

アポE欠損マウスの動脈硬化の進展に及ぼす大豆たん白質, そのアミノ酸混合物およびエタノール抽出物の影響

倪 偉華・今泉 勝己*

九州大学農学部

Effects of Soy Protein, Amino Acid Mixture and Ethanol Extracts on Arterial Lesions in Apo E-deficient Mice

Wei-Hua NI and Katsumi IMAIZUMI

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81

ABSTRACT

Effects of dietary soy protein, soy amino acid mixture and ethanol extracted soy protein on serum lipids and atherosclerotic lesions in apo E-deficient mice were examined. Soy protein, compared with casein, prevented atherosclerotic lesions, although serum cholesterol levels were not influenced. Soy protein simulated amino acids and ethanol extracted soy protein were partially effective to the lesion. Soy protein ethanol extracts had no significant effect on the lesion and serum cholesterol. These results show antiatherogenic effect of soy protein is attributed to protein. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 92-95, 1997.

Key words: atherosclerosis, soy protein, casein, isoflavone, apo E-deficient mice

ビタミンDを過剰摂取させた高コレステロール血症ラット¹⁾やアポE欠損マウス²⁾を用いて、分離大豆たん白質がカゼインと比較して動脈硬化の発症抑制に効果があることを報告した。今回は、これらたん白質のアミノ酸混合物および大豆たん白質のエタノール抽出物の動脈硬化発症に及ぼす影響について、アポE欠損マウスを用いて検討した。

実験方法

アポE欠損マウスに AIN-93G³⁾ に準じた食事を6から24週間与えた。コレステロールと胆汁酸を添加した食事あるいはこれらを添加しない食事を調製した。

たん白質源として、分離大豆たん白質(不二製油)、カゼイン、これらのアミノ酸混合物、エタノール抽出分離大豆たん白質を用いた。大動脈病変を観察するために、大動脈弓部を6分割した(Fig. 1)。パラフィン切片を調製後ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、内膜の肥厚面積を測定した。また、ズダンIVによって大動脈の脂肪染色を施し、その染色面積を計測した。これら病変面積の定量は画像解析装置を用いて行った。

血清の脂質は市販のキットを用いて測定した。大豆のイソフラボンは HPLC によって分離定量した。

結果と考察

まず、動脈の切片を調製し、内膜の肥厚を測定することで病変の程度を評価した。高コレステロール食で

*〒812-81 福岡市東区箱崎6-10-1

6週間飼育したマウスの動脈硬化病変に及ぼす食事たん白質、アミノ酸混合物、大豆たん白質からのエタノール抽出物の除去およびそのカゼインたん白質食群への添加の影響を Table 1 に示した。いずれの場合にも病変の程度は心臓に近い部位で顕著であった。大豆たん白質はカゼインと比較して、大動脈弓の各部位での病変を抑制する傾向があり、特に部位 1 で顕著であった。ANOVA 検定では、大豆たん白質のこの効果はそのアミノ酸混合物では認められなかったが、部位 5 と 6 ではアミノ酸の違いの影響が認められた。エタノール抽出大豆たん白質を給餌した場合と、その抽出物をカゼイン食群に混ぜて給餌した場合の病変の程度は ANOVA では有意な差異を検出できなかった。なお、Table 2 に示すイソフラボンがエタノール抽出によ

て大豆たん白質から除去された。

無コレステロール食で9週間飼育した場合にも、エタノール抽出大豆たん白質摂取マウスの病変の程度はその抽出物を摂取したマウスと比較して ANOVA では差異を検出できなかったが、部位 2 と 6 の大豆たん白質群で病変が軽減された。大豆たん白質の動脈硬化抑制作用は、6 カ月間無コレステロール食で飼育した場合にも観察され、特に部位 5 で顕著であった。

Table 2. Isoflavone content in soy protein isolate (mg/100 g protein)

Isoflavones				
Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total
34.9	74.3	11.4	21.7	143

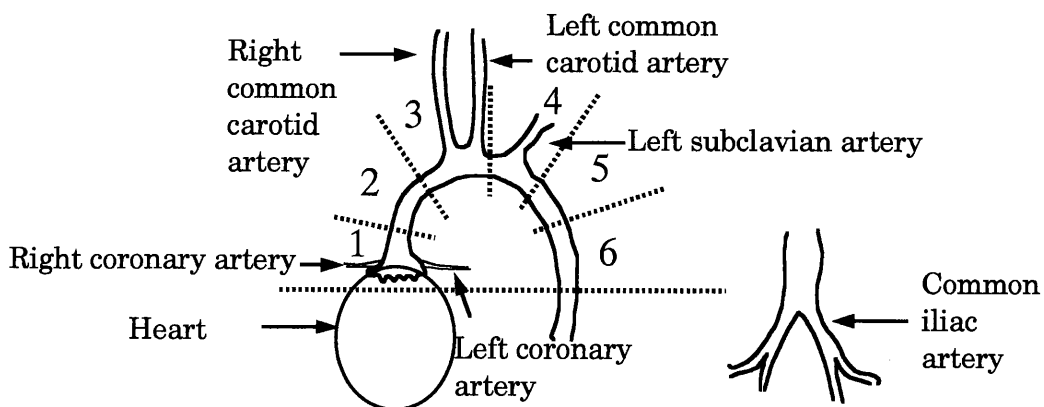


Fig. 1. Line graphs showing the arteries in apo E-deficient mice. Sites subjected for microscopic analyses are indicated in number.

Table 1. Effect of dietary soy protein, soy amino acid and soy ethanol extract on atherosclerotic lesions of intima estimated microscopically in Apo E(-) mice

Group	Feeding period(wk)	Number of mice	Lesion area ($\mu\text{m}^2\times 10^3$)						ANOVA	
			Part 1	Part 2	Part 3	Part 4	Part 5	Part 6	Protein	Part
High cholesterol diet										
Soy protein	6	6	115±26.6*	165±41.2	120±34.6	79.6±17.9	71.2±2.20	52.8±8.40	<0.01	<0.01
Casein	6	6	291±61.2	161±22.3	238±152	103±1.48	152±69.6	74.8±12.1		
SP AA	6	4	159±67.2	89.6±18.6	63.6±35.4	37.4±18.8	9.80±0.85*	10.8±5.24*	NS	<0.001
Casein AA	6	4	175±30.5	82.4±8.04	96.0±28.6	39.6±11.7	40.4±34.3	38.2±25.2		
SP-EE	6	3	260±51.7	79.4±33.8	55.7±6.46	35.1±6.52	35.1±6.28	28.2±10.3	NS	<0.001
Casein+EE	6	3	270±34.5	118±31.8	86.0±27.2	38.2±3.72	102±87.7	23.6±3.52		
Cholesterol free diet										
SP-EE	9	12	241±15.2	35.3±7.12*	72.4±6.50	21.5±4.92	6.13±3.83	1.90±1.10*	NS	<0.001
Casein+EE	9	13	231±19.3	74.1±16.1	77.1±13.3	35.7±8.41	7.01±2.92	5.71±2.33		
Soy protein	24	9	218±37.0	70.4±37.3	131±66.2	99.2±21.0	36.3±30.8*	30.1±16.3	<0.01	<0.001
Casein	24	8	243±67.2	140±30.1	186±51.3	199±67.9	106±36.2	58.3±38.1		

*Significant difference at $P < 0.05$ by Student's t test within each feeding study. Abbreviations: SP, soy protein; AA, amino acid; EE, ethanol extract.

次に、摘出した全大動脈を脂肪染色することによって、脂肪が沈着している内膜の表面積を指標にして動脈硬化病変の程度を評価した。Table 3 に示すように、9 週間無コレステロール食でマウスを飼育したところ、大豆たん白質群でカゼイン群と比較して、胸部大動脈の病変の程度が軽減された。

Table 4 に実験に供したマウスの血清コレステロールとトリグリセリド濃度を示した。高コレステロール食マウスは無コレステロール食マウスと比較して、血清のコレステロールとトリグリセリド濃度はそれぞれ顕著に上昇した。高コレステロール食マウス間では各食事たん白質の影響は観察されなかった。無コレステロール食マウスでは飼育期間（9 週間と24週間）および食事の影響は観察されなかった。トリグリセリド濃度は24週間飼育マウスで9 週間飼育マウスよりも低下した。

以上のように、大豆たん白質はカゼインと比較して動脈硬化を抑制することが確認された。ラットでは大豆たん白質がカゼインと比較して血清のコレステロー

ル濃度を低下させることを報告したが¹⁾、このマウスでは食事たん白質の影響は認められなかった。このマウスではアポEが欠損していることから、大豆たん白質の血清コレステロール濃度の低下にはアポEが必要であるのかも知れない。大豆たん白質の動脈硬化軽減作用は血清コレステロール濃度の違いに係わらず観察されたことから、大豆たん白質は動脈壁の代謝にカゼインたん白質とは異なった影響を及ぼしていると考えられる。大豆たん白質の抗動脈硬化作用はそのアミノ酸混合食やエタノール抽出大豆たん白質でも一部観察されたことから、このたん白質の抗動脈硬化作用はたん白質そのものに基づくかと判断される。他の動物種では分離大豆たん白質中に含まれるイソフラボンが血清コレステロール低下作用を発揮することが報告されているが、本実験ではこのような作用や抗動脈硬化作用は認められなかった。イソフラボンの血清コレステロール低下作用も血清のアポEを介して発揮されるのかも知れない。

Table 3. Effect of dietary soy protein on atherosclerotic lesions of aortic surface stained with Sudan IV

Group	Feeding period (wk)	Number of mice	Lesion% of whole aorta	Lesion% of thoracic aorta	Lesion% of abdominal aorta
Cholesterol free diet					
Soy protein	9	11	11.3±1.6	20.4±4.6*	12.1±15.7
Casein	9	12	14.6±1.7	27.4±6.6	13.9±18.3

*Significant difference at $P < 0.01$, by Student's t test.

Table 4. Effect of dietary soy protein, soy amino acid and soy ethanol extract on serum lipid in Apo E(-) mice

Group	Feeding period (wk)	Number of mice	Cholesterol (mg/100 mL)	Triglycerides (mg/100 mL)
High cholesterol diet				
Soy protein	6	6	1913±285 ^{ab}	794±116
Casein	6	6	1264±237 ^b	664±95.6
SP AA	6	4	2354±274 ^a	420±116
Casein AA	6	4	1761±211 ^{ab}	834±261
SP-EE	6	3	2053±355 ^{ab}	482±10.4
Casein+EE	6	3	2217±543 ^{ab}	340±73.5
Cholesterol free diet				
SP-EE	9	12	674±61.3	173±34.6
Casein+EE	9	13	750±92.1	222±44.3
Soy protein	9	11	753±85.0	231±62.2
Casein	9	12	654±70.2	197±46.7
Soy protein	24	9	708±65.9	103±13.8
Casein	24	8	689±111	83.8±15.3

^{ab} Different letters show significant difference at $P < 0.05$ by Duncan's new multiple range test. Abbreviations: SP, AA and EE, see Table 1.

要 旨

アポE欠損マウスを用いて、大豆たん白質、そのアミノ酸混合物とエタノール抽出物の動脈硬化に及ぼす影響を検討した。大豆たん白質はカゼインと比較して動脈硬化を抑制した。しかし、血清コレステロール濃度には影響しなかった。大豆たん白質類似アミノ酸混合物とエタノール処理大豆たん白質は動脈硬化を抑制する傾向があった。エタノール抽出物は動脈硬化ならびに血清コレステロール濃度に影響しなかった。これらの結果から、分離大豆たん白質の抗動脈硬化作用は、たん白質成分に基づくと推定した。

文 献

- 1) Sakono M, Fukuyama T, Ni W-H, Nagao K, Ju H-R, Sato M, Sakata N, Iwamoto H and Imaizumi K (1997) : Comparison between dietary soybean protein and casein of the inhibiting effect on atherogenesis in the thoracic aorta of hypercholesterolemic (ExHC) rats treated with experimental hypervitamin D. *Biosci Biotech Biochem*, **61**, 514-519.
- 2) 窄野昌信, 福山俊彦, 倪 偉華, 今泉勝己(1996) : アポE欠損マウスの動脈硬化の進展に及ぼす食事たん白質の影響. 大豆たん白質研究会会誌, **17**, 114-117.
- 3) Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC Jr (1993) : AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-1951.