

氏名 (本籍)	川 森 俊 人 (三重県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲 第 3 0 3 号
学位授与日付	平 成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	(I) Suppression of Azoxymethane-induced Rat Colon Aberrant Crypt Foci by Dietary Protocatechuic Acid (II) Modifying Effects of Naturally Occurring Products on the Development of Colonic Aberrant Crypt Foci Induced by Azoxymethane in F344 Rats
審 査 委 員	(主査) 教授 森 秀 樹 (副査) 教授 武 藤 泰 敏 教授 佐 治 重 豊

論 文 内 容 の 要 旨

大腸癌による死亡率は我が国では消化器癌のうち、胃癌に次いで高く、近年食生活の欧米化により急増している。分析疫学的研究により大腸癌発生に関する環境要因が明らかにされつつあり、特に食生活習慣が大腸癌発生に大きな影響を与えていると考えられている。最近、癌の化学予防 (cancer chemoprevention) という概念が提唱されている。これは天然性ないし合成物質 (化学予防物質) を投与することにより、癌の発生を阻止する (癌の積極的予防) という考えである。我々は今までに、口腔、大腸、肝臓などの発癌動物モデルを用いて、様々な物質の化学予防物質としての可能性を検討してきた。しかし長期実験は、期間が長くかかり、費用もたくさんかかり、多くの物質を検討することは不可能でした。

Birdらは大腸発癌剤を投与したマウスの大腸に異型腺窩巢 (aberrant crypt foci, ACF) が発生することを報告したが、ACFはヒト大腸にも存在し、*c-fos*や*ras*のmutationもみられることから一種の大腸癌の前駆病変と考えられている。ラットやマウスのACFは発癌剤投与後8日から2週間後に出現することから、大腸発癌の良い生物学的指標 (biomarker) になると考えられている。

今回、azoxymethane (AOM) 誘発ラット大腸ACFをbiomarkerとした発癌抑制物質の短期スクリーニング法の確立を目指して、実験1) では、柑橘類に多く含まれるsimple phenolic acidの一種でAOM誘発ラット大腸発癌抑制作用を有すprotocatechuic acid (PCA) のACF等のbiomarkersに及ぼす影響を検討し、実験2) では、この短期実験モデルを用いて天然物より抽出された7種類の物質の化学予防物質としての可能性を検討した。

研究材料と方法

実験1) 総数50匹の4週齢雄F344ラットを5群 (各10匹) に分け、以下の処置を行った。実験は5週齢より開始し、第1-3群には実験開始1週目よりAOM (15mg/kg体重) を週1回計3回皮下注射した。第2, 3, 4群には、実験開始よりPCAをそれぞれ1000, 2000, 2000ppmの濃度で混餌投与した。第5群は基礎食のみを投与した。実験開始後5週で全動物を屠殺し、各群5匹の大腸ACFの頻度をBirdの方法により測定した。また大腸粘膜のornithine decarboxylase (ODC) 活性とsilver-stained nucleolar organizer region protein (AgNOR) 染色標本にて大腸粘膜上皮のAgNOR数を測定し、大腸粘膜における細胞増殖の変化を検討した。

実験2) 被験物質は、4種類のテルペノイド (ジテルペノイドのrebaudioside A, トリテルペノイド・サポニンのoleanolic acid, soyasaponin A₂, セスキテルペノイドのcostunolide), フラボノイドの一種のliquiritinと2種類のイソクマリン (phyllodulcinとhydrangenol) の7種類で、総数176匹の5週齢雄F344ラットを16群に分け、以下の処置を行った。第1-8群 (各16匹) には実験開始1週目よりAOM (15mg/kg体重) を週1回計3回皮下注射した。第2-15群 (第9-15群は各6匹) には、実験開始よりそれぞれ被験物質を200ppmの濃度で5週間混餌投与した。第16群 (6匹) は基礎食のみを投与した。実験開始後5週で全動物を屠殺し、第1-8群は各8匹、第9-16群は各1匹について大腸ACFの頻度をBirdの方法により測定した。また、同時にAgNOR染色を行い大腸粘膜上皮のAgNOR数を測定した。他に大腸粘膜のODC活性とポリアミン濃度も測定した。

研究結果と考察

実験 1)

a) 5 週間の実験期間中AOM, PCA投与による体重に及ぼす影響は認めず, 屠殺時の肝臓重量にも変化は見られなかった。組織学的にもPCA投与による主要臓器の毒性所見はみられなかった。

b) 大腸ACFはAOM投与群(第1-3群)にのみ認め, その発生率は100%であった。大腸あたりのACF数は第1群が最も多く 149.4 ± 26.2 , 第2, 3群はそれぞれ 68.6 ± 21.1 , 91.0 ± 13.6 と第1群に比し有意に少なかった($P < 0.005$, $P < 0.01$)。PCA投与群(第2, 3群)では, 第1群に比しACFの中でもfocusあたり1 cryptを有するものが最も減少しており, また5 crypts以上を有するfocusはみられなかった。また大腸あたりのaberrant crypts数も第1群が最も多く 208.6 ± 45.8 , 第2, 3群はそれぞれ 116.4 ± 41.9 , 128.0 ± 25.1 と第1群に比し有意に低下していた($P < 0.05$)。Focusあたりのaberrant crypts数では各群間に有意な差は認めなかった。

c) 大腸粘膜ODC活性は第1群が 10.5 ± 7.15 であり, 第2, 3群はそれぞれ 0.44 ± 0.44 , 0.42 ± 0.72 と第1群に比し有意に低下していた($P < 0.05$)。大腸粘膜上皮の核あたりのAgNOR数は第1群が最も多く 1.47 ± 0.28 , 第2, 3群はそれぞれ 1.13 ± 0.33 , 0.96 ± 0.29 と第1群に比し有意に低下していた($P < 0.0001$)。

以上より, PCAはこのAOM誘発ACFを用いた短期実験モデルにおいて, ACFの発生を抑制した。また, そのメカニズムとして大腸粘膜のODC活性や大腸粘膜上皮のAgNOR数が低下していることより細胞増殖抑制が関与しているものと考えられた。さらに, この短期実験モデルが, 大腸癌に対する化学予防物質(特にblocking agents)の検出に有効であると考えられた。

実験 2)

a) Costunolide以外の被験物質とAOM同時投与群はすべて, 屠殺時の体重がAOM単独投与群に比し低下していた。また屠殺時の肝重量はすべてAOM単独投与群に比し低下していたが, 被験物質単独投与群の体重では特に変化は見られなかった。これらすべての群で屠殺時の剖検では明らかな毒性所見は認めなかった。

b) 大腸のACFはAOM投与群にのみ認め, その発生率は100%であった。大腸あたりのACF数はAOM単独投与群が最も多く 152.5 ± 30.6 で, hydrangenol投与群, oleanolic acid投与群, costunolide投与群はそれぞれ 115.6 ± 30.7 , 97.6 ± 11.1 , 118.6 ± 16.9 とAOM単独投与群に比し有意に少なかった($P < 0.05 \sim 0.005$)。

c) 大腸粘膜のODC活性は, AOM単独投与群は 22.1 ± 19.3 で, rebaudioside A投与群, liquiritin投与群, hydrangenol投与群, oleanolic acid投与群, costunolide投与群, soyaaponin A₂投与群はそれぞれ 6.6 ± 6.7 , 1.9 ± 1.9 , 4.3 ± 6.9 , 4.3 ± 3.0 , 0.6 ± 1.2 , 0 とAOM単独投与群に比し有意に低下していた($P < 0.05 \sim 0.001$)。

d) 大腸粘膜上皮の核あたりのAgNOR数は, AOM単独投与群が 1.44 ± 0.28 と最も高値で, liquiritin投与群, oleanolic acid投与群, costunolide投与群ではそれぞれ 1.01 ± 0.29 , 0.85 ± 0.25 , 0.88 ± 0.20 とAOM単独投与群に比し有意に少なかった($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$)。

e) 大腸粘膜のポリアミン量は, AOM単独投与群は 6.79 ± 0.43 で, costunolide投与群, soyaaponin A₂投与群ではそれぞれ 5.42 ± 0.55 , 5.96 ± 0.67 とAOM単独投与群に比し有意に少なかった($P < 0.001$, $P < 0.05$)。

以上より, 短期実験モデルで検索した天然物7種類のなかでは, 大腸癌に対する化学予防物質(特にblocking agent)として最も有効な物質は, costunolideであった。Costunolideは, AOM誘発大腸ACFの発生を抑制し, その抑制機序の一つとして細胞増殖抑制作用が考えられた。またcostunolideは大腸粘膜のODC活性, ポリアミン合成も抑制することより, blocking activityのみならず, suppressing activityも有する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 川森俊人は, AOM誘発ラット大腸ACFを用いた短期実験モデルを確立し, PCA, costunolideが大腸癌に対する化学予防物質として有効である可能性を示した。本研究の成果は, ヒト大腸癌に対する化学予防物質検出の一助となるものであり, 腫瘍病理学の進歩に少なからず寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

(I) Suppression of Azoxymethane-induced Rat Colon Aberrant Crypt Foci by Dietary Protocatechuic Acid

平成6年7月発行 Jpn. J. Cancer Res. 85 (7) : 686~691

(II) Modifying Effects of Naturally Occurring Products on the Development of Colonic Aberrant Crypt Foci Induced by Azoxymethane in F344 Rats

平成7年3月発行 Cancer Res. 55 (6) : 1277~1282