ポストイニシエーション期に投与した 高温高压処理ニンニク粉末による 1,2-ジメチルヒドラジン誘発ラット 大腸前がん病変抑制作用

千原 猛[§], 新保 寛, 金児孝晃, 別府秀彦,
戸松亜希子, 東口高志*, 園田 茂

藤田保健衛生大学藤田記念七栗研究所

* 藤田保健衛生大学医学部外科・緩和医療学講座

Effects of High Temperature- and Pressure-Treated
Garlic on 1,2-Dimethylhydrazine-Induced
Premalignant Lesions in the Rat Colorectum
at the Post-Initiation Stage

Takeshi Chihara[§], Kan Shimpō, Takaaki Kaneko,
Hidehiko Beppu, Akiko Tomatsu,
Takashi Higashiguchi* and Shigeru Sonoda

Fujita Memorial Nanakuri Institute, Fujita Health Uni-
versity, 1865 Hisai-issiki-cho, Tsu, Mie 514-1296

* Department of Surgery & Palliative Medicine, Fujita
Health University School of Medicine,
424-1 Ohtori-cho, Tsu, Mie 514-1295

We examined the effects of high temperature- and pressure-treated garlic (HTPG), which has enhanced anti-oxidative activity, on 1,2-dimethylhydrazine (DMH)-induced mucin-depleted foci (MDF), as premalignant lesions, in the rat colorectum at the post-initiation stage. Male F344 rats (5 weeks old) were injected s.c. with DMH (40 mg/kg, once weekly for 2 weeks). Rats were fed basal diet or experimental diets containing 1% or 3% HTPG for 6 weeks, starting 1 week after the last injection of DMH. At sacrifice, the number of MDF in the 3% HTPG diet group was significantly lower than that in the basal diet group. In addition, we also studied the influence of 3% HTPG diet ingestion. Rats were fed basal diet or 3% HTPG diet under the above conditions without DMH treatment. The 3% HTPG diet did not affect most hematological and plasma biochemical parameters. These results, combined with our previous work (APJCP, 2009), suggest that HTPG may be useful as a health supplement.

(Received Oct. 1, 2010 ; Accepted Dec. 13, 2010)

Keywords : high temperature- and pressure-treated garlic, 1, 2-dimethylhydrazine, mucin-depleted foci

キーワード : 高温高压処理ニンニク, 1,2-ジメチルヒドラジン, ムチン枯渇巣

ニンニクの多彩な薬効はにおい成分や人為的に形成され

〒514-1296 三重県津市久居一色町 1865

* 〒514-1295 三重県津市大鳥町 424-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), tchihara@fujita-hu.ac.jp

た成分により発揮されることが知られている¹⁾。しかし本邦においては、ニンニク臭は嫌われることが多く、健康食品素材として様々な無臭化の試みがなされている²⁾³⁾。その一つとして我々はこれまでに、生ニンニク鱗茎を煮沸処理することにより、アリシンの生成酵素であるアリイナーゼを失活させる方法を試み、その粉末が *N*-エチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン誘発マウス十二指腸がんを有意に抑制することを報告してきた⁴⁾。

一方、Jeong らは、新たなニンニク処理方法として、高温高压 (130℃, 2 時間) 処理すると抗酸化能が増強し、総ポリフェノール量も増量することを報告した⁵⁾。我々もオートクレーブを用いた簡便な方法で高温高压処理を行ったところ、ニンニク臭がなく強い抗酸化能を有するニンニクを作製することができた⁶⁾。また、その高温高压処理ニンニク (high temperature- and pressure-treated garlic ; HTPG) を 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) 誘発ラット大腸前がん病変形成実験におけるイニシエーション期に投与すると、前がん病変であるムチン枯渇巣 (mucin-depleted foci ; MDF) 形成を有意に抑制し、粘膜異型腺窩巣 (aberrant crypt foci ; ACF) 形成は抑制傾向を示すことを報告した⁷⁾。

そこで、我々はマウス皮膚二段階発がん実験で活性酸素が特に関与することが報告されている⁸⁾ ポストイニシエーション (プロモーション) 期に HTPG を投与し、MDF 発生に対する修飾作用を検討した。また、DMH 非投与群の血液学および血漿生化学的検査を行い、短期間投与であるが HTPG の生体に及ぼす影響を検討した。

1. 実験方法

(1) HTPG および試験試料の作製方法

HTPG は次のように作製した。市販乾燥ニンニクスライス (甘利香辛食品(株), 京都) をパワーブレンダーで微粉末にした。その粉末 100 g にアリイナーゼ活性を失活させるために沸騰水 250 ml を加えオートクレーブで 150 分間、高温高压 (130℃, 0.18 MPa) 処理した後に凍結乾燥した。次いで、基礎飼料 (MF 粉末飼料, オリエンタル酵母工業(株)) に HTPG を 3% または 1% の割合で混餌して実験に供した。

(2) MDF および ACF 解析

実験は、Yoshimi ら⁹⁾ の方法に準じ図 1 に示すプロトコルで行った。4 週齢雄性 F344 ラットを 1 週間の馴化飼育後に 1~5 の 5 群に分け、全群に基礎飼料を与えた。そして、DMH 投与群は実験開始時と 1 週間後の計 2 回、DMH を 40 mg/kg 体重用量で皮下投与した。DMH の最終投与 1 週間後より 1 群 ($n=14$) には基礎飼料、2 群 ($n=14$) には 3% HTPG 食、3 群 ($n=12$) には 1% HTPG 食を実験終了までの 6 週間与えた。一方、DMH 非投与群も試料投与は DMH 投与群と同様に行い、4 群 ($n=7$) には基礎飼料、5 群 ($n=6$) には 3% HTPG 食を与えた。実験開

図 1 実験プロトコール

(ポストイニシエーション期での検討)

始 8 週間後に全てのラットをエーテル麻酔下で心臓採血にて屠殺剖検した後、大腸を摘出した。大腸内部を生理食塩水で洗浄した後に長軸方向に切り開き、10% 中性リン酸緩衝ホルマリンで 24 時間固定した。そして、結腸直腸部位の MDF と ACF を次のように解析した。固定した大腸を 3% 酢酸で 5 分間洗浄後、1% アルシアンブルー溶液 (pH 2.5) で 30 分間染色した。その後、非特異的染色抑制に 3% 酢酸で 10 分間、最後に蒸留水で洗浄し光学顕微鏡にて計測した。また、実験期間中は一般状態の観察と飼料摂取量測定を毎日、体重は週 2 回測定した。

なお、これらの実験は藤田保健衛生大学動物実験委員会の承認を受けて、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号) を遵守して行われた。

(3) 血液学および血漿生化学的検査

DMH 非投与群の血液 (基礎飼料群: $n=6$, 3% HTPG 群: $n=5$) を用いて、以下の 8 項目の血液学的検査を多項目自動血球計数装置 K-4500 (シスメックス(株), 神戸) を用いて計測した。赤血球数 (RBC), ヘモグロビン量 (HB), ヘマトクリット値 (HT), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH), 平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC), 白血球数 (WBC), 血小板数 (PLT)。

また、血漿を用いて次の 18 項目の生化学的検査を自動分析装置コバスインテグラ 400 (ロシュ・ダイアグノスティックス(株), 東京) を用いて計測した。総タンパク (TP), アルブミン (ALB), 尿酸 (UA), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (CRE), グルコース (GLC), トリグリセライド (TG), 総コレステロール (T-CHO), HDL-コレステロール (HDL), 総ビリルビン (T-BIL), 乳酸脱水素酵素 (LDH), クレアチンキナーゼ (CK), アミラーゼ (AML), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP), アルカリフォスファターゼ (ALP), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), カルシウム (Ca), さらに、ナトリウム (Na), カリウム (K), およびクロール (Cl) を電解質分析装置

STAX-2 ((株)テクノメディカ, 横浜) で測定した。

(4) 統計処理

MDF および ACF 発生数の統計学的評価は Dunn または Dunnett の多重比較検定で行った。また、血液学および血漿生化学的検査の評価は Student の t 検定で行った。

2. 実験結果

(1) 体重の推移, 平均飼料摂取量および臓器重量の比較

DMH 投与群では体重変化および平均飼料摂取量は、各群間において有意な変化はみられなかった (データ省略)。また、主要臓器 (肝臓, 腎臓, 脾臓) の絶対重量も各群間で有意な変化はみられなかった (データ省略)。一方、相対重量 (体重 100 g 当たり) では 3% HTPG 群の左腎臓が基礎飼料群に対して有意に ($p<0.01$) 高値を示したが、1.1 倍と軽度の増加であった。

DMH 非投与群も DMH 投与群と同様に体重変化, 平均飼料摂取量および主要臓器絶対重量は、各群間で有意な変化はみられなかった (データ省略)。しかし、右腎と脾臓の相対重量では 3% HTPG 群が基礎飼料群に対して有意に ($p<0.05$) に高値を示したが、いずれも 1.1 倍の増加であった。

なお、DMH 投与群と非投与群でともにみられた 3% HTPG 群での相対重量増加は、同群のわずかな体重減少を反映した結果と考えられた。

(2) 大腸前がん病変解析 (図 2)

MDF 評価は、総 MDF 数および MDF 腺窩数 (MDF を構成する全腺窩数) とともに、基礎飼料群に対して 1% HTPG 群では抑制効果はみられなかったが、3% HTPG 群では有意に低個数であった (抑制率はそれぞれ 30%, 32%)。

一方、ACF 評価では ACF 数および大型 ACF 数とも、基礎飼料群に対して両 HTPG 群では有意な変化はみられなかった。

(3) 血液・血漿生化学的検査 (表 1)

血液学的検査では、HT と MCHC で有意な変動を認めた。しかし、これらは正常域範囲内の変化で、また、他のパラメーターには変化がないことより、HTPG 投与に関連のない変化と判断した。

血漿生化学的検査では、T-CHO, HDL, T-BIL および Ca において有意な変動が認められた。しかし、HTPG 群のこれらの値はいずれも基礎飼料群に対して低値 (4~38% 減少) を示したものであり、毒性学的にも意義のない変化と考えられた。

3. 考察

我々は既に HTPG の MDF 形成に対するイニシエーション期の検討において、HTPG がその発生を有意に抑制し、その抑制メカニズムの 1 つとして、DNA 付加体形成抑制、肝臓第 1 相解毒酵素シトクロム P450-2E1 (CYP2E1) の活性低下および第 2 相解毒酵素キノンレダクターゼ (QR) とグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 活性

図 2 Mucin-depleted foci (MDF) と Aberrant crypt foci (ACF) の評価

測定値は平均値±標準誤差で表示。

^a $p < 0.05$ vs 基礎飼料群 (Dunn's multiple comparisons test).

増強が考えられることを報告してきた⁷⁾。

今回の MDF および ACF 形成に対するポストイニシエーション期 (プロモーション期) の検討では, MDF 形成において 3% HTPG 群で有意な抑制効果がみられた。Yoshimi ら⁹⁾ はこの ACF と MDF を病理組織学的に比較検討した結果, ACF は過形成, MDF は異形成と診断される組織病変であり, また MDF には β -カテニン蓄積変異巢が認められ, MDF が大腸腫瘍発症を反映する優れたバイオマーカーであると報告している。それに対して抑制効果がみられなかった ACF は, その出現部位と実際の大腸がんの発生部位が一致しないこと¹⁰⁾, また ACF を抑制しても発がん実験においては腫瘍発生を促進する例もあること¹¹⁾ などから, 大腸前がん病変といえるかは疑問とされている。HTPG はイニシエーション期およびポストイニシエーション期の投与で MDF 形成抑制効果を示し, ラット大腸がんを抑制する可能性が示唆された。HTPG はオートクレーブ処理によりアリイン-アリイナーゼ系によるスルフィド系のイオウ化合物が生成されずニンニク特有の臭いが少なくなり, 粉末色はメイラード反応により褐色になっている。これは熟成ニンニク抽出液 (Aged garlic ex-

tract, AGE) に類似していると思われ, 含有成分の類似も推測される。Imai ら¹²⁾ は AGE に水溶性硫黄化合物の S-アリルシステイン (SAC) と S-アリルメルカプトシステインが, Ryu ら¹³⁾ はメイラード化合物であるフルクトシルアルギニンが, Ichikawa ら¹⁴⁾ はテトラヒドロ- β -カルボリン誘導体が増加しており, いずれも抗酸化成分であることを報告している。我々も HTPG 中の SAC を測定したところ, 含有量はオートクレーブ処理前に対して 4.7 倍増量していた⁷⁾。さらに, 高温高圧による変化として総ポリフェノール含量が増加することが報告されているが⁵⁾, HTPG もその含量はオートクレーブ処理前に対して 24.9 倍増量していた⁶⁾。我々は SAC と総ポリフェノール以外は測定を行っていないが, 上述の成分が含有されていると推測され, ポリフェノール含量と抗酸化能が比例関係にあることも報告されている¹⁵⁾ ことより, 今回の抑制機序の 1 つとして抗酸化作用が考えられる。また, 6 週間と短期間の投与であったが, 臓器重量, 血液学的および血漿生化学的検査において, HTPG 投与による影響と考えられる異常所見はみられなかった。

ニンニクの新たな処理法である高温高圧処理した HTPG

表 1 血液学および血漿生化学的所見

Group		基礎飼料群	3% HTPG 群
No. of animal		6	5
RBC	(10 ⁴ /μL)	890.3±13.3	857.4±8.6
HB	(g/dL)	15.6±0.2	15.3±0.1
HT	(%)	46.2±0.7	44.2±0.3*
MCV	(fL)	51.9±0.2	51.6±0.2
MCH	(pg)	17.5±0.1	17.8±0.2
MCHC	(g/dL)	33.7±0.2	34.5±0.2*
WBC	(10 ² /μL)	81.5±8.9	63.0±3.0
PLT	(10 ⁴ /μL)	54.9±4.0	63.2±2.2
TP	(g/dL)	6.75±0.07	6.59±0.10
ALB	(g/L)	4.40±0.06	4.46±0.06
UA	(mg/dL)	1.21±0.13	1.29±0.21
BUN	(mg/dL)	19.3±0.7	20.7±0.7
CRE	(mg/dL)	0.25±0.01	0.26±0.01
GLC	(mg/dL)	203.0±9.7	205.8±6.3
TG	(mg/dL)	312.7±22.7	263.3±20.1
T-CHO	(mg/dL)	63.5±1.5	58.5±1.1*
HDL	(mg/dL)	38.8±1.1	34.5±1.0*
T-BIL	(mg/dL)	0.82±0.06	0.59±0.06*
LDH	(U/L)	907.7±57.5	1040.8±246.6
CK	(U/L)	512.8±32.5	535.8±59.7
AML	(U/L)	2739.5±51.3	2575.5±62.9
LAP	(IU/L)	55.2±0.3	55.0±1.1
ALP	(IU/L)	1011.5±5.3	1084.2±31.0
ALT	(U/L)	44.2±3.4	36.8±3.6
AST	(U/L)	107.2±5.1	102.7±7.6
Ca	(mg/dL)	11.4±0.1	10.9±0.1**
Na	(mmol/L)	140.9±0.47	141.1±1.3
K	(mmol/L)	4.10±0.06	4.12±0.1
Cl	(mmol/L)	98.0±0.5	98.2±1.0

測定値は平均値±標準誤差で表示。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs 基礎飼料群 (Student's *t*-test)。

は、イニシエーション期およびポストイニシエーション期の投与において大腸前がん病変の MDF 形成を有意に抑制した。これらの結果とともにニンニクの無臭化の見地、さらに推測される含有成分と血液学および血漿生化学的検査においてその投与による影響がみられないことを考え合わせると、HTPG は健康食品素材として有用かもしれない。

4. 要 約

ニンニクの新たな処理法である高温高压処理したニンニク (HTPG) を用い、1,2-ジメチルヒドラジン誘発ラット大腸前がん病変形成に対するポストイニシエーション期投与の影響を検討した。その結果、HTPG の 3% 混餌群では大腸前がん病変であるムチン枯渇巣 (MDF) 形成を有意に抑制した。また、血液学および血漿生化学的所見では HTPG 投与による影響はほとんどみられなかった。我々はこれまでに HTPG がイニシエーション期投与によっても MDF 形成を有意に抑制することや抗酸化能が増強するこ

とを報告しており、これらの結果と考え合わせる HTPG は健康食品素材として有用かもしれない。

文 献

- 1) 角慎一郎, ニンニク特有成分の吸収・代謝・排泄, 「ニンニクの科学」, 第 1 版, 齋藤 洋編, (朝倉書店, 東京), pp. 133-143 (2000).
- 2) Pentz, R. and Siegers, C-P., Garlic preparations : methods for qualitative and quantitative assessment of their ingredients. In "Garlic : the Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species," 2nd ed, eds. Koch, HP, and Lawson, LD, (Williams & Wilkins, Baltimore), pp. 109-134 (1996).
- 3) Koch, HP., Nonmedicinal applications of garlic and curiosities. In "Garlic : the Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species," 2nd ed, eds. Koch, HP, and Lawson, LD, (Williams & Wilkins, Baltimore), pp. 229-233 (1996).
- 4) Shimpo, K., Chihara, T., Kaneko, T., Shinzato, M., Beppu, H., Hoshino, M., Ida, C., Shamoto, M. and Kuzuya, H., Inhibitory effects of heated garlic on *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis in the duodenum and jejunum of C57BL/6 mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **3**, 339-344 (2002).
- 5) Jeong, H-S., Woo, K.S., Kwon, O.C., Kim, T.M., Kwon, H. J., Ban, J.O., Kim, D.J. and Hong, J.T., Antioxidative and cytotoxic activities of garlic (*Allium sativum* L.) on the high temperature and pressure treatment, 日本がん予防学会第 13 回プログラム・抄録集, p. 26, 京都 (2006).
- 6) 戸松亜希子, 千原 猛, 金児孝晃, 別府秀彦, 園田 茂, 新保 寛, 高温高压処理ニンニクの抗酸化能評価, 藤田学園医学会誌, **31**, 173-176 (2007).
- 7) Chihara, T., Shimpo, K., Kaneko, T., Beppu, H., Tomatsu, A. and Sonoda, S., Inhibitory effects of high temperature- and pressure-treated garlic on formation of 1,2-dimethylhydrazine-induced mucin-depleted foci and *O*⁶-methylguanine DNA adducts in the rat colorectum. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **10**, 827-831 (2009).
- 8) Wei, H. and Frenkel, K., Suppression of tumor promoter-induced oxidative events and DNA damage *in vivo* by Sarcophytol A : a possible mechanism of antipromotion. *Cancer Res.*, **52**, 2298-2303 (1992).
- 9) Yoshimi, N., Morioka, T., Kinjo, T., Inamine, M., Kaneshiro, T., Shimizu, T., Suzui, M., Yamada, Y. and Mori, H., Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci.*, **95**, 792-797 (2004).
- 10) 森 秀樹, 山田泰広, 広瀬善信, 前癌病変, 日本臨牀, **61**, 67-71 (2003).
- 11) Rao, CV., Wang, C-X., Simi, B., Lubet, R., Kelloff, G., Steele, V. and Reddy, B.S., Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res.*, **57**, 3717-3722 (1997).
- 12) Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H. and Itakura, Y., Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.*, **60**, 417-420 (1994).
- 13) Ryu, K., Ide, N., Matsuura, H. and Itakura, Y., *N*α-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-arginine, an antioxidant compound identified in aged garlic extract. *J. Nutr.*, **131**,

- 972S-976S (2001).
- 14) Ichikawa, M., Yoshida, J., Ide, N., Sasaoka, T., Yamaguchi, H. and Ono, K., Tetrahydro- β -carboline derivatives in aged garlic extract show antioxidant properties. *J. Nutr.*, **136**, 726S-731S (2006).
- 15) Tzulker, R., Glazer, I., Bar-Ilan, I., Holland, D., Aviram, M. and Amir, R., Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9559-9570 (2007).
- (平成 22 年 10 月 1 日受付, 平成 22 年 12 月 13 日受理)
-