

二次胆汁酸捕捉指向性ポリペプチドの検索とそのマスキング活性測定法の確立

Binding of Secondary Bile Acids to Polypeptides from Soy Protein, and Assessment of Their Masking Efficiency in Relation to Antitumorigenicity

岩見公和・金谷昌広・東 直之・金本龍平 (京都府立大学農学部)

Kimikazu IWAMI, Masahiro KANAYA, Naoyuki ADZUMA and Ryuhei KANAMOTO

Department of Agricultural Chemistry, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

The high-molecular weight fraction of indigestible polypeptides from soy protein (HMF) was examined for its ability to trap secondary bile acids in Fischer rats fed on casein or HMF diets supplemented with and without deoxycholate. The HMF intake caused a considerable increase in the fecal excretion of secondary bile acids relative to the casein intake; implying that the colon had been exposed to high concentrations of such bile acids. Secondary bile acids are well-known to serve as risk factors for colonic tumorigenesis. For this reason, the safety of HMF against tumorigenesis was reevaluated by measurement of aberrant crypt foci (ACF) in the colon of rats loaded with azoxymethane and/or deoxycholate. As a result, it was revealed that the multiplicity of ACF, but not the number of ACF, was significantly depressed by HMF feeding in DCA-loaded rats. Further study is required for assessment of the safety or antitumorigenicity of HMF. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 70-77, 1995.

近年、我国でも食生活の変化（高脂肪食や無繊維食の摂取）に伴って大腸癌が増加する傾向にある。胆汁酸は、肝細胞においてコレステロールから合成され体内コレステロールの代謝調節に、また脂肪の消化や吸収に重要な役割を演じている。しかし、腸腔内で再吸収を免れ微生物変換をうけた胆汁酸の二次生成物（二次胆汁酸）は、大腸癌誘発の危険因子とみなされている。就中、デオキシコール酸(deoxycholic acid, DCA)は、癌原物質であるメチルコランスレン (20-methylcholanthrene)に類似した構造をもち、実際*in vitro*での酸化反応によってメチルコランスレンを生ずる。これまで実験動物腸内からこの物質が検出された例はないが、発癌剤処理した実験動物に二次胆汁酸を腸注し続けると、大腸腫瘍の発生は明らかに促進される^{1,2)}。一方、かつて高コレステロール血症の治療薬としてよ

く用いられたコレステラミン（陰イオン交換樹脂）は、胆汁酸と結合してその再吸収を妨げコレステロール異化を促進して血中コレステロール濃度を下げることが、長期にわたって服用した場合には逆に大腸内の胆汁酸濃度を高め大腸癌発生の危険を増大させる^{3,4)}。このような不都合が起きる理由には、大腸内での有機酸発酵によってpHが下がり、胆汁酸はコレステラミンから遊離して発癌プロモーターとして働く可能性が考えられる。

血中コレステロール値改善に有効性の認められている大豆たん白質摂取も、糞中への胆汁酸排泄を高める。これに関連した大豆たん白食の安全性評価のため、今回の報告ではラットを用いた発癌剤およびDCA負荷実験を実施し、まず大豆たん白質由来ペプチド高分子画分(HMF)摂取による二次胆汁酸の糞中排泄とアゾキシメタン(azoxymethane, AOM)誘発性大腸粘膜

変異陰窩 (aberrant crypt foci, ACF) に対するHMF食の影響について述べる。

実験方法

実験動物および発癌剤処理

実験には7週齢、体重150～160 gのFischer系雄ラット（日本クレア）を用いた。AOM（Sigma Chemical Co., St. Louis）は、飼育実験開始から最初の3週間、毎週1回15 mg/kg体重ずつ、腹腔内に投与した。なお、同容量の生理的食塩水のみ注射したものを対照とした。

飼育条件

試験群を8群に分け（n=5）、Table 1に示したようにA、C、E、G群には20%カゼイン食を、B、D、F、H群には27% HMF食を与え、C～HをAOM投与群、A、Bを生理的食塩水投与の対照群とした。またA～Dの飼料には、あらかじめ0.2% DCAを混入した。ラットは1回目の注射後、個別の飼育ケージに入れ、明暗12時間周期、恒温恒湿の飼育室で4週間飼育した。飼育方法はG、H群のみ自由摂取で、A～F群はpair-feedingとしている。飼育期間中、毎日1回飼料摂取量と体重の測定を行い、屠殺前4日間の糞を集めた。所定期間（4週間）飼育後、全ラットをペントバルビタール麻酔下で開腹して腹部大動脈から採血、大腸およびその他の臓器を集めた。

大腸粘膜の観察

摘出した大腸は生理的食塩水でよく濯いだ後、コルク板上にピンでシート状に広げて水分を拭き取り、10%ホルマリン溶液中に入れて保存（固定）、0.2%メチレンブルーで10～15分間染色後直ちに実体顕微鏡下でACF数の測定と形態の観察を行った。

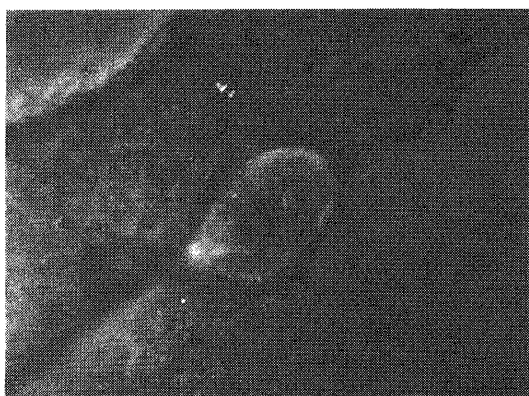
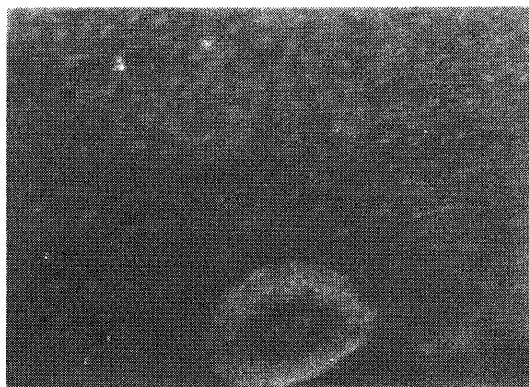


Fig. 1. Microscopic observation for aberrant crypt foci in the colon of a rat with AOM loading. The formalin-fixed colon was stained with 0.2% methylene blue, and the number as well as multiplicity of aberrant crypt foci was counted under a microscope. The above photograph represents examples of ACF-1 and ACF-2 ($\times 100$).

Table 1. Dietary composition for each group (%)

Ingredient	A	B	C	D	E	F	G	H
Protein								
Casein + 0.7% Met	20	—	20	—	20	—	20	—
HMF + 2.0% Lys		27	—	27	—	27	—	27
α -Corn starch	64.8	57.8	64.8	57.8	65.0	58.0	65.0	58.0
Soybean oil	5	5	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture	5	5	5	5	5	5	5	5
Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1	1	1
Cellulose powder	4	4	4	4	4	4	4	4
Deoxycholic acid	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0	0	0
AOM injection	—	—	+	+	+	+	+	+

顕微鏡で大腸粘膜表面を観察すると、陰窩とその周囲層が拡大、上皮層に肥厚の伴った変異陰窩がみられる (Fig. 1参照)。これは大腸発癌物質投与によって始めて出現し、腫瘍化するものもあることから‘前癌病変’とみなされ、aberrant cryptと称される⁵⁾。ACFは発癌プロモーターや各種抗腫瘍性成分だけでなく宿主の栄養状態に応答して盛衰を繰り返すが、最近、多くの研究室で発癌(腫瘍化)予知のきわめて簡便なバイオアッ

セイ手段として用いられている⁶⁻⁸⁾。

糞中脂質および胆汁酸の分別定量

乾燥糞粉末の一定量を10倍容のクロロホルム-メタノール (2:1) で数回抽出を繰り返し、溶媒を減圧乾固した後の残留物量を秤量して糞中総脂質量とした。

別に乾燥糞粉末の一定量を10倍容の1N-NaOH/90% ethanol中で60~70°Cに1時間加熱後、水を加えて同量の石油エーテルで抽出したものを中性ステロイ

Table 2. Food intake and body weight gain of experimental rats

Group	DCA	AOM	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/4 weeks)
A	+	—	9.6±0.2	15.6±2.0
B	+	—	9.7±0.1	12.9±3.3
C	+	+	9.8±0.3	11.7±0.9
D	+	+	9.6±0.2	12.8±1.7
E	—	+	9.7±0.1	13.5±1.0
F	—	+	9.8±0.1	11.3±0.7
G	—	+	12.6±0.4	55.2±3.5
H	—	+	12.1±0.2	44.2±2.4

Rats weighing 150-160g were pair-fed (A-F) or *ad libitum* fed (G, H) with prescribed diets for 4 weeks. AOM was intraperitoneally injected once a week for the first 3 weeks.

Table 3. Liver, kidney and spleen weights of experimental rats

Group	DCA	AMO	Tissue weight (g/100 g of body weight)		
			Liver	Kidney	Spleen
A	+	—	3.25±0.07	0.77±0.01	0.36±0.01
B	+	—	3.18±0.07	0.78±0.02	0.34±0.01
C	+	+	3.26±0.11	0.78±0.01	0.36±0.02
D	+	+	3.09±0.03	0.78±0.01	0.36±0.01
E	—	+	3.00±0.03	0.76±0.01	0.32±0.01
F	—	+	3.15±0.01	0.77±0.01	0.32±0.01
G	—	+	3.04±0.04	0.72±0.01	0.32±0.01
H	—	+	3.11±0.04	0.74±0.01	0.29±0.01

Table 4. Total protein and albumin levels in rat serum

Group	DCA	AOM	Total protein (g/100 mL)	Albumin (g/100 mL)	A/G Ratio
A	+	—	6.67±0.11	3.75±0.10	1.25±0.04
B	+	—	6.63±0.13	3.65±0.09	1.20±0.02
C	+	+	6.51±0.08	3.73±0.06	1.28±0.08
D	+	+	6.37±0.15	3.51±0.08	1.23±0.05
E	—	+	6.28±0.05	3.49±0.02	1.27±0.02
F	—	+	6.45±0.15	3.59±0.05	1.26±0.04
G	—	+	6.30±0.12	3.54±0.03	1.29±0.06
H	—	+	6.39±0.10	3.49±0.04	1.24±0.02

A, albumin ; G, globulin.

ド画分、水層および残渣をオートクレーブ(120°C, 2時間)でアルカリ分解後、酸性条件下(pH 2)でクロロホルム-メタノール(2:1)抽出したものを酸性ステロイド画分として各々の定量分析に供した。中性ステロイドの定量は塩化第二鉄-ジギトニン法によって、酸性ステロイドの定量は硫酸法によって行った。胆汁酸個々の含量は、酸性ステロイドをシリカゲル薄層クロマトグラフィー〔展開溶媒; イソオクタン-酢酸エチル-酢酸(5:5:1)〕で各成分に分離後、標準化合物のRfに一致するバンドを掻き取ってシリカゲル粉末を65%硫酸水溶液で抽出、上澄み液の385 nmの吸光度から求めた。

血清成分(脂質, たん白質)の定量

麻酔下腹部大動脈より採血, 遠心分離によって血漿を分離し, 測定まで-20°Cに凍結保存した。解凍後の血清中の総コレステロールおよびHDL-コレステロール濃度の定量は, 市販のアッセイキット(コレステロールC-テストワコー, HDL-コレステロールテストワコー)を用いて行った。血清中の総たん白質量の測定はマイクロビュレット法に, アルブミン濃度の測定はプロモクレゾールグリーン法に準拠した。

統計分析

測定値は平均±SE(n=5)で表わし, 全群間の比較はANOVAにより, 対となるカゼイン食群とHMF食

群間の有意差はStudent's *t*-testによって検定した。

結果と考察

Table 2は1日あたりの飼料摂取量および飼育期間を通しての体重増加量をまとめたものである。AOM投与後ラットは食欲不振と脱毛の症状を呈し, 毒性からの回復にはラットの個体差が影響してpair-feedingでもバラツキが大きかった。*Ad libitum* feedingしたG, H群間の体重増加量には有意な差が生じ, HMF食群で劣った。Fischer系ラットはWistar系ラットよりDCAの苦味に鋭敏なようで, 飼料摂取量はpair-feeding群で平均9.7 g/day/ratとなった。これらのラットはDCAを19.4 mg/day食べていることになる。屠殺時の各臓器重量をTable 3に示した。E, F群間で肝重量に有意な差がみられたが, これはF群の最終体重がE群より低かったためと考えられる。全般にDCA添加群に肝重量の高い傾向がみられたが, 有意な差とは認められなかった。腎重量はG, H群で低い傾向にあり, E, G群間で有意な差となったが, これは分母(体重)の違いによる。

Table 4に血清中のたん白質測定の結果を示した。総たん白質濃度とアルブミン濃度はA, B, C各群でC, D, E各群より若干高い傾向がみられたが, 血漿分離に

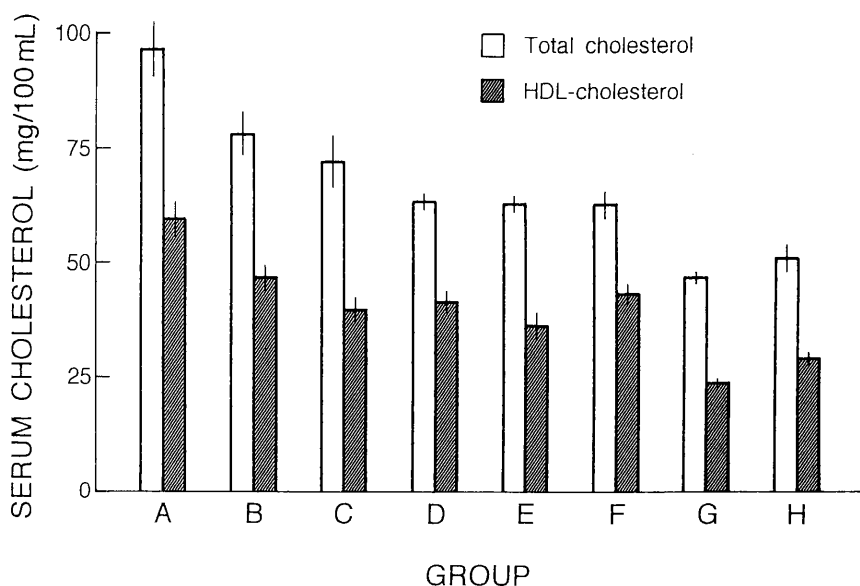


Fig. 2. Serum cholesterol levels in experimental rats. The feeding and growing conditions for each group were shown in Tables 1~4.

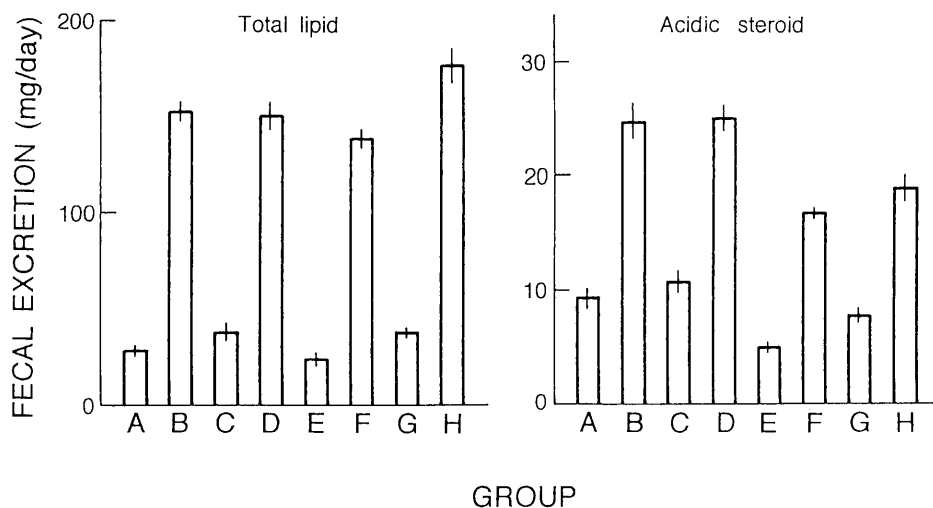


Fig. 3. Fecal lipid and acidic steroid levels in experimental rats. The experimental conditions were the same as in Fig. 2.

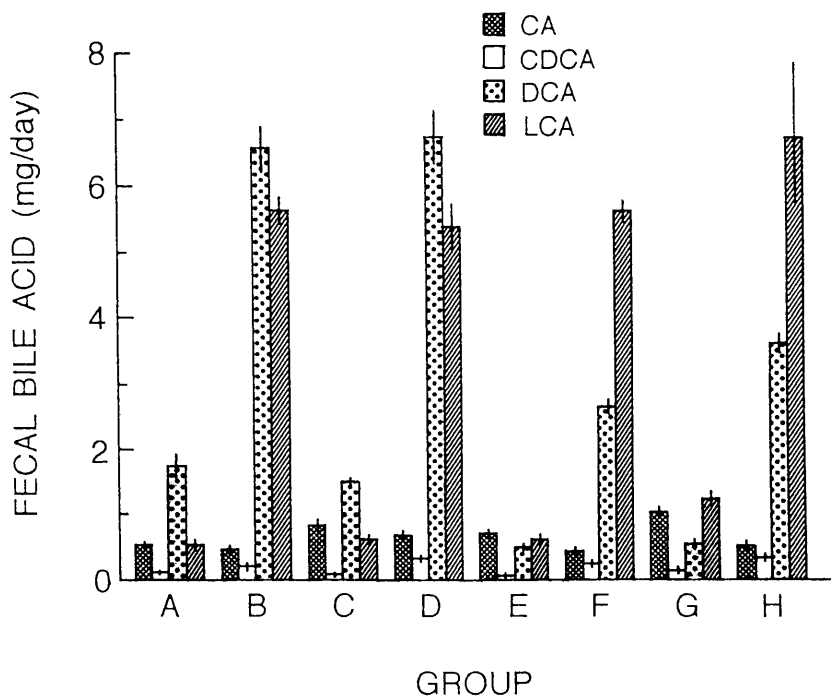


Fig. 4. Individual bile acid levels in the feces. These bile acids were separated on thin-layer chromatogram by R_f -reference to authentic compounds, extracted with 60% sulfuric acid, and determined by absorbance measurement at 385 nm. CA, cholic acid ; CDCA, chenodeoxycholic acid ; DCA, deoxycholic acid ; LCA, lithocholic acid.

際しての溶血の影響もあり、AOM投与による影響はそう大きくないと判断した。血清コレステロール値測定の結果はFig. 2に図示した。一般にAOM無投与のA, B群で高い傾向がみられたが、AOMを投与されDCA添加のC, D群間やDCA無添加のE, F群間に有意な差は認められなかった。HDL-コレステロール値の変動も概ね総コレステロール値と類似の傾向にあるものの、

atherogenic indexはHMF食D, F両群で他の群に比べて若干高くなった。

糞中脂質および酸性ステロイド（胆汁酸）排泄量測定の結果はFig. 3に図示した。両パラメーター共、AOM投与、DCA添加の有無にかかわらずHMF食群はカゼイン食群に比べ高い値を与えた。中性ステロイドも同様の傾向を示したが、1日あたりの糞中排泄量は

Table 5. Number of aberrant crypt foci in rat colon with azoxymethane loading

Group	DCA	Foci	Aberrant crypts	AC/focus
C	+	28.8 ± 5.6	40.0 ± 8.2	1.38 ± 0.04
D	+	57.0 ± 6.8	71.4 ± 9.8	1.24 ± 0.03*
E	—	103.8 ± 6.3	119.0 ± 6.7	1.15 ± 0.02
F	—	99.0 ± 10.7	113.4 ± 12.3	1.15 ± 0.01
G	—	80.4 ± 7.7	102.0 ± 7.7	1.28 ± 0.04
H	—	97.2 ± 6.4	126.0 ± 6.4	1.30 ± 0.04

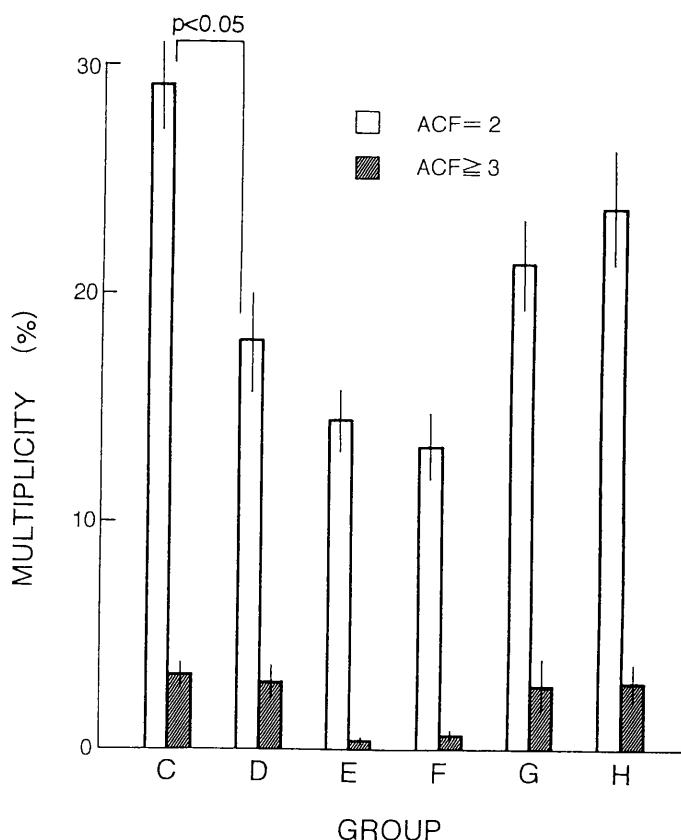


Fig. 5. Appearance ratio of multiple ACF to total ACF in rat colon with AOM loading.

多くても胆汁酸の1/3以下であった (data not shown)。糞中胆汁酸の組成を調べた結果をFig. 4に図示した。CA (コール酸) やCDCA (ケノデオキシコール酸) は、DCA (デオキシコール酸) 添加の有無、摂取たん白質の違いにもかかわらず、全ての群を通して低い傾向にあった。これに対しDCAは糞中胆汁酸の主要成分であり、HMF食群では食餌へのDCA添加によって更に高い排泄量増加が認められた。LCA (リトコール酸) もHMF食群において高い値を示しており、DCA無添加のF、H両群では最も排泄量の高い糞中胆汁酸であった。これらの二次胆汁酸は、ラットを対象とした発癌実験によって腸注を続けられればCAやCDCAに比べ大腸腫瘍化を倍加することが示されている^{1,2)}。

HMF食ラット糞中へのDCA+LCA著量排泄は、大腸粘膜が高濃度の二次胆汁酸に曝される危険のあったことを意味しており、大腸内でのHMF未消化物の役割が注目された。そこで、ホルマリン固定、メチレンブルー染色後の大腸粘膜を実体顕微鏡を用いて観察し、ACF測定の結果をTable 5にまとめた。カゼイン食、HMF食いずれの群もAOM投与しない対照群にACFの出現は認められなかった。AOM投与のカゼイン食およびHMF食群間では、むしろDCAを添加していない食餌群 (E、GやF、H) に数多くのACFが出現した。従来のACF評価法によれば、ACF出現を抑える食餌群ほど病変の腫瘍化の可能性は少なく、したがってその食餌は抗腫瘍効果があるとされてきた。しかし最近、CAを食べさせたラットで食べさせないものよりACF数は少なくとも、当然腫瘍発生率は高くなることが見い出された。この矛盾を説明するため、ACF評価法の発案者であるBirdらはACFにmultiplicityの概念を導入し、ACF-multiplicityと腫瘍化の程度の間こそ密接な相関があることを報告した⁸⁾。Table 5のデータから彼等の新解釈に従ってACFの分裂指数 (crypts/focus) を求めてみると (同表の右端)、DCA添加のC、D群は対応する無添加のE、F群より有意に高くなり、同じDCA添加群間でもC群はD群より高くなった。また、DCA無添加群間に摂取たん白質の違いによる差異は認められなかった。同じ食餌組成でも摂取量を制限しないG、H群ではACF分裂指数の増加する傾向があり、栄養状態が良いほど腫瘍化の進行は早い (?) ことと一致するのかもしれない。

Fig. 5は、AOM投与ラット大腸のACF絶対数ではなくfocusに占める‘複数’のaberrant crypts分布 (%) を図示したものである。ACF-1出現の多寡は必ずしも腫瘍化と結びつかないので、これを省略しACF-2およびACF ≥ 3 についてまとめた。ACF-2ではC群と

それ以外のD、E or F群の間に明らかな差があり、ACF ≥ 3 でもC、D群とE、F群間には有意な差が認められた。

以上、今回の我々の実験でも、AOM投与をうけたラットだけにACFが出現し、DCA添加によりACF数が激減したがACF-multiplicityは有意に増加するという、Birdらの報告と類似の現象を認めた。興味深いのはDCA添加群のACF-multiplicityがカゼイン摂取よりHMF摂取によって低く抑えられたことで、糞中への二次胆汁酸の高い排泄量が腸での高濃度を反映したものであることを考慮するとき、HMF由来の未消化産物はコレステラミンの場合と異なりおそらく疎水結合によって二次胆汁酸をマスクしてプロモーター作用を軽減しようと推察した。

文 献

- 1) 成沢富雄(1987): 大腸癌と胆汁酸、代謝, **24**, 719-725.
- 2) Narisawa T, Magadia NE, Weisburger JH and Wynder EL (1974): Effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J Natl Cancer Inst*, **53**, 1093-1097.
- 3) Sachatello CR (1979): Colon cancer and cholestyramine. *N Engl J Med*, **301**, 1007.
- 4) Nigro ND, Bhadrachari N and Chomchai C (1973): A rat model for studying colonic cancer: Effect of cholestyramine on inducing tumor. *Dis Col Rect*, **16**, 438-443.
- 5) Bird RP (1987): Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*, **37**, 147-151.
- 6) Kawamori T, Tanaka T, Kojima T, Suzui M, Ohnishi M and Mori H (1994): Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn J Cancer Res*, **85**, 686-691.
- 7) Rao CV, Simi B and Reddy BS (1993): Inhibition by dietary curcumin of azoxymethane-induced ornithine decarboxylase, tyrosine protein kinase, arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in the rat colon. *Carcinogenesis*, **14**, 2219-2225.

- 8) Magnuson BA, Carr I and Bird RP (1993) : Ability of aberrant crypt foci characteristics to predict colonic tumor incidence in rats fed cholic acid. *Cancer Res*, **53**, 4499-4504.