

抗腫瘍性食品素材としての HMF 消化産物と 粉末“雪花菜（オカラ）”利用法の検討

岩見公和*・東 直之・須田仁志・岩崎浩恭・山県夏子・佐伯 徹・金本龍平

京都府立大学農学部

Utilization as Antitumorigenic Foodstuffs of Undigested High-molecular-weight Fraction (HMF) and Curd Refuse (*Okara*) from Soy Protein

Kimikazu IWAMI, Naoyuki AZUMA, Hitoshi SUDA, Hiroyuki IWASAKI,
Natsuko YAMAGATA, Tohru SAEKI and Ryuhei KANAMOTO

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8522

ABSTRACT

Fischer rats under resectional operation on ileum and jejunum were taken as rat models devoid and possessed of active bile acid transporter, respectively, and examined for azoxymethane-induced colonic tumorigenesis. The rats were fed for 39 weeks 20% casein diets supplemented with 0.2% deoxycholate, and then the individual colons were excised to locate the tumors and to count their number. Supplementation of the diets with deoxycholate was necessary to actualize the experimental design. Ileal resection caused a considerable increase in tumor number compared to jejunal resection, indicating that such a secondary bile acid may well serve as an important risk factor for colonic tumorigenesis. Subsequently, azoxymethane-treated F-344 rats weighing about 300 g were fed 0.2% deoxycholate-supplemented diets including HMF, *okara*, gluten, codfish protein, yolk protein or casein at a 10% level. At 16, 22 or 28 weeks, tumor development in the colon was inspected by the use of a bronchial endoscope. As a result of endoscopic observation (at 28 weeks), one-half the casein-fed group proved to bear tumor (s) but only a rat did so in the HMF- or *okara*-fed group. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 111-116, 1998.

Key words : ileal resection, deoxycholate, colonic tumor, soybean curd refuse (*okara*), undigested high-molecular-weight fraction (HMF)

生体内代謝産物である胆汁酸が腸内微生物によって脱水酸化された二次胆汁酸は、大腸がん誘発を促進す

る危険因子として作用する¹⁻³⁾。分離大豆たん白質を微生物由来の中性プロテアーゼで処理した後に残る不溶性の高分子画分 (HMF) は、これまで知られている可食性食品成分の中では最も強い胆汁酸結合能を有する⁴⁾。

*〒 606-8522 京都市左京区下鴨半木町

かって高コレステロール血症の治療薬として用いられていたコレステラミン（陰イオン交換樹脂）はHMFより強い胆汁酸結合能を有するが、その長期服用により大腸がん多発の危険性が指摘された⁵⁾。HMFの血中コレステロール降下作用は胆汁酸の糞中排泄増加と深いかわりをもつと考えられている^{6,7)}。コレステラミンの胆汁酸結合が大腸がん発生を高めるならば、HMFによる胆汁酸結合は危険でないと言えるだろうか。この疑義を質するため「HMFの腫瘍抑制または促進効果」を研究課題に取り上げ、アゾキシメタン（AOM）処理したラットを0.2%デオキシコール酸（DCA）を含むHMF食またはカゼイン食で39週間飼育すると、カゼイン食群に比してHMF食群の腫瘍発生数が有意に少ないことを見出した^{8,9)}。このときDCA無添加群には1年間以上飼育を続けても腫瘍発生が進まず、食餌へのラット体内胆汁酸プールのおよそ半分程度のDCA添加は発癌実験を再現性よく実施可能なものとする上でやむをえない処置である。小腸における胆汁酸能動輸送系は回腸末端に局在し、分泌された胆汁酸の90%が再吸収をうけ腸肝循環を繰り返す¹⁰⁾。いま遺伝的あるいは疾病に伴う要因で胆汁酸吸収能が失われたとき、二次胆汁酸は多量に大腸に滞留または通過することになる。

本報告は、回腸または空腸に切除手術を施したラット（胆汁酸輸送系欠損モデル）を0.2% DCA含有20% カゼイン食で飼育して胆汁酸吸収能の存否がAOM誘導大腸腫瘍発生の個数および部位にどのような影響を及ぼすか調べると共に、HMFや“雪花菜（オカラ）”の大腸腫瘍発生抑制効果を他の食品たん白質の効果と比較検討したものである。

方 法

空回腸切除手術と飼養

9週齢フィッシャー系雄ラットの空腸（トライツ靱帯より下方20 cm）または回腸（回盲弁より上方20 cm）を切除縫合後、体重回復を待ってAOM処理を施し（15 mg/kg, 週1回, 計3回腹腔内注射）、0.2% DCA（Na塩を腸溶剤被膜）を含む20% カゼイン食で自由摂取により39週間飼育した。

大腸腫瘍数およびサイズの計測

飼育開始39週目に摘出した大腸の内腔を生理的食塩水でよく洗浄後、腫瘍発生数とサイズ（長径mm）を実体顕微鏡下で計測した。

K-ras 変異の検出

隆起した腫瘍部分のゲノムDNAを抽出後、エキソン

1領域のコドン12/13を含む116 bp断片をPCR増幅し、single-strand conformation polymorphism（SSCP）分析を行った。

オカラ食の栄養試験

離乳直後のウィスター系雄ラットを2群に分け（n=14）、0.2% Met添加50% 粉末オカラ（プロプラス500S）食と0.2% Met添加15% カゼイン食で12日間飼育後、オカラ群はさらに92.5% オカラ食（10日後、75% 食に切り替え）を与える群（n=7）と50% オカラ食を与える群（18日間、n=7）に、カゼイン群はさらに0.2% Met添加10% カゼイン食を与える群（18日間、n=7）と20% カゼイン食（10日後、当初の食餌に戻す）を与える群（n=7）に分けた。

‘リタイヤ’ラットの各種飼料による長期飼育

成長が進み過ぎて成長試験などの実験目的に合わなくなったラットを業界では‘リタイヤ’ラットと称する。数ヵ月前に予約しておけば必要匹数が揃う。今回、窒素出納を維持するのに必要なたん白質量が少なく（カゼイン含量10%以下）また群間の体重差に厳密な考慮を払わずに済む‘リタイヤ’ラットを対象として腫瘍実験を試みた。体重300 g前後のフィッシャー系雄ラットを、各々0.2% DCAを含む13.5% HMF食、50% オカラ食、10% グルテン食、10% 鰯肉たん白質食、10% 卵黄たん白質食、10% カゼイン食、の6食餌群に分けた（n=7～9）。化学発癌剤処理は投与量・投与回数共に上述の通り。体重の増減はわずかなはずのところ、7週目に急激な食欲減退がみられ、同室の他のラットやマウスにも類似の症状が観察されたので、数匹を有料の病理検査に供すると共に実験食を市販固型飼料に切り替え事態の推移を見守った。ほぼ1ヵ月経って検査結果が報告されたが、何れの項目にも病因を特定できる異常値は認められなかった。この間減少していた体重も回復していたので、事態発生から5週目（実験開始12週目）当初の実験食に戻し、実験を再開した。結局、原因不明のままとなったが、季節柄（2月下旬）ラット間にインフルエンザの感染があったのではないと思われる。

胆汁酸およびコレステロール血中濃度の測定

凍結保存中の血漿を溶解、試験管に分注後、当該アッセイキット“総胆汁酸テストワコー”と“コレステロールC-テストワコー”を用いて胆汁酸およびコレステロールの血中濃度を求めた。

糞中胆汁酸の分離と定量

凍結保存しておいた糞の凍結乾燥粉末をエタノール性1 M KOHでケン化（70℃, 1 h）、中性ステロールを除去後、10 M NaOHでアルカリ分解（120℃, 2 h）し

たものを強酸で中和し、クロロホルム-メタノール(2:1)抽出残渣のメタノール溶液から所定のアッセイキットを用いて求めた。

大腸粘膜の *in vivo* 内視鏡観察

一夜絶食後のラットをネブタール麻酔下、肛門から気管支内視鏡(オリンパス BF Type 3C3)を挿入して大腸粘膜表面を観察、必要に応じて付属の装置により写真撮影を行った。

統計処理

空回腸切除群間における担腫瘍ラットの発生腫瘍数によるラットの順位関係は non-parametric Mann-Whitney U-test によって検定し、 $P < 0.05$ を有意と評価した。腫瘍発生が部位毎に偏りがあるかどうかの判定は χ^2 検定によって行った。

結果と考察

Fig. 1 は、空回腸切除が腫瘍発生に及ぼす影響を評価するため、ラットを担腫瘍の数に応じ手術群毎に配置したものである。Mann-Whitney 検定に従って、回腸切除群 ($n_1=13$) に対して空腸切除群 ($n_2=12$) の U

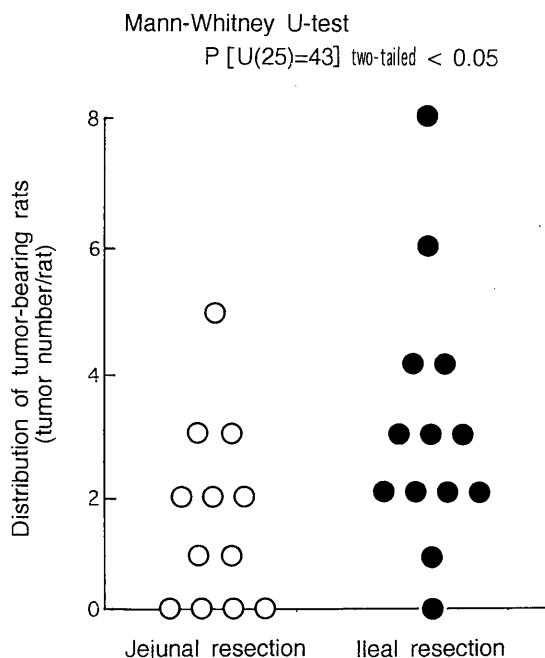
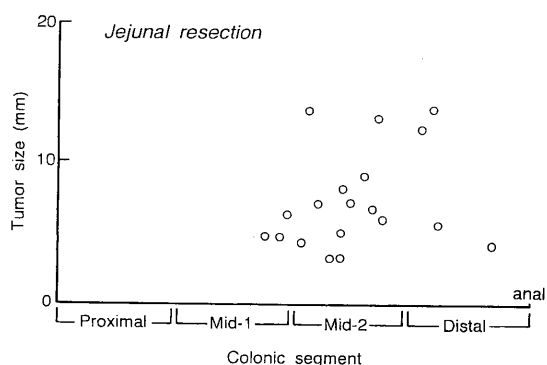


Fig. 1. Number of tumors in the colons of rats under resectional operation on ileum or jejunum and distribution of ranked rats in this respect. The experimental conditions were described in detail in the text.



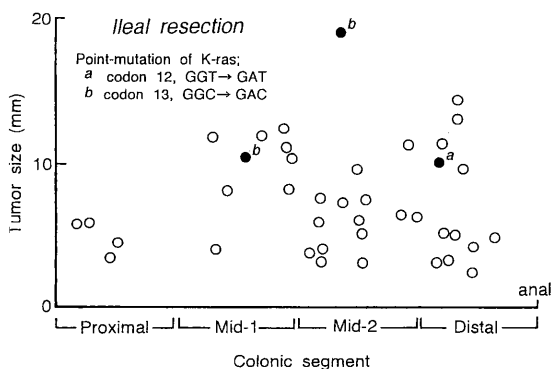
	Number of tumors			
	Proximal	Mid-1	Mid-2	Distal
Observation	0	3	12	4
Expectation	4.8	4.8	4.8	4.8

$$\chi^2 = 1/4.8 [(0-4.8)^2 + (3-4.8)^2 + (12-4.8)^2 + (4-4.8)^2]$$

$$= 1.0 + 0.7 + 10.8 + 0.1 = 12.6$$

$$\chi^2 (df 3; 0.01) = 11.345$$

Fig. 2. Relationship between positions and sizes of colonic tumors in rats with jejunal resection. The experimental conditions were the same as in Fig. 1.



	Number of tumors			
	Proximal	Mid-1	Mid-2	Distal
Observation	4	9	15	12
Expectation	10	10	10	10

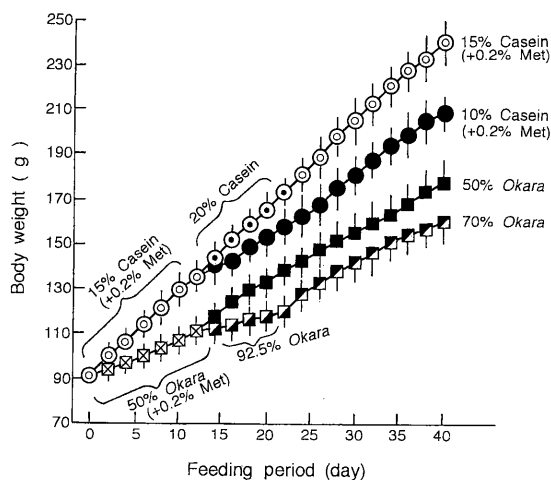
$$\chi^2 = 1/10 [(4-10)^2 + (9-10)^2 + (15-10)^2 + (12-10)^2]$$

$$= 3.6 + 0.1 + 2.5 + 0.4 = 6.6$$

$$\chi^2 (df 3; 0.05) = 7.815$$

Fig. 3. Relationship between positions and sizes of colonic tumors in rats with ileal resection. The experimental conditions were the same as in Fig. 1.

値を求めると $U = 43$ となり, $P < 0.05$ で両群の配置 (順序関係) に有意な差のあることが確かめられた. 空腸切除群および回腸切除群の腫瘍総数は各々 19 個と 40 個であり, 個々の腫瘍の大腸における箇所 (盲腸側から肛門までの相対位置) およびサイズ (長径 mm) を群毎にプロットしたのが Fig. 2 と 3 である. 仮に大腸を 4 等分し (proximal, mid-1, mid-2, distal), 腫瘍発生箇所の分布に対して χ^2 独立性の検定を試みたところ, 空腸切除群には腫瘍発生に位置的な偏りが認められるが (Fig. 2), 回腸切除群では肛門側に多いものの盲腸側にも少なからぬ発生がみられ (Fig. 3) 有意差なしと判定された. とくに回腸切除群の近位部で腫瘍が発生した事実は, 胆汁酸能動輸送系の喪失によって DCA の流入が高まり (閾値を超え), 腫瘍化が促進した可能性を示唆する. 腫瘍サイズについては, 空回腸切除両群間に統計的に有意な差は認められなかった. 癌化の促進や抑制に関与する遺伝子が数多く報告されているが, 実験的大腸がんでは K-ras への関心が高い.



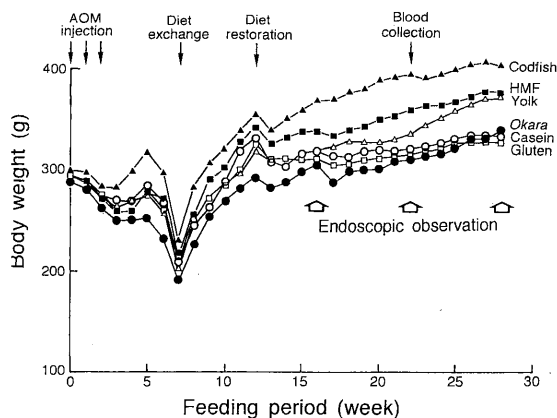
Composition of experimental diets

	Okara			Casein		
	50%	70%	92.5%	10%	15%	20%
Okara	50	70	92.5	-	-	-
DL-Methionine	(0.2)	-	-	0.2	0.2	-
Casein	-	-	-	10	15	20
α -Corn starch	41 (40.8)	22	0	73.8	66.8	60
Soybean oil	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture	3	2	1.5	5	5	5
Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1
Cellulose powder	0	0	0	6	7	9

Fig. 4. Growth curves of rats fed diets containing okara or casein at various levels. Growing rats of the Wistar strain were used in this experiment. Compositions of the respective diets were tabulated herein.

この理由により, Fig. 2 と 3 で示した空回腸切除群ラット 40 個の腫瘍の K-ras 変異の検出を試みた. SSCP 分析の結果, 回腸切除群の 3 個の腫瘍にコドン 12 の GGT が GAT に, コドン 13 の GGC が GAC に変異を起こしていることが見い出された (Fig. 3 中の黒丸). うち 2 個は同じラットの腫瘍によるものであり, K-ras 変異の出現は担腫瘍ラット総数 20 匹中の 2 匹に限られた. このことは K-ras 変異が腫瘍悪性化の原因となるのではなく, むしろ異型度の進んだ腫瘍に K-ras 変異が偶発的に出現することを示唆する.

前報では HMF 食が DCA の糞中排泄を著しく高めるにもかかわらず腫瘍発生を軽減することを実証した^{8,9)}. この一見矛盾する効果は, HMF に捕捉された DCA が結合状態を維持したまま大腸内腔を通過し (コレステラミンは低 pH で解離) 大腸粘膜に刺激を与えない,



Composition of experimental diets

	Ingredient (g/100 g diet)					
	HMF	Okara	Gluten	Codfish	Yolk	Casein
Protein source	13.5	50.0	10.0	10.0	10.0	10.0
α -Corn starch	73.8	42.8	73.8	73.8	73.8	73.8
Soybean oil	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	5.0	1.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cellulose powder	1.5	0	5.0	5.0	5.0	5.0
Deoxycholate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

Fig. 5. Body weight changes in mature Fischer rats fed various diets different in protein source and experimental design. In this experiment, "retired" rats of the Fischer strain were purchased, and after treatment with azoxymethane, were allowed free access to the respective diets of which compositions were tabulated herein.

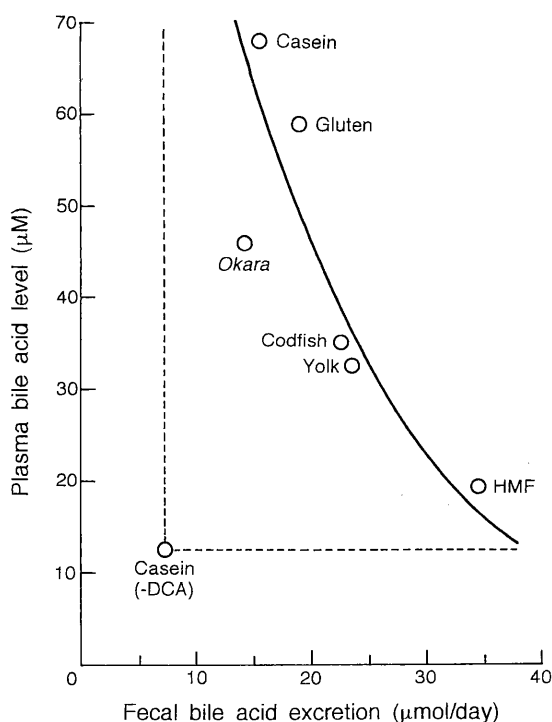


Fig. 6. Relationship between plasma bile acid level and fecal bile acid excretion in rats fed various diets. Blood samples were withdrawn from the tail vein at 22 weeks. Feces were collected for several days before then.

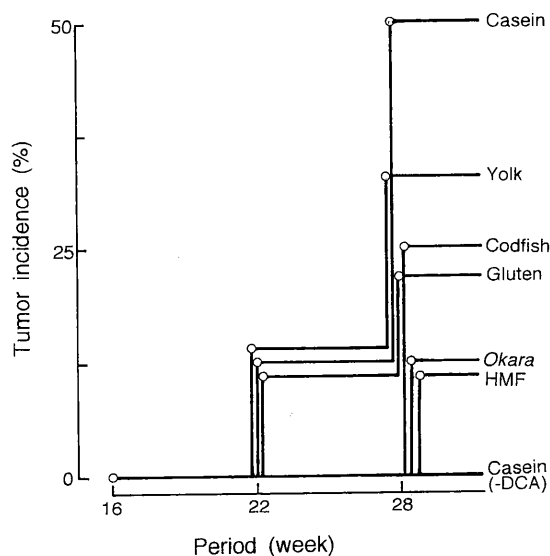


Fig. 7. Endoscopically observed tumor incidence in various dietary groups at weeks 16, 22 and 28.

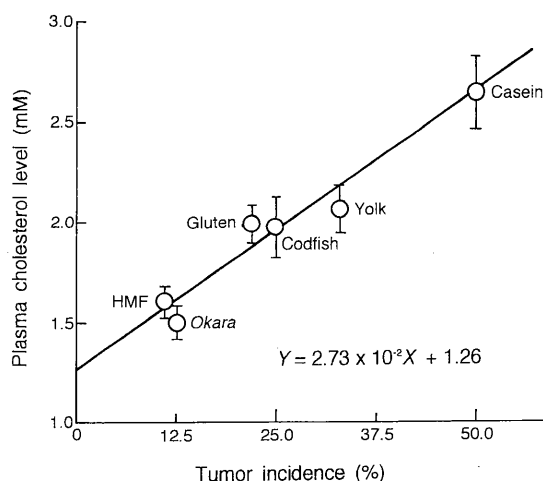


Fig. 8. Plot of plasma cholesterol level against tumor incidence in various dietary groups. The plasma cholesterol level was due to the blood withdrawn at week 22, while tumor incidence was observed within a few days at week 28.

あるいは大腸組織内に取り込まれない、ことに帰せられるのかもしれない。現状においてHMFはそれ自体の調製を目的としなければ入手できない食品素材である。一方、豆腐製造の副産物であるオカ라는食用に向けられる量が年々減少し産業廃棄物の運命をたどりつつある。そこで、オカ라의食用化を喚起する手段として、抗腫瘍の観点からオカ라의有効性を評価することを試みた。Fig. 4は、オカ라의たん白質性食品としての価値を動物栄養試験によって確かめたものである。幼ラットは92.5% オカラ食を嫌って食べなかったが、50% オカラ (± 0.2% Met) 食では10% カゼイン (± 0.2% Met) 食と類似の成長を示した。

成熟ラットは10% 以下のカゼイン食で窒素平衡を維持し (別の実験で確認)、腫瘍実験は長期にわたって行われる。Fig. 5は、13.5% HMFや50% オカラなど実験食のたん白質含量を10% に揃えて実施した成熟ラット (フィッシャー系、初体重 約 300 g) 飼育中の体重変化を示したものである。実験開始7週目に起きた事態とその善後策については方法の項で述べた。実験開始22週目に採血し、血中胆汁酸とコレステロール濃度を測った。各食餌群血中胆汁酸濃度を糞中胆汁酸排泄量に対してプロットしたのがFig. 6である。全般的に糞中胆汁酸排泄が高まれば血中胆汁酸濃度が低くなる傾向を示したが、オカラ食群の血中胆汁酸濃度は糞中胆汁酸排泄量が少ないにもかかわらず低かった。実験開始16、22、28週目に各群ラットの大腸粘膜表面を内視鏡を用いて観察し、腫瘍発生率の推移をFig. 7

に図示した。16週目には何れの群にも腫瘍は観察されなかったが、22週目ではカゼイン食群、卵黄たん白質食群、グルテン食群の各1匹に1または2個の腫瘍が見い出され、28週目ではカゼイン食群の発生率50%を筆頭に何れの食餌群にも腫瘍の発生が認められた（ただしDCA無添加カゼイン食群では零）。我々の踏襲している実験条件で成熟ラットに腫瘍を確実に起こさせようとすれば20週以上の経過観察が必要のようである。

Fig. 8は、28週目に観察された各食餌群の腫瘍発生率(%)に対して22週目に測定された血中コレステロール値をプロットしたもので、回帰直線 $Y = 2.73 \times 10^{-2} X + 1.26$ が求められた。観察(測定)時期のずれもあり、血中コレステロール濃度が高いと何故腫瘍発生率が増えるか合理的な説明をつけかねているが、担腫瘍ラットにおける生理生化学的パラメーターの変動と腫瘍進行程度との関係は当該ラットの死亡直前まで追跡可能である。

要 約

胆汁酸能動輸送系欠損のモデルとして空回腸切除ラットを作成して腫瘍実験を行い、腫瘍発生を効率よく再現するためには0.2%のDCAの添加が有効なこと、また回腸切除群で腫瘍発生頻度が著しく増加し(K-ras変異も検出)、二次胆汁酸が強い腫瘍誘発促進作用を有するきわめて危険な因子であることを確かめた。さらにAOM処理した成熟ラットを13.5% HMF食、50% オカラ食、10% グルテン食、10% 鰯肉たん白質食、10% 卵黄たん白質食、10% カゼイン食（いずれも0.2% DCA添加）を与えて長期飼育し、28週目の内視鏡による大腸腫瘍の観察では全ての食餌群に腫瘍発生がみられるものの群間で差があり、HMF食やオカラ食が低い発生率をもたらすことを明らかにした。

文 献

- 1) Reddy BS, Narisawa T, Weisburger JH and Wynder EL (1976): Promoting effect of sodium deoxycholate on adenocarcinoma in germ-free rats. *J Natl Cancer Inst*, **56**, 441-442.
- 2) Wilpart M, Mainguet P, Masken A and Robertfroid M (1983): Structure-activity relationship amongst biliary acids showing co-mutagenic activity toward 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, **4**, 1239-1241.
- 3) McSherry CK, Cohen BI, Bokkenheuser VD, Mosbach EH, Winter J, Matoba N and Scholes J (1989): Effects of calcium and bile acid feeding on colonic tumors in the rat. *Cancer Res*, **49**, 6039-6043.
- 4) Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1990): Cholesterol-lowering activity of various undigested fraction of soybean protein in rats. *J Nutr*, **120**, 977-985.
- 5) Nigro ND, Bhadrachari N and Chomchai C (1973): A rat model for studying colonic cancer: effect of cholestyramine on induced tumors. *Dis Colon Rectum*, **16**, 438-443.
- 6) Sugano M, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuo T and Kimoto M (1988): The hypocholesterolemic action of the undigested fraction of soybean protein in rats. *Atherosclerosis*, **72**: 115-122.
- 7) Ogawa T, Galchalian-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.
- 8) 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.
- 9) 岩見公和, 東 直之, 田口由美子, 須田仁志, 佐伯 徹, 金本龍平 (1997): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **18**, 105-111.
- 10) Hofman AF (1994): Biliary secretion and excretion: the hepatobiliary component of the enterohepatic circulation of bile acids. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Johnson LR, ed, 3rd Ed, Raven Press, New York. pp. 1555-1576.