

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：23102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500812

研究課題名（和文） 主食である米タンパク質摂取による 2 型糖尿病および腎機能への効果の検証

研究課題名（英文） Effects of rice protein on type 2 diabetes and the renal functions in diabetic model rats

研究代表者

渡邊 令子（WATANABE REIKO）

新潟県立大学・人間生活学部・教授

研究者番号：70141348

研究成果の概要（和文）：日本人の 2 型糖尿病のモデルとされる非肥満 2 型糖尿病自然発症 Goto-Kakizaki ラットにカゼインおよび米タンパク質（胚乳部）を長期摂取させて、タンパク質給源の相違が糖尿病および糖尿病性腎症に与える影響を検討した。その結果、米タンパク質摂取は空腹時血糖値や血漿インスリン濃度、血圧等では明確な効果はみ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に対して抑制効果がみられ、腎機能保持効果を有することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We examined the effects of the rice protein prepared from well-milled rice on diabetes and diabetic nephropathy in male non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats, by comparing the rice protein to casein as the different protein source. GK rat is a kind of model animals of Japanese type 2 diabetes mellitus. In the results, the rice protein had no effects on the levels of fasting blood glucose and plasma insulin, and systolic blood pressures. However, both urinary albumin excretion and renal glomerular damages in GK rats fed the rice protein were significantly suppressed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：米タンパク質、2 型糖尿病モデル GK ラット、糖尿病性腎症、尿中アルブミン、腎糸球体障害度

## 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病である 2 型糖尿病患者の爆発的増加は、わが国だけでなく、先進国、発展途上国を問わず、世界的規模で深刻な問題となっている。ちなみに、平成 19 年国民健康・栄養調査結果より、わが国の糖尿病患者は 890 万人、糖尿病の可能性を否定できない予備軍は 1320 万人、合計 2210 万人と推定され、国民の約 17% に相当することになる。糖尿病

のさまざまな合併症の中でも、とくに糖尿病性腎症は重篤な合併症で、新規透析導入患者の原因疾患の第 1 位を占めている。このような現状を受けて、生活習慣病の一次予防における食生活の重要性が強く指摘され、さまざまな食品の機能性解明が進んでいる。しかし、米は日本人の食生活の原点であり、わが国では自給可能な唯一の食料であるにもかかわらず、その栄養生理機能に関して未だ十分な

評価はなされていない。

精白米（米胚乳可食部）の組成は、炭水化物が約 77%、タンパク質が約 6%、脂質が約 1% であるため、米はエネルギー供給源としてしか認識されていないのが現状である。しかし、平成 19 年国民健康・栄養調査結果における 20 歳代の食品群別摂取量からタンパク質摂取量の割合を計算してみると、肉類から 23.9%、魚介類から 19.3%、次いで米・加工品由来が 12.3% で、米は植物性食品では第一のタンパク質供給源となっている。植物性タンパク質の代表とされている大豆等の豆類由来のタンパク質摂取量の割合は 6.1% にすぎず、米は重要なタンパク質供給源でもある。この米タンパク質（RP）の栄養生理学的な意義に関しては、脂質代謝改善作用などの極めて限られた研究報告しかみられない。そこで、前研究課題（課題番号：19500706）の成果を進展させて、米タンパク質（胚乳部）の長期摂取が、2 型糖尿病の進行抑制および腎機能保持にどのように有効であるかどうかを検討する必要性が生じた。

## 2. 研究の目的

日本人やアジア人種の 2 型糖尿病患者のよいモデルとされている非肥満 2 型糖尿病自然発症モデルラットを用いて、高精製度のアルカリ処理 RP の長期摂取により、空腹時血糖値、血圧、糖尿病関連血中パラメータ等の指標が改善されるかどうか、さらに糖尿病の進行によって引き起こされる腎機能障害に対して予防および緩和効果があるかどうかについて解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物および飼養試験

供試動物として 7 週齢雄 Goto-Kakizaki (GK) ラット（日本エスエルシー株）24 匹を用いた。市販固形飼料（ラボ MR ストック、ノーサン）で予備飼育後、平均体重、空腹時血糖値、収縮期血圧が均一になるように、カゼイン（C）群（コントロール）、RP 群、および大豆タンパク質（SP）群（比較対照）の 3 群に分けて、ステンレス製個別ケージにて 10 ないし 15 週間飼育した。飼料摂取はペアフィーディングとし、飼料摂取量は毎日、体重は週 3 回測定した。収縮期血圧は、試験開始時および終了時とその期間内で計 4 回、ラット用無加温型非観血式血圧計（MK-2000ST、室町機械株）で測定した。

試験終了時には、ペントバルビタール麻酔下で開腹し、腹部下大静脈から採血、頸部動脈切断により放血屠殺し、腎臓、肝臓、貯蔵脂肪（腎周囲、副辜丸周囲）等を採取した。腎臓は、左腎を組織観察用と RNA 分析用に分けて、速やかに組織固定液や RNAlater に浸漬して保存した。右腎およびその他の臓器は

重量測定後、直ちに液体窒素で凍結処理して、分析に供するまで -80℃ で保存した。

### (2) 実験飼料および米タンパク質

実験飼料は、AIN-93G に準じて各々のタンパク質レベルを CP20% とした標準飼料、および糖尿病の病態を憎悪させることが知られているスクロースのみ AIN-93G の 3 倍量に設定した高スクロース飼料（30% スクロース、スターチ量で調整）を用いた。

米タンパク質の調製は亀田製菓株の協力を得て行われた。精白米（コシヒカリ）を原料として米粉にしてから、アルカリ水溶液で抽出して不要物であるデンプン粒を除去した後、遊離したタンパク質を中和・沈殿させたものである。その成分組成（g/100g）は、タンパク質 87.5、炭水化物 2.5、脂質 5.4、灰分 0.7、食物繊維 0.5 であった。また、比較に用いた大豆タンパク質は不二たん白質研究振興財団より提供されたもので、その成分組成は、タンパク質 83.8、炭水化物 1.9、脂質 3.8、灰分 4.4、食物繊維 1.5 であった（日本食品分析センター）。

### (3) 血中パラメータの測定

#### ① 空腹時血糖値

試験開始時から毎週 1 回、測定前日 20 時から 18 時間絶食させて、ジェントレット（株三和化学研究所）針を用いて尾静脈をせん刺し、メディセーフミニ（GR-102、テルモ株）で測定した。

#### ② 血漿インスリン、アディポネクチン濃度

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（森永生科学研究所株）、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（大塚製薬株）を用いて測定した。

#### ③ 一般生化学検査値

血漿総タンパク質濃度はじめ、23 項目の一般生化学検査値の測定は、株江東微生物研究所に依頼した。

#### ④ ヘマトクリット値

マイクロヘマトクリット法で測定した。血液を吸い上げたガラス毛細管をインバータ・ヘマトクリット遠心機（久保田製作所株）で 12,000 rpm で 5 分の遠心後、ヘマトクリットリーダーを用いて測定した。

#### (4) 尿中アルブミン濃度等の測定

0、3、8、12、15 週目に、代謝ケージに移して 24 時間尿を連続 3 日間採取し、尿量を測定して遠心分離処理後、分析に供するまで -40℃ で保存した。尿中アルブミン濃度の測定は、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）を用いて行った。また、尿細管障害度の指標として N-アセチルグルコサミニダーゼ活性等の測定も試みた。

#### (5) 腎糸球体障害度の評価

採取後、4% パラホルムアルデヒド溶液に

浸漬し、速やかに固定処理した腎組織片はPAS染色後、個体ごとに皮質部と皮髄境界部で各10個ずつの糸球体を解析に用いた。画像解析は、メサングウム細胞の増殖程度について、Image pro (日本ローパー株)を用いて評価した。なお、本解析は新潟大学大学院・歯学総合研究科・斎藤亮彦特任教授に協力依頼した。

#### (6)統計処理

測定値は平均値±SEMで示した。2群間の有意差はt検定、3群間での有意差検定はFisherの最小有意差法を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1)主な結果と考察

##### ① 体重および臓器重量等に対する効果

終体重や総飼料摂取量で有意差はみられなかったが、肝臓重量はRP群がC群に比べ有意に低値であった(標準飼料では $p < 0.01$ 、高スクロース飼料では $p < 0.05$ )。タンパク質栄養状態の指標である血中アルブミン濃度が、どちらの飼料でもRP群が有意に高いこと( $p < 0.05$ )やGKラットが22~23週齢であることから、RPは肝臓への脂肪蓄積を抑制していることが示唆された。また、腎臓重量は、標準飼料では有意差がみられなかったが、高スクロース条件下ではC群はRP群に比べ有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。腎疾患の初期病変として腎臓肥大が知られているので、RP摂取は糖尿病性腎症の進行を抑制している可能性がうかがえた。

##### ② 空腹時血糖値の経時変化と血漿インスリンおよびアディポネクチン濃度

空腹時血糖値については、標準飼料を用いた15週間の飼育試験では試験開始3週目までは、各群ともに120 mg/dL以下であったが、4週目以降は図1に示した高スクロース飼料を用いた飼育試験の場合と同様に、約120~140 mg/dLの範囲内で推移し、各群間の明確な有意差はみられなかった。血漿インスリン

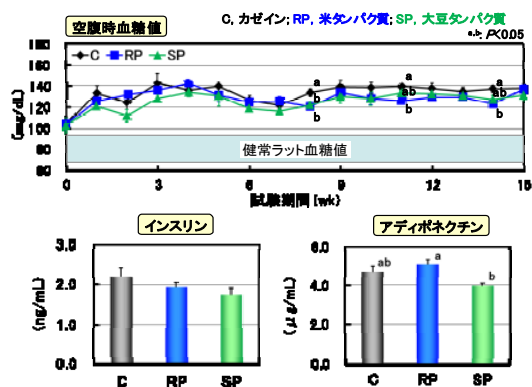


図1 米タンパク質摂取が空腹時血糖値、血漿インスリン、およびアディポネクチン濃度に対する影響 (高スクロース飼料)

濃度は、標準飼料の場合はいずれの群も1.4~1.5 ng/mL、高スクロース飼料の場合は少し高め1.8~2.2 ng/mLで、各群で有意差はみられなかった。また、インスリン感受性を増強することが報告されている血漿アディポネクチン濃度は、標準飼料で試験期間が10週間の場合はRP群がC群に比べて有意に高値を示した( $p < 0.05$ )が、15週間では、標準飼料と高スクロース飼料のいずれでも有意差はみられなかったものの、RP群が高値になる傾向が確認された(図1)。

##### ③ 糖尿病及び腎機能関連血中パラメータに与える影響

図2に示したように、アルカリホスファターゼ(ALP)活性は、C群に比べRP群は有意に低値を示した( $p < 0.05$ )。ALPは炎症反応の代表的指標であるC反応性タンパク質と正相関があることや、香港在住の中国人を対象とした疫学調査で糖尿病患者では高値になり、HOMA-IRよりも強い相関があることが報告されている。われわれのGKラットを用いた全実験において、ALP活性は常にRP群が有意に低値を示した。また、RPには健常ラットにおいて脂質代謝改善効果があることを既に報告しているが、2型糖尿病モデルラットで、長期に高スクロース飼料を給与した場合でも総コレステロール濃度の有意な低下を確認できた( $p < 0.05$ )。さらに、貧血の指標であるヘマトクリット値は、RP群がC群に比べて有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。このRPの効果は、GKラットを用いた今までの全実験において確認している。腎臓の重要な機能の一つとしてエリスロポエチン産生があるが、糖尿病性腎症は他の腎疾患に比べて早期に貧血を発症することが知られている。引き続き、RP摂取による腎性貧血予防・抑制効果を検証するために血中エリスロポエチン濃度を測定して、確認中である。

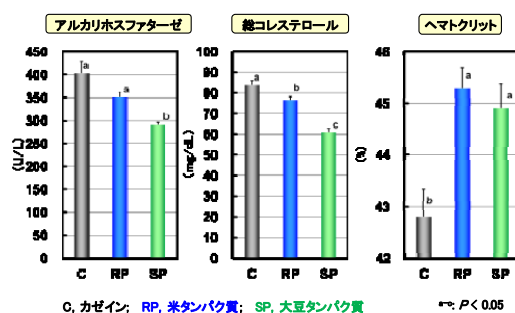


図2 米タンパク質摂取が血中アルカリホスファターゼ活性、総コレステロール濃度およびヘマトクリット値に及ぼす影響 (高スクロース飼料を15週間摂取した場合)

##### ④ 尿量および尿中アルブミン排泄に対する効果

尿量の増加は糖尿病の特徴とされるが、い

ずれの実験でも 10 mL/日程度で同週齢の健常 Wistar 雄ラットと比較しても多量とはいえなかった。しかし、尿中アルブミン排泄量は、標準飼料の場合は 15 週終了時に RP 群が C 群より約 40% 有意に低値を示し ( $p < 0.05$ )、さらにスクロース負荷条件下でも 8、12 週目で有意に低値を示し ( $p < 0.05$ )、RP の長期摂取による尿中アルブミン排泄抑制効果が明らかになった (図 3)。腎糸球体細胞や尿管に障害が起こると、ろ過機能や再吸収機能が低下して、血中アルブミンは尿中に漏出する。このことから尿中アルブミン排泄量は、腎糸球体疾患の初期病変、とりわけ糖尿病性腎症の早期発見のマーカーとされている。したがって、RP の尿中アルブミン排泄抑制効果は、糖尿病性腎症の発症予防、進行緩和作用として意義が大きいと考える。

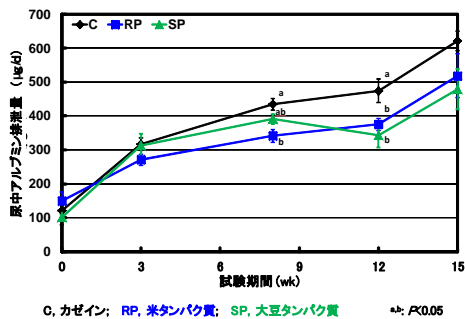


図 3 米タンパク質の長期摂取が尿中アルブミン排泄量に与える効果 (高スクロース飼料)

#### ⑤ 腎糸球体組織障害に対する効果

一般的に糖尿病性腎症における組織変化は、最初に腎臓肥大が起こり、その後に糸球体基底膜の肥厚やメサンギウム領域の細胞増殖などが引き起こされ、糸球体硬化に至り、そのろ過機能が失われる。RP の長期摂取は、10 週間、15 週間のいずれでも図 4 に示したように、皮質および皮髄境界部の糸球体障害を有意に抑制していることが明らかになった ( $p < 0.05$ )。このように組織画像解析からも、RP 摂取は糖尿病性腎症進行抑制効果があることが確認できた。

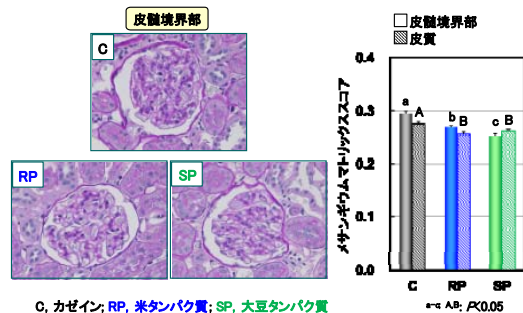


図 4 腎臓の皮髄境界部糸球体組織像とメサンギウムスコア (高スクロース飼料を 15 週間摂取した場合)

#### ⑥ 腎臓における MCP-1 産生に対する効果

糖尿病性腎症の発症および進行機序は未解明な点が多いが、高血糖が惹起する代謝異常を発端として、さまざまなサイトカインの発現増加により機能異常が起こると考えられている。サイトカインの中でも、MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) はインスリン抵抗性を引き起こす 2 型糖尿病促進因子として注目されている。そこで、RP の作用メカニズム解明の手始めに MCP-1 の mRNA 発現を調べた。C 群では経時的 (0、3、6 週) に MCP-1 の有意な増加がみられたのに対して RP 群ではその mRNA 発現を抑制していることが明らかになった ( $p < 0.05$ , データ表示せず)。この MCP-1 の発現変化は血漿インスリンや CRP 濃度と整合性がみられた。したがって、RP は MCP-1 の産生を制御して、インスリン抵抗性や 2 型糖尿病の発症を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果から、GK ラットを用いた検討では、RP 摂取は糖代謝関連の指標や血圧への有意な改善効果はみられなかったものの、腎臓においては、アルブミン排泄量および腎糸球体障害に対する明確な抑制効果が確認され、2 型糖尿病とそれに起因する糖尿病性腎症への RP の有効性が明らかになった。比較に用いた SP も RP とほぼ同様な有効性を示したが、低分子の機能性成分 (イソフラボン等) が完全に除去されている素材ではないので、このような効果が植物性タンパク質に共通性があるものかどうかについて、今後の検討が必要である。

#### (2) 研究成果の意義

糖尿病患者の約 95% を占めるといわれる 2 型糖尿病は、国内外を問わず、今後も患者数の増加が懸念されている。2 型糖尿病は一般に発症時期が不明瞭で、かつ高血圧を合併していることが多い。患者の病識もよく、合併症を併発して初めて治療を受けるケースも多い。さらに、糖尿病性腎症はわが国の維持透析導入の原疾患の第 1 位で、医療費高騰の原因にもなっている。また、透析導入後の糖尿病患者の生命予後は不良であることも報告されている。さらに、病態が進行した顕性腎症期では食事療法としてタンパク質制限がなされているが、現在は「量」のみで「質」の違いについては議論されていない。それゆえ、主食として (精白) 米を中心とした食生活習慣により米由来のタンパク質を摂取することが、2 型糖尿病や糖尿病性腎症の予防や病態の進行抑制に有効である可能性を示せた本研究成果の意義は大きいといえよう。さらに、米の消費拡大につながるゆえ、本研究成果の社会的意義は大きいと考える。

### (3) 今後の研究方向

糖尿病および糖尿病性腎症に対する米のタンパク質の有効性を世界に向けて発信していくためには、肥満型のインスリン抵抗性を主体とする2型糖尿病モデルを用いて検討を行う必要がある。これは同時に、作用メカニズム解明にもつながる。そこで、最近 Zucker diabetic fatty ラットを用いた試験を実施中である。さらに、長年にわたる食経験のある精白米のタンパク質なので、臨床試験の可能性について、検討していきたい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① M. Kubota, R. Watanabe, M. Kadowaki 他4名(7名中5番目), Improvement of the in vivo digestibility of rice protein by alkali extraction is due to structural changes in prolamin/protein body-1 particle, *Biosci Biotechnol Biochem*, 74, 614-619, 2010, 査読有.
- ② T. Kumagai, R. Watanabe, M. Kadowaki 他3名(6名中2番目), Superiority of alkali-extracted rice protein in bioavailability to starch degraded rice protein comes from the digestion of prolamin in growing rats, *J Nutr Sci Vitaminol*, 55, 170-177, 2009, 査読有.

[学会発表] (計11件)

- ① 伊藤里紗、渡邊令子、門脇基二、他、2型糖尿病モデルGKラットの腎機能に対する米タンパク質および大豆タンパク質摂取の効果、日本アミノ酸学会、名古屋大学シンポジオン、2011年11月4-5日.
- ② R. Watanabe, M. Kubota, M. Kadowaki et al., Effect of alkali-extracted rice protein on the renal function in type 2 diabetic rats, 12<sup>th</sup> International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins. Beijing, China, August, 1-5, 2011.
- ③ 久保田真敏、渡邊令子、門脇基二、他、米タンパク質の長期摂取が糖尿病モデルGKラットの腎機能に与える影響、日本栄養・食糧学会、お茶の水女子大学、2011年5月14日.
- ④ R. Watanabe, M. Kubota, M. Kadowaki et al., Effect of rice protein on the progression of diabetic nephropathy, 2011 International Symposium Dietary Protein for Human Health, Auckland, New Zealand, March, 27-30, 2011.
- ⑤ M. Kadowaki, M. Kubota, R. Watanabe, et.

*al*, Influence of alkali-extracted rice protein on serum albumin and cholesterol levels in elderly Japanese, 2011 International Symposium Dietary Protein for Human Health, Auckland, New Zealand, March, 28, 2011.

- ⑥ 久保田真敏、渡邊令子、門脇基二、他、米タンパク質摂取がスクロース負荷2型糖尿病モデルGKラットに及ぼす影響、日本栄養・食糧学会、アスティ徳島、2010年5月22日.
- ⑦ R. Watanabe, M. Kubota, M. Kadowaki et al., Effects of alkali-extracted rice protein on plasma levels of glucose, insulin and adiponectin in non-obese type-2 diabetic Goto-Kakizaki rats, 19<sup>th</sup> International Congress of Nutrition, Bangkok, Thailand, October, 7, 2009.
- ⑧ 久保田真敏、渡邊令子、門脇基二、他、米タンパク質摂取が2型糖尿病モデルGKラットの糖代謝関連マーカーに及ぼす影響、日本栄養・食糧学会、長崎ブリックホール、2009年5月21日.

他

[図書] (計1件)

- ① M. Kadowaki, R. Watanabe, 他3名(5名中2番目), 三共出版, RICE STUDIES, PRESENT AND FUTURE, Digestibility, bioavailability, and beneficial effects of alkali-extracted protein, 123-135 (総頁数 336), 2012.

[その他]

<http://www.unii.ac.jp/>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

渡邊 令子 (WATANABE REIKO)  
新潟県立大学・人間生活学部・教授  
研究者番号：70141348

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

門脇 基二 (KADOWAKI MOTONI)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号：90126029

#### (4) 協力研究者

久保田 真敏 (KUBOTA MASATOSHI)  
新潟大学・超域学術院・助教  
研究者番号：00595879