

## 大腸発癌における腸内細菌の役割

### —糞便中 $\beta$ -Glucuronidase, Bile Acids および Neutral Sterol について—

関西医科大学外科学教室

高田 秀穂 平松 義文 坂口 道倫  
滝藤 尊照 日置紘士郎 山本 政勝

#### RELATION OF FECAL BILE ACIDS, NEUTRAL STEROL AND $\beta$ -GLUCURONIDASE TO COLON CARCINOGENESIS

Hideho TAKADA, Yoshifumi HIRAMATSU, Michitomo SAKAGUCHI  
Sonsho TAKITO, Koshiro HIOKI and Masakatsu YAMAMOTO

Department of Surgery, Kansai Medical University

索引用語：大腸発癌,  $\beta$ -Glucuronidase, 便中ステロール

#### I. はじめに

近年、本邦における大腸癌の発生状況は増加傾向にあり、その主因としては食事の欧米化すなわち牛肉などの動物性蛋白質および脂肪摂取量の増大が重要な因子と考えられている。これら摂取量の増加は糞便中のコレステロールやその代謝物および胆汁酸の量的、質的变化を招き、同時に腸内細菌叢の変化をも惹起し、これらが大腸癌の発生に対して強い関連性があるものと考えられている。

大腸発癌剤である azoxymethane (以下 AOM と略) はこのままでは不活性な発癌物質であるが、これが肝臓において methylazoxymethanol に代謝活性化され、さらにグルクロナイド抱合を受けて胆汁とともに腸管内に排出された後に腸内細菌由来の  $\beta$ -glucuronidase (以下  $\beta$ -Gase と略) の作用を受けて free active carcinogen となって大腸で濃縮を受け、大腸発癌に至るものと考えられている。そこで著者らはこの腸内細菌由来の  $\beta$ -Gase に注目して、もしこれを阻害することができれば発癌剤は抱合されたまま糞便とともに排出されてしまうので、発癌作用は発揮できないであろうと考え、以下に述べるような検討を行った。

さらに著者らは大腸発癌の機序の一端を解明すべく食餌性コレステロールの大腸発癌に及ぼす影響について検討を加えたところ、食餌性コレステロールは大腸

発癌に対する増強効果を示し、またこの際の糞便中の中性ステロールや胆汁酸の動態についても興味ある知見が得られたので、併せて報告する。

#### II. 実験材料および方法

1. 実験 1:  $\beta$ -Gase inhibitor の大腸発癌に及ぼす影響

1) 糞便中  $\beta$ -Gase 活性: 5 週齢の呑竜系雄ラットを用い、実験群には  $\beta$ -Gase inhibitor として N-cyclohexyl-5-o-acetyl-2,4-o- (p-methoxybenzylidene) -D-glucaro-1-amide-6,3-lactone<sup>1)</sup> (以下 C-GAL と略) を 0.1% の割合で日本クレア社製 CE-II 粉末飼料に混じて投与した。対照群は CE-II 粉末飼料で全期間飼育した。AOM は 7.4mg/kg づつ週 1 回の割合で合計 11 回にわたり皮下注射を行った。糞便中  $\beta$ -Gase の測定は AOM 投与開始後 3 週目、11 週目ならびに AOM 投与終了後 20 週目の計 3 回、phenolphthalein glucuronide を基質として Fishman の方法<sup>2)</sup> に準じて測定を行った。

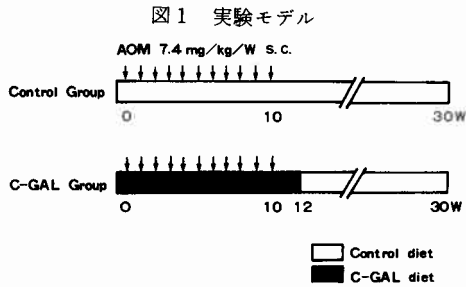
2) 発癌実験: 5 週齢の呑竜系雄ラットを用い C-GAL 投与群と対照群の 2 群を作製し、図 1 に示したごとく AOM を 7.4mg/kg づつ週 1 回の割合で合計 11 回にわたり皮下注射の上、AOM 最終投与後 20 週目に全動物を屠殺し、肉眼的ならびに組織学的検索を行った。

2. 実験 2: 食餌性コレステロールの大腸発癌に及ぼす影響

1) 発癌実験: 5 週齢の呑竜系雄ラットを用い、以下

※第20回日消外会総会シンポジウム

外科的消化器疾患と腸管内細菌



の2群を作製した。対照群のラットは全期間にわたり日本クレア社製 CE-II 粉末飼料で飼育、実験群にはこのコントロール食にコレステロールを1%の割合で添加した実験食を全期間にわたり投与した。AOMは実験1と同様に7.4mg/kgを週1回の割合で合計11回皮下注射した。AOM最終投与後20週目に全動物を屠殺し、肉眼的ならびに組織学的検索に供した。

2) 血清コレステロール値の変動：食餌性コレステロールの血中コレステロールに対する影響を検討するために、上記と同様のモデルを用い実験開始後4週間ごとにエーテル麻酔下に腹部大動脈より採血の上、血中コレステロール値の変動について検討を加えた。

3) 糞便中の各種ステロールの測定：ラット糞便中のステロールの経時的変動を測定するにあたり、ラット糞便の採取は各群4匹のラットを用い、24時間採取とし実験開始後4週間ごとに計6回行った。糞便は採

取後直ちに凍結乾燥の上、乾燥重量の0.5gを分析に供した。糞便中のステロールの抽出および測定はMadsen<sup>3)</sup>ならびに Miettinen<sup>4)</sup>らの方法に準じ図2のごとく行った。3回の薄層クロマトグラフィー(TLC)にて分離精製の上、ガスクロマトグラフ・マススペクトロメトリー(GC-MS)によって物質の同定を行い、さらにガシリキッドクロマトグラフィー(GLC)を用いて定量を行った。

### III. 実験成績

1. 実験1： $\beta$ -Gase inhibitorの大腸発癌に及ぼす影響

1) 糞便中 $\beta$ -Gase活性：糞便中 $\beta$ -Gase活性は表1に示した如くC-GAL投与群では大腸の proximal half ならびに distal half の両者において有意の抑制が認められた。しかしAOM最終投与後20週目の屠殺時における糞便中の $\beta$ -Gaseは対照群とC-GAL群との間には差異がみられなかった。この時期においては、大腸癌は大きく増殖し、腫瘍自体や腸重積の発生によって腸管は狭窄や閉塞状態を呈し、これらのために糞便は腐敗状態となっており、また糞便中には大量の血液の混入がみられた。このような因子がC-GALによって $\beta$ -Gase活性が抑制されなかった原因を形成しているものと考えられた。また発癌剤であるAOMは糞便中の $\beta$ -Gase活性に対しては影響を及ぼさなかった。

2) 発癌結果：発癌率は対照群が100%でありC-GAL群は92%であった。一匹当たりの大腸癌数は対照群が $9.9 \pm 6.3$ 個であるのに比し、C-GAL群では $3.1 \pm 4.0$ でありC-GAL群において大腸発癌は表2に示したごとく有意に抑えられた。組織学的には大多数が高分化型腺癌であり、両群間には組織学的に差異はみられなかった。

図2 糞便中ステロールの分析法

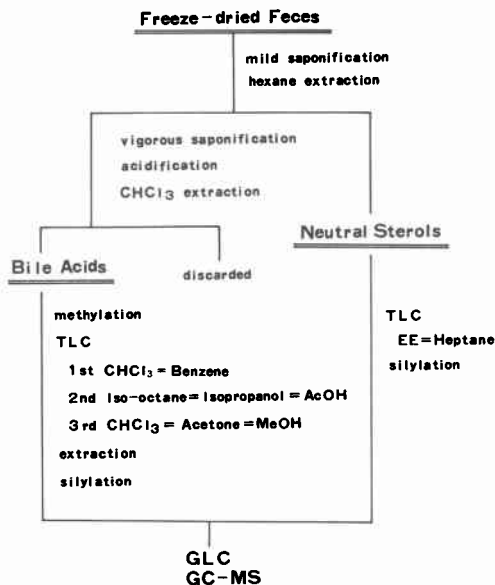


表1 糞便中 $\beta$ -Glucuronidase活性

	Proximal half	Distal half
Control diet group		
I <sup>a</sup>	9.05 $\pm$ 1.77 <sup>b,c</sup>	12.93 $\pm$ 1.65
II <sup>d</sup>	12.05 $\pm$ 5.81	12.12 $\pm$ 4.49
III <sup>e</sup>	6.94 $\pm$ 4.03	8.14 $\pm$ 4.42
C-GAL diet group		
I <sup>a</sup>	4.43 $\pm$ 3.07 <sup>f</sup>	4.55 $\pm$ 2.75 <sup>g</sup>
II <sup>d</sup>	4.51 $\pm$ 1.48 <sup>f</sup>	5.37 $\pm$ 3.85 <sup>f</sup>
III <sup>e</sup>	10.40 $\pm$ 9.68	5.27 $\pm$ 3.01

a Three weeks after the first injection of AOM.  
 b  $\mu$ g phenolphthalein per mg, wet weight, of colonic content per hr.  
 c Means  $\pm$  S. D.  
 d After 11 weekly injections of AOM.  
 e At sacrifice (20 weeks after last injection).  
 f Significantly different from control diet group at each period ( $p < 0.05$ ).  
 g  $p < 0.01$ .

表2 C-GAL 投与の大腸発癌に対する影響

	Rat		No. of colon tumor/rat		
	No	% with tumor	Total	Proximal half	Distal half
Control Group	19	100	9.9±6.3 <sup>a</sup>	4.8±3.5	5.1±3.7
C-GAL Group	25	92	3.1±4.0 <sup>b</sup>	0.8±1.1 <sup>b</sup>	2.2±3.6 <sup>c</sup>

a Mean ± S.D.  
 b Significantly different from Control Group (p<0.001)  
 c p<0.02

2. 実験2：食餌性コレステロールの大腸発癌に及ぼす影響

1) 発癌結果：コレステロール投与群および対照群における発癌率、一匹当たりの大腸癌、小腸癌数ならびに転移巣形成率を表3に示した。対照群では大腸発癌率は97.1%で一匹当たりの大腸癌数は5.58±4.48であったのに対し、コレステロール群でのそれは100%および8.15±5.85であって、対照群に比し有意の発癌促進効果が認められた。小腸における発癌状況に関しては両群間に差異は認められなかった。一方転移巣を形

成していたラットはコレステロール群において対照群に比べ2倍に達していた。組織学的には対照群では高分化型腺癌が大部分を占めているのに対し、コレステロール群では中分化型腺癌の占める割合が多く、また signet-ring-cell-carcinoma も多くみられた。

2) 血清コレステロール値の変動：表4に血清コレステロール値の経時的変動を示した。1%コレステロール投与により、血清コレステロール値は対照群のそれに比べ、20%以上の増加を示したが、極端な高コレステロール血症を呈するまでには至らなかった。

3) 糞便中各種ステロールの変動：糞便1g当たり の総胆汁酸量および各種胆汁酸濃度ならびに1日排泄量についての測定結果を表5に示した。1%コレステロールの添加によって糞便中の総胆汁酸量は対照群に比べ、2倍から3倍の著増を示し、また同定し得たすべての胆汁酸はコレステロール添加によって増加していた。各胆汁酸別に検討してみると、コール酸由来のデオキシコール酸(DCA)の増加は軽微であるのに対し、ケノデオキシコール酸由来のリトコール酸

表3 食餌性コレステロールの大腸発癌に対する影響

	Large intestine		Small intestine		Rats with metastases
	animals with tumors	no. of tumors per rat	animals with tumors	no. of tumors per rat	
Control group (35 rats)	34 (97.1%)	5.58 ± 4.48 <sup>a</sup>	20 (57.1%)	1.51 ± 2.09	8 (22.8%)
Cholesterol group (44 rats)	44 (100%)	8.15 ± 5.85 <sup>b</sup>	20 (45.4%)	0.88 ± 1.38 <sup>c</sup>	20 (45.4%) <sup>b</sup>

a Mean ± S.D.  
 b Significantly different from Control Group, p<0.05.  
 c Not significantly different from Control Group, p>0.05.

表4 血清コレステロール値の経時的変動

	4	8	12	16	20	24	w
Control Group	48.8±2.6 <sup>a</sup>	43.8±3.5	40.5±4.4	40.0±1.8	38.8±3.3	52.3±4.5	
Cholesterol Group	58.0±6.1 <sup>b</sup>	58.3±8.5 <sup>c</sup>	66.8±5.1 <sup>d</sup>	46.5±12.7	58.3±3.6 <sup>d</sup>	62.5±12.7	

a Mean ± S.D. (mg/100 ml serum)  
 b Significantly different from Control Group, p<0.05  
 c p<0.02  
 d p<0.001

表5 食餌性コレステロールの糞便中胆汁酸への影響

bile acid	Control Group	Cholesterol Group
LCA	0.04 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.07 <sup>b</sup>
DCA	0.80 ± 0.33	1.06 ± 0.31
HDCA	0.55 ± 0.16	1.36 ± 0.22 <sup>c</sup>
β-MCA	0.21 ± 0.08	0.78 ± 0.21 <sup>c</sup>
ω-MCA	0.29 ± 0.13	1.25 ± 0.42 <sup>d</sup>
mono-keto-3α-OHs <sup>e</sup>	0.26 ± 0.03	0.87 ± 0.22 <sup>b</sup>
total amount	2.59 ± 0.33	6.19 ± 1.45 <sup>d</sup>
daily output (mg/day/rat)	10.36 ± 1.97	25.28 ± 6.28 <sup>d</sup>

a Mean ± S.D. (mg/g dry feces)

b Significantly different from Control Group,  $p < 0.01$

c  $p < 0.05$

d  $p < 0.001$

e Mono-keto-3α-OHs = 7-keto-lithocholic acid + 12-keto-lithocholic acid.

表6 食餌性コレステロールの糞便中 neutral sterol への影響

neutral sterol	Control Group	Cholesterol Group
cholesterol	1.04 ± 0.28 <sup>a</sup>	19.03 ± 2.40 <sup>b</sup>
coprostanol	2.16 ± 0.25	12.52 ± 1.66 <sup>b</sup>
cholesterol degradation <sup>c</sup>	67.5%	39.7%
total amount <sup>d</sup>	8.99 ± 0.90	39.95 ± 2.36 <sup>b</sup>
daily output	35.60 ± 6.16	162.92 ± 16.17 <sup>b</sup>

a Mean ± S.D. (mg/g dry feces)

b Significant difference between the two dietary groups,  $p < 0.001$

c Cholesterol degradation = coprostanol / cholesterol + coprostanol

d Total amount = cholesterol, several phytoosterols, and their bacterial metabolites

(LCA), ヒオデオキシコール酸 (HDCA) および  $\beta$ ,  $\omega$ -ムリコール酸 ( $\beta$ ,  $\omega$ -MCA) の増加が顕著であった。

糞便中のコレステロールおよびコプロスタノール濃度を測定した成績を表6に示した。実験群においては対照群に比べ、コレステロールは約20倍に、コプロスタノールは7倍に増加していた。cholesterol degradationをみると、対照群に比し実験群において低値を示し、大量の負荷コレステロールを腸内細菌では処理し得ない状況を呈していた。

#### IV. 考 察

冒頭で述べたように日本における大腸癌の発生は増加傾向を示し、平山<sup>9)</sup>によると今世紀末には胃癌を抜いて大腸癌が最多発癌となる可能性を推定している。このような意味からも大腸癌に対する治療法の研究および開発とともに大腸癌発生の機序を明らかにし、その抑制策に関する研究が大いに望まれる。今回著者らは大腸の発癌の際における腸内細菌の役割に注目し、 $\beta$ -Gase 阻害剤を用いて大腸の発癌を抑制することが出来たが、この様に大腸発癌の抑制法として腸内細菌の酵素を抑制する方法としては無菌動物を用いる方

策<sup>9)</sup> 以外には報告がみられない。大腸発癌の抑制に関しては古くよりいくつかの試みがなされてきた。松島ら<sup>7)</sup> はプロテアーゼ阻害剤(ロイペプチン)によって大腸発癌が抑制されるとの報告をした。これ以外にも各種ビタミンを用いた方法などが報告されている。最近 Raicht ら<sup>8)</sup> は植物性ステロールに大腸発癌に対する抑制効果のあることを報告しているが、その抑制の機序に関しては未だ不明である。今回、著者らはコレステロールの大腸発癌に対する増強効果を報告したが、両者は化学的構造が類似している事を考えると興味ある報告といえる。

さて、大腸癌の発癌に関与する因子には多くのものが考えられているが、とくに腸内細菌叢は食餌成分や摂取された食餌成分に対し反応性に代謝分泌される内因性物質を、発癌物質や補発癌物質に代謝活性化する作用によって大腸発癌に関与しているとされている。なかでも腸内細菌により腸管内で代謝を受ける胆汁酸の発癌性やプロモーター作用は重要である。Narisawa ら<sup>9)</sup> は各種胆汁酸の大腸発癌に対する増強効果を報告しており、LCA が培養細胞の DNA に構造変化を起こしたとの報告<sup>10)</sup> もみられ、LCA の initiator としての活性が推測されている。著者らは今回コレステロールの大腸発癌に対する増強作用について報告したが、その機序として糞便中の胆汁酸の増量が重要な因子と考えている。またコレステロールの投与によって糞便中のコレステロールは著増を示すが、これらのエポキシド体が大腸発癌に何らかの関与をしていることが推定されるが、その詳細に関しては不明である。大腸発癌に関しては外因性の因子や内因性因子が複雑にからみあっているが、これら大腸発癌の機序を明らかにし、本邦において増加傾向にある大腸癌に対し何らかの予防的方策を講ずることは困難な途ではあるが、可能性のあることと考えている。

#### V. おわりに

大腸発癌には腸内細菌が重要な役割を演じており、腸内細菌由来の  $\beta$ -Gase に対する阻害剤による大腸発癌抑制効果について述べるとともにコレステロールによる大腸発癌増強効果とその機序の一端を明らかにしたので報告した。

#### 文 献

- 1) Takada H, Hirooka T, Hiramatsu Y et al: Effect of  $\beta$ -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 42: 331-334, 1982
- 2) Fishman WH:  $\beta$ -glucuronidase. In: *Method*

- of Enzymatic Analysis. 2nd ed. Edited by Bergmeyer HU., New York, Academic Press, Inc., 1974, p929-943
- 3) Madsen D, Beaver M, Chang L et al: Analysis of bile acids in conventional and germ-free rats. *J Lipid Res* 17 : 107-111, 1976
  - 4) Miettinen TA, Ahrens EH, Grundy SM: Quantitative isolation and gas-liquid analysis of total dietary and fecal neutral steroids. *J Lipid Res* 6 : 411-424, 1965
  - 5) 平山 雄: 日本と世界の大腸癌. 常田建二編, 大腸癌のすべて. 東京, 南江堂, 1978, p15-28
  - 6) Reddy BS, Narisawa T, Wright P et al: Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res* 35 : 287-290, 1975
  - 7) 松島泰次郎, Richard SY, 原 和子ほか: アゾキシメタンによる大腸癌, ロイペプチンによる抑制. *医のあゆみ* 88 : 710-714, 1973
  - 8) Raicht RF, Cohen BI, Fazzin EP et al: Protective effects of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res* 40 : 403-405, 1980
  - 9) Narisawa T, Magadia NE, Weisburger JH et al: Promoting effects of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *JNCI* 53 : 1093-1097, 1974
  - 10) Kulkarni MS, Heidepriem PM, Yielding KL: Production by lithocholic acid of DNA strand breaks in L 1210 cells. *Cancer Res* 40 : 2666-2669, 1980