C3H/He 雄マウスの自然発生肝腫瘍に 及ぼす食物繊維の影響

竹 久 文 之, 星 清 子

宮城学院女子大学家政学科

Effect of Dietary Fiber on Spontaneous Liver Tumorigenesis in C3H/He Male Mice

Fumiyuki TAKEHISA and Seiko HOSHI

Department of Home Economics, Miyagi-Gakuin Women's College, Sendai 980

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 41, 141~145 (1988)

C3H/He male mice have a high incidence of spontaneous liver tumor. It is recognized that this tumorigenesis is modified by the intestinal microflora. The effects of dietary fiber (cellulose, apple pulp, guar gum) on spontaneous liver tumorigenesis in C3H/He male mice and on comutagenicity induced by Trp-P-1 in the cecal contents were studied. Eight-week-old mice were fed either a fiber-free diet or a semipurified diet containing 5% dietary fiber for 44 weeks. The results obtained were as follows: 1) No differences in body weight were found among the groups throughout the experimental period. 2) The incidence of spontaneous liver tumor was high, above 90% in the fiber-free, cellulose and apple pulp diet groups. However, the incidence of liver tumor in the guar gum diet group was 62%, which was significantly lower than in the other groups. 3) The number of liver tumor nodules per tumor-bearing mouse in the guar gum diet group was significantly lower than that in the other groups. 4) Because no mutagenicity in the Ames test was recognized in cecal contents from C3H male mice, comutagenicity in the cecal contents induced by Trp-P-1 was studied. Comutagenicity was found in the cellulose and apple pulp diet groups, but not in the fiber-free and guar gum diet groups. Thus, the present study demonstrated that dietary guar gum inhibited spontaneous liver tumorigenesis in C3H male mice and that at least the comutagenicity induced by Trp-P-1 was not related to this inhibitory effect.

(Received September 18, 1987)

多くの実験的研究は、食物繊維が発ガン剤（1,2-ジメチルヒドラジン等）による大腸ガンの発生率に影響を及ぼすことを示している。しかしその影響は食物繊維の種類により異なり、セルロース¹⁾²⁾や小麦フスマ³⁾⁴⁾は抑制的に作用し、ペクチン¹⁾⁵⁾やカラギーナン⁶⁾は促進的である。食物繊維の大腸ガン発生に及ぼすその機序として、腸内滞留時間短縮にもとづく発ガン関連物質と腸粘膜との接触時間短縮効果、腸内容物増加に伴う希釈効果、腸内細菌叢への影響⁷⁾、発ガン関連物質の繊維への吸着⁸⁾が考えられている。

雄 C3H マウスは自然発症肝腫瘍を好発することが知られているが、Mizutani ら⁹⁾¹⁰⁾は無菌マウスやコンニャクマンナンを摂取した通常マウスではその発生率が著

しく抑制されることを報告している。この事実は、C3H マウスにおける肝腫瘍の自然発症には腸内細菌が深く関与しており、コンニャクマンナンは腸内細菌叢を修飾していることを示している。

本研究は雄 C3H マウスの肝腫瘍自然発症に及ぼすセルロース（不溶性繊維）、グァーガム（可溶性繊維）、リンゴバルブ（混合繊維）の影響を検討したものである。また肝腫瘍の自然発症に腸内容物中の変異原活性の関与も考えられたので、あわせて盲腸内容物中の変異原活性に及ぼす影響をも検討した。

実 験 方 法

1. 動物の飼育

実験動物として、8週齢の C3H/He 雄マウス（静岡県農業協同組合）125 匹を購入し、固形飼料（F-1：船

Table 1. Composition of experimental diets.

Basal diet* (%)		Experimental diets (%)				
		Group	Basal diet	Cellulose	Apple pulp	Guar gum
Starch	69.9	Fiber-free	100	—	—	—
Casein	20					
Soybean oil	5	Cellulose	95	5	—	—
Mineral mix.**	4					
Vitamin mix.**	1	Apple pulp	95	—	5	—
Choline chloride	0.1	Guar gum	95	—	—	5

* Diet also contained 400 IU retinyl palmitate, 200 IU vitamin D and 10 mg *d*- α -tocopheryl acetate per 100 g. ** Harper, A.E.: *J. Nutr.*, 68, 405 (1959).

橋農場)で1週間予備飼育した後に、31~32匹の4群に分け Table 1 に示す実験食を与えた。無繊維の半合成飼料(基本食)に食物繊維を5%になるように添加した。用いた食物繊維はセルロース(濾紙粉末D:東洋濾紙)、リンゴパルプ(リンゴジュース残渣の85%エタノール抽出残渣)、グァーガム(青葉化成)であった。調製した粉末飼料をほぼ等量の水で団子状に練り、毎日夕方に与え、餌と水は自由摂取させた。基本食、セルロース食、リンゴパルプ食、グァーガム食を摂取させた群をそれぞれ、無繊維群(対照)、セルロース群、リンゴパルプ群、グァーガム群とした。飼育は $24\pm1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm5\%$ 、明期08:00-20:00、暗期20:00-08:00の環境で、ステンレス金網(5.5×5.5 mm)製床のステンレスケージ内で1匹飼いとしました。

2. マウスの解剖

実験食投与44週後の午前中に、絶食させることなくネブタール麻酔下に開腹し、心臓より採血した(この血液は本実験においては分析しなかった)。盲腸を摘出し、重量測定後ただちに盲腸内容物を取り出し、ドライアイス-アセトンで凍結し、分析まで -20°C 下に保存した。

肝臓を摘出し腫瘍数を調べた後、中性10%ホルマリン液で固定し、エオシン-ヘマトキシリン染色して鏡検した。

3. 盲腸内容物の変異原促進活性

固形飼料で飼育したC3Hマウスの盲腸内容物の水(超音波処理後)、エタノール、クロロホルム:メタノール混液抽出物を試料として、Ames法のプレインキューション改良法¹¹⁾を用い、*Salmonella typhimurium* TA100, TA98に対する突然変異テストを行った。S-9添加の有無にかかわらず変異原活性は認められなかったが、Trp-P-1の変異原活性に対する促進活性がどの抽出物にも認められ、その促進活性の強さはエタノール抽出物が

もっとも大きかった。またTA100とTA98は同じ傾向を与えた。したがって、本実験においては、TA98を使用して盲腸内容物のエタノール抽出物のTrp-P-1に対する変異原促進活性を検討した。

1) 試料の調製 盲腸内容物試料に20倍量のエタノールを加え、超高速ホモジナイザー(バイオトロン)でホモジナイズした後、濾過した。濾液を減圧濃縮し、盲腸内容物として5 mg/10 μl の濃度になるようジメチルスルフォキシド(DMSO)に再溶解した。この溶液をメンブランフィルター(TM-2 P:東洋濾紙)で濾過して試料とした。

2) 試薬 *Salmonella typhimurium* TA100, TA98 および S-9 [ポリ塩化ビフェニール(PCB)投与ラット肝ホモジネートの9,000 g 上清]は東北大学農学部栄養化学研究室より分与され、Trp-P-1は和光純薬より購入した。

3) Trp-P-1, 試料添加量の検討 培地へのTrp-P-1の添加量を0.1, 0.2 μg とし、試料添加量を盲腸内容物として10~40 mgの範囲で変異原促進活性を検討し、Fig.1の結果を得た。すなわち、Trp-P-1 0.1, 0.2 μg に対して盲腸内容物10~30 mgの範囲で、内容物量の増加に伴い変異数が増加した。このことより、本実験の変異原促進活性測定条件はTrp-P-1 0.1 μg 、盲腸内容物20 mgを使用することとした。

実験結果

1. 動物の発育および盲腸重量

飼育44週間の体重をTable 2に示したが、群間に差は認められなかった。なお、飼育中にリンゴパルプ群3匹、グァーガム群8匹のマウスが死亡した。リンゴパルプ群の1匹とグァーガム群の6匹は糞詰まりが原因と考えられ、リンゴパルプ群の1匹は飼育上の単純な不注意によるものであり、グァーガム群の1匹は結腸に腫瘍

Fig. 1. Ames test, with *S. typhimurium* TA98, on cecal contents in C3H male mice fed stock diet. Comutagenic activity induced by 0.1 (●) or 0.2 μg (▲) of Trp-P-1 was tested on various amounts of cecal contents.

Table 2. Body weight of mouse fed experimental diet (g).

Weeks	Fiber-free	Cellulose	Apple pulp	Guar gum
0	26.7±1.2*	26.8±1.6	26.8±1.4	26.7±1.3
10	33.0±1.9	33.0±2.2	32.3±2.2	33.0±2.6
20	36.1±3.2	36.5±2.8	35.6±3.1	35.7±3.3
30	40.2±2.0	40.0±2.7	38.9±3.1	39.4±3.4
40	38.2±2.6	37.8±3.1	37.4±2.8	37.1±3.4
44	37.6±2.5	37.1±3.3	36.8±2.9	36.1±3.3

* Mean±S.D.

(25週目)が認められた。他の1匹ずつについては原因不明であった。これら屠殺前に死亡したマウス11匹には肝腫瘍は認められなかった。

屠殺時の盲腸重量と盲腸内容物を Table 3 に示した。無繊維群に比較して、グァーガム群の盲腸内容物 ($p<0.01$) と盲腸重量 ($p<0.01$) は高値であったのに対して、リンゴパルプ群の内容量は高値 ($p<0.01$) であったが盲腸重量 ($p<0.01$) は低値であり、セルロース群の内容量は等しいが盲腸重量 ($p<0.01$) は低値であった。

2. 自然発生肝腫瘍

肝腫瘍は黄白色、円形で2mm以上のものは隆起していた。腫瘍は肝細胞性のもので、組織病理的に群間での相違は認められなかった。

グァーガム群の担腫瘍動物数(発生率)および担腫瘍動物当たりの腫瘍数は、他群に比較して有意に低値であ

Table 3. Effect of dietary fiber on weight of caecum and its contents.

	<i>n</i>	Caecum (mg)	Contents (mg)
Fiber-free	31	109±30 ^a	174±54 ^a
Cellulose	31	91±20 ^b	190±42 ^a
Apple pulp	28	89±24 ^b	226±64 ^b
Guar gum	24	157±26 ^c	395±116 ^c

* Mean±S.D.

^{a-c} Different superscript letters in the same column means are significantly different, at least at $p<0.05$.

った ($p<0.01$, Table 4)。セルロース群の発生率、動物当たりの腫瘍数は無繊維群と等しかった。リンゴパルプ群では無繊維群に比較して、発生率に差は認められなかったが、動物当たりの腫瘍数は低い傾向が認められた。

3. 変異原促進活性

ブランクプレート (S-9+DMSO) 上のコロニー数はつねに60前後であったが、対照プレート (Trp-P-1+S-9+DMSO) 上のコロニー数が300~450の間で変動していたので、変異原促進活性は対照プレートコロニー数に対する試験プレートコロニー数の比、すなわち(試験値-ブランク値)/(対照値-ブランク値)で表わした (Table 5)。

無繊維群とグァーガム群の盲腸内容物には変異原促進活性は認められなかったが、セルロース群、リンゴパルプ群には有意 ($p<0.01$) に促進活性が認められた。

考 察

本実験から、C3Hマウスの肝腫瘍の自然発生率は食物繊維の影響を受けること、そしてその程度は繊維の種類により異なることが明らかとなった。

C3Hマウスの肝腫瘍の自然発生には遺伝的要因や男性ホルモンの関与¹²⁾が知られているが、Roeら¹³⁾はC3H無菌マウスでは肝腫瘍の自然発生率が低下することを報告している。Mizutaniら⁹⁾はC3Hノトパイオートマウスを用い、無菌動物では肝腫瘍発生率が低下すること、*Streptococcus* や *Clostridium* 等によって上昇した発生率を *Bifidobacterium* や *Lactobacillus* が低下させることを認めている。

さらに Mizutani ら¹⁰⁾は C3H 通常化マウスにコンニャクマンナンを投与し、コンニャクマンナンは肝腫瘍発生率を低下させると同時に腸内の *Bifidobacteria* を増加させることを報告している。このように C3Hマウスの肝腫瘍の自然発生には遺伝的要因やホルモンだけな

Table 4. Effect of dietary fiber on spontaneous liver tumorigenesis.

	n	Mice with liver tumor		No. of liver tumor nodules				
		No.	(%)	Size (mm)			Total	Per tumorbearing mouse
				< 2	2~5	5<		
Fiber-free	31	29	93.5 ^a	120	24	14	158	5.45±3.20 ^a
Cellulose	31	30	96.8 ^a	85	26	14	125	4.17±3.62 ^a
Apple pulp	28	26	92.9 ^a	74	15	10	99	3.81±3.31 ^a
Guar gum	24	15	62.5 ^b	8	4	7	19	1.27±0.59 ^b

* Mean±SD

^{a-b} Different superscript letters in the same column means are significantly different, at least at $p<0.05$.Table 5. Effect of dietary fiber on comutagenic activity induced by Trp-P-1 in cecal contents.^{a)}

	n	(Test-blank)/(Control-blank) ratio ^{b)}
Fiber-free	24	1.06±0.46*
Cellulose	25	1.16±0.25‡
Apple pulp	25	1.22±0.22‡
Guar gum	21	0.92±0.33

^{a)} 0.1 µg of Trp-P-1 and corresponding amount to 20 mg cecal contents per plate were used in Ames assay.^{b)} Blank; Mutation No. of *S. typhimurium* TA98 in case of S-9+DMSO in soft agar. Control; Mutation No. of *S. typhimurium* TA98 in case of S-9+Trp-P-1+DMSO in soft agar. Test; Mutation No. of *S. typhimurium* TA98 in case of S-9+Trp-P-1+cecal contents extract in soft agar.* Mean±S.D. ‡ Significant difference from 1.0 at $p<0.05$.

く、腸内細菌が深く関わっており、食物繊維は腸内細菌を介して影響を及ぼしている可能性が考えられる。

今回、グァーガムは C3H 通常化マウスの肝腫瘍の自然発生率および発生腫瘍数を低下させたのに対して、リンゴパルプは発生腫瘍数を減少させる傾向があり、セルロースは発生率および発生腫瘍数に影響を及ぼさなかった。この可溶性繊維であるグァーガムの肝腫瘍自然発生抑制効果はコンニャクマンナンの効果と同質のものと考えられる。そしてリンゴパルプの発生腫瘍数減少傾向は、リンゴパルプが可溶性繊維であるペクチンを含んでいることによっていと考えられる。グァーガムやコンニャクマンナンの糞増量効果および腸内滞留時間の短縮効果はリンゴパルプやセルロースに比較して著しく弱いこと¹⁴⁾ から、C3H 雄マウスの肝腫瘍発生に対するグァー

ーガムやコンニャクマンナンの抑制効果は滞留時間の短縮や糞量の増加では説明できない。

Osawa ら¹⁵⁾、Suzuki ら¹⁶⁾は腸内細菌抽出物に DNA 損傷活性や変異原活性を見いだしている。一方、Moorman ら¹⁷⁾ は加熱調理し変異原活性をもたせたミートバイを摂取させたラットの糞、尿中に変異原活性をほとんど見いださなかった。de Vet ら¹⁸⁾ はヒトの糞中に変異原活性を認めなかったが、2-アセチルアミノフルオレンに対する変異原促進活性の存在を認めている。著者らは C3H 雄マウスの盲腸内容物中に変異原活性を検出できなかったが、Trp-P-1 に対する変異原促進活性を認めたので、この変異原促進活性と肝腫瘍の自然発生率との関連を検討した。肝腫瘍発生率が高く変異原促進活性の高いセルロース群やリンゴパルプ群と、肝腫瘍発生率が低く変異原促進活性を示さなかったグァーガム群との比較においては、C3H 雄マウスの肝腫瘍の自然発生に盲腸内容物の変異原促進活性が関連しているようにも思われる。しかし、無繊維群ではグァーガム群と同様に変異原促進活性が認められなかったにもかかわらず、肝腫瘍の自然発生率はグァーガム群に比較して著しく高かったことは、肝腫瘍自然発生に盲腸内容物の変異原促進活性が関連している可能性を否定している。本実験における変異原促進活性は Trp-P-1 に対しての促進活性を見たものであって、他の変異原物質に対する促進活性と肝腫瘍の自然発生との関連については今後さらに検討の必要があろう。

著者らは先に、dd 系雄マウスを 12 カ月間飼育し、盲腸内容物中の β-グルクロニダーゼおよび尿中フェノール類（腸内細菌により消化管内で生成されたクロシン代謝物¹⁹⁾）に及ぼす食物繊維の影響を検討した²⁰⁾。測定までの飼育日数によって異なるが、試験した食物繊維のすべてが β-グルクロニダーゼ活性を低下させたのに対して、リンゴパルプとグァーガムは尿中フェノール類（フェノール+カクレゾール）を減少させた。この成績と本

実験の成績を合わせ考えると、C3H マウスの肝腫瘍自然発生に消化管内で生成されるフェノール類が関連している可能性が考えられる。摂取タンパク質量の増加は尿中フェノールを増加させ¹⁹⁾、低カゼイン食は C3H マウスの肝腫瘍発生を抑制する²¹⁾ことが報告されている。

ラットに経口投与されたプロナーゼとリゾチームは腸内細菌を溶菌し、その細胞壁成分が宿主の免疫機能を増強することが報告されている²²⁾。リゾチームは腸粘膜のリーベルキューン腺（腸腺、腸陰窩）から分泌²³⁾されているが、われわれはセルロース、リンゴパルプ、グァーガムの3種類の繊維のうちグァーガムのみが腸陰窩長を有意に増加させることを認めている²⁴⁾。したがって、グァーガムは腸陰窩からのリゾチーム分泌を高めているかもしれない。そのことにより C3H マウスの免疫機能が増強され、肝腫瘍の発生率を抑制した可能性も考えられる。

いずれにせよ、1,2-ジメチルヒドラジン等による大腸発癌と C3H マウスの肝腫瘍自然発生では当然その発生機序は異なっているであろう。前者を不溶性繊維であるセルロースや不溶性繊維を多く含む小麦フスマが抑制するのに対して、後者を可溶性繊維であるグァーガムやコンニャクマンナンが抑制するということは、少なくとも可溶性繊維と不溶性繊維とでは腫瘍発生に及ぼすその作用機序が異なることを示している。

要 約

C3H マウスの肝腫瘍自然発生と盲腸内容物の変異原促進活性に及ぼす食物繊維の影響を検討した。食物繊維としてセルロース、リンゴパルプ、グァーガムを用い、これらを5%含む食餌で44週間飼育し、次のような結果を得た。

- 1) 食物繊維はマウスの体重増加に影響を与えなかった。
- 2) 肝腫瘍の自然発生率は無繊維群、セルロース群、リンゴパルプ群で90%以上と高率であったが、グァーガム群では62%であり有意に低率であった。
- 3) 担腫瘍マウス当たりの腫瘍数は無繊維群に対して、リンゴパルプ群では少ない傾向を示し、グァーガム群では有意に少なかった。
- 4) Trp-P-1に対する盲腸内容物の変異原促進活性は無繊維群とグァーガム群では認められなかったが、セル

ロース群とリンゴパルプ群では認められた。

以上の結果より、食物繊維のうちグァーガムは C3H マウスの肝腫瘍の自然発生を抑制するが、この抑制効果は盲腸内容物の Trp-P-1 に対する変異原促進活性では説明されないことが示された。

文 献

- 1) Freeman, H.J., Spiller, G.A. and Kim, Y.S.: *Cancer Res.*, **40**, 2661 (1980)
- 2) 大政良二: 慈恵医大雑, **98**, 867 (1983)
- 3) 桐山修八: 化学と生物, **18**, 95 (1980)
- 4) Barbolt, T.A. and Abraham, R.: *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **157**, 656 (1978)
- 5) Bauer, H.G., Asp, N.-G., Oste, R., Dahlquist, A. and Fredlund, P.: *Cancer Res.*, **39**, 3752 (1979)
- 6) Arakawa, S., Okumura, M., Yamada, S., Ito, M. and Tejima, S.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **32**, 481 (1986)
- 7) Burkitt, D.P.: *Cancer*, **28**, 3 (1971)
- 8) Smith-Barbaro, P., Hansen, D. and Reddy, B.S.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **67**, 495 (1981)
- 9) Mizutani, T. and Mitsuoka, T.: *Cancer Letters*, **11**, 89 (1980)
- 10) Mizutani, T. and Mitsuoka, T.: *Cancer Letters*, **17**, 27 (1982)
- 11) 矢作多貴江: 蛋白質 核酸 酵素, **20**, 1178 (1975)
- 12) 北川知行, 桑原紀之, 高山昭三: 化学物質と癌の発生 (小田嶋成和, 橋本嘉幸編), 218 (1978), 学会出版センター (東京)
- 13) Roe, F.J. and Grant, G.A.: *Int. J. Cancer*, **6**, 133 (1970)
- 14) 竹久文之: 栄食誌, **39**, 457 (1986)
- 15) Osawa, T., Namiki, M., Suzuki, K. and Mitsuoka, T.: *Mutation Res.*, **122**, 299 (1983)
- 16) Suzuki, K. and Mitsuoka, T.: *Mutation Res.*, **50**, 295 (1978)
- 17) Moorman, W.F.B., Moor, N.J., Worthington, R.E. and Miller, J.: *Nutr. Rep. Int.*, **29**, 79 (1984)
- 18) de Vet, H.C.W. Sharma, C. and Reddy, B.S.: *Nutr. Rep. Int.*, **23**, 653 (1981)
- 19) Drasor, B.S. and Hill, M.J.: *Human Intestinal Flora*, 96 (1974), Academic Press (London)
- 20) 竹久文之: 生活科学研究所報告, **20**, 1 (1988)
- 21) Tannenbaum, A. and Silverstone, H.: *Cancer Res.*, **9**, 162 (1949)
- 22) 難波祐三郎, 守本富昭, 光岡知足: 理研腸内フローラシンポジウム I. 腸内フローラと発癌 (光岡知足編), 139 (1981), 学会出版センター (東京)
- 23) Erlandsen, S.L., Parsons, J.A. and Taylor, T.D.: *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 401 (1974)
- 24) 竹久文之: 未発表

(1987年9月18日受理)