

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

研究者 広瀬雅雄

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

**研究要旨** フラボノイドを主成分とするムラサキトウモロコシ色素、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の発がん抑制作用について、ラット大腸中期発がん性試験法、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、あるいはラット肝中期発がん性試験法により解析した。被験物質は各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、ムラサキトウモロコシ色素は、乳腺発がんモデルにおいて用量依存的に腫瘍発生を抑制したが、大腸及び肝中期発がん試験法では明らかな作用を示さなかった。酵素処理イソクエルシトリンについては、大腸発がんに対する抑制作用を示唆する結果が得られたが、用量反応性はみられなかった。肝中期試験法では明らかな作用はなかった。イソクエルシトリンは、大腸中期発がん試験法において明らかな効果を示さなかった。ヤマモモ抽出物は、1%群において大腸発がん抑制作用を示した。なお、*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 津田洋幸
- (2) 香川大学医学部 今井田克己
- (3) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 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大腸短期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) 陽性細胞巢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も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した。

16年度はトウモロコシの紫色の種子より抽出して得られ、アントシアニン系のフラボノイドである cyanidin-3-O- $\beta$ -glucoside を主成分とするムラサキトウモロコシ色素について検討した。ムラサキトウモロコシ色素の生体作用として、マウスに高脂肪食を与えた際の高レプチンを正常値に下げることが示されているほか (Tsuda et al., *J. Nutr.*, 133:2125-30, 2003)、慢性毒性試験も行われ、その安全性は確認されている。また、DMHによるイニシエーション後、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) とムラサキトウモロコシ色素 (5%混餌) を同時投与したラット大腸発がんモデルにおいて抑制作用が報告されているが (Hagiwara et al., *Cancer Lett.*, 171:17-25, 2001)、発がんプロモーション期における大腸発がん修飾作用については検討されていない。また、大腸以外の臓器での発がん抑制効果も期待されている。そこで今回、ラット大腸中期発がん性試験法、

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及びラット肝中期発がん性試験法により最高 1%濃度で混餌投与した際の発がん修飾作用を検討した。

17 年度は、ルチンの水に対する溶解度向上の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、フラボノイドである myricitrin を有効成分とするヤマモモ抽出物について検討した。18 年度は、ルチンを酵素 (ナリンジナーゼ、ヘスペリジナーゼ又はラムノシダーゼ) 処理して得られ、デキストリン存在下で糖転移酵素により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、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、ラット大腸中期発がん試験法及び肝中期発がん性試験法により、イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物については大腸中期試験法により、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) 大腸中期発がん性試験法では、各群 30 匹の 6 週齢の F344 雄ラットに対し、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 週より各群にムラサキトウモロコシ色素 (cyanidin-3-*O*- $\beta$ -

glucoside 含量、33.7%:三栄源エフ・エフ・アイ株式会社) 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、第 10 週剖検群については、大腸組織を短冊状に縦に 3 分割し、第 20 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 (10 週間及び 20 週剖検群)。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%:三栄源エフ・エフ・アイ)、イソクエルシトリン (無水物換算含量、95.3%:三栄源エフ・エフ・アイ) あるいはヤマモモ抽出物 (myricitrin 含量、98.8%:三栄源エフ・エフ・アイ) についても 0.01、0.1 及び 1%濃度で混餌投与し、同様の検索を行った。

(2) 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では、7 週齢の雌ラットにジメチルベンズ (a) アントラセン (DMBA, 25 mg/kg 体重) を 1 回強制経口投与した。翌日より、ムラサキトウモロコシ色素を 0 (9 匹)、0.01 (9 匹)、0.1 (10 匹) 及び 1% (10 匹) 濃度で 8 週間混餌投与した。また、野生型 SD 雌ラットについても各群 12 匹を用いて、DMBA を同様に投与した後、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。いずれも投与期間中、毎週、乳腺腫瘍の発生を触診で確認した。投与期間終了後、剖検を行い乳腺腫瘍を摘出、重量を測定した。

乳腺発がんに関しては、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、乳腺腫瘍由来細胞株を用いた検討を加えた。即ち、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 誘発乳腺腫瘍組織から単一コロニー由来の細胞を得て細胞株とし、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  $2\mu\text{M}$  から 2mM (cyanidin-3-*O*- $\beta$ -glucoside 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 In situ Apoptosis Detection Kit (Takara) による TUNEL 法により検出した。その他、Erk、Akt あるいは caspase-3 の活性化に関する検討も併せて行った。また、これらの検討に関してはムラサキトウモロコシ色素とその主成分の cyanidin-3-*O*-s-glucoside 及びその代謝産物である protocatechuic acid と比較した。

(3) 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 群にはムラサキトウモロコシ色素を 0, 0.01, 0.1 及び 1%濃度で混餌投与し、5 群には 1%のムラサキトウモロコシ色素を投与した。全ての動物には実験開始 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 抗体を用いた免疫染色を行った。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、単位面積当たりの発生個数及び面積を算出した。酵素処理イソクエルシトリンについても同様の方法で検討した。

(4) 動物飼料中の既存添加物の分析法の確立ならびに安定性に関して、まずはムラサキトウモロコシ色素の純度を測定した。また、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飼料中での安定性を確認する目的で、各々 0.01~1%濃度で飼料に混じ、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 myricitrin とした。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 及び 5%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も 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、実験期間を通じて、ムラサキトウモロコシ色素の投与による体重及び摂餌量への影響は認められなかった。ACF の発生数及び異形成巣、腺腫及び腺癌の発生頻度及び発生数について、10 週剖検群ではムラサキトウモロコシ色素の投与による影響はみられなかった。20 週剖検群においても、10 週間剖検群の検索項目及び腫瘍体積について、ムラサキトウモロコシ色素による影響は認められなかった。酵素処理イソクエルシトリン及びヤマモモ抽出物に関しても、被験物質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 の発生数は基礎飼料のみを与えた対照と比較し、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、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については、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 の発生数及び異形成巣、腺腫及び腺癌の発生頻度及び発生数に関して、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みられなかった。

(2) 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では、実験期間を通じて、ムラサキトウモロコシ色素の投与による体重への影響は認められなかった。DMBA 投与後 5 週目より全群において触知可能な乳腺腫瘍の発生がみられた。5 週目において 0, 0.01, 0.1 及び 1%群で各々 44, 56, 20 及び 10%の頻度で触知可能な乳腺腫瘍がみられ、0.1 及び 1%群で発生抑制を示した。7 週目においても、0 及び 0.01%群で 78%, 0.1%群で 50%, 1%群で 30%の頻度で発生がみられ、0.1 及び 1%群で発生抑制を示した。8 週目の剖検時には、肉眼的に全ての群のほぼ全ての個体に腫瘍発生が確認され、発生率に群間の差はみられなかった。個体あたりの腫瘍数は、0, 0.01, 0.1 及び 1%の各群で 6.2, 9.4, 5.4 及び 4.9 個と 1%群で減少傾向を示した。触診可能な 1g 以上の個体あたりの腫瘍数は、0, 0.01, 0.1 及び 1%の各群で 1.7, 2.4, 1.6 及び 0.6 個と 1%群で低値を示した。野生型ラットを用いた 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 週時点で、発生頻度は対照の 27% (3/11) に比し 1%群では 8% (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% (7/10) に比し 1%群では 17% (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。

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、7 系統全てにおいてコドン 12 の変異、更に 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。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、C3, C11, C17 の 3 系統を用いて検討した。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 0.25mM 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。更に protocatechuic acid においても 2mM の濃度で細胞数の有意な減少がみられた。また、細胞増殖刺激として血清飢餓状態に置いた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ことから、cyanidin-3-*o*-*s*-glucoside と 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する抑制効果を示すと考えられた。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 及び caspase-3 の活性化について、細胞株に対する 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、0.5mM の cyanidin-3-*o*-*s*-glucoside、5.0mM 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。更に 12 時間後より caspase-3 の活性化がみられた。また TUNEL 法を用いた検討では、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。

(3) ラット肝中期発がん性試験法では、ムラサキトウモロコシ色素に関して、1-4 群における肝の単位面積あたりの GST-P 陽性細胞巢の発生個数は 0.86-1.26 個/cm<sup>2</sup>、面積は 0.24-0.37mm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>であり、2-4 群のいずれにおいても DEN 単独投与の 1 群と統計学的な有意差はみられなかった。なお、DEN を投与せずムラサキトウモロコシ色素のみを投与した 5 群での GST-P 陽性細胞巢の発生は認められなかった。酵素処理イソクエルシトリンについては、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みられなかった。肝 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。

(4) 動物飼料中の既存添加物の分析法の確立ならびに安定性に関しては、ムラサキトウモロコシ色素の純度を測定した結果、アントシアニン含量は cyanidin-3-glucoside として 33.7% であった。また、酵素処理イソクエルシトリンの飼料中の安定性については、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。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 0.03、0.16、0.84 及び 4.57% に対し、0.03、

0.16、0.85 及び 4.56% であった。

#### D. 考察

ラット大腸中期発がん性試験法では、DMH-DSS 処置後にムラサキトウモロコシ色素を 0.01、0.1 及び 1% 濃度で 7 あるいは 17 週間混餌投与した各群において、基礎飼料のみを与えた対照群と比較して ACF の発生数及び腫瘍性病変の発生頻度、発生数、体積ともに明らかな影響は認められなかった。従って、本実験条件下においてムラサキトウモロコシ色素は大腸発がん抑制作用を示さないと判断された。文献的には、DMH によるイニシエーション後、PhIP とムラサキトウモロコシ色素を同時に混餌投与した実験において有意な発がん抑制作用が示され (Hagiwara et al., *Cancer Lett.*, 171: 17-25, 2001)、PhIP によるラット大腸発がんには DNA 付加体の形成と細胞増殖促進が関与していると報告されている (Ochiai et al., *Carcinogenesis*, 17: 95-8, 1996)。ムラサキトウモロコシ色素の主成分である cyanidin-3-*o*- $\beta$ -glucoside は抗酸化作用を示すことから (Tsuda et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 368: 361-6, 1999)、PhIP との同時投与により酸化ストレスを介した DNA 付加体の形成を抑制することにより発がんを抑制した可能性がある (Mooney L. A. et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 14: 237-42, 2005)。一方、今回の検討では、DMH-DSS 処置 1 週間後からムラサキトウモロコシ色素を投与することにより発がんプロモーションに対する影響を検索したが、明らかな作用を認めなかった。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 20 週剖検群について解析し、酵素処理イソクエルシトリンと比較検討することが必要である。

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では、ムラサキトウモロコシ色素の 1% 群において DMBA 誘発乳腺腫瘍の明らかな発生抑制が認められた。0.01% 群では抑制はみられないが、0.1% 群においても抑制し、用量依存性がみられた。剖検時にほぼ全ての個体において乳腺腫瘍の発生がみられたことから、ムラサキトウモロコシ色素は腫瘍の発生を抑制するのではなく、腫瘍の成長を抑制していることが示唆された。実際に 1g 以上の腫瘍数を比較すると、1% 群で低値を示した。我々はこれまで、ヒト正常型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットは乳腺発がん高感受性であることを示してきた。このラットでは乳腺組織の TEB において MAPK リン酸化経路の活性化と細胞回転の亢進で示される細胞増殖能の亢進が背景にあり(発がん準備状態)、導入 *ras* 遺伝子の発がん物質による変異活性化がおり、早期にがんの発生に至ることが明らかとなっている。今後、ムラサキトウモロコシ色素の Ras 蛋白に与える影響、及びその下流のシグナル伝達への影響など、その機構の解析を行う必要がある。一方、ムラサキトウモロコシ色素は、野生型 SD ラットにおいても 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、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。

ラット肝中期発がん性試験法では、ムラサキトウモロコシ色素は肝発がんに対して抑制作用を示さなかった。しかし、1% の高用量群でも前がん病変の発生の増加はみられず、肝発がんの修飾作用を示さないことを明らかにした。酵素処理イソクエルシトリンについては、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み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。

## E. 結論

ムラサキトウモロコシ色素、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の発がん抑制作用について、ラット大腸中期発がん性試験法、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、あるいはラット肝中期発がん性試験法を用いて、最高 1% 濃度の混餌投与により検討した。その結果、ムラサキトウモロコシ色素は、本実験条件下では、乳腺発がんモデルでは用量依存的に腫瘍発生を抑制したが、大腸及び肝発がんに対しては明らかな作用を示さなかった。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において抑制作用を示唆する結果が得られたが、用量反応性はなかった。肝中期発がん性試験法では明らかな作用を示さなかった。イソクエルシトリンについては、大腸中期発がん試験法では 10 週剖検群において明らかな効果はみられなかった。ヤマモモ抽出物は、1% 群において大腸発がん抑制作用を示した。なお、*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、その機序として乳腺腫瘍由来細胞株を用いた実験より、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) Hamaguchi, T., Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ueda, S., Shimizu, K., Ohki, M., Kusunoki, M., Sakakura, T., Yoshida, H., 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.
- (2) Park, C.B., Fukamachi, K., Takasuka, N., Han, B.S., Kim, C.K., Hamaguchi, T., Fujita, K., Ueda, S., Tsuda, H. Rapid induction of skin and mammary tumors in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats by treatment with 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene followed by 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate. *Cancer Sci.*, 95: 205-210, 2004.
- (3) Naito, A., Suzuki, A., Ueda, S., Nomoto, H., Toriyama-Baba, H., Asamoto, M., Tsuda, H. Preferential mammary carcinogenic effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats, *Cancer Sci.*, 95: 399-403, 2004.
- (4) Fukamachi, K., Han, B.S., Kim C.K., Takasuka, N., Matsuoka, Y., Matsuda E., Yamasaki, T., Tsuda, H. Possible enhancing effects of Atrazine and Nonylphenol on

- 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene induced mammary tumor development in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats, *Cancer Sci.*, 95: 404-410, 2004.
- (5) 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)
- (6) Ichihara, T., Miyashita, K., Kawabe, M., Imaida, K., Asamoto, M., Ogiso, T., Tamano, S., Hirose, M., Shirai, T. Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrole when given with NaNO<sub>2</sub> in the rat. *Journal of Toxicological Sciences*, 30: 1-6, 2005.
- (7) 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)
- (8) 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)
- (9) 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)
- (10) 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)
- (11) Ueda, S., Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Takasuka, N., Takeshita, F., Naito, A., Iigo, M., Alexander, D.B., Moore, M.A., Saito, I., Ochiya, T., 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)
- (12) Yokohira, M., Takeuchi, H., Yamakawa, K., Saoo, K., Matsuda, Y., Zeng, Y., Hosokawa, K., Maeta, H., 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)
2. 学会発表
- (1) 今井田克己: いわゆる'健康食品'を含む健康食品をめぐってー機能性食品の安全性評価に関する基本的な考え方. 日本食品化学学会 シンポジウム 大阪 (2004)
- (2) 横平政直, 竹内聖, 山川けいこ, 竿尾光祐, 松田陽子, 曾于, 塩岡忠夫, 今井田克己: ラット肝中期発癌性試験法(伊東法)を用いた各種 COX 阻害剤による肝発癌の修飾作用. 日本癌学会総会福岡 (2004)
- (3) Imai, T., Onose, J., Hasumura, M., Cho, Y.M., Hirose, M.: Rapid induction of colorectal tumors in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine followed by dextran sodium sulfate treatment - possible application for a new medium-term rat colon bioassay. 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (2005)
- (4) 曾于, 竿尾光祐, 松田陽子, 横平政直, 今井田克己: Modifying potential of dietary D-psicose, a rare sugar, in a medium-term liver carcinogenesis bioassay. 第 21 回日本毒性病理学会, 浜松 (2005)
- (5) 太田世志雄, 今井俊夫, 曹 永晩, 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)
- (6) 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