

化学発がん剤で誘発されたラット乳がんに対する 大豆のトリプシンインヒビターとイソフラボンの抑制効果の比較

王 銘富¹・曹 麗文¹・詹 吟青¹・王 順成²・廖 俊旺²・
鍾 淑英³・翁 玉青⁴・新城澄枝⁵・高松清治⁶・山本孝史⁶・山本 茂^{*7}

¹ 台湾静宜大学食物栄養系 ² 台湾省農業薬物毒物試験所応用毒理系 ³ 中台医護技術学院護理系
⁴ 中山医学院栄養系 ⁵ 琉球大学教育学部 ⁶ 不二製油株式会社新素材研究所 ⁷ 徳島大学医学部

Effect of Soybean Trypsin Inhibitor and Isoflavone on Chemically Induced Mammary Tumor in Rats

Ming-Fu WANG¹, Li-Wen TSAO¹, Yin-Ching CHAN¹, Shun-Cheng WANG², Jiunn-Wang LIAO²,
Shu-Ying CHUNG³, Yue-Ching WONG⁴, Sumie SHINJO⁵, Kiyoharu TAKAMATSU⁶,
Takashi YAMAMOTO⁶ and Shigeru YAMAMOTO⁷

¹ Department of Food and Nutrition, Providence University, Taichung, Taiwan

² Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung, Taiwan

³ Department of Nursing, Chungtai Institute of Health Sciences and Technology, Taichung, Taiwan

⁴ Department of Nutrition, Chungshan Medical and Dental College, Taichung, Taiwan

⁵ College of Education, University of the Ryukyus, Nishihara 903-0213

⁶ Novelty Materials Institute, Fuji Oil Co., Izumisano 598-8540

⁷ School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

Many researchers have reported the anti-carcinogenic effects of soybean. Isoflavone and trypsin inhibitor are identified as the effective substances. We have also shown such effects of soybean whey (rich source of trypsin inhibitor) in chemically induced skin-tumor mice and hepatoma rats. Last year we switched dietary protein from soybean to casein and were not successful to observe such effects of soybean whey and embryo bud (EB, rich source of isoflavone) on skin tumor in mice. In this study we tried to confirm such results in rats induced mammary tumor by chemical carcinogen. We fed control, whey or EB diet to female SD strain rats. Control diet contained 30% casein (isoflavone-free, trypsin inhibitor-free), EB diet contained 27% casein plus 3% EB (isoflavone 18.6 mg/100 g, trypsin inhibitor-free), and whey diet contained 27.5% casein plus 2.5% whey (isoflavone 0.5 mg/100 g, trypsin inhibitor 1,440 U/100 g) for 18 weeks. Rats were administered chemical carcinogen orally at the first week of the study, sacrificed at 18th week and incidence, number and weight of mammary tumor were

* 〒 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

measured. The result showed no difference in the mammary tumor among the three dietary groups, suggesting that soybean whey and isoflavone are effective to prevent cancer when soybean protein is used but not when casein is used. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 117-123, 1998.

Key words : trypsin inhibitor, isoflavone, mammary tumor, rat

我々は、これまでに化学的に誘発したマウスの皮膚がんやラットの肝臓がんに対して、大豆ホエイが有効であることを明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。大豆ホエイの主成分はトリプシンインヒビター、ヘマグルチニンなどである⁵⁾。大豆の制がん作用を発揮する成分としては、トリプシンインヒビターやイソフラボンがこれまでに知られている⁶⁻¹⁶⁾。我々の測定では、ホエイ中のイソフラボン含量は0.2 mg/gであり、食事に添加するホエイが2%であったことから食事100 g中に0.4 mgと量的に少なく、これまでに我々が観察した各種がんに対するホエイの効果はトリプシンインヒビターによると

考えてきた。ところが最近我々が食事たん白質源として利用している分離大豆たん白質を分析したところ、イソフラボン(2 mg/g)とトリプシンインヒビター(15.3 U/g)をかなり含んでいることがわかった¹⁷⁾。このことは、これまでに観察した制がん効果が、トリプシンインヒビターによるのか、イソフラボンによるのか、それとも両成分によるものかが明確でないことを意味している。それ故、昨年は化学的に誘発したマウスの皮膚がんに対する両成分の効果を比較した結果、両成分とも無効であった¹⁸⁾。

従来、大豆の制がんに関する報告は皮膚がんも含め多岐にわたっているが、イソフラボンの効果に関する報告は主に乳がんや前立腺がんなどの性ホルモンと関係する臓器が多い。そこで、本実験では、食事たん白質源をカゼインとしたときの両成分の制がん効果を化学的に誘発したラットの乳がんモデルで調べた。

方 法

7週齢のSD系雌ラット46匹を3群に分け、コントロール食、大豆胚軸(embrryo bud, EB)食、あるいはホエイ食で18週間飼育した。大豆胚軸は焙煎したものを使用した。Table 1に食事組成および食事のトリプシンインヒビター活性およびイソフラボン濃度を示した。コントロール食はカゼイン30%、胚軸食はカゼイン27%と胚軸を3%、そしてホエイ食はカゼイン27.5%と大豆ホエイ2.5%とした。他の食事組成は全ての食事でミネラル混合5%(オリエンタル酵母製)、ビ

Table 1. Dietary composition and concentrations of trypsin inhibitor and isoflavone (/100 g)

	Contorol	EB	Whey
Casein(g)	30	27	27.5
Whey(g)	0	0	2.5
Embryo bud(g)	0	3	0
α -Cornstarch(g)	38	38	38
Sucrose(g)	19	19	19
Corn oil(g)	5	5	5
Cellulose powder(g)	2	2	2
Mineral mixture(g)	5	5	5
Vitamin mixture(g)	1	1	1
Trypsin inhibitor(U)	0	0	1,440
Isoflavone(mg)	0	18.6	0.5

Table 2. Comparisons of body weight gain, food intake and food efficiency ratio of rats fed control, EB or whey diet for 18 weeks

Diet	N	Initial weight g	Final weight g	Weight gain g/126 d	Food intake g/day	Food efficiency ratio
Control	16	193.2 $\pm$ 5.0	317.4 $\pm$ 11.5	124.2	28.4 $\pm$ 1.3	0.035
EB	15	193.7 $\pm$ 4.3	290.2 $\pm$ 7.7	96.5	26.1 $\pm$ 1.2	0.029*
Whey	15	194.2 $\pm$ 4.0	313.8 $\pm$ 11.8	119.6	27.6 $\pm$ 1.5	0.034

* Significantly different from other groups by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

タミン混合1% (オリエンタル酵母製), セルロースパウダー 2% (オリエンタル酵母製), 大豆白絞油 5% (不二製油製) とし, 残り炭水化物 (α - コーンスターチ: 砂糖 = 2:1) を加えて 100% となるようにした. 飼料中のトリプシンインヒビター活性は benzoylarginine-p-nitroanilide hydrochloride 法¹⁷⁾ で, イソフラボン濃度は液クロ変法^{19,20)} で測定した.

食事中的トリプシンインヒビター量 (U/ 100 g) は, コントロール食 0, 胚軸食 0, ホエイ食 1,440 であった. イソフラボン実測値は, 胚軸 0.62%, ホエイ 0.02% であった. 食事中的イソフラボン含量 (mg/ 100 g) は, コントロール食 0, 胚軸食 18.6 およびホエイ食 0.5 であった. 飼育期間は 18 週間とした. 餌は毎日新しいものを給餌し, 残量を測定した. 水は自由摂取とした. 飼育は室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 70% の空調下で行った. 実験食開始 1 週間後に発癌剤 7, 12-dimethylbenzanthracene (DMBA, 50 mg/kg 体重) を一回経口投与した. 実験期間中は, 2 週間ごとに乳房の腫瘍を触診で観察した. 飼育 18 週間終了後, 解剖し, 乳房の腫瘍発生率, 発生腫瘍個数, 腫瘍総重量の測定, 並びに病理学的検査を行った.

各群間の結果の比較にはカイ 2 乗検定あるいは Duncan's multiple range test を用いた. P 値 0.05 以下をもって有意差有りとした.

結 果

Table 2 にラットの実験開始時と終了時の体重, 18 週間の体重増加量, 食物摂取量, food efficiency ratio を示した. 初体重は, 3 群でよく似ていたが, 最終体重は胚軸群で他 2 群に比べて低い傾向にあった. これは, 食物摂取量が胚軸群で低い傾向があったためと考えられる. food efficiency ratio は, 胚軸群で他 2 群よりも有意に低かった.

Fig. 1 に腫瘍を持ったマウスの割合を示した. 腫瘍発生は, 約 30% で各群間に有意差は無かった.

Fig. 2 に腫瘍の発生したラット一匹あたりの腫瘍個数を示した. ホエイ群で高い傾向がみられたが有意差はなかった.

Fig. 3 に腫瘍をもったラット一匹あたりの平均腫瘍重量を示した. 有意差はないもののコントロール群, 胚軸群, ホエイ群の順に重くなる傾向が観察された.

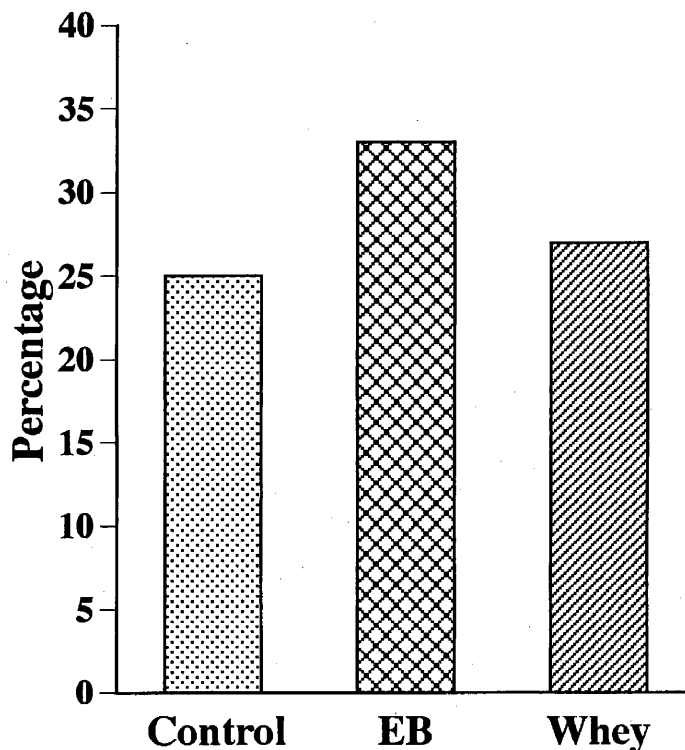


Fig. 1. Percentages of tumor bearing rats fed control diet (n=16), soybean embryo bud diet (EB) (n=15) or soybean whey diet (n=15) for 18 weeks. Statistical difference was not observed by chi-square test ($P > 0.05$).

考 察

化学的に誘発したラットの乳がんに対するトリプシンインヒビターとイソフラボンの効果を比較したが、両成分に差がないばかりか、対照食群と比べても差を見ることができなかった。今回の結果は、前回の化学的に誘発した皮膚がんモデルのマウスでみたものと同じであった¹⁸⁾。しかしこれらは、これまでの多くの報告と必ずしも一致しておらず、また我々自身の過去の観察とも矛盾している。

今回の研究の特徴は、食事たん白質源としてカゼインを使ったことである。これまでの多くの研究では、たん白質源として大豆たん白質を用いている。このことから、カゼインを用いた時にトリプシンインヒビターやイソフラボンの制がん効果が失われるかどうかについて考慮する必要がある。分離大豆たん白質とカゼインの発がんに対する効果についてはこれまでいくつかの研究があるが、前者の方に後者より強い制がん作用があるとするものと²¹⁻²³⁾、差はないとするものに分かれる²¹⁾。また今回の我々とよく似た条件で

DMBA 誘発による乳がんの実験をラットで行った報告では、カゼインと大豆たん白質の発がん率にはそれほど差がなかった²⁴⁾。このようなことから、カゼインの発がんに対する影響は大豆たん白質のそれと顕著に異なるものではなく、カゼインがトリプシンインヒビターやイソフラボンの制がん効果を消去したとは考えにくい。

大豆たん白質を用いたときに効果が見られ、カゼインではみられないことは、大豆たん白質に含まれる他の成分の影響についても考える必要がある。これまでの実験で我々が大豆たん白質源として用いたのは分離大豆たん白質であった。前述のとおり分離大豆たん白質は、トリプシンインヒビターやイソフラボンをかなり含有している。それゆえ、胚軸あるいはホエイを添加しない食事でも、トリプシンインヒビターやイソフラボンの量はかなり多い。また、トリプシンインヒビター活性は加熱によっても数パーセント残っている。それ故、丸大豆を用いたときはもちろん、分離大豆たん白質を用いたときにもイソフラボンとトリプシンインヒビターを同時に摂取していることになる。このことから、大豆たん白質を用いたときに見られる制がん

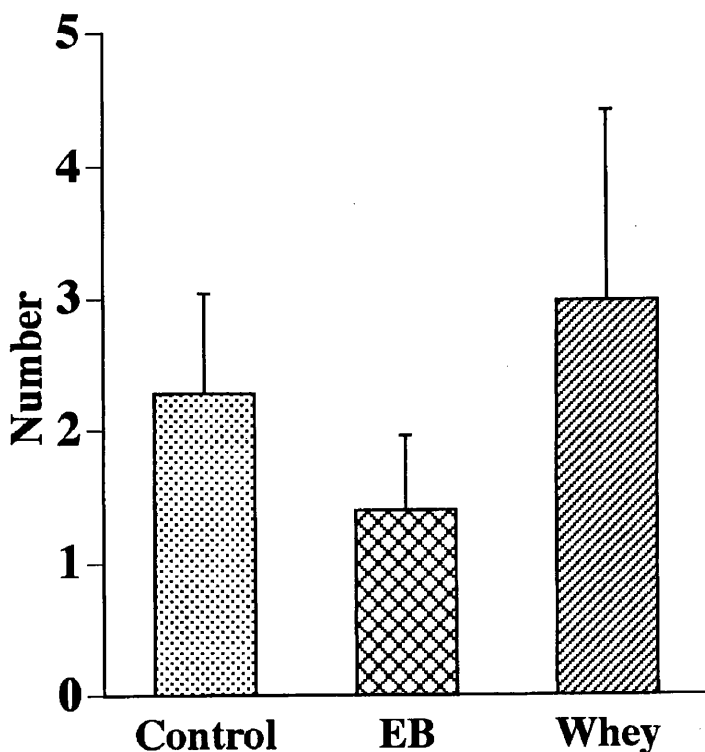


Fig. 2. Average tumor number in tumor-bearing rats fed control (n=4), soybean embryo bud (EB) (n=5) or soybean whey (n=4) diet for 18 weeks. Statistical difference was not observed by Duncan's multiple range test ($P > 0.05$).

作用がカゼインを用いたときにはみられないことは、イソフラボンとトリプシンインヒビターが同時に存在するときのみに制がん効果が発揮されることを意味しているのかもしれない。この証明のために我々は現在、たん白質源としてカゼインと分離大豆たん白質を用い、これらにトリプシンインヒビターあるいはイソフラボンを添加した食事でのDMBAによってひきおこされるラット乳がんについて研究を進めている。

今回の実験でトリプシンインヒビターとイソフラボンがともに発がん抑制に対して必ずしも有効でなかった理由として、与えた量の問題も考えておかねばならない。胚軸食群では3%の胚軸を食事に添加したが、食物摂取量および体重増加量が他2群に比べ低い傾向にあり、food efficiency ratioは他2群に比べて有意に低かった ($P < 0.05$)。前回のマウスの実験では、食事に5%の胚軸を添加すると食欲低下があったが2%の添加ではカゼイン食群と食物摂取量に差がなかった。これらのことは、我々が使用した胚軸は食事に対する添加が2%を越す程度で動物の食欲を低下させるようななんらかの原因があることを示している。胚軸食のイソフラボン濃度は18.6 mg/100 gで、ラットはこれを1

日30 g 足らず摂取しているので、一匹あたり1日約6 mgの摂取になる。ラットの体重が約300 gであったので、体重1 kgあたりの摂取量は約20 mgになる。これは体重50 kgのヒトでは1日約1,000 mgの摂取に相当する。日本人のイソフラボン摂取量は成人で1日あたり20 mg 足らずと推測されている²⁵⁾。それ故、今回の実験に用いたイソフラボン量は、我々の日常摂取量に比べると高すぎる負荷となった可能性がある。胚軸食での食欲低下が、イソフラボンの含量のみによるのかどうかは明らかでないが、このように食物摂取量が低下する条件では、いかなる影響が発がんに対しておこるかも知れず、食欲に影響をあたえない量での試験を行う必要があろう。

一方、今回の実験食のトリプシンインヒビター摂取量は、飼料中の活性が約1,440 U/100 g、ラットの体重が約300 g、食物摂取量が一日約30 gであったことから計算すると、1,440 U/ 体重 kg であった。一方、我々が測定した日本人の一日あたりのトリプシンインヒビター活性量は、1 U/ 体重 kg 以下であった¹⁷⁾。すなわち体重当たりで比較すると、動物実験での摂取量はヒトの日常的な摂取量に比べて高すぎるかもしれない。

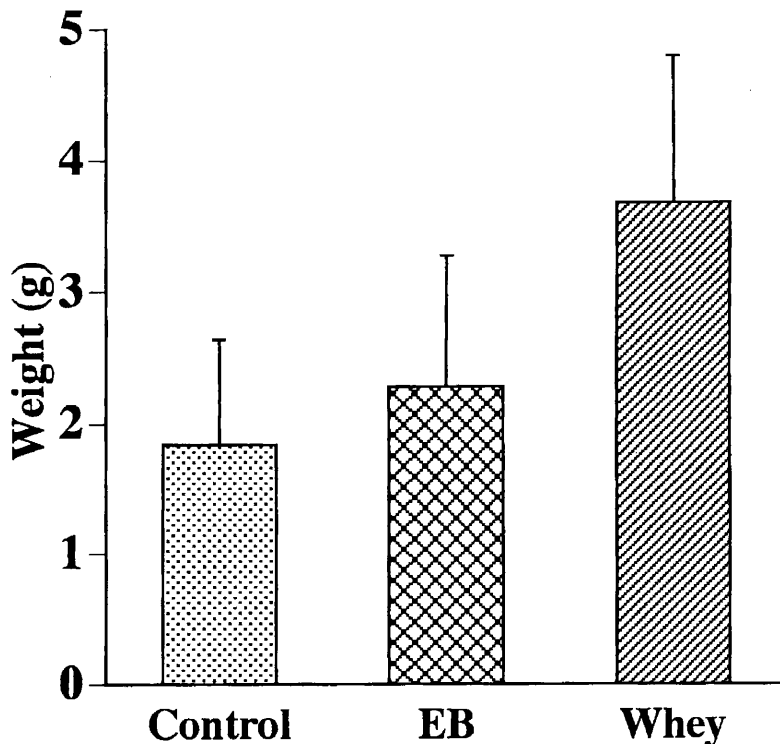


Fig. 3. Average tumor weight in tumor-bearing rats fed control (n=4), soybean embryo bud (EB) (n=5) or soybean whey (n=4) diet for 18 weeks. Statistical difference was not observed by Duncan's multiple range test ($P > 0.05$).

トリプシンインヒビターの残存した未加熱大豆粉を使った試験で、食餌中のサンプルレベルが5%の場合ではがん頻度の低下が顕著であるが、10%レベルでは頻度が増加し、更に20%レベルに上げると再度頻度が低下することが報告されている¹⁴⁾。このようなことからトリプシンインヒビターの効果は濃度によって異なる

可能性があり、今後濃度を変えての検討も必要である。

以上、トリプシンインヒビターやイソフラボンの制がん作用は食事たん白質源としてカゼインを用いたときには現れず、大豆たん白質を用いたときに現れることが示唆された。

要 約

これまでに多くの研究者が大豆の制がん作用を報告している。その有効成分としては、イソフラボンとトリプシンインヒビターをあげている。我々も、これまでに化学的に誘発したマウスの皮膚がんやラットの肝臓がんに対して、大豆ホエイが有効であることを明らかにしてきた。昨年、食事たん白質を従来大豆たん白質からカゼインに変えて大豆ホエイと胚軸の皮膚がん抑制効果を調べたところ、効果がみられなかった。そこで、このようなことが乳がんモデルのラットでもおこるかどうかを確認するために本実験を行った。試験は、SD系雌ラットをコントロール食、大豆胚軸食、あるいはホエイ食で18週間飼育して行った。実験食開始1週間後に発がん剤DMBAを経口投与した。飼育18週間終了後、解剖し、乳房の腫瘍発生率、腫瘍個数、腫瘍重量の測定、並びに病理学的検査を行った。その結果、腫瘍発生率、腫瘍個数、平均腫瘍重量などに食事群間の違いはなかった。このことを従来の結果と併せて考えると、大豆ホエイや胚軸のがん抑制効果は、食事たん白質が分離大豆たん白質ではおこるがカゼインではおこらないことを示唆している。

文 献

- 1) 山本 茂, 上江洲香代子, 安里 龍, Limtrakul PN, Suttajit M (1992):大豆ホエイたん白質がマウスの皮膚癌に及ぼす影響。大豆たん白質栄養研究会会誌, **13**, 76-79.
- 2) Limtrakul PN, Suttajit M, Semura R, Shimada K and Yamamoto S(1993): Suppressive effect of soybean milk protein on experimentally induced skin tumor in mice. *Life Sci*, **53**, 1591-1596.
- 3) 勢村利恵, 島田勝政, 加藤克幸, 大城吉秀, 新城澄枝, 山本 茂(1994):大豆ホエイたん白質が肝臓癌に及ぼす影響。大豆たん白質研究会会誌, **15**, 130-133.
- 4) 新城澄枝, 宮城裕子, 宮城知佳, 久場恵美, 當間美香, 王 銘富, 高松清治, 山本孝史, 安里 龍, 山本 茂(1996):沖縄寄せ豆腐がマウスの皮膚癌に及ぼす影響。大豆たん白質研究会会誌, **17**, 84-88.
- 5) 荒井綜一(1984):大豆—そのタンパク質の特性を中心に。米・大豆と魚。藤巻正生・井上五郎・田中武彦責任編集, 光生館, 東京, pp.112-113.
- 6) Liener IR (1962): Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am J Clin Nutr*, **11**, 281-298.
- 7) Troll W, Belman S, Wiesner R and Shellabarger CJ (1979): Protease action in carcinogenesis. In : *Biological Functions of Proteinases*. Holzer Z and Tschesche H, eds., Springer-Verlag, Berlin, pp. 165-170.
- 8) Troll W, Wiesner R, Shellabarger CJ, Holtzman S and Stone JP(1980): Soybean diet lowers breast tumor incidence in irradiated rats. *Carcinogenesis*, **1**, 469-472.
- 9) Birnboim HC(1982): DNA strand breaks in human leukocytes exposed to a tumor promoter, phorbol myristate acetate. *Science*, **215**, 1247-1249.
- 10) Corasanti JG, Hobika GH and Markus G(1982): Interference with dimethylhydrazine induction of colon tumors in mice by ϵ -aminocaproic acid. *Science*, **216**, 1020-1021.
- 11) Yavelow J, Finalay TH, Kennedy AR and Troll W (1983): Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res*, **43**, 2454s-2459s.
- 12) Clair WH, Billings PC, Carew JA, Keller M, Newbern

- P and Kennedy AR(1990): Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res*, **50**, 580-586.
- 13) Hendrich S, Lee KW, Xu X, Wang HJ and Murphy PA (1994): Defining food components as new nutrients. *J Nutr*, **124**, 1789s-1792s.
 - 14) Barnes S, Grubbs C, Setchell KDR and Carlson J (1990): Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. In : *Mutagens and Carcinogens in the Diet*, Wiley-Liss, Inc., pp. 239-253.
 - 15) Steele VE, Pereira MA, Sigman CC and Kelloff CJ (1995): Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nutr*, **125**, 713s-717s.
 - 16) Coral A, Tinier L, Moore J, Holland M and Barnes S (1995): Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*, **208**, 120-123.
 - 17) Miyagi Y, Shinjo S, Nishida R, Miyagi C, Takamatsu K, Yamamoto T and Yamamoto S(1997): Trypsin inhibitor activity in commercial soybean products in Japan. *J Nutr Sci Vitaminol*, **43**, 575-580.
 - 18) 宮城知佳, 新城澄枝, 宮城裕子, 久場恵美, 當間美香, 王 銘富, 高松清治, 山本孝史, 山本 茂 (1997): 化学的に誘発したマウス皮膚癌に及ぼす大豆トリプシンインヒビターとイソフラボンの効果. 大豆たん白質研究会会誌 **18**, 112-119.
 - 19) 太田直一, 桑田五郎, 赤堀 浩, 渡辺忠雄 (1980): 大豆イソフラボン化合物の高速液体クロマトグラフィーによる分離・同定. 日本食品工業学会誌, **27**, 348-351.
 - 20) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR and Barnes S (1993): Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates : Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem*, **41**, 1961-1967.
 - 21) 全米科学アカデミー(1983): がん予防と食生活. 厚生省公衆衛生局栄養課訳. 日本栄養食品協会, 東京, pp. 115-130.
 - 21) FAO 栄養部食糧政策及食品科学課編(1970): 食品のアミノ酸含量とその蛋白生物価. 大磯敏雄訳. 第一出版, 東京, pp. 89-110.
 - 22) 岩見公和, 東 直之, 田口由美子, 須田仁志, 佐伯 徹, 金本龍平, 土橋康成(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.
 - 23) 西野輔翼(1997): 大豆中に含まれるイソフラボノイドの発がん抑制作用に関する研究. 大豆たん白質研究会会誌 **18**, 130-134.
 - 24) Morita T and Kiriya S(1996): A rice protein isolate alters 7, 12-dimethylbenz [alpha] anthracene induced mammary tumor development in female rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, **42**, 325-337.
 - 25) 宮城裕子(1996): 大豆製品中のトリプシンインヒビター活性およびイソフラボン含有量に関する研究. 琉球大学大学院保健学研究科修士論文, pp. 13-21.