

学 位 論 文 題 名

Studies on the effect of dietary fibers on morphological changes at an early carcinogenesis of colorectum

(大腸発ガン初期の形態変化に及ぼす食物繊維摂取の効果に関する研究)

学位論文内容の要旨

大腸ガンは主要な死因の一つであり、その発生率は増加し続けている。ガンの発生には遺伝的な要因だけではなく環境要因が大きく関与する事が知られている。特に消化器系ガンの場合、食餌成分は常にその上皮細胞と接しているので、主要な環境因子といえる。食事成分の中でも脂質の過剰摂取は大腸ガンの発生率を高める一方、食物繊維は大腸ガンを抑える可能性がある成分と考えられている。大腸発ガン研究では腫瘍の数やその発生頻度を指標としているものが多い。しかし、大腸ガンの予防という観点から考えると、発ガンに至る前兆をより早期に評価することが必要になる。発ガン剤や放射線照射などのイニシエーション処理をすると、数時間後から大腸クリプト下部に上皮細胞のアポトーシスが見られる。大腸クリプト下部には幹細胞が存在することから、大腸ガンが上皮細胞の異常増殖と考えると、このアポトーシスは上皮細胞の増殖と死のバランスに少なからず影響を与えると考えられる。また、腫瘍ができるより前に観察される形態変化として、クリプト部分の上皮細胞の異常増殖である aberrant crypt foci (ACF)がある。これは腫瘍を発生させる場合より、比較的低い発ガン剤投与量、短期間で観察されるだけでなく、大腸ガンを患うヒトの結腸粘膜にも見られることから、大腸ガンの前ガン病変と考えられている。本研究では組織化学的手法を用い、ラットに発ガン剤(1,2-dimethylhydrazine, DMH)投与後比較的早期に見られるこれらの指標に対して、食物繊維の摂取が与える影響について影響を検討した。

1. 食事摂取状態及び免疫調節が大腸発ガン初期の指標に与える影響

絶食または摂食時の遠位結腸及び直腸上皮細胞における DMH 処理後のアポトーシスの頻度を測定した。投与 6 時間後、DMH により誘導されたアポトーシスの頻度は、摂食時に比べ絶食

時で有意に高い値となり、その頻度は直腸より遠位結腸で多い傾向を示した。このことから、DMH誘発アポトーシスは食事の摂取如何により影響を受けることが明らかになった。また、抗アシアロ GM1 を投与する事により、ナチュラルキラー活性が一時的に減少し、*In vivo* での腫瘍増殖が亢進することが知られている。そこで ACF 形成に対する免疫系の関与を調べるために、DMH により誘発される ACF 形成に対して抗アシアロ GM1 投与が影響を与えるかどうかを検討した。DMH を投与する前に予め抗アシアロ GM1 ウサギ血清または正常ウサギ血清（対照群）を 2 回にわたりラットに投与した。その後、DMH (20 mg/kg) を一回投与し 4 週間後にラット結腸直腸の ACF 発生頻度を記録した。その結果、対照群に比べ抗アシアロ GM1 投与群において遠位結腸、直腸、結腸直腸全体における ACF 数は有意に多くなった。この結果から、イニシエーションの時期における抗アシアロ GM1 の投与により、遠位結腸、直腸、結腸全体における ACF と異常クリプト総数の有意な増加を引き起こすことが明らかになった。即ち、発ガン初期における DMH 誘発 ACF 形成に免疫監視機構が影響を与えることが初めて明らかになった。

2. 食物繊維の摂取が大腸発ガン初期の指標に与える影響

食物繊維は大腸ガンの発生を抑制する可能性のある食事成分である。本研究では、小麦ふすま (Wb) と Wb より優れた抗腫瘍性を持つ食物繊維に甜菜食物繊維 (SBF) を食物繊維源として用いた。

DMH 誘発 ACF 形成に対する食物繊維摂取の影響を検討した。遠位結腸における ACF 数は無繊維食群に比べ Wb 食群において有意に低下した。Wb 添加量が増えるにつれて、ACF 数と全異常クリプト数はともに減少した。盲腸内の酪酸濃度が高いラットでは遠位結腸における ACF 数が減少した。これらの結果から、Wb 食摂取は ACF 形成を遅延または抑制させること、及びその抑制効果に酪酸が関与することが示唆された。

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は DNA 合成だけでなくその修復にも関与するといわれる。DMH 投与後の結腸、直腸上皮細胞の中で PCNA を発現している細胞とアポトーシスを起こしている細胞の経時的変化を免疫組織化学的に解析した。その結果、DMH 投与後の PCNA 発現細胞数は無繊維食群に比べ Wb 摂取群で早く回復することが明らかになった。本研究により、DMH 投与によりイニシエートされたラット結腸直腸における PCNA 発現上皮細胞の数が Wb 摂取により影響されること、Wb の摂取は DMH 投与数時間後から一週間の間の細胞数の回復を早めることが明らかになった。一方、Wb 摂取群では、遠位結腸におけるアポトーシス数は DMH

投与 6 時間後では無繊維食群に比較して有意に少ないが 7 日後では逆に有意に増加することが明らかになった。この事は食物繊維による発ガン剤の希釈や排泄だけでなく他の機構によって抗腫瘍性が発揮される可能性があることを示唆している。Wb 食群では結腸内容物中の酪酸濃度は DMH 投与後 12 時間で一時的に減少するが、無繊維食群に比べると常に高い値を維持しており、DMH 投与 12 時間後でも無繊維食群に比べて 4 倍以上、最大 9 倍程度の値を示していた。さらに、DMH 投与 24 週後の腫瘍発生数は Wb 食群で有意に抑制された。これらのことから、Wb の摂取は大腸上皮細胞の turnover に影響し、DMH 誘発腫瘍に対して抑制的に作用することが示唆された。

SBF は Wb より強力に DMH 誘発 ACF の発生を抑制する。この SBF の ACF 抑制効果が抗アシアロ GM1 の投与による NK 活性抑制の影響を受けるかどうかを検討した。抗アシアロ GM1 を予め投与した場合には、無繊維食群では DMH 誘発 ACF の有意な増加が起こったのに対し、SBF 摂取群ではその増加が抑えられることが明らかになった。これらの結果から、SBF 摂取による ACF 抑制効果は、抗アシアロ GM1 投与による ACF 増加効果を凌駕することが示唆された。

以上のことから、食物繊維の抗腫瘍性を説明する機構として、上皮細胞のアポトーシスを増加させること、あるいは腫瘍免疫を維持あるいは亢進することでガンになりうる細胞をあらかじめ除去するという意義が考えられる。腫瘍が出来る前のきわめて早い時期に、細胞増殖の制御に関わる上皮細胞の turnover やアポトーシス、異常細胞の除去に関与する免疫監視機構に対して食物繊維の摂取が影響を及ぼすことが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 葛 西 隆 則

副 査 教 授 青 山 頼 孝

副 査 教 授 近 藤 敬 治

学 位 論 文 題 名

Studies on the effect of dietary fibers on morphological changes at an early carcinogenesis of colorectum

(大腸発ガン初期の形態変化に及ぼす食物繊維摂取の効果に関する研究)

本論文は総頁数 82 ページの英文論文で、表 13、図 9、写真 6、引用文献 86 を含み、6 章で構成されている。別に参考論文 7 編が添えられている。

大腸ガンは主要な死因の一つであり、その発生率は増加し続けている。ガンの発生には遺伝的な要因だけではなく環境要因が大きく関与する事が知られている。特に消化器系ガンの場合、食餌成分は常にその上皮細胞と接しているので、主要な環境因子といえる。食事成分の中でも脂質の過剰摂取は大腸ガンの発生率を高める一方、食物繊維は大腸ガンを抑える可能性がある成分と考えられている。大腸発ガン研究では腫瘍の数やその発生頻度を指標としているものが多い。しかし、大腸ガンの予防という観点から考えると、発ガンに至る前兆をより早期に評価することが必要になる。発ガン剤や放射線照射などのイニシエーション処理をすると、数時間後から大腸クリプト下部に上皮細胞のアポトーシスが見られる。大腸クリプト下部には幹細胞が存在することから、大腸ガンが上皮細胞の異常増殖と考えると、このアポトーシスは上皮細胞の増殖と死のバランスに少なからず影響を与えと考えられる。また、腫瘍ができるより前に観察される形態変化として、クリプト部分の上皮細胞の異常増殖である aberrant crypt foci (ACF)がある。これは腫瘍を発生させる場合より、比較的低い発ガン剤投与量、短期間で観察されるだけでなく、大腸ガンを患うヒトの結腸粘膜にも見られることから、大腸ガンの前ガン病変と考えられている。本研究では組織化学的手法を用い、ラットに発ガン剤(1,2-dimethylhydrazine, DMH)投与後比較的早期に見られるこれらの指標に対して、食物繊維の摂取が与える影響について検討した。

1. 食事摂取状態及び免疫調節が大腸発ガン初期の指標に与える影響

絶食または摂食時の遠位結腸及び直腸上皮細胞における DMH 処理後のアポトーシスの頻度を測定した。この結果、DMH 誘発アポトーシスは食事の摂取状態により影響を受けることが明らかになった。また、抗アシアロ GM1 を投与する事により、ナチュラルキラー活性が一時的に減少し、in vivo での腫瘍増殖が亢進することが知られている。そこで ACF 形成に対する免疫系の関与を調べるために、DMH により誘発される ACF 形成に対して抗アシアロ GM1 投与が影響を与えるかどうかを検討した。その結果、対照群に比べ抗アシアロ GM1 投与群において遠位結腸、直腸、結腸全体における ACF 数は有意に多くなった。この結果から、DMH 誘発 ACF 形成に免疫監視機構が関与することが初めて明らかになった。

2. 食物繊維の摂取が大腸発ガン初期の指標に与える影響

DMH 誘発 ACF 形成に対する食物繊維摂取の影響を検討した。遠位結腸における ACF 数は無繊維食群に比べ小麦ふすま (Wb) 食群において有意に低下した。Wb 添加量が増えるにつれて、ACF 数と全異常クリプト数はともに減少した。盲腸内の酪酸濃度が高いラットでは遠位結腸における ACF 数が減少した。これらの結果から、Wb 食摂取は ACF 形成を遅延または抑制させること、及びその抑制効果に酪酸が関与することが示唆された。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) は DNA 合成だけでなくその修復にも関与するといわれる。本研究により、DMH 投与によりイニシエートされたラット結腸直腸における PCNA 発現細胞の数が Wb 摂取により影響されること、Wb の摂取は DMH 投与数時間後から一週間の間の細胞数、アポトーシス数に対しても影響することが明らかになった。さらに、投与 24 週後の腫瘍発生数は Wb 食群で有意に抑制された。これらの事から、Wb の摂取は大腸上皮細胞の turnover に影響し、DMH 誘発腫瘍に対して抑制的に作用することが示唆された。Wb より優れた抗腫瘍性を持つ食物繊維に甜菜食物繊維 (SBF) がある。SBF は Wb より強力に DMH 誘発 ACF の発生を抑制する。この SBF の ACF 抑制効果が抗アシアロ GM1 の投与による NK 活性抑制の影響を受けるかどうかを検討した。抗アシアロ GM1 を投与した場合には、無繊維食群では DMH 誘発 ACF の有意な増加が起こったのに対し、SBF 摂取群ではその増加が抑えられることが明らかになった。これらの結果から、SBF 摂取による ACF 抑制効果は、抗アシアロ GM1 投与による ACF 増加効果を凌駕することが示唆された。

以上のことから、腫瘍が出来る前のきわめて早い時期に、細胞増殖の制御に関わる上皮細胞の

turnover やアポトーシス、異常細胞の除去に関与する免疫監視機構に対して食物繊維の摂取が影響することを明らかにしたことは高く評価される。よって、審査員一同は石塚 敏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。