

# 低たん白質食，慢性アルコール飲用ウサギの肝ミクロソームにおける肝臓発癌物質ジメチルニトロサミンの発癌化代謝及び解毒化代謝に対する分離大豆たん白質の影響

EFFECT OF SPI ON CARCINOGENIC AND DETOXICATING METABOLITES OF DIMETHYLNITROSAMINE IN LIVER MICROSOMES OF RABBITS FED ON LOW PROTEIN DIET AND ETHANOL

細野道雄（杏和総合医学研究所）

鈴木啓文・梶野大典・石指宏通・堀 清記（兵庫医科大学第一生理学）

吉尾雅春（協和会病院）

賀来正俊（賀来医院）

Michio HOSONO<sup>1</sup>, Hirofumi SUZUKI<sup>2</sup>, Daisuke KAJINO<sup>2</sup>, Hiromichi ISHIZASHI<sup>2</sup>, Seiki HORI<sup>2</sup>, Masaharu YOSHIO<sup>3</sup> and Masatoshi KAKU<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Kyowa Synthetic Medical Laboratory, Nishinomiya 663

<sup>2</sup>First Department of Physiology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663

<sup>3</sup>Kyowakai Hospital, Suita 574

<sup>4</sup>Kaku Clinic, Kobe 658

## ABSTRACT

To study how the metabolism of dimethylnitrosamine (DMN) is affected by administration of ethanol and 2 kinds of low protein diets, 24 rabbits at 18 weeks of age, assigned to four groups, each with 6 rabbits, were fed for 8 weeks on the following 4 different diets: 7% protein containing 4.8% casein and water, 7% protein containing 4.8% casein and 7.5% ethanol, 7% protein containing 4.8% soy protein isolate (SPI) and water, and 7% protein containing 4.8% SPI and 7.5% ethanol. Microsomal protein contents and cytochrome P-450 contents were greater in SPI diet groups than in casein diet groups. DMN demethylation activity and DMN denitrosation activity were greater in SPI diet groups than in casein diet groups. Chronic ethanol feeding increased DMN denitrosation activity in both low protein diet groups. The ratio of DMN demethylation activity (carcinogenic action) to DMN denitrosation activity (detoxication action) was smaller in SPI diet groups than in casein diet groups. The value of this ratio was decreased by chronic ethanol feeding in both low protein diet groups. Cytotoxic and carcinogenic actions of DMN might be reduced by 7% SPI diet due to increase of denitrosation of DMN in liver microsome and chronic 7.5% ethanol feeding alleviates metabolic activation of DMN to carcinogenic compounds. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **12**, 23-28, 1991.

食事中の栄養素の不足やアンバランス、嗜好品（アルコール・たばこなど）が肝臓における異物代謝反応を変動させることは、これまでに数多く報告されており<sup>1-8)</sup>、一般に低たん白質食や無たん白質食ではその異物代謝反応の第一相で主役を担うミクロソーム（Ms）中の cytochrome P-450（P-450）量やその電子伝達系の構成成分である NADPH-P-450 還元酵素活性および cytochrome b<sub>5</sub> 量は低下し、異物代謝酵素活性も減少する傾向にある。一方高たん白質食では P-450 関連成分含量の増加や代謝酵素活性の亢進を生じる傾向にある。しかし興味深いことは、たん白質の量ばかりでなく質によっても P-450 量や代謝酵素の活性が著しく変動することである<sup>9,10)</sup>。今回、我々は異なった2種類のたん白質を用いた7%低たん白質食（カゼイン食・SPI 食）で各々アルコール・非飲用の計4群に分けて飼育したウサギの肝臓 Ms を用いて肝臓の強力な前駆発癌物質であるジメチルニトロサミン（DMN）<sup>11,12)</sup>の発癌代謝活性とも言うべき脱メチル化活性と解毒代謝活性ともいうべき脱ニトロ化活性<sup>13-15)</sup>を測定し、両代謝活性の比率（脱メチル化活性/脱ニトロ化活性）を算出、比較した。

さらに、それら両代謝反応を触媒する P-450 関連成分の活性・含量も測定し、低たん白質食・慢性アルコール摂取条件下における DMN 代謝への SPI の影響を検討した。

## 実験方法

### 動物

ウサギは、生後18週齢のオス白ウサギ（体重約2.8 kg）を1週間、標準固形飼料（日本クレア CE-2）で予備飼育した後、実験に供した。

### 食餌

食餌中のたん白質として分離大豆たん白質（SPI；フジプロ R）とカゼインを用いて2種類のたん白質食を作成し、脂質、塩分、ビタミン、ミネラルなどの栄養成分は等量の配合とした（Table 1）。アルコールは7.5%エタノール水溶液を飲料水として与えた。

### 実験群

①7%たん白質食（4.8% casein 含有）・蒸留水飲用群、②7%たん白質食（4.8% casein 含有）・7.5%エタノール飲用群、③7%たん白質食（4.8% SPI 含有）・蒸留水飲用群、④7%たん白質食（4.8% SPI 含有）・7.5%エタノール飲用群の4群（1群は6羽）に分けて8週間飼育し、発育、一般状態、食餌摂取量と飲水量、体重の変化などを調べた。

### Ms の調製

飼育終了後、屠殺して速やかに肝臓を摘出し、重量、大きさを測定して1.15% KCl 液で灌流した。肝臓 Ms は市原、賀来らの方法<sup>16,17)</sup>に改良を加えた超遠心分画法にて調製した。

### P-450 関連成分の含量、活性測定法

Ms 中の 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<sup>18)</sup>を用いて測定した。NADPH-P-450 還元酵素（FP<sub>2</sub>）活性は谷口らの方法<sup>19)</sup>、cytochrome b<sub>5</sub>（Cyt. b<sub>5</sub>）含量は大村と佐藤の方法<sup>18)</sup>を用いて分光学的に測定した。

### DMN の脱メチル化活性および脱ニトロ化活性測定法

DMN 脱メチル化活性は Yang らの方法<sup>20)</sup>を一部変換して測定した。反応液0.5 mL 中に Ms 1 mg、250 mM の DMN、2 mM の NADPH、100 mM の Tris-HCl buffer（pH 8.5）を加えて37℃、20分間反応させ、代謝産物である HCHO の量を Nash の方法<sup>21)</sup>で分光学的に測定することにより DMN 脱メチル化活性の測定をした。一方、DMN の脱ニトロ化活性は Lorr らの方法<sup>14)</sup>を改良して測定した。即ち反応液0.5 mL 中に Ms 1 mg、70 mM の DMN、0.3 mM の NADPH、100 mM の Tris-HCl buffer（pH 8.25）を加えて37℃、1分間反応させ、代謝産物である NO<sub>2</sub><sup>-</sup>の量を分光学的に545 nm の波長で測ることにより活性を測定した。

### DMN 代謝バランスの検討

調製した肝臓 Ms 1 mg たん白質当たりの1分間に

Table 1. Composition of experimental diet

| Ingredients                                     | Casein | SPI    |
|-------------------------------------------------|--------|--------|
| Protein level                                   | 7 %    | 7 %    |
| SPI                                             | 0      | 4.8    |
| Casein                                          | 4.8    | 0      |
| Corn starch                                     | 41.6   | 41.6   |
| Ocenol                                          | 2.0    | 2.0    |
| Alfalfa                                         | 10.0   | 10.0   |
| Corn                                            | 15.0   | 15.0   |
| Avicel                                          | 7.5    | 7.5    |
| Soy bean oil                                    | 3.5    | 3.5    |
| CaCO <sub>3</sub>                               | 1.5    | 1.5    |
| Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> | 2.0    | 2.0    |
| NaCl                                            | 1.1    | 1.1    |
| Mix. of vitamins                                | 1.0    | 1.0    |
| Mix. of minerals                                | 10.0   | 10.0   |
| Total                                           | 100(%) | 100(%) |

SPI : soy protein isolate

における DMN の脱メチル化活性と脱ニトロソ化活性の比率 (nmol HCHO/nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) を算出し、4 群間で比較・検討した。

## 結 果

### 低たん白質食の相違とアルコール飲用の有無によるウサギ体重への影響

飼育開始前に比べて飼育終了時の体重変化は4群ともに有意に減少を示した。しかし、摂取たん白質の相違やアルコール飲用による影響は認められなかった (Table 2)。

### 低たん白質食の相違とアルコール飲用の有無によるウサギ肝重量、肝 Ms たん白質含量への影響

8週間飼育後の肝重量およびその体重に対する割合はカゼイン食群、SPI 食群で差はなかった。しかし両群ともにアルコール飲用により低値を示す傾向を認めた。肝 Ms 中のたん白質含量は、1g 肝臓当たりでも肝臓全体当たりでも SPI 食群で高値を示した (Table

3)。

### 肝 Ms 中の P-450 関連成分の含量および活性

P-450 および Cyt. b<sub>5</sub> 含量は1mg Ms たん白質当たり、肝臓全体当たり共に SPI 食群で有意に高値を示した。アルコール飲用による影響は1mg Ms たん白質当たりでは認められなかった。しかし肝臓全体当たりでは肝重量の差により EtOH 群で低値を示した。FP<sub>2</sub> 活性は逆に SPI 食群で低値を示したがアルコール飲用の影響はやはり1mg Ms たん白質当たりでは認められなかった (Table 4)。

### ジメチルニトロサミン脱メチル化活性

Fig. 1 縦軸上向きに DMN の発癌化代謝活性とされている脱メチル化活性を示し、本活性に与える摂取たん白質やアルコールの影響を検討した。たん白質の相違による影響としては、SPI 食群の方がカゼイン食群よりも1mg Ms たん白質当たり、肝臓全体当たり共に高い傾向が認められた。しかしアルコール摂取による本活性への影響は認められなかった。

Table 2. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of low protein diets on body weight gain

| Diet      | Drink    | Body weight<br>before exp. feed | Body weight<br>after exp. feed | Change<br>in body weight |
|-----------|----------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
|           |          | <i>kg</i>                       | <i>kg</i>                      | <i>kg</i>                |
| 7% Casein | D. D. W. | 2.88±0.17                       | 2.64±0.17                      | -(0.24±0.11)             |
|           | EtOH     | 2.93±0.21                       | 2.55±0.19                      | -(0.38±0.15)             |
| 7% SPI    | D. D. W. | 2.83±0.14                       | 2.52±0.26                      | -(0.31±0.19)             |
|           | EtOH     | 2.57±0.13                       | 2.30±0.07                      | -(0.23±0.13)             |

SPI : soy protein isolate, D. D. W. : deionized distilled water,  
EtOH : ethanol (7.5 %), exp. feed : experimental feeding.  
(mean±S. E. M. n=6)

Table 3. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of low protein diets on liver weight and liver microsomal protein content

| Diet      | Drink    | Liver weight<br>after exp. feed | Relative<br>liver weight | Liver microsomal protein content |                       |
|-----------|----------|---------------------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|
|           |          | <i>g</i>                        | <i>%</i>                 | <i>mg/g liver</i>                | <i>mg/whole liver</i> |
| 7% Casein | D. D. W. | 65.3± 4.3                       | 2.58±0.13                | 6.60±1.13                        | 425.6±67.2            |
|           | EtOH     | 57.6± 7.2                       | 2.22±0.25                | 7.16±1.15                        | 383.1±46.6            |
| 7% SPI    | D. D. W. | 72.3±14.5                       | 2.85±0.34                | 8.06±0.37                        | 578.4±93.0            |
|           | EtOH     | 54.7± 7.8                       | 2.38±0.34                | 7.71±1.54                        | 414.6±49.0            |

SPI : soy protein isolate, D. D. W. : deionized distilled water, EtOH : ethanol (7.5 %),  
exp. feed. : experimental feeding. (mean±S. E. M. n=6)  
Relative liver weight : liver (g)/body (g) (%)

## ジメチルニトロサミン脱ニトロソ化活性

Fig. 1 縦軸下向きに DMN の分解・解毒代謝活性とされている脱ニトロソ化活性を示し、本活性に与える摂取たん白質やアルコールの影響を検討した。たん白質の相違による影響は顕著であり、いずれの単位当たりの活性でも SPI 食群の方がカゼイン食群よりも 3～8 倍高活性を示した。さらにその際のアルコール摂取は本活性を 1.5～4 倍増強させた。

## ジメチルニトロサミン代謝バランス

Fig. 2 では DMN 代謝を発癌側と解毒側の両側から検討するために脱メチル化活性/脱ニトロソ化活性比率を両代謝反応において 1 mg Ms たん白質当たり 1 分間に生成される反応生成物の量 (nmol/HCHO/nmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) より算定し、摂取たん白質の相違およびアルコールの影響をこの比率を用いて検討した。その結果、SPI 食は DMN の脱メチル化活性/脱ニトロソ

Table 4. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of low protein diets on cytochrome P-450, NADPH-cytochrome P-450 reductase, and cytochrome b<sub>5</sub> of rabbit liver microsomes

| Microsomal cytochrome P-450 linked system | 7 % Casein |            | 7 % SPI     |            |
|-------------------------------------------|------------|------------|-------------|------------|
|                                           | D. D. W.   | EtOH       | D. D. W.    | EtOH       |
| Cytochrome P-450 content                  |            |            |             |            |
| nmol/mg Ms protein                        | 0.44±0.06  | 0.38±0.07  | 0.88±0.30   | 0.68±0.12  |
| nmol/whole liver                          | 192.3±39.9 | 141.5±32.0 | 511.8±224.5 | 279.1±24.7 |
| NADPH-P-450 reductase activity            |            |            |             |            |
| Unit/mg Ms protein                        | 0.10±0.01  | 0.07±0.02  | 0.03±0.01   | 0.04±0.01  |
| Unit/whole liver                          | 40.7±7.0   | 25.5±6.8   | 17.1±9.6    | 15.3±3.4   |
| Cytochrome b <sub>5</sub> content         |            |            |             |            |
| nmol/mg Ms protein                        | 0.64±0.07  | 0.57±0.12  | 0.80±0.14   | 0.78±0.09  |
| nmol/whole liver                          | 285.0±61.4 | 203.9±41.7 | 462.5±120.8 | 321.0±31.2 |

Ms : microsome, SPI : soy protein isolate, D. D. W. : deionized distilled water, EtOH : ethanol.  
(mean±S. E. M. n=6)

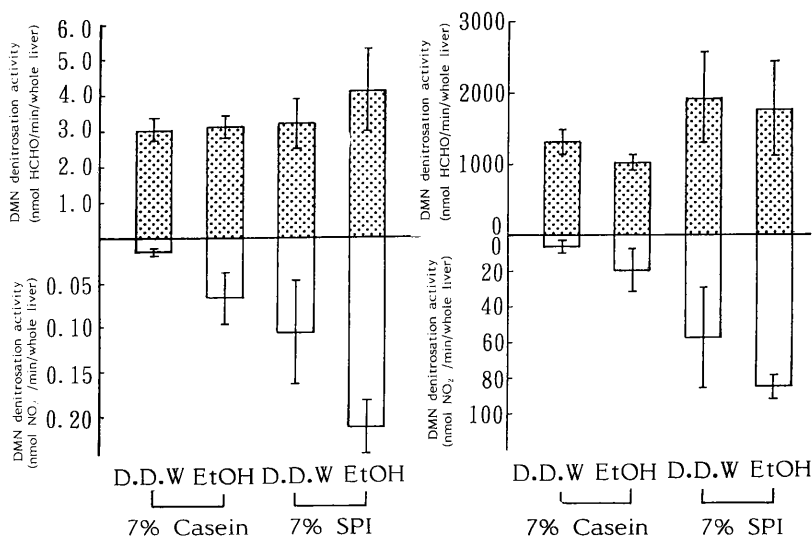


Fig. 1. Effects of chronic alcohol feeding with two kinds of low protein diets on DMN demethylation and denitrosation activities by rabbit liver microsomes.  
DMN : dimethylnitrosamine, D. D. W : deionized distilled water, EtOH : ethanol.

化活性比率をカゼイン食に比べて顕著に低下させた。またいずれの低たん白質食条件下においてもアルコール摂取は本比率を有意に低下させた。

## 考 察

摂取たん白質の相違、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。肝臓重量およびその体重に対する割合には、カゼイン食群、SPI 食群で差はなかったが両群ともにアルコール飲用により低値を示す傾向を認めた。SPI の効果として興味あることは、肝 Ms 中のたん白質含量および P-450 含量の変化であり 1 g 肝臓当たりでも肝臓全体当たりでも SPI 食群で高値を示した。一方 P-450 の電子供与体の変化は Cyt. b<sub>5</sub> 含量は増加するものの FP<sub>2</sub> 活性は逆に減少することから SPI 食群では NADH からの電子伝達が優位である可能性がある。またこれら肝 Ms 中の P-450 関連成分に与えるアルコールの影響としては有意なものはなく、肝臓重量の減少による影響の方が強く現れた。

DMN 代謝活性に与える SPI 食の影響としては脱メチル化活性を 1.1~1.75 倍、脱ニトロソ化活性を 3~8 倍いずれもカゼイン食よりも増強させるが、脱ニトロソ化活性の増強効果が顕著であるため脱メチル化活性/脱ニトロソ化活性比率を有意に低下させた。DMN 代謝活性に与えるアルコール摂取の影響としては、脱

メチル化活性にはあまり影響を与えずに脱ニトロソ化活性をカゼイン食群、SPI 食群いずれでも増強させ脱メチル化活性/脱ニトロソ化活性比率を有意に低下させた。即ち低たん白質食条件下では、カゼインよりも SPI を中心としたたん白質食摂取のほうが脱ニトロソ化を通じて DMN の解毒代謝を促進し、DMN の代謝バランスの細胞傷害・発癌側への移行を抑制すると考えられ、さらにその際のアルコール摂取は本作用をさらに増強していることが示唆された。これらのメカニズムを説明することは大変難しいが、その可能性として肝臓 Ms 中の異なった機能を持った P-450 分子種の割合の変化が考えられる。

## 文 献

- 1) Jean, G. J. and Claude, H. (1975): Effects of chronic ethanol administration in the rat: Relative dependency on dietary lipids-I. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1475-1480.
- 2) Rolf, T., Fernando, M. and Alexander, S. P. (1981): Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): Respective roles of ethanol and carbohydrates for the enhanced activity after chronic alcohol consumption. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 1745-1751.
- 3) Antal, M., Nagy, K. and Bedo, M. B. (1982): Effect of dietary protein and lipid on the activity of hepatic mixed-function oxidase system in young and adult rats. *Ann. Nutr. Metab.*, **26**, 393-399.
- 4) Diane, F. B., Dan, S. H. and Pamela, Y. B. (1983): Effects of dietary protein level on hepatic microsomal mixed-function oxidase systems during aging in two generation of Syrian hamsters. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, **68**, 77-86.
- 5) 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.
- 6) Liver, C. S. (1988): The microsomal ethanol oxidizing system: its role in ethanol and xenobiotic metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, **16**, 232-239.
- 7) Suzuki, H., Kaku, M., Hori, S. and

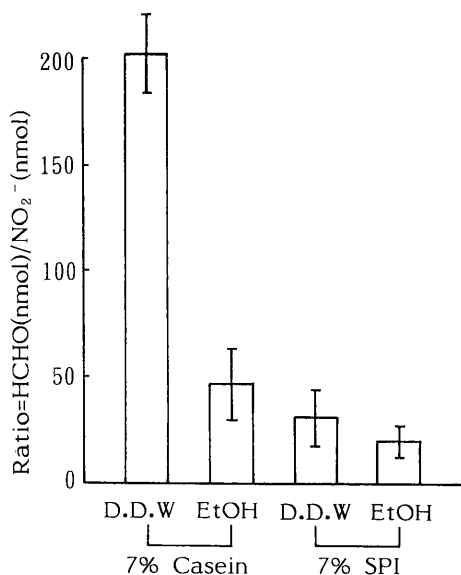


Fig. 2. The ratio of DMN demethylation activity to DMN denitrosation activity in rabbit liver microsomes.

- Shimoyama, T. (1991) : Effect of dietary protein depletion and ethanol on demethylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine by rabbit liver microsomes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **37**, 301-312.
- 8) Amelizad, S., Appel, K. E., Schoepe, M., Ruhl, C. S. and Oeach, F. (1989) : Enhanced demethylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine by human liver microsomes from alcoholics. *Cancer Lett.*, **46**, 43-49.
- 9) Diane, F. B. and Gloria, H. S. (1982) : Dietary amino acids and hepatic microsomal drug metabolism in Syrian hamster. *Drug-Nutrient Interactions*, **1**, 177-187.
- 10) 鈴木啓文, 賀来正俊, 梶野大典, 堀 清記, 細野道雄, 河野節子, 吉尾雅春 (1989) : 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. 大豆たん白質栄養研究会誌**10**, 39-44.
- 11) Bartsch, H. and Montesano, R. (1984) : Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis*, **5**, 1381-1393.
- 12) Lai, D. Y. and Arcos, J. C. (1980) : Dialkyl-nitrosamine bioactivation and carcinogenesis. *Life Sci.*, **27**, 2149-2165.
- 13) Tu, Y. Y. and Yang, C. S. (1983) : High-affinity nitrosamine dealkylase system in rat liver microsomes and its induction by fasting. *Cancer Res.*, **43**, 623-629.
- 14) 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.
- 15) Maduagwu, E. N. (1989) : Nitrosamine metabolism in protein-deficient weanling rats during the process of repletion. *Ann. Nutr. Metab*, **33**, 49-56.
- 16) Ichihara, K., Yamakawa, I., Kusunose, E. and Kusunose, M. (1979) : Fatty acid  $\omega^-$  and ( $\omega$ -1)-hydroxylation in rabbit intestinal mucosa microsomes. *J. Biochem.*, **86**, 139-146.
- 17) 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.*, **96**, 1883-1891.
- 18) Omura, T. and Sato, R. (1964) : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- 19) 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 vesicle. *Biochim. Biophys. Acta*, **550**, 341-356.
- 20) Yang, C. S., Tu, T. T., Koop, D. R., and Coon, M. J. (1985) : Metabolism of nitrosamine by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Res.*, **45**, 1140-1145.
- 21) Nash, T. (1953) : The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.*, **55**, 416-421.
- 22) Astrom, A., and Depierre, J. W. (1986) : Rat liver microsomal cytochrome P-450 purification, characterization, multiplicity and induction. *Biochim. Biophys. Acta*, **853**, 1-27.