

#### (4) 大腸腫瘍発生頻度および個数

AOM+DSS の系によって非常に強い腫瘍発生が誘発されたため、第 8 週および第 12 週における大腸腫瘍発生頻度は 100%であった。

各群の腫瘍発生数を比較すると、第 8 週では、A、B、C、D、E 群それぞれ、 $13\pm 3.5$ 、 $6.2\pm 3.3$ 、 $5.8\pm 3.0$ 、 $6.8\pm 3.2$ 、 $7.2\pm 0.8$  個/匹と、群間に有意な差が認められた(Kruskal-Wallis test,  $P<0.05$ )。各群をそれぞれ比較すると、B (Mann-Whitney U test,  $P<0.05$ )、C ( $P<0.05$ )、D ( $P<0.05$ )、E ( $P<0.01$ )群いずれも、A 群に比して大腸腫瘍発生数に有意な減少が見られた。

しかし、第 12 週では、各群の大腸腫瘍発生数は、 $6.8\pm 2.8$ 、 $7.3\pm 2.8$ 、 $8.4\pm 3.6$ 、 $6.2\pm 3.6$ 、 $6.6\pm 3.6$  と、群間の有意な差は消失した(Kruskal-Wallis test,  $P=0.18$ )。

組織学的には、いずれも、分化型腺癌の像を示した。

#### (5) 大腸腫瘍体積

大腸腫瘍を回転楕円体として近似し、各群の腫瘍の体積を計測すると、第 8 週では、A、B、C、D、E 群それぞれ、 $6.5\pm 6.2$ 、 $7.6\pm 10.1$ 、 $3.2\pm 3.5$ 、 $10.6\pm 17.0$ 、 $5.0\pm 4.8$   $\text{mm}^3$  と群間で有意な差があり(Kruskal-Wallis test,  $P<0.05$ )、C 群では、A 群より有意に腫瘍体積の低下が見られた(Dunn's multiple comparison test,  $P<0.05$ )。

一方、第 12 週では、各群それぞれ、 $9.1\pm 14.0$ 、 $6.9\pm 10.3$ 、 $11.4\pm 25.4$ 、 $14.4\pm 33.9$ 、

$12.0\pm 24.8$   $\text{mm}^3$  と統計学的な有意な差は消失した(Kruskal-Wallis test,  $P=0.24$ )。

#### (6) 炎症マーカーの発現

GAPDH を内部標準として、大腸粘膜での TNF- $\alpha$ 、COX-2、iNOS、IL-17A、FoxP3 の遺伝子発現を real-time RT-PCR 法により比較検討し、A 群の値を 1.00 とした時の相対値を算出した。

第 8 週では、いずれの遺伝子も、それぞれ、 $P<0.01$ 、 $P<0.02$ 、 $P<0.005$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.005$  (Kruskal-Wallis test)と群間に有意な差が見られた。さらに各群間を個別に見ると、TNF- $\alpha$  は A 群( $1.00\pm 0.33$ )と比較して E 群で  $0.10\pm 0.02$  と有意な低下を認めた (Dunn's multiple comparison test,  $P<0.05$ )。COX-2 では、各群では有意な差は認めなかった。iNOS の発現量は、E 群で  $0.04\pm 0.01$  と A 群 ( $1.00\pm 0.25$ )に比して有意な低下があった (Dunn's multiple comparison test,  $P<0.01$ )。IL-17A は、E 群で  $0.05\pm 0.03$  と低下した (Dunn's multiple comparison test,  $P<0.01$  vs. A 群= $1.00\pm 0.74$ )。FoxP3 では、C 群( $0.23\pm 0.05$ , Dunn's multiple comparison test,  $P<0.05$  vs. A 群= $1.00\pm 0.13$ )、E 群( $0.19\pm 0.05$ , Dunn's multiple comparison test,  $P<0.02$  vs. A 群)で有意に低値であった。

第 12 週では、これら全てに遺伝子で群間に有意な差は見られなくなった (Kruskal-Wallis test)。

D. 考察

発がんの促進に炎症反応が重要な役割を果たしている。しかし、その発がん促進機構は十分解明されているとは言えない。未熟ヘルパーT細胞(Th0)は、サイトカイン刺激により、Th1、Th2、Th17、Tregに分化することが知られている。本研究では、Th1優位であるC57BL/6Jを用いて、AOM+DSS投与対照群(A群)に対して、インスタントコーヒー(B群)、フレンチプレスコーヒー(C群)およびコーヒー主成分であるchlorogenic acid(D群)、caffestol(E群)による炎症反応抑制効果と大腸腫瘍抑制効果を検討した。

DSSによる炎症促進効果が非常に強く、いずれの群も腫瘍発生頻度は100%となり、各群の差を検討できなかった。腫瘍発生数を検討したところ、実験第8週では、BからE群全てで腫瘍発生数の低下があり、C群では腫瘍体積の有意な低下が見られた。炎症関連マーカーの発現をみるとC群でFoxP3の有意な低下、E群でTNF- $\alpha$ 、iNOS、IL-17A、FoxP3の低下が見られた。E群で用いたコーヒーオイル成分であるCafestolは、フレンチプレスコーヒー(C群)に多く含まれることから、Cafestolおよび何らかのオイル成分がAOM+DSS発がん抑制に有効であることが示唆された。一方で、Chlogogenic acidのような抗酸化物質は、炎症抑制作用が期待されたが、本モデルでは、有効性を証明できなかった。FoxP3は、Treg細胞の転写因子であり、IL-17Aは、Th17細胞から産生されることが知ら

れている。今後、コーヒー摂取によって、Th1、Th2のみならず、Th17やTreg経路の変動、あるいはDSS誘発大腸炎および大腸発がんに及ぼす影響について検討する必要があると考えられた。実験第12週では、第8週で見られた差が消失する結果となった。これは、DSSによる炎症促進効果が非常に強く、各群で用いたコーヒーあるいは化学物質のもつ抗炎症作用を凌駕したためと考えられた。

#### E. 結論

C57BL/6マウスを用いて、AOM+DSS大腸発がん系に対するコーヒーおよびその主成分による炎症の抑制効果と発がん抑制効果を検討した。実験第8週の検討では、A群に比して、BからE群全てで腫瘍発生数の低下があり、C群では腫瘍体積の有意な低下が認められた。炎症性サイトカインあるいは炎症関連マーカーの発現をみるとC群でFoxP3の有意な低下、E群でTNF- $\alpha$ 、iNOSの低下、IL-17A、FoxP3の低下が見られた。E群で用いたコーヒーオイル成分であるCafestolは、フレンチプレスコーヒー(C群)に多く含まれることから、Cafestolおよび何らかのオイル成分がAOM+DSS発がん抑制に有効であることが示唆された。今後、Th17あるいはTreg経路のコーヒー摂取による変動、DSS誘発大腸炎および大腸発がんに及ぼす影響について検討する必要があると考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Matsubara, S., Takasu, S., Tsukamoto, T., Mutoh, M., Masuda, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y. Induction of glandular stomach cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian gerbils by 1-nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int. J. Cancer* 130: 259-266, 2012.
  - 2) Jiang, J., Cao, D., Tsukamoto, T., Wang, G., Jia, Z., Suo, J., Cao, X. Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Oncol. Lett.* 5: 1562-1566, 2013.
  - 3) Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M. Helicobacter pylori infection and gastric carcinogenesis in rodent models. *Semin. Immunopathol.* 35: 177-190, 2013.

2. 学会発表

- 1) 塚本徹哉、田中卓二。コーヒーおよびその成分を用いた DSS 誘発大腸炎に対する抑制効果の検討。第 19 回がん予防学会 in 岐阜、抄録集 p. 53, 2012 年、岐阜市 (2012 年 6 月)
- 2) Tsukamoto, T. and Tanaka, T. Preventive effect of coffee on dextran sulfate sodium induced colitis, The 71st Annual meeting of the Japanese cancer association, Proceeding, p.

553, 2012, Sapporo (September, 2012)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

大腸 ACFを用いた大腸がん予防薬の評価

分担研究者 氏名 高山哲治 所属 徳島大学 職名 教授

研究要旨 RAS の FARNESYL 化を阻害剤する manumycin A (RAS 阻害剤) の大腸発がんに対する抑制効果を azoxymethane (AOM) 誘導ラット大腸発がんモデルを用いて検討した。AOM 投与ラットに manumycin A 5mg/kg (3 回/週) を 8 週間または後半の 4 週間投与したところ、8 週後の ACF 数は有意に抑制された。AOM 投与ラットに manumycin A を 8 週間投与し、24 週後に屠殺して大腸ポリープを評価したところ、ポリープ数も有意に抑制された。Manumycin A 投与群の大腸組織を用いて、RAS の下流になるリン酸化 ERK, リン酸化 MEK ならびに Ki67 の発現を免疫染色や Western blot で評価したところ、これらの発現はいずれも有意に抑制されていた。また、TUNEL 染色ではアポトーシスの亢進が認められた。つまり、manumycin A 投与により RAS/RAF/MEK/ERK pathway のシグナル伝達を抑制して細胞増殖を抑制する機序、ならびにアポトーシスを誘導する機序により大腸がんの発生を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、我が国では食生活の欧米化等により大腸癌死亡率が増加し、有効な予防薬の開発が期待されている。我々はこれまで、動物やヒト大腸の微小病変である aberrant crypt foci (ACF) には高率に K-RAS 変異が認められることを報告した。これらの病変の K-RAS 活性を阻害することにより、大腸発癌を効果的に予防することが予想される。そこで本研究では、ラットを用いて、RAS の farnesyltransferase 阻害剤である manumycin A の ACF 及び癌に対する抑制効果を検討した。

B. 研究方法

<実施経過>

28 匹の F344 ラットに AOM(15mg/kg)を

2 回皮下投与し、manumycin A 群と vehicle 群の 2 群に分けた。Manumycin A 投与群では、manumycin A 5mg/kg (3 日/週) を 8 週間または 4 週間(5~8 週)投与し、vehicle 群は vehicle のみを投与し、8 週後に ACF 数を評価した。同様に、manumycin A 投与を行った治療群と対照群を 24 週後に屠殺し、polyp の評価を行った。さらに、治療中のラットを屠殺し、リン酸化 MEK, ERK, Ki67 の免疫染色及び TUNEL 染色を行い、細胞増殖及びアポトーシスを評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）、および徳島大学における動物実験の指針を遵守して行われた。また、あらかじめ徳島大学

動物実験施設長の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

Manumycin A 8 週間投与群では平均  $72.9 \pm 20.1$  個の ACF が認められ、vehicle 群 ( $155.6 \pm 56.7$  個) に比べて有意に減少した ( $p=0.003$ )。同様に、manumycin A 4 週(第 5~8 週目)投与群においても、平均 ACF 数 ( $92.2 \pm 13.0$  個) は vehicle 群 ( $222.3 \pm 83.3$ ) に比べて有意に減少した ( $p=0.004$ )。また、manumycin A を 8 週間投与したラットの 24 週後の平均 polyp 数は  $0.73 \pm 0.6$  個であり、対照群 ( $3.0 \pm 1.6$  個) に比べて有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。AOM 投与ラットに manumycin A を 4 回投与し、摘出した大腸の ACF におけるリン酸化 ERK, リン酸化 MEK, Ki67 の発現は、いずれも manumycin A 群で低下していた。同様に、TUNEL 染色を行ったところ、manumycin A 群では対照群に比べ TUNEL 陽性細胞が有意に増加していた。

### D. 考察

RAS の farnesyltransferase 阻害剤である manumycin A は、AOM 誘導ラット大腸発癌モデルにおける ACF, ポリープの発生を有意に抑制した。その機序として、manumycin A が RAS を阻害することにより、その下流の RAF/MEK/ERK pathway のシグナル伝達を阻害し、細胞増殖を抑制すること、及びアポトーシスを誘導することの 2 つの機序が関与することが明らかとなった。

### E. 結論

RAS 阻害剤である manumycin A の大腸発癌に対する抑制効果が示唆され、K-RAS 分子を標的とした大腸癌予防薬の有効性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Kimura M, Kitamura S, Takenaka H, Muguruma N, Okahisa T, Aoyagi E, Kajimoto M, Tsuji Y, Kogawa T, Tsuji A, Takayama T. Clinical benefit of high-sensitivity KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR antibody therapy. *Oncology* 82, 298 - 304, 2012.

#### 2. 学会発表

Tsuda M, Okamoto K, Fujino Y, Takaoka T, Kitamura S, Sannomiya K, Aoyagi E, Kajimoto M, Muguruma N, Okahisa T, Takayama T. Chemopreventive effect of RAS inhibitor on azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis. The 71 th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association -Proceedings- p 105. September 19-21, 2012 (Sapporo).

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

### G. 知的所有権の取得状況

#### 1. 特許取得

とくに無し。

#### 2. 実用新案登録

とくに無し。

#### 3. その他

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

がん化学予防剤の開発に関する基礎及び臨床研究に関する研究

分担研究者 分担研究者 石川秀樹 京都府立医科大学 特任教授

研究要旨 これまでに家族性大腸腺腫症患者を対象とした二重盲検無作為割付臨床試験において、アスピリンは大腸腺腫を縮小する可能性を示した。石川がこれまでに実施してきた手術拒否例における大腸腺腫の内視鏡的徹底的摘除のパイロット的試みにおいて、腺腫の徹底的摘除により大腸癌の発生が予防できる可能性が示唆されたため、多施設研究において内視鏡的徹底的摘除を実施する試験を開始した。エントリー後に、アスピリンなどの化学予防物質を組み合わせる臨床試験を開始する予定である。

#### A. 研究目的

家族性大腸腺腫症(FAP)は極めて稀な常染色体優性遺伝疾患である。この病気の患者は大腸に多数の腺腫が発生することを特徴とし、40歳までに患者の半数に大腸癌が発症する。

家族性大腸腺腫症は、これまで大腸を全て摘除することが唯一の大腸癌の予防法であった。大腸を全摘すると、頻回の下痢などにより患者の生活の質(QOL)は著しく低下する。手術を避けるために、腺腫の増大を候補物質で抑制し、その後発生する大腸癌を予防する化学予防の研究が進められている。

そこで私たちは、家族性大腸腺腫症患者を対象に低用量アスピリン腸溶錠(1錠100mg/day)による大腸腺腫予防効果を二重盲検無作為割付臨床試験にて評価する研究を実施した。その結果、アスピ

リンは大腸腺腫を縮小する可能性が示された。

これまでも大腸全摘を拒否した患者に対して、次善の策として早期大腸癌や比較的大きな大腸腺腫を内視鏡的に摘除して経過をみることを手探りで行われてきた。内視鏡機器の進歩によりかなり安全に多数の大腸ポリープを摘除することが可能となったため、本研究の責任者である石川は、手術拒否FAP患者に対して、これまでも積極的に内視鏡により大腸腺腫を摘除してきた。1986年から2012年までに、手術を希望しない113人の患者に対して、頻回の大腸内視鏡検査により多数の大腸ポリープを摘除して経過観察しているが、これまでに内視鏡的に摘除困難な大腸癌の発生は認めていない。また、内視鏡的摘除により穿孔や、輸血や緊急手術を要するような出血を経験して

いない。このことより、大腸腺腫を内視鏡的に徹底的に摘除することは比較的安全であり、さらに手術を回避できたり、遅らせることができたりする可能性が期待された。

そこで、本班研究では、内視鏡的ポリープ徹底的摘除と化学予防を組み合わせた家族性大腸腺腫症に対する大腸発癌防研究を行うこととした。

## B. 研究方法

対象者条件 16 歳以上の家族性大腸腺腫症である。大腸を手術していない者、または、大腸の一部を手術したが大腸は 10cm 以上残存している者である。

試験方法は単一介入研究であり、下記の手順に従い、徹底的に大腸腺腫を内視鏡的に摘除する。密生型に移行したり、腸管の癒着などで内視鏡観察が困難になったりすることにより、内視鏡での経過観察が困難になった場合は、強く手術を受けることを勧める。追跡期間は 5 年である。

### 内視鏡検査および治療手順

大腸に 1cm 以上のポリープを認める場合、4 ヶ月以内の間隔にて 1cm を越える大きなポリープをすべて摘除する。1cm 以上の病変は原則的としてすべて回収し病理診断を行う。1cm 以上のポリープがなくなれば、1cm 未満のポリープをできるだけ多数摘除する。癌を疑う病変は回収し病理検査をおこなうが、すべての病変の病理検査は必要としない。5mm 未満のポリープも可能な範囲で摘除を心がけ

る。5mm 以上のポリープをすべて摘除できたと考えた場合、検査間隔を 4 ヶ月以上あけても良いが、1 年以上は間隔をあげないこととする。経過観察中の内視鏡検査では、5mm 以上のポリープはすべて摘除し、5mm 未満のポリープも可能な限り摘除するよう心がける。5mm 以上のポリープが残ったと考える時には、次の間隔を 4 ヶ月以内とする。

アスピリンやスリダク、ニメスリドなどの非ステロイド系抗炎症剤 (NSAIDs)、乳酸菌製剤やビタミン剤、いわゆる健康食品のサプリメントなどの摂取は制限しないが、服用状況は把握する。エントリーがある程度進んだ時点で、エントリー者の中で同意を得た者に対して、アスピリンの長期間投与試験を行うこととする。

主エンドポイントは、介入期間の大腸手術の有無とする。副エンドポイントは、有害事象 (穿孔、出血、大腸癌死、それ以外の死亡)、大腸発癌、粘膜内癌、内視鏡的治療困難腫瘍の有無である。

目標参加者数は 200 名である。

### (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。

#### C. 研究結果

京都府立医科大学倫理審査委員会において本試験プロトコールは審査され、2012年9月26日に承認が得られ、UMINへの登録の後、2012年11月24日よりエントリーが開始された。

現在までに19施設の倫理審査委員会では本試験は承認を受け、6施設にて総数59人がエントリーされている。

#### D. 考察

大腸内視鏡検査の普及により大腸に腺腫の多発する患者が多く診断されるようになってきた。併せて、内視鏡的治療技術の向上により、かなり多数の腺腫の摘除が可能となり、一般臨床の場において、多数の大腸腺腫を摘除する機会が増えてきている。

以前には家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis: FAP) 患者は大腸癌を発症したり、腺腫が大きくなったことにより、下血や貧血、腹痛などの症状が発生してから診断されることが多かった。しかし、大腸癌検診の普及などにより大腸内視鏡検査の受検機会が増えたことや、FAPの遺伝診療体制の充実により血縁者のサーベイランスがされることにより、未症状にて腺腫が小さな段階で診断されるFAP患者が増えてきている。

このような背景から日本の診療現場では、大腸腺腫数が比較的少ない場合や、大腸腺腫が小さい場合には、FAPと診断されても、すぐに手術をするのではなく、大きな腺腫を内視鏡的に摘除して経過をみることも行われてきている。しかし、腺腫を摘除することにより大腸癌の発生が予防できて大腸切除を避けることができるのか、または手術の時期を遅らせることができるのか、などについての知見はまったく得られていないため、臨床現場における治療方針は定まっていない。

石川は、手術を希望しないFAP患者に対して、積極的に内視鏡により大腸腺腫を摘除し、これまで内視鏡的治療が困難な大腸癌は認めていない。ただし、この結果は1人の内視鏡医による1施設での成績であるので、日本における大腸内視鏡専門施設による多施設研究により、同様の成績が得られるか否かを検討することが必要と考え、本研究を行うこととした。

本試験のエントリーが順調に行われたのちに、アスピリンなどの化学予防物質を組み合わせた大腸癌予防試験を実施する予定である。

#### E. 結論

家族性大腸腺腫症に対して、徹底的な大腸腺腫摘除を行う前向き介入研究を行い、さらに大腸癌予防効果を高めるために、その集団に対してアスピリンなどの化学物質を用いた臨床試験を実施する予定である。



F. 研究発表

1. 論文発表

Ikematsu, H., Saito, Y., Tanaka, S., Uraoka, T., Sano, Y., Horimatsu, T., Matsuda, T., Oka, S., Higashi, R., Ishikawa, H., Kaneko, K. The impact of narrow band imaging for colon polyp detection: a multicenter randomized controlled trial by tandem colonoscopy. *J Gastroenterology*. **47**, 1099-1107 (2012).

Yao, K., Iwashita, A., Nambu, M., Tanabe, H., Nagahama, T., Maki, S., Ishikawa, H., Matsui, T., Enjoji, M. The nature of white opaque substance in the gastric adenoma and cancer as visualized by magnifying endoscopy with narrow-band imaging. *Dig Endosc*. **24**, 419-425 (2012).

Nemoto, H., Kataoka, K., Ishikawa, H., Ikata, K., Arimochi, H., Iwasaki, T., Ohnishi, Y., Kuwahara, T., Yasutomo, K. Reduced diversity and imbalance of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis compared to healthy adult. *Dig Dis Sci*. **57**, 2955-2964 (2012).

Muroi, A., Kiyotani, K., Fujieda, M., Ishikawa, H., Takeshita, T., Iwano, S., Yamazaki, H., Kamataki, T. Effect of Genetic Polymorphism of CYP2A6 on Individual Susceptibility to Colorectal Tumors in Japanese Smokers.

*J Cancer Therapy*. **3**, 207-215 (2012).

石川秀樹。消化器内視鏡における臨床試験デザインの考え方。 *消化器内科*. **27**, 711-714 (2012)。

石川秀樹。大腸がん化学予防介入試験ーアスピリンを中心に。 *医学のあゆみ*. **241**, 411-415 (2012)。

Tanaka, T., Ishikawa, H. Mast cell and inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Semin Immunopathol*. **35**, 245-254 (2012).

Ishikawa, H., Wakabayashi, K., Suzuki, S., Mutoh, M., Hirata, K., Nakamura, T., Takeyama, I., Kawano, A., Gondo, N., Abe, T., Tokudome, S., Goto, C., Matsuura, N., Sakai, T. Preventive effects of low-dose aspirin on colorectal adenoma growth in patients with familial adenomatous polyposis: double-blind, randomized clinical trial. *Cancer Medicine*. **In-press** (2012).

Ishikawa, H., Goyo, M., Matuura, N., Murakami, Y., Goto, C., Sakai, T., Kanazawa, K. A Pilot, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Phase 0/Biomarker Study on Effect of Artepillin C-Rich Extract of Brazilian Propolis in Frequent Colorectal Adenoma Polyp Patients. *J Am Coll Nutr*. **31**, 327-337 (2012).

角川康夫、斎藤 豊、斎藤彰一、渡辺憲治、大宮直木、村野実之、岡 志郎、相原弘之、倉本貴典、能田貞治、松本美野

里、荒川哲男、後藤秀実、樋口和秀、田  
中信治、石川秀樹、田尻久雄。カプセル  
内視鏡の現状と将来。*胃と腸*。48、493-498  
(2012)。

石川秀樹。遺伝子異常と癌の多様性 癌  
家系をめぐる諸問題。*臨床と研究*。90、  
49 (2013)。

Nakajima, T., Saito, Y., Tanaka, S.,  
Iishi, H., Kudo, S., Ikematsu, H.,  
Igarashi, M., Saitoh, Y., Inoue, Y.,  
Kobayashi, K., Hisashi, T., Tsuruta,  
O., Sano, Y., Yamano, H., Shimizu, S.,  
Yahagi, N., Watanabe, T., Nakamura, H.,  
Fujii, T., Matsuda, T., Ishikawa, H.,  
Sugihara, K. Current status of  
endoscopic resection strategy for  
large, early colorectal neoplasia in  
Japan. *Surgical endoscopy*. In-press  
(2013).

石川秀樹。家族性大腸腺腫症に対するア  
スピリンによる大腸癌化学予防。*家族性  
腫瘍*。13、28-31 (2013)。

## 2. 学会発表

石川秀樹、J-FAPP Study II グループ。  
S2-5 家族性大腸腺腫症に対するアスピ  
リンによる大腸癌予防のための化学予防。  
第 18 回日本家族性腫瘍学会学術集会シ  
ンポジウム、大阪 (2012 年 6 月)

中島建、石川秀樹、菅野康吉、権藤延久、  
阿部孝、石黒信吾、斎藤豊、酒井敏行。  
S1-3 リンチ症候群患者の大腸腫瘍性病  
変の発育は速い。第 18 回日本家族性腫瘍  
学会学術集会シンポジウム、大阪 (2012

年 6 月)

柚木崎紘司、石川秀樹、野田雅史、塚本  
潔、久野隆史、山岸大介、山崎之良、奥  
順介、田村公佑、李兆亮、志村陽子、川  
添智太郎、金鏞民、阿部孝。O-22 FAP  
の一卵性双生児の術後回腸嚢に腺癌を発  
症した一症例。第 18 回日本家族性腫瘍学  
会学術集会口演、大阪 (2012 年 6 月)

小林容子、土井悟、武田祐子、上野いづ  
み、川崎優子、石川秀樹、岩間毅夫。O-31  
家族性大腸腺腫症の医療費対策に関する  
活動。第 18 回日本家族性腫瘍学会学術集  
会口演、大阪 (2012 年 6 月)

石川秀樹。S10-2 無作為割付臨床試験に  
よる大腸癌予防研究。第 12 回日本抗加齢  
医学会総会シンポジウム、横浜 (2012 年  
6 月)

石川秀樹。臨床試験データセンターの取  
り組みについて。Gastrointestinal cancer  
conference 講演、東京 (2012 年 8 月)

石川秀樹。大腸癌の発癌予防。第 22 回日  
本消化器病学会四国支部教育講演会講演、  
徳島 (2012 年 9 月)

石川秀樹。5 遺伝性大腸腫瘍と遺伝カウ  
ンセリング。第 54 回日本内科学会東海支  
部主催生涯教育講演会講演、名古屋 (2012  
年 10 月)

石川秀樹。大腸癌予防。大阪市中央区薬  
剤師会講演講演、大阪 (2012 年 11 月)

石川秀樹。大腸癌はなぜ増えたのか、予  
防は可能なのか。東京がん化学療法研究  
会講演、東京 (2013 年 1 月)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

大腸ポリープ患者に対する発癌予防臨床試験

分担研究者 鈴木貞夫 名古屋市立大学大学院医学研究科公衆衛生学分野 教授

研究要旨 大腸癌化学予防薬の開発のために低用量アスピリン腸溶錠(100mg/day)を用いた多施設二重盲検無作為割付臨床試験を実施した。対象は大腸腫瘍（腺腫または大腸粘膜内癌）患者である。試験薬は2年間投与する。主エンドポイントは、2年目の大腸内視鏡検査における大腸腫瘍の発生の有無とする。490人へ参加を呼び掛け389人(79%)が参加同意、そのうち311人が2年目の大腸内視鏡検査を受けた。アスピリン群152人中96人、プラシーボ群159人中86人は2年間に大腸腫瘍の発生を認めなかった。年齢、性、エントリー前の大腸腫瘍数で補正したオッズ比(95%信頼区間)は0.60(0.36-0.98)であり、アスピリンは有意に大腸腫瘍の発生を抑制することが示された。

喫煙の有無で層別化した解析では、現在非喫煙者（禁煙者を含む）ではオッズ比(95%信頼区間)は0.37(0.20-0.66)と有意にアスピリンが大腸腫瘍の発生を抑制したが、現在喫煙者では2.43(0.89-6.60)と逆に促進する傾向がみられた。飲酒の有無で層別化した解析では、ほとんど飲酒しない者（週2回以下）ではオッズ比(95%信頼区間)は0.44(0.21-0.94)と有意にアスピリンが大腸腫瘍の発生を抑制した。

A. 研究目的

本邦では大腸癌の罹患が急激に増加しているため、大腸癌発生を予防する方法の開発が急務である。これまでも、われわれは食生活指導、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る。そこで今回は、低用量アスピリン腸溶錠を用いたより強力な大腸癌予防法の開発するために臨床試験を実施することにした。

B. 研究方法

対象者は、組織診断で確診された大腸腫瘍（粘膜内癌・腺腫）を1個以上持ち、それらすべてを内視鏡的に摘除できた者である。他の条件として、大腸腫瘍の内

視鏡的治療歴がすべて判明していること、全大腸内視鏡検査を2回以上受けて全大腸のクリーンコロンを3カ月以内に確認していること、40歳以上、70歳以下である。

除外基準は、粘膜下浸潤(sm)以深の大腸癌の既往、抗凝固剤、抗血栓剤を服用中、脳卒中（一過性脳虚血発作：TIAを含む）の既往、大腸切除者（虫垂切除を除く）、家族性大腸腺腫症、胃潰瘍、十二指腸潰瘍の治療既往、炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎、クローン病）、出血性憩室炎、高度の出血性胃炎などの易出血性疾患の合併、出血傾向（血小板数10万以下、PT異常値）、癌保有、抗癌剤服用、アスピリンアレルギーの既往、妊娠中及び試験期間中に妊娠予定、非ステロイド系抗炎症剤

(NSAIDs)を週3回以上服用しているものである。

参加呼びかけは、各施設の試験担当者が、面談により対象者本人へ試験内容を詳しく説明する。対象者がこれらの試験の内容をよく理解したことを確認した上で、試験への参加を依頼する。対象者が試験参加に同意した場合は、説明文書に自署による署名を得る。

試験手順は下記の通りである。

- 1)各施設にて条件に合致した者を診察した場合、「参加者情報カード」のチェックリストを用いて、適格か否かを判断する。
- 2)適格条件を満たした場合、対象者に本試験を説明し、参加同意を得る。
- 3)参加時ケースカードに必要事項を記入する。
- 4)参加者情報を試験統計家に連絡し、割付番号を受ける。
- 5)割付番号の記載された試験薬を3カ月から6カ月分手渡す。
- 6)参加者は、1カ月毎に服用日誌と服用後PTPシートを事務局に郵送する。
- 7)定期的に受診し、次回受診日までの試験薬を手渡す。
- 8)2年目に大腸内視鏡検査を行う。

割り付けは、施設、性、年齢(60歳未満・60歳以上)を割付因子とした層別化ブロックランダム法を採用する。試験統計家(鈴木貞夫:名古屋市立大学)が症例の登録、割付を管理する。

有害事象が発生した場合、その都度、主治医は『有害事象報告書』に必要事項を記入し、事務局にFAXする。事務局は

追加事項を記入の上、FAXを試験統計家に転送する。試験統計家は割付内容を記載する。有害事象がきわめて本研究において重大であると考えられたとき、または有害事象の発生の偏りが、両群共に等しいという仮説を20%以下の危険率で棄却された場合、試験統計家は倫理モニタリング委員会委員長に直ちに報告する。倫理モニタリング委員会委員長は倫理モニタリング委員会を至急開催し、協議を行う。

参加者が試験の中止を希望した場合は、中止とする。ただし、参加者本人の意思による本試験参加への同意撤回により試験薬の服用を中止した場合でも、参加者の了解が得られれば intent to treat (ITT) 解析を行うために大腸内視鏡検査は実施する。

試験データの使用や2年目の大腸内視鏡検査受検を参加者が了解しなかった場合のみ中断とし、ITT解析には含めない。

追跡調査として、2年目の大腸内視鏡検査が終了後、その後2年から3年後に大腸内視鏡検査を実施して、その結果を把握する。その大腸内視鏡検査までは、アスピリンの服用はしないように指導する。その後も参加者の了解が得られれば、可能な限り大腸内視鏡検査結果を把握する。

使用する試験薬は、アスピリン(100mg/day)腸溶錠またはプラシーボ錠である。登録の実務はデータセンターにて行う。

検査は、エントリー時と2年目に大腸

内視鏡検査（服用開始前、服用開始2年目）、一部施設ではS状結腸大腸粘膜mRNA発現（石川担当症例のみ）、直腸ACF計測（高山担当症例のみ）を行う。

エントリー時に、血液検査（PT、末梢血球数、AST、ALT、 $\gamma$  GTP、尿酸、T-Chol、HDL-Chol、中性脂肪）、食事調査（FFQ）、生活習慣アンケートを行う。

1年目、2年目に服用内容認識の確認と採血による貧血確認を行う。

低用量アスピリン腸溶錠による有害事象は消化管粘膜傷害（胃痛、胃部不快感、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、小腸潰瘍）や出血傾向に起因する疾患（脳出血、吐血、下血、貧血）などが考えられる。重大な副作用（頻度不明）としてショック、出血、皮膚粘膜眼症候群、再生不良性貧血、喘息発作などが考えられる。

主エンドポイントは、2年目の大腸内視鏡検査における新たな大腸腫瘍（腺腫、癌）の発生の有無である。副エンドポイントは、試験期間内の有害事象発生率、他臓器癌の発生の有無、2年目の大腸内視鏡検査における新たな大腸腫瘍の大きさ・個数・組織（異型度、絨毛状腺腫成分の有無）、介入後2～3年後の大腸腫瘍発生状況、直腸粘膜のACF数、S状結腸粘膜の大腸癌関連蛋白のmRNA発現程度である。

700名の試験参加を目標とする。参加者数算定の根拠は下記の通りである。プラシーボ群の2年目の腫瘍発生率を過去の報告から25%とし、アスピリンの投与によりポリープの発生減少率を60%とし

た場合、両側有意水準5%の検定を実施したとき、80%の検出力を確保することができるのは、1群当たり、250人である。研究組織と各施設の参加予定人数は、阿部孝（大阪警察病院；36人）、水野元夫（広島市民病院；30人）、岡村正造（豊橋市民病院；40人）、小西尚巳（三重県立総合病院；5人）、楠正人（三重大学消化器外科；5人）、斉田芳久（東邦鎌谷病院；40人）、田近正洋（愛知がんセンター；40人）、工藤進英（昭和大学横浜市北部病院；30人）、平田敬治（産業医科大学；18人）、田中信治（広島大学病院；30人）、権藤延久（木村病院；40人）、山村誠（神戸掖済会病院；10人）、飯室正樹（東住吉森本病院；40人）、李喬遠（守口敬任会病院；10人）、小澤平太（北里大学医学部外科；10人）、佐々木誠人・城卓志（名古屋市立大学臨床機能内科；20人）、北村信次（市立堺病院；30人）、辻井正彦（大阪大学医学部消化器内科；10人）松田尚久（国立がんセンター中央病院；40人）、佐野寧（佐野病院；40人）、杉本憲治（杉本憲治クリニック；20人）、高山哲治（札幌医科大学第4内科；60人）、石川秀樹（大阪中央病院；200人）である。

運営委員は、若林敬二、徳留信寛、酒井敏行、松浦成昭、試験統計家は、鈴木貞夫、データセンターは大谷透（メディカル・リサーチ・サポート）である。

本試験のために独立して倫理モニタリング委員会（竹下達也（和歌山県立医科大学公衆衛生学；委員長）、若林直樹（京

都府立医科大学)、平栗勲(弁護士)、辻直子(近畿大学堺病院消化器内科)を設置した。

#### (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。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。

試験参加者の個人情報(名前、住所、電話番号、通院施設、試験開始日時、個人連絡用登録番号)は、試験精度維持のため、京都府立医科大学分子標的癌予防医学大阪研究室に設置された事務局で管理するが、秘密保持のために十分な配慮を行う。具体的には、個人情報保護のため、参加者の個人情報にアクセスできる担当者を限定し、立ち入りが限定される部屋の鍵のかかるキャビネットに資料は保管され、データはインターネットとつながらないコンピューターのみに保存する。個人情報を含む文書等は、必ず封書による郵便を用い、FAX、E-mailは用いない。

#### C. 研究結果

全体会議によりプロトコルを作成し、倫理モニタリング委員会に申請、承認を得て、参加施設の倫理委員会に申請を行った。

試験薬(低用量アスピリン腸溶錠、プラシーボ)はドイツのバイエル本社より輸入し、1シート31錠のカレンダー型PTP両面アルミ包装を行い、試験統計家により割付内容を匿名化して封印した。

倫理委員会の承認の得られた施設より参加呼びかけが開始された。2007年1月に呼び掛けを開始したが、当初のエントリー期間内に目標症例数に到達することができず、エントリー期間を2回延長し、2009年7月末(31ヶ月間)までエントリーを行った。490人に参加を呼び掛け389人(79%)が参加同意し、エントリーは終了とした。

エントリー参加者のうちポリープが多数ありすべてのポリープの摘除ができなかった者1人、71歳以上1人、40歳未満3人の5人をプロトコル違反として除いた。73人は2年目の大腸内視鏡検査を受けなかった。その結果、311人が2年目の大腸内視鏡検査を受けて試験は完遂した。

試験参加中に患者の希望または重篤な副作用のためキーオープンしたのは9例あった。そのうち、特に重篤な副作用であった出血性十二指腸潰瘍、スティーブンス・ジョンソン症候群、硬膜下血腫、肺線維症の4例は全例プラシーボ群であった。

全データをエクセルに入力し、倫理モ

ニタリング委員会に提出することによりデータ固定を行った後に、臨床試験統計家によりキーオープンされた。

2群間で年齢、性別、飲酒、喫煙状況、身長、体重、エントリー前の腫瘍摘除数、大腸癌既往者数、大腸癌家族歴、介入期間、試験薬服用状況に差を認めなかった。

アスピリン群 152人中 96人、プラシーボ群 159人中 86人は2年間に大腸腫瘍の発生を認めなかった。この結果を、年齢、性、エントリー前の大腸腫瘍数で補正したオッズ比（95%信頼区間）は 0.60（0.36-0.98）であり、アスピリンは有意に大腸腫瘍の発生を抑制することが示された。

喫煙の有無で層別化した解析では、現在非喫煙者（禁煙者を含む）ではオッズ比（95%信頼区間）は 0.37（0.20-0.66）と有意にアスピリンが大腸腫瘍の発生を抑制したが、現在喫煙者では 2.43（0.89-6.60）と逆に促進する傾向がみられた。

飲酒の有無で層別化した解析では、ほとんど飲酒しない者（週2回以下）ではオッズ比（95%信頼区間）は 0.44（0.21-0.94）と有意にアスピリンが大腸腫瘍の発生を抑制したが、飲酒者（週3回以上）では 0.73（0.38-1.42）と有意な抑制効果は認められなかった。

#### D. 考察

日本人においても、大腸腫瘍保有者においてアスピリンは大腸腫瘍の発生を抑制することが示された。これまでの欧米から同様の試験が4つ報告されている。

それらの4つの報告のメタ・アナリシスによる腺腫の発生のリスク比は0.83であり、私達の研究成績とほぼ同様であった。そのことより、アスピリンの大腸癌予防効果は人種によらず、人類全体で認める作用である可能性が高いと考えられた。

ただ、これまでに報告された4つの臨床試験では、飲酒、喫煙を層別化した解析結果は示されていない。私達の結果が報告されれば、過去の4つの試験についても飲酒、喫煙を層別化した追加解析がされると思われ、それらでも同様の結果が出れば、大腸癌予防のためにアスピリンを服用する際には、禁煙することが条件になる可能性が高いと考える。

現在、本試験の2年間の介入後のさらなる追跡研究が進行中であり、その結果が待たれるが、アスピリン群において重篤な有害事象は認められなかったことより、現時点でも大腸癌や多発腺腫の既往者、Lynch症候群など大腸癌高危険度群に対してアスピリン投与について臨床応用を検討する時期になったと思われる。

#### E. 結論

日本人においても、低用量アスピリン腸溶錠は大腸腫瘍の発生を安全に予防することを無作為割付臨床試験で証明した。その効果は喫煙しない者でさらに強まるため、アスピリン服用時には禁煙することが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表



- 1) Suzuki, S., Kojima, M., Tokudome, S., Mori, M., Sakauchi, F., Wakai, K., Fujino, Y., Lin, Y., Kikuchi, S., Tamakoshi, K., Tamakoshi, A. Obesity/weight gain and breast cancer risk: findings from the Japan collaborative cohort study for the evaluation of cancer risk. *J. Epidemiol.* **23**:139-145, 2013.
- 2) Sakane, N., Kotani, K., Takahashi, K., Sano, Y., Tsuzaki, K., Okazaki, K., Sato, J., Suzuki, S., Morita, S., Izumi, K., Kato, M., Ishizuka, N., Noda, M., Kuzuya, H. Japan Diabetes Outcome Intervention Trial-1 (J-DOIT1), a nationwide cluster randomized trial of type 2 diabetes prevention by telephone-delivered lifestyle support for high-risk subjects detected at health checkups: rationale, design, and recruitment. *BMC Public Health*, **13**:81.
- 3) Hishida, A., Wakai, K., Okada, R., Morita, E., Hamajima, N., Hosono, S., Higaki, Y., Turin, T.C., Suzuki, S., Motahareh, K., Mikami, H., Tashiro, N., Watanabe, I., Katsuura, S., Kubo, M., Tanaka, H., Naito, M. *Endocr J.*, **60**:237-243, 2013.

## 2. 学会発表

### G. 知的所有権の取得状況

#### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

乳腺発がん抑制物質の探索

分担研究者 今井俊夫

独立行政法人国立がん研究センター 研究所 動物実験支援施設長

研究要旨 高カロリー/高脂肪食摂取による高レプチン血症に着目し、7, 12-ジメチルベンズ(a)アントラセン (DMBA) 誘発ラット乳腺発がんに対するレプチンの影響を明らかにするとともに、高レプチン血症に対する改善作用が期待される分岐鎖アミノ酸 (BCAA) の乳腺発がんに対する抑制作用を検討することを目的としている。今年度は F344 雌ラットに対し 5~9 週齢時に高脂肪食（コーン油あるいは牛脂添加食）及び BCAA 添加食を与えた際の DMBA 乳腺発がんに及ぼす影響を検討した。また、高脂肪食/BCAA の DMBA 投与時における血清生化学値及び乳腺組織に対する影響を検索する目的で、5~6 週齢時に高脂肪食/BCAA を与えた予備実験を併せて実施した。予備実験の結果、基礎飼料を与えた対照群に比しコーン油食群と牛脂食群に共通した影響として、血清レプチン値の上昇あるいは上昇傾向及びアディポネクチン値の低下がみられたが、BCAA はこれらに対して明らかな改善作用を示さなかった。発がん実験においては、腺がんの発生時期、発生頻度、数および体積の各指標にて、対照群に比しコーン油食群と牛脂食群では発がん促進作用を示し、発生する腺がんの形質にも影響することを明らかにした。また、BCAA は高脂肪食による発がん促進作用に対し、抑制傾向を示すことを明らかにした。また、発がん促進及び腺がんの形質変化に関与する遺伝子の探索を試みた結果、2つのキナーゼの遺伝子発現レベルあるいはタンパク質レベルでの増加との関連性を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

米国に移住したアジア人女性の乳がんリスクの増加、特に胎児期あるいは若齢期における米国での生活習慣が乳がん罹患率に影響することが報告されているが (Ziegler RG, et al., 1993)、その原因を裏付ける詳細なデータは得られていない。一方、5日間高カロリー/高脂肪食を摂取した男性においてレプ

チン値を含む種々の血清パラメーターの顕著な変動がみられたとの報告がある (Brons C et al., 2009)。

本研究では、高カロリー/高脂肪食摂取による高レプチン血症に着目し、7, 12-ジメチルベンズ(a)アントラセン (DMBA) 誘発ラット乳腺発がんに対するレプチンの影響を検討している。また、マウスの高脂肪食/過食による脂質

異常症/高インシュリン/高レプチン血症に対し改善作用を示す分岐鎖アミノ酸 (BCAA) について、ラット乳腺発がんに対する抑制作用を検討し、予防法の確立に向けた基礎データを構築することを目的とする。

これまでに我々が実施した研究において、レプチン受容体遺伝子のヘテロ変異体である Zucker (+/*fa*) ラットは野生型 (+/+) ラットに比して 7~11 週齢時における血清レプチン値が高いこと (Cho YM et al., 2012)、DMBA 誘発性の乳がんの発生時期が早く、発生頻度、発生数、腫瘍体積が増加することを明らかにした。また、野生型 (+/+) ラットに発生する乳がんは高分化型であるのに対し、乳がんの発生がみられた Zucker (+/*fa*) ラットの約半数例には強い浸潤性と豊富な間質増生を伴う高異型度中・低分化腺がんが認められたことから、若齢期の高レプチン血症が乳腺発がんの促進のみならず組織型にも関与している可能性を示した (Imai T et al., 2013)。以上より、本年度の研究においては、高レプチン血症誘発との関連性が示唆されている高脂肪食を与えた F344 ラットを用いて、乳腺発がんとの関連性を解析した。

## B. 研究方法

[高脂肪食及びBCAAを2週間与えた際のF344 雌ラットの血清生化学値と乳腺組織に及ぼす影響 (予備実験) ]

F344 雌ラット 37 匹を 6 群に分け、5 週齢~6 週齢時の 2 週間にわたり 1) 基礎食 (対照) 2) 3.0%BCAA 添加食 3) 10%コーン油添加食 4) 10%コーン油+3.0%BCAA 添加食 5) 牛脂添加食 (Quick Fat™、QF、日本クレア) あるいは 6) QF+ 3.0%BCAA 添加食を与えた。実験期間中、体重は週 1 回、摂餌量は 2 日に 1 回測定し、実験終了時にはイソフルラン麻酔下にて腹大動脈より採血した後、出血致死させ、肝臓、腹腔内 (子宮周囲) 脂肪、乳腺組織 (fat pad) を採取して重量を測定した。また、片側の乳腺組織については常法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、HE 染色標本による病理組織学的検索と Ki-67 免疫染色による陽性細胞を指標とした細胞動態学的検索を行った。また、片側の乳腺組織については whole mount 標本を作製し、単位面積当りの terminal end bud の数を計測した。血清生化学検査として、採血後に遠心分離により得られた血清を用いて、エストラジオール (SRL)、レプチン (Rat Leptin HS、YK051、矢内原研究所)、アディポネクチン (Adiponectin(rat) ELISA Kit、AdipoGen)、インシュリン (Rat Insulin ELISA、Mercodia)、IGF-I (Quantikine™ ELISA、Mouse/Rat IGF-I、R&D Systems)、トリグリセリド (TG、富士ドライケムスライド、TG-PⅢ、富士フィルム)、総コレステロール (T-Cho、TCho-PⅢ、同左) 及び HDL コレステロール (HDL-C、

HDL-C-PⅢD、同左)濃度を測定した。

[高脂肪食及びBCAAを幼若期に5週間与えた際のDMBA誘発F344ラットの乳腺発がんおよび影響]

F344雌ラット60匹を5群に分け、5週齢～9週齢時の5週間にわたり1)基礎食 2)10%コーン油添加食 3)10%コーン油+3.0%BCAA 4)牛脂添加食(QF)あるいは5)QF+3.0%BCAA添加食を与えた。実験開始3週目の7週齢時にはDMBAを50 mg/kg体重の用量で強制経口投与した。実験期間中は週1回、体重及び摂餌量を測定するとともに触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察し、実験終了時にはイソフルラン麻酔下にて腹大動脈より採血した後に放血致死させ、乳腺腫瘍、乳腺組織を採取して病理組織学的及び免疫組織化学的に検索した。乳腺腫瘍の長径が概ね7 mmを超えるものについては、腫瘍組織の一部と当該個体の正常乳腺の一部を液体窒素にて凍結し、-80℃にて保存した。また、触診において乳腺腫瘍の長径が30 mmを超えたことが確認された時点を実験的エンドポイントとして当該動物を切迫屠殺し、最終剖検例と同様に検索した。

凍結保存した一部の乳腺腫瘍については、総RNAを抽出し、全遺伝子型DNAチップ(3D-Gene、Rat Oligo chip 20k、東レ)を用いた解析を行った。また、凍結保存した正常乳腺組織及び乳腺腫瘍について、タンパク質あるいは総RNAを

抽出し、ウェスタンブロッティングあるいはRT-PCRを併せて行った。

(倫理面への配慮)

使用する動物数は最少限に留めた。投与実験は混餌による経口投与が主体であり、また動物は全てイソフルラン麻酔下で大動脈からの脱血により安楽死させ、その他の実験手技についても動物の愛護に十分配慮して行った。実験の開始に当っては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)」及び「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出して実施承認を得た。

## C. 研究結果

[高脂肪食及びBCAAを2週間与えた際のF344雌ラットの血清生化学値と乳腺組織に及ぼす影響(予備実験)]

・体重、摂餌量、臓器/組織重量

各群の体重の推移を表1に示した。各群間の差はみられなかった。一方、摂餌量は1)基礎食(対照)と2)BCAA食群では11.3～13.4 g/rat/dayの範囲で推移したのに対し、3)コーン油食、4)コーン油+BCAA食、5)QF及び6)QF+BCAA食群では8.7～11.8 g/rat/dayの範囲であり、基礎食(粗脂肪4.7%)、コーン油食(同