

カラゲニン誘発炎症モデルラットのサイトカイン産生と 脂質代謝異常に対する大豆たん白質の作用解析

矢ヶ崎一三*・金子正治・三浦 豊

東京農工大学農学部

Effect of Soy Protein Isolate on Cytokine Productivity and Abnormal Lipid Metabolism in Rats with Carrageenan-induced Inflammation

Kazumi YAGASAKI, Masaharu KANEKO and Yutaka MIURA

Department of Applied Biological Science, Tokyo Noko University, Fuchu 183-8509

ABSTRACT

Effect of soy protein isolate (SPI) on tumor necrosis factor- α (TNF- α) productivity and abnormal lipid metabolism was studied in rats with carrageenan-induced inflammation. Two days after carrageenan injection, serum triglyceride (TG) and albumin concentrations decreased, while liver TG content and TNF- α productivity in macrophages increased. Feeding previously for 2 weeks a 20% SPI diet, compared with feeding a 20% casein diet, decreased pouch fluid volume and carrageenan-induced rises in TNF- α production in macrophages 2 days after carrageenan injection. The SPI diet remedied carrageenan-induced hypoalbuminemia, but failed to suppress carrageenan-induced, temporary accumulation of liver TG. These results suggest a potent anti-inflammatory action of SPI. *Soy Protein Research, Japan* 4, 65-69, 2001.

Key words : soy protein isolate, carrageenan, inflammation, albumin, triglyceride, cytokine

我々はこれまでに、担がん時と糸球体腎炎時にはサイトカインの一つである腫瘍壊死因子- α (TNF- α) 産生が亢進し、大豆たん白質摂取時にはその亢進が沈静化されることを見いだした¹⁻³⁾。これらの結果から、大豆たん白質は抗炎症作用を有する可能性が示唆された。本研究は、この可能性を炎症モデル動物を用いて検証しようと試みるものである。そのようなモデルの一つ

としてカラゲニンを起炎物質とする炎症ラットが知られており、浸出液量を測定することにより容易に抗炎症効果を判定することができる。我々は、このモデルを用いn-3系脂肪酸の抗炎症作用を検討したが、その過程でトリグリセリドを主要蓄積脂質とする一過性の脂肪肝が発生することを見いだした⁴⁾。そこで、このカラゲニン誘発炎症モデルラットの炎症組織内浸出液量とマクロファージのTNF- α 産生能に対する作用とともに、脂肪肝の発症に対する大豆たん白質の効果に

*〒 183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

ついても合わせて検討することを目的とする。

方 法

ウィスター系雄ラット（3週齢, Charles River Japan）を固型飼料および標準の20%カゼイン食(20C) (Table 1) で予備飼育したのち, 予めラット背部に無菌空気（8 mL）をドーム状に皮下注射し（day（-1））, その翌日（day 0）空気嚢の中へ起炎物質としてカラゲニン溶液（4 mL）を注入することにより炎症を惹起した。カラゲニン溶液は, λ -カラゲニンを終濃度2%となるよう注射用生理食塩水に懸濁し, オートクレーブにて121℃, 15分間加熱し, 溶解と滅菌を兼ねて調製した。

まず, 20Cを摂取させたラットへカラゲニンを注射

し, 0, 1, 2, 3, 4および5日後の血清アルブミン（炎症の負のマーカー）, 血清と肝トリグリセリド（TG）および総コレステロール（T-Ch）含量, 腹腔マクロファージのTNF- α 産生能の経時変化を検討した。次に, 予め20%大豆たん白質食（20S）を14日間摂取させたラットにカラゲニンで炎症を惹起し, 同様に処理した20C摂取ラットを対照として, 炎症惹起2日後の血清と肝のTG含量, 肉芽腫内浸出液量, 腹腔マクロファージのTNF- α 産生能, 血清アルブミン濃度等を比較した。

血清および肝脂質含量は既報⁵⁾に従い測定した。腹腔マクロファージの採取とTNF- α 産生は既報⁶⁾に従って行い, TNF- α の測定は, バイオアッセイ⁶⁾またはELISA キット（フナコシ）により行った。血清アルブミンは市販のキット（和光純薬）で測定した。

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient (%)	20C	20S
Casein ^a	20.00	—
Soy protein isolate ^b	—	20.00
Corn starch ^c	40.05	40.05
α -Corn starch ^c	13.20	13.20
Sucrose ^d	10.00	10.00
Soybean oil ^e	7.00	7.00
Cellulose powder ^a	5.00	5.00
Mineral mixture (AIN-93G) ^f	3.50	3.50
Vitamin mixture (AIN-93) ^f	1.00	1.00
Choline bitartrate ^g	0.25	0.25

^aOriental Yeast Co., Tokyo.

^bFuji Oil Co., Osaka.

^cNihon Nosan Kogyo Co., Yokohama.

^dMitsui Suger Co., Tokyo.

^eMiyazawa Yakuhin Co., Tokyo.

^fAIN93 composition, Nihon Nosan Kogyo Co., Yokohama.

^gWako Pure Chemical Industries, Osaka.

結果と考察

まず, 基本食である20Cを摂取させ, カラゲニンによる炎症惹起後の諸パラメータの経時変化を検討した。Table 2に示したように, 炎症惹起2日後まで体重は減少するが, 3日後以降は増加に転じた。浸出液量は4日目までは徐々に増加した。血清および肝T-Chレベルに大きな変化は認められなかったが, 肝T-Chは炎症惹起2日目にピークとなった。Fig. 1に示すように, 炎症の負のマーカーである血清アルブミン濃度は炎症惹起の翌日から有意に低下しはじめ, その後5日目まで時間依存的に低下し続けた（図中の○□は空気のみを注入したNor-0 day群を示す）。腹腔マクロファージにおけるリポ多糖（LPS）存在下のTNF- α 産生能は, 有意差はないもののカラゲニン注入翌日から上昇しはじめ, 2日目にピークとなり, 3日目には低下

Table 2. Changes in growth, food intake, liver weight, pouch fluid volume, serum and liver cholesterol levels in rats with carrageenan-induced inflammation

Measurement	Normal	Carrageenan					
	0 day	0 day	1 day	2 day	3 day	4day	5 day
Initial body weight (g)	124.1±5.8	124.0±5.9	124.4±4.8	124.3±5.0	124.1±3.7	124.3±3.8	124.1±4.8
Final body weight (g)	240.8±3.7	247.2±8.8	237.6±5.6	250.3±7.0	239.6±6.8	262.0±6.4	272.3±11.8
Body weight gain (g/day)	—	—	-4.3±1.4	-1.8±4.3	2.70±4.0	18.8±3.9*	30.5±5.3*
Food intake (g/day)	—	—	18.6±1.8	18.1±1.8	16.2 ±1.4	20.2±1.6	20.3±1.4
Liver weight (g/100 g BW)	4.92±0.13	5.20±0.23	5.61±0.21	5.44±0.21	4.64±0.22	4.25±0.11*	4.42±0.17*
Pouch fluid (mL)	—	—	4.64±0.34	4.94±0.46	5.00±0.59	6.48±0.58*	4.64±0.48
Serum T-Ch (mmol/L)	2.77±0.28	2.48±0.13	2.04±0.26	2.49±0.21	2.23±0.22	2.37±0.15	2.35±0.30
Liver T-Ch (μ mol/g liver)	5.12±0.23	5.19±0.29	5.19±0.25	5.79±0.27	5.65±0.15	5.54±0.27	5.50±0.40

Each value represents the mean $\pm$ SEM for 5 rats. *Significantly different from the Car-0 day group at $P<0.05$ by Student's t -test.

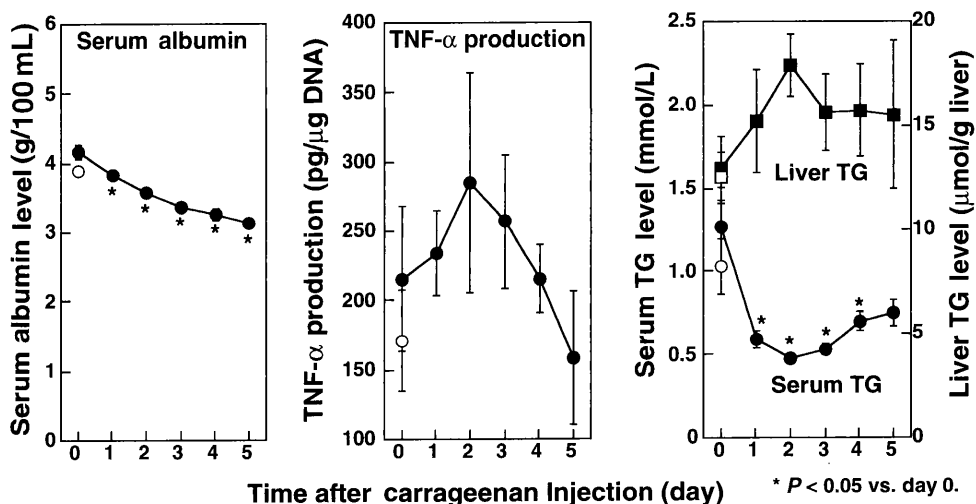


Fig. 1. Changes in serum albumin, TNF- α production and triglyceride (TG) levels in rats with carrageenan-induced inflammation.

Table 3. Effect of a soy protein isolate (S) diet on growth, food intake, organ weights, pouch fluid volume and serum and liver cholesterol levels

Measurement	Normal	Carrageenan	
	20C	20C	20S
Body weight gain (g/3 days)	28.4 $\pm$ 0.8*	7.3 $\pm$ 2.7	9.3 $\pm$ 3.0
Total food intake (g/3 days)	67.3 $\pm$ 4.5*	48.7 $\pm$ 2.8	53.7 $\pm$ 3.9
Liver weight (g/100 g BW)	4.98 $\pm$ 0.10*	5.41 $\pm$ 0.13	4.92 $\pm$ 0.13*
Kidney weight (g/100 g BW)	0.93 $\pm$ 0.01*	1.11 $\pm$ 0.03	1.07 $\pm$ 0.04
Spleen weight (g/100 g BW)	0.50 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02
Pouch fluid (mL)	—	6.83 $\pm$ 0.18	5.03 $\pm$ 0.47*
Serum T-Ch (mmol/L)	2.18 $\pm$ 0.13	1.99 $\pm$ 0.13	2.32 $\pm$ 0.15
Liver T-Ch (μ mol/g liver)	4.97 $\pm$ 0.20*	6.28 $\pm$ 0.14	6.57 $\pm$ 0.25

Each value represents the mean $\pm$ SEM for 6 rats. *Significantly different from the Car-20C group at $P < 0.05$ by Student's t -test.

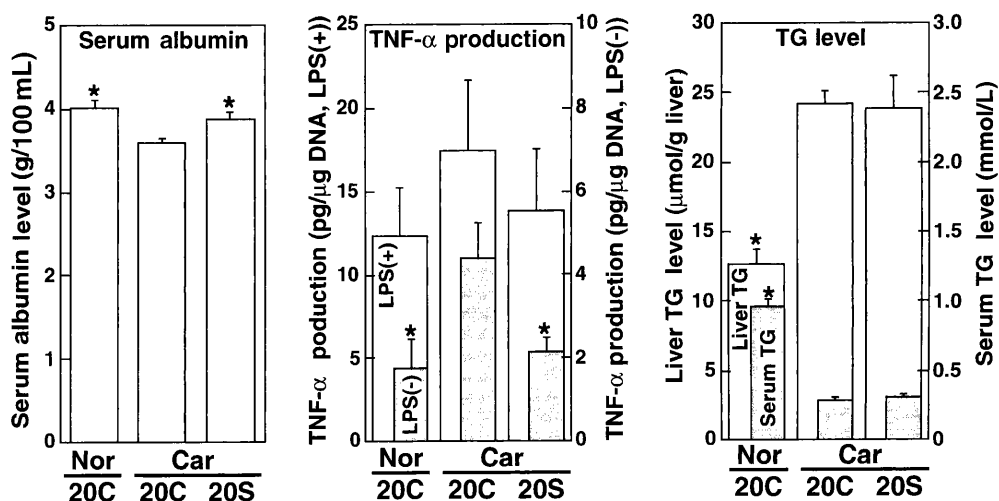


Fig. 2. Effect of a 20% soy protein isolate diet on serum albumin, TNF- α production and TG levels in rats with carrageenan-induced inflammation.

しはじめ5日目には正常レベルに復した。肝TG含量も2日目に最大となり、以後3日目に低下し5日目まではほぼ同じ含量を維持した。一方、肝TG蓄積とは逆に、血清TGは炎症惹起後1日目から低下し3日目まで同様な低値を示し、4日目から上昇の方向に転じた。すなわち、肝からのTG分泌抑制がTG蓄積の一因であることを示唆している。

以上のように、炎症惹起後2日目にTNF- α 産生能と肝TG含量が極大となることが明らかとなった。そこで、予め20Cまたは20Sを13日間摂取させたラットに空気嚢を作り、翌日(14日目)カラゲニンで炎症を惹起し、炎症惹起2日後の血清と肝のTG含量、肉芽腫内浸出液量、腹腔マクロファージのTNF- α 産生能、血清アルブミン濃度等を比較した。このとき、対照として無処理の20C摂取ラットを用いた。その結果、Table 3に示したように、炎症惹起により食下量と体重増加量が有意に低下すること、この低下に対し有意差はないものの20Sは改善する方向に作用することが認められた。また、炎症惹起により、肝と腎の相対重量が有意に増し、20Sはこの増加を有意に抑制する(肝)かその傾向(腎)を示した。脾重量は3群間で差はなかった。興味深いことに、抗炎症効果の最も簡便な指標である炎症組織浸出液量は20C群に比べ20S群で有意に低下した。肝T-Ch含量は炎症により有意に増加したが、20Sはこの増加にさらなる影響を与えなかった。血清T-Ch濃度は、炎症惹起でやや低下し20Sで少し上昇したものの、有意な変化ではなかった。

Fig. 2に示したように、炎症惹起により負の炎症マ

ーカーである血清アルブミンの濃度が有意に低下した。この炎症性低アルブミン血症は、20Sの摂取により有意に軽減化された。すなわち、SPIが抗炎症的に作用することがここでも示された。マクロファージの培養時にLPSが存在する場合(LPS(+))でも存在しない場合(LPS(-))でも、炎症惹起によりTNF- α 産生能は上昇し、20Sの摂取によりその上昇は抑制された。とくにLPS(-)時の炎症惹起と20S摂取の効果は有意であった。肝TG含量は炎症惹起により有意に増加し、軽度の脂肪肝を示した。20Sの摂取はこの状況を改善できなかった。血清TG濃度は、逆に炎症により有意に低下し、20Sはこの低下になんらの影響も与えなかった。これらの結果から、炎症時の肝TG蓄積の一因が肝から血中へのTG分泌の低下によるものであることが強く示唆された。

以上の成績は、SPIが抗炎症的に作用することを強く示唆している。SPIは炎症時の肝TGの蓄積を抑制できなかったが、この蓄積は一過性であることから炎症治癒に伴って軽減化すると考えられる。SPI中のどのような要因あるいは成分が抗炎症作用を示すのか興味を持たれるところである。食品因子で抗炎症作用を示すものとしてブドウ果皮中の抗酸化性物質スチルベン⁷⁾が知られているが、われわれはこの因子が糸球体腎炎の諸症状を軽減化することを見いだしている⁸⁾。大豆たん白質にも同様の機能性を持つ成分の存在が考えられ、そのような因子の同定が今後の課題である。

要 約

カラゲニン誘発炎症モデルラットにおける腫瘍壊死因子 α (TNF)産生能と脂質代謝異常に対する分離大豆たん白質(SPI)の影響を検討した。背部皮下に作製した空気ドームへのカラゲニン注射の2日後、ラットの血清トリグリセリド(TG)とアルブミン濃度は低下し、逆に肝TG含量とマクロファージによるTNF産生能は上昇した。あらかじめ20%SPI食を2週間摂取させておくと、同様に20%カゼイン食を摂取させたときに比べ、カラゲニン注射2日の肉芽組織内浸出液量を低下させ、カラゲニン注射によって上昇するTNF産生能を低下させた。また、20%SPI食はカラゲニンによって誘発される一過性の肝TG蓄積は抑制しなかったが、炎症時に発生する低アルブミン血症を改善した。これらの結果から、SPIには抗炎症作用のあることが示唆された。

文 献

- 1) 矢ヶ崎一三, 小松 渡, 三浦 豊(1998): サイトカイン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.

- 2) 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捕捉の影響. 大豆たん白質研究, **2**, 106-111.
- 3) 矢ヶ崎一三, 山田竜彦, 金子正治, 三浦 豊 (2000): 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. 大豆たん白質研究, **3**, 48-53.
- 4) Yagasaki K (1998): Dietary control of abnormal lipid metabolism secondary to hypothyroidism, cancer and inflammatory diseases. *Recent Res Devel Lipids Res*, **2**, 21-28.
- 5) Kawasaki M, Funabiki R and Yagasaki K (1998): Effects of dietary methionine and cystine on lipid metabolism in hepatoma-bearing rats with hyperlipidemia. *Lipids*, **33**, 905-911.
- 6) 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.
- 7) Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC and Pezzuto JM (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **275**, 218-220.
- 8) Nihei T, Miura Y and Yagasaki K (2001): Inhibitory effect of resveratrol on proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia in nephritic rats. *Life Sci*, **68**, 2845-2852.