

#### 4-1) LF 投与による血清中 IL-18 濃度

LF100 mg/kg の5日間の腹腔内投与では、血清 IL-18 濃度に変化はなかった。

#### 4-2) LF によるマクロファージからの IL-18 産生

マクロファージ培養液に LF を添加することにより、経時的に IL-18 が産生された(図 5)。

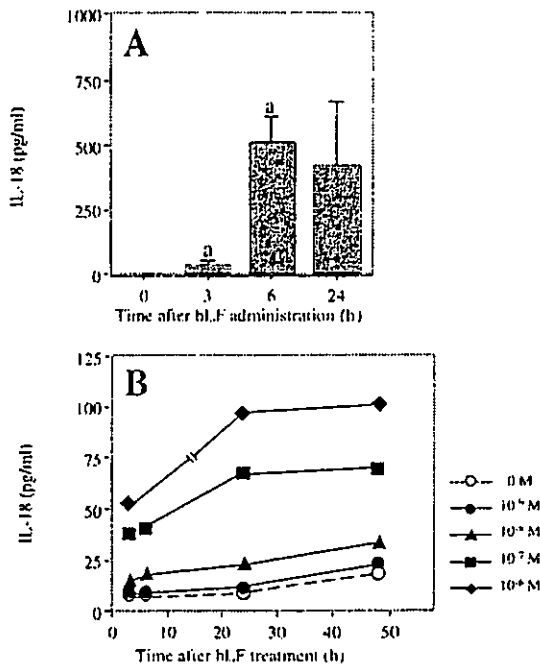


図5 A: bLFの Maus への投与後の血清中 IL-18 濃度  
B: bLF 添加後のマクロファージ内 IL-18 濃度

#### D. 考察

本研究では、LF が CAM 法、マウスでの DAS 法や血管内皮細胞の機能に及ぼす阻害作用について検討した結果、強い血管新生阻害作用を有することを証明した。また LF が IL-18 の産生を増加することによって作用をもたらす可能性も示した。

CAM 法に用いられる 4-6 日の受精卵では免疫応答が不全である。従って CAM 法で観察された血管新生の阻害は血管内皮細胞に対する直接作用であろうと考えられた。さらに *in vitro* で血管内皮細胞の増殖や管腔形成の阻害が認められたことから、LF が直接に内皮細胞に作用することが裏付けられた。一方、LF の阻害作用は CAM 法で血管新生因子 bFGF を添加すると減弱することから、

bFGF を介する血管新生の過程を阻害することが示唆された。

LF は bFGF や VEGF で誘導した内皮細胞の増殖を阻害した。しかし、bFGF 誘導の繊維芽(A31)細胞や血清誘導の腫瘍(3LL)細胞の増殖は阻害しなかった。以前、LF はヒト臍帯静脈由来の内皮細胞の増殖を阻害することが報告され、その機序として①血管新生因子との結合、②血管新生因子が内皮細胞の表面に存在する特異的レセプターと結合する前にトラップされるヘパリン様分子との結合、③内皮細胞の表面に存在し LF と特異的に結合する RAGE や IRP のようなレセプターとの結合、を推測した。もし LF が bFGF やヘパリン様分子と結合するのみなら bFGF 誘導の繊維芽細胞の増殖は阻害されるであろうが実際は阻害されなかった。いくつかの報告で、ヘパリン様分子であるヘパリン硫酸プロテオグリカン(HSPG)がラクトフェリンや LDL リセプター関連蛋白の結合に重要であることが述べられている。さらに本研究では血清誘導の内皮細胞のそれも阻害しなかった。これらより、血管内皮細胞の増殖に対する LF の阻害効果は HSPG への結合と IRP や RAGE のような特異的レセプターへの結合の両者を阻害することが推察された。

一方、LF の経口投与によって血中の IL-18 の濃度が上昇することが明らかになった。しかし腹腔内の投与では影響されなかった。マウス腹腔内から得たマクロファージによっても IL-18 の産生は濃度依存的経時的に増加した。最近、LF の経口投与によって IFN- $\gamma$  や IL-18、caspase-1 の産生が小腸上皮で生ずることが報告され、LF のがん転移の抑制は IL-18 の産生に起因していることが示唆されている。我々が得た結果は血中の IL-18 は主として小腸上皮由来と推察された。しかし、マクロファージで産生される IL-18 も血管新生阻害活性に重要な役割を担っていると考えられる。というのは IL-18 は腫瘍近傍に存在するマクロファージによって産生され、血管内皮細胞の機能に直接に阻害作用をしていると考えられるからである。

IL-18 は IFN- $\gamma$ -inducing factor である IL-1 family の新しいメンバーである。最近、持続的に分泌された IL-18 が腫瘍の退縮を促し、免疫組織化学的解析から血管数を顕著に減少させることが

報告された。さらに IL-18 による抗腫瘍効果は免疫不全マウスやヌードマウスで報告されている。このことは免疫システムの調節によってではなく、直接的な作用で血管新生を阻害することを示唆している。さらに、経口 DNA ワクチンとして小腸上皮細胞に IL-18 を産生させるシステムでは、腫瘍の増大、転移を抑制し、さらにマウスでの Matrigel Plug assay で血管新生を阻止することが報告されている。IL-18 は CAM 法で免疫応答に関係なく直接内皮細胞に作用することが示唆されている。従って、腫瘍細胞由来あるいは分泌された IL-18 は血管新生を阻害するであろうとがんがえられる。以上より、LF によってマクロファージや他の細胞から産生された IL-18 は免疫応答や内皮細胞への直接作用によって血管新生の阻害に貢献していると推察される。

DAS assay では経口、腹腔内いずれの投与でも腫瘍細胞が誘導した血管新生を比較的低用量で抑制した。この結果は以前に VEGF で小腸に誘導した血管新生に対する阻害効果と一致した。比較的低用量で阻害効果をもたらすことは LF の抗腫瘍効果が血管新生の阻害に起因すると同時に、LF が有用な治療薬と成る可能性を示唆している。

本研究の結果から、LF は血管内皮細胞の管腔形成や増殖の抑制、IL-18 の産生増加を介して腫瘍血管新生を阻害することが明らかになった。従って、LF は腫瘍の増殖、転移、リウマチ、白癩や糖尿病性網膜症等の血管新生を伴う難治性疾患に対する有効な治療薬として期待出来る。

#### E. 結論

ラクトフェリンは *in vivo* および *in vitro* の血管新生実験系において、強い阻害活性を示した。ラクトフェリンは血管内皮細胞の機能（増殖、管腔形成）を抑制すると共に小腸上皮細胞やマクロファージ等の細胞で IL-18 を産生し、腫瘍血管新生を阻害することが示唆された。これらの結果から、LF が示す抗腫瘍作用は血管新生の阻害が関与していることが明らかになった。ラクトフェリンは、がん予防あるいはがん治療に、経口投与可能な物質となりうると考えられた。

#### 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

LF の摂取による毒性変化は観察されていない。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., Kohno, H., Nomura, E., Taniguchi, H., Tsuno, T. and Tsuda, H. A novel geranylated derivative, ethyl 3-(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propenoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and inducible nitric oxide synthase in rat tongue. *Oncology*, 64: 166-175 (2003),
- 2) Moore, M. A., Tajima, K. and Tsuda, H. Epidemiology of the major cancers in the Asian Pacific. *Proc. Jpn. Acad.*, 79: 27-33 (2003),
- 3) Fukushima, S., Moore, M.A. and Tsuda, H. Appropriate models and an understanding of carcinogenic mechanisms-requirements for hazard risk assessment. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4:75-78 (2003),
- 4) Moore, M.A., Kunimoto, T., and Tsuda, H. Cancer screening literature in the period 2000-2002: Pointers to future research avenues. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4:57-60 (2003),
- 5) Tsuda, H., Naito, A., Kim, C.K., Fukamachi, K., Nomoto, H. and Moore, M.A. Carcinogenesis and its modification by environmental endocrine disruptors: *In vivo* experimental and epidemiological findings. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 33:259-270 (2003),
- 6) Matsuoka, Y., Fukamachi, K., Hamaguchi, T., Toriyama-Baba, H., Kawaguchi, H., Kusunoki, M., Yoshida H., and Tsuda, H. Rapid emergence of mammary preneoplastic and malignant lesions in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats: possible application for screening of chemopreventive agents. *Toxicol. Pathol.*, 31:632-637 (2003),
- 7) Goldberg, G.S., Alexander, D.B., Pellicena, P., Zhang, Z-Y., Tsuda, H. and Miller, W.T. Src phosphorylates cas on tyrosine 253 to promote

- migration of transformed cells. *J. Biol. Chem.*, 278:46533-46540 (2003),
- 8) Iigo, M., Shimamura, M., Matsuda, E., Fujita, K., Nomoto, H., Satoh, J., Kojima, S., Alexander, D.B., Moore, M.A. and Tsuda, H. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. *Cytokine*, 25:36-44 (2004),
  - 9) Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ueda, S., Shimizu, K., Ohki, M., Kusunoki, M., Sakakura, T., Yoshida, H. and Tsuda, H. Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res. Treat.*, 83:43-56 (2004),
  - 10) Park, C.B., Fukamachi, K., Takasuka, N., Han, B.S., Kim, C.K., Hamaguchi, T., Fujita, K., Ueda, S. and Tsuda, H. Rapid induction of skin and mammary tumors in human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats by treatment with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene followed by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Sci.*, in press.
  - 11) Shimamura, M., Yamamoto, Y., Ashino, H., Oikawa, T., Hazato, T., Tsuda, H. and Iigo, M. Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, in press.
  - 12) Alexander, D.B., Ichikawa, H., Bechberger, J.F., Valiunas, V., Ohki, M., Naus, C.C.G., Kunimoto, T., Tsuda, H., Miller, W.T. and Goldberg, G.S. Normal cells control the growth of neighboring transformed cells independent of gap junctional communication and src activity. *Cancer Res.*, in press.
2. 学会発表
- 1) 津田洋幸、がん遺伝子トランスジェニックラットを用いた発がん研究、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
  - 2) 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の乳腺発がんにおける nonylphenol, atrazine の修飾効果、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
  - 3) 松岡洋一郎、川口博明、濱口哲也、高須賀信夫、吉田縁、深町勝巳、吉田浩己、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット乳腺の生物学的特性と発がん高感受性の関連、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
  - 4) 内藤暁宏、上田しのぶ、津田洋幸、TGF $\alpha$  トランスジェニックラットの種々の発がん段階における発がん感受性の検討、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
  - 5) 大西隆仁、内藤暁宏、上田しのぶ、泉啓介、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras transgenic rat(Tg)の乳腺発がんを指標とした環境発がん物質中期検索モデルの開発、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
  - 6) 上田しのぶ、内藤暁宏、津田洋幸、ヒト変異型 c-Ha-ras コンディショナル・トランスジェニックラットにおける発がん性の検討、第92回日本病理学会、福岡、(2003年4月)
  - 7) Tsuda, H., Iigo, M., Fujita, K., Sekine, K., Ohkubo, S., Takahashi, T., Nomoto, H., Kunimoto, K., Alexander, D.B., Okada, S. and Kozu, T. Cancer chemoprevention by lactoferrin and analysis on the mechanisms. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)
  - 8) Iigo, M., Fujita, K., Shimamura, M., Yamamoto, F., Nomoto, H., Alexander, D.B., Sekine, K., Tamura, Y. and Tsuda, H. Induction of cytokines in the intestinal mucosa by oral administration of bovine lactoferrin-A possible explanation for inhibition of carcinogenesis and metastasis. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)
  - 9) Fujita, K., Takahashi, T., Sekine, K., Tamura, Y., Iigo, M. and Tsuda, H. Lactoferrin enhances TNF-related apoptosis-inducing ligand(trail)-induced apoptosis on human colon carcinoma cell lines. Sixth International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Capri, (May 2003)
  - 10) 藤田健一、高橋徹行、関根一則、飯郷正明、津田洋幸、ラクトフェリンによる AOM 投

- 与ラット大腸における Bcl-2 関連遺伝子の発現変動、第10回日本がん予防研究会、札幌、(2003年6月)
- 11) 野本博、飯郷正明、浜田博喜、大谷修一、小島周二、津田洋幸、プロアントシアニン類緑物質の AOM 誘発ラット大腸 ACF への修飾作用、第10回日本がん予防研究会、札幌、(2003年6月)
- 12) 濱口哲也、松岡洋一郎、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析-Ras 情報伝達系活性化により乳腺上皮に何が起こるか、第22回分子病理学研究会、稲敷郡、(2003年7月)
- 13) 松岡洋一郎、濱口哲也、川口博明、吉田浩己、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析-笹最終報 Ras 情報伝達系活性化により乳腺上皮に何が起こるか、第13回乳癌基礎研究会、鳥取、(2003年8月)
- 14) 津田洋幸、天然成分の生理活性とがん予防-動物実験からヒトへ、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 15) 飯郷正明、藤田健一、野本博、大久保重敏、関根一則、國元武彦、飯沼元、神津隆弘、奥坂拓志、岡田周市、津田洋幸、ウシラクトフェリンを用いた介入研究の基礎と応用、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 16) 内藤暁宏、上田しのぶ、高須賀信夫、落谷孝広、鰐淵英機、福島昭治、津田洋幸、発がん物質短期検索法を目指した肝発がん高感受性トランスジェニックラットの作製、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 17) 藤田健一、高橋徹行、松田栄治、飯郷正明、津田洋幸、ラクトフェリンによるヒト大腸がん細胞株における TRAIL 誘発細胞死増強作用、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 18) 高須賀信夫、飯郷正明、Kim, C.K., 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-(Tg)の $\gamma$ -線照射に対する乳腺発がん感受性について、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 19) 濱口哲也、松岡洋一郎、川口博明、高須賀信夫、深町勝巳、吉田浩己、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット乳がんの発生母地について-化学発がんと自然発がんの比較-、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 20) 松田栄治、飯郷正明、高須賀信夫、藤田健一、小島周二、矢澤一良、関根一則、津田洋幸、マウス大腸発がんに対するラクトフェリンと不飽和脂肪酸併用による抑制効果の検討、第62回日本癌学会総会、名古屋、(2003年9月)
- 21) Tsuda, H. Models for Assessment of Chemopreventive Agents Chemoprevention-Past, Present and Future. 7th Thai National Cancer Conference Satellite Symposium, Bangkok, (Nov. 2003)

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

- 1) 特許名称：ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット  
 発明者：津田洋幸  
 (国立がんセンター研究所化学療法部)  
 朝元誠人  
 (国立がんセンター研究所化学療法部)  
 鳥山弘靖  
 (国立がんセンター研究所化学療法部)  
 落谷孝広  
 (国立がんセンター研究所がん転移研究室)  
 関谷剛男  
 (国立がんセンター研究所腫瘍遺伝子研究部)  
 取得日：平成15年8月22日  
 特許番号：第3463061
- 2) 特許名称：Transgenic rat with human normal type c-Ha-ras gene  
 発明者：津田洋幸  
 (国立がんセンター研究所化学療法部)  
 朝元誠人  
 (国立がんセンター研究所化学療法部)  
 鳥山弘靖  
 (国立がんセンター研究所化学療法部)  
 落谷孝広  
 (国立がんセンター研究所がん転移研究室)

関谷剛男

(国立がんセンター研究所腫瘍遺伝子研究  
部)

取得日：June 10, 2003 (米国)

特許番号：US6576811B1

カナダ・審査請求中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

前立腺癌の化学予防の実験的アプローチに関する研究

分担研究者 白井智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨 ラット前立腺発癌モデルにおいてイソフラボンを投与したところ腹葉前立腺の癌発生率及び腫瘍性病変の病巣数に占める癌の割合が有意に減少した。また cDNA アレイによる解析では癌促進作用が考えられるいくつかの遺伝子の前立腺特異的な発現低下が示された。イソフラボンは前立腺発癌において PIN から癌への進展の抑制することが考えられ、cDNA アレイ解析で示された遺伝子発現変化がこれに関わる可能性が示唆された。イソフラボンの摂取がヒト前立腺癌の治療、予防においても有用であることが期待される。

A. 研究目的

前立腺癌罹患率の人種差には大豆食品摂取の影響が指摘され、大豆に含まれるイソフラボンの癌予防及び抑制効果が近年多く報告されている。また、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)は欧米人がよく摂取する加熱調理した食肉に多く含まれ、ラットに前立腺癌、乳癌、大腸癌といった欧米型の癌を誘発する点で注目される。今回、市販の大豆イソフラボン補助食品を用い PhIP 誘発ラット前立腺発癌に対するイソフラボンの抑制効果及びイソフラボンによる前立腺組織の遺伝子発現変化を検討した。

B. 研究方法

F344 雄ラットに PhIP 200mg/kg を週 2 回、10 週間強制経口投与後 2 群に分け、一

群は大豆フリー食を与え、他群はこれに大豆胚芽由来の混合イソフラボン抽出物であるフジフラボン P40（フジッコ）を 0.25% 混餌投与し、60 週間後に屠殺剖検して前立腺の病理組織学的検討を行った。また、大豆フリー食、フジフラボン食各々を 2 週間与えたラットの前立腺組織から RNA を抽出し cDNA アレイで遺伝子発現の差異を検討し、定量的 RT-PCR で発現変化を確認した。

C. 研究結果

腹葉前立腺癌の発生率は大豆フリー群で 62.5%、フジフラボン群で 21.4%と後者で有意な低下を認めた。前癌病変とされる PIN の発生率は両群で差がなかった。フジフラボン群では大豆フリー群より PIN の病巣数が有意に多かったが PIN と癌の合計病巣数

は両群で同等であった。cDNA アレイ解析では他臓器と比べて、ornithine decarboxylase (ODC)、prothymosin alpha (PTA) の遺伝子発現低下（それぞれ 0.52 倍、0.36 倍）が特異的であった。

#### D. 考察

以上より、大豆イソフラボンは前立腺発癌においてPINから癌への進展の抑制することが考えられ、cDNAアレイ解析で示された遺伝子発現変化がこれに関わる可能性が示唆された。

#### E. 結論

イソフラボンはラット前立腺発癌に対し抑制効果を示し、ヒトにおいてもイソフラボンの摂取が前立腺癌も予防や治療に寄与する事が期待される。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋市立大学動物実験委員会の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護を十分配慮して行った。

#### F. 健康危惧情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Cho, Y.-M., Takahashi, S., Asamoto, M., Suzuki, S., Inaguma, S., Hokaiwado, N. and Shirai, T. Age-dependent histopathological findings in the prostate of probasin/SV40 T antigen transgenic rats: Lack of influence of carcinogen or testosterone treatment. *Cancer Sci.*, 94: 153-157

(2003):

Takeshita, F., Ogawa, K., Asamoto, M. and Shirai, T. Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Lett.*, 194: 25-35 (2003).

Cheng, J.-L., Futakuchi, M., Ogawa, K., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., Hirose, M. and Shirai, T. Dose response study of conjugated fatty acid derived from safflower oil on mammary and colon carcinogenesis pretreated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 196: 161-168 (2003).

Ichihara, T., Yoshino, H., Imai, N., Tsutsumi, T., Kawabe, M., Tamano, S., Inaguma, S., Suzuki, S. and Shirai, T. Lack of carcinogenic risk in the prostate with transplacental and lactational exposure to bisphenol A in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 28(3): 165-171 (2003).

Inaguma, S., Takahashi, S., Ohnishi, H., Suzuki, S., Cho, Y.-M. and Shirai, T. High susceptibility of the ACI and spontaneously hypertensive rat (SHR) strains to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) prostate carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 94: 974-979 (2003).

Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Shirai, T., Nakae, D., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A. Effects of maternal exposure

to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 16: 259-266 (2003).

Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.-M., Tsuda, H. and Shirai, T. Lack of effect of human *c-Ha-ras* proto-oncogene overexpression on prostate carcinogenesis in *probasin/SV40 T antigen* transgenic rats. *Cancer Sci.*, 94: 1042-1045 (2003).

Hikosaka, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Kato, K., Kuzutani, K., Kohri, K. and Shirai, T. Inhibitory effects of soy isoflavones on rat prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, 25: 381-387 (2004).

## 2. 学会発表

二口充、高橋青志郎、朝元誠人、白井智之、ラット前立腺癌骨浸潤モデルを用いた bisphosphonate の抑制効果、第 92 回日本病理学会総会、福岡 (2003 年 4 月)。

朝元誠人、外岩戸尚美、白井智之、がん予防物質による遺伝子発現変化、第 10 回日本がん予防研究会、北海道 (2003 年 6 月)。

白井智之、ラット前立腺癌モデルを用いてのイソフラボンによる化学予防、第 62 回日本癌学会総会、名古屋 (2003 年 9 月)。

朝元誠人、外岩戸尚美、白井智之、2次元電気泳動法によるラット前立腺癌血清マーカーの同定、第 62 回日本癌学会総会、名古

屋 (2003 年 9 月)。

栗林正伯、朝元誠人、鈴木周五、白井智之、薬物代謝酵素誘導物質による MeIQx の肝発がん修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋 (2003 年 9 月)。

杉浦諭、小川久美子、二口充、彦坂敦也、高橋青志郎、加藤浩司、白井智之、Phenylethyl isothiocyanate (PEITC) のマウス膀胱発がんに対する影響、第 62 回日本癌学会総会、名古屋 (2003 年 9 月)。

大西浩之、辻村和也、朝元誠人、白井智之、植物由来各種がん抑制候補物質の肝発がん修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋 (2003 年 9 月)。

Ohnishi, H., Tsujimura, K., Asamoto, M., Kuribayashi, M., Suzuki, S., Ogiso, T. and Shirai, T. Chemopreventive effects of plant derived compounds in a rat medium term liver bioassay and on hepatocellular carcinoma cell lines and gene expression analysis by a microarray. *JSTP/IFSTP(IATP)*, Kobe (Feb. 2004).

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



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 効果的な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 prostaglandin E<sub>2</sub> receptor EP<sub>1</sub> の選択的阻害剤 ONO-8711 で、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)誘発ラット舌発がんモデルを使用して 4-NQO 投与後に 400 ppm、800 ppm の用量にて混餌投与して発がん修飾効果を検討した。その結果、いずれの用量でも ONO-8711 の混餌投与により舌がんの発生が有意 (P<0.05) に抑制された。

A. 研究目的

我が国における舌がんを含む口腔がんの発生頻度は、欧州、東南アジア、南米など高頻度にみられる地域に比べて低いとされるが、近年、増加傾向にある。加えて、食道がんとともに"field cancerization"の概念があてはまる頭頸部腫瘍の1つであり、その多発や再発に対する対策が急務である。したがって、口腔がんや食道がんの発生や多発、再発を阻止するための有用な基礎的資料を得ることは重要な研究課題と考えられる。

大腸をはじめとする諸臓器での発がんには、アラキドン酸代謝、特にその律速段階酵素である cyclooxygenase (COX)-2 が重要な働きを担っていること、さらに COX-1 の発がんへの関与も指摘されている。口腔発がんにおいても、NSAIDs (indomethacin、piroxicam、nimesulide など)による発がん抑制効果が報告され、アラキドン酸代謝とそ

の代謝産物 prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> の関与が指摘されている。事実、PGE<sub>2</sub> 投与による大腸発がん促進が報告されている。最近、若林らは、PGE<sub>2</sub> receptor(EP<sub>1</sub>、EP<sub>2</sub>、EP<sub>3</sub>、EP<sub>4</sub>)のうち EP<sub>1</sub> の選択的阻害剤や EP<sub>1</sub>-KO マウスを使用した実験で大腸ないし乳腺における発がん抑制を報告し、EP<sub>1</sub>、EP<sub>4</sub> がこれらの臓器での発がんに関与していることを指摘した。口腔を含む頭頸部悪性腫瘍では周囲粘膜に比べ PGE<sub>2</sub> 量が多く、頭頸部の扁平上皮に EP<sub>1-4</sub> の発現が報告されている。

そこで、本分担研究では食道がんとともに"field cancerization"の概念があてはまる口腔（舌）における発がんの予防や再発阻止を目指した有用な科学的情報を得るため、EP<sub>1</sub> 選択的阻害剤 ONO-8711 の舌における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用いて検討した。なお、食道発がんに対する

indole-3-carbinol と 3,3'-methylenediindole の影響に関する実験は終了し、現在分子病理学的な解析を行なっているところである。

## B. 研究方法

EP<sub>1</sub> 選択的阻害剤 ONO-8711 の 4-NQO 誘発ラット舌発がんを知る目的で、雄性 F344 ラット 82 匹を使用した 32 週間の動物実験を行った。舌腫瘍は、Shiotani らの方法 (Cancer Res. 61: 1451-1456, 2001) で誘発した。即ち、20 ppm の 4-NQO を 2 週間、25 ppm の 4-NQO を 2 週間、次いで 30 ppm の 4-NQO を 4 週間、飲水投与して誘発した。ONO-8711 は 400 ppm、800 ppm の用量で、4-NQO 投与終了後 1 週より 23 週間、混餌投与した。別に、800 ppm ONO-8711 を実験期間中 (32 週間) 投与した群、無処置対照群を設けた。実験終了時に屠殺後、剖検し、舌を含む全臓器の病理組織学的解析、舌病変における COX-2、iNOS 発現の免疫組織化学的解析、非病変部の舌扁平上皮における細胞増殖活性 (BrdU 標識率) と apoptosis 細胞率の解析を行なった。さらに、EP<sub>1</sub> の発現を腫瘍部、その周辺粘膜などで解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は金沢医科大学動物実験実施規定のガイドラインに沿って実施した。動物飼育については、空調や清潔な住環境の維持に努め、動物への発がん物質の投与や屠殺の際には動物の苦痛軽減に十分配慮した。

## C. 研究結果

実験終了時における舌扁平上皮がんの平均発生頻度・発生個数は 4-NQO 群 : 16/25 (64%) · 0.88±0.88、4-NQO → 400 ppm ONO-8711 群 : 5/17 (29%) · 0.35±0.61、4-NQO → 800 ppm ONO-8711 群 : 5/17 (29%) · 0.29±0.47 であり、4-NQO → 400 ppm ONO-8711 群、4-NQO → 800 ppm ONO-8711 群のいずれにおいても舌扁平上皮がんの発生頻度と発生個数が有意 (P<0.05) に減少していたが、用量相関は認めなかった。舌扁平乳頭種の平均発生頻度と発生個数に関しては、4-NQO 群 : 6/25 (24%) · 0.24±0.44、4-NQO → 400 ppm ONO-8711 群 : 4/17 (24%) · 0.24±0.44、4-NQO → 800 ppm ONO-8711 群 : 3/17 (18%) · 0.18±0.39 と、これらの群間に有意な差は認めなかった。舌前がん性病変 (高度異形成) の平均発生頻度と発生個数は、4-NQO 群 : 20/25 (80%) · 0.92±0.64、4-NQO → 400 ppm ONO-8711 群 : 6/17 (35%) · 0.35±0.49、4-NQO → 800 ppm ONO-8711 群 : 4/17 (24%) · 0.24±0.44 と、4-NQO → 400 ppm ONO-8711 群、4-NQO → 800 ppm ONO-8711 群のいずれにおいても有意 (P<0.05) に減少していた。軽度異形成、中等度異形成の平均発生頻度と発生個数は、これらの群でほぼ同様の値を示していた。非病変部舌扁平上皮における BrdU 標識率は、4-NQO 群 : 10.33±2.36% (n=25)、4-NQO → 400 ppm ONO-8711 群 : 7.52±2.82% (n=17)、4-NQO → 800 ppm ONO-8711 群 : 8.81±2.99% (n=17)、ONO-8711 群 : 5.07

±1.63% (n=12)、無処置対照群:4.82±1.88% (n=11)と 4-NQO 群は無処置対照群に比べ有意 (P<0.05) に高く、4-NQO→400 ppm ONO-8711 群では 4-NQO 群に比べ有意 (P<0.05) な低下を認めた。舌病変における COX-2、iNOS 発現の免疫組織化学的発現、舌病変部における apoptosis 細胞率、EP<sub>1-4</sub> の発現は、現在解析中である。実験期間中、ONO-8711 投与による毒性を示唆するような臨床徴候はみられず、病理組織学的にも主要臓器における毒性所見は認めなかった。

#### D. 考察

以上の結果から、大腸や乳腺における発がん抑制効果と同様に EP<sub>1</sub> 選択的阻害剤 ONO-8711 を発がん物質投与後に混餌投与するとラット舌発がんを効果的に抑制することが明らかとなった。今回の実験で用いた ONO-8711 の用量は、大腸や乳腺での発がん抑制効果をみた報告を参考にした。ONO-8711 による大腸・乳腺発がん抑制では、用量相関がみられているが、今回の舌発がん抑制には用量相関を認めなかった。舌発がん抑制効果を発揮する ONO-8711 の最低用量を決定するため、今後、400 ppm 以下の用量で舌発がん抑制効果を検討する必要がある。ONO-8711 によるラット舌発がん抑制の機構に関しては、細胞増殖活性の修飾が考えられたが、COX-2、iNOS 発現、apoptosis、EP<sub>1-4</sub> 発現への影響を詳細に検討する必要があり、現在解析中の結果を待ちたい。

#### E. 結論

PGE<sub>2</sub> receptor EP<sub>1</sub> の選択的阻害剤 ONO-8711 は、ラットにおいて舌発がん物質 4-NQO 投与後に混餌投与すると、毒性作用を示さず効果的に舌発がん抑制作用を示すことが判明した。その抑制機構として、現在のところ initiate された舌扁平上皮細胞増殖活性の修飾作用が考えられるが、今後詳細な検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

本実験を遂行するにあたり、実験者の健康に特に問題はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshida, K., Tanaka, T., Kohno, H., Yanaida, Y., Yamada, Y., Hirose, Y., Sugie, S., Kawamori, T., Wakabayashi, K. and Mori, H. A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically-induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression. *Histol. Histopathol.*, 18: 39-48 (2003).
- 2) Tanaka, T., Kohno, H., Nomura, E., Taniguchi, H., Tsuno, T. and Tsuda, H. A novel geranylated derivative, ethyl 3(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propenoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and inducible nitric oxide synthase in rat tongue. *Oncology*, 64: 166-175

- (2003).
- 1) Yoshida, K., Hirose, Y., Tanaka, T., Yamada, Y., Kuno, T., Kohno, H., Katayama, M., Qiao, Z., Sakata, K., Sugie, S., Shibata, T. and Mori, H. Inhibitory effects of troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligand, in rat tongue carcinogenesis initiated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Sci.*, 94: 365-371 (2003).
  - 4) Murakami, A., Hayashi, R., Tanaka, T., Kwon, K.H., Ohgashi, H. and Safitri, R. Suppression of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice by zerumbone, a subtropical ginger sesquiterpene, and nimesulide: separately and in combination. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 1253-1261 (2003).
  - 5) Sakata, K., Hirose, Y., Qiao, Z., Tanaka, T. and Mori, H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Lett.*, 199: 139-145 (2003).
  - 6) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S. and Tanaka, T. Dietary protocatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4: 319-326 (2003).
  - 7) Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S. and Mori, H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, 94: 965-973 (2003).
  - 8) Kohno, H., Sugie, S., Vinh, P.Q., Mori, H. and Tanaka, T., Cancer chemoprevention by silymarin. In: R.M. Mohan (Ed.), *Research Advances in Cancer*, Vol. 3, pp. 55-66, Global Research Network (2003).
  - 9) Rahman, K.M.W., Sugie, S., Watanabe, T., Tanaka, T. and Mori, H. Chemopreventive effects of melatonin on diethylnitrosamine and Phenobarbital-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats. *Nutr. Cancer*, 47: 148-155 (2003).
  - 10) 田中卓二. NSAIDs による癌の化学予防. *医学のあゆみ*, 204: 105-111 (2003).
  - 11) 田中卓二. 動物を用いた大腸がんの化学予防研究. *癌の臨床*, 49: 169-177 (2003).
2. 学会発表
    - 1) 中村理絵子、佐々木啓子、吉村昭毅、田中卓二、和田啓爾、食用および薬用植物成分の研究 (第 49 報) Limonoid 類のチトクローム P450 に対する阻害効果、日本薬学会第 123 年会、長崎市、(2003 年 3 月)
    - 2) 牧野えりか、佐々木啓子、吉村昭毅、田中卓二、和田啓爾、食用および薬用植物

- 成分の研究 (第 50 報) コロンボ中苦味成分コロンピンの薬物代謝酵素に及ぼす影響、日本薬学会第 123 年会、長崎市、(2003 年 3 月)
- 3) 甲野裕之、鈴木里加子、山口かずえ、米谷 俊、田中卓二、酵素処理 hesperidin (glycosyl hesperidin) の 4-nitroquinoline 1-oxide 誘発ラット舌発がん修飾効果、第 92 回日本病理学会総会、福岡市、(2003 年 4 月)
- 4) 田中卓二、がんの化学予防、第 92 回日本病理学会総会ワークショップ WS-12-5、福岡市、(2003 年 4 月)
- 5) 甲野裕之、鈴木里加子、山口かずえ、田中卓二、4-nitroquinoline 1-oxide 誘発ラット舌発がんに対する酵素処理 hesperidin (glycosyl hesperidin) の修飾効果、第 10 回日本がん予防研究会、札幌市、(2003 年 6 月)
- 6) Tanaka, T., Yoshida, K., Kohno, H., Suzuki, R., Yamaguchi, K., Kawamori, T., Mori, H. and Wakabayashi, K., A COX-2 inhibitor, nimesulide, inhibits chemically-induced rat tongue carcinogenesis through suppression of cell proliferation activity and COX-2 and iNOS expression. 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Minisymposium, Washington, D.C. (July 2003).
- 7) Kohno, H., Tanaka, T., Suzuki, R., Yamaguchi, K., Nomura, E., Taniguchi, H., Tsuno, T. and Tsuda, H., A novel geranylated derivative, ethyl 3-(4'-geranyloxy-3'-methoxyphenyl)-2-propenoate, synthesized from ferulic acid suppresses carcinogenesis and iNOS expression in rat tongue. 94th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Poster Discussion, Washington, D.C. (July 2003).
- 8) 田中卓二、食べ物と発癌、その予防、第 30 回日本電顕皮膚生物学会総会および学術集会：特別講演 2、金沢市、(2003 年 9 月)
- 9) 田中卓二、動物モデルによる大腸発がん発生の予防、第 14 回日本消化器癌発生学会総会：特別シンポジウム、金沢市、(2003 年 9 月)
- 10) 甲野裕之、鈴木里加子、佐々木啓子、吉村昭毅、和田敬爾、田中卓二、Azoxymethane 誘発大腸 ACF に対するイチョウ葉エキスおよび biobalide による修飾効果、第 14 回日本消化器癌発生学会総会、金沢市、(2003 年 9 月)
- 11) 加藤恵三、杉江茂幸、吉田浩二郎、田中卓二、甲野裕之、盛 弘強、テイ キョウ、久野寿也、坂田佳子、廣瀬義信、山田泰広、原 明、森 秀樹、3,3'-methylenediindole (DIM) の N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA) 誘発ラット食道発癌における修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003

- 年9月)
- 12) 杉江茂幸、加藤恵三、吉田浩二郎、田中卓二、甲野裕之、盛 弘強、久野壽也、坂田佳子、廣瀬義信、山田泰広、原 明、森 秀 樹、N-Nitrosomethylbenzylamine (NMBA) 誘発食道発がんにおける Indole-3-carbinol (I3C) の修飾作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 13) 甲野裕之、鈴木里加子、岡田忠司、杉江茂幸、田中卓二、発芽ブロッコリーパウダーによる azoxymethane (AOM) 誘発大腸 ACF の抑制、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 14) 鈴木里加子、甲野裕之、山口かずえ、細川雅史、宮下和夫、田中卓二、ニガウリ種子油(BGO)による azoxymethane (AOM) 誘発大腸発がん抑制、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 15) 坂田佳子、原 明、廣瀬義信、久野壽也、山田泰広、Zheng Qiao、村上 明、大東 肇、Ikemoto Kohei、小清水弘一、田中卓二、森 秀樹、柑橘類由来 AUraptene の F344 ラット N,N-Diethylnitrosamine 誘発肝癌モデルに対する抑制作用、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 16) 田中卓二、甲野裕之、鈴木里加子、山田泰広、杉江茂幸、森 秀樹、炎症関連マウス大腸発がんモデル作出の試み、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 17) 村上 明、田中卓二、金 河元、川畑球一、中村宜督、大東 肇、Zerumbone の皮膚発がん抑制作用とその分子機構、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 18) 下地由美、甲野裕之、南田久美子、西川 泰、大東 肇、田中卓二、黒酢エキスによる azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸発癌に対する抑制効果、第 62 回日本癌学会総会、名古屋市、(2003 年 9 月)
- 19) Suzuki, R., Kohno, H., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Yano, M., Tokuda, H., Nishino, H. and Tanaka, T., Citrus nobiletin inhibits azoxymethane (AOM)-induced large bowel carcinogenesis in rats. The 3rd International Conference on Food Factors: Physiologic Functions and Disease Risk Reduction (ICoFF-3), Tokyo (December 2003).
- 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。

厚生労働科学研究費補助金（がん予防健康科学総合研究事業）  
分担研究報告書

肺および膵臓発がん抑制物質の検索に関する研究

分担研究者 堤 雅弘 奈良県立医科大学 腫瘍病理

研究要旨

サメ軟骨水抽出物（SCE）の膵発癌抑制作用機構に関する検索と膵癌患者への応用を試みた。SCE は、TIMP-1 および 2 以外の内因性 MMPs 阻害物質を介して MMPs を阻害することで、ハムスター膵発癌を抑制することが示唆された。また、膵癌患者においてもハムスター同様に血清の MMP 阻害活性の増加がみられたことより、SCE はヒト膵癌の化学予防物質となる可能性が示唆された。

A.研究目的

膵癌は予後不良である難治癌の代表的なものの1つであり、集学的治療法の進歩により一定の予後改善はみられているものの、その予後は依然不良であり、新たな治療戦略として、癌の進展を阻止または遅延させる化学予防剤の開発が研究課題の1つとして重要である。癌細胞の浸潤増生に重要とされる matrix metalloproteinase(MMP)の阻害剤は膵癌の化学予防の候補物質であることを報告してきた。また、サメ軟骨から MMPs 阻害作用を持つ画分を抽出し、膵発癌抑制作用があることをみいだした。今年度は、サメ軟骨水抽出物(SCE)の作用開こうを解明し、ヒトへの応用を試みる目的で研究を行った。

B.研究方法

ハムスター短期膵癌発生系に従い実験開始 50 日目より SCE を 0.4%の濃度で基礎飼料に混じり 50 日間投与し、血清および膵癌組織を採取した。健常人へは、SCE 6 g を一回経口投与、膵癌患者へは 1 日 2 から 3 g を 2 回に分け経口投与し、血清を採取した。MMP-2 および MMP-9 の発現量はゼラチンザイモグラフィーにて、阻害物質の発現はリバーズザイモグラフィーにて検索した。MMP-2 および MMP-9 の血清阻害活性は、それぞれの MMP によるコラーゲン分解産物をウェスタンブロットにて検出することにより計測した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、奈良医大動物実験施設の倫理規定に準拠し行った。ヒトへの SCE 投与については、十分な説明をし、本人の納得と同意を得たうえで行った。また、血液検査等を定期的に行い副作用の出現についての検索を行った。

### C. 研究結果

ハムスターにおいて、0.4% SCE 投与群では基礎食投与群に比較し動物 1 匹あたりの腭癌発生個数は有意に減少した。腭癌組織において MMP-2 および MMP-9 の発現と活性化がみられ、また、血清中にも MMP-2 および MMP-9 が検出されたが、SCE 投与により MMPs の活性化の阻害や発現量の変化はみられなかった。SCE 投与により Tissue inhibitor of MMPs (TIMP)-1 および TIMP-2 の発現量に差異はみられなかった。SCE を投与した動物血清では MMP-9 に対する阻害活性の増加がみられた。健常人および腭癌患者血清において、SCE 投与後 MMP-9 に対する阻害活性の上昇がみられた。

### D. 考察

SCE の腭癌抑制作用は、MMPs の活性を阻害することによることが示唆された。この阻害作用は、MMP-2 および MMP-9 発現や活性化を阻害するものではなく、また、TIMP-1 および TIMP-2 を介するものでもないことが示された。SCE はプロテオグリカンやコラーゲンを主とする生体高分子化合物の複合体であり、吸収されたものがどのような形に代謝されるか、どのような機序で MMPs を阻害するかについては、今後の検討が必要である。SCE を投与したヒト血清においても、ハムスターと同様の MMPs 阻害活性の上昇がみられたことは、SCE がヒトにおいても有効に作用する可能性を示唆すると思われる。また、この阻害活性の検索は SCE の有効性を判定するためのバイオマーカーとして利用しうることが推測される。

### E. 結論

ハムスター腭癌抑制作用を有する SCE は、ハムスター血清の MMP-9 阻害活性を上昇させることで、腭癌を抑制することが示唆された。SCE を投与した健常人および腭癌患者においてもハムスターと同様に血清の MMP-9 阻害活性が上昇することが示され、SCE は腭癌患者にも適用しうる可能性が示唆された。



## F.健康危険情報

SCE を投与されたハムスターおよびラットにおいて毒性変化はみられなかった。また、SCE を投与された健常人および膀胱癌患者においても有害な反応はみられなかった。

## G.研究発表

### 1.論文発表

- 1) Tsujiuchi T., Sasaki Y., Kubozoe T., Konishi Y., Tsutsumi M. Alterations In the Fhit gene in pancreatic duct adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine in hamsters. Mol. Carcinogenesis 36: 60-66 (2003)
- 2) Tsujiuchi T., Tsutsumi M., Konishi Y. Molecular aspects during multi-step chemical induced carcinogenesis in the lung and pancreas. J. Toxicol Pathol. 16: 133-138 (2003)

### 2.学会発表

- 1) 堤雅弘、ハムスターにおける膀胱癌発生の形態的特徴と遺伝子異常、第 92 回日本病理学会総会、福岡、(2003 年 4 月)
- 2) 堤雅弘、岡保夫、辻内俊文、実験膀胱がんにおける形態と分子の異常、第 62 回日本癌学会総会、名古屋、(2003 年、9 月)

## H.知的財産権の出願、登録状況

(予定を含む)

### 1.特許取得

軟骨魚類から単離されたプロテオグリカンおよびその製造方法 (出願中)

### 2.実用新案登録

なし

### 3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん予防健康科学総合研究事業）  
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 奥坂 拓志 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。2001年5月より患者登録を開始し、2004年3月現在、194例(目標患者数は250例)が登録されている。

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11施設からなる多施設共同研究であり、3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

2001年5月より患者登録を開始し、2004年3月現在、194例が登録されている。最初の125症例の患者調査票が各施設から既に回収されており、その結果を基に現在中間解析が行われている。中間解析の結果は2004年4月3日にモニタリング委員会で検討される予定である。

## 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行っている。

本研究は2004年3月までに250症例を集積する予定であったが、2002年より承認されたインターフェロン+リバビリンの影響などで、2004年3月現在の患者登録数は194症例に留まっている。125症例の中間解析の結果が2004年4月3日にモニタリング委員会で検討される予定であるため、その検討内容を基に、今後の試験の継続の可否等を決定する予定である。

## 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、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、2001年5月より患者登録を開始し、2004年3月現在、194例が登録されている。中間解析の結果、登録継続が決定された場合には、研究期間の延長および参加施設の拡大にて目標の250症例を集積する予定である。

## 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

#### 外国語論文

1) Okusaka, T., Okada, S., Nakanishi, T., Fujiyama, S., and Kudo, Y. Phase II trial of intra-arterial chemotherapy using a novel lipophilic platinum derivative (SM-11355) in patients with hepatocellular carcinoma. *Invest New Drug*, 22:169-176, 2003.

2) Okusaka, T., Matsumura, Y., and Aoki, K. New approach for pancreatic cancer in Japan. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003 (in press).

3) Okusaka, T., and Kosuge, T. Systemic chemotherapy for pancreatic cancer (including gemcitabine).

Pancreas, 28(3), 2003 (in press).

4) Morizane, C., Okada, S., Okusaka, T., Hideki, U., and Saisho, T. Phase II study of cisplatin, epirubicin, and continuous-infusion of 5-fluorouracil (5-FU) (CEF therapy) for advanced biliary tract cancer. *Oncology*, 64:475-476,2003.

5) Tokuyue, K., Sumi, M., Kagami, Y., Muramatsu, S., Ikeda, H., Ikeda, M., Okusaka, T., Ueno, H., and Okada, S. Small-field radiotherapy in combination with concomitant chemotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Radiother Oncol*, 67:327-330,2003.

#### 日本語論文

1) 奥坂拓志. 肝がん・膵がん. 化学療法の領域19(S-1):140-146,2003

2) 奥坂拓志. 膵癌の化学療法. 肝胆膵46(5):635-642,2003

3) 奥坂拓志. 化学療法.特集:肝細胞癌とどう戦うべきか. IV再発治療とその予防. 外科65(8):925-931,2003

4) 奥坂拓志. 切除不能膵癌に対する治療. 肝・胆・膵疾患の最新医療. 戸田剛太郎他編集. 株式会社寺田国際事務所/先端医療技術研究所. 東京. pp368-374,2003.

5) 奥坂拓志. 膵癌. 1.内科. 臨床腫瘍学 第3版. 有吉 寛他編集. 癌と化学療法. 東京. pp707-716,2003.

6) 奥坂拓志. 総論:膵癌の化学療法の位置付け. 胆と膵24(9):621-

626,2003.

7) 奥坂拓志. 膵癌化学療法の過去・現在・未来. *Suigan*7:2003. (印刷中)

8) 奥坂拓志, 伊藤芳紀. 膵がんに対する放射線化学療法の現状と展望. *癌の臨床*:2003(掲載予定)

9) 上野秀樹, 竹迫賀子, 奥坂拓志. 肝内胆管癌. 化学療法の現状. *肝胆膵*46(5):603-607,2003

10) 小菅智男, 島田和明, 佐野 力, 奥坂拓志, 上野秀樹, 池田公史. 膵癌の集学的治療-臨床試験による評価-. *肝胆膵*46(6):761-766,2003

#### 2. 学会発表

1) Okusaka, T., Ito, Y., Ueno, H., Ikeda, M., Takezako, Y., Kawauchi, S., Kagami, Y., Ikeda, H., and Okada, S. Phase II trial of chemotherapy using weekly gemcitabine (GEM) in patients with locally advanced pancreatic cancer. 39th ASCO, Chicago (May 2003), *Proc ASCO*, 22:300 (Abstract No.1203), 2003.

2) Ueno, H., Okusaka, T., Ikeda, M., Kuriyama, H., Saisho, T., Morizane, C., and Okada, S. A phase II and pharmacokinetic trial of S-1 in patients with advanced biliary tract cancer (BTC). 39th ASCO, Chicago (May 2003), *Proc ASCO*, 22: Abstract No.1355, 2003.

3) Hamaguchi, T., Matsumura, Y.,