

スーザン・E・エブラー博士、アンドリュー・J・クリフォード博士  
カリフォルニア大学デーヴィス校ブドウ栽培学・ワイン醸造学・栄養学部  
カリフォルニア州

ブルーンのガン予防に対する化学的効用

1997年

1999年完成

ブルーンのガン予防に対する化学的効用

最終報告

カリフォルニアブルーン協会にむけて作成

1999年6月

主要研究者：

スーザン・E・エブラー博士

カリフォルニア大学デーヴィス校ブドウ栽培学・ワイン醸造学・栄養学部

95616 カリフォルニア州デーヴィス、ワン・シールズ・アヴェニュー

[Sccebeler@ucdavis.edu](mailto:Sccebeler@ucdavis.edu)

530-752-0696

アンドリュー・J・クリフォード博士

カリフォルニア大学デーヴィス校ブドウ栽培学・ワイン醸造学・栄養学部

95616 カリフォルニア州デーヴィス、ワン・シールズ・アヴェニュー

[Ajclifford@ucdavis.edu](mailto:Ajclifford@ucdavis.edu)

まとめ：

粉末プルーンを 20%添加した食餌を、本実験に使用したトランスジェニックマウスに与えても、腫瘍発生の時期に有意な変化は見られなかった。この 20%という補充割合は、下痢症状を起こさずに最適な健康状態を保つことができる最大レベルと思われる。

目的：

最近の疫学研究で、野菜や果物を多く摂取した場合、ある種のガンの発症率が低下することが明らかにされている。我々は以前の研究で、赤ワイン由来のポリフェノールに富んだ抽出物が、トランスジェニックマウスを使った神経繊維腫症モデルにおいて腫瘍発生の時期を遅らせる働きがあることを示した。現プロジェクトの主な目的は、ヒドロキシ桂皮酸フェノール類が豊富なプルーンおよびプルーン抽出物の、ガン予防に対する化学的活性を評価することである。

プロポーザルには、以下の革新的な点が含まれる。

- ・ 研究に使用したトランスジェニックマウスが、ヒトの神経繊維腫症の症状に似た腫瘍を神経鞘に発生させたものであり、腫瘍の動態や組織への関わりがよく研究されている対象であること。
- ・ 化学的に規定された食餌中に、プルーンおよびプルーン抽出物を添加すること。その結果食餌は、食品に含まれるフェノール類と栄養学的に同等の評価を得た。

完了した研究

#### 実験 1

本実験の目的は、マウスの食餌に添加する粉末プルーンの、過度の下痢症状を起こさずにいられる最大添加レベルを決定することであった。本研究で得られた結果は、最終的な研究の補遺において、添加レベルを選択するのに使われた。

全研究を通じて使用した粉末プルーンは、カリフォルニアプルーン協会提供の低含水量粉末プルーンである（製品の仕様は別紙参照のこと）。

食餌の調製：以前シュニーマン博士が行った研究（Tinker et al., 1991）によれば、ヒトが下痢をもよおすことなく摂取できるプルーンの日当たり最大量は、体重 1 キロあたり 1.3 g である。この量は、ヒト 1 人の体重が 70kg、一日の食事量が 400 g（乾質量）とした場合、全食事量の 22.8%にあたる。我々の目的は、マウスの場合にも、体重や健康状態に悪影響を及ぼすことなく同様の（あるいはより高い）レベルでプルーンを摂取できるかを決定することである。そこで、食餌へのプルーン添加レベルを、23%をはさんで何点かに決

定した（表 1）。

本研究で基準とした食餌は、栄養学的に妥当であり、フェノール類およびフラボノイド類を含まないアミノ酸をベースとした食餌である（Clifford et al., 1996）。粉末プルーンを基準食に適切な割合（表 1）で加えてフードプロセッサーで攪拌し、均質な混合物とした。これを、参加を最小限にとどめるため真空状態で冷凍保存した。

表 1. 実験 1 のための基準食へのプルーン添加レベル

望ましいプルーンレベル (食餌 1 g 当たりのプル ーンの g 数)	基準食量 (g)	粉末プルーン重量 (g)	食餌中の全プルーン の割合 (%)
0	160	0	0
0.06	160	10	5.8
0.125	160	20	11.1
0.250	160	40	20.0
0.375	160	60	27.3
0.500	160	80	33.3

動物：研究には、非トランスジェニックの成獣マウスを使用した。各処理グループの個体数は 1 であった。全個体の体重を 16 日間毎日記録した。マウスには、毎日調製してすぐの食餌を与え、毎日の摂取レベルを追跡した。食餌を摂取した後の便を前半の 8 日間にわたって採取・保存した。

## 結果

便排出量：便の全排出量は、プルーンの添加量が、27%および 33%と高い方の 2 つの食餌を摂取させた場合に増加した（表 2）。プルーン添加量が少ない方の 3 つの場合では、便排出量は基準食を与えた場合に比べて若干増加していたが、添加量 5.8%、11.1%、20.0% のデータの間には有意な差は見られなかった。便の硬さは、どの添加量においても正常であると見なされた（図 1）。以上の結果は、ティンカーらのヒトを対象とした研究と矛盾しない（Tinker et al., 1991）。これにより、プルーンの添加量を 20%にまで増加しても、下痢症状は誘発されないことが示された。

表 2. 粉末プルーン添加食を摂取したマウスの便排出量

処理 (食餌中のプルーン%)	便排出量 <sup>1</sup> (g)
0%	2.71
5.8%	3.88
11.1%	3.78
20.0%	4.35
27.0%	5.15
33.0%	6.34

<sup>1</sup>便排出量は乾重量で表示、データは 8 日間の総量である。

図 1. マウスの便排出量  
実験 1

1 2 3 4 5 6

1997年12月19日

1 2 3 4 5 6

動物の体重増加／減少：個々のマウスの体重を実験 1 の期間中観察し、実験食の摂取期間における体重の増減を予測した（図 2）。プルーン添加量の最も多い場合を除いては、各マウスの体重は、実験食摂取期間中（16 日間）ほとんど変化が見られなかった。このことから、プルーン添加レベルが最高 27%までなら、きわめて良い健康状態が維持されるという結論に達した。

結論：食餌中のプルーン添加レベルが 27%までの範囲では、本実験がマウスの体重に及ぼす影響はほぼ見られなかった。ただし便排出量に関しては、添加レベルが 20%以上になると、有意に増加することがわかった。これらの結果から、食餌中のプルーン添加量が約 23%（乾重量ベース）までならば、下痢症状を呈することなく良好な健康状態を維持できることがわかった。これは、以前に報告されたヒトを対象とした一連の研究（Tinker et al., 1991）と矛盾するところがない。これより、プルーン添加レベル 20%を、実験 2 の化学的予防に関する研究において最高レベルに設定した。

## 実験 2

本実験の目的は、プルーン添加レベル 20%の実験食が腫瘍の発生に及ぼす効果を、トランスジェニックマウスをモデルとして評価することである。この実験は、ワインの成分が同様の動物モデルの腫瘍発生に与える影響を評価する実験とセットで行っている。

全研究を通じて使用した粉末プルーンは、カリフォルニアプルーン協会提供の低含水量粉末プルーンである（製品の仕様は別紙参照のこと）。

食餌の調製：本研究に使用した基準食（対照）は、栄養学的に完全なものであり、フェノール類およびフラボノイド類を含まないアミノ酸をベースとした食餌である（Clifford et al., 1996）。基準食中の糖（ブドウ糖および果糖）の割合はプルーン添加食と等しくなるよう調整し、両者間のエネルギー摂取量を同等にした。基準食に粉末プルーンを 20%添加したものをフードプロセッサーで攪拌し、均質な混合物とした。食餌は、調製ごとのばらつきを最小限にとどめるため、あらかじめ 5kg 調製し、酸化防止のためチッソ雰囲気下にて冷凍保存した。

動物：本実験で使用したのは、カリフォルニア大学デーヴィス校の繁殖コロニーとして飼育されてきたトランスジェニックマウスである（Hinrichs et al., 1987, Nerenberg et al., 1987）。マウスは 1 匹ずつ針金床のステンレス製の檻に入れ、室温 20°C下 12 時間周期で照明を点灯・消灯した。これらマウスは、神経鞘に神経繊維腫症のヒトに見られるのと同様の腫瘍が発生しやすいよう前処置されたものである。マウスたちは 7 種類の親から生まれたものを使用した。これらについて生後 10 日以内に遺伝子型を調べ、腫瘍が発生するような遺

伝子を保持する個体を同定した (Clifford et al., 1996)。トランスジェニック陽性のマウスを、無作為に 7 つの処理グループに 1 匹ずつ割り振り (表 3)、性別および親の違いによるグループ間の差をできるだけ小さくした。研究の開始時におけるマウスの平均体重は、各処理グループで有意な差は見られなかった ( $F_{6,39}=0.230$ ;  $p=0.96$ )。



図 2

プルーン実験 1—マウスの 1 日ごとの体重変化

(縦軸) マウスの体重 (g)

(横軸) 日 (研究期間)

(レジェンド) 0.0%、6.9%、11.1%、20.0%、27.0%、33.0%

表 3. 実験 2 における実験処理グループ

処理	マウスの個体数
対照区	10 (メス 3、オス 7)
プルーン	7 (メス 3、オス 4)
固形赤ワイン	7 (メス 3、オス 4)
赤ワイン、第 1 分画	7 (メス 3、オス 4)
赤ワイン、第 2 分画	7 (メス 3、オス 4)
赤ワイン、第 3 分画	8 (メス 3、オス 5)
赤ワイン、第 4 分画	7 (メス 3、オス 4)

子マウスは生後 14~21 日で親と離し、対照実験の基準食であるアミノ酸食を摂取させた。6 日後 (生後 20~27 日齢)、基準食を各処理グループごとの実験食に変え、基準食グループ、実験食グループとも、残りの研究期間中その条件を維持した。マウスには毎日食餌を与えて体重を測り、食餌と水は自由に摂取させることとした。

腫瘍の発生：最初の腫瘍がいつ出るかを知るため、マウスの口吻、耳、足、尾を毎日注意深く調べた。最初の腫瘍が見つかった時点のマウスの日齢が、腫瘍発生までの時間 (腫瘍潜伏期間) とした。終了点としては、腫瘍多重度 (腫瘍の数をマウスの個体数で割ったもの) ではなく、腫瘍潜伏期間を選んだ。理由は、腫瘍多重度はほとんどの場合、あらかじめ決められた時期に決定するものであるが、その時期が過ぎた後で腫瘍が発生する個体も出てくる可能性があるためである。

血液学と化学：腫瘍の重量が体重の 1% 近くなった時点で、その個体に二酸化炭素で麻酔を施し、心臓穿刺により血液を採取した。白血球総数 (WBC) を測定し (Unopette, Beckton-Dickenson, Franklin Lakes, NJ)、WBC 微分、充填細胞体積 (PCV) を算出して、処置した時点におけるマウスの総合的な健康状態を査定した。全血液に加えて、以下の組織を得た—心臓、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、脳、腫瘍、精巣、足。各組織の重量を測定し、液体チッソ中で急速冷凍して  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。ただし、これらは本研究には利用しなかった。

データ解析：すべての反応変数について平均値±標準偏差あるいは (SEMs) を算出した。基準食マウスと実験食マウスの平均値の差は ANOVA とカプラン-マイヤーテストによって評価した。

## 結果

食餌の摂取と成長速度：処理グループの間では、食餌の摂取量に有意な差は見られなかった ( $F_{6,46}=1.491$  ;  $p=0.20$ )。平均成長速度（研究開始から 18 日間の体重増加の割合）は、対照グループとブルー添加食グループとでほとんど差はなかった ( $F_{1,5}=1.67$  ;  $p=0.2528$ )。白血球総数 (WBC) 測定、WBC 微分、充填細胞体積 (PCV) 算出結果は、すべての処理グループで正常値をみた。つまり、これらの食餌がマウスの体に合っており、栄養的にも優れ、良好な健康状態の維持に貢献しているということが言えよう。

腫瘍の発生：対照グループの腫瘍発生の平均日数 ( $\pm$ SEM) は、 $81 \pm 6$  日であった (表 4)。これは、以前のマウスをモデルとした一連の研究において見られたのと近い値である (Ebeler et al., 1997)。ブルー添加食を摂取したマウスの腫瘍発生時期 ( $91 \pm 16$  日) は、基準食を摂取したマウスの場合よりも、若干ではあるが遅かった (表 4)。ただし、今回観察された腫瘍発生時期の差は、どの処理グループについても統計学的に有意なものではなかった ( $F_{6,39}=1.21$  ;  $p=0.32$ ) (表 4 ; 図 2)。さらに、対照グループおよびブルー添加食グループの各マウスの腫瘍発生日を、本報告の最後に記載した。

表 4. 各処理グループにおける腫瘍発生の平均日

### 平均値表

効能：食餌

従属：日

	個体数	平均値	標準偏差	標準誤差
対照	10	81.500	20.162	6.376
ブルー	7	91.286	43.450	16.423
ワイン	7	78.143	10.684	4.038
分画 1	7	79.286	18.400	6.955
分画 2	7	66.857	14.622	5.527
分画 3	8	87.875	18.742	6.626
分画 4	7	85.714	24.164	9.133

図 3. 各処理グループの腫瘍発生平均日 (±SEM) の棒グラフ

相互作用棒グラフ

効能：食餌

従属：日

標準誤差バーを含む

(縦) 腫瘍発生日

120, 100, 80, 60, 40, 20, 0, -20

(横) 食餌

対照、プルーン、ワイン、ワイン分画 1、ワイン分画 2、ワイン分画 3、ワイン分画 4

結論：食餌に粉末プルーンを 20%添加しても、本研究に用いたトランスジェニックマウスの腫瘍発生時期には、統計的に有意な影響はなかった。この 20%というレベルは、下痢症状を催さない最高の添加レベルであると思われる。これより低いレベルでは、腫瘍発生時期に影響を及ぼすことは期待できない。

今後の研究および推奨事項：

生体モデルを使った研究においては、抗酸化活性およびその他潜在的な化学的予防メカニズムの評価は、発ガンを阻害すると思われるようなプルーン中の成分を同定するにあたっては、スクリーニングに引けを取らないほど有用である。この報告は、組成分析と合わせれば、プルーンの品種や加工パラメータ、そして、潜在的な化学的予防因子の含有量を可能な限り大きくしうる貯蔵条件を同定する上での指針となろう。さらに、本研究においては、腫瘍発生時期に対する有意な効果は認められなかったものの、ほかの動物モデルを使って研究を進めれば、他の一般的なガン（胸ガン、大腸ガンなど）に対するプルーンの化学的予防作用に関し、さらなる重要情報が得られるであろう。

参考文献：

A. J.クリフォード、S.E.エブラー、J.D.エブラー、N.D.ビルズ、S.H.ハインリッヒス、P.L.テストア、A.-L.ウォーターハウス (1996)。「固形赤ワインを添加したアミノ酸ベースの食餌を与えたトランスジェニックマウスにおける腫瘍発生時期の遅延」アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション、64、748-756.

Clifford, A. J., Ebeler, J. E., Ebeler, J.D., Hinrichs, S.H., Teissedre, P. -L., and Waterhouse, A. L. (1996)Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am. J. Clin. Nutr.*, 64:748-756.

S.E.エブラー、A. J.クリフォード、J.D.エブラー、N.D.ビルズ、S.H.ハインリッヒス (1997)。「食餌中に含まれる腫瘍発生遅延因子の同定と評価のための生体モデル実験プロトコル」栄養学のおよび健康維持に大いに貢献する食品、ワイン。T.R.ワトキンス編、アメリカン・ケミカル・ソサエティー、ワシントンDC、pp.215-229.

Ebeler, J. E., Clifford, A. J., Ebeler, J.D., Hinrichs, S.H. (1997)An in vivo experimental protocol for identifying and evaluating dietary factors that delay tumor onset. In:Wine, Nutritional and Therapeutic Benefits. T. R. Watkins, ed., American Chemical Society, Washington, DC, pp. 215-229.

S.H.ハインリッヒス、M.ネレンバーグ、R.K.レイノルズ、G.コウリー、G.ジェイ (1987)。「ヒト神経繊維腫症のトランスジェニックマウスモデル」サイエンス、237、1340-1343.

Hinrich, S. H., Nerenberg, M., Reynolds, R. K., Khoury, G., and Jay,G. (1987)A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science*, 237: 1340-1343.

M.ネレンバーグ、S.H.ハインリッヒス、R.K.レイノルズ、G.コウリー、G.ジェイ (1987)。「ヒトT-リンパ親和性ウイルス 1 型の tat 遺伝子はトランスジェニックマウスの間充織に腫瘍を誘発する」サイエンス、237、1234-1329.

Nerenberg, M., Hinrich, S. H., Reynolds, R. K., Khoury, G., and Jay,G. (1987)The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science*, 237: 1234-1329.

L.F.ティンカー、B.O.シュニーマン、P.A.デーヴィス、D.D.ギャラハー、C.R.ワゴナー (1991)。「軽度の高脂血症を患う男性における食物繊維源としてのプルーン摂取」アメリカン・ジャーナル・オブ・クリニカル・ニュートリション、53 (5)、1259-65.

Tinker, L. F., Schneeman, B. O., Davis, P. A., Gallaher, D. D., Waggoner, C. R. (1991)Consumption of prunes as a source of dietary fiber in men with mild hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 53(5): 1259-65.



実験 2 で使用した各マウスの腫瘍発生データ

<u>処理</u>	<u>マウス番号</u>	<u>腫瘍発生時のマウスの日齢</u>
対照	1	71
対照	2	85
対照	3	87
対照	4	94
対照	5	74
対照	6	53
対照	7	120
対照	8	54
対照	9	97
対照	10	<u>80</u>
	平均	81±20

プルーン	1	61
プルーン	2	136
プルーン	3	66
プルーン	4	80
プルーン	5	69
プルーン	6	58
プルーン	7	<u>169</u>
	平均	91±43