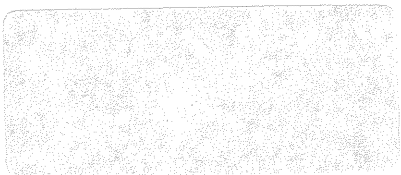


199800143A

発がんの抑制に関する実験的研究

主任研究者
津田 洋 幸



厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

発がんの抑制に関する実験的研究

主任研究者 津田洋幸 国立がんセンター研究所部長

研究要旨 ラットにおいて大腸発がん抑制作用のある牛乳成分ウシラクトフェリン (bLF) は新たに肺と舌に対する発がんと*ApcMin*マウス大腸発がんにも有効であることが分かった。しかしbLFのペプシンによる消化産物のbLFHには食道発がんを促進する可能性が示唆された。抗炎症剤でCOX-2選択的阻害剤ニメスリドは消化管障害の少ない大腸発がん予防薬として有用であることが分かった。フラボノイドのモリンは舌と大腸発がんに対して抑制効果を示し、その作用には細胞増殖活性抑制の関与が示された。大豆製品に含まれるフィトエストロゲンのゲニステインおよびダイゼインはラット前立腺腹葉がんの発生を抑制した。しかし血中エストラジオール値の上昇はみられず、ホルモン活性以外の機序の関与が示唆された。トマトジュースは大腸発がん抑制作用を示すが、主要成分のリコペン以外の成分の関与が考えられた。黄杞茶に含有されているフラボノイドのアスチルピンはマウス肺発がん抗プロモーション作用を示すことが明かとなった。

分担研究者

1. 津田洋幸 国立がんセンター研究所部長
2. 若林啓二 国立がんセンター研究所部長
3. 西野補翼 京都府立医科大学 教授
4. 白井智之 名古屋市立大学医学部 教授
5. 小西陽一 奈良県立医科大学 教授
6. 田中卓二 金沢医科大学 教授
7. 渡辺 昌 東京農業大学 教授

A. 研究目的

がんは死亡原因の第1位を占めており、がんの発生を抑制することは緊急を要する課題である。疫学的研究により食品中の因子ががん発生に深く関与していると考えられ、これらの中からがん化学予防に直結する物質を見出すことは社会的必要性の高い研究である。本研究の目的は、主として食品中に含まれる新しいがん予防物質をラット及びマウスを用いた実験系で見出すことにある。有効な物質は全臓器的な見地にて毒作用等の検討を十分に行い、臨床試験の実施に即した情報を得ることにある。本研究により、食品成分のラクトフェリン、フラボノイド、カロテノイド、

フィトエストロゲンさらに非ステロイド抗炎症剤のCOX-2阻害剤と抗生物質等のがん化学予防物質としての有効性が明らかになれば、臨床応用に直結したデータが得られることになる。

B. 研究方法

(1) ラクトフェリン発がん抑制作用
ラット大腸発がんを顕著に抑制する牛乳中の抗菌成分のウシラクトフェリン (bLF) の*ApcMin*マウス大腸発がん抑制作用とラット多臓器発がん修飾作用を検索した。**実験1**：6週齢*ApcMin*マウスに2%と0.2%のbLFを8週間投与した。対照群は無処置とした。**実験2**：5週齢F344雄ラットにN,N-diethylnitrosamine (DEN, 100mg/kg, i.p., 第1日)、N,N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN, 0.1%, 飲料水, 第2-5週)、N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA, 0.5mg/kg, s.c., 第7-8週に計5回) の多臓器発がん処置後、第11週から41週まで2%、0.2%、0.02%および0.002%のbLFを混餌投

与し (n=14-19)、食道、肺、肝、腎、甲状腺の腫瘍病変について発がん処置のみの対照群 (n=29) と比較した。(津田洋幸)

(2) ラクトフェリンの肺、食道、甲状腺、肝および腎における発がん修飾作用
6週齢雄Wistarラットを用い12群に分けた。第1群は基礎食投与のみ、第2群は2%bLF、第3群は2%ラクトフェリンペプシン分解産物(bLFH)、第4群は飲水中2000ppmBHPを12週間投与し、第5群はBHP→0.5% bLF、第6群はBHP→2%bLF、第7群はBHP→0.5%bLF H、第8群はBHP→2% bLFHとした。第9から12群は実験開始時より同用量BHP12週間投与し、bLFとbLFHはBHP投与期間中も含め全期間中投与した。第9群は0.5% bLF、第10群は2% bLF、第11群は0.5% bLFH、第12群は2%bLFHとした。実験開始後20週にて全動物を屠殺、剖検し、肺、甲状腺、胸腺、腎、肝、食道腫瘍の発生について検索した。(小西陽一)

(3) ラクトフェリンのPhIP誘発乳腺発がん修飾作用
6週齢SD雌ラット89匹を用い、全ての群に20%高脂肪基礎食与えた。第1群は無処置(12匹)、第2群はPhIP(26匹)、第3群は0.2% bLF+PhIP(25匹)、第4群は2% bLF+PhIP(26匹)とし、bLFは実験の全期間投与した。PhIPはbLF投与開始2週目より85mg/kgづつ8回胃内投与した。全経過40週にて屠殺した。(渡辺 昌)

(4) cyclooxygenase-2(COX-2)選択的阻害物質ニメスリド(4-nitro-2-phenoxymethanesulphonanilide)のマウス大腸発がん抑制作用
6週齢の雄ICRマウスにAOMを10mg/kgの用量で週1回、6週間腹腔内投与した。ニメスリドは200 ppm、400 ppmの濃度でAOM投与の前日から実験終了まで30週間混餌投与した。対照群には基礎飼料のみとした。(若林敬二)

(5) モリンのラット舌、大腸発がん抑制作用

マメ科植物等に存在するフラボノイドのモリンについて、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発舌発がんモデルと

azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸発がんモデルを用いて、発がん修飾効果を検討した。実験1：舌発がん抑制作用：F344雄性ラットに4-NQO (20 ppm) を8週間飲水投与した。イニシエーション期(4-NQO投与開始の1週間前から10週間)、ポストイニシエーション期(4-NQO投与終了の1週間後から22週間)に100 ppmないし500 ppmのモリンを混餌投与し32週で終了した。また、舌上皮の細胞増殖活性(PCNA標識率)の変化と肝、舌粘膜のglutathione S-transferase(GST)、quinone reductase (QR) 活性も測定した。(以上n=136) 実験2：イニシエーション期ではAOM

(15mg/kg、s.c/wx3) 投与前後1週間の計5週間、ポストイニシエーション期ではAOM投与終了後の28週間混餌投与し、全経過32週で終了した。大腸腫瘍の発生頻度とACFにおけるPCNA標識率と肝、大腸粘膜におけるGST、QR活性を測定した。(n=55) (田中卓二)

(6) フィトエストロゲンのラット前立腺発がん抑制作用

大豆等に含まれる女性ホルモン活性物質のフィトエストロゲンは、ヒト乳がん、前立腺がんおよび大腸がんの発生率の低下と関係していると考えられている。2種のフィトエストロゲンのゲニステインおよびダイゼインのラット前立腺発がんに対する抑制作用の有無を検討した。

実験1：腹葉前立腺に対するフィトエストロゲンの影響を検討する目的でF344雄ラットに3-2' dimethyl 4-aminobiphenyl (DMAB) を20週間投与後ゲニステインあるいはダイゼインをそれぞれ0.1%の濃度で40週間混餌投与した。実験2：フィトエストロゲンの細胞増殖に対する影響を検討する目的で短期実験を行

い、4週間0.1% ゲニステインと 0.1% ダイゼインを投与し、血中のホルモンレベルと前立腺上皮のPCNAの標識率を検討した。(白井智之)

(7) リコピンとアスチルビンの発がん抑制作用

カロテノイドのリコピンは、肺、肝および皮膚発がんに対して抑制効果を示すことを明らかにしてきた。本研究ではリコピン及びリコピンを豊富に含有するトマトジュースの大腸発がん抑制作用と、漢方薬の黄杞茶に含有されているフラボノイドのアスチルビンの肺発がん抗プロモーション作用を検索した。実験1: F344 ラットを用い、MNU直腸内投与誘発大腸発がんに対するトマトジュース(リコピンが50 ppm 含まれるように調整したトマトジュース)あるいはリコピン(飲料水中50 ppm)の作用を比較した。実験2: ddYマウスを用い、4-NQO(0.3mg/マウス、s.c.)にてイニシエーション処置し、1か月後からプロモーターのグリセロール(飲料水中8%)を25週間経口投与した。アスチルピンはプロモーション過程の全期間にわたって週3回0.2mg、胃内投与した。(西野補翼)

C. 研究結果とD. 考察

(1) ラクトフェリン発がん抑制作用

実験1: 6週齢ApcMinマウスにおける空腸ポリープの数は対照群 18.83 ± 1.96 に対し2%群 12.80 ± 1.80 (対照の68%)で有意の減少($P < 0.05$)を示した。十二指腸、回腸、大腸でも減少傾向が見られた。実験2: 食道腫瘍(乳頭腫+がん)の数は対照 0.48 ± 0.11 に対し、0.2%群で 0.05 ± 0.05 であり、肺腫瘍(腺腫+がん)の数は対照の 3.48 ± 0.33 に対し、0.02%群で 1.98 ± 0.41 でそれぞれ有意の($P < 0.05$)減少がみられた。肝腫瘍(腺腫+がん)は増加傾向、腎上皮腫瘍は減少傾向、甲状腺腫瘍は差はなかった。従ってbLFは食道、肺発がんを抑制することが示された。肝では促進傾向がみられたことは今後の研究課題となった。

(2) ラクトフェリンの肺、食道、甲状腺、肝および腎における発がん修飾作用
bLF投与による毒性変化は見られなかった。bLFH投与の第7、8、11群において、食道扁平上皮がんの発生頻度はそれぞれ55、43、36%と第4群11%に比較して有意に

($P < 0.05$)増加しており、1匹あたりのがんの発生個数もそれぞれ 0.6 ± 0.7 、 0.4 ± 0.5 、 0.5 ± 0.7 と第4群の 0.1 ± 0.3 に比較して有意な($P < 0.05$)増加がみられた。肺病変の発生頻度は各群間に有意差はみられなかったが、動物1匹あたりの肺胞上皮過形成の発生個数は第4群 8.9 ± 3.8 に対して、2%bLF投与の第6、10群において 4.9 ± 2.4 、 5.8 ± 2.9 と有意に減少していた。腺がんの発生個数は2%bLF投与群において減少傾向がみられた。甲状腺腫瘍、肝腫瘍、腎腫瘍の発生頻度、発生個数は、各群間に有意差はみられなかった。以上から、BHPによるラット発がん実験系において、2%LFには軽度の肺発がん抑制作用がみられた。一方、0.5%および2%bLFHは食道扁平上皮がんの発生を促進し、bLFとは異なる結果であった。

(3) ラクトフェリンのPhIP誘発乳腺発がん修飾作用

bLF投与による毒性変化は見られなかった。触診による累積腫瘍発生率はPhIPのみで53.8%、0.2%bLF+PhIPで72.0%、2%bLF+PhIPで69.2%であった。組織の標本は現在作成中である。以上から、bLFを投与した群で乳腺腫瘍の発生が促進される傾向がみられた。しかしこの結果に用量依存性がみられず、さらに確認する必要があると考えられた。

(4) COX-2選択的阻害物質ニメスリドのマウス大腸発がん抑制作用

ニメスリド投与による体重及び主要臓器重量の異常は認められなかった。尚、ニメスリドのマウス1匹当たりの平均摂取量は、200ppm投与群で20.9mg/kg体重、400ppm投与群で38.8mg/kg体重であった。対照群及びニ

メスリド投与群に発生した大部分の大腸腫瘍は、高分化又は中分化型腺がんであった。大腸がんの発生率は対照群の50% (14/28) に対して、ニメスリド200ppm投与群で32% (12/37) に、400 ppmで25% (10/40) に減少した ($P<0.01$)。マウス一匹当たりの大腸がんの個数は対照群で 1.79 ± 0.47 、200 ppm投与群で 0.70 ± 0.28 、400 ppm投与群で 0.35 ± 0.11 であり、有意 ($P<0.01$) に低下した。大腸がんの大きさも低下することがわかった。非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)は、大腸発がん抑制効果を示すが消化器系に潰瘍等の副作用を引き起こす。ニメスリドは、インドメタシンと同様の抗炎症作用をもつNSAIDであるが消化管障害がすくないことが知られており副作用の少ない大腸発がん予防薬として有用であることが分かった。

(5) モリンの舌、大腸発がん抑制作用

実験1：舌扁平上皮がんの発生頻度は、イニシエーション期投与群では、100 ppmで5%、500 ppmで0%であり、対照の4-NQO投与群の56%に比べて有意に

($P<0.001$) 減少した。ポストイニシエーション期投与群でも100、500 ppmとも5%であり有意に ($P<0.001$) 減少した。舌上皮のPCNA標識率(%)は、モリンのイニシエーション投与群 (100 ppm : 17.6 ± 5.0 、500 ppm : 15.7 ± 5.7)、ポストイニシエーション期投与群 (100 ppm : 15.8 ± 7.8 、500 ppm : 17.0 ± 5.1) で4-NQO投与群 (24.3 ± 2.9) に比べ有意 ($P<0.05$) に減少した。肝GST活性 (mU/mgprotein) はイニシエーション期投与で、4-NQO投与群 (511 ± 37) に比べ1.25-1.18倍 ($P<0.02$) と有意に増加した。また肝QR活性 (mU/mg protein) イニシエーション期投与で対照の4-NQO群の1.12-1.48倍 ($P<0.05$)、ポストイニシエーション期投与で1.97-2.30倍 ($P<0.001$) と有意に増加した。舌QR活性はイニシエーション期投与で0.55-0.53倍 ($P<0.001$)、ポストイニシエーション期投与で0.52-0.52倍 ($P<0.001$) と有意に減少

した。**実験2**：大腸腺がん発生頻度は、イニシエーション期投与群 (43%)、ポストイニシエーション期投与群 (29%) であり、AOMのみの対照群 (75%) に比べ減少し、ポストイニシエーション期で有意の減少をみた ($P=0.023$)。発生個数では有意差はなかった。ACFのPCNA標識率は、ポストイニシエーション期投与群 (27.9 ± 6.3) でAOM投与群 (18.8 ± 5.2) に比べ有意 ($P<0.05$) に減少した。肝、大腸のGST活性はポストイニシエーション期投与でAOM投与群 (肝 : 517 ± 9 、大腸 : 73 ± 5) に比べ、それぞれ1.13倍 ($P<0.01$)、1.57倍 ($P<0.001$) と、また肝、大腸のQR活性はモリンの後イニシエーション相投与でAOM投与群 (肝 : 52 ± 9 、大腸 : 283 ± 37) に比べ、それぞれ1.60倍 ($P<0.005$)、1.33倍 ($P<0.005$) と有意に増加した。モリンのイニシエーション期投与では大腸のGST (1.39倍、 $P<0.001$)、QR活性 (1.25倍、 $P<0.01$) のみが有意に増加した。フラボノイドの黄色色素であるモリンは、抗酸化作用やアラキドン酸カスケードに関与する酵素 (COX、LOX) の阻害作用を有するが、舌と大腸発がんに対して抑制効果を示すことが分かった。その抑制効果には細胞増殖活性の修飾作用が関与していることが明らかとなった。(田中卓二)

(6) Phytoestrogenのラット前立腺発がん抑制作用

実験1：対照DMAB単独投与群では腹葉の異型過形成およびがんの発生頻度は、それぞれ80%および45%に対し、ゲニステイン投与群ではそれぞれ53%、18%、ダイゼイン投与群ではそれぞれ58%、16%と抑制傾向が見られた。また異型過形成およびがん発生数/ラットは、対照でそれぞれ 3.0 ± 4.0 および 0.8 ± 1.1 、ゲニステイン投与群では 1.6 ± 1.9 および 0.1 ± 0.4 、ダイゼイン投与群で 1.7 ± 1.8 および 0.1 ± 0.4 であり、ゲニステイン投与群、ダイゼイン投与群で異型過形成は抑制傾向、がんは有意に ($P<0.05$) 抑制された。血中のテストステロンおよびエストラジオールレベ

ルは有意差は見られなかった。実験2：4週間の短期実験では、ダイゼイン+ゲニステインの血中濃度は対照群は 275 ± 117 ($\mu\text{g/l}$)であったが、ゲニステインおよびダイゼイン投与群ではそれぞれ、 363 ± 151 , 421 ± 285 と高い傾向を示した。前立腺腹葉におけるPCNA陽性細胞率は有意差はなかった。以上から、大豆に含まれるゲニステインおよびダイゼインはラット腹葉前立腺がんの発生を有意に抑制し、*in vitro*や疫学データを裏付ける結果となっている。しかし、両物質の女性ホルモン活性は、 $17-\beta$ エストラジオールの10万分の1程度で、受容体結合性能は $1/1000 \sim 10000$ である。事実、血中のエストラジオールの濃度の上昇はみられなかった。従ってホルモン活性以外の機序で前立腺がん発生に対し抑制的に働くことが示唆された。

(7) リコピンとアスチルビンの発がん抑制作用

実験1：大腸腫瘍の発生率は、対照群($n=24$)では54%であったのに対して、トマトジュース(リコピン50 ppmに調製)群 ($n=24$)で21%、リコピン33%であり有意の

($P < 0.01$) 抑制がみられた。ラット一匹当たりの大腸腫瘍の発生個数では、対照群では 0.6 ± 0.6 個であったのに対して、トマトジュース群では 0.3 ± 0.5 、リコピン群 0.4 ± 0.6 であり有意 ($P < 0.05$) の減少を示した。トマトジュースの方が、精製したリコピンよりも高い抑制効果を示した。実験2：対照群($n=15$)における発生率および平均発生数はそれぞれ93%、 3.1 ± 2.2 個/マウスであったのに対して、アスチルビン投与群 ($n=15$)では40% ($P < 0.01$)、 0.9 ± 1.3 個/マウス

($P < 0.01$) であり、有意の抑制作用がみられた。以上から、トマトジュースの方が、リコピンを単独投与した場合よりも強い抑制効果を示したことから、トマトジュース中にはリコピン以外にも有効成分が含まれていると考えられた。アスチルビンは、優れた発がん抗プロモーション作用を示すことが明らかとなり、今後さらに検討を加える価値のある物質

であると考えられた。

E. 結論

ラットにおいて、大腸発がん抑制作用のある牛乳成分ウシラクトフェリン (bLF) に、新たに肺に対しても発がん抑制作用のあることが分かった。しかしbLFのペプシン分解産物のbLFHには食道発がんを促進する可能性が示唆された。bLFと関連物質の発がん修飾作用についてはさらに検索する必要があると考えられた。非ステロイド性抗炎症剤のCOX-2選択的阻害物質ニメスリドは消化管障害の少ない大腸発がん予防薬として有用であることが分かった。フラボノイドのモリンは舌と大腸発がんに対して抑制効果を示した。大豆製品に含まれるフィトエストロゲンのゲニステインおよびダイゼインはラット腹葉前立腺がんの発生を抑制したが、その作用にはホルモン活性以外の機序が示唆された。トマトジュースの大腸発がん抑制作用には主要成分のリコピン以外の有効成分の関与があると考えられた。黄杞茶に含まれるフラボノイドのアスチルビンはマウス肺発がん抗プロモーション作用を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kim, J. M., Araki, S., Kim, D. J., Park, C. B., Takasuka, N., Baba-Toriyama, H., Ota, T., Nir, Z., Khachid, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T., Uraji, T., Murakoshi, M., Nishino, H. and Tsuda, H., Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis*, 19(1): 81-85 (1998).
2. Moore, M. A., Tsuda, H. Insulin sensitizers: a promising group of cancer preventive agents? *The Cancer Journal*, 11(2): 72-75 (1998).
3. Moore, M. A., Park, C. B. and Tsuda, H. Implications of the hyperinsulinaemia-

- diabetes-cancer link for preventive efforts. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 89-107 (1998).
4. Asamoto, M., Baba-Toriyama, H., Krutovskikh, V., Cohn, S. M. and Tsuda, H. Enhanced tumorigenicity of rat bladder squamous cell carcinoma cells after abrogation of gap junctional intercellular communication. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 481-486 (1998).
 5. Moore, M. A., Park, C. B. and Tsuda, H. Soluble and insoluble fiber influences on cancer development. *Oncology Hematology*, 27: 229-242 (1998).
 6. Moore, M. A., Park, C. B., and Tsuda, H. Physical exercise: a pillar for cancer prevention? *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 177-193 (1998).
 7. Asamoto, M., Hori, T., Baba-Toriyama, H., Sano, M., Takahashi, S., Tsuda, H. and Shirai, T. p16 gene overexpression in mouse bladder carcinomas. *Cancer Lett.*, 127: 9-13 (1998).
 8. Nagamachi, Y., Tani, M., Shimizu, K., Tsuda, H. Niitsu, Y. and Yokota, J., Orthotopic growth and metastasis of human non-small cell lung carcinoma cells injected into the pleural cavity of nude mice. *Cancer Lett.*, 127: 203-209 (1998).
 9. Moore, M. A., Kunimoto, T., Park, C. B., Takasuka, N. and Tsuda, H. Cross-country comparisons provide evidence of a strong link between female lung and colon adenocarcinoma development. *The Cancer Journal*, 11(5): 259-262 (1998).
 10. Tsuda, H., Sekine, K., Nakamura, J., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Kim, D. J., Asamoto, M., Baba-Toriyama, H., Moore, M. A., Nishino, H. and Kakizoe, T. Inhibition of azoxymethane initiated colon tumor and aberrant crypt foci development by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 443: 273-284 (1998).
 11. Tsuda, H., Iwase, T., Matsumoto, K., Ito, M., Hirono, I., Nishida, Y., Takasuka, N., Iwahori, Y., Ota, T., Kim, D. J. and Kadenbach, B. Histogenetic stereological reconstruction of rat basophilic, Clear, and oncocytic neoplastic renal cell lesions using carbonic anhydrase type II-PAS double-stained sections. *Toxicol. Pathol.*, 26(6): 769-776 (1998).
 12. Moore, M. A., Thamavit, W., Tiwawech, D., Ito, N. and Tsuda, H. Modulation of dihydroxy-di-n-propylnitrosamine-induced liver lesion development in opisthorchis-infected syrian hamsters by praziquantel treatment in association with butylated hydroxyanisole or dehydroepiandrosterone administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 1113-1117 (1998).
 13. Moore, M. A., Tsuda, H. Co-ordination and ecology in practical cancer prevention. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 409-415 (1998).
 14. Moore, M. A., Tsuda, H. Chronically elevated proliferation as a risk factor for neoplasia. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 353-385 (1998).
 15. Moore, M. A., Kunimoto, T., Park, C. B., Takasuka, N. and Tsuda, H. European country comparisons provide evidence of a link between colon cancer and adenocarcinoma development in the lung but not the oesophagus. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 473-478 (1998).
 16. Ushida, Y., Sekine, K., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M. and Tsuda, H. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on intestinal polyposis in the ApcMin mouse. *Cancer Lett.*, 134: 141-145 (1998).
 17. Moore, M. A., Kunimoto, T. and Tsuda, H. Cancer associations at the country level and shared risk factors - a fuzzy concept? *Eur. J. Cancer Prev.*, 8: 63-65 (1998).
 18. Moore, M. A., Tsuda, H. Cancer screening:

- an educational challenge. *Eur. J. Cancer Prev.*, 8: 7-16 (1998).
19. Moore, M. A., Kunimoto, T., Park, C. B., Takasuka, N. and Tsuda, H. Cross-country comparisons of colon and rectal cancer mortality suggest the existence of differences risk factors in eastern and western Europe. *Eur. J. Cancer Prev.*, 8: 67-71 (1998).
 20. Tsuda, H., Park, C. B. and Moore, M. A. Short-and medium-term carcinogenicity tests:simple initiation-promotion assay systems.In:The use of short- and medium-term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation. D. B. McGregor, J. M. Rice, S. Venitt, eds., IARC Scientific Publications, No.146, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp: 203-249 (1998).
 21. Ushida, Y., Sekine, K., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M., Maeda, M. and Tsuda, H. Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 262-267 (1999).
 22. Iigo, M., Tsuda, H. Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice.Clinical and Experimental Metastasis, in press.
 23. Moore, M. A., Tsuda, H., Marriage of a medium-term liver model to surrogate markers - a practical approach for risk and benefit assessment.*Toxicol.Pathol.*, in press.
 24. Takahashi, M., Fukuda, K., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. β -Catenin is frequently mutated and demonstrates altered cellular location in azoxymethane-induced rat colon tumors. *Cancer Res.*, 58: 42-46 (1998).
 25. Ohata, T., Fukuda, K., Murakami, A., Ohigashi, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Inhibition by 1' - acetoxychavicol acetate of lipopolysaccharide -and interferon- γ - induced nitric oxide production through suppression of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW264 cells. *Carcinogenesis*, 19: 1007-1012 (1998).
 26. Onozawa, M., Fukuda, K., Ohtani, M., Akaza, H., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28: 360-363 (1998).
 27. Fukutake, M., Nakatsugi, S., Isoi, T., Takahashi, M., Ohta, T., Mamiya, S., Taniguchi, Y., Sato, H., Fukuda, K., Sugimura T. and Wakabayashi, K. Suppressive effects of nimesulide, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 19: 1007-1012(1998).
 28. Nishino, H. Cancer prevention by carotenoids. *Mutation Res.*, 402: 159-163 (1998).
 29. Okajima, E., Tsutsumi, M., Ozono, S., Akai, H., Denda, A., Nishino, H., Oshima, S., Sakamoto, H. and Konishi, Y. Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine initiation. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 22-26 (1998).
 30. Colombo, D., Scala, A., Taino, I. M., Toma, L., Ronchetti, F., Tokuda, H., Nishino, H., Nagatsu, A., Sakakibara, J. Inhibitory effect of fatty acid monoesters of 2-O-b-D-glucosylglycerol on Epstein-Barr virus activation. *Cancer Lett.*, 123: 83-86 (1998).
 31. Kim, J. M., Araki, S., Kim, D. J., Park, C. B., Takasuka, N., Baba-Toriyama, H., Ota, T., Nir, Z., Khachik, F., Shimidzu, N., Tanaka, Y., Osawa, T., Uraji, T., Murakoshi, M., Nishino, H. and Tsuda, H. Chemopreventive effect of carotenoids and

- curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis*, 19: 81-85 (1998).
32. Nosaka, K., Kawahara, M., Masuda, M., Satomi, Y. and Nishino, H. Association of Nucleoside Diphosphate Kinase nm23-H2 with Human Telomeres. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243: 342-348 (1998).
 33. Kapadia, G. J., Tokuda, H., Sridhar, R., Balasubramanian, V., Takayasu, J., Bu, P., Enjo, F., Takasaki, M., Konoshima, T. and Nishino, H. Cancer chemo-preventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. *Cancer Lett.*, 129: 87-95 (1998).
 34. Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H., Nishino, H., Duc, N. M., Kasai, R., and Yamasaki, K. Anti-tumor-promoting activity of Majonoside-R2 from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv (I). *Biol. Pharm. Bull.*, 21: 834-838 (1998).
 35. Nishino, H. Cancer prevention by natural carotenoids. in "Antioxidant Food Supplements in Human Health", eds., Packer, L., Hiramatsu, M., and Yoshikawa, T., Academic Press, San Diego, pp: 231-288 (1998).
 36. Nishino, H. Carotenoids, as promising factor for functional foods. in "Functional Foods for Disease Prevention I: Fruits, Vegetables, and Teas", eds., Shibamoto, T., Terao, J., and Osawa, T., the American Chemical Society, New York, pp: 59-70 (1998).
 37. Cui, L., Mori, T., Takahashi, S., Imaida, K., Akagi, K., Yada, H., Yaono, M. and Shirai, T. Slight promotion effects of intermittent administration of testosterone propionate and/or diethylstilbestrol on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-initiated rat prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 122: 195-199 (1998).
 38. Takahashi, S., Hirose, M., Tamano, S., Ozaki, M., Orita, S.-I., Ito, T., Takeuchi, M., Ochi, H., Fukada, S., Kasai, H. and Shirai, T. Immunohistochemical detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in paraffin-embedded sections of rat liver after carbon tetrachloride treatment. *Toxicol. Pathol.*, 26: 247-252 (1998).
 39. Kato, K., Takahashi, S., Mori, T., Futakuchi, M., Cui, L., Ito, N. and Shirai, T. Establishment of transplantable rat prostate carcinomas from primary lesions induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone. *J. Toxicol. Pathol.*, 11: 27-32 (1998).
 40. Futakuchi, M., Hirose, M., Miki, T., Tanaka, H., Ozaki, M. and Shirai, T. Inhibition of DMBA-initiated rat mammary tumour development by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone, phenylethyl isothiocyanate, and novel synthetic ascorbic acid derivatives. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 153-159 (1998).
 41. Kato, T., Hirose, M., Takahashi, S., Hasegawa, R., Kohno, T., Nishibe, S., Kato, K. and Shirai, T. Effects of the Lignan, Arctiin, on 17- β -ethinyl estradiol promotion of preneoplastic liver cell foci development in rats. *Anticancer Res.*, 18: 1053-1058 (1998).
 42. Hirose, M., Futakuchi, M., Tanaka, H., Orita, S.-I., Ito, T., Miki, T. and Shirai, T. Prevention by antioxidants of heterocyclic amine-induced carcinogenesis in a rat medium-term liver bioassay: results of extended and combination treatment experiments. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 61-67 (1998).
 43. Ogawa, K., Futakuchi, M., Hirose, M., Boonyaphiphat, P., Mizoguchi, Y., Miki, T. and Shirai, T. Stage and organ dependent effects of 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone, ascorbic acid derivatives, n-heptadecane-8,10-dione and

- phenylethyl isothiocyanate in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Int. J. Cancer*, 76: 851-856 (1998).
44. Hirose, M., Ito, T., Takahashi, S., Ozaki, M., Ogiso, T., Nihro, Y., Miki, T. and Shirai, T. Prevention by synthetic phenolic antioxidants of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)- or activated MeIQx-induced mutagenesis and MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis, and role of antioxidant activity in the prevention of carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 233-241 (1998).
 45. Takahashi, S., Tamano, S., Hirose, M., Kimoto, N., Ikeda, Y., Sakakibara, M., Tada, M., Kadlubar, F. F., Ito, N. and Shirai, T. Immunohistochemical demonstration of carcinogen-DNA adducts in tissues of rats given 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP): Detection in paraffin-embedded sections and tissue distribution. *Cancer Res.*, 58: 4307-4313 (1998).
 46. Iwasaki, S., Kato, K., Mori, T., Takahashi, S., Futakuchi, M. and Shirai, T. Development of androgen-independent carcinomas from androgen-dependent preneoplastic lesions in the male accessory sex organs of rats treated with 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone propionate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 23-30 (1999).
 47. Majima, T., Tsutsumi, M., Nishino, H., Tsumoda, T. and Konishi, Y. Inhibitory effects of β -carotene, Palm carotene, and Green Tea polyphenols on pancreatic carcinogenesis initiated by *N*-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters. *Pancreas*, 16: 13-18 (1998).
 48. Okajima, E., Tsutsumi, M., Ozono, S., Akai, H., Denda, A., Nishino, H., Okita, S., Sakamoto, H. and Konishi, Y. Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine initiation, *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 22-26 (1998).
 49. Okajima, E., Denda, A., Ozono, S., Takahama, M., Akai, H., Sasaki Y., Kitayama, W., Wakabayashi, K. and Konishi, Y. Chemoprevention effects of Nimesulide, a Selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary bladder carcinomas initiated *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res.*, 58: 3028-3031 (1998).
 50. Denda, A., Endho, T., Tang, Q., Tsujiuchi, T., Nakae, D. and Konishi, Y. Prevention by inhibitors of arachidonic cascade of liver carcinogenesis, cirrhosis and oxidative DNA damage caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Mutation Res.*, 402: 279-288 (1998).
 51. Kobayashi, Y., Nakae, D., Akai, H., Kishida, H., Okajima, E., Kitayama, W., Denda, A., Tsujiuchi, T., Murakami, A. and Konishi, Y. Prevention by 1'-acetoxychavicol acetate of the induction but not growth of putative preneoplastic, glutathione S-transferase placental form-positive, focal lesion in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet., *Carcinogenesis*, 19: 1809-1814 (1998).
 52. Nakae, D., Kotake, Y., Kishida, H., Hensly, K., Denda, A., Kobayashi, Y., Kitayama, W., Tsujiuchi, T., Sang, H., Stewart, C., Tabatabaie, T., Floyd, R. and Konishi, Y. Inhibition by Phenyl *N*-tert Butyl Nitron of early phase carcinogenesis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet., *Cancer Res.*, 58: 4548-4551 (1998).
 53. Yoshimoto, M., Tsutsumi, M., Iki K., Sasaki, Y., Tsujiuchi, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. and Konishi, Y.

- Carcinogenicity of heterocyclic amine for the pancreatic duct epithelium in hamsters., *Cancer Lett*, in press.
54. Iki, K., Konishi, Y. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), membrane-type 1 MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and activation of proMMP-2 in pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters treated with N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine., *Carcinogenesis*, in press.
 55. Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Matsunaga, K., Mori, H., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Satoh, K., Hara, A., Maeda, M., Ota, T., Odashima, S., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rats. *Carcinogenesis*, 18: 425-431 (1998).
 56. Okuno, M., Tanaka, T., Komaki, C., Nagase, S., Shiratori, Y., Kajiwara, K., Maki, T. and Moriwaki, H. Suppressive effect of low amounts of safflower and perilla oils on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr. Cancer*, 30: 186-193 (1998).
 57. Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Hara, A., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Maeda, M., Ota, T., Odashima, S., Yamane, T., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. Citrus auraptene exerts dose-dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis: the inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid peroxidation, and induction of phase II drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 58: 2550-2556 (1998).
 58. Sugie, S., Okamoto, K., Ueda, F., Watanabe, T., Tanaka, T. and Mori, H. Suppressive effect of irsogladine maleate on diethyl-nitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 371-376 (1998).
 59. Sugie, S., Okamoto, K., K.M. Wahidur Rahman, Tanaka, T., Kawai, K., Yamahara, J. and Mori, H. Inhibitory effects of plumbagin and juglone on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.*, 127: 177-183 (1998).
 60. Nakamura, Y., Murakami, A., Ohto, Y., Torikai, K., Tanaka, T. and Ohigashi, H. Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 11-acetoxychavicol acetate. *Cancer Res.*, 58: 4832-4839 (1998).
 61. Tatsuka, M., Katayama, H., Ota, T., Tanaka, T., Odashima, S., Suzuki, F. and Terada, Y. Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the Aurora- and Ip11-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res.*, 58: 4811-4816 (1998).
 62. K.M. Wahidur Rahman, Sugie, S., Okamoto, K., Watanabe, T., Tanaka, T. and Mori, H. Modulating effects of dirt high in w-3 and w-6 fatty acids in initiation and postinitiation stages of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 31-39 (1999).
 63. Ota, T., Maeda, M., Tatsuka, M., Matsui, T., Tanino, M. and Tanaka, T. Decrease of metastatic ability after selection for intravasating ability in Lewis lung carcinoma (3LL) cell line. *Cancer Lett.*, in press (1999).
 64. Tanaka, T., Kimura, M., Matsunaga, K., Fukuda, D., Mori, H. and Okano, Y. A centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res.*, in press (1999).
 65. Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Ushida, J., Honjo, S., Hara, A., Tsuda, H. and Mori, H. Modifying effects of a flavonoid morin on azoxymethane-induced large bowel tumorigenesis. *Carcinogenesis*, in press

- (1999).
66. Watanabe, S., Yamaguchi, M., Sobue, T., Takahashi, T., Miura, Y., Arai, S, H. Mazur W., Wahaha, K. and Adlercreutz, H. Pharmacokinetics of soybean isoflavonoids in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako). *J. Nutr* 128: 1710-1715 (1998).
 67. Watanabe, S., Changes of dietary habits for health promotion. *Proc. Asian Agriculture Society, Tokyo University of Agriculture, Tokyo* (1998).
 68. Watanabe, S., Adlercreutz, H. Pharmacokinetics of soy phytoestrogens in humans. *ACS Symposium Series 702: 198-208* (1998).
 69. Watanabe, S., Arai, Y., Haba, R. and Uehara, M. Adlercreutz H, Shimoi K, Kinai N. Dietary intake of flavonoids and isoflavonoids by Japanese and their pharmacokinetics and bioactivities. In; *Functional Food Properties: Overview and Disease Prevention. Vol 1, in press.*
 70. Adlercreutz, H., Yamada, T., Wahala, K. and Watanabe, S. Maternal and neonate phytoestrogen in Japanese women at birth. *Am J. Gynecol Obst, in press.*
2. 学会発表
1. 高須賀信夫、安田有利、朴哲範、金大中、関根一則、牛田吉彦、裏地達哉、大澤俊彦、津田洋幸、ラット多臓器発がんモデルによるテトラヒドロクルクミンの発がん抑制効果、第5回日本がん予防研究会、仙台、(1998年)
 2. 牛田吉彦、関根一則、高須賀信夫、久原徹哉、金大中、安田有利、朴哲範、西野輔翼、津田洋幸、ウシラクトフェリンのラット多臓器発がんモデルにおける修飾作用の検討、第5回日本がん予防研究会、仙台、(1998年)
 3. Malcolm A. Moore、國元武彦、朴哲範、高須賀信夫、津田洋幸、国別に見た肺の腺がんと大腸がんの相関の解析、第5回日本がん予防研究会、仙台、(1998年)
 4. 久原徹哉、飯郷正明、牛田吉彦、関根一則、津田洋幸、ウシラクトフェリン経口投与によるがん転移抑制作用とその機序の解析、第5回日本がん予防研究会、仙台、(1998年)
 5. 久原徹哉、飯郷正明、関根一則、津田洋幸、ウシラクトフェリンの経口投与によるマウス大腸がんコロネ26の肺転移抑制、第7回がん転移研究会総会、札幌、(1998年)
 6. 高須賀信夫、安田有利、朴哲範、金大中、関根一則、牛田吉彦、裏地達哉、大澤俊彦、津田洋幸、ラット多臓器発がんモデルによるテトラヒドロクルクミンの発がん抑制効果、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 7. 飯郷正明、久原徹哉、関根一則、津田洋幸、ウシラクトフェリンの経口投与によるマウス大腸がんコロネ26の肺転移抑制とその機構、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 8. 久原徹哉、飯郷正明、牛田吉彦、関根一則、津田洋幸、ウシラクトフェリン経口投与によるがん転移抑制作用機序の解析、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 9. 牛田吉彦、関根一則、久原徹哉、高須賀信夫、飯郷正明、安田有利、金大中、朴哲範、西野輔翼、津田洋幸、ウシラクトフェリンの大腸発がん抑制の作用機序の検討、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 10. 関根一則、牛田吉彦、久原徹哉、上原宣昭、朴哲範、金大中、出川雅邦、津田洋幸、ウシラクトフェリン(bLF)によるPhIPの大腸発がん抑制作用、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)

- 年)
11. 中継清一、太田俊久、高橋真美、杉江茂幸、境美智順、杉村隆、若林敬二、COX-2選択的阻害剤ニメスリドによるPhIP誘発ラット乳腺発がんの抑制、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 12. 西野輔翼、がん予防のためのデザイナーフーズ、1988年度日本農芸化学会、名古屋、(1998年)
 13. 西野輔翼、一酸化窒素によるマウス皮膚発がん、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 14. Nishino, H. Phytochemicals : a new health paradigm. Carotenoids and curcumine, California State Polytechnic University Symposium, Pomona, California (1998).
 15. 白井智之、雀林、小木曾正、加藤浩司、二口充、高橋智、DMAB誘発ラット前立腺癌に対する植物由来女性ホルモン活性物質genistin/genisteinおよびdaidzin/daidzeinの抑制作用、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 16. 田中卓二、川端邦裕、杉江茂幸、森秀樹、前田雅代、太田隆英、谷野幹夫、小田島肅夫、SilymarinによるAOM誘発ラット大腸がん前駆病変の抑制と解毒酵素GST、QR活性の修飾作用、第87回日本病理学会総会、広島、(1998年)
 17. 川端邦裕、田中卓二、杉江茂幸、森秀樹、前田雅代、太田隆英、谷野幹夫、小田島肅夫、Morinによる4-NQO誘発ラット舌発がんの抑制と解毒酵素GST、QR活性の修飾、第87回日本病理学会総会、広島、(1998年)
 18. 田中卓二、川端邦裕、和田啓爾、松井勇樹、前田雅代、太田隆英、谷野幹夫、小田島肅夫、Obakunone (Oba)、limonin (Limo)によるazoxymethane (AOM)誘発ラット大腸aberrant crypt foci (ACF)の抑制と解毒酵素の誘導、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 19. 川端邦裕、田中卓二、角本幹夫、松永研吾、前田雅代、太田隆英、谷野幹夫、村上明、小清水弘一、大東肇、森秀樹、1'-Acetoxychavicolacetate (ACA)によるN-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)誘発ラット食道腫瘍の抑制。第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)
 20. 甲野裕之、田中卓二、前田雅代、太田隆英、大土井知恵、山口宣夫、小田島肅夫、Azoxymethane (AOM)誘発ラット大腸aberrant crypt foci (ACF)に対するマグロ眼窩脂肪の抑制効果、第57回日本癌学会総会、横浜(1998年)
 21. 中村宜督、村上明、大音良美、鳥飼康二、大東肇、田中卓二、1'-Acetoxychavicolacetateの活性酸素産生抑制作用、第57回日本癌学会総会、横浜(1998年)
 22. 達家雅明、片山博志、太田隆英、寺田泰比古、田中卓二、小田島肅夫、鈴木文夫、細胞分裂を制御するM期カイネース遺伝子ヒトAIM1のクローニング、マッピングならびに癌細胞における発現異常の検討、第57回日本癌学会総会、横浜(1998年)
 23. 渡邊昌、Japanese Society for Food Factors、大豆胚軸茶の抗酸化能、東京(1998年)

発がんの抑制に関する実験的研究

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨 ラット前立腺癌発生に対するgenisteinおよびdaidzeinの抑制作用について検討した結果、genisteinおよびdaidzeinは実験前立腺癌の発生・進展に対して抑制的に働くことが示された。その抑制機序はホルモン変化や細胞増殖抑制に関わるものによるものではなく、別の要因によるものと推察された。

A. 研究目的

大豆食品をよく摂取する日本人をはじめとするアジアの人々の健康と大豆との関連性が注目され、大豆等に多量に含まれる植物由来で女性ホルモン活性を有するである phytoestrogenは、ヒト乳癌、前立腺癌および大腸癌の罹患率低下と関係していると考えられている。本研究ではgenisteinおよびdaidzeinの2種のphytoestrogenのラット前立腺癌に対する抑制作用の有無について検討した。

B. 研究方法

腹葉前立腺に対するphytoestrogenの影響を検討する目的でF344雄ラットに3-2' dimethyl 4-aminobiphenyl (DMAB)を20週間投与後 genisteinあるいはdaidzeinをそれぞれ0.1%の濃度で飼料中に混じり40週間投与した。またDMAB投与後にtestosterone propionate (TP)と同時にgenisteinあるいはdaidzeinを投与する群も設け、浸潤癌に対する影響も検討した。実験第60週で屠殺剖検し、前立腺を中心に病理組織学的検索を行った。さらに血中のテストステロンおよびエストロゲンの濃度を測定した。また、phytoestrogenの細胞増殖に対する影響を検討する目的で短期実験を行い、4週間0.1% genistein, 0.1% phytoestrogenを投与し、血中のgenistein, phytoestrogenレベルと前立腺上皮のPCNAの標識率を検討した。

C. 研究結果

対照群のDMAB単独投与群では腹葉の異型過形成および癌の発生頻度は、それぞれ80%

および45%みられたが、genistein投与群ではそれぞれ53%、18%、daidzein投与群ではそれぞれ58%、16%と抑制傾向が見られた。また異型過形成および癌の一個体あたりの平均発生数は、DMAB単独投与群でそれぞれ3.0±4.0および0.8±1.1(個/匹)、genistein投与群では1.6±1.9、0.1±0.4、daidzein投与群で1.7±1.8、0.1±0.4とgenistein投与群、daidzein投与群で異型過形成の数の抑制傾向が見られ、癌の数は有意に抑制された。また、浸潤癌の発生頻度は対照群のDMAB+TP投与群で8%、genistein投与群で14%、daidzein投与群で16%と発生率に差は見られなかった。血中のtestosteroneおよびestradiolの濃度は、DMAB単独投与群でそれぞれ0.4±0.3 (ng/ml), 4.9±1.1 (pg/ml)、genistein投与群で0.3±0.1, 4.4±1.2、daidzein投与群で6.6±1.8と、ホルモンレベルに対する有意な影響は見られなかった。

4週間の短期実験では、daidzein+genisteinの血中濃度は対照群は275±117 (ug/l)であったが、genistein投与群およびdaidzein投与群ではそれぞれ、363±151, 421±285と高い傾向を示した。腹葉前立腺におけるPCNA陽性細胞率は、対照群で0.3±0.2(%), genistein投与群で0.6±0.5、daidzein投与群で1.1±1.0と、有意な差は見られなかった。

D. 考察

大豆などに多く含まれるphytoestrogenは女性ホルモン活性を有するとともに、各種の癌細胞の増殖をin vitroで抑制するデータが報告されている。一方、大豆製品を摂取する民族

では、前立腺癌や乳癌の死亡率が低いことから、これらphytoestrogenが癌の抑制に働くとする疫学的研究報告も多い。本研究でもgenisteinおよびdaidzeinはラット腹葉前立腺癌の発生を有意に抑制し、in vitroや疫学データを裏付ける結果となっている。しかしgenisteinおよびdaidzeinの女性ホルモン様活性は、17- β エストラジオールの10万分の1程度で、受容体への結合性は1000分の1~1万分の1と、弱いものである。本研究で用いたphytoestrogenの濃度は、現在まで報告で見られる濃度に比べて低く、血中のエストラジオールの濃度の上昇もみられなかったことより、女性ホルモン様物質としての作用は弱く、浸潤癌の発生率に対して差は見られなかったのは、phytoestrogenの濃度が低かったことが原因のひとつと考えられる。また、細胞増殖に対しても影響が見られなかったことより、ホルモン活性の変化や細胞増殖抑制以外の機序でgenisteinおよびdaidzeinは実験前立腺癌発生に対し抑制的に働くことが示唆され、今後抑制機構の解明が必要である。

E. 結論

phytoestrogenであるgenisteinおよびdaidzeinは実験前立腺癌の発生・進展に対して抑制的に働くことが示された。その抑制機序はホルモン変化や細胞増殖抑制に関わるものによるものではなく、別の要因によるものと推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Cui, L., Mori, T., Takahashi, S., Imaida, K., Akagi, K., Yada, H., Yaono, M. and Shirai, T. Slight promotion effects of intermittent administration of testosterone propionate and/or diethylstilbestrol on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-initiated rat prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 122: 195-199 (1998).
2. Takahashi, S., Hirose, M., Tamano, S., Ozaki, M., Orita, S.-I., Ito, T., Takeuchi, M.,

Ochi, H., Fukada, S., Kasai, H. and Shirai, T. Immunohistochemical detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in paraffin-embedded sections of rat liver after carbon tetrachloride treatment. *Toxicol. Pathol.*, 26: 247-252 (1998).

3. Kato, K., Takahashi, S., Mori, T., Futakuchi, M., Cui, L., Ito, N. and Shirai, T. :Establishment of transplantable rat prostate carcinomas from primary lesions induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone. *J. Toxicol. Pathol.*, 11: 27-32 (1998).
4. Futakuchi, M., Hirose, M., Miki, T., Tanaka, H., Ozaki, M. and Shirai, T. Inhibition of DMBA-initiated rat mammary tumour development by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone, phenylethyl isothiocyanate, and novel synthetic ascorbic acid derivatives. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 153-159 (1998).
5. Kato, T., Hirose, M., Takahashi, S., Hasegawa, R., Kohno, T., Nishibe, S., Kato, K. and Shirai, T. Effects of the Lignan, Arctiin, on 17- β ethinyl estradiol promotion of preneoplastic liver cell foci development in rats. *Anticancer Res.*, 18: 1053-1058 (1998).
6. Hirose, M., Futakuchi, M., Tanaka, H., Orita, S.-I., Ito, T., Miki, T. and Shirai, T. :Prevention by antioxidants of heterocyclic amine-induced carcinogenesis in a rat medium-term liver bioassay: results of extended and combination treatment experiments. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 61-67 (1998).
7. Ogawa, K., Futakuchi, M., Hirose, M., Boonyaphiphat, P., Mizoguchi, Y., Miki, T. and Shirai, T. Stage and organ dependent effects of 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone, ascorbic acid derivatives, n-heptadecane-8,10-dione and phenylethyl isothiocyanate in a rat multiorgan carcinogenesis model. *Int. J. Cancer*, 76: 851-856 (1998).

8. Hirose, M., Ito, T., Takahashi, S., Ozaki, M., Ogiso, T., Nihro, Y., Miki, T. and Shirai, T. Prevention by synthetic phenolic antioxidants of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)- or activated MeIQx-induced mutagenesis and MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis, and role of antioxidant activity in the prevention of carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 233-241 (1998).
9. Takahashi, S., Tamano, S., Hirose, M., Kimoto, N., Ikeda, Y., Sakakibara, M., Tada, M., Kadlubar, F. F., Ito, N. and Shirai, T. Immunohistochemical demonstration of carcinogen-DNA adducts in tissues of rats given 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP): Detection in paraffin-embedded sections and tissue distribution. *Cancer Res.*, 58: 4307-4313 (1998).
10. Iwasaki, S., Kato, K., Mori, T., Takahashi, S., Futakuchi, M. and Shirai, T. Development of androgen-independent carcinomas from androgen-dependent preneoplastic lesions in the male accessory sex organs of rats treated with 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone propionate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 23-30 (1999).

2. 学会発表

白井智之、雀 林、小木曾正、加藤浩司、二口 充、高橋 智、DMAB誘発ラット前立腺癌に対する植物由来女性ホルモン活性物質genistin/genisteinおよびdaidzin/daidzeinの抑制作用、第57回日本癌学会総会、横浜、(1998年)

発がんの抑制に関する実験的研究

分担研究者 小西 陽一 奈良県立医科大学付属がんセンター教授

研究要旨 N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine(BHP)によるラット発癌実験系において、lactoferrin(LF)およびlactoferrin hydrate(LFH)の肺、食道、甲状腺、肝および腎発癌修飾作用について検索した。その結果、2%LF投与群において軽度の肺発癌抑制作用がみられた。一方、0.5%および2%LFH投与群においては食道扁平上皮がんの発生の増加がみられた。

A. 研究目的

Lactoferrin (LF)は抗菌作用、免疫活性化作用などを持つ糖蛋白で、ラットにおいて大腸発癌を抑制することが報告され、種々のがんにおける化学予防効果が期待されている。

N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)はラットにおいて、肺、食道、甲状腺、肝および腎に標的性を有する多臓器発癌物質である。今年度、BHPによるラット発癌系においてlactoferrin (LF)およびlactoferrin hydrate (LFH)の種々の臓器における発癌修飾作用について検索した。

B. 研究方法

動物は6週齢雄性Wistarラットを用い、以下の12群を作製した。第1群は基礎食投与のみの対照群、第2群は2%LF投与群、第3群は2%LFH投与群とした。第4から8群は実験開始時よりBHPを2000ppmの濃度で飲水に混じて12週間投与した後、8週間被検物質を投与した群で、第4群は基礎食投与の陽性対照群、第5群は0.5% LF投与群、第6群は2% LF投与群、第7群は0.5% LFH投与群、第8群は2% LFH投与群とした。第9から12群は実験開始時よりBHPを2000ppmの濃度で飲水に混じり12週間投与し、被検物質は実験開始時よりBHP投与期間中も含め実験の全期間中投与した群とした。第9群は0.5% LF投与群、第10群は2% LF投与群、第11群は0.5% LFH投与群、第12群は2% LFH投与群とした。被検物質は飼料中に混じり投与し、実験開始後20週にて全動物を屠殺、剖検し、肺、甲状腺、胸

腺、腎、肝、食道腫瘍の発生について検索した。

C. 研究結果

実験期間中、被検物質による体重増加の有意な抑制はみられなかったが、第12群において食道腫瘍の発生による死亡が15週目より（第4群においては18週目より）みられ、19週および20週において死亡率の有意な増加がみられた。LFH投与の第7、8、11群において、食道扁平上皮癌の発生頻度はそれぞれ55、43、36%と第4群11%に比較して有意に増加しており、1匹あたりの癌の発生個数もそれぞれ 0.6 ± 0.7 、 0.4 ± 0.5 、 0.5 ± 0.7 と第4群の 0.1 ± 0.3 に比較して有意な増加がみられた。肺病変の発生頻度は各群間に有意差はみられなかったが、動物1匹あたりの肺胞上皮過形成の発生個数は第4群 8.9 ± 3.8 に対して、2%LF投与の第6、10群において 4.9 ± 2.4 、 5.8 ± 2.9 と有意に減少していた。腺癌の発生個数は2%LF投与群において、減少傾向はあるものの有意差はみられなかった。甲状腺腫瘍、肝腫瘍、腎腫瘍の発生頻度、発生個数は、各群間に有意差はみられなかった。

D. 考察

BHPによるラット発癌実験系において、0.5%および2%LFH投与により食道扁平上皮癌の発生が促進されることがみいだされた。また、LFH投与により肺の扁平上皮化生、扁平上皮癌の発生が増加する傾向がみられ、LFHは扁平上皮細胞の分化、増殖に関与することが示唆された。

E. 結論

BHPによるラット発癌実験系において、2%LFには軽度の肺発癌抑制作用がみられた。一方、0.5%および2%LFHは食道扁平上皮癌の発生を促進した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Majima, T., Tsutsumi, M., Nishino, H., Tsumoda, T. and Konishi, Y. Inhibitory effects of β -carotene, Palm carotene, and Green Tea polyphenols on pancreatic carcinogenesis initiated by *N*-Nitrosobis(2-oxopropyl)amine in Syrian golden hamsters. *Pancreas*, 16: 13-18 (1998).
2. Okajima, E., Tsutsumi, M., Ozono, S., Akai, H., Denda, A., Nishino, H., Okita, S., Sakamoto, H. and Konishi, Y. Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine initiation, *Jpn. J. Cancer Res.*, 89: 22-26 (1998).
3. Okajima, E., Denda, A., Ozono, S., Takahama, M., Akai, H., Sasaki Y., Kitayama, W., Wakabayashi, K. and Konishi, Y. Chemoprevention effects of Nimesulide, a Selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary bladder carcinomas initiated *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res.*, 58: 3028-3031 (1998).
4. Denda, A., Endho, T., Tang, Q., Tsujiuchi, T., Nakae, D. and Konishi, Y. Prevention by inhibitors of arachidonic cascade of liver carcinogenesis, cirrhosis and oxidative DNA damage caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. *Mutation Res.*, 402: 279-288 (1998).
5. Kobayashi, Y., Nakae, D., Akai, H., Kishida, H., Okajima, E., Kitayama, W., Denda, A., Tsujiuchi, T., Murakami, A. and Konishi, Y. Prevention by 1'-acetoxychavicol acetate of the induction but not growth of putative preneoplastic, glutathione S-transferase placental form-positive, focal lesion in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet., *Carcinogenesis*, 19: 1809-1814 (1998).
6. Nakae, D., Kotake, Y., Kishida, H., Hensly, K., Denda, A., Kobayashi, Y., Kitayama, W., Tsujiuchi, T., Sang, H., Sewart, C., Tabatabaie, T., Floyd, R. and Konishi, Y. Inhibition by Phenyl *N*-*tert* Butyl Nitroene of early phase carcinogenesis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet., *Cancer Res.*, 58: 4548-4551 (1998).
7. Yoshimoto, M., Tsutsumi, M., Iki K., Sasaki, Y., Tsujiuchi, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. and Konishi, Y. Carcinogenicity of heterocyclic amine for the pancreatic duct epithelium in hamsters., *Cancer Lett*, in press.
8. Iki, K., Konishi, Y. Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), membrane-type 1 MMP and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 and activation of proMMP-2 in pancreatic duct adenocarcinomas in hamsters treated with *N*-nitrosobis(2-oxopropyl)amine., *Carcinogenesis*, in press.

発がんの抑制に関する実験的研究

分担研究者 田中 卓二 金沢医科大学教授

研究要旨 フラボノイドであるmorinの発がん抑制作用を4-nitroquinoline 1-oxide誘発ラット舌発がんモデルとazoxymethane誘発ラット大腸発がんモデルを用いて検討し、両モデルで発がん抑制作用を有すること、特に舌発がん抑制効果が著明であることが判明した。その、抑制機序として標的臓器の細胞増殖活性や解毒酵素の修飾作用が関与していることを明らかにした。別に、種々の生理活性を有し、ラット大腸発がん抑制効果が報告されている牛ラクトフェリンについても同様に、舌発がん抑制効果の有無をラット舌発がんモデルで検討し、弱いながらも舌発がん抑制効果がみられることが明らかとなった。

A. 研究目的

フラボノイドの発がん抑制作用を検討する目的で、morinについて4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発ラット舌発がんモデルとazoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸発がんモデルを用いて、その発がん修飾効果を検討した。別に、種々の生理活性を有し、ラット大腸発がん抑制効果が報告されている牛ラクトフェリン (bLF) についても同様に、舌発がん抑制効果の有無を4-NQO誘発ラット舌発がんモデルで検討した。

B. 研究方法

1) Morinの舌発がん修飾効果：F344雄性ラット136匹を使用し、舌がん誘発のため、4-NQO (20 ppm) を8週間飲水投与した。イニシエーション相（発がん剤投与の1週間前から10週間）、後イニシエーション相（発がん剤投与終了の1週間後から22週間）に100 ppmないし500 ppmの濃度でmorinを混餌投与した。実験は32週で終了し、舌がんの発生頻度を測定した。また、舌上皮の細胞増殖活性 (PCNA標識率) の変化と肝、舌粘膜のglutathione S-transferase (GST)、quinone reductase (QR) 活性も測定した。

2) Morinの大腸発がん修飾効果：F344雄性ラット55匹を用い、大腸腫瘍はAOM (15 mg/kg体重、週1回、計3回、皮下注射) で誘発した。Morin (500 ppm) はイニシエーション相では5週間、後イニシエーション相では28週間、混餌投与した。実験は32週で終了し、大腸腫瘍の発生頻度を測定し

た。同時に、大腸がん前駆病変 (ACF) におけるPCNA標識率と肝、大腸粘膜におけるGST、QR活性を測定した。

3) bLFの舌発がん修飾効果：F344雄性ラット124匹を使用した。舌腫瘍は、4-NQO (20 ppm) を8週間飲水投与して誘発した。イニシエーション相（発がん剤投与の1週間前から10週間）、後イニシエーション相（発がん剤投与終了の1週間後から22週間）に2000 ppmないし20000 ppmの濃度でbLFを混餌投与した。実験は32週で終了し、舌がんの発生頻度と舌上皮のポリアミン量を測定した。

C. 研究結果

1) Morinの舌発がん修飾効果：実験終了時の舌扁平上皮がんの発生頻度はmorinのイニシエーション相投与群 (100 ppm：5%、500 ppm：0%) で、4-NQO投与群 (56%) に比べて有意に低下した (それぞれ $P=0.0004$ 、 $P=0.00003$)。Morinの後イニシエーション相投与群 (100、500 ppm：5%) でも、舌がんの発生頻度は有意に低下した

($P=0.00003$)。舌上皮のPCNA標識率 (%) は、morinのイニシエーション投与群 (100 ppm： 17.6 ± 5.0 、500 ppm： 15.7 ± 5.7)、後イニシエーション相投与群 (100 ppm： 15.8 ± 7.8 、500 ppm： 17.0 ± 5.1) で4-NQO投与群 (24.3 ± 2.9) に比べ有意 ($P<0.05$) に減少していた。さらに、肝GST活性 (mU/mg protein) はmorinのイニシエーション相投与で、4-NQO投与群 (511 ± 37) に比べ、1.25倍 ($P<0.05$)、1.18倍 ($P<0.02$) と有意に増加

したが、後イニシエーション相投与では有意の増加をみなかった。舌GST活性は、各群間で有意差をみなかった。また肝QR活性 (mU/mg protein) は4-NQO投与群 (43±9) に比べ、morinのイニシエーション相投与で1.12倍-1.48倍 (P<0.05)、morinの後イニシエーション相投与で1.97倍-2.30倍 (P<0.001) と有意に増加した。舌QR活性は4-NQO投与群 (462±10) に比べ、morinのイニシエーション相投与で0.55倍-0.53倍 (P<0.001)、morinの後イニシエーション相投与で0.52倍-0.52倍 (P<0.001) と有意に減少した。

2) Morinの大腸発がん修飾効果：実験終了時の大腸腺がん発生頻度は、morinのイニシエーション相投与群 (43%)、後イニシエーション相投与群 (29%) でAOMのみの群 (75%) に比べ減少し、後イニシエーション相投与群で有意差をみた

(P=0.023)。しかし、発生個数の比較では有意差がなかった。また、ACFのPCNA標識率 (%) は、後イニシエーション相投与群 (27.9±6.3) でAOM投与群 (18.8±5.2) に比べ有意 (P<0.05) に減少していた。さらに、肝、大腸のGST活性はmorinの後イニシエーション相投与でAOM投与群 (肝：517±9、大腸：73±5) に比べ、それぞれ1.13倍 (P<0.01)、1.57倍 (P<0.001) と、また肝、大腸のQR活性はmorinの後イニシエーション相投与でAOM投与群 (肝：52±9、大腸：283±37) に比べ、それぞれ1.60倍 (P<0.005)、1.33倍 (P<0.005) と有意に増加した。Morinのイニシエーション相投与では大腸のGST (1.39倍、P<0.001)、QR活性 (1.25倍、P<0.01) のみが有意に増加した。

3) bLFの舌発がん修飾効果：実験終了時 (32週) の舌がん発生頻度は高濃度bLFの後イニシエーション相投与群 (20%) で、舌がん発生頻度は4-NQOのみの群 (55%) に比べて有意に低下した (P=0.024)。また、舌上皮のポリアミン量 (mmol/mg protein) はbLFの後イニシエーション相投与群 (2000 ppm: 3.1±0.4、20000 ppm: 2.8±0.4) で、4-NQO投与群 (3.7±0.4) に比べて有意 (P<0.05) に低下した。

D. 考察

フラボノイドの1つで黄色色素であるmorinは、抗酸化作用やアラキドン酸カスケードに関与する酵素 (COX、LOX) の阻害作用を有

するが、舌、大腸における発がん修飾効果の報告はこれまでなかった。本研究では、morinは舌発がんや大腸発がんに対して抑制効果を示すこと、また、舌発がんに対しては強力な抑制効果を発揮するが、大腸発がんでの抑制効果は比較的弱く、後イニシエーション相投与でのみ発がん抑制効果を発揮した。さらに、morinの発がん抑制効果の機序として、標的臓器の細胞増殖活性や解毒酵素の修飾作用が推察された。一方、bLFは、従来報告されている大腸での発がん抑制に加えて舌においても発がん抑制効果を発揮すること、その抑制効果は高濃度の後イニシエーション相投与で発現し、大腸発がん抑制作用に比べて弱いことが判明した。また、その抑制効果には細胞増殖活性の修飾作用が関与していることが明らかとなった。以上より、morin、bLFには舌ないし大腸において発がん抑制効果がみられるが、その抑制効果の程度は臓器間、投与スケジュールで異なることが示唆された。

E. 結論

フラボノイドのmorinは、舌発がんや大腸発がん抑制作用を有すること、特に舌発がん抑制効果が著明であること、さらに、morinの発がん抑制効果の機序として、標的臓器の細胞増殖活性や解毒酵素の修飾作用が関与していることが判明した。一方、従来、大腸発がん抑制効果が報告されているbLFには弱いながらも舌発がん抑制効果もみられること、また、その抑制効果には細胞増殖活性の修飾作用が関与していることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Matsunaga, K., Mori, H., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Satoh, K., Hara, A., Maeda, M., Ota, T., Odashima, S., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by citrus auraptene in rats. *Carcinogenesis*, 18: 425-431 (1998).
2. Okuno, M., Tanaka, T., Komaki, C., Nagase, S., Shiratori, Y., Kajiwara, K., Maki, T. and Moriwaki, H. Suppressive effect of low amounts of safflower and perilla oils