

ウサギ肝臓ミクロソームによる前駆発癌物質ジメチル ニトロサミン活性化に及ぼす長期分離大豆たん白質お よびアルコール摂取の影響

CHRONIC ADMINISTRATION OF SOY PROTEIN ISOLATE AND
ETHANOL ENHANCED CARCINOGENIC INDEX ON DIMETHYLNITRO-
SAMINE METABOLISM IN THE RABBIT LIVER MICROSOMES

鈴木啓文・賀来正俊・梶野大典・堀 清記（兵庫医科大学第一生理
学），細野道雄（杏和総合医学研究所），河野節子（名古屋女子大学家政
学部），吉尾雅春（協和会病院）

Hirofumi SUZUKI¹, Masatoshi KAKU¹, Daisuke KAJINO¹, Seiki HORI¹,
Michio HOSONO², Setsuko KAWANO³ and Masaharu YOSHIO⁴

¹First Department of Physiology, Hyogo College of Medicine, Nishino-
miya 663

²Kyowa Synthetic Medical Laboratory, Nishinomiya 663

³Department of Food Science and Nutrition, Nagoya Women's Univer-
sity, Nagoya 467

⁴Kyowakai Hospital, Suita 574

ABSTRACT

Effects of chronic administration of ethanol and soy protein isolate (SPI) on the carcinogenic index, the ratio of dimethylnitrosamine (DMN) demethylation activity (carcinogenic metabolism) to DMN denitrosation activity (detoxification metabolism) were studied in the rabbit. Twenty-four adult male white rabbits were divided into 4 groups of 6 each, the first group of 21% casein diet with distilled deionized water (DDW) drink, the second group of 21% casein diet with 7.5% (W/V) ethanol drink, the third group of 21% SPI diet with DDW drink and the fourth group of 21% SPI diet with 7.5% ethanol drink. All animals were allowed to feed freely throughout the study for 8 weeks. At 8 weeks of experimental period, all animals were killed and microsomes were isolated from the liver. And cytochrome P-450 content, two microsomal P-450 related compositions, i. e., NADPH P-450 reductase activity, cytochrome b₅ content, protein concentration, DMN demethylation activity and DMN denitrosation activity of these microsomes were evaluated. These P-450 related compositions were not significantly affected by ethanol in casein diet group but ethanol increased these compositions by 17.5~37.1% only in SPI diet group. DMN demethylation activity (1.91~2.9 nmol HCHO/min/mg Ms protein) was inhibited to 40.6% by carbon monoxide (CO) and was reduced to 12.3% by deficiency of NADPH. These results showed that DMN demethylation was mainly catalyzed by P-450. On the contrary,

DMN denitrosation activity (0.007~0.016 nmol NO₂ /min/mg Ms protein) was enhanced to 125~142% by CO and was reduced to about 25% by deficiency of NADPH. Therefore, the catalytic enzyme on DMN denitrosation did not belong to P-450 and rather might be the unknown enzyme. The values of carcinogenic index (=DMN demethylation activity : nmol HCHO/min/mg Ms protein ÷ DMN denitrosation activity : nmol NO₂/min/mg Ms protein) were about 200 in two groups without ethanol administration. Ethanol increased values of these indices to 151~227% and especially the index value in 21% SPI diet group was induced by about 230% because of strong reducing effects of 7.5% ethanol and 21% SPI on DMN denitrosation activity. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **10**, 39-44, 1989.

ヒトの癌の大半が経口摂取物に起因するといわれている。ジメチルニトロサミン dimethylnitrosamine (DMN)は強力な肝臓発癌物質であり¹⁾、多くの食品や水道水にも含まれるほか、胃内にてアミンと亜硝酸より自然生成される不可避な異物である^{2~4)}。DMN それ自身は発癌性のない前駆発癌物質に分類されるものであるが、生体内に入ると細胞のミクロソーム膜にあるチトクローム P-450 (P-450) によって脱メチル化され変異原性を有するホルムアルデヒド (HCHO) や遺伝子 DNA を傷害する究極的発癌物質メチルカチオンおよびジアゾニュウムイオンなどを発生する(発癌化代謝)^{5~7)}。一方、脱ニトロソ化反応は DMN を分解、解毒する系(解毒化代謝)であるが、本反応に関与する酵素などはほとんど明らかにされていない。今回、我々はウサギに長期間分離大豆たん白質やエタノールを摂取させ、肝ミクロソームの DMN 脱メチル化活性および脱ニトロソ化活性を測定して、これらの比より独自の発癌化指数を求め、食餌たん白質の相異やアルコール飲用の有無による DMN の発癌化代謝への影響を検討し、興味ある知見を得たので報告する。

実 験 方 法

動物飼育法

生後17週齢(体重約2.5 kg)の雄白ウサギ24羽を1週間市販標準固形飼料(日本クレア社製)で予備飼育後、(1) 21%カゼイン食・エタノール非いん飲用群、(2) 同・7.5%エタノール飲用群、(3) 21%大豆たん白質(SPI)食・エタノール非飲用群、(4) 同・7.5%エタノール飲用群の計4群(一群は6羽)に分け、18から26週齢までの8週間、各々の実験食で飼育した。実験食は粉末 SPI (フジプロ R[®]) と標準たん白質としてのカゼインを用いて、21%たん白質食を2種類作り、それぞれ炭水化物、脂肪、塩分、ミネラル、ビタミンなどは等量の配合とした(Table 1)。エタノール飲用群(EtOH 群)は7.5% (W/V) のエタノール水溶

液を、またエタノール非飲用群(control群)は脱イオン蒸留水を飲料水として与えた。食餌は期間中全て自由摂食、摂水とした。

試料採取

飼育終了後、12時間絶食の後、屠殺解剖し速やかに肝臓を摘出して賀来ら⁸⁾の方法によってミクロソームを調製した。

ミクロソーム電子伝達系成分の測定

P-450含量は還元型一酸化炭素結合差スペクトルを用いる大村と佐藤の方法⁹⁾を用いて測定した。NADPH-チトクローム P-450還元酵素(FP₂)活性、チトクローム b₅含量は谷口らの方法¹⁰⁾を用いて各々測定した。

ジメチルニトロサミン脱メチル化活性

DMN 脱メチル化活性はYang らの方法¹¹⁾を一部改変して測定した。即ち反応液0.5 ml 中にミクロソーム1.5 mg、そのほか最終濃度として100 mM の DMN、10 mM の NADPH、100 mM の Tris-HCl buffer (pH

Table 1. Composition of experimental diet

Ingredients	21% SPI	21% Casein
	%	%
SPI	21.1	0
Casein	0	21.1
Corn starch	25.3	25.3
Ocenol	2	2
Alfalfa	10	10
Corn	15	15
Avicel	7.5	7.5
Soy bean oil	3.5	3.5
CaCO ₃	1.5	1.5
CaHPO ₄	2	2
NaCl	1.1	1.1
Vitamins mix.	1	1
Minerals mix.	10	10
Total	100	100

SPI : soy protein isolate

8.5)を入れて37°C, 20分間反応させ、代謝産物であるHCHOの含量をNashの方法¹²⁾で測ることにより活性測定した。

ジメチルニトロサミン脱ニトロソ化活性

DMN 脱ニトロソ化活性はLorrらの方法¹³⁾を一部改変して測定した。即ち反応液0.5 ml 中にミクロソーム1.5 mg, そのほか最終濃度として100 mM のDMN, 10 mM のNADPH, 100 mM のTris-HCl buffer (pH 8.5)を入れて37°C, 20分間反応させ、代謝産物である二酸化窒素(NO₂)の含量を測ることによって、活性を測定した。

結 果

摂取たん白質の相異とアルコール飲用の有無によるウサギの体重への影響

飼育開始時と終了時のウサギの体重変化は両時期とも4群間に有意な差はなかつた (Table 2)。体重はい

ずれも増加を示し、変化量ではSPI群がカゼイン群に比べて少ない傾向を示した。アルコール飲用は体重へほとんど影響を与えなかった。

摂取たん白質の相異とアルコール飲用の有無によるウサギ肝臓重量への影響

8週間飼育後の肝重量は、SPI群の方がカゼイン群に比べてcontrol群, EtOH群ともに有意に重く、体重に対する肝重量の割合も大きかった。アルコール飲用の肝重量に及ぼす影響は認められなかった (Table 3)。

肝ミクロソームのP-450関連成分とたん白質の含量および活性

食餌たん白質の影響としては、肝ミクロソーム中のたん白質含量, P-450含量, FP₂活性, チトクロームb₅含量の全てが肝全体当りでSPI群の方がカゼイン群に比べて多い傾向を示した。さらにSPI群ではEtOH群の方がcontrol群に比べて全ての含量, 活性

Table 2. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of dietary proteins on body weight gain

Diet	Drink	BW before exp. feed	BW after exp. feed	Change in BW
		kg	kg	%
21%	Casein			
	Cont	2.32±0.12	3.42±0.16	+49.7±11.9
	EtOH	2.52±0.17	3.26±0.12	+31.5±9.3
21%	SPI			
	Cont	2.70±0.20	3.64±0.27	+19.3±8.2
	EtOH	2.75±0.09	3.54±0.16	+21.4±4.1

SPI: soy protein isolate, Cont: control, EtOH: ethanol.
(mean±S.E.M.)

Table 3. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of dietary proteins on liver weight

Diet	Drink	Liver wt after exp. feed	Relative liver wt
		g	%
21% Casein			
	Cont	82.2±7.5	2.39±0.11
	EtOH	81.6±8.4	2.50±0.22
21% SPI			
	Cont	109.9±8.9	3.08±0.31
	EtOH	94.0±8.7	2.65±0.21

Cont: control, EtOH: ethanol. (mean±S.E.M.)

Table 4. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of dietary proteins on cytochrome P-450, NADPH-P-450 reductase, cytochrome b₅ and protein of rabbit liver microsomes

Composition of microsomal P-450 system		21% Casein		21% SPI	
		Control	EtOH	Control	EtOH
Ms protein	mg/g liver	8.77±1.57	9.22±1.57	8.20±0.86	10.0±0.54
	mg/whole liver	724.0±151.6	745.5±133.8	882.4±75.3	924.0±60.0
P-450	nmol/mg Ms protein	0.71±0.09	0.70±0.10	0.63±0.07	0.74±0.09
	nmol/whole liver	495.4±86.4	479.2±39.9	572.0±93.7	687.7±104.8
FP ₂	Unit/mg Ms protein	0.047±0.002	0.039±0.006	0.038±0.007	0.051±0.005
	Unit/whole liver	33.3±6.0	30.3±6.3	33.4±5.4	46.0±4.0
Cyt. b ₅	nmol/mg Ms protein	0.423±0.03	0.492±0.055	0.350±0.12	0.480±0.121
	nmol/whole liver	302.8±54.8	352.4±48.6	313.7±106.7	432.8±97.6

Ms: microsome, FP₂: NADPH-cytochrome P-450-reductase, Cyt: cytochrome, EtOH: ethanol. (mean±S.E.M.)

ともに多い傾向を認めた。カゼイン群ではアルコールの有意な影響は認められなかった (Table 4)。

ジメチルニトロサミンの脱メチル化反応および脱ニトロソ化反応におけるチトクローム P-450の関与

本実験の DMN 脱メチル化活性は、一酸化炭素により約60%阻害され、NADPH 非存在下では約88%減少することより、本反応は主に P-450によって触媒されていることが示された。ところが DMN 脱ニトロソ化活性は NADPH 非存在下では約73%減少するが、一酸化炭素による阻害は認められず、むしろ逆に

約30%の活性増加を認めた。即ち本反応は P-450触媒反応ではないことが示された (Fig. 1)。

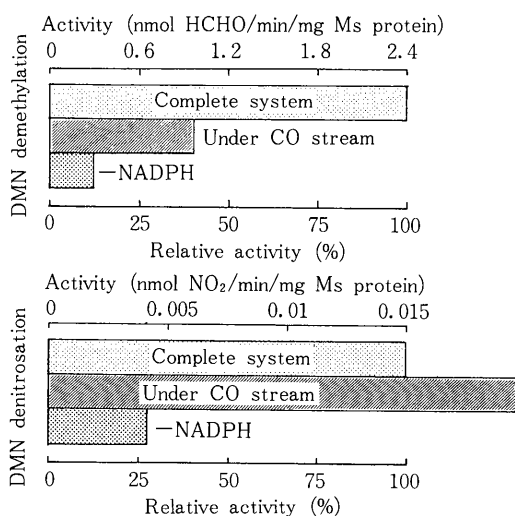
ジメチルニトロサミン脱メチル化活性

Table 5 にウサギ肝臓のミクロソームによる DMN の発癌化代謝とされている脱メチル化代謝活性に及ぼす食餌たん白質やアルコールの影響を示した。食餌たん白質の影響としては肝全体当りおよび体重 1 kg 当りの活性では SPI 群の方がカゼイン群よりも高い傾向が control 群, EtOH 群のいずれにも認められた。またアルコールの影響としては 1 mg ミクロソームた

Table 5. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of dietary proteins on DMN demethylation activity by rabbit liver microsomes

Activity of DMN demethylation	21% Casein		21% SPI	
	Control	EtOH	Control	EtOH
<i>nmol HCHO/min /g Ms protein</i>	2.35±0.18	2.97±0.35	1.91±0.17	2.56±0.16
<i>nmol HCHO/min /g liver</i>	18.81±1.05	25.25±3.01	16.38±3.48	25.69±2.88
<i>nmol HCHO/min /whole liver</i>	1539±140	1977±110	1744±333	2367±268
<i>nmol HCHO/min /kg body weight</i>	449.8±34.7	605.2±22.1	463.5±60.1	680.7±88.8

SPI : soy protein isolate, Ms : microsome, DMN : dimethylnitrosamine, EtOH : ethanol.
(mean±S.E.M.)



DMN: dimethylnitrosamine. Ms: microsome.

Fig. 1. DMN demethylation and denitrosation activities by rabbit liver microsomes under carbon monoxide and in absence of NADPH.

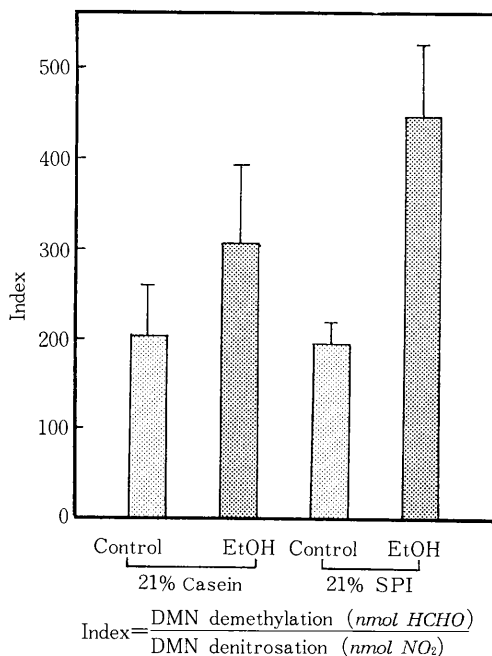


Fig. 2. The index of carcinogenesis on DMN metabolism.

Table 6. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of dietary proteins on DMN demethylation activity by rabbit liver microsomes

Activity of DMN demethylation	21% Casein		21% SPI	
	Control	EtOH	Control	EtOH
<i>nmol NO₂/min</i> <i>/g Ms protein</i>	0.013±0.004	0.016±0.002	0.010±0.001	0.007±0.001
<i>nmol NO₂/min</i> <i>/g liver</i>	0.138±0.064	0.156±0.043	0.081±0.012	0.069±0.008
<i>nmol NO₂/min</i> <i>/whole liver</i>	11.52±5.45	12.67±3.33	8.67±0.94	5.93±0.41
<i>nmol NO₂/min</i> <i>/kg body weight</i>	3.33±1.56	3.85±1.03	2.37±0.13	1.69±0.14

SPI : soy protein isolate, Ms : microsome, DMN : dimethylnitrosamine,
EtOH : ethanol.
(mean±S.E.M.)

ん白質当り, 1g 肝臓当り, 肝全体当り, 1kg 体重当りの全ての活性が EtOH 群で有意に高いことが, カゼイン群と SPI 群の両群で認められた。

ジメチルニトロサミン脱ニトロソ化活性

Table 6 では DMN の解毒代謝活性とされている脱ニトロソ化活性に対する食餌たん白質とアルコールの影響を示しているが, 食餌たん白質の影響としては 1mg ミクロソームたん白質当り, 1g 肝臓当り, 肝全体当り, 1kg 体重当りの活性はいずれも control 群, EtOH 群ともに SPI 群においてカゼイン群よりも有意に低値を示した。さらに興味あることに, アルコールは SPI 群で一層その活性を低下させた。

ジメチルニトロサミン代謝における発癌化指数

Fig. 2 では DMN による肝臓発癌化メカニズムを発癌側と生体防御側の両側から検討するために独自の発癌化指数 (脱メチル化活性/脱ニトロソ化活性) を考案し, 食餌たん白質やアルコールの影響をこの指数をもって比較検討した。これによると食餌たん白質の影響としては control 群どうしでは有意差はなかったが, EtOH 群では SPI 群がカゼイン群に比べて有意に高値を示した。すなわち, SPI 食 EtOH 群の発癌化指数がもっとも高かった。

考 察

食餌たん白質の相異, アルコール飲用の有無による体重への影響は, 有意な変化はなかったが, 肝臓は SPI 群の方がカゼイン群より明らかに重かった。このため肝臓ミクロソームのたん白質含量, P-450 含量, FP₂ 活性, チトクローム b₅ 含量は 1mg ミクロソームたん白質当りでは著差はなかったが, 肝臓全体当りでは SPI 群の方で高値を示した。またアルコールの影響と

しては, SPI 群の EtOH 群でこれらの成分が高値を示し, これは 1mg ミクロソームたん白質当り, 1g 肝臓当り, 肝全体当り, 1kg 体重当りのいずれの場合にも同様の傾向を認めた。

その一酸化炭素阻害や NADPH の要求性より P-450 によって触媒されることが明らかである DMN の脱メチル化 (発癌化) 活性は, 食餌たん白質の影響は少なく, 慢性アルコール摂取群によって両たん白質群ともに 1.26~1.56 倍促進されることがわかった。一方 DMN の脱ニトロソ化活性は, SPI 群において全ての単位当りの活性がカゼイン群よりも低値を示しており, さらにその中でも慢性アルコール摂取群に一層の活性低下 (カゼイン・control 群の約 50%) を認めた。即ち本反応は, SPI 食のうえアルコール飲用することでもっとも減少することが判明した。さらにこの反応は P-450 によっては触媒されず, むしろ P-450 による反応を強力に阻害する一酸化炭素によって逆に反応が促進される点が興味深い。

最後に DMN 代謝を発癌側 (脱メチル化反応) と生体防御側 (脱ニトロソ化反応) から検討するために考案した独自の発癌化指数は, 前述の 4 群間における両活性から, 食餌たん白質の影響は認められなかったが, 慢性アルコール摂取によって SPI 食群の方に明らかな高指数を示した。このことは, 肝ミクロソームにおける DMN 脱メチル化酵素 (P-450) はカゼイン群, SPI 群ともに, 慢性アルコール摂取によって同程度に誘導されるが, 一方 DMN 脱ニトロソ化酵素はカゼイン群では慢性アルコール摂取によって誘導される傾向にあるにもかかわらず, 逆に SPI 群では 15~32% 酵素活性が低下することに起因する。即ちアミノ酸組成の相異に原因するかどうか定かではないが, と

にかく“異なったたん白質食ではアルコールの影響の仕方も異なる場合がある”，ということである。

文 献

- 1) Bartsch, H. and Montesano, R. (1984) : relevance of nitrosoamines to human cancer. *Carcinogenesis*, **5**, 1381-1393.
- 2) Forman, D., Al-Dabbagh, S. and Doll, R. (1985) : Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. *Nature*, **313**, 620-625.
- 3) Hecht, S. S. (1985) : Chemical carcinogenesis : an overview. *Clin. Physiol. Biochem.*, **3**, 89-97.
- 4) 根岸友恵, 早津彦哉 (1989) : 発癌物質の摂取と排泄. 代謝, **24**, 17-27.
- 5) Alderson, T. (1985) : Formaldehyde-induced mutagenesis : a novel mechanism for its action. *Mutation Res.*, **154**, 101-110.
- 6) Montesano, R. and Bartsch, H. (1976) : Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds : possible environmental hazards. *Mutation Res.*, **32**, 179-228.
- 7) 賀来正俊 (1989) : 消化管における第一線生体防御機構とその発生. 生体防御, **6**, 33-43.
- 8) Kaku, M., Ichihara, K., Kusunose, E., Ogita, K., Yamamoto, S., Yano, I. and Kusunose, M. (1984) : Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for prostaglandin and fatty acid hydroxylase activities from the microsomes of rabbit small intestinal mucosa. *J. Biochem.*, **86**, 1883-1891.
- 9) Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2385.
- 10) Taniguchi, H., Imai, Y., Iyanagi, T. and Sato, R. (1979) : Interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450 in the membrane of phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **550**, 341-356.
- 11) Yang, C. S., Tu, Y. Y., Koop, D. R. and Coon, M. J. (1985) : Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.*, **45**, 1140-1145.
- 12) Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, **55**, 416-421.
- 13) Lorr, N. A., Tu, Y. Y., and Yang, C. S. (1982) : The nature of nitrosamine denitrosation by rat liver microsomes. *Carcinogenesis (Lond.)*, **3**, 1039-1043.
- 14) 鈴木啓文, 賀来正俊, 堀 清記, 細野道雄, 河野節子. (1988) : SHR における肝臓ミクロソームのチトクローム P-450 およびジメチルニトロサミン脱メチル化活性におよぼす分離大豆たん白質と運動の影響. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **9**, 25-32.