。血中の脂質濃度は、吸収と代謝の結果の値を反映しているが、脂質吸収そのものを反映してはいない。経口摂取された脂肪は、腸管から門脈でなく腸間膜リンパ管へ移送される。腸間膜リンパ管にカニューレを挿入しリンパ液を採取して脂肪含有量を測定することで、腸管からどれだけの脂肪が吸収されているかを直接測定することができる。この技術は1980年代にアメリカのTsoraによって確立されたが、非常に繊細で高度の技術を必要とするため国内で行いえるのは、佐賀医大、岐阜大、および当研究所のみである。

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、総カロリーをほぼ同じに調整した大豆たん白質飼料を用いた(Table 1)。

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°C±10%の条件下で飼育した。CCK-ARKOマウスは当研究室で繁殖し対照として同腹のwild-typeを用いた⁷⁾。生後12週齢まで、普通食(CRF-1)で飼育し、12週齢から大豆たん白飼料投与を開始した。

OLETFラットの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一本挿入した。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中止し、非刺激下に1~2時間リンパ液を採液後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、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⁸⁾。さらに分離大豆たん白質(フジプロ)(1 g/25 mL)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(Table 2)。

CCK-ARKOマウスの胆石形成頻度に対する大豆たん白食の効果

6ヶ月および12ヶ月齢で体重と摂食量を記録し、断頭と殺、採血後、開腹して、胆嚢を摘出、肉眼的に胆石、胆砂の存否を検索した。血液中のコレステロールを測定した。

Table 1. Components of standard diet (CRF-1) and soy-protein diet

100 g	Standard diet (CRF-1)	Soy-protein diet (open 18)
water	8.1	7.7
protein	22.6	17.4
fat	5.6	5.9
minerals	6.6	7.4
fiber	3.3	3.8
carbohydrate	53.8	57.8
calory	356	354

Table 2. Composition of lipid emulsion (infusion rate)

Olive oil	295 mg (35.4 mg/hr)
lecithin	50.7 mg (7.8 mmol/hr)
taurocholate	250 mg (57 mol/hr)

The components were emulsified in 25 mL phosphate buffer saline. Fat emulsion was mixed with an isolated soy protein (1 g/25 mL)

統計

結果は、Student *t*-testまたはカイ二乗検定で解析した。

結果

OLETFラットの腸管からの脂肪吸収

オリーブ油の腸管内注入時の脂肪のリンパ液への移行をCRF-1投与時のOLETFラットと大豆たん白質食投与時のOLETFラットと比較してみたが、CRF-1における脂肪吸収の結果と比較して、大豆たん白質群は特に抑制効果を示さなかった。一方、脂肪と同時に大豆分離たん白質を注入すると、脂肪吸収が抑制された(Fig. 1)。

CCK-ARKOマウスの胆石形成頻度に対する大豆たん白食の効果

結果をTable 3, Table 4に示した。CRF-1を継続投与されていたマウスは、wild-typeでは胆石形成はみられなかった。しかし、CCK-ARKOマウスでは12ヶ月齢で8匹中3匹に胆石が形成された。一方、大豆たん白質食を投与されたマウスは、6ヶ月齢では胆石は形成されていないが、12ヶ月齢になると、いずれのgenotypeにおいても胆石が形成された。発生頻度はCCK-ARKOの方がwild-typeより有意に高かった。血中コレステロール値は、genotype間で差がみられないが、大豆食群の方がCRF-1群よりも有意に高値を示していた。

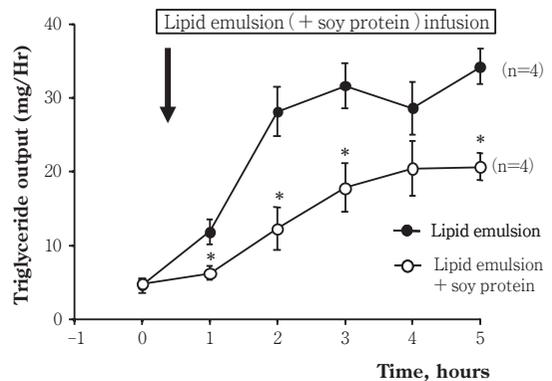


Fig. 1. Lymphatic triglyceride transport in OLETF rats at 18-19 weeks of age. Closed circles represent the results of Lipid emulsion infusion (n=4, the mean±SE), and open ones do those of Lipid emulsion+soy been peptide infusion (n=4). *significantly different from the respective values.

Table 3. Gallstone formation in male mice treated with a standard diet (CFE-1)

	genotype	6 M	12 M
body weight	CCK-ARKO	29.66 ± 0.59	32.7 ± 0.7
	wild	29.68 ± 0.91	33.6 ± 0.5
Food intake (g/day/10 g b.wt.)	CCK-ARKO	1.44 ± 0.06	no tested
	wild	1.64 ± 0.08	no tested
gallstone	CCK-ARKO	0/8	3/8*
	wild	0/20	0/20
plasma cholesterol (m mol/L)	CCK-ARKO	no tested	2.61 ± 0.23
	wild	no tested	2.41 ± 0.26

Number of sludge and gallstone formations/the number of animals examined.

*Significantly higher than other 3 groups of standard diet.

Table 4. Gallstone formation in male mice treated with a soy protein diet

	genotype	6 M	12 M
body weight	CCK-ARKO	32.84 ± 0.72	36.40 ± 1.5
	wild	28.37 ± 0.54	32.84 ± 0.9
Food intake (g/day/10 g b.wt.)	CCK-ARKO	1.14 ± 0.06	1.12 ± 0.08
	wild	1.18 ± 0.06	1.07 ± 0.06
gallstone	CCK-ARKO	0/11	4/11*
	wild	0/11	2/11
plasma cholesterol (m mol/L)	CCK-ARKO	no tested	2.957 ± 0.19
	wild	no tested	3.371 ± 0.22

Number of sludge and gallstone formations/the number of animals examined.

*Significantly higher than other 3 groups of soy protein diet, but there was no difference with values of 12 M CCK-ARKO mice treated with standard diet.

考 案

糖尿病患者では、心筋梗塞や脳梗塞といった動脈硬化性疾患が極めて高頻度に発症することが知られており、近年の糖尿病患者数の激増とも相俟って、現在、糖尿病の予防・治療は国民の健康政策上、最重要問題の一つとなっている。その一方で、糖尿病になぜ動脈硬化性疾患が合併しやすいかについては、未だ、病因上必ずしも明確にはなっていない。動脈硬化を惹起するメカニズムとしては、高血糖そのものが引き起こすたん白の糖化、特に血中リポたん白の中でもLDL（低比重リポたん白）の糖化が重要とされている。また、インスリンの作用不足に起因する血中リポたん白代謝の変化、即ち、催動脈硬化性の異常リポたん白であるレムナントリポたん白やsmall dense LDLの出現と抗動脈硬化作用を持つHDL（高比重リポたん白）の低下も動脈硬化の発症に大きく関与しているといわれている。

経口摂取された中性脂肪は、小腸内のアルカリ、胆汁酸によって乳化し、リパーゼで分解され、脂肪酸とグリセロール、あるいはモノグリセリドになる。腸管内に中性脂肪が投与されると、そのうち約80%が腸間膜リンパ流に移送される。我々はOLETFラットでは、

NIDDMを発症する18週令に一致して、脂肪の吸収亢進が認められ⁸⁾、糖尿病に伴う高脂血症の発症には腸管からの脂肪吸収、脂肪代謝の変化が関係していることを呈示してきた。

NIDDMの患者は肥満傾向が強く、高脂血症が伴う頻度も高い。ヒトでは、腸管内腔からリンパ流への脂肪の移送を直接測定することができないが、腸管からの脂肪吸収亢進も、高脂血症の一因となっている可能性が考えられる。そこで今回、大豆たん白質飼料の投与が亢進した脂肪吸収を正常化させることができるかどうか検討したが、腸管からの脂肪吸収そのものには有意の影響を与えなかった。しかし、脂肪を腸管内に注入する際、分離大豆たん白質を混入させて注入すると、有意に脂肪吸収を抑制することができ、脂肪吸収量は対照LETOラットよりも低値を示していた。

マウスにおいては、大豆たん白質飼料の投与とCRF-1投与とでは、胆石形成頻度に差が認められなかった⁹⁾。この原因の一つとして、大豆たん白質飼料の脂肪含有量がやや高い（Table 1）ことが考えられる。12ヶ月齢のマウスの血中コレステロール値は、CCK-ARKO、wild-typeともに大豆たん白質飼料食投与の方が高値を示しており、生体内コレステロールは70%が食事由来であることから、これらの飼料中のコレステロール含有量を確認する必要があるかもしれない。

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）ラットにみられた腸管からの脂肪吸収亢進を正常化させることはできなかった。しかし腸管に注入する脂質エマルジョンに分離大豆たん白質を添加すると、著明な脂肪吸収抑制効果がえられ、リンパ液中の脂肪濃

度は、正常LETOラットのレベルよりも低値となった。一方、CCK-ARKOマウスにおける胆石形成は、大豆たん白質飼料によっても抑制することはできず、血中コレステロール値も高値を示していた。この原因の一つは、大豆たん白質飼料中の脂肪含有量がやや多かったためかもしれない。

文 献

- 1) 梶山 悟朗：コレステロール胆石の成因と臨床 (2000)：日本内科学会雑誌 **89**, 1728-1737.
- 2) Swaroop VS, Chari ST and Clain JE (2004): Severe acute pancreatitis. *JAMA*, **291**, 2065-2068.
- 3) 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.
- 4) 宮坂京子, 金井節子, 太田 稔, 関目綾子 (2004)：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。大豆たん白質研究 **7**, 102-107.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Takiguchi S, Suzuki S, Sato Y, Kanai S, Miyasaka K, Jimi A, Shinozaki H, Takata Y, Funakoshi A, Kono A, Minowa O, Kobayashi T and Noda T (2002): Role of CCK-A receptor for pancreatic function in mice: A study in CCK-A receptor knockout mice. *Pancreas* **24**, 276-283.
- 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 Gastrointest Liven Physiol*, **282**, G69-76.
- 9) Sato N, Miyasaka K, Suzuki S, Kanai S, Ohta M, Kawanami T, Yoshida Y, Takiguchi S, Noda T, Takata Y and Funakoshi A (2003): Lack of cholecystokinin (CCK)-A receptor enhanced gallstone formation: A study in CCK-A receptor gene knockout mice. *Dig Dis Sci*, **48**, 1944-1947.