ラット褥瘡モデルを用いた大豆たん白質，大豆ペプチド摂食による予防効果

大石祐一*・志村茉里・善行　緑・森岡由夏

東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科生体環境解析学研究室

Feeding Soy Protein Isolate and Soybean Peptide Has a Preventive Effect on Bedsore in Rat Skin

Yuichi OISHI*, Mari SHIMURA, Midori Zengyo and Yuka MORIOKA

Department of Nutritional Science and Food Safety, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156-8502

ABSTRACT

The preventive effects of soy protein isolate (SPI) or soybean peptide (SP) on bedsore were investigated in rat skin. Thirteen-week-old male HWY/Sic rats were fed on experimental diets and had a load of 300 g on the dorsal surface for 16 days. The 6 experimental groups (n=6) were a group feeding on 20% casein diet *ad libitum* (C), a group feeding on 14 g/day of 20% casein diet (CR), a group feeding on 14 g/day of 18% casein diet containing 2% collagen peptide (COL), a group feeding on 14 g/day of 20% SPI diet (SPI), a group feeding on 14 g/day of 20% SP diet (SP), and a group feeding on 14 g/day of 18% SP diet containing 2% collagen peptide (SP+COL). After 16 days, rats had a wound on the dorsal. The wound area of the C group was the smallest, whereas the area of the CR group was the largest. The area of the COL, SPI, and SP groups was smaller than that of the CR group. The level of type III tropocollagen and the mRNA level of Col3α1 in the periwound skin increased in the COL and SP groups relative to the levels in the CR group. The amounts of hyaluronan and the mRNA level of hyaluronan synthase 3 were larger in the periwound skin of the COL and SP groups than those in the periwound skin of the CR group. The increment of type III collagen and hyaluronan is highly relevant to wound-healing. Furthermore, the feeding on soybean peptide increases the amount of serum adiponectin, which has amplifying effects on collagen and hyaluronan synthesis. These results suggested that SP might have preventive effects on bedsore via the increase of type III tropocollagen, hyaluronan and serum adiponectin. ***Soy Protein Research, Japan* 17**, 103-109, 2014.

Key words : bed sore, collagen, hyaluronan, soybean peptide

*〒156-8502　東京都世田谷区桜丘1-1-1

高齢社会となった日本では，寝たきりになる高齢者も増えており，褥瘡への対策は重要な課題となっている．褥瘡のできる原因の一つとして，皮膚や筋肉の組織の耐久性の低下であり，これは低栄養状態により悪化する．褥瘡は一度できると難治のため，栄養状態の改善などといった予防が重要である[1]．

栄養状態改善のためには，摂取エネルギーと摂取たん白質量の確保が重要である．中でも摂取たん白質量の減少は，筋肉量を低下させ，骨が突出し皮膚組織の耐久性の低下を招く．さらに，体たん白質の重要な働きである水分保持力も低下し，褥瘡が発生しやすくなる．よって褥瘡の改善のためには，十分なたん白質の摂取が重要である．しかし，褥瘡が発生しやすい高齢者は，老化や嚥下障害，また他の病気による食欲不振より，健康な成人と同じ量の食事をとることは困難である[2]．

真皮の主成分（重量比約70 ～ 90%）はコラーゲンであり，皮膚の弾力の維持に寄与している[3]．コラーゲンとともに細胞外マトリックスを形成する物質としてヒアルロン酸があり，その特徴的な物理的性質として，保水能力と粘弾性が挙げられる．十分な量のヒアルロン酸やコラーゲンなどが共存することで，健康的な肌の構成が保たれていると考えられている．これまでの研究により，大豆ペプチドとコラーゲンを経口摂取させたラットの皮膚中のコラーゲン量が増加傾向を示すことが明らかになっている[4]．また，大豆ペプチドを経口摂取させたラットにおいては，皮膚中のヒアルロン酸量が増加傾向を示した[5]．

これらのことより，我々は大豆たん白質および大豆ペプチドの摂取が褥瘡発症予防につながるのではないかと推測した．そこで今回の研究では，褥瘡モデルラットを用いて，大豆たん白質および大豆ペプチドを摂食したラットの褥瘡様創傷の発生への影響を検討した．

方　　法

動物実験には，13週齢のHWY/Sic雄性ラット（日本エスエルシー株式会社）を用いた．群はコントロール群（C），コントロール低栄養群（CR），コントロール食に2%コラーゲン（JNC株式会社より供与）を含ませ，低栄養にした群（COL），分離大豆たん白質を含む低栄養にした群（SPI），大豆ペプチドを含む低栄養にした群（SP），大豆ペプチドに2%コラーゲンを含む低栄養にした群（SP+COL）の計6群を設けた．エサはAIG-93Gを基本とした．約300 g体重になるまでラットを馴化飼育後，一日14 gの制限食飼育を7日間，さらに6群に分けての飼育を16日間行った．この16日間は，ラット背部に300 g荷重されるようにした．飼育後解剖し，皮膚，血清を採取した．なお，本実験は東京農業大学動物実験委員会の承認を得て行った．皮膚の採取は，各群とも非創傷部位と創傷部位から行った．創傷部位に関しては創傷部位周囲5 mm広く採取した．採取した皮膚からはRNAを抽出し，real time PCR法にて各種mRNA量を測定した．また，ウエスタンブロッティング法にて皮膚中の合成して間もないトロポコラーゲン量，カルバゾール硫酸法にてヒアルロン酸量を測定した．

結　　果

平均体重の推移

コントロール（C）群に比してCR群, COL群, SPI群, SP群，SP+COL群は減少傾向を示した．

血清アルブミン量 （Fig. 1）

血清アルブミン量は，群全体で有意な差は認められなかったが，制限食5群はC群に比して減少傾向を示した．

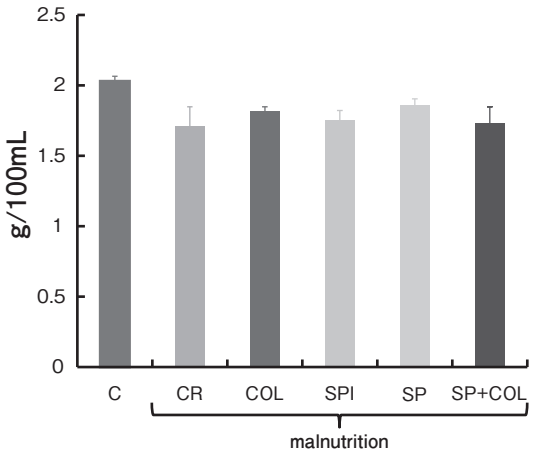

Fig. 1. Effects of different 6 experimental diets on serum albumin level. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE.

相対的創傷面積 (Fig. 2)

C群の創傷面積を1とした場合の各群の創傷面積を求めた．CR群，COL群，SPI群，SP群，SP+COL群ともに有意な差は見られなかったが，いずれの群もC群に比して創傷面積が大きかった．制限食の中で比較すると，COL群，SP群においてその面積が減少傾向を示した．

非創傷部位のヒアルロン酸量，Has2mRNA量，Has3mRNA量 (Fig. 3)

非創傷部のヒアルロン酸量は低栄養5群ともにC群よりも低くなった．この結果は，従来の結果と一致した．SP群はCR群に対して増加傾向を示した．また，ヒアルロン酸合成酵素のHas2およびHas3のmRNA量はSP群で増加した．

創傷部位のヒアルロン酸量，Has2mRNA量，Has3mRNA量 (Fig. 4)

創傷部位においてもヒアルロン酸量は低栄養でC群よりも低下傾向を示した．低栄養群の中では，COL群およびSPI群で増加傾向を示した．Has2のmRNA量はSPI群で増加傾向を示した．また，Has3mRNA量ではCR群でC群よりも低下した．他の低栄養4群はCR群よりも増加傾向を示した．中でもCOL群およびSP群は増加を示した．

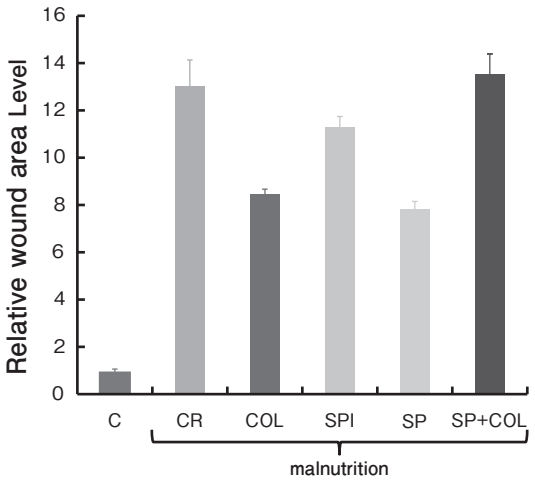

Fig. 2. Effects of different 6 experimental diets on the wound area. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE.

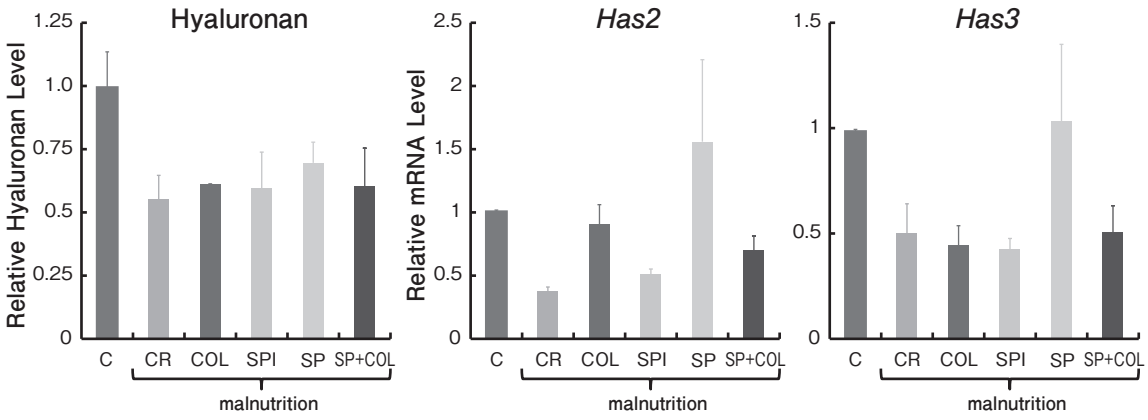

Fig. 3. Effects of different 6 experimental diets on hyaluronan and the mRNA levels of hyaluronan synthases in the non-wound area. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE.

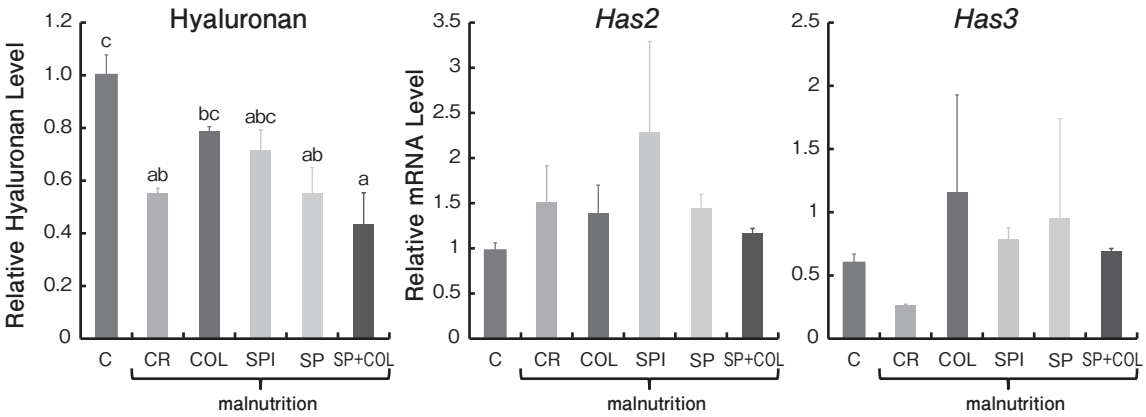

Fig. 4. Effects of different 6 experimental diets on hyaluronan and the mRNA levels of hyaluronan synthases in the periwound skin. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE. Bars without a common letter represent significant differences ($p<0.05$).

非創傷部位のI型トロポコラーゲン量，Col1A1 mRNA量（Fig. 5），Ⅲ型トロポコラーゲン量，Col3A1 mRNA量（Fig. 6）

非創傷部位においてI型トロポコラーゲン量は，C群と比してCR群で低下傾向を示した．CR群と比して，SP群は増加傾向を示した．COL群とSPI群は低下傾向を示した．I型トロポコラーゲン遺伝子Col1A1のmRNA量は，SP+COL群を除く低栄養4群で低下傾向を示した．

III型トロポコラーゲン量は，SP群を除く低栄養4群で低下傾向を示した．III型トロポコラーゲンの遺伝子Col3A1のmRNA量は，低栄養群の中でCOL群とSP群で増加傾向を示した．

創傷部位I型トロポコラーゲン量，Col1A1 mRNA量（Fig. 7），Ⅲ型トロポコラーゲン量，Col3A1 mRNA量（Fig. 8）

創傷部位においてI型トロポコラーゲン量は，C群と比して低栄養5群で低下傾向を示した．Col1A1のmRNA量はたん白質量と同様に低栄養群で低下傾向を示した．

III型トロポコラーゲン量は，I型トロポコラーゲン量と同様に低栄養5群で低下傾向を示したが，CR群と比してCOL群およびSP群は増加傾向を示した．Col3A1のmRNA量は，低栄養群，SPI群で減少したが，COL群，SP群，SP+COL群で増加した．とくに，SP群は顕著に増加した．

考　　察

大豆ペプチドはコラーゲンとともに経口摂取させるとラット皮膚中のコラーゲン量を増加させる[4]．また，大豆ペプチドを経口摂取させたラットにおいては，皮膚中のヒアルロン酸量が増加傾向を示した．そこで，我々は，褥瘡モデルを用いて，分離大豆たん白質（SPI），大豆ペプチド摂食の褥瘡予防への効果について検討した．

低栄養で飼育することで血清アルブミン値は減少傾向にとどまったが，より顕著に創傷が形成された．創傷面積は，コラーゲン食，SPI食，大豆ペプチド摂食により抑制傾向を示した．とくにコラーゲン食，大豆ペプチド食では抑制が顕著だった．創傷治癒過程ではIII型コラーゲンの合成が必要であるといわれている[6]．そこで，合成間もないIII型トロポコラーゲン量およびそのmRNA量を測定したところ，COL群およびSP群で増加していた．よって，SP群には創傷治癒促進効果があり，このことと創傷面積の減少効果との間に関連があるのかもしれない．また，ヒアルロン酸量もCOL群，SPI群で増加傾向を示し，ヒアルロン酸の表皮での合成酵素Has3もCOL群，SP群で顕著に増加した．Has3mRNA量の増加は，ヒアルロン酸量に反映されていなかったが，表皮における創傷抑制に何らかの影響を与えているのかもしれない．大豆ペプチドは，血中アディポネクチン量を増加させるという報告

がある．アディポネクチンは，皮膚でのコラーゲン量，ヒアルロン酸量を増加させる効果があるので[7]，SP群の創傷面積抑制効果には，アディポネクチンが関わっている可能性があった．

今後，創傷を確実にできるモデルのさらなる開発と，創傷と細胞外マトリクスの形成との関連性について検討し，大豆ペプチドが褥瘡に有効であることを明らかにしていきたい．

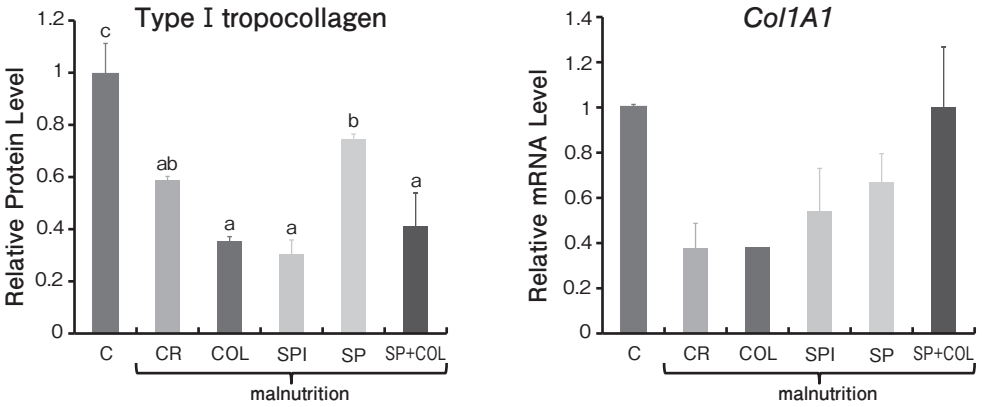

Fig. 5. Effects of different 6 experimental diets on type I tropocollagen and the mRNA levels of Col1A1 in the non-wound area. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE. Bars without a common letter represent significant differences ($p<0.05$)

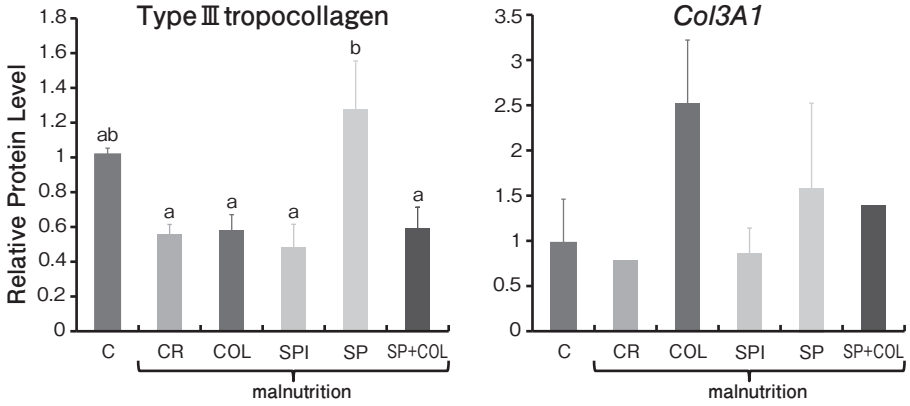

Fig. 6. Effects of different 6 experimental diets on Type III tropocollagen and the mRNA levels of Col3A1 in the non-wound area. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE. Bars without a common letter represent significant differences ($p<0.05$)

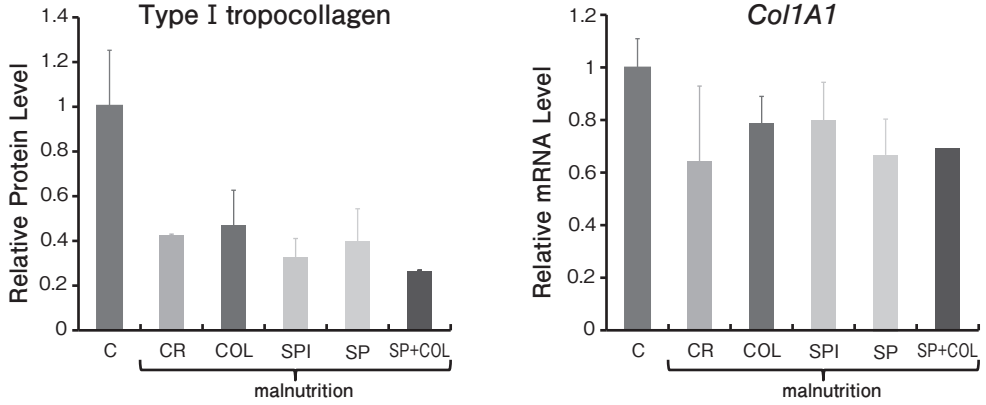

Fig. 7. Effects of different 6 experimental diets on Type I tropocollagen and the mRNA levels of Col1A1 in the periwound skin. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE. Bars without a common letter represent significant differences ($p<0.05$)

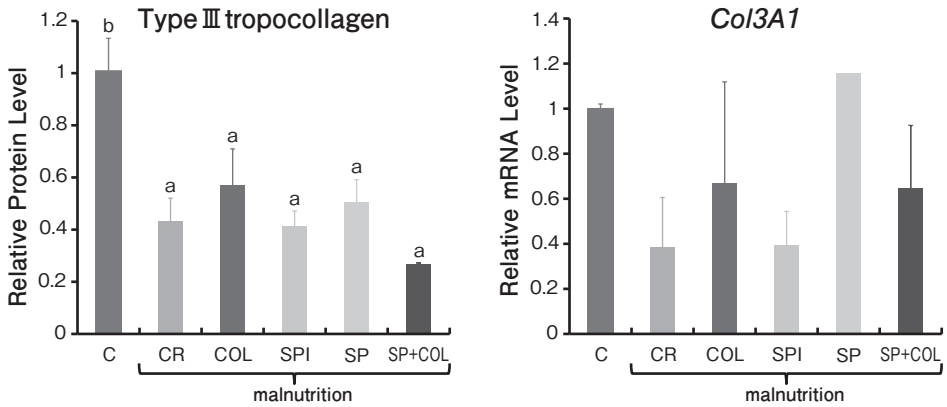

Fig. 8. Effects of different 6 experimental diets on Type III tropocollagen and the mRNA levels of Col3A1 in the periwound skin. C; Control (AIN-93G), CR; 14 g/day of AIN-93G diet, COL; 14 g/day of CR diet containing 2% collagen peptide, SPI; 14 g/day of CR containing soy protein isolate instead of casein, SP; 14 g/day of CR diet containing soy peptide instead of casein, SP+COL; 14 g/day of CR diet containing soy protein isolate and 2% collagen peptide instead of casein. Bars are expressed as mean ± SE. Bars without a common letter represent significant differences ($p<0.05$)

要　　約

高齢社会の日本では，褥瘡患者が増加している．褥瘡は低栄養状態で惹起しやすい．そこで，我々は，低栄養状態の褥瘡動物モデルを用いて，褥瘡予防によい食餌とそのメカニズムを解析した．食餌たん白質源としてカゼイン，分離大豆たん白質，大豆ペプチドさらにコラーゲンを用いた．その結果，カゼインおよびコラーゲンを含む食餌および大豆ペプチドを食餌としたとき，創傷面積増大が抑制された．これらの食餌を摂食したラット皮膚中のIII型トロポコラーゲン量およびそのmRNAである*Col3A1*量が増加傾向を示した．また主要な表皮ヒアルロン酸合成酵素のmRNA量が増加傾

向を示した．これら分子は創傷治癒改善に重要な分子と言われており，この変動が創傷面積増大抑制効果に関与する可能性が考えられた．

文　　献

1）Dan L.Barder（1994）：褥瘡－予防・治療の実際と研究の展開．協同医書出版社，pp.13-25.

2）宮地良樹，真田弘美（2002）：よくわかって役に立つ新・褥瘡のすべて 永井書店，pp.120－130.

3）大石祐一（2002）：皮膚におけるコラーゲン代謝に関わる分子．中部大学応用生物学部，**1**, 19-26.

4）Inoue Y, Itoh H, Aoki M, Ogawa S, Yamane T, Baba T, Tachibana N, Kohno M, Oishi Y and Kobayashi-Hattori K (2012): Accelerating effect of soy peptides containing collagen peptides on type I and III collagen levels in rat skin. *Biosci Biotechnol Biochem*, **76**, 1549-1451.

5）大石祐一（2005）：食餌大豆たん白質摂食のラット皮膚のプロテオグリカンに与える影響の分子レベルでの解析．大豆たん白質研究, **8**, 86-89.

6）野村隆，久保田健彦，一戸千華子，小川伸之，大石祐一，井上紳太郎，高橋徳也，原耕二（1995）：ラットにおける実験的歯周手術後のI型およびIII型collagen形成量の変動に及ぼす没食子酸プロピルの影響．日本歯周病学会学会誌，**37**, 84-96.

7）Yamane T, Kobayashi-Hattori K and Oishi Y (2011): Adiponectin promotes hyaluronan synthesis along with increases in hyaluronan synthase 2 transcripts through an AMP-activated protein kinase/peroxisome proliferator-activated receptor-α-dependent pathway in human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **415**, 235-238