

NEWS LETTER

No.30 Dec. 2001

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

抗酸化性カルチノイドと 素材野菜と抗発癌能

成澤 富雄

(秋田大学医療技術短期大学部、
現：介護老人保健施設くらかげの里)



最近、われわれは天然抗酸化物質カルチノイドの中で最も抗酸化能が強いとされているリコピンとカプサンチンによる大腸発癌阻止の一連のモデル研究をラットを用いて行ってきた。トマト、パプリカ(赤ピーマン)から抽出、精製したリコピン、カプサンチンと市販のトマトジュース、パプリカジュースの効果の比較検討

である。ここでは、その結果の要約とそれから感覚的に導かれたいささかの私見を述べたい。

実験では7週令の雌F344ラットをリコピンあるいはトマトジュース(実験A)、カプサンチンあるいはパプリカジュース(実験B)を水道水に溶解、希釈(濃度は表1参照、調製法は文献1、2参照)した飲水とCE-2固形飼料で飼育した。リコピン(17ppm)溶液とトマトジュース(1/3)溶液、カプサンチン(2ppm)溶液とパプリカジュース(1/17.7)溶液は同濃度のリコピンあるいはカプサンチン含有している。発癌剤メチルニトロソウレア0.4%水溶液0.5mlを実験第1週から週3回、3週間、注腸投与して発癌処置を行った。第35週(実験A)あるいは30週(実験B)に屠殺、剖検、組織学的検索後、大腸癌の発生状況を確定した。

表1のごとく、リコピン(17ppm)溶液群は対照群より低率ではあるが、有意差ではない。これに対し、同濃度のリコピンを含むトマトジュース(1/3)溶液群は有意に低率であった。カプサンチン(2ppm)溶液群は対照群より低率ではあるが、有意差ではない。これに対し、パプリカジュース(1/17.7)溶液群は、他の2群に比べて

有意に低率であった。実験結果は、リコピン溶液あるいはカプサンチン溶液よりもそれらを同濃度含有しているトマトジュース溶液あるいはパプリカジュース溶液の方が強い大腸発癌阻止能を有することを示している。参考のために、表1には発癌阻止率を併記した。

トマトジュースの効果を再確認するために、トマトジュース(1/3)溶液とトマトジュース(1/15)溶液を使って再実験を行っている。対照群における発癌率84%に対し、(1/3)溶液群では40%(阻止率52%)と有意に低率であった。しかし、(1/15)溶液群では72%(阻止率14%)にとどまっていた。実験Bの他の実験群、すなわちカプサンチン(10ppm)溶液群とパプリカジュース(1/3.5)溶液群の発癌率はそれぞれ68%(阻止率18%)と60%(阻止率27%)に低下したが、有意ではなかった。

体重増加、飼料摂取量、飲水量は各群間で差はなかった。給水瓶は遮光し、飲水は新鮮溶液と毎日交換した。残余溶液中のリコピン、カプサンチンをHPLC法で測定し、24時間後でもその含量に変化のないことを確認している。なお、リコピン、カプサンチンの濃度ないし投与量は、予備実験で得た、大腸粘膜aberrant crypt fociの発生を阻止した最少投与量を採用している。

以上に述べた実験成績から、トマトあるいはパプリカから抽出、精製した想定有効化学成分(リコピン、カプサンチン)よりもトマトあるいはパプリカ全体の搾汁の方が効果的に大腸発癌を阻止したことを、再度、強

目次

| | |
|--|---|
| 抗酸化性カルチノイドと素材野菜と抗発癌能(成澤富雄)..... | 1 |
| 動物実験データの解釈 | |
| —イソチオシアナート類を例として—(西川秋佳)..... | 2 |
| 携帯電話の電磁波による発がんリスク評価(今井田克己)..... | 3 |
| 大腸前がん病変と発がん予防物質検出におけるその有用性(山田泰広、森 秀樹)..... | 5 |
| ポリメトキシフラボノイドの特徴的な活性と代謝特性(村上 明)..... | 6 |
| 消化管におけるフラボノイドの吸収代謝と機能性(室田佳恵子)..... | 7 |

表1. Inhibitory effects of carotenoids against N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats

| Treatment groups with drinking fluids | Tumor incidence | Inhibition rate |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|
| A: tap water:control | 13/24 (54%) | — |
| lycopene (17ppm) fluid | 8/24 (33%) | 38% |
| tomato juice (1/3) fluid | 5/24 (21%)* | 62% |
| B: tap water:control | 24/29 (83%) | — |
| capsanthin (2ppm) fluid | 17/25 (68%) | 18% |
| paprika juice (1/17.7) fluid | 10/25 (40%)** | 52% |

Significantly different from tap water group (*), and from tap water and capsanthin (2ppm) fluid groups (**), by χ^2 test: $p < 0.05$ or more.

表2. Contents of antioxidant vitamins and carotenoids

| | Tomato juice (100g) | Paprika juice (100g) | CE-2 chow (100g) |
|------------------------|---------------------|----------------------|------------------|
| ascorbic acid | 9.0 mg | 74.3 mg | 19.0 mg |
| α -tocopherol | 0.3 | 1.4 | 7.0 |
| β -carotene | 0.2 | 0.4 | 0.2 |
| lutein | 0.04 | 0.07 | 0.9 |
| lycopene | 5.0 | — | — |
| capsanthin | — | 3.5 | — |
| β -cryptoxanthin | — | 0.7 | 0.04 |

調したい。実験に使用したトマトジュース、パプリカジュースおよびCE-2飼料中の抗酸化ビタミンとカルチノイド含有量を表2に示した。搾汁にはその他の非栄養性微量化学成分（ポリフェノールなど）も含まれていることが知られている。われわれの実験結果は、多数の抗酸化物質それぞれの活性の相加なのか、活性酸素消去連鎖過程における共同作業による相乗なのかは定かではないものの、発癌予防にはこのような自然の素材そのものを利用する方が有利である場合もあることを強く示唆していると考えている。生活習慣、ここでは食習慣の改善が最も大切な基本的事項で、しかもより有効であることを物語っているのではないだろうか。リコピン、カプサンチンの摂取形態と吸収、排泄の違いについては不明のままであるが、幸いなことに、われわれの実験でラットに摂取させた搾汁の量は人にも適用できる量である。従来の医学的思考では、精製物質の利用はより有効で、科学的とされてきたきらいがあるが、癌の化学予防では、上記のような研究方法と人への応用が大切な選択枝の一つと考えている。このことは、例えばEGCGと緑茶と癌予防、EPA,DHAと魚油と癌予防の基礎研究と臨床応用で、われわれはすでに経験済みのはずである。最近、話題にあがりつつある保健機能食品の議論の中に、癌の一次予防が常に課題の一つになる所以でもある。

参考文献

1) Narisawa T, et al. Prevention of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in F344 rats by lycopene and tomato juice rich in lycopene. Jpn. J. Cancer Res. 89,1003-1008,1998

2) Narisawa T, et al. Prevention of N-methylnitrosourea-induced colon carcinogenesis in rats by oxygenated carotenoid capsanthin and capsanthin-rich paprika juice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 224, 116-122,2000

動物実験データの解釈 —イソチオシアナート類を例として—

西川 秋佳

(国立医薬品食品衛生研究所病理部)



1. はじめに

ヒトがんを予防する候補物質の効果を実験的に検討するために、実験動物を用いた各種の発がんモデルが用いられている。しかし、その動物実験データをできるだけ正当に解釈するには、複雑に絡む色々な要素を分析する必要がある。ここでは、動物実験データの解釈に関する私見を述べさせていただくことにする。まず第一に、ヒトと実験動物との種差を考慮する必要があるが、これは化学物質の安全性や有効性に関わる動物試験が抱えるポストゲノム時代の重要な課題の一つと考えられ、今後時間をかけて解決されていく



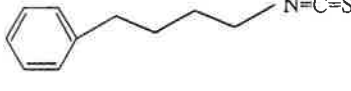
ものと思われる。極端な場合には、その結果動物実験そのものが消滅してしまう可能性も完全には否定できないが……。第二に、同じ臓器を対象とする発がんモデルにおいても、どういう実験デザインを用いるかは各研究者に委ねられており、無数に存在すると考えられるがん予防物質の効果を単純に比較することを困難にしている。便宜的に、がん抑制率 $|\text{陽性対照群のがん発生率} - \text{投与群のがん発生率}| / \text{陽性対照群のがん発生率}$ を計算することにより、一応の比較は可能と思われる。しかし、検索動物数、投与量、陽性対照群のがん発生率、発生腫瘍の組織型などによってその重みが変わってしまう欠点がある。

以下に、腫瘍を誘発することが知られているN-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) ハムスター発がんモデルを用いたイソチオシアナート類の実験データを基にして、その解釈に関するその他の問題点について考察する。

2. 発がん過程に特異的な抑制

アブラナ科植物に豊富に含まれるphenethyl isothiocyanate (PEITC) は、タバコ特異的なニトロサミンの一つである4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) によるラットやマウスの肺発がん等を抑制する作用のあることが知られており、その主な抑制機序としてニトロサミン類の代謝への影響によることが報告されている¹⁾。そこで、別のニトロサミンであるBOP誘発ハムスター発がんモデルのイニシエーション期またはポストイニシエーション期に限定してPEITCを投与する実験を行った。その結果、PEITCはBOPによる腫瘍および肺発がんのイニシエーション過程を特異的に抑制し、ポストイニシエーション期に単純に計

Table Summary of modification of BOP-tumorigenesis by isothiocyanates.

| Chemical structures | Pancreas | Liver | Lung |
|--|----------|-------|------|
|  PEITC | ↘ | → | ↓ |
|  PPITC | → | → | ↓ |
|  PBITC | ↘ | ↑ | ↓ |

算して約4,000倍のPEITCを投与しても抑制効果はないことが明らかとなった³⁴⁾。このことから、米国などでは発がんの全過程にイソチオシアナート類を投与する実験が多く行われているが、その抑制効果は主にイニシエーション過程におけるものと推察される。ところで、BOPは環境中に存在するかどうか不明な点が多いことから、そのイニシエーション過程を阻害することの意味を問うことも確かに重要なポイントと思われる。しかし、動物モデルはあくまでも単純系を指向した試験系であり、ヒトが環境中において様々な発がん物質に複合的に絶え間なく曝露されている可能性を考えると、がん化学予防に関連する作用機構を解明するための重要な情報となるはずである。

3. 組織親和性と臓器特異性

PEITCの脂溶性を増し組織親和性を高めるために、アルキル側鎖を延長したいくつかのイソチオシアナート類が合成されており、マウスのNNK誘発肺発がんに対する影響を比較した実験では、アルキル側鎖の長さや肺腫瘍の抑制率との間に正の相関が見られることが報告されている³⁵⁾。そこで、BOP誘発ハムスター発がんモデルにおいても同様な傾向がみられるかどうかを、PEITCと合成の3-phenylpropyl isothiocyanate (PPITC) および4-phenylbutyl isothiocyanate (PBITC) をイニシエーション期に同一の実験条件下で投与し、それらの効果を比較した³⁶⁾。その結果、肺腫瘍の発生は3つの化合物で大差なく高度に抑制された。一方、脾の腫瘍性病変に対しては、PEITCおよびPBITCに抑制効果がみられ、PPITCには顕著な影響が認められなかった。また、肝腫瘍に対しては、PEITCや

PPITCには顕著な影響がなかったが、最も長鎖のPBITCではむしろ発生が促進された。Tableにまとめたように、これらの影響を総合評価すると、BOPハムスターモデルにおいては天然成分のPEITCが最も優れていることになる。従って、ラットやマウスを用いたNNK誘発肺発がんに対する成績とは異なる結果となった。このことは、脂溶性を増すことが動物種によっては必ずしも発がんの抑制効果を高めることに繋がらないことを意味し、もっとアルキル側鎖の長い6-phenylhexyl isothiocyanate (PHITC) でラットの大腸や食道の腫瘍発生が促進されたことと符合するものと思われる⁷⁸⁾。これらの成績のヒトへの外挿性に関しては、発がん物質とがん予防物質の相互作用に関わる臓器特異性や動物種差を追究する必要があると思われる。

4. おわりに

このように、動物モデル自体は基本的には単純系を指向した試験系であるが、その中でも動物実験データを解釈する上に考慮すべき要素が複雑に絡んでいるといえる。興味あることに、天然成分であるPEITCやbenzyl isothiocyanate (BITC) にもラット膀胱に対する発がん性を疑う成績が報告されている³⁹⁾。ハムスターに対する50週間のPEITC投与では、膀胱上皮への影響は殆どみられないことから、動物種差に絡む問題と思われるが、どちらがヒトでのリスクを反映しているかについては更なる検討を要する。

参考文献

- 1) Morse, M.A. et al.: Cancer Res. 49: 549-553, 1989.
- 2) Morse, M.A. et al.: Cancer Res. 51: 1846-

1850, 1991.

- 3) Nishikawa, A. et al.: Carcinogenesis 17: 1381-1384, 1996.
- 4) Nishikawa, A. et al.: Cancer Lett. 141: 109-115, 1999.
- 5) Nishikawa, A. et al.: Jpn. J. Cancer Res. 87: 122-126, 1996.
- 6) Son, H.-Y., Nishikawa, A. et al.: Cancer Lett. 160: 141-147, 2000.
- 7) Rao, C.V. et al.: Cancer Res. 55: 4311-4318, 1995.
- 8) Stoner, G.D. et al.: Carcinogenesis 16: 2473-2476, 1995.
- 9) Hirose, M. et al.: Int. J. Cancer 77: 773-777, 1998.

携帯電話の電磁波による 発がんリスク評価

今井田 克己

(香川医科大学医学部 第1病理学)

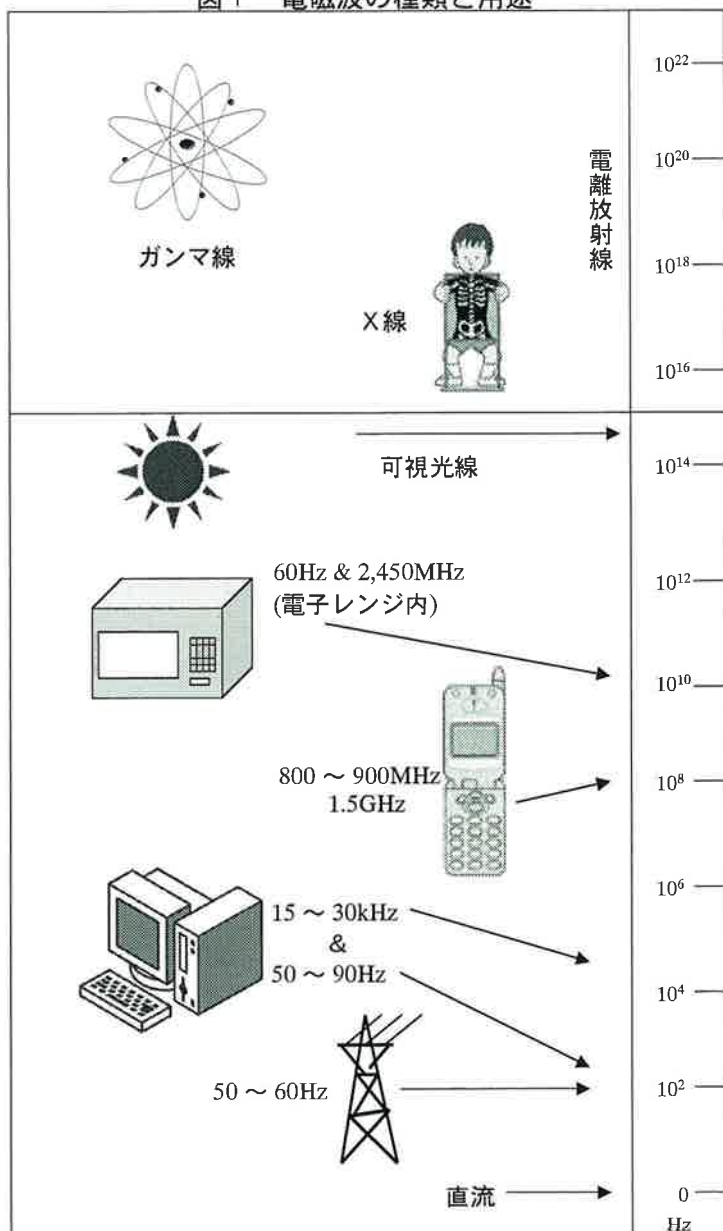


はじめに

近年の急速な携帯電話の普及に伴い、その利便性と引替えに電磁波曝露による生体への影響が危惧され、アメリカでの脳腫瘍患者による携帯電話会社への訴訟をきっかけに、マスコミの注目を集めることとなった。また、その普及にともない中継基地局のアンテナの設立も増加し、その基地周辺の住民の漫然とした不安が報道されるなど、電磁波による生体への影響、特に電磁波と発がんとの関連が関心を集めている。

電磁波の波長による種類と実際に使用されている用途を図1示す。携帯電話に用いられる電波は900MHz帯や1.5GHz帯のいわゆる高周波電磁波が用いられており、この周波数帯はラジオ周波数帯(Radio frequency, RF)に分類される。一方、高圧送電線周辺の住民に対する腫瘍を含めた健康への影響についても議論が

図1 電磁波の種類と用途



週間行った。この曝露群の他、曝露装置には入れるものの曝露は行わない偽曝露群、曝露装置にも入れず、通常の飼育を行う対照群を設けた。いずれの動物も実験開始3週目に肝の部分切除を行った。実験は8週間で終了し、胎盤型 glutathione S transferase (GST-P) の肝の免疫染色を行い、肝の前がん病変である GST-P陽性細胞巢の数ならびに面積を画像処理装置を用いて計測した。そしてその数と面積を算出し、曝露群、偽曝露群および対照群の間で定量的に比較検討した。その結果、肝の前がん病変の数および面積とも曝露群、偽曝露群の間で有意差は認められず、曝露群ではむしろ減少傾向を示し、電磁波曝露には肝の発がん性ならびに肝発がんプロモーション作用はないことを明らかにした。また、実験終了時の血中ホルモン値を測定すると、ACTHやCorticosterone レベルの上昇とともに Melatonin 値も上昇していることが明らかとなった。Melatonin は多彩な作用機序を示すホルモンであるが、その作用機序の一つとして抗腫瘍作用も知られている。このことは、肝の前がん病変の発生が曝露により減少傾向を示したことを考えると極めて興味深い結果といえる。この成果をふまえて、我々は同様の実験系を用いて Melatonin による肝の前がん病変の発生を抑制することを確認している。[3]

マウス皮膚発がんにおける電磁波 (1.5GHz) の影響

次に、我々は携帯電話のアンテナから最も近い「臓器」である頭部皮膚を想定してマウス皮膚発がんモデルを用いて、高周波電磁波の影響を検討した。

曝露実験は名古屋工業大学工学部の藤原教授らとの共同研究で行い、この実験のために特別に開発した曝露装置を用いた。曝露条件は皮膚の平均 SAR は 2.0W/kg、全身 SAR 0.08W/kg とした。7,12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA, 100/100) をあらかじめ剃毛した10週齢の CD-1 雌マウスの背部皮下に単回塗布し、その1週間より、曝露装置で 1.5GHz の電磁波曝露を一日90分、週5回、実験終了まで行った。偽曝露群と通常飼育の対照群を設けるとともに、陽性対照として既知の皮膚発がんのプロモーターである 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を塗布する群を設け、実験は20週間で終了した。その結果、皮膚腫瘍の発生頻度と1個体当たりの発生個数は TPA を塗布した群では 29/30 (97%)、18.4個と、DMBA 塗布のみの対照群の

あるが、これは50~60Hzの超低周波帯であり、携帯電話からの高周波電磁波とは生物学的な影響は異っており、区別して考える必要がある。

電磁界の強さは比吸収率 (Specific absorption rate, SAR) を単位として表現され、単位質量の組織あたりの熱発生率として定義され、単位は W/Kg である。携帯電話の電磁波からのヒト頭部内の SAR 分布を評価し、動物実験を行う際の臓器内での電磁波曝露量の定量化などの実験の曝露評価が、実験結果を評価する場合でも極めて重要である。次に、我々の行ってきた電磁波曝露実験とその関連の実験を示す。

ラット中期肝発がん性試験による電磁波 (900MHz, 1.5GHz) の影響

東京都立大学の多氣教授らとの共同研究として、我々の開発したラット肝中期発がん性試験法を用いて、携帯電話で使用されている 900MHz および 1.5GHz の電磁波曝露による肝発がんに対する発がん性ならびに発がんプロモーション作用の有無を検討した[1,2]。

実験は6週齢の雄ラットを用い、まず、肝発がん物質である Diethylnitrosamine (DEN, 200mg/kg) を単回腹腔内投与し、その2週間より 900MHz または 1.5GHz の電磁波の近傍界曝露を行った。この実験では標的臓器である肝に電磁波曝露が行えるよう特殊な曝露装置を開発した。肝における平均 SAR を 2.0W/kg とし、電磁波曝露を一日90分、週5日、6

1/30 (3%), 0.1個に比較して明らかに有意に皮膚腫瘍の発生が上昇したが、DMBA投与後に電磁波曝露した群では0/48 (0%), 0個、偽曝露群では0/48 (0%), 0個と皮膚腫瘍の発生は全くみられなかった。従って、1.5GHzの高周波電磁波曝露はマウス皮膚発がんに影響をおよぼさないと結論づけた。

電磁波によるラット脳腫瘍発生におよぼす影響

高周波電磁波による脳腫瘍発生におよぼす影響に関する動物実験としては、Adeyらの詳細な研究がある[4]。これは中枢神経系に発がん性を示す ethylnitrosourea (ENU) を経胎盤的に投与された動物に836.55MHzの電磁波をラットの頭部に2年間曝露したもので、脳のSARは雌1.0W/kg、雄1.2W/kgであった。その結果、生存率、脳腫瘍の発生頻度、発生個数、および腫瘍の組織型に偽曝露群との間で統計学的な有意差はなかったとするものである。

我々もラットを用い、脳腫瘍発生におよぼす高周波電磁波の影響の検討を現在行っている。これは妊娠ラットに脳神経系の発がん物質であるENUを経胎盤に投与し、生まれた動物を用いて2年間の2種類のデジタル・パルス変調した電磁波の曝露(脳の平均SAR2.0W/kgと0.67W/kg)による脳の発がん性の評価を行うものであり、実験は現在も進行中である。

おわりに

電磁波によるヒトに対する影響に関しては多くの漠然とした不安があり、例えば前述したような白血病や脳腫瘍発生に関するもの他、心筋梗塞から神経変性疾患、さらにはうつ病や神経過敏症に至るまで多くの疾病への関与が取りざたされている。しかし、いずれも明らかな科学的な根拠に乏しく、漠然とした不安感から人々の恐怖感をあおるものも多いことは否定できない。重要なことはしっかりと科学的なデータに基づいたヒトへのリスク評価が行われることである。我々のデータでも、電磁波曝露によりラット肝の前がん病変発生はむしろ抑制傾向を示し、それにはMelatoninの関与の可能性も示されている。わが国でもこの分野での科学的、そして医学的な検討が積極的に行われており、現在その科学的な根拠となりうる基礎的なデータが蓄積されつつある。今後、WHOやInternational Agency for Research on Cancer (IARC) による評価が2004年を目標に行われる予定であり、我が国で行われた実験デー

タ、さらに現在進行しつつある実験データも重要なその科学的な根拠となりうるものとして期待される。

参考文献

- [1] K. Imaida, M. Taki, S. Watanabe, Y. Kamimura, T. Ito, T. Yamaguchi, N. Ito, and T. Shirai. The 1.5 GHz electromagnetic near-field used for cellular phones does not promote rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay. *Jpn J Cancer Res*, Vol. 89, pp. 995-1002, 1998.
- [2] K. Imaida, M. Taki, T. Yamaguchi, T. Ito, S. Watanabe, K. Wake, A. Aimoto, Y. Kamimura, N. Ito, and T. Shirai. Lack of promoting effects of the electromagnetic near-field used for cellular phones (929.2 MHz) on rat liver carcinogenesis in a medium-term liver bioassay. *Carcinogenesis*, Vol. 19, pp. 311-314, 1998.
- [3] K. Imaida, A. Hagiwara, H. Yoshino, S. Tamano, M. Sano, M. Futakuchi, K. Ogawa, M. Asamoto, and T. Shirai. Inhibitory effects of low doses of melatonin on induction of preneoplastic liver lesions in a medium-term liver bioassay in F344 rats: relation to the influence of electromagnetic near field exposure. *Cancer Lett*, Vol. 155, pp. 105-114, 2000.
- [4] WR. Adey, CV. Byus, CD. Cain, RJ. Higgins, RA. Jones, CJ. Kean, N. Kuster, A. MacMurray, RB. Stagg, and G. Zimmerman. Spontaneous and nitrosourea-induced primary tumors of the central nervous system in Fischer 344 rats exposed to frequency-modulated microwave fields. *Cancer Res*, Vol. 60, pp. 1857-1863, 2000.

大腸前がん病変と発がん予防物質検出におけるその有用性

山田 泰広、森 秀樹
(岐阜大学医学部病理学講座)



前がん病変の発生、発育を抑制することは、がん予防の観点から非常に意義深

いものと考えられる。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。大腸において aberrant crypt foci (ACF) は現在まで広く前がん病変として認識されてきた。ACFは1987年、Birdによって提唱された病変で、azoxymethan (AOM) などの選択的大腸発がん剤投与後の大腸粘膜に観察され、ヒトでも同様の病変が確認されている(1,2)。ACFは発がん剤投与後早期より出現し、長期間大腸発がんの標的部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きた。当然の如く、大腸発がん予防物質の検出に有望であり、これを使用した化学予防物質の検出および作用機序に関する検索が広く行われてきた。実際、我々もACFの短期バイオアッセイにより、幾つかの有望な物質を見いだしてきた。しかしながら、ACFの有用性には限界があり、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しばしば報告される。例えば、発がん予防作用が期待されているフラボノイドの一種であるゲニスタインはラットにお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(3)。

最近、我々はAOM誘発ラット大腸発がんモデルにおいて、ACFの形態を持たない新たな大腸発がん早期病変の存在を報告した(4,5)。興味深いことに、それらの組織学的異型度は、ACFより強く、一部には腺腫様組織像を呈するものも見られた。我々はこの早期病変における β -catenin 遺伝子の変異およびその蛋白の蓄積の有無を検索した。その結果、ACFの形態を持たない病変には、ACFよりも高頻度に β -catenin 遺伝子の変異が存在することが分かった。さらにACFでは明らかな蛋白の蓄積が無いのに対して、新規病変にはほぼ全例に β -catenin 蛋白の蓄積が認められた。この病変、 β -catenin-accumulated crypts (BCAC) では、核小体オルガナイザー(AgNORs)を指標とした検索により、ACFよりも高い細胞増殖能を有することが分かった。このような結果はBCACがACFに比して、より直接的な大腸前がん病変であることを示唆するものと考えられる。

次に、BCACが大腸がん抑制物質によりどの様な修飾を受けるかについて検索した。ACFのアッセイの成績と長期発がん

表1 Effects of Celecoxib on AOM-induced BCAC and ACF

| Group no. | Treatment | No. of segment examined | No. of BCAC /cm ² colonic mucosa | No. of ACF /cm ² colonic mucosa |
|-----------|------------------------|-------------------------|---|--|
| 1 | AOM alone | 21 | 4.77 ± 1.55* | 9.33 ± 4.82 |
| 2 | AOM+500 ppm celecoxib | 21 | 2.51 ± 1.88* (47.4) | 7.37 ± 3.36 (21.0) |
| 3 | AOM+1500 ppm celecoxib | 21 | 1.45 ± 1.25* (69.6) | 6.20 ± 3.98* (33.5) |
| 4 | No treatment | 21 | 0 | 0 |

BCAC; β -catenin-accumulated crypts, ACF; aberrant crypt foci.

*Mean \pm SD, **Significantly different from group 1 by Student's t-test (* p < 0.001, ** p < 0.03).

Values in parentheses represent percentage inhibition compared to group 1.

ん試験による成績との不一致が知られる、celecoxibが用いられた。CelecoxibはCOX-2 inhibitorの一つであり、AOM誘発大腸がんを強力に抑制することが知られる一方、ACFの形成抑制には弱い作用しか示さないことが報告されている。Celecoxibの投与により、ACFの形成は約35%の抑制を示すに過ぎなかったが、BCACでは約70%の抑制率が認められた(表1)(6)。この病変でのAgNORsによる検索により、BCACにおける細胞増殖活性の低下が示唆され、抑制機序の一つとして重要と考えている。

我々の結果はBCACが大腸前がん病変であることを裏付けるとともに、BCACが大腸がん性より正確なバイオマーカーとなりうることを示すものと考えられる。BCACは組織切片上に観察される病変であるために、免疫染色法、in situ ハイブリダイゼーション法などによる前がん病変に対する直接的な分子生物学的検索が可能であり、発がん抑制物質の抑制機序解明に有用であると考えられる。しかしながら、BCACを検索するには粘膜面に水平に、しかも連続に組織切片を作製する必要があり、その解析は技術的に非常に困難かつ煩雑である。一方、ACFは粘膜表面をメチレンブルーで染色するだけで観察され、非常に容易である。この点において、ACFを利用する短期バイオアッセイは、予防物質のスクリーニングとしては、いまだ有用な方法であると考え(7)。今後BCACの検索法の簡便化をはかり、より容易で正確な短期バイオアッセイ法の開発を行いたいと考えている。

参考文献

1. Bird, R. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings., *Cancer Lett.* 37: 147-151, 1987.
2. Pretlow, T., et al. Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa., *Cancer Res.* 51: 1564-1567, 1991.
3. Rao, C., et al. Enhancement of experimental colon cancer by genistein., *Cancer Res.* 57:

3717-3722, 1997.

4. Yamada, Y., et al. Frequent β -catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis., *Cancer Res.* 60: 3323-3327, 2000.

5. Yamada, Y., et al. Sequential analysis of morphological and biological properties of β -catenin-accumulated crypts, provable preneoplastic lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis., *Cancer Res.* 61: 1874-1878, 2001.

6. Yamada, Y., et al. Suppression of occurrence and advancement of β -catenin-accumulated crypts, possible premalignant lesions of colon cancer, by selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib., *Jpn J Cancer Res.* 92: 617-623, 2001.

7. Yamada, Y., et al. Reply to Letter to the Editor by Dr Pretlow TP, et al., *Cancer Res.* 61: 7699-7701, 2001.

ポリメトキシフラボノイドの 特徴的な活性と代謝特性

村上 明
(近畿大学生物理工学部)



C6-C3-C6の炭素骨格を有するフラボノイドの多くはフェノール性水酸基を有し、この官能基が優れた抗酸化性を

示す構造的要因であることはよく知られている。しかしながら、自然界には水酸基の全て、あるいはほとんどがメチル化されているフラボノイド(ポリメトキシフラボノイド、ここではPMFと略称)も存在することはさほど知られていない。PMFはカンキツ類に特徴的に含まれる成分であり、最近、がん予防やがん治療に関連した種々の活性で注目されている物質群の1つである。

本稿では、PMFの生理機能や体内での代謝吸収特性に関して、通常の水酸化フラボノイドとどのように異なるのかといった点を簡単に紹介してみたい。

がん予防・治療に関連したPMFの活性

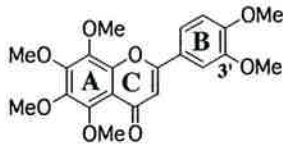
代表的なPMFの1つであるnobiletin(NOB)やtangeretin(TAN)(図1)には、がん予防効果を期待させる報告がいくつかある。例えば、白血病細胞の分化誘導¹⁾、がん細胞の増殖抑制²⁾、抗変異原性³⁾、matrix metalloproteinase-9産生抑制⁴⁾、P-糖タンパク機能の抑制⁵⁾、15-lipoxygenase阻害⁶⁾、inducible nitric oxide synthaseやcyclooxygenase(COX)-2の誘導抑制⁷⁾などである。

以上の報告の中には、PMFの活性は通常の水酸化フラボノイドよりも概して高いと結論する例もある。例えば著者らグループは、TPAによるO₂-産生系に対するNOBとluteolin(LT、図1)の抑制作用を比較し、両者のIC₅₀値には約8倍もの差があり(NO: 1.2 μ M、LT: 9.8 μ M)、NOBの方が有意に高い抑制活性を示すことを報告している⁸⁾。

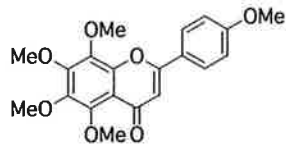
この要因を探る目的で、実験に使用した分化HL-60細胞への取り込み能についてHPLCを用いて分析したところ、100 μ Mの濃度ではNOBとLTの細胞内局在割合はそれぞれ約10%および5%、20 μ Mでは約5%および0%(検出限界以下)であり、NOBの優れた細胞内取り込み能が高いO₂-産生抑制能と関連している可能性が提示できた⁹⁾。

以上の文献情報や実験結果から、PMFには優れた発がん予防効果が期待されるが、現在までに動物実験で確認された効果は、著者の知る限りではマウス皮膚パピローマ形成抑制作用¹⁰⁾、とラット大腸aberrant crypt foci(ACF)形成抑制作用⁸⁾だけであり、今後さらに種々の臓器における発がん抑制活性を幅広く検討する必要がある。後者の試験では、NOBの経口投与によってACFの発生のみならず、大腸粘膜中のPGE₂量をも低減させている点も注目され、in vitroで示されたCOX-2誘導抑制作用¹¹⁾

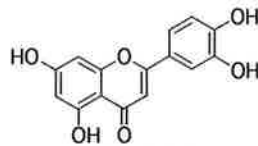
NEWS LETTER



Nobiletin (NOB)



Tangeretin (TAN)



Luteolin (LT)

図1 NOB、TAN、LTの化学構造

が *in vivo* で確認できた⁸⁾ものと思われる。

このように、NOBは新しいがん予防物質として期待される一方で、PMFは好ましい作用性だけを持つのではないことも記しておきたい。例えばNOBは、ラット肝臓外因系 (DEN) 発がんモデルにおいて前がん病変の発生を抑制する一方で、内因系 (コリン欠乏食) ではその発生を促進する⁹⁾。またTANは、tamoxifenのがん治療効果を低減させることがヌードマウスを用いた実験で報告されている¹⁰⁾。この機序は、TANによるナチュラルキラー細胞数の減少で説明できるらしい¹¹⁾。

β -caroteneの例を引用するまでもなく、発がん予防成分の逆作用を明らかにし、報告し続けることはヒトへの応用のためには不可欠なプロセスであると思われる。

PMFの代謝吸収特性

NOBの細胞内取り込み効率が優れている原因は、メチル化による分子疎水性の増大にあることは容易に想像できるが、この物理化学的な特性は、生体内での代謝吸収パターンにも強い影響を与える。

例えば、*in vitro*の小腸吸収モデルとして汎用されている分化Caco-2 (ヒト結腸がん細胞) を用いて、NOBとLTの吸収特性を解析したところ、LTは腸腔側に残存しやすく、細胞内には全く局在しないのとは対照的に、NOBは細胞透過速度が比較的速く、細胞内にも有意な量が検出できる¹²⁾。

また、ラット肝臓S-9mixtureの添加実験では、LTはほとんど未変化だったのに対し、NOBは継時的な減少を見せ、その代謝物を検索したところ、1つはB環3'位が脱メチル化されたものであった。水酸化フラボノイドのB環は、肝臓などで逆にメチル化を受ける部位でもあり、フラボノイド水酸基の数や存在位置によって、メチル化・脱メチル化の双方が制御されているようである。

NOBは、脱メチル化された後、水酸基が露出した部位でグルクロン酸抱合

や硫酸化抱合を受け、最終的に水溶性代謝産物へと変換された後、体外へ排泄されるものと思われる。

ラットを用いた最近の実験では、LTと比較した場合、NOBは胃・小腸・大腸などの粘膜に局在しやすい傾向が明瞭に現れ、未変化体のNOBは $1\mu\text{M}$ 付近の濃度で血清中に検出された (村上ら、投稿準備中)。消化管粘膜への局在性が高いことから、NOBの適用臓器としては、消化管が重要であると思われるが、慢性毒性や逆作用の検討なども当然必要である。

以上、駆け足で恐縮だが、PMFの特徴的な活性や代謝特性について紹介させて頂いた。NOBは温州ミカンにも含まれるが、沖縄特産のシークワシャーというカンキツ類に豊富に存在することから、こういったカンキツ類試料を摂取した場合の、がん予防活性も今後検討すべきであろう。越えるべきハードルが眼前にいくつも存在するが、異分野の先生方との共同研究によって、それらを1日も早く、1つでも多く乗り越えられることを願いながら筆を置きたい。

参考文献

- 1) Kawaii, S. et al.: *Anticancer Res.*, 19, 1261-1269, 1999.
- 2) Kawaii, S. et al: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 896-899, 1999.
- 3) Miyazawa, M. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 47, 5239-5244, 1999.
- 4) Ishiwa, J. et al: *J Rheumatol.*, 27, 20-25, 2000.
- 5) Takanaga, H. et al: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293, 230-236, 2000.
- 6) Malterud, KE. et al: *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5576-5580, 2000.
- 7) Murakami, A. et al: *Cancer Res.*, 60: 5059-5066, 2000.
- 8) Kohno, H. et al.: *Life Sci.*, 69: 901-913, 2001.
- 9) 中江 大、第8回日本がん予防研究会抄録集、p27, 2001.
- 10) Bracke ME et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 91: 354-359, 1999.

11) Depypere HT, et al.: *Eur. J. Cancer.*, 36 Suppl 4, S73, 2000.

12) Murakami, A. et al: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 194-197, 2001.

消化管におけるフラボノイドの 吸収代謝と機能性

室田佳恵子

(徳島大学医学部栄養学科 (食品学講座))



フラボノイドは野菜や果物といった植物性食品中に広く存在しており、ヒトが一日に摂取する総量は数10mgから約1gともいわれている。フラボノイドは植物中では主に配糖体 (グルコース、ラムノースやルチノースなどがフェノール性水酸基に結合したもの) として存在している。例えばケルセチンはレタス、ブロッコリー、タマネギなど植物性食品に広く存在している典型的なフラボノール型フラボノイドであり、アグリコン (配糖体の糖が脱離したもの) は強い抗酸化性を有している。主要な配糖体はケルセチン-3-グルコシドであるが、タマネギでは4位にグルコースが付加したものが主であるし、またソバなどに含まれるルチン (ケルセチン-3-ルチノシド) など、さまざまな配糖体が常に食事から摂取されている。

フラボノイドの摂取は、動脈硬化の初期病変であるLDLの酸化変性を抑制し、心疾患等に対して予防効果があると期待されているほか、最近では抗がん作用なども報告されている。しかし、フラボノイドのバイオアベイラビリティは完全には明らかになっておらず、疾病予防作用を発揮する分子構造と量が体内で維持できるのかという重要な問題については多くの議論がある。ここ数年フラボノイドの血中代謝物についての分析が世界中で行われているが、吸収されたフラボノ

NEWS LETTER

イドが血中でアグリコンとして存在しているのか、摂取した配糖体のまま存在しているのか、あるいは代謝を受け抱合体として存在しているのかは今でも争点となっている。最近では血中にフラボノイドは抱合体として存在している¹²⁾という考えが主流となってきており、これらの代謝物の生理機能³⁾が今後注目されていくと考えられる。

フラボノイド配糖体は消化管内で腸内細菌の作用により加水分解され、生じたアグリコンが大腸で受動拡散により吸収されるという考え方がこれまでの主流であった。私達は、ある種の配糖体は小腸内で加水分解されアグリコンとなって小腸で吸収される、と考えており、ヒト小腸モデルとして汎用されているCaco-2細胞を用いた実験系において、アグリコンはグルコース配糖体に比べ10倍以上吸収されやすいことを示した⁴⁾。そして小腸粘膜を通過して体内へ入るのは、アグリコン、配糖体のいずれを与えた場合でもほとんどが抱合体であることを示唆した。またラットのin situ perfusion系を用いた実験において、ルチンと比較してアグリコンの方が吸収されやすく、腸管細胞内で抱合体となったケルセチンは腸腸循環（あるいは腸肝循環）により再び管腔内へ戻される経路が存在していることが報告されている⁵⁾。近年、小腸粘膜にフラボノイド配糖体のいくつかを基質としてもつ β -グルコシダーゼの存在が報告され、実際に小腸でもフラボノイド配糖体の加水分解が起こり得ることがわかった^{6,7,8)}。また私達は、このようなケルセチンアグリコンと配糖体の腸管での吸

収されやすさの違いがそれぞれの化合物の疎水性の違い、すなわち細胞膜への親和性の違いに起因している可能性を示したが、Caco-2細胞およびSGLT1（ナトリウム依存性グルコース輸送担体1型、小腸での主要なグルコース輸送担体）をトランスフェクションしたCHO細胞を用い、ケルセチン-4'-グルコシドがSGLT1を介して細胞内へ取り込まれることを示す結果も報告されている⁹⁾。ただし、細胞内へ入ったケルセチン配糖体は殆どが薬物トランスポーターであるMultidrug resistance protein (MRP2)によって再び管腔内へ排泄されることも示唆されている¹⁰⁾。ちなみに、ケルセチンではないが、イソフラボンは主に胃から吸収される¹¹⁾という報告もあり、フラボノイドとってひとくくりにはできないようである。

総合すると、食事に含まれるフラボノイド配糖体は胃で若干の吸収があった後、小腸で一部がアグリコンとなって速やかに吸収され、体内で代謝されたものの一部は再び小腸管腔内へ戻ってくることで、配糖体はアグリコンに比べて吸収されにくいいため、いくらかはSGLTを介すなどして小腸で吸収されるとしても大部分はそのまま盲腸大腸へと移行し、そこで腸内細菌の作用によりさらに加水分解を受け大腸でアグリコンとして吸収され、その残りが糞中へ排泄されるという経路が推定できる（図1）。

以上食品中のフラボノイドの吸収について紹介したが、吸収率となると最大でも数10%と考えられるため、フラボノイドの機能性が発揮される場合は、吸収後

の生体内ではなく、むしろ吸収されなかった（あるいは胆汁から排泄された）ものが多量に存在する消化管とも考えられる。では、最終的に小腸、大腸に残ったフラボノイドは消化管でどのような効果を示すのかについてはわかっていないことが多い。消化管での酸化ストレスは消化管疾病発症増悪の原因の一つと考えられており、フラボノイドの持つ強い抗酸化作用やその他の機能が消化管疾病を予防する可能性が考えられる。代表的な消化管疾病に対する影響としては、消化管粘膜潰瘍モデル動物にフラボノイドを与えて潰瘍が軽減された¹²⁾報告や、また、大腸ガンに対する抑制効果も田中ら¹³⁾やその他のグループ¹⁴⁾より報告されている。この効果がフラボノイドの抗酸化作用によるものか否かは明らかではないが、培養細胞の系においては、過酸化水素などによる酸化ストレスに対し、フラボノイドの添加は大腸ガン細胞のDNA損傷の軽減等抗酸化効果を示す¹⁵⁾ことが報告されている。これらの実験はアグリコンを用いたものが主であるが、私達はラット消化管粘膜ホモジネートを用い、ケルセチン配糖体もある程度鉄イオン誘導脂質過酸化を防ぐこと、特に小腸粘膜では配糖体の加水分解が顕著に起こり添加したアグリコンと配糖体がほぼ同等の抗酸化作用を示すことを見出している¹⁶⁾。

実際の生体においては消化管内には配糖体、アグリコン、抱合体、さらには腸内細菌による開環、開裂産物が混在していると予想され、真に疾病予防効果を発揮する分子を同定するのは難しい。しかし、実際に経口投与あるいは混餌としてフラボノイドを摂食させた場合に消化管での抗疾病作用が報告されているということは非常に興味深く、今後の研究の進展が望まれる分野である。

謝辞

本稿で述べた研究は、徳島大学の寺尾純二教授、文齊鶴博士との共同研究によるものです。紙面を借りて感謝いたします。なお本研究の一部は生研機構基礎研究推進機構の補助金によって行われたものです。

参考文献

- 1) Moon, J.-H. et al. Free Radic Biol. Med. 30, 1274, 2001.
- 2) Shimoi, K. et al. FEBS Lett. 438, 220, 1998.
- 3) Shirai, M. et al. J. Agric. Food Chem. in press.

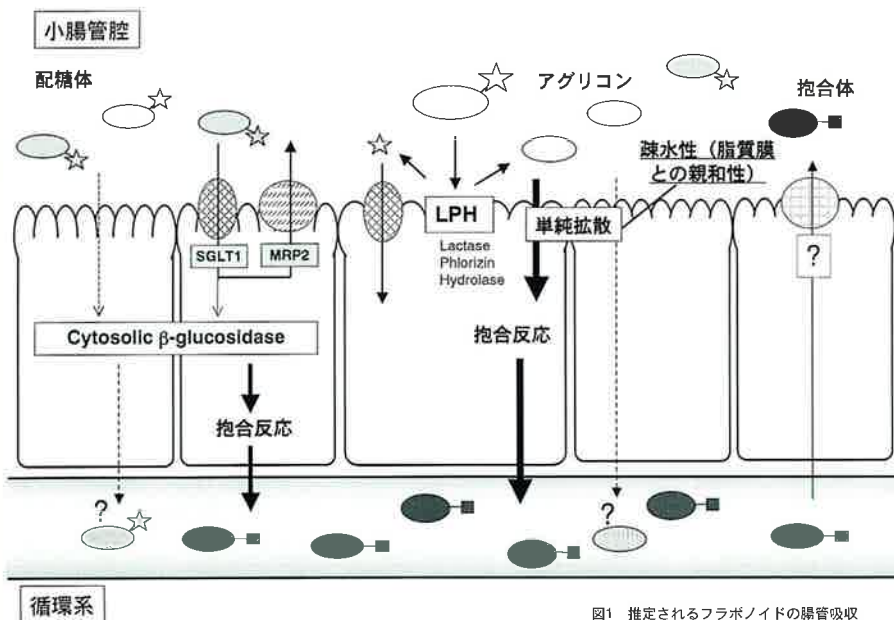


図1 推定されるフラボノイドの腸管吸収