

## 平成 25 年度豆類振興事業調査研究（雑豆需要促進研究）成果概要

- 1 課題名 「豆類食物繊維摂取による発がん予防に関する研究」
- 2 研究者 研究代表者 栗原 伸公（神戸女子大学・家政学部・教授）  
共同研究者 山根 千弘（神戸女子大学・家政学部・教授）  
研究協力者 橋本 弘子、岩渕 友香、瀬川悠紀子  
花田 奈央、松田のぞみ（神戸女子大学家政学部）

### 3 成果概要

#### (1) 研究目的

がんによる死亡者数は年々増加し、わが国の死因のうちほぼ3割を占めていることから、治療法とともに予防法の開発が急がれている。さまざまな疫学データにより食物繊維摂取による死亡率低下が示唆されているものの、有意な低下は見られなかったという大規模調査の報告も複数あり、未だ明確なエビデンスは得られていない。この仮説が決着を見ない理由のひとつとして、発がん予防効果のメカニズムを実験的に示した基礎研究がほとんどないことがあげられる。そうした中、は、先行研究において、経口摂取した食物繊維セルロースが、腸内に投与した発癌性複素環状アミン Trp-P-1 を吸着し、その体内への吸収を阻害したという基礎的データを得た。このデータは、食物繊維がある種の発癌物質の腸管からの吸収を抑制する可能性があることを示唆したものである。

豆類は食物繊維を多く含んでいることから、発がん予防に有効である可能性があることは以前より指摘されている。しかし、その予防効果あるいはそれにつながる現象を動物実験等で直接的に示した報告は多くは見られない。

これらのことから、本研究では動物実験により、豆類の経口摂取が腸内に投与された発癌性複素環状アミン Trp-P-1（3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole）を吸着し、その体内への吸収を抑制するか否かを観察することにより、豆類摂取による発がん予防の可能性を検討することとした。

#### (2) 研究方法および手法

<実験飼料> 大豆、小豆、いんげん豆を約 10%含む実験飼料を標準飼料をベースに作成した。主としてラット標準食のコーンスターチの一部を豆類に置き換えることとしたが、脂質を多く含む大豆のみ、脂質を調整し、エネルギーを揃えた。

その結果、それぞれの餌は、セルロースを5%含む標準食に比べ、エネルギーは同じだが、食物繊維は大豆で4割、小豆、いんげん豆で約7-8割多く含むこととなった。同時に、脂質が約1割、たんぱくも2-3割多くなる一方、炭水化物は5%程度少ないものとなったが、これら主成分の変動は通常の食事の変動の範囲内と考えた。

<動物> 10週齢の雄SDラットを、4日間の予備飼育を経て、5群（n=8-9）に分け、上に示した ①標準食、②食物繊維除去食、③大豆食、④小豆食、⑤いんげん豆食をそれぞれ

れ 6 日間与えた。本動物実験のすべてのプロトコールは、神戸女子大学動物実験倫理委員会の承認のもと行った。

それぞれの餌を 6 日間投与後、三種混合麻酔（ドミトール 0.06mg/100g、ドルミカム 0.16mg/100g、ベトリファール 0.2mg/100g）下にて開腹し、十二指腸上部と回腸末端を絹糸（4-0）により結紮し小腸ループを作成した。Trp-P-1 溶液（500 $\mu$ g/5ml/匹）（DMSO で溶解後、pH7.0 リン酸緩衝液にて調製）を PE-50 カテーテルで小腸ループ内に注入し、Trp-P-1 溶液投与後、10 分間保持し、肝門脈および腹部大静脈から採血を行った。麻酔下での失血による安楽死後、小腸ループと肝臓を摘出した。

**<Trp-P-1 の抽出>** 腹部大動脈血・門脈血：血液を 2500rpm,10 分間遠心分離し血漿を分離した後、2 倍量のアセトニトリルを添加し攪拌後、15 分間、冷所にて静置しタンパク質を析出させ、遠心分離（1700g、15 分間）後、有機溶媒層を回収した。

小腸ループ内容物：小腸ループの内容物を pH7.0 リン酸緩衝液中に懸濁させ、遠心分離（3000rpm,50 分間）上澄み 10ml に 20mg のブルーレーオンを加え 37°C で 60 分間攪拌したのち、ブルーレーオンを取り出して超純水にて洗浄後、10ml のメタノール/NH<sub>3</sub>(50/1, v/v)混合液中に入れ、37°C で 20 分間振とうさせた。ブルーレーオンを取り出して、溶液を遠心濃縮（70 - 80 分）させ、得られた固形物にアセトニトリル/20mM リン酸二水素カリウム pH3.0 (60/40,v/v)を 500 $\mu$ l 加え溶解した。

肝臓：肝臓全体の重量を測定後、全体を肝臓 1g あたり 3ml の生理食塩水中でホモジナイズし、3ml を取り出し、3ml のアセトンを加え混合後、遠心分離にかけ（15000rpm,5°C,10 分間）上澄み 1.5ml に 25%NH<sub>3</sub>を加え、アンモニアを用いて pH10 に調製した。さらに 4ml の Hexane を加え混合し、3 層に分離させ有機層・白濁層を除去後、遠心濃縮を行い、得られた固形物にアセトニトリル/20mM リン酸二水素カリウム pH3.0 (60/40,v/v)を加え溶解した。

**<Trp-P-1 の測定>** 各液体サンプルは、フィルターでろ過した後、高速液体クロマトグラフィ（HPLC）（カラム： TOSO・TSK gel ODS-80TM 4.6mmID $\times$ 25cm、測定温度：40°C、測定波長：UV 263nm、測定流速：0.7ml/min、移動相：アセトニトリル/20mM リン酸二水素カリウム pH3.0 (60/40,v/v)）にて、Trp-P-1 の測定を行った。

### (3) 研究成果

**【結果】<体重および臓器重量>** 飼料投与開始時の各群の体重および 6 日間の飼料投与終了後の各群の体重(n=8-9)に有意な差は見られなかった

6 日間の飼料投与終了後の各群の小腸、肝臓の重量には有意差が見られなかったが、肝臓については各豆食群で標準食群、食物繊維除去食群に比べ、若干低くなる傾向が見られた。一方、盲腸重量については各豆食群では標準食群、食物繊維除去食群に比べ有意に上昇していた(P<0.01)。

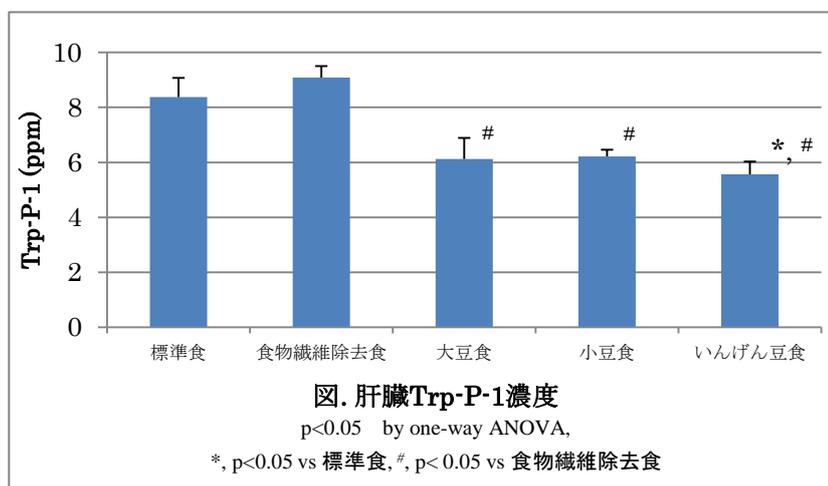
**<腹部大動脈血・門脈血 Trp-P-1 濃度>** 小腸ループに Trp-P-1 を注入し、10 分静置したあとに採血した腹部大動脈血・門脈血中の Trp-P-1 濃度については各群間に有意差は見られな

かった。なお、この際の抽出による回収率は42.6%であった。

＜小腸ループ内 Trp-P-1 量＞ 小腸ループ内の内容物から回収した Trp-P-1 量についても5群間に有意な差は見られなかった。なお、この際の抽出による回収率は36.1%であった。

＜肝臓中 Trp-P-1 濃度＞ 肝臓中 Trp-P-1 濃度には、一元配置分散分析により有意な差が認められた(図、 $p < 0.01$ )。

多重比較の結果、標準食群に比べ、いんげん豆食群で有意に低下( $P < 0.05$ )し、大豆食群、小豆食群では低下傾向が見られた( $P < 0.10$ )。食物繊維除去食群では、標準食群に比べやや高い値を示したが有意な差



は見られなかった。しかし、食物繊維除去食群に比べ、いんげん豆食群 ( $P < 0.01$ )、大豆食群 ( $P < 0.05$ )、小豆食群 ( $P < 0.05$ ) ではいずれも有意な低下が認められた。

【考察】各豆食群において、血漿中の Trp-P-1 濃度や小腸内容物に有意な差を認めることは今回はできなかったが、肝臓中の Trp-P-1 濃度は標準食群および食物繊維除去食群に比べ、低下傾向ないし有意に低下していた(図)。各豆食群の肝臓重量は、標準食群および食物繊維除去食群と比べて有意な差はなく、むしろ低下傾向が見られたことから、各豆食群では、肝臓に取り込まれた Trp-P-1 の量が少なかったために、その濃度が低下したものと考えられる。このことは、各豆食が発癌性複素環状アミン Trp-P-1 の腸管からの吸収を抑制した可能性を強く示唆している。

各豆食群が Trp-P-1 の吸収を抑制するとすれば、豆を摂取することにより、この発がん物質の吸収は抑制され、少なくともこれによって生じる発癌を予防する可能性があるものと考えられる。本実験では Trp-P-1 のみの検討であるが、少なくともこれと構造の近い他の発癌性複素環状アミン類も、同様の効果を示す可能性があるものと考えられ、今後他の発癌性複素環状アミン類やそのほかの発癌物質についても、各々同様の効果があるか否か検討することは大変意義深いものであるものと思われる。本研究はそれらの研究の礎となるものといえよう。

併せて、本研究の結果では、各豆食群は、3種類の豆をほぼ同じ割合で食餌に加えたのにもかかわらず、豆の種類によって肝臓における Trp-P-1 濃度に若干の差異が見られた。このことから、豆類に発癌予防効果があるとするれば、豆の種類によってその効果が異なる可能性が示唆されたものと考えられ、今後のさらなる検討により、本研究は、豆類摂取による効果的な発癌予防法の開発につながる可能性があるものと考えられた。