

大豆たん白質摂取が2型糖尿病モデルGKラットの糖代謝および腎機能に与える影響

久保田真敏^{*1}・伊藤里紗²・渡邊令子⁴・藤村 忍^{1,2,3}・門脇基二^{1,2,3}

¹新潟大学超域学術院 ²同大学院自然科学研究科 ³同農学部 ⁴新潟県立大学人間生活学部

Effects of Soy Protein Isolate on Glucose Homeostasis and Kidney Functions of Type II Diabetic Model GK Rats

Masatoshi KUBOTA^{*1}, Risa ITO², Reiko WATANABE⁴, Shinobu FUJIMURA^{1,2,3}
and Motoni KADOWAKI^{1,2,3}

¹Center for Transdisciplinary Research, Niigata University, Niigata 950-2181

²Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Niigata 950-2181

³Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-2181

⁴Department of Health and Nutrition, University of Niigata Prefecture, Niigata 950-8680

ABSTRACT

The number of type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients is rapidly increasing and is becoming a serious problem all over the world. T2DM may lead to various complications such as diabetic retinopathy, neuropathy and nephropathy. In the therapy of diabetic nephropathy, most people pay attention to the dietary protein intake, but only a few focus on the effect of protein sources on diabetic nephropathy. Therefore, we attempted to clarify the effects of different protein sources on diabetes and diabetic nephropathy. Male non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats were fed high sucrose diets for 15 wk with 20% casein (C) or soy protein isolate (SPI). The fasting blood glucose levels and the markers related to diabetes and kidney functions in the blood and urinary albumin excretion were determined. Kidney tissue sections were obtained for histological analysis. SPI had no effects on fasting blood levels of glucose, insulin and adiponectin. However, the levels of plasma alkaline phosphatase, hematocrit and urinary albumin excretion in GK rats fed SPI were significantly improved compared with those of the C group. In addition, renal glomerular damage was significantly suppressed in the SPI group. These results suggest that SPI has a suppressive effect on progression of diabetic nephropathy. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 151-155, 2012.

*〒950-2181 新潟市西区五十嵐二の町8050

Key words : soy protein isolate, diabetes, diabetic nephropathy, Goto-Kakizaki rat

糖尿病は先進国だけでなく発展途上国においても患者数が激増している疾患であり、世界規模でその対策が重要視されている。この糖尿病はさまざまな合併症を引き起こすことが知られ、特に糖尿病性腎症は日本における新規透析導入患者の原因疾患の第1位となっており、近年問題になっている医療費高騰の大きな原因の1つとなっている。この糖尿病性腎症の治療には、血糖値や血圧のコントロールだけでなく食事たん白質のコントロールが重要とされている。病態が進行した糖尿病性腎症では特にたん白質の摂取制限が必要であるとされ、たん白質の摂取「量」に関するさまざまな研究が行われている¹⁾。しかし、このたん白質の摂取制限は患者が順守することが大変困難であるだけでなく、低たん白栄養状態を招く危険性があり、患者のQuality of Life (QOL) の低下など問題点も報告されている。一方、たん白質の“質”の違いについてはほとんど議論されておらず、糖尿病性腎症の進行に与える影響については未解明な点が多く存在している。申請者らはこれまで、このたん白質の“質”の違いが糖尿病や糖尿病性腎症に与える影響について、米たん白質の効果を中心に検討を行ってきた。

大豆たん白質 (SPI) は脂質代謝改善作用を始めとして様々な機能が報告されている。腎不全モデル動物や肥満型2型糖尿病モデル動物での腎機能保護作用が報告されているが^{2, 3)}、日本人の2型糖尿病の良いモデルとされているGoto-Kakizaki (GK) ラットに関する研究は、十分になされていない。そこで本研究では日本人の糖尿病対策を念頭に置き、GKラットを用いてSPI摂取が糖尿病や糖尿病性腎症に与える影響について明らかにすることを目的に研究を行った。

方 法

実験動物および飼養試験

実験動物として7週齢Goto-Kakizaki (GK) 雄性ラット (日本エスエルシー) 16匹を用いた。市販飼料 (ラボMRストック, ノーサン) で予備飼育をした後、平均体重、空腹時血糖値が均一になるようにカゼイン (C) 区, SPI区の2区に区分けした。動物はステンレス製個別ケージに収容し、室温22±2℃、湿度45-75%、12時間の明暗サイクル条件下 (明期6:00 ~ 18:00) で15週間飼育した。試験食は糖尿病の病態を悪化させることが報告されている高スクロース飼料 (30%スク

ロース) を用い、CPはそれぞれのたん白質源を用いて20%に調製した (Table 1)。

15週間の試験終了後、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg b.w.) にて開腹し、腹部下大静脈よりヘパリン処理したシリンジを用いて採血を行った。採血後、頸部動脈より放血屠殺を行い、肝臓、腎臓、貯蔵脂肪 (腎臓背部、副睾丸周囲) を採取した。採取した腎臓の一部は4%パラホルムアルデヒド溶液に浸漬し、速やかに固定処理を行い、形態学的観察に供した。

空腹時血糖値の測定

毎週1回血糖値の測定を行った。血糖値測定の前日より18時間の絶食をした後、ジェントレット (株式会社三和化学研究所) を用いてラット尾静脈より採血を行った。血糖値の測定にはメディセーフミニGR-102 (テルモ株式会社) を用いた。

血液生化学的検査値の測定

血漿インスリン濃度はモリナガラットインスリン測定キット (森永生科学研究所)、血漿アディポネクチン濃度はマウス/ラットアディポネクチンELISAキット (大塚製薬) を用いて測定した。その他の血液生化学的検査値の測定については、江東微生物研究所に分析を依頼した。

尿中アルブミン排泄の測定

0, 3, 8, 12, 15週目に代謝ケージに入れて、それぞれ3日間尿の回収および尿量の測定を行った。尿中微量アルブミンの測定は、パナテスト®Aシリーズラットアルブミン (三菱化学メディエンス株式会社) を用いて行った。

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient [†]	C CP20%	SPI CP20%
	%	
Casein (CP 84.3%)	23.72	—
SPI (CP 85.3%)	—	23.45
Cornstarch	29.22	29.80
Sucrose	30.00	30.00
Soybean oil	7.00	7.00
Cellulose	5.00	5.00
Mineral mix (AIN-93G-MX)	3.50	3.50
Vitamin mix (AIN-93-VX)	1.00	1.00
L-cystine	0.30	—
Choline bitartrate	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014

[†]Based on AIN-93G except for 30% sucrose. C, casein; SPI, soy protein isolate.

腎糸球体障害度の評価

腎糸球体障害度の解析は、新潟大学大学院 医歯学総合研究科 齋藤亮彦特任教授に依頼して行った。固定した腎糸球体をPAS染色した後、個体ごとに皮質部10個、皮髄境界部10個ずつの糸球体を解析に用いた。腎糸球体の画像解析はImage pro（日本ローバー）を用いて行った。

統計処理

測定値は平均値±SEMで示した。2区間の有意差検定はt検定を用いて行い、 $p<0.05$ のものを有意差ありと判定した。

結果と考察

飼育成績に対する効果

体重で有意差は見られなかったが、肝臓重量で有意な差が見られた（Table 2）。試験終了時のラットの週齢は22週齢となっており、成長期は既に終了した状態と考えられ、2区間の肝臓重量の差が成長速度、あるいはたん白質栄養の違いに起因することは考えにくい。このことを支持する結果として、終体重に差が見られなかったことや、たん白質栄養の指標である血漿アルブミン濃度がSPI区で有意に高い値を示したことが挙げられる（ $p<0.05$ 、データ示さず）。以上の結果より、SPI区における肝重量の有意な低下は、肝臓への脂肪蓄積が抑制されていることに起因すると推察された。

空腹時血糖値に対する効果

高スクロース飼料を摂取させたWistar/ST系雄ラット（非糖尿病ラット）の空腹時血糖値は70～90 mg/100mLの間で推移しており（データ示さず）、今回使用したGKラットはこれら健常ラットより高い血糖値を示していた（Fig. 1）。15週間の試験期間を通して2区間で明確な差は確認されず、大豆たん白質摂取はGKラットの空腹時血糖値には影響をおよぼさない

Table 2. Growth performance

	C	SPI
Initial body weight (g)	172.4±4.0	172.2±3.7
Final body weight (g)	384.5±8.1	379.8±3.5
Food intake (g/15 wk)	1,680.3±23.5	1,603.4±11.9*
Liver weight (g/100 g b.w.)	2.66±0.07	2.38±0.04*
Kidney weight (g/100 g b.w.)	0.71±0.02	0.69±0.02
Depod fat weight (g/100 g b.w.)	4.42±0.14	4.38±0.14

C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means±SEM. *An asterisk shows a significant difference ($p<0.05$).

ことが示唆された。この結果はTeixeiraらの肥満型の2型糖尿病モデルマウスを用いた報告と同様であった³⁾。

糖尿病および腎機能関連パラメータに対する効果

血中のインスリン濃度やインスリン感受性を改善することが報告されているアディポネクチン濃度において、有意差は見られなかった（Fig. 2）。この結果は空

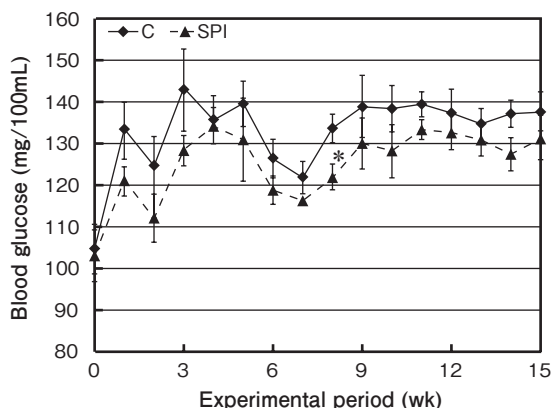


Fig. 1 Effects of soy protein isolate on fasting blood levels in GK rats. The blood was collected from the tail vein after the rats were fasted for 18 h. C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means ± SEM. *An asterisk shows a significant difference ($p<0.05$).

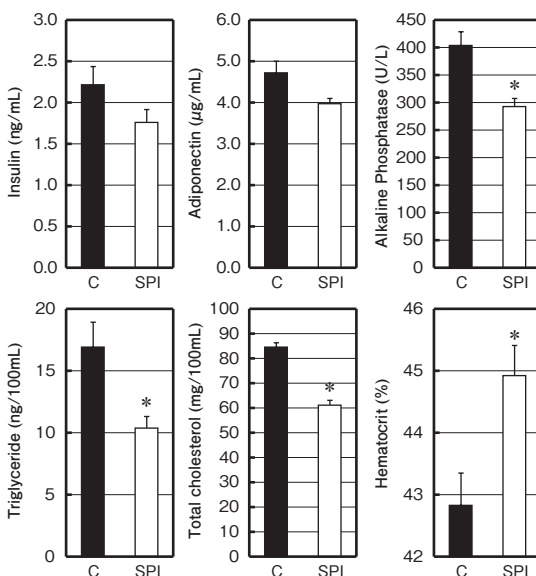


Fig. 2 Effects of soy protein isolate on blood parameters related to diabetes and diabetic complication. C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means ± SEM. *Asterisks show a significant difference ($p<0.05$).

腹時血糖値の結果と一致するものであった。一方、ヒトの疫学調査により糖尿病患者で数値が高くなることや、炎症反応のマーカーとして利用されるC-reactive proteinと正の相関があることが報告されている血中アルカリホスファターゼがSPI区で有意に低くなっていた。このことから大豆たん白質は糖尿病に対し、何らかの有益な効果を有している可能性が推察された。また、血中のトリグリセリド濃度や総コレステロール濃度はSPI区で有意に低い値を示していた。この結果は過去に報告されている健常ラットを用いた大豆たん白質の脂質代謝改善作用と同様の結果であり、大豆たん白質はGKラットにおいても脂質代謝改善作用を有していることが示された。また、腎臓は造血刺激ホルモンであるエリスロポエチンを産生する臓器であり、腎不全により腎性貧血が引き起こされることが知られている。貧血の指標として利用されるヘマトクリット値は、SPI区で有意に高い値を示した。このことからSPIは腎機能を保護し、糖尿病性腎症において問題になる腎性貧血を予防する効果を有していることが推察された。

尿中アルブミン排泄に対する効果

腎糸球体のろ過機能や尿細管での再吸収機能に障害が起こると、血中のアルブミンが尿中へと排泄されるようになる。このことから、尿中へのアルブミン排泄は糖尿病性腎症の発症および進行のマーカーとして利用されており、本試験でも尿中アルブミン濃度の測定を行った。試験開始後3週目までは2区間で差は見られなかったものの、8週目以降はSPI区で低くなる傾向あるいは有意に低下しており、SPI摂取により尿中アルブミン排泄が抑制されることが示された (Fig. 3)。

腎糸球体組織障害に対する効果

糖尿病性腎症における一般的な組織変化は初めに腎肥大が起こり、その後糸球体基底膜の肥厚やメサンギウム領域の拡大などが起こり、最終的に糸球体硬化に至り糸球体機能が失われるとされている。本試験では皮質および皮髄境界部の糸球体において、SPI摂取により有意に障害の進行が抑制されていることが明らかとなった (Fig. 4)。以上の結果より、SPI摂取により糖尿病性腎症の進行が遅延されることが明らかとなった。

本検討ではGKラットの糖代謝関連マーカーには明確な改善効果は見られなかったが、これはSPIに糖代謝改善効果がないのではなく、GKラットの血糖値上昇が中程度であったため、十分な効果を観察することができなかった可能性も考えられる。より顕著な血糖値の上昇が見られる他のモデル動物を使用することで、糖代謝に対する効果も確認できるかもしれない。

一方、腎臓においては、アルブミン排泄の抑制や腎糸球体組織保護効果などが明確に表れており、大豆たん白質摂取が糖尿病性腎症の進行を緩やかにしていることが明らかとなった。

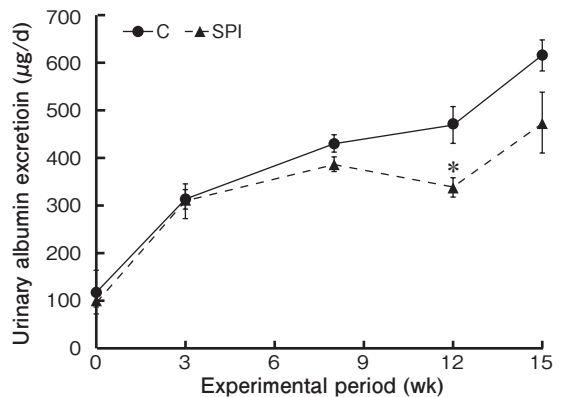


Fig. 3 Effects of soy protein isolate on urinary albumin excretion in GK rats. Urine was collected for 3 d and the collection was conducted at 0, 3, 8, 12, 15 wk. C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means $\pm$ SEM. *An asterisk shows a significant difference ($p < 0.05$).

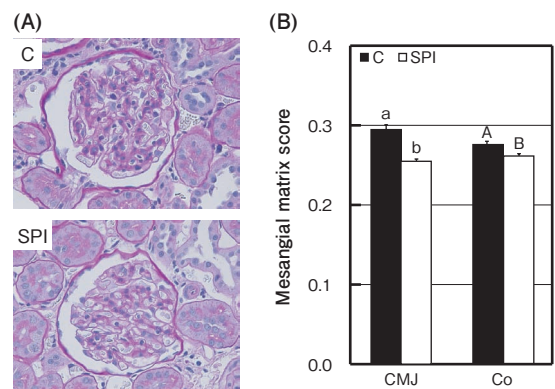


Fig. 4 Effects of soy protein isolate on kidney histological damages in GK rats. Kidneys were fixed by 4% paraformaldehyde. After stained by periodic acid-Schiff stain, the degree of glomerular damage in the kidneys of GK rats was quantitated with Image pro. (A), microscopic images of glomeruli in the cortico-medullary junction of kidneys. (B), the degree of glomerular damage in kidneys. C, casein; SPI, soy protein isolate; CMJ, cortico-medullary junction; Co, cortex. Data represent means $\pm$ SEM. ^{a, b, A, B} Different letters show a significant difference ($p < 0.05$).

要 約

非肥満2型糖尿病モデルGKラットにカゼインおよび大豆たん白質を摂取させ、摂取たん白質の違いが糖尿病および糖尿病性腎症に与える影響を検討した。それぞれのたん白質を用いて調製した30%スクロース負荷飼料を15週間摂取させ、空腹時血糖値や血中パラメータおよび尿中アルブミン排泄の測定、腎糸球体の組織学的な観察を行った。空腹時血糖値や血漿中インスリン、アディポネクチン濃度では差が見られなかったものの、尿中アルブミン排泄量および腎糸球体障害の抑制効果が見られた。以上の結果から、大豆たん白質は糖尿病性腎症の進行を遅延させる効果を有することが明らかとなった。

文 献

- 1) Pedrini MT, Levey AS, Lau J, Chalmers TC and Wang PH (1996): The effect of dietary protein restriction on the progression of diabetic and nondiabetic renal diseases: A meta-analysis. *Ann Intern Med*, **124**, 627-632.
- 2) Williams AJ and Walls J (1987): Metabolic consequences of differing protein diets in experimental renal disease. *Eur J Clin Invest*, **17**, 117-122.
- 3) Teixeira SR, Tappenden KA and Erdman JW Jr (2003): Altering dietary protein type and quantity reduces urinary albumin excretion without affecting plasma glucose concentration in BKS. cg-m +Lepr db/+Lepr db (db/db) mice. *J Nutr*, **133**, 673-678.