

イソフラボンとトリプシンインヒビターの制がん作用に及ぼす 食事たん白質の影響

王 銘富¹・小松龍史²・詹 吟青¹・翁 玉青³・曹 麗文¹・
呉 青蓮¹・林 正忠⁴・新城澄枝⁵・陳 姿秀²・山本 茂^{*2}

¹ 靜宜大学食物栄養系 ² 徳島大学医学部 ³ 中山医学院栄養系
⁴ 中興大学獣医病理研究所 ⁵ 琉球大学教育学部

Effect of Dietary Protein on Anti-carcinogenesis of Soybean Trypsin Inhibitor and Isoflavone in Rats

Ming-Fu WANG¹, Tatsushi KOMATSU², Yin-Ching CHAN¹, Yue-Ching WONG³,
Li-Wen TSAO¹, Ching-Lein WU¹, Cheng-Chung LIN⁴,
Sumie SHINJO⁵, Tzu-Hsiu CHEN² and Shigeru YAMAMOTO²

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

² School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503

³ Department of Nutrition, Chungshan Medical and Dental College, Taichung, Taiwan

⁴ Graduate Institute of Veterinary Pathology, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan

⁵ College of Education, University of the Ryukyus, Okinawa 902-0213

ABSTRACT

Isoflavone (IF) and trypsin inhibitor (TI) are identified as anti-carcinogenic substances of soybean. We have shown such effects of soybean whey (rich source of TI) in mice and rats. However, when we switched dietary protein from soybean to casein, the effect was not observed. We hypothesized that the effects may be due to the combination of TI and IF and this study was designed to clarify it. IF was supplied by embryo bud (EB, rich source of IF). Five diets with different combination of TI and IF were prepared. They were; Casein diet (TI, 0 U/100 g diet ; IF, 0 mg/100 g diet), SPI diet (TI, 422 ; IF, 55), SPI+TI inactivated SP diet (TI, 310 ; IF, 81), SPI +TI active SP diet (TI, 1310 ; IF, 81), and SPI+TI inactivated SP+EB diet (TI, 290 ; IF, 97). Incidences of the mammary tumor were 95, 75, 80, 55 and 30% in the Casein, SPI, SPI +TI inactivated SP, SPI +TI active SP and SPI +TI inactivated SP+EB group, respectively. The results support our hypothesis that anti-mammary tumor effect was due to the combination of TI and IF. *Soy Protein Research, Japan* 2, 99-105, 1999.

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

*〒 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

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 (TI) であり⁵⁾、我々が観察した各種がんに対するホエイの効果はこれによると考えてきた。ところが我々が食事たん白質源として利用していた分離大豆たん白質 (SPI) を分析したところ、イソフラボン (IF: 2 mg/g) と TI (15.3 U/g) をかなり含んでいることがわかった⁶⁾。大豆の制がん作用を発揮する成分は、TI だけでなく IF も知られており⁷⁻¹⁷⁾。この分析結果は、これまでに観察した制がん効果が、TI によるのか、IF によるのか、それとも両者によるものかが明確でないことを意味している。そこで、この点を明らかにするために、たん白質源を両物質を含む SPI の代わりに、それらを含まないカゼインとし、これをベースに IF を含有する大豆胚軸を加えた EB 食、TI を含有する大豆ホエイを加えた Whey 食およびいずれも含まないコントロール食でマウスの皮膚がんに対する両成分の効果を比較したところ、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、IF 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、次にがんの種類をラットの乳がんモデルに変えて制がん効果を調べた。食事たん白質源はカゼインで統一し、IF を含有する大豆胚軸を加えた大豆胚軸食、TI を含有する大豆ホエイ

を加えたホエイ食およびいずれも含まないコントロール食で 18 週間飼育し、腫瘍発生率、腫瘍個数、平均腫瘍重量などを調べた結果、この研究においても食事群間の違いはなく、両物質の効果を明確にすることはできなかった¹⁹⁾。

この 2 回の実験結果と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 SPI 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。このことは TI または IF 単独の効果ではなく両者の共存が必要であるのかもしれない。

そこで今回は、カゼイン食をコントロールとし、SPI 食に丸大豆や胚軸を組み合わせて TI と IF の含有量を様々に変化させ、これらが化学的に誘発したラットの乳がんモデルに対して、どのように影響を及ぼすかを調べた。

方 法

7 週齢の SD 系雌ラットを用い、カゼイン食群、SPI 食群、SPI + TI 不活性丸大豆食群、SPI + TI 活性丸大豆食群、SPI + TI 不活性丸大豆 + 3% 胚軸食群の 5 種類でそれぞれ 20 匹ずつ 18 週間飼育した。Table 1 に食事組成および食事の中の TI 活性および IF 濃度を示した。コントロール食すなわちカゼイン食はたん白質源にカゼインを用い、他の 4 群はすべて SPI をたん白質源とした。SPI 群はたん白質源を単純に SPI に置き換えた

Table 1. Dietary composition and concentration of trypsin inhibitor and isoflavone

	(/100 g)				
	Casein	SPI	SPI+TI inactivated SP	SPI+TI active SP	SPI+TI inactivated SP+EB
Casein (g)	27.2	0	0	0	0
Soybean protein isolate (SPI) (g)	0	27.6	20.3	20.3	19
Soy powder (SP) (g)	0	0	20	20	20
Embryo bud (EB) (g)	0	0	0	0	3
α -Starch (g)	39.9	39.6	34	34	32.9
Sucrose (g)	19.9	19.8	17	17	16.4
Vitamin mixture (g)	1	1	1	1	1
Mineral mixture (g)	5	5	5	5	5
Cellulose powder (g)	2	2	2	2	2
Soy bean oil (g)	5	5	0.7	0.7	0.7
Trypsin inhibitor (U)	0	422	310	1,310	290
Isoflavone (mg)	0	55	81	81	97

食事で TI を 422 U/100 g, IF を 55 mg/100 g 含む. SPI + TI 不活性丸大豆食群は SPI の一部をオートクレーブにて TI を不活性化化した丸大豆に置き換えた食事で TI を 310 U/100 g, IF を 81 mg/100 g 含む. SPI + TI 活性丸大豆食群は加熱しない丸大豆を SPI + TI 不活性丸大豆食群と同じ量を含み, その結果 TI を特に多く含有し 1,310 U/100 g, IF を 81 mg/100 g 含む. SPI + TI 不活性丸大豆 + 3% 胚軸食群は SPI + TI 不活性丸大豆食群の食事組成の内 SPI の一部を 3% 胚軸を加えて置き換えた食事である. この群では TI は SPI + TI 不活性丸大豆食群とあまり変わらず 290 U/100 g で, IF は 5 群で最も多く 97 mg/100 g となる.

飼料中の TI 活性は benzoylarginine-*p*-nitroanilide hydrochloride 法⁶⁾で, IF 濃度は液クロ変法^{20, 21)}で測定した.

飼育は専用の飼育室を用い室温 25 ± 2℃, 湿度 70% の空調下で行った. 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. 実験食開始 1 週間後に発がん剤 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.

結 果

Table 2 にラットの実験開始時と終了時の体重, 摂食量を示した. 初体重は, 5 群でよく似ていたが, 最終体重はカゼイン群と SPI 群で高く, SPI + TI 不活性

丸大豆群, SPI + TI 活性丸大豆群が前 2 群に比べて有意に低い傾向にあった. さらに SPI + TI 不活性丸大豆群 + 胚軸群が前 4 群に比べて有意に低く 5 群間で最低であった. 摂食量は全群有意差は無いものの, SPI + TI 不活性丸大豆群 + 胚軸群が最も低値を示した.

Fig. 1 に腫瘍を持ったマウスの割合を示した. 腫瘍発生は, カゼイン群 95%, SPI 群 75%, SPI + TI 不活性丸大豆群 80%, SPI + TI 活性丸大豆群 55%, SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群 30% と後 2 群が特に低下する傾向が見られた.

Fig. 2 に腫瘍の発生したラット 1 匹あたりの腫瘍個数を示した. SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群がカゼイン群に比べ有意に少ない傾向が見られ, 他の 3 群と比べても有意ではないが, かなり低値を示した.

Fig. 3 に腫瘍をもったラット 1 匹あたりの平均腫瘍重量を示した. 有意差はないものの SPI 群が重くなる傾向が観察された.

考 察

化学的に誘発したラットの乳がんに対する TI と IF の共存効果を検討した. この結果, TI と IF を共に含まないカゼイン群と比較して SPI + TI 活性丸大豆群と SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群が有意に発がん率が低値を示した. その内, SPI + TI 活性丸大豆群は 1310 U/100 g と最も TI 活性が高いが, 昨年報告したカゼインベースにホエイを加えて TI 活性を 1,440 U/100 g にした場合には全く制がん効果が得られなかった¹⁹⁾. 今回は IF が 81 mg/100 g 共存し, これに対し前回は 0.5

Table 2. Comparisons of body weight, food intake and food efficiency of rats fed five different diets for 18 weeks^{1, 2}

Diet ⁴	Initial weight	Final weight	Food intake	Food efficiency ratio ³
	g	g	g/day	
Casein	181.4 ± 4.3	378.4 ± 9.8 ^a	28.9 ± 0.5	5.6 ± 0.2 ^a
SPI	180.8 ± 4.3	396.2 ± 10.0 ^a	28.6 ± 0.3	6.0 ± 0.3 ^a
SPI+TI inactivated SP	180.7 ± 4.4	350.5 ± 7.3 ^b	28.0 ± 0.5	4.8 ± 0.1 ^b
SPI+TI active SP	181.0 ± 4.4	339.7 ± 7.7 ^b	28.6 ± 0.4	4.4 ± 0.2 ^b
SPI+TI inactivated SP+EB	179.8 ± 4.4	305.9 ± 7.4 ^c	27.8 ± 0.6	3.6 ± 0.2 ^c

¹ Each value represents mean ± SEM of 20 rats.

² Values with different letters in the same vertical column indicate significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

³ Food efficiency ratio = weight gain (g/day)/food intake (g/day) × 100.

⁴ SPI, soybean protein isolate; SP, soy powder; EB, embryo bud; TI, trypsin inhibitor; IF, isoflavone.

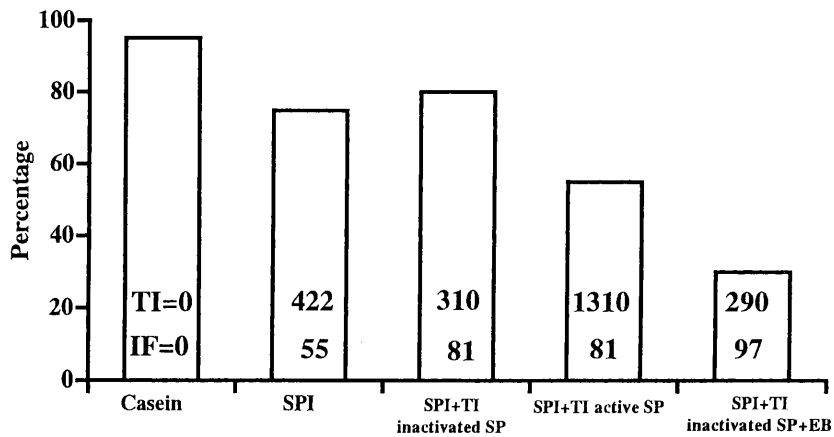


Fig. 1. Incidences of the mammary tumor in the Casein, SPI, SPI + TI inactivated SP, SPI + TI active SP and SPI + TI inactivated SP + EB groups for 18 weeks. Rat number of each group was 20. Values in each column show trypsin inhibitor (unit/100 g diet) and isoflavone (mg/100 g diet). SPI, soybean protein isolate ; SP, soy powder ; EB, embryo bud ; TI, trypsin inhibitor ; IF, isoflavone. Statistical difference was observed by chi-square test ($P < 0.05$).

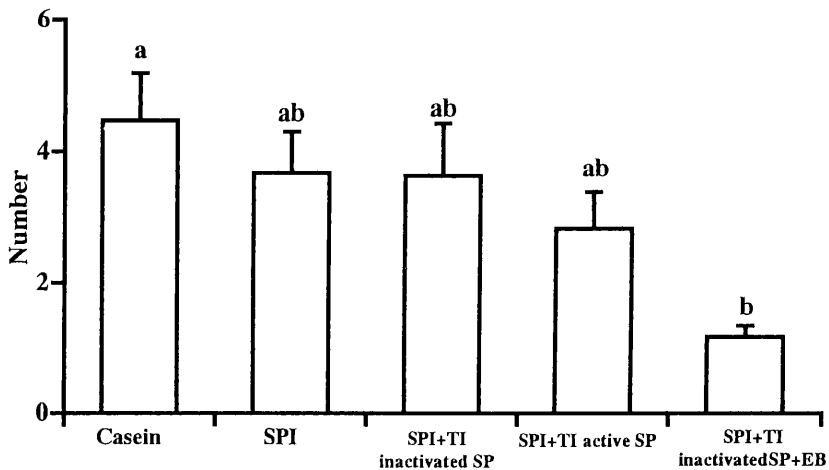


Fig. 2. Average tumor number in tumor-bearing rats fed casein ($n=19$), SPI ($n=15$), SPI + TI inactivated SP ($n=16$), SPI + TI active SP ($n=11$) or SPI + TI inactivated SP + EB ($n=6$) for 18 weeks. SPI, soybean protein isolate; SP, soy powder; EB, embryo bud ; TI, trypsin inhibitor ; IF, isoflavone. Values are mean $\pm$ SEM. Bars with different letters indicate significant difference by Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

mg/100 g とほとんど IF が含まれず TI のみであったことが異なる。このことは TI のみでは十分な効果が得られず IF の存在が必要であることを示唆している。また IF 含有量が共に 81 mg/100 g の SPI + TI 不活性丸大豆群と SPI + TI 活性丸大豆群で発がん率が、それぞれ

80% および 55% と有意ではないが後者が低い傾向であった。この場合 TI 活性が前者では 310 U/100 g に対し、後者では 1,310 U/100 g と高く、制がん効果の差はこれによるものと考えられた。これらのことは、IF と TI がある程度のレベルで共存していることが制がん

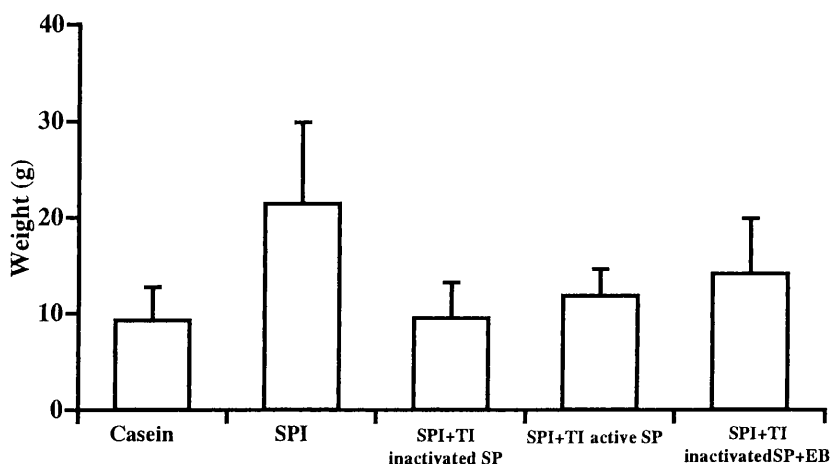


Fig. 3. Average tumor weight in tumor-bearing rats fed casein (n=19), SPI (n=15), SPI + TI inactivated SP (n=16), SPI + TI active SP (n=11) or SPI + TI inactivated SP + EB (n=6) for 18 weeks. SPI, soybean protein isolate; SP, soy powder; EB, embryo bud; TI, trypsin inhibitor; IF, isoflavone. Values are mean $\pm$ SEM. Statistical difference was not observed by Duncan's multiple range test ($P > 0.05$).

効果を発揮させていることを示唆している。

一方、SPI + TI 不活性丸大豆群と SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群では発がん率は、それぞれ 80% と 30% で、前者の制がん効果が有意に高かった。これらの食事の TI と IF の含有量は前者が 310 U/100 g と 81 mg/100 g、後者が 290 U/100 g と 97 mg/100 g で、後者の IF 含有量が 20% ほど高いものの、両成分の含有量に大きな違いがあるとは言いがたい。それにもかかわらず、このように大きく制がん効果に差が見られたことは両物質の含有量だけでは説明が付きにくい。考えられる理由としては後者の摂食量がやや低く体重増加量が最も低値であったためにがんの発生を抑制した可能性と未知の物質が関与して後者の制がん効果を高めた可能性である。

摂食量は最も制がん作用を示した SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群は 27.8 g/day で他群に比べ有意差はないが、やや低い傾向にあった。その結果、この群の最終体重は他群よりも有意に低かった。このことは SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群での成長抑制が制がん効果を高めた可能性を否定できない。今回、発がん率の他、腫瘍を発症したラットの平均腫瘍数を観察した。これによると、カゼイン群に比べて SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群のみが有意に低い腫瘍発生数を示した。他群と比べても有意ではないが最も少ない発生数であった。これに対し平均腫瘍体積で見ると、各群多少のばらつ

きがあるもののほとんど差が見られなかった。このことは今回観察された制がん効果は発がん抑制であり、がん細胞の増殖への効果ではなさそうである。しかし、これまでに報告されている成長抑制をおこすような食事条件での制がんメカニズムは、がん細胞の増殖抑制で²²⁻²⁴⁾、今回の結果とは異なっており、今後の検討が必要である。

一方、SPI + TI 不活性丸大豆 + 胚軸群の制がん効果が高かったもう一つの仮説として、TI と IF 以外の物質の共存が考えられる。この実験食は、胚軸を 3% 含んでいる。大豆胚軸には 2% にもおよぶサポニンが含まれており、サポニンによる制がん作用も報告されている^{25, 26)}。この他にも大豆胚軸には様々な成分が含まれており、これらの中で制がん作用を持つ物質も少なくない。TI と IF 以外にサポニンを含めていくつかの成分が発がんのプロモーションの様々な段階で作用している可能性は十分考えられる。

今後は体重や栄養状態が一定な条件下で制がん効果の確認を行うと共に、大豆に含まれる他の物質も視野に入れて大豆の制がん効果について検討する必要がある。

要 約

我々は化学的に誘発された皮膚がんマウスと肝がんラットに対する大豆ホエイ（トリプシンインヒビター（TI）を豊富に含有）の抗がん効果を示してきた。しかし大豆からカゼインに食事たん白質を切り換えると、皮膚がんマウスに対する大豆ホエイの効果や乳がんラットに対する大豆胚芽（イソフラボン（IF）を豊富に含有）の効果を観測することができなかった。今回の研究では、この原因を探るために化学誘発乳がんラットを用い TI と IF を様々な割合に含んだ実験食を調製して抗がん効果を検討した。7 週齢の SD 系雌ラットを用い、カゼイン食群（TI：0 U/100 g diet, IF：0 mg/100 g diet）、SPI 食群（TI：422, IF：55）、SPI + TI 不活性丸大豆食群（TI：310, IF：81）、SPI + TI 活性丸大豆食群（TI：1,310, IF：81）、SPI + TI 不活性丸大豆 + 3% 胚軸食群（TI：290, IF：97）の 5 種類でそれぞれ 20 匹ずつ 18 週間飼育した。乳がん発生率はカゼイン食群で 95%、SPI 食群で 75%、SPI + TI 不活性丸大豆食群で 80%、SPI + TI 活性丸大豆食群で 55%、SPI + TI 不活性丸大豆 + 3% EB 群で 30% であった。体重増加は乳がん発生率が最低値であった SPI + TI inactivated SP + EB 群で最も低く、飼料効率も低かった。今回の研究から、大豆の乳がん抑制は、TI と IF の共存あるいは別の化合物であることが示唆された。

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誌, **17**, 84-88.
- 5) 荒井総一 (1984) : 大豆—そのタンパク質の特性を中心に。米・大豆と魚。藤澤正生・井上五郎・田中武彦責任編集, 光生館, 東京, pp. 112-113.
- 6) 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.
- 7) Liener IR (1962) : Toxic factors in edible legumes and their elimination. *Am J Clin Nutr*, **11**, 281-298.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Birnboim HC (1982) : DNA strand breaks in human leukocytes exposed to a tumor promoter, phorbol myristate acetate. *Science*, **215**, 1247-1249.
- 11) 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.
- 12) Yavelow J, Finalay TH, Kennedy AR and Troll W (1983) : Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res*, **43**, 2454s-2459s.
- 13) 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.
- 14) Hendrich S, Lee KW, Xu X, Wang HJ and Murphy PA (1994) : Defining food components as new nutrients.

- J Nutr*, **124**, 1789s-1792s.
- 15) 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.
 - 16) Steele VE, Pereira MA, Sigman CC and Kelloff GJ (1995): Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nutr*, **125**, 713S-717S.
 - 17) 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.
 - 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) 王 銘富, 曹 麗文, 詹 吟青, 王 順成, 廖俊旺, 鍾 淑英, 翁 玉青, 新城澄枝, 高松清治, 山本孝史, 山本 茂 (1998): 化学発がん剤で誘発されたラット乳がんに対する大豆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. 大豆たん白質研究, **1**, 117-123.
 - 20) 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.
 - 21) Coward L, Barnes LC, 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.
 - 22) Zhu Z, Jiang W and Thompson HJ (1999): Effect of energy restriction on the expression of cyclin D1 and p27 during premalignant and malignant stages of chemically induced mammary carcinogenesis. *Mol Carcinog*, **24**, 241-245.
 - 23) Komatsu H, Nishihira T, Chin M, Doi H, Shineha R, Mori S and Satomi S (1997): Effects of caloric intake on anticancer therapy in rats with valine-depleted amino acid imbalance. *Nutr Cancer*, **28**, 107-112.
 - 24) Torosian MH (1995): Effect of protein intake on tumor growth and cell cycle kinetics. *J Surg Res*, **59**, 225-228.
 - 25) 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.
 - 26) 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.