

かき肉エキス給餌による1,-2ジメチルヒドラジン誘発マウス 大腸前ガン病変の予防効果

細見 亮太¹⁾, 松田 芳和²⁾, 石丸 綾子¹⁾, 福永 健治¹⁾, 吉田 宗弘^{1,3)}

(¹⁾関西大学工学部食品工学研究室*, (²⁾日本クリニック株式会社中央研究所**,

³⁾関西大学ハイテクノロジーリサーチセンター***)

Preventive Effects of Dietary Oyster Extract on the Development of 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Colonic Aberrant Crypt Foci in Mice.

Ryota HOSOMI¹⁾, Yoshikazu MATSUDA²⁾, Ayako ISHIMARU¹⁾, Kenji FUKUNAGA^{†1)} and Munehiro YOSHIDA^{1,3)}

¹⁾*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kansai University*

²⁾*Central Research Institute, Japan Clinic Co., Ltd*

³⁾*High Technology Research Center, Kansai University*

Summary

During the past twenty years, many studies have been conducted to evaluate the effect of oyster extract on various life-style related diseases. The present study was designed to evaluate the preventive effects of oyster extract on the formation of chemically induced colonic aberrant crypt foci (ACF). At 6 weeks of age, mice fed an AIN93G modified diet containing oyster extract (0.2, 1.0 and 5.0 %) were given DMH (25 mg/kg body wt) once weekly for 6 weeks. The number of ACF was evaluated in the 0.1 % methylene blue stained colon. ACF was scored under a light microscope with 40 times magnification to transilluminate the colon. ACF were distinguished from normal crypts by their large size and elliptical shape. The mice fed the oyster extract diet showed decreased colonic total ACF and with a multiplicity of 4+ aberrant crypts compared with control. It is considered that the intake of oyster extract caused effectively detoxication of DMH because a few decrease rate of body weight and mortality. As feeding dosage of oyster extract, the development of ACF was inhibited effectively. Further, ACF multiplication more than 4+ aberrant crypts was inhibited. These results suggest that dietary oyster extract showed promise in colon cancer prevention by reducing the ACF formation. However, clear evidence of cancer prevention was not obtained in the present study.

我が国における3大死因は悪性新生物, 心疾患, 脳血管疾患の順であり, 1981年以降悪性新生物が死因の1位である。なかでも大腸ガンの罹患率, 死亡率は漸増し, 年間の罹患数が1990年には6万人, 現在は10万人を超え, 危険性が高い疾患といえる。これは, 欧米型の食生活や運動不足など生活習慣の変化と符合する。一方で, 大腸ガン予防因子として, 食物繊維や野菜摂取の有効性が提唱されてきたが, 厚生労働省研究班報告(2005年9月13日)では, 推奨量以上の摂取による予防効果を疑問視する疫学調査結果が示されている。大腸ガン予防効果を期待して, 魚介類に特徴的なn-3

† To whom correspondence and reprint requests should be addressed. E-mail: fukunagk@ipcku.kansai-u.ac.jp

*所在地: 大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

**所在地: 京都市右京区太秦開日町10-1 (〒616-8555)

***所在地: 大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

系高度不飽和脂肪酸や野菜に含まれるさまざまな食品成分の抗ガン活性が検討されている。一方、かき肉エキスは様々な健康維持・増進機能が確認されているが^{1, 2)}、大腸ガン予防効果を検討した例はない。そこで、本研究では実験動物としてマウスを用い、ヒトにおいても前ガン病変の生物学的指標として臨床応用が進んでいる大腸粘膜に見られる異型腺窩巢 (aberrant crypt foci; ACF) の発生抑制効果を指標にかき肉エキスの大腸ガン発生予防効果を検討した。

かき肉エキス給餌量が多いほど、総ACF数およびガンに発展する可能性が高い4Crypts以上のACFが抑制され、実験期間中の死亡も少なかった。本実験では作用機序解明には至ってないが、大腸ガン発生過程における予防効果は十分期待できるものと考えられる。

実験方法

1. 餌料および試薬

餌料調製に用いた α -トウモロコシ澱粉、 β -トウモロコシ澱粉、ミルクカゼイン、ショ糖、セルロース粉末、ミネラル混合、ビタミン混合はオリエンタル酵母工業株式会社、L-シスチンはシグマアルドリッチジャパン株式会社、重酒石酸コリン、大豆油は和光純薬工業株式会社から購入した。中性緩衝10%ホルマリン溶液、メチレンブルーは和光純薬工業株式会社、1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) は東京化成工業株式会社から購入した。かき肉エキス粉末は、日本クリニック株式会社から供与されたものを用いた。

2. 動物実験

被験動物はA/Jマウスを用いた。実験群は、対照群、0.2%、1%および5%群の4群を設定した。1週間の対照群用餌料 (AIN93G) 給餌による予備飼育後、無作為に4群 (1群n = 10) に分割した。試験群にはAIN93Gに対してかき肉エキス粉末を0.2%、1%および5% (w/v) 混合した。飼育期間中、水および試験餌料は自由摂取とした。また、飼育期間中週1回、大腸ガン化学誘発物質であるDMH³⁾ を背部皮下に投与 (15 mg/kg) し、体重測定を行った。飼育開始1週から2週の間に対照群では4匹、0.2%群では3匹、1%群では2匹が死亡したため、その後、対照群n = 6、0.2%群n = 7、1%群n = 8として実験を続けた。試験餌料給餌開始6週後、エーテル麻酔下で大腸を摘出、切開し、生理食塩水で洗浄後に中性緩衝10%ホルマリン溶液で24時間固定した。次いで0.02%メチレンブルーで3分間染色し、実体顕微鏡 (×40) でACF数を計測し、ACFあたりの異型腺窩Crypt数1個、2個、3個、4個以上に分類した。

結 果

Fig. 1に本飼育期間中の各群の体重変化を示した。飼育開始1週間から2週間の間10%~15%の体重の減少が観察されたが、その後体重は増加に転じた。かき肉エキス含量の高い給餌群ほど体重の減少は軽微であった。また、飼育開始1週から2週の間に対照群では4匹、0.2%群では3匹、1%群では2匹の死亡が確認された。かき肉エキス含量の高い給餌群ほど死亡数が少なかった。5%群では体重の減少も少なく、死亡もみられなかった。Fig. 2にはメチレンブルーで顕微鏡化した2cryptsおよび4crypts以上のACFの実体顕微鏡画像を示した。

Table 1にはマウス1匹あたりの総ACFおよびAFCをCrypt数毎に分類して示した。総ACFは、0.2%群および5%群で有意に少なかった。1%群では、有意差はなかったものの少ない傾向にあった。また、ACFごとのCrypt数はかき肉エキス含量の高い給餌群ほど少なかった。

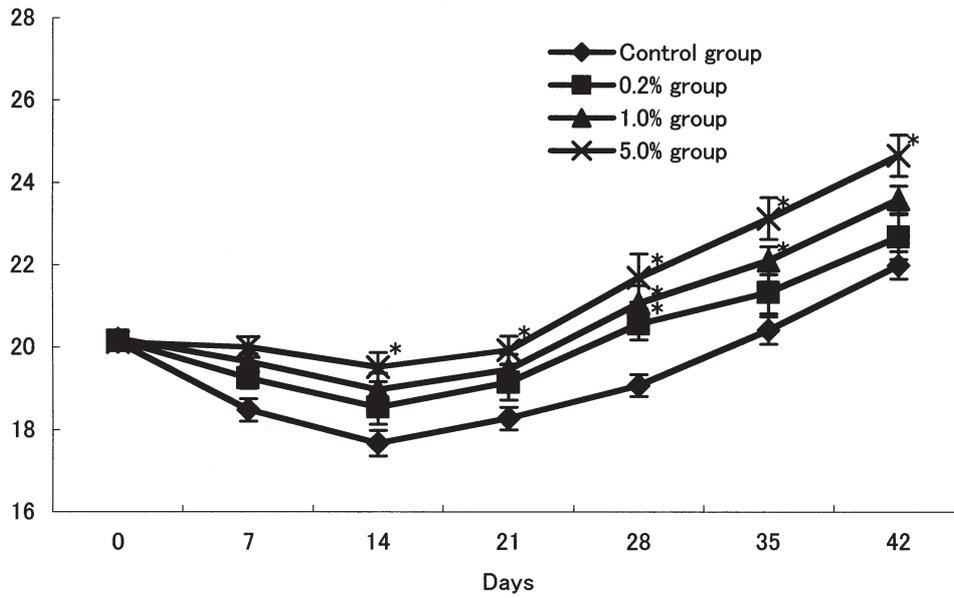


Fig. 1 Changes in body weight of mice.
Data are means \pm SEM. *Significantly different from Control group at $p < 0.05$.
Experimental status is represented in the text.

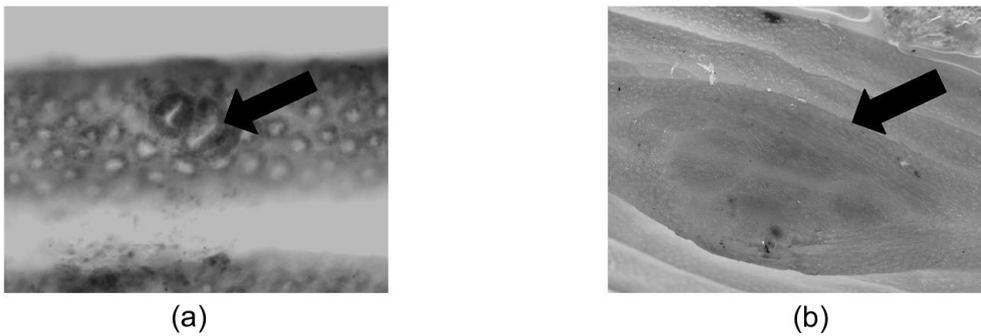


Fig. 2 Magnifying view of a colonic aberrant crypt foci in mice.
(a) ACF of 2crypts, (b) ACF more than 4crypts.

Table 1 Effect of dietary oyster extract on ACF formation in mice colon

	Control	0.2 % group	1.0 % group	5.0 % group
ACF-1 Crypt	3.0 \pm 0.4	1.8 \pm 0.6	2.4 \pm 1.1	1.3 \pm 0.4 *
ACF-2 Crypts	1.3 \pm 0.6	0.6 \pm 0.3	1.4 \pm 0.3	0.5 \pm 0.3
ACF-3 Crypts	1.5 \pm 0.6	0.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.4	0.4 \pm 0.2 *
ACF-4+ Crypts	10.5 \pm 0.3	6.8 \pm 0.6 *	6.9 \pm 0.6 *	3.0 \pm 0.6 *
ACF Total	16.3 \pm 1.4	9.8 \pm 2.2 *	12.0 \pm 1.0	5.2 \pm 0.8 *

Data are means \pm SEM per mouse. Control (n = 6), 0.2 % (n = 7), 1.0 % (n = 8), 5.0 % (n = 10).
*Significantly different from Control group at $p < 0.05$.

考 察

カキ肉エキス給餌量が多いほど飼育期間中の体重減少と死亡数が少ないことから、DMHによる急性毒性発現の抑制作用、すなわち肝臓におけるDMHの解毒の促進が考えられる。また、ACFの発生個数については、かき肉エキス給餌によってTotal ACF数の減少がみられ、5%群ではガンに進展する可能性の高いACFすなわちCrypt4以上のACF⁴⁾が顕著に抑制されていた。ACFはヒトにおいても大腸正常粘膜から顕性ガンへと他段階発ガンしていく過程で出現することがわかっている⁵⁾。本研究ではDMH投与期間に平行してかき肉エキスを給餌したため、前述のようにかき肉エキスのDMH解毒作用によってACF発生を抑制していることも考えられるが、Crypt4以上のACF発生が抑制されていることから、腺腫、腺ガンに進展する可能性が高い病変の発生抑制も期待出来る。

大腸ガン予防が期待出来る薬剤や食品成分として、非ステロイド性消炎鎮痛剤 (NSAIDs)、ビタミンD、葉酸、カルシウムなどの報告がある⁶⁾。このうちガン抑制機序が明らかにされているのは、NSAIDsのシクロオキシゲナーゼ-2選択的阻害作用⁷⁾ およびビタミンDのP450(CYP)3A発現誘導を介した腸管内リトコール酸の解毒作用⁸⁾ であるが、葉酸やカルシウムをはじめ大腸ガン抑制効果が期待されている多くの成分については作用機序は不明である。かき肉エキスあるいは類似物質での検討はこれまでにないことから、新規タイプの前ガン病変抑制すなわち大腸ガンの予防成分として期待できる。今後、ガン抑制機序解明に向けてさらに検討を続けたい。

本研究は、平成18年度関西大学学術研究助成基金(共同研究)研究課題「水産廃棄物に含有される機能性食品成分の有効利用に関する研究」を対象とする研究助成金によって得られた成果として公表するものである。

参考文献

- 1) 糖尿病患者における血小板凝集能と、血中ミネラル・核酸関連物質の変動におよぼすかき肉エキスの影響 (1992) 松田芳和, 出田祐久, 藤田忠義, 村田道代, 土井悦四郎, 太田隆男, 中塚正博, 石津弘き, 坪内凉子, 柴田幸男, 微量栄養素研究 9: 67-74.
- 2) カキ (*Crassostrea gigas*) 熱水抽出物のガン細胞増殖抑制作用および抗腫瘍作用の検討 (1998) 松田芳和, 高谷英子, 山口雅子, 太田隆男, 真部真理子, 河村幸雄, 広石伸互, 柴田幸雄, 微量栄養素研究 15: 121-128.
- 3) McLellan E, Bird RP. Effect of disulfiram on 1,2-dimethylhydrazine- and azoxymethane-induced aberrant crypt foci. *Carcinogenesis*. 1991; 12(6): 969-72.
- 4) Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med*. 1998; 339(18): 1277-84.
- 5) Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, Stellato TA. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res*. 1991; 51(5): 1564-7.
- 6) 高山哲治, 新津洋司郎. 大腸ガンにおける化学予防. *G. I. Research* 2004; 12(1): 41-48.
- 7) Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, Wallace MH, Hawk E, Gordon GB, Wakabayashi N, Saunders B, Shen Y, Fujimura T, Su LK, Levin B. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 2000; 342(26): 1946-52.
- 8) Martinez ME, Giovannucci EL, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Speizer FE, Wing A, Willett WC. Calcium, vitamin D, and the occurrence of colorectal cancer among women. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(19): 1375-82.