

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 ……	124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 ……	129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 ……	134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 ……	142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 ……	148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 ……	152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 ……	156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 ……	160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 ……	167
第3分野			
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 ……	175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 ……	185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 ……	194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 ……	200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 ……	210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 ……	218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 ……	226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 ……	235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 ……	243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 ……	252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 ……	257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ ……	261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法的确立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

食品添加物等の新機能性に関する研究

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
研究者 広瀬 雅雄

研究要旨 フラボノイドを主成分とする酵素処理イソクエルシトリン、ヤマモモ抽出物あるいはムラサキトウモロコシ色素の発がん抑制作用について解析している。酵素処理イソクエルシトリンについては、ラット大腸中期発がん性試験法及びラット肝中期発がん性試験法の標準的スケジュールに従い、ヤマモモ抽出物についてはラット大腸中期発がん試験法により、0.01, 0.1 及び 1%濃度で混餌投与した。その結果、大腸中期試験法の 10 週剖検群では、いずれの被験物質も腫瘍発生に対し影響を示さなかった。大腸中期試験法の 20 週剖検群及び肝中期発がん試験法については実験を継続しており、それらの結果をあわせて最終評価する。また、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにおいて乳腺発がん抑制作用の示されたムラサキトウモロコシ色素は、同ラットの乳腺腫瘍由来細胞株に対し、細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘発作用を示した。

分担研究者

- (1) 名古屋市立大学大学院医学研究科
分子毒性学分野 津田洋幸
- (2) 香川大学医学部腫瘍病理学 今井田克己
- (3) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
学術部 鈴木幸雄

A. 研究目的

種々の天然物質のがん予防作用に関して多くの研究が進められているが、isothiocyanate のように予防物質として期待されていたものの中には (Yu et al., Cancer Res., 58:402-8, 1998) 発がん性が認められるなど毒性面で問題となる物質も多い (Ogawa, Hirose et al., Nutr. Cancer, 40, 134-9, 2001)。一方、現在多くの天然添加物が流通しており、これらの安全性については検討が進められている。それらの中には、ポリフェノール類や含硫化合物など、がん予防が期待される物質が数多く含まれているが、一般的にいずれの臓器組織を対象にした予防に関しても評価方法が複雑で、解析に長期間を要することから殆ど検討されていない。大腸発がんに関しては、予防物質のスクリーニングに用いられてきた腫瘍性病変を最終指標とした試験法は 30~40 週間と長期間を要することから、多数の物質を対象とした研究の立遅れがみられ、aberrant crypt foci (ACF) を指標にしたラット短期大腸試験法を用いた研究が多数報告されているが、中・長期試験での腫瘍発生と必ずしも一致しないものもあり (Zheng et al., Carcinogenesis, 20, 255-60, 1999)、適切な試験法を用いてがん予防物質を探索することが期待されている。乳腺発がんに関しては、腫瘍性病変を最終指標とした試験法が広く用いられているが、30~40 週間と長期間を要することから、多数の物質を対象とした研究の立遅れがみられる。一方、

肝発がんに関しては、ラット肝における前がん病変として広く認知されている胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巣を指標とした肝中期発がん性試験法により、多数の化学物質の発がん修飾性が検証されている。本研究では、我々が新たに開発した大腸発癌物質の 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) と大腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸 (DSS) の組合せ投与による腫瘍性病変を最終指標としたラット大腸中期発がん性試験法及びヒトプロト型 *c-Ha-ras* を導入したトランスジェニックラット (Hras128) 乳腺発がん高感受性モデル、前がん病変を指標として化学物質の発がん性を比較的短期間に高い信頼性を持って予測できるシステムとして確立されたラット肝中期発がん性試験法を用いて、既存添加物を中心としてそのがん予防作用を検討する。

今年度はルチンの水に対する溶解度向上を図るためにその糖鎖構造を変換させ、フラボノイドである α -グリコシルイソクエルシトリンを主成分とする酵素処理イソクエルシトリン、及びヤマモモ (*Myrica rubra* SIEBOLD) より抽出して得られ、やはりフラボノイドであるミリシトリンを有効成分とするヤマモモ抽出物について検討を行った。フラボノイドはフェノール性水酸基を多数含むことから抗酸化作用を示し (Herrmann et al., J. Food. Technol., 11, 433-448, 1976)、酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物ともに酸化防止剤として使用されている。フラボノイドについてはがん予防作用に関する報告もみられ (Feng et al., Free Radic. Res. 35, 779-788, 2001)、azoxymethane によるイニシエーション後、クエルセチン類縁化合物であるルチン、クエルセチンあるいはモリンを投与したラットモデルにおいて、大腸 ACF 発生の抑制作用が報告されている (Wargovich et al., Carcinogenesis, 21, 1149-1155, 2000; Tanaka et al., Oncol. Rep., 6, 1333-

1340, 1999)が、腫瘍性病変を指標としたモデルでの検討は行われていない。また、クエルセチンを投与したラット乳腺発がんモデルでは、腫瘍の発生を抑制したとの報告がある(Verma et al., Cancer Res., 48, 5754-5758, 1988)。なお、酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物についてはラットを用いた反復投与毒性試験、遺伝毒性試験などが行われ、その安全性は確認されている。今回、酵素処理イソクエルシトリンについては、腫瘍性病変を最終指標としたラット中期大腸発がん試験法及びラット肝中期発がん性試験法により、ヤマモモ抽出物については中期大腸試験法により、最高1%濃度で混餌投与した際の発がん修飾作用を検討した。また、16年度にヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにおいて乳腺発がん抑制を示すことが明らかとなったムラサキトウモロコシ色素については、同ラットの乳腺腫瘍由来細胞株を樹立し、細胞増殖及びアポトーシス誘導に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

(1) ラット大腸中期発がん性試験法では、6週齢のF344雄ラットを各群30匹の7群に分け、DMH(40mg/kg体重)を1週間に3回皮下投与した後、DSS(1%)を1週間飲水投与し、DSS投与終了後1週間は蒸留水及び基礎飼料のみを与えた。4週目より各群に酵素処理イソクエルシトリンあるいはヤマモモ抽出物を0.01、0.1及び1%濃度で10及び20週目まで混餌投与し、この間基礎飼料のみを与えた群を対照とした。投与期間終了後剖検時に摘出した大腸を切開し、0.2%のメチレンブルーにより粘膜染色を行い、実体顕微鏡下にてACFの計測を行った。その後、10週剖検群については、肉眼的にみられた結節の大きさを計測した後、大腸組織を短冊状に縦に3分割あるいは肉眼的に観察された結節性病変を全て切出し、パラフィン包埋切片、HE標本を作製し、病理組織学的検索を行った。20週剖検群については現在、実験を継続している。

(2) ラット肝中期発がん性試験法では、6週齢のF344雄ラットを5群に分け、1から4群には肝発癌物質であるジエチルニトロサミン(DEN, 200mg/kg体重)を1回腹腔内投与した。第5群にはDENの溶媒である生理食塩水を投与した。2週後から、1から4群にはそれぞれ、酵素処理イソクエルシトリンを0、0.01、0.1及び1%濃度で混餌投与し、5群には1%の酵素処理イソクエルシトリンを投与した。すべての動物は実験開始3週目で2/3肝部分切除を行った。実験は8週で終了して屠殺剖検し、肝臓を摘出、ホルマリン固定し、パラフィン包埋切片、HE染色標本を作製するとともに、抗GST-P抗体を用いて肝に対する免疫染色を行う。GST-P陽性細胞巢は画像処理装置を用いて定量的に解析し、肝臓の切片全体の面積に対する発生個数、ならびに面積を算出し、各群毎に統計学的に比較検討する。

(3) 酵素処理イソクエルシトリンあるいはヤマモ

モ抽出物を0.01~1%濃度で飼料に混じり、室温、1日14時間散光下の開放系にて最長4週間にわたり放置した時の安定性について、HPLCにより測定した。指標ピークは、酵素処理イソクエルシトリンでは保持時間の最も大きい方から3番目のピーク(G2)、ヤマモモ抽出物ではミリシトリンとした。

(4) ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットの乳腺腫瘍由来細胞株に関しては、同ラットにジメチルベンズ(a)アントラセン(DMBA)を投与することにより発生したDMBA誘発乳腺腫瘍を用いた。腫瘍組織を0.2% Collagenase type I, 0.1% Hyaluronidaseと5%FCSを含む199培地中で2時間処理し、40 μ m フィルターに通して得られた細胞を5%FCS, 5 μ g/ml Insulin, 0.5 μ g/ml Hydrocortisone, 0.1 μ g/ml Progesteroneを含むDMEM/F12培地で2時間培養し、培養皿に接着しなかった細胞を新しい培養皿に移すことにより上皮細胞を得た。2回の限界希釈を行うことにより、単一コロニー由来の細胞を得て細胞株とし、10%FCS DMEM 中で培養した。細胞増殖試験は、96ウェルプレートに1.0 x 10⁵ cells/mlの乳がん細胞を播種し、翌日にムラサキトウモロコシ色素を2 mMから約2 μ M(主成分であるシアニジン-3-*o*-s-グルコシダーゼの濃度に換算)の濃度で培地に添加した。添加24時間後、ムラサキトウモロコシ色素の細胞増殖に与える影響をCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega)により測定した。アポトーシス誘発については、6 cm dishに1.0 x 10⁵ cells/mlの濃度で乳がん細胞を播種し、翌日0.1、0.25及び0.5 mM濃度のムラサキトウモロコシ色素培地に添加した。24時間後にDNAを抽出しアガロースゲル電気泳動を行いDNAラダーによりアポトーシスの誘導を検出した。また細胞株を用いた実験とは別に、発がん実験として7週齢の野生型SD雌ラット各群12匹にDMBAを25 mg/kg体重の用量で一回強制経口投与し、翌日よりムラサキトウモロコシ色素を0及び1%の濃度で20週間の予定で混餌投与している。実験期間中、毎週、乳腺腫瘍の発生を触診で確認している。

(倫理面への配慮)動物実験は国立医薬品食品衛生研究所、名古屋市立大学大学院医学研究科あるいは香川大学の規定に従って行った。なお、投与は混餌、飲水による経口投与が主体であり、屠殺はエーテル深麻酔下、動脈からの脱血により行い、動物へ苦痛を最小限に留めた。その他実験手技についても動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究成果

(1) ラット大腸中期発がん性試験法では、酵素処理イソクエルシトリンあるいはヤマモモ抽出物の投与による一般状態、体重及び摂餌量への影響は、10週剖検群については投与期間を通じて認められなかった。20週剖検群については、現在15週目であるが影響は認められていない。ACFの発生数については、10週剖検群におけるACFの発生数は0.1%酵素処理イソクエルシトリン群で有意に(p<0.05)増加し、

1%ヤマモモ抽出物群で有意に ($p < 0.05$) 減少したが、*dysplastic foci*, adenoma 及び adenocarcinoma の発生頻度及び発生数については影響がみられなかった。1 及び 0.1%ヤマモモ抽出物群で結節性病変の体積が減少傾向を示したが、統計的に有意な差は認められなかった。20 週剖検群については現在、実験を継続している。

(2) ラット肝中期発がん性試験法については、ラットに DEN 及び被験物質の投与を行うとともに、2/3 肝部分切除を行い、現在、実験 8 週目の屠殺前の段階である。

(3) 酵素処理イソクエルシトリンについては、調製時の飼料中濃度 0.01, 0.10 及び 1.02% に対し、1, 2, 4 週後のいずれにおいても 0.01, 0.10 及び 0.98 ~ 1.02% であった。ヤマモモ抽出物については、調製時濃度 0.01 及び 1.01% に対し、1, 2, 4 週後のいずれにおいても 0.01 及び 1.00 ~ 1.02% であった。

(4) ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットに発生した DMBA 誘発乳腺腫瘍から 7 系統の細胞株 (C1, C2, C3, C6, C11, C15, C17) を樹立した。これらラット乳がん細胞株のヒト *c-Ha-ras* 遺伝子の変異を検索したところ、7 系統全てにおいてコドン 12 の変異、さらに C2, C11 と C15 の 3 系統においてコドン 61 の変異が検出された。また、C11 においては p53 のコドン 246 の変異が検出された。C3, C11, C17 の 3 系統の乳がん細胞株を用いてムラサキトウモロコシ色素の細胞増殖活性に与える影響を検討した。その結果、ムラサキトウモロコシ色素添加 24 時間後の細胞数は濃度依存的に減少し、0.25 mM の濃度で用いた 3 系統全ての細胞株において未処理群に比べ細胞数の有意な減少がみられた。高濃度のムラサキトウモロコシ色素により細胞数の有意な減少が認められたことから、細胞増殖活性の抑制並びにアポトーシスの誘導が示唆された。死細胞が多くみられたことから、まずは乳がん細胞に対するアポトーシスへの影響を検討した。乳がん細胞をムラサキトウモロコシ色素で 24 時間処理した後、DNA を抽出し DNA に断片化がおきているか検討した。その結果、0.5 mM の濃度で DNA の分解は起こっているが、明らかな断片化は今回の条件では観察されなかった。

野生型 SD ラットにおける DMBA 誘発乳腺腫瘍の発生頻度は 13 週が経過した時点で、対照群の 27.3% (3/11) に対し 1%ムラサキトウモロコシ投与群で 8.3% (1/12) と低下傾向がみられた。

D. 考察

ラット大腸中期発がん性試験法では、DMH-DSS 処置後に酵素処理イソクエルシトリンあるいはヤマモモ抽出物を 0.01, 0.1 及び 1%濃度で 10 週目まで混餌投与した結果、基礎飼料のみを与えた対照群と比較して ACF の発生数が 0.1%酵素処理イソクエルシトリン群で有意に増加したものの用量依存性はなかった。1%ヤマモモ抽出物群では ACF 数が有意に減少し、他のフラボノイドに関する報告 (Wargovich et al., *Carcinogenesis* 21, 1149-1155, 2000; Tanaka et al., *Oncol. Rep.* 6, 1333-

1340, 1999) と同様の結果が得られた。しかし、腫瘍性病変の発生頻度、発生数、体積に対する酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物の明らかな影響は認められなかった。20 週剖検群の結果をあわせて最終評価する。

ラット肝中期発がん性試験法による実験については、現在 8 週目の屠殺前の段階であり、剖検終了後、肝臓の病理組織標本を作製するとともに、GST-P 免疫染色を行い、画像処理装置を用いて定量的に解析して最終評価する。

ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラット乳腺発がん高感受性モデル用いた研究では、16 年度にムラサキトウモロコシ色素が DMBA 誘発乳腺腫瘍の発生を抑制することを明らかにした。今年度、実験途中ではあるが野生型ラットにおいてもムラサキトウモロコシ色素が DMBA 誘発乳腺腫瘍の発生を抑制する傾向を示しており、遺伝子改変動物だけでなく、野生型ラットにおいても同様の効果のあることが示唆された。また、乳がん細胞株を用いた実験結果より、ムラサキトウモロコシ色素が乳がん細胞の増殖を抑制、あるいはアポトーシスを誘導する可能性が示された。今後、細胞増殖、アポトーシス関連の遺伝子あるいはタンパク発現変化を検討することにより、その機構を明らかにする。

E. 結論

酵素処理イソクエルシトリンについては、ラット大腸中期発がん性試験法及びラット肝中期発がん性試験法により、ヤマモモ抽出物についてはラット大腸中期発がん試験法により、それらの発がん抑制作用について解析している。その結果、大腸中期試験法の 10 週剖検群では、いずれの被験物質も腫瘍発生に対し影響を示さなかった。大腸中期試験法の 20 週剖検群及び肝中期発がん試験法については、実験を継続しており、それらの結果をあわせて最終評価する。また、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにおいて乳腺発がん抑制作用の示されたムラサキトウモロコシ色素は、同ラットの乳腺腫瘍由来細胞株に対し、細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘発作用を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Hirose, M.: A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoint for detection of carcinogenesis modifiers - validation with known modifiers. *Cancer Lett.* 232:272-278 (2006)
- (2) Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Bechberger, J., Ohnishi, T., Fujita, K., Naus, C.C., Kusunoki, M., Tsubura, A., Tsuda, H. Establishment of an apoptosis-sensitive rat mammary carcinoma cell line with a mutation in the DNA-binding region of p53. *Cancer Lett.* 232: 279-288 (2006)
- (3) Tsuda, H., Fukamachi, K., Ohshima, Y., Ueda,

- S., Matsuoka, Y., Hamaguchi, T., Ohnishi, T., Takasuka, N., Naito, A. High susceptibility of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats to carcinogenesis: a cancer-prone animal model. *Cancer Sci.* 96: 309-316 (2005)
- (4) Zeng, Y., Saoo, K., Yokohira, M., Takeuchi, H., Yamakawa, K., Matsuda, Y., J.Q. Li, Imaida, K. Dietary D-psicose, a rare sugar, does not show any modifying effects in a medium-term liver carcinogenesis bioassay in F344 male rat. *J. Toxicol. Pathol.* 18: 85-88 (2005)
- (5) Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nakae, D., Tsuda, H., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M., Furukawa, F. Lack of potential of low dose N-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesions, glutathione S-transferase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett.* 222: 11-15 (2005)

2. 学会発表

- (1) 太田世志雄, 今井俊夫, 曹 永暁, 蓮村麻衣, 広瀬雅雄: ラット中期大腸発がん試験法におけるムラサキトウモロコシ色素の発がん修飾作用. 第22回日本毒性病理学会(2006)

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社