

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

西野輔翼*

京都府立医科大学大学生化学教室

Anti-carcinogenic Effect of Isoflavonoids in Soybeans

Hoyoku NISHINO

Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602-8566

ABSTRACT

In the previous study, we showed that genistein, one of the isoflavonoids found in soybean, inhibited the proliferation of prostate cancer DU145 cells. In addition to prostate cancer cells, various tumor cell lines were also proven recently to be sensitive to genistein. In the present study, we found that genistein induced morphological differentiation, and apoptosis in rat neuroblastoma B104 cells. In the previous study, we showed that oral administration of isoflavonoid-rich soybean hypocotyl powder resulted in suppression of spontaneous liver carcinogenesis in C3H/He male mice. Since various substances in soybean hypocotyl co-existed with isoflavonoids may have anti-carcinogenic activity and/or potentiate the anti-carcinogenic activity of isoflavonoids, studies on these soybean constituents seem to be valuable. In this context, we have started to assess biological activities of these substances. In the present study, we evaluated the anti-carcinogenic activities of soybean constituent-related compounds, i.e., myo-inositol and tocotrienol, and found that these substances were effective to suppress spontaneous liver carcinogenesis in C3H/He male mice, and also 4-nitroquinoline 1-oxide-initiated, and glycerol-promoted lung tumorigenesis in ddY male mice. *Soy Protein Research, Japan* 1, 129-132, 1998.

Key words : isoflavonoids, genistein, myo-inositol, tocotrienol, anti-carcinogenic activity

大豆に含まれているゲニステインなどのイソフラボノイドが前立腺や乳腺などの発がんを抑制する可能性のあることが示唆されている。そこで本研究においては、ゲニステインを取り上げて、その生物学的活性に関して検討を加えてきた。前年度には、ゲニステインが培養前立腺がん細胞の増殖を抑制することを明らか

にし報告した。その後、ゲニステインは前立腺がん細胞のみならず、その他の腫瘍細胞の増殖も抑制することが明らかとなってきた。さらに、今回、ラット神経芽細胞腫である B104 細胞の増殖を抑制するのみならず、形態学的に分化を誘導することを見出したので、その結果を報告する。

ところで、イソフラボノイドを豊富に含有する大豆胚軸が C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんを抑

*〒 602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル

制することを前年度に報告したが、大豆胚軸にはイソフラボノイド以外にも種々の発がん抑制効果を示す化合物が含まれていることは確実と考えられる。たとえば、食物繊維、イノシトール 6-P (フィチン酸)、トコフェロール およびその関連化合物、プロテアーゼインヒビターなどが、その候補である。したがって、これらの成分とイソフラボノイドとの協同作用によって大豆胚軸の発がん抑制作用が発現しているものと考える必要がある。そこで、イソフラボノイド以外の成分に関して基礎的なデータを収集することは重要な課題となるが、本年度はこの課題への取り組みの一環として、フィチン酸に関して検討を開始した。フィチン酸は豆類や穀類などに豊富に含まれており、大腸がんや乳がんの発生を抑制することが報告されたことから、注目を集めるようになった化合物である。フィチン酸は経口摂取された場合、消化管から吸収される時にイノシトールおよびイノシトール 1-P になり、血液液中に入ることが明らかにされている。したがって、発がん抑制作用を発現しているのは、これらの脱リン酸されたものと考えられている。事実、イノシトールがフィチン酸とほぼ同じ効力で乳がんの発生を抑制することが報告されている¹⁾。このようなデータに基づいて、まずはじめに、イノシトールの肝発がん抑制効力について検討した。また、これまでトコフェロール に関しては多くの研究があるものの、その関連化合物についてはほとんど検討されていないので、本年度はトコトリエノールを取り上げて肝発がん抑制効力を検討した。また、肝臓に加えて、肺の発がんに対するイノシトールおよびトコトリエノールの効果についても検討を加えた。以上の検討結果について報告する。

方 法

実験材料

ゲニステインはフナコシより購入した。イノシトール (myo-inositol) は和光純薬より購入した。4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) およびその他の試薬はナカライテスクより購入した。トコトリエノールはγ-トコトリエノールを主として含む (全体の 30% 以上) サンプルを用いた。

細胞培養

ラット神経芽細胞腫 B104 細胞は、10% FBS を含む RPMI 1640 培養液で維持した。

肝発がん実験

C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんに対するイノシトールの効果を検討した。動物は 7 週齢で購入

し、1 週間馴化させた後、実験に用いた。イノシトールは 1% の濃度になるように飼料中に添加した。またトコトリエノールは 0.05% の濃度になるように飼料中に添加した。実験開始後 40 週目に犠牲死させ、肝臓に発生した腫瘍数を計測した。

肺発がん実験

ddY 雄マウス (6 週齢) を 1 週間馴化させた後、実験に用いた。実験第 1 日目に olive oil : cholesterol (20 : 1) に溶解した 4NQO を一匹当たり 0.3 mg ずつ皮下注射することによって、発がんプロモーションをかけた。その 1 ヶ月後から、グリセロール (10% の濃度になるように飲料水中に添加) によって発がんプロモーションを行った。発がんプロモーション期間は 25 週間とした。イノシトールは 1% の濃度になるように飲料水中に添加して、またトコトリエノールは 0.05% の濃度になるように飼料中に添加してプロモーション段階で投与した。実験第 30 週目に犠牲死させ、肺に発生した腫瘍数を計測した。

結 果

ゲニステインによる分化誘導

ゲニステインはラット神経芽細胞腫 B104 細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、形態学的に分化を誘導することが明らかとなった。また、フローサイトメトリーによって、ゲニステインは B104 細胞の細胞周期を G2/M 期で抑制することが証明された。なお、ゲニステイン添加 48 時間後の mitotic index の解析より細胞周期の抑制点は G2 期あるいは M 期早期であることが示唆された。また、アポトーシスも誘導されることが明らかとなった。すなわち、電気泳動による DNA の分析の結果、ヌクレオソームサイズの DNA フラグメントによる ladder pattern が検出された。

イノシトールおよびトコトリエノールによる肝発がん抑制

Table 1 に示したように、イノシトールおよびトコト

Table 1. Effect of myo-inositol and tocotrienol on spontaneous liver carcinogenesis in C3H/He male mice

Condition	(n)	Tumor-bearing mice (%)	Tumors per mouse
Control	(17)	88 ^a	7.8 ^{b,c}
Myo-inositol	(13)	38 ^a	0.8 ^b
Tocotrienol	(14)	79	1.9 ^c

^aP<0.05, ^bP<0.01, ^cP<0.05

リエノールは肝発がんを有意に抑制することが明らかとなった。すなわち、1%の濃度になるように飲料水中に添加することによってイノシトールを経口投与した群では、マウス一匹当たりの平均肝腫瘍数が、対照群の10%にまで減少（すなわち90%阻害）し、その効果には有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）。また、発生率も対照群で88%、イノシトール投与群で38%であり、有意な抑制がみられた（ $P < 0.05$ ）。トコトリエノールを0.05%の濃度になるように飼料中に添加して経口投与した群においても、マウス一匹当たりの平均肝腫瘍数が、対照群の24%にまで減少（すなわち76%阻害）し、その効果には有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。
イノシトールおよびトコトリエノールによる肺発がん抑制

Table 2に示したように、イノシトールおよびトコトリエノールは肺発がんも有意に抑制することが明らかとなった。すなわち、1%の濃度になるように飲料水中に添加することによってイノシトールを経口投与した群では、マウス一匹当たりの平均肺腫瘍数が、対照群の32%にまで減少（すなわち68%阻害）し、その効果には有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。また、トコトリエノールを0.05%の濃度になるように飼料中に添加して経口投与した群では、マウス一匹当たりの平均肺腫瘍数が、対照群の30%にまで減少（すなわち70%阻害）し、その効果には有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）。

考 察

ゲニステインが細胞の分化およびアポトーシスの両方を誘導する場合があることを明らかにした報告はこれまでに見当たらず、今回の報告が初めてである。

また、今回の実験結果より、大豆胚軸による肝発がんの抑制はイソフラボノイドの効果のみではなく、イノシトールおよびトコフェロール 関連化合物などの効果も加味されて発現されていることが示唆された。今後、さらに他の成分についても評価を加える必要があり、継続して実験を行う計画である。なお、これらの有効成分はイソフラボノイドと共存することによって相乗効果を現わしている可能性もあり、この点についても検討を加えることが重要であろう。

ところで、イノシトールおよびトコトリエノールは肝臓のみならず、肺における発がんプロモーションも

Table 2. Effect of myo-inositol and tocotrienol on two-stage lung carcinogenesis in ddY mice

Condition	(n)	Tumor-bearing mice (%)	Tumors per mouse
Control	(11)	91	3.7 ^{a,b}
Myo-inositol	(11)	73	1.2 ^a
Tocotrienol	(12)	50	1.1 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

抑制することが明らかとなった。したがって、これらの化合物の有用性は高く、さらに詳細な検討を加える価値は十分にある。まずはじめに取り組むべき課題は、これらの化合物の作用機序を解明することである。

イノシトールに関しては、A/Jマウスにおける肺発がんを抑制することが以前に報告されている²⁾が、その効果がプロモーション段階で得られることを示したのは今回の研究が初めてである。

また、トコトリエノールに関しては、肝臓および肺において発がん抑制効果を示すことはこれまで知られておらず、今回の結果は注目すべきものであろう。いずれにしても、豆類や穀物類の中にトコフェロールと共存しているトコトリエノールに関する研究はこれまであまり進んでいないが、今後重点的に検討する価値は十分にあると考えられる。特に抗酸化作用という点では、トコトリエノールはトコフェロールよりも強力であることが明らかにされており、評価すべき化合物であることはまちがいない。

なお、トコトリエノールはわれわれが提唱している「バイオケモプリベンション」の研究対象としても注目している。すなわち、トコフェロールよりも優れた特性を持つトコトリノールを豊富にもつ大豆を、バイオテクノロジーの活用によって作り出す計画を進めているのである。この計画は、いわゆるデザイナーフーズ（新機能性食品）として実用化することを目的としたものであり、今後の重点課題として位置付けている。具体的には、まずはじめにトコフェロールをトコトリエノールに変換する酵素の遺伝子をクローニングする必要がある、それが当面の課題である。いずれにしても、大豆が基本的に多機能な食品であることは明らかであるが、さらに機能を強化した新規の大豆を創り出すことにチャレンジしようとしているわけである。

要 約

大豆に含まれているイソフラボノイドの一つであるゲニステインが、ラット神経芽細胞腫 B104 細胞の形態学的な分化を誘導することを見い出した。さらに、アポトーシスも誘導されることが明らかとなった。イソフラボノイドを豊富に含有する大豆胚軸は C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんを抑制するが、大豆胚軸にはイソフラボノイド以外にも種々の発がん抑制効果を示す化合物が含まれていることは確実と考えられる。たとえば、食物繊維、フィチン酸、トコフェロール およびその関連化合物、プロテアーゼインヒビターなどが、その候補である。今回、フィチン酸が経口摂取された後、消化管から吸収される時に生じるイノシトールおよびトコフェロール の関連化合物であるトコトリエノールが C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんを抑制することを明らかにした。さらに、イノシトールおよびトコトリエノールは肺発がんも有意に抑制することを証明した。

文 献

- 1) Vucenik I, Yang G-Y and Shamsuddin AM (1995): Inositol hexaphosphate and inositol inhibit DMBA-induced rat mammary cancer. *Carcinogenesis*, **16**, 1055-1058.
- 2) Estensen RD and Wattenberg LW (1993): Studies of the chemopreventive effects of myo-inositol on benz [a] pyrene-induced neoplasia of the lung and forestomach of female A/J mice. *Carcinogenesis*, **14**, 1975-1977.