

カゼインへのアルギニンの添加はアポ E 欠損マウスの 動脈硬化の進展を抑制する

倪 偉華・津田恭征・佐藤匡央・永尾晃治・今泉勝己*

九州大学農学部

Supplementation of L-Arginine to Casein-based Diet Alleviates Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E-deficient Mice

Wei-Hua NI, Tomoyasu TSUDA, Masao SATO, Koji NAGAO and Katsumi IMAIZUMI

Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

Apolipoprotein E-deficient mice were fed on diet containing soy protein isolate (SPI), casein and 0.92% L-arginine supplemented casein for 15 wk. Increasing L-arginine content in casein diet to the same level as SPI contained diet significantly reduced lesion size by 20%, compared with casein contained diet. Mice received arginine, compared with those fed casein, had significant reduction of liver thiobarbituric acid-reactive substances and higher level of liver α -tocopherol, and tended to have lower serum autoantibody titers against oxidized LDL and higher level of serum NO_2/NO_3 . These results suggest that antiatherogenic properties of dietary SPI at least are mediated through increasing formation of NO and preventing lipid from oxidation in arterial wall. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 102-105, 1998.

Key words : apolipoprotein E-deficient mice, L-arginine, atherosclerosis, casein, cholesterol, L-methionine, nitric oxide, soy protein isolate

食事中的大豆たん白質には抗動脈硬化作用があることが知られており、その作用の主な機作としてはコレステロール濃度低下にあることがヒト¹⁾ や実験動物²⁾ において報告されている。しかしながら、そのメカニズムや有効成分についての知見は充分とはいえない。

大豆たん白質は、カゼインのような動物性たん白質に比べ、アルギニンが多くメチオニンが少ないことが

知られている。このようなアミノ酸組成が、大豆たん白質の抗動脈硬化作用に影響しているかどうかは、まだ知られていない。そこで今回は、アポ E 欠損マウスに分離大豆たん白質(SPI)、SPIにL-メチオニン(Met)を添加したもの、カゼインおよびカゼインにL-アルギニン(Arg)を添加したものをそれぞれ与え、動脈硬化病変の進展および血清と肝臓の脂質濃度に対する影響を検討した。また肝臓のチオバルビツール酸反応物(TBARS)値、 α -トコフェロール濃度および血清の酸

*〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

化 LDL に対する自己抗体価も測定した。

方 法

アポ E 欠損マウスに AIN-93G³⁾ に準じた食事を 15 週間与えた。実験群には、たん白質源としてカゼインを用いた食事を与えた CAS 群、CAS 群の食事に 0.9% (w/w) Arg を添加した食事を与えた CAS + Arg 群、たん白質源として SPI を用いた食事を与えた SPI 群および SPI 群の食事に 0.3% (w/w) Met を添加した食事を与えた SPI + Met 群を設けた。なお、CAS + Arg 群のアルギニン含量は SPI 群および SPI + Met 群と同等に、SPI + Met 群のメチオニン含量は CAS 群および CAS + Arg 群と同等になっている。

Aortic root の病変面積は、Paigen らの方法⁴⁾ に従って測定した。血清の脂質と NO₂/NO₃ レベルは市販のキットを用いて行った。肝臓脂質は Folch らの方法⁵⁾ により抽出し、化学法により測定した。肝臓の α -トコフェロール含量および TBARS 値は、それぞれ Burton ら⁶⁾ および Woodall ら⁷⁾ の方法に従って測定した。Cu²⁺ により修飾した LDL に対する自己抗体価は、Jansen ら⁸⁾ の方法に従い ELISA により測定した。

結果と考察

Fig. 1 に各群の病変面積の平均を示した。その結果、

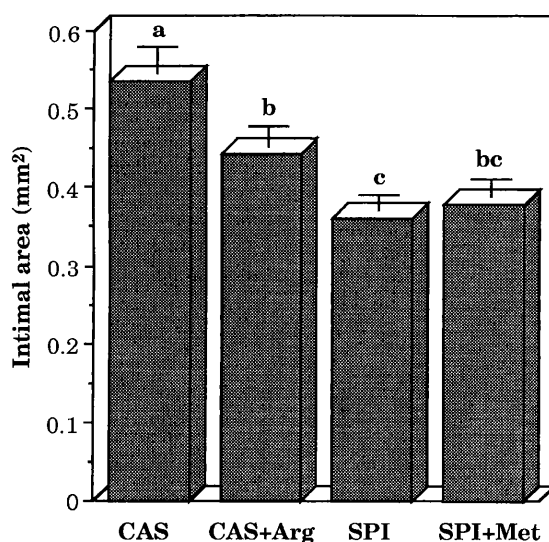


Fig. 1. Intimal area in transversal tissue sections of aortic root of apoE-deficient mice fed on casein (CAS), casein plus L-arginine (CAS+Arg), soy protein isolate (SPI), and SPI plus L-methionine (SPI+Met) contained diet for 15 weeks. Each bar shows the mean $\pm$ SEM for 5-8 mice per group (male, 9-10 wk-old). The intimal area was dependent on the dietary protein sources ($P < 0.001$ by 2-factor ANOVA), but not on the supplementation of amino acid. ^{abc} Different letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

Table 1. Food intake, growth parameter, serum lipid, NO₂/NO₃ level and autoantibody titers against Cu²⁺-LDL in apoE-deficient mice fed with soy protein isolate (SPI), SPI+L-methionine, casein and casein+L-arginine for 15 weeks^{1,2}

Group	n	weeks		TC	TG	PL	NO ₂ /NO ₃	Autoantibody titer	
		Food intake	Body weight					IgM class	IgG class
		g/day	g						
CAS	5	3.79 ^b	32.3	18.2 ^b	1.08 ^a	5.68 ^b	13.7 ^b	1.41	2.56
CAS+Arg	6	3.73 ^b	32.1	21.0 ^{bc}	1.47 ^{ab}	6.99 ^{ab}	27.9 ^{ab}	0.775	2.07
SPI	7	4.26 ^a	32.0	27.7 ^{ac}	3.12 ^{ab}	9.08 ^{ab}	39.3 ^a	ND	ND
SPI+Met	8	4.34 ^a	35.6	31.5 ^a	4.91 ^b	10.9 ^a	40.7 ^a	ND	ND
Pooled SEM		0.064	0.841	1.64	0.643	0.730	4.14	0.239	0.443
<u>ANOVA</u>									
Protein		<i>P</i> <0.001	NS	<i>P</i> <0.001	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.01	<i>P</i> <0.05		
AA		NS	NS	NS	NS	NS	NS		
Protein×AA		NS	NS	NS	NS	NS	NS		

¹ Values are expressed as means with pooled SEM.

² Abbreviations used : Arg, L-arginine ; BW, body weight ; CAS, casein ; Met, L-methionine ; NO₂/NO₃, nitrite/nitrate ; PL, phospholipids ; SPI, soy protein isolate ; TC, total cholesterol ; TG, triacylglycerols.

^{abc} Different letters within each column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P < 0.05$.

Table 2. Liver lipid, α -tocopherol and thiobarbituric acid-reactive substance levels in apoE-deficient mice fed with casein, casein+L-arginine, soy protein isolate (SPI) and SPI+L-methionine contained diets for 15 weeks^{1,2}

Group	Liver TC	Liver TG	Liver PL	TBARS	Liver α -tocopherol
	$\mu\text{mol/g liver}$			nmol/g liver	$\mu\text{mol/g liver}$
CAS	27.2 ^{ac}	103 ^{ab}	34.6 ^{ab}	64.4 ^b	0.469 ^a
CAS+Arg	26.9 ^a	188 ^{ab}	32.0 ^a	51.5 ^a	0.773 ^b
SPI	22.0 ^{ac}	97.4 ^a	38.0 ^b	55.2 ^a	0.212 ^c
SPI+Met	20.4 ^b	206 ^b	34.0 ^{ab}	54.2 ^a	0.202 ^c
Pooled SEM	0.957	18.6	0.840	1.81	0.058
ANOVA					
Protein	$P<0.01$	NS	$P=0.01$	NS	$P<0.001$
AA	NS	$P<0.01$	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$
Protein $\times$ AA	NS	NS	NS	NS	$P<0.05$

¹ Values are expressed as means with pooled SEM for 5-8 rats in each group.

² Abbreviations used : AA, amino acid ; Arg, L-arginine ; Met, L-methionine ; NS, not significantly different ; PL, phospholipids ; SPI, soy protein isolate ; TC, total cholesterol ; TG, triacylglycerols ; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

^{abc} Different letters within each column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test at $P<0.05$.

CAS 群は他の群に比べ顕著に高い値を示した。また CAS + Arg 群では SPI 群よりは高い値を示したが、CAS 群よりも顕著に低下していた。このことから、CAS 群の Arg 含量を SPI 群と同程度に増やすことで、SPI の抗動脈硬化作用を部分的に再現できることが示された。しかしその作用は SPI 群よりも弱いので、ほかにも抗動脈硬化作用を持つ成分が SPI には含まれているものと思われる。

Table 1 に示すように、血清コレステロール濃度は、カゼイン食よりも SPI 食の方が高い値を示した。このことは、他の動物モデルにおいて SPI が血清コレステロール濃度を低下させた結果とは一致しないが、アポ E 欠損マウスのコレステロール代謝の詳細が明らかではないため、現時点ではその理由は説明できない。また SPI + Met 群および CAS + Arg 群において血清コレステロール濃度は影響を受けず、カゼイン食と SPI 食で血清トリグリセリドとリン脂質濃度に違いはみられなかった。一酸化窒素 (NO) の生成の指標である NO₂/NO₃ 濃度は、SPI 群と SPI + Met 群に比べ低い値を示した。CAS + Arg 群では SPI 群と CAS 群の中間の値を示していたことから、食事の SPI と Arg の抗動脈硬化作用は、循環系における NO の作用が一部関与し

ているものと思われる。なお、血清の酸化-LDL に対する自己抗体価は CAS + Arg 群に比べ CAS 群で高い傾向を示したが、有意差には至らなかった。

肝臓のコレステロール濃度は、カゼイン食と SPI 食で差はみられず、それぞれに対する Arg および Met の添加による影響もみられなかった (Table 2)。肝臓のトリグリセリド濃度は、CAS 群と SPI 群で差はみられなかったが、SPI + Met 群では顕著な上昇がみられた。肝臓の TBARS レベルは CAS 群で顕著に高い値を示し、他の 3 群間では有意差はみられなかった。このことから、SPI は動脈硬化病変の進展を脂質の過酸化を阻害することにより抑制しているものと思われる。

以上のように、アポ E 欠損マウスにおいて SPI はカゼインに比べて動脈硬化病変の進展を抑制し、その作用は脂質代謝への影響には依存しないことが示された。カゼインの Arg 含量を SPI と同等に増やすことで、SPI の抗動脈硬化作用を一部再現できることが示されたが、SPI そのものに比べると病変のサイズは大きく進展の頻度も高かった。よって、アポ E 欠損マウスにおける SPI による抗動脈硬化作用は、Arg 含量のみでは説明できず、その他の有効成分の検索や作用機作の解明が望まれる。

要 約

アポE欠損マウスに分離大豆たん白質(SPI), カゼイン及びSPI中のアルギニン含量に相当するようアルギニンを添加したカゼインを含む食事を15週間与えた。アルギニンの添加によって動脈硬化病変の程度は約20%低下した。また、アルギニンの添加によって肝臓の過酸化脂質の低下と α -トコフェロールの増加及び血清のNO代謝産物の増加と酸化LDLに対する自己抗体の低下が観察された。これらの結果から、SPIの抗動脈硬化作用の一部は上記のアルギニンの作用を介して発揮されると推定した。

文 献

- 1) Anderson JW, Johnstone BM and Cook-Newell ME (1995): Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med*, **333**, 276-282.
- 2) Potter SM (1996): Soy protein and serum lipids. *Curr Opin Lipidol*, **7**, 260-264.
- 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.
- 4) Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D and Williams RA (1987): Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis*, **68**, 231-240.
- 5) Folch J, Lees M and Sloane-Stanley GH (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509.
- 6) Burton GW, Webb A and Ingold KU (1985): A mild rapid and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids*, **20**, 29-39.
- 7) Woodall AA, Britton G and Jackson MJ (1996): Dietary supplementation with carotenoids: effects on α -tocopherol levels and susceptibility of tissues to oxidative stress. *Br J Nutr*, **76**, 307-317.
- 8) Jansen H, Ghanem H, Kuypers JHSAM and Brikenhäger JC (1995): Autoantibodies against malondialdehyde-modified LDL are elevated in subjects with an LDL subclass pattern B. *Atherosclerosis*, **115**, 255-262.