

大豆イソフラボングルコシドおよびアグリコンの血栓予防効果： apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウスを用いた研究

山本順一郎^{*1}・井尻吉信^{1,2}・村上真由¹・三浦真由子¹・山下 勉¹・橋本 賢¹・大岩和弘³・奥田豊子⁴

¹神戸学院大学栄養学部 ²兵庫大学健康科学部 ³通信総合研究所生体物性研究室 ⁴大阪教育大学教養学科

Effects of Isoflavone Glucoside and Aglycone on Thrombogenicity as Measured Using apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}Double Knockout Mice

Junichiro YAMAMOTO¹, Yoshinobu IJIRI^{1,2}, Mayu MURAKAMI¹, Mayuko MIURA¹,
Tsutomu YAMASHITA¹, Masaru HASHIMOTO¹, Kazuhiro OIWA³ and Toyoko OKUDA⁴

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

²Faculty of Health Science, Hyogo University, Kakogawa 675-0101

³Communications Research Laboratory, Kansai Advanced Research Center, Kobe 651-2492

⁴Department of Art and Sciences, Osaka Kyoiku University, Kashiwara 582-8582

ABSTRACT

Prevention of life style-related diseases, in which thrombogenesis is deeply involved, is the currently important social problem. Diet is undoubtedly one of the important risk factors of the diseases. Therefore, prevention of thrombogenesis is beneficial for that of the diseases. To prevent, prothrombotic state has to be assessed. Currently used multifactorial tests seem not to have succeeded. As thrombus is the result of the interaction among blood cells, blood vessels and blood flow, we established a sensitive and reproducible animal model of thrombogenesis for assessing the effect of diets on thrombotic state. In the model thrombus is formed by He-Ne laser irradiation in the carotid arteries of genetically atherogenic mice deficient both in apolipoprotein E (apoE^{-/-}) and low density lipoprotein receptor (LDLR^{-/-}). We have demonstrated using this model that genistein-rich isoflavone aglycone prevents high fat diet-induced prothrombotic states. However, purity of the isoflavone preparation used in this study was low (30%). Therefore, the results were not conclusive. The aim of the present study was to clarify the antithrombotic effect of isoflavone and to compare the effects of isoflavone forms, glucoside (daidzin and glycitin rich) and aglycone (daidzein and glycitein rich), using the preparation with high purity (glucoside 80%; aglycone 90%). The male mice were raised with commercial solid diet until 6 weeks of age and the test diet feeding started from 6 until 14 weeks of age.

*〒651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬518

Isoflavones were supplemented to the basic high fat diet (40% in energy; control diet) to be 25 mg/kg diet (glucoside), 13 mg/kg diet (aglycone equivalent to 25 mg/kg diet of glucoside in molar concentration) and 650 mg/kg diet (aglycone). Thrombus was formed in the left carotid artery by He-Ne laser irradiation in the presence of Evans blue. He-Ne laser-induced thrombosis method (*in vivo*) revealed that aglycones showed antithrombotic effect at 13 mg/kg diet ($P=0.031$) and at 650 mg/kg diet ($P=0.007$) but not glucoside ($P=0.349$). Shear-induced platelet reactivity test (*in vitro*) showed the antiaggregatory tendency in aglycone at 650 mg/kg diet ($P=0.064$). The results confirmed that daidzein and/or glycitein have antithrombotic effect, but not daidzin and/or glycitin. The antithrombotic effect may be partly due to antiaggregatory effect. Deficiency of antithrombotic effect in glucoside might be due to its lower absorption in the intestine. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 108-116, 2002.

Key words : thrombosis, atherosclerosis, isoflavone, polyphenol, platelets

生活習慣病の予防は大きな社会問題となっているが、生活習慣病の主要な危険因子のひとつは疑いもなく食事である。生活習慣病に血栓形成が深い関わりをもつことから、適切な食事による血栓の予防は生活習慣病の予防にとっても有益であろうと考えられる。

食事と血栓に関する研究においては動物実験が行われることが多い。しかし、これらの研究においては、血液中の幾つかの血栓関連因子を定量し、これらの結果に基づいて推測が行われ結論が導かれ、食事指針が作られてきた。しかしその指針はしばしば変更を余儀なくされ、このことが栄養学に対する人々の信頼を揺らがせてきたように考えられる。より確かな指針を作るためには、できるだけ推論を排するような研究方法を確立・使用することである。

血栓の栄養学的研究において最も重要なことは、血栓形成傾向（血栓準備状態）評価にいかなる方法を用いるかということである。ヒトをはじめ実験動物で汎用されている血栓形成傾向測定法は、血中の血栓性因子定量法である。すなわち多くの因子の測定結果に基づき血栓形成傾向が推測されている。しかし、これらの多因子定量法による血栓形成傾向把握の有効性については限界が指摘されている。そこで我々は、上記の目的に適した評価法を確立することを企図してきた。

血栓は血球、血管壁、血流の相互作用によって形成される。したがって血管内に血栓をつくり、そのでき易さから血栓形成傾向を総合的に評価する方法はより生理的である。我々が採用した測定法は、麻酔下のラット血管をヘリウムネオン（He-Ne）レーザーで照射して血栓をつくり、そのでき易さから血栓形成傾向を評価するものである¹⁾。この評価法が優れていることは幾つかの実験で確かめられた²⁻⁵⁾。食事と血栓に関

する多くの動物実験においては、健常ラットやマウスに非現実的な、多量のコレステロール（1%）やコラー酸が与えられる。しかし、これらの動脈硬化発症に強い抵抗性をもつ動物では、動脈硬化指数が上昇しても、動脈硬化が形態的に確認されることは希であり、血栓形成傾向の亢進の報告も希である。そこで我々は 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) の頸動脈に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動物モデルを確立した⁶⁾。このモデルを用いれば、実際の食事に含まれる程度のコレステロールや高脂肪食が、動脈硬化や血栓形成傾向を亢進させることを証明することができる。そして我々はこの動物モデルを用いて、イソフラボンアグリコン (genistein rich) が血栓予防作用をもつことを明かにした⁷⁾。しかし、この実験に用いられたイソフラボン試料に含まれるイソフラボン含量は30%であり、この試料の血栓予防作用をイソフラボンの効果と結論づけるには無理がある。最近、純度90%のイソフラボンアグリコンと純度80%のイソフラボングルコシドが精製された。

本研究はイソフラボンの血栓予防効果を検討すること、アグリコンとグルコシドのいずれがより強い効果をもつかを明らかにすること、またその効果のメカニズムの一端を明らかにすることを目的として行われた。

材料と方法

材 料

実験動物 apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウスはJackson Laboratory (Bar Harbor, USA) から購入し、神戸学院大学動物飼育室で兄妹交配して繁殖させた。本研究には雄性マウスのみを使用し、全期間を通じて明暗それぞれ12時間、室温22.5±0.5℃、湿度55±5%で飼育した。また水道水と飼料は自由摂取とした。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 精製飼料と天然飼料を配合して半合成食を調製した。用いた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（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）、重石石炭酸コリン、第3ブチルヒドロキノン（以上和光純薬工業(株), Japan）、(株)豊年より提供されたイソフラボングルコシド（純度78.4%（daidzin 34.2%, glycitin 35.6%, genistin 6.9%））、およびアグリコン（純度90.7%（daidzein 40.5%, glycitein 43.5%, genistein 6.4%））。

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。

方 法

給餌プロトコル 実験飼料は、AIN93G[®]を改変した高脂肪食（脂肪エネルギー比40%）をコントロールとし⁶⁾、これにグルコシドを25 mg/kg diet含むグルコシド食、イソフラボン部分を同量含むアグリコン食（13 mg/kg diet）およびアグリコンを50倍量含む高アグリコン食（650 mg/kg diet）の4種類の餌を調整した（Table 1）。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形とし、給餌まで-30℃の冷凍庫で保存した。雄性apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウスに標準固形飼料（CE-2, 日本クレア(株), Japan）を6週齢まで与え予備飼育した後、8週間実験飼料を摂取させ種々の測定に用いた。

He-Neレーザー惹起マウス頸動脈血栓形成法 -in vivo- 本法の詳細は別報の通りである^{6,7)}。簡単に述べると、まずNembutal（65 mg/kg body weight）をマウス殿筋に注射し、麻酔した。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（径450~500μm）、石英ファイバーを用いて鏡筒内に導入されたHe-Neレーザー（Model NEO-50MS, ネオアーク(株), JAPAN）を照射した。血栓形成はカニキュレより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）。

Table 1. Experimental diets supplemented by isoflavone glucoside and aglycone

Ingredient	Control	Glucoside	Aglycone	High aglycone
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	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	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
Isoflavone glucoside or aglycone	0	0.0025	0.0013	0.065
Total grams	100	100	100	100

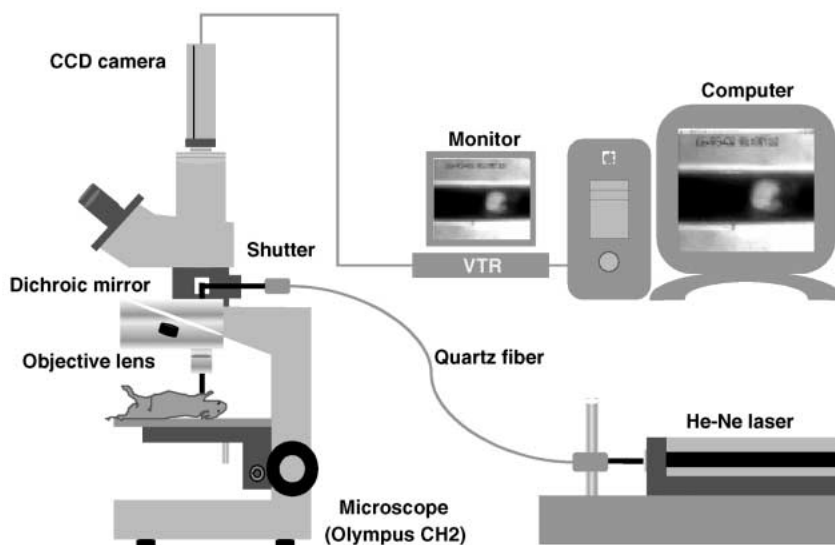


Fig. 1. He-Ne laser-induced mouse carotid artery thrombosis model.

Evans blue動注から10秒間隔で10分間、合計61枚の画像を取り込み血栓サイズの解析に用いた (Fig. 2)。

ズリ惹起血栓形成法 (Haemostatometry) -*in vitro*-

本法はGorogとKovacsによって開発された方法である⁹⁻¹¹⁾。この方法の特徴は、抗凝固剤を添加しない血液を用いて、血液流動下でズリ惹起血小板反応性 (血小板粘着+血小板凝集能)、凝固能、血栓溶解能を連続的に測定できる点である。測定原理をFig. 3に示す。まず、Nembutal麻醉下のマウス腹大動脈より25Gの注射針を用いて、抗凝固剤を加えないで採血した。直ちに注射筒をヘモスタトメーターのホルダー (A) にセットした。注射筒に2本のポリエチレンチューブ (id, 0.50 mm; od, 1.00 mm) を取り付け、60 mm Hg下で1本のチューブから流動パラフィンを一定流速 (0.057 mL/min) で注射筒内に流入させ、他方のチューブから同量の血液を押し出した。採血2分30秒後、(B)においてチューブを針 (直径0.18 mm) で穿刺し、生理食塩水中に出血させた。穴はズリ応力 (375 dyne/cm²) で活性化された血小板からなる止血栓で塞がれた。止血栓形成により (C) への血流は回復するが、やがて凝固により血流は停止した。これらの変化を圧変化として経時的に記録し、コンピュータで解析した。典型的なHaemostatogramをFig. 4に示す。穿刺により生じる圧の最大降下から圧が30%および90%回復するまでの面積をそれぞれH1, H2, 採血から凝固により圧が10 mm Hg低下するまでの時間をCT1, 10 mm Hgになるまでの時間をCT2として、それぞれ血小板反応性 (H1, H2) と凝固能 (CT1, CT2) の指標とした。

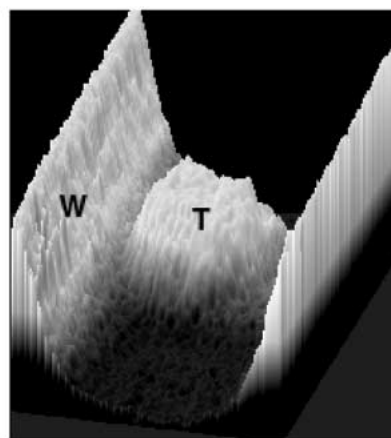


Fig. 2. Three dimensional feature of a thrombus.

血漿脂質の測定 麻醉下マウス腹大動脈より採血後、抗凝固した (Microtainer, EDTA K₂, Becton Dickinson and Company, USA)。次いで、遠心分離し (3,000 rpm, 10 min, 4℃) 血漿を得た。血漿コレステロール量と血漿トリグリセライド量は市販の酵素法キットで測定した (コレステロールEテストワコー, トリグリセライドEテストワコー, 和光純薬工業 (株))。

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。この解析には市販の統計用ソフトを用いた (StatView 5.0, SAS Institute Inc, USA)。結果はmean ± SEMで表し, $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした。

結 果

体重に及ぼす影響

結果をFig. 5に示す。本実験では餌は自由摂取としたが、各群間に有意差は認められなかった。

血漿コレステロール値に及ぼす影響

グルコシド食群およびアグリコン食群では、コントロール食群に比べ血漿コレステロールの減少傾向が認められた（それぞれ $P=0.09$ および $P=0.07$ ）。一方、高アグリコン食群（650 mg/kg diet）では差は認められなかった（Table 2）。

血漿トリグリセライド値に及ぼす影響

各群間に有意な差は認められなかった（Table 2）。

血栓形成傾向に及ぼす影響

結果をFig. 6に示す。アグリコン食群（13 mg/kg diet）および高アグリコン食群（650 mg/kg diet）では、コントロール食群に比べ血栓形成傾向の有意な抑制が認められた。一方、グルコシド食群には有意な抑

制は認められなかった。

血小板反応性および凝固能に及ぼす影響

結果をFig. 7に示す。有意ではないが、H1ではアグリコン添加によって血小板反応性が抑制される傾向が認められた（ $P=0.06$ ）。しかしH2では認められなかった。

考 察

過去数十年の間、年を追って生活習慣病が増加してきた。生活習慣病には血栓症が一次性あるいは二次性に発症する。従って生活習慣病は血栓性疾患でもある。生活習慣病急増の重要な危険因子の一つが食事であることは広く認められているところである。本研究は日本人の代表的な食品である大豆に多く含まれているイソフラボンの血栓予防効果を明らかにすることを企図して行われた。

本研究に先立ち我々は、食事と血栓に関わる研究に役立つ、感度、再現性に優れたHe-Neレーザー惹起

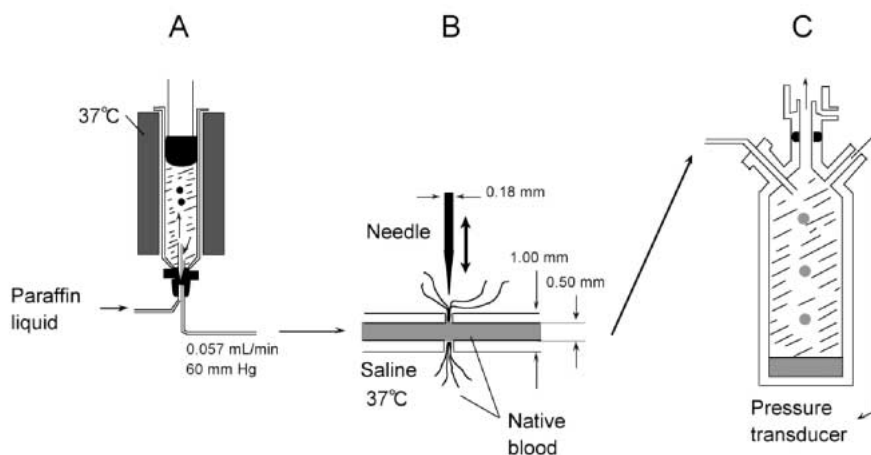


Fig. 3. Principle of haemostatometry. Haemostatometer is composed of three parts, A, B and C. Non-anticoagulated blood in a syringe is kept vertically in a holder at 37°C (A). Non-anticoagulated blood is displaced by paraffin liquid at 0.057 mL/min, resulting in blood flow in the other polyethylene tubing (i.d., 0.50 ± 0.01 mm; o.d., 1.00 ± 0.02 mm). Bleeding in surrounding saline at 37°C is caused by punching with a needle, 0.18 mm in diameter, followed by haemostasis, and shear-induced platelet-rich plug formation (B). Polyethylene tubing is connected to a blood waste reservoir under 60 mm Hg and changes in pressure are recorded (C).

Table 2. Effects of isoflavone glucoside and aglycone on plasma cholesterol and triglyceride, as measured using apoE and LDLR double knockout mice. $n=4-6$ in each group

Measurement	Control	Glucoside	Aglycone	High aglycone
Cholesterol (mg/100 mL)	1183 ± 50	1017 ± 42 ($P=0.09$)	980 ± 22 ($P=0.07$)	1156 ± 74
Triglyceride (mg/100 mL)	121 ± 19	162 ± 29	182 ± 32	—

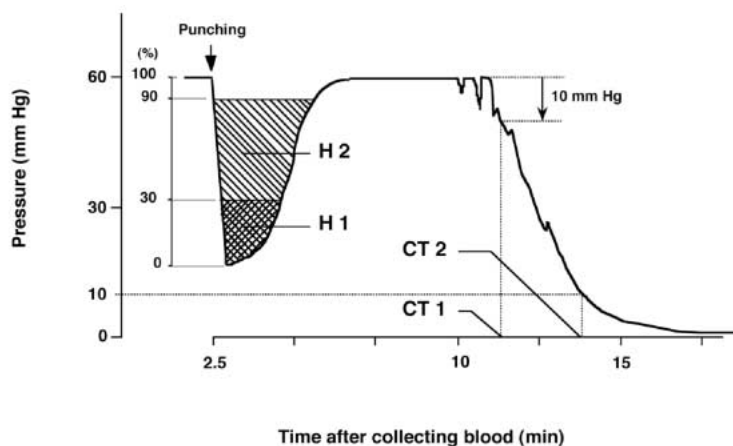


Fig. 4. Typical haemostatogram. Arrow indicates needle puncture. H1=Area until 30% pressure recovery; H2=area until 90% pressure recovery; CT1=time until a pressure drop of 10 mm Hg from baseline (60 mm Hg) caused by clotting; CT2=time until pressure decreases to 10 mm Hg and keeping below 10 mm Hg for 1 min.

apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウス頸動脈血栓モデルを確立した⁶⁾。我々はこのモデルを用いて、genisteinを主体とするイソフラボンが血栓予防作用をもつことを示唆した⁷⁾。しかし、用いたイソフラボン試料のイソフラボン含量は30%と低く、血栓予防作用がイソフラボン以外の物質による可能性を排除できなかった。そこで今回、genistein以外の成分を主体とするが、イソフラボン含量の高い試料を用いて、イソフラボンの血栓予防作用を検討することにした。また、これらの作用はグルコシドとアグリコンのいずれが強いのか、いかなるメカニズムによるのかを探るべく本実験を行った。

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血栓の動物モデルである¹⁾。本法においてはEvans blueの静注と血管のレーザー照射により血栓が形成される。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傷が起こる。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。生活習慣病特に動脈において形成される血栓で中心的な役割を果たすものは血小板であり、本血小板血栓モデルは、ヒトにおける動脈血栓症研究のよいモデルになりうる。

イソフラボンの血栓予防作用を検討する本研究においては、基本食として西欧食の成分を参考にした。これは日本人の食事組成が西欧化されていること、西欧食の高脂肪含量が易血栓性を惹起することから、この食餌がイソフラボンによる易血栓性予防を検討するの

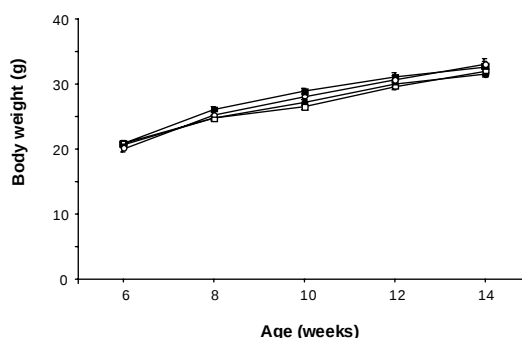


Fig. 5. Body weight change in control and isoflavone-treated mice. (●), control group; (■), glucoside group; (○), aglycone group; (□), high aglycone group. n=16-20 in each group.

に適していると考えたからである⁶⁾。

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り、イソフラボンと種々の生活習慣病に関しては、疫学研究はじめ種々の研究がある¹²⁾。日本人1日当たりのイソフラボン摂取量については17.96 mg¹²⁾、30 mg¹³⁾、50 mg¹⁴⁾などが報告されている。これらの値は西欧人の摂取量3~5 mg¹³⁾に比べて多い。本研究において得られた結果を単純計算すると、イソフラボンアグリコン125 mg/日/人(体重65 kg)の摂取が血栓予防に有効であることになる。この値は動物による種差を考えると人の摂取量の範囲内にあるように考えられる。

本実験において、同じモル濃度を含むイソフラボンの場合、グルコシドに比べてアグリコンがより有効で

あることが示された。4群の体重増加曲線に有意差がなかったことから、グルコシドとアグリコンの摂取量の間に差があったとは考えにくい。グルコシドは腸管内の微生物やグルコシダーゼによりアグリコンとして吸収される^{15, 16)}。そしてグルコシド摂取の場合にはアグリコン摂取に比べてそれらが長期間投与であっても、血中濃度はほぼ半分である¹⁷⁾。グルコシドとアグリコン摂取の血栓予防効果の違いは血中濃度増加の違いに起因するものと思われる。これらのことからアグリコンとしての摂取がグルコシドとしての摂取に比べて、血栓予防という観点からは優れているように考えられる。

アグリコンの血小板血栓形成抑制機序については明らかではないが、本研究においてアグリコン摂取でズリ惹起血小板反応性が抑制されていたことから、一部は血小板抑制によるものと考えられる。

本研究において、daidzeinとglycitein混合物に血栓予防効果があることが明らかにされた。その活性が両者にあるのかいずれか一方にあるのかは現段階では不明である。また、以前の研究においてgenisteinに血栓抑制効果があることが示唆されたが、これらを総合するといずれのアグリコンにも活性があるように予想される。したがって今後の研究において、アグリコンとグルコシドの血栓予防作用の違いが腸管からの吸収率の違いによるのか、アグリコンとグルコシドを血中に注入したときに血栓阻害作用に違いがあるのか (*in vivo*)、*in vitro*において両者間に血小板反応性阻害作用に差があるのかなどを、その作用機序解明を考慮しつつ検討する必要がある。

結論 本研究はHe-Neレーザー惹起apoE^{-/-}・LDLR^{-/-}ダブルノックアウトマウス頸動脈血栓モデルを用いて、イソフラボンアグリコンに血栓予防作用があることを証明した。

謝辞 イソフラボンサンプルをご提供頂いた(株)ホーネンコーポレーションに深甚なる謝意を表する。

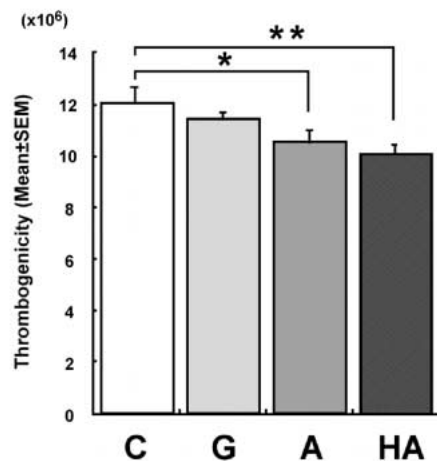


Fig. 6. Effect of isoflavone glucoside and aglycone on high fat diet-induced thrombogenicity, assessed by the mouse carotid artery thrombosis method in apoE and LDLR double knockout mice. C: control diet, G: glucoside diet, A: aglycone diet, HA: high aglycone diet. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n = 6-9$ in each group.

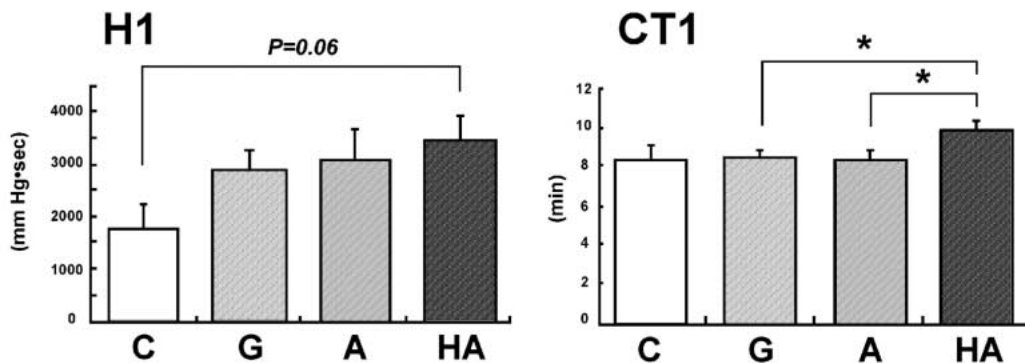


Fig. 7. Effect of isoflavone glucoside and aglycone on shear-induced platelet reactivity, assessed by haemostatometry in apoE and LDLR double knockout mice. C: control diet; G: glucoside diet; A: aglycone diet; HA: high aglycone diet. * $P < 0.05$, $n = 5-6$ in each group.

要 約

血栓形成が深く関与している生活習慣病の予防は、最近の重要な社会問題である。食事は明らかに生活習慣病の重要な危険因子の一つである。それ故、食事による血栓形成の予防は生活習慣病の予防に有益である。血栓形成を阻害するには、易血栓性状態が測定されなければならない。現在使われている多因子測定法が成功しているようには思えない。血栓は血液細胞、血管壁、血流の相互作用により形成されるので、我々は食餌の影響を評価できる、感度が高く再現性に優れた動物モデルを確立した。このモデルにおいては、血栓はapoEとLDLRの両者を欠損した先天的動脈硬化マウスの頸動脈に、He-Neレーザー照射により形成される。我々は以前にこのモデルを用いて、genistein richイソフラボンアグリコンが高脂肪食によって惹起される易血栓性を阻害することを証明した。しかしながら、この研究に用いられた試料のイソフラボン含有量は30%と低い値であった。それ故、我々はその結果から結論を出すのは早計であると考えた。本研究の目的は、イソフラボン含有量の高い試料を用いて（80%グルコシド試料および90%アグリコン試料）、イソフラボンの血栓予防作用を明瞭にすること、およびグルコシド（daidzinおよびglycitin rich）とアグリコン（daidzeinおよびglycitein rich）の形態の違いが血栓予防作用に及ぼす影響を比較することであった。雄性マウスを6週齢まで標準固形飼料で予備飼育した後、6週齢から14週齢まで実験飼料で飼育した。イソフラボンを25 mg/kg diet（グルコシド）、13 mg/kg diet（アグリコン、25 mg/kg dietグルコシドと同じモル濃度）、650 mg/kg diet（アグリコン）になるように高脂肪食（エネルギー比40%、コントロール）に添加した。血栓はマウス左頸動脈に、Evans blueの存在下でHe-Neレーザー照射により形成した。この方法（*in vivo*）により、アグリコンは13 mg/kg diet（ $P=0.031$ ）、650 mg/kg diet（ $P=0.007$ ）において血栓予防作用を持つこと、一方、グルコシドには有意な作用が認められないこと（ $P=0.349$ ）が明かにされた。ズリ惹起血小板反応性測定法により（*in vitro*）、アグリコンが650 mg/kg dietにおいて抗血小板凝集作用の傾向をもつことを示した（ $P=0.064$ ）。これらの結果から、daidzein and/or glyciteinは血栓予防効果をもつこと、しかし、daidzin and/or glycitinにはその効果が、認められないことが確かめられた。アグリコンの血栓予防効果は一部血小板凝集阻害作用に起因しているのかもしれない。またグルコシドにおける抗血栓効果の欠如は、腸管における吸収率の低さに起因しているのかもしれない。

文 献

- 1) 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.
- 2) Yamamoto J, Iizumi H, Hirota R, Shimonaka K, Nagamatsu Y, Horie N and Morita S (1989) : Effect of physical training on thrombotic tendency in rats: Decrease in thrombotic tendency measured by the He-Ne laser-induced thrombus formation method. *Haemostasis*, **19**, 260-265.
- 3) Noguchi T, Sasaki Y, Seki J, Giddings JC and Yamamoto J (1997) : Enhanced thrombogenicity and altered hemodynamics in the cerebral microvasculature of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Haemostasis*, **27**, 237-345.
- 4) Sasaki Y, Noguchi T, Seki J, Giddings JC and Yamamoto J (2000) : Protective effects of imidapril on He-Ne laser-induced thrombosis in cerebral blood vessels of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Thromb Haemost*, **83**, 722-727.
- 5) Taka T, Ono M, Sasaki Y, Seki J and Yamamoto J (2002) : Platelet reactivity in spontaneously diabetic rats is independent from blood glucose and insulin levels. *Platelets*, **13**, 313-316.
- 6) Ijiri Y, Miura M, Hashimoto M, Fukunaga C, Watanabe S, Kubota A, Oiwa K, Okuda T and Yamamoto J (2002) : A new model to evaluate the diet-induced prothrombotic state, using He-Ne laser-induced thrombogenesis in the carotid artery of apolipoprotein E-deficient and low-

- density lipoprotein receptor-deficient mice. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **13**, 497-504.
- 7) 井尻吉信, 三浦真由子, 橋本 賢, 高 智美, 窪田 彬, 渡邊定博, 大岩和弘, 福永千鶴, 奥田豊子, 山本順一郎 (2001): 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. 大豆たん白質研究, **4**, 107-116.
 - 8) 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.
 - 9) Kovacs IB, Hutton RA and Kernoff PB (1989): Hemostatic evaluation in bleeding disorders from native blood. Clinical experience with the hemostatometer. *Am J Clin Pathol*, **91**, 271-279.
 - 10) Ratnatunga CP, Edmondson SF, Rees GM and Kovacs IB (1992): High-dose aspirin inhibits shear-induced platelet reaction involving thrombin generation. *Circulation*, **85**, 1077-1082.
 - 11) Yamamoto J, Taka T, Nakajima S, Ueda M, Sugimoto E, Sasaki Y, Muraki T, Seki J and Watanabe S (1999): A shear-induced *in vitro* platelet function test can assess clinically relevant anti-thrombotic effects. *Platelets*, **10**, 178-184.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Messina M (1995): Isoflavone intakes by Japanese were overestimated. *Am J Clin Nutr*, **62**, 654. Comment on: *Am J Clin Nutr*, **60**, 333-340.
 - 15) Brown JP (1988): Hydrolysis of glycosides and esters. In: *Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*. Rowland IR, ed., Academic press, San Diego, CA, pp. 109-144.
 - 16) Day AJ, Dupont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA and Williamson G (1998): Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver α -glucosidase activity. *FEBS Lett*, **436**, 71-75.
 - 17) Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y and Kikuchi M (2000): Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in human. *J Nutr*, **130**, 1695-1699.