

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

ラクトフェリンの発がん抑制作用の検討と作用機序の解明

分担研究者 津田洋幸 国立がんセンター研究所 化学療法部 部長

研究要旨 ラクトフェリンは乳汁や涙液などに存在する鉄含有糖蛋白で、感染防御と免疫担当細胞の活性化作用などを示す。今までに我々はウシラクトフェリン(bLF)によるラット大腸発がん及びマウス肺転移巣形成の抑制を報告した。その作用機構として免疫細胞の活性化とそれに関わる IL-18 産生を見出し、さらに本報告において腸粘膜（上皮+固有層）及び血清中の各種サイトカイン濃度と腸粘膜内免疫系細胞の変動について検討した。小腸粘膜組織内 T および B 細胞は bLF, bLFH で著しく増加したが、bTF では影響なかった。IL-18 の小腸粘膜内濃度は 3-6 時間後に最高値を示し有意に増加した（無処置群の約 2.5 倍）。血清中濃度は bLF のみで有意に増加した。免疫組織染色で小腸上皮細胞に強い発現がみられた。IFN- γ の小腸粘膜内濃度は bLF で約 4 倍増加した。小腸粘膜内に IFN- γ ⁺細胞が多数存在していた。bTF では影響なかった。IL-2 と IL-12 は bLF, bLFH, bTF で減少、TNF- α や IL-1 β も減少した。IL-4 や GM-CSF には大きな変動はなかった。以上の結果から bLF 及び bLFH は、腸上皮で IL-18 を誘導し、T、B 細胞や NK 細胞を増加させ、さらに血管新生阻害に関係ある IFN- γ を増加させることにより、がんの転移及び発がん抑制効果を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

今までの研究において、ウシ乳汁中の成分であるラクトフェリン (bLF) がポストイニシエーション、または同時投与で大腸、膀胱、食道、舌等の発がんを抑制し、さらに実験的がん転移も著しく抑制することを見出した。bLF の発がん予防効果の機序として、マウスに経口投与することにより、腸管上皮内における IL18 の誘導産生と、粘膜固有層内における CD4⁺細胞、CD8⁺細胞および IFN- γ ⁺細胞の増加が、局所の大腸および遠隔臓器の発がん抑制に重要な役割を担っている可能性を示した。本研究では発がん抑制機序における免疫能の亢進に主眼を置き、bLF とそのペプシン加水分解産物 (bLFH) について関連するサイトカインとリンパ球および白血球の誘導について解析を行った。

B. 研究方法

材料：ウシラクトフェリン (bLF、純度 98%) およびそのペプシン加水分解産物 (bLFH) は森

永乳業株式会社（東京）、ウシアポトランスフェリン (bTF) とウシアルブミンはシグマケミカル (株) (St. Louis、米国) から購入した。動物は 5 週齢雄 BALB/c マウス (日本チャールスリバー・厚木) を一週間の順化後 6 週齢にて実験に用いた。基礎飼料は CE-2 (日本クレア (株)) を用い、飲料水と共に自由に摂取させた。

血清および腸組織の解析：一群 4 匹のマウスを用い、bLF、bLFH および bTF を 300mg/kg にて 1 回胃内投与 1、3、6、24 および 48 時間後、または 1 日 1 回 7 日連続胃内投与し、最終投与 6 時間後にエーテル麻酔下にて採血、屠殺し、小腸、大腸組織を採取した。血液からは血清を分離し、腸は生食で洗浄後、腸の縦軸に沿って開いて氷冷したガラス板において粘膜上皮をスライドガラスで掻きとり、素早くアセトンドライアイスで凍結後、-80°C で保存した。

C. 研究結果

小腸粘膜における免疫系細胞の数：bLF および bLFH の投与により、小腸リンパ組織および粘膜層内における CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、さらに粘膜層内 IgM⁺及び IgA⁺細胞（図 1）の数も有意に増加した（無処置対照の 19-38% および 10-25% の増加）。bTF では増加しなかった。

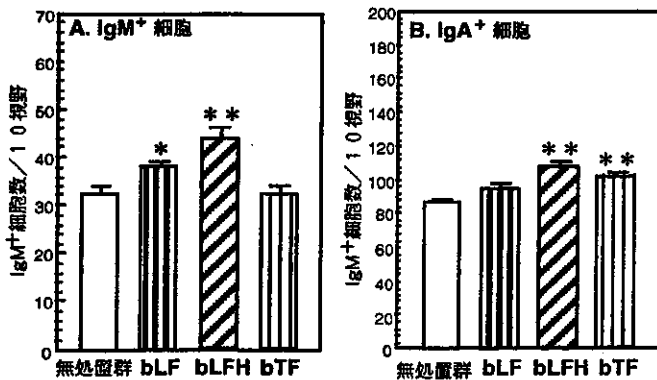


図 1 bLF, bLFH 及び bTF 投与による小腸粘膜内 IgM⁺ および IgA⁺ 細胞数の変動

腸粘膜及び血清中 IL-18 濃度：小腸粘膜内 IL-18 濃度は、bLF 投与 6 時間後に無処置群の約 2.5 倍と最高値を示し、bLFH と bTF では投与 3 時間後に各々無処置群の 2.5 および 2.2 倍に増加し (bLF, 358 ± 42 pg/mg protein ; bLFH, 369 ± 43 pg/mg ; bTF, 318 ± 17 pg/mg、無処置群, 146 ± 43 pg/mg) (何れも有意の増加)、その後徐々に減少した (図 2)。大腸粘膜における IL-18 濃度も有意に増加した (図 3)。ウシアルブミンでは影響はなかった。血清中 IL-18 濃度は、bLF 投与群 6 時間後に有意に増加したが (423 ± 111 pg/ml vs 117 ± 6 pg/ml, p<0.05)、他の投与群では有意な増加はなかった (図 4)。

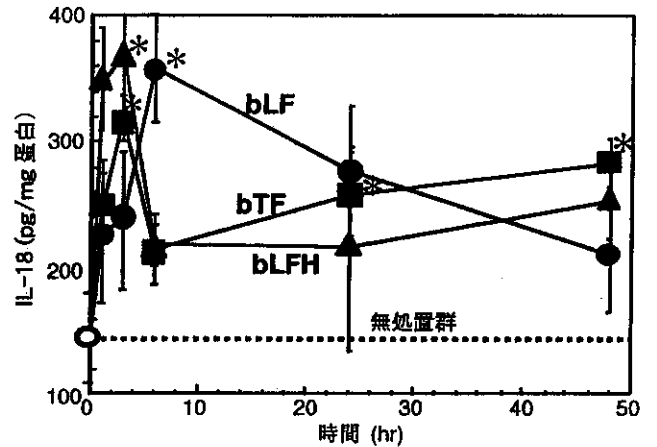


図 2 bLF, bLFH 及び bTF 投与後の小腸粘膜内 IL-18 濃度の変化

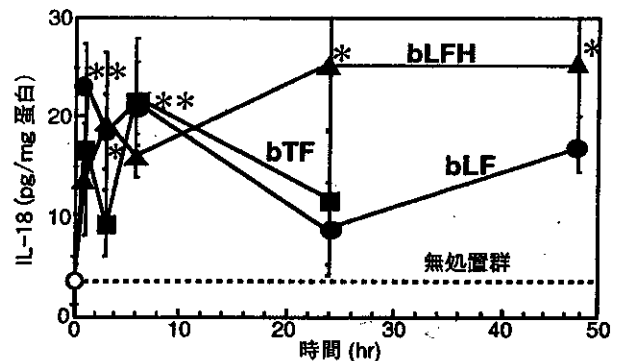


図 3 bLF, bLFH 及び bTF 経口投与後の大腸粘膜内 IL-18 濃度の変化

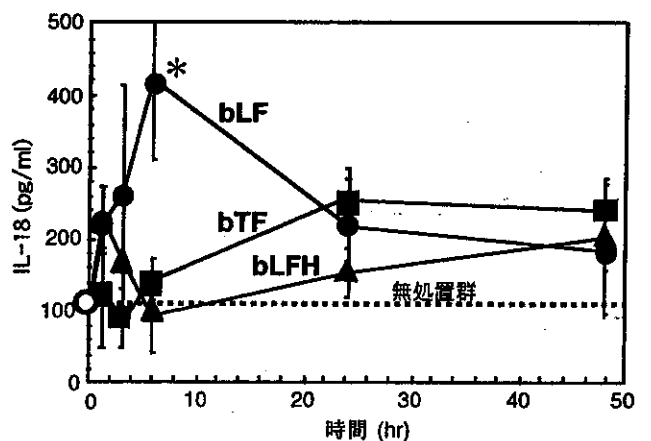


図 4 bLF, bLFH 及び bTF 経口投与後の血清中 IL-18 濃度の変化

腸粘膜内および血清中 IFN- γ 濃度：小腸粘膜内の IFN- γ 濃度は、bLF および bLFH の 1 回投与では大きな変化はなかったが、7 回投与後には対照の

1.03±0.69 pg/mg protein に対し、3.67±0.72 (P<0.05)および 3.53±2.40 pg/mg protein と著しい増加をみた。(図5)。血清中の IFN- γ 濃度には有意の変化はみられなかった。

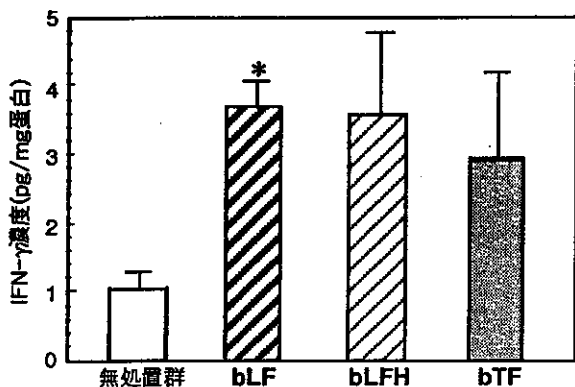


図5 bLF、bLFH及びbTF経口投与後の小腸粘膜内IFN- γ 濃度の変化

腸粘膜および血清中他のサイトカイン濃度：

bLF、bLFH、bTFはいずれもT細胞から出されるIL-2やIL-4の血清レベルに対しては、ほとんど影響しないか軽度減少させた。B細胞等から出されるIL-12に対しても減少させた。炎症性サイトカインと考えられているIL-1 β 、TNF- α 等のサイトカインは著しく減少した(対照の1/16-1/2)(図6)。

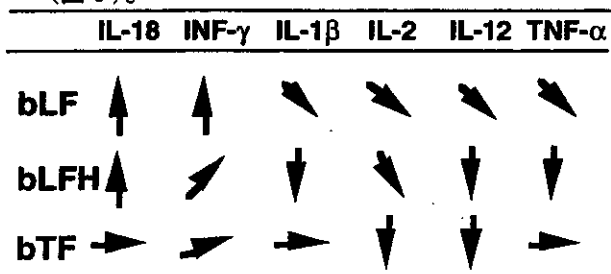


図6 bLF、bLFH及びbTF経口投与後の小腸粘膜内サイトカイン濃度の変動

有意な増加または減少、 増加または減少傾向、 変化無し、

D. 考察

今回我々はbLFおよびbLFHが小腸においてサイトカインを制御し免疫細胞を活性化することを見出した。特に、ラクトフェリンやその加水分解産

物は、小腸上皮細胞においてIL-18を多量に誘導したが、一方で炎症性サイトカインであるIL-1 β やTNF- α を著しく減少させることを見出した。しかしウシアルブミンにはその様な影響はなかった。腸におけるIL-18などのサイトカインの誘導又は抑制に関しては腸粘膜における免疫系に重要な役目をはたしているものと考えられる。IL-18はCD4⁺、CD8⁺T細胞の生成、NK細胞の活性化に影響することが報告されている。

腸には病原菌から宿主を守る為、十分な免疫機構が備わっている。LactobacilliやE. coliにより、小腸粘膜層の単球より免疫細胞を活性化するために、IL-12が誘導されることが報告されている。糖脂質(LPS)は腸粘膜内細胞に作用しIL-6やTNF- α を誘導する。しかし、bLFはLPSに結合し、それらのサイトカイン誘導を阻害する。従って、腸内細菌により誘導されていた炎症性サイトカイン、IL-1 β やTNF- α 、およびIL-12などのサイトカイン誘導は、bLFまたはbLFHとLPSの結合により抑制させたものと考えられる。観察された炎症性サイトカインの減少と発がん抑制との相関については今後の検討が必要である。またIFN- γ には血管新生を阻害する作用があるため発がんに対して抑制的に作用したと考えられた。

一方、bLFおよびbLFH投与によって、小腸粘膜固有層に殺細胞活性に関与するT細胞や免疫能に関与するIgA⁺、IgM⁺B細胞が有意に増加し、さらにIFN- γ 細胞も多数誘導された。これら免疫細胞の活性化の機序として、ラクトフェリンによる直接的な作用が想定されるが、ラクトフェリンは投与後の血中には検出されない(6 ng/ml以下)ことから(M. Iigo et al., Clin. Exp. Metastasis, 17:35-40, 1999)、ラクトフェリン自体によるものではなくIL-18などを含むサイトカインを介するものと考えられる。しかも、消化管内容物内にはほとんどが消化酵素による多数の加水分解産物ペプチドが見いだされている(Ushida et al., 未発表)。これらは多くの分子量の異なったペプチドからなり、その中にはT細胞を活性化できるペプチドがある可能性がある。これら短いペプチドは消化管から吸収され、体内で免疫細胞を活性化する可能性もある。今後これら活性

ペプチドのサイトカイン誘導及び発がん抑制についての研究もすすめていく予定である。

E. 結論

ラクトフェリンおよびその加水分解産物によって小腸上皮内に IL-18 が誘導され、細胞傷害性 T 細胞や、IFN- γ 細胞も多数誘導された。また IL-18 は血清中にも増加し全身的に細胞傷害性 T 細胞や、IFN- γ 細胞を誘導していると考えられた。IFN- γ は血管新生を阻害することから、このようなサイトカインによる免疫系細胞の活性化とともに新生血管阻害が、発がん抑制や転移抑制に大きく影響したものと考えられた。

F. 健康危険情報

ラットとマウスを用いた今までの研究において bLF の摂取による毒性変化は観察されていない。ラットでは bLF 及び bLFH を 2% 混餌投与した場合でもあきらかな毒作用は観察されなかった。ラットにおける大腸等の発がん予防効果は 0.2% 混餌投与でも有効である。この量はヒトの 60kg 体重に換算すると約 9g/日であり、投与可能な用量となる。実際、ヒト慢性活動性肝炎の患者に対する臨床試験は一日 1.8 及び 3.6g であり、今後の大腸がん予防の臨床試験を考慮するにあたって有利である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka, T., Kawabata, K., Kohno, H., Honjo, S., Murakami, M., Ota, T. and Tsuda, T.
Chemopreventive effect of bovine lactoferrin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 25-33 (2000).
- 2) Krutovskikh, V. K., Troyanovsky, S. M., Piccoli, C., Tsuda, H., Asamoto, M. and Yamasaki, H.
Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth *in vivo*. *Oncogene*, 19: 505-513 (2000).
- 3) Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H.,

- Ota, T., Sekiya, T., Terada, M. and Tsuda, H.
Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to N-methyl-N-nitrosourea mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(2): 243-249 (2000).
- 4) Tanaka, T., Kawabata, K., Kohno, H., Honjo, S., Murakami, M., Shimada, R., Kagami, S. and Tsuda, H. Bovine lactoferrin inhibits rat tongue carcinogenesis. Shimazaki, k., Tsuda, H., Tomita, M., Kuwata, T., Perraudin, J. (eds.) In: *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*, Elsevier Science, Tokyo, pp: 401-411 (2000).
- 5) Shimizu, N., Ikehara, Y., Nozaki, K., Kaminishi, M., Tsuda, H., Sugiyama, A., Katsuyama, T. and Tatematsu, M. Effects of lactoferrin administration in *helicobacter pylori* infection animal model. K. Shimazaki et al. (eds.) In: *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*, Elsevier Science, Tokyo, pp: 209-215 (2000).
- 6) Tsuda, H., Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M., Han, B. S. and Moore M. A. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. *Mutation Res.*, 462: 227-233 (2000).
- 7) Ota, T., Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Yamamoto, F., Matsuoka, Y., Ochiya, T., Sekiya, T., Terada, M., Akaza, H. and Tsuda, H.
Transgenic rats carrying copies of the human c-Ha-ras proto-oncogene exhibit enhanced susceptibility to N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(7): 1391-1396 (2000).
- 8) Wang, W. P., Iigo, M., Sato, J., Sekine, K., Adachi, I. and Tsuda, H. Activation of intestinal mucosal immunity in tumor-bearing mice by lactoferrin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 1022-1027 (2000).
- 9) Maeda, M., Iigo, M., Tsuda, H., Fujita, H., Yonemura, Y., Nakagawa, K., Endo, Y. and Sasaki, T. Antimetastatic and antitumor effects of 2,4-diamino-6-(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine

(4PyDAT) on the high lung metastatic colon 26 tumor in mice. *Anti-Cancer Drug Design*, 15: 217-223 (2000).

- 10) Kim, D. J., Takasuka, N., Nishino, H. and Tsuda, H. Chemoprevention of lung cancer by lycopene. Flohé, L., Niki, E., Whelan, J. (eds.) In: *Bio Factors*, IOS Press, vol: 13, pp: 95-102 (2000).
 - 11) Tsuda, H., Sekine, K. Milk components as cancer chemopreventive agents. *Asian Pacific J. of Cancer Prev.*, 1: 277-282 (2000).
 - 12) Park, C. B., Kim, D. J., Moore, M. A., Takasuka, N. and Tsuda, H. Promotion of liver lesion development in the syrian hamster by dietary fat following multi-organ initiation is inhibited by DHEA-S administration. *Asian Pacific J. of Cancer Prev.*, 1: 329-332 (2000).
 - 13) Tokuzen, R., Iwahori, Y., Asamoto, M., Iigo, M., Hasegawa, F., Satoh, T., Ishidate, M. Jr. and Tsuda, H. Establishment and characterization of three new rat renal cell carcinoma cell lines from *N*-ethyl-*N*-hydroxyethyl nitrosamine-induced basophilic cell tumors. *Pathol. International*, 51: 65-71 (2000).
 - 14) Tsuda, H., Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T. and Terada, M. High susceptibility or transgenic rats carrying the human *c-Ha-ras* proto-oncogene to chemically-induced mammary carcinogenesis. *Mut. Res.*, 9120: 1-10 (2001).
 - 15) Han, B. S., Park, C. B., Takasuka, N., Naito, A., Sekine, K., Nomura, E., Taniguchi, H., Tsuno, T. and Tsuda, H. A ferulic acid derivative, ethyl 3-(4'-geranyloxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoate (EGMP), as a new candidate chemopreventive agent for colon carcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92(4): in press.
2. 学会発表
- 1) Tsuda, H., Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Takasuka, N. and Iigo, M. Chemoprevention of colon carcinogenesis and metastasis by bovine lactoferrin (bLF) in rodents. 91th American Association for Cancer Research Annual Meeting, San Francisco, (April 2000)
 - 2) 鳥山—馬場弘靖、山本扶美、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける初期変化について、第 89 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)
 - 3) 内藤暁宏、鳥山—馬場弘靖、朝元誠人、津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにおける自然発生腫瘍の頻度と *ras* 遺伝子の突然変異、第 89 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)
 - 4) 深町勝巳、高須賀信夫、松岡洋一郎、津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにおける DMBA-TPA 皮膚塗布二段階発がんモデル、第 89 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)
 - 5) 鳥山—馬場弘靖、山本扶美、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける初期変化について、第 47 回日本実験動物学会総会、徳島、(2000 年 5 月)
 - 6) Tsuda, H., Toriyama-Baba, H., Iigo, M., Takasuka, N., Ishikawa, C. and Yazawa, K. Organotropic chemopreventive effects of N-3 unsaturated fatty acids in a rat multi-organ carcinogenesis model. 4th Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL 2000, Tsukuba, (June 2000)
 - 7) 津田洋幸、深町勝巳、内藤暁宏、高須賀信夫、鳥山—馬場弘靖、松岡洋一郎、ヒト正常型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットを用いたがん化学予防物質の早期検索法の試み、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 8) 飯郷正明、佐藤淳、鳥村真理子、津田洋幸、ラクトフェリンによる発がん抑制とサイトカイン誘導、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 9) 高須賀信夫、韓範錫、高橋徹行、築野卓夫、野村英作、谷口久次、津田洋幸、フェルラ

- 酸誘導体 γ -Oryzanol のラット大腸発がん抑制効果、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
- 10) 内藤暁宏、鳥山一馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける大腸、前立腺、乳腺に対する発がん感受性の解析、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 11) 韓範錫、高須賀信夫、高橋徹行、野村英作、谷口久次、津田洋幸、フェルラ酸誘導体のラット大腸発がん抑制効果、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 12) 藤田健一、大西隆仁、関根一則、津田洋幸、ウシラクトフェリン(bLF)による MeIQx 誘発ラット肝前がん病変発生抑制機序の解析、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 13) 大西隆仁、関根一則、藤田健一、津田洋幸、MeIQx によるラット肝臓と大腸の前がん病変に対するウシラクトフェリンの発がん抑制効果、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 14) 深町勝巳、松岡洋一郎、高須賀信夫、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラット(Hras128)における 17 β estradiol および 4-n-Octylphenol の乳腺発がんへの影響、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 15) 高橋徹行、馬場正樹、高須賀信夫、奥山徹、西野輔翼、津田洋幸、Isoliquiritigenin のマウス及びラット大腸発がん抑制効果、第 7 回日本がん予防研究会、淡路島、(2000 年 7 月)
 - 16) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離と機能解析、第 10 回乳癌基礎研究会、倉敷、(2000 年 8 月)
 - 17) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、北中千史、口野嘉幸、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離と機能解析、第 15 回発がん病理研究会、穂高郡、(2000 年 8 月)
 - 18) 津田洋幸、発がんの化学予防、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 19) 前田満和、徳善玲子、國元武彦、上原宣昭、津田洋幸、発がん性ヘテロサイクリックアミン類の試験管内相互作用、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 20) 深町勝巳、松岡洋一郎、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 NLR-3 の単離、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 21) 藤田健一、大西隆仁、関根一則、出川雅邦、津田洋幸、ウシラクトフェリン(bLF)による MeIQx 誘発肝前がん病変発生抑制機序の解析、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 22) 内藤暁宏、鳥山一馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける乳腺部上皮・肉腫腫瘍の組織発生の解析、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 23) 鳥山一馬場弘靖、太田智則、落谷孝広、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの MNU による膀胱発がん感受性について、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 24) 飯郷正明、佐藤淳、津田洋幸、ラクトフェリン投与によるインターロイキン-18 誘導と肺転移抑制、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 25) 高須賀信夫、韓範錫、高橋徹行、築野卓夫、野村英作、谷口久次、津田洋幸、フェルラ酸誘導体 λ -Orizanol のラット大腸 ACF に対する抑制効果、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
 - 26) 韓範錫、高須賀信夫、高橋徹行、野村英作、谷口久次、津田洋幸、フェルラ酸誘導体の

- ラット大腸 ACF に対する抑制効果、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
- 27) 高橋徹行、高須賀信夫、馬場正樹、奥山徹、西野輔翼、津田洋幸、Isoliquiritigenin のマウス及びラット大腸発がん抑制効果、第 59 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
- 28) Tsuda, H. Establishment of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats for short-term screening of carcinogens and chemopreventive agents. International Congress of the International Academy of Pathology, Nagoya, (October 2000)
- 29) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離、第 53 回日本細胞生物学会、福岡、(2000 年 10 月)
- 30) 内藤暁宏、鳥山一馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸、雄ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける乳腺、大腸、前立腺発癌感受性の解析、第 17 回日本疾患モデル学会、東京、(2000 年 11 月)
- 31) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離、第 17 回日本疾患モデル学会、東京、(2000 年 11 月)
- 32) Tsuda, H. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats to short-term environmental carcinogen detection method. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP), Pataya, (November 2000)
- 33) 大西隆仁、韓範錫、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras transgenic (Hras128)ラットにおける乳癌非標的発がん物質による乳腺発がん、第 17 回日本毒性病理学会、淡路島、(2001 年 1 月)
- 34) Han, B. S., Takasuka, N., Kunimoto, T., Takahashi, T. and Tsuda, H. Inhibitory effect of genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. 第 17 回日本毒性病理学会、淡路島、(2001 年 1 月)
- 35) 鳥山一馬場弘靖、山本扶美、外岩戸尚美、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの経胎盤発がん感受性、第 17 回日本毒性病理学会、淡路島、(2001 年 1 月)
- 36) 松岡洋一郎、鳥山一馬場弘靖、深町勝巳、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性についての解析、第 17 回日本毒性病理学会、淡路島、(2001 年 1 月)
- 37) Iigo, M., Wang, W. P., Satoh, J., Kuhara, T., Sekine, K., Tsuda, H. Bovine lactoferrin, a potent preventive agent active against colon carcinogenesis and metastasis, causes interleukin-18 induction in intestinal epithelium. 5th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Hawaii, (February 2001)
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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

前立腺癌の化学予防の実験的アプローチ

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部第一病理学教室 教授

研究要旨：ヒト前立腺癌の化学予防を目的として、大豆由来イソフラボンを豊富に含む大豆胚芽熱水抽出物の前立腺発癌に及ぼす影響を最近我々が開発したトランスジェニックラット前立腺癌モデルで追究した。しかし cDNA アレイ法では、大豆胚芽熱水抽出物の投与によって前立腺で種々の遺伝子発現が変化するにもかかわらず、明らかな前立腺癌修飾作用は見いだされなかった。

A. 研究目的

前立腺癌は西欧諸国において男性の悪性腫瘍の好発腫瘍である。本邦においては前立腺癌の罹患率および死亡率は低いものの、近年増加傾向にあり、将来臨床癌が急増する懸念がある。ヒト前立腺癌の発生頻度が欧米に比較して日本男性に少ないのは、大豆摂取に伴うイソフラボンの高摂取が要因の一つであると示唆されている。そのイソフラボンの活性の中心として考えられているのがゲニスチンおよびダイジンであるが、これらの分離精製には多大の労力と費用が必要である。さらに、従来のラット前立腺癌モデルを用いてイソフラボンの前立腺発癌修飾作用を検討するには、長期間の実験期間が必要であった。そこで、より精製の容易で大豆由来イソフラボンを豊富に含む大豆胚芽熱抽出物および独自に開発した SV40Tag 遺伝子導入ラット前立腺癌モデルを用いて、イソフラボンの前立腺発がん修飾作用を短期間に検討することを目

的として、前立腺発がんに及ぼすイソフラボンの影響を検討した。

B. 研究方法

本大学の実験動物教育センターで飼育繁殖している 5 週令 Probasin SV40Tag トランスジェニックラット (Tg ラット) に、大豆胚芽熱水抽出イソフラボン (種々のイソフラボンの混合物) を 0.25% の濃度で飼料に混じて 15 週間投与した。対照群には大豆非含有基礎食を投与した。実験第 15 週で屠殺剖検し、前立腺を摘出し、ラット前立腺の腹葉、背側葉、前葉における腺癌、および Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) の頻度を病理組織学的に追究し、イソフラボンによる前立腺腫瘍発生の抑制の有無を検討した。

さらに別実験として、イソフラボン投与による前立腺における遺伝子発現変化を検討するために、6 週令の F344 雄ラットに、0.25% の熱水抽出イソフラボンを 2 週間混餌投与した。摘出した前立腺から

RNA を抽出し、Stress/Toxicology cDNA アレイを用いて、対照群および熱水抽出イソフラボン群の間で、発現の差のある遺伝子を検索した。

C. 研究成果

使用した熱抽出イソフラボンは Daidzin が 22.3%、Glycitin が 15.0%、Genistin が 5.4% 含まれ、その他の成分は極めて少なく、Daidzein, Glycitein および Genistein はそれぞれ、0.21、0.40、0.06% 含まれるに過ぎない。熱抽出イソフラボン投与による体重増加抑制は観察されず、対照群である大豆非含有基礎食のみの群とほぼ同様な体重増加曲線を示した。前立腺重量では熱抽出イソフラボン投与群で、背側葉に軽度の上昇をみとめたが、腫瘍の発生する腹葉には重量増加は認められなかった。血中のテストステロン濃度は 0.59 と 0.41ng/ml と両群に有意差はみられず、熱抽出イソフラボン投与によってテストステロンの分泌、代謝には影響ないと結論づけられた。腫瘍性病変の発生頻度は、対照群で、腹葉前立腺に腺癌が 12 例中 12 例(100%)観察された。背側葉では PIN のみが 5 例、PIN および腺癌が混在するものは 7 例観察され、前葉には腺癌が 11 例観察された。熱抽出イソフラボン投与群では、腹葉癌は 12 例中 12 例、背側葉では PIN のみが 3 例、PIN および腺癌が混在するものが 9 例、前葉の腺癌は 10 例観察され、両群間に明らかな腫瘍性病変発生の差は認められなかった。

207 個の遺伝子の乗った Stress/Toxicology cDNA アレイを用いて、熱抽

出イソフラボンによる前立腺上皮細胞における遺伝子の動きを検討した結果、対照群に比して熱抽出イソフラボン投与群で 2 倍以上発現が上昇する遺伝子は、HSP27, CDK4, GST など 8 種類、0.5 倍までの発現低下を示す遺伝子は、MAP kinase, NDP kinase, Cyclin D1, D3 など 9 種類みられた。このように、cDNA アレイを用いた研究では、大豆胚芽熱水抽出物投与により、前立腺において種々の遺伝子発現が変化していることも見いだされたが、明らかな前立腺発がん修飾作用は見いだされなかった。

D. 考察

大豆由来イソフラボンを豊富に含む大豆胚芽熱水抽出物の前立腺発がんおよび影響を、最近我々が開発した Probasin SV40Tag トランスジェニックラット前立腺発がんモデルで検索したところ、明らかな前立腺発がん修飾作用は見いだされなかった。一方、cDNA アレイを用いた研究では、この大豆胚芽熱水抽出物をラットに投与すると、前立腺で細胞増殖に関連する種々の遺伝子発現が変化していることも見いだした。従ってこのイソフラボン投与により前立腺組織の遺伝子発現に何らかの影響を与えていることが示唆されるが、発がん修飾作用を示すまでには至らなかった。今後、トランスジェニックモデルの発がん予防物質のスクリーニングへの応用の有用性と共に、大豆胚芽熱水抽出物の発がん修飾作用の検索にはさらなる研究が必要であると考えられる。

E. 結論

大豆由来イソフラボンを豊富に含む大豆胚芽熱水抽出物の前立腺発癌に及ぼす影響を最近我々が開発したトランスジェニックラット前立腺癌モデルで追究した。cDNA アレイ法では、大豆胚芽熱水抽出物の投与によって前立腺で種々の遺伝子発現が変化するにもかかわらず、明らかな前立腺癌修飾作用は見いだされなかった。今後ヒトで十分期待されている大豆由来のイソフラボンの前立腺発がん発生抑制において、どの成分がもっとも有効のかを検討する必要があるだろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ogawa, K., Kimoto, N., Asamoto, M., Nakanishi, M., Takahashi, S. and Shirai, T.: Aberrant expression of p27^{kip1} is associated with malignant transformation of the rat urinary bladder epithelium. *Carcinogenesis*, 21: 117-121, 2000.

Cui, L., Takahashi, S., Tada, M., Kato, K., Yamada, Y., Kohri, K., Shirai, T.: Immunohistochemical detection of carcinogen-DNA adducts in normal human prostate tissues transplanted into the subcutis of athymic nude mice: Results with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) and relation to cytochrome P450s

and *N*-acetyltransferase activity. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 52-58, 2000.

Imaida, K., Ogawa, K., Takahashi, S., Ito, T., Yamaguchi, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, K., Ito, N., Shirai, T.: Delay of DNA-adduct repair and severe toxicity in xeroderma pigmentosum group A gene (XPA) deficient mice treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP). *Cancer Lett.*, 150: 63-69, 2000.

Yaono, M., Tamano, S., Mori, T., Kato, K., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Lobe specific effects of testosterone and estrogen on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced rat prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 150: 33-40, 2000.

Shirai, T., Imaida, K., Ito, N. Prostate. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born carcinogenesis*, pp. 270-274. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

Imaida, K., Shirai, T., Ito, N. Degenerative Changes. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 275-284. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

Takahashi, S., Ikeda, Y., Kimoto, N., Okochi, E., Cui, L., Nagao, M., Ushijima, T., Shirai, T.: Mutation induction by mechanical

irritation caused by uracil-induced urolithiasis in Big Blue[®] rats. *Mutation Res.*, 447: 275-280, 2000.

Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., Imaida, K. : Experimental prostate carcinogenesis—rodent models. *Mutation Res.*, 462: 219-226, 2000.

Imaida, K., Hagiwara, A., Yoshino, H., Tamano, S., Sano, M., Futakuchi, M., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Inhibitory effects of low doses of melatonin on induction of preneoplastic liver lesions in a medium-term liver bioassay in F344 rats: relation to the influence of electromagnetic near field exposure. *Cancer Lett.*, 155: 105-114, 2000.

Archer, C. L., Morse, P., Jones, R. F., Shirai, T., Haas, G. P., Wang, C. Y.: Carcinogenicity of the *N*-hydroxy derivative of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline and 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl in the rat. *Cancer Lett.*, 155: 55-60, 2000.

Hirose, M., Yamaguchi, T., Cui, L., Kimoto, N., Futakuchi, M., Kono, T., Nishibe, S., Shirai, T.: Effects of arctiin on PhIP-induced mammary, colon and pancreatic carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats and MeIQx-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 155: 79-88, 2000.

Kato, K., Takahashi, S., Cui, L., Toda, T., Suzuki, S., Futakuchi, M., Sugiura, S., Shirai, T. : Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 786-791, 2000.

Takahashi, S., Ikeda, Y., Orita, S.-i., Sakakibara, M., Kimoto, N., Suzuki, S., Imaida, K., Shirai, T. : Enhancing effects of 2-amino-4,5-diphenylthiazole-induced polycystic kidneys on renal carcinogenesis in rats treated with dimethylnitrosamine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 167: 12-17, 2000.

Akaza, H., Tsukamoto, S., Morita, T., Yamauchi, A., Onozawa, M., Shimazui, T., Ideyama, Y., Shirai, T.: Promoting effects of antiandrogenic agents on rat ventral prostate carcinogenesis induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 3: 115-119, 2000.

Tiwawech, D., Hirose, M., Futakuchi, M., Cui, L., Thamavit, W., Ito, N., Shirai, T.: Enhancing effects of Thai edible plants on 2-amino-3,8-dimethylimidazo(4,5-*f*)quinoxaline-hepatocarcinogenesis in a rat medium-term bioassay. *Cancer Lett.*, 158: 195-201, 2000.

Imaida, K., Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H., Shirai, T.: Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate

carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 22, 467-472, 2001.

Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.-M., Imaida, K., Shirai, T.: Frequent c-Ha-ras gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine. *Cancer Lett.*, 163:187-190, 2001.

2. 学会発表

朝元誠人、外岩戸尚美、高橋 智、曹 泳晩、池田佳久、今井田克己、白井智之、前立腺癌トランスジェニックラットモデルーテストステロン投与および去勢の影響、第 16 回毒性病理学会、岐阜、(2000 年 1 月)

朝元誠人、外岩戸尚美、曹 泳晩、高橋 智、二口充、今井田克己、白井智之、前立腺癌トランスジェニックラットモデルーテストステロン投与および去勢の影響、第 59 回日本癌学会、横浜、(2000 年 10 月)

曹 泳晩、高橋 智、朝元誠人、今井田克己、鈴木周五、白井智之。Probasin 遺伝子プロモーター/SV40T 抗原発現遺伝子導入ラットにおける前立腺癌の経時的検討、第 59 回日本癌学会、横浜、(2000 年 10 月)

朝元誠人、外岩戸尚美、葛谷和也、小川久美子、高橋 智、白井智之、大豆由来イソフラボンによるラット諸臓器における遺伝子発現の変化—cDNA アレイを用

いた解析、第 7 回日本がん予防研究会、(2000 年 7 月)

G. 知的所有権の取得状況
なし

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

口腔及び食道発がん抑制物質の検索

分担研究者 田中 卓二 金沢医科大学教授

研究要旨 天然性ないし合成性の口腔発がん阻止物質を見出す目的で動物実験を行った。被験化合物は capsaicin、rotenon、nimesulide で、イニシエーション相ないしプロモーション相に混餌投与して 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発ラット舌発がんモデルで検討した。その結果、0.05% rotenone のイニシエーション相投与で、また 0.04% nimesulide のプロモーション相投与で、舌がん発生が有意 ($P < 0.05$) に抑制された。

A. 研究目的

本分担研究は、天然性ないし合成性の化合物を用いて口腔、食道の前がん性病変発生や発がん阻止のための基礎的実験を行い、臨床試験に応用できる具体的な資料を得ることを目的とした。若年者に増加中の口腔がんや早期に浸潤・転移を来す食道がんの高危険群へ応用し、がん発生を阻止しようとするための化合物を検索するこのような試みは社会的必要性の高い研究であると言えよう。

B. 研究方法

本年度の研究対象とした化合物は、唐辛子に辛味主成分として約 0.1-1% 含有され、抗菌・抗炎症作用のある capsaicin、マメ科植物中に 0.01-3% 含有され、含有電子伝達系阻害作用のある rotenon、COX-2 の選択的阻害剤として知られる nimesulide の舌発がん修飾作用について 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) 誘発ラット舌発がんモデルを使用し、2つの実験で検討した。

実験 1：雄性 F344 ラット 105 匹を使用し、舌扁平上皮がんは 4-NQO (20 ppm) の 8 週間飲水投与で誘発した。Capsaicin、rotenon はいずれも 0.05% の濃度でイニシエーション相に 10 週間ないしプロモーション相に 28 週間混餌投与し、実験は 38 週で終了し、病理組織学的解析を行った。

実験 2：雄性 F344 ラット 57 匹を使用した。舌がんは 4-NQO (20 ppm) の 8 週間飲水投与で誘発した。Nimesulide は 0.01% ないし 0.04% の濃度でプロモーション相に 22 週間混餌投与し、実験は 32 週で終了し、病理学的解析を行った。また、舌組織及び舌の誘発病変における COX-2、iNOS、

PPAR γ の発現を免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験は必要最小限の匹数を用いるよう十分な準備を行った。実験にあたっては金沢医科大学の実験動物取り扱い（倫理）規定を遵守し、温度、湿度がコントロールされた施設内で飲料水・試料を適正に投与し飼育、実験した。実験終了時の屠殺に際しては苦痛を与えないよう十分量のエーテル麻酔下で瀉血死させた。

C. 研究結果

実験 1：実験終了時における舌がんの発生頻度は 4-NQO 投与群：53% (8/15)、4-NQO+0.05% capsaicin 群：24% (4/17)、4-NQO+0.05% rotenone 群：16% (3/19)、4-NQO → 0.05% capsaicin 群：21% (3/14)、4-NQO → 0.05% rotenone 群：19% (3/16) で、0.05% rotenone のイニシエーション相投与で舌扁平上皮がんの発生を有意 ($P < 0.05$) に抑制した。0.05% capsaicin 群 (0/8)、0.05% rotenone 群 (0/8)、無処置対照群 (0/8) に舌腫瘍は発生しなかった。また、capsaicin、rotenone 投与による毒性所見は実験期間中認めず、毒性を示唆する病理組織学的所見もみなかった。

実験 2：実験終了時の舌がんの発生頻度は 4-NQO 投与群：53% (9/17)、4-NQO → 0.01% nimesulide 群：42% (5/12)、4-NQO → 0.04% nimesulide 群：8% (1/12) で、0.04% nimesulide 投与で舌扁平上皮がん発生を有意 ($P < 0.02$) に抑制した。0.04% nimesulide 群 (0/8)、無処置対照群 (0/8) に舌腫瘍の発生はなかった。また、免疫組織化学的染色で検討した COX-2 と iNOS の発現は、

前がん性病変（異形成）や癌胞巣に比べて扁平上皮がんの浸潤部で著しく、一方PPAR γ の発現は非病変部の表層に弱い発現を、前がん性病変（異形成）、乳頭腫、扁平上皮がんで強い発現を認めた。また、実験期間中 nimesulide 混餌投与による毒性所見はみられず、病理組織学的毒性所見も認めなかった。

D. 考察

以上の結果より、天然性化合物 rotenone、COX-2 阻害剤 nimesulide には舌発がんを抑制する効果があることが判明した。その抑制機構は、細胞増殖活性修飾の観点から現在解析中である。また、4-NQO 誘発ラット舌発がんには炎症も関与すると考えられた。capsaicin はマウス皮膚発がんを抑制し (Cancer Lett. 114: 183, 1997)、最近 COX-2 阻害作用 (Life Sci. 67: 3087, 2000) や phorbol ester による NF- κ B 誘導活性を抑制する効果 (Cancer Lett. 164: 119, 2001) が報告されたが、口腔発がんには影響しないことが明らかとなり、COX-2 阻害作用は nimesulide に比べて弱いものと予想された。最近終了した nimesulide (0.01% ないし 0.04%) を 4-NQO 誘発ラット舌発がんモデルでイニシエーション相投与した実験結果では肉眼所見のみであるが、舌腫瘍の発生頻度に変化をみなかった。従って、rotenone はイニシエーション相投与で、nimesulide はプロモーション相投与で舌発がん抑制効果を発揮するものと考えられた。Rotenone の発がん修飾（抑制）効果は初めて明かとなったが、最近、rotenone 曝露のパーキンソン病発症への関与が指摘されており (Nat. Neurosci. 3: 1301, 2000)、介入試験を目指す候補物質は nimesulide であると考えられた。

E. 結論

本分担研究の結果より、rotenone、nimesulide には舌発がんを抑制する効果があることが判明した。

F. 健康危険情報

本実験を遂行するに当たり、実験者の健康に特に問題はなかった。最近、rotenone の曝露とパーキンソン病発症の関連性が指摘された (Nat. Neurosci. 3: 1301, 2000)。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tanaka, T., Kawabata, K., Kohno, H., Honjo, S., Murakami, M., Ota, T. and Tsuda, H.

Chemopreventive effect of bovine lactoferrin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. Jpn. J. Cancer Res., 91: 25-33 (2000).

2) Kawabata, K., Tanaka, T., Yamamoto, T., Ushida, J., Hara, A., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Stoner, G.D. and Mori, H. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis by dietary feeding of 11-acetoxychavicol acetate. Jpn. J. Cancer Res., 91: 148-155 (2000).

3) Tanaka, T., Kohno, H., Shimada, R., Kagami, S., Yamaguchi, F., Kataoka, S., Ariga, T., Murakami, A., Koshimizu, K. and Ohigashi, H. Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. Carcinogenesis, 21: 1183-1189 (2000).

4) Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Shimada, R., Kagami, S., Sumida, T., Azuma, Y. and Ogawa, H. Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by Mandarin juices rich in β -cryptoxanthin and hesperidin. Int J Cancer, 88: 146-150 (2000).

5) Kohno, H., Yamaguchi, N., Ohdoi, C., Nakajima, S., Odashima, S. and Tanaka, T. Modifying effect of tuna orbital oil rich in decosahexaenoic acid and vitamin D₃ on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. Oncol. Reports, 7: 1069-1074 (2000).

6) Tanaka, T., Kohno, H., Murakami, M., Kagami, S. and El-Bayoumy, K. Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium

1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and the citrus antioxidant auroaptene on lung metastasis of melanoma cells in mice. Cancer Res., 60: 3713-3716 (2000).

7) Murakami, A., Nakamura, Y., Tanaka, T., Tokuda, H., Nishino, H., Kuwahara, S., Takahashi, Y., Ogawa, K., Yano, M., Koshiba, T., Koshimizu, K., Torikai, K. and Ohigashi, H. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative

stress, and tumor-promotion in mice. *Cancer Res.*, 60: 5059-5066 (2000).

8) Kawabata, K., Tanaka, T., Yamamoto, T., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Stoner, G.D. and Mori, H. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis by dietary feeding of auraptene. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 19: 45-52 (2000).

9) Tanaka, T., Maeda, M., Kohno, H., Murakami, M., Kagami, S., Miyake, M. and Wada, K. Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by citrus limonoids, obacunone and limonin. *Carcinogenesis*, 22: 193-198 (2000).

2. 学会発表

1) 田中卓二, 甲野裕之, 川端邦裕, 和田啓爾, リモノイド (obacunone, limonin) による azoxymethane 誘発ラット大腸変異腺窩巢の抑制, 第16回日本毒性病理学会, 岐阜, (2000年1月)

2) 川端邦裕, 田中卓二, 片山雅貴, 山田泰広, 松永研吾, 原明, 吉見直己, 杉江茂幸, 村上明, 小清水弘一, 大東肇, 森秀樹, N-Nitrosomethylbenzylamine (NMBA) 誘発食道腫瘍の auraptene 混餌投与による抑制. 第16回日本毒性病理学会, 岐阜, (2000年1月)

3) 甲野裕之, 川端邦裕, 隅田孝司, 東誠広, 小川浩史, 田中卓二, β -クリプトキサンチン, ヘスペリジン高含有粉末のラット大腸 ACF 抑制作用, 第16回日本毒性病理学会, 岐阜, (2000年1月)

4) 杉江茂幸, 田中卓二, Karam El-Bayourry, 新規セレン化合物による癌化学予防の試み, 第120回日本薬学会シンポジウムII「必須微量元素セレン研究の最近の進歩と発展」, 岐阜, (2000年3月)

5) Tanaka, T., Maeda, M., Kohno, H., Honjo, S., Sumida, T., Hamada, S. and Ogawa, H., Inhibition of colonic aberrant crypt foci (ACF) by the β -cryptoxanthin- and hesperidin-rich powder prepared from Citrus unshiu Marc. juice in male F344 rats. 91st Annual Meeting of American Association for Cancer Research, San Francisco, (April 2000)

6) Tanaka, T., Kohno, H., Maeda, M., Honjo, S.,

Sumida, T., Azuma, Y. and Ogawa, H., Chemoprevention of colon carcinogenesis by β -cryptoxanthin-rich citrus juice on in rats. 91st Annual Meeting of American Association for Cancer Research, San Francisco, (April 2000)

7) 田中卓二, 天然物による消化管発がん予防, 日本癌学会シンポジウム「21世紀にむけた動物発がん研究」, 名古屋, (2000年5月)

8) 田中卓二, 柑橘を利用した実験的大腸発がん抑制の試み, 第15回発癌病理研究会, 穂高, (2000年8月)

9) 牛田淳, 杉江茂幸, 川端邦裕, 田中卓二, 藤井恵子, 伊藤八次, 森秀樹, 4NQO 誘発ラット舌発癌モデルにおける inducible NO synthase (iNOS) 発現マクロファージの部位的検討, 第59回日本癌学会総会, 横浜, (2000年10月)

10) 清水雅仁, 甲野裕之, 村上明, 小清水弘一, 大東肇, 森秀樹, 田中卓二, Zerumbone の azoxymethane (AOM) 誘発大腸 ACF の抑制, 第59回日本癌学会総会, 横浜, (2000年10月)

11) 村上学, 甲野裕之, 村上明, 山口典男, 小清水弘一, 大東肇, 田中卓二, ガルシノールによる azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸 ACF の抑制, 第59回日本癌学会総会, 横浜, (2000年10月)

12) 甲野裕之, 田中卓二, 村上明, 小清水弘一, 大東肇, 矢野昌充, 徳田春邦, 西野輔翼, Nobiletin の azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸 ACF の抑制, 第59回日本癌学会総会, 横浜, (2000年10月)

13) 谷野幹夫, 甲野裕之, 植田尚美, 和田啓爾, 田中卓二, Columbin の azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸発がん抑制効果, 第59回日本癌学会総会, 横浜, (2000年10月)

14) 田中卓二, 甲野裕之, 谷野幹夫, 隅田孝司, 小川浩史, β -クリプトキサンチン (Crip), ヘスペリジン (Hpd) 高含有蜜柑ジュースによる AOM 誘発ラット大腸発がんの抑制効果, 第59回日本癌学会総会, 横浜, (2000年10月)

15) Kohno, H., Sumida, T., Hamada, S., Azuma, Y., Ogawa, H. and Tanaka, T., Inhibition of rat colonic aberrant crypt foci by β -cryptoxanthin/hesperidin-rich powder prepared from Satsuma Mandarin juice. XXIII international Congress of the International Academy of Pathology and 14th World Congress of Academic and Environmental Pathology,

Nagoya, (October 2000)

16) Tanaka, T., Kohno, H., Yamaguchi, F., Kataoka, S., Ariga, T., Murakami, A., Koshimizu, K. and Ohigashi, H., Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. XXIII International Congress of the International Academy of Pathology and 14th World Congress of Academic and Environmental Pathology, Nagoya, (October 2000)

17) Murakami, M., Kohno, H., Ueda, N., Wada, K. and Tanaka, T., Inhibition of rat colon carcinogenesis by dietary feeding of a terpenoid furanolactone, columbin. XXIII international Congress of the International Academy of Pathology and 14th World Congress of Academic and Environmental Pathology, Nagoya, (October 2000)

18) Tanaka, T., Kohno, H., Taima, M. and El-Bayoumy, K., Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and the citrus antioxidant auroaptene on experimental lung metastasis melanoma cells in mice. 5th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Maui, (February 2001)

19) Kohno, H., Shimada, R., Taima, M., Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H. and Tanaka, T., Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by mandarin juices rich in β -cryptoxanthin and hesperidin. 5th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association, Maui, (February 2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

発がんの高危険度群を対照としたがん予防に関する基礎研究

分担研究者 堤 雅弘 奈良県立医科大学腫瘍病理

研究要旨

ラット肺癌発生系とハムスター膵管癌発生系を用い、慢性炎症の制御と発癌抑制の可能性について検索した。肺発癌は抗生物質と抗炎症剤の投与により抑制されることをみいだし、 α -streptococcusなどの細菌の発癌促進作用について検索をすすめている。膵発癌について、plasminogen activatorの阻害剤であるtranexamic acidに発癌抑制効果のあることをみいだした。

A.研究目的

種々の臓器において慢性に持続する炎症が発癌を促進することが報告されているが、細菌の暴露を受けやすい呼吸器系の癌と炎症の関連についての知見は乏しい。また、膵癌の発生に対する膵炎の関与についても一定の見解はない。本研究の目的は、ラット肺癌発生系とハムスター膵管癌発生系を用い、細菌感染による肺発癌促進作用について、および膵炎の制御による膵発癌抑制の可能性を検索することにある。

B.研究方法

1)ラット肺癌発生系における、 α -streptococcusの肺発癌促進作用の検索。雄性Wistar系ラットにN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)を投与した後、肺癌患者より分離した α -streptococcusを経気管的に肺内へ2週間に1回の割合で計4回投与した。

2)ハムスター膵管癌発生系におけるphenyl-N-tert-butyl nitronとtranexamic acidの膵発癌抑制作用の検索、雌性シリアンハムスターにN-nitrosobis(2-oxypropyl)amine (BOP)を投与し、短期膵発癌発生系に従い促進圧力操作を2回行った後、誘導型NO合成酵素阻害剤であるphenyl-N-tert-butyl nitron(PBN)およびplasminogen activator(PA)阻害剤であるtranexamic acid (TA)を投与した。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて奈良医大動物実験施設において行い、同施設の規定に従い倫理面に配慮して実験を行った。

C.研究結果

1)肺癌発生系における、 α -streptococcusの肺発癌促進作用の検索

今回の実験条件下で、 α -streptococcus単独では肺に腫瘍性病変を誘発することはなく、強い炎症を惹起することもなかった。また、 α -streptococcusの投与はBHPによる肺腺癌および扁平上皮癌発生に有意な促進作用を示さなかった。

2)ハムスター膵管癌発生系におけるPBNとTAの膵発癌抑制作用の検索

1% TA投与群において、膵癌の発生頻度、動物1匹あたりの発生個数の有意な減少がみられた。また、TA投与群では膵の炎症反応の減弱もみられたが、PBN投与群においては、膵発癌の抑制、炎症の減弱はみられなかった。TAの膵発癌抑制作用を確認するため同様の実験を再度行った結果、0.05%および0.1% TA投与群において動物1匹あたりの膵癌発生個数の有意な減少がみられた。

D.考察

今回の実験条件下で、

α -streptococcusに有意な肺発癌促進はみられなかったが、肺の炎症反応もほとんど誘発されておらず、細菌の投与頻度が少なく、菌が生着しなかった可能性が考えられる。今後、菌の投与頻度を増やし、さらにヒト食道癌との関連が示唆されているstreptococcus milleri groupの菌を用いて実験を行い細菌感染による肺発癌の促進について検索する必要がある。膵管病変周囲の炎症反応はTA投与により減弱したが、PBNにはそのような作用がないことより、膵の炎症にNOラジカルをかいする炎症反応系の関与は少ないことが示唆され、膵発癌においてもNOラジカルの関与は少ないことが示唆される。一方、TAが膵の炎症反応と発癌を抑制したことより、膵炎および膵発癌にPAが関与することが示唆された。

E.結論

BHPによるラット肺癌発生系において、今回の実験条件下は α -streptococcusに有意な肺発癌促進はみられなかった。BOPによるハムスター膵管癌発生系において、tranexamic acidに発癌抑制作用のあること、PBNには発癌抑制作用のないことが示された。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1.論文発表

1) Tsutsumi M., Kitada H., Shiraiwa K., Takahama M., Tsujiuchi T., Sakitani H., Sasaki Y., Murakawa K., Yoshimoto Y., Konishi Y. Inhibitory effects of combined administration of antibiotics and anti-inflammatory drugs on lung tumor development initiated by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Carcinogenesis* 21, 251-256, 2000

2) Tsutsumi M., Kadomatsu K., Tsujiuchi T., Sakitani H., Ikematsu S., Kubozoe T., Yoshimoto Y., Muramatsu T., Sakuma S., Konishi Y. Overexpression of midkine in pancreatic duct adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in hamsters and their cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 976-986, 2000

2.学会発表

- 1)堤 雅弘、辻内俊文、久保添忠彦、小西陽一、ハムスターにおける中枢性と末梢性膵管内腫瘍の浸潤機構の差異、第89回に本病理学会総会、大阪、(2000年4月)
- 2)佐々木康孝、堤 雅弘、辻内俊文、村川幸一、村田奈保、小西陽一、BHP誘発ラット肺発癌系におけるEGDRakおよびPBNと抗生物質の複合問うよによる発癌抑制作用、第89回に本病理学会総会、大阪、(2000年4月)
- 3)佐々木康孝、堤 雅弘、辻内俊文、伝田阿由美、小西陽一、抗生物質とPBNの複合投与によるラット肺発癌の抑制、第59回日本癌学会総会、横浜、(2000年、10月)
- 4)堀口浩資、堤 雅弘、楠岡 修、村田奈保、辻内俊文、小西陽一、ハムスター短期肺癌発生系におけるtranexamic acidの発癌抑制作用、第59回日本癌学会総会、横浜、(2000年、10月)

H.知的財産権の出願状況

特許出願

トラネキサム酸、そのエステルまたはそれらの塩を有効成分とする抗悪性腫瘍剤

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

ラクトフェリン含有食品のC型慢性肝炎に対する臨床試験

分担研究者 岡田 周市 国立がんセンター中央病院 医長

研究要旨：ラクトフェリン(LF)がC型慢性肝炎患者のC型肝炎ウイルス(HCV)のRNA量を減少させるかを調べるため、ランダム化二重マスク化プラセボコントロール試験を計画した。C型慢性肝炎患者をLF群(1.8g/日)とplacebo群に無作為化割り付けする。主要評価項目はLF摂取12週後の時点でのウイルス学的効果(HCV RNA量の50%以上の減少)である。7施設からなる多施設共同研究であり、2年間に250例の患者登録を予定している。

A. 研究目的

分子量約80,000の糖蛋白質であるラクトフェリン(LF)は、C型肝炎ウイルス(HCV)のエンベロープと結合し、HCVを中和することで、培養細胞へのHCVの感染を防御する。本研究の目的はLFがC型慢性肝炎患者のHCV RNA量を減少させるかを調べることである。

B. 研究方法

C型慢性肝炎患者をLF群(1.8g/日)とplacebo群に無作為化割り付けする。LF群ではLF摂取12週後の時点で、HCV RNA量またはGPT値の50%以上の減少が認められた場合、LFをさらに1年間摂取する。主要評価項目はLF摂取12週後の時点でのウイルス学的効果(HCV RNA量の50%以上の減少)である。本試験は7施設からなる多施設共同研究であり、2年間に250例の患者登録を予定している。

患者に本試験の理解を求め同意を得る際には、担当医師は患者本人に、試験で

はLFあるいはplaceboのいずれかに無作為に割り付けられること、試験への参加は自由で、参加しなくても不利益を受けないことなどを詳しく説明する。患者本人が試験への参加に同意した場合は、説明同意書に自著による署名を得る。

C. 研究結果

本年度はプロトコルを作成し、来年度(平成13年度)から患者登録を開始する。

D. 考察

HCVの持続感染は慢性肝炎など慢性肝疾患の主たる原因であり、我が国では慢性肝疾患の70%以上が抗HCV抗体陽性である。また慢性肝疾患は経過観察中に高率に肝細胞がんを合併するため、HCVに対する有効な抗ウイルス剤の開発は慢性肝疾患の原因療法として、さらには肝細胞がんの予防法として切望されている。

これまでに行ったC型慢性肝炎患者を対象とした用量反応試験では、GPT値とLF摂

取量との間に用量反応関係は認めなかったが、LF(1.8-7.2g/日)の摂取により、HCV RNA量は45例中9例(20%)、GPT値は6例(13%)で50%以上の減少がみられた。以上の成績に基づき、LFがC型慢性肝炎患者のHCV RNA量を減少させるかを調べるため、ランダム化二重マスク化プラセボコントロール試験を計画した。

E. 結論

LFがC型慢性肝炎患者のHCV RNA量を減少させるかを調べるため、今回のランダム化二重マスク化プラセボコントロール試験を計画し、来年度(平成13年度)から患者登録を予定している。

F. 健康危険情報

C型慢性肝炎患者を対象とした用量反応試験(45例)では、LFの摂取によると考えられる有害事象はほとんどみられなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Okada, S. How to manage hepatic vein tumor thrombus in hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15:346-348(2000)

2) Okada, S. How can we avert hepatic vascular complications in SMANCS therapy for hepatocellular carcinoma? *J. Gastroenterol.*, 35:407-409(2000)

3) Okada, S., and Abo T. Spontaneous regression of hepatocellular car-

cinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15:965-966(2000)

4) Okada, S., Ueno, H., Okusaka, T., Ikeda, M., Furuse, J., and Maru, Y. Phase I trial of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 31:7-12(2001)

5) Okada, S., Sato, T., and Yamamoto, S. Adjuvant interferon for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 33:481-482(2001)

6) Okusaka, T., Okada, S., Ueno, H., Ikeda, M., Yoshimori, M., Shimada, K., Yamamoto, J., Kosuge, T., Yamasaki, S., Iwata, R., Furukawa, H., Moriyama, N., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. Evaluation of therapeutic effect of transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 57: 293-299(2000)

7) Ueno, H., Okada, S., Okusaka, T., and Ikeda, M. Prognostic factors in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma receiving systemic chemotherapy. *Oncology*, 58:296-301(2000)

8) Matsumura, Y., and Okada, S. Transcatheter therapy for liver metastasis from gastric cancer. *J. Gastroenterol.*, 35:949-950(2000)

9) Tokuuye, K., Sumi, M., Kagami, Y., Murayama, S., Kawashima, M., Ikeda, H., Ueno, H., Okusaka, T., and Okada, S. Radiotherapy for hepatocellular