

**イソフラボンアグリコンが血栓形成傾向に及ぼす影響：
apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウス頸動脈血栓形成法を用いた研究**

井尻吉信^{1,2}・三浦真由子^{1,2}・橋本 賢^{1,2}・高 智美^{1,2}・窪田 彬³・
渡邊定博⁴・大岩和弘⁵・福永千鶴⁶・奥田豊子⁷・山本順一郎^{*1,2}

¹神戸学院大学栄養学部 ²神戸学院大学ハイテクリサーチセンター

³兵庫医科大学病院病理部 ⁴神戸市看護大学基礎医学系 ⁵通信総合研究所生体物性研究室

⁶(財)加古川総合保健センター ⁷大阪教育大学教養学科

**Effect of Isoflavone Aglycone on Thrombogenicity Assessed by the Mouse Carotid
Artery Thrombosis Method Using apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}Double Knockout Mice**

Yoshinobu IJIRI^{1,2}, Mayuko MIURA^{1,2}, Masaru HASHIMOTO^{1,2}, Tomomi TAKA^{1,2},
Akira KUBOTA³, Sadahiro WATANABE⁴, Kazuhiro OIWA⁵, Chizuru FUKUNAGA⁶,
Toyoko OKUDA⁷ and Junichiro YAMAMOTO^{1,2}

¹ Faculty of Nutrition, Kobe Gakuin University, Kobe 651-2180

² High Technology Research Center, Kobe Gakuin University, Kobe 651-2180

³ Department of Surgical Pathology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663-8501

⁴ Division of Basic Medical Science, Kobe City College of Nursing, Kobe 651-2103

⁵ Communications Research Laboratory, Kansai Advanced Research Center, Kobe 651-2492

⁶ Kakogawa Synthetic Public Health Center, Kakogawa, Japan 675-0101

⁷ Department of Ars and Sciences, Osaka Kyoiku University, Kashiwara 582-8582

ABSTRACT

Thrombosis is deeply involved in life style-related diseases and prevention of these diseases by diet is very important. However, suitable animal models to demonstrate epidemiological results by experiments have been poorly established. The aim of the present study was to establish the animal model, which can evaluate the effect of diet on thrombogenicity, and to demonstrate antithrombotic effect of isoflavone aglycone using the animal model. Congenital atherogenic mice, apolipoprotein E and LDL receptor double knockout mice (apoE^{-/-} and LDLR^{-/-}), were used. Helium-neon laser-induced carotid artery thrombosis method and the cross section method of carotid artery were used to evaluate thrombotic tendency and atherogenicity, respectively. Diet models were prepared on the basis of Western and Japanese diets in 1970s and AIN93G. These were given to mice for 4 or 8 weeks. Western diet feeding with high

*〒 651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬 518

fat (40% in energy) resulted in significant enhancement of thrombotic tendency and atherogenicity. Isoflavone aglycone supplemented in Western diet suppressed enhanced thrombotic tendency. *Soy Protein Research, Japan* 4, 107-116, 2001.

Key words : thrombosis, animal model, atherogenic mice, diet, isoflavone

生活習慣病予防法の確立は緊急の課題であり、様々な方針が提案されている。しかし、方針が変更されることも希ではなく、消費者の信頼を十分に得ているとは言い難い。疫学研究は有益な情報を提供しているが、関連因子が数限りなくあり、原因を特定することが難しい。疫学研究の成果を更に有益にするためにも、動物実験による検証が必要である。

食事は生活習慣病に大きく関与しており、また血栓形成は生活習慣病発症・進展に深く係わっている。食事と血栓に関する研究においては、しばしば動物実験が行われる。しかし、これらの実験においては健常な動物が用いられ、また我々の日常の食事内容から大きく異なった組成の食餌が与えられている。また血栓形成傾向も血栓性マーカーなど多くの分析的な測定結果から推測されている。そこで食事と血栓の研究においては、新たなアプローチが望まれる。我々は、疾患動物と新しい血栓形成傾向測定法を用いて、食餌が血栓形成傾向に及ぼす影響を明らかにすることを企図した。

近年、発生工学的手法は著しい進歩を遂げており、特定の遺伝子をマウスに導入あるいは欠失させて、トランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスを創出することを可能にした。本研究では Apolipoprotein E (apoE) と Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) の両者を欠損している先天性動脈硬化マウス (apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウス, DK マウス) を用い、この頸動脈にヘリウム-ネオン (He-Ne) レーザーを照射して血栓を形成し、血栓形成傾向を判定するという方法¹⁾を用いて、高脂肪食 (西欧食) が血栓形成傾向と動脈硬化に及ぼす影響、および大豆食品に含まれるイソフラボンが、高脂肪食による血栓形成傾向の亢進を抑制するか否かを検討した。

方 法

実験材料

実験動物：apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}DK マウスは Jackson Laboratories (USA) から購入した。兄妹交配して繁殖させて生まれた雄性 DK マウスを実験に用いた。マウスは神戸学院大学動物飼育室 (明暗それぞれ12時間、室温 22.5 ± 0.5℃、湿度 55 ± 5%) で、全飼育期間を

通じてチップケージ (ソフトチップ, 日本 SLC (株), Japan) 上で飼育した。水は水道水を用い自由に摂取させた。実験動物の取り扱い、日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本方針」および「神戸学院大学研究・教育遂行上の生命倫理に関する申し合わせ」に従った。

飼料：精製飼料を配合して実験食を調整した。用いた精製飼料は以下の通りである。ミルクカゼイン、 β -コーンスターチ、シュクロース、セルロースパウダー、ミネラル混合、ビタミン混合およびビタミン E を除去したビタミン混合 (以上オリエンタル酵母工業 (株), Japan)、大豆油 (不二製油 (株), Japan)、精製牛脂 (植田製油 (株), Japan)、バター (明治乳業 (株), Japan)、L-シスチン、コレステロール (以上ナカライテスク (株), Japan)、重酒石酸コリン、第3ブチルヒドロキノン (以上和光純薬工業 (株), Japan)、サンスター (株) より提供されたイソフラボンアグリコン (SoyAct, キッコーマン社製、純度 30.3% (ゲニステイン 41.3%, ダイゼイン 52.5%, グリシテイン 6.2%))。

薬剤：麻酔剤：Sodium pentobarbital (Nembutal, 50 mg/mL, Abbott Lab, USA) を用いた。Evans blue：Merck 社製 (Germany) Evans blue を生理食塩水で種々の濃度に希釈して用いた。

実験方法

餌実験プロトコル：

1) 高脂肪食実験 (西欧食)

実験食の組成は、AIN93G²⁾をもとに、1970 年代の日本および西欧における脂質摂取量を反映させるようにした (Table 1)。脂肪エネルギー比 16% の餌をコントロール食 (日本食) とし、脂肪エネルギー比 40%、コレステロール 0.05% の餌を高脂肪食 (西欧食) とした。粉末飼料は終濃度 0.6% になるように添加した寒天を用いて固型とし、給餌まで -30℃ の冷凍庫で保存した。DK マウスに標準固型飼料 CE-2 (日本クレア (株), Japan) を 6 週齢まで与え予備飼育した後、4 週間及び 8 週間実験食を与えた。

2) イソフラボンアグリコン添加実験

本実験では、上述の西欧食を改変した餌 (ビタミン混合をビタミン E 除去のビタミン混合に変え、更にアルミナカラムでトコフェロールを除去した大豆油を使

Table 1. Ingredients of two diet models prepared on the basis of Japanese and Western diets in 1970s and AIN93G

Ingredient	Japanese diet		Western diet	
	g	kcal	g	kcal
Casein	20	80	23.2	92.8
Cystine	0.3	1.2	0.3	1.2
Corn starch	52.9	211.8	36.2	145.0
Sucrose	10	40	9.95	39.8
Soy oil	7	63	3	27
Butter	0	0	7.5	67.5
Beef tallow	0	0	10	90
Cellulose	5	0	5	0
Mineral mixture	3.5	0	3.5	0
Vitamin mixture	1	4	1	4
Choline bitartrate	0.25	0	0.25	0
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.0014	0	0.0041	0
Cholesterol	0	0	0.05	0
Total grams and kcal	100	400.0	100	467.3
Macronutrient content	%kcal		%kcal	
Protein	20		20	
Carbohydrate	64		40	
Lipid	16		40	

Table 2. Ingredients supplemented by isoflavone aglycone

Ingredient	Control	IF1	IF2	IF3
	(VE poor Western diet)	(3.5 mg/kg diet)	(35 mg/kg diet)	(350 mg/kg diet)
Casein	23.2	23.2	23.2	23.2
Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	36.2	36.2	36.2	36.2
Sucrose	9.95	9.95	9.95	9.95
Soy oil (vitamin E free)	3	3	3	3
Butter	7.5	7.5	7.5	7.5
Beef tallow	10	10	10	10
Cellulose	5	5	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (Vitamin E free)	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.0041	0.0041	0.0041	0.0041
Cholesterol	0.05	0.05	0.05	0.05
Soy Act	0	0.00035	0.0035	0.035
Total grams	100	100	100	100

用)をコントロールとし(以下, VE 非添加西欧食), これに 3.5 (IF1), 35 (IF2), 350 (IF3) mg/kg diet の Soy Act を添加した実験食を調製した (Table 2). なお Soy act は, エタノールに懸濁してから大豆油に添加した. 粉末飼料は前述した方法により固型にし, 凍結保存した. 各種の餌は 6 週間の予備飼育後, 8 週間

与えた.

He-Ne レーザー惹起マウス頸動脈血栓形成法:
Nembutal をマウス殿筋に注射し, 麻酔した (65 mg/kg body weight). 注射 20 分後, 左大腿動脈にポリエチレンチューブ (PE10, Becton Dickinson and Company, USA) を留置した. 次いでマウス頸部を切

開し、左総頸動脈を露出、乾燥を防ぐため随時 37℃ の生理食塩水を滴下した。手術を施したマウスは 37℃ に加温した顕微鏡載物台上に固定した (Model CH-2, オリンパス (株), JAPAN)。石英ファイバーを用いて鏡筒内に導入、ダイクロイックミラーで反射、対物レンズ ($\times 4$) により集光 ($200\text{ }\mu\text{m}$ at focal plane) した He-Ne レーザー (Model NEO-50MS, 日本科学エンジニアリング, JAPAN) をマウス頸動脈 (径 $450 \sim 500\text{ }\mu\text{m}$) に照射した。血栓形成はカニューレより Evans blue を動注して開始させた。血栓形成過程は頸動脈を落射照明装置で照明し (Model LG-PS2, オリンパス (株), Japan), 鏡筒上部に設置した CCD カメラを介して (Model TMC-7, 竹中機器システム (株), Japan), パソコンに取り込んだ (Macintosh Power Mac G3) (Fig. 1)。Evans blue 動注から 10 秒間隔で 10 分間、合計 60 枚の画像を取り込んだ。

血栓サイズ解析法と易血栓性 (血栓形成傾向) の評価: 血栓画像をパソコンに取り込み、画像解析ソフト Image Analyst Software (Automatix Inc, USA) を用いて血栓面積の算出を行った。すなわち画像に一定の輝度閾値を与えて血栓の輪郭を求め、輪郭内の面積を計測した (Fig. 2A)。この値に輝度値を乗じて積分光学濃度を求め、これを血栓サイズの近似値とした (Fig. 2B, 3 次元表示)。

Fig. 3 に血栓形成開始から 600 秒間にわたる血栓サイズの経時的变化を示す。成長した血栓は飛翔血栓として血流により流されるが、増減を繰り返した。Evans blue 動注から 10 分間、合計 60 枚の画像の血栓サイズを計測し、合算したものを易血栓性の指標とした (Fig. 4)。

透過電子顕微鏡による血栓の形態的観察: 頸動脈にレーザー照射で血栓を形成した後、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4) で血管表面を洗った。次いで、2.5% グルタルアルデヒド (ナカライテスク (株), Japan) で 15 分間固定し、頸動脈を切り出しさらに 2.5% グルタルアルデヒドで 60 分間固定、PBS で洗浄、最後に 1% 四酸化オスミウム (Merck, Germany) に移し変え 60 分間固定を行い、次いで蒸留水で洗浄した。固定を終えた頸動脈は、アセトンシリーズで脱水後、エポキシ樹脂に包埋した。準超薄切片をトルイジンブルー (TAAB Laboratories Equipment Ltd, England) で染色し、血栓を確認した後、超薄切片を作成し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色を行い、透過電子顕微鏡 (Model JEM2000EX, 日本電子 (株), JAPAN) にて加速電圧 80kV で観察した。

動脈硬化測定法 (Cross section 法): 右総頸動脈に続く内頸動脈と外頸動脈への分岐部分を評価の対象と

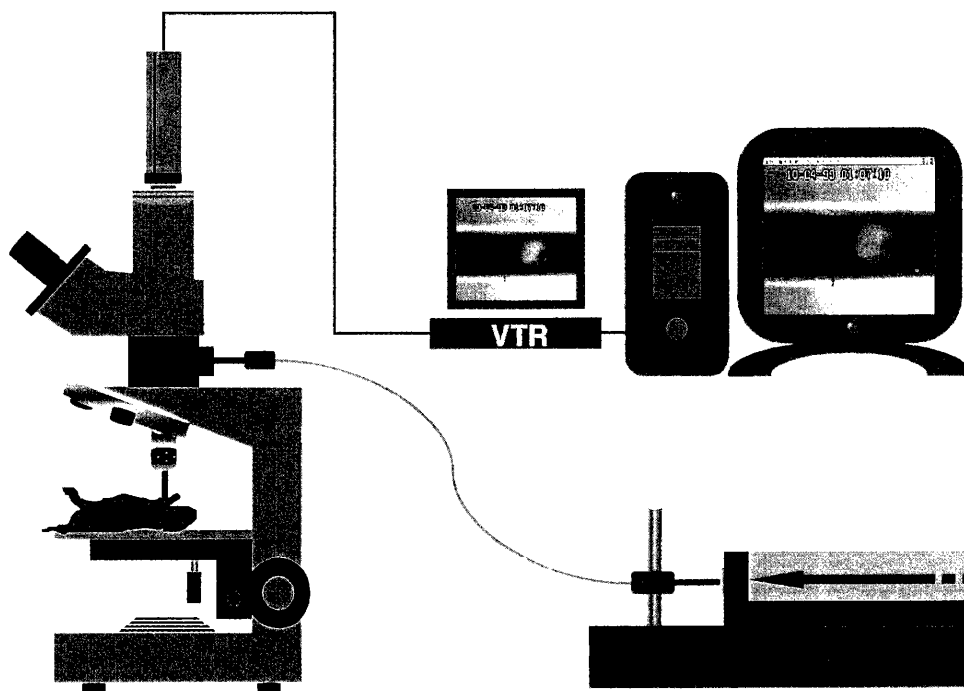


Fig. 1. He-Ne laser-induced mouse carotid artery thrombosis system.

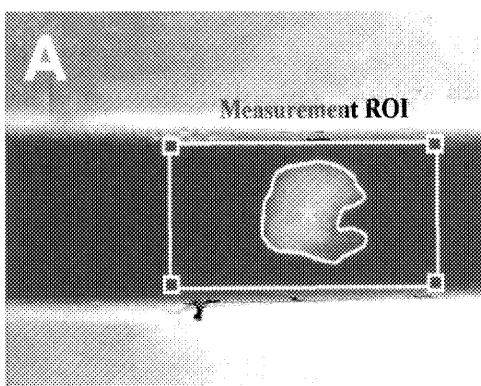


Fig. 2A. A thrombus delineated by computer.

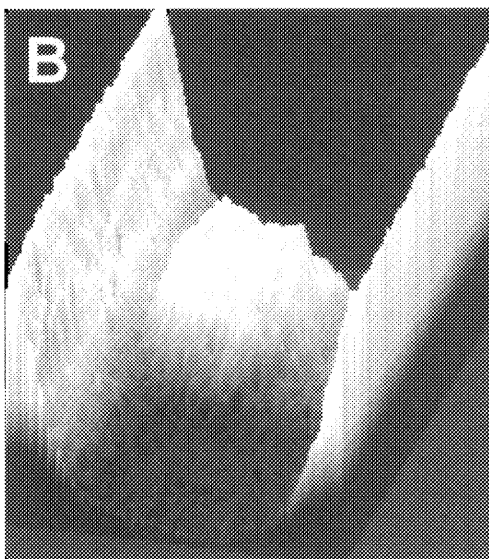


Fig. 2B. Three dimensional feature of a thrombus.

した。以下に手順を記す。左総頸動脈を用いた血栓形成実験終了後、マウス胸部を開切し、左心室に翼状針（トップ化成（株），Japan）を留置した。そこからPBSを50 mL 灌流させ、血管内を洗浄した後、10% 中性緩衝ホルマリン溶液（ナカライテスク（株），Japan）を同じく50 mL 流し、灌流固定した。切り出した右総頸動脈はパラフィン包埋後、厚さ2 μm の連続横断切片とし、それを10枚毎に1枚採用して、エラスチカワンギーソン染色（弾性線維染色）を行った。横断切片は内頸動脈と外頸動脈への分岐部を中心としてMiddle, Proximal, Distal 部に分け、各セクション毎7枚ずつを評価対象とした。切片像は、顕微鏡上部に取り付けたデジタルカメラ（Model Camedia 3030 Zoom, オリンパス（株），Japan）で取り込み、画像解析ソフトを用いて、動脈硬化度の測定を行った。画像解析ソフトに

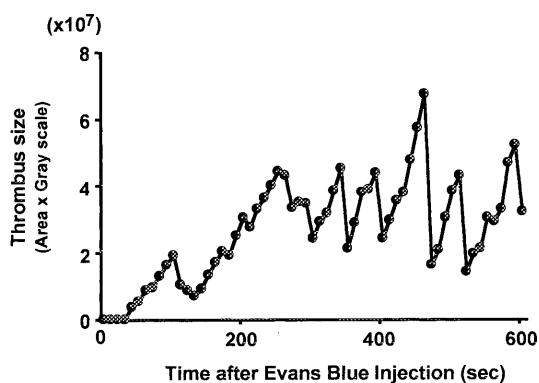


Fig. 3. Change in thrombus size over time.

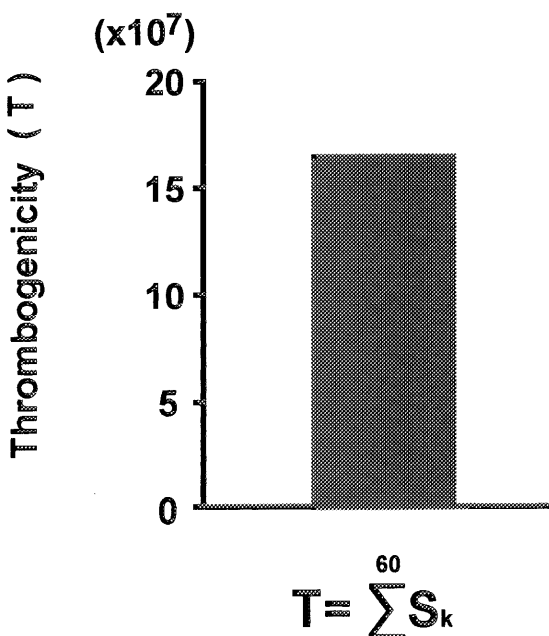


Fig. 4. An index of thrombogenicity.

は Adobe Photoshop ver 5.0 および NIH Image ver 1.62, Power Macintosh を用いた (Fig. 5). 定法に従いまず内弾性板の長さを測定し、そして周囲長から正円を求め、血管内腔正円推定面積 (A) を算出した。次いで白抜き矢印で示される泡沫細胞で満たされた内膜肥厚部位の面積 (B) を測定した。それらより、血管内腔に対する肥厚部位の割合 (B/A) を求めて内膜肥厚度、すなわち動脈硬化度を算出した。

統計処理

統計学的有意差検定には ANOVA を用い、post hoc には Fisher PLSD を用いた。この解析は市販の統計用ソフトで行った (StatView ver 5.0, SAS Inc, USA)。結果は mean $\pm$ SEM で表し、 $P < 0.05$ を統計学的に有

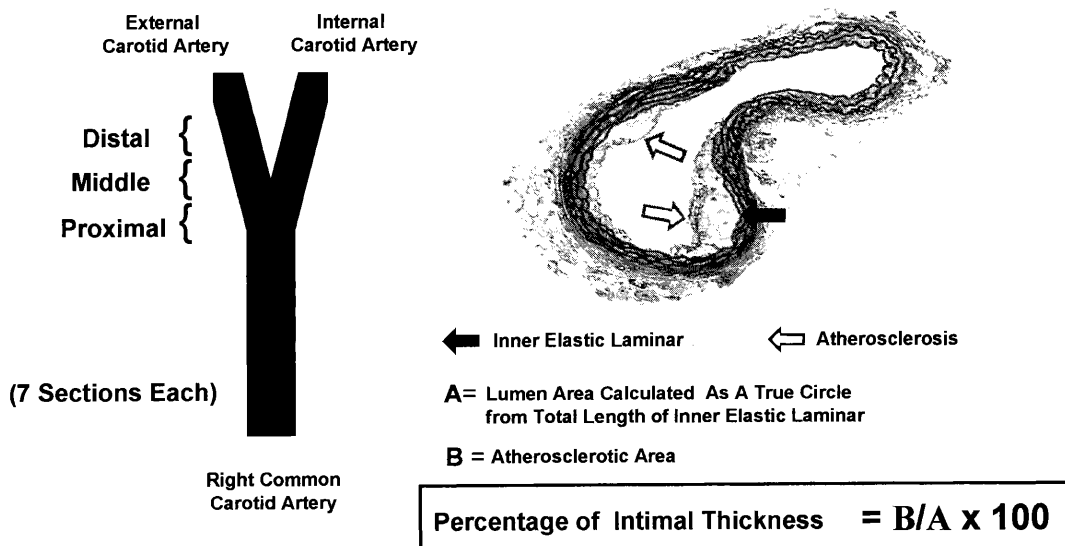


Fig. 5. Assessment of atherogenicity by intimal thickness, measured according to the cross section method.

意差ありとした。

結 果

電子顕微鏡による血栓の形態的観察

8 週間日本食および西欧食を摂取させた DK マウスに形成させた血栓を電子顕微鏡で観察したところ、グループ間で血栓の形態的な違いは認められなかった。また各グループとも血栓内部には脱顆粒をおこした血小板が詰まっており、それを覆うように顆粒のある血小板が重なっていた。この観察から血栓は血小板主体の血栓であることが示された。血管内皮細胞の剥離は観察されず、血小板が同細胞上に粘着・凝集していることが示された。

高脂肪食実験（西欧食）

a) 西欧食が血栓形成傾向に及ぼす影響：結果を Fig. 6 に示す。4 週間の給餌実験では日本食を与えた群に比べ、西欧食を与えた群で血栓形成傾向の有意な増大が認められた。また 8 週間の給餌では日本食を与えた群に比べ、西欧食を与えた群で更に劇的な血栓形成傾向の増大が認められた。給餌期間の比較では、日本食の場合 4 週間と 8 週間の間には有意差がなかったが、西欧食群においては、摂取期間に依存して血栓形成傾向が有意に増大することが認められた。

b) 西欧食が動脈硬化に及ぼす影響：給餌 4 週間では内膜肥厚がほとんど見られず、日本食と西欧食群間に有意差は認められなかった。しかし給餌 8 週間にお

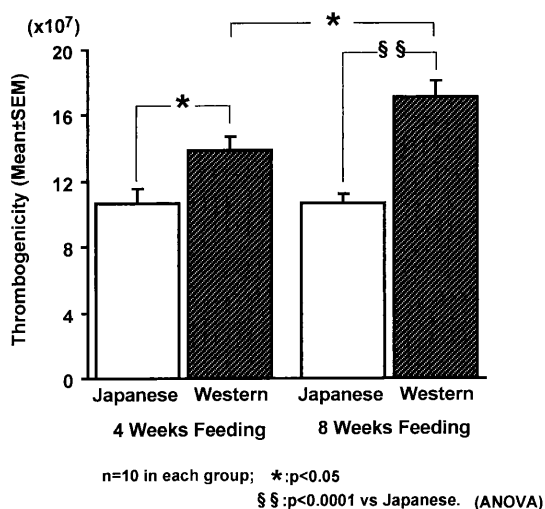


Fig. 6. Effect of Japanese and Western diets on thrombogenicity assessed by the mouse carotid artery thrombosis method in apoE^{-/-} · LDLR^{-/-} double knockout mouse.

いては、分岐前 Proximal の部位において、西欧食群で動脈硬化度の有意な増大が認められた (Fig. 7)。

イソフラボンアグリコン添加実験

イソフラボンアグリコンが血栓形成傾向に及ぼす影響：コントロール群に比べ、3.5 (IF1), 35 (IF2), 350 (IF3) mg/kg diet の Soy Act を添加した群において、血栓形成傾向の有意な抑制が認められた (Fig. 8)。3.5 ~ 350 mg/kg diet 群間 (IF1 ~ IF3 群間) には有

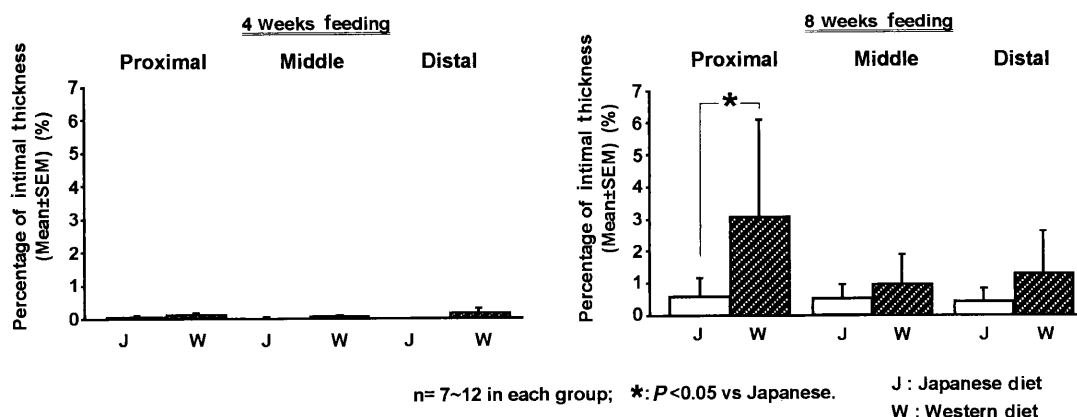


Fig. 7. Effect of Japanese and Western diets on atherogenicity assessed by the cross section method in apoE^{-/-} · LDLR^{-/-} double knockout mouse.

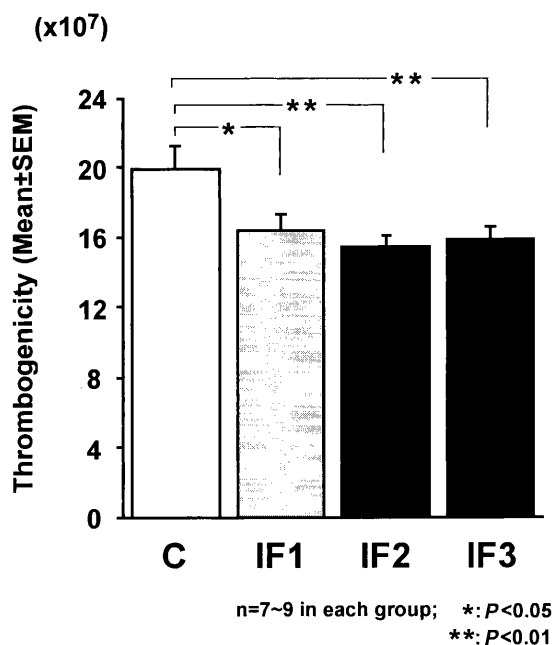


Fig. 8. Effect of isoflavone aglycone on thrombogenicity induced by Western diet, assessed by the mouse carotid artery thrombosis method in apoE^{-/-} · LDLR^{-/-} double knockout mouse.

意差は認められなかったものの、3.5 mg/kg diet に比べ、35 mg/kg dietの方が血栓形成傾向の抑制が顕著であり、イソフラボンの抗血栓作用は投与量に依存していることが示唆された。

考 察

心筋梗塞や脳卒中はもちろんのこと、多くの生活習

慣病としての血管病変に血栓形成が深く関与している。従って血栓症の予防は生活習慣病の予防にとって重要である。種々の予防法が提案され実行されているが、食事による予防は効果的であり、基本的な重要性をもつ。しかし生活習慣病予防を目的にした食事指針は、これまで十分な信頼を得ているとはいえない。それは例えばある時に推奨された脂肪酸が時と共に変った等に起因する。この混乱をもたらした理由の一つは、原因と結果の関係が適切な方法を用いて実証されていないことにある。本研究の目的は食餌が血栓形成傾向に及ぼす影響を実証できる方法を確立することおよび確立された方法を用いてイソフラボンアグリコンの抗血栓作用を実証することであった。

広く用いられてきた血栓形成傾向測定法では、血栓関連因子が定量され、これらの分析値を総合して血栓形成傾向が推測される。しかし多くの研究結果は、このアプローチにより血栓形成傾向を推測することが極めて難しいことを示している。かつて我々は健常ラット腸間膜微小血管にHe-Neレーザー照射により血栓を作る方法³⁾を用いて、食餌が血栓形成傾向に与える影響を検討した。この方法は血栓形成傾向測定法としては優れていると考えられたが、1%コレステロールを含む高脂肪食を与えても、血栓形成傾向の変化を実証することができなかった(未発表)。そこで本実験において、健常ラットを疾患マウスに変えて、高脂肪食(西欧食)が血栓形成傾向へ影響を与えるか否かを検討することにした。

血栓形成が動脈硬化と密接な関係にあることは広く認められているところである⁴⁾。そこで本血栓研究においては、疾患マウスとして先天的動脈硬化 apoE^{-/-} · LDLR^{-/-} のダブルノックアウトマウスを用いることに

した。このマウスは Ishibashi らによって創出された先天的動脈硬化マウスである。このマウスは普通食を与えても重度の高脂血症と動脈硬化症を呈する。リポ蛋白質パターンおよび血漿コレステロール値が親マウスの C57BL/6 と異なっていることは勿論のこと、LDLR^{-/-}あるいは apoE^{-/-}ノックアウトマウスとも異なっている⁵⁾。

He-Ne レーザー惹起血栓形成法は Kovacs と Gorog によって確立された⁶⁾。本法においては Evans blue の静注とレーザー照射が組み合わされている。青い色素の Evans blue は He-Ne レーザーの赤い光を吸収してそのエネルギーを熱に変える。そのため照射部位の血管内皮に熱による障害が起こる。障害は血小板の粘着と凝集を惹起して血小板を主体とする血栓を形成させる。生活習慣病において重要な役割を果たす血栓は動脈にできるものであり、この血栓形成においては血小板が中心的な役割を果たす。静脈血栓形成においても血小板の役割は重要である。従って He-Ne レーザー照射によって形成される血栓モデルは、ヒトにおける血栓症研究のよいモデルになりうると考えられる。

本実験は apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}DK マウスと He-Ne レーザー惹起血栓形成モデルの組合せが、食餌の血栓形成傾向への影響を検討するよいモデルとなりうることを示した。この組合せで得られた本結果は、脂肪を多く含む西欧食が血栓形成傾向を亢進させること実証した。これは初めての報告である。代表的な高脂血症動物である渡辺ウサギは多くの動脈硬化研究に用いられているが、このウサギにおいても、高脂肪食が血栓形成傾向を亢進するとする結果は未だ得られていない。ラットやマウスを用いた実験においては、高脂肪に加えて、我々の日常生活からは考えられないような 1%ものコレステロールが餌に添加されている。にもかかわらず血栓形成傾向の亢進を示した報告はない。一方、食餌が血小板凝集に及ぼす影響を検討した報告は多数ある。これらの研究においては、血小板凝集能はアゴニスト惹起血小板凝集法 (*in vitro*) で測定されている。しかし、この方法で得られた結果が *in vivo* の血小板凝集能をどれだけ反映しているかについては、疑問の残るところである⁷⁾。

イソフラボンは大豆に含まれる代表的なポリフェノールである。イソフラボンが種々の生活習慣病を予防

するとする疫学研究やその他の種々の研究がある⁸⁾。日本人の食事の組成が西欧化されている現状を考慮に入れ、本研究では西欧食にイソフラボンを添加して、その抗血栓作用を検討した。なお、イソフラボン添加実験においては、ビタミン E を含まないビタミン混合とビタミン E を除去した油を用いた。餌に含まれるビタミン E を少なくしたのは、ビタミン E もイソフラボンも共に抗酸化作用を持つことが報告されており、ビタミン E が多量にある条件下ではイソフラボン添加の影響が検出され難いと考えたからである。

日本人 1 日当たりのイソフラボン摂取量は 17.96 mg⁸⁾、30 mg⁹⁾、50 mg¹⁰⁾と報告されており、これらの値は西欧人の摂取量 3 ~ 5 mg⁹⁾に比べて多い。本実験においては、摂取量 17.96 mg 値に基づきマウスへの投与量を単純計算し、3.5 mg/kg diet を最少量とした。この最小投与量ですでに血栓形成傾向の抑制が認められた。この投与量、10 倍量および 100 倍量投与群間には有意差は認められなかった。しかし、3.5 mg/kg diet より 35 mg/kg diet の方が、血栓形成傾向の抑制が強い傾向が認められ、35 mg/kg diet までは効果が投与量に依存しているように思われた。

イソフラボンの血栓形成傾向抑制機序の解明は今後の課題である。しかし、酸化 LDL が動脈硬化促進に重要な役割を果たしていることが明らかにされている¹¹⁻¹³⁾。また、イソフラボンがリポ蛋白質の酸化を阻害するとする多くの報告がある¹⁴⁻¹⁷⁾。従って、イソフラボンが動脈硬化の進展を抑制し、その結果血管内皮の NO 産生能が保持されて、血栓形成傾向増大の抑制がもたらされたのかもしれない^{18,19)}。イソフラボンの 1 カ月間の摂取にもかかわらず、コラーゲン惹起血小板凝集能に変化が認められなかったとする結果は、この考えを支持している²⁰⁾。しかし、コラーゲン惹起凝集が *in vivo* における血小板反応性を反映するかについては問題のあるところであり、生理的なズリ惹起血小板反応性測定法で今後検討する必要がある⁷⁾。

謝辞：本研究を行うに際して、有益なご助言をいただいた山下 勉博士、ご協力をいただいた北森一哉修士に深甚なる謝意を表す。また、本研究は(財)不二たん白質研究振興財団および(財)大阪ガスグループ福祉財団の研究助成金の援助を得て行われた。両財団に対して深甚なる謝意を表す。

要 約

生活習慣病には血栓形成が深く関与しており、これらを食事で予防することは非常に重要である。しかし食餌と血栓形成傾向に関する動物実験では、解決されるべき多くの問題が残されている。そこで我々は、食餌が血栓形成傾向に及ぼす影響を実証できる方法を確認し、その方法を用いてイソフラボンの抗血栓作用を明らかにすることを目的として本実験を行った。実験動物には先天的動脈硬化マウス apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウスを用いた。He-Ne レーザーを頸動脈に照射して血栓を形成した。動脈硬化度は頸動脈横断切片法で評価した。1970 年代の西欧人および日本人の食事組成をモデルにして、高脂肪食（エネルギー比 40%）と低脂肪食（エネルギー比 16%）を調製した。これらを 4 または 8 週間マウスに摂取させた。その結果、高脂肪食は血栓形成傾向および動脈硬化度を有意に増大させた。また日本人が日常摂取する量のイソフラボンアグリコンは、高脂肪食による血栓形成傾向の充進を抑制した。

文 献

- 1) 井尻吉信, 三浦真由子, 橋本 賢, 窪田 彬, 渡辺定博, 大岩和弘, 福永千鶴, 奥田豊子, 山本順一郎 (2000) : 高脂肪食による血栓形成傾向の増大 : 動脈硬化易発症性マウス頸動脈を用いた研究. 血栓止血誌, **11**, 485.
- 2) Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC (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.
- 3) Yamashita T, Tsuda Y, Konishi Y, Okada Y, Matsuoka A, Giddings JC and Yamamoto J (1998) : The antithrombotic effect of potent bifunctional thrombin inhibitors based on hirudin sequence, P551 and P532, on He-Ne laser-induced thrombosis in rat mesenteric microvessels. *Thromb Res*, **90**, 199-206.
- 4) Fuster V (1994) : Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*, **90**, 2126-2146.
- 5) Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL and Brown MS (1994) : The two-receptor model of lipoprotein clearance : Tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 4431-4435.
- 6) Kovacs IB, Tigyi-Sebes A, Trombiras K and Gorog P (1975) : Evans blue: An ideal energy-absorbing material to produce intravascular microinjury by the He-Ne gas laser. *Microvasc Res*, **10**, 107-124.
- 7) 山本順一郎, 佐々木康人, 山下 勉, 高 智美, 鶴木秀夫 (2001) : 抗凝固剤を加えない血液を用いる血小板反応性測定法—*in vivo* の血小板反応性を反映する *in vitro* 測定法の検討—. 血栓止血誌, **12**, 11-16.
- 8) 戸田登志也, 奥平武則, 家森幸男 (1996) : 大豆イソフラボンの機能とその応用. 食品と開発, **31**, 44-47.
- 9) Barnes S, Peterson TG and Coward L (1995) : Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *J Cell Biochem*, **22** (Suppl), 181-187.
- 10) Messina M (1995) : Isoflavone intakes by Japanese were overestimated. Comment on: Am J Clin Nutr, **60**, 333-340. *Am J Clin Nutr*, **62**, 654.
- 11) Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC and Witztum JL (1989) : Beyond cholesterol : Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, **320**, 915-924.
- 12) Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M and Fogelman AM (1990) : Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest*, **85**, 1260-1266.
- 13) Morel DW, Hessler JR and Chisolm GM (1983) :

- Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res*, **24**, 1070-1076.
- 14) Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A and LeBoeuf RC (1998) : Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, **128**, 954-959.
 - 15) Kapiotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H and Gmeiner BMK (1997) : Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 2868-2874.
 - 16) Hadgson JM, Croft KD, Puddey IB, Mori TA and Beilin LJ (1996) : Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *J Nutr Biochem*, **7**, 664-669.
 - 17) Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V and Adlercreutz H (1998) : Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 3106-3110.
 - 18) Ohara Y, Peterson TE and Harrison DG (1993): Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*, **91**, 2546-2551.
 - 19) Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B and Just H (1993) : Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans : Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*, **92**, 652-662.
 - 20) Gooderham MJ, Adlercreutz H, Ojala ST, Wahala K and Holub BJ (1996) : A soy protein isolate rich in genistein and daizein and its effects on plasma isoflavone concentration, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. *J Nutr*, **126**, 2000-2006.