

サイトカイン産生に及ぼすアルコール処理大豆たん白質含有食の影響

矢ヶ崎一三*・山田竜彦・金子正治・三浦 豊

東京農工大学農学部

Effect of Ethanol-extracted Soy Protein Isolate on Cytokine Productivity in Macrophages from Hepatoma-bearing and Nephritic Rats

Kazumi YAGASAKI, Tatsuhiko YAMADA, Masaharu KANEKO and Yutaka MIURA

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu 183-8509

ABSTRACT

The effect of ethanol-extracted soy protein isolate (SPI-EE) on cytokine productivity in macrophages was studied using tumor-bearing and nephritic rats. As model cancer cells, a rat ascites hepatoma cell line of AH109A was employed. The hepatoma cells were transplanted in the back of rats. Nephritis was induced in rats by injecting nephrotoxic serum into tail vein. The animals were given either a 20% casein diet (20C), 20% soy protein isolate diet (20S), or 20% SPI-EE diet (20SE) for 14 days (hepatoma-bearing rats) or 10 days (nephritic rats). In the hepatoma bearing state, productivity of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in resident peritoneal macrophages was found to be significantly lower in 20S-fed rats than in 20C-fed ones, and tended to be higher in 20SE-fed rats than in 20S-fed ones. Likewise, in the nephritic state, productivity of TNF- α in macrophages tended to be lower in 20S-fed rats than in 20C-fed ones, and was significantly higher in 20SE-fed rats than in 20S-fed ones. These results suggest that suppressive effect of SPI on TNF- α productivity in macrophages from both hepatoma-bearing and nephritic rats is reduced by ethanol extraction and that some factor(s) suppressing TNF- α productivity must exist in the ethanol extract. *Soy Protein Research, Japan* 3, 48-53, 2000.

Key words : hepatoma, macrophage, nephritis, soy protein isolate, tumor necrosis factor- α

腫瘍壊死因子- α (TNF- α) は、主に活性化マクロファージ (M ϕ) によって産生されるサイトカインであり、免疫応答や炎症反応において重要な役割を演じている。これらのサイトカインの産生が低下している状況下ではその産生能を高めて免疫賦活作用を有する

食品因子¹⁾の摂取が望ましい。一方、その産生が過剰になると生体にとって不利に働くことが知られており、この場合には過剰産生を沈静化する必要がある。我々は、肝がん移植ラット²⁾や糸球体腎炎ラット³⁾の腹腔M ϕ では、TNF- α 産生能が亢進していることを明らかにした。さらに、カゼイン食に比べ大豆たん白質食が肝がん移植ラット⁴⁾および腎炎ラット³⁾におけるこの

*〒183-8509 府中市幸町3-5-8

サイトカイン産生亢進を沈静化させることを見いだした。そこで本研究では、この沈静化作用が大豆たん白質標品中のエタノール可溶性成分によって誘導されるのかどうかを、サイトカイン産生能の亢進している上記 2 つの病態モデル動物にエタノール処理大豆たん白質食を摂取させることによって明らかにすることを目的とする。

方 法

大豆たん白質のエタノール処理

Ni ら⁵⁾の方法に従い、分離大豆たん白質 (SPI) に 70%エタノール処理を行ない、イソフラボンとサポニンを取り除いた。エタノール不溶性画分を凍結乾燥したものを SPI-EE とした。

担がん時における検討

ドンリユウ系雄ラットを 4 週齢で購入し、固型飼料 (CE-2, 日本クレア) で 6 日間および粉末標準飼料 (20C, Table 1) で 5 日間予備飼育したのち、体重が等しくなるよう 3 群に分けた。すべてのラットの背部皮下へ腹水肝がん AH109A 細胞 (5×10^5 細胞/ラット) を移植し⁶⁾、Table 1 に示した組成の① 20%カゼイン食 (20C)、② 20%分離大豆たん白質食 (20S) あるいは③ 20%エタノール処理分離大豆たん白質食 (20SE) を実験食として 14 日間摂取させた。飼育最終日の午前 9 時に飼料を取り除き (水は与えたまま) 午後 1 時より屠

殺した。直ちに腹腔 MΦ を採取してリポ多糖 (LPS) と培養後、培地中へ分泌される TNF- α の活性を L929 細胞を標的細胞とするバイオアッセイ法^{1,2)}で測定した。

糸球体腎炎時における検討

ウィスター系雄ラットを 4 週齢で購入し、固型飼料 (CE-2) で 5 日間および 20C で 5 日間予備飼育したのち 3 群に分け、腎炎を惹起した。抗ラット糸球体基底膜ウサギ抗血清をラットの尾静脈に注射し、翌日ウサギ γ -グロブリンを後肢フットパッドに皮下注射することにより、糸球体腎炎ラットを作製した^{7,8)}。なお、抗血清注射 3 日前から代謝ケージに移し、必要に応じ 24 時間尿を採取した。腎炎惹起後、直ちに 20C, 20S, 20SE に切り換え 10 日間摂取させた。なお、腎炎の場合には飼料に蔗糖を加えず、糖質源はすべてコーンスターチとした。飼育最終日の午前 9 時に飼料を取り除き、午後 1 時より屠殺し、腹腔 MΦ を採取・培養し、上述のごとく TNF- α 産生能を測定した。

分析

肝がん移植時にはがん性悪液質としての高脂血症⁶⁾が、腎炎時には続発性の内因性高脂血症^{7,8)}が発生するので、血清総コレステロール (T-Ch)、トリグリセリド (TG) およびリン脂質 (PL) 濃度も既報^{6,7)}に従い測定した。また、尿たん白質排泄量、血清アルブミン濃度、血清過酸化脂質 (TBARS) を市販キットを用いて測定した。

Table 1. Composition of experimental diets (dry weight basis)

Ingredient (%)	20C	20S	20SE
Casein ¹	20.0	—	—
SPI ²	—	20.0	—
SPI-EE	—	—	20.0
α -Cornstarch ³	51.3	51.3	51.3
Sucrose ⁴	17.0	17.0	17.0
Corn oil ⁵	5.0	5.0	5.0
Cellulose powder ¹	2.0	2.0	2.0
Mineral mixture (AIN-93G-MX) ³	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN-93-VX) ³	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate ⁶	0.2	0.2	0.2

¹ Oriental Yeast Co., Tokyo

² Fuji Oil Co., Ltd., Osaka

³ Nihon Nosan Kogyo Co., Yokohama

⁴ Nisshin Sugar Manufacturing Co. Ltd., Tokyo

⁵ Hayashi Chemical Co., Tokyo

⁶ Wako Pure Chemical Industries, Osaka

結果と考察

まず、担がんラット由来腹腔 M ϕ の TNF- α 産生能に対するエタノール処理大豆たん白質の影響を検討した。その結果を Tables 2 と 3, Fig. 1 に示した。体重増加量、飼料摂取量、肝重量、固型がん重量（以上、Table 2）、血清アルブミン濃度、血清過酸化脂質濃度、血清と肝臓の脂質（T-Ch, TG, PL）レベル（以上、Table 3）は、20C, 20S, 20SE の 3 群間でいずれも有意な変化は認められなかった。このような状況下で腹腔 M ϕ の TNF- α 産生能を測定した（Fig. 1）。その結果、TNF- α 産生能は、20C 群に比べ 20S 群で有意に低下し、20SE 群では低下の程度が弱まった。

次に、糸球体腎炎ラット由来腹腔 M ϕ の TNF- α 産生能に対するエタノール処理大豆たん白質の影響を検討した。その結果を Tables 4 と 5, Fig. 2 に示した。体重増加量、飼料摂取量、肝重量は、20C 群に比べ 20S

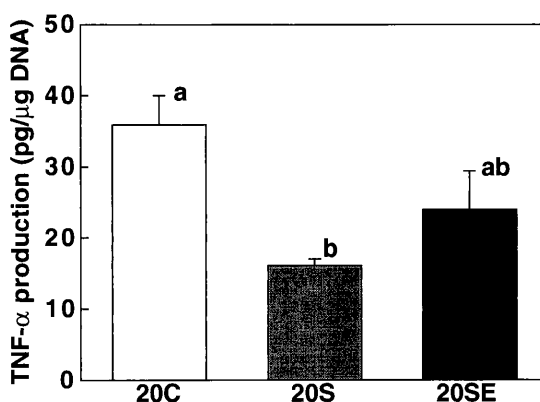


Fig. 1. Effect of ethanol-treated soy protein isolate on TNF- α production by peritoneal macrophages from hepatoma-bearing rats. Each value represents the mean $\pm$ SEM of five rats. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey-Kramer multiple-comparisons test.

Table 2. Effect of ethanol-treated soy protein isolate on food intake, growth, liver and hepatoma weights in hepatoma-bearing rats

Diet	Initial body weight	Body weight gain	Food intake	Liver weight	Hepatoma weight
	g	g/14 days		g/100 g body weight	
20C	148 $\pm$ 2	80.0 $\pm$ 7.0	228 $\pm$ 7	4.18 $\pm$ 0.14	11.5 $\pm$ 0.9
20S	151 $\pm$ 2	75.7 $\pm$ 6.5	228 $\pm$ 12	3.75 $\pm$ 0.13	12.8 $\pm$ 2.4
20SE	151 $\pm$ 2	93.1 $\pm$ 7.6	253 $\pm$ 8	3.73 $\pm$ 0.10	11.8 $\pm$ 1.1

Each value represents the mean $\pm$ SEM of five rats.

Table 3. Effect of ethanol-treated soy protein isolate on serum albumin, TBARS and lipid levels, and liver lipid levels in hepatoma-bearing rats

Diet	Serum albumin	Serum TBARS	Serum lipid level		
			T-Ch	TG	PL
	g/L	μ mol/L		mmol/L	
20C	37.5 $\pm$ 0.8	4.85 $\pm$ 0.46	3.27 $\pm$ 0.15	1.27 $\pm$ 0.16	2.05 $\pm$ 0.09
20S	37.0 $\pm$ 1.4	6.96 $\pm$ 1.40	3.26 $\pm$ 0.27	1.39 $\pm$ 0.18	2.19 $\pm$ 0.19
20SE	39.2 $\pm$ 0.8	6.12 $\pm$ 0.51	3.11 $\pm$ 0.09	1.39 $\pm$ 0.26	2.08 $\pm$ 0.08

Diet	Liver lipid level		
	T-Ch	TG	PL
		μ mol/g liver	
20C	4.49 $\pm$ 0.43	15.1 $\pm$ 2.7	32.3 $\pm$ 0.7
20S	4.41 $\pm$ 0.28	10.3 $\pm$ 1.2	34.0 $\pm$ 1.0
20SE	4.85 $\pm$ 0.17	15.3 $\pm$ 1.1	33.9 $\pm$ 1.2

Each value represents the mean $\pm$ SEM of five rats.

群で有意に低下した。20SE 群ではこれらの低下は認められなかった。腎重量は3飼料群間で有意な差は認められなかった（以上，Table 4）。血清アルブミンレベルは，20C 群と 20S 群間には有意な変化は認められなかったが，20SE 群では 20C 群に比べ有意に低下していた。血清脂質レベルは，20C 群と 20S 群間には有意な変化は認められなかったが，20SE 群では 20C 群に比べ上昇する様相を呈し，TG の場合には有意に上昇していた（Table 5）。尿たん白質排泄量は，腎炎惹起 3 日目では 20C に比べ 20S および 20SE で低下するかその傾向を示した。それ以外の日では 3 群間に有意な差は認められなかった。肝脂質含量はいずれの脂質も 3 飼料群間で差は認められなかった（Table 5）。このような状況で腹腔 Mφ の TNF- α 産生能を測定したところ，20C 群に比べ 20S 群で低下する傾向を示し，20S 群に比べ

20SE 群では有意に上昇していた。すなわち，エタノール処理で SPI の TNF- α 産生能沈静化作用は完全に消失した（Fig. 2）。

このように，TNF- α 産生能が亢進している 2 つの病態モデルにおいて，エタノール処理で SPI の TNF- α 産生能沈静化作用は消失するか弱まる傾向を示した。これらの成績は，SPI からのエタノール抽出画分に Mφ の TNF- α 産生抑制作用を有する成分が存在することを示唆している。エタノール抽出画分にはイソフラボンやサポニンが含まれている⁵⁾ ので，そのなかに有効成分があるものと考えられる。作用本体の同定と作用機構の解明は今後の課題である。また，これらの結果は，大豆たん白質に抗炎症作用のあることも示唆している。従って，ほかの炎症モデルにおける作用の検討も必要である。

Table 4. Effect of ethanol-treated soy protein isolate on food intake, growth, liver and kidney weights in nephritic rats

Diet	Initial body weight	Body weight gain	Food intake	Liver weight	Kidney weight
	g	g/10 days		g/100 g body weight	
20C	149 $\pm$ 4	51.7 $\pm$ 4.8 ^a	170 $\pm$ 6 ^a	6.04 $\pm$ 0.18 ^a	1.58 $\pm$ 0.06
20S	152 $\pm$ 4	24.7 $\pm$ 2.7 ^b	143 $\pm$ 7 ^b	5.50 $\pm$ 0.18 ^b	1.46 $\pm$ 0.09
20SE	152 $\pm$ 3	44.0 $\pm$ 5.5 ^{ab}	185 $\pm$ 10 ^a	6.28 $\pm$ 0.09 ^a	1.55 $\pm$ 0.09

Each value represents the mean $\pm$ SEM of five rats. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey-Kramer multiple-comparisons test.

Table 5. Effect of ethanol-treated soy protein isolate on serum albumin, urinary protein excretion, serum and liver lipid levels in nephritic rats

Diet	Serum albumin	Serum lipid level		
		T-Ch	TG	PL
	g/L	mmol/L		
20C	28.3 $\pm$ 1.2 ^a	18.0 $\pm$ 1.9	3.30 $\pm$ 0.78 ^a	5.74 $\pm$ 0.74
20S	24.0 $\pm$ 1.9 ^{ab}	20.0 $\pm$ 3.2	6.09 $\pm$ 0.87 ^{ab}	6.21 $\pm$ 0.62
20SE	23.2 $\pm$ 1.0 ^b	26.7 $\pm$ 3.9	7.37 $\pm$ 1.12 ^b	7.63 $\pm$ 0.80

Diet	Urinary protein excretion (day 3)	Liver lipid level		
		T-Ch	TG	PL
	mg/day/100 g BW	μ mol/g liver		
20C	418 $\pm$ 30 ^a	4.99 $\pm$ 0.36	9.08 $\pm$ 0.70	34.7 $\pm$ 1.9
20S	296 $\pm$ 34 ^{ab}	4.92 $\pm$ 0.29	10.68 $\pm$ 1.43	37.8 $\pm$ 1.5
20SE	265 $\pm$ 45 ^b	4.77 $\pm$ 0.26	11.54 $\pm$ 1.40	38.2 $\pm$ 1.6

Each value represents the mean $\pm$ SEM of five rats. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey-Kramer multiple-comparisons test.

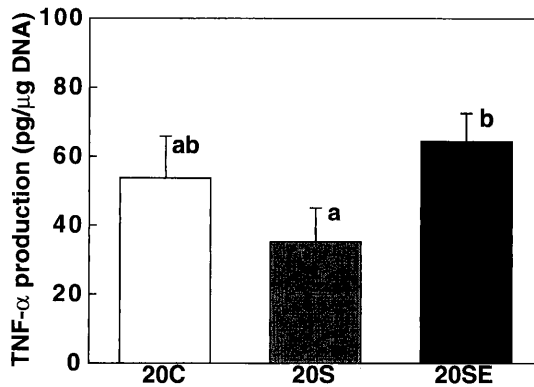


Fig. 2. Effect of ethanol-treated soy protein isolate on TNF- α production by peritoneal macrophages from nephritic rats. Each value represents the mean $\pm$ SEM of five rats. Values not sharing a common letter are significantly different at $P < 0.05$ by Tukey-Kramer multiple-comparisons test.

要 約

我々は、肝がん移植ラットや糸球体腎炎ラットの腹腔マクロファージ ($M\phi$) では、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 産生能が亢進していることを明らかにした。さらに、カゼイン食に比べ大豆たん白質食が肝がん移植ラットおよび腎炎ラットにおけるこのサイトカイン産生亢進を沈静化させることを見いだした。そこで本研究では、この沈静化作用が大豆たん白質標品中のエタノール可溶性成分によって誘導されるのかどうかを、上記二つの病態モデル動物にエタノール処理大豆たん白質食を摂取させることによって明らかにすることを目的とした。肝がん移植ラットは、ドンリユウ系雄ラットの背部皮下に腹水肝がん AH109A 細胞を移植することによって作製した。腎炎ラットは、ウィスター系雄ラットに抗ラット腎糸球体基底膜ウサギ抗血清を静脈注射することにより作製した。それぞれの病態モデルラットに 20% カゼイン食 (20C)、20% 分離大豆たん白質食 (20S)、あるいはエタノール処理分離大豆たん白質を 20% 含む実験食 (20SE) を 14 日間 (担がんラット) または 10 日間 (腎炎ラット) 摂取させた。実験最終日、腹腔 $M\phi$ を採取してリボ多糖と培養後、培地中へ分泌される TNF- α の活性を L929 細胞を標的細胞とするバイオアッセイ法で測定した。その結果、TNF- α 産生能が亢進している 2 つの病態モデルにおいて分離大豆たん白質は TNF- α 産生能沈静化作用を有するが、エタノール処理によりその作用は消失するか弱まる傾向を示した。これらの成績は、分離大豆たん白質のエタノール抽出画分に $M\phi$ の TNF- α 産生抑制作用を示す成分が存在することを示唆している。

文 献

- 1) Komatsu W, Yagasaki K, Miura Y and Funabiki R (1997): Stimulation of tumor necrosis factor and interleukin-1 productivity by the oral administration of cabbage juice to rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **61**, 1937-1938.
- 2) Komatsu W, Yagasaki K, Miura Y and Funabiki R (1996): Modification of tumor necrosis factor and interleukin-1 productivity in macrophages from hepatoma-bearing rats by dietary proteins. *Nutr Res*, **16**, 1699-1707.

- 3) 矢ヶ崎一三, 永田順子, 三浦 豊(1999):腎炎時のサイトカイン産生に及ぼす摂取大豆たん白質レベルおよびアミノ酸補足の影響. 大豆たん白質研究, **2**, 106-111.
- 4) 矢ヶ崎一三, 小松 渡, 三浦 豊(1998):サイトカイン産生に対する大豆たん白質の作用解析. 大豆たん白質研究, **1**, 106-110.
- 5) Ni W, Tsuda Y, Sakono M and Imaizumi K(1998): Dietary soy protein isolate, compared with casein, reduces atherosclerotic lesion area in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr*, **128**, 1884-1889.
- 6) Kawasaki M, Funabiki R and Yagasaki K: Effects of dietary methionine and cystine on lipid metabolism in hepatoma-bearing rats with hyperlipidemia. *Lipids*, **33**, 905-911, 1998.
- 7) Fujisawa K, Yagasaki K and Funabiki R(1995): Reduction of hyperlipidemia and proteinuria without growth retardation in nephritic rats by a methionine-supplemented, low-soy-protein diet. *Am J Clin Nutr*, **61**, 603-606.
- 8) Fujisawa K, Yagasaki K, Funabiki R, Masuda S and Sasaki R (2000): Restoration of low casein feed-induced decrease in serum erythropoietin concentration by fortifying diet with methionine and threonine in normal and nephritic rats. *Nutr Res*, **20**, 685-693.