

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

## 目 次

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 ……	589
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 ……	636
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 ……	656
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 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
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 ……	691
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 ……	707
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 ……	720
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 ……	728
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 ……	740
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 ……	761
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 ……	772
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 ……	783
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 ……	795
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 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
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 ……	836
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 ……	839
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 ……	919
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 ……	939
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の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
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 ……	966

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 ……	979
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 ……	1000
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 ……	1021
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 ……	1042
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 ……	1054
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 ……	1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 ……	1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 ……	1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 ……	1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 ……	1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 ……	1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 ……	1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 ……	1115

## 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、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た。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、ラット肝中期発がん性試験法及びヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットを用いた乳腺発がん高感受性モデルの標準的スケジュールに従い、0.01、0.1及び1%濃度で混餌投与した。その結果、大腸発がんに対して抑制作用を有することが示唆されたが、用量反応性はなかった。肝中期試験法では有意な抑制は示されなかった。*c-Ha-ras* トランスジェニックラットを用いた実験は、現在継続している。イソクエルシトリンについては、大腸中期発がん性試験法及び肝中期発がん性試験法の標準的スケジュールに従い、0.01、0.1及び1%濃度で混餌投与した。その結果、大腸中期試験法では10週剖検群において明らかな効果はみられなかった。現在20週剖検群の実験を継続している。肝中期試験法の実験は、現在継続している。ヤマモモ抽出物については、大腸中期発がん性試験法の標準的スケジュールに従い、0.01、0.1及び1%濃度で混餌投与した。その結果、20週剖検群において1%投与により大腸発がん抑制作用を示す結果が得られた。また、16年度の研究でヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにより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、野生型ラットにおいてもDMBA誘発乳腺発がんを抑制し、その機序として細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘発作用の関与していることが示唆された。

### 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 類 (Yu et al., *Cancer Res.*, 58:402-8, 1998) のように予防物質として期待されていたものの中には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 (Ito et al., *Cancer Sci.*, 94:3-8, 2003)。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ナトリウム (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。

昨年度は、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て得られ、フラボノイドである $\alpha$ -glycosyl-isoquercitrin 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 et Zucc) 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始めた。また今年度は、酸化防止剤として使用され、デキストリン存在下で糖転移酵素を作用させて酵素処理イソクエルシトリンを生成する前の親化合物であるイソクエルシトリン

(isoquercitrin; quercetin-3-glucoside) について検討を開始した。更に、16年度の研究でヒトプロト型 *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についても検討を継続した。

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、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)、ラットにアゾキシメタンによるイニシエーション後、クエルセチン類緑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実験において、大腸 ACF 発生の抑制作用が報告されているが (Wargovich et al., *Carcinogenesis*, 21:1149-55, 2000, Tanaka et al., *Oncol. Rep.*, 6:1333-40, 1999)、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、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、ラット肝中期発がん性試験法及びヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットを用いた乳腺発がん高感受性モデルにより、イソクエルシトリンについては、大腸中期発がん性試験法及び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、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、野生型ラットにおける DMBA 誘発乳腺発がんに対する抑制作用、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。第 4 週より各群に酵素処理イソクエルシトリン ( $\alpha$ -glycosyl-isoquercitrin のルチン換算含量: 78.7%) 及びヤマモモ抽出物 (ミリシトリン含量: 98.8%) を 0.01、0.1 及び 1%濃度で 7 及び 17 週間混餌投与し、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 (10 週剖検群)。その後、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 標本作製した (10 週間及び 20 週剖検群)。また、イソクエルシトリン (無水物換算含量: 95.3%) についても同様の方法で検討している。

(2) ラット肝中期発がん性試験法では、6 週齢の F344 雄ラットを各群 20 匹の 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 週間後から、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、肝臓を摘出し、パラフィン包埋切片、HE 染色標本作製するとともに、抗 GST-P 抗体を用いて肝に対する免疫染色を行った。GST-P 陽性細胞数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た。また、イソクエルシトリンについても同様の方法で検討している。

(3) ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットを用いた乳腺発がん高感受性モデルでは、7 週齢のトランスジェニックラット各群 12 匹にジメチルベンズ (a) アントラセン (DMBA, 25mg/kg 体重) を 1 回強制経口投与し、翌日より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 8 週間の予定で混餌投与している。

野生型ラットの DMBA 誘発乳腺発がんモデルを用いた実験では、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、混餌投与した。実験期間中、毎週、乳腺腫瘍の発生を触診で確認した。

ムラサキトウモロコシ色素の細胞増殖及びアポトーシス誘導に及ぼす影響を検討するため、昨年度に樹立したヒトプロト型 *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のうち C3、C11、C17 の 3 系統を用いた。細胞増殖試験は、96 ウェルプレートに  $1.0 \times 10^5$  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  $\mu$ 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。アポトーシス誘導については、6 cm dish に  $1.0 \times 10^5$  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。

(4) 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動物飼料中に混じ、室温に保存した時の安定性については昨年度報告した。また、ルチン酵素分解物(イソクエルシトリン)を 0.04、0.2、1.0 及び 5.0%濃度で飼料中に混じ、室温に 2 週間保存した時の安定性については HPLC により測定した。

(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及び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認められなかった。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投与群で有意に ( $p < 0.05$ ) 増加し、1%ヤマモモ抽出物投与群で有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した。異形成巣、腺腫及び腺癌の発生頻度及び発生数について、10 週剖検群においては酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物の投与による明らかな影響は認められなかったが、20 週剖検群では、基礎飼料のみを与えた対照と比較し、ヤマモモ抽出物の 1%投与により腺腫及び腺癌の発生頻度、発生数及び腫瘍体積が、有意な ( $p < 0.05$ ) 減少あるいは減少傾向を示した。酵素処理イソクエルシトリンについては、腺癌あるいは腺腫+腺癌の発生数あるいは腫瘍体積が、0.01 及び 1%群において減少傾向を示した。

イソクエルシトリンの実験では、被験物質の投与による一般状態、体重及び摂餌量への影響は認められなかった。10 週剖検群における ACF の発生数に関して、いずれの群においてもイソクエルシトリンによる明らかな影響は認められなかった。また、異形成巣、腺腫及び腺癌の発生頻度及び発生数についてもイソクエルシトリンの投与による明らかな影響は認められなかった。現在、20 週剖検群について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、酵素処理イソクエルシトリンの実験において、8 週目の摂餌量が基礎飼料のみを与えた対照と比較し、0.1 及び 1%群で有意な ( $p < 0.05$ ) 低値を示したが、体重には群間の明らかな差は認められなかった。肝重量には有意な変化は認められなかった。肝臓における GST-P 陽性細胞巢の単位面積あたりの個数および面積の比較において、対照群と酵素処理イソクエルシトリン投与群の間に有意な差は認められなかった。

イソクエルシトリンの実験では、DEN 投与各群における 8 週目の体重が生理食塩水投与群に比べて有意な ( $p < 0.05$ ) 減少を示したものの、被験物質投与による影響は認められなかった。摂餌量についても同様の傾向がみられた。肝重量については、相対値が

1%群で有意に ( $p < 0.05$ ) 増加した。現在、病理標本作製しており、肝臓における GST-P 陽性細胞巢の発生状況により最終評価する。

(3) ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットを用いた乳腺発がん高感受性モデルでは、酵素処理イソクエルシトリンの実験を開始した。

野生型 SD ラットを用いた DMBA 誘発乳腺発がんに対するムラサキトウモロコシ色素の影響に関しては、触診による観察において実験開始 12 週で乳腺腫瘍の発生がみられ、13 週が経過した時点で、その発生頻度は対照の 27.3% (3/11) に比し 1%群では 8.3% (1/12) と減少傾向がみられた。その後、両群で頻度、数の増加がみられたが、22 週の屠殺剖検時まで 1%群では対照群に比し顕著な増加を示した。剖検時の発生頻度は、対照群の 70.0% (7/10) に比し 1%群では 16.7% (2/12) と有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した。また、発生数は対照の  $7.6 \pm 15.3$  個に対し 1%群では  $1.2 \pm 3.2$  個と減少傾向を示した。腫瘍重量は対照群の  $0.9 \pm 1.2$ g に比し 1%群で  $0.2 \pm 0.3$ g と有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した。

ムラサキトウモロコシ色素の細胞増殖に与える影響に関しては、主成分の Cyanidin-3-*o*-s-glucoside 及びその代謝産物である protocatechuic acid と比較検討した。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、0.25mM 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。同様に Cyanidin-3-*o*-s-glucosidase でも 0.25 mM の濃度で用いた 3 系統全ての細胞株において細胞数の有意な ( $p < 0.05$ , 0.01) 減少がみられた。さらに protocatechuic acid においても 2 mM の濃度で細胞数の有意な減少がみられた。更に、細胞増殖刺激として血清飢餓状態に置いた乳腺細胞株を血清で刺激したところ、Erk、Akt のリン酸化が亢進したが、Cyanidin-3-*o*-s-glucoside または protocatechuic acid で前処理するとリン酸化が抑制された。従って、Cyanidin-3-*o*-s-glucoside 及び protocatechuic acid は Erk、Akt の活性化を抑制することにより細胞増殖に対して抑制効果を持っていることが示唆された。ムラサキトウモロコシ色素のアポトーシス誘導に与える影響に関しては、アポトーシスの制御に重要な Akt および Caspase-3 の活性化について、乳腺細胞株における Cyanidin-3-*o*-s-glucoside と protocatechuic acid の影響をウエスタンブロットにより検討した。その結果、0.5 mM の Cyanidin-3-*o*-s-glucoside、5.0 mM の protocatechuic acid により時間経過とともに 6 時間後より Akt のリン酸化の抑制がみられた。さらに 12 時間後より Caspase-3 の活性化がみられた。この時に、実際にアポトーシスがおきているかどうか、TUNEL 法を用いて検討を行った結果、未処理細胞ではほとんどアポトーシス細胞は検出できなかったが、Cyanidin-3-*o*-s-glucoside または protocatechuic acid 処理細胞では、アポトーシス細胞が有意に ( $p < 0.05$ ) 増加した。

(4) ルチン酵素分解物(イソクエルシトリン)を

0.04、0.2、1.0 及び 5.0%濃度で飼料中に混じ、室温に 2 週間保存した時の安定性については、初期値の 0.031、0.159、0.835 及び 4.566%に対し、0.031、0.163、0.853 及び 4.561%であった。

#### D. 考察

酵素処理イソクエルシトリンの大腸発がん抑制作用に関しては、10 週剖検群において DMH-DSS 処置後基礎飼料のみを与えた対照と比較し、大腸 ACF の発生数は 0.1%群で有意に ( $p < 0.05$ ) 増加したが用量反応性はなく、腫瘍性病変の発生状況に対しても明らかな影響を示さなかった。一方、20 週剖検群では腺癌あるいは腺腫+腺癌の発生数あるいは腫瘍体積が、0.01 及び 1%群において減少傾向を示し、用量反応性はみられなかったものの酵素処理イソクエルシトリンに弱い発がん抑制作用のあることが示唆された。ヤマモモ抽出物に関しては、10 週剖検群において対照と比較し、ACF は 1%群で有意に ( $p < 0.05$ ) 減少し、フラボノイドによる大腸 ACF 発生の抑制作用に関する報告 (Miyamoto et al., *Oncol. Rep.*, 15, 1169-73, 2006; Tanaka et al., *Oncol. Rep.*, 6, 1333-40, 1999) と一致する結果となった。しかし、腫瘍性病変の発生状況に対しては明らかな影響を示さなかった。一方、20 週剖検群では、1%群において腺腫及び腺癌の発生頻度、発生数及び腫瘍体積が有意な ( $p < 0.05$ ) 減少あるいは減少傾向を示し、10 週剖検群における ACF の結果と矛盾しない結果が得られた。フラボノイドの大腸発がん抑制作用に関して腫瘍性病変を指標としたモデルでの検討は殆ど行われていないが、今回の結果よりヤマモモ抽出物の本モデルにおける発がん抑制作用を示す結果が得られた。イソクエルシトリンに関しては、10 週剖検群において ACF 及び腫瘍性病変の発生状況に対して明らかな影響を示さなかった。前述のように、酵素処理イソクエルシトリンを用いた実験では、弱いながらも 20 週剖検群で発がん抑制作用を示唆する結果が得られていることから、イソクエルシトリンについても実験を継続し、20 週剖検群での結果を酵素処理イソクエルシトリンと比較検討する。

酵素処理イソクエルシトリンの肝発がん抑制作用についてラット肝中期発がん性試験法を用いて検討を行った結果、GST-P 陽性細胞巢の個数および面積において、対照と比較して有意な減少はみられなかった。しかし、酵素処理イソクエルシトリン投与群のみに着目すると GST-P 陽性細胞巢の抑制に有意な用量相関性を示した。この原因として、今回、対照群 (DEN 投与+基礎食群) に発生した GST-P 陽性細胞巢が個数、面積ともに少ないことが一つの可能性として考えられた。更に、GST-P 陽性細胞巢の抑制において有意な用量相関性が見られたことから酵素処理イソクエルシトリンの投与濃度をさらに高く設定した検討も望まれる。また、イソクエルシトリンによる肝発がん抑制作用の検討に関しては実験の一部が継続中であり、現時点でのイソクエルシトリンの発がん抑制作用の有無の判定はできず、最終的には実験結果を待って判断する。

ムラサキトウモロコシ色素に関しては c-Ha-ras トランスジェニックラットにおいて DMBA 誘発乳腺腫瘍を抑制することを明らかにしてきた。今回、野生型 SD ラットにおいてもムラサキトウモロコシ色素は DMBA 誘発乳腺発がんを抑制することが明らかとなった。またその機序として、ムラサキトウモロコシ色素に含まれるの主なアントシアニンである Cyanidin-3-*o*-s-glucoside あるいはその代謝産物である protocatechuic acid の細胞増殖抑制あるいはアポトーシス誘導作用によることが示唆された。

#### E. 結論

DMH と DSS を用いたラット中期大腸発がん試験法により最高 1%濃度で酵素処理イソクエルシトリンおよびヤマモモ抽出物を混餌投与した際の発がん抑制作用を検討した結果、ヤマモモ抽出物の大腸発がん抑制作用を示す結果が得られた。酵素処理イソクエルシトリンについては、抑制作用を有することが示唆されたが、用量反応性はなかった。イソクエルシトリンについては現在、検討を継続している。

ラット肝中期発がん性試験法を用いて酵素処理イソクエルシトリン及びイソクエルシトリンの発がん抑制作用を検討した結果、酵素処理イソクエルシトリンは有意な抑制作用を示さなかった。イソクエルシトリンについては現在、検討を継続している。

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、野生型ラットにおいても DMBA 誘発乳腺発がんを抑制し、その機序として細胞増殖抑制作用及びアポトーシス誘発作用の関与していることが示唆された。

#### 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) Yokohira M., Takeuchi H., Yamakawa K., Saoo K., Matsuda Y., Zeng Y., Hosokawa K., Maeta H., and Imaida K.: A COX-2 Inhibitor, SC58125, promotes liver carcinogenesis in a rat medium-term liver bioassay, possibly due to induction of CYP 2B1 and 3A1. *J. Toxicol. Pathol.* 19: 37-45 (2006)
- (3) Ueda, S., Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Takasuka, N., Takeshita, F., Naito, A., Iigo, M., Alexander, D.B., Moore, M.A., Saito, I., Ochiya, T. and Tsuda, H.: Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis* 27: 2497-2510 (2006)



## 2. 学会発表

- (1) 曹 永晩、今井 俊夫、蓮村 麻衣、高見 成昭、  
広瀬 雅雄：ラット中期大腸発がん試験法における酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物の発がん修飾作用. 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

---

平成18年度  
政策創薬総合研究  
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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