

Ⅲ 研究事業報告

〔発癌抑制に及ぼす影響評価〕

(1) ルバーブ及び桑葉の変異原性及び抗変異原性に関する検討

大森 清美 (衛生研究所)
 岸 美智子 (衛生研究所)
 成松 次郎 (農業総合研究所)
 鈴木 誠 (蚕業センター)
 高橋 恭一 (蚕業センター)
 有賀 勲 (蚕業センター)

本共同研究の素材であるルバーブ及び桑葉について、食品としての安全性を確認する目的での変異原性の検討、また、食品のもつ機能性を評価する目的での抗変異原性の検討を行った。

ルバーブ茎の乾燥粉末をn-ヘキサン、ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸エチル及びn-ブタノールで順次振とう抽出することにより得られた各種エキスについて、Salmonella typhimurium TA株を用いて変異原性を検討した結果、TA1537、S 9 Mix存在下において、各エキスとも変異原性陽性であった。ルバーブの抗変異原性に関する検討では、メタノール抽出エキスのエーテル可溶性画分についてB(a)P、Trp-P-1、IQ及びAF-2の変異原性に対する抑制作用を検討した結果、芳香族アミノ化合物であるTrp-P-1及びIQに対する変異原性抑制効果が顕著であった。また、上記の5種有機溶媒による抽出エキスのいずれもが、IQの変異原性を抑制した。

桑葉乾燥粉末の熱メタノール抽出エキスのエーテル可溶性画分について、ルバーブと同様に変異原性を検討した結果、桑葉乾燥重量1g相当においても変異原性は認められなかった。桑葉の抗変異原性に関する検討では、エーテル可溶性画分がB(a)P及びIQの変異原性を顕著に抑制した。

1 はじめに

癌は、我が国における疾病による死亡原因の首位を占めている。発癌のメカニズムは、近年ではイニシエーション、プロモーションの二段階説、さらにプログレッションが加わった三段階説等が唱えられているが、それらにおいて、変異原性物質はイニシエーターとして発癌に関与しており、環境中及び食品中にもいくつかの変異原性化合物が確認されている。食品中の変異原性物質には、植物そのものが作り出す天然化学物質、例えばワラビのブタキロサイト等の他に、B(a)P、Trp-P-1、Trp-P-2、Glu-P-1、Glu-P-2、IQ及びMeIQ等のように、日常の食物中に含まれている炭水化物、アミノ酸等の有機化合物が加熱されることにより生成する変異原性物質もある。一方、食品中にはビタミン類¹⁾やタンニン類²⁾、フラボノイド類³⁾など、変異原性抑制作用を有する物質も存在する事が報告されている。従って、食品の安全性を確認する上での変異原性の検討、また食品のもつ機能性評価としての抗変異原性の検討は、我々の健康維持にとってたいへん意義深いことと思われる。

本研究の素材の一つであるルバーブは、食用大黄とも呼ばれている生薬大黄と同属の植物であり、欧米ではサ

ラダとして生で食べられている他、ジャム等にも加工されている。桑葉は、一部地域では昔から食用とされているが、一般に葉は養蚕の飼料として用いられる他、根皮は生薬(桑白皮)とされている。

これらルバーブ及び桑葉について、Salmonella typhimurium TA株を用いた微生物変異原性試験法(Ames法)により、安全性としての変異原性及び有用性としての抗変異原性について検討を行った。

2 方法

2.1 試料液の調製

1) ルバーブ

ルバーブ(1990産)茎部の乾燥粉末200gにメタノール1ℓで3回超音波抽出し、ろ過後、ろ液のメタノールを減圧留去しルバーブ抽出エキスM(メタノール)とした。さらにルバーブ抽出エキスMを水及びジエチルエーテルで分配抽出し、各抽出溶媒を減圧留去することにより、ルバーブ抽出エキスM-W(メタノール-水)及びM-E(メタノール-エーテル)とした。

また、ルバーブ乾燥粉末20gをn-ヘキサン、ジエチルエーテル、クロロホルム、酢酸エチル、n-ブタノール

及び水で、順次各320mlで3回ずつ30分間の振とう抽出及び遠心分離により各種上澄液を集め、溶媒を減圧留去し、ルバーブ抽出エキスH (n-ヘキサン)、E (ジエチルエーテル)、C (クロロホルム)、A (酢酸エチル)、B (n-ブタノール) 及びW (水) とした。

これら8種のルバーブ抽出エキスのうちM-E、H、E、C、A及びBについてはジメチルスルホキシド (以後DMSOとする) に溶解し、また、M-W及びWについては滅菌水に溶解して試料溶液とした。

2) 桑葉

乾燥桑葉100gを熱メタノール3ℓで抽出し、ろ過後、ろ液のメタノールを減圧留去し、桑葉抽出エキスMとした。さらに、桑葉抽出エキスMを水及びジエチルエーテルで分配抽出し、各抽出溶媒を減圧留去することにより、桑葉抽出エキスM-W (メタノール-水) 及びM-E (メタノール-エーテル) とした。

これら桑葉抽出エキスのうちM-EについてはDMSOに溶解し、M-Wについては滅菌水に溶解して試料溶液とした。

2.2 変異原性試験

各抽出画分の変異原性試験は、Ames法⁴⁾にしたがい以下の条件で行った。

Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA97及びTA1537はニュートリエントブロス Na₂ 培地溶液中、37℃で16時間培養を行った。

肝薬物代謝酵素による代謝活性化に用いるラット肝ホモジネート (9,000×g上清) は、フェノバルビタール及び5,6-ベンゾフラボンにより誘導されたキッコマン株式会社製のS9を使用した。また、コファクターは、オリエンタル酵母工業株式会社のCofactor I (S9 Mix用) を使用した。

各種菌株の一夜培養菌懸濁液0.1ml、リン酸緩衝液 (pH7.8) 0.5ml及び試料溶液100μℓを混合し、37℃で20分間ブレインキューベーション後、最小グルコース寒天培地上に重層した (-S9 Mix)。同様にリン酸緩衝液の代わりに、S9及びコファクターの混合液 (S9 Mix) を加える事により、肝薬物代謝酵素による代謝活性化を行った (+S9 Mix)。重層後、37℃で48時間培養を行った。

2.3 抗変異原性試験

Salmonella typhimurium TA98及びTA100はニュートリエントブロス Na₂ 培地溶液中、37℃で16時間培養を行った。

S9及びコファクターは3)と同様。

各種菌株の一夜培養菌懸濁液0.1ml、S9 Mix (もしくはリン酸緩衝液) 0.5ml、変異原性陽性化合物溶液100μ

ℓ及び各濃度段階の試料溶液100μℓ (Controlは滅菌水又はDMSOを100μℓ) を混合し、37℃で20分間ブレインキューベーション後、最小グルコース寒天培地上に重層した。

重層後、37℃で48時間培養を行った。

変異原性陽性化合物と使用菌株を次に示す。

B(a)P; TA100 (+S9 Mix)

Trp-P-1; TA98 (+S9 Mix)

IQ; TA98 (+S9 Mix)

AF-2; TA98 (-S9 Mix)

各濃度段階の試料溶液が試験菌株の生存数に与える影響は、有元らの方法⁵⁾にしたがい、Control (滅菌水又はDMSO) での生存率を1として示した。

3 結果及び考察

3.1 ルバーブの変異原性及び抗変異原性

3.1.1 ルバーブの変異原性

ルバーブ抽出エキスM-E及びM-Wについて、Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA97及びTA1537において-S9 Mix及び+S9 Mixで変異原性試験を行った。M-Wは殺菌性のため試験を行うことができなかったが、M-EについてはTA98、TA100及びTA97では変異原性は認められなかった。TA1537においては、-S9 Mixでは変異原性陰性であったが、+S9 Mixでは疑陽性であった。そこで、さらにルバーブさらに細かく分画抽出した抽出エキスH、E、C、A及びBについてTA1537 (+S9 Mix) において変異原性を調べた結果、H及びEでは明らかな変異原性陽性を示し、抽出エキスC、A、及びBではわずかに陽性であった。

3.1.2 ルバーブの抗変異原性

加熱食品中で生成され、強力な変異原性化合物かつ発癌性物質として知られるB(a)P、Trp-P-1及びIQ、かつて食品添加物として用いられていたAF-2の変異原性に対するルバーブ抽出エキスM-Eの変異原性抑制効果について検討した (図1、図2及び図3)。その結果、B(a)P、Trp-P-1及びIQに対しての変異原性抑制を認め、特にTrp-P-1やIQ等の芳香族アミンに対しては、顕著な変異原性抑制効果を認めた。しかし、AF-2に対する変異原性抑制効果は微弱であった。このことから、抽出エキスM-Eの変異原性抑制メカニズムとして、チトクロームP-450系の抑制が関与している可能性が示唆された。

そして、抽出エキスH、E、C、A及びBについてもIQの変異原性に対する抑制効果を検討した結果、いずれの画分においても変異原性抑制作用が認められ、抽出エキスE、H及びBでは抑制は比較的強い結果であった

(図4)。

さらに、抗変異原性活性物質について検討した結果、エモジン、フィシオンがTrp-P-1及びIQの変異原性を抑制する事が確認された(図5及び図6)。抽出エキスM-E及びM-E中のアントラキノン構成量による試料溶

液について、IQに対する変異原性抑制作用を比較した結果、抽出エキスM-Eはアントラキノン構成量による試料溶液よりも抑制作用は強く、エーテル画分エキスには遊離型アントラキノン類の他にも変異原性抑制物質が存在することが示唆された(図7)。

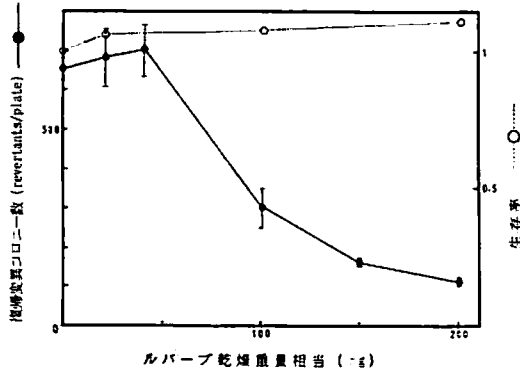


図1 ルバーブ抽出エキスM-EによるB(a)Pへの
変異原性抑制効果 (TA100, + S 9 Mix)

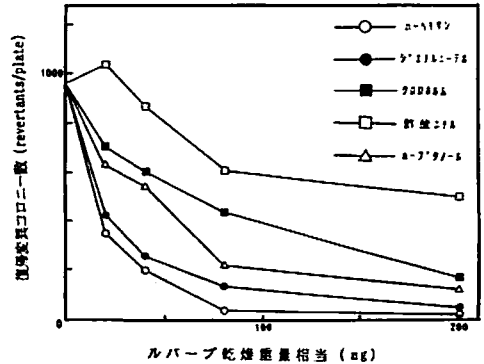


図4 ルバーブ各種抽出エキスによるIQへの
変異原性抑制効果 (TA98, + S 9 Mix)

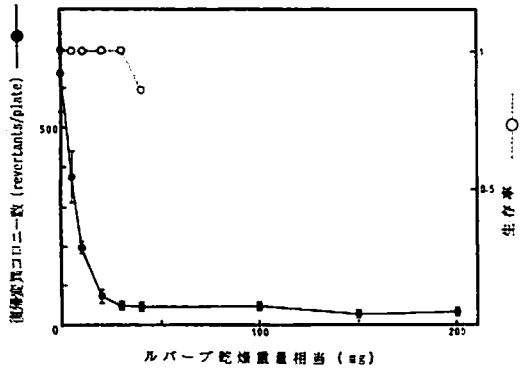


図2 ルバーブ抽出エキスM-EによるTrp-P-1への
変異原性抑制効果 (TA98, + S 9 Mix)

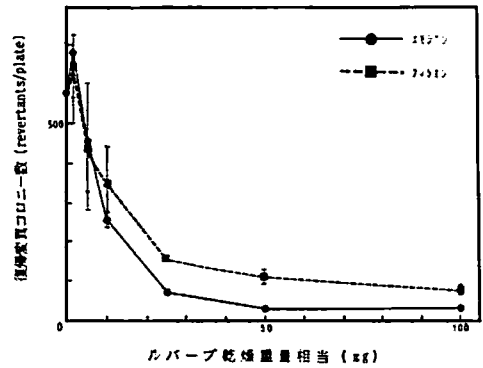


図5 エモジン及びフィシオンによるTrp-P-1への
変異原性抑制効果 (TA98, + S 9 Mix)

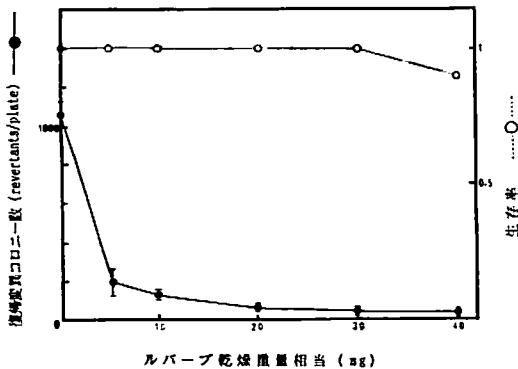


図3 ルバーブ抽出エキスM-EによるIQへの
変異原性抑制効果 (TA98, + S 9 Mix)

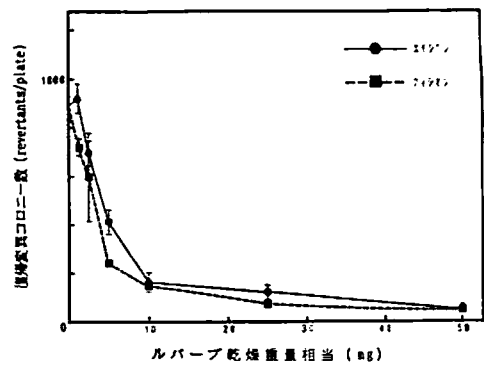


図6 エモジン及びフィシオンによるIQへの
変異原性抑制効果 (TA98, + S 9 Mix)

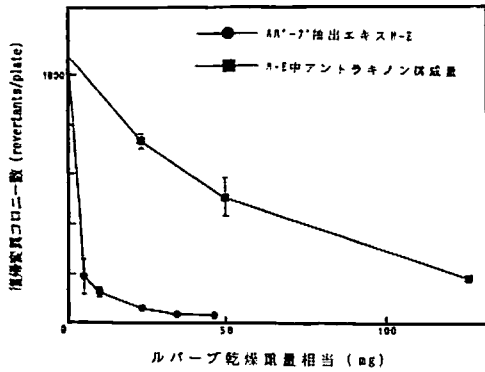


図7 ルバーブ抽出エキスM-E及びM-W中アントラキノン構成量によるIQへの変異原性抑制効果 (TA98, + S 9 Mix)

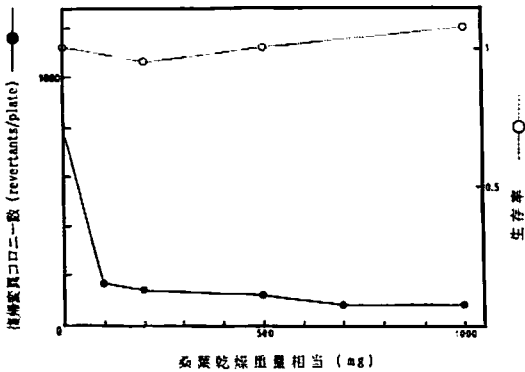


図8 桑葉抽出エキスM-EによるB(a)Pへの変異原性抑制効果 (TA100, + S 9 Mix)

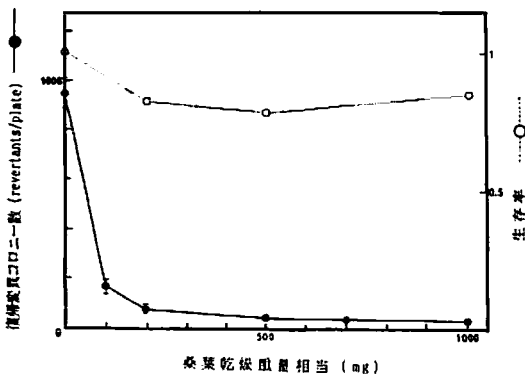


図9 桑葉抽出エキスM-EによるIQへの変異原性抑制効果 (TA98, + S 9 Mix)

3.2 桑葉の変異原性及び抗変異原性

3.2.1 桑葉の変異原性

桑葉抽出エキスM-E及びM-Wについて、Salmonella typhimurium TA98、TA100、TA97及びTA1537において-S 9 Mix及び+S 9 Mixで変異原性試験を行った。抽出エキスM-Eでは、1プレートあたり桑葉乾燥重量1000mg相当のエキスでも変異原性は認められなかった。M-Wについては、アミノ酸が含有されており、Ames試験の妨害となったため変異原性試験を行う事はできなかった。

3.2.2 桑葉の抗変異原性

桑葉抽出エキスM-E及びM-Wについて、B(a)P及びIQの変異原性に対する抑制効果を検討した。その結果、抽出エキスM-Eでは、アミノ酸の影響で用量依存的に生菌数が増加しているにもかかわらず、IQの変異原性に対する抑制作用が認められた。また、M-Wでは、B(a)P及びIQの変異原性に対して顕著な抑制作用が認められた(図8及び図9)。

4 むすび

ルバーブをn-ヘキサン及びジエチルエーテルにより抽出したエキスは、TA1537のS 9 Mix存在化において変異原性を示した。しかし、一方、ルバーブ中にはB(a)P、Trp-P-1及びIQの変異原性を抑制する物質が存在し、エモジンやフィシオン等の遊離型アントラキノン類が、ルバーブにおける抗変異原性作用の一部を担っていることが明らかとなった。

桑葉については、メタノール抽出エキスのエーテル可溶性画分は、乾燥重量1gにおいても変異原性は認められず、B(a)P及びIQの変異原性を顕著に抑制する事が示された。

5 文献

- 1) Wood et al., ; Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), 79, 5122-5126 (1982)
Busk et al., ; FoodChem. Toxicol., 22, 725-730 (1984)
- 2) Okuda et al., ; Chem. Pharm. Bull., 32, 3755-3758 (1984)
- 3) Huang et al., ; Carcinogenesis, 4, 1631-1637 (1983)
- 4) Ames et al., ; Method for detecting carcinogens and mutagens Salmonella mammalian microsome mutagenicity test, Mutation Res., 31, 347-364 (1975)
- 5) Arimoto et al., ; 環境変異原研究 12 34-43 (1990)
- 6) Joseph et al., ; Agric. Biol. Chem., 44 (10), 2513-2515 (1980)

(2) N-メチル-N-ニトロソウレアのアルキル化に及ぼす影響

中村 昌道 (衛生研究所)

4-(4'-ニトロベンジル)ピリジン (NBP) は、N-アルキル化により青色に発色するが、抗N-アルキル化活性を有する物質があれば、青色が消失する現象を利用して、桑茶およびルバーブについて検討した。桑茶については、沸騰水抽出液について他の数種類の茶と比較したところ、紅茶の1/10、緑茶1/100程度の抗アルキル化活性しかなかった。ルバーブはメタノール抽出液について検討したところ、同じ科に属するイタドリよりは抗アルキル化活性は高いが、スイバの約1/2の程度であった。

1 はじめに

N-ニトロ化合物をはじめとして発ガン物質の多くは、DNAにアルキル化を起こす。究極発ガン物質は大抵求電子体であり、DNAは求核体と見なすことが出来るので、細胞の癌化は、求電子体と求核体との間の化学反応により引き起こされることになる。NBPは、N-アルキル化により青色に発色する¹⁾。逆に、N-アルキル化を抑制する物質を添加すれば、発色は抑制される。今回、この現象を利用して、桑茶、ルバーブ抽出液が抗N-アルキル化作用を有するか否かを検討した。このNBP法によるアルキル化活性と、*S. typhimurium* TA1535を用いたAmes Testの結果とよく一致することが報告されている²⁾。発ガン物質としては代謝なしで直接発ガン作用のあるN-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) を使用した。

2 方法

2.1 試薬：MNU (ナカライテスク)、NBP (東京化成)、3-アミノ-1-プロパノール (東京化成) 及びその他の試薬は試薬特級を精製することなくそのまま使用した。

2.2 抗アルキル化活性の測定方法：抗アルキル化活性の測定はYanoの方法に準じて行った³⁾。即ち、0.1M酢酸緩衝液 (pH4.76) 0.5mlと同一緩衝液に溶解したMNU (5.2mg, 50 μmol) を共栓試験管にとり、試料の一定量を加え、37℃、60min、振とう恒温水槽中で反応させる。0.1M酢酸緩衝液0.15ml及び5%NBPアセトン溶液0.50mlを加え、さらに37℃、120min反応させる。水で冷却し、反応を停止し、25%3-アミノ-1-プロパノール・アセトン溶液1.0mlを加え、1min激しく振とうし、アセトン3.0mlを加え、濾過し、540nmで吸光度の測定を行う。ブランクはMNUを加えないもので同様に行ったものを使用する。

2.3 試料の調製：

2.3.1 桑茶、杜仲茶、よもぎ茶、緑茶および紅茶それぞれ5gに水50mlを加え、2min沸騰させ濾過後50mlに定容し、その一定量を実験に供した。

2.3.2 ルバーブ、イタドリ、スイバ、フキおよびセロリそれぞれ10gに20mlのメタノールを加え、ホモジナイズし、濾過後、20mlに定容し、その0.2ml (0.1g相当) を実験に供した。

3 結果

3.1 桑茶の抗アルキル化活性について

表1 種々茶抽出液のN-アルキル化活性阻害効果

	10%	25	50	100	150	250	500 (対照)
桑茶	-	-	-	0	0	15.5	37.1
よもぎ茶	-	13.5	39.2	50.0	-	-	-
杜仲茶	-	15.2	34.6	67.9	-	-	-
紅茶	10.0	22.5	40.0	-	-	-	-
緑茶	91.6	100	-	-	-	-	-

※ 抽出液10μlは茶1mgに相当する

表1は、桑茶およびその他の茶抽出液を比較したもので、水を対照 (100%) とした時の、MNUのアルキル化活性を測定し、その阻害率を%で表したものである。表1から、よもぎ茶、杜仲茶および紅茶抽出液のアルキル化活性の阻害効果は、ほとんど同程度であったが、桑茶抽出液は、これらの約1/10の効果しかなかった。また、緑茶抽出液と比べると、1/100程度の効果しなく、桑茶のMNUのアルキル化抑制効果は非常に小さいものであった。

3.2 ルバーブの抗アルキル化活性について

ルバーブは、タデ科の植物であるので、同科に属するイタドリおよびスイバ、および茎を食用とするフキおよびセロリについて比較した。これらの植物は、茎全体を食用とするので、水溶性および脂溶性の画分が同時に抽

出出来るように、抽出溶媒はメタノールを使用した。Yanoの方法³⁾では、水抽出液で検討しているが、メタノール抽出液でも発色に影響を与えないことが分かったので、同様に測定した。表2は、ルバーブおよびその他の食用植物抽出液の抗アルキル化活性を比較したものである。

表2に示したように、ルバーブは、同じ科のイタドリとMNUのアルキル化阻害率よりは高いが、スイバの約1/2であった。セロリの阻害効果はほとんどなく、フキは、スイバ同程度であった。

表2 ルバーブ抽出液等のN-アルキル化活性阻害効果

	アルキル化阻害率(%)
ルバーブ(タデ科)	31.5
イタドリ(タデ科)	19.1
スイバ(タデ科)	72.1
フキ(キク科)	71.6
セロリ(セリ科)	2.2

試料添加量は0.2ml(0.1g相当)

4 むすび

胃ガンの原因物質の一つと考えられているNMUのアルキル化阻害効果を検討した結果、桑茶の沸騰水抽出液には、その効果が非常に小さく研究を進めるのは困難と思われる。ルバーブについては、今回は、メタノール抽出について検討したが、5つの植物の中では、中間的な効果を示した。今後は、水溶性画分および脂溶性画分それぞれ検討し、物質を同定する必要がある。

5 文献

- 1) Druckrey, H. , Kruse, H. , Preussmann, R. , Ivankovic, S. & Landschutz, Z. , Krebsforsch. **74**, 241 (1970)
- 2) Yano, K. & Isobe, M. , Cancer Res. **39**, 5147 (1979)
- 3) Yano, K. , J. Agric. Food Chem. , **27**, 456 (1979)

(3) ラット肝化学発癌系を用いた桑葉の発癌抑制効果の検討

清水 昭男 (ガンセンター臨床研究所)

原田 昌興 (ガンセンター臨床研究所)

鈴木 誠 (蚕業センター)

高橋 恭一 (蚕業センター)

有賀 勲 (蚕業センター)

桑葉ないしその成分の発癌過程に対する影響・抑制効果を検討する目的で、diethylnitrosamine (DEN)によるラット化学肝発癌モデルを用い、発癌初期病変としての酵素担体 (GST-P) を指標とする実験的研究を行った。その結果、桑葉粉末10%混餌持続投与群ではGST-P陽性細胞巢の発現個数が対照群に比して明らかに少なく、面積の経時的増大にも抑制傾向が認められ、特に promoter として phenobarbital (PB) を併用投与した群間においては統計学的にも有意差が見られた。従って、桑葉は肝発癌過程の initiation, promotion 何れの過程においても抑制的効果を持つ可能性が示唆された。

1 はじめに

桑葉には多量の食物繊維をはじめカロチン、ビタミンA、各種フラボノイド、フマル酸など健康状態の改善に役立つと目される様々な成分が含まれることが知られており、機能的食品の素材として有用と考えられる。桑葉に含有されているこれらの諸成分中には、食物繊維、カロチノイド等による変異原成分不活性化作用、エピガロカテキンその他の成分の抗変異原作用、レチノイン酸の抗プロモーター作用、フラボノイド類の変異原修飾作用等、発癌過程との関わりを想定される成分も数多くあり、桑葉の長期摂取により発癌抑制効果の得られる可能性も想定される^{1,2)}。本研究ではこれらの諸種生理活性成分を未調整の状態で含有する桑葉乾燥粉末混餌投与による発癌過程抑制・修飾効果を検討する目的で、確立された実験系であるラット肝化学発癌モデルを用いて短期ならびに中期発癌実験を試みた。

2 材料と方法

2.1 実験動物

F344 4週齢雄ラット80匹を日本チャールスリバー株式会社(厚木)より購入、1週間の無処置試験観察の後、5週齢より実験を開始した。動物は室温 22 ± 2 ℃、湿度 50 ± 20 %に保たれた specific pathogen free の飼育室におかれた laminar flow chamber 内で飼育し、ケージ、床敷、ならびに飼料は高圧蒸気滅菌後のものを用いた。

2.2 薬剤・試薬

発癌 initiator として試薬特級 diethylnitrosamine (DEN) を、発癌 promoter としては試薬特級 sodium phenobarbital (PB) を用い、いずれも和光純薬株式会社

(大阪)より購入した。抗 glutathione S-transferase placental form (GST-P) 抗体は弘前大学生化学教室、佐藤清美教授より供与を受けた。その他の免疫組織学的染色に必要な抗体、試薬類はニチレイ株式会社(東京)より購入した。

2.3 飼料

基礎飼料はオリエンタル酵母工業株式会社(東京)より購入した半合成飼料 CRF-1 を用いた。被検桑葉添加飼料は、蚕業センターより提供された桑葉乾燥粉末を CRF-1 に10%(W/W)の割合で混合調整したものをを用いた。

2.4 実験計画

実験動物を各群8~12匹、A~Hの8群に分割し、A群はDEN+PB+桑葉投与、B群はDEN+PB投与、C群はDEN+桑葉投与、D群はDENのみ投与、E群はPB+桑葉投与、F群は桑葉のみ投与、G群はPBのみ投与、H群は基礎飼料のみの投与による無処置対照群とした。DENは生理的食塩水にて20mg/ml濃度に溶解した後、200mg/kg体重を各ラットの腹腔内に投与した。PBはDEN投与2週後より、飲料水中に500ppmの濃度で溶解した飲料水の自由摂取により投与した。飼料は前記基礎飼料または桑葉添加飼料をDEN投与直後より自由摂取とした。実験開始7週および16週後に各群5-7匹をエーテル麻酔下に腹部大動脈より脱血屠殺、全身諸臓器を摘出、重量を測定後、10%リン酸緩衝中性ホルマリンにて固定した。固定後、肝は桑葉の肝門部を通る最大断面より各1片を採取し、型の如くパラフィン包埋、4μmの切片を作成、hematoxylin-eosin (HE) 染色、Masson-trichrome 染色、ならびに抗 GST-P 抗体を用いた streptavidin-biotin 法による免疫組織化学染色を施

し、光顕的に検索した。肝以外の臓器は型の如く切り出し、パラフィン切片作成後HE染色標本にて観察した。

肝のGST-P免疫染色については、標本中の全陽性巢の個数を光学的顕微鏡下で算定し、更に画像解析装置を

用いて各陽性巢の面積ならびに標本の面積を測定した。各個体における全陽性巢の個数を標本面積で除して肝単位面積当たりのGST-P陽性巢個数を求めた。統計学的検定はstudent t検定および χ^2 検定によった。

表1 体重・肝重量の平均値および標準偏差

群 (投与物質)	体 重 (gm)		肝重量 (gm)	
	7週	16週	7週	16週
A群 (DEN+PB+桑葉)	268.6±18.8	350.9±18.9	12.5±1.0	14.1±1.1
B群 (DEN+PB)	274.4± 8.8	357.5±19.2	12.6±1.0	14.5±1.0
C群 (DEN+桑葉)	277.2±21.4	329.4±16.5	10.1±0.5	10.7±0.4
D群 (DENのみ)	272.9± 9.4	347.8±16.5	9.8±0.3	10.9±0.8
E群 (PB+桑葉)	279.3±16.9	351.2±23.3	13.2±0.7	13.5±0.9
F群 (桑葉のみ)	280.7± 8.0	357.4±21.3	10.9±0.6	11.2±0.8
G群 (PBのみ)	283.7±12.1	367.2±13.5	13.3±0.5	14.6±0.3
H群 (無処置)	274.3± 3.8	338.9±13.9	10.3±0.7	10.1±0.7

3 結果

3.1 体重・臓器重量に対する影響

各群実験開始後7、16週における体重と肝平均重量および標準偏差を表1に示す。対応する各群間には、いずれも桑葉投与の有無による差は認められなかった。肝以外の諸臓器においても7週、16週とも重量に特記すべき変化は認めなかった。

3.2 肝の組織学的所見

肝の組織学的変化は主としてDEN投与群すなわちA、B、C、D群に認められた。7週、16週ともkupffer細胞の腫大、肝細胞索の乱れ、肝細胞の大小不同など肝組織に対する障害と再生を思わせる像が主体となり、その中にやや小型でわずかに好塩基性の細胞質を有し、核細胞質比の増大した肝細胞より成る、いわゆるfociが散在している像がこれらの各群に共通してみられ、群間のこれらの所見の差はわずかなものであった(図1)。なおB群の1匹に、周辺圧排性に増殖する異型細胞集団、いわゆるneoplastic noduleが1個みられたが他の群では認められなかった。一方、DEN非投与E、F、G、Hの各群では、HE染色標本上、ほとんど特徴的な所見を認めなかった。各群の肝以外の全身諸臓器についても組織学的に有意の変化は認められなかった。

肝のGST-P免疫染色標本ではDEN投与を受けたA、B、C、D群にのみGST-P陽性肝細胞集団すなわちGST-P陽性巢が散見された(図2)。DEN非投与のE、F、G、H群ではいずれにもGST-P陽性巢は見られなかった。

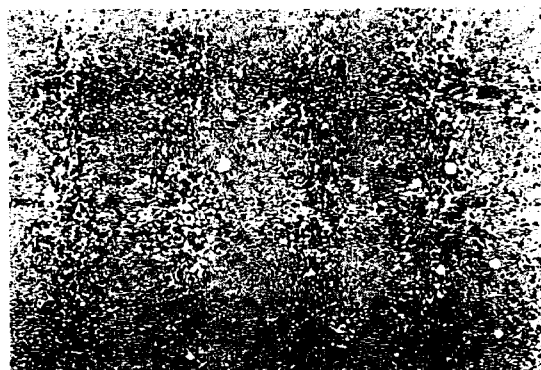


図1 A群 (DEN+PB桑葉投与) 16週の肝組織像。肝細胞の大小不同、肝細胞索の乱れなどを認める。いわゆるfociが1個見られる。HE染色、×20

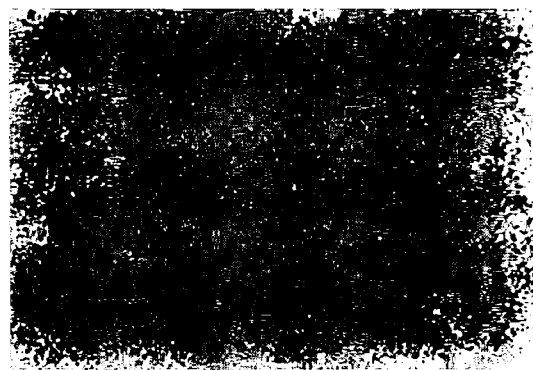


図2 B群 (DEN+PB投与) 16週のGST-P陽性細胞巢。複数のGST-P陽性細胞巢が散在性に認められる。GST-P免疫染色、×10

3.3 GST-P陽性細胞巢の各群間における比較

7、16週における各群の肝単位面積当たりのGST-P陽性巢の個数を表2に、陽性巢1個当たりの面積の平均値ならびに標準偏差を表3、表4に示す。Student t検定における危険率を表中表示した。肝単位面積当たりのGST-P陽性巢個数は、A群とB群、C群とD群の比較においてそれぞれA、C群が少数となる傾向にあり、特

に16週においてはA群がB群に比し危険率1%で統計学的有意差をもって少数であった。GST-P陽性巢の面積の比較では、同じくA群とB群、C群とD群の比較においてそれぞれA、Cでは面積小となる傾向にあり、16週後のA、B群の比較ではA群が危険率5%で有意に面積小との結果であった。

表2 肝単位面積当たりのGST-P陽性巢個数 (n/㎠, mean±SD)

群	7週	16週
A群 (DEN+PB+桑葉)	0.542 ± 0.138	0.535 ± 0.148
B群 (DEN+PB)	0.555 ± 0.090	0.907 ± 0.088
C群 (DEN+桑葉)	0.204 ± 0.061	0.275 ± 0.130
D群 (DENのみ)	0.265 ± 0.046	0.397 ± 0.102

比較結果: A群 vs B群 (p=0.86), C群 vs D群 (p=0.12), A群 vs C群 (p<0.001), B群 vs D群 (p=0.11)

表3 実験第7週のGST-P陽性巢1個当たりの面積 (μ㎡, mean±SD)

群	実際の測定値	対数変換値
A群 (DEN+PB+桑葉)	5222.5 ± 6159.8	7.953 ± 1.165
B群 (DEN+PB)	5727.8 ± 6983.2	7.998 ± 1.214
C群 (DEN+桑葉)	2759.0 ± 3353.6	7.417 ± 1.004
D群 (DENのみ)	4851.1 ± 22680.0	7.574 ± 1.137

比較結果: A群 vs B群 (p=0.14), C群 vs D群 (p=0.12), A群 vs C群 (p=0.47), B群 vs D群 (p=0.09)

表4 実験第16週のGST-P陽性巢1個当たりの面積 (μ㎡, mean±SD)

群	実際の測定値	対数変換値
A群 (DEN+PB+桑葉)	20255.4 ± 25298.6	9.199 ± 1.363
B群 (DEN+PB)	24005.3 ± 10588.2	9.335 ± 1.208
C群 (DEN+桑葉)	7735.8 ± 9605.4	8.236 ± 1.101
D群 (DENのみ)	6797.3 ± 9744.9	8.297 ± 1.221

比較結果: A群 vs B群 (p=0.26), C群 vs D群 (p=0.17), A群 vs C群 (p=0.011), B群 vs D群 (p=0.44)

4 考察

今回用いた、initiatorとしてDENを、promoterとしてPBを用いるラット実験化学肝発癌モデルは我々の施設において実績がありまた2段階発癌のモデル系として広く用いられている標準的な方法である³⁾。この方法により実験4-10週前後に肝に出現する各種の酵素偏倚集は前癌病変とされており、GST-P陽性細胞集はその代表的なものの一つである。その際、GST-P陽性集の肝単位面積当たりの個数は主としてinitiationの強度を、その平均面積は主としてpromotionの強度を反映するとされている⁴⁾。結果に示したごとく、桑葉の混餌投与は肝単位面積当たりのGST-P陽性集を減少させる傾向にあり、またpromoterを併用したときも、またpromoterを使用しないときもGST-P陽性集面積をも減少させる傾向にある。すなわち、桑葉混餌投与は、initiation, promotionいずれの段階においても、化学肝発癌モデルに対し抑制的効果を有する可能性が示唆された。このことは、直ちに発癌抑制物質としての使用の可否を意味するものではないが、機能性食品の素材として有用である可能性を示すものと考えられる。

これまでの検討は、発癌初期過程のみを観察し、桑葉の配合量も10%と高率であり、実際の摂取態様とは隔たりが大きい。従って今後、同様の実験系を用い低濃度の桑葉配合飼料飼育による、より長期にわたる最終的な発癌に至る過程の観察、高発癌系モデル動物などを用いた自然発癌に対する効果の検討等を加える必要があろう。また、この実験的検討では桑葉中の如何なる成分が発癌

初期段階に対して有効であったかの分析はなされていない。今後は桑葉中成分の詳細な分析と共に、諸種含有成分の培養細胞等を用いた検討結果、抗変異原活性試験の結果等を踏まえ、有効成分もしくはその組み合わせ等による検討、あるいは特定の成分濃度を高めた品種等を用いた検討、更に機能性食品として如何に実用化するかの検討が必要と考えられる。

5 むすび

桑葉の長期経口摂取は、実験的化学肝発癌の初期過程に対して抑制的に作用する可能性のあることが示唆された。今後、肝癌成立過程における抑制効果についての検討、有効成分の分析同定、他のモデル実験系による検討も必要と考えられる。また、機能性食品としてこの素材を実用化する方法の検討が重要課題であろう。

6 文献

- 1) 藤木博太, 菅沼雅美, 吉岡晃子: 種々のプロモーターの生物活性. 日本医師会雑誌, 92: 613-618, (1984)
- 2) 関 武純, 安部一起, 下田妙子, 向井純一郎: 制癌機能を付与した食品. 食品機能 (藤巻正生監修), pp. 471-478, 学会出版センター, 東京, (1988)
- 3) Farber E: Chemical carcinogens: A Biologic perspective. Am J Pathol, 108: 271-296, (1982)
- 4) Sato K: Glutathione S-transferase and hepatocarcinogenesis. Jpn J Cancer Res, 79: 556-572, (1988)