

大豆たん白質摂取がZDF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}・山口実希²・渡邊令子³・藤村 忍^{1,2}・門脇基二^{1,2}

¹新潟大学超域学術院 ²同大学院自然科学研究科 ³新潟県立大学人間生活学部

Effects of Soy Protein Isolate on Glucose Homeostasis and Kidney Functions of ZDF Rats

Masatoshi KUBOTA^{*1}, Miki YAMAGUCHI², Reiko WATANABE³,
Shinobu FUJIMURA^{1,2} and Motoni KADOWAKI^{1,2}

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

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

³Department of Health and Nutrition, University of Niigata Prefecture, Niigata 950-8680

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a serious disease caused by lifestyle and genetic factors. T2DM leads to various complications such as diabetic retinopathy, neuropathy and nephropathy. In Japan the restriction of dietary protein intake is recommended in order to control the progression of diabetic nephropathy. However, the effect of the kinds of proteins on controlling diabetic nephropathy has been unclear. Therefore, we focused on clarifying the effects of soy protein isolate (SPI) on diabetes and diabetic nephropathy. Male obese type 2 diabetic Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats were fed casein (C) or SPI diets for 8 wk. The following values were determined; fasting blood glucose level, blood parameters including insulin and adiponectin, the excretion of urinary albumin which is a diagnostic marker of diabetic nephropathy, and urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) which is a marker of proximal renal tubule damage. Kidney tissue sections were obtained for histological analysis. SPI had beneficial effects on glucose homeostasis such as fasting blood glucose levels, hemoglobin A1c, and adiponectin. SPI significantly improved the total cholesterol level and the markers liver damage in the plasma and the accumulation of total lipids in the livers, compared with C. In addition, urinary albumin and NAG excretion in the SPI group were significantly improved, compared with those of the C group. The renal glomerular damage was significantly suppressed in the SPI group. These results show that SPI has a

*〒950-2181 新潟市西区五十嵐二の町8050

suppressive effect on progression of diabetes and diabetic nephropathy. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 43-47, 2013.

Key words : soy protein isolate, diabetes, diabetic nephropathy, Zucker Diabetic Fatty rat

肥満は生活習慣病の最大の危険因子であり、2型糖尿病の発症や進行も肥満が関与している場合が多く、肥満は社会的な問題となっている。糖尿病は慢性的な高血糖状態を呈する疾病であり、さまざまな合併症を引き起こすことが知られている。糖尿病の3大合併症は網膜症、神経症、腎症であり、特に糖尿病性腎症は新規透析導入患者の原因疾患の第1位で、わが国における医療費高騰の原因の一つとなっている。この糖尿病性腎症を含む慢性腎疾患の食事療法では、高血圧を合併している場合はナトリウム（食塩）、高カリウム血症時にはカリウムの摂取制限が行われている。さらに、持続性たん白質尿があらわれる病期分類ステージ3以降になると、腎機能を維持するためにステージ毎にたん白質の摂取制限も行われる。しかし、患者がこのたん白質の摂取制限を順守することは大変困難であるだけでなく、低たん白質栄養状態を招く危険性があり、患者のQuality of Lifeの低下など問題点も報告されている。このように、たん白質の摂取制限に注目が集まる一方、摂取たん白質の種類の違いについてはほとんど議論されておらず、たん白質の種類の違いが糖尿病性腎症の進行に与える影響については不明である。申請者らはこれまで、摂取たん白質の種類の違いが糖尿病や糖尿病性腎症に与える影響について、非肥満2型糖尿病モデルGoto-Kakizaki (GK) ラットを用いて米胚乳たん白質について検討を行っており、米胚乳たん白質がGKラットの糖尿病性腎症の進行を遅延させる効果を有していることを明らかにした¹⁾。

大豆たん白質 (SPI) は脂質代謝改善作用などさまざまな機能性を有していることが報告されており、腎機能についても腎不全モデルや肥満型2型糖尿病モデルでの検討がなされているが^{2,3)}、未だ十分とはいえない。そこで本研究では、肥満2型糖尿病モデルZucker Diabetic Fatty (ZDF) 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検討を行った。

方 法

実験動物および飼養試験

実験動物として6週齢のZDF雄性ラット (日本チャー

ルズリバー) 16匹を用いた。市販固形飼料 (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 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度45-75%、12時間の明暗サイクル条件下 (明期 6 : 00 ~ 18 : 00) で8週間飼育した。試験飼料は、AIN-93Gに準じてCPはそれぞれのたん白質源を用いて20%に調製した (Table 1)。なお、C区の飼料はSPI区の摂取量に合わせて制限給与し、水は自由摂取とした。

8週間の試験終了後、ペントバルビタール麻酔下 (50 mg/kg body weight) 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。測定前日より18時間の絶食後、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。

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient [†]	C	SPI
	CP 20%	CP 20%
%		
Casein (CP 83.4%)	23.98	—
Soy protein isolate (CP 84.8%)	—	23.58
Cornstarch	48.97	49.66
Sucrose	10.00	10.00
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. C, casein; SPI, soy protein isolate.

血液生化学的検査値の測定

ヘモグロビンA1cはDCA2000（バイエルメディカル）、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。また、血中オステオカルシン濃度はRAT OSTEOCALCIN EIA KIT（Biomedical Technologies Inc.）を用いて行った。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（株）に分析を依頼した。

尿中アルブミン排泄の測定

0, 4, 6, 8週目に代謝ケージに入れて、それぞれ3日間採尿し尿量の測定を行った。尿中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）を用いて行い、尿中N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（NAG）活性の測定はSRL（株）に依頼した。

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 斎藤亮彦特任教授に依頼した。固定した腎糸球体をPAS染色した後、個体ごとに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±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

終体重はSPI区で有意に高値を示し、肝臓および腎臓重量はSPI区で有意に低値を示した（Table 2）。2区間で終体重に差がみられたが、これは試験終了2週間前よりC区での体重上昇がほとんどみられなくなったこと（データ示さず）が原因であり、糖尿病の病態が進行したことが原因であると推測された。また肝臓重量の差は、肝臓への脂肪蓄積がSPI区で有意に抑制されていること（Table 3）が原因であると考えられた。一方、腎肥大は糖尿病性腎症の初期病変と考えられているが、この腎肥大がSPI摂取により有意に抑制されており、腎臓に対して保護的に作用している可能性が推察された。

Table 2. Growth performance

	C	SPI
Initial body weight (g)	234.7±2.4	234.7±5.1
Final body weight (g)	423.1±8.4	453.4±6.1**
Food intake (g/8wk)	1159.9±10.0	1118.3±24.8
Liver weight (g/100g b.w.)	5.95±0.16	3.21±0.16**
Kidney weight (g/100g b.w.)	0.56±0.02	0.49±0.02*
Depod fat weight (g/100g b.w.)	6.93±0.13	7.09±0.21

C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means±SEM. *,**Asterisks show significant differences (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$, respectively).

Table 3. Effect of soy protein isolate on blood and liver parameters in ZDF rats

	C	SPI
Blood		
Blood glucose (mg/100mL)	256.1±25.8	172.8±15.0*
Insulin (ng/mL)	9.6±1.5	11.9±1.3
Adiponectin (μg/mL)	4.1±0.2	5.6±0.3**
Albumin (g/100mL)	3.8±0.1	4.5±0.1**
AST (U/L)	878.1±57.7	318.1±45.6**
ALT (U/L)	556.0±37.9	264.6±38.0**
ALP (U/L)	904.1±57.2	464.0±32.2**
Total cholesterol (mg/100mL)	354.6±7.6	199.6±13.2**
Urea nitrogen (mg/100mL)	19.7±0.8	14.4±0.9**
Creatinine (mg/100mL)	0.19±0.01	0.21±0.00
Osteocalcin (ng/mL)	12.6±2.1	22.9±4.3*
Liver		
Total lipids (g/liver)	5.5±0.5	1.1±0.2**

ZDF rats were fed the casein or soy protein isolate diets for 8 wk. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means±SEM. *,**Asterisks show significant differences (* $p<0.05$ and ** $p<0.01$, respectively).

空腹時血糖値に対する効果

空腹時血糖値はC区で6週目以降に顕著な増加を示したが、SPI区ではその上昇が有意に抑制されていた（Fig. 1A）。また、試験終了時のヘモグロビンA1c値は空腹時血糖値と同様にSPI区で有意に低値を示し（Fig. 1B）、SPI摂取により血糖値調節能が改善されていることが示された。

血中パラメータに対する効果

血中インスリン濃度は2区間で有意差はみられなかったが、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は、SPI区で有意に高値を示した（Table 3）。このアディポネクチン濃度の上昇が先に述べた血糖値調節能の改善に寄与して

いる可能性が推察された。また、血中の肝機能マーカーであるAspartate aminotransferaseおよびAlanine aminotransferaseはともにSPI摂取により有意に低値を示し、肝障害の進行が抑制されている可能性が示された。さらに、血漿総コレステロール濃度も同様にSPI摂取により有意に低値を示した。以上の結果より、SPI摂取は脂質代謝を改善し、肝臓への脂肪蓄積を抑制することで肝機能を維持している可能性が推察された。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漿Alkaline phosphataseがSPI区で有意に低くなっていた。また、腎機能の評価に使用される血漿クレアチニン濃度は変化がみられなかったものの、腎機能が低下すると血中濃度が上昇する尿素窒素はSPI区で有意に低値を示した。これらの結果より、SPI区でC区と比較して腎機能が維持されている可能性が推察された。さらに血漿オステオカルシン濃度がSPI区で有意に高値を示した。骨粗しょう症は糖尿病の合併症の1つあり、骨形成マーカーであるオステオカルシンは糖尿病モデルラットで低値を示すことが報告されている⁴⁾、本研究におけるSPI区でのオステオカルシン濃度の上昇から、SPIが骨代謝の改善に寄与している可能性が推察された。

尿中アルブミン、NAG排泄に対する効果

尿中へのアルブミン排泄は、腎糸球体でのろ過機能

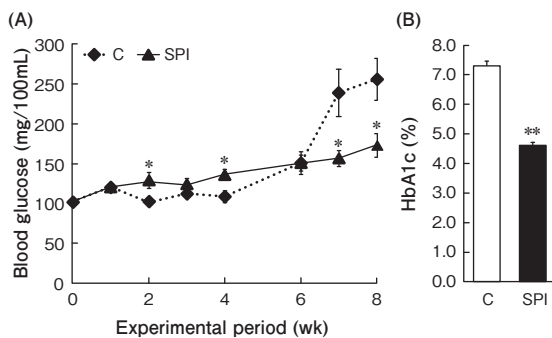


Fig. 1. Effects of soy protein isolate on glucose homeostasis in ZDF rats. (A), After 18 h fasting, blood samples were collected from the tail vein without anesthesia every week. (B), After 18 h fasting, blood samples were collected from inferior vena cava under anesthesia at 8 wk. C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means $\pm$ SEM. *,**Asterisks show significant differences (* p <0.05 and ** p <0.01, respectively).

あるいは尿細管での再吸収機能に障害が起こると上昇することが知られている。それゆえ、尿中アルブミン排泄は糖尿病性腎症の発症および進行マーカーとして利用されており、本試験でも評価指標として尿中アルブミン量の測定を行った。試験開始後4週目以降でSPI区において尿中アルブミン排泄が有意に抑制され、糖尿病性腎症の進行が抑制されていることが示された (Fig. 2)。さらに、尿中NAG量も同様に4週目以降で有意に低値を示した (Fig. 3)。NAGは近位尿細管に多く存在しているリソソーム系の酵素であり、尿細管に障害が起こると尿中への排泄量が増加し、近位尿細管の障害マーカーとして利用されている。本酵素の尿

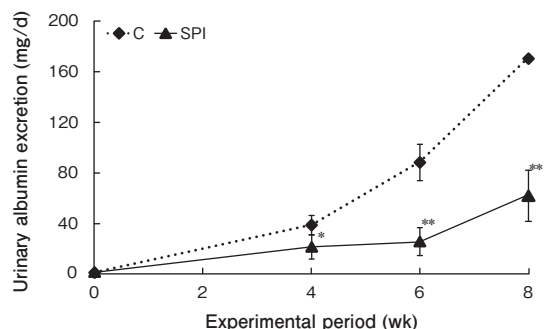


Fig. 2. Effects of soy protein isolate on urinary albumin excretion in ZDF rats. Urine was collected for 3 d and the collection was conducted at 0, 4, 6, 8 wk. The measurements of albumin in urine were conducted by ELISA method. C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means $\pm$ SEM. *,**Asterisks show significant differences (* p <0.05 and ** p <0.01, respectively).

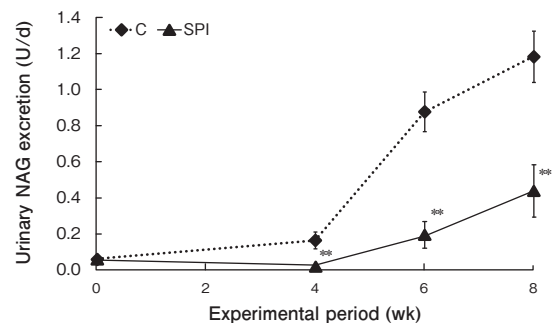


Fig. 3. Effects of soy protein isolate on urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase excretion in ZDF rats. Urine was collected for 3 d and the collection was conducted at 0, 4, 6, 8 wk. C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means $\pm$ SEM. **An asterisk shows a significant difference (p <0.01).

中排泄が有意にSPI区で抑制されていたことから、SPIは近位尿細管障害を軽減する効果を有することが示された。

腎糸球体組織障害に対する効果

糖尿病性腎症でみられる代表的な組織変化の一つに、メサンギウムマトリックスの増加がある。腎糸球体の形態観察の結果から、SPI摂取により有意に腎糸

球体のメサンギウムマトリックスの増加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摂取により腎臓の組織障害が軽減されることが示された。

以上の結果より、大豆たん白質は糖代謝の改善、肝臓への脂質蓄積抑制効果、さらに糖尿病性腎症の進行を遅延させる効果を有していることが明らかとなった。

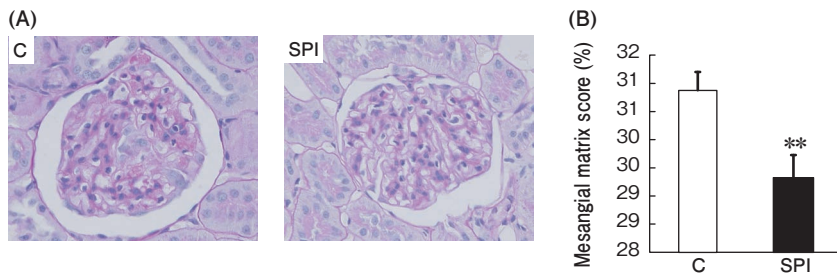


Fig. 4. Effects of soy protein isolate on kidney histological damage in ZDF rats. Kidneys were fixed by 4% paraformaldehyde. After stained by periodic acid-Schiff stain, the degree of glomerular damage in the kidneys of ZDF rats was quantitated with Image pro. (A), Microscopic images of glomeruli in the kidneys of ZDF rats. (B), The degree of glomerular damage in kidneys. C, casein; SPI, soy protein isolate. Data represent means $\pm$ SEM. **An asterisk shows a significant difference ($p < 0.01$).

要 約

肥満2型糖尿病モデルZDF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。各々のたん白質を用いて調製した飼料を8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とNAG排泄の測定、腎糸球体の組織学的観察を行った。大豆たん白質摂取により、空腹時血糖値やヘモグロビンA1cの改善、血漿アディポネクチン濃度の上昇がみられ、血糖値調節能が改善している可能性が示された。さらに、尿中アルブミンとNAG排泄、および腎糸球体障害の抑制効果がみられた。以上の結果から、大豆たん白質は糖尿病および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) Kubota M, Watanabe R, Kabasawa H, Iino N, Saito A, Kumagai T, Fujimura S and Kadowaki M (2013): Rice protein ameliorates the progression of diabetic nephropathy in Goto-Kakizaki rats with high-sucrose feeding. *Br J Nutr*, **110**, 1211-1219.
- 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.
- 4) Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J, Henkenjohann V, Rauner M, Hempel U, Bernohardt R, Fratzl-Zelman N, Roschger P, Rammelt S, Günther KP and Hofbauer LC (2011): Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **301**, E1220-E1228.