

### C. 研究結果

実験期間中の体重、摂餌量、屠殺時の最終体重および前立腺腹葉、心、腎の相対臓器重量および血清中エストラジオール(E2)濃度のいずれにおいても実験群と対照群の間に有意差は認められなかった。屠殺時の相対肝重量が 200mg/kg  $\gamma$ -トコフェロール群で低値を示し、血清中テストステロンでは 50mg/kg  $\gamma$ -トコフェロール群が対照群と比較して高値を示した。血清中の  $\gamma$ -トコフェロール濃度は投与量依存性に増加傾向を示した。前立腺癌発生頻度は腹葉では全群で 93-100%、側葉では 36-50%と群間で明らかな差は認められなかった。背葉および前葉には癌の発生はみられなかった。腺腔を含めた腺房面積に対する腺上皮の比率を算出する事により前立腺腫瘍性病変の進展度を定量した結果、腹葉において  $\gamma$ -トコフェロール投与により有意な用量相関性を示す前立腺癌増殖抑制効果が認められた。増殖指標である Ki-67 labeling index は腹葉、背葉、側葉のいずれにおいても群間で差はみられなかったのに対し、apoptotic index は腹葉のみではあるが  $\gamma$ -トコフェロール投与量に相関して有意な増加が観察された。腹葉前立腺におけるアポトーシス関連因子および細胞増殖関連因子の発現量をウエスタン解析した結果、カスパーゼ 3 および 7 の活性化が  $\gamma$ -トコフェロール投与群で用量依存的に観察された。これらのカスパーゼの上流に存在するカスパーゼ 8, 12 あるいはグランザイム B のタンパク発現についても検討したが群間で明らかな差は認められなかった。

### D. 考察

最近の介入試験の報告ではビタミン E ( $\alpha$ -トコフェロール) 摂取を行なっても癌に対する化学予防効果がみられない一方、逆に心不全のリスクを増加させる可能性があるとして問題視されている。 $\alpha$ -トコフェロールと同様にビタミン E 同族体である  $\gamma$ -トコフェロールを用いた今回の実験では短期間ではあるものの高濃度投与群においても心血管系への副作用は明らかではなく、ヒトにおける前立腺癌化学予防剤として  $\gamma$ -トコフェロールは有望であると考えられる。 $\gamma$ -トコフェロール前立腺癌抑制メカニズムとしてカスパーゼ 3 および 7 を介したアポトーシスの亢進が考えられるが、これらのカスパーゼを

活性化させる直接的な作用機構について未だ解明できていない。Ames らはヒト前立腺癌細胞株に対する  $\gamma$ -トコフェロールの増殖抑制作用を見いだしており、その作用機序としてスフィンゴ脂質の合成阻害によるカスパーゼ非依存性経路を介したアポトーシス誘導が重要であると報告している。そこで現在セラミド合成量を中心にスフィンゴ脂質合成経路に対する影響について検討を加え、アポトーシス亢進のメカニズムについて追求している。

### E. 結論

$\gamma$ -トコフェロールの TRAP ラット前立腺癌の発生初期に対する影響を検討した結果、前立腺癌の発生そのものを抑制することはなかったが増殖に対する抑制効果は観察された。この結果は今までに報告されている疫学的データ、*in vitro* における前立腺癌細胞の増殖抑制効果を支持するデータであり、 $\gamma$ -トコフェロールはヒト前立腺癌に対する化学予防剤として有望であることが確認された。前立腺癌に対する増殖抑制メカニズムとして、カスパーゼ 3 および 7 を介したアポトーシスの亢進が推察されたが、さらなる検討によってカスパーゼ 3 および 7 の上流に存在する  $\gamma$ -トコフェロールの標的分子を特定することにより、ヒト前立腺癌に対する分子標的治療薬の開発にも大きく寄与するものと期待される。

### F. 健康危惧情報

なし

### G. 研究発表

#### B. 論文発表

- 1) Yamashita, S., Suzuki, S., Nomoto, T., Kondo, Y., Wakazono, K., Tsujino, Y., Sugimura, T., Shirai, T., Homma, Y. and Ushijima, T. Linkage and microarray analyses of susceptibility genes in ACI/Seg rats: A model for prostate cancers in the aged. *Cancer Res.* 65: 2610-2616, (2005)
- 2) Ikeda, Y., Cho, Y.-M., Takahashi, S., Tang, M., Asamoto, M., Ogawa, K. and Shirai, T.

- Equivocal impact of transplacental and lactational exposure to a food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, on prostate and colon lesion development in F344 rats. *Cancer Lett.* 224: 23-30, (2005)
- 3) Kandori, H., Suzuki, S., Asamoto, M., Murasaki, T., Tang, M., Ogawa, K. and Shirai, T. Influence of atrazine administration and reduction of calorie intake on prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats. *Cancer Sci.* 96: 221-226, (2005)
- 4) Kawai, N., Ito, A., Nakahara, Y., Futakuchi, M., Shirai, T., Honda, H., Kobayashi, T. and Kohri, K. Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic liposomes and immune-response induction in transplanted syngeneic rats. *Prostate*, 64: 373-381, (2005)
- C. 学会発表
- 1) 唐明希、小川久美子、朝元誠人、外岩戸尚美、Azman Seeni、鈴木周五、高橋智、白井智之、Nobiletin および Auraptene による probasin/SV40 T 抗原トランスジェニック ラット前立腺癌の抑制効果、第 12 回日本がん予防研究会、岐阜、(2005 年 7 月)
- 2) 杉浦諭、高橋智、竹下健太郎、Azman Seeni、唐明希、白井智之、阿部皓一、中楯雅生、栗山宏樹、 $\gamma$ -トコフェロールの PB/SV40 T antigen transgenic rat 前立腺癌に対する抑制効果、第 12 回日本がん予防研究会、岐阜、(2005 年 7 月)
- 3) 唐明希、小川久美子、朝元誠人、外岩戸尚美、Azman Seeni、田中卓二、白井智之、Nobiletin および Auraptene による probasin/SV40 T 抗原トランスジェニック ラット前立腺癌の抑制効果、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、(2005 年 9 月)
- 4) 外岩戸尚美、朝元誠人、杉浦諭、高橋智、小川久美子、白井智之、PB/SV40Tag Tg ラット由来のアンドロゲン非依存性前立腺癌のヌードマウス皮下移植腫瘍の確立と遺伝子発現解析、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、(2005 年 9 月)
- 5) 竹下健太郎、朝元誠人、外岩戸尚美、唐明希、鈴木周五、白井智之、Leuprorelin による SV40Tag TG ラット前立腺癌の抑制作用、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、(2005 年 9 月)
- 6) Takahashi, S. and Shirai, T., Experimental Prostate Carcinogenesis. Fall Symposium of the Korean Society for Toxicologic Pathology, Cheongju, (September, 2005)
- 7) Takeshita, K., Takahashi, S., Azman, S., Sugiura, S., Tang, M., Abe, K. and Shirai, T., Chemoprevention of early stage prostate carcinogenesis by gamma-tocopherol in PB/SV40 T antigen transgenic rats. 45th Annual meeting of the Society of Toxicology, San Diego, (March 2006)
- H. 知的財産権の出願・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

薬剤による炎症関連発がんの修飾

分担研究者 田中 卓二 金沢医科大学教授

研究要旨 ウルソデオキシコール酸を用いたより効果的な炎症関連大腸発がんの阻止方法を探るために、ウルソデオキシコール酸およびサラゾスルファピリジンによる大腸炎関連発がんへの影響を azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS) 誘発マウス大腸発がんモデルで比較、検討した。その結果、ウルソデオキシコール酸による大腸発がんの抑制作用はサラゾスルファピリジンによる発がん抑制よりも効果的であった。

A. 研究目的

本邦では、炎症性腸疾患 (IBD) 患者の増加とともに、大腸炎関連大腸がん (いわゆる colitic cancer) 患者の増加が予想されており、その対策が必要とされる。大腸発がんに対して抑制効果が指摘されている NSAIDs はこれまで IBD には効果がないか逆に促進する疫学あるいは実験的データが報告されている。IBD に有効とされている 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) は、colitic cancer を抑制するという報告がある。しかし、炎症関連大腸発がん動物モデルでの検討はなされていない。一方、成沢らは肝機能改善を目的に臨床的に用いられているウルソデオキシコール酸 (UDCA) の大腸発がん抑制作用を報告した。そこで、本分担研究では、UDCA を用いたより効果的な炎症関連大腸発がんの阻止方法が可能か否かを検討するため、我々が開発した azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS) 誘発炎症関連マウス大腸発がんモデルを用いて UDCA の抑制効果を検討した。実験では、生体内で代謝され 5-ASA を生じるサラゾスルファピリジン (SASP) との比較も行った。

A. 研究方法

4週齢の雄性ICRマウス139匹を1週間の検疫の後、実験に供した。実験群は、AOM/DSS群 (20匹)、AOM/DSS→0.016% UDCA群 (20匹)、AOM/DSS→0.08% UDCA群 (20匹)、AOM/DSS→0.4% UDCA群 (20匹)、AOM/DSS→0.05% SASP群 (20匹)、AOM/DSS→0.4% UDCA+0.05% SASP群 (20匹)、0.4% UDCA群 (4匹)、0.05% SASP群 (5匹)、0.4% UDCA+0.05% SASP群 (5匹)、無処置群 (5匹) の計10群とした。AOMは10 mg/kg体重を1回腹腔内投与し、その1週後に1% DSSを1週間飲水投与した。被験化合物は、DSS投与終了1週間より17週間混餌投与した。実験期間は20週とし、実験終了時に大腸および主要臓器の病理組織学的解析を行った。別に、実験開始後10週時に、大腸粘膜のiNOS発現(mRNA)を測定した。

(倫理面への配慮) 動物実験にあたっては、金沢医科大学の動物実験指針に従い実験動物委員会の承認に基づき実験を実施した。また、動物への発がん物質の投与や屠殺時には苦痛を軽減し、動物愛護の精神を充分考慮した。

B. 研究結果

大腸腺がんの発生頻度 (個数/大腸) は、AOM/DSS群:45% (2.15±4.46)、AOM/DSS→0.016% UDCA群:25% (0.25±0.44, P<0.05)、AOM/DSS→0.08% UDCA群:25% (0.25±0.44, P<0.05)、AOM/DSS→0.4% UDCA群:20% (0.30±0.66, P<0.05)、AOM/DSS→0.05% SASP群:40% (0.70±1.08)、AOM/DSS→0.4% UDCA+0.05% SASP群:45% (0.60±0.75)、0.4% UDCA群:0%、0.05% SASP群:0%、0.4% UDCA+0.05% SASP群:0%、無処置群:0%であり、UDCA投与により大腸腺がんの発生頻度が低下傾向を示し、発生個数は有意に低下していた。さらに、UDCA混餌投与により大腸腫瘍の大きさも減少していた。一方、SASPの混餌投与は大腸腺がんの発生頻度・発生個数や大腸腫瘍の大きさに有意な影響を示さなかった。被験物質のみの投与群、無処置群に大腸腫瘍の発生は認めず、また、被験物質のみの投与群に毒性を示唆する臨床徴候や主要臓器における組織学的変化を認めなかった。実験開始後10週時における大腸粘膜のiNOS発現(mRNA)は、AOM/DSS群に比較して、AOM/DSS→0.016% UDCA群で0.33倍、AOM/DSS→0.08% UDCA群で0.14倍、AOM/DSS→0.4% UDCA群で0.43倍、AOM/DSS→0.05% SASP群で1.24倍であり、UDCA混餌投与により大腸粘膜のiNOS発現(mRNA)が抑制された。また、大腸腺がんのPCNA標識率(%)は、AOM/DSS群で61±11、AOM/DSS→0.016% UDCA群で40±9 (P<0.05)、AOM/DSS→0.08% UDCA群で38±6 (P<0.05)、AOM/DSS→0.4% UDCA群で37±8 (P<0.05)、AOM/DSS→0.05% SASP群で53±10、AOM/DSS→0.4% UDCA+0.05% SASP群で41±11とUDCA混餌投与により有意に低下していた。

### C. 考察

本研究において、UDCAはいずれの濃度においてもAOM/DSS誘発炎症関連マウス大腸発がんを抑制することが判明したが、濃度依存性は認められなかった。また、SASP投与群では大腸腺癌の発生に対する有意な抑制は認められず、IBDを背景とする大腸発がんの抑制には、SASPよりもUDCAが有効である可能性が示唆された。現在、AOM/DSSで誘発される大腸がんの前駆病変や大腸炎への影響を、解析中である。UDCAの炎症関連大腸発がん抑制機構としては、大腸粘膜におけるiNOS mRNAの発現低下作用や細胞増殖の低下作用が考えられたが、胆汁酸への影響など、さらなる検討が必要であると考えている。

### D. 結論

UDCAは炎症関連マウス大腸発がんに対して抑制的に作用することが示唆され、その抑制作用には、iNOS mRNAの発現低下作用や細胞増殖の低下作用などが考えられた。

### E. 健康危険情報

本研究を実施するに当たり、実験者の健康への影響はなかった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Tanaka, T., Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Takahashi, M. and Wakabayashi, K. Colonic adenocarcinomas rapidly induced by the combined treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and dextran sodium sulfate in male ICR mice possess  $\beta$ -catenin gene mutations and increases immunoreactivity for  $\beta$ -catenin, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase. *Carcinogenesis*, 26: 229-238 (2005)
- 2) Sugie, S., Ohnishi, M., Ushida, J., Yamamoto, T., Hara, A., Koide, A., Mori, Y., Kohno, H., Suzuki, R., Tanaka, T., Wakabayashi, K. and Mori, H. Effect of  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary carcinogenesis in rats. *Int. J. Cancer*, 115: 346-350 (2005)
- 3) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S. and Tanaka, T.  $\beta$ -Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.*, 96: 69-76 (2005)
- 4) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S. and Tanaka, T. Dose-dependent promoting effect of dextran sodium sulfate on mouse colon carcinogenesis initiated with azoxymethane. *Histol. Histopathol.*, 20: 483-492 (2005)
- 5) Sano, T., Kagawa, M., Okuno, M., Ishibashi, N., Hashimoto, M., Yamamoto, M., Suzuki, R., Kohno, H., Matsushima-Nishiwaki, R., Takano, Y., Tsurumi, H., Kojima, S., Friedman, S.L., Moriwaki, H. and Tanaka, T. Prevention of rat hepatocarcinogenesis by acyclic retinoid is accompanied by reduction in emergence of both TGF- $\alpha$ -expressing oval-like cells and activated hepatic stellate cells. *Nutr. Cancer*, 51: 197-206 (2005)
- 6) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S. and Tanaka, T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC Cancer*, 5: 46 (2005)
- 7) Sugie, S., Vinh, P.Q., Rahman, K.M., Ushida, J., Kohno, H., Suzuki, R., Hara, A., Quang, le B., Tanaka, T. and Mori, H. Suppressive effect of 1,4-phenylene diisothiocyanate on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int. J. Cancer*, 117: 524-530 (2005)
- 8) Yasui, Y., Hosokawa, M., Sahara, T., Suzuki, R., Ohgiya, S., Kohno, H., Tanaka, T. and Miyashita, K. Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR $\gamma$  in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 73: 113-119 (2005)
- 9) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H. and Tanaka, T. Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Clin. Cancer Res.*, 11: 4962-4967 (2005)
- 10) Suzui, M., Inamine, M., Kaneshiro, T., Morioka, T., Yoshimi, N., Suzuki, R., Kohno, H. and Tanaka, T. Indole-3-carbinol inhibits the growth of human colon carcinoma cells but enhances the tumor multiplicity and volume of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis. *Int. J. Oncol.*, 27: 1391-1399 (2005)
- 11) Ishigamori, H., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K. and Takahashi, K. Docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine enhances HL-60 cell differentiation by regulation of c-jun and c-myc expression. *Mol. Cell. Biochem.*, 275: 127-133 (2005)
- 12) Kwon, K.H., Murakami, A., Tanaka, T. and Ohgashi, H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochem. Pharmacol.*, 69: 395-406 (2005)
- 13) Yoshida, K., Tanaka, T., Hirose, Y., Yamaguchi, F., Kohno, H., Toida, M., Hara, A., Sugie, S., Shibata, T. and Mori, H. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-

- induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.*, 221: 29-39 (2005)
- 14) Hara, A., Sakata, K., Yamada, Y., Kuno, T., Kitaori, N., Oyama, T., Hirose, Y., Murakami, A., Tanaka, T. and Mori, H. Suppression of beta-catenin mutation by dietary exposure of auraptene, a citrus antioxidant, in N,N-diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in rats. *Oncol Rep.*, 14: 345-351 (2005)
  - 15) Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Hata, K., Sugie, S., Niho, N., Sakano, K., Takahashi, M. and Wakabayashi, K. Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in *Apc<sup>Min/+</sup>* mice: Inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. *Int. J. Cancer*, 118: 25-34 (2006)
  - 16) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Nakagama, H. and Tanaka, T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*, 27: 162-169 (2006)
  - 17) Suzuki, R., Kohno, H., Suzui, M., Yoshimi, N., Tsuda, H., Wakabayashi, K. and Tanaka, T. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. *Carcinogenesis*, 27: 619-630 (2006)
  - 18) Kawamori, T., Osta, W., Johnson, K.R., Pettus, B.J., Bielawski, J., Tanaka, T., Wargovich, M.J., Reddy, B.S., Hannun, Y.A., Obeid, L.M. and Zhou, D. Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. *FASEB J.*, 20: 386-388 (2006)
  - 19) Hata, K., Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Qiang, S.H., Yamada, Y., Oyama, T., Kuno, T., Hirose, Y., Hara, A. and Mori, H.  $\beta$ -Catenin-accumulated crypts in the colonic mucosa of juvenile *Apc<sup>Min/+</sup>* mice. *Cancer Lett.*, in press (2006)
  - 20) Hata, K., Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Qiang, S.H., Kuno, T., Hirose, Y., Hara, A. and Mori, H. Lack of enhancing effects of degraded  $\lambda$ -carrageenan on the development of  $\beta$ -catenin-accumulated crypts in male DBA/2J mice initiated with azoxymethane. *Cancer Lett.*, in press (2006)
  - 21) Kohno, H., Suzuki, R., Curini, M., Epifano, F., Maltese, F., Prieto, S., Gonzales, S.P. and Tanaka, T. Dietary administration with prenyloxycompounds, auraptene and collinin, inhibits colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Int. J. Cancer*, in press (2006)
  - 22) Miyamoto, S., Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Murakami, A., Ohigashi, H. and Tanaka, T. Preventive effects of chrysin on the development azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Oncol. Rep.*, in press, (2006).
2. 学会発表
- 1) 杉江茂幸、山田泰広、釘 橋、森下由起夫、田中卓二、森 秀樹、DL-Alanine の慢性毒性。21 回日本毒性病理学会、浜松、(2005 年 1 月)
  - 2) 鈴木里加子、高橋真美、甲野裕之、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二。2-Amino-1-methyl-6-imidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) あるいは 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を用いた炎症関連マウス大腸発がん。第 21 回日本毒性病理学会、浜松、(2005 年 1 月)
  - 3) 田中卓二、オーラプテン：ヒトへの応用を目指して。文部科学省特定領域「発がんの防御（個体レベルでの新しい病理形態学的がん研究の推進と支援に関する委員会）シンポジウム-動物発がんヒト発がんの架け橋-」、東京、(2005 年 2 月)
  - 4) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、中釜 齊、AOM/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。日本癌学会カンファレンス「がんゲノム研究の新戦略 -オーダーメイド医療を目指して-」、蓼科、(2005 年 3 月)
  - 5) 武田公一、宇都宮洋才、山崎 尚、覚道、健一、宮嶋正康、稲田健一、田中卓二、*Hlicobacter pylori* 感染スナネズミ腺胃における auraptene の修飾作用。第 94 回日本病理学会総会、横浜市、(2005 年 4 月)
  - 6) 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二、Azoxymethane/dextran sodium sulfate (DSS) 誘発マウス大腸発がんおよび DSS 投与期間の影響。第 94 回日本病理学会総会、横浜市、(2005 年 4 月)
  - 7) 杉江茂幸、ビイン・ファン・クワン、盛 弘強、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、森 秀樹、OH-BBN 誘発ラット膀胱発がんモデルにおける benzyliothiocyanate、phenylethyl isothiocyanate の修飾効果。第 94 回日本病理学会総会、横浜市、(2005 年 4 月)
  - 8) 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、津田洋幸、田中卓二、Silymarin による 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl 誘発ラット前立腺発がん修飾効果。第 94 回日本病理学会総会、横浜市、(2005 年 4 月)
  - 9) Sugie, S., Kato, K., Kitaori, N., Yoshida, K., Kohno, H., Suzuki, R., Shimada, S., Mori, H. and Tanaka, T., Chemopreventive effects of yeast, Zinc (Zn) and enriched Zn yeast on 4-nitroquinoline oxide-induced rat tongue carcinogenesis. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, (April 2005)
  - 10) Kawamori, T., Osta, W., Johnson, K.R., Pettus, B.J., Tanaka, T., Wargovich, M.J., Reddy,

- B. S., Obeid, L. M., Hannun, Y. A., and Zhou, D., Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, (April 2005)
- 11) Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Hata, K., Sugie, S., Niho, N., Sakano, K., Takahashi, M. and Wakabayashi, K., Dextran sodium sulfate strongly promotes colorectal carcinogenesis in *ApcMin/+* mice: Inflammatory stimuli by dextran sodium sulfate results in development of multiple colonic neoplasms. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, (April 2005)
  - 12) Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., Hirose, Y., Nakagama, H. and Tanaka, T., Strain difference in sensitivity to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, (April 2005)
  - 13) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Takahashi, M., Wakabayashi, K., Tanaka, T., b-Catenin mutations in colonic adenocarcinomas in male ICR mice initiated with three different colonic carcinogens (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, azoxymethane and 1,2-dimethylhydrazine) and promoted by dextran sodium sulfate. 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, (April 2005)
  - 14) Tanaka, T.: Pre-clinical study on cancer chemoprevention by non-nutritive constituents in citrus fruit. ISCaP "Molecular Targeting Cancer Chemoprevention" – ProBRAIN Joint Symposium "citrus constituents and Cancer Prevention", Kyoto, (May 2005)
  - 15) Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., Tsuda, H. and Tanaka, T., Dietary supplementation with silymarin inhibits 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. ISCaP "Molecular Targeting Cancer Chemoprevention", Kyoto, (May 2005)
  - 16) Suzuki, R., Kohno, H., Hata, K., Sumida, T., Sugawara, K., Sugie, S. and Tanaka, T., Modifying effect of citrus unshiu segment membrane on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in C57BL/KsJ-*db/db* mice. ISCaP "Molecular Targeting Cancer Chemoprevention", Kyoto, (May 2005)
  - 17) Sugie, S., Kato, K., Kitaori, N., Yoshida, K., Kohno, H., Suzuki, R., Shimada, S., Tanaka, T. and Mori, H., Chemopreventive effects of yeast, Zinc and zinc-enriched yeast on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. ISCaP "Molecular Targeting Cancer Chemoprevention", Kyoto, (May 2005)
  - 18) 田中卓二, Indole-3-carbinol による発がん修飾: 特に大腸発がんへの影響についての考察。第 12 回日本がん予防研究会・第 28 回日本がん疫学研究会合同シンポジウム、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 19) 浅野奈美、原 明、宮崎康雄、岡 直樹、智慧蘭、尾山 武、盛 弘強、加藤恵三、坂田佳子、久野壽也、森 秀樹、田中卓二、Zerumbone による diethylnitrosamine (DEN) 誘発ラット肝発癌に対する影響。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 20) 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、田中卓二、AOM/DSS 誘発マウス大腸発がんに対するクマリン系フラボノイドによる修飾効果。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 21) 森 幸雄、立松憲次郎、杉江茂幸、田中卓二、森 秀樹、 $\alpha$ -Naphthyl isothiocyanate の実験発がん抑制作用における代謝活性化の役割。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 22) 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、田中卓二、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 4-NQO 誘発舌発がんとその抑制。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 23) 久野壽也、廣瀬善信、山田泰広、浅野奈美、尾山 武、原 明、森 秀樹、杉江茂幸、田中卓二、玄米発酵食による N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine 誘発マウス膀胱癌抑制効果の検討。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 24) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、田中卓二、盛 弘強、森 秀樹、BBN 誘発ラット膀胱発がんモデルにおける benzyliothiocyanate (BITC)、phenylethyl isothiocyanate (PEITC) の修飾効果。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 25) 唐 明希、小川久美子、朝元誠人、外岩戸尚美、Azman Seeni、鈴木周五、高橋 智、白井智之、田中卓二、Nobiletin および Auraptene による probasin/SV40 T 抗原トランスジェニックラット前立腺癌の抑制効果。第 12 回日本がん予防研究会、岐阜市、(2005 年 7 月)
  - 26) 鈴木里加子、甲野裕之、杉江茂幸、仁保直子、坂野克久、高橋真美、若林敬二、田中卓二、*ApcMin/+*マウス大腸発がんに対する dextran sodium sulfate の影響。第 20 回発癌病理研究会 旭川、(2005 年 8 月)
  - 27) Suzuki, R., Kohno, H., Hata, K. and Tanaka, T., Dextran sodium sulfate strongly promotes the development of intestinal lesions in *ApcMin/+* mice. 18th Asia Pacific Cancer Conference – Toward the Tailored Therapy for Cancer, Seoul, (September 2005)

- 28) 田中卓二、がん化学予防前臨床試験のための動物実験モデル。第 64 回日本癌学会シンポジウム S5「がん化学予防の実践と戦略」、札幌、(2005 年 9 月)
- 29) 鈴木里加子、甲野裕之、畑 和也、杉江茂幸、仁保直子、坂野克久、高橋真美、若林敬二、田中卓二、*ApcMin/+*マウス大腸発がんに対する dextran sodium sulfate の影響。第 64 回日本癌学会ワークショップ W3-8「炎症とがん」、札幌、(2005 年 9 月)
- 30) 甲野裕之、鈴木里加子、山口かずえ、杉江茂幸、若林敬二、田中卓二、AOM/DSS 誘発マウス大腸発がんに対する COX-2 阻害剤および PPAR リガンドの修飾作用。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 9 月)
- 31) 宇都宮洋才、稲田健一、武田公一、田中卓二、*Helicobacter pylori* 感染スナネズミ腺胃における auraptene の作用。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 9 月)
- 32) 浅野奈美、原 明、宮崎康雄、岡 直樹、智慧蘭、尾山 武、盛 弘強、加藤恵三、坂田佳子、久野壽也、田中卓二、森 秀樹、Zerumbone による diethylnitrosamine (DEN) 誘発ラット肝発癌に対する影響。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 9 月)
- 33) シーニ アズマン、小川久美子、朝元誠人、高橋 智、唐 明希、田中卓二、白井智之、ヒト大腸癌細胞株を用いた柑橘類化合物 Auraptene と Nobiletin の化学予防効果の解析。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 2 月)
- 34) 唐 明希、小川久美子、朝元誠人、外岩戸尚美、シーニ アズマン、田中卓二、白井智之、Nobiletin および Auraptene による probasin/SV40 T 抗原トランスジェニックラット前立腺癌の抑制効果。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 2 月)
- 35) 畑 和也、盛 弘強、山田泰広、尾山 武、久野壽也、廣瀬善信、原 明、田中卓二、森 秀樹、幼若な *ApcMin/+* mice の大腸にも b-Catenin-accumulated crypts は存在する。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 2 月)
- 36) 杉江茂幸、甲野裕之、鈴木里加子、中釜 斉、田中卓二、AOM/DSS マウス大腸発がんモデルにおける系統差の検討。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 9 月)
- 37) 中西雅子、田澤 大、田中卓二、杉村 隆、中釜 斉、PhIP と DSS により誘発されるマウス大腸発がんにおける炎症の影響。第 64 回日本癌学会、札幌、(2005 年 2 月)
- 38) 甲野裕之、鈴木里加子、杉江茂幸、田中卓二、炎症関連マウス大腸発がんに対するウルソデオキシコール酸の修飾作用およびその機構解析。第 16 回日本消化器癌発生学会総会、鹿児島、(2005 年 10 月)
- 39) 森 幸雄、立松憲次郎、杉江茂幸、田中卓二、森秀樹、ナフトフラボンによるラット肝のシトクロム P450 1A、ヘテロサイクリックアミンの変異原的活性化及び UDP-グルクロン酸抱合の誘導。第 34 回日本環境変異原学会、(2005 年 11 月)
- 40) Tanaka T., Inflammation-related colon carcinogenesis. 2005 Annual Meeting of Korean Society for Free Radical Research, Seoul, (November 2005)
- 41) Tanaka T., An animal model for the inflammation-related colon carcinogenesis. Symposium 4: Cellular Signaling Network Regulating Inflammation: A Prime Target for Disease Prevention and Therapy. The Annual Meeting of the Korea Society of Pharmaceutical Sciences, Seoul, (November 2005)
- 42) Kohno, H., Suzuki, R., Miyamoto, S., Sumida, T., Sugawara, K., Sugie, S. and Tanaka, T., Citrus unshiu segment membrane suppresses azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and b-catenin accumulated crypts in male *db/db* mice. 4<sup>th</sup> Regional APOCP Conference, Symposium IV-Pathology and Chemoprevention, Nagoya, (January 2006)
- 43) Miyamoto, S., Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S. and Tanaka, T., Dietary auraptene inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in female *db/db* mice. 4<sup>th</sup> Regional APOCP Conference, Nagoya, (January 2006)
- 44) Tanaka, T., Cancer chemoprevention by laactoferrin and its possible mechanisms. 4<sup>th</sup> Regional APOCP Conference, Luncheon Seminar, Nagoya, (January 2006)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実案新案登録  
なし
  3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

胃発がん抑制物質の検索

分担研究者 塚本 徹哉 愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部長

研究要旨

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)感染は、慢性胃炎、腸上皮化生、胃がんあるいは胃マルトリンパ腫発生に大きく関わっている。スナネズミを用いた研究においても、*H. pylori* の除菌は、胃炎や胃がんの抑制に非常に効果的であるが、除菌には、経済的問題、耐性菌発生の危険、副作用の発生等、課題が多いのも事実であり、食品中の有効成分による安全かつ安価な方法で胃がんを予防する方法は、その解決法の一つである。本研究においては、菜種油中に含まれる強力な酸化ラジカルスカベンジャーである 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol)による抗炎症作用を検討した。5 週齢スナネズミに *H. pylori* を感染させ (A~C 群)、2 週後より 0.1% canolol/0.5 ppm butylated hydroxytoluene (BHT) (A 群) あるいは 0.05 ppm BHT (B 群) を AIN93G に混餌投与した。C 群は、AIN93G のみとした。また、D~F 群は、非感染群とし、それぞれ Canolol 投与群、BHT 単独群、基礎食のみの群とした。その結果、群間に屠殺時の *H. pylori* 菌数に有意な差は見られなかったが、A 群では、B、C 群に比べて、血清 8OH-dG 値、血清抗 *H. pylori* 抗体価の有意な低下が見られた。組織学的検索の結果、A 群では、好中球、単核球の炎症細胞浸潤、粘膜過形成の所見の有意な改善が見られた。また、Cox-2、iNOS 陽性細胞数も低下した。以上のことから、

A. 研究目的

1991年、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)と胃がんの関係を示すいくつかの報告がなされ、*H. pylori*感染は、慢性胃炎、腸上皮化生、胃がん、あるいは胃マルトリンパ腫の発生に大きく関わっていることが明らかにされてきた。1994年には、World Health Organization (WHO) / International Agency for Research on Cancer (IARC)によって*H. pylori*は胃がんの“definite carcinogen”と報告され注目された。2000年には、*H. pylori*除菌療法が保険適応となり、治療に大きく貢献したが、近年では、抗生物質耐性の*H. pylori*株が増加傾向にあったり、副作用が出現したりと、临床上大きな問題となっている。除菌に伴うこれらの問題解決に向けて、胃発がんを予防し得る安価かつ安全な食品あるいは化学物質の開発が急務である。近交系スナネズミ (Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*) に*H. pylori*が安定して感染することが見出されて以来、*H. pylori*感染による炎症と腺胃発がん率が強く相関することを見いだしてきた。本研究においては、

菜種油中に含まれる強力な酸化ラジカルスカベンジャーである4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol)の抗炎症作用を*H. pylori*感染スナネズミ腺胃病変を用いて検討し、発がん性の検討に資することを目的とする。

A. 研究方法

5 週齢スナネズミ (Seac Yoshitomi) 60 匹を A~F の 6 群に分け、A~C 群は、*H. pylori* (ATCC43504 株) 約  $1 \times 10^8$  cfu を強制胃内投与した。D~F 群には、陰性対照として、Broth を投与した。実験第 2 週より、AIN93G をベースとして、抗酸化剤の第三ブチルヒドロキノンは無添加、大豆油を菜種油に改

変した基礎食に、A 群および D 群には、0.1% 菜種油抽出抗酸化物質 (Canolol) /0.5 ppm butylated hydroxytoluene (BHT) (菜種油精製物に 500 ppm butylated hydroxytoluene (BHT) 添加) を混餌投与した。B 群、E 群には、対照群として 0.5 ppm BHT



を混餌投与した。C および F 群には、基礎食のみ摂取させた。実験 12 週で bromodeoxyuridine (BrdU) ラベル後に屠殺し、腺胃組織像、炎症細胞浸潤の程度の検討、cyclooxygenase-2 (Cox-2)、inducible nitric oxide synthase (iNOS)、BrdU の免疫染色、血清 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH-dG) 値、血清抗 *H. pylori* 抗体価、屠殺時の *H. pylori* 菌数の検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物は必要最小限の頭数を用いるよう十分な準備を行ったうえで開始した。実験は、愛知県がんセンター動物実験施設の実験動物取り扱い規定を遵守し、遂行した。

## B. 研究結果

A、B、C、D、E、F 群の血清 8OH-dG 値は、 $0.33 \pm 0.05$ 、 $0.48 \pm 0.12$ 、 $0.51 \pm 0.19$ 、 $0.30 \pm 0.05$ 、 $0.27 \pm 0.05$ 、 $0.26 \pm 0.07$  ng/ml と A 群は、B 群 ( $P < 0.05$ ) や C 群 ( $P < 0.01$ ) に比較して有意に酸化ストレスの減少が確認された。血清抗 *H. pylori* 抗体価を調べると、A~F 群それぞれ、 $19.6 \pm 5.5$ 、 $29.8 \pm 7.6$ 、 $30.5 \pm 8.2$ 、 $1.0 \pm 0.4$ 、 $1.6 \pm 0.5$ 、 $1.1 \pm 0.5$  (arbitrary index) と A 群では、B、C 群に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に抗体価の低下が認められた。屠殺時の胃内の *H. pylori* 菌数を検討したところ、腺胃半分あたり、A、B、C 群それぞれ、 $10^{4.42 \pm 0.19}$ 、 $10^{4.54 \pm 0.28}$ 、 $10^{4.47 \pm 0.23}$  cfu と有意な差は認められなかった。

組織学的に、好中球、単核球、過形成の所見を幽門部、胃体部に分けて、スコア 0~3 にスコアリングした。幽門部の好中球浸潤の程度は、A、B、C 群それぞれ、 $1.2 \pm 0.4$ 、 $2.9 \pm 0.3$ 、 $3.0 \pm 0.1$  と A 群では B、C 群より有意 ( $P < 0.01$ ) に低下した。単核球浸潤の程度は、それぞれ、 $2.2 \pm 0.4$ 、 $3.0 \pm 0.1$ 、 $3.0 \pm 0.1$  と A 群では B、C 群より有意 ( $P < 0.01$ ) に低下した。また、粘膜過形成の程度を検討したところ、それぞれの群で、 $1.2 \pm 0.6$ 、 $2.2 \pm 0.3$ 、 $2.3 \pm 0.4$  と A 群で低下 ( $P < 0.01$ ) が見られた。胃体部では、好中球浸潤の程度は、A、B、C 群それぞれ、 $0.9 \pm 0.2$ 、 $1.5 \pm 0.1$ 、 $1.5 \pm 0.2$ 、単核球は、 $0.9 \pm 0.2$ 、 $1.3 \pm 0.1$ 、 $1.5 \pm 0.2$ 、過形成は、 $0.7 \pm 0.2$ 、 $1.2 \pm 0.1$ 、 $1.2 \pm 0.1$  といずれも A 群では、B、C 群より有意 ( $P < 0.01$ ) に低値であった。*H. pylori* 非感染の D、E、F 群には、幽門腺、胃底腺粘膜とも、炎症所見や過形成は

見られなかった。

BrdU labeling index (LI) を検討したところ、幽門部では、*H. pylori* 非感染群 (D、E、F 群) では、 $4.2 \pm 1.1 \sim 5.2 \pm 0.8\%$  程度であったが、B、C 群では、 $20.3 \pm 3.7$ 、 $20.9 \pm 3.3\%$  と増加し、A 群では、 $12.5 \pm 2.5\%$  に有意 ( $P < 0.01$ ) に低下した。Cox-2、iNOS の免疫染色の結果、Cox-2 は、A~C 群それぞれ、 $0.9 \pm 0.2$ 、 $2.2 \pm 0.2$ 、 $2.3 \pm 0.3$ 、iNOS は、それぞれ  $0.9 \pm 0.1$ 、 $1.7 \pm 0.2$ 、 $1.5 \pm 0.3$  であった。いずれも A 群で有意 ( $P < 0.01$ ) な低下が見られた。D~F 群のスコアは、 $0.2 \sim 0.3$  であった。また、胃体部では、A~C 群の BrdU LI は、それぞれ、 $6.8 \pm 1.7$ 、 $9.6 \pm 2.6$  ( $P < 0.05$  vs A 群)、 $10.4 \pm 2.7\%$  ( $P < 0.01$  vs A 群) と A 群で低下した。Cox-2 のスコアは、それぞれ、 $0.6 \pm 0.2$ 、 $1.0 \pm 0.2$ 、 $1.1 \pm 0.1$ 、iNOS は  $0.5 \pm 0.1$ 、 $0.8 \pm 0.2$ 、 $0.8 \pm 0.2$  といずれも A 群で有意 ( $P < 0.01$ ) に低下が見られた。

## C. 考察

スナネズミには、*H. pylori* が安定して感染し、長期の感染によって、慢性胃炎、腸上皮化生、異所性増殖性腺管の時に漿膜下に達する様な強い過形成性の病変を形成する事が明らかとなっており、ヒトの良いモデルとなっている。*H. pylori* 感染 N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 誘発腺胃がんモデルにおいて、*H. pylori* 除菌は、腺胃がん抑制に非常に有効であることがわかっている。しかし、胃がんの予防に、除菌による菌体成分や *cagA*、*cagE*、*vacA* 等の菌由来毒素の消失が必要なのか、あるいは除菌に伴う炎症所見の軽快でも効果があるのか明らかではない。今回、菜種油中に含まれる強力な酸化ラジカルスカベンジャーの投与により、組織学的な炎症所見の軽快、Cox-2 や iNOS 陽性細胞数の減少、血清 8OH-dG 値の低下と血清抗 *H. pylori* 抗体価の低下が見られた。*H. pylori* 菌数には、明らかな影響が見られなかったことから、酸化ラジカルの制御が炎症の抑制に有効であり、菌の増殖を増悪させないことが示唆された。

## D. 結論

疫学的に、*H. pylori* 感染は、慢性胃炎、腸上皮化生、あるいは胃がん等の胃病変に大きく関わっており、スナネズミを用いた研究においても、*H.*

pylori 感染は腺胃発がんのプロモーターであることが明らかとなっている。実験的にも *H. pylori* の除菌は、胃炎や胃がんの抑制に非常に効果的であるが、*H. pylori* 感染者全てが胃がんを発生する訳ではなく、またその除菌には、経済的問題、耐性菌発生の危険、副作用の発生等、課題が多いのも事実である。多くのヒトを対照として胃がんを予防するには、食品中の安全かつ安価な有効成分を用いる方法がその解決法の一つであると考えられる。炎症の場において酸化ラジカルの発生が、DNA や細胞に障害性に働くことが知られており、酸化ラジカルの消去が細胞保護の一助となると考える。本研究において、菜種油に含まれる強力な酸化ラジカルスカベンジャーである canolol による抗炎症作用を検討した結果、血清 8OH-dG 値、血清抗 *H. pylori* 抗体価の有意な低下が見られた。組織学的検索においても、好中球、単核球の炎症細胞浸潤、粘膜過形成の所見の有意な改善が見られた。また、Cox-2、iNOS 陽性の炎症細胞浸潤も軽快した。一方で、*H. pylori* 菌数には著変なく、菌の増殖が悪化するような現象は見られなかった。以上のことから、食品中の抗酸化物質によって DNA の酸化ストレスの改善、炎症所見の軽快が見られ、発がん予防の一助となる可能性が示唆された。

#### E. 健康危険情報

特に有害事象は認められなかった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mizoshita, T., Tsukamoto, T., Cao, X., Otsuka, T., Ito, S., Takahashi, E., Nakamura, S., Nakamura, T., Yamamura, Y., and Tatematsu, M. Microsatellite instability is linked to loss of hMLH1 expression in advanced gastric cancers: lack of a relationship with the histological type and phenotype. *Gastric Cancer*, 8: 164-172 (2005)
2. Mizoshita, T., Tsukamoto, T., Tanaka, H., Takenaka, Y., Kato, S., Cao, X., Joh, T., and Tatematsu, M. Colonic and small-intestinal phenotypes in gastric cancers: Relationships

with clinicopathological findings. *Pathol. Int.*, 55: 611-618 (2005)

3. Otsuka, T., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Inada, K., Takenaka, Y., Kato, S., Yamamura, Y., Miki, K., and Tatematsu, M. Coexistence of gastric- and intestinal-type endocrine cells in gastric and intestinal mixed intestinal metaplasia of the human stomach. *Pathol. Int.*, 55: 170-179 (2005)
4. Otsuka, T., Tsukamoto, T., Tanaka, H., Inada, K., Utsunomiya, H., Mizoshita, T., Kumagai, T., Katsuyama, T., Miki, K., and Tatematsu, M. Suppressing Effects of Fruit-juice Concentrate of *Prunus Mume* Sieb. et Zucc. (Japanese apricot, Ume) on *Helicobacter Pylori*-induced Glandular Stomach Lesions in Mongolian Gerbils. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 6: 337-341 (2005)
5. Tanaka, H., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Inada, K., Ogasawara, N., Cao, X., Kato, S., Joh, T., and Tatematsu, M. Expression of small intestinal and colonic phenotypes in complete intestinal metaplasia of the human stomach. *Virchows Arch.*, 447: 806-815 (2005)
6. Mizoshita, T., Tsukamoto, T., Takenaka, Y., Cao, X., Kato, S., Kaminishi, M., and Tatematsu, M. Gastric and intestinal phenotypes and histogenesis of advanced glandular stomach cancers in carcinogen-treated, *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Cancer Sci.*, 97: 38-44 (2006)
7. Ogasawara, N., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Inada, K., Cao, X., Takenaka, Y., Joh, T., and Tatematsu, M. Mutations and nuclear accumulation of beta-catenin correlate with intestinal phenotypic expression in human stomach cancer. *Histopathology*, (in press)
8. Tsukamoto, T., Mizoshita, T., and Tatematsu, M.

Gastric-and-Intestinal Mixed Intestinal Metaplasia: Aberrant Expression of Transcription Factors and Stem Cell Intestinalization. Gastric Cancer, (in press)

2. 学会発表

- 1) Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Ito, S., Yamamura, Y., Nakamura, T., Ushijima, T., and Tatematsu, M., Alteration of gastric and intestinal transcription factors in intestinal metaplasia and adenocarcinomas of the human stomach. 6<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress, Yokohama, Japan (May 2005)
- 2) Mizoshita, T., Tsukamoto, T., Takenaka, Y., Ogasawara, N., Joh, T., Itoh, M., Ito, S., Nakamura, T., Yamamura, Y., and Tatematsu, M., Cdx2 correlates with the intestinal phenotypic expression and prognosis in advanced gastric cancers. 6<sup>th</sup> International Gastric Cancer Congress, Yokohama, Japan (May 2005)
- 3) 塚本徹哉、溝下 勤、加藤総介、曹 雪源、立松正衛、*Helicobacter pylori* 感染と食塩の胃粘液への影響、第12回日本がん予防研究会総会、岐阜、(2005年7月)
- 4) 溝下 勤、塚本徹哉、田中晴就、稲田健一、小笠原尚高、曹 雪源、片岡洋望、佐々木誠人、城 卓志、伊藤誠二、山村義孝、立松正衛、胃癌あるいは腸上皮化生腺管での大腸粘膜上皮特異的マーカー carbonic anhydrase1 の発現、第64回日本癌学会総会、札幌、(2005年9月)

8. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

ラクtof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tof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月から2004年3月31日までに199人が登録され、解析可能な198人に対して主要評価項目の解析が行われた。

A. 研究目的

分子量約80,000の糖蛋白質であるラクtof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型肝炎肝炎患者を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31日までに、199人が登録された。その時点で最初の125人のCRFに基づいた中間解析が行われ、内容がモニタリング委員会で検討された結果、「さらに症例を増加させても新たな結論が得られる可能性は低く、2004年3月31日をもって登録を終了とし、それまでに登録された199例を対象として最終解析をするのが妥当である」と判断された。Randomization前に参加を取りやめた1人を除いた198人に対して最終解析が行われた。その結果、主要評価項目であるウイルス学的効果は、LF群で

14.4% (14/97)、プラセボ群で18.8% (19/101)であり、有意差は認められなかった。また、副次評価項目であるALTの改善に関しても、LF群とプラセボ群で有意差は認められなかった。

D. 考察

我が国には多数のC型肝炎肝炎患者がおり、IFN療法に加えて新たな抗ウイルス療法の開発が切望されている。LFはいくつかの前臨床試験および小規模な臨床試験で抗HCV効果を示したことから、C型肝炎肝炎に対する効果が期待され今回のランダム化比較試験が行われた。しかし結果は残念ながら、LFの抗HCV作用、および肝機能(ALT)改善作用を証明することはできなかった。経口摂取されたLFはヒト成人の血中からは検出されないとの報告もあり、本研究でも探索的に少人数で検討したLFの免疫学的効果(IL-18、リンパ球表面マーカーの変化)に関しては、プラセボ群との違いを認めなかった。経口摂取されたLFの代謝やメカニズムの解明が必要と考えられる。

E. 結論

LFがC型肝炎肝炎患者の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た。本試験の結果、本研究で用いた方法(ウシLF1.8g 12週間経口摂取)ではLFはC型肝炎肝炎に対して有効ではないと結論された。

F. 健康危険情報

治療を受けた198人に、重篤な有害事象は認められなかった。報告された軽度な有害事象としては、好中球減少、 $\gamma$ GTP上昇、血糖上昇などが挙げられたが、プラセボ群と有意差は認められず、基礎疾患(C型肝炎肝炎)による影響と考えられた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 外国語論文

- 1) Ueno, H., Sato, T., Yamamoto, S., Tanaka, K., Ohkawa, S., Takagi H., Yokosuka, O., Furuse, J., Ishii, H., Sawaki, A., Kasugai, H., Osaki, Y., Fujishiro, S., Sato, K., Wakabayashi, K., Okusaka, T. Randomized, double-blind, placebo-control trial of orally administered bovine lactoferrin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, in press.
- 2) Okusaka, T., Ishii, H., Funakoshi, A., Yamao, K., Ohkawa, S., Saito, S., Saito, H., Tsuyuguchi, T. Phase II study of single-agent gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 2: 1-7 (2005)
- 3) Ueno, H., Okusaka, T., Ikeda, M., Takezako, Y., Morizane, C. An early phase II study of S-1 in patients with metastatic pancreatic cancer. *Oncology*, 68: 171-178 (2005)
- 4) Ueno, H., Okusaka, T., Ikeda, M., Ishiguro, Y., Morizane, C., Matsubara, J., Furuse, J., Ishii, H., Nagase, M., Nakachi, K. A phase I study of combination chemotherapy with gemcitabine and oral S-1 for advanced pancreatic cancer. *Oncology*, 69: 421-427 (2005)
- 5) Ikeda, M., Okusaka, T., Ueno, H., Takezako, Y., and Morizane, C. A phase II trial of continuous infusion of 5-fluorouracil, mitoxantrone and cisplatin for metastatic hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 103: 756-762 (2005)
- 6) Ikeda, M., Okusaka, T., Ueno, H., Morizane, C., Furuse, J., Ishii, H. A phase II trial of Uracil-tegafur (UFT) in patients with advanced biliary tract carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.*, 35: 439-443 (2005)
- 7) Morizane, C., Okusaka, T., Ito, Y., Ueno, H., Ikeda, M., Takezako, Y., Kagami, Y., and Ikeda, H. Chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic carcinoma in elderly patients. *Oncology*, 68: 432-437 (2005)
- 8) Yonemori, K., Ueno, H., Okusaka, T., Tamamoto, N., Ikeda, M., Saijo, N., Yoshida, T., Ishii, H., Furuse, J., Sugiyama, E., Kim, SR., Kikura-Hanajiri, R., Hasegawa, R., Saito, Y., Ozawa, S., Kaniwa, N., Sawada, J. Severe drug toxicity associated with a single-nucleotide polymorphis of the cytidine deaminase gene in a Japanese cancer patient treated with gemcitabine puls cisplatin. *Clin Cancer Res.*, 11: 2620-2624 (2005)
- 9) Saisho, T., Okusaka, T., Ueno, H., Morizane, C., Okada, S. Prognostic factors in patients with advanced biliary tract cancer receiving chemotherapy. *Hepato-Gastroenterol.*, 52: 1654-1658 (2005)
- 10) Takezako, Y., Okusaka, T., Ueno, H., Ikeda, M., Morizane, C., Najima, M. Phase II study of cisplatin, epirubicin and continuous infusion of 5-fluorouracil in patients with advanced intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterol.*, in press.
- 11) Honda, T., Okusaka, T., Kosuge, T., Tsuchida, A., Honda, K., Kikuchi, S. Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling, CAN-05-1851 Versuin 4. *Cancer Res.*, 65: 10613-10622 (2005)
- 12) Furuse, J., Ishii, H., Okusaka, T., Nagase, M., Nakachi, K., Ueno, H., Ikeda, M., Morizane, C., Yoshino, M. Phase I study of fixed dose rate infusion of gemcitabine in patients with unresectable pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol.*, 35: 733-738 (2005)
- 13) Takayasu, K., Muramatsu, Y., Mizuguchi, Y., Moriyama, N., Okusaka, T. Multiple non-tumorous arterioportal shunts due to chronic liver disease mimicking hepatocellular carcinoma: outcomes and the associated elevation of alpha-fetoprotein. *Gastroenterol Hepatol.*, 21: 288-294 (2005)
- 14) Ueno, H., Okusaka, T., Funakoshi, A., Ishii, H., Yamao, K., Ishikawa, O., Ohkawa, S., Saitoh, S. A phase II study of weekly irinotecan as first-line therapy for patients with metastatic pancreatic cancer. *Oncology*, in press.

#### 日本語論文

- 1) 奥坂拓志、上野秀樹、池田公史. 8. 原発性肝癌. 特集 エビデンスに基づいた癌化学療法. 外科 67: 434-440 (2005)
- 2) 奥坂拓志. 膵癌に対する治療方針と治療法の選択について: 内科的立場から. 特集 肝臓・胆道・膵癌に対する治療戦略. FOCUS on ONCOLOGY 3: 12-14 (2005)
- 3) 上野秀樹、奥坂拓志. 切除不能膵癌に対する化学療法、放射線療法. *Medical Practice* 22: 305-310 (2005)
- 4) 上野秀樹、奥坂拓志. 進行膵癌の化学療法—現状と将来. 特集 進行膵癌への挑戦. *消化器画像* 7: 667-672 (2005)

#### 2. 学会発表

- 1) 奥坂拓志、上野秀樹、池田公史、森実千種、NIK-333 (非環式レチノイド) の安全性について—NIK-333 第 I 相臨床試験の結果— 第 3 回日本臨床腫瘍学会総会、横浜、(2005 年 3 月)
- 2) 上野秀樹、奥坂拓志、池田公史、進行膵癌の予後改善を目指す治療戦略、第 9 1 回日本消化器病学会総会、東京、(2005 年 4 月)
- 3) Okusaka T., Ueno H, Ikeda M, Morizane C. A phase I and pharmacokinetic clinical trial of oral administration of the acyclic retinoid NIK-333.

- 41th ASCO, Orland (May 13-17, 2005)
- 4) Furuse J, Okusaka T, Funakoshi A, Boku N, Yamao K, Ohkawa S, Saito H. A phase II study of S-1 in patients with metastatic pancreatic cancer. 41th ASCO, Orland (May 13-17, 2005)
  - 5) Funakoshi A, Okusaka T, Ishii H, Yamao K, Ohkawa S, Saito H, Saito S, Tsuyuguchi T. A multicenter phase II study of gemcitabine (GEM) in patients with unresectable biliary tract cancer. 41th ASCO, Orland (May 13-17, 2005)
  - 6) Ishii H, Furuse J, Okusaka T, Yamao K, Funakoshi A, Ohkawa S, Boku N, Tanaka K, Nagase M. Retrospective analysis of systemic chemotherapy for unresectable advanced biliary tract cancer. 41th ASCO, Orland (May 13-17, 2005)
  - 7) Ueno H, Okusaka T, Saijo N, Furuse J, Ishii H, Yoshida T, Sugiyama E, Kim S, Najima N, Sawada J. Impact of cytidine deaminase genetic polymorphisms on gemcitabine kinetics and toxicity in Japanese cancer patients. 41th ASCO, Orland (May 13-17, 2005)
  - 8) Ikeda M, Ueno H, Okusaka T, Morizane C, Ito Y, Ikeda K. Phase II study of hyper-fractionated with protracted 5-fluorouracil infusion in patients with locally advanced pancreatic cancer. 41th ASCO, Orland (May 13-17, 2005)
  - 9) 池田公史、奥坂拓志、上野秀樹、森実千種、名嶋弥菜、小倉孝氏、門脈腫瘍栓を有する肝細胞癌に対する高用量塩酸エピルビシンによる肝動注化学療法、第 41 回日本肝癌研究会、千葉、(2005 年 6 月)
  - 10) 上野秀樹、奥坂拓志、西條 長宏、古瀬 純司、吉田 輝彦、鹿庭 なほ子、金 秀良、ゲムシタピンの投与を受けたがん患者を対象とした薬理ゲノムの研究、第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、(2005 年 9 月)
  - 11) 上野秀樹、池田公史、森実千種、奥坂拓志、進行膵癌に対する新しい化学療法の開発、DDW-Japan2005、神戸、(2005 年 10 月)
  - 12) 上野秀樹、奥坂拓志、西條長宏、石井 浩、鹿庭なほ子、澤田純一、吉田輝彦、ゲムシタピンの薬物動態および毒性に対する CDA 遺伝子 - 塩基多型 (SNP) の影響、DDW-Japan2005、神戸、(2005 年 10 月)
  - 13) 池田公史、奥坂拓志、上野秀樹、肝外転移を有する肝細胞癌に対する FMP 療法の治療成績と効果・予後因子、DDW-Japan2005、神戸、(2005 年 10 月)
  - 14) 松原淳一、奥坂拓志、切除不能膵癌患者におけるエコーガイド下経皮膵腫瘍針生検の安全性と有用性の検討、DDW-Japan2005、(2005 年 10 月)
  - 15) 奥坂拓志、舩越顯博、古瀬純司、朴 成和、山雄健次、大川伸一、齋藤 博、進行膵癌患者における S-1 後期臨床第 II 相試験、第 43 回日本癌治療学会、名古屋、(2005 年 10 月)
  - 16) 池田公史、奥坂拓志、伊藤芳紀、上野秀樹、森実千種、石井 浩、古瀬純司、河島光彦、加賀美芳和、池田 恢、局所進行膵がんに対する化学放射線療法 - 現状と展望 -、第 43 回日本癌治療学会、名古屋、(2005 年 10 月)
  - 17) 森実千種、奥坂拓志、上野秀樹、池田公史、米盛 勲、長井完治、廣川 智、名嶋弥菜、遠隔転移を有する膵がん患者の予後予測式の作成と検証、第 43 回日本癌治療学会、名古屋、(2005 年 10 月)
  - 18) 名嶋弥菜、奥坂拓志、上野秀樹、池田公史、森実千種、測定不能微小遠隔転移病変を有する膵癌例に対する放射線化学療法の臨床第 II 相試験、第 43 回日本癌治療学会、名古屋、(2005 年 10 月)
  - 19) 石井 浩、古瀬純司、奥坂拓志、上野秀樹、池田公史、舩越顯博、切除不能膵癌に対する塩酸ゲムシタピン・フルオウラシル併用化学療法の第 I / II 相試験、第 43 回日本癌治療学会、(2005 年 10 月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得 なし
  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 第3次対がん総合戦略研究事業

(分担)研究報告書

大腸 ACF を用いた大腸がん予防薬の評価

(分担) 研究者 高山哲治 札幌医大内科学第四講座

研究要旨 ヒトに大腸腺腫や癌の前病変と考えられる aberrant crypt foci(ACF)に対するアスピリンや NSAIDs の効果を検討した。初めに、アスピリンや種々の NSAIDs を服用する者を対象に ACF を観察したところ、非服用者に比べて ACF 数が有意に少ないことが明らかとなった。また、ACF を有する者を対象にこれらの薬剤を投与すると、ACF は数ヶ月後にアポトーシスを起こして消失することが明らかとなった。

A. 研究目的

我々はこれまで、拡大内視鏡を用いて大腸の微小病変である aberrant crypt foci(ACF)を観察し、健常人、大腸腺腫及び癌患者の ACF を解析することにより、ACF が adenoma-carcinoma sequence の precursor であることを報告した(N Engl J Med, 1998)。現在、「大腸腫瘍患者へのアスピリンによる発癌予防臨床試験」を計画中である。我々は、この臨床試験のなかで、アスピリンの効果半年後の ACF を評価することにより、短期間で評価しうるかどうかを調べる予定である。そこで、まずアスピリンや NSAIDs により ACF が実際に消失するかどうかを調べるとともに、ACF におけるアポトーシスの有無を検討した。さらに、動物モデルを用いて、ACF に対するアスピリンや NSAIDs の抑制効果と機序を検討した。

B. 研究方法

1) 対象

アスピリンまたはスリダク、ジクロフェナク、ロキソプロフェンなどの NSAIDs を服用している者 12 人を対象に下部直腸領域の ACF 数を検討した。また、大腸ポリープ切除術後の ACF を有する者 12 人を対象に、NSAIDs を投与し、ACF に対する抑制効果を検討した。

2) ヒト ACF の観察

ACF の観察は既報に従って行った。すなわち、拡大内視鏡を用いて total colonoscopy を施行したのち、下部直腸領域に 0.2%メチレンブルーを散布し、良

く洗浄して ACF を観察した。

3) アポトーシスの検出

ACF 組織のパラフィン包埋ホルマリン固定標本作製し、TUNEL 法によりアポトーシスの有無を検出した。

4) 動物発癌モデルに対する NSAIDs の効果

マウスにアゾキシメタンを投与し、スリダクを連日投与したのち 8 週後に大腸における ACF の評価を行った。

「倫理面への配慮」

本研究は、当院の倫理委員会の承認を得て行った。ACF の解析は、本研究の目的・意義を十分に説明し、文書による承諾を得た上で行った。また、データの解析は個人情報漏洩しないように十分な管理を行っている。

C. 研究結果

1) アスピリンや NSAIDs 服用者における ACF の解析

アスピリン服用者 4 例、スリダク服用者 3 例、ジクロフェナク服用者 4 例、ロキソフェナク服用者 3 例における平均 ACF 数は、 $1.8 \pm 0.9$  個であった。これは、同年齢の平均 ACF 数  $7.6 \pm 3.0$  個に比べて有意に低かった。

2) NSAIDs 投与による ACF 数の変化

ACF を有する者 5 例を対象にスリダク 300mg/日投与し、2~6 ヶ月後の ACF 数を検討した。その結果、投与前では平均  $9.7 \pm 3.5$  個であったが、投

与後では  $1.8 \pm 1.5$  個と有意に減少した。

### 3) ACF 組織におけるアポトーシスの検討

スリダク投与群と非投与群より ACF を生検採取し、TUNEL 染色によりアポトーシスの検討を行った。その結果、投与群では  $24 \pm 10\%$  の TUNEL 陽性細胞が認められ、対照群  $9.3 \pm 8.2\%$  に比べて高い傾向にあった。

### 4) 動物モデルにおける NSAIDs の効果

スリダクを投与したマウスにおける平均 ACF 数は、 $9.7 \pm 3.3$  個であり、対照群 ( $18.1 \pm 6.5$ ) より有意に少なかった。

## D. 考案

アスピリンや NSAIDs などの服用者では、ACF 数が少ないことが明らかとなった。これらの薬剤の服用者では、腺腫や癌の発生率が少ないことから、ACF が良いバイオマーカーになりうることを示唆された。また、スリダク投与により ACF 数が減少することが確かめられ、その機序としてアポトーシスが関与することが示唆された。さらに、これらの機序を明確にするため、今後マウスを用いた大腸発癌モデルで機序を検討する予定である。

尚、「大腸腫瘍患者へのアスピリンによる発癌予防臨床試験」は、プロトコールができあがり、参加施設も決定し、間もなく開始される見込みである。

## E. 結論

NSAIDs の投与により、ヒトの ACF は比較的短期間(数ヶ月間)にアポトーシスを起こして消失することが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Takayama T, et al. Aberrant crypt foci: Detection, Molecular abnormalities and Clinical Usefulness. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 3/7S1 pp. S42-S45, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) 高山哲治, 他. NSAIDs のヒト ACF に対する抑制効果とその機序の検討—家族性大腸

腺腫症 (FAP) と非 FAP 症例を比較して—, 第 28 回日本がん予防研究会、岐阜 (2005 年 7 月).

- 2) 高山哲治. シンポジウム「分子標的治療と chemoprevention の現状と展望」大腸癌の chemoprevention. 第 14 回日本癌病態治療研究会、札幌 (2005 年 6 月).

3)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特に無し。



家族性大腸腺腫症の予防に関する研究

分担研究者 石川秀樹 健康保険組合連合会 大阪中央病院消化器科 部長

研究要旨：大腸癌の超高危険度群である家族性大腸腺腫症に対する2つの発癌予防介入試験を企画、実施している。

第一の試験は、家族性大腸腺腫症患者に対して、食事指導と運動指導を行い、その上で、緑茶抽出物または無機能食品を2年間投与する無作為割付二重盲検試験である。2年目に行う大腸内視鏡検査における直腸の腺腫の増減を主エンドポイントとする。現在までに185名に予備登録を行い、83人が試験食品服用中である。現在、順調に試験は進行中で、2006年8月には緑茶抽出物が家族性大腸腺腫症の大腸腫瘍を抑制するか否かを明らかにできると考える。

第二の試験は、家族性大腸腺腫症100人に対する、多施設二重盲検無作為割付臨床試験であり、低用量アスピリン（100mg）腸溶錠1日1錠または偽薬を6カ月間投与する。主エンドポイントは、投与後6カ月から1年後の直腸粘膜の大腸腫瘍の増大の有無である。平成18年7月より試験開始予定である。

## A. 研究目的

本邦において大腸癌は急激に増加している。そのため、大腸癌発生予防法の開発が急がれる。発癌予防を行うためには、発癌の高危険度群集団を対象に行う方が効果的である。そこで我々は、大腸癌の超高危険度群である家族性大腸腺腫症患者を対象に食生活の変容と緑茶抽出物、低用量アスピリン腸溶錠の投与による2つの臨床試験を行うことにした。

## B. 研究方法

### 1) 緑茶抽出物による発癌予防介入試験

対象は家族性大腸腺腫症患者である。条件は、大腸に腫瘍性病変が100個以上存在することにより家族性大腸腺腫症と診断されたことがあるか、または、家系内に家族性大腸腺腫症患者がおり、APC遺伝子の保因者診断により、APC遺伝子の異常を指摘された者とする。その他の条件として、大腸切除の有無は問わないが、大腸粘膜が残っていること、年齢16歳以上、悪性疾患や重篤な疾患を参加呼びかけ時点で持っていないことである。

大腸癌の予防法として食生活指導、緑茶抽出物（GTE錠）、乳糖錠（NF錠）を用いる二重盲検法による無作為割付試験を採用した。A群は食生活指導+GTE

錠、B群は食生活指導+NF錠とする。

緑茶試験食品は緑茶抽出物（GTE錠）1日に緑茶抽出物約1g（959.4mg）であり、この量は、日本茶として約10杯に相当する。乳糖錠（NF錠）は乳糖を主体とした緑茶抽出物と外見上見分けのつかない錠剤である。これらを2年間投与する

食事指導は、脂肪摂取量の適正化（総摂取エネルギー量のうち、脂肪のしめる割合：18歳未満23～27%、18歳以上：18～22%）、豚肉・牛肉は1日80gまで、1日あたり野菜350g以上、イモ類の摂取を勧める、飲酒は2合程度まで、飲酒後下痢のしない程度、BMI（体重(kg)/身長(m)<sup>2</sup>乗）が25以下、禁煙指導、精製していない穀類の摂取を勧める、である。これらの指導は、平日3日間連続記録式食事調査を用いて、栄養士の電話による食事内容聞き取り調査の成績から食事指導を行う。

運動指導は、週5回以上、1日30分から60分のニコニコペースによる運動指導を行う。ニコニコペースは、運動負荷による乳酸上昇閾値の測定より計算する。他に、情報提供として、これまでの疫学的研究成果の紹介をニュースレターの形式で行う。

2000年8月1日から2001年7月31日までは、パイロット研究として、小麦ふすまおよび緑茶抽出物の投与は、大阪府立成人病センターに通院中の患者12名のみ行う。大阪府立成人病センター以外に

通院中の患者は、予備登録として食事指導および運動指導と付置研究を行い、2001年8月1日より、注腸造影検査や大腸内視鏡検査と調整しつつ、小麦ふすまおよび緑茶抽出物の投与試験への参加を呼びかける。

主エンドポイントは肛門縁から20cmの範囲における大腸腫瘍の2年間の増減である。目標数は各群40人、全体で80人である。

倫理的配慮としては、本研究のために設置された関西及び関東の患者会の代表者2名を含む倫理モニタリング委員会及び、各参加施設の倫理委員会の承認を得ている。本試験の対象者に対しては、本試験の説明を面接により十分に行い、理解を得たことを確認した上で、本人の自由意思による参加同意を得る。参加同意の証拠は、本人の署名による。対象者の選定では、参加を呼びかける研究者と利害関係のない者を選び、ボランティアとしての参加であることを十分に説明する。試験に参加しなくとも不利益を受けないこと、いつでも参加を取り消すことができること、などについて小冊子を用いながら説明する。本研究で得られた情報は、鍵のかかるロッカーで管理し、それらを見ることのできる人間を限定する。個人情報を知ることのできる研究者および研究補助者の一覧は参加者に伝える。

## 2) アスピリンによる発癌予防介入試験

対象、条件、食事指導、運動指導は、緑茶抽出物による試験と同じである。

多施設による二重盲検無作為割付試験とし、参加者は1)低用量アスピリン(100mg)腸溶錠を投与する群、2)偽薬を投与する群の2群に分ける。大腸内視鏡検査を行ってから試験を開始し、次の大腸内視鏡検査まで試験薬を投与する。投与期間は6カ月とする。目標数は各群50人、全体で100人である。

### (倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省や関連学会等が示す指針に従って実施する。参加施設はすべて各施設の倫理委員会の承認を得てから試験を開始する。参加呼びかけは面接により行い、インフォームドコンセントを得た場合、書面により記録を残す。参加を拒否しても一切の不利益を受けないこと、いつでも参加同意を取り消す権利を持つことなどを説明する。すべての個人情報や研究データは厳重な管理のもとに置き、守秘を徹底する。本試験研究者と独立した倫理モニタリング委員会を設置し、試験の進捗をモニターするシステムを整える。

## C. 研究結果

### 1) 緑茶抽出物による発癌予防介入試験

2000年8月より参加呼びかけ開始、2002年3月まで大阪府立成人病センターにおけるパイロット試験では12名に参加を呼びかけ、1名は予防試験の参加を拒否、その他は参加を同意し、緑茶抽出物試験食品を服用、2003年3月までに2年目の内視鏡は完了した。予備登録では185人が参加し、これまでに83

人が試験食品の服用を開始している。参加募集は完遂し、試験は順調に進み、2年目の大腸内視鏡検査実施中である。重篤な有害事象は認めていない。

### 2) アスピリンによる発癌予防介入試験

倫理モニタリング委員会による審査を受け、承認を得た。ドイツのバイエル本社より低用量アスピリン腸溶錠と偽薬を輸入し、PTPシート包装を行った。参加施設の倫理委員会の審査準備中である。

## D. 考察

家族性大腸腺腫症は大腸にきわめて多数の腺腫が発生し、若年より大腸癌を発生する遺伝性疾患であり、原因遺伝子として癌抑制遺伝子のAPC遺伝子やMYH遺伝子が見出されている。本疾患と診断された場合、通常は大腸癌の予防のため大腸摘除術が行われるが、大腸摘出により頻回の下痢が起こるため、患者の生活の質(QOL)は著しく低下する。従って、腺腫の増大や大腸癌の発生を予防する方法の開発が強く望まれている。

また、分子生物学的に散発性大腸癌と発癌機序が類似するため、家族性大腸腺腫症に対する発癌予防技術は、散発性大腸癌の予防法の開発にも重要な知見となり得る。

これまでに、われわれは食事指導や生活指導、食品成分の投与などによる臨床試験を行い、多くの大腸癌予防に関する知見を得てきたが、それらによる予防効果は比較的軽度であった。そこで今回は、薬剤を用いたさらに強力な大腸癌予防法の開発を研究の目的とした。

NSAIDsの一つであるインドメサシンが化学発癌によるラット大腸癌の発生を予防することを1980年にKudoらが最初に見いだして以来、ラットやマウスを用いた実験で各種のNSAIDsが大腸発癌を予防すると報告されている。また、人においても、アスピリンの長期服用者に大腸癌の罹患が少ないことが、症例対照研究やコホート研究で報告されている。これらより、アスピリンを含むNSAIDsは大腸癌を予防する可能性があると考えられたが、NSAIDsを長期間服用すると消化管傷害による潰瘍や出血などの副作用が発生する問題がある。その対策として、プロドラッグのためその他のNSAIDsに比べて消化管傷害が比較的少ないとされるスリダクを用いた臨床試験が多く行われてきた。スリダクを用いた臨床試験は1983年にWaddellらが家族性大腸腺腫症患者4例に対してスリダクを投与し、直腸のポリープがほとんど消失したことを報告したのが最初である。その後、多数の臨床試験が行われ、それらの報告のすべてで、スリダクは家族性大腸腺腫症のポリープを退縮させると報告されている。その機序として、スリダクがアポトーシスを亢進させることが考えられている。

しかし、スリダクやその他のNSAIDsの投与により、消化管の潰瘍や穿孔などの重篤な副作用が報告されている。さらに、スリダクを投与してポリープは退縮したにも関わらず、進行癌が発生したとの症例が複数、報告されている。本当にスリダク

が大腸癌を予防するかどうかは、長期間の追跡調査などにより慎重に検討する必要がある。

正常の粘膜では発現していない cyclooxygenase-2 (COX2) が大腸癌組織では発現していることから、COX2 が大腸癌に関与していると考えられること、正常の消化管粘膜には COX2 は発現していないため COX2 を阻害しても消化管粘膜に傷害を与える可能性が低いことなどから、最近になり、celecoxib や rofecoxib などの COX2 選択的阻害剤による臨床試験が行われ、米国では、家族性大腸腺腫症に対するポリープの縮小を目的とした celecoxib 投与が承認されていた。しかし、2005 年になり、celecoxib や rofecoxib による大規模な大腸腺腫発生予防試験において、COX2 選択的阻害剤の長期投与により心血管イベントが 2 倍程度上昇することがわかり、これらの COX-2 選択的阻害剤の使用は困難となっている。

スリダク以外の NSAIDs ではインドメサシンの坐剤や経口投与による臨床試験が行われている。インドメサシンでも大腸ポリープは減少するが、消化管粘膜傷害による貧血も報告されており、長期間の継続した投与には問題が多いと考える。

本来、スリダクなど鎮痛剤として開発された薬は慢性リウマチなどによる疼痛に対する鎮痛を目的として用いられるものであり、長期間、連続して大量に使用することを念頭に置いては開発されていない。短期間では副作用が出なくても 1 年以上投与後に突然、胃穿孔などの重篤な副作用が発生することもあるため、長期間の投与には厳重な注意が必要である。

低用量アスピリン腸溶剤はバイアスピリンとして狭心症や心筋梗塞の治療に広く用いられている。この治療ではバイアスピリンは長期間の投与が原則であり、長期間投与の安全性はきわめて高いと考えられる。そこで、私たちは本試験で用いる NSAID はバイアスピリンと同じ低用量アスピリン腸溶錠 (100mg) 1 日 1 錠投与と決定した。

家族性大腸腺腫症に対する化学予防臨床試験では、アスピリンを用いた報告はほとんどなく、日本でもこれまでに臨床試験は行われていない。従って、本試験は実施する価値があると判断し、試験を企画した。

## E. 結論

家族性大腸腺腫症患者に対する予防介入試験として、2006 年 8 月には緑茶抽出物の評価ができ、さらに 2009 年 12 月には低用量アスピリン腸溶錠の評価が出すことができると考える。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 石川秀樹、飯石浩康. 大腸癌増加と食生活—食事を中心に、消化器内科、19:1769-1775 (2004)
2. Kaji, I., Kasugai, H., Takenaka, A., Ishikawa, H., Inoue, A., Iishi, H., Ishiguro, S., and Tatsuta, M. Outcome of 51 nonmalignant nodules in the liver: usefulness of aspiration cytology for diagnosis of dysplastic nodules. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 23: 425-431 (2004)
3. Ishikawa, H., Akedo, I., Otani, T., Suzuki, T., Nakamura, T., Takeyama, I., Ishiguro, S., Miyaoka, E., Sobue, T., and Kakizoe, T. Randomized trial of dietary fiber and Lactobacillus casei administration for prevention of colorectal tumors. *Int. J. Cancer.*, 116: 762-767 (2005)
4. Ichihara, T., Tamano, S., Yoshino, H., Imaida, K., Ishikawa, H., Kakizoe, T., and Shirai, T. Lack of chemoprevention or promotion effects of docosahexaenoic acid on small intestine, colon, liver, lung, thyroid, esophagus, kidney, and forestomach carcinogenesis in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. *J. Toxicol. Pathol.*, 18: 53-59 (2005)
5. Tokudome, S., Soeripto, Triningsih FX, Ananta, I., Suzuki, S., Kuriki, K., Akasaka, S., Kosaka, H., Ishikawa, H., Azuma, T., and Moore, MA. Rare Helicobacter pylori infection as a factor for the very low stomach cancer incidence in Yogyakarta, Indonesia. *Cancer Lett.*, 28: 57-61 (2005)
6. 石川秀樹、中村富予、竹山育子. 肥満と癌. *アディポサイエンス*. 2: 157-160 (2005)
7. 石川秀樹. 遺伝性大腸癌の癌予防の現状と将来の展望. *癌と化学療法*. 32: 973-976 (2005)
8. 石川秀樹、中村富予、竹山育子. 大腸がん予防のための腸内環境コントロール. *臨床栄養*. 107: 300-303 (2005)
9. Jiang, J., Gajalakshmi, V., Wang, J., Kuriki, K., Suzuki, S., Nakamura, S., Akasaka, S., Ishikawa, H., and Tokudome, S. Influence of the C161T but not Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on colorectal cancer in an Indian population. *Cancer Sci.*, 96: 507-512 (2005)
10. Wang, J., Gajalakshmi, V., Jiang, J., Kuriki, K., Suzuki, S., Nagaya, T., Nakamura, S., Akasaka, S., Ishikawa, H., and Tokudome, S. Associations between 5, 10-

- methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 genetic polymorphisms and environmental factors with reference to susceptibility to colorectal cancer: A case-control study in an Indian population. *Int J Cancer.*, 118; 991-997(2005)
11. 石川秀樹. 家族性大腸腺腫症の化学予防、家族性腫瘍、6:33-35(2006)
  12. Hirata, K., Kanemitsu, S., Nakayama, Y., Nagata, N., Itoh, H., Ohnishi, H., Ishikawa, H., and Furukawa, Y. HNPCC registry and genetic testing project of the Japanese society for cancer of the colon and rectum (JSCCR). A Case of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer with Novel Germline Mutation of MSH2, Associated with Liposarcoma of the Thigh. *Am J Gastroenterology.*, 101: 193-196(2006)
  13. Jiang, J., Wang, J., Suzuki, S., Gajalakshmi, V., Kuriki, K., Zhao, Y., Nakamura, S., Akasaka, S., Ishikawa, H., and Tokudome, S. Elevated risk of colorectal cancer associated with the AA genotype of the cyclin D1 A870G polymorphism in an Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 132; 193-199(2006)
  14. Katsuki, T., Hirata, K., Ishikawa, H., Matsuura, N., Sumi, S., and Itoh, H. Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *J Nutr.*, 136(3):847S-851S(Mar 2006)
  15. Matsuura, N., Miyamae, Y., Yamane, K., Nagao, Y., Hamada, Y., Kawaguchi, N., Katsuki, T., Hirata, K., Sumi, S., and Ishikawa, H. Aged garlic extract inhibits angiogenesis and proliferation of colorectal carcinoma cells. *J Nutr.*, 136(3):842S-846S. (Mar 2006)
  16. Ishikawa, H., Saeki, T., Otani, T., Suzuki, T., Shimosuma, K., Nishino, H., Fukuda, S., and Morimoto, K. Aged garlic extract prevents a decline of NK cell number and activity in patients with advanced cancer. *J Nutr.*, 136(3):816S-820S(Mar 2006)
2. 学会発表
    1. 澤田尚子、梶本仙子、石川秀樹、大野秀樹  
脳静脈洞血栓症を合併した潰瘍性大腸炎の1例、第82回日本消化器病学会近畿支部例会、大阪(2005年2月)
    2. 梶本仙子、澤田尚子、大野秀樹、石川秀樹、石黒信吾、腫瘍性病変と鑑別が困難な炎症性ポリープを合併した潰瘍性大腸炎の1例、第74回日本消化器内視鏡学会近畿地方会、大阪(2005年3月)
    3. 石川秀樹、梶本仙子、澤田尚子、大野秀樹、大腸腺腫を認めない APC 遺伝子病的変異保有者の1例、第74回日本消化器内視鏡学会近畿地方会、大阪(2005年3月)
    4. 石川秀樹、遺伝性大腸癌 (FAP・HNPCC) に対する発癌予防介入試験、第2回日本癌学会カンファレンス講演、長野(2005年3月)
    5. 石川秀樹、医学論文と統計、第2回鬼怒川フォーラム教育講演、栃木(2005年3月)
    6. 石川秀樹、介入試験による大腸癌予防のための生物学的指標の開発、第64回日本癌学会、札幌、(2005年9月)
- H. 知的所有権の取得状況
- なし