

摂取タンパク質量が成長期ラットの 腎臓の機能に及ぼす影響

奥村ミサヲ・宮崎 幸恵

Effect of Dietary Protein Levels on the Function of the Kidney in Growing Rats

Misao Okumura and Sachie Miyazaki

緒 言

近年、日本人の食生活は質的にも向上し、欧米化の傾向をたどりつつある。しかし、タンパク質、脂肪の摂取量が増しその結果として日本人の疾病構造も感染症から代謝性疾患へと変化している事実はその予防、治療という面からもあらたな問題を生じてきている。従来、日本人のタンパク質摂取量は欧米人に比較して著しく少なく、それが体位の低下を招いたといっても過言ではない。タンパク質摂取量が質・量ともに欧米人に近づきつつあることは喜ばしいことではあるが、多量のタンパク質摂取は腎臓に負担をかけ、腎障害を招くと言われていることから、体の生理作用に適した量のタンパク質摂取が必要になる。しかし、実験的腎障害と腎機能測定成績は数多くみられるが、^{1) 2)}タンパク質摂取量と腎機能に関する報告はみられない。

そこで本研究では、栄養教育の一助とする目的で、幼若ラットを用いてタンパク質量を変化させた3種の飼料を投与した場合、その発育状態、尿量の変化、尿中タンパク質および尿素窒素排泄量、血清中タンパク質および尿素窒素量を測定し、タンパク質摂取量が腎臓の機能に及ぼす影響について比較検討した。

実 験 材 料

1) 供試動物

体重 50 g 前後 (4 週令) の Wistar 系純系雄ラット15匹を用いた。

2) 飼 料

表1に示すように Harper³⁾の精製飼料に準じ飼料を調製した。すなわち、22%カゼインを標準として過不足のカゼインをコーンスターチと置き換えて低タンパク質飼料 (8%)、標準タンパク質飼料 (22%) および高タンパク質飼料 (40%) とした。

表 1. 飼料組成

成分% \ 群	低タンパク質飼料	標準タンパク質飼料	高タンパク質飼料
カゼイン	8.0	22.0	40.0
ミネラル混合物 ^a	5.0	5.0	5.0
ビタミン混合物 ^b	0.75	0.75	0.75
コーンオイル	4.5	4.5	4.5
コーンスターチ	81.597	67.597	49.597
塩化コリン	0.15	0.15	0.15
マンガン	0.003	0.003	0.003
計	100.0	100.0	100.0

a: (ミネラル混合物 100g 中g)

CaCO₃ 29.25, CaHPO₄·2H₂O 0.43, KH₂PO₄ 34.31,
NaCl 25.06, MgSO₄ 9.98, Fe(C₆H₅O₇)·6H₂O 0.623,
CuSO₄·5H₂O 0.156, MnSO₄·H₂O 0.121, ZnCl₂ 0.02,
KI 0.0005, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.0025

b: (飼料 100g 中含量)

ビタミン B₁ 0.5 mg, ビタミン B₂ 0.5 mg, ニコチン酸 2.5 mg,
パントテン酸カルシウム 2.0 mg, ビタミン B₆ 0.25 mg,
ビタミン K 0.05 mg, ビオチン 0.01 mg, 葉酸 0.02 mg,
イノシット 10.0 mg, ビタミン B₁₂ 0.002 mg, ビタミン C 5.0 mg,
ビタミン A 400 I.U., ビタミン D 200 I.U., ビタミン E 10 mg

3) 試薬

Ponceau S, B. C. G., ウレアーゼおよび牛血清アルブミンはシグマ社製を, 尿素はメルク社製を, エチレンジアミントリ酢酸ナトリウム (EDTA-2Na) は半井化学製のものを使用した。また, クエン酸ナトリウム, アルカリ性次亜塩素酸ナトリウムその他の一般試薬は片山化学工業製のものをを用いた。なお試薬はすべて特級品を使用し, パームチットはビタミン学会より供与をうけた。

実験方法

1) 動物の飼育および試料の採取

動物を群間で体重ができるだけ等しくなるように5匹ずつ3群に分けて飼育した。すなわち, 動物室は温度を 22±2°C, 湿度50%前後に, 照明を14時間明, 10時間暗 (6時点灯, 20時消灯) に調節し, 尿と糞を別々に採取できる Immortal 型代謝ケージを用いて4週間単飼した。体重は毎日または隔日に測定し, 飼料の投与量は体重の15%とし, 水は純水を自由に摂取

させた。また体重測定時に、飼料の残量，尿量を測定し，尿は一週間ずつプールして凍結保存し，以下の実験に供した。飼育4週間後にエーテルで麻酔し，後部腹大動脈から注射器で血液を採取，30分放置後3000回転にて15分間遠心して得られた上清を血清試料とした。

2) 尿中タンパク質定量法

Pesce らの色素比色法⁴⁾により行った。すなわち，表2に示すごとく，標準液および尿を各0.1 ml ずつとり，これに反応液1.0 ml ずつ加えて振盪，混和の後遠心した。次いで，試験管を濾紙上に逆さにたて水分を除去，さらに管壁の水滴を毛細管でとる。残存した沈殿に，0.8 g/dl NaOH を加えて溶解し，波長560 nm における吸光度を測定した。牛血清アルブミン標準液から得た検量線をもとに尿中タンパク質量を算出した。なお，吸光度測定には島津分光々度計 QV-50 を使用した。

表 2. 尿中タンパク質定量法

試 薬 (ml)	標準液 (mg/dl)				試 料
	0	50	100	200	
	0.1				0.1
TCA・PS 試液 ^a	1.0				1.0
振盪，遠心 (3500 r. p. m., 15分) 沈 殿 物					
0.8g/dl NaOH	2.5				2.5
比 色 (O. D. 560)					

a : 色素 Ponceau S 1.0 g を 30 g/dl TCA 溶液で溶解して
100 ml に調製，10倍希釈して使用。

3) 尿中および血清中尿素窒素の定量

Fawcett らの Urease Indophenol 法⁵⁾により行った。血清はそのまま，尿は前処理として，各週ごとに採取したものをそれぞれよく混合しその0.2 ml に水3.8 ml，パームチット200 mg を加えて振盪，10分間静置の後3000回転，15分間遠心して得られた上清を試料溶液とした。表3に示すように標準液，血清および尿の試料溶液を各々0.02 ml ずつとり，これにウレアーゼ試薬を加えて混和，37°C，15分加温の後フェノール試薬，アルカリ性試薬を加えて再び37°C，15分加温の後，水を加えて波長540 nm における吸光度を測定した。尿素標準液から得た検量線をもとに尿中および血清中尿素窒素量を算出した。

4) 血清中タンパク質定量

総タンパク質は Biuret 法⁶⁾により測定した。すなわち，血清0.04 ml に Biuret 試薬3 ml を加えて室温にて30分反応させた後，波長540 nm における吸光度を測定した。また，血清アルブミンの測定は Doumas らの B. C. G. 法⁷⁾により行った。すなわち，血清0.02 ml

に B. C. G. 試薬 4.0 ml を加え室温にて 30 分反応させた後、波長 628 nm にて吸光度を測定した。なお標準には牛血清アルブミンを使用した。

表 3. 尿中尿素窒素の定量法

試薬 (ml)	標準液 (mg/dl)			試料
	0	25	50	
	0.02			0.02
ウレアーゼ試薬 a	1.0			1.0
37°C, 15分				
フェノール試薬 b	1.0			1.0
アルカリ試薬 c	1.0			1.0
37°C, 15分				
水	4.0			4.0
比色 (O.D. 540)				

- a : EDTA・2Na 40 mg を 80 ml の水で溶解, 1N-NaOH で pH を 7.0 に調整し, さらに 6 mg のウレアーゼを加えて溶解, 水で 100 ml に調製。
- b : フェノール 1g とニトロプルシット Na 5 mg を水で溶解して 100 ml に調製。
- c : NaOH 1g を 60 ml の水に溶解, さらに 0.25 ml の次亜塩素酸 Na (有効塩素 10%) を加えて水で 100 ml に調製。

実験結果

1) 体重の変化

飼育 4 週間における各群の体重変化と平均摂食量を表 4 に示した。低タンパク質飼料投与群の成長はわるく、飼育 4 週間目には標準タンパク質飼料投与群の約半分の体重であった。全飼育期間を通し、低タンパク質飼料投与群と標準タンパク質飼料投与群、高タンパク質飼料投与群の 3 群間に体重増加量において有意な差が認められた。また摂食量においては低タンパク質飼料投与群と他の 2 群間に有意な差が認められたが ($p < 0.01$), 標準タンパク質飼料投与群と高タンパク質飼料投与群の間に有意な差は認められなかった。

表 4. 体重変化と摂食量

実験群	体重 (g)		増加量(g)	摂食量(g/日)
	初体重	終体重		
低タンパク質飼料	53.5±0.6	120.0±3.5 ^A	61.5±0.3 ^A	9.75±0.22 ^A
標準タンパク質飼料	53.5±0.9	221.7±3.7 ^B	169.0±3.4 ^B	14.83±0.86 ^B
高タンパク質飼料	53.8±0.4	190.0±7.3 ^C	136.3±7.2 ^C	14.97±1.58 ^B

測定値は Mean±SE (N=5), 異符号間に有意差あり ($p < 0.01$)

2) 尿量

表5に体重 100g あたりの尿量を示した。2週目まで群間に有意な差は認められなかったが、3週目より3群間に有意な差が認められ ($p < 0.01$)、4週目では3群間の差は大きく開き高タンパク質飼料投与群は低タンパク質飼料投与群の6倍、標準タンパク質飼料投与群の4倍もの数値を示した。

表 5. 尿量の変化

実験群	尿 量 (ml/日/100g 体重)			
	1	2	3	4
低タンパク質飼料	4.57±1.05	5.32±1.21	2.42±0.60 ^A	2.06±0.18 ^A
標準タンパク質飼料	5.23±1.38	6.01±0.77	5.46±0.94 ^B	4.49±0.75 ^B
高タンパク質飼料	7.20±2.45	9.87±0.93	10.57±0.84 ^C	12.16±1.04 ^C

測定値は Mean±SE (N=5), 異符号間に有意差あり ($p < 0.01$)

3) 肝臓・腎臓の重量

表6に肝臓・腎臓の重量ならびに比体重を示した。低タンパク質飼料投与群は他の2群との間に肝重量, その比体重において有意な差が認められたが ($p < 0.05$), 標準タンパク質飼料投与群と高タンパク質飼料投与群との間に有意な差は認められなかった。また, 腎重量においては3群間に有意な差が認められ ($p < 0.01$), 比体重では低タンパク質飼料投与群と標準タンパク質飼料投与群の間に有意な差が認められなかったが, 他の2群と高タンパク質飼料投与群との間に有意な差が認められ ($p < 0.05$), 高タンパク質飼料投与群に腎臓肥大の傾向がみられた。

表 6. 肝臓, 腎臓の重量

実験群	肝 臓		腎 臓	
	重量 (g)	比 体 重	重量 (g)	比 体 重
低タンパク質飼料	3.63±0.61 ^a	3.31±0.24 ^a	0.85±0.08 ^A	0.81±0.04 ^a
標準タンパク質飼料	8.72±1.05 ^b	4.19±0.30 ^b	1.70±0.14 ^B	0.83±0.02 ^a
高タンパク質飼料	8.85±0.68 ^b	4.64±0.19 ^b	1.93±0.15 ^C	1.01±0.01 ^b

測定値は Mean±SE (N=5), 異符号間に有意差あり (大文字 $p < 0.01$, 小文字 $p < 0.05$)

4) 尿中タンパク質, 尿中尿素窒素量

表7に示すごとく, 尿中タンパク質量は2週目まで3群間に有意な差が認められなかったが, 3週目より3群間に有意な差が生じ ($p < 0.05$), 4週目にその差が著しくなった (有意差 $p < 0.01$)。尿中尿素窒素量もタンパク質量と平行して増加の傾向を示した。すなわち, 2週目より3群間に有意な差が生じ ($p < 0.01$), 3週目, 4週目にいたっては高タンパク質飼料投与群は標準タンパク質飼料投与群の倍量の数値を示し, 摂取タンパク質量が多くなると尿

中のタンパク質，尿素窒素量も増すことがわかった。

表 7. 尿中タンパク質量および尿中尿素窒素量の変化

実験群	週	尿 中 タ ン パ ク 質 量 (mg/日)			
		1	2	3	4
低タンパク質飼料		1.20±0.29	1.28±0.19	1.29±0.26 ^a	1.04±0.17 ^A
標準タンパク質飼料		1.01±0.30	1.57±0.21	4.60±0.56 ^b	11.63±2.10 ^B
高タンパク質飼料		1.39±0.28	2.37±0.42	8.51±1.91 ^c	24.01±0.81 ^C
実験群	週	尿 中 尿 素 窒 素 量 (mg/日)			
		1	2	3	4
低タンパク質飼料		10.91± 2.12	14.37± 1.11 ^A	19.54± 2.92 ^A	22.70± 2.70 ^A
標準タンパク質飼料		54.51±12.39	95.35± 9.77 ^B	112.04±13.18 ^B	115.12±18.04 ^B
高タンパク質飼料		71.61±24.41	140.86±13.88 ^C	213.72±14.81 ^C	309.08±26.28 ^C

測定値は Mean±SE (N=5), 異符号間に有意差あり (大文字 $p<0.01$, 小文字 $p<0.05$)

5) 血清中タンパク質，尿素窒素量

表 8 に血清中総タンパク質，アルブミン量，アルブミン対グロブリン比 (A/G 比) ならびに血清中尿素窒素量を示した。表にみるごとく，総タンパク質，アルブミン量とも低タンパク質飼料投与群と他の 2 群との間に有意な差が認められた ($p<0.05$) が，標準タンパク質飼料

表 8. 血清中タンパク質および尿素窒素量の変化

実 験 群	血 清 中 タ ン パ ク 質			血清中尿素窒素 (mg/dl)
	総タンパク質 (g/dl)	アルブミン (g/dl)	A/G 比	
低タンパク質飼料	5.96±0.23 ^a	4.50±0.10 ^a	3.47±0.74	6.64±1.41 ^a
標準タンパク質飼料	7.34±0.36 ^b	5.55±0.27 ^b	3.21±0.37	12.22±1.12 ^b
高タンパク質飼料	7.31±0.28 ^b	5.35±0.15 ^b	3.04±0.43	14.85±1.08 ^b

測定値は Mean±SE (N=5), 異符号間に有意差あり ($p<0.05$)

投与群と高タンパク質飼料投与群との間に有意な差は認められなかった。A/G 比においては 3 群間に有意な差が認められなかったが低タンパク質飼料投与群，標準タンパク質飼料投与群，高タンパク質飼料投与群の順に高かった。また，血清中尿素窒素量もタンパク質量と同様の傾向を示した。

考 察

1. タンパク質投与量が発育におよぼす影響

発育期の動物にとってタンパク質摂取量の多少がその発育に大きく影響することは周知の事実⁸⁾であるが，発育には適量のタンパク質が必要であることが確証された。前報⁹⁾において，22%

タンパク質飼料投与群と30%タンパク質飼料投与群の間に有意な差は認められなかったが、本実験の場合40%までタンパク質量を上げると明らかに有意な差が認められ、40%タンパク質飼料投与群は標準の22%タンパク質飼料投与群より発育が劣ることがわかった。これらの事実より、標準量までは投与タンパク質量と発育は平行するが、投与タンパク質量が30%をこえると発育は停滞することがわかる。

2. タンパク質投与量と尿量

表4, 5より、高タンパク質飼料投与群は標準タンパク質飼料投与群に比べて、体重あたりの摂食量が多いにもかかわらず体重増加が劣る。このことは、摂食量が多いことがどの渴きを訴え、飲水量を増し尿量を増すことになると思われる。

3. 肝臓、腎臓の重量変化

肝臓においては3群間で有意な差が認められなかったが、腎臓においては3群間に有意な差が認められ、体重比でみると低タンパク質飼料投与群、高タンパク質飼料投与群は標準タンパク質飼料投与群に比して高いことがわかる。このことは、前述のごとく高タンパク質飼料投与群は尿量が多く腎臓に負担をかけることから腎肥大を招くものと思われる。

4. 尿中タンパク質および尿素窒素量の変化

両者とも週毎に増加しているが、低タンパク質飼料投与群は他の2群に比して著しく少ないことがわかる。このことは、低タンパク質投与では発育保持に殆んどどのタンパク質が使われ排泄量が標準より低いものと思われる。腎障害の指標とされる尿素窒素もタンパク質量と同様週毎に増大するが、低タンパク質飼料投与群、標準タンパク質飼料投与群において3~4週の値が同レベルなのに対し、高タンパク質飼料投与群ではさらに増大の傾向を示し、飼育日数を増し持続投与すればより顕著な結果を示すであろう。

5. 血清中タンパク質含量および尿素窒素量の変化

血清中タンパク質量は尿中タンパク質量程著しい差は認められなかった。しかし低タンパク質飼料投与群と他の2群との間に有意な差が認められたので、一定量まで血中のタンパク質量は変化するが、標準量を越えても一定量は血中に保持され余剰分は炭水化物や脂肪に転化したり、尿中に排泄するものと考えられる。また血清中尿素窒素量も同様の傾向を示し、標準タンパク質飼料投与群と高タンパク質飼料投与群の間に有意な差が認められなかったが、後者の方が前者より高い値を示し、継続投与により増大する傾向が示唆された。

要 約

幼若ラットを用いてタンパク質含量の異なる3種の飼料を投与し4週間飼育した。その体重変化、尿量、肝臓および腎臓の重量、尿中タンパク質量、尿中尿素窒素量、血清中タンパク質および尿素窒素量を測定した結果、以下のことが判明した。

1. 成長は、高タンパク質飼料投与群は標準タンパク質飼料投与群よりわるく、低タンパク質飼料投与群では著しく下まわった。

2. 尿量は、高タンパク質飼料投与群、標準タンパク質飼料投与群、低タンパク質飼料投与群の順に多く、とくに高タンパク質飼料投与群では体重に比して著しく多かった。

3. 肝臓の重量は3群間に有意な差が認められなかったが、腎臓では3群間で有意な差が認められ高タンパク質投与による腎肥大が伺えた。

4. 尿中タンパク質量と尿素窒素量は平行し、高タンパク質飼料投与群>標準タンパク質飼料投与群>低タンパク質飼料投与群の順に多かった。この傾向は尿量の変化と一致した。

5. 血清中タンパク質量および尿素窒素量は、低タンパク質飼料投与群と他の2群間で有意な差が認められたが、標準タンパク質飼料投与群と高タンパク質飼料投与群では有意な差が認められなかった。

参 考 文 献

- 1) 石本二見男：新内科学大系 37A p. 199 中山書店 (1975)
- 2) 石本二見男：総合臨床 24, 572 (1975)
- 3) Harper, A.E.: J. Nutr., 21, 405 (1958)
- 4) Pesce, M.A., and Strande, C.S.: Clin. Chem., 19, 1265 (1973)
- 5) Fawcett, J.K., and Scott, J.E.: J. Clin. Path., 13, 156, (1960)
- 6) Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and Maxima, M.M.: J. Biol. Chem., 177, 751 (1949)
- 7) Doumas, B. T., Watson, W. A., and Biggs, H. G. : Clin. Chim. Acta, 31, 87 (1971)
- 8) Mitchell, H. H.: Protein and Amino Acid Nutrition, (A. A. Albanese), p.18 (1959)
- 9) 宮崎幸恵, 奥村ミサヲ：東海学園女子短期大学紀要 18号, 1 (1983)