

大豆胚軸成分による発がんプロモーションの抑制： ニトロソメチルウレア誘発ラット発がん に及ぼす大豆胚軸の摂食効果

竹下正純・財前行宏・松尾哲孝・調 恒明*

大分医科大学 大学生化学

Inhibitory Effect of Soybean Hypocotyls on Tumor Promotion: Effect of Dietary Hypocotyls on *N*-Nitroso-*N*-Methylurea-Induced Rat Tumorigenesis

Masazumi TAKESHITA, Yukihiro ZAIZEN, Noritaka MATSUO and Komei SHIRABE

Department of Biochemistry, Oita Medical University, Oita 879-5593

ABSTRACT

We reported an inhibitory effect of the extract of soybean hypocotyls on tumor promotion examined with Epstein-Barr virus activating assay and mice skin tumor promoting test. In the present study, the effect of feeding the soybean hypocotyls on chemically induced carcinoma in rats was examined. In this experiment, rats were fed casein diet, soy protein isolate diet, 1.5% soybean hypocotyl diet or 5% soybean hypocotyl diet. Carcinogen was injected via tail veins of the rats at ages of 9 weeks and 29 weeks. Tumors were observed macroscopically at 42 weeks of age. One tumor was detected in one of 23 rats in casein group, and tumors were detected in 4 of 19 rats in soy protein isolate group, whereas in 1.5% and 5% hypocotyl groups, tumors were detected in 2 of 23 rats, and in 2 of 24 rats, respectively. Analysis of cumulative palpable tumor incidence indicated at 51 weeks of age tumor incidence of soy protein and hypocotyl diet groups was less than casein diet group. In the four diet groups tumors appeared least rapidly in 5% hypocotyl group. *Soy Protein Research, Japan* **1**, 124-128, 1998.

Key words : soybean hypocotyl, chemically-induced tumor, isoflavone, rat, tumor promotion

近年、大豆のがん抑制効果が疫学的・実験的に報告されている¹⁻³⁾。一方、大豆の芽の部分である大豆胚軸には、様々な成分が大豆より多く含まれている事が知られている^{4,5)}。ここで、大豆胚軸にがん抑制に対する効果があれば、大豆製品製造過程の副産物として捨てられている大豆胚軸が利用されるだけでなく、発がん

予防にも役立つ可能性が期待できる。

我々は、発がんプロモーション促進・抑制物質のスクリーニングに利用されている Epstein-Barr (EB) ウイルス活性化試験法を用い、大豆胚軸抽出液が発がんプロモーションを抑制している事を示した。さらに、より生体に近い実験系であるマウス皮膚2段階発がん試験においても、大豆胚軸抽出液が腫瘍形成を抑制する事を明らかにし、その抑制活性に胚軸中のイソフラ

*〒 879-5593 大分県大分郡挾間町医大ヶ丘 1-1

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients (g)	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
	Casein diet	SPI diet	Hypocotyl 1.5%	Hypocotyl 5%
Casein	20	0	0	0
SPI	0	20	19.25	17.5
Hypocotyl	0	0	1.5	5
α -Corn starch	10	10	10	10
β -Corn starch	42	42	41.25	39.5
Sucrose	8	8	8	8
Fat	10	10	10	10
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose powder	5	5	5	5
Vitamin mixture	1	1	1	1
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5
Total	100	100	100	100

SPI : soy protein isolate.

Table 2. Effect of dietary hypocotyls on tumor promotion

Treatment group	Total No. of rats with tumors/ No. of rats (sites)
Casein	1/23 (oral angle)
SPI	4/19 (parotid gland, infrascapular region, oral angle, zygomatic region)
1.5% Hypocotyls	2/23 (parotid gland, oral angle)
5% Hypocotyls	2/24 (abdominal mammary gland)

ボンが関与していることを示した^{6,7)}。そこで本研究では、発がんプロモーション抑制効果を示した大豆胚軸の摂食効果について、ラット化学発がんモデルを用いて検討した。

方 法

実験には4週齢F 344 雌ラット（セアック吉富）を用い、2週間馴化させた後、カゼイン食（グループ1）、分離大豆たん白質（soy protein isolate, SPI）食（グループ2）、大豆たん白質+焙煎大豆胚軸1.5%（グループ3）、大豆たん白質+焙煎大豆胚軸5%（グループ4）の4群（1群30匹）に分けた⁸⁾。各群の食餌組成は、Table 1に示した。これら調製飼料を中板方式粉末飼料用給餌器を用いてラットに自由摂食させた。

9週齢（平均体重約120 g）にて各群25匹ずつに発がん物質であるニトロソメチルウレア（*N*-nitroso-*n*-methylurea, NMU, Sigma）を尾静脈より投与（37.5 mg/kg 体重）した⁹⁻¹¹⁾（NMU未投与、1群5匹）。NMU投与1カ月後（13週齢）から、週1回定期的に、視診・触

診を開始した。さらに、無作為に選んだラット各群12匹に対して、29週齢（平均体重約160 g）にてNMUの再投与（50 mg/kg 体重）を行った。

結 果

各群において、飼料の違いによる体重に有意な差は認められなかった（Fig. 1）。

NMU投与後33週（42週齢）で腫瘍の出現が観察されているラットは次の通りである。カゼイン食のラット1匹の左口角部に5 mmの腫瘍、大豆たん白質食のラット1匹に直径・高さとも1.5 cmの左耳下腺部腫瘍、1匹の左肩甲下部に直径2 cm、高さ1 cmの膨隆、1匹の右口角部に5 mmの腫瘍、1匹の右頬部に直径1 cm、触診で判る程度の膨隆、胚軸1.5%食のラット1匹の左口角部に4 mmの腫瘍、1匹に直径1.5 cm、高さ1 cmの左耳下腺部腫瘍、胚軸5%食の1匹に直径1 cmの平坦な右腹部乳腺腫瘍、1匹に直径2.5 cm、高さ1 cmの左腹部乳腺の腫瘍が出現している（Table 2, Fig. 2）。Fig. 3は、NMU再投与後22週（51週齢）迄の腫瘍形成を

1 回投与群, 2 回投与群, 合わせて示したものである。22 週目 (51 週齢) において腫瘍の形成は, カゼイン食群に比べ, 大豆たん白質食群, 大豆胚軸食群で低い傾向を示した。また, 4 群の中で胚軸 5% 食群が最も腫瘍の形成が遅い傾向を示した。なお, NMU 未投与群では腫瘍の出現は認められていない。

考 察

食品中には多くのがん抑制成分が含まれている事が知られており, これらの成分を含む食品の摂取によるがん予防効果が期待されている。しかしながら, がん

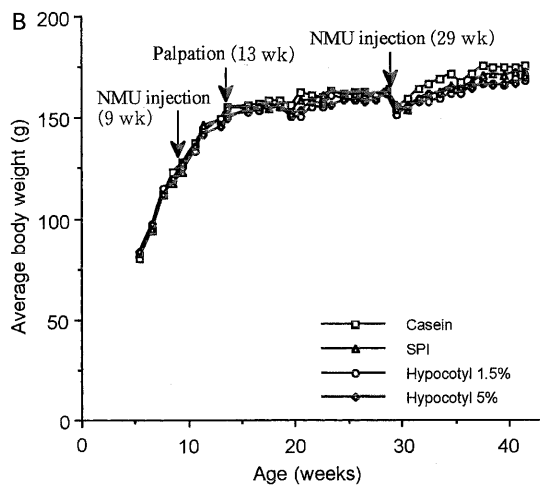
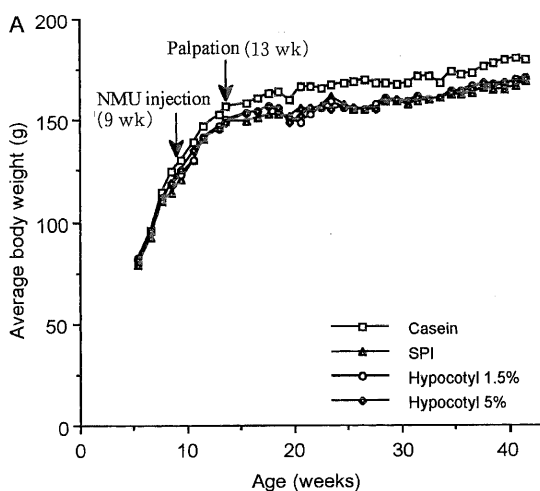


Fig. 1. Change of average group body weights of rats in the experimental period. A, injection once; B, injection twice.

A



B



C

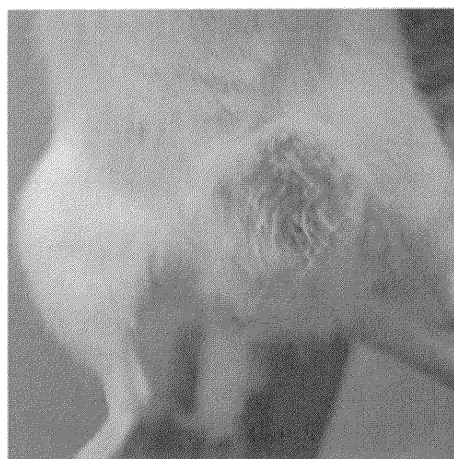


Fig. 2. Photographs of tumors induced. A, tumor at left parotid gland; B, tumor at right abdominal mammary gland; C, tumor at left abdominal mammary gland.

はイニシエーション、プロモーション、プログレッションといった複雑な過程を経て発生しているの、それぞれの過程に対応した実験系を用いて、ある成分の発がん促進または抑制効果を検討する必要がある。

EB ウイルス活性化試験法は、EB ウイルス潜在感染ヒトリンパ芽球様細胞株 Raji 細胞の発がんプロモーターによる活性化を指標とする *in vitro* の実験系である。ここで、活性化抑制物質はプロテインキナーゼCの活性化を初発とする細胞内シグナル伝達機構を抑制し、その多くは *in vivo* 試験にて発がんプロモーション抑制物質となる。この方法は、多くの発がんプロモーション促進または抑制物質のスクリーニング法として用いられている。

EB ウイルス活性化試験法によって抑制活性を示した物質は、より生体に近い実験系であるマウス皮膚2段階発がん試験法で検討される場合が多い。この方法では、発がんプロモーターを皮膚に塗布すると、その作用によりパピローマという良性腫瘍が発生する。この系では、プロモーターは細胞数を増やす点でがんの発生に関与している。一方、プロモーター処理前にある種の物質を塗布すると、腫瘍の発生が抑制される。この腫瘍抑制効果を持つ物質がプロモーション抑制物質と考えられる。

前回報告したように、大豆胚軸抽出液が、EB ウイルス活性化試験およびマウス皮膚発がん試験において、発がんプロモーション抑制活性を示す事が明らかになった^{6,7)}。しかし、これらの実験結果だけでは、大豆胚軸食品摂取によるがん予防効果の有効性が明らかになったとは考えにくい。そこで今回の実験では、実際に大豆胚軸を摂食させることにより、その発がん抑制効果を検討した。現在、触診による腫瘍形成を観察している途中であり、摂食実験終了後は、腫瘍生検、細胞診を行い、組織病理学的検討を加える予定である。

これまでの研究で、生・焙煎胚軸とも同様に抑制効果が認められ、プロモーション抑制活性にイソフラボンが関与している可能性を示した^{6,7)}。しかしながら、大豆胚軸には多くの成分が含まれていることから、大豆胚軸中の多様な成分が複雑なプロモーション過程をそれぞれに阻害し、その相乗効果により抑制活性を示している可能性が考えられる。これらの関係を明らかにするために、抑制活性成分の更なる検討が今後必要であろう。また、今回の摂食実験では苦みの残る生胚軸よりも芳ばしい焙煎胚軸を用いている。今回の結果により、焙煎胚軸で抑制活性が認められれば、がん予防食品として大豆胚軸が利用できる可能性がある。

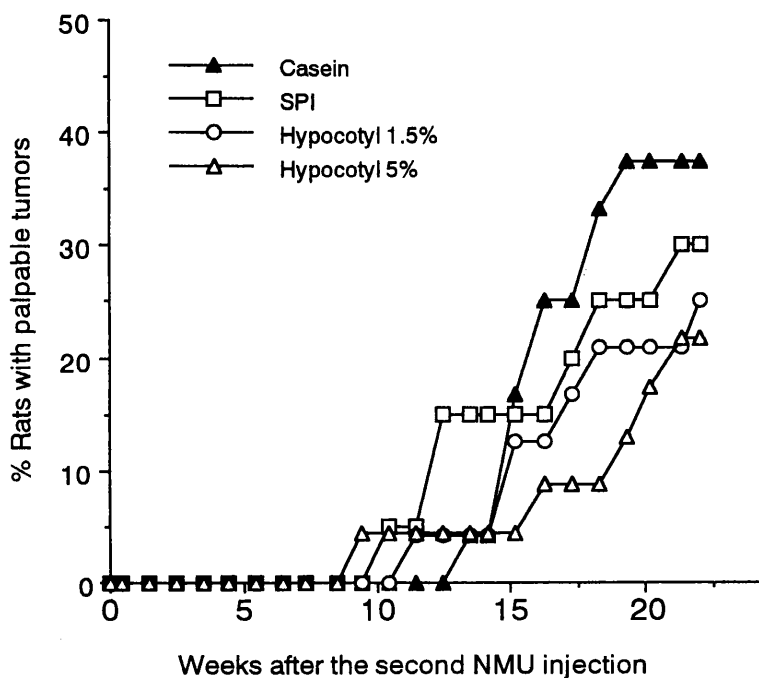


Fig. 3. Cumulative palpable tumor incidence studied for Casein, SPI, 1.5% hypocotyl, and 5% hypocotyl diets. Life table data include all palpable tumors (adenocarcinoma etc.). Data points represent total palpable tumors, including those that regressed during the experiment.

要 約

大豆胚軸抽出液が, Epstein-Barr ウイルス活性化試験およびマウス皮膚2段階発がん試験で発がんプロモーション抑制作用を示す事を前回報告した. 本研究では, 大豆胚軸の摂食効果を, ラット化学発がん実験系を用いて検討した. 本実験では, カゼイン食, 大豆たん白質食, 1.5% 大豆胚軸食, 5% 大豆胚軸食の4群に分け, ラットに摂食させた. 9週齢と29週齢で発がん物質を尾静脈に投与し, 腫瘍の出現を触診により確認している. 現在, 実験の途中であるが, 腫瘍形成が観察されつつある. 42週齢において, カゼイン群では23匹中1匹に腫瘍が検出され, 大豆たん白質群では19匹中4匹であり, 大豆胚軸群では, それぞれ23匹中2匹, 24匹中2匹であった. 腫瘍の形成は51週齢において, カゼイン食群に比べ, 大豆たん白質食群, 大豆胚軸食群で低い傾向を示した. また, 4群の中で胚軸5%食群が最も腫瘍の形成が遅い傾向を示した.

文 献

- 1) Goodman MT, Wilkens LR, Hankin JH, Lyu LC, Wu AH and Kolonel LN (1997): Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *Am J Epidemiol*, **146**, 294-306.
- 2) 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.
- 3) Messina M and Barnes S (1991): The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 541-546.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 財前行宏, 徳田春邦, 西野輔翼, 竹下正純(1997): 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. 大豆たん白質研究会会誌, **18**, 125-129.
- 8) Reeves PG, Nielsen FH and Fahey Jr GC (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-1951.
- 9) 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.
- 10) Gullino PM, Pettigrew HM and Grantham FH (1975): N-nitrosomethylurea as mammary gland carcinogens in rats. *J Natl Cancer Inst*, **54**, 401-414.
- 11) Cohen LA, Thompson DO, Maeura Y, Choi K, Blank ME and Rose DP (1986): Dietary fat and mammary cancer. I. Promoting effects of different dietary fats on N-nitrosomethylurea-induced rat mammary tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst*, **77**, 33-42.