

NEWS LETTER

No.20 Jun. 1999

Japanese Society For Cancer Prevention

日本がん予防研究会

21世紀のがん対策
—今やパラダイム
シフトが必要—

前田 浩
(熊本大学医学部微生物学)



1. これまでの経過

20世紀は大量生産と環境汚染と戦争の世紀であったといえるが、明るい側面として医学の進歩と寿命が延びたことがあげられる。その理由として抗生物質など薬剤の発見が直接的な病死の改善において大きく寄与したことは明かであるが、GNPや栄養、さらに公衆衛生等のレベルの向上の寄与も極めて大きいといえよう。そのような状況下において、今なお増加しているのがんであり、我国においては死亡原因の第一位となつて久しい。そのがんの原因と治療の本格的な研究が始まって約半世紀が経とうとしているが、がんの狩人は今や深山に入り込んで、下山ルートさえも見失っているように思われる。これまでの天動説的癌研究を地動説を組み込んだ考え方(パラダイム)に変換して問題の解決をはかるべきときに来ているのではなかろうか。筆者の身近な研究領域を見据えて、愚感を述べたい。

2. 癌治療におけるパラダイムシフト

(1) これまでの化学療法とミサイル療法：
選択毒性の問題

感染症に対するミサイル療法の概念は、丁度100年前にポール・エルリッヒによって、種々の異なった色素が、動植物組織に対して異なった染色性(親和性)を示すことから、細菌に選択的な殺菌物質の存在の可能性を信じ、大規模な合成プロジェクトを施行した。その結果、何とか満足すべきものとしてサルバルサンを発見した。しかしこのものは必ずしも細菌に選択毒性を示すミサイルではなく、ペニシリンが発見(1928年/発表1929年)[市販;日本は1947年]されるまでは、現在の多くの制癌剤と同様の一般毒性の問題を抱えていた。この場合、細菌細胞と動物細胞という生物学上の二大生物界(Kingdom)の基本的な差異にもとづく選択毒性の標的部位の差があった。一方、癌は宿主の分身した細胞であることからすれば、癌と正常細胞との選択毒性を示す標的部位の差異もなく、分子レベルあるいは遺伝子レベルでも両者は本質的に同じであつてもおかしくない。ここが癌に選択的な薬剤の発見の困難さがある理由であろう。

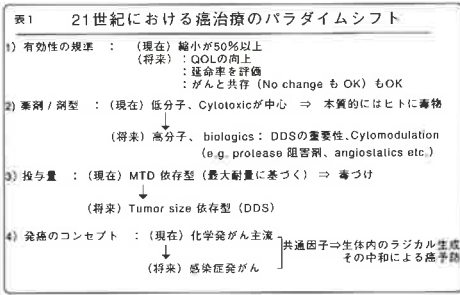
1950年代から活発な抗癌剤探索が行われてきたが、50年経た今日、在来型の制癌剤のなかに筆者は真に癌に選択的なものは知らない。最近注目されている新生血管阻害因子(エンドスタチンやアンジオスタチン)が、どちらかといえば上出来の方であろう。このAngiogenesisとて、正常組織の創傷や炎症の治療過程において、あるいは胎生期や分化過程でもみられる現象であることは周知の事実であり、癌固有の現象ではない。

(2) 選択毒性としての血管標的：
それにつけても DDS

腫瘍の新生血管増生の結果多くの固型腫瘍における高い血管密度、粗雑な血管構築、多数の血管透過性亢進因子の産生、その結果腫瘍局所で生ずる血漿成分

や高分子薬剤の漏出と、漏出成分(高分子薬剤)のリンパ網内系からの回収不全による腫瘍局所での蓄積は実に固型腫瘍にとってユニークな現象である。これらをまとめた現象を筆者はEPR効果(enhanced permeability and retention effect in solid tumor for macromolecules and lipids)と定義・命名した(1984, 1986年)¹⁾(注1)。そのEPR効果は現在では、高分子型制癌剤開発の基本根本概念として世界的に知られている。ちなみに、そのEPR効果発現の要因の一つの血管内皮細胞増生成因子(VEGF)はもともと血管透過性亢進因子(VPF, vascular permeability factor)としてDvorakによって見出されたのもであり、血管増生と透過亢進作用が表裏一体の関係にあるといえる。このような観点に立てば、腫瘍にユニークなEPR効果を利用した癌に選択的なDDS(Drug delivery system)の開発が可能になると信じている。つまりEPR効果により高分子薬剤はミサイルとなるといえる。

しかしこれまで半世紀にわたって行われてきたがんの化学療法剤の探索は少なくともごく最近までは低分子物質のみに限られたものであった。ただし薬剤の腫瘍選択的デリバリーの観点では例外として、アンジオテンシンⅡによる昇圧療法は腫瘍選択性では優れた方向といえる。しかし、拡散係数の高い低分子薬剤では思ったほどの実力を発揮していないと思う。(腫瘍局所へデリバリーされてもすぐに血行性に拡散消失する)(注2)。一方、EPR効果は高分子制癌剤を用いることによってはじめて利用可能となる。さらにまた、高分子制癌剤の他に各種サイトカイン、モノクローナル抗体、各種タンパク性メディエーターなども分子量5万以上で、生体親和性さえあれば、EPR効果によって腫瘍内濃度が血中の数倍~10倍まで上げられる。ちなみに、Franco MuggiaはClin. Cancer Res.1999年1月号のEditorial Commentで“Further demonstration of EPR”と題し、臨床の場



で、現在治験中の高分子制癌剤PK-1について論じており、高分子制癌剤をめざす方向の制癌剤開発が最も理にかなっていることをコメントしている。現在世界で6種以上の高分子性制癌剤が治験中であり、さらに年内にはこれが倍増するが、そのほとんどは21世紀になって使用が期待されるといえる(表1)。以上は、DDS 関連の話題であり、それは時間的、空間的(四次元的)な薬物動態に対して十分に考慮した思想である。

(3) Cytotoxic agent から

Cytostatics/Cytomodulatorへ

制癌剤開発の初期においては毒ガスのナイトロジンマスタードやその関連物質から始まり、抗癌抗生物質の多くはDNA合成阻害を中心とし、ほとんどはCytotoxicな薬剤であった。また、いわゆるNCIを中心としたdisease oriented screening programでは、Pharmacokinetics/DDS等の四次元的概念が欠如しているため、この種のCytotoxic物質は検出されるが、過去20年間にその方法で臨床的に有用な物質が見出された例を知らない。

また、放射線治療においては、何があんでも、tumorを完全に焼き殺すような高線量療法がこれまでは普通であったが、今後はこのような力まかせの治療よりも、癌と共生し、癌の良性化をめざしたような方法はないものだろうかと思う。何れにしても、在来型の低分子性のCytotoxic agentはもう限界ではなかろうか。

このようなCytotoxic agentの薬効上の効果に加えてもう一つの問題は、それらは何れもQOL(Quality of Life)がよくないことである。これも低分子のCytotoxicな毒物が腫瘍選択性が乏しく全身にいきわたるといって、DDS機能の欠如に帰因することも心に留めておくべきである。

QOLの向上といえば、癌性胸膜炎や癌性腹膜炎は肺がんや胃がんで高発するが、その胸水や腹水の制御は患者の病態の増悪防止として重要な課題である。このような癌そのものではなく、胸・腹水の生成を止めるなど周辺から病態改善をめざすような対癌作戦も重要ではないかと考えられる。このような方向として、例えばキニン系やNO系などの制御が考えられるが、現在そのような薬剤で一般化したものはないと思う。同様に、コラゲナーゼやプロテアーゼ阻害剤³⁾も多面的に癌予防や転移抑制、増殖抑制、さら

に腹水予防が考えられる。しかし、これらは必ずしも癌の縮小、特に現在その効果が有効と判定される基準の50%以上の縮小は、これら阻害剤単独ではとても得られないと考えられるものである。つまり、これまでの制癌剤開発において、最初から除外されていた類の物質にも有用なものがあると考えられる。

(4) MTDからTumor size dependent doseへ: 投与量設定に関して

20世紀の癌治療はそれにしても、リンパ腫や白血病では見るべき進歩があった訳である。そのときの薬剤投与量設定の基盤は体重/体表面積当たりその薬剤の投与量で耐え得る最大の量、つまり最大耐量であり、これは腫瘍がいくら大きくても、あるいは小さくても、同じ量の毒物を投与することになってしまう。我々はDDS機能の最もすぐれた治療法であるスマンクス/リピオドール(油剤)の動注療法での経験から、小さい癌に大量投与の必要はなく、大きい癌には多く、小さい癌には少量という腫瘍サイズに比例した投与法が最適であることを見出した(注3)。これは既存の化学療法のMTD(体重/体表面積)に比例した投与量の設定からのパラダイムシフトである。つまり、DDSが完成すると、古いパラダイムは不要というよりも害あって益なしということになる。

今後21世紀に予想される遺伝子(DNA)治療に際しても、MTDにもとづく投与量の設定よりもTumor sizeにもとづく投与量設定の概念に変えるべきであることは容易に理解されるといえる。

(5) 有効性のクライテリア: これが問題

我国はもちろん米国においても薬剤が有効であるとの判定は何よりも腫瘍サイズの縮小であり、それも50%以下にならないと有効と判定されない。投与後の腫瘍サイズが不変~50%縮小までは無効である。QOL(患者の状態)がいかに改善され、かつ何カ月にもわたって、腫瘍サイズが不変のような薬剤でも、現今の規準は無効の薬であり、治療薬になる可能性はゼロである。これまで、筆者の経験でも、このような観点で著しく有用と思われるも、製薬会社は初めから商品になる可能性のないものを開発しないのは当然である。

さらに、その有効性のクライテリアの項目に、治療患者の延命やQOLの評価点もほとんど考慮されていない訳である。また、Cost benefitの考えもその中に入っていない。このような有効性の判定規準は21世紀に向けたパラダイムシフトにおいて、変更を考えるべき課題といえる。最近話題のエンドスタチンのようなものもそれ単独ではすでに樹立した腫瘍血管に作用することが考えにくく、縮小よりも、増殖阻止において見るべきものがあると思われる。このような優れた最新の腫瘍生物学の進歩も、有効性の判

定基準の改善なしに、その御利益が患者側にフィードバックすることはない。ここに次世紀におけるパラダイムシフトの要がある訳である。

3. 制癌剤開発に関する経済上の問題

現今の新薬開発には高額(200~400億円)の資金を要するといわれている。10~20年でその投資分を回収しようとする製造販売の経費の他に年10-20億円の償却益が必要となる。それを達成するには年間総売上100億円以上の販売を達成せねばならない。一方、メーカーとしては薬剤の販売量が適応疾患(薬価収載)の患者数×投与期間によって左右されることを考えると、患者数が少ない癌ではとても採算がとれない。胃がん、肺がん、乳がん患者数の比較的多い癌種でも何れも10万人以下で、高血圧、高脂血症、糖尿病、骨粗鬆症の数百万人に比べると患者数は100分の1以下である。癌患者は全部の癌をあわせても年間30~40万人であり、抗癌剤は経済的に割があわないというのが常識となっている。このように考えるとある薬剤の適応症の患者総数が10万以下の場合には税制上無税にするとか、開発経費を税制上の控除対象にするなどの措置がないと、その癌に対する治療薬開発のインセンティブがないといえる。この点に対する国家レベルの配慮が21世紀には重要となる。それにつけても癌が死亡原因第一位であることには変わりはないのである。

もう一点経済問題と関連して上に述べた今はやりのDDS(徐放型製剤を含む)に関して一言述べたい。DDS機能を高度に満足することのできる薬剤例えば、リユープリン、スマンクスなどは、1~3ヶ月に一度の投与で充分有効で、社会にとっては経済性のよい薬剤となり、保険財政の軽減の上からも社会に大きく貢献できる。しかし、メーカーにとっては販売量の軽減となり、高い薬価が保証されない限り会社の収益上からは魅力の乏しい薬剤ということになることも留意すべきであろう。

4. 発がんがんと癌予防に関するパラダイムシフト

我国の癌の中心的なものに胃癌、肝癌がある。これらは何れも細菌とウイルス感染によるものと最近では考えられている。さらに子宮癌の原因ウイルスもよく知られている。最近、国立がんセンターの発表で食道癌の原因に、連鎖球菌の関与の可能性が示唆されている。その他に褥瘡性の皮膚癌や慢性口内炎が原因となる口腔癌の発生も知られている。これらを総計すると日本人の癌の約半分は慢性感染症依存的な癌であるといえる。また、血液癌の可成のものも同様の発癌機構が考えられている³⁾(図1)。つまり、慢性感染症も相当な発癌要因になることを考えるべきであろう。一方、ヘテロサイクリックアミンなどの化学物質の発癌

はそれがDNAに直接結合することによって生ずる遺伝子変化に依存することは広く知られている。筆者らは、慢性感染と化学発癌剤という一見全く異なる因子、すなわち、活性酸素・フリーラジカルという共通項でつながる可能性を見出した。感染時に炎症性に生ずるフリーラジカル (NO、O₂⁻、H₂O₂、OCI⁻、NO₂Cl、ONOO⁻その他) 性の反応性分子がDNAやタンパクと急速に反応することがわかってきた。感染とヘテロサイクリックアミンは、直接的にDNAに付加体を作るメカニズムの他に、チトクロームP-450 NADPH還元酵素やNADHチトクロームb5還元酵素などによってスーパーオキシドを生成することを見出している⁹⁾。従って、感染症でも化学物質 (発癌剤) でも、遺伝子に対し共通項としてのフリーラジカルを介して変異を起こすことが考えられる (図1)。言い換えれば、慢性感染予防や化学発癌剤の予防にも緑色野菜などのラジカル消去食品の重要性が理論的にも指摘されるといえる。

5. おわりに

社会の高齢化に伴って癌や成人病患者の増加は避けられない。そのうちでも死亡原因第一位の21世紀の癌対策の方向として、上に記した何点かをプロポーズする訳であるが、ともかくできるだけ健康に長寿を達成し、天寿がんのときはQOLのよい治療を受けられるようなシステムが望まれるのではなかろうか。

文献

- (1) Matumura Y. and Maeda H., *Cancer Research* 46, 6387 (1986)
- (2) Naito K. et al., *Int. J. Cancer* 58, 730 (1994)
- (3) 前田 浩：化学療法の領域14, 25 (1998)
- (4) Maeda H. et al., *Cancer Letter*, in press (1999)

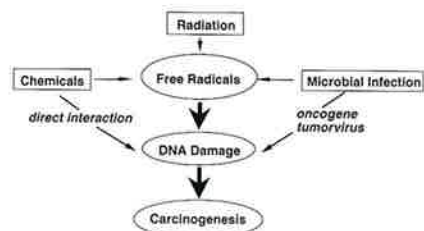


表1 発癌の共通項としてのフリーラジカルの生成とDNA損傷：発癌のメカニズムの模式図

(注1) EPR 効果とは、enhanced permeability and retention effect of macromolecules and lipids のことで、高分子薬剤、蛋白、油などを動注または静注後にこれらの物質が癌部だけに選択的に捕捉され、長期間にわたりその局所にとどまることをいう。その理由は、①多くの固型癌の血管は、たとえば平滑筋層を欠くなど構築上の欠陥があり、高分子物質でさえも組織内へ漏出しやすい、②さらに血管透過性亢進因子 (例：ブラディキニン、一酸化窒素、VEGF) が多量に産出されて血液成分の漏出を促進し、③加えて血管密度が高く漏出性は高くなるが、血行性の回収はない、④一方、組織からリンパ系の回収が正常組織のように進行せずに長期にわたって癌局所に滞留する。これらの要因は固型癌でのリボゾームやIgGも含めた高分子の腫瘍選択的な集積に寄与している。これに対して低分子は拡散によって消失し、血液濃度より腫瘍濃度のほうが高くなることはない。以上が高分子が腫瘍選択性を示す EPR 効果の理由である。

(注2) 多くの低分子制癌剤では、腫瘍局所濃度が血中濃度以上にはならず、数分内にその局所から wash out されてしまう。そのため抗腫瘍効果も充分ではないといえる。

(注3) この方法では薬物の Tumor/blood 比が > 1000 倍以上となる。

ポルフィリン様の化合物で変異原を捕まえる

早津 彦哉
(岡山大学薬学部)



がん予防の基礎研究の一つに、メカニズムの解明に重点をおいた行き方がある。私は約20年ほど前に偶然見つけた現象をもとにいろいろと展開をはかり、かなり現実味を帯びたがん予防の可能性の一つに辿りついた。今回はこれについてその展開の過程を述べてみたい。

ヘミンが多環変異原物質の活性を阻害する

1978年私の研究室ではAmes testを用いて変異原性阻害の実験を始めた。変異原物質としては発見されたばかりのTrp-P-1などいくつかのヘテロサイクリックアミンを杉村研究室の長尾博士から分与していただいて、ベンツピレンなどの繁用発がん物質とともに用いた。サルモネラ菌と変異原を混ぜて変異コロニーを作らせるとき、種々の化合物を加えて変異が阻害されるかを見るという単純な実験であった。阻害候補物質としては生体関係の小分子を用いることとし、生化学の教科書に出ている化合物を片端からテストした。まもなく、血色素ヘミンが強い阻害作用を示すことを見出した¹⁰⁾。おもしろいことに、この阻害作用はヘテロサイクリックアミンやベンツピレンに対して起こるがMNNGやMNNUには起こらないことが観察された。ヘミンはポルフィリンであり、図1に示すように二重結合が環状に連なった平面化合物である。Trp-P-1やベンツピレンも平面状化合物であるから、ひょっとしたら平べったい分子同志がくっつくのではないかと考えて、Trp-P-1の水溶液にヘミンを加えると果たして沈殿物が生成した。これを結晶化する試みは不成功に終わったものの、Trp-P-1とヘミンを混ぜると吸光カーブが加算的にならず、違う形になることを見出したので、両者はやはりくっつくのだろうと推定した。平面状芳香環の分子が重なり合ってくっつくことは化学の常識であるので、これは妥当な推定と考えた。

ブルーコットン

そのうちに青チョコの粉に変異原性があることを見つけた¹¹⁾。授業の時に青チョコをなるべく使わないようにしようと思ったが、一方この青色は何かを調べたところ、銅フタロシアニンであることがわかった。この化合物の構造式を見ると、なんとヘミンとそっくりのポルフィリン的構造である。そこで銅フタロシアニンはTrp-P-1とくっつくのではないかと考え、それをテストするのに銅フタロシアニンの水溶性誘導体を綿に固着したものを、ブルーコットンとブルーレーヨン (図1) を作成し、Trp-P-1を吸着するかを調べた。予想は当たり、ブルーコットンはTrp-P-1はもとより、ヘテロサイクリックアミンのすべて、さらにベンツピレンなどの多環芳香族やアフラトキシンB1をよく吸着し、対照的にジメチルニトロサミン、MNNGなどは吸着しないことがわかった。60種以上の化合物について調べたところ、3環以上の多縮合環を持つ平面性の分子は吸着するがそれ以外のものはくっつかないことがわかった。ブルーコットンに吸着した多環物質は、アンモニアを含んだメタノールで簡単にはずれて溶出されることもわかった。ブルーコットンは食物や河川水など

訂正

石川秀樹先生よりNo.19号8頁のBoone先生とLipkin先生の名前が左右逆であるとの訂正がありました。

の環境粗試料からヘテロサイクリックアミンを濃縮する最初のステップとして便利に使えることがわかり、現在まで、多くの研究者によって利用されている⁴⁾。

クロロフィル、クロロフィリンがヘテロサイクリックアミンを捕捉する

緑黄色野菜ががん予防に役立つことは疫学的にはほぼ確立されている。しかしその理由については繊維、カロテンなど諸説あり、一成分に帰せられるものではなさそうである。私は野菜中の緑色色素クロロフィルの関与を考えた。すなわち図1のようにクロロフィルはポルフィリン様の化学構造を持ち、ヘミンやブルーコトロンとその形が似ている。そこでクロロフィルおよびクロロフィリン(クロロフィルを加工して水によく溶ける形に直してある)について実験したところ、予想どおり種々の多環性変異原の活性を阻害した。阻害の機構もヘミンなどと同じく、複合体を形成して吸着してしまうためであることが推定された。図2にTrp-P-2の活性化体、Trp-P-2(NHOH)に対するハウレンソウクロロフィルの阻害作用を示した。また、クロロフィルとTrp-P-2を混合したときに見られる差スペクトル(理論的加算吸収曲線との違い)を図3に描いてある⁵⁾。

われわれがクロロフィル、クロロフィリンの抗変異原性を見出し、そのメカニズムが複合体形成によることを発表して以後、世界的にクロロフィリンのがん予防作用の研究が盛んに行なわれるようになった。すなわち、多環構造を持つ各種発がん物質について、動物発がん実験を行なう際に、クロロフィリンの同時投与が発がん阻害をする例が多数報告されている⁶⁾。最近の情報では、中国の一地方でアフラトキシンB1の血中DNAアダクト形成をクロロフィリン投与が妨害するかどうかのヒト臨床試験が行なわれているということである。このようにAmes試験という単純な実験から見つかった現象が、人への応用の可能性追求まで発展

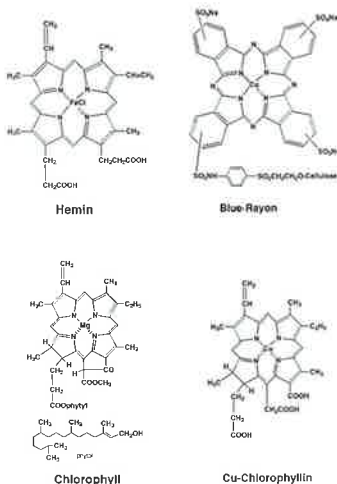


図1. ヘテロサイクリックアミンを捕捉するポルフィリン様の化合物

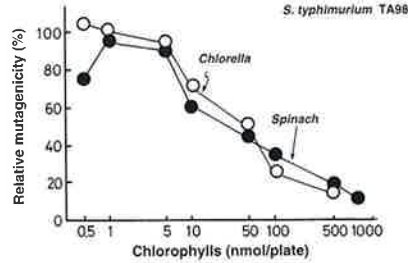


図2. Trp-P-2(NHOH)の変異原性に対するクロロフィルの阻害作用 Ames test

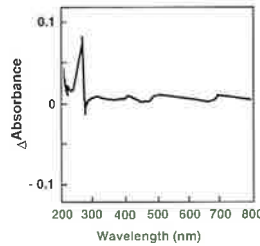


図3. Trp-P-2とクロロフィルの相互作用差スペクトル

各々20mM溶液(0.1Mリン酸緩衝液、pH7)のスペクトルから計算した和のスペクトルと、各々を等量合わせた液のスペクトルとの差。

していることは、実験者としてとても嬉しいことである。

クロロフィリン-キトサンについて

クロロフィリンについてがん予防実験がどんどん行なわれるようになって、クロロフィリン大量投与がもたらすかも知れない副作用が気になり始めた。そこでクロロフィリンを支持体に固着する、すなわちブルーレーヨンのような不溶性吸着剤をこしらえることを思い立った。支持体として、かのにの甲羅から得られるキチンを加工して作成されているキトサンを利用してみた。キトサンはポリグルコサミンであり、カルボン酸化合物であるクロロフィリンはこれと塩を作ってくつづくのではないかと考えた。両者の水溶液を混ぜると、はたして沈殿が生じ、得られる濃緑色の粉末は、水を加えても緑色は溶けてこない。この粉末はクロロフィリンとキトサンが約1:1の重量比でできていた。これを用いるとヘテロサイクリックアミンがよく吸着する。そして胃液のpHであるpH2-3の液で洗っても、わずかしこヘテロサイクリックアミンは溶け出してこないことがわかった⁷⁾。

クロロフィリン-キトサンは1種の不溶性クロロフィリンと考えることができる。これをマウスに食べさせると、そのまま糞便中に排泄されるように見えた。すなわち糞便中に緑の粒子が散らばっており、水で洗っても緑色は溶け出してこない。従ってこのクロロフィリン-キトサンは多環化合物吸着性の固体であって、それ自身は分解吸収されずに消化管

を通過するだけであることが期待される。そしてその間に発がん性多環物質をくっつけて排出するであろう。クロロフィリンもキトサンも食品添加物として用いられており、人間が食べても安全なはずである。最近われわれはこのクロロフィリン-キトサンを用いてマウスで実験を行ない、ヘテロサイクリックアミン-DNAアダクトの形成の阻害が起こることを観察している。それをもとに実験をさらに展開中である。

がん予防を目指して機構解明に重点をおいて研究を進めてきた。今後ポルフィリン以外の抗変異原物質を見出し、その機構を解くのが楽しみである。

文献

- (1) S. Arimoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 92, 662-668, 1980
- (2) S. Arimoto et al., Cancer Letters, 11, 29-33, 1980
- (3) H. Hayatsu et al., Mutation Res., 124, 1-7, 1983
- (4) H. Hayatsu, J. Chromatography, 497, 37-56, 1992
- (5) T. Negishi et al., Carcinogenesis, 10, 145-149, 1989
- (6) R. Dashwood et al., Mutation Res., 399, 245-253, 1998
- (7) S. Arimoto-Kobayashi et al., Mutation Res., 381, 243-249, 1997

がん化学予防における動物実験を行って

白井 智之

(名古屋市立大学医学部第一病棟)



1. がん予防

近年がんの化学予防が盛んに叫ばれるようになってきた。多くの国で高齢化社会を迎え、がんの発生が避けられなくなっている昨今、がんの治療法の進歩とともに、がんの発生を少しでも押さえることを目的とした化学予防の必要性に対する認識が研究者のみならず、一般の人々にも広がっている。動物実験データをもとに欧米を中心に大規模なヒトを対象とした介入試験がいくつか行われ、好結果を得たものや、副作用のために中止になっ

たもの、全く効果が見いだせなかったなど、さまざまである。特にがんのハイリスクグループに対しての早期発見・早期治療とは別に予防の模索と方法の確立に向けての多くの実験が行われている。介入試験を行うに当たっては十分な動物実験によるデータの集積が必要であるの言うまでもないことで、その重要性は益々高まっている。これまでがんの化学予防を行って来て、日頃思っていることを述べてみたい。

2. 動物実験モデルの選択

化学予防剤の開発には *in vitro* の研究はもちろんのことであるが、*in vivo* は *in vitro* と異なって物質の吸収、運搬、代謝など生体内のきめ細かいネットワークの種々の作用を受けることになるし、投与された物質の臓器分布においても種々異なることは周知のことである。従って動物実験でがん予防効果が認められ、しかもメカニズムにおいてもヒトと共通点が見いだされてはじめてヒトに応用できると考えられる。研究者が慣れ親しんだ実験モデルあるいは独自に開発したモデルを用いることが多いが、用いているモデルが適切かどうかを常に考慮する必要がある。動物実験には設備が整った動物施設で、中・長期間の飼育観察が必要であり、また使用する発がん物質や化学予防剤が極めて高価なこともあるなど、大変費用のかかることが多い。従ってどの様な実験モデルを用いて、どの様なプロトコルで研究を進めるかはいつも研究者を悩ましていた点でもある。選択枝のなかに、(1) 自然発生腫瘍を用いる、(2) 発がん物質誘発の腫瘍を対象にするが、その際、単一臓器あるいは2~5の臓器の腫瘍発生を対象とする、(3) ラット、マウス、あるいはハムスターなのか、(4) 最近では遺伝子操作（遺伝子導入あるいは遺伝子破壊動物）動物を用いるようになってきた。異なる動物種あるいは系統間の結果を比較することはヒトへの応用や抑制機構を追求する上で貴重な資料になりうると思われる。

3. 化学予防剤の投与時期

小動物の自然発生腫瘍を対象とする実験モデルでは、目的に応じて、実験期間の初期あるいは前半期また後期あるいは後半期に投与したり、あるいはそれに関係なく実験の全期間に投与される。発がん物質を用いる実験系では発がん物質の投与期間や時期に左右されるが、多くの場合二段階発がんモデルが適応され、発がんイニシエーションとして実験の初期に短期間発がん物質が投与される。この場合、発がん物質と同時に投与あるいはその前から投与する実験系（同時投与、前投与）、発がん物質の投与が終了してから検体を投与する実験系（後投与）、さらに発がん物質の投与期間を含めて、検

体が実験期間を通して投与される場合など、様々である。このような異なった実験プロトコルでの結果を評価する場合、発がん抑制作用の機構が異なっているため一概に発がん抑制作用を示したとの結果のみで判断する事はまちがった理解となるかもしれない。その場合には必ず実験条件を付記した表現が必要になろう。現在までに知られている発がん抑制物質には①発がん物質と同時に投与したときのみ抑制作用を示すもの、②発がん物質の投与後のみ発がん抑制作用を示すもの、③両方で効果を示すもの、などである。発がん抑制作用の機構として同時投与でのみ効果のあるものは、経口投与した発がん物質の腸からの吸収を阻害する、発がん物質の代謝活性化を抑制する、あるいは発がん物質の解毒酵素を活性化するなど、その結果発がん物質そのものの発がん作用を減弱し、発がん抑制作用を発揮する。発がん物質の投与後のみに効果のあるものは腫瘍の発育と進展に関わる種々の因子を修飾して発がん抑制に働いていると考えられる。最近腫瘍の発育に関連する酵素として注目されている cyclooxygenase は発がん物質の代謝活性化にも関与していることが見いだされており、同時投与でも後投与でも抑制効果が期待される薬物もあるようである。逆に代謝活性化を促進するような働きがあるにも関わらず腫瘍の発育や増殖そのものには抑制的に働く物質では同時投与ではむしろ発がんを促進し、後投与では発がん抑制を示すことも十分考えらる。このように実験のプロトコルによっては全く異なった成果が得られることが予想される。つまり実験プロトコルの違いによって発がん抑制作用を示しながら、全く抑制機構が異なることがあり、成果の評価や理解には十分注意を払う必要がある。

4. 発がん物質の投与量

実際にヒトでの発がん要因はきわめて多彩である。ヒトは絶えず発がん物質にさらされているものの、通常の生活ではその量はきわめて少ないこと、ただし同時期に多数の発がん物質に暴露されると推察される。従ってヒトの実体を反映させた低用量の発がん物質を用いた実験が望ましい。しかし実際に低用量では対照群に期待通りに腫瘍性病変が誘発されなかったり、長期間実験が必要になるなど、研究遂行上問題を生じることになる。発がんプロモーターの研究とは異なって発がんイニシエーションは腫瘍を十分に誘発するために普通やや強めに行われる。そのため統計学的に有意な差をもって腫瘍発生抑制のデータが得られるためには発がん抑制作用が強いことが必要であり、それゆえ高濃度での発がん抑制物質の投与が避けられない。ヒトの状況を反映した実験系としてマイルドな発がん過程をベースにした、しかもサイズの

大きい実験系での解析が必要になるであろう。

5. エンドマーカースには何がいいか。

発がん抑制作用を評価するための指標は当然悪性腫瘍の発生抑制であるが、実験期間の短縮などのために、前がん病変を指標とした研究が多い。しかし前がん病変を判定指標とする場合には不確実性がつきまとう。短期試験で前がん病変の発生が著しく抑制された結果が認められても、がんを指標にした長期の実験では明らかな抑制結果が得られない場合がある。これには実験条件の違いなどがあるかもしれないが、前がん病変としての位置づけに問題を抱えていることも考えられる。例えば、ラット大腸に発生する aberrant crypt foci (ACF) はしばしば前がん病変として重宝され、用いられているが、時に大腸がんの発生と相関しないデータも報告されている。もう一度 ACF の前がん病変として真に適切かどうかを検証しておく必要があるだろうし、がんの発生を指標にした長期実験を必ず行うことが大切と考えられる。

6. 臓器特異性の問題点

がんの化学予防はしばしば単一臓器に的を絞って研究されることが多い。しかし化学物質の薬理作用は多彩であり、しかも臓器特異性を示すものが多い。臓器が変われば発がんに対する修飾作用も全く正反対の結果になることをしばしば経験する。多くの抗酸化剤を用いた我々の研究においても臓器特異性を認めている。例えば大腸がんには明瞭な抑制作用を示すにもかかわらず、肺などほかの臓器のがんの発生を促進する結果などが、よい例である。従って単一の臓器でのみ発がん抑制作用を検討することは、他臓器での腫瘍発生促進作用を見逃す危険性があり、この点に十分な注意を払う必要がある。β-カロテンやビタミンAによる大規模な臨床介入試験では中国での試験で胃がん及び全がんで抑制がみられたにもかかわらず、他の2つの試験では肺がんの罹患率が上昇するという残念な結果が認められたのは記憶に新しい。動物実験でβ-カロテンが肺がんを促進する傾向が見いだされた結果もあり、化学予防の研究においては不利益なデータもはっきりさせておくことが大切である。最近、十時花科の植物に豊富に含まれる化学予防剤として注目されている phenylethyl isothiocyanate (PEITC) を多臓器発がん性試験法で検討したところ、発がん物質との同時投与では腎、食道、肝の発がんを抑制したものの、長期間後投与でした実験群では、肺の抑制のほかに肝と膀胱の腫瘍発生を促進することが判明した。その後肝と膀胱のみに的を絞った実験系でも同様の促進作用が示され、膀胱に対しては強力な腫瘍促進作用があることが確認された。必ずしも PEITC が化学予防剤

として優れているのではないことを示唆している。現在膀胱腫瘍の促進作用がラット特有なものかどうかメカニズム解析を行っている。

7. がん予防薬の安全性

がん予防薬といえども身体にとって悪い影響を与えないとは限らない。長期間にわたってヒトが摂取するため、ヒトに対する安全性はしっかりと確認しなければならない。すべての化学物質は天然、人工に関わらず、濃度によっては毒性を生体に示すことが多くあり、用量が毒と薬を区別するポイントでもある。長期間の慢性毒性試験を含めた動物実験を行い、安全性の評価を得ることが大切で、ヒトにおける有効性と安全性の確認のためにはきわめて長い期間の研究が求められ、がんの化学予防薬の開発は容易でないことが伺える。

8. 用量—効果曲線

ヒトが年余にわたって摂取することになる予防薬は安全性の面からも低用量であることが望まれる。通常動物実験ではがん抑制は比較的高濃度で認められることが多い。しかしヒトに応用する前には低用量での抑制作用の確認と同時に用量効果のデータをしっかりと把握する必要がある。前述したように用いる実験系によっては弱い発がん抑制作用を検知できない場合もあり、実験系や実験プロトコルの選択が実験の成否を握ることもある。しばしば高濃度ではなく中等度の用量にのみ有効との結果が得られることもあり、実験結果の解釈に苦慮することになる。

9. 実験結果の再現性

どんな研究でも結果の再現性があることが必須である。しかし実験動物を用いた研究成果ではデータがばらつくことあり、研究者を悩ます点でもある。例えば同じソースの動物を場所の異なる研究施設で飼育しても、施設間で自然発生病変の頻度が大きく異なることが報告されているように、動物実験の成果が一定しないことは知っておく必要がある。我々の研究でも前立腺がんをリコペンやクルクミンが抑制する結果を得たが、再度類似の実験を行ったところ全く抑制作用を見いだすことができず、データの再現性に欠けた結果となっている。また我々の教室ではお茶の成分であるカテキンの大腸腫瘍に対する抑制作用が見いだされず、逆に腫瘍促進作用が見られるなど、ほかの研究室での成果と異なる結果となっている。ヒトへの応用を最終目的とする化学予防は再現性がより大切なポイントと考えられる。

10. 今後のがん予防薬の研究方向。

これまでに多くの研究室で、数多くの化学物質のがん抑制作用の有無について

動物実験が行われてきた。Vitamin Aとそのアナログのように動物実験ではきわめて有効との評価であったが、ヒトでの介入試験では毒性が予想以上に現れてしまい、中止になってしまった例もある。動物とヒトでの毒性発現の程度の違いを示した好例と言える。最近中間報告された乳がん高リスク女性における抗エストロゲン剤、タモキシフェンによる乳がん発生の抑制結果や、大腸腫瘍の非ステロイド抗炎症剤やcyclooxygenase 2の特異的阻害剤による予防など明るい材料もあり、がん予防薬の開発は重要度を増しているようである。食生活の違いによるがんの罹患率や死亡率の違いを指摘する疫学研究が多い。がんのリスクを上昇させるような食餌要因や反対にリスクを少なくしていると考えられている食餌要因が判明しており、その中から新たながん抑制物質の開発が進むことが望まれる。栄養成分に注目したがん予防薬の追究は安全面からも有利であり、機能性食品としてもヒトが摂取することもでき、食生活の改善を含めたトータルながん予防の推進が大切であろう。

現状では研究者各自が各自のプロトコルを用いて動物実験を行っている。前述のごとく、研究室間で結果が異なることは多くの例が証明しており、その効果を一定の基準で評価していくことが化学予防剤の開発のためには重要な課題である。そのためには単一臓器では各々の臓器における実験プロトコル、多臓器ではどのような臓器を対象にすべきか、またどのような実験プロトコルがよいかなど、発がん抑制作用検討のための基準となるガイドラインの制定が望まれる。これは大変な作業であるが、日本がん予防研究会がプロジェクトの推進役を担う日がくるかもしれない。

新しいがん予防のアプローチのひとつとしてがん化に伴って不活性化した細胞周期調節遺伝子を外から投与した薬剤で再活性化させ、腫瘍細胞の増殖を阻止あるいは細胞死に導こうとする試みがなされている。がんの予防と治療の両面に応用可能である。p53の異常に伴うp21^{waf}の不活性化は細胞のG1期停止が障害され、細胞増殖が持続する。このような状況下で酪酸などある種の薬剤はp21^{waf}のプロモーターに作用し、その遺伝子の活性化をもたらす、その結果細胞増殖を抑制することがin vitroで確認されている。一定の遺伝子を標的とした新しい試みであり、in vivoでの成果と今後の発展が期待される。

発がん予防物質検出に於ける前がん病変の有用性

森 秀樹

(岐阜大学医学部病理学講座)



前がん病変の概念に関しては歴史的に多くの議論がある。その存在を認めるにしても、臨床的な概念と組織変化に立脚した概念には差異があり、この用語の使用には注意を払う必要がある。しかしながら、実験発がんの立場では前がん病変として肝の酵素変異増殖巣や大腸のaberrant crypt foci (ACF)などの如く、よく知られているものがある。これらは発がん物質投与後、比較的早期に出現し、イニシエートされた細胞集団とみなされている。二つの病変のうち、酵素変異増殖巣に関しては、結節性病変を介する経路や直接的な経路などによる肝細胞がんへの進展の可能性など、歴史的に多くの研究データの報告がある。酵素変異増殖巣に類似する病変は偶発的にヒトでも観察されるが、ヒトの前がん病変としての意義は不明である¹⁾。けっし動物に誘発されるこの病変は単位面積ないし体積当たりの数として定量解析が容易であることから特に肝がん発生予防物質検出の為の良いバイオマーカーとみなされている。この場合、有効な発がん予防物質はdiethylnitrosamine (DEN)などによって誘発される本病変の出現率などを低下させることになる²⁾。実際、私共も発がん予防物質による肝がんの発生に対する影響と酵素変異増殖巣の発現に対する影響との高い相関性を見ている。

一方、ACFの方は肝の酵素変異増殖巣と比べれば、比較的新しい概念であり、実験動物の発がん過程で出現する他、ヒトでも見られることから、現在注目されている病変の一つである。ラットに於いてこの病変はazoxymethane (AOM)などの発がん物質の投与後早期より出現し、長期間大腸発がんの標的部位に観察されることより、発がん性の評価、発がんの修飾など種々の目的で良いマーカーとして使用されている。当然の如く、大腸発がん予防物質の検出に有望であり³⁾、これを使用した化学予防物質の検出および作用様式に関する成績が広く行われている

お詫び

No.19号10頁に本研究会の会長名が渡辺民郎先生になっていますが、垣添忠生先生の誤りです。お詫びして訂正致します。

る。実験動物およびヒトのACFに関して、核の形態により異型度の強いものと弱いものに分けることがなされており⁹⁾、特にヒトでは過形成型と異形性型の分類が行われている。さらに、実験動物では4個以上のcryptを有するものとそれ以下のものに分けて記述することが多い。ACFの分子生物学的特徴として、ラットのものではk-ras遺伝子の変異が知られており¹⁰⁾、最近われわれのグループは β -catenin遺伝子の変異を報告している⁷⁾。ヒトのものでもAPCやk-rasの変異は知られている⁸⁾。この病変の定量的な検索は発がん抑制物質の作用様式の解明にも有効と考えられる。表1は我々のデータであり、大腸発がん抑制物質を発がん剤によってACFを誘発した後に投与することにより、ACFの退縮させることを示している⁹⁾。この現象の詳細な機序は不明であるが、ACFに於けるapoptosisの促進の可能性などが考えられる。最近、ACFの短期のバイオアッセイにより、大腸がん予防作用を推定する研究がかなり多くなされており、我々もこのアッセイによる幾つかの有望な物質を見いだしている。この様な検索は容易であり、予防物質のスクリーニングの一つとして妥当である。しかしながら、ACFの有用性には限度があり、ACFのアッセイの成績と長期発がん試験による成績との不一致の例はかなり存在する。細胞の分化誘導や細胞周期の調節作用が知られ、発がん予防作用が期待されているフラボノイドであるゲニスタインはラットに於ける短期のアッセイによりAOMが誘発するACFの発生を抑制したが、長期実験ではAOMによる大腸発がんを促進している¹¹⁾。肝の酵素変異増殖巣についても同様なことが考えられる。そこで、前がん病変によって、発がん抑制物質の検出を推定する際には前がん病変のアッセイの他に、他のバイオマーカーのアッセイを行うことが推奨される。我々のグループは発がん抑制物質に共通する生物学的性質として、発がんの標的部位に於いて発がん物質が惹起する細胞増殖を制御することを指摘している¹²⁾。それ故、前がん病変のアッセイと共に、標的臓器の非病変部位に於ける細胞増殖性の定量的検索を併せて行うことがスクリーニングに際し有効と考えられる。表2に天然生薬成分を対象とした大腸発がん抑制性の推定をACFと細胞増殖抑制性を指標として短期にアッセイした結果を示す¹³⁾。表に見られる如く、例えば、木香の成分であるcostunolideはAOMが誘発したACFの発生を抑制し、核小体オルガナイザー(AgNORs)やオルニチン脱炭酸酵素(ODC)やBrdUなどによって表される大腸粘膜上皮に於ける細胞増殖の制御を示す。事実、costunolideは長期の発がん試験によって、腸管発がんを抑制することも分かっている¹³⁾。

肝の酵素変異増殖巣の場合も同様と考

表 1

Table 1. Effects of Chemopreventive Agents on Carcinogen-Induced ACF in Rats

Treatment	No. of ACF/colon			
	6 weeks	12 weeks	18 weeks	24 weeks
AOM alone	50.6 ± 12.1	68.0 ± 10.4	49.0 ± 16.0	55.6 ± 38.4
AOM → 0.02% KYN-54	-	-	45.4 ± 13.0*	41.2 ± 22.8*
AOM → 0.01% MMTS	-	-	53.4 ± 13.3	31.2 ± 5.8*
AOM → 0.025% CA	-	-	23.0 ± 12.8*	34.0 ± 24.8*
AOM → 0.0125% piroxicam	-	-	36.8 ± 10.8*	19.6 ± 5.7*
Non-treatment	0	0	0	0

KYN-54: 5-hydroxy-4-(2-phenyl-(E)-ethenyl)-2(5H)-furanone, MMTS: S-methyl methane thiosulfonate, CA: chlorogenic acid. *Significantly different from the corresponding value (P < 0.05).

表 2

Table 2. Effects of Test Chemicals on AOM-Induced ACF in Rats

Test chemicals	No of ACF/colon	No. of AgNORs/nucleus	ODC activity (pmol ¹⁴ C ¹⁴ O ₂ /h/mg protein)
AOM alone	152.5 ± 30.6	1.44 ± 0.28	22.1 ± 19.3
AOM + rebaudioside A	123.1 ± 34.8	1.07 ± 0.28	6.6 ± 6.7*
AOM + liquiritin	143.0 ± 37.1	1.01 ± 0.29*	1.9 ± 1.9*
AOM + phyllodulcin	139.1 ± 32.9	1.05 ± 0.27	9.2 ± 7.1
AOM + hydrangenol	115.6 ± 30.7*	1.05 ± 0.29	4.3 ± 6.9*
AOM + oleanolic acid	97.6 ± 11.1*	0.85 ± 0.25*	4.3 ± 3.0*
AOM + costunolide	118.6 ± 16.9*	0.88 ± 0.20*	0.6 ± 1.2*
AOM + soyasaporin A	128.0 ± 25.1	1.13 ± 0.21	1.47 ± 0.12

Each chemical was given in diet at the concentration of 0.02%. *Significantly different from the value of the group with AOM alone (P < 0.05).

表 3

Table 3. Chemopreventive Effect of Taurine on DEN and Phenobarbital-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats

Treatment	Density (/cm ²) of GST-P positive foci	ODC activity (pmol ¹⁴ C ¹⁴ O ₂ /mg protein/h)	Average No. of hepatocellular neoplasms
DEN → PB	46.6 ± 7.6	39.03 ± 4.83	5.15 ± 3.92
DEN + taurine → PB	37.9 ± 10.3*	24.47 ± 11.15*	1.95 ± 1.00*
DEN → taurine + PB	31.8 ± 9.0*	13.68 ± 7.99*	1.81 ± 1.89*
DEN alone	21.6 ± 6.3*	30.93 ± 3.66	0.50 ± 0.65*
DEN → taurine	18.0 ± 0.9*	19.13 ± 5.00*	0.44 ± 0.68*

GST-P: glutathione S-transferase placental form. aMeasurement was done for the non-neoplastic tissues. *Significantly different from the value of the group (DEN → PB)(P < 0.05).

えられ、この病変の定量的解析と共に肝組織に於ける細胞増殖に関するアッセイが肝がん予防物質検出に有効と考えられる。表3にDENとphenobarbital (PB)モデルに於けるtaurineが示す酵素変異増殖巣発現の低下およびODC活性の抑制と肝発がん抑制性の相関を示す。前がん病変は動物モデルに於いて大腸や肝以外にも幾つか知られている。これらは主に、いわゆる異形上皮として記述されているものである。この様な病変の場合も非病変部位の細胞増殖のアッセイと平行して検索されるのが望ましい。当然、この様な検索をヒト組織に於いて有効的に行える場合はがんの二次予防として意義深い。

文献

- Mori H, et al. J Natl Cancer Inst 1982; 69: 1277-82.
- Okamoto K, et al. Jpn J Cancer Res 1996; 87: 30-6.
- Pereira MA, et al. Carcinogenesis 1994; 15: 1049-54.
- McLellan EA, et al. Cancer Res 1991; 51: 5270-4.
- Nucci MR, et al. Human Pathol 1997; 28: 1396-407.
- Shivapurkar N, et al. Carcinogenesis 1994; 15: 775-8.
- 山田康広 その他. 消化器癌の発生と進展 1998; 10 321-3.
- Smith AJ, et al. Cancer Res 1994; 54: 5527-30.
- Morishita Y, et al. Jpn J Cancer Res 1997; 88: 815-20.
- Rao CV, et al. Cancer Res 1997; 57: 3717-22.
- Mori H, et al. J Cell Biochem Suppl 1997; 27: 35-41.
- Kawamori T, et al. Cancer Res 1995; 55: 1277-82.
- Mori H, et al. Cancer Lett 1994; 83: 171-5.