

大豆たん白質による過酸化LDL産生ならびにLDL分子サイズの増大抑制効果

Suppressive Effects of Soy Protein on the Production of Peroxidized LDL and Enlargement of LDL Molecular Size

金沢武道 (弘前大学医学部第二内科)

Takemichi KANAZAWA

The Second Department of Internal Medicine, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki 036

ABSTRACT

In human and rabbit, it was investigated whether the administration of soy protein was effective or not to reduction of plasma cholesterol, inhibition of LDL peroxidation and suppression of enlargement of LDL molecular size.

1. Peroxidized LDL and large molecular size LDL are injurious to arterial vessels.
2. Soy protein suppressed the peroxidation of LDL *in vitro* and *in vivo* experiments.
3. The increase of LDL-cholesterol after cholesterol feeding was suppressed more than that of LDL-apo B by soy protein. Namely, LDL-cholesterol/LDL-apo B ratio became lower by soy protein administration. The ratio after cholesterol feeding increased with enlargement of LDL molecules. Thus, it was speculated that enlargement of LDL molecules due to cholesterol feeding was inhibited by soy protein administration.
4. Soybean is very good food for protection of vessel injuries and prevention of cardiovascular disease. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 21-31, 1995.

家族性高脂血症の発症機序は低密度リポ蛋白質 (LDL) レセプターの発見¹⁾によって、また、動脈硬化における foam cell 形成の機序は modified LDL^{2,3)}の発見によって明解に説明された。特に modified LDL に関しては *in vitro* の実験によって説明されていたが、最近血漿^{4,5)}ならびに動脈壁⁶⁾からも証明されるに至り、動脈硬化の形成機序は一躍注目された。

われわれはこれまで過酸化LDLは血漿中に存在していること⁷⁾、血小板凝集能を亢進させること⁸⁾、マクロファージに大量に取り込まれること⁹⁾、家兎の静脈への注入によって動脈壁が傷害されること¹⁰⁾を報告した。

一方、LDLの分子サイズの動脈硬化における重要性については種々報告されている¹¹⁾。われわれも normal LDLは抗動脈硬化作用を有するが、分子サイズの大き

いLDLは動脈血管壁に対して傷害的に作用することを世界に先がけて報告した¹²⁾。分子サイズの大きいLDLは家兎をコレステロール添加飼料にて飼育することによって、経過的に産生されることも報告した⁵⁾。

以上のことから過酸化LDLの産生と分子サイズの大きいLDLの出現は動脈血管の傷害において重要なリスクであると考えた。

本研究は大豆たん白質がLDLの被過酸化性ならびに分子サイズの大きいLDLの産生にどのように作用するかを検討した。

1. 大豆たん白質と過酸化LDL

1) 過酸化LDLの定量とLDLの被過酸化性

われわれは血漿中に存在する過酸化LDLの脂質構成は動脈硬化性疾患と肺癌とでは明らかに差があることを報告した¹³⁾。従って、単にLDL中の過酸化脂質

(LPO) をLPO-Kitにて測定しても動脈硬化性疾患に特異的であるかどうかは不明であり、十分な検索ではない。本研究ではLDL中にhydroperoxidized cholesteryl linoleate (HPO-CL) の検出を持って過酸化LDLの指標とした (Fig. 1)。われわれは、HPO-CLは動脈硬化性疾患の血漿中に存在し、その化学構造を決定した¹⁴⁾。

また、症例によってコレステロール値に差があり、HPO-CLはCEから産生されるので、(HPO-CL/

CE)×100はLDLの被過酸化性を示す指標となると考えた。

2) 大豆たん白質の過酸化LDL産生に及ぼす効果

大豆たん白質はFig. 2に示すように作製した。フィルターを通した水道水はapo Bを破壊させないで軽度な過酸化LDLを産生させるには極めてよい。Normal LDLを水道水あるいはCu⁺⁺に透析するとFig. 1に示すようにspot X₁ (HPO-CL) が明瞭に検出されるが、透析水中に大豆たん白質 (1 mg/mL) を入れるとspot X₁

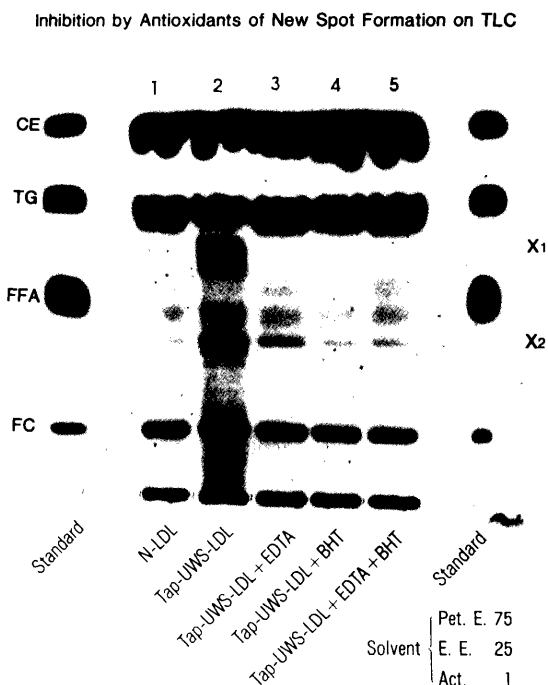


Fig. 1. Inhibition of antioxidants of new spot formation on TLC. TLC profiles of lipids in LDL: lane 1, normal LDL; lane 2, peroxidized LDL (dialyzed into filtered tap water for mild oxidation); lane 3, LDL dialyzed into filtered tap water with EDTA·2Na; lane 4, LDL dialyzed into filtered tap water with butylated hydroxytoluene (BHT), and lane 5, LDL dialyzed into filtered tap water with EDTA·2Na + BHT. X₁ and X₂ are recognized in peroxidized LDL and those from normal LDL are not stained. Lane 1 shows TLC profiles of lipids in LDL isolated from the plasma of healthy persons. Solvent : petroleum ether : ethyl ether : acetic acid (75 : 25 : 1).

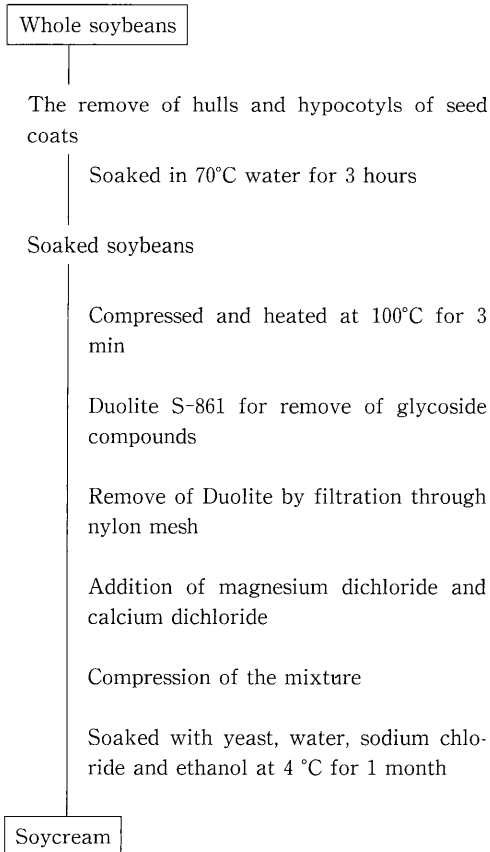


Fig. 2. Preparation of soy protein solution.

の産生は明らかに抑制された (Fig. 3, 4)。

次に、大豆たん白質 (0.1 mg/mL) 180 mLを毎日6か月間脳血管障害患者に投与し、その前と後の脂質について検討した。また、被過酸化性についても検討した。

健常者18名、脳血管障害患者26例ならびに大豆たん白質を投与した患者23例について、各対象より Havel¹⁵⁾の方法に従ってLDLを分離し、5 μ M CuCl₂による被過酸化性を検討した。同時にvery low density lipoprotein (VLDL), high density lipoprotein (HDL)

についても検討した。Table 1, 2, 3には薄層クロマトグラフィーによる各脂質の百分比を示した。Table 1に示すように健常者からのLDLのspot X₁ (HPO-CL)の産生は脳血管障害患者のLDLに比して少ないが、大豆たん白質を投与した脳血管障害患者のLDLは健常者のものと差はなかった。同時にVLDL (Table 2) ならびにHDL (Table 3) においても検討したが同じであった。

以上のように大豆たん白質は*in vitro*の研究においても、*in vivo*の研究においてもLDLの被過酸化性を明

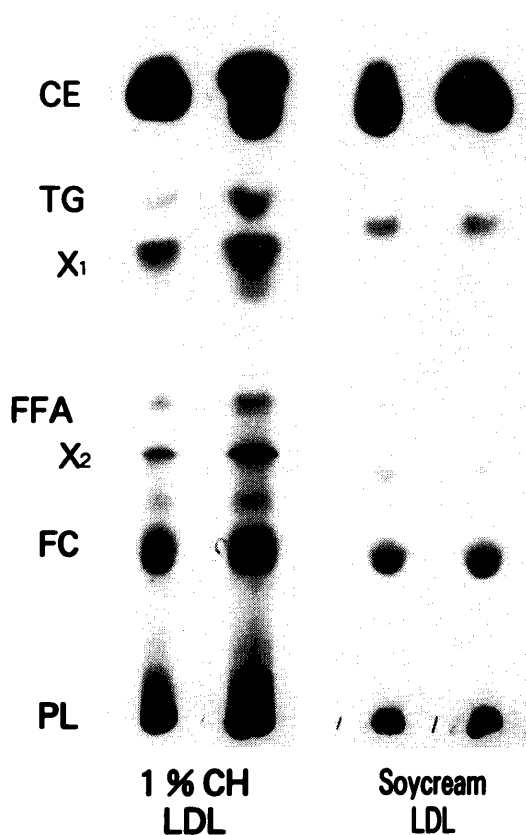


Fig. 3. The effect of soycream on the production of peroxidized lipids. The spot X₁ and X₂ were produced from 1 % cholesterol feeding low density lipoprotein (LDL) by Cu⁺⁺ oxidation. But the LDL with soycream in the dialyzate did not produce the spot X₁ and X₂ by Cu⁺⁺ oxidation.

らかに抑制した。

2. 大豆たん白質とLDLの分子サイズ

コレステロール添加飼料により家兎を飼育するとLDL分子のサイズは経週の的に増大することを報告し

た⁷⁾(Fig. 5)。そこで1%コレステロール添加家兎の10週目の血漿LDLを分離し、生食水にて48時間透析したものゝ正常家兎の血漿LDL濃度まで希釈した。この分子サイズの大きいLDLと正常家兎から分離したnor-

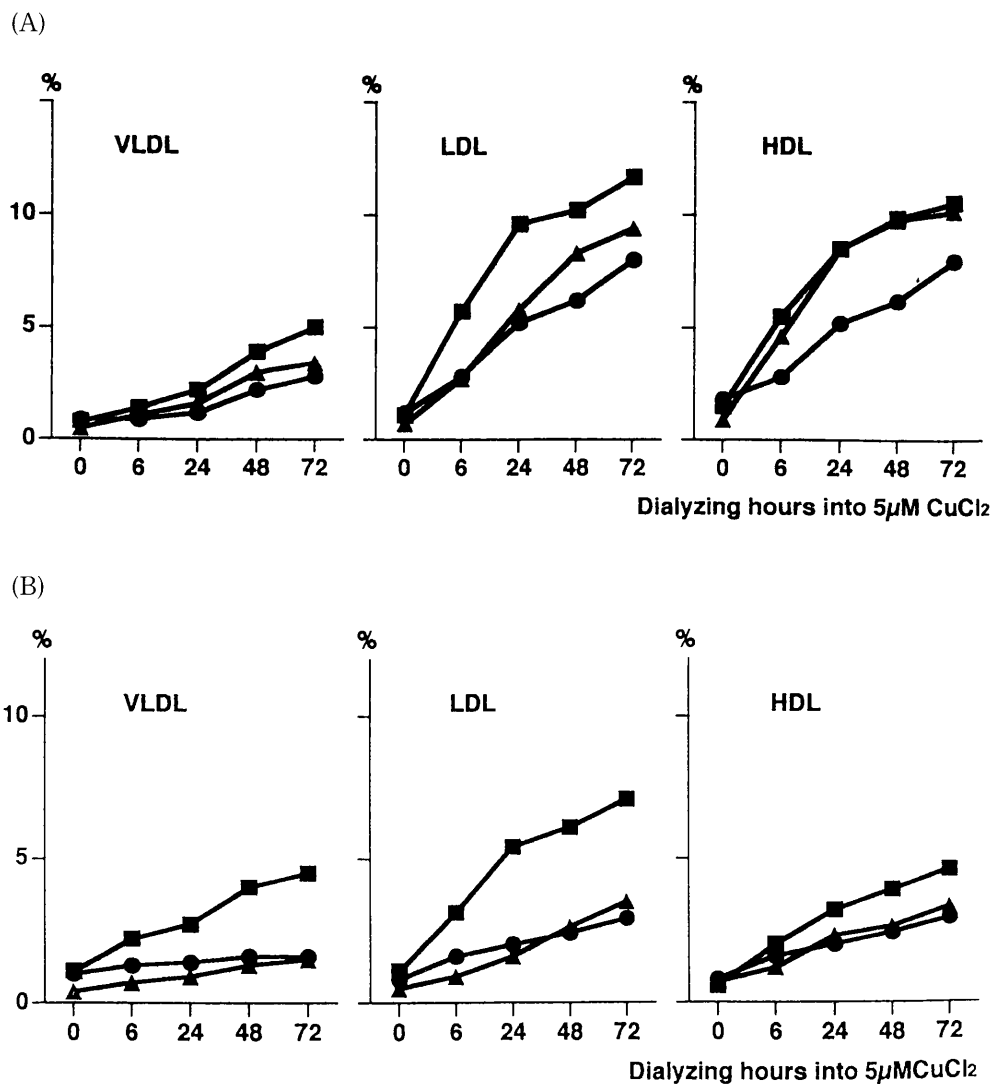


Fig. 4. Percent of spot X₁ (panel A) and spot X₂ (panel B) productions from VLDL, LDL and HDL due to dialysis into 5 μ M CuCl₂.

—■— CVD (n=24)
 —●— CVD+Soy (n=14) for 6 months
 —▲— Young healthy persons (n=11)

mal LDLとを各300 mLずつ4時間かけて家兎の耳静脈に注入した。Fig. 6に示すようにnormal LDLを注入しても両頸動脈にはほとんど変化を認めないが、分子サイズの大きいLDLを注入したものでは多数の赤血球、白血球ならびに血小板が動脈内皮の表面に付着し内皮細胞の傷害像が認められた。大動脈、脳動脈ならびに冠動脈においても同様の所見が観察された。

この血管傷害性を持つ分子サイズの大きいLDL産生に大豆たん白質がどのように影響するかを検討した。

Fig. 7には家兎に1%コレステロールを添加した飼料にて飼育した場合のLDL-apo BとLDL-コレステロール値との相関を示した。コレステロールを負荷するとregression coefficientは明らかに右下方に推移するが、大豆たん白質を加えた飼料にて飼育するとその

Table 1. Comparison of the influence of dialyzing into Cu⁺⁺ on percentages of lipid constituents in LDL among CVD patients (n=24), CVD patients+soy (n=14) and healthy persons (n=11)

	0 hour	6 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CE					
Patients	36.0±5.0	29.1±5.5 ^{##}	22.5±7.2 [#]	16.3±5.3	13.4±6.2
Patients+ Soy	35.8±5.1	34.5±7.0	31.8±6.4	20.8±4.5	16.8±3.8 [#]
Healthy	37.8±4.1	36.4±5.6	30.1±5.3	19.8±4.1	13.4±3.9
TG					
Patients	20.6±7.2	15.1±5.2	9.5±4.7	6.9±4.0	5.8±4.1
Patients+ Soy	19.8±6.8	18.7±6.8	16.8±4.8	10.9±4.2 [#]	9.8±4.0 ^{##}
Healthy	16.9±4.8	13.6±4.7	11.2±4.1	6.8±2.7	5.3±2.5
Spot X ₁					
Patients	1.1±1.2 [#]	5.7±2.3 ^{##}	9.6±2.7 ^{##}	10.2±2.5	11.7±1.7 [#]
Patients+ Soy	1.2±0.8 [#]	2.8±1.2	5.2±1.9	6.2±2.1	8.0±2.2
Healthy	0.7±0.5	2.7±1.0	5.8±1.6	8.3±1.6	9.4±2.1
FFA					
Patients	0.7±0.3	2.4±1.2	4.3±1.7 [#]	4.7±1.4	4.8±1.4
Patients+ Soy	1.0±0.4	1.6±0.6	2.2±1.0	2.7±1.1 [#]	3.0±1.8 [#]
Healthy	1.0±0.9	0.9±0.6	2.5±1.6	3.7±1.4	4.2±1.4
Spot X ₂					
Patients	1.1±0.8 [#]	3.1±0.8 ^{##}	5.4±3.4 ^{##}	6.1±2.8 ^{##}	7.1±2.3 ^{##}
Patients+ Soy	0.8±0.4 [#]	1.6±0.6 [#]	2.0±0.6	2.4±0.8	2.9±1.0 [#]
Healthy	0.5±0.4	0.9±0.6	1.6±0.8	2.6±0.9	3.5±1.6
FC					
Patients	14.7±2.9	15.2±2.1	17.0±3.1	17.6±2.6	17.9±2.7 ^{##}
Patients+ Soy	14.0±2.2	16.2±2.4	17.0±4.2	19.2±2.1	21.2±1.5
Healthy	14.7±2.0	15.5±1.3	16.3±2.1	19.6±1.9	21.2±2.1
PL					
Patients	25.5±4.0	29.6±4.7	31.9±2.8	37.6±5.1	40.8±8.5
Patients+ Soy	26.5±4.0	24.6±5.0 [#]	25.0±5.2 ^{##}	37.8±6.0	38.3±5.4 [#]
Healthy	27.4±1.8	29.2±4.3	32.4±4.5	39.3±4.6	43.5±6.6

%, Mean ± S.D. Compared with healthy persons : [#], $P < 0.05$; ^{##}, $P < 0.01$.

傾きは明らかに左上方に推移した。このことは大豆たん白質はLDL-コレステロールの降下に比してLDL-apo Bの降下が小さいことを示しており、LDL-apo B当りのコレステロールが少なくなりLDL分子サイズの小さいLDLを産生することを意味している。

考 察

これまで大豆たん白質による血漿コレステロールの降下¹⁶⁾、血圧の降下¹⁷⁾に関する報告はみられるが、過酸化LDLならびにLDL分子サイズに関する報告は見当らない。

Table 2. Comparison of the influence of dialyzing into Cu⁺⁺ on percentages of lipid constituents in VLDL among CVD patients (n=24), CVD patients+soy (n=14) and healthy persons (n=11)

	0 hour	6 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CE					
Patients	18.6±6.2	14.3±3.8	12.0±3.2	7.9±2.7	6.3±2.3
Patients+Soy	18.8±4.8	17.4±3.8 [#]	16.8±4.0 [#]	14.8±3.9 ^{##}	10.6±3.0 ^{##}
Healthy	15.5±3.4	13.9±5.2	12.5±4.8	7.1±2.0	5.5±3.0
TG					
Patients	49.2±5.2 [#]	39.8±6.4 ^{##}	33.2±8.8	20.6±7.8 [#]	17.8±8.0
Patients+Soy	50.2±5.2 [#]	49.2±6.0	46.2±5.6	40.8±5.0 [#]	14.7±4.8 [#]
Healthy	57.0±7.6	51.8±9.7	44.6±16.1	33.8±13.8	24.8±12.5
Spot X ₁					
Patients	0.8±0.7	1.4±0.8	2.2±1.1	3.9±1.4	5.0±2.1 [#]
Patients+Soy	0.9±0.4	0.9±0.5	1.2±0.4	2.2±0.6 [#]	2.8±0.8 [#]
Healthy	0.5±0.6	1.1±1.1	1.6±1.2	3.0±1.5	3.4±1.4
FFA					
Patients	1.2±1.1	2.4±0.9 [#]	3.4±1.6 ^{##}	3.9±2.2	4.4±2.6
Patients+Soy	1.3±1.0	1.7±1.2	2.0±1.0	2.4±1.1	2.6±1.2 [#]
Healthy	0.9±0.6	1.3±0.8	1.8±0.8	2.8±1.4	3.7±1.5
Spot X ₂					
Patients	1.1±0.6 ^{##}	2.2±0.8 ^{##}	2.7±1.2 ^{##}	4.0±2.2 ^{##}	4.5±2.3 ^{##}
Patients+Soy	1.0±0.4 ^{##}	1.3±0.5	1.4±0.5	1.6±0.6	1.6±0.6
Healthy	0.4±0.3	0.7±0.6	0.9±0.5	1.3±0.7	1.5±0.6
FC					
Patients	10.4±2.2 [#]	12.3±2.7	14.2±2.3 ^{##}	14.8±3.9	17.0±4.7
Patients+Soy	11.3±2.4 [#]	11.8±2.8	11.5±2.9	12.8±3.0	13.8±3.4
Healthy	8.2±2.3	10.0±2.7	10.7±2.4	13.4±2.9	15.5±3.6
PL					
Patients	19.9±2.3	26.6±8.0	32.7±10.4	45.0±12.3	46.6±12.4
Patients+Soy	16.7±4.0	17.7±4.1	20.9±4.8 ^{##}	25.4±5.0 ^{##}	32.8±5.5 ^{##}
Healthy	17.4±4.1	20.4±6.8	27.4±13.3	39.1±11.0	45.4±10.3

%, Mean ± S.D. Compared with healthy persons : [#], $P < 0.05$; ^{##}, $P < 0.01$.

近年、過酸化LDL^{4,5)}ならびにLDL分子サイズ^{7,11)}と動脈硬化との関係が注目されてきた。本研究においても大豆たん白質には過酸化LDLの産生抑制作用ならびにLDL分子サイズの増大抑制作用のあることが確認された。

大豆たん白質は血漿コレステロール低下のメカニズ

ムとして糞便中のステロールの排泄を増加させ¹⁶⁾ることが挙げられている。また、Sirtori *et al.*¹⁸⁾は大豆たん白質のLDLレセプター合成の促進を血漿コレステロール降下のメカニズムに挙げている。さらにKhosla *et al.*¹⁹⁾はコレステロールの代謝回転の促進をそのメカニズムに考えている。

Table 3. Comparison of the influence of dialyzing into Cu⁺⁺ on percentages of lipid constituents in HDL among CVD patients (n=24), CVD patients+soy (n=14) and healthy persons (n=11)

	0 hour	6 hour	24 hour	48 hour	72 hour
CE					
Patients	32.2±5.1	25.5±6.2 [#]	13.0±4.6	6.7±2.6	4.8±1.9
Patients+Soy	35.8±5.1	34.5±7.0	31.8±6.4 ^{##}	20.8±4.5 ^{##}	16.8±3.8 ^{##}
Healthy	37.0±6.0	31.1±4.8	15.5±3.6	7.4±3.2	5.4±2.2
TG					
Patients	12.4±7.0	7.5±6.1	3.6±3.3	2.8±2.5	2.7±2.2
Patients+Soy	15.8±6.8 [#]	18.7±6.8 ^{##}	16.8±4.8 ^{##}	10.9±4.2 ^{##}	9.8±4.0 ^{##}
Healthy	8.9±3.3	8.0±4.0	3.4±1.1	2.7±0.8	2.5±1.0
Spot X ₁					
Patients	1.5±2.1 [#]	5.5±1.7	8.5±1.8	9.9±2.9	10.6±3.4
Patients+Soy	1.8±0.8 [#]	2.8±1.2 [#]	5.2±1.9 ^{##}	6.2±2.1 ^{##}	8.0±2.2 ^{##}
Healthy	0.9±0.4	4.6±1.9	8.5±1.9	9.8±2.2	10.2±1.7
FFA					
Patients	1.3±0.5	2.4±0.8	3.2±0.9	3.4±1.0	3.9±1.6
Patients+Soy	1.0±0.4	1.6±0.6	2.2±1.0 [#]	2.7±1.1 [#]	3.0±1.8
Healthy	0.8±0.5	1.8±0.9	3.5±0.9	3.5±1.0	3.5±0.9
Spot X ₂					
Patients	0.6±0.6	2.0±1.5	3.2±1.7	3.9±2.3	4.6±2.1
Patients+Soy	0.8±0.4	1.6±1.0	2.0±0.6	2.4±0.8	2.9±1.0
Healthy	0.7±0.4	1.2±0.7	2.3±1.4	2.6±1.5	3.3±1.6
FC					
Patients	11.1±1.2	12.7±1.9	15.3±1.3	16.3±1.8 [#]	17.7±2.5
Patients+Soy	14.0±2.2 [#]	16.2±2.4 [#]	17.0±4.2	19.2±2.1	21.2±1.5
Healthy	10.8±2.8	11.9±3.3	16.5±3.3	18.1±1.9	19.6±1.7
PL					
Patients	40.6±3.8	44.3±6.7	52.9±6.0	56.9±7.4	57.0±8.3
Patients+Soy	26.5±4.8 [#]	24.6±5.0 [#]	25.0±5.2 ^{##}	37.8±6.0 [#]	38.3±5.4 [#]
Healthy	40.3±3.4	41.4±6.1	50.3±7.4	55.9±6.6	55.4±5.4

%, Mean ± S.D. Compared with healthy persons : [#], $P < 0.05$; ^{##}, $P < 0.01$.

LDL Particles

by Negative Staining

Rabbit

20nm

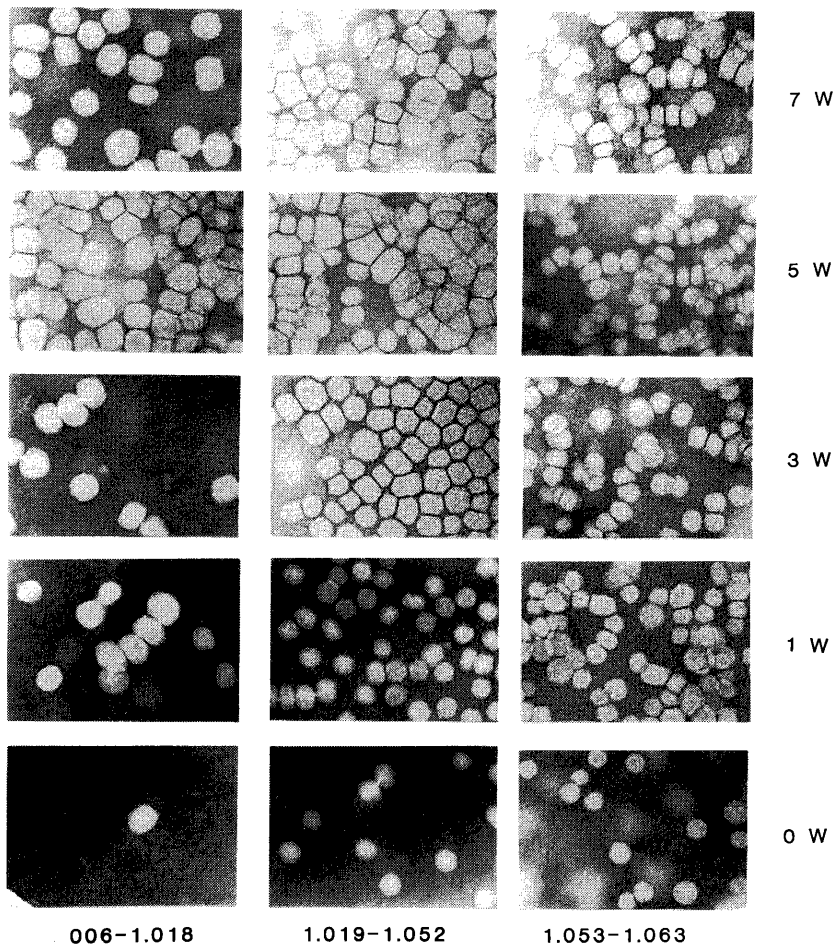


Fig. 5. Rabbits were fed on 1% cholesterol added food for 7 weeks. Each LDL was separated at each period and each LDL was photographed by negative staining.

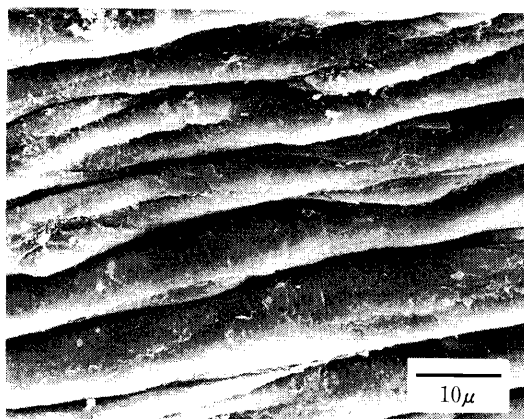
以上のように大豆たん白質の生物活性に関しては多方面から研究されている。大豆たん白質は動脈硬化性疾患に対しても極めて良い作用を持っており、大豆は健康を考えるうえで重要な食物と考える。

文 献

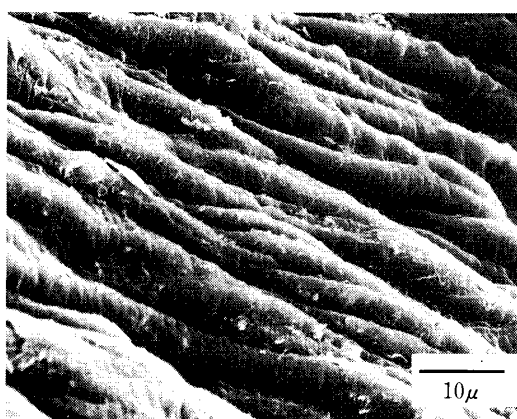
- 1) Anderson RGW, Goldstein JL, and Brown M S (1980) : Fluorescence visualization of receptor-bound low density lipoprotein in human fibro-

Normal LDL

Right I.C.A

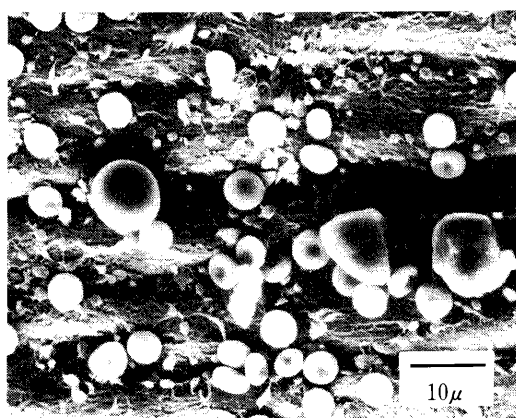


Left I.C.A



1% cholesterol feeding LDL

Right I.C.A



Left I.C.A

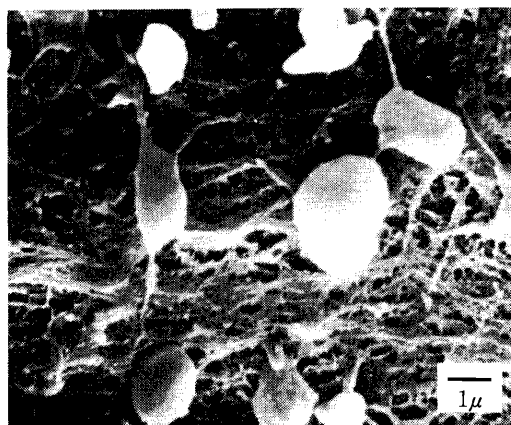
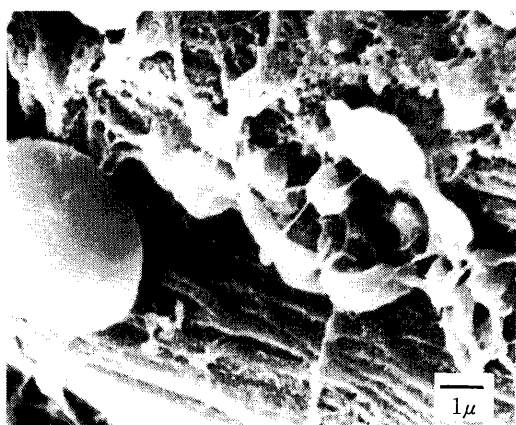
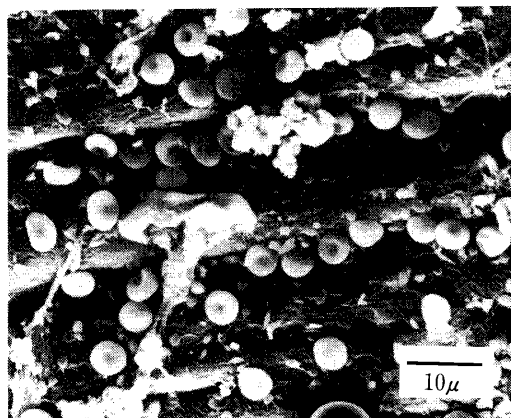


Fig. 6. Scanning electron microscope (SEM) findings of internal carotid artery (ICA) after LDL infusion into left internal carotid artery.

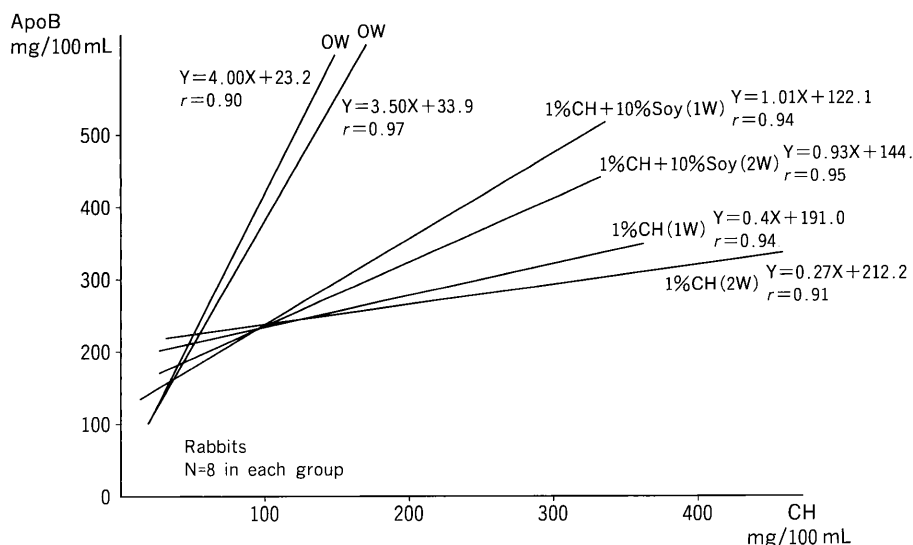


Fig. 7. Regression coefficients were calculated between LDL-apo B and LDL-cholesterol at 0, 1 and 2 weeks after 1% cholesterol feeding and feeding with 10% soy protein. The same experiment was carried out twice.

blasts. *J Receptor Res*, **1**, 17-39.

- 2) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK and Brown M S (1979) : Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, **76**, 333-337.
- 3) Fogelm AM, Schechter I, Seager J, Hokom M, Child J S and Edwards PA (1980) : Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**, 2214-2218.
- 4) Avogaro P, Bon GB and Cazzolato G (1988) : Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*, **8**, 79-87.
- 5) Kanazawa T, Uemura T, Konta Y, Tanaka M, Fukushi Y, Onodera K, Metoki H and Oike Y (1990) : A new approach to prevention and treatment of atherosclerosis by dyslipoproteinemia. *Ann NY Acad Sci*, **598**, 281-300.
- 6) Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Steinberg D and Witztum JL (1990) : Lipoproteins in normal and atherosclerotic aorta.

Eur Heart J, **11**, 88-99.

- 7) Kanazawa T, Osanai T, Uemura T, Onodera K and Oike Y (1993) : Evaluation of oxidized low-density lipoprotein and large molecular size low-density lipoproteins in atherosclerosis. *Pathobiology*, **61**, 200-210.
- 8) Uemura T (1990) : A study of the biological function and lipid constituents of oxidatively modified lipoproteins. *J Jpn Atheroscler Soc*, **18**, 81-90.
- 9) Kaneko H (1990) : The causes of the arteriosclerosis - Internalization of ultra-water-soluble LDLs into mouse peritoneal macrophages and their cell injury potential. *J Jpn Atheroscler Soc*, **18**, 51-61.
- 10) Kanazawa T, Chui DH, Tanaka M, Fukushi Y, Onodera K, Metoki H and Oike Y (1990) : Endothelial cell injuries by an infusion of various low density lipoproteins into rabbit auricular vein. *Ann NY Acad Sci*, **598**, 512-513.
- 11) Tajima S, Yokoyama S and Yamamoto A (1983) : Effect of lipid particle size on association of apolipoproteins with lipid. *J Biol*

- Chem*, **25**, 10073-10082.
- 12) 金沢武道, 上村継道, 長内智宏, 小野寺庚午, 目時弘文, 大池弥三郎(1994): 粥状動脈硬化の急性形成と慢性形成における過酸化LDLの意義. 動脈硬化, **22**, 245-256.
 - 13) 高瀬 洋(1992): 肺癌患者における血漿過酸化低比重リポ蛋白の特異性に関する研究. 日胸疾会誌, **33**, 520-527.
 - 14) Kanazawa T, Uemura T, Osanai T, Fukushi Y, Imura T, Oike Y, Onodera K, Akasaka K, Ohkubo K and Takahashi S (1994): Plasma peroxidized low-density lipoprotein with hydroperoxidized cholesteryl linoleates estimated in patients with familial hypercholesterolemia. *Pathobiology*, **62**, 269-282.
 - 15) Havel RJ, Eder HA and Bragdon JH (1955): The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, **51**, 1486-1494.
 - 16) Tanaka M, Kanazawa T, Imura T, Watanabe T, Fukushi Y, Osanai T, Uchida T and Onodera K (1993): Effect of soy protein on the excretion amount of fecal sterols in Jcl: Wistar rats. *Ann NY Acad Sci*, **676**, 359-363.
 - 17) Imura T, Kanazawa T, Watanabe T, Fukushi Y, Kudou S, Uchida T, Osanai T and Onodera K (1993): Hypotensive effect of soy protein and its hydrolysate. *Ann NY Acad Sci*, **676**, 327-330.
 - 18) Sirtori CR, Even R and Lovati M (1993): Soybean protein diet and plasma cholesterol: From therapy to molecular mechanisms. *Ann NA Acad Sci*, **676**, 188-201.
 - 19) Khosla P, Samman S and Carroll KK (1991): Decreased receptor-mediated LDL catabolism in casein-fed rabbits precedes the increase in plasma cholesterol levels. *J Nutr Biochem*, **2**, 203-209.