

大腸における腫瘍誘発の大豆たん白質食による軽減

岩見公和*・東 直之・町田恵子・佐伯 徹・金本龍平

京都府立大学農学部

Alleviation of Tumorigenesis in Rat Colon by Soy Protein (HMF) Intake

Kimikazu IWAMI, Naoyuki ADZUMA, Keiko MACHIDA,
Tohru SAEKI and Ryuhei KANAMOTO

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

ABSTRACT

HMF, a high-molecular weight 'peptide (insoluble)' fraction from the digestive product of soy protein, was examined for its anti-tumorigenic effect in rat colon. Male Fischer-344 rats with 3 shots of azoxymethane (15 mg/kg BW, once a week) were fed over a period of 39 weeks on 21% HMF- or 15% casein-based diets with or without supplemental 0.2% deoxycholic acid (DCA). Twelve weeks later, five rats from each group were sacrificed to excise the colon, of which the mucosal surface was microscopically observed for aberrant crypt foci (ACF). As a result, the DCA administration was found to cause a considerable decrease in ACF in the casein-fed group, but not in the HMF-fed group. During the feeding period, fecal bile acids were much more excreted in the latter than in the former. This implies that a harmful action of DCA must have been effectively masked by unabsorbed leavings of digested HMF. At the end of 39 weeks' feeding, the colons were taken out of all the rats and subjected to tumorigenic inspection. Among the animals without DCA loading, tumor was observed for only one of the casein-fed group. With respect to the DCA-loaded animals, tumor incidence was 30% in the HMF-fed group (n=9) relative to 60% in the casein-fed group (n=10). The total tumor number was one-sixth as much in the former as in the latter and the average size of tumors (mm in major axis) was 2.0 ± 0.1 in the former against 4.7 ± 0.4 in the latter. It thus seems reasonable to consider that HMF has some alleviative effect on azoxymethane-induced colonic tumorigenesis. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **17**, 77-83, 1996.

Key words: colonic tumor, azoxymethane, deoxycholic acid, aberrant crypt foci, anti-tumorigenic HMF

*〒606 京都市左京区下鴨半木町 1

大豆たん白質は、対成人のアミノ酸スコアが 100

を超え(FAO/WHO/UNU, 1985), 血清コレステロール値低下作用をもち, また成形加工に適した物性を有することから, 近年ますますその食品価値を高めつつある。大豆たん白質の降コレステロール作用については, 諸説があり未だ見解の一致をみないが, 糞中ステロイド排泄増加とそれに伴う代償的なコレステロールの異化亢進によるとするのが最も有力である¹⁾。糞中へのステロイド排泄を高める作用には, 腸内に残存する疎水性ペプチドの胆汁酸結合能の関与が大きい。コレステラミン(陰イオン交換樹脂)にも同様な効果が認められており, メパロチンが開発されるまでは治療薬として実際に用いられていた。しかし, コレステラミンと結合し再吸収を受けなかった胆汁酸が大腸内で二次胆汁酸に変換されると大腸癌誘発促進の危険因子となることが指摘され, 動物実験によってその危険性を示唆する証拠が報告された^{2,3)}。

最近, 実験期間の短縮と検出手段の簡便さのゆえに, 化学発癌剤を投与したとき大腸粘膜に発生する変異陰窩(aberrant crypt foci, 以下 ACF)を前癌病変とみなして⁴⁾食品や天然物成分の発癌性あるいは抗癌性を評価する試みが増えている。我々もアゾキシメタン誘発性腫瘍化に対する大豆たん白質(特に HMF)の影響をみるため ACF 法を採用し, 発癌プロモーター作用を有すると考えられている二次胆汁酸(deoxycholic acid, 以下 DCA)をカゼイン食または HMF 食に添加した場合, ACF および AC 発生総数は前者に比べて後者ではるかに多く, また発癌促進の危険が DCA より大きいとされる lithocholic acid (以下 LCA)の糞中排泄量も HMF 食で著しく高いことを見出した⁵⁾。HMF 食で高いというよりカゼイン食で本来出現すべき ACF が DCA 投与によって抑えられたと解すべきこのような現象は, cholic acid (以下 CA)を摂取させた実験でも認められており⁶⁾, 小腸での吸収を免れた CA が腸内細菌の作用によって DCA に変換されることを考慮するとき, ACF を発癌または抗癌の評価基準とすることへの疑念は決定的となった。そこで, 前回の観察結果の真偽を ACF 数ではなく腫瘍発生の有無によって確かめるため, HMF の継続的供与をうけながら長期間の飼育実験を実施した。

方 法

実験動物および飼育条件

実験には離乳直後の Fischer-344系雄ラット(日本クレア)を用い, 市販粉末飼料に数日間馴らした後, 15%カゼイン(カゼイン14.6%+メチオニン0.4%)食

群と21% HMF (HMF20.6%+メチオニン0.4%)食群および各々に0.2% DCA を添加した食餌群の4群に分け, Table 1に示した組成の飼料で12週間または39週間飼育した。飼育開始より3週間, 毎週1回(計3回), アゾキシメタン(15 mg/kg 体重)を腹腔内に注射し, 飼料および飲料水に対しては自由摂取とした。前回(昨年度)の実験で DCA をそのまま飼料に添加すると, その苦味のため摂取量が著しく減少することを経験していたので, 今回の実験では DCA のナトリウム塩粉末を腸溶性皮膜(フタル酸酢酸セルロース)で塗布する操作を行ってから使用した。これによって食欲減退も抑えられシヨ糖食とする必要もなくなった。予備実験により15%カゼイン食に対しては21% HMF 食で類似の成長曲線が得られ, またカゼインおよび HMF 共に幼動物に対してはメチオニンが第1制限アミノ酸となることを考慮して, 各々の窒素源の0.4%をメチオニンと入れ替えた。一方, 各群飼料のカゼインと HMF の含量差(6%)は, HMF が窒素源として利用されない「食物繊維」と解釈して HMF 食群にセルロースを加えなかった。ラットは, 1回目のアゾキシメタン注射後それぞれ個別の飼育ケージに入れ, 恒温(約25°C)の飼育室(12時間明暗周期)で所定期間飼育した。飼育期間中, 2日毎に体重および飼料摂取量の測定を行い, 飼育開始後12週目, 1群当たり5匹ずつそれまで4日間の糞を採取すると共に屠殺当日に腹部大動脈からの採血と大腸の摘出を行った。得られた血液は血漿分離後, -80°Cで凍結保存した。飼育開始後39週目, 残りの全ラットに対しても同じ処置を施した。

大腸 ACF および腫瘍形成の観察

摘出した大腸組織は内腔を生理的食塩水でよく洗浄, ろ紙に挟んで10%ホルマリン中で固定(約1日), メチレンブルーで染色後, 実体顕微鏡による ACF の観察を行った⁴⁾。大腸腫瘍形成の判定は, 肉眼的に識別可能なものにとどめ, 顕微鏡倍率を拡大することによってやっと認められるような微小な病巣を除外した。

糞中ならびに血清脂質およびステロイドの定量

採取した糞は凍結乾燥後に秤量, その一部をクロロホルム-メタノール(2:1)で抽出し溶媒乾固後の重量を糞中総脂質量とした⁷⁾。糞中ステロイドについては, 糞乾燥粉末に1N NaOH/90%エタノール溶液を加えてよく懸濁, 70°Cで1時間のケン化後, 石油エーテルで抽出して中性ステロイド画分を得^{8,9)}, 蒸発乾固後, tert-ブチルアルコール・トリトン X-100・メタノール混液に再溶解して市販のアッセイキット(コレステロール C-テストワコー)を用いて中性ステロール量

を求めた。一方、石油エーテル抽出後の水層に10N NaOHを加えて強アルカリ pH 条件下で120°Cに2時間オートクレープしたものを pH 1~2 に調整、クロホルム-メタノール(2:1)抽出乾固後の残渣をメタノールに溶かし、市販アッセイキット(総胆汁酸テストワコー)を用いて胆汁酸量を求めた。

凍結保存中の血漿は溶解して遠心分離後の上清を試験管に分注、市販のアッセイキット(トリグリセリド E-テストワコー、コレステロール C-テストワコー、総胆汁酸テストワコー)を用いて、血清中の中性脂肪、総コレステロールおよび胆汁酸濃度を求めた。

統計処理

得られた測定値を平均±標準誤差で表した。測定値の群間での比較は Tukey 法に準じ $P < 0.05$ のとき有意と評価した。

結 果

飼育期間中の摂食量(1日当り)および体重増加量(期間を通して)を Table 2 にまとめた。日々の摂食量には4群間に有意な差はなかったが、体重増加量には12週目の DCA 負荷 Casein および HMF の両群で、39週目の Casein+DCA 群で低い傾向が認められた。

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Casein	HMF	Casein+DCA	HMF+DCA
Casein	14.6	—	14.6	—
HMF	—	20.6	—	20.6
L-Methionine	0.4	0.4	0.4	0.4
α -Corn starch	69.0	68.0	68.8	67.8
Soybean oil	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	5.0	—	5.0	—
Sodium deoxycholate	—	—	0.2	0.2

In the upper row, are arranged the names of experimental groups without and with DCA loading in their order. DCA, deoxycholic acid; HMF, a high-molecular 'peptide' fraction from the digestive product of soy protein.

Table 2. Food intake and body weight gain in rats fed with experimental diets for 12 and 39 weeks

	- DCA		+ DCA	
	Casein	HMF	Casein	HMF
After 12 weeks	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
Food intake (g/day)	10.7±0.2	10.8±0.1 ^a	10.8±0.3 ^a	10.8±0.2 ^a
Body weight gain(g/12 weeks)	199.1±1.3 ^a	197.9±3.5 ^a	179.5±2.3 ^b	181.2±2.9 ^b
After 39 weeks	(n=10)	(n=5)	(n=10)	(n=9)
Food intake (g/day)	11.9±0.4 ^a	10.8±0.5 ^a	12.1±0.3 ^a	11.3±0.6 ^a
Body weight gain(g/39 weeks)	300.1±10 ^a	283.3±5.6 ^{ab}	267.8±4.7 ^b	284.3±8.1 ^{ab}

Figures in parentheses represent the number of experimental animals for each group. DCA, deoxycholic acid. HMF, a high-molecular 'peptide' fraction from the digestive product of soy protein. Values are the means±SE (n=5~10); those without common superscript letters are significantly different at $P < 0.05$ (by Tukey test).

肝臓、腎臓、脾臓など臓器重量(体重当り)は Casein+DCA 群でのみ高かったが、血清アルブミン濃度に群間での差は認められなかった(data not shown).

Table 3 は、39週間飼育した群の糞中ならびに血清中の脂質およびステロイド含量の測定結果である。糞への酸性ステロイド(胆汁酸)排泄量は Casein 群より HMF 群で有意に高く、DCA 添加によってさらに増加した。この傾向を反映して(胆汁酸捕捉によるミセル形成低下)、糞中総脂質排泄量も HMF 群で高くなった。糞中中性ステロイド排泄量は、DCA 無添加群では HMF 群<Casein 群、DCA 添加群では

HMF+DCA 群>Casein+DCA 群となったが、いずれも低いレベルでの変化であった。血清の中性脂肪および胆汁酸濃度については Casein+DCA 群に大きな変化が認められ、血清コレステロール値も HMF(±DCA)群に及ばないものの Casein+DCA 群で有意に低くなった。屠殺時の解剖所見では、この群の肝臓に腫瘍発生がみられ、このことが肝機能に影響した可能性が高い。

Table 4は、12週目および39週目における大腸 ACF の観察結果を数値化したものである。ここで特筆すべきは ACF や AC のカウント数が Casein+DCA 群で著しく低く、逆に HMF(±DCA)群で

Table 3. Fecal or serum lipid and steroid levels in experimental animals during the 39th week or at its end

	- DCA		+ DCA	
	Casein	HMF	Casein	HMF
Fecal parameter (mg/day)				
Lipid	39±11 ^a	156±2 ^b	53±27 ^a	175±7 ^b
Neutral steroid	3.5±0.9 ^a	6.2±0.2 ^{bc}	7.2±0.5 ^c	5.1±0.1 ^{ab}
Acidic steroid	6.4±1.4 ^a	16.2±3.4 ^b	10.3±0.2 ^{ab}	27.7±1.9 ^c
Serum paprameter (mg/dL)				
Triacylglycerol	84.3±8.3 ^a	73.2±10.4 ^{ab}	40.3±3.0 ^b	82.1±11.1 ^a
Cholesterol	103.8±4.6 ^a	48.6±1.7 ^b	66.8±3.9 ^c	53.3±2.4 ^{bc}
Bile acid (μM)	34.0±2.6 ^a	30.8±3.1 ^a	62.9±5.6 ^b	27.3±2.5 ^a

Values are the means±SE (n=5~10); those not sharing common superscript letters are significantly different at $P < 0.05$ (by Tukey test). DCA, deoxycholic acid. HMF, a high-molecular 'peptide' fraction from the digestive product of soy protein.

Table 4. Aberrant crypts and crypt foci in rat colon after 12 or 39 weeks' feeding

	- DCA		+ DCA	
	Casein	HMF	Casein	HMF
After 12 weeks				
Aberrant crypt foci	29.2±5.4 ^a	33.4±1.7 ^a	3.0±1.8 ^b	44.0±8.2 ^a
Aberrant crypts	98.8±20.0 ^a	142.6±18.4 ^a	8.8±5.6 ^b	187.0±35.6 ^a
Crypt/focus	3.3±0.1 ^a	4.2±0.4 ^a	1.7±0.7 ^b	4.2±0.5 ^a
After 39 weeks				
Aberrant crypt foci	36.6±3.3 ^b	44.5±6.2 ^{ab}	4.8±1.6 ^c	55.0±3.8 ^a
Aberrant crypts	157.8±15.1 ^b	217.8±31.5 ^{ab}	23.7±9.5 ^c	273.1±23.9 ^a
Crypt/focus	4.3±0.1 ^b	4.9±0.1 ^a	3.4±0.8 ^{ab}	5.0±0.3 ^{ab}

The animals used in Table 2 were allocated for microscopic observations of formalin-fixed as well as methylene blue-stained colonic mucosae. Values (the means±SE for 5~10 animals) not sharing common superscript letters are significantly different at $P < 0.05$ (by Tukey test). DCA, deoxycholic acid; HMF, a high-molecular 'peptide' fraction from the digestive product of soy protein.

Table 5. Changes in aberrant crypts and crypt foci in the Casein+DCA group

	Feeding period (weeks)			
	4	8	12	39
Aberrant crypt foci	6.4±2.4	2.6±0.5	3.5±1.6 (3.0±1.8)	— (4.8±1.6)
Aberrant crypts	9.4±3.5	7.0±1.5	9.8±4.7 (8.8±5.6)	— (23.7±9.5)
Crypt/focus	1.3±0.2	2.6±0.2	2.2±0.7 (1.7±0.7)	— (3.4±0.8)

Values are the means±SE (n=5~6) and figures in parentheses (at 12 and 39 weeks) are the same as in Table 4.

Table 6. Tumorigenesis in rat colon at 39 weeks

	- DCA		+ DCA	
	Casein	HMF	Casein	HMF
Tumor incidence	1/10	0/5	6/10	3/9
Total tumor number	1	0	18	3
Tumor size (mm)	4.0	0	4.7±0.4	2.0±0.1

Fischer-344 rats given 3 injections of azoxymethane (15 mg/kg BW, i.p.) once a week for the first 3 weeks, were fed over a period of 39 weeks with the respective diets. HMF, a high-molecular 'peptide' fraction from the digestive product of soy protein. DCA, deoxycholic acid. Tumor was pathologically diagnosed as cancer.

DCA 添加の有無にかかわらず高かったことである。Casein+DCA 群のこのような低値がアゾキシメタン注入漏れによるものか、あるいは偶然の所為によるものかの疑念を晴らすため、アゾキシメタン注入には細心の注意を払い4,8,12週目の ACF 変化を追試した。Table 5 に示す如く、Casein+DCA 群の ACF および AC 数にはわずかな変化しかみられず、ACF の発生が DCA 投与によって抑えられる、あるいは発生してもすぐ消滅することが確かめられた。

長期飼育中のラットに食欲減退あるいは衰弱の兆候は無く順調に成育していたが、アゾキシメタン投与後8ヶ月経てば腫瘍発生がみられるとの知見を根拠に39週目に全ラットを屠殺して大腸粘膜組織の変異を観察し、各群ラットの腫瘍発生率、腫瘍数およびその大きさ(長軸側 mm)について測定した結果を Table 6 にまとめた。DCA 無添加群における腫瘍発生は Casein 群の1例(径4 mm)だけであったが、DCA 添加群においては Casein+DCA 群で6匹18個(径4.7±0.4 mm)、HMF+DCA 群で3匹3個(径2.0±0.1 mm)の腫瘍が観察された。なお、これらの腫瘍は専門家(京都府立医大病院病理部長)の診断により腺癌または腺腫と認定された。

考 察

今回の実験において、HMF 食摂取によって食餌に DCA を添加していてもいなくても、血中コレステロール値が低いレベルに抑えられることが確かめられた。しかし糞中への胆汁酸排泄量はやはり相当高く、このことは逆に大腸内環境が高濃度の二次胆汁酸に曝されることを意味する。これまで漠然とした認識しか持ちえなかった二次胆汁酸の発癌プロモーターとしての危険性が、今回の実験でかなり明かとなった。すなわち DCA 無添加の食餌群では15匹中1例(Casein 群)にすぎなかったものが、0.2% DCA 添加群では19匹中9例に腫瘍発生が認められた。Casein 群の6匹は各々が複数個の腫瘍を抱え、腫瘍サイズ(平均値)でも HMF 群のその約2.3倍に達した。このように腫瘍発生率、発生腫瘍総数、腫瘍サイズの何れをとっても Casein 群より HMF 群で少なく、HMF には大腸腫瘍発生軽減効果があると思なすことができた。

他方、化学発癌剤処理したラット大腸に ACF が観察され、それが前癌病変であろうと唱えられて以来⁴⁾、ACF を判定基準とした実験報告が急増している¹⁰⁻¹²⁾。しかし今回の報告で示したように、アゾキシメタン投与による腫瘍化に対し明かに促進作用をもつ二次胆汁

酸(DCA)のCasein食への添加はACFカウント数を激減させた。これに対してDCAのHMF食への添加は、そのような顕著な抑制効果を示さなかった。いま非吸収性のHMF消化産物が疎水結合によって胆汁酸を捕捉し、有機酸発酵などで大腸管腔内pHが低下しても解離せず、大腸内胆汁酸濃度が高くても直接大腸粘膜との接触を妨げていると解釈すれば、Casein食とHMF食における上述の矛盾を旨く説明できる。ACFがいかに多発しても腫瘍細胞へ変化するのはいわめて稀で、DCAにACFを消滅させる作用がある

とすれば、HMF食でのACF多発はHMF消化産物によるDCA捕捉の状況証拠を示しているにすぎないのではあるまいか。いずれにせよACFから腫瘍細胞への変化過程を理解するためには遺伝子レベルでの解析が必要であり、敢えて単純化して論を進めれば、Casein+DCA食でACF激減にもかかわらず腫瘍発生危険が高まるのは、二次胆汁酸の刺激を受けてACFの細胞周期が加速されるうち変異細胞出現が助長されるからであろう。

要 約

アゾキシメタン処理ラットを0.2% DCA添加有無のHMF食またはカゼイン食で長期間飼育し、大腸腫瘍発生に及ぼす影響を調べた。12週目、各群ラットの大腸粘膜におけるACFを数えたところ、カゼイン食群のACF出現はDCA添加で著しく抑えられるものの、HMF食群にそのような傾向はみられなかった。このとき糞中ステロイド排泄量はHMF食群で高く、血清コレステロール濃度も有意な低値を示した。39週目、DCA無添加群ではカゼイン食群の1例に腫瘍発生がみられただけであったが、DCA添加群ではHMF食9匹中の3匹、カゼイン食10匹中の6匹に腫瘍発生がみられ、各々の腫瘍パラメーターはHMF食(腫瘍総数3, 腫瘍サイズ 2.0 ± 0.1 mm)、カゼイン食(腫瘍総数18, 腫瘍サイズ 4.7 ± 0.4 mm)となつて、HMFに二次胆汁酸の発癌プロモーター作用に対する軽減効果のあることが確められた。

文 献

- 1) 菅野道廣 (1991): 大豆たん白質のコレステロール低下作用。植物性たん白質の栄養に関する講演会記録 (1991年3月11日, 於 東京), pp. 55-83.
- 2) Sachtello CR (1979): Colon cancer and cholestyramine. *N Engl J Med*, **301**, 1007.
- 3) Nigro ND, Bhadrachari N and Chomchai C (1973): A rat model for studying colonic cancer; effect of cholestyramine on inducing tumor. *Dic Col Rect*, **16**, 438-443.
- 4) 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.
- 5) 岩見公和, 金谷昌広, 東 直之, 金本龍平 (1995): 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。大豆たん白質研究会会誌, **16**, 70-77.
- 6) 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.
- 7) Folch J, Lees M and Sloane-Stansey GH (1957): A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509.
- 8) Forman DT, Phillips C, Eiseman W and Tayler CB (1968): Fluorometric measurement of fecal bile acids. *Clin Chem*, **14**, 348-359.
- 9) Ide T and Horii M (1987): A simple method for the extraction and determination of non-conjugated and conjugated luminal bile acids in rats. *Agric Biol Chem*, **51**, 3155-3157.
- 10) 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.
- 11) Alabaster O, Tang ZC, Frost A and

Shivapurkar N (1995) : Effect of β -carotene and wheat bran fiber on colonic aberrant crypt and tumor formation in rats exposed to azoxymethane and high dietary fat. *Carcinogenesis*, **16**, 127-132.

12) Kawamori T, Tanaka T, Yamahara J and Mori H (1995): Modifying effects of naturally occurring products on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Cancer Res*, **55**, 1277-1282.