

ジメチルヒドラジン投与マウスにおける大腸異型陰窩巢形成に及ぼす 亜セレン酸とセレン強化カイワレダイコンスプラウトの抑制効果

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**)

Inhibitory Effect of Selenite and Se-enriched Kaiware Radish Sprouts on Formation of Aberrant Crypt Foci in Colon of Mice Administered 1,2-Dimethylhydrazine

Toshihide OKADA¹⁾, Kenji FUKUNAGA¹⁾, Toshimasa NISHIYAMA²⁾, 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 anti-carcinogenic activity of selenite and selenium (Se)-rich kaiware daikon sprouts (Se sprouts), their inhibitory effects on formation of aberrant crypt foci (ACF) were evaluated in colon of mice administered 1,2-dimethylhydrazine (DMH). Male 4-week A/J mice were divided into 7 dietary groups and fed a casein-based low Se basal diet (Se content: 0.03 µg/g) or the basal diet supplemented with selenite, Se-sprouts (Se content: 135 µg/g dry basis) or selenite + control sprouts (Se content: < 0.01 µg/g dry basis) at a level of 0.05 or 0.10 µg Se/g for 9 weeks. After 1 week of feeding, mice in all dietary groups were given six subcutaneous injections, separated by 1 week, of DMH (20 mg/kg body weight). Several number of mice fed the basal diet were injected with saline. Injection with DMH caused formation of a lot of number of ACF in colon of the mice fed the basal diet. Dietary supplementation with selenite at a level of 0.05 µg Se/g significantly inhibited the formation of ACF. However, this inhibitory effect of selenite was not observed in mice supplemented with selenite at a level of 0.10 µg Se/g. On the other hand, significant inhibitory effect of Se sprouts on the ACF formation was not observed in mice supplemented with Se sprouts at a level of 0.05 µg Se/g but observed in those at a level of 0.10 µg Se/g. Supplementation with control sprouts did not effect on the ACF formation.

セレンは、グルタチオンペルオキシダーゼをはじめとする酵素の活性中心にセレノシステイン残基として存在しており、栄養上必須の微量元素と位置付けられている。一方、疫学研究においては、低セレン状態は、多くのがんの発生にとって、リスクファクターであることが報告されている¹⁾。また、化学発がん剤を用いた動物実験においては、栄養レベルを超える投与量のセレン化合物に抗腫瘍効果のあることが認められている²⁾。これらのことから、セレン化合物やセレンを高濃度に含有する食品素材に対する「がん予防」の期待が高まっており、様々なセレンサプリメントが市場に流通している。動物実験においては、Se-メチルセレノシステイン (MSeC) のような、特殊な含セレンアミノ酸を含有

*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)

するセレン強化ニンニクやブロッコリの抗腫瘍効果が高いといわれており^{2,3)}、様々なセレン強化植物の調製が試みられている⁴⁾。われわれは、様々な野菜の種子を亜セレン酸溶液で水耕することにより、MSeCを高濃度に含有するセレン強化スプラウトが容易に調製できることを報告した⁵⁾。今回、セレン強化スプラウトの抗腫瘍効果を評価する目的で、化学発がん剤である1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) を投与したマウスを用いて、大腸前がん病変と位置付けられている異型陰窩巢 (Aberrant crypt foci: ACF) 形成に及ぼす亜セレン酸とセレン強化カイワレダイコンスプラウトの抑制効果を検討したので報告する。

実験方法

1. スプラウトの調製

カイワレダイコンの種子を、セレン濃度10 µg/mlの亜セレン酸ナトリウム水溶液に浸した脱脂綿上に播き、25℃で水耕することによりセレン強化カイワレダイコンスプラウトを調製した⁵⁾。また、対照スプラウトは、蒸留水を用いて同様に調製した。調製したカイワレダイコンスプラウトは、凍結乾燥後、細粉化し、実験に用いた。なお、セレン強化スプラウトの乾燥粉末のセレン含量は135 µg/g、対照スプラウトのセレン含量は0.01 µg/g未満だった。

2. 動物と投与飼料

4週齢のオスA/Jマウス83匹をA～H群 (A群は11匹、B群は12匹、C～H群は各々10匹) に分け、A、B群にはAIN93G飼料⁶⁾ からセレン酸ナトリウムを除いた低セレン基本飼料 (セレン含量、0.03 µg/g) を、C～H群には基本飼料に、Table 1に示すような、亜セレン酸ナトリウム、セレン強化カイワレダイコンスプラウトの凍結乾燥粉末、または亜セレン酸ナトリウム+対照スプラウトの凍結乾燥粉末を混合した飼料を与え、9週間飼育した。

3. DMHの投与

飼育開始8日目から1週間おきに6回、A群を除くすべてのマウスの背部皮下に、生理食塩水に溶解したDMH 20 mg/kgを注射した。

4. 大腸の摘出とACFの観察

飼育期間終了後、すべてのマウスをエーテル麻酔下で放血して処理し、大腸を摘出した。摘出した大腸は、切開し、十分に洗浄して内容物を除去後、濾紙に貼り付け、10%中性ホルマリン溶液 (pH 7.4) で固定した。固定した大腸を0.02%メチレンブルー溶液で染色後、実体顕微鏡 (×40) で観察し、ACFを計数した。計数においては、ACFをfocusあたりのAC数の違い (focusあたり1, 2, 3, および4個以上に分類) によって分類した。

5. 統計解析

得られたデータは分散分析 (ANOVA) により評価し、群間の比較は最小有意差法 (PLSD test) によった。解析には統計解析プログラムのStatView-J ver. 5.0を用いた。

Table 1 Experimental diet and DMH treatment in each experimental group

Group	Supplements added to basal diet				Treatment of DMH
	Selenium		Freeze-dried sprouts		
	Source	Level (µg/g)	Type	Level (mg/g)	
A	—	—	—	—	—
B	—	—	—	—	+
C	Selenite	0.05	—	—	+
D	Se sprouts	0.05	Se	0.37	+
E	Selenite	0.05	Control	0.37	+
F	Selenite	0.10	—	—	+
G	Se sprouts	0.10	Se	0.74	+
H	Selenite	0.10	Control	0.74	+

結果と考察

Table 2に飼育期間終了時の各群マウスの体重をまとめた。DMH投与はマウスの体重を有意に低下させた。亜セレン酸ナトリウムの飼料への補足は、この体重減少を若干緩和する傾向を示した。一方、スプラウト乾燥粉末の補足は、セレン強化とは無関係に、DMH投与によるマウスの体重減少に影響を及ぼさなかった。

Table 3に大腸ACFの計数結果をまとめた。A群とB群の比較で明らかのように、DMH投与は大腸ACFの数を大幅に増加させた。B群と比較したとき、ACF数が有意に少なかったのは、0.05 µg Se/gの亜セレン酸ナトリウムを補足したC群とE群、および0.10 µg Se/gのセレン強化スプラウトを補足したG群だった。この結果は、セレンの補足水準が0.05 µg/gの場合には亜セレン酸、0.10 µg/gの場合にはセレン強化スプラウトにACF形成抑制効果があり、かつ、対照スプラウトにはACF形成抑制効果がないことを示している。

ACFは、Birdらによって、アゾキシメタン投与ラットおよびマウスの大腸に発見されたメチレンブルー濃染性の微小病変である⁷⁾。ACFは、病理学的には過形成であり、大きなものは腺腫に移行することから、大腸前がん病変として位置付けられている⁸⁾。またACFは、化学発がん剤投与4週間後には発現することから、セレンをはじめとする各種の発がん抑制物質を評価する実験においてバイオマーカーとして用いられている⁹⁾。ラットを用いた実験では、栄養レベルの約10倍量に相当する2.0 µg Se/gの亜セレン酸¹⁰⁾、セレノメチオニン¹¹⁾、セレン強化ブロッコリ³⁾の投与がACF形成抑制に効果があったと報告されている。栄養レベルに相当する低水準のセレン添加の効果を調べた研究は少ないが、ラットを用いた実験では、0.1 µg Se/gの亜セレン酸投与がACF形成を抑制している^{10, 12)}。今回のマウスを用いた実験では、セレン補足水準が0.05 µg/gの場合には亜セレン酸、0.10 µg/gの場合にはセレン強化スプラウトにACF形成抑制

Table 2 Body weight of each experimental group

Group	Supplements added to basal diet	Number of mouse	Treatment of DMH	Body weight ¹⁾ (g)
A	None	11	-	34.0 ± 1.3 ^d
B	None	12	+	29.5 ± 0.8 ^{abc}
C	Selenite (0.05) ²⁾	10	+	32.4 ± 0.9 ^{cd}
D	High-Se sprouts (0.05) ²⁾	10	+	30.4 ± 0.8 ^{bc}
E	Selenite (0.05) ²⁾ + normal sprouts	10	+	31.6 ± 0.7 ^{cd}
F	Selenite (0.10) ²⁾	10	+	31.0 ± 1.0 ^e
G	High-Se sprouts (0.10) ²⁾	10	+	27.1 ± 1.3 ^a
H	Selenite (0.10) ²⁾ + normal sprouts	10	+	27.9 ± 1.4 ^{ab}

¹⁾ Values are means ± SEM. Means not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$) based on ANOVA followed by PLSD test.

²⁾ Values express supplementary level at µg Se per g diet.

Table 3 Inhibitory effect of selenite and high-Se sprouts on formation of ACF in colon of DMH-treated mice

Group	Number of ACF per colon				Total ACF
	1	Number of AC per focus			
		2	3	≥ 4	
A	1.5 ± 0.8 ***	1.0 ± 0.4 ***	0.5 ± 0.2 ***	0.8 ± 0.3 **	3.8 ± 1.4 ***
B	10.2 ± 1.1	8.0 ± 1.2	3.4 ± 0.7	4.2 ± 1.0	25.8 ± 3.2
C	4.1 ± 0.7 ***	3.9 ± 1.0 ***	0.6 ± 0.4	1.7 ± 0.6 *	10.3 ± 2.1 ***
D	8.6 ± 1.1	8.9 ± 1.2	3.1 ± 0.7	6.1 ± 1.7	26.7 ± 3.6
E	5.7 ± 1.0 ***	4.9 ± 0.8 *	0.5 ± 0.2 ***	1.6 ± 0.4 *	12.7 ± 1.6 ***
F	8.1 ± 1.0	8.6 ± 1.1	1.7 ± 0.5 *	3.4 ± 0.5	21.8 ± 2.1
G	5.2 ± 1.3 ***	5.1 ± 1.0 *	0.5 ± 0.3 ***	1.2 ± 0.5 *	12.0 ± 2.1 ***
H	8.4 ± 1.2	8.0 ± 1.0	1.0 ± 0.3 ***	2.8 ± 0.7	20.2 ± 2.1

Values are means ± SEM. Significant difference was observed from B-group at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (***) by ANOVA followed by PLSD test.

効果を認めた。亜セレン酸のACF抑制効果が0.05 µg Se/gで生じ、0.10 µg Se/gで消失するという結果は、過去の報告において、亜セレン酸のACF抑制効果が0.1～2.0 µg Se/gの範囲で認められていることと矛盾する。今回の実験はマウスを、過去の実験はいずれもラットを用いていることから、実験動物の違いが原因である可能性は否定できない。また、過去の実験では、2.0 µg Se/gの亜セレン酸が統計的に有意ではないがACF形成数を増加したことや³⁾、葉酸欠乏下において2.0 µg Se/gの亜セレン酸がACF形成を有意に促進したことも報告されていることから¹³⁾、亜セレン酸のACF形成抑制効果の有効水準の範囲がきわめて狭く、高水準投与が逆効果を生じる可能性も考えられる。

今回、セレン強化スプラウトは0.10 µg Se/gの投与においてACF形成を抑制した。しかし、上述のごとく亜セレン酸が高水準投与において逆効果が生じる可能性を否定できないことから、セレン強化スプラウトにおいても0.10 µg Se/gを超える高水準投与の影響を検討する必要がある。かりに、セレン強化ブロッコリで認められているように³⁾、セレン強化スプラウトにおいて2.0 µg Se/gの高水準投与でも効果が継続していれば、腫瘍抑制効果が高く、かつ安全性にも秀でたセレン含有食品として期待できるが、今回の亜セレン酸のように有効な投与水準の範囲が狭い場合は、現実への応用は難しくなるだろう。今回の結果、および過去の実験結果は、セレンの抗腫瘍効果に関する実験が、わずかな条件(投与量、実験動物、セレンの形態、動物の栄養条件など)の違いによって異なった結果をもたらすことを意味している。ゆえに、現状においては、抗腫瘍効果を期待して、セレン化合物やセレン含有食品素材をサプリメントとして安易に摂取することは、控えることが賢明と思われる。

参考文献

- 1) Schrauzer GN (2000) Anticarcinogenic effects of selenium. *CMLS Cell Mol Life Sci* 57: 1864-1873.
- 2) 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.
- 3) Finley JW, Davis CD, Feng Y (2000) Selenium from high selenium broccoli protects rats from colon cancer. *J Nutr* 130: 2384-2389.
- 4) Finley JW (2005) Selenium accumulation in plant foods. *Nutr Rev* 63: 196-202.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Bird RP (1987) Observation and qualification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett* 37: 147-151.
- 8) 山下直行, 大鳥和彦, 桜澤信行, 田中宣威, 田尻 孝, 江角浩安 (2004) Aberrant crypt foci (ACF) の大腸発癌過程における位置付け. *消化器科* 38 : 543-548.
- 9) Reddy BS, Upadhyaya P, Simi B, Rao CV (1994) Evaluation of organoselenium compounds for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Anticancer Res* 14: 2509-2514.
- 10) Feng Y, Finley JW, Davis CD, Becker WK, Fretland AJ, Hein DW (1999) Dietary selenium reduces the formation of aberrant crypt in rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Toxicol Appl Pharmacol* 157: 36-42.
- 11) Baines AT, Holubec H, Basye JL, Thorne P, Bhattacharyya AK, Spallholz J, Shriver B, Cui H, Roe D, Clark LC, Earnest DL, Nelson MA (2000) The effect dietary selenomethionine on polyamines and azoxymethane-induced aberrant crypts. *Cancer Lett* 160: 193-198.
- 12) Davis CD, Uthus EO (2002) Dietary selenite and azadeoxycytidine treatments affect dimethylhydrazine-induced

aberrant crypt formation in rat colon and DNA methylation in HT-29 cells. J Nutr 132: 292 - 297.

- 13) Davis CD, Uthus EO (2003) Dietary folate and selenium affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation, global DNA methylation and one-carbon metabolism in rats. J Nutr 133: 2907 - 2914.