

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

平成11年度

ヒトがんの予防に役立つ物質に関する研究
(H10-がん-020)

埼玉県立がんセンター研究所
藤木 博太

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

ヒトがんの予防に役立つ物質に関する研究

主任研究者 埼玉県立がんセンター研究所 藤木博太

研究要旨：ヒトがんの予防に役立つ物質として、緑茶、カバラクトン及びメグスリの木から分離されたゲラニニンについて研究を行った。緑茶についての研究はコホート研究の結果も含むことができ、緑茶の飲用とがん予防が直接結びついてきた。がん予防の結果を有効にするには、早期診断マーカーの開発が望まれる。特に肺がんの早期診断マーカーとしてhnRNP B1蛋白質の高発現を見出した。以下 9項目の要点を簡単にまとめ要旨とする。1) TNF- α 欠損マウスは発がんプロモーション活性に対し抵抗性を示し、TNF- α が発がんプロモーションに本質的役割を果たしていることを証明した。2) がん予防物質の検索には細胞からのTNF- α 遊離抑制が最初のスクリーニングとして有効である。3) 緑茶とsulindacの併用はMinマウスの消化管発がんを相乗的に抑制した。4) EGCGとtamoxifenの併用はアポトーシスを相加的に誘導した。5) 緑茶の多量飲用はがんだけでなく、心臓循環器疾患にも予防効果を示し、延命をもたらすことが示唆された。6) 80%以上のボランティアは1日10杯以上の緑茶ポリフェノールを摂取できることが示された。7) hnRNP B1蛋白質の高発現はヒト肺扁平上皮がん、肺の異形成病変、口腔扁平上皮がん、口腔白板症、食道の扁平上皮がん認められた。8) フィジーの飲み物カバから5個のカバラクトンを分離した。これらはTNF- α の遊離を抑制した。9) メグスリの木からがん予防物質としてゲラニニンを分離した。これはゲンノショウコに含まれる化合物と同一である。

分担研究者

- | | |
|----------|-----------------|
| 1. 藤木博太 | 埼玉県立がんセンター研 所 長 |
| 2. 菅沼雅美 | 埼玉県立がんセンター研 専門研 |
| 3. 末岡榮三朗 | 埼玉県立がんセンター研 主任研 |
| 4. 中地 敬 | 埼玉県立がんセンター研 専門調 |
| 5. 松山 悟 | 埼玉県立がんセンター研 研究員 |
| 6. 岡部幸子 | 埼玉県立がんセンター研 研究員 |

A. 研究目的

1) ヒトがんの予防に役立つと思われる物質の検索とその作用機構の研究を私共は1983年以来続けている。最近、私共はTNF- α が内因性発がんプロモーターであるとの立場から、一段と深く研究を進めることができた。例えば、TNF- α mRNAの発現抑制、及びTNF- α の遊離抑制を示す物質は、がんの化学予防薬となると推測できることである。私共が今迄見出したいろいろな発がんプロモーションの抑制物質の結果を基に、TNF- α mRNAの発現抑制とTNF- α の遊離抑制をまとめ、一つの学説を提唱することを目的とする。

2) 緑茶はヒトがんの予防に役立つ物質として注目されている。私共は日本では緑茶をがん予防飲料として、アメリカではがん予防薬として進めるよう努力してい

る。これら両者の立場は違っているが、それぞれの研究の発展にとって、緑茶の飲用に関する実験データ及びコホート研究による疫学データの検討が求められている。本年度は特に、緑茶とがん予防薬sulindacとの相乗効果を、単に培養がん細胞のアポトーシスの誘導に於いてだけでなく、Min (C57BL6/JMin⁺) マウスでの消化管発がんの抑制に於いても証明することを目的とした。更に、緑茶とがん予防薬との相乗効果は、緑茶とtamoxifenの場合、肺がん細胞のアポトーシスの促進、乳がん細胞の増殖抑制、BALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離抑制等としてみられた。緑茶の飲用が、臨床的にがん予防薬の効果を広く増強すると考え、この研究を進めることも目的とした。

3) 埼玉県のある町で住民8,552名を対象とした前向きコホート研究は1997年で11年目を迎えた。その追跡調査から、488例のがん発症を見出している。緑茶の多量飲用ががんを予防することは更に確認できたが、その上、心臓循環器疾患に対しても予防効果を見出すことができた。ひいては、寿命を延長させる効果が証明できた。ここにそれぞれのデータをまとめる。

4) 1日緑茶10杯を飲用する人は男性で30%、女性で13

%である。残りの男性70%、女性87%の人が1日緑茶10杯を飲用すれば、がん予防効果を達成することが可能である。埼玉県茶業試験場が6ヘクタールの茶畑から得た荒茶を用い、緑茶抽出物を得た。飲用量を正確にするため緑茶抽出物0.5g(約緑茶2杯分)を1粒とした。この粒と普通の緑茶飲用で10杯分の緑茶ポリフェノールの摂取が可能か、どのような症状を感じるか検討することを目的として飲用試験を企画した。

5) 肺がん術後の5年生存率は40%であり、胃がんの5年生存率より明らかに低い。しかし、臨床病期I期で手術可能であれば、肺がんの5年生存率は80%以上に上昇するわけであるから、新しい肺がんの早期診断マーカーの開発が望まれる。私共は独自に作成したheterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP B1)蛋白質を特異的に認識する抗体(抗-B1抗体)を作成し、肺がん組織を染色した。この抗体は、肺がんだけでなく、口腔がん、食道の扁平上皮がん細胞をも強く染色した。したがってhnRNP B1蛋白質の発現亢進はがん化の非常に早い時期に生じている分子変化と考えている。この系を確立すれば、がん予防効果を判定する新しいバイオマーカーとして使用できると考え、その有用性を検討することも目的とした。

6) 1985年、南カリフォルニア大学のB. E. Henderson博士は、フィジーの住民のがん発生頻度が、太平洋の他の島々との住民に比較して低いと発表していた。太平洋の島の中でフィジーはカバを飲用することが報告されていたので、カバの中にがん予防物質が含まれているとの仮説を立て、TNF- α の遊離抑制を指標にカバラクトンを分離した。本年度は更に新たなカバラクトンを分離し、研究を進めることも目的とした。

7) 埼玉県農林試験場はカエデ科の植物であるメグスリの木の苗を培養することに成功した。メグスリの木は本来漢方薬で眼病の薬、あるいは、肝臓の薬として使用されている。私共はメグスリの木の葉、樹皮、小枝、材等のがん予防物質が含まれるとして、TNF- α の遊離抑制を指標に化合物の分離を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1) 発がんプロモーションにTNF- α が直接関与していることを証明するために、TNF- α 欠損マウス(TNF^{-/-}129/Svj)、その野生マウス(TNF^{+/+}129/Svj)と通常の実験に用いているマウス(TNF^{+/+}CD-1)の3系統を使用した。実験は、100 μ g 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)の1回塗布でイニシエートした後、5.0 μ gオカ

ダ酸、あるいは、2.5 μ gTPAを週に2回塗布し、20週まで続けた。各群10匹とした。

2) 化合物による細胞からのTNF- α の遊離抑制は、まず、いろいろな濃度の化合物でBALB/3T3細胞(2×10^5 /well)を処理した。1時間後、0.2 μ Mオカダ酸を加え、24時間処理し、培養液中のTNF- α の濃度をマウスTNF- α のELISAキットで測定した。64個の化合物につき測定し、遊離を抑制したもの、抑制しなかったもの、亢進したものについて分類した。

3) Min (C57BL6/JMin^{-/-})マウスはadenomatous polyposis coli gene (APC)遺伝子の変異をもち、腸管に多数の腫瘍が自然に発症する。6週令のMinマウス雄に、それぞれ0.1%緑茶抽出物投与、sulindac投与、緑茶抽出物+sulindac投与、及び未処理のコントロールの4群に分け、10週間観察した。Sulindacは、0.03%のsulindacを含む餌として、緑茶抽出物と別々に与えた。

4) 緑茶のEGCGとtamoxifenとの併用による相乗効果はヒト肺がん細胞株PC-9(2×10^5 /ml)を培養し、75 μ M EGCGとさまざまな濃度のtamoxifenで処理した。アポトーシスの定量にはELISA法で細胞質のオリゴヌクレオゾームに結合したDNAを測定した。又、EGCGとtamoxifenによるTNF- α 遊離抑制の相乗効果はBALB/3T3細胞(2×10^5 /0.5 ml)を用い、2)に記した如く行った。

5) 1986年、埼玉県のある町の住民(40才以上)について、90項目からなる生活習慣調査を行った。その時以来、毎年がん罹患者を追跡調査した。11年間の追跡調査の結果、488例のがん罹患者が見出された。一方、死亡診断書による全死亡例を追跡すると、1,109名の死亡が確認された。心臓循環器疾患による死亡は274例であった。これらのデータを基に緑茶の飲用との関係を検討した。

6) 県の職員ボランティア102名をAグループ51名、Bグループ51名に分け、Aグループは3月から6月までの3ヶ月間、Bグループは6月から9月までの3ヶ月間に普通の緑茶飲用プラス緑茶粒で10杯分を摂取する飲用方式を行ってもらった。飲用試験の開始前、6月と終了時の9月には採血とアンケート調査を集めた。勿論飲用試験の開始にあたっては、当センターの倫理委員会の承諾を得、又、各ボランティアの同意を得た。

7) 私共独自が作成した、抗-hnRNP B1抗体を用い、43例の肺がん、43例の潜在微小肺扁平上皮がん、11例の

気管支異形成、肺癌患者の喀痰、更には、口腔がん、口腔白板症、食道がん等の組織について、hnRNP B1蛋白質の発現を免疫組織染色法にて解析した。又、肺癌細胞では、hnRNP B1蛋白質の発現をウエスタンブロット法で検討した。この方法はがん予防を判定するマーカーとして発展すると考える。

8) フィジーより入手したカバ粉末をメタノールで抽出した。得られた抽出物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、合計5個のカバラクトンを得た。上記2) に記したBALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離抑制の系にいろいろな濃度のカバラクトンを加え、TNF- α 遊離抑制をELISA法で測定した。

9) 埼玉県農林試験場からメグスリの木の葉、樹皮、小枝、材をそれぞれ水で抽出した液を得た。一定量を凍結乾燥し、その粉末を実験材料とした。各抽出液の粉末を用い、2) で記したTNF- α の遊離抑制を検討した。

C. 研究結果

1) DMBA+オカダ酸の発がんプロモーション活性は、20週まで腫瘍発生頻度 (%) と平均腫瘍個数を調べた。まず、TNF- α 欠損マウス (TNF^{-/-}) は19週まで腫瘍を生じず、20週で10匹中1匹に小さい腫瘍が一個生じた。一方、TNF- α を産生するCD-1マウスの腫瘍発生は、9週でまず発生したのに対し、TNF^{+/+}129/Svjマウスは11週で最初の腫瘍発生を認めた。しかし、100%の腫瘍発生頻度は共に17週で達した。結局TNF- α 欠損マウスはオカダ酸の発がんプロモーション活性に対し抵抗性を示した。

DMBA+TPAの発がんプロモーション活性はTNF- α 欠損マウスとCD-1マウスで比較した。傾向としてはオカダ酸と同様にTPAに対し、抵抗性を示し、例えば、100%腫瘍発生頻度に達した週は、CD-1では11週で、TNF- α 欠損マウスは20週であり、9週間の遅延を認めた。

オカダ酸とTPAは作用機構が異なるが共に強力な発がんプロモーターである。TNF- α 欠損マウスはオカダ酸に著明な抵抗性を、一方、TPAには弱い抵抗性を示した。その理由を次に検討した。オカダ酸、あるいはTPAをそれぞれTNF- α 欠損マウスとCD-1マウスの皮膚に1回塗布し、オカダ酸の場合は、24時間後、TPAの場合は、4時間後、背部皮膚から全RNAを抽出し、TNF- α 、IL-1 α とIL-1 β の遺伝子発現について検討した。明らかにオカダ酸とTPAの塗布はTNF- α 欠損マウスに於いて、TNF- α の発現は認められず、CD-1マウスではその発現は認められた。IL-1 α とIL-1 β の発現をオカダ

酸とTPAで比較すると、TPAの方が両者を強く発現すると推測された。IL-1 α とIL-1 β はv-H-ras遺伝子を含むBALB/3T3細胞のクローナル増殖を強力に促進したので、TNF- α 欠損マウスの場合、IL-1 α とIL-1 β がTNF- α と同様に内因性発がんプロモーターとして作用すると考えられる。

2) 64個の化合物についてBALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離抑制を検討した結果、45個が抑制、15個が効果なし、4個が遊離亢進を示した。抑制した45個の化合物の内、マウス皮膚で発がんプロモーションの抑制を示したものの15個、効果なし3個、発がんプロモーションの亢進したものの1個、残りの26個はまだ動物実験は行っていない。したがって、この結果から、約80%の化合物 (15/19) は、TNF- α の遊離抑制と発がんプロモーションの抑制が一致した。更に、TNF- α の遊離を亢進した化合物4個についてマウスの発がんプロモーション活性を比較すると、1個 (1/4) は発がんプロモーション活性の亢進を示した。残りの3個についてはまだ動物実験の結果は無い。以上のように、BALB/3T3細胞を用いたTNF- α の遊離抑制は、がん予防薬を検索する簡便な方法であり、マウス皮膚の発がん二段階実験に代わりうることを示した。

3) APC遺伝子に異変をもつMin (C57BL6/JMin⁺) マウスは6週令より緑茶抽出物、sulindac、緑茶抽出物+sulindacを投与し、10週後腫瘍の発生を測定した。各群のマウス消化管をメチレンブルーで染色し、小腸と大腸に生じた0.4mm以上の腫瘍を計測した。コントロールの未処理群の腫瘍平均個数は、72.3個 (100%)、緑茶抽出物群56.7個 (78.4%) と抑制効果が認められた。既に多くの研究者から報告が出ているsulindacの抑制効果は確認でき、この実験群の腫瘍平均個数は49.0個 (67.7%) であった。この実験の目的である緑茶抽出物とsulindacの併用群では腫瘍平均個数が32.0個 (44.3%) と有意な減少を示し、動物実験でも相乗効果を証明することができた。その相乗効果の機構については、アポトーシスの誘導、TNF- α 遊離抑制等にも見出されている。

4) EGCGとがん予防薬tamoxifenの相乗効果については、PC-9細胞のアポトーシスの誘導で検討した。Tamoxifen 5, 10, 20 μ M処理により、誘導されたDNAの断片化を数値で表現すると、415 nmの吸収は、0.04, 0.82と1.71であった。次に75 μ M EGCGとtamoxifen 5, 10, 20 μ Mの処理を併用すると、415 nmの吸収は、0.24, 1.02と2.0であり、明らかにアポトーシスは亢進した。しかし、75 μ M EGCGの効果はむしろ5 μ M tamoxifenで6倍も強

く認められ、10と20 μM では、強い相乗効果は得られていない。全体としてEGCGとtamoxifenはむしろ相加効果となることが見出された。

5) 11年間の追跡調査の結果、男女共で488例のがん罹患患者が見出された。がん種としては胃がん(140)、肺がん(69)、結腸直腸がん(60)、と肝がん(35)であった。このがん種の分布は、日本の他の地域のがん種と同様であった。緑茶によるがん予防効果は、肺がんについて、最も強く認められ、1日10杯以上の緑茶飲用者群の相対危険度は0.33であった。同様に結腸直腸がん、肺がん、胃がんに対する1日10杯以上の緑茶飲用者群の相対危険度は0.56、0.53と0.69であり、予防効果は示唆された。更に488例についてもがんの平均罹患年齢は1日10杯以上の飲用の女性で6.2才、男性では3.2才、1日3杯以下の平均罹患年齢より遅れていた。

更に、274例の心臓循環器疾患による死亡について、1日10杯以上の緑茶を飲用する男性の相対危険度は、1日3杯以下の群に対し、0.58であった。女性についても同様な傾向が認められた。がんと心臓循環器疾患は、日本の死亡の約半数を占めるほど重要である。これらの死亡平均年齢を、緑茶を多く飲用する群と少なく飲用する群について比較すると、約4.4才の寿命の延長を見出すことができた。

6) 102名のボランティアで、通常の緑茶飲用にプラス服用した緑茶粒の数は、5粒(38名)、4粒(23名)、3粒(2名)、2粒(11名)、他の薬を服用のため中止(6名)であった。緑茶粒の継続状態については、継続(75%)、減量(11%)、増量(4.5%)、中止(9%)であった。今後の飲用継続に対して84%の人は前向きであった。この結果から、80%の人が1日10杯分の緑茶ポリフェノールを摂取することが可能であることが分かった。緑茶と同様、緑茶粒にはカフェインが含まれているので、カフェインによる症状、例えば胃部不快感、胸やけ、吐き気、嘔吐等が生じることもあり、全体として50%の人がこの程度の症状を認めている。しかし、緑茶粒の服用時、大量の水を飲むとか、食後に服用するとこれらの症状はほとんど消失した。いづれにしても、緑茶による症状は抗がん剤の症状とは異なるけれど、抗がん剤の副作用の判定に従うと、5段階の内の最も程度の軽いもの、重篤な症状と解釈しない段階に含まれることが分かった。

7) hnRNP B1蛋白質の高発現は、肺扁平上皮がんの全例で、とくに、臨床病期I期の段階から認められた。微小肺扁平上皮がんでは58.1% (25/43)に、更には、異

形成病変に於いても、高発現を認めた。したがって、hnRNP B1蛋白質の発現亢進は、肺扁平上皮がんの早期診断への有用性が高いと考える。

7例の口腔扁平上皮がん(臨床病期I-IV期)の組織では、肺がんの場合と同様、全例にhnRNP B1蛋白質の高発現を認めた。更に、3例の口腔白板症に於いても全例に高発現を認めた。口腔がん患者の口腔塗抹標本では、2例とも扁平上皮がん細胞を染色することができ、この結果は、口腔がんの早期診断にも有用性が高いことを示している。

次に、16例の食道の扁平上皮がんについて組織を抗B1抗体で免疫染色を行った。がん組織では63% (10/16)にhnRNP B1の高発現が認められた。これらのがん組織を病理組織学的に分類し、その高発現を調べると、高分化型83% (5/6)、中分化型83% (5/6)、低分化型0% (0/4)の陽性率となり、低分化の食道がんでは、hnRNP B1は高発現していないことを見出した。この結果は、hnRNP B1蛋白質の機能を考える上に於いて重要である。

8) 昨年分離した2個のカバラクトンに続いて、3個の新しいカバラクトンを分離した。これら5個の化合物について、構造解析を行うと、次のように既知のもので、Kava-1(methysticin), Kava-2(yangonin), Kava-3(desmethox), Kava-4((+)-dihydrokewain), Kava-5 ((+)-kawain)であった。BALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離抑制の活性をIC₅₀(μM)の濃度で比較すると、Kava-1 54, Kava-2 32, Kava-3 17, Kava-4 >100, Kava-5 54であった。次に、Kava-3が最も強力な活性を示したのでマウス皮膚発がんプロモーション活性の検討を始めたが、皮膚にKava-3の沈殿が見られ、実験は中止した。別な実験系での検討が必要になった。

9) メグスリの木から得られた凍結乾燥の粉末についてそれぞれTNF- α の遊離抑制を検討した結果、いづれの抽出液にも弱い抑制効果を認めることができた。しかし、その抑制の活性を緑茶抽出物と比較すると、一段と活性は弱く、緑茶抽出物の方には、はるかに活性物質が多く含まれていることが推測された。メグスリの木の抽出物の中で、最も活性が認められたのは木の葉から分離されたものであった。中に含まれている活性物質を検討すると、ゲラニインが見出された。ゲラニインは元来、生薬であるゲンノショウコより分離されたタンニンである。ゲラニインは緑茶のEGCGと同様にいろいろな活性を持つので、メグスリの木の活性物質はまず、ゲラニインで説明できると考える。

D. 考察

1) TNF- α が発がんプロモーションに本質的に作用することをTNF- α 欠損マウスで証明することができた。私共はこの場合、TNF- α を一つのinstigatorとして考え、instigatorが次にいろいろなサイトカインネットワークを活性化すると考える。しかしinstigatorはTNF- α 唯一であるとは考えない。TNF- α とIL-1は非常に良く類似した作用を示すのでIL-1もinstigatorである。したがって、逆に発がんプロモーションを抑制する物質は共にTNF- α 発現抑制、あるいは、TNF- α の遊離抑制を示すことと一致する。

2) TNF- α の遊離抑制を示し、又、発がんプロモーション活性を抑制した15の化合物の中に、EGCGが含まれていた。一方、TNF- α の遊離抑制を示し、又、発がんプロモーション活性を抑制しなかった3個の化合物の中には、マウス皮膚への透過性の問題がある化合物も含まれると推測する。更に、TNF- α 遊離を亢進し、又、発がんプロモーション活性を亢進した化合物にとって1個の化合物があるが、それは化学合成されたサンスクリンであった。このような意味に於いても、マウス皮膚の発がんプロモーション活性の抑制あるいは、亢進はTNF- α の遊離を指標として推測できることが分かった。

3) EGCGとsulindacの相乗効果のヒントは、ECとEGCGがPC-9細胞のアポトーシスを相乗的に誘導することから得られた。この場合、ECは活性が無いけれど、³H-EGCGの細胞内取り込みを亢進することを見出し、相乗効果の存在を推測した。同様にEGCGとsulindacについて相乗効果を認めることができた。昨年、PC-9細胞のアポトーシスで示したように、sulindacは活性型のsulindac sulfideや活性が無いsulindac sulfoneに於いても相乗効果は認められた。したがって、アポトーシスの相乗効果はsulindacが持つ本来の機能とは別の作用で相乗効果を誘導していると考えられる。

4) EGCGとsulindac, EGCGとtamoxifenに相乗効果と相加効果が認められたことは、sulindacやtamoxifenを服用しているがん予防の患者にとって朗報である。例えば、緑茶の飲用によりsulindac及びtamoxifenの投与量を減量し、誘発される副作用を軽減できると考えられる。この結果を、アメリカ癌学会で昨年、発表した時、コメントの多くは、sulindacあるいは、tamoxifenの投与量を減少できることで一致した。

5) 11年間の追跡調査の結果、緑茶の多量飲用はがんだけでなく、心臓循環器疾患の発症を予防することが

示された。この場合、調査は埼玉県のある町の住民に対して行われたわけであるから、発がん剤の被曝は同等であると仮定した。一方、心臓循環器疾患を生じる原因はまだ不明であるが、同一の地域の住民の脂肪摂取量等ほぼ同等と考えられる。緑茶の飲用はこの地方で全く生活習慣の一つと結びついている。これらの結果を発表すると、度々、緑茶ポリフェノールに薬効が証明されているにもかかわらず、飲用した水分が有効成分ではとのコメントに合うことは多い。前向きコホート研究からこのコメントに対する答えは得られない。

6) 緑茶粒の開発は薬を目的として行っているものではない。日本人は800年来 緑茶を飲物として飲用しているが、緑茶にがん予防効果が見出された現在では、がん予防効果をもたらす1日の摂取量を決めることが次の課題となった。コホート研究の結果、1日10杯量が導き出され、緑茶粒を用い実際の飲用試験が開始されたわけである。1日10杯の緑茶ポリフェノール量を3ヶ月間飲用して感じた症状は、ほとんどカフェイン摂取によるものであり、その程度は軽く、又、摂取方法を工夫することによりほとんどの症状は消失している。現在、緑茶ポリフェノールの組成を変えず、カフェイン量を減らす工夫が進められている。一方、アメリカではFDAを通じ、緑茶カプセルががん予防薬として開発されている。第1相試験で得られた最大耐用量は約1日35杯分の量と報告されており、日本で得られた1日10杯の症状は重篤なものでないことは理解できる。

7) hnRNP B1蛋白質の高発現を肺がん、口腔がん、更に食道がんが証明することができた。この研究は1988年TockmanらがhnRNP A2/B1の発現が原発性の非小細胞性肺がんが高いことを発表していた。私共はhnRNP B1はhnRNP A2 mRNAの選択的スプライシングで得られたものであり、hnRNP A2/B1及びhnRNP B1について遺伝子発現を別々に検討した。その結果、hnRNP B1 mRNAはがん組織に強く発現しており、hnRNP A2/B1 mRNAはがん部と非がん部共に同等の発現で特異性を見出すことはできなかった。この結果から私共はhnRNP B1について研究を進め、扁平上皮がんでの発現亢進を発見した。この早期診断マーカーはあくまでもがん予防効果を有効にするためにも役立つと考える。

8) カバラクトンをTNF- α 遊離抑制物質として分離した。しかしフィジーで現地の人々が飲用し薬効として認めているものは鎮静・催眠作用がある。分離精製した5個のカバラクトンに鎮静・催眠作用があるのか、次に検討する必要がある。もしそれらの活性が得られると脳神経への新しい薬効を考えることが生じてくる。

- 9) 最近、アメリカでがん予防と一緒に注目されているのが、民間療法である。現在のところ、まだ古来の習慣にもとづいた薬草を集めたものが市販されているが、TNF- α の遊離抑制を指標にすると、いろいろな活性物質を分離できることが示された。昨年アメリカ癌学会で緑茶によるがん予防を講演した時、民間療法の見直しの必要性をコメントとしていただき、同感と思ったことがあった。今後、益々研究が進むと考えられる。

E. 結論

ヒトがんの予防に役立つ物質に関する研究をこの3年間、集中的に進めることができた。私共の研究グループにとって、緑茶は1つのリード化合物であった。がん予防のために1日10杯の緑茶ポリフェノールの摂取をすすめる段階まで進んだ。次に、カバラクトン、更には、ゲラニインが見出された。毒性の無いがん予防薬の組み合わせが、更なる研究課題だと感じる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K. and Nakachi, K. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- α , and cancer preventive agents (-)epigallocatechin gallate and green tea. *Cancer Detect. Prev.*, 24, 91-99, (2000)
- 2) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K. and Kimura, S. Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220, 225-228, (1999)
- 3) Fujiki, H. Two stages of cancer prevention with green tea. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125, 589-597, (1999)
- 4) Fujiki, H. and Suganuma, M. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125, 150-155, (1999)
- 5) Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E. and Fujiki, H. Synergistic effects of (-)epigallocatechin gallate with (-)epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in human lung cancer cell line, PC-9. *Cancer Res.*, 59, 44-47, (1999)
- 6) Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E. and Fujiki, H. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res.*, 59, 4516-4518, (1999)
- 7) Takahashi, K., Hano, Y., Suganuma, M., Okabe, S. and Nomura, T. 28-Deacetylbelamcandal, a tumor-promoting triterpenoid from *Iris tectorum*. *J. Natl. Prod.*, 62, 291-293, (1999)
- 8) Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T. and Fujiki, H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 566-570, (1999)
- 9) Komori, A., Sueoka, E., Fujiki, H., Ishii, M. and Kozu, T. Association of MTG8 (ETO/CDR), a leukemia-related protein, with serine/threonine protein kinases and heat shock protein HSP90 in human haematopoietic cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 60-68, (1999)
- 10) Sueoka, E. and Fujiki, H. Carcinogenesis of okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural products. In "Harmful Algae" (Ruguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L. and Wyatt, T. eds) Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. PP. 573-5, (1999)
- 11) Sueoka, E., Goto, Y., Sueoka, N., Kai, Y., Kozu, T. and Fujiki, H. Heterogenous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers. *Cancer Res.*, 59, 1404-1407, (1999)
- 12) Goto, Y., Sueoka, E., Chiba, H. and Fujiki, H. Significance of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new early detection marker for oral squamous cell carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 1358-1363, (1999)
- 13) Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M. and Imai, K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease. Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors.*, in press, (2000)
- 14) Freese R., Basu, S., Hietanen, E., Nair, J., Nakachi, K., Bartsch, H. and Mutanen, M. Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *Eur. J. Nutr.*, 38, 149-157, (1999)
- 15) Nakachi, K. and members of Prospective Studies Collaboration. Collaborative overview (meta-analysis) of prospective observational studies of the

associations of usual blood pressure and usual cholesterol levels with common causes of death: protocol for the second cycle of the Prospective Studies Collaboration. *J. Cardiovasc. Risk*, 6, 315-320, (1999)

- 16) Nakachi, K., Limtrakul, P., Sonklin, P., Sonklin, O., Jarern, C. T., Lipigorngoson, S., Arai, K., Sone, Y., Imai, K., Suga, K., Matsuyama, S., Shimizu, H., Takahashi, T. and Suttajit, M. Risk factors for lung cancer among northern Thai women: Epidemiological, nutritional, serological, and bacteriological surveys of residents in high-and low-incidence areas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 1187-1195, (1999)
- 17) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat. Res.*, 428, 339-344, (1999)
- 18) Okabe, S., Suganuma, M., Tada, Y., Ochiai, Y., Sueoka, E., Kohya, H., Shibata, A., Takahashi, M., Mizutani, M., Matsuzaki, T. and Fujiki, H. Disaccharide esters screened by inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 669-676, (1999)
- 19) Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Lim, S.-J., Nomura, T., Suganuma, M. and Fujiki, H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive effect of components on human stomach cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 733-739, (1999)
- 20) Inoue, K., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Tabei, T. and Suganuma, M. The role of interleukin-6 in inhibition of lung metastasis in subcutaneous tumor-bearing mice. *Oncology Reports*, 7, 69-73, (2000)
- 21) Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S-I., Imai, K., Nakachi, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Kawakami, Y. and Tsuchiya, E. The expression of p73 is increased in lung cancer, independently of p53 gene alteration. *Br. J. Cancer*, 80, 1623-1629, (1999)

2. 学会発表
省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

がん化学予防物質の研究

主任研究者 藤木博太 埼玉県立がんセンター研究所 所長

研究要旨：がん化学予防物質の研究のために発がんプロモーションの実験系は新しい意味づけを獲得している。しかし、発がんプロモーションをヒトのがん化に応用して考えた場合、まだ充分解明されていないことに気づいた。そこで私共はオカダ酸の発がんプロモーション活性の研究から、TNF- α が内因性の発がんプロモーターであると考え、細胞の形質転換能の促進を検討し証明した。本年度はTNF- α 欠損マウスを用いて、7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)+ オカダ酸、DMBA +TPAの発がん二段階実験を行い、TNF- α が発がんプロモーションにとって本質的役割を果たすことを証明することができた。更に、今迄がん予防物質として検討してきた実験結果を基に、TNF- α mRNAの発現抑制、TNF- α の遊離抑制をまとめ、がん化学予防物質の検索には、まずTNF- α の遊離抑制が一つの簡便な指標になることを示した。

A. 研究目的

ヒトがんの予防に役立つと思われる物質の検索とその作用機構の研究を私共は1983年以来続けている。最近、私共はTNF- α が内因性発がんプロモーターであるとの立場から、一段と深く研究を進めることができた。例えば、TNF- α mRNAの発現抑制、及びTNF- α の遊離抑制を示す物質は、がんの化学予防薬となると推測できることである。私共が今迄見出したいろいろな発がんプロモーションの抑制物質の結果を基に、TNF- α mRNAの発現抑制とTNF- α の遊離抑制をまとめ、一つの学説を提唱することを目的とする。

B. 研究方法

発がんプロモーションにTNF- α が直接関与していることを証明するために、TNF- α 欠損マウス（TNF^{-/-}129/Svj）、その野生マウス（TNF^{+/+}129/Svj）と通常の実験に用いているマウス（TNF^{+/+}CD-1）の3系統を使用した。実験は、100 μ g 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)の1回塗布でイニシエートした後、5.0 μ gオカダ酸、あるいは、2.5 μ gTPAを週に2回塗布し、20週まで続けた。各群10匹とした。

化合物による細胞からのTNF- α の遊離抑制は、まず、いろいろな濃度の化合物でBALB/3T3細胞（ 2×10^5 /well）を処理した。1時間後、0.2 μ Mオカダ酸を加え、24時間処理し、培養液中のTNF- α の濃度をマウスTNF- α のELISAキットで測定した。64個の化合物につき測定し、遊離を抑制したもの、抑制しなかったもの、亢進したものについて分類した。

C. 研究結果

DMBA+オカダ酸の発がんプロモーション活性は、20週まで腫瘍発生頻度（%）と平均腫瘍個数を調べた。まず、TNF- α 欠損マウス（TNF^{-/-}）は19週まで腫瘍を生じず、20週で10匹中1匹に小さい腫瘍が一個生じた。一方、TNF- α を産生するCD-1マウスの腫瘍発生は、9週でまず発生したのに対し、TNF^{+/+}129/Svjマウスは11週で最初の腫瘍発生を認めた。しかし、100%の腫瘍発生頻度は共に17週で達した。結局TNF- α 欠損マウスはオカダ酸の発がんプロモーション活性に対し抵抗性を示した。

DMBA+TPAの発がんプロモーション活性はTNF- α 欠損マウスとCD-1マウスで比較した。傾向としてはオカダ酸と同様にTPAに対し、抵抗性を示し、例えば、100%腫瘍発生頻度に達した週は、CD-1では11週で、TNF- α 欠損マウスは20週であり、9週間の遅延を認めた。

オカダ酸とTPAは作用機構が異なるが共に強力な発がんプロモーターである。TNF- α 欠損マウスに於いてオカダ酸は著明な抵抗性を、一方、TPAは弱い抵抗性を示した。その理由を次に検討した。オカダ酸、あるいはTPAをそれぞれTNF- α 欠損マウスとCD-1マウスの皮膚に1回塗布し、オカダ酸の場合は、24時間後、TPAの場合は、4時間後、背部皮膚から全RNAを抽出し、TNF- α 、IL-1 α とIL-1 β の遺伝子発現について検討した。明らかにオカダ酸とTPAの塗布はTNF- α 欠損マウスに於いて、TNF- α の発現は認められず、CD-1マウスではその発現は認められた。IL-1 α とIL-1 β の発現をオカダ酸とTPAで比較すると、TPAの方が両者を強く発現すると推測された。IL-1 α とIL-1 β はv-H-ras遺伝子を含む

BALB/3T3細胞のクローナル増殖を強力に促進したので、TNF- α 欠損マウスの場合、IL-1 α とIL-1 β がTNF- α と同様に内因性発がんプロモーターとして作用すると考えられる。

64個の化合物についてBALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離抑制を検討した結果、45個が抑制、15個が効果なし、4個が遊離亢進を示した。抑制した45個の化合物の内、マウス皮膚で発がんプロモーションの抑制を示したものの15個、効果なし3個、発がんプロモーションの亢進したものの1個、残りの26個はまだ動物実験は行っていない。したがって、この結果から、約80%の化合物(15/19)は、TNF- α の遊離抑制と発がんプロモーションの抑制が一致した。更に、TNF- α の遊離を亢進した化合物4個についてマウスの発がんプロモーション活性を比較すると、1個(1/4)は、発がんプロモーション活性の亢進を示した。残りの3個についてはまだ動物実験の結果は無い。以上のように、BALB/3T3細胞を用いたTNF- α の遊離抑制はがん予防薬を検索する簡便な方法であり、マウス皮膚の発がん二段階実験に代わりうることを示した。

D. 考察

TNF- α が発がんプロモーションに本質的に作用することをTNF- α 欠損マウスで証明することができた。私共はこの場合、TNF- α を一つのinstigatorとして考え、instigatorが次にいろいろなサイトカインネットワークを活性化すると考える。しかしinstigatorはTNF- α 唯一であるとは考えない。TNF- α とIL-1は非常に良く類似した作用を示すのでIL-1もinstigatorである。したがって、逆に発がんプロモーションを抑制する物質は共にTNF- α 発現抑制、あるいは、TNF- α の遊離抑制を示すことと一致する。

TNF- α 遊離抑制を示し、又、発がんプロモーション活性を抑制した15の化合物の中に、EGCGが含まれていた。一方、TNF- α の遊離抑制を示し、又、発がんプロモーション活性を抑制しなかった3個の化合物の中には、マウス皮膚への透過性の問題がある化合物も含まれると推測する。更に、TNF- α 遊離を亢進し、又、発がんプロモーション活性を亢進した化合物にとって1個の化合物があるが、それは化学合成されたサンスクリーンであった。このような意味に於いても、マウス皮膚の発がんプロモーション活性の抑制あるいは、亢進はTNF- α の遊離を指標に推測できることが分かった。

E. 結論

発がんプロモーションにTNF- α が関与し、同様にIL-1 α とIL-1 β も作用する。これらのサイトカインは炎症性のサイトカインであるから、古来の発がんプロモーションを新しいキーワード“サイトカイン”で説明することができた。最近サイトカインは更に沢山見出されているし、新たにケモカインの種類も増えた。今後は各サイトカインの反応連鎖を解明したいと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiki, H. and Suganuma, M. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125, 150-155, (1999)
- 2) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K. and Kimura, S. Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220, 225-228, (1999)
- 3) Fujiki, H. Two stages of cancer prevention with green tea. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125, 589-597, (1999)
- 4) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K. and Nakachi, K. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- α , and cancer preventive agents (-)epigallocatechin gallate and green tea. *Cancer Detect. Prev.*, 24, 91-99, (2000)

2. 学会発表

省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

緑茶とがん予防薬との相乗効果

分担研究者 菅沼雅美 埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

研究要旨：緑茶はアメリカではがん予防薬として、日本ではがん予防飲物として研究が進められている。アメリカの場合は薬物の開発マニュアルに従って最大耐用量が決められ、第II相試験に進んでいる。一方日本では緑茶は飲物であるため、がん予防有効量を疫学データを基に1日10杯以上（約緑茶エキス2g）とした。EGCGとsulindac、EGCGとtamoxifenに相乗効果が見出された。例えば、細胞のアポトーシスを指標とした場合、75 μ M EGCG+10 μ M sulindacは、それぞれの単独の場合の20倍も強く促進した。本年度はMinマウスを用いて、緑茶抽出物+sulindacの相乗効果を検討した。Minマウスの動物実験では、確かに相乗効果は認められたが、細胞のアポトーシスのように20倍まで促進しなかった。Sulindacの活性型と同様、不活性型にも相乗効果が認められたため、sulindac本来の機能とは別の作用によると考えている。又、EGCG+tamoxifenは、むしろ相加的であった。今後、sulindacやtamoxifenを服用している患者に、飲用させる緑茶の量も充分検討する必要が示された。

A. 研究目的

緑茶はヒトがんの予防に役立つ物質として注目されている。私共は日本では緑茶をがん予防飲物として、アメリカではがん予防薬として進めるよう努力している。これら両者の立場は違っているが、それぞれの研究の発展にとって、緑茶の飲用に関する実験データ及びコホート研究による疫学データの検討が求められている。本年度は特に、緑茶とがん予防薬sulindacとの相乗効果を、単に培養がん細胞のアポトーシスの誘導においてだけでなく、Min (C57BL6/JMin⁺) マウスでの大腸発がんの抑制においても証明することを目的とした。更に、緑茶とがん予防薬との相乗効果は、緑茶とtamoxifenの場合、肺がん細胞のアポトーシスの促進や、乳がんやBALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離抑制としてとらえられた。緑茶の飲用が、臨床的にがん予防薬の効果を広く増強すると考え、この研究を進めることも目的とした。

B. 研究方法

1) Min (C57BL6/JMin⁺)マウスはadenomatous polyposis coli gene (APC)遺伝子の変異をもち、腸管に多数の腫瘍が自然に発症する。6週令のMinマウス雄に、それぞれ0.1%緑茶抽出物投与、sulindac投与、緑茶抽出物+sulindac投与、及び未処理のコントロールの4群に分け、10週間観察した。Sulindacは、0.03%のsulidacを含む餌として、緑茶抽出物は飲用水にして別々に与えた。

2) 緑茶のEGCGとtamoxifenとの併用による相乗効果はヒト肺がん細胞株PC-9 (2×10^5 /ml) で培養し、75 μ M EGCGといろいろな濃度のtamoxifenで処理した。アポトーシスの定量にはELISA法で細胞質のオリゴヌクレオゾームに結合したDNAを測定した。又、EGCGとtamoxifenによるTNF- α 遊離抑制の相乗効果はBALB/3T3細胞 (2×10^5 /0.5 ml) を用い行った。EGCG単独、tamoxifen単独、あるいはEGCG+tamoxifenで処理した。1時間後、0.2 μ Mオカダ酸を加え、24時間処理し、培養液中のTNF- α の濃度をマウスTNF- α のELISAキットで測定した。

C. 研究結果

1) APC遺伝子に異変をもつMin (C57BL6/JMin⁺) マウスは6週令より緑茶抽出物、sulindac、緑茶抽出物+sulindacを投与し、10週後腫瘍の発生を測定した。各群のマウス消化管をメチレンブルーで染色し、小腸と大腸に生じた0.4mm以上の腫瘍を計測した。コントロールの未処理群の腫瘍平均個数は、72.3個（100%）、緑茶抽出物群56.7個（78.4%）と抑制効果が認められた。既に多くの研究者から報告が出ているsulindacの抑制効果は確認でき、この実験群の腫瘍平均個数は49.0個（67.7%）であった。この実験の目的である緑茶抽出物とsulindacの併用群では腫瘍平均個数が32.0個（44.3%）と有意な減少を示し、動物実験でも相乗効果を証明することができた。その相乗効果の機構については、

アポトーシスの誘導、TNF- α 遊離抑制等にも見出している。

2) EGCGとがん予防薬tamoxifenの相乗効果については、PC-9細胞のアポトーシスの誘導で検討した。Tamoxifen 5, 10, 20 μ M処理により、誘導されたDNAの断片化を数値で表現すると、415 nmの吸収は、0.04, 0.82と1.71であった。次に75 μ M EGCGとtamoxifen 5, 10, 20 μ Mの処理を併用すると、415 nmの吸収は、0.24, 1.02と2.0であり、明らかにアポトーシスは亢進した。しかし、75 μ M EGCGの効果はむしろ5 μ M tamoxifenで6倍も強く認められ、10と20 μ Mでは、強い相乗効果は得られていない。全体としてEGCGとtamoxifenはむしろ相加効果となることが見出された。

D. 考察

1) EGCGとsulindacの相乗効果のヒントは、ECとEGCGがPC-9細胞のアポトーシスを相乗的に誘導することから得られた。この場合、ECは活性が無いけれど、³H-EGCGの細胞内取り込みを亢進することを見出し、相乗効果の存在を推測した。同様にEGCGとsulindacについて相乗効果を認めることができた。昨年、PC-9細胞のアポトーシスで示したように、sulindacは活性型のsulindac sulfideや、活性が無いsulindac sulfoneにおいても相乗効果が認められた。したがって、アポトーシスの相乗効果はsulindacが持つ本来の機能とは別の作用で相乗効果を誘導していると考えられる。

2) EGCGとsulindac, EGCGとtamoxifenに相乗効果と相加効果が認められたことは、sulindacやtamoxifenを服用しているがん予防の患者にとって朗報である。例えば、緑茶の飲用によりsulindacやtamoxifenの投与量を減量し、誘発される副作用を軽減できると考える。この結果を、アメリカ癌学会で昨年、発表した時、コメントの多くは、sulindacあるいは、tamoxifenの投与量を減少できることであった。

E. 結論

緑茶ががん予防薬と相乗効果を示したり、相加効果を示すことは非常に興味深い。私共は、がん予防効果にとって一つの重要なプロセスはTNF- α 遊離抑制と考えている。事実、EGCG+sulindac, EGCG+tamoxifenは、この系で相乗効果を見出している。ヒトへの投与の場合、今後、相乗効果をどのように予測できるか、一つの重要な課題となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E. and Fujiki, H. Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with (-)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in human lung cancer cell line, PC-9. *Cancer Res.*, 59, 44-47, (1999)
- 2) Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E. and Fujiki, H. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res.*, 59, 4516-4518, (1999)
- 3) Takahashi, K., Hano, Y., Suganuma, M., Okabe, S. and Nomura, T. 28-Deacetylbelamcandal, a tumor-promoting triterpenoid from *Iris tectorum*. *J. Natl. Prod.*, 62, 291-293, (1999)
- 4) Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T. and Fujiki, H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 566-570, (1999)
- 5) Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M. and Imai, K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease. Epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors.*, in press, (2000)
- 6) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat. Res.*, 428, 339-344, (1999)
- 7) Okabe, S., Suganuma, M., Tada, Y., Ochiai, Y., Sueoka, E., Kohya, H., Shibata, A., Takahashi, M., Mizutani, M., Matsuzaki, T. and Fujiki, H. Disaccharide esters screened by inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 669-676, (1999)
- 8) Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Lim, S.-J., Nomura, T., Suganuma, M. and Fujiki, H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive effect of components on human stomach cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 733-739, (1999)
- 9) Inoue, K., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Tabei, T. and Suganuma, M. The role of interleukin-6 in inhibition of lung metastasis in subcutaneous tumor-bearing mice. *Oncology Reports*, 7, 69-73, (2000)

2. 学会発表
省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

緑茶の飲用によるがん予防

分担研究者 中地 敬 埼玉県立がんセンター研究所 専門研究員
分担研究者 松山 悟 埼玉県立がんセンター研究所 研究員

研究要旨：1986年90項目の質問票を用い、前向きコホート研究を始めた。その1項目が緑茶を飲みますか？（はい、いいえ）、では1日何杯ですか？（3杯以下、4～9杯、10杯以上）であった。10年経過し、488例のがん罹患者が集まった時、その90項目の中にあつた緑茶のアンケート結果とがん罹患平均年齢の結果が、緑茶によるがん予防の研究に、ヒトでの疫学データとして加わつた。次に、1日10杯以上の緑茶の飲用はがんの予防だけでなく、心臓循環器疾患の予防をもたらすことが証明された。日本人は緑茶を飲用する国民であるから、がん予防有効量の摂取をどのように進めるか検討したのが本年度の研究であつた。がん予防薬でない、がん予防飲物としての研究である。

A. 研究目的

1) 埼玉県のある町で住民8,552名を対象とした前向きコホート研究は1997年で11年目を迎えた。その追跡調査から、488例のがん発症を見出している。緑茶の多量飲用ががんを予防することは更に確認できたが、その上、心臓循環器疾患に対しても予防効果を見出すことができた。ひいては、寿命を延長させる効果が証明できた。ここにそれぞれのデータをまとめる。

2) 1日緑茶10杯を飲用する人は男性で30%、女性で13%である。残りの男性70%、女性87%の人が1日緑茶10杯を飲用すれば、がん予防効果を達成することが可能である。埼玉県茶業試験場が6ヘクタールの茶畑から得た荒茶を用い、緑茶抽出物を得た。飲用量を正確にするため緑茶抽出物0.5g（約緑茶2杯分）を1粒とした。この粒と普通の緑茶飲用で10杯分の緑茶ポリフェノールの摂取が可能か、どのような症状を感じるか検討することを目的として飲用試験を企画した。

B. 研究方法

1) 1986年、埼玉県のある町の住民（40才以上）について、90項目からなる生活習慣調査を行った。その時以来、毎年がん罹患患者を追跡調査した。11年間の追跡調査の結果、488例のがん罹患患者が見出された。一方、死亡診断書による全死亡例を追跡すると、1,109名の死亡が確認された。心臓循環器疾患による死亡は274例であつた。これらのデータを基に緑茶の

飲用との関係を検討した。

2) 県の職員ボランティア102名をAグループ51名、Bグループ51名に分け、Aグループは3月から6月までの3ヶ月間、Bグループは6月から9月までの3ヶ月間に普通の緑茶飲用プラス緑茶粒で1日10杯分を摂取する飲用方式を行ってもらつた。飲用試験の開始前、6月と終了時の9月には採血とアンケート調査を集めた。勿論飲用試験の開始にあたっては、当センターの倫理委員会の承諾を得、又、各ボランティアの同意を得た。

C. 研究結果

1) 11年間の追跡調査の結果、男女共で488例のがん罹患患者が見出された。がん種としては胃がん(140)、肺がん(69)、結腸直腸がん(60)と肝がん(35)であつた。このがん種の分布は、日本の他の地域のがん種と同様であつた。緑茶によるがん予防効果は、肺がんに於いて、最も強く認められ、1日10杯以上の緑茶飲用者群の相対危険度は0.33であつた。同様に結腸直腸がん、肺がん、胃がんに対する1日10杯以上の緑茶飲用者群の相対危険度は0.56、0.53と0.69であり、予防効果は示唆された。更に488例についてもがんの平均罹患年齢は1日10杯以上の飲用の女性で6.2才、男性では3.2才、1日3杯以下の平均罹患年齢より遅れていた。

更に、274例の心臓循環器疾患による死亡について、1日10杯以上の緑茶を飲用する男性の相対危険度は、

1日3杯以下の群に対し、0.58であった。女性についても同様な傾向が認められた。がんと心臓循環器疾患は、日本の死亡の約半数を占めるほど重要である。これらの死亡平均年齢を、緑茶を多く飲用する群と少なく飲用する群について比較すると、約4.4才の寿命の延長を見出すことができた。

2) 102名のボランティアで、通常の緑茶飲用にプラス服用した緑茶粒の数は、5粒(38名)、4粒(23名)、3粒(2名)、2粒(11名)、他の薬を服用のため中止(6名)であった。緑茶粒の継続状態については、継続(75%)、減量(11%)、増量(4.5%)、中止(9%)であった。今後の飲用継続に対して84%の人は前向きであった。この結果から、80%の人が1日10杯分の緑茶ポリフェノールを摂取することが可能であることが分かった。緑茶と同様、緑茶粒にはカフェインが含まれているので、カフェインによる症状、例えば胃部不快感、胸やけ、吐き気、嘔吐等が生じることもあり、全体として50%の人がこの程度の症状を認めている。しかし、緑茶粒の服用時、大量の水を飲むとか、食後に服用するとこれらの症状はほとんど消失した。いづれにしても、緑茶による症状は抗がん剤の症状とは異なるけれど、抗がん剤の副作用の判定に従うと、5段階の内の最も程度の軽いもの、重篤な症状と解釈しない段階に含まれることが分かった。

D. 考察

1) 11年間の追跡調査の結果、緑茶の多量飲用はがんだけでなく、心臓循環器疾患の発症を予防することが示された。この場合、調査は埼玉県のある町の住民に対して行われたわけであるから、発がん剤の被曝は同等であると仮定した。これらの結果を発表すると、度々、緑茶ポリフェノールに薬効が証明されているにもかかわらず、飲用した水分が有効成分ではとのコメントに合うことは多い。前向きコホート研究からこのコメントに対する答えは得られない。

2) 緑茶粒の開発は薬を目的として行っているものではない。日本人は800年来 緑茶を飲物として飲用しているが、緑茶にがん予防効果が見出された現在では、がん予防効果をもたらす1日の摂取量を定めることが次の課題となった。コホート研究の結果、1日10杯量が導き出され、緑茶粒を用い実際の飲用試験が開始されたわけである。1日10杯の緑茶ポリフェノール量を3ヶ月間飲用して感じた症状は、ほとんどカフェイン摂取によるものであり、その程度は軽く、又、摂取方法を工夫することによりほとんどの症状は消失している。現在、緑茶ポリフェノールの組成を

えず、カフェイン量を減らす工夫が進められている。一方、アメリカではFDAを通じ、緑茶カプセルががん予防薬として開発されている。第I相試験で得られた最大耐用量は約1日35杯分の量と報告されており、日本で得られた1日10杯の症状は重篤なものではないことは理解できる。

E. 結論

8,552名を対象としたコホート研究から、1日10杯の緑茶飲用者群にがん予防効果が見出された。その結果を基に、1日10杯分の緑茶ポリフェノールの飲用で積極的にがん予防を行う準備を進めた。日本では緑茶をがん予防効果をもつ飲物として広めている。国内の各機関で同様な介入試験が始まっており、日本人に多いがん種の予防は数年の内に証明されると期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tokuchi, Y., Hashimoto, T., Kobayashi, Y., Hayashi, M., Nishida, K., Hayashi, S-I, Imai, K., Nakachi, K., Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Kawakami, Y. and Tsuchiya, E. The expression of p73 is increased in lung cancer, independently of p53 gene alteration. *Br. J. Cancer*, 80, 1623-1629, (1999)
- 2) Freese R., Basu, S., Hietanen, E., Nair, J., Nakachi, K., Bartsch, H. and Mutanen, M. Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *Eur. J. Nutr.*, 38, 149-157, (1999)
- 3) Nakachi, K. and members of Prospective Studies Collaboration. Collaborative overview ('meta-analysis') of prospective observational studies of the associations of usual blood pressure and usual cholesterol levels with common causes of death: protocol for the second cycle of the Prospective Studies Collaboration. *J. Cardiovasc. Risk*, 6, 315-320, (1999)
- 4) Nakachi, K., Limtrakul, P., Sonklin, P., Sonklin, O., Jarern, C. T., Lipigorngoson, S., Arai, K., Sone, Y., Imai, K., Suga, K., Matsuyama, S., Shimizu, H., Takahashi, T. and Suttajit, M. Risk factors for lung cancer among northern Thai women: Epidemiological, nutritional, serological, and bacteriological surveys of residents in high-and low-incidence areas. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 1187-1195, (1999)

- 5) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E.,
Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H.
Green tea and cancer chemoprevention. Mutat. Res.,
428, 339-344, (1999)

2. 学会発表
省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

hnRNP B1を指標としたがん予防の研究

分担研究者 末岡榮三朗 埼玉県立がんセンター研究所 研究員
分担研究者 松山 悟 埼玉県立がんセンター研究所 研究員

研究要旨：Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP B1)蛋白質に対する抗体(抗B1抗体)は、hnRNP B1蛋白質と特異的に反応した。同抗体を用いた肺扁平上皮がんの免疫染色では、その蛋白質の発現が充進していることが見出された。この特長は肺がんの早期診断に有用と考え、扁平上皮がんが主な、肺がん、口腔がん及び、食道がんについて検討した。例えば、肺がんでは潜在微小肺扁平上皮がん、気管支異形成、肺がん患者の喀痰で強い染色性を示した。口腔がんでは、口腔白板症の他に、口腔粘膜の塗抹標本でも陽性を示した。食道がん組織も強い染色性が認められたが、分化度の程度で分類すると、低分化の食道がんではhnRNP B1は高発現していなかった。このような結果から、hnRNP B1蛋白質の高発現の細胞に対する意味づけを、分子生物学的に検討している。細胞分裂が早いがん細胞にはhnRNP B1の高い発現が認められた。しかし、hnRNP B1の高発現は非常に早期の扁平上皮がんにも認められるので、正常細胞との区別を識別できるマーカーとして重要性を持っている。

A. 研究目的

肺がん術後の5年生存率は40%であり、胃がんの5年生存率より明らかに低い。しかし、臨床病期I期で手術可能であれば、肺がんの5年生存率は80%以上に上昇するわけであるから、新しい肺がんの早期診断マーカーの開発が望まれる。私共は独自に作成したheterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP B1)蛋白質を特異的に認識する抗体(抗-B1抗体)を作成し、肺がん組織を染色した。この抗体は、肺がんだけでなく、口腔がん、食道の扁平上皮がん細胞をも強く染色した。したがってhnRNP B1蛋白質の発現充進はがん化の非常に早い時期に生じている分子変化と考えている。この系を確立すれば、がん予防効果を判定する新しいバイオマーカーとして使用できると考え、その有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

私共独自が作成した、抗-hnRNP B1抗体(抗B1抗体)を用い、43例の肺がん、43例の潜在微小肺扁平上皮がん、11例の気管支異形成、肺がん患者の喀痰、更には、口腔がん、口腔白板症、食道がん等の組織について、hnRNP B1蛋白質の発現を免疫組織染色法にて解析した。又、肺がん細胞では、hnRNP B1蛋白質の発現をウエスタンブロット法で検討した。この方

法はがん予防も判定するマーカーとして発展すると考える。

C. 研究結果

hnRNP B1蛋白質の高発現は、肺扁平上皮がんの全例で、とくに、臨床病期I期の段階から認められた。微小肺扁平上皮がんでは58.1% (25/43) に、更には、異形成病変においても、高発現を認めた。したがって、hnRNP B1蛋白質の発現充進は、肺扁平上皮がんの早期診断への有用性が高いと考える。

7例の口腔扁平上皮がん(臨床病期I-IV期)の組織では、肺がんの場合と同様、全例にhnRNP B1蛋白質の高発現を認めた。更に、3例の口腔白板症においても全例に高発現を認めた。口腔がん患者の口腔塗抹標本では、2例とも扁平上皮がん細胞を染色することができる。この結果は、口腔がんの早期診断にも有用性が高いことを示している。

次に、16例の食道の扁平上皮がんについて組織を抗B1抗体で免疫染色を行った。がん組織では63% (10/16) にhnRNP B1の高発現が認められた。これらのがん組織を病理組織学的に分類し、その高発現を調べると、高分化型83% (5/6)、中分化型83% (5/6)、低分化型0% (0/4)の陽性率となり、低分化の食道が

んでは、hnRNP B1は高発現していないことを見出した。この結果は、hnRNP B1蛋白質の機能を考える上において重要である。

D. 考察

hnRNP B1蛋白質の高発現を肺がん、口腔がん、更に食道がんで証明することができた。1988年TockmanらがhnRNP A2/B1の発現が原発性の非小細胞性肺がんで高いことを発表していたが、私共はhnRNP A2 mRNAの選択的スプライシングで生じるhnRNP B1に着目し、hnRNP A2/B1及びhnRNP B1について遺伝子発現を別々に検討した。その結果、hnRNP B1 mRNAはがん組織に強く発現しており、hnRNP A2/B1 mRNAはがん部と非がん部共に同等の発現で特異性を見出すことはできなかった。この結果から私共はhnRNP B1について研究を進め、扁平上皮がんでの発現亢進を発見した。この早期診断マーカーはあくまでもがん予防効果を有効にするためにも役立つと考える。

E. 結論

扁平上皮がん組織に特異的に高発現する分子量37kDaのhnRNP B1蛋白質を見出した。より早期の肺がんの診断が可能になれば益々がん予防の重要性が評価されると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T. and Fujiki, H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 566-570, (1999)
- 2) Komori, A., Sueoka, E., Fujiki, H., Ishii, M. and Kozu, T. Association of MTG8 (ETO/CDR), a leukemia-related protein, with serine/threonine protein kinases and heat shock protein HSP90 in human haematopoietic cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 60-68, (1999)
- 3) Sueoka, E. and Fujiki, H. Carcinogenesis of okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural products. In "Harmful Algae" (Ruguera, B., Blanco, J., Fernandez, M. L. and Wyatt, T. eds) Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. PP. 573-5, (1999)

- 4) Sueoka, E., Goto, Y., Sueoka, N., Kai, Y., Kozu, T. and Fujiki, H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new marker of early detection for human lung cancers. *Cancer Res.*, 59, 1404-1407, (1999)
- 5) Goto, Y., Sueoka, E., Chiba, H. and Fujiki, H. Significance of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 as a new early detection marker for oral squamous cell carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 1358-1363, (1999)
- 6) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat. Res.*, 428, 339-344, (1999)

2. 学会発表

省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

カバ及び、メグスリの木のがん予防物質

分担研究者 岡部 幸子 埼玉県立がんセンター研究所 研究員

研究要旨：フィジーの住民は肺がん、胃がん、前立腺がんの発生率が他の島の住民に比較し極端に低いことが太平洋のがん疫学調査で報告されている。私共はフィジーで飲用されているカバに注目した。カバから分離したカバラクトンKava-1とKava-2は、TNF- α の遊離を抑制した。カバの飲用はフィジー住民のがん予防に役立っていると考え研究を進めた。本年度は、更に3個のカバラクトンを分離した。5個のカバラクトンを改めて構造解析した結果、既知の化合物であった。次に、TNF- α 遊離抑制について測定した。同様にメグスリの木の葉、樹皮、小枝、材について遊離抑制を指標に活性物質を分離した。この活性物質はゲラニニンであり、ゲンノショウコに含まれるものと同一であった。TNF- α 遊離抑制を指標に民間薬の見直しが可能であることを示した。

A. 研究目的

1) 1985年、南カリフォルニア大学のB. E. Henderson博士は、フィジーの住民のがん発生頻度が、太平洋の他の島々との住民に比較して低いと発表していた。太平洋の島の中でフィジーはカバを飲用することが報告されていたので、カバの中にがん予防物質が含まれているとの仮説を立て、TNF- α の遊離抑制を指標にカバラクトンを分離した。本年度は更に新たなカバラクトンを分離し、研究を進めることも目的とした。

2) 埼玉県農林試験場はカエデ科の植物であるメグスリの木の苗を培養することに成功した。メグスリの木は本来漢方薬で眼病の薬、あるいは、肝臓の薬として使用されている。私共はメグスリの木の葉、樹皮、小枝、材等のがん予防物質が含まれるとして、TNF- α の遊離抑制を指標に化合物の分離を目的として研究を進めた。

B. 研究方法

1) フィジーでは、ヤンゴナ（別名カバ）と呼ばれるコショウ科の根汁を飲用する習慣がある。私共は、カバに注目してTNF- α 遊離抑制物質を検索した。フィジーより入手したカバ粉末をメタノールで抽出をした。得られた抽出物はシリカゲルクロマトグラフィーで分離した。次にBALB/3T3細胞に発がん促進物質オカダ酸を処理すると、培養上清中にTNF- α が遊離する。この系にカバ抽出物をオカダ酸を処理する1時間前に添加し、24時間後の培養上清中のTNF- α 遊離が抑制されるかELISA法を用いて測定した。

2) 埼玉県農林試験場からメグスリの木の葉、樹皮、小枝、材をそれぞれ水で抽出した液を得た。一定量を凍結乾燥し、その粉末を実験材料とした。各抽出液の粉末を用い、TNF- α の遊離抑制を検討した。

C. 研究結果

1) カバ粉末から得られたメタノール抽出液は、オカダ酸で誘導されるBALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離を抑制した。メタノール抽出物は、シリカゲルクロマトグラフィーで分離した結果、約4種類の化合物の混合物であると推定された。更に精製を進め、主成分であるKava-1とKava-2を単離した。Kava-1とKava-2は濃度依存性にTNF- α の遊離を抑制することを見出した。抑制の強さをオカダ酸だけの処理で遊離されるTNF- α 量を100%とし、50%抑制する濃度（IC₅₀）で比較すると、Kava-1とKava-2のIC₅₀は48.7 μ Mと34.0 μ Mであった。一方、がん予防薬として注目されている緑茶抽出物の主成分(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)のIC₅₀は20 μ Mであるのに対し、Kava-1とKava-2はほぼ同等の活性を持つことが示された。

昨年分離した2個のカバラクトンに続いて、3個の新しいカバラクトンを分離した。これら5個の化合物について、構造解析を行うと、次のように既知のもので、Kava-1(methysticin), Kava-2(yangonin), Kava-3 (desmethox), Kava-4((+)-dihydrokewain), Kava-5 ((+)-kawain)であった。BALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離抑制の活性をIC₅₀(μ M)の濃度で比較すると、Kava-1 54, Kava-2 32, Kava-3 17, Kava-4 >100, Kava-5 54であった。次に、Kava-3が最も

強力な活性を示したのでマウス皮膚発がんプロモーション活性の検討を始めたが、皮膚にKava-3の析出が見られ、実験は中止した。別な実験系での検討が必要になった。

2) メグスリの木から得られた凍結乾燥の粉末についてそれぞれTNF- α の遊離抑制を検討した結果、いずれの抽出液にも弱い抑制効果を認めることができた。しかし、その抑制の活性を緑茶抽出物と比較すると、一段と活性は弱く、緑茶抽出物の方には、はるかに活性物質が多く含まれていることが推測された。メグスリの木抽出物の中で、最も活性が認められたのは木の葉から分離されたものであった。中に含まれている活性物質を検討すると、ゲラニインが見出された。ゲラニインは元来、生薬であるゲンノショウコより分離されたタンニンである。ゲラニインは緑茶のEGCGと同様にいろいろな活性を持つので、メグスリの木活性物質はまず、ゲラニインで説明できると考える。

D. 考察

1) カバの抽出物は、TNF- α の産生抑制活性を示した。その活性は緑茶に含まれるEGCGと同様に強いことを見出した。EGCGはTNF- α 遺伝子の発現を転写因子AP-1及び、NF- κ Bの活性化抑制を介していることを見出している。Kava-1及び2についても同様の作用機構でTNF- α の産生を抑制しているか検討を進めている。フィジーではカバの飲用が、既になん予防物質として作用していると考えている。

カバラクトンをTNF- α 遊離抑制物質として分離した。しかしフィジーで現地の人々が飲用し薬効として認めているものは鎮静・催眠作用である。分離精製した5個のカバラクトンに鎮静・催眠作用があるのか、次に検討する必要がある。もしそれらの活性が得られると脳神経への新しい薬効を考えることが生じてくる。

2) 最近、アメリカでがん予防と一緒に注目されているのが、民間療法である。現在のところ、まだ古来の習慣にもとづいた薬草を集めたものが市販されているが、TNF- α の遊離抑制を指標にすると、いろいろな活性物質が分離できることが示された。昨年アメリカ癌学会で緑茶によるがん予防を講演した時、民間療法の見直しのコメントをいただき、同感と思ったことがあった。今後、益々研究が進むと考えられる。

E. 結論

フィジーで飲用されているカバから、TNF- α の遊離抑制を指標に5個のカバラクトンを分離し、構造解析

を行った。カバラクトンの飲用は住民のがん予防に役立つことが示唆された。同じ方法を用いメグスリの木抽出物からゲラニインを見出した。ゲラニインはゲンノショウコに含まれる既知の化合物で漢方では重要な化合物である。TNF- α 遊離抑制の有用性を示した例である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K. and Nakachi, K. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- α , and cancer preventive agents (-)-epigallocatechin gallate and green tea. *Cancer Detect. Prev.*, 24, 91-99, (2000)
- 2) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K. and Kimura, S. Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220, 225-228, (1999)
- 3) Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E. and Fujiki, H. Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with (-)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer-preventive activity in human lung cancer cell line, PC-9. *Cancer Res.*, 59, 44-47, (1999)
- 4) Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E. and Fujiki, H. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res.*, 59, 4516-4518, (1999)
- 5) Takahashi, K., Hano, Y., Suganuma, M., Okabe, S., and Nomura, T. 28-Deacetylbelamcandal, a tumor-promoting triterpenoid from *Iris tectorum*. *J. Natl. Prod.*, 62, 291-293, (1999)
- 6) Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T. and Fujiki, H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 252, 566-570, (1999)
- 7) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat. Res.*, 428, 339-344, (1999)
- 8) Okabe, S., Suganuma, M., Tada, Y., Ochiai, Y., Sueoka, E., Kohya, H., Shibata, A., Takahashi, M., Mizutani, M., Matsuzaki, T. and Fujiki, H.