

# 大豆たん白質のLPS肝炎抑制効果に関する研究

杉山公男\*・厚見恵名・島田康彦・森田達也

静岡大学農学部

## Studies on Suppressive Effect of Soy Protein on LPS-induced Hepatitis

Kimio SUGIYAMA, Ena ATSUMI, Yasuhiko SHIMADA and Tatsuya MORITA

Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529

### ABSTRACT

We investigated the effect of dietary protein on lipopolysaccharide (LPS) +D-galactosamine (GalN)-induced hepatitis by measuring plasma alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities as hepatitis markers in rats. When rats were fed diets containing 25% casein or an equivalent amount of other proteins (purified whole egg protein, soy protein isolate (SPI) or wheat gluten) for 10 days and then injected with LPS+GalN, hepatitis was most suppressed in rats fed an SPI diet. The hepatitis-suppressive effect of SPI could not solely be ascribed to impurities included in SPI. When L-Methionine was added to the SPI diet to make it comparable to that of the casein diet, hepatitis was significantly intensified, suggesting that the hepatitis-suppressing effect of SPI might be attributable, at least in part, to the low methionine content of the protein. LPS is thought to induce apoptosis of liver cells through the action of TNF- $\alpha$ , which is produced by macrophages in response to LPS, and leading to hepatitis. Thus, we investigated the effects of an SPI diet on plasma TNF- $\alpha$  concentration and apoptosis of liver cells. The SPI diet did not suppress LPS+GalN-induced enhancement of plasma TNF- $\alpha$  concentration as compared with the casein diet, but it significantly suppressed apoptosis of liver cells. On the other hand, the SPI diet significantly suppressed TNF- $\alpha$ +GalN-induced hepatitis compared to the casein diet, suggesting that SPI might elicit its protective effect against LPS+GalN-induced hepatitis by suppressing the action of TNF- $\alpha$ . Our results suggest that SPI might be effective in preventing certain types of hepatitis that are mediated by TNF- $\alpha$ . *Soy Protein Research, Japan* **6**, 67-72, 2003.

Key words : lipopolysaccharide, hepatitis, soy protein, tumor necrosis factor- $\alpha$

\* 〒422-8529 静岡市大谷836

リポポリサッカリド (LPS) 誘導性の肝炎は最も汎用されている肝炎モデルの一つで、D-ガラクトサミン (GalN) と組み合わせると極少量で急性の肝炎を引き起こすことができる。LPSはkupffer細胞などのマクロファージを活性化し、産生されたTNF- $\alpha$ はdeath signalを介して肝細胞にアポトーシスをもたらす、これが肝炎発症の主な原因になっていると考えられている<sup>1)</sup>。私達はこの肝炎モデルを用いて茶、コーヒー、スパイス類などの抑制効果とそれらの活性成分について検討を行ってきた<sup>2-5)</sup>。肝障害あるいは肝炎に及ぼす食餌たん白質の影響についてはSanadaらによるGalN肝障害モデルを用いての研究結果が報告されている<sup>6,7)</sup>。しかし、LPS+GalNによる肝炎 (以下LPS肝炎と略す) モデルで食餌たん白質の効果が詳しく検討された例は見当たらない。

そこで本研究では、ラットを実験動物として用い、LPS肝炎発症に及ぼす食餌たん白質の影響について大豆たん白質の効果が注目しながら基本的な事柄を検討しようとした。

## 方 法

Wistar系雄ラット (日本SLC, 6週齢) を購入し、25%カゼイン食 (Table 1) で3日間予備飼育した後、実験食を10日間与えた。実験食は実験毎に異なるが、本研究ではたん白質源としてカゼインの他に全卵たん白質 (PEP, 太陽化学)、分離大豆たん白質 (SPI, 不二製油)、小麦グルテン (WG, 新進食糧) を用い、窒素量を25%カゼイン食に合わせ、全量をスターチで調整した。小麦グルテンをたん白質源として用いた場合

Table 1. Composition of experimental diets (Exp. 1)

Ingredient	Casein PEP SPI WG			
	(g/100 g)			
Casein	25	—	—	—
PEP	—	24.5	—	—
SPI	—	—	25	—
WG	—	—	—	27.7
Corn starch	43.25	43.75	43.25	39.55
Sucrose	20	20	20	20
Corn oil	5	5	5	5
Mineral mixture <sup>a</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>a</sup>	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25
Cellulose	2	2	2	2
L-Lysine·HCl	—	—	—	0.8
L-Threonine	—	—	—	0.2

<sup>a</sup> AIN-76. PEP, purified whole egg protein; SPI, soy protein isolate; WG, wheat gluten.

には0.8% L-Lys塩酸塩と0.2% L-Thrを補足した。10日目の午前10:00~10:30にLPS (10  $\mu$ g/kg)+GalN (200 mg/kg)を腹腔内注射し、8時間後に断頭殺し、血液と肝臓を採取した。また、一部の実験ではTNF- $\alpha$  (10  $\mu$ g/kg)+GalN (250 mg/kg)を尾静脈注射して肝炎を惹起させた。肝炎の指標として血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) とアスパルテートアミノトランスフェラーゼ (AST) 活性をキット (和光) を用いて測定した。血漿TNF- $\alpha$ 濃度はELISA法によるキット (Cosmo Bio) を用いて測定した。アポトーシスの指標としてDNA断片化率をELISA法によるキット (Boehringer) を用いて測定するとともに、DNAラダーをアガロースゲル電気泳動で観察した。肝臓GSH濃度はDTNB法で測定した。

## 結果と考察

### 実験 1

25%カゼイン食およびこれと同量の窒素を含むPEP食、SPI食、小麦グルテン (WG) 食のLPS肝炎発症に及ぼす影響を検討した。ラットの成長は4群間に有意な差は見られなかった。LPS+GalN注射8時間後の血漿ALTおよびAST活性をFig. 1に示す。カゼイン食を与えたラットではALTおよびAST活性の上昇が顕著であり、これに対してSPI食を与えたラットではこれらの酵素活性の上昇が強く抑えられていた。PEP食およびWG食を与えたラットの応答は、カゼイン群とSPI群の中間の値であった。本研究では肝炎の指標として血漿ALTおよびAST活性のみを用いているが、別の実験で、食餌たん白質の種類の違いが肝臓の酵素活性に影響を及ぼして、これが血漿酵素活性に反映しているにすぎないという可能性は否定された。これらの結果は、摂取するたん白質の種類はLPS肝炎の発症に影響を及ぼすことを示しており、SPIはLPS肝炎抑制効果の強いたん白質であることが判明した。

### 実験 2

カゼイン食とSPI食はLPS肝炎の発症に対照的な影響を及ぼすことが示されたので、SPI中のどんな要因がSPIの肝炎抑制効果に関与するかを検討した。SPIは90%以上のたん白質を含むとされているが、いわゆる「不純物」も相当含んでいるので、70%エタノール、80%エタノールおよび99%エタノールで順次抽出し、約8%の抽出物を得た。そこで、この抽出物と洗浄したSPIの効果を実験1と同様に検討した。実験群は25%カゼイン食 (25C)、25C+2%抽出物、25% SPI食、23%洗浄SPI食の4群である。ラットの成長は各群で

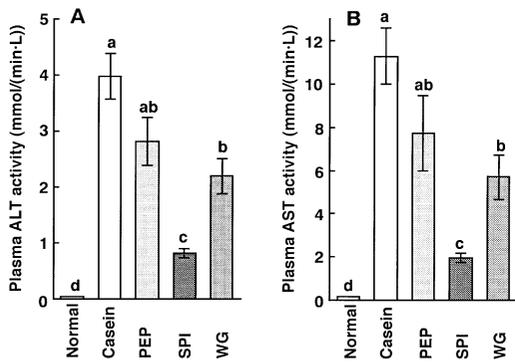


Fig. 1. Effects of different types of dietary protein on the LPS+GalN-induced enhancement of plasma ALT (A) and AST (B) activities in rats. Values are mean  $\pm$  SEM for 5 (normal) and 8-10 (other groups) rats; values with different letters are significantly different at  $P < 0.05$  by Duncan's multiple-range test. Rats of normal group were fed a casein diet and treated with saline instead of LPS+GalN. LPS, lipopolysaccharide; GalN, D-galactosamine; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; PEP, purified whole egg protein; SPI, soy protein isolate; WG, wheat gluten.

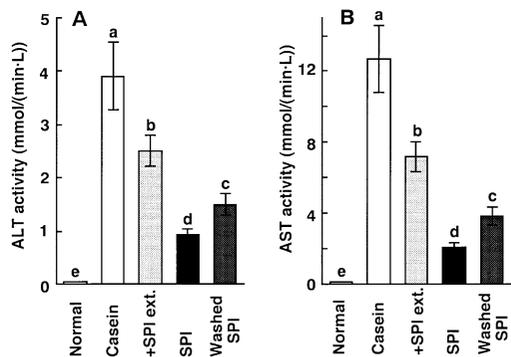


Fig. 2. Effects of extract from SPI and washed SPI on the LPS+GalN-induced enhancement of plasma ALT (A) and AST (B) activities in rats. Values are mean  $\pm$  SEM for 5 (normal) and 10 (other groups) rats; values with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ . See Fig. 1 for other details.

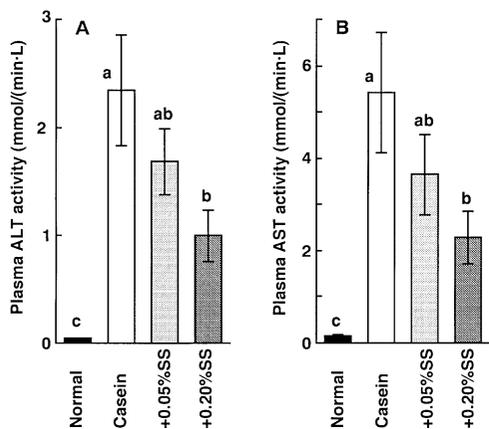


Fig. 3. Effects of dietary supplementation with soy saponins on the LPS+GalN-induced enhancement of plasma ALT (A) and AST (B) activities in rats. Values are mean  $\pm$  SEM for 5 (normal) and 8-10 (other groups) rats; values with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ . SS, soy saponins. See Fig. 1 for other details.

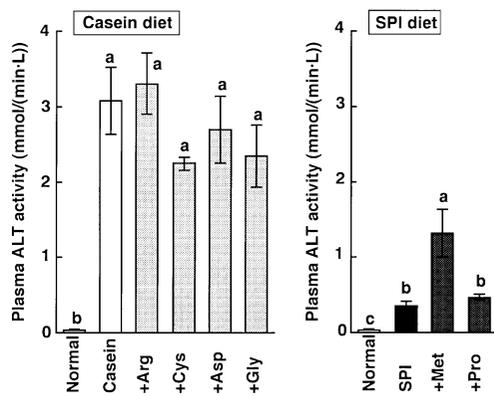


Fig. 4. Effects of dietary supplementation with certain amino acids on the LPS+GalN-induced enhancement of plasma ALT activity in rats fed casein and SPI diets. Values are mean  $\pm$  SEM for 5 (normal) and 8-10 (other groups) rats; values with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ . See Fig. 1 for other details.

有意な差は見られなかった。血漿ALT活性をFig. 2に示す。カゼイン食にSPI抽出物を添加するとALTおよびAST活性の有意な低下が見られたが、SPI群のレベルにまでは低下しなかった。一方、SPIの代わりに洗浄したSPI食を与えるとALTおよびAST活性は有意に

上昇したが、カゼイン群のレベルまでは上昇しなかった。これらの結果は、SPIに含まれる「不純物」もSPIのLPS肝炎抑制効果に寄与しているが、「不純物」以外のたん白質そのものに起因する効果も無視できないことを示唆している。SPIの「不純物」中のどんな

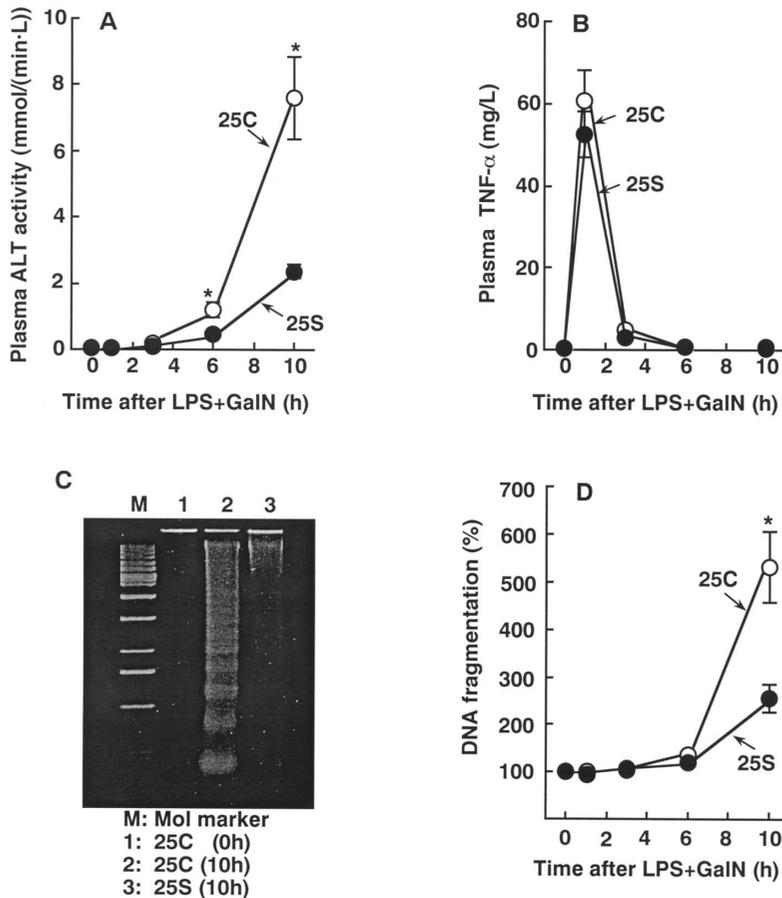


Fig. 5. Effects of casein and SPI diets on the LPS+GalN-induced enhancement of plasma ALT activity (A), plasma TNF- $\alpha$  concentration (B), DNA ladder pattern (C) and DNA fragmentation (D) of liver cells in rats. Values are mean  $\pm$  SEM for 8-10 rats. \* $P < 0.05$  by Student's  $t$ -test. See Fig. 1 for other details.

成分がLPS肝炎の抑制に関与しているかは不明であるが、食餌に大豆サポニン（和光）を0.05%添加（25%SPI食と同レベル）しても有意な抑制効果は見られなかった（Fig. 3）。しかし、食餌に0.2%添加した場合には有意な抑制効果が見られたので、大豆サポニンはLPS肝炎抑制効果を有する化合物のようである。

### 実験 3

カゼインとSPIではいくつかのアミノ酸の含量が大きく異なることが知られている。どちらかのたん白質で含量が約2倍以上あるいは約1/2以下のアミノ酸はArg, Cys, Asp, Gly（以上はカゼインで少ない）、Met, Pro（以上はSPIで少ない）である。そこで、カゼイン食およびSPI食にこれら含量の低いアミノ酸を両たん白質食間で同等になるように添加して、実験1と同様にLPS肝炎の発症に及ぼす影響を検討した。実験3-1の実験群は25C, 25C+0.89% L-Arg,

25C+0.18% L-Cys, 25C+1.43% L-Asp, 25C+0.53% Glyの5群で、実験3-2の実験群は25S, 25S+0.38% L-Met, 25S+1.21% L-Proの3群である。ラットの成長は各群で大きな差は見られなかった。血漿ALT活性をFig. 4に示す。カゼイン食にL-CysあるいはGlyを添加するとALT活性の上昇が抑制される傾向が見られたものの有意ではなかった。一方、SPI食にL-Proを添加してもALT活性に変化は見られなかったが、L-Metの添加で有意な上昇が見られた。これらの結果は、SPI中のMet含量が低いことがSPIのLPS肝炎抑制効果に一部寄与していることを示唆している。

### 実験 4

SPIのLPS肝炎抑制効果の機構について知見を得るため、血漿TNF- $\alpha$ 濃度および肝臓細胞のアポトーシスに及ぼす影響を検討した。ラットに25%カゼイン食あるいは25%SPI食を10日間与えた後、LPS+GalN注

射前（0時間）および注射後1, 3, 6, 10時間後に解剖し、いくつかのパラメータを測定した。結果をFig. 5にまとめて示す。実験1～3の結果と同様に血漿ALT活性の上昇はSPI食投与ラットで有意に抑制されたが、LPS+GalN注射1時間後に鋭いピークを示す血漿TNF- $\alpha$ 濃度はカゼイン群とSPI群との間に有意な差は見られなかった。一方、肝臓細胞のDNA断片化

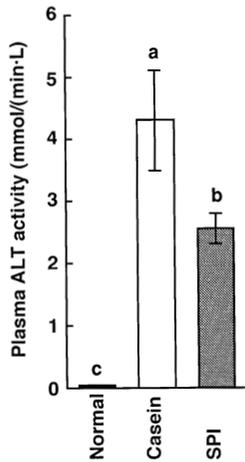


Fig. 6. Effects of casein and SPI diets on the TNF- $\alpha$  +GalN-induced enhancement of plasma ALT activity in rats. Values are mean  $\pm$  SEM for 5 (normal) and 10 (other groups) rats; values with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ . See Fig. 1 for other details.

率はSPI食投与ラットで有意に抑制されており、またDNAラダーも抑制されていた。これらの結果は、SPI食投与ラットではマクロファージからのTNF- $\alpha$ の分泌は抑制されないが、TNF- $\alpha$ による肝臓細胞のアポトーシスは抑制されており、これが肝炎の抑制をもたらすという可能性を示唆している。そこで、TNF- $\alpha$  + GalNによる肝炎の発症に及ぼす25C食と25S食の効果を検討したところ、25S食投与ラットでは肝炎の発症が有意に抑制されており (Fig. 6), SPI食投与ラットではTNF- $\alpha$ の作用が抑制されていることが示された。

SPI食はどんな機構でTNF- $\alpha$ の作用を抑制するのであろうか。これに関連して、肝臓中のGSH濃度がLPSなどによる肝炎の発症に影響を及ぼすとの報告が目される。例えば、Hentzeら<sup>8)</sup>は肝臓GSH濃度の低下はdeath receptorを介する肝炎の発症を抑制するとの考え方を提示している (Fig. 7A)。そこで、肝臓GSH濃度を測定したところ、25S食投与ラットでは肝臓中のGSH濃度は25C食投与ラットに比べて有意に低値を示した (Fig. 7B)。SPI中の含硫アミノ酸の総量は他の代表的なたん白質に比較して少ないことはよく知られており、25S食投与ラット肝臓での低GSH濃度はそれを反映したものであるが、肝臓GSH濃度の低いSPI食投与ラットでTNF- $\alpha$  + GalNによる肝炎が抑制されていたという結果はHentzeらの考え方と一致する。また、SPI食にMetを添加すると肝炎の発症程度は上昇するという結果も肝臓GSH濃度の上昇で部分的に説明するように思われる。一方、LPS+GalN注射後、カゼイ

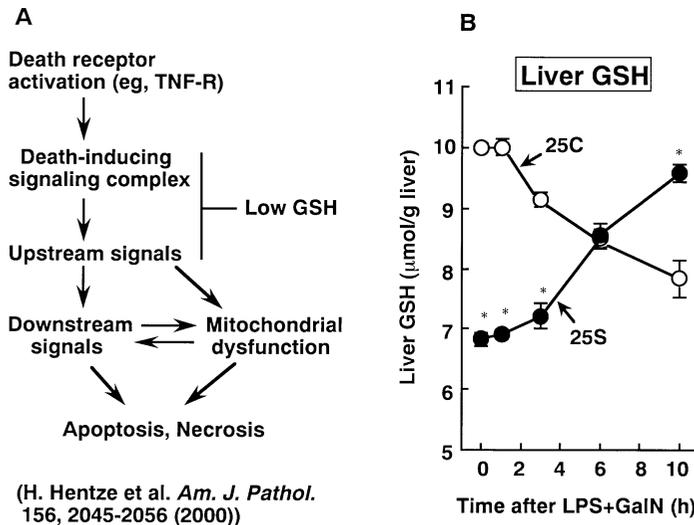


Fig. 7. Hypothetical scheme for the regulation of death receptor-mediated hepatitis by cellular glutathione concentration (A) and changes in hepatic glutathione concentration after the injection of LPS+GalN in rats fed casein and SPI diets (B). Values are mean  $\pm$  SEM for 8-10 rats. \* $P < 0.05$ .

ン食投与ラットでは肝臓GSH濃度は低下するのに対し、SPI食投与ラットでは逆に肝臓GSH濃度は上昇す

るという興味深い現象が観察されたが、これがどのような意味を有するかは今のところ不明である。

## 要 約

リポポリサッカリド (LPS)+D-ガラクトサミン (GalN) で惹起されるラットの急性肝炎モデルを用い、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼとアスパルテートアミノトランスフェラーゼ活性を肝炎の指標として肝炎発症に及ぼす食餌たん白質の影響を検討した。25%カゼイン食あるいはこれと同レベルのたん白質 (精製全卵たん白質, SPI, 小麦グルテン) を含む食餌をラットに10日間与えたのち肝炎を発症させたところ、SPI食投与ラットではカゼイン食投与ラットに比べて肝炎の発症が強く抑制された。SPIの肝炎抑制効果には、たん白質以外の成分が一部関与しているが、たん白質そのものの効果も無視できないと考えられた。カゼイン食と同レベルになるようにL-MetをSPI食に添加すると肝炎の発症は有意に高まり、SPIの効果にはMet含量の少ないことが関与していることが示唆された。LPSはマクロファージを活性化してTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生・分泌を促進し、TNF- $\alpha$ は肝細胞にアポトーシスをもたらす、これが炎症を引き起こすと考えられている。そこで血漿TNF- $\alpha$ 濃度および肝細胞のアポトーシスに及ぼすSPI食の影響を調べたところ、SPI食はTNF- $\alpha$ 濃度の上昇を抑制しないが肝細胞のアポトーシスを抑制した。LPS+GalNの代わりにTNF- $\alpha$ +GalNで肝炎を惹起させた場合にもSPI食はカゼイン食に比べて有意に肝炎の発症を抑制したことから、SPI食はTNF- $\alpha$ の作用を抑制することにより肝炎の発症を抑制することを示している。本研究結果は、SPIはTNF- $\alpha$ が関与するタイプの肝炎の発症抑制に有効なたん白質であることを示している。

## 文 献

- 1) Bradham CA, Plumple J, Manns MP, Brenner DA and Trautwein C (1998): Mechanism of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am J Physiol*, **275**, G387-G392.
- 2) He P, Noda Y and Sugiyama K (2001): Green tea suppresses lipopolysaccharide-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized rats. *J Nutr*, **131**, 1560-1567.
- 3) He P, Noda Y and Sugiyama K (2001): Suppression of lipopolysaccharide-induced liver injury by various types of tea and coffee in D-galactosamine-sensitized rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 670-673.
- 4) He P, Noda Y and Sugiyama K (2001): Suppressive effect of coffee on lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine-sensitized rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**, 1924-1927.
- 5) Morita T, Jinno K, Kawagishi H, Arimoto Y, Sugauma H, Inakuma T and Sugiyama K (2003): Hepatoprotective effect of myristicin from nutmeg (*Myristica fragrans*) on lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury. *J Agric Food Chem*, **51**, 1560-1565.
- 6) Manabe A, Cheng CC, Egashira Y, Ohta T and Sanada H (1996): Dietary wheat gluten alleviates the elevation of serum transaminase activities in D-galactosamine-injected rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, **42**, 121-132.
- 7) Cheng CC, Etoh J, Tanimura T, Egashira Y, Ohta T and Sanada H (1996): Effect of dietary gluten on the hepatotoxic action of galactosamine and/or endotoxin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, **60**, 439-443.
- 8) Hentze H, Gantner F, Kolb SA and Wendel A (2000): Depletion of hepatic glutathione prevents death receptor-dependent apoptotic and necrotic liver injury in mice. *Am J Pathol*, **156**, 2045-2056.