

二次胆汁酸の発癌プロモーター作用と大豆ペプチド高分子画分の 大腸癌発生抑制効果に関する分子栄養学的解析

岩見公和^{1*}・東 直之¹・田口由美子¹・須田仁志¹・佐伯 徹¹・金本龍平¹・土橋康成²

¹京都府立大学農学部 ²京都府立医科大学付属病院

Action of Secondary Bile Acid as a Potent Promoter in Colonic Tumorigenesis and Preventive Effect of HMF Diet against Cancer Risk

Kimikazu IWAMI¹, Naoyuki ADZUMA¹, Yumiko TAGUCHI¹, Hitoshi SUDA¹, Tohru SAEKI¹,
Ryuhei KANAMOTO¹ and Yasunari TSUCHIHASHI²

¹Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

²University Hospital, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602

ABSTRACT

Azoxymethane-treated male Fischer-344 rats were fed for 39 weeks casein diet (group A), HMF diet (group B), deoxycholate-supplemented casein diet (group C) and deoxycholate-supplemented HMF diet (group D), respectively, from which the colons were excised and examined for tumor development. Firstly, tumors visible to the naked eye were picked up to make a comparison between both groups without and with deoxycholate loading. As a result of Fisher's test, tumor incidence in groups A and B was significantly different at $P=0.01$ from that in groups C and D. In other words, deoxycholate served as a potent promoter in colonic tumorigenesis. With respect to a comparison between both C and D groups, a clear distinction was observed for tumor size (t -test, $P<0.001$) but not for tumor incidence (Fisher's test, $P>0.2$). For this reason, the colons without seemingly visible tumors were inspected over again through a magnifier and faint prominentiae 'bud tumors' were tentatively ranked with half a tumor altogether. The rats of each group were arranged in order of their bearing tumors, followed by non-parametric Mann-Whitney test. Consequently a gap in arrangement between both C and D groups proved to be significant at $P<0.05$, implying that HMF diet was more effective in retardation of colonic tumorigenesis than casein diet probably through the capture of secondary bile acids. In this connection, large-size tumors of which thin slices were pathologically inspected under the microscope were all diagnosed as highly-developed adenocarcinomas. Secondly, the stimulatory or damaging effect of secondary bile acids on cell proliferation was investigated in order to obtain some information about their cancer-promotive action. In view of a preliminary approach, mouse fetal fibroblast 3T3 cells were used for this experi-

*〒606 京都市左京区下鴨半木町1-5

mental purpose. The culture medium containing cholic acid or its related conjugate in the range of 0.2 to 1.0 mM did not affect the proliferation of 3T3 cells. Alternatively the presence of dihydroxybile acids such as deoxycholate and chenodeoxycholate at more than 0.6 mM did not only suppress the proliferation of viable cells but also affected its restoration after removal of the bile acids. A similar effect was observed for monohydroxybile acid 'lithocholate', although being a little different in restoration after its removal. Further information is required to reasonably explain the cancer-promotive risk of these bile acids in connection with such a cell toxicity. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **18**, 105-111, 1997.

Key words: colon cancer risk, secondary bile acids, cultured 3T3 cells, anti-tumorigenicity of HMF, suppression of cell proliferation

ミルクカゼインに比べ、大豆たん白質に血清コレステロール値上昇抑制効果のあることはよく知られている。その作用機作は、主に糞中へのステロイド排泄増加に伴う血中コレステロールからの代償によって説明される。

これに関連して、分離大豆たん白質を微生物由来の中性プロテアーゼに作用させて調製される未消化高分子画分（以下、HMF）が栄養的に有効だけでなく優れた胆汁酸結合能を有し（糞中へのステロイド排泄を高め）、実験動物を HMF 食で飼育したとき、実際、きわめて効果的に血中コレステロール濃度は低下する^{1,2)}。糞中ステロイド排泄増加と血中コレステロール濃度低下の関係については、高コレステロール血症の治療にかつて用いられたコレステラミンを投与した場合にも類似の効果が認められる³⁾。しかし、2%コレステラミンを含む飼料で飼育したラットでは実験的大腸癌の発生率が高まり⁴⁾、またコレステラミンの経口投与は糞中へのステロイド排泄だけでなく二次胆汁酸の含量比を著しく増加させる⁵⁾。二次胆汁酸が大腸での発癌を促進する危険を考慮すれば、HMF の血清コレステロール改善目的の利用には安全性の確認が必要となる。本報告では、アゾキシメタン処理ラットに給餌した HMF 食の抗腫瘍効果と胆汁酸の培養細胞増殖に対する影響について述べる。

実験方法

実験的発癌と病理検査

アゾキシメタン処理 (15 mg/kg, 週 1 回, 計 3 回腹腔内注射) した Fischer-344 雄ラットを 0.2% デオキシコール酸 (DCA) 添加, 無添加の 15% カゼイン食と同 21% HMF 食で 39 週間飼育し⁶⁾、各食餌群ラットの大腸粘膜表面に発生した腫瘍の、肉眼で認められるものについては数とサイズ (直径) を測り、当該部分および周辺組織の切片を作成してヘマトキシリン-エオシン染色後、顕微鏡下で腺管組織の変性や異型を観察した。

細胞培養と細胞計数

マウス胎仔繊維芽細胞 (以下, 3T3 細胞) を 6 cm 径の培養皿または 96 穴マイクロプレート内の 10% 仔牛血清を含む Dulbecco-modified Eagle's 培地 (以下, DMEM) に 2.3×10^5 /dish または 1.2×10^3 /well の割合で植え付け、37°C, 5% CO₂ の条件で培養した。Dish 培養のサンプルについては、培地を除去・洗浄後、0.25% トリプシン溶液処理によって細胞を分散させ、細胞懸濁液を試験管に分注してトリパンブルーを加え、血球計算板を用いて顕微鏡下で色素排除細胞の計数を行い、生細胞数の上限を求めた。Well 培養のサンプルに

Table 1. Difference in tumor incidence between both groups loaded with and without deoxycholic acid

	Number of rats		Total
	Tumor-burdened	Non-burdened	
+Deoxycholate	9	10	19
-Deoxycholate	1	14	15
Total	10	24	34

Fisher's exact probability test:

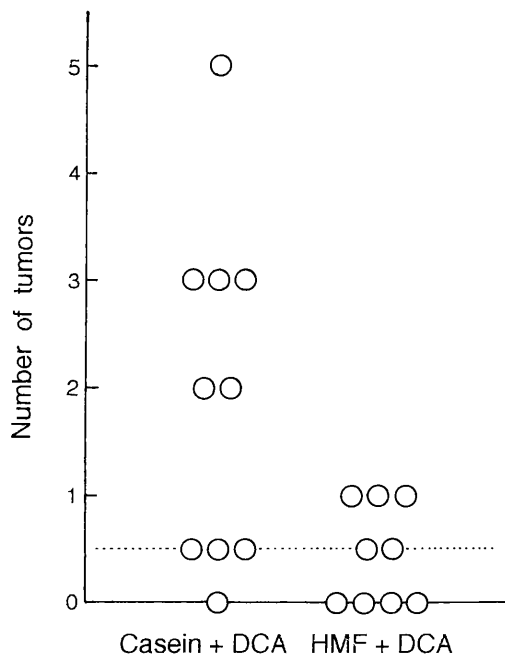
$$P = [19! 15! 10! 24! / 34!] \times [1/9! 10! 1! 14! + 1/10! 9! 0! 15!] = 0.01$$

A bar chart comparing tumor size (mm in diameter) between two groups: Casein + DCA and HMF + DCA. The y-axis represents tumor size in mm, ranging from 0 to 5. The Casein + DCA group (hatched bar) has a mean tumor size of approximately 4.7 mm with a sample size of 18. The HMF + DCA group (dotted bar) has a mean tumor size of approximately 2.0 mm with a sample size of 3. A horizontal line with brackets above the bars indicates a statistically significant difference with $P < 0.001$.

Group	Mean Tumor Size (mm)	n
Casein + DCA	~4.7	18
HMF + DCA	~2.0	3

接595 nm での吸光度を求めた。なお胆汁酸の添加に際しては、細胞洗浄の後、0.02 M~0.1 M DCA を含む70%エタノール溶液40 μ L を 4 mL の培地に加え (dish 培養の場合)、あるいは上と同じ濃度の胆汁酸を含む70%エタノール溶液10 μ L を加えた100 μ L の培地を用いて培地交換を行った (well 培養の場合)。

予め腸溶剤 (cellulose acetate phthalate) で被覆した DCA-Na 塩微細粉末を用いたため、自由摂取にもかかわらず飼育期間を通しての飼料摂取量や体重増加量に 4 群間に有意な差異は生じなかった。39 週目、大腸を摘出して Fig. 1 の A-3 や C-3 にみられるような



107

肉眼的にはっきり認められる腫瘍のみを数え、まず Table 1 に示すように全群を飼料への DCA 添加の有無による 2 群に大別し、DCA 負荷の大腸腫瘍発生に及ぼす影響を調べた。DCA 無添加のカゼイン食群 (n=10) 中の 1 匹に直径 4 mm 大の腫瘍が見いだされたが、DCA 無添加の HMF 食群 (n=5) にそれと識別できるポリープ状の隆起は観察されなかった。一方、DCA 添加カゼイン食群 (n=10) 中の 6 匹に各々複数の計 18 個の腫瘍が、DCA 添加 HMF 食群 (n=9) 中の 3 匹に各 1 個の腫瘍が認められた。実験匹数の少なさを補

うため、大別 2 群の腫瘍出現の有無を Fisher の直接確率法に従って計算すると $P=0.01$ と求められ、DCA 添加の有無によって腫瘍発生率に差があると判定された。

Fig. 2 は、DCA 負荷群中のカゼイン食群と HMF 食群の大腸に形成された腫瘍の平均サイズ (直径) について比較したものである。カゼイン食群の腫瘍サイズは 4.7 ± 0.4 mm (腫瘍数 18)、HMF 食群のそれは 2.0 ± 0.1 mm (腫瘍数 3) と求められ、大きさや個数の違いが腫瘍化の程度を反映したものとみなせば両群間には有意な差 (t -検定, $P < 0.001$) があるといえる。し

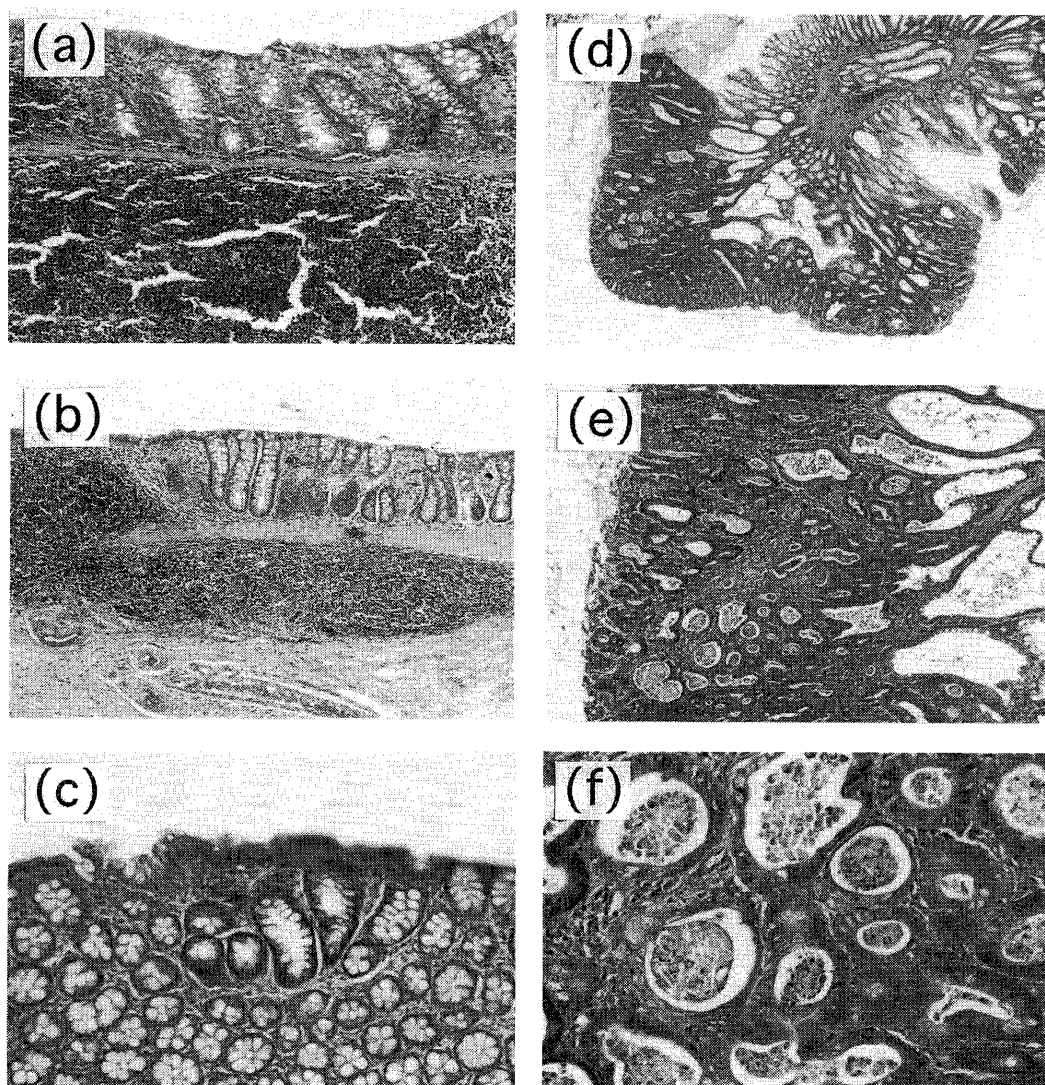


Fig. 4. Histological observations for the respective colons from four dietary groups. Thin colon slices were stained with hematoxylin-eosin and photomicrographs were taken at appropriate magnification: (a) from casein group, $\times 50$; (b) from HMF group, $\times 50$; (c) from HMF+DCA group, $\times 50$; a typical colon tumor from casein+DCA group, (d) $\times 5$, (e) $\times 25$, (f) $\times 100$.

かし、このような明瞭な差異にもかかわらず、匹数の限定された腫瘍発生率に両群での差は認められなかった (Fisher 検定, $P > 0.2$)。そこで、肉眼的にポリープ状腫瘍を認め得ないものでも拡大鏡で「腫瘍の芽」が観察されたものは個体毎にまとめて半腫瘍とみなし、両群のラットをその腫瘍数に応じて Fig. 3 に示すように配置して、それらの関係について Mann-Whitney 検定を行った。計算の結果、カゼイン食群の個々の点より高い位置にある HMF 食群の個数は $U = 19$, $P[U(19)]_{\text{two-tailed}} < 0.05$ と求められ、両群間の腫瘍を抱えた個々のラットの配置 (順序関係) には偏りがあると判定された。

Fig. 4 に大腸粘膜組織切片の顕微鏡写真の例を示した。(a) と (b) は腫瘍発生は認められなかったカゼイン (-DCA) 食群と HMF (-DCA) 食群由来のもので、腺管組織は粘液を多く貯蔵して粘液分泌能もあり、正常と考えられる。(c) は HMF (+DCA) 食群由来のもので、腺管組織中に肥大や異型を起こしたものの集合がみられ、このような病巣は腫瘍の芽とみなされる。(d) ~ (f) はカゼイン (+DCA) 食群由来の大腸粘膜表面に隆起した腫瘍によるもので、細胞が異常増殖を起こして異型度も進み、形や配列も著しく不規則、倍率を上げると剝離した細胞が多数みられ、この腫瘍の悪性度はかなり高い。なお、カゼイン (-DCA) 食群と HMF (+DCA) 食群由来の大腸粘膜上に肉眼的に認められた計 4 個の腫瘍はいずれも類似の組織像を示し、アデノカルシノーマと診断された。

上述の実験結果 (Table 1, Fig. 4) より、二次胆汁酸 'DCA' は生理的上限内濃度でも実験的大腸発癌に対して強力なプロモーター作用を発揮することが確かめられた。胆汁酸による発癌促進作用の理解を深めるため、次に培養細胞を用いて培地中に添加した濃度の異なる胆汁酸の細胞増殖に及ぼす影響を調べた。今回培養細胞としてマウス胎仔繊維芽 3T3 細胞を用いたが、その主な理由は扱いに慣れ、培養後の細胞分散も容易なことによる。将来的には、ヒト大腸癌由来の Caco-2 細胞やラット小腸腺窩由来の IEC-6 細胞も対象にしたいと考えている。Fig. 5 は、濃度の異なる DCA を含む培地で 3T3 細胞を培養した場合および培地交換によって胆汁酸を除去した後の細胞数の変化をみたもので、トリパンプルー色素排除法によって生細胞数の上限を求めた。0.5 mM DCA 存在下で細胞増殖抑制がみられるものの、DCA 除去後はやがて増殖に転じたが、0.6 mM または 0.7 mM DCA 存在下では増殖停止の状態にあり、DCA 除去後も殆ど回復しなかった。Figs. 6 と 7 は、DCA およびその他の胆汁酸の各

濃度における細胞増殖抑制効果と胆汁酸除去後の影響を調べた結果である。3T3 細胞の 1.2×10^3 個を 96 穴マイクロプレートに植え付けて 5 日目 (胆汁酸添加後 3 日目) および 8 日目 (胆汁酸除去後 3 日目) の生細胞数は、多数サンプル処理の都合上 MTT 由来還元色素の 595 nm の吸光度で表した。因みに、植え付け後 2 日目 (胆汁酸添加の直前) の吸光度は 0.120 である。トリヒドロキシ胆汁酸であるコール酸 (CA) の遊離型と抱合型は、0.2~1.0 mM の範囲で、その除去後

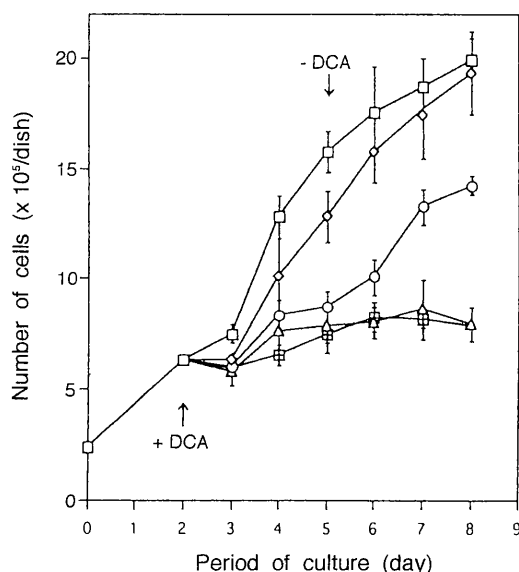


Fig. 5. Effect of deoxycholic acid at varied concentrations on proliferation of 3T3 cells in dish culture. Mouse fetal fibroblast 3T3 cells (2.3×10^5) were inoculated into each petri-dish of 6 cm in diameter and incubated at 37°C under 5% CO₂ atmosphere. Two days later, Dulbecco-modified Eagle's medium (DMEM) was exchanged for the one including bile acid at varied concentrations, followed by incubation in the usual way for 3 days. Then, each dish was twice washed with 1 mL of DMEM, and after removal of bile acid, cell culture was continued for 3 days. Sampling was carried out 2, 5 and 8 days after the beginning of inoculation, on which viable cells dyed badly with trypan blue were enumerated on a Thoma hemacytometer under the microscope. Medium deoxycholate concentration on days 2-5; □ no addition, ◇ 0.4 mM, ○ 0.5 mM, △ 0.6 mM, ⊞ 0.7 mM.

も増殖抑制あるいは促進効果を示さなかった。一方、一次胆汁酸であるケノデオキシコール酸(CDCA)は同じ濃度範囲でDCAと類似の増殖抑制効果を示し、0.6 mM以上のCDCAやDCAは共存中ではもとより除去後もほぼ完全に細胞増殖を抑えた。これに対しCDCAの二次胆汁酸であるリトコール酸(LCA)には、0.2 mMや0.4 mMではジヒドロキシ胆汁酸に比べ強い増殖抑制効果がみられたが、胆汁酸除去後はジヒドロキ

シ酸0.6~1.0 mMの場合よりわずかながら増殖回復傾向があった。

このように0.6 mM以上で顕著な細胞増殖抑制効果をもつDCAやLCAなど二次胆汁酸が大腸内で発癌プロモーターとして作用する危険は古くから指摘されているが、*in vitro*での増殖抑制と*in vivo*での発癌促進の現象を合理的に説明するためには、更なる知見の集積が必要である。

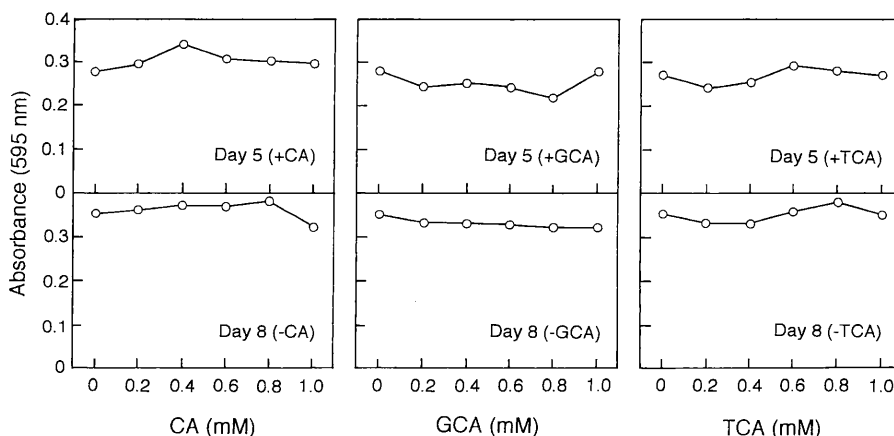


Fig. 6. Effects of cholic acid and its conjugates at varied concentrations on proliferation of 3T3 cells. The conditions for cell culture were the same as in Fig. 5, except that 3T3 cells were inoculated at 1.2×10^3 /well into the microplate with 96 holes and that cholic acid (CA), glycocholic acid (GCA) or taurocholic acid (TCA) was used instead of deoxycholic acid. The degree of cell proliferation was, for convenience' sake, represented by absorbance at 595 nm after staining with MTT on prescribed days.

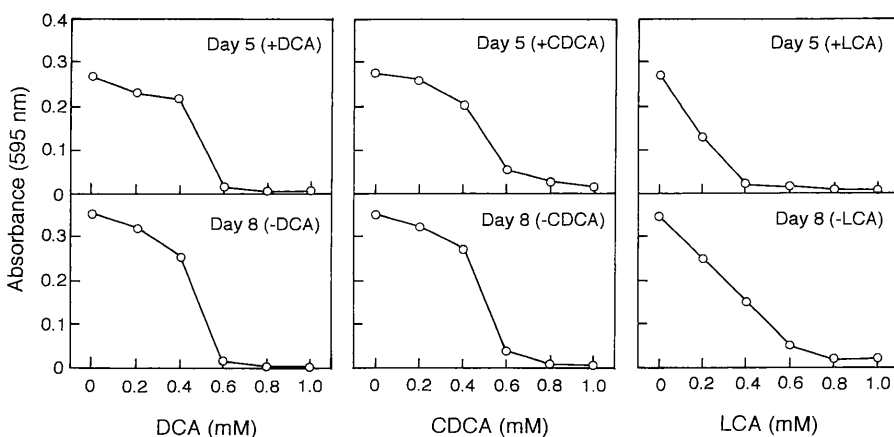


Fig. 7. Effects of mono- or di-hydroxybile acids at varied levels on proliferation of 3T3 cells. The conditions for cell culture were the same as in Fig. 6, except for mono- or di-hydroxybile acid instead of cholic acid or its conjugate: DCA, deoxycholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; LCA, lithocholic acid.

要 約

アゾキシメタン処理したフィシャー系雄ラットをカゼイン食 (A), HMF 食 (B), デオキシコール酸を添加したカゼイン食 (C) またはデオキシコール酸を添加した HMF 食 (D) で 39 週間飼育し, 各飼料群ラットから大腸を摘出して腫瘍発生を調べた。まずデオキシコール酸負荷の有無による効果を比較するため, 肉眼的に認めうる腫瘍を数え, Fisher 検定を行った。その結果, 腫瘍発生率にはデオキシコール酸負荷の C + D 群 (n=19) と負荷しない A + B 群 (n=15) の間に $P=0.01$ で有意な差があり, デオキシコール酸が大腸腫瘍発生を著しく促進していることが確かめられた。デオキシコール酸を負荷した C 群と D 群の比較では, 腫瘍発生総数 (C, 18 個; D, 3 個) およびそれらの平均直径 (C, 4.7 ± 0.4 mm; D, 2.0 ± 0.1 mm) に明らかな差異があるにもかかわらず腫瘍発生率に有意な差はなかった。このため, 大腸粘膜表面から隆起した腫瘍を肉眼的に認められなかったものについては拡大鏡を通して異変の兆候を捕え, その存在するものを「腫瘍の芽あり」と定義して 1 検体に 1/2 腫瘍を当て, C, D 両群ラットについて腫瘍数に応じて群毎に配置したプロットを基に Mann-Whitney 検定を行った。C 群個々の点より高い位置にある D 群ラットの総数は $U=19$ で, $P<0.05$ と求められ, 順序関係においては D は C より下位にあると判定された。換言すれば, このことはカゼイン食に比べて HMF 食には大腸での腫瘍発生を遅延させる効果があることを示唆する。肉眼的に識別できた大サイズの腫瘍は, 組織切片 (ヘマトキシリン-エオシン染色) の病理検査により, 異型度のかなり進んだ腺癌と診断された。次いで, 二次胆汁酸の発癌プロモーター作用に関する知見を得るため, マウス胎仔繊維芽細胞 (3T3) を用いて, その増殖に及ぼす各種胆汁酸の濃度効果を調べた。0.2~1.0 mM の濃度範囲でコール酸やその抱合胆汁酸に添加効果は認められなかったが, 二次胆汁酸 (デオキシコール酸, リトコール酸) や一次胆汁酸でもケノデオキシコール酸には 0.6 mM 以上で 3T3 細胞の増殖を殆ど抑え, 胆汁酸除去後にもその抑制効果が持続することを認めた。培養細胞での増殖抑制効果を動物実験での発癌促進作用に関連付けて説明するためには, 更なる検討を要する。

文 献

- 1) Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1990) : Cholesterol-lowering activity of various undigested fraction of soy protein in rats. *J Nutr*, **120**, 977-985.
- 2) Ogawa T, Gatchalian-Yee M, Sugano M, Kimoto M, Matsuo T and Hashimoto Y (1992) : Hypocholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in rats fed no cholesterol. *Biosci Biotech Biochem*, **56**, 1845-1848.
- 3) 竹久文之, 鈴木ゆかり (1990) : ラットの血漿リポタンパクコレステロールに及ぼすグアガムとコレステラミンの影響。日本栄養・食糧学会誌, **43**, 269-274.
- 4) Nigro ND, Bhadrachari N and Chomchai C (1973) : A rat model for studying colonic cancer; effect of cholestyramine on induced tumors. *Dis Col Rect*, **16**, 438-443.
- 5) Imai Y, Kawata S, Inada M, Miyoshi S, Minami Y, Matsuzawa Y, Uchida K and Tarui S (1987) : Effect of cholestyramine on bile acid metabolism in conventional rats. *Lipids*, **22**, 513-516.
- 6) 岩見公和, 東 直之, 町田恵子, 佐伯 徹, 金本龍平 (1996) : 大腸における腫瘍誘発の大豆たん白質食による軽減。大豆たん白質研究会会誌, **17**, 77-83.