

NEWS LETTER

No.17 Sep.
1998

Japanese Society For Cancer Prevention
日本がん予防研究会

充実した発表、活発に討論 盛会裡に第5回研究会終わる

代表世話人
渡辺 民朗
(岩手県立大)

平成10年7月30日、31日の2日間に亘り、仙台市国際センターにて会議が持たれた。天候の勝れない季節の故か、前回の神戸の会議に比し、出席者は少なかった。総数約140名である。しかし、シンポジウム2題と一般演題について、それぞれ活発な討論があり、がん予防の研究会に相応しい発表内容であった。これらの大部分はそれぞれの座長の津田、前田の両先生より報告があると思う。

私は一般演題を中心として、一部私自身の発表を含めて、印象記をまとめたと思う。

本年の発表で目につくのはやはりラジカル産生抑制物質である。それらはTPAによるSuperoxide生成やLPS/IFN- γ によるNO生成をPolymethoxyflavonoidsによる抑制(近大・村上)、Butylhydroperoxideによるそのラジカルの産生をFlavonoidやPhenolにより抑える(澤・熊大)報告である。さらに、炎症性腸炎と大腸発がんのリスクとの関連からAP-1やNF- κ Bの活性化の抑制がアポトシスを誘導したり(大高・国立がんセ)、Cyclooxygenase-2(COX-2)や誘導型NO合成酵素の転写活性の抑制因子が大腸がんの増殖抑制物質の検索に有用である(武藤・国立がんセ)ことを示唆している。さらに、

COX-2の選択的阻害剤の効果はニメスリドによるPhIP誘発ラット乳腺発がん(中継・国立がんセ)や、セレコキシブ(川森・国立がんセ)とNS398(吉見・岐阜大)によるAzoxymethane(AOM)誘発ラット大腸発がんの抑制として証明している。

一方、大腸がんの発生抑制をみるとS-MethylcysteineとCysteine(市原・大阪市大)の効果、またAOM誘発がんの米胚芽(川端・岐阜大)やフェルリ酸誘導体(Park・国立がんセ)の効果が報告され、乳腺がんの発生抑制ではPhIPの誘発がんの大豆製品(太田・国立がんセ)とNMU誘発がんの味噌含有食(殷・広島大)の阻害効果が示された。

欧米での増加が顕著な前立腺がんの発がん抑制には、DMABによるAtypical Hyperplasiaに対する緑茶抽出物(森田・筑波大)やLycopeneなどのカロテン類(二口・名古屋市大)の発がんへの効果が報告された。しかし、被検物質の投与方法により発がんの抑制と促進の相反する両面性の効果があることも示され、化学予防の問題点が再び指摘された。すなわち、小林(奈良医大)によるDEN投与とコリン欠乏アミノ酸食による肝がん発生に対するAuraptaneの異なった効果や、



第5回研究会総会であいさつする渡辺民朗代表世話人

加藤(名古屋市大)による多臓器中期発がん試験において、プロポリスは乳腺がんを抑制し、肝がんは促進的に作用したからである。

次に、シンポジウムの話題としての、薬物代謝酵素遺伝子の多型と発がん感受性について述べる。ヒトの発がんリスクを考えると、例えば肺がんをとりあげても、がん抑制遺伝子P53やRbの欠損、そしてがん遺伝子のK-rasやbcl-2の変異と共に、発がん性化学物質の活性化、または不活性化酵素の遺伝子の変異との相

関も問題になってきている。がん原性芳香族炭化水素によるマウスの皮下肉腫、皮膚扁平上皮がん、または肺がんの発生の遺伝的系統間の差異は、薬物代謝酵素、シトクロームP450 (CYP) 1A1と関連するAh受容体 (ダイオキシン受容体) の多型に依存することが証明されているため、ヒトへの分子疫学的研究が始まった。

神奈川県立がんセンターの木原は、ケースコントロール研究により、CYP1A1とGlutathione S-transferase(GST)M1/P1の遺伝子多型と呼吸器、尿路のがんのリスクとの関連を調べた。その結果、CYP1A1の多型の内、制限酵素Msp1に対する変異とGSTM1の変異 (たんばくの欠損) が共存する場合に、喫煙者のみにOdds Ratioが上がり、リスクが増大した。しかし、非喫煙者ではリスクが上がらなかった。また、GSTM1の変異とGSTP1の変異 (イソロイシンからバリリンへの変換) の共存は喫煙者でリスクを上昇させた。一方、前立腺がんについては、喫煙歴と関係なく、CYP1A1とGSTM1の変異対立遺伝子の共存でリスクが増大した。これらは喫煙中の芳香族炭化水素はCYP1A1により活性化され、活性型のエポキシドはGSTM1、またはP1の基質となり解毒されるため、変異遺伝子の共存は生体内における活性型がん原物質の濃度の上昇を示唆し、細胞のがん化との関連、すなわち個体レベルのがん感受性の増大となると考えた。

渡辺 (岩手県立大) は肺がんにおける薬物代謝酵素遺伝子の多型とがん感受性との相関についての概説を試みた。遺伝子の多型は、ヒトのリンパ球を使用して容易に同定できるが、その遺伝子の発現型としてのたんばく量、または酵素活性の測定の高確性、再現性については解決されるべき課題が多い。ヒトでのCYP1A1の酵素活性を測定する試みはリンパ球をin vitroで誘導することにより行われていた。しかし、酵素活性や誘導性に季節変動を示したり、誘導剤のメチルコラントレンや芽球化のために使用する植物性変異原物質の添加効果による定量性が問題になるため、その再現性に疑問が生じる。そこで、野生型と変異性CYP1A1遺伝子を酵母、または大腸菌に導入し、その発現蛋白の酵素活性を測定する試みがなされた。その結果、ベンツピレン3水酸化酵素活性、または活性型物質、ベンツピレン-7,8-ジオール体の生成反応において、両者の間でVmax、Km共に差異が認められなかった。このことはCYP1A1遺伝子の多型において合計四

種の変異部位、CYP1A1 (野生型)、2A (T₆₂₃₅C)、2B (T₆₂₃₅C、A₄₈₈₉G)、3 (T₃₆₃₉C)、4 (C₄₈₈₇A) があることと考え合わせて、より詳細な検討を要する。

ニトロサミン類やベンゼンの代謝活性化酵素としてのCYP2E1の遺伝子多型も詳細に検討されている。CYP2E1遺伝子の制限酵素Dra1 (T₇₆₆₈A) による多型の存在を確かめ、そのヘテロ体が肺がんの感受性を上げることを初めて報告した。しかし、世界的には追認されなかった。その後、遺伝子上に多くの変異部位が発見され、肺がんとの相関が論じられてきている。現在は5'上流域の変異についての研究がすすみ、in vitroのmRNAの活性測定から、(T₂₉₇A) / (G₃₅T) の変異型が重要ではないかと推定されているが、CYP2E1の酵素活性との相関についての報告はない。

また、マウスで指摘されたヒトのAh受容体の遺伝子多型を調べると、マウスとヒトとの相同性から推定される遺伝子変異部位と肺がんとの相関は認められず、他のG₁₇₂₁A (アルギニン554リジン) の変異も検討されたが肺がんとの相関はなかった。現在はCYP1A1のin vitroの酵素活性との関連から (G₁₇₂₁A) に連鎖した (G₁₉₈₈A) の変異型が重要と考えられるが、ケースコントロール研究よりの報告はない。

これら遺伝子多型についての疫学的研究において強調したいことの一つに、東洋人と白人の間の民族差が著明にあることであり、特定地域における癌原性化学物質への暴露との関連に加えて、ケースコントロール研究の結果の説明をより困難にしている。しかし、薬物代謝酵素の遺伝的多型の存在は明らかであり、新たな多型性の検索と共に、同一人における異なる遺伝子変異の共存についてもより詳細な検討が求められる。

最後に、市民公開講演会について報告する。ヒトがんの予防を主題として、伊東信行先生の「がんから逃れて天寿を全うするために」と、阿部薫先生の「がん診療の現状」についての講演があった。伊東先生は化学物質によるがん化の機構からがん化学予防の機構について具体的に説かれ、天寿がんの意識とヒトの寿命との関連性を平易に話された。また、内分泌攪乱物質についても触れた。阿部先生はがん診療からがんの緩和ケア、そして臨終に際しての生と死の問題を医学と哲学の両面から話しをされ、先生の広い、そして深い宗教観に聴衆は深い感銘を受けた。

津田 洋幸

(国立がんセンター研究所化学療法部)

シンポジウム1-6では「ヒトと動物における遺伝的発がん体質：その予知と予防」のテーマにてヒトにおける遺伝子異常の関与と種々の動物の高発がん形質モデルを用いて、発がんの予知と予防の可能性について熱心な討論がなされた。ここでは、ヒトではHNPCCの自然史と予防・治療に関わる諸問題と、動物では遺伝的発がん体質実験モデルにおける最近の知見についての発表を要約する。

九州がんセンターの牛尾恭輔博士は遺伝的素因によるがん好発家系として、国立がんセンターでのHNPCCについて臨床医の立場からその自然史を通常の大腸がんと比較し、効果的な予防方法について考察を行った。その結果、HNPCC大腸がんは59例あり、1家系あたり3.7人の頻度であった。また大腸がん以外の悪性腫瘍の頻度は、胃がん8例 (30.8%)、子宮体がん5例 (19.2%)、卵巣がん4例 (15.4%)、泌尿器系がん2例 (7.7%)、悪性リンパ腫2例 (7.7%)、その他の悪性腫瘍5例 (19.2%) であり、他の悪性腫瘍との合併が多いことが特徴であった。さらに、世代を経るにつれて悪性腫瘍の出現が若年化する傾向を認めた。しかし、HNPCCでみられた進行大腸がん通常進行大腸がんの大きさのdoubling timeは、それぞれ12.0カ月と11.1カ月で、両者に統計学的な差は認められなかった。以上から、HNPCCは大腸以外の臓器との重複がんとして胃がん、子宮体がんおよび卵巣がんとの合併頻度が高いが自然史は通常の大腸がんと同じであろうと推定された。したがって、HNPCCの診療に際しては、大腸と重複がんの定期的な経過観察と早期がんでの切除が進行がんへの推移を防ぎ得ると結論した。化学予防に関しては今後の課題としている。

東京大学の石川隆俊教授は、遺伝的素因によるがん好発実験モデルとして、発がんの初期過程に関与するDNA修復酵素遺伝子トランスジェニックマウスないしはノックアウトマウスの発がん感受性についてみずからのデータに基づき検討を加えた。ニトロソ化合物等によるDNA損傷のO⁶メチルグアニンを除去するメチルトランスフェラーゼ遺伝子を導入したマウスはその酵素活性は通常マウ



熱心に討論が行われたシンポジウム会場

スの10倍であり、ジエチルニトロサミンおよびジメチルニトロサミンによる肝発がん実験において対照マウスに比べ有意に抑制された。逆にDNA除去修復のできない色素性乾皮症XPA群遺伝子ノックアウトマウスにおける皮膚発がんでは極めて早期に発がんがみられ、遺伝的素因としてDNA修復能が発がんに関与していることを示した。またヒトの皮膚では太陽紫外線によって多数の細胞にピリミジンダイマーの形成によって見出されるDNA傷害がおこることを実証し、DNA傷害は実際に高頻度におきることから遺伝的素因としての修復酵素の活性の程度が発がんに関与することを指摘した。

さらに癌研究所の伊藤正紀博士は、消化管に約60個の腫瘍が発生する家族性大腸腺腫症(FAP)モデルマウス(APC1309)を作製し、この動物と各種近交系マウスとの交配を行ったところ発生する腫瘍の数に大きな差異のあることが分かり、発がん感受性を制御している他の遺伝子(モディファイアー遺伝子)の存在を想定し、その同定の試みを紹介した。遺伝的背景がC57BL/6(B6/B6)であるAPC1309マウスを、野生型近交系マウスCAST/Eiと交配する事により得られたF1マウスでは、発生する腫瘍数が平均5個と顕著に抑制された。そこで、このF1マウスをB6マウスに戻し交配し、N2を得て、腫瘍発生数に影響を

与える発がん制御遺伝子をQTL(Quantitative trait loci)法により解析している。染色体4番、17番に消化管腫瘍発生を優性に抑制するがん制御遺伝子の存在が示唆され、その発がん制御メカニズムの解明の試みを解説した。実験モデルにおける新しいがん制御遺伝子の単離が期待された。

筆者らは、ラットではマウスに比べて豊富に前がん病巣の解析データが得られているにも拘わらず、発がん感受性トランスジェニックラットはまだ作られていないことから、ヒトプロト型c-Ha-rasトランスジェニックラットを作製しその発がん感受性について要約した。このラットはヒトc-Ha-ras遺伝子が3コピー導入されていることによって乳腺、食道および膀胱に発がん感受性の亢進がみられとくに乳腺ではMNU、DMBA、PhIPのいずれの発がん物質にも極めて感受性が高く、わずか8~12週の短期間でほぼ全例に乳がんの発生をみることを見出した。今後発がん物質および発がん抑制物質中期検索系としての有用性について言及した。

がん化学予防物質についていくつかの新しい成果が提示された。近畿大学の清水博士らは、今までの多くのがん化学予防物質のように発生したラジカルを消去する作用ではなく、ラジカルの産生を抑制する物質として柑橘類成分からフラボノイドのノビレチンを単離した。ラジ

カル消去作用物質には前胃等に発がん性を示すものがあるため、今後有望な物質の一つである。国立がんセンター研究所の太田博士はPhIP乳腺発がんに対して大豆イソフラボンが有効であることを示した。とくにイソフラボンの乳酸菌発酵によってより有効ながん予防作用をもつアグリコンが生成されることが分かった。大豆摂取と乳がんの発生が逆相関する傾向が指摘されていることから興味もたれる。同様に名古屋市立大学の崔博士はラット前立腺発がんに対して大豆イソフラボンのゲニスチン/ゲニスタイン、ダイジン/ダイゼインが有効であるとの発表があった。広島大学の殷博士の味噌がMNU乳がんの有効であるとの発表もイソフラボンによると考えられる。フラボノイドは抗炎症作用も持つことからこの面での臨床試験への進展が期待される。また岐阜大学の川端博士による米胚芽成分による大腸がん予防効果の報告は、原材料が容易に得られる意味においてもさらに発展することが望まれる。大腸発がんに対するCOX-2選択的阻害剤については、ニメスリド、セレコキシブ、NS-398等が検討され、有効性が確認されてきた。高危険度群に対する臨床応用への早い進展が望まれる。筆者らによって明らかにされてきたラットの大腸発がん予防物質のウシラクトフェリンは肺と食道に対しても有効であり、さらにながんの肺転移も抑制することが分かってきた。後者においては末梢血中のNK細胞とCD8⁺/CD4⁺細胞の誘導作用が関与する可能性が新たに示された。

第5回がん予防研究会の報告 —シンポジウムⅡを中心に—

前田 浩

(熊本大・医・微生物学)

今回は二つのシンポジウム(計12題)があり、またポスター36題については、各2分間のサマリープレゼンテーションが施行された。本稿ではシンポジウム(Ⅱ)演題S-7~S-12を中心にまとめた。

シンポジウムⅡの講演演題は次の通りである。(以下文中、敬称略)

[主題] がん抑制に関わる酵素及び調節因子

[S-7] ・感染症発癌に関与する酵

素群とフリーラジカル（前田 浩、熊本大・医）

[S-8] ・ DNA 傷害ストレス応答におけるNF- κ B活性化とその役割（山本健一、金沢大ガン研）

[S-9] ・ NO Synthase, Cyclooxygenase（若林敬二、国立がんセンター研）

[S-10] ・ がん抑制に関わる酵素および調節因子：Glutathione peroxidase (GPX) 及びMn-superoxide dismutase (Mn-SOD)（谷口直之、大阪大・医）

[S-11] ・ 発がん過程におけるGlutathione S-transferaseの発現と機能（土田成紀、弘前大・医）

[S-12] ・ アセチルトランスフェラーゼとスルホトランスフェラーゼ（山添 康、東北大・薬）

このシンポジウムⅡは、まず、オーガナイザー [前田 浩・若林敬二] を代表して、前田が、このシンポジウムはラジカル発癌を見据えた立場で、その内容を発癌とがん抑制に関わる諸酵素とその産生分子種（ラジカル種）などを中心に、それらに基づく癌予防の展望を論じるべく企画した。

最初の演題 [S-7] で前田が、日本における癌のうち、胃癌、肝癌などをあわせると50%以上は微生物の慢性感染症による発癌となること、その背景というか、主たるメカニズムは宿主由来のラジカル（反応）性分子種によるDNA傷害が多様に生じていることを総括的に論じた。例えば、その中心はスーパーオキシド (O_2^-) とNOの同時生成であり、この両者から生じるONOO $^-$ の核酸の化学修飾に起因するとの考え方である。また、今年になってEiserichらの報告による好中球ミエロパーオキシダーゼ由来のHOClとNO $_2$ によって生ずるNO $_2$ Clの強い反応性も注目に値するという。前田はセンダイウイルス (RNA型) および、その他のモデルDNA/RNAを用いて、塩基の修飾がONOO $^-$ によって高頻度に起こることを示した。

感染や炎症の場では数多くのサイトカインが変動するが、[S-8] の演題において、山本はそのうちの転写因子のNF- κ BがDNA損傷時に活性化し、細胞のアポトーシスやp53のプロモーターの活性化について論じた。一方、国立がんセンターの若林は [S-9] で誘導型のNO合成酵素とシクロオキシゲナーゼ (COX) - IIを中心にマウス、ラットの大腸がんモデル系の成績を報告した。また、COX-

IIの誘導に対して、NSAID (non-steroidal antiinflammatory drugs) のうちCOX-IIをより選択的に阻害するnimesulide等を投与することで、その発癌抑制効果のあることを示した。また、 ω -3系のDHAやアセトキヤビコール酢酸 (ACA) がiNOSの転写を抑え、NO生成の抑制によって癌抑制の有効性を発現していることにも言及した。

このようなスタンスにあった発癌抑制の型の酵素としてSOD (スーパーオキシドディスムターゼ) とGPX (グルタチオンパーオキシダーゼ) にフォーカスをあて、それに関する問題を谷口が [S-10] において論じた。このポイントはラジカル生成に付随して、これらの酵素が不活性化され、ラジカル除去機能が喪失することである。通常ミトコンドリアに存在するMnSODは、大腸癌への移行が疑われている潰瘍性大腸炎モデル等でも強く出現してくるが、NO代謝物のONOO $^-$ によって特定のMnSOD上のチロシンがニトロ化され、失活する。また、GPXにおいては分子内のKeyアミノ酸であるセレノシステイン (SeCys) に対するニトロ化やニトロソ化が、この酵素活性を阻害することになる。かくして、炎症反応性の酸化ストレスは生体内の抗ラジカルシステムを傷害し、vicious cycleが始まると考えられる。もう一群の発癌抑制酵素ともいえるGST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ) について、[S-11] で土田が講演した。GSTは、発癌剤の解毒とともにグルタチオンレベルを保持することによって、生体の酸化的ストレスに抵抗性を与えると考えられる。GSTには4つのアイソザイム [a, m, Pi, Theta] が知られているが、そのアイソザイムの一つ、GST-Piはラット肝の前がん状態で40倍も上昇している。これから異なったアイソザイムの誘導が異なった癌腫の発生に関係があることが示唆された。また、発癌と癌抑制を制御することの知られているレチノイドをGSTが代謝し、また、それがレチノイン酸受容体の機能をモジュレートすることがわかってきた。これもGSTがレチノイン酸による発癌のモジュレーションに関わることを示すということもできよう。GSTの各サブユニットは異なった遺伝子にコードされ、そのDNAの変異の多様性が存在する。このうちのPiクラスについて言うとならとマウスの種差によって高発癌の臓器が異なり、また、ある場合には増加し、アポトーシス抑制に働くという。これらはまた、細胞内のグルタチオンレベルの制御によって caspase

(アポトーシスを制御する) の活性制御にリンクしているかどうか興味のあるところである。

最後は、チトクロームP-450関連はシンポジウム (I) で取りあげられたが、[S-12] ではそれに多少関連するアセチルトランスフェラーゼとスルホトランスフェラーゼを中心に山添が論じた。この両酵素はP-450によってOH化された芳香族化合物などのアセチル化、硫酸化を行う酵素であるが、この遺伝子も多く多型が見出されたが、その特定の型別が特定の癌腫の発生に関わるかどうか、興味をもたれる。そのアイソザイムのいくつかは、癌原物質の代謝に関わることが明らかとなった。

次に今回初めて試みられたポスターセッションの2分間のブリーフ・プレゼンテーションは大変好評であったと思う。2分間で、結構意味のある内容が表現でき、それに対する質疑応答も大変活発であった。紙数の都合でその内容を逐一ここで取りあげるわけにはいかないが、大半は充実した内容が多かった。フラボノイドその他の発癌抑制物質、COX-2インヒビター、ラクトトランスフェリンなど、また、多くの食品成分、例えば、お茶類、ビフィズス菌など、各種化学発癌剤投与モデル動物に対する各種抗酸化剤の影響、抗炎症剤、*H. pylori*の胃癌発生の増強因子、肺腺癌と大腸癌発生の国別比較、便のpHと大腸腺癌の関係、などである。

筆者の希望としては今後もこのブリーフ・サマリー・プレゼンテーションは続けてほしいと思う。

国際交流会館に変更

第6回がん予防研究会の会場

第6回がん予防研究会の会場は当初予定していた灘尾ホールから下記に変更された。

期 日 1999年7月16、17日

会 場 国立がんセンター内がん研究振興財団 国際交流会館 3Fホール

会 長 垣添忠生・国立がんセンター中央病院長

シンポジウム (仮題)

「動物がん予防の愉びと空虚、ヒトがん予防の悦びと苦しみ」

パネルディスカッション (仮題)

「ヘリコバクター・ピロリの除去：その期待と不安」

野菜・果物とがん予防

小清水 弘一

(近畿大学生物理工学部生物工学科)



はじめに

野菜と果物を多く摂取すると、例外もあるが、いろいろな部位での発がんの危険度を低減させることが、137例におよぶ疫学調査研究に基いた最近のレビューで、あらためて確認されている。^{1,2)}特に、消化器系や呼吸器系の上皮性がんでは、顕著な相関性が認められている。

疫学調査研究によって証明されている野菜・果物の発がん抑制効果を化合物レベルで解明するために、筆者らは抑制活性を広くスクリーニングすることからスタートした。顕著な抑制活性を示した試料がみつければ、含まれている活性本体を単離し、化学構造を解明するとともに、その作用機構を検討しようとする構図で、生理活性天然物化学の研究手法である。その概略を以下に述べさせていた

発がんプロモーション抑制活性の評価系

植物の粗抽出物から目的とする生理活性物質を効率よく精製・単離するためには、少量で数多くの試料を同時に検定できる短期検定系が必須で、研究の成否を支配する。筆者らは1970年代にトウダイグサ科植物の有毒成分を探索していた過程で、Epstein-Barr virus (EBV) 活性化試験法を伊藤洋平教授(京大医)、大里外誉郎教授(北大医、現北医療大)から導入させていただいた。このEBV活性化試験法によってナンキンハゼからTPA関連化合物である発がんプロモーターを単離することができた。³⁾

興味あることに、その分離精製のある段階で、プロモーション活性が劇的に急上昇することが判ってきた。すなわち、プロモーション活性を抑制する成分が混在していることを示唆していた。これが

ヒントとなって、TPAを添加したEBV活性化試験系を発がんプロモーション抑制活性の評価に*in vitro*試験法として適用できることがわかった。

プロモーション抑制に着目したもう一つの理由は、化学発がんの多段階機構においてプロモーション過程は可逆的であり、また成立には長期間を必要とすることにある。すなわち、この過程の進行を停止、あるいは遅延させることが可能であり、化学予防が効果的に行える過程であると考えられたからである。

日本産野菜・果物の発がんプロモーション抑制活性評価

そこで上述の*in vitro*法を用いて、野菜・果物121種133部位についてプロモーション抑制活性の評価を開始した。発がんプロモーターに対してメタノール抽出物5,000倍添加条件下で検定し、抑制率(IR)により強活性(+++、IR \geq 70%)、中活性(++、70% $>$ IR \geq 50%)、弱活性(+、50% $>$ IR \geq 30%)、および不活性(-、30% $>$ IR)の四段階に分けて評価した。図1(最下段)のように、強活性を示した種数は全体の12%に相当する16種、さらに中活性および弱活性を示した種数はそれぞれ6種および10種で、4種に1種はポジティブな活性を示すことが判った。⁴⁾

ここで得られたプロモーション抑制活性は、粗メタノール抽出物に混在する化合物の相互作用によって、加算的、相乗的に強い活性を、場合によっては総和的に不活性または弱い活性を示している可能性がある。特に強い活性を示したワカメやコンブの粗抽出物を分離精製するにつれて、活性が分散、あるいは低下した例は、その可能性を示唆していた。逆に不活性な粗抽出物であっても、部分精製によって活性が現われる例も認められた。特に、ゴボウなど根菜類でその傾向を示す種が多く認められた。

東南アジア産野菜・果物の評価

発がんプロモーションのスクリーニングを食文化が豊かな東南アジアに広げた。同地域では品種改良などの人為的な操作が加わっていない原種に近い野菜類も多く、伝統的な調味料、あるいは伝承民間薬として利用されている種を含めると、食用植物種は極めて多彩である。さらに、野草も依然として一般に消費されていて、貴重な試料となった。

まず、タイの市場で購入(1993年11月)した各種食用植物122種を上記と同様な方法で抽出し、プロモーション抑制

活性を検定した。図1(下から二段目)に示したように、強活性39種(32%)、中活性12種(10%)、弱活性22種(18%)で、日本産常食野菜類と比較して、予想を超える2倍以上の高い頻度で抑制活性が検出できた。⁵⁾興味あることに、ショウガ科、ミカン科、シソ科、コショウ科の食用種では、そのほとんどが強活性を示し、タイ特産の食用植物は、発がん予防機能性食品を開発するうえで注目すべき研究対象であることが示唆された。

ついでインドネシア(1996年2月)からマレーシア(1996年11月)へとスクリーニングを拡大し、都市や田舎の市場で販売されている食用植物素材それぞれ141種および134種を購入し、プロモーション抑制活性を検定した。インドネシアについては、中活性18種(13%)と弱活性14種(10%)で、その出現頻度はタイ産と同程度であったが、強活性は66種(47%)と極めて高く、最優先の研究対象であることが明かとなった。⁶⁾マレーシア産のスクリーニングは現在進行中であるが、活性出現頻度の途中経過はインドネシア産のそれとほぼ同程度(図1最上段)で、強活性42種(31%)、中活性32種(24%)、弱活性21種(21%)と高い値を示した。

東南アジア食用植物種の多様性

ところで、分析試料の採取にあたっては、いずれの国においても市場で通常販売されている食用植物をランダムに購入してきた。したがって、同種の野菜・果物を取り扱ってきた可能性がある。そこで、評価した食用植物種が各国でどの程度重複しているのかを知るために、種の同定が完了した日本、タイおよびインドネシアの三国の野菜類について取りまとめた。図2に示したように、三国間で重複市販されている野菜種数は13種と限られていて、二国相互間でも10~14種程度であった。この事実は、それぞれの国の伝統的食文化に沿った嗜好性の高い特有の食用植物が消費されていることを窺わせる。すなわち、東南アジア産の食用植物は種的に多様性に富み、がん予防物質の探索研究の対象として最適であることが判明してきた。

*In vitro*抑制活性物質の同定と発がん抑制活性の評価

有効な活性を示した野菜・果物からEBV抑制活性を指標として、これまでに20種以上の*in vitro*発がんプロモーション抑制物質を単離・同定することができた。これらの化合物について、さらに

動物実験系で発がん抑制活性を評価するには、i) *in vitro*系で顕著な活性を示し、ii) 特徴ある化学構造で、抑制活性について未知であり、iii) 天然素材から、あるいは合成的に、容易に大量調製できる、などの条件を満たすことが望まれる。⁷⁾

この条件をクリアした化合物は、シヨウガ科に属すナンキョウ (*Languas galanga*) 根茎の成分 1'-acetoxychavicol acetate (ACA)⁸⁾ と各種カンキツ類果皮成分のクマリン誘導体 auraptene⁹⁾ (図3)であった。

まず、マウス皮膚発がんモデル (DMBA/TPA系) では、両化合物とも顕著なプロモーション抑制作用を示した。⁸⁾ ⁹⁾ さらにラット口腔発がん (4-NQO誘発)¹⁰⁾ およびラット大腸異型腺窩巢形成 (AOM誘発)¹¹⁾ のモデル系において、両化合物とも顕著な発がん抑制活性を示すことが田中卓二教授 (岐阜大医、現金沢医科大) によって認められた。

作用機構

動物実験と並行して作用機構についても検討が進められていて、その結果の一部を表1にとりまとめた。xanthine oxidase による superoxide (O_2^-) 産生抑制において、auraptene は活性を示さなかった点を除くと、両化合物の作用機構は類似していた。¹²⁾ すなわち、ACA と auraptene は分化 HL-60 細胞で強い O_2^- 産生抑制能 (ACA: $IC_{50}=4.3\mu M$, auraptene: $IC_{50}=1.2\mu M$) を示し、また細胞内 peroxide (ROOH) 量をも減少させることが確認された。両化合物とも O_2^- 消去作用を示さないことから、NADPH oxidase 系を抑制していると推測される。さらに両化合物は、RAW 細胞で顕著な NO 産生阻害作用 (ACA: $IC_{50}=1.3\mu M$, auraptene: $IC_{50}=7.1\mu M$) を示したが、NO 消去効果は認められなかった。また、マウス皮膚炎症過程における H_2O_2 生成を顕著に抑制し、その後期過程である炎症部位に集積した白血球による酸化ストレスを選択的に抑制することが推察された。

さらに、本会報 (News Letter, No.13, Sep.,10-12, 1997) でも紹介されているように、ラット胃内強制投与に際して肝、大腸などでイニシエーション期の作用機構に関与する解毒酵素 glutathione S-transferase (GST) および quinone reductase (QR) の活性を両化合物が誘導することを田中教授らは見だし、^{10), 13)} プロモーションに加えてイニシエーションの抑制にも関与していることが示唆され、興味深い。

図1 和産および東南アジア産野菜類のEBV 活性化抑制活性

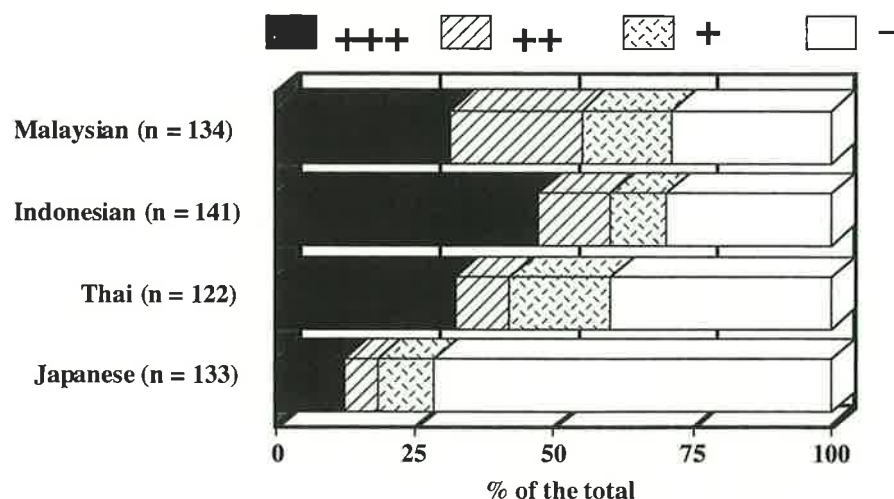
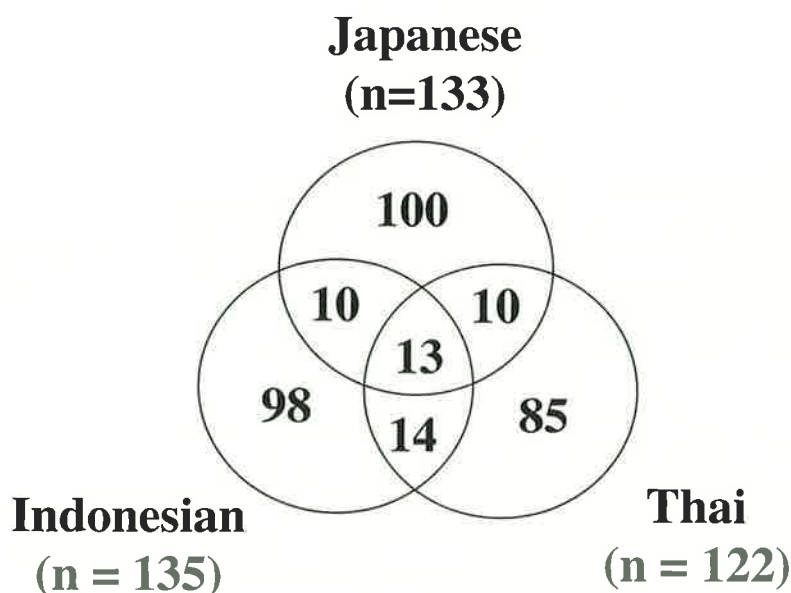


図2 三国産野菜類の試験におけるサンプルの重複度



おわりに

キャベツ、タマネギ、ニンニク、アブラナ科の野菜類、セロリー、キュウリ、パセリなどは、古代エジプトで薬用的に摂食、あるいは外用薬として利用され、また古代ローマでも、レンズマメ (ヒラマメ) やシトロン、ブドウなど、現在日常的に食卓へのぼってくる野菜・果物が既に利用されていた。今でも、タマネギやニンニクを食べると、病気を予防し、長寿につながると信じている人も多い。¹⁾ このように、ヒトは植物を生理的に重要な食品素材として長年にわたって選択し、利用してきた。いわゆる食同源性が保存されていた。しかし、最近のわが国の野菜・果物をみると、外見的品質、すなわち色、形、大きさにこだわり、生

産性、栽培適応性、耐病性をはじめ、流通性、輸送性、貯蔵性などを重視した選抜育種が急速に進んでいる。その結果として、本来野菜や果物が備えていた生理的機能成分を脱落させている可能性が危惧される。図1はその一端を示していると結論するのは、あまりにも短絡的であろうか? あらためて野菜・果物の生理的機能性を検討するとともに、バイオテクノロジーによって、消費者側を考慮した機能性品種の創製が強く望まれるところである。

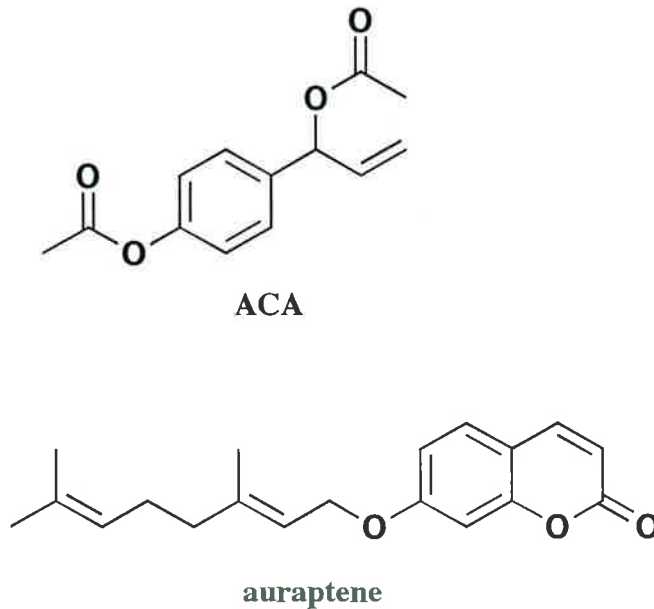
カンキツ類の分野では水菓子を求める選抜育種ではなく、がん予防を目指したカンキツの基礎的研究が、生物系特定産業技術研究開発機構の基礎研究推進事業で取り上げられ、矢野昌充室長 (農水省

表1 ACAと aurapteneの作用機構検討結果

	ACA	auraptene
抑制作用		
Epstein-Barr virus activation	yes	yes
xanthine oxidase activity	yes	no
O ₂ ⁻ generation	yes	yes
ROOH formation	yes	yes
Toxic aldehyde formation	NT*	yes
NO generation	yes	yes
TPA-induced H ₂ O ₂ generation (in vivo)	yes	yes
活性誘導作用		
glutathione S-transferase activity	yes	yes
quinone reductase activity	yes	yes

*末試験。

図3 ACAと aurapteneの構造



果樹試)、西野輔翼教授(京都府立医大)、大東肇教授(京大)および村上明博士(近畿大)らのリードで研究が展開している。上記 auraptene の研究成果の一部は本プロジェクトによるものである。

すでに、食品素材由来の多種多様な化合物に、発がん抑制活性が見いだされている。しかし、疫学的研究によって提示されている野菜・果物の発がん予防効果には、これらの成分だけではなく、さらに未知の成分が関与している可能性も否定できない。食品として摂取する場合には、複合系における効果が重要であり、活性物質の相乗効果とともに相殺効果についても究明しなければならないであろう。そのためには、見いだされた発がん抑制物質の *in vivo* 活性と作用機構を徹底究明することとともに、異なる作用機構を持つ化合物の組み合わせ効果を検討することが必要となり、分野の異なる

研究者との共同研究を今後ともお願いしたい。

なお、図表は村上明博士の提供による。

[文献]

- 1) Steinmetz, K.A. and Potter, J.D.: Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, 2, 325-357, 1991.
- 2) Steinmetz, K.A. and Potter, J.D.: Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control*, 2, 427-442, 1991.
- 3) Ohigashi, H., Ohtsuka, T., Hirota, M., Koshimizu, K., Tokuda, H. and Ito, Y.: Tiglane type diterpene-ester with Epstein-Barr virus-inducing activity from *Sapium sebiferum*. *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1617-1622, 1983.
- 4) Koshimizu, K., Ohigashi, H., Tokuda, H., Kondo, A., and Yamaguchi, K.: Screening of edible plants against anti-tumor promoting activity. *Cancer Lett.*, 39, 247-257, 1988.

5) Murakami, A., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., and Ohigashi, H.: Screening for *in vitro* anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Lett.*, 95, 139-146, 1995.

6) Murakami, A., Morita, H., Safitri, R., Ramlan, A., Koshimizu, K., and Ohigashi, H.: Screening for *in vitro* anti-tumor-promoting activities of edible plants from Indonesia. *Cancer Detect. Prev.* (in press).

7) Murakami, A., Koshimizu, K., and Ohigashi, H.: Chemoprevention with food phytochemicals: screening, rodent studies, and action mechanisms. *J. Med. Food*, 1, 29-38, 1998.

8) Kondo, A., Ohigashi, H., Murakami, A., Suratwadee, J., and Koshimizu, K.: 1'-Acetoxychavicol acetate as a potent inhibitor of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation from *Languis galanga*, a traditional Thai condiment. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1344-1345, 1993.

9) Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Nakamura, Y., Ohto, Y., Ohigashi, H., and Koshimizu, K.: Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in ICR mouse skin possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 443-452, 1997.

10) Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Matsunaga, K., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., Murakami, A., Koshimizu, K., and Ohigashi, H.: Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by a xanthine oxidase inhibitor, 1'-acetoxychavicol acetate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88, 821-830, 1997.

11) Tanaka, T., Makita, H., Mori, H., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Satoh, K., Hara, A., Ohigashi, H., and Koshimizu, K.: *Citrus auraptene* inhibits chemically-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*, 18, 2155-2161, 1997.

12) 村上明: 炎症性白血球による酸化ストレスの抑制とがんの化学予防. 日本農芸化学会誌大会講演要旨集, 72 臨時増刊, 495, 1998.

13) Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Hara, A., Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Maeda, M., Ota, T., Odashima, S., Yamane, T., Koshimizu, K., and Ohigashi, H.: *Citrus Auraptene* exerts dose-dependent chemopreventive activity in rat large bowel tumorigenesis: The inhibition correlates with suppression of cell proliferation and lipid peroxidation and with induction of phase II drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 58, 2550-2556, 1998.

Antioxidants or Prooxidants ?

成澤 富雄

(秋田大学医療技術短期大学部)



抗酸化物質が抗発癌活性を發揮することが知られるようになり、それに関する *in vitro* 試験、*in vivo* 実験が盛んに行なわれるようになった。動物を用いたモデル実験では、疫学研究、(亜)急性毒性試験などの結果をもとに計算した投与量を決定することになるが、高投与量を選択しがちである。人と動物の薬物動態と代謝の差を考慮することは勿論のことではあるが、低投与量の際の結果に不安をいだくのが人情であるろう。

昨年の本研究会における討論の際に、抗酸化物質を大量に投与した場合には、それは prooxidant として作用することがあり、その実例として緑茶ポリフェノール EGCG (epigallocatechin gallate) の実験成績の概要を述べた。本欄を借りてその詳細について説明したい。

実験は SPF 動物室で行ない、いずれも 7 週令の F344 ラットに MNU (N-methyl-nitrosourea) 0.4% 水溶液 0.5ml の注腸投与を週 3 回、2~3 週間行って発癌処置を終了した。その翌週から、EGCG あるいは GTE (green tea extract) の水溶液を実験終了まで飲水として自由に摂取させた。MNU 水溶液は肛門から 5cm 挿入した feeding tube を通じて注入するが、左半大腸に充満する。後日、同部に限局して大腸癌 (高分化腺癌) が発生する。

① 実験第 4 週から EGCG 0.1%、0.05% あるいは 0% (対照群) 飲水を摂取させ、第 30 週に検索したラットにおける大腸癌発生率は、それぞれ 11/16 (69%)、9/16 (56%)、8/15 (53%) であった。高濃度 EGCG 飲水が発癌率をわずかではあるが上昇させ

たことになる。癌腫発生個数も同じ傾向を示していた。

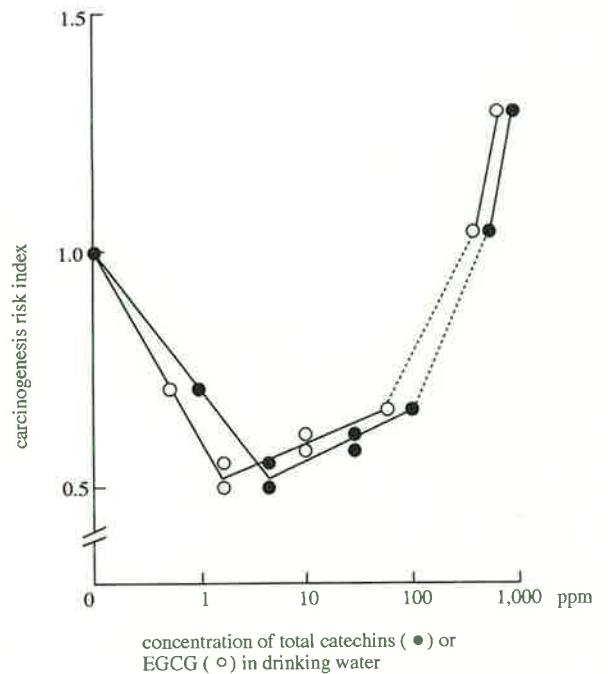
② 実験第 3 週から GTE 0.05%、0.01%、0.002% あるいは 0% 飲水を摂取させ、第 35 週に検索したラットにおける大腸癌発生率は、それぞれ 13/30 (43%)、12/30 (40%)、10/30 (33%)、26/39 (67%) であった (Jpn. J. Cancer Res. 84: 1007-1009, 1993)。GTE 摂取群は対照群よりも有意に低率であることに加え、低濃度 GTE 飲水群がより低率であることが注目された。

③ 実験第 3 週から GTE 0.002%、0.0004% あるいは 0% 飲水を摂取させ、第 40 週に検索した実験における大腸癌発生率は、それぞれ 7/30 (23%)、9/30 (30%)、15/36 (42%) であった。GTE 0.002% 飲水が有効であることを確認できたとともに、negative control として設定した GTE 0.0004% 飲水群でも低率であることに驚いた実験である。

④ 実験第 3 週から GTE 0.01% あるいは 0% 飲水を摂取させ、第 35 週に検索した実験における大腸癌発生率は、それぞれ 11/30 (37%)、19/30 (63%) であり、GTE 0.01% 飲水群が対照群よりも有意に低率となることを再確認できた。

以上はそれぞれ異った目的で、別々に行った実験の結果であるが、発生した大腸癌の病理および組織所見 [発生部位、肉眼型 (ポリープ型)、大きさ (ほとんどが径 1cm 以下)、組織型、深達度 (ほとんどが m、sm 癌)] は EGCG あるいは GTE 投与群と対照群で差はなかった。

提供を受けて使用した EGCG 固型粉末の組成は EGCG 85%、(-) EC 10%、(-) ECG 5%、総カテキン 100%、GTE 固型粉末の組成は gallic acid 0.2%、theobromine 0.1%、caffeine 6.7%、(-) EGC 10.3%、(+) C 0.5%、EGCG 11.2%、(-) EC 2.4%、(-) ECG 2.2%、総カテキン 26.6% である。この成分比から実験で摂取させた飲水中の総カテキン濃度、あるいは EGCG 濃度を算出した。各対照群の発癌危険度を 1.0 とし、各実験群の発癌危険度



を実験群発癌率/対照群発癌率の比で表わした。比較の方法が間違っているとの批判を恐れずに、飲水濃度と発癌危険度の関係を片対数グラフに図示した。両者の関係の傾向をうかがい知ることにはできそうである。すなわち、生体にとって異常で過度な抗酸化物質の大量投与は無効であるばかりではなく、むしろ発癌を促進する可能性さえあることを示していると考えている。

GTE 0.002% (カテキン 5ppm、EGCG 2ppm) 飲水群と GTE 0.01% (カテキン 25ppm、EGCG 10ppm) 飲水群の発癌危険度は、別々に行われた 2 回の結果が近似していることがグラフ上から分かる。したがって、われわれの一連の実験結果は再現性のあること、そして発癌危険度を求めて比較することは妥当であると考えている。

京都府立医大、山根氏は F344 ラットにわれわれが使用したものと同一出所の GTE を飲水投与し azoxymethane 誘発大腸発癌の抑制実験を行っている (Jpn. J. Cancer Res. 82: 1336-1339, 1991)。GTE 0.1%、0.01% 飲水群における発癌率は、それぞれ 10/21 (48%)、8/21 (38%) であり、GTE 0% 対照飲水群の 17/22 (77%) よりも有意に低率である。注目したいことは、GTE 低濃度飲水群の発癌率が高濃度群よりも低率であることである。この傾向はわれわれの実験結果とも一致している。抗酸化物質の動物試験では、有効最少投与量の検討を行なった上で、人への応用を旨とした指針を示す必要があると考えている。