

1,2-ジメチルヒドラジンの害作用に対するセレン強化 カイワレダイコンスプラウトの影響

岡田 敏 英¹⁾, 福永 健 治¹⁾, 西山 利 正²⁾, 吉田 宗 弘^{1,3)}

(¹⁾関西大学工学部生物工学科食品工学研究室*, (²⁾関西医科大学公衆衛生学教室**

³⁾関西大学ハイテクノロジーリサーチセンター***)

Influence of Selenium-enriched *Kaiware Daikon* Sprouts on Adverse Effects Caused by 1,2-Dimethylhydrazine in Mice

Toshihide OKADA¹⁾, Kenji FUKUNAGA¹⁾, Toshimasa NISHIYAMA²⁾ and Munehiro YOSHIDA^{1,3)}

¹⁾Laboratory of Food and Nutritional Sciences, Department of Biotechnology,

Faculty of Engineering, Kansai University

²⁾Department of Public Health, Kansai Medical University

³⁾High Technology Research Center, Kansai University

Summary

To evaluate health-promotional functions of selenium (Se)-enriched *kaiware daikon* sprouts (SeS), influence of SeS on adverse effects caused by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) was compared with that of selenate or Se-unenriched sprouts (USeS). Male 3-week A/J mice were fed a diet containing a low level (0.15 $\mu\text{g/g}$) or a high level (2.0 $\mu\text{g/g}$) of Se as selenate or SeS or fed a diet containing the low or high level of selenate and USeS for 32 weeks. On the 1st to 5th week, all mice were administered with 20 mg/kg of DMH once a week. During the feeding, several mice were died. Supplementation with the both types of sprouts or the high level of selenate to the diets decreased the mortality. Low body weights were observed in mice fed the diets containing the high level of Se as selenate irrespective of supplementation with USeS. However, mice fed the diet containing the high level of Se as SeS did not show the low body weight. Lymphocyte permeation reaction (LPR) in large intestine was also examined in the all mice. Numbers of the LPR were decreased by supplementation with the high level of selenate or the both types of sprouts. In the present study, we could not confirm a difference between SeS and USeS in the influence on adverse effects by DMH. However, SeS can be used as a Se-enriched food without a high side effect since its toxicity is considered to be lower than selenate.

必須微量ミネラルであるセレンは、疫学研究や動物実験において、抗腫瘍活性のあることが確認されている^{1, 2)}。最近では、皮膚がん既往者を対象とした疫学的介入試験において、栄養的必要量を超えるセレンの投与が全がんの発生と死亡の相対危険度を低下させたと報告されており³⁾、高セレン含量の食品やセレンサプリメントに対する関心が高まっている。動物実験においては、セレン強化土壌で栽培したセレン強化ニンニクやブロッコリに含有されるSe-メチルセレンシステインなどの特殊な含セレンアミノ酸の抗腫瘍活性が、他のセレン化合物よりも高いことが報告されている^{4, 5)}。

*所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

**所在地：守口市文園町10-15 (〒570-8506)

***所在地：吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

われわれは、カイワレダイコンをはじめとする多くの野菜類の種子を亜セレン酸溶液で発芽・水耕することによって、Se-メチルセレンシステインを高濃度に含有するセレン強化スプラウトが調製できることを報告した⁶⁾。本研究では、調製したセレン強化カイワレスプラウトの抗腫瘍活性を検討する目的で、大腸がん誘発剤1,2-ジメチルヒドラジンの投与がマウスに起こす害作用を強化スプラウトがどの程度軽減させるかを調べた。

実験方法

セレン強化カイワレダイコンスプラウトの調製：セレン濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の亜セレン酸ナトリウム溶液を浸した脱脂綿上にカイワレダイコンの種子を播いて発芽させ、明所において25°Cで約1週間栽培して、セレン強化カイワレダイコンスプラウト（セレン濃度、135 $\mu\text{g}/\text{g}$ dry weight）を調製した⁶⁾。また、蒸留水を浸した脱脂綿上で同様にカイワレダイコンを栽培し、セレン非強化カイワレスプラウト（セレン濃度、 $< 0.01 \mu\text{g}/\text{g}$ dry weight）を調製した。いずれのスプラウトも凍結乾燥粉末として飼料調製に用いた。

マウスの飼育と処理：3週齢のオスのA/Jマウス70匹を10匹ずつA～Gの7群に分け、A～D群には基本飼料（マウスに対する標準精製飼料であるAIN-93G飼料⁷⁾からセレン酸ナトリウムを除いたもの）にセレン源としてセレン酸ナトリウムまたはセレン強化スプラウトをセレン濃度0.15または2.00 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加した飼料、E～G群にはセレン濃度0.15または2.00 $\mu\text{g}/\text{g}$ のセレン酸ナトリウムとセレン非強化スプラウトを添加した飼料を投与し、32週間飼育した。E～G群飼料へのセレン非強化スプラウトの添加量は、BおよびD群飼料へのセレン強化スプラウトの添加量（1.1または14.8 mg/g）に合わせた。各群飼料に添加したセレン供給源とスプラウトの種類および添加量をTable 1にまとめた。

飼育開始1週目から5週目までの間、すべてのマウスに、週1回、生理食塩水に溶解した1,2-ジメチルヒドラジン二塩酸塩20 mg/kgを背部皮下に注射した。飼育期間終了後、すべてのマウスを解剖し、大腸を摘出した。摘出した大腸は、十分に洗浄し、縦に切断後、粘膜側を表にして濾紙に貼り付け、methacarn溶液（メタノール：クロロホルム：酢酸=6：3：1）に10分間浸漬した。その後、濾紙から剥がし、肛門側から巻いて渦状とし、再びmethacarn溶液に一夜浸漬して固定した。固定した渦状の大腸をパラフィン包埋後、渦状に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行なって組織標本とし、光学顕微鏡（ $\times 40$ ）で観察した。

Table 1 Source of selenium, type of kaiware sprouts and their supplementary levels in diet of each group

Group	Selenium added		Kaiware sprouts added	
	Source	Level ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Type	Level (mg/g)
A	Selenate	0.15	—	No addition
B	SeS	0.15	SeS	1.1
C	Selenate	2.00	—	No addition
D	SeS	2.00	SeS	14.8
E	Selenate	0.15	USeS	1.1
F	Selenate	0.15	USeS	14.8
G	Selenate	2.00	USeS	14.8

SeS: Selenium-enriched sprouts. USeS: Selenium-unenriched sprouts.

結果と考察

32週間の飼育期間中に、9匹のマウスが死亡した。死亡したマウスの内訳は、A群が4匹、C群が2匹、D、E、F群がそれぞれ1匹ずつだった。 Spraウトが未添加で、低水準のセレン ($0.15 \mu\text{g/g}$) を添加した飼料を与えたA群にもっとも死亡例が多かったことは、1,2-ジメチルヒドラジンの害作用に対して、Spraウト添加もしくは高水準 ($2.00 \mu\text{g/g}$) のセレン添加が抑制的に作用したことを示唆している。

Table 2に飼育期間終了まで生存した各群マウスの体重をまとめた。セレン酸ナトリウムをセレン濃度 $2.00 \mu\text{g/g}$ の高水準で含有する飼料を与えたC群とG群の体重が有意に少なかった。マウス用精製飼料としてもっとも一般的なAIN93G飼料のセレン濃度が $0.17 \mu\text{g/g}$ であることから⁷⁾、飼料中セレン濃度 $2.00 \mu\text{g/g}$ は至適濃度の10倍以上に相当する。ゆえに、これら両群マウスで観察された低体重は、セレン自身の害作用である可能性が高い。しかし、C、G群と同様の高水準セレンをセレン強化Spraウトとして与えたD群マウスでは、低体重は観察されなかった。高水準のセレン酸ナトリウムとセレン非強化Spraウトを与えたG群には低体重が出現していることから、セレン強化Spraウトを高水準で与えたD群マウスにおいて体重が維持できたのは、Spraウトの成分がセレンの毒性を抑制したのではなく、セレン強化Spraウト中のセレンの分子種が、セレン酸ではなく、Se-メチルセレノシステインである⁶⁾ ためと考えられる。すなわち、セレン強化Spraウト中のセレンの害作用は、セレン酸ナトリウムよりも小さいといえよう。

1,2-ジメチルヒドラジンは実験動物に大腸がんを誘発することが知られている⁸⁾。しかし本実験において、解剖時に大腸を肉眼で観察したところ、明らかな腫瘍の形成を認めたマウスは7匹にとどまり、特定の群に偏る傾向はなかった。一方、大腸全体を渦状に巻いてから作成した組織標本を光学顕微鏡 ($\times 40$) で観察したところ (Fig. 1)、すべての標本において、Fig. 1b~dに示すような、リンパ球の集合したリンパ球浸潤反応巣が観察された。リンパ球浸潤反応巣は生体防御反応の一つであり、腫瘍形成に先立って生ずることが知られている^{9, 10)}。そこで本実験では、リンパ球浸潤反応巣を1,2-ジメチルヒドラジンが誘発する大腸がんの前段階と位置づけ、各マウスから調製した大腸粘膜組織標本を光学顕微鏡下 ($\times 40$) で精査し、反応巣を計数してセレンおよびSpraウトの抗腫瘍効果を評価することにした。

Table 3はリンパ球浸潤反応巣の計数結果を各群間で比較したものである。全群中、Spraウトが未添加で低水準のセレン酸ナトリウムのみを添加した飼料を摂取したA群において、もっとも多くのリンパ球浸潤反応巣が観察された。飼育期間中の死亡率もA群がもっとも高かったことから、飼育期間中のマウスの死亡とリンパ球浸潤反応巣の増加には関連があるのかもしれない。セレン酸ナトリウムの高水準添加のみ (C群)、セレン酸ナトリウムとセレン非強化Spraウトの低水準添加 (E群) は、いずれも大腸のリンパ球浸潤反応巣数の減少を起こしており、セレンおよびSpraウトのいずれも効果があることが確認された。しかし、B群 (セレン強化Spraウト低水準添加) とE群 (セレン非強化Spraウト低水準添加) の比較、およびD群 (セレン強化Spraウト高水準添加) とG群 (セレン非強化Spraウト高水準添加) の比較で明らかなように、セレン強化Spraウトとセレン非強化Spraウトの効果の差は認められなかった。また、Spraウト添加水準のみが異なるB群とD群の比較、およびE群とF群の比較から明らかなように、Spraウト

Table 2 Body weight of mice after 32-wk feeding on experimental diet

Group	Number of mice	Body weight (g)
A	6	$27.8 \pm 1.9^{\text{ab}}$
B	10	$30.9 \pm 1.5^{\text{b}}$
C	8	$25.1 \pm 1.7^{\text{a}}$
D	9	$30.0 \pm 1.0^{\text{b}}$
E	9	$27.8 \pm 1.9^{\text{ab}}$
F	9	$30.4 \pm 1.6^{\text{b}}$
G	10	$25.8 \pm 0.9^{\text{a}}$

Values are means \pm SEM. Values in the same column not sharing a common superscript differ significantly by PLSD test after ANOVA.

添加水準の影響も認めることはできなかった。さらにセレン酸ナトリウムの高水準添加群（C群）とスプラウト添加群（B, D～G群）との差も統計的には明確でなかった。カイワレダイコンをはじめとするアブラナ科植物には抗腫瘍効果を有するスルホラファンをはじめとするイソチオシアネート化合物が高濃度に含有されている¹¹⁾。このため、セレン非強化カイワレダイコンスプラウトの低水準（1.1 mg/g）添加においても、大腸におけるリンパ球浸潤反応巣の形成を十分に抑制したと推察される。また先に述べた飼育期間中の死亡率に低減にも、このイソチオシアネート化合物がかかわっている可能性は高い。ゆえにセレン強化スプラウトの効果を検証するには、より低添加水準での比較、あるいは有効セレン成分であるSe-メチルセレノシステインそのものを用いての実験が必要と考えられる。

本実験では、1,2-ジメチルヒドラジン投与が起す害作用に対するセレン強化スプラウトの特異的抑制効果は確認できなかった。しかし、セレン強化スプラウトを高水準（2.0 $\mu\text{g/g}$ ）で投与したとき、同じセレン投与水準のセレン酸ナトリウムで認められた低体重が出現しなかったことから、セレン強化スプラウトは無機セレン化合物より毒性が低く、低副作用のセレン強化食品として利用できる可能性があると考えられる。

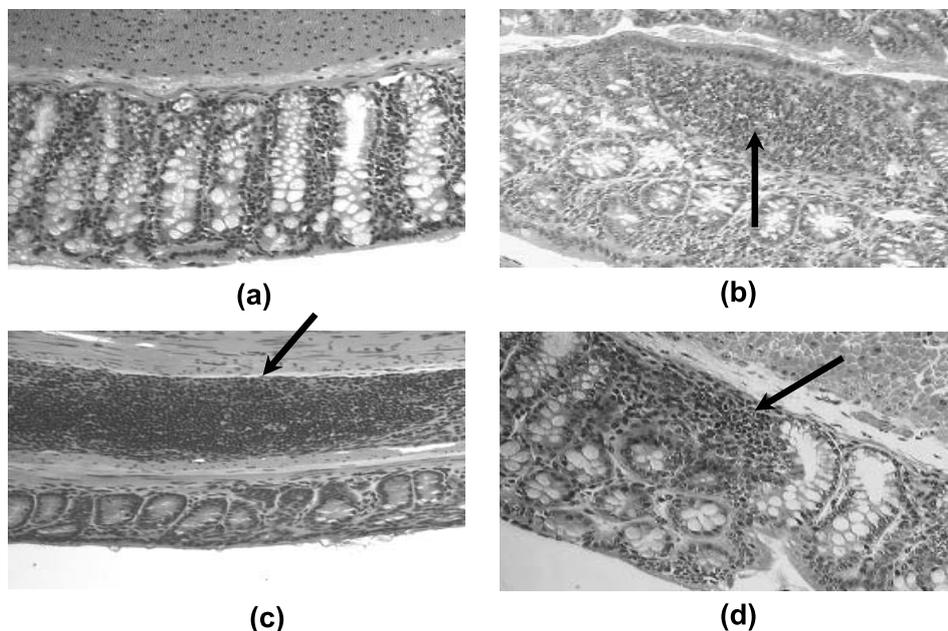


Fig. 1 Microscopic image ($\times 40$) of large intestine of mice administered with 1,2-dimethylhydrazine; (a), normal area; (b) to (d), area with lymphocyte permeation reaction indicated by arrows.

Table 3 Number of lymphocyte permeation reaction in tissue sample from large intestine of mice

Group	Number of mice	Lymphocyte permeation reaction (number/sample)
A	6	21.3 \pm 1.8 ^b
B	10	15.8 \pm 1.7 ^a
C	8	17.0 \pm 0.8 ^{ab}
D	9	16.8 \pm 1.5 ^a
E	9	14.9 \pm 1.6 ^a
F	9	14.2 \pm 1.2 ^a
G	10	15.1 \pm 0.8 ^a

Values are means \pm SEM. Values in the same column not sharing a common superscript differ significantly by PLSD test after ANOVA.

参考文献

- 1) Combs GF Jr, Gray WP (1998) Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 79: 179-192.
- 2) Schrauzer GN (2000) Anticarcinogenic effects of selenium. *CMLS Cell Mol. Life Sci* 57: 1864-1873.
- 3) Duffield-Lillico AJ, Reid ME, Turnbull BW, Combs GF Jr, Slate EH, Fischbach LA, Marshall JR, Clark LC (2002) Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the nutritional prevention of cancer trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 630-639.
- 4) Ip C, Birringer M, Block E, Kotrebai M, Tyson JF, Uden PC, Lisk DJ (2000) Chemical speciation influences comparative activity of selenium-enriched garlic and yeast in mammary cancer. *J Agric Food Chem* 48: 2062-2070.
- 5) Dong Y, Lisk D, Block E, Ip C (2001) Characterization of the biological activity of γ -glutamyl-Se-methylselenocysteine: A novel naturally occurring anticancer agent from garlic. *Cancer Res* 61: 2923-2928.
- 6) Sugihara S, Kondô M, Chihara Y, Yûji M, Hattori H, Yoshida M (2004) Preparation of selenium-enriched sprouts and identification of their selenium species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 193-199.
- 7) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
- 8) Rogers AE, Nauss KM (1985) Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig Dis Sci* 85: 87S-102S.
- 9) 宇佐見詞津夫, 佐藤幹則, 松本幸三, 西脇慶治, 大久保憲, 小谷彦蔵, 由良二郎 (1990) 大腸癌間質の組織反応について. *日外会誌* 91: 667-676.
- 10) 田中良哉 (1997) 腫瘍浸潤リンパ球と接着分子. *臨床免疫* 29: 815-822.
- 11) Matusheski NV, Jeffery EH (2001) Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J Agric Food Chem* 49: 5743-5749.