

## 食品添加物等の新機能性に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部  
研究者 広瀬 雅雄

**研究要旨** アントシアニン系色素を主成分とするムラサキトウモロコシ色素の発がん抑制作用について、ラット大腸中期発がん性試験法、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット乳腺発がん高感受性モデル及びラット肝中期発がん性試験法により解析した。ムラサキトウモロコシ色素は、各試験法の標準的スケジュールに従い、0.01, 0.1 及び 1%濃度で混餌投与した。その結果、ムラサキトウモロコシ色素は、乳腺発がんモデルでは用量依存的に腫瘍発生を抑制したが、大腸及び肝発がんに対しては明らかな作用を示さなかった。

### 分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科  
分子毒性学分野 津田洋幸
- (2) 香川大学医学部腫瘍病理学 今井田克己
- (3) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社学術部  
鈴木幸雄

### A. 研究目的

種々の天然物質のがん予防作用に関して多くの研究が進められているが、isothiocyanate のように予防物質として期待されていたものの中には (Yu et al., *Cancer Res.*, 58:402-8, 1998) 発がん性が認められるなど毒性面で問題となる物質も多い (Ogawa, Hirose et al., *Nutr. Cancer*, 40:134-9, 2001)。一方、現在多くの天然添加物が流通しており、これらの安全性については検討が進められている。それらの中には、ポリフェノール類や含硫化合物など、がん予防が期待される物質が数多く含まれているが、一般的にいずれの臓器組織を対象にした予防に関しても評価方法が複雑で、解析に長期間を要することから殆ど検討されていない。大腸発がんに関しては、予防物質のスクリーニングに用いられてきた腫瘍性病変を最終指標とした試験法は 30~40 週間と長期間を要することから、多数の物質を対象とした研究の立遅れがみられ、aberrant crypt foci (ACF) を指標にしたラット短期大腸試験法を用いた研究が多数報告されているが、中・長期試験での腫瘍発生と必ずしも一致しないものもあり (Zheng et al., *Carcinogenesis*, 20: 255-60, 1999)、適切な試験法を用いてがん予防物質を探索することが期待されている。乳腺発がんに関しては、腫瘍性病変を最終指標とした試験法が広く用いられているが、30~40 週間と長期間を要することから、多数の物質を対象とした研究の立遅れがみられる。一方、肝発がんに関しては、ラット肝における前がん病変として広く認知されている胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巣を指標とした肝中期発がん性試験法により、多数の化学物質の発がん修飾性が検証されている。本研究では、我々

が新たに開発した 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) とデキストラン硫酸 (DSS) の組合せ投与による腫瘍性病変を最終指標としたラット大腸中期発がん性試験法及びヒトプロト型 *c-Ha-ras* を導入したトランスジェニックラット (Hras128) 乳腺発がん高感受性モデル、前がん病変を指標として化学物質の発がん性を比較的短期間に高い信頼性を持って予測できるシステムとして確立されたラット肝中期発がん性試験法を用いて、既存添加物を中心としてそのがん予防作用を検討する。

今年度はトウモロコシの紫色の種子より抽出して得られ、アントシアニン系のフラボノイドである cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside を主成分とするムラサキトウモロコシ色素について検討を行った。ムラサキトウモロコシ色素の生体作用として、マウスに高脂肪食を与えた際の高レプチンを正常値に下げることが示されているほか (Tsuda et al., *J. Nutr.*, 133: 2125-30, 2003)、慢性毒性試験も行われ、その安全性は確認されている。また、DMH によるイニシエーション後、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) とムラサキトウモロコシ色素 (5%混餌) を同時投与したモデルにおいて、ムラサキトウモロコシ色素の大腸発がん抑制作用が報告されているが (Hagiwara et al., *Cancer Lett.*, 171: 17-25, 2001)、発がんプロモーション期における大腸発がん修飾作用については検討されていない。また、大腸以外の臓器での発がん抑制効果も期待されている。そこで今回、ラット大腸中期大腸発がん性試験法、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット乳腺発がん高感受性モデル及びラット肝中期発がん性試験法により最高 1%濃度で混餌投与した際の発がん修飾作用を検討した。

### B. 研究方法

(1) ラット大腸中期発がん性試験法では、6 週齢の F344 雄ラットを各群 30 匹の 4 群に分け、DMH (40mg/kg 体重) を 1 週間に 3 回皮下投与した後、DSS (1%) を 1 週間飲水投与し、DSS 投与終了後 1 週間は蒸留水及び基礎飼料のみを与えた。第 4 週より各群にムラサキトウモロコシ色素 (三栄源エ

フ・エフ・アイ株式会社)を0.01, 0.1及び1%濃度で7及び17週間混餌投与し、この間基礎飼料のみを与えた群を対照とした。投与期間終了後剖検時に摘出した大腸を切開し、0.2%のメチレンブルーにより粘膜染色を行い、実体顕微鏡下にてACFの計測を行った。その後、第10週剖検群については、大腸組織を短冊状に縦に3分割し、第20週剖検群については肉眼的にみられた結節の大きさを計測した後、大腸組織を短冊状に縦に3分割あるいは肉眼的に観察された結節性病変を全て切出し、パラフィン包埋切片、HE標本を作製し、病理組織学的検索を行った。

(2) ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット乳腺発がん高感受性モデルでは、7週齢の雌ラットにジメチルベンズ(a)アントラセン(DMBA, 25 mg/kg 体重)を1回強制経口投与した。翌日より、ムラサキトウモロコシ色素を0(9匹), 0.01(9匹), 0.1(10匹)及び1%(10匹)濃度で8週間混餌投与した。また、野生型ラットについても同様に行った。投与期間中、毎週、乳腺腫瘍の発生を触診で確認した。投与期間終了後、剖検を行い乳腺腫瘍を摘出、重量を測定した。

(3) ラット肝中期発がん性試験法では、6週齢のF344雄ラットを5群に分け、1から4群には肝発癌物質であるジエチルニトロサミン(DEN, 200mg/kg 体重)を1回腹腔内投与した。第5群にはDENの溶媒である生理食塩水を投与した。2週間後から、1から4群にはそれぞれ、ムラサキトウモロコシ色素を0, 0.01, 0.1及び1%濃度で混餌投与し、5群には1%のムラサキトウモロコシ色素を投与した。すべての動物は実験開始3週目で2/3肝部分切除を行った。実験は8週で終了して屠殺剖検し、肝臓を摘出、ホルマリン固定し、パラフィン包埋切片、HE染色標本を作製するとともに、抗GST-P抗体を用いて肝に対する免疫染色を行った。GST-P陽性細胞巢は画像処理装置を用いて定量的に解析し、肝臓の切片全体の面積に対する発生個数、ならびに面積を算出し、各群毎に統計学的に比較検討した。

(4) 使用したムラサキトウモロコシ色素は、三栄源エフ・エフ・アイ株式会社において、次の方法にて精製した(Lot. 040421)。イネ科トウモロコシ(*Zea mays* LINNE)の紫色の種子より、温時水又は弱酸性水溶液で抽出→固液分離→助剤ろ過→樹脂処理→減圧濃縮→殺菌(70°C)→冷却→スプレードライ→粉碎。

(倫理面への配慮) 動物実験は国立医薬品食品衛生研究所、名古屋市立大学大学院医学研究科あるいは香川大学の規定に従って行った。なお、屠殺は動物へ苦痛を与えないよう、エーテル深麻酔下、動脈からの脱血により行い、その他実験手技についても動物の愛護に十分配慮して行った。

## C. 研究成果

(1) ラット大腸中期発がん性試験法では、ムラサキトウモロコシ色素の投与による体重及び摂餌量への影響は、投与期間を通じて認められなかった。ACF

の発生数及び dysplastic foci, adenoma 及び adenocarcinoma の発生頻度及び発生数について、第10週剖検群では、ムラサキトウモロコシ色素の投与による影響は認められなかった。第20週剖検群においても、10週間剖検群の検索項目及び腫瘍体積について、ムラサキトウモロコシ色素の投与による影響は認められなかった。

(2) ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット乳腺発がん高感受性モデルでは、ムラサキトウモロコシ色素の投与による体重への影響は、投与期間を通じて認められなかった。DMBA投与後5週目よりヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットの全群において触知可能な乳腺腫瘍の発生がみられた。5週目において0, 0.01, 0.1及び1%群でそれぞれ44.4, 55.6, 20及び10%の頻度で触知可能な乳腺腫瘍がみられ、0.1及び1%群で発生抑制を示した。7週目においても、0及び0.01%群で77.8%, 0.1%群で50%, 1%群で30%の頻度で発生がみられ、0.1及び1%群で発生抑制を示した。8週目の剖検時には、肉眼的に全ての群のほぼ全ての個体に腫瘍発生が確認されたが、その発生率に群間の差はみられなかった。個体あたりの腫瘍数は、0, 0.01, 0.1及び1%の各群で6.2, 9.4, 5.4及び4.9個と1%群で減少傾向を示した。触診可能な1グラム以上の個体あたりの腫瘍数は、0, 0.01, 0.1及び1%の各群で1.7, 2.4, 1.6及び0.6個と1%で抑制していた。野生型ラットについては8週間の実験期間中、乳腺腫瘍の発生は殆ど認められなかった。

(3) ラット肝中期発がん性試験法では、1-4群における肝の単位面積あたりのGST-P陽性細胞巢の発生個数は0.86-1.26個/cm<sup>2</sup>、面積は0.24-0.37mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>であり、2-4群のいずれにおいてもDEN単独投与の1群と統計学的な有意差は見られなかった。なお、DENを投与せずムラサキトウモロコシ色素のみを投与した5群でのGST-P陽性細胞巢の発生は認められなかった。

(4) アントシアニン含量は、cyanidin-3-glucosideとして33.7%であった。アントシアニン以外のポリフェノールとして、エピガロカテキンが2.0%含まれていたが、カテキン、エピカテキン、エピカテキンガレート及びエピガロカテキンガレートについては検出限界未満であった。

## D. 考察

ラット大腸中期発がん性試験法では、DMH-DSS処置後に0.01, 0.1及び1%濃度で7あるいは17週間混餌投与した各群において、基礎飼料のみを与えた対照群と比較してACFの発生数及び腫瘍性病変の発生頻度、発生数、体積ともに明らかな影響は認められなかった。従って、本実験条件下においてムラサキトウモロコシ色素は大腸発がん抑制作用を示さないと判断された。文献的には、DMHによるイニシエーション後、PhIPとムラサキトウモロコシ色素を同時に混餌投与した実験において、有意な抑制作用が示されている(Hagiwara et al., Cancer Lett., 171: 17-25, 2001)。PhIPによる

ラット大腸発がんには DNA 付加体の形成と細胞増殖促進が関与していると報告されている (Ochiai et al., *Carcinogenesis*, 17: 95-8, 1996)。ムラサキトウモロコシ色素の主成分である cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside は抗酸化作用を示すことから (Tsuda et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 368: 361-6, 1999), PhIP との同時投与により酸化的ストレスを介した DNA 付加体の形成抑制により発がん抑制を示した可能性が考えられた (Mooney L.A. et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14: 237-42, 2005)。一方, 今回検討した DMH-DSS による大腸発がんモデルでは, DMH-DSS 処置 1 週間後からムラサキトウモロコシ色素を投与することにより, 発がんプロモーションに対する影響を検索したが, 明らかな作用を認めなかった。

ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット乳腺発がん高感受性モデルでは, 1%群において DMBA 誘発乳腺腫瘍の明らかな発生抑制が認められた。0.01%群では抑制はみられないが, 0.1%群においても抑制し, 用量依存性がみられた。今回, 示された結果は *c-Ha-ras* トランスジェニックラットを用いたものであり, 野生型においても同様の作用を示すか否か確認を要する。剖検時にほぼ全ての個体において乳腺腫瘍の発生がみられたことから, ムラサキトウモロコシ色素は腫瘍の発生を抑制するのではなく, 腫瘍の成長を抑制していることが示唆された。実際に 1 グラム以上の腫瘍数を比較すると, 1%群で低値を示した。我々はこれまで, ヒト正常型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットは乳腺発がん高感受性であることを示してきた。このラットでは TEB において MAPK リン酸化経路の活性化と細胞回転の亢進で示される細胞増殖能の亢進が背景にあり (発がん準備状態), 導入 *ras* 遺伝子の発がん物質による変異活性化がおこり, 早期にがんの発生に至ることが明らかとなっている。今後, ムラサキトウモロコシ色素の Ras 蛋白に与える影響, 及びその下流のシグナル伝達への影響など, その機構の解析を行う必要がある。

ラット肝中期発がん性試験法では, ムラサキトウモロコシ色素は肝発がんに対して抑制作用を示さなかった。しかし, 1%の高用量群でも前がん病変の発生の増加は見られず, 肝発がんの修飾作用を示さないことを明らかにした。

## E. 結論

ムラサキトウモロコシ色素の発がん抑制作用について, ラット大腸中期発がん性試験法, ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット乳腺発がん高感受性モデル及びラット肝中期発がん性試験法により, 最高 1%濃度の混餌投与により検討した。その結果, ムラサキトウモロコシ色素は, 本実験条件下では, 乳腺発がんモデルでは用量依存的に腫瘍発生を抑制したが, 大腸及び肝発がんに対しては明らかな作用を示さなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Hirose, M.: A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoint for detection of carcinogenesis modifiers - validation with known modifiers. *Cancer Lett.* (In press)
- (2) Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ueda, S., Shimizu, K., Ohki, M., Kusunoki, M., Sakakura, T., Yoshida, H. and Tsuda, H. Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human *c-Ha-ras* protooncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83: 43-56, 2004.
- (3) Park, C.B., Fukamachi, K., Takasuka, N., Han, B.S., Kim, C.K., Hamaguchi, T., Fujita, K., Ueda, S. and Tsuda, H. Rapid induction of skin and mammary tumors in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats by treatment with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene followed by 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Sci.*, 95; 205-210, 2004.
- (4) Naito, A., Suzuki, A., Ueda, S., Nomoto, H., Toriyama-Baba, H., Asamoto, M., and Tsuda, H. Preferential mammary carcinogenic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats, *Cancer Sci.*, 95: 399-403, 2004.
- (5) Fukamachi, K., Han, B.S., Kim C.K., Takasuka, N., Matsuoka, Y., Matsuda E., Yamasaki, T. and Tsuda, H. Possible enhancing effects of Atrazine and Nonylphenol on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene induced mammary tumor development in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats, *Cancer Sci.*, 95: 404-410, 2004.
- (6) Ichihara T, Miyashita K, Kawabe M, Imaida K, Asamoto M, Ogiso T, Tamano S, Hirose M, Shirai T. Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrole when given with NaNO<sub>2</sub> in the rat. *Journal of Toxicological Sciences*, 30: 1-6, 2005.
- (7) Zeng Y, Saoo K, Yokohira M, Takeuchi H, Yamakawa K, Matsuda Y, J.Q. Li, Imaida K. Dietary D-psicose, a rare sugar, does not show any modifying effects in a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 male rat. *J. Toxicol. Pathol.* (in press)

### 2. 学会発表

- (1) Imai, T., Onose, J., Hasumura, M., Cho, Y.M., Hirose, M.: Rapid induction of colorectal

tumors in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment - possible application for a new medium-term rat colon bioassay. 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (2005)

- (2) 今井田克己：「いわゆる'健康食品'を含む健康食品をめぐって」「機能性食品の安全性評価に関する基本的な考え方」日本食品化学学会 シンポジウム 大阪 (2004)
- (3) 横平政直, 竹内聖, 山川けいこ, 竿尾光祐, 松田陽子, 曾宇, 塩岡忠夫, 今井田克己：「ラット肝中期発癌性試験法(伊東法)を用いた各種 COX 阻害剤による肝発癌の修飾作用」日本癌学会総会 福岡 (2004)
- (4) 曾宇, 竿尾光祐, 松田陽子, 横平政直, 今井田克己：Modifying potential of dietary D-psicose, a rare sugar, in a medium-term liver carcinogenesis bioassay. 第 21 回日本毒性病理学会, 浜松 (2005)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし