

大豆胚軸の Epstein-Barr ウイルス初期抗原誘導及び 皮膚腫瘍プロモーションに対する抑制効果

財前行宏¹・徳田春邦²・西野輔翼²・竹下正純^{*1}

¹大分医科大学学生化学 ²京都府立医科大学学生化学

Inhibitory Effect of Soybean Hypocotyls on Epstein-Barr Virus Early Antigen Induction and Skin Tumor Promotion

Yukihiro ZAIZEN¹, Harukuni TOKUDA², Hoyoku NISHINO² and Masazumi TAKESHITA¹

¹Department of Biochemistry, Oita Medical University, Oita 879-55

²Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602

ABSTRACT

The *in vitro* anti-tumor promoting effect of hypocotyls from fresh soybeans was evaluated. The dimethyl sulfoxide extracts of hypocotyls showed stronger inhibitory effect than that of soybeans on Epstein-Barr virus early antigen activation induced by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Daidzin, one of isoflavones with the highest content in hypocotyls, was also inhibitory. An *in vivo* evaluation of anti-tumor promoting activity of hypocotyls against the mice skin also revealed a significant inhibitory effect on tumor formation. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 125-129, 1997.

Key words: soybean hypocotyl, anti-tumor promoting effect, Epstein-Barr virus-early antigen, mouse skin tumor, isoflavonoid

乳癌や大腸癌・前立腺癌等に対する大豆食品の効能が評価されているが、大豆は癌に対する予防効果があるとされているイソフラボンの供給源である¹⁾。一方、大豆胚軸は大豆製品製造過程における副産物であり、これにはさらに多くのイソフラボンが含まれている²⁾。本研究では、EB ウイルス活性化試験法と皮膚2段階発癌試験を行い、発癌プロモーションに対する大豆胚軸の有効性について検討した³⁾。

実験方法

大豆胚軸成分の抽出

10 mg の大豆胚軸を、ジメチルスルフォキシド (DMSO) 1 mL に一晩浸けておいた。イソフラボン (ダイジン) も同様にした。100 µg/mL の濃度にするには、細胞培養培地 1 mL 中に 10 µL の抽出液を加える。

大豆胚軸に含まれているイソフラボン量の分析結果を示す (Table 1)。

*〒879-55 大分県大分郡挾間町医大ヶ丘 1 丁目 1 番地

Raji 細胞の EBV 抗原検出法

Epstein-Barr ウイルス (EBV) 潜在感染ヒトリンパ芽球様細胞株 Raji 細胞は、*n*-酪酸の存在下、発癌プロモーター活性を持つテトラデカノイルホルボールアセテート (TPA) の作用により、EBV 早期抗原 (EBV-EA) を発現する。本実験では、発癌プロモーターによる EBV-EA 発現を抑える事を指標として、発癌プロモーター抑制物質の活性を測定した³⁻⁷⁾。

4 mM の *n*-酪酸ならびに 20 ng/mL の TPA を加えた 1 mL の RPMI-1640 培地 (8% FCS) を反応培地とし、Raji 細胞を 1×10^6 個/mL で調製し、これを陽性コントロールとした。これにさらに大豆胚軸を 100 μ g/mL、10 μ g/mL の濃度になるように加えたものを作った。細胞は 37°C、5% CO₂ の条件で 48 時間培養した。培養後、トリパンブルーで細胞数・生存率を測定し⁸⁾、1,000 rpm で 10 分遠心した。上清を除去した後、0.1 mL の PBS に浮遊した。スライドガラスに塗抹し、ドライヤーで素早く乾燥させ、アセトンにより 10 分間固定した。乾燥後、EBV に感染した上咽頭癌患者の血清を PBS により 100 倍の濃度に希釈したものを載せて、37°C で 45 分間反応させた。反応後、振動を加えながら PBS でスライドガラスを洗浄し乾燥させた後、PBS で 20 倍に希釈した抗ヒト IgG (FITC 標識) を載せ、遮光した状態で 37°C、45 分間反応させた。その後、振動を加えて PBS で洗浄し、乾燥後、封入液 (グリセロール 20%) を少量載せ、カバーガラスをかけた。蛍光顕微鏡で観察し、細胞 500 個以上中の EBV-EA 発現細胞の比率 (%) を求めた。

In vivo マウス皮膚発癌 2 段階試験⁹⁾

ICR 雌性マウス (6 週齢) を用いて、各実験群あたり 5 匹、同条件下で 3 個のケージ、合計各群 15 匹として以下の実験を行った。

マウス背部体毛を剃毛した翌日より、アセトン (0.1 mL) に溶解した DMBA (100 μ g, 390 nmol) を塗布してイニシエーションを行い、その 1 週間後から被験マウスを 3 群 (I ~ III) に分け、I 群は、同部分にア

セトン (0.1 mL) に溶解した TPA (1 μ g, 1.7 nmol) を週 2 回、20 週間塗布し続け、これを陽性コントロールとした。II 群は、同様に DMBA でイニシエーション後、TPA 塗布 1 時間前に生大豆胚軸 (50 μ g) をアセトンに溶解してコントロールと同様の処理を行った。III 群は、焙煎胚軸で同様の処理を継続して行った。10 mg の大豆胚軸を、DMSO 1 mL に一晩浸けておき、その抽出液 50 μ L を 1 mL のアセトンに溶解し、アセトン抽出液 0.1 mL を塗布したものである。いずれも TPA 塗布を開始後、20 週までにマウス 1 匹あたりの背部に発生する papilloma の数、並びに papilloma の発生したマウスの匹数を I 群の陽性コントロールと比較した。

結 果

EBV-EA 発現試験の結果を Table 2 に示す。細胞の生存率に示す如く、大豆胚軸には毒性はみられない。大豆胚軸は生・焙煎とも、10 μ g/mL で 80% 程度の EBV 活性化抑制活性を認め、100 μ g/mL ではさらに顕著な抑制効果が認められた。大豆胚軸中のイソフラボン成分の内、含量の高いダイジン (Table 1) では高い抑制活性を示した。これは、大豆胚軸の発癌抑制活性がイソフラボンの効果による事を示唆している。しかし、他の成分の効能も検討する必要がある。

Fig. 1A に腫瘍マウスの割合を示した。陽性コントロール群では 6 週で腫瘍の発生が認められた。一方、大豆胚軸塗布群では腫瘍の発生は 8 ~ 9 週後であり、遅延効果が認められたが、腫瘍を治癒させる事はなく、20 週目では、大豆胚軸塗布群・コントロール群全例に腫瘍の発生がみられた。

Fig. 1B に各群マウス一匹あたりの腫瘍の個数を示した。20 週後の腫瘍個数はコントロール群で平均 10 個、大豆胚軸群では、約半分であった。

したがって、大豆胚軸にはマウス皮膚発癌に対する抑制効果があることが明らかになった。

考 察

発癌プロモーターである TPA による、発癌プロモーションと Raji 細胞の EBV-EA 発現とは同様の経路をとると考えられ、EBV-EA 発現と発癌プロモーションとの相関が言われている。今回の実験結果では、大豆胚軸は生・焙煎とも EBV-EA 発現の抑制効果を示し、脱脂大豆よりも高い抑制活性を示した。さらに、TPA による皮膚腫瘍の発生にも、大豆胚軸塗布群で

Table 1. Isoflavonoid content of soybean hypocotyls

Isoflavonoids	Raw hypocotyl	Roast hypocotyl
	μ g/g dry matter	
Daidzin	7,715	4,805
Genistin	1,342	1,180
Daizein	143	1,621
Genistein	34	338
Total	9,234	7,944

は、腫瘍発生に対する遅延効果が認められた。大豆胚軸のイソフラボンの含有量は大豆の5倍以上であり、これらの抑制効果はイソフラボンによる事を示唆している。

大豆製品の制癌作用についての報告も多い¹⁰⁻¹⁵⁾。それは、イソフラボンやフィチン酸・サポニンに関するものである。イソフラボンは *in vitro* でリンパ球や癌細胞の増殖を抑制する¹⁶⁾。ケルセチン等のフラボノイ

ドはプロテインチロシンキナーゼやトポイソメラーゼを阻害する¹⁷⁾。結果として、ゲニステインは細胞増殖サイクルの G₂-M アレストになり、他のフラボノイド(ケルセチン・ルテオリン・アピゲニン)では G₁ アレストになって増殖が止まる¹⁸⁾。さらに、フラボノイドは *in vivo* で抗活性酸素作用も指摘されている^{19,20)}。

大豆や大豆製品にはイソフラボンの他に、フィチン酸、サポニン、トリブシンインヒビターも含まれてい

Table 2. Inhibitory effect of the extracts of hypocotyls, soybean and daidzin on TPA-induced EBV-EA

Test substances ^c	Percent of EBV-EA positive cells ^a (% of viability ^b)			
	Concentration of test substances (μ g/mL) ^d			
	100		10	
	TPA (-)	TPA (+) ^e	TPA (-)	TPA (+) ^e
Hypocotyl (raw)	0 (60)	0 (60)	0 (>70)	17 (>70)
Hypocotyl (roast)	1 (60)	0 (60)	0 (>70)	23 (>70)
Defatted soybean	0 (60)	17 (>70)	0 (>70)	32 (>70)
Daidzin	0 (60)	16 (>70)	0 (>70)	15 (>70)

^aValues represent means of three separate experiments.

^bValues in parentheses are percentage of viable Raji cells.

^cThe control without test substances showed less than 1% of EBV-EA positive cells in the absence of TPA and more than 70% viability of the cells. In the presence of TPA, EBV-EA positive cells were 34% of total cells and the cell viability was about 60%.

^dDetailed description is given in Materials and Methods.

^eTPA (+) represents 32 nM of TPA which was added to the medium.

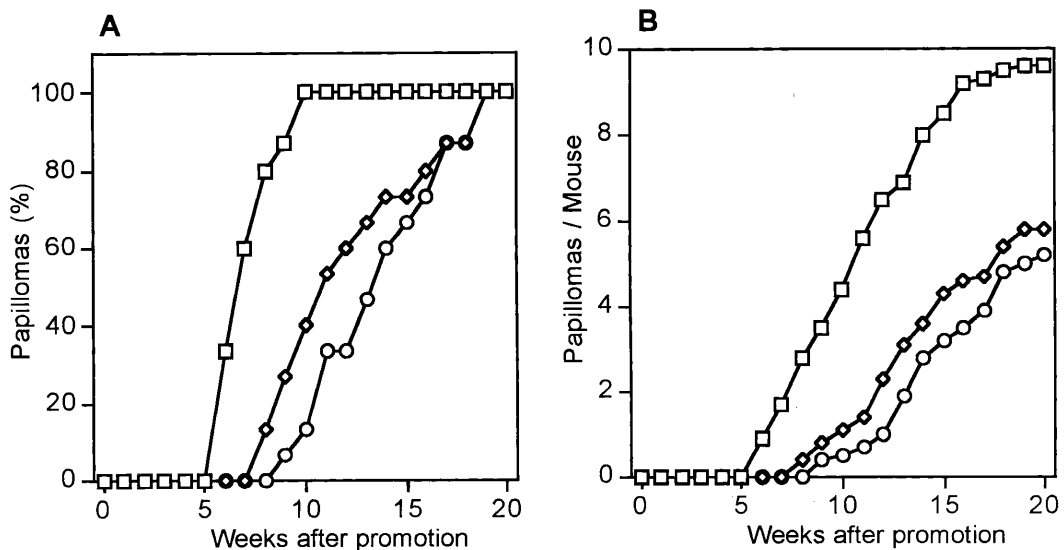


Fig. 1. Effect of hypocotyls on TPA induced papillomas. (A) The number of animals having papillomas. (B) The number of papillomas occurring in each animal. □, TPA (1.7 nmol); ◇, TPA (1.7 nmol) with raw hypocotyl (50 μ g); ○, TPA (1.7 nmol) with roast hypocotyl (50 μ g).

る。脱脂大豆には、1～2%のフィチン酸を含んでいるが、大豆胚軸で0.88%に低下する¹⁴⁾。大豆には、0.1～0.5%のサポニンを含んでおり、大豆胚軸では2%に達する¹⁴⁾。食用として摂取されたサポニンは血清コレステロール低下作用がある¹⁵⁾。サポニンにはEBV-EA発現の抑制効果も報告されているが²¹⁾、今回の実験結果は、抑制作用がイソフラボンによる事を示唆するものである (Table 2)。イソフラボンとサポニンの共同作用についても研究する必要がある。

膵臓から分泌されるトリプシンは、炎症作用があり、炎症の継続が消化管に潰瘍・癌を引き起こす。プロスタグランディン合成阻害剤 (アスピリン・インドメタシン) の抗癌作用は、癌のプロモーションの一因が、炎症による事を示している²²⁾。今回の実験で用いた焙

煎大豆胚軸では、加熱による変性によりトリプシンインヒビター活性は失われている (未発表)。一方、EBV-EA発現に対しても、皮膚腫瘍の発生に対しても、焙煎大豆胚軸には抑制効果が残っていた。以上の事は、癌の抑制作用ではトリプシンインヒビターよりもイソフラボンの作用の方が強い事を示唆している。

大豆胚軸の発癌プロモーション抑制効果については、イソフラボンによる細胞周期の停止と細胞増殖の抑制が重要な役割を果たしている。今後は抑制効果について、摂食実験を行う必要があると考えられる。さらに、大豆胚軸中のイソフラボンや他の成分に関して、発癌メカニズムや、体内への取り込み、利用の仕方についてさらに研究していく必要があろう。

要 約

EBウイルス活性化試験法を用いて、大豆胚軸の発癌プロモーション抑制作用を検討した。大豆胚軸抽出物は、生でも焙煎でも抑制作用を示し、特に100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で強い抑制活性が観察され、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度でも抑制活性を示したが、脱脂大豆では抑制活性は弱まっていた。大豆胚軸に含まれているイソフラボンでも強い抑制活性が観察された。更にマウス皮膚2段階発癌試験において、生及び焙煎大豆胚軸ともに発癌の抑制を示した。以上の結果は、大豆胚軸に含まれているイソフラボンによる発癌プロモーション抑制作用を示唆している。

文 献

- 1) Messina MJ, Perskey V, Setchell KDR and Barnes S (1994) : Soy intake and cancer risk : a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer*, **21**, 113-131.
- 2) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR and Barnes S (1993) : Genistein, daizein, and their β -glycoside conjugates : antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem*, **41**, 1961-1967.
- 3) Zaizen Y, Tokuda H, Nishino H and Takeshita M (1997) : Inhibitory effect of soybean hypocotyls on Epstein-Barr virus early antigen induction and skin tumor promotion. *Cancer Lett*, **121**, 53-57.
- 4) Kapadia GJ, Sharma SC, Tokuda H, Nishino H and Ueda S (1996) : Inhibitory effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term *in vitro* assay for anti-tumor promoters. *Cancer Letters*, **102**, 223-226.
- 5) Ito Y, Kawanishi M, Harayama T and Takabayashi S (1981) : Combined effect of the extracts from *Croton tiglium*, *Euphorbia Lathyris* or *Euphorbia Tirucalli* and *n*-butyrate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells. *Cancer Lett*, **12**, 175-180.
- 6) Ito Y, Yanase S, Fujita J, Harayama T, Takashima M and Iwanaka H (1981) : A short term *in vitro* assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Cancer Lett*, **13**, 29-37.
- 7) Honda I, Tokuda H, Kozuka M, Yoneyama K, Nishino H, Iwashima A, Shibagaki M, Noma M, Takahashi N and Yoshida S (1991) : Inhibitory effects of 3-nitro-2,4,6-trihydroxyben-

- zamides on Epstein-Barr virus early antigen induction. *Cancer Lett*, **59**, 83-88.
- 8) Sanford KK, Earle WR, Evans VJ, Waltz HK and Shannon JE (1951) : The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. *J Natl Cancer Inst*, **11**, 773-795.
 - 9) Kapadia GJ, Tokuda H, Konoshima T and Nishino H (1996) : Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Lett*, **100**, 211-214.
 - 10) Wattenberg LW and Leong JL (1970) : Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a)-pyrene by flavones. *Cancer Res*, **30**, 1922-1925.
 - 11) Diamond L, MacFall R, Miller J and Gelboin V (1972) : The effects of two isomeric benzo-flavones on aryl hydrocarbon hydroxylase and the toxicity and carcinogenicity of polycyclic hydrocarbons. *Cancer Res*, **32**, 731-736.
 - 12) Nishino H, Iwashima A, Fujiki H and Sugimura T (1984) : Inhibition by quercetin of the promoting effect of teleocidin on skin papilloma formation in mice initiated with 7,12,-dimethylbenz-(a)anthracene. *Gann*, **75**, 113-116.
 - 13) Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R and Schweigerer L (1995) : Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *J Nutr*, **125**, 790-797.
 - 14) Anderson RL and Wolf WJ (1995) : Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr*, **125**, 581S-588S.
 - 15) Messina M and Barnes S (1991) : The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 541-546.
 - 16) Kondo K, Tsuneizumi K, Watanabe T and Oishi M (1991) : Induction of *in vitro* differentiation of mouse embryonal carcinoma (F9) cells by inhibitors of topoisomerases. *Cancer Res*, **51**, 5398-5404.
 - 17) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y (1987) : Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262**, 5592-5595.
 - 18) Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H and Aoiike A (1993) : Genistein arrests cell cycle progression at G₂-M. *Cancer Res*, **53**, 1328-1331.
 - 19) De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JRS, Jessup W and Leake DS (1990) : Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmac*, **39**, 1743-1750.
 - 20) Ioku K, Tsushida T, Takei Y, Nakatani N and Terao J (1995) : Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochem Biophys Acta*, **1234**, 99-104.
 - 21) Tokuda H, Konoshima T, Kozuka M and Kimura T (1988) : Inhibitory effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and teleocidin B induced Epstein-Barr virus by saponin and its related compounds. *Cancer Lett*, **40**, 309-317.
 - 22) Marnett LJ (1992) : Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res*, **52**, 5575-5589.