

養生片仔癯の研究内容：

<実例報告><専門誌掲載>

「漢方養生サプリメント養生片仔癯（YHK）、 実験誘発肝腫瘍性病変の初期段階に抑制効果」

ILSIヨーロッパ国際シンポジウム、ヨーロッパの機能性食品：

健康強調表示の科学において マルタ共和国

2007年5月9日～11日

米国癌研究協会 例年研究会議 アメリカ

2008年11月6日～7日

マロッタ・F^{1,4}；ハラダ・M²；ゴー・KL³；ロレンゼティ・A¹；ゲロサ・F¹；ミネリ・E⁴

[要旨]

本研究は、スプラッグ・ドーリー・ラットのジエチルニトロソアミン(DEN)誘発肝癌形成に対する漢方養生サプリメントYHKの効果を確かめることを目的として実施した。ラットは無作為抽出により3群に分け、15週間にわたり追跡調査を行った。第1群には標準的食餌を与え、健康な対照群とした。第2、第3群（ラット数はそれぞれ20匹）に対しては、DEN法を用いて肝前癌細胞巣を誘発した。しかし、第3群には同時に、1日当たり50mg/kgのYHKを投与した。肝前癌細胞巣の定量的評価としては、免疫組織化学的染色及び画像解析を用いて胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼP型（GST-P）陽性細胞巣の測定を行った。DEN処置群は対照群と比べて有意の体重減少、肝重量の増加が認められた一方、DEN処置と同時にYHKを補助投与した群は、体重減少、肝重量増加が抑えられた。DEN処置のみの群と比べると、YHK同時投与群のGST-P陽性細胞巣の数、大きさ、容積は有意に低値であった。さらに、YHK同時投与群では、肝細胞癌の発生頻度、数、大きさ、容積が有意に抑えられた。YHKの抗酸化作用はいうまでもなく抗炎症性や抗線維化作用は、YHKの保護効果の説明に役立つと考えられるメカニズムである。従って、ラットのDEN誘発肝前癌病変の肝癌形成を抑制する漢方薬YHKは、漢方養生サプリメントとして大規模な臨床応用の可能性を有すると結論付けることができる。

養生片仔癯の研究内容：

[はじめに]

今日、生体異物が癌形成に関与している可能性があるとの懸念が高まっており、ヒトおよびラット、ネズミなどの齧歯動物の両方を対象とした研究が確実な趨勢となっている。確かに、DNAは発癌物質の体内吸収の全過程、最も感受性の高い組織への分布、更なるDNA反応型を生じる代謝発現、解毒、そして分泌といった諸々のプロセスを通じて損傷を受ける可能性がある。環境中には、大グループの複素環アミン変異原物質を始めとして、数多くの遺伝毒性発癌物質が自然発生している(1,2)。例えば、食品由来物質の一つである、2-アミノ-3,8-ジメチルイミダゾ[4,5-f]キノキサリン(MelQx)はラット肝においてDNA付加体形成を誘発する能力を有し(3)、高用量の投与により明らかな肝細胞癌が発生することもある(4)。

臨床実験では、ヒトの1日のMelQx摂取量は被験者1人当たり0.2~2.6 μ gと推定され(5)、調理済みの食肉を食べた健康な被験志願者の尿からMelQxが検出され、定量化できること(6~8)も判明している。しかし、何にも増して重要なことは、ヒトの腎臓や結腸組織にMelQx-DNA付加体が発見されたという点である(9)。そうした発癌候補物質の検出・除去が最重要であることは言うまでもないが、癌形成予防効果のある食事によるアプローチが理想的な対策と言えるだろう。実際、生体異物への恒常的な暴露に対する保護効果のある天然成分がいくつか推奨されているが、実験研究において有効性が認められた天然成分は数えるほどしかない。著者らのこれまでのインビトロ、インビボ両実験研究においては、YHKが肝細胞損傷や虚血-再灌流モデルの肝微小循環に強い保護効果を発揮すること、(10,11)、YHKがインビトロで肝実質細胞の金属誘発酸化ストレスに強い保護制効果があることを示した(12)。実際、YHKは臨床研究では、実験的に検査した多くのハーブ療法とは異なり、投与後2~3週間以内にほとんどのC型肝炎ウイルス感染に伴う慢性肝疾患患者のALT値が有意に低下し、受賞パイロット研究ではマルヤマ・スコアが低下することも立証されている(13)。

さらに最近では、別のカナダのグループが、非アルコール性脂肪性肝炎患者を対象とした生化学的、組織学的研究の中で、YHKの治療効果を確認している(14)。ラット肝は、癌イニシエーションやその後の発達の経時変化すべてを研究するのに理想的なモデルである。なぜなら、種々の肝遺伝毒性発癌物質の投与後、数日もすれば、肝の単一細胞が胎盤型グルタチオン-S-トランスフェラーゼ[単一胎盤型グルタチオンS-トランスフェラーゼ陽性(GST-P)細胞]を発現するからである(15,16)。そうしたGST-P単一細胞とは別のある細胞群はGST-P細胞巢へと伸長し、腫瘍促進剤の投与により、一段とその数や大きさを増し、最終的にはGST-P腫瘍へと転換していく。従って、GST-P単一細胞は「癌細胞の起始となるもの」と見なされ、GST-P細胞巢の数や大きさだけでなく、GST-P単一細胞の数も、その後の癌リスクの定量的指標として用いることが可能であ

養生片仔癯の研究内容：

る(15)。ただし肝GST-P陽性細胞巢のすべてが必ずしも腫瘍に発達するとは限らない。とはいえ、肝GST-P陽性細胞巢と腫瘍との間には90%超の相関性があり、同種長期研究の分析では、肝細胞癌の発生頻度との相関性も示されている(17)。こうしたことを前提として、本研究の目的は、化学的肝発癌の初期段階におけるYHKの抑制効果の可能性を確かめることである。

[材料・方法]

スプラッグ・ドリー・ラットは環境(温度、換気、湿度、明・暗サイクル)制御型飼育ケース内に収容し、12時間明/暗サイクル下温度23°C、湿度60%/10%で、イオン交換水と非栄養繊維を随時自由に摂れる条件下で飼育した。ラットは15週にわたり環境順応させた。

[実験プロトコル]

60匹のラットは無作為抽出によりそれぞれ20匹ずつ、3群に分け、実験終了時まで以下のような処置を施した。第1群は通常の固形飼料を食餌として与え、健康な対照群とした。第2群には標準固形飼料を食餌として投与、また第3群にはYHK(三七人參、杜仲、黄精、甘草、オタネニンジン、(株)協通事業、東京、日本)を含有する標準固形飼料を食餌として与えた。なおYHKは1日摂取量を確実に50mg/kgとなるようにし、これら両群を肝癌形成モデルとした。その後、多少の修正を加えた上でSoltおよび、Farber路油脂の報告(18)の記述に従い、両群のラットにジエチルニトロソアミン(DEN)(生理食塩水中200mg/kg/体重)を腹腔内へ単回投与した。標準飼料と粉末化YHKを適宜混合した食餌を毎日作製し、食事トレーは毎日チェックし、ゴミを取り除き、重量を測り、食餌を補充するようにした。

[組織病理学的分析及びグルタチオンS-トランスフェラーゼ胎盤型(GST-P)染色と計測]

ラットは、15週にわたる研究期間終了時に屠殺し、外面的病状を確認するために肉眼検査を実施した。ついで肝臓を切除して重量を計測した。ラットごとに、肝臓の両葉から5ミリ厚の切片を切り取り、直ちに冷却したアセトン(0~4°C)で6時間かけて固定した。切片は、後に実施するGST-Pの免疫組織化学的検査のためパラフィン包埋した。GST-P細胞巢(0.01mm²を超える面積の細胞病変として定義)は、Hsuらの報告(19)にあるとおり、ストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(ABC)を用いた免疫組織化学法により分析を行った。すなわち、キシレンで脱パラフィンし、過酸化水素で冷却し、正常血清でブロックした後、肝組織切片はヤギ正常血清、

養生片仔癩の研究内容：

抗ウサギGST-P抗体（1:2000）、ビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG（1:400）、そして最後にABCにより順次処置した。ペルオキシダーゼ結合部位を示すために、ジアミノベンジジン法（20）を用いた。病変の定量的評価としては、他の報告（21,22）に記載されていたように、画像解析システムを用いて、平方センチ当たりのGST-P陽性細胞巢の数、細胞巢が占める切片面積のパーセント比、およびGST-P陽性細胞巢や小結節の直径（ $>0.2\text{mm}$ ）とした。肝病変はSquireとLevittの報告（23）に記載された基準、並びに米国実験動物研究会のガイドライン（24）に則って作成した解説書に従い記述に従い診断を行った。

[統計分析]

結果は中央値±標準偏差として表した。統計分析はウインドウズXPのSPSSプログラムを使用して実施した。各グループ間の格差は一元配置分散分析を用いて評価し、その後、Dunnettesの対比較検定並びにTukeyの群間誤差率による評価を行った。いずれの場合も、 $p < 0.05$ が統計的有意の最低水準と考えられた。

[結果]

体重と肝重量

ラットはいずれも、屠殺を予定していた時点まで良好な状態のまま生存した。DEN処置を施した群は、対照群に比べて有意に体重が減少し、肝重量は増加した（ $p < 0.05$ ）（表I）。YHK経口投与群では、DEN誘発の体重減少や肝重量増加が抑えられた（ $p < 0.05$ ）。

GST陽性細肝細胞巢の評価

GST陽性細胞巢の頻度についての定量分析の結果を表IIにまとめた。二次元評価では、GST陽性病変は、YHKを投与した第3群のほうが第2群より有意に少なかった(図1)。立方センチ当たりの病変数、平均容積、肝実質に占めるGST陽性病変のパーセント比率として表した場合の容積などの容積評価、統計分析を適用した場合にも、まったく同じ結果が得られた。

腫瘍発生頻度

未処置群のラットでは肝腫瘍は検出されなかったが、DEN処置群のラット(第2、第3群)では、肝細胞原発の腫瘍が認められた。第3群の癌発生頻度は第2群のそれと比べ有意に低かった（ $p <$

養生片仔癯の研究内容：

0.01)。また、癌の多重度と腫瘍合計を、容積計測により評価した場合も、第2群より第3群のほうが有意に低かった ($p < 0.05$)。

表 I DEN誘発肝癌形成時における体重と肝重量の変化：YHK同時投与の効果

群	処置	体重		肝重量
		研究開始時	研究終了時	グラム
1	標準的飼料のみ	127 ± 1	353 ± 9	14.7 ± 0.5
2	DEN処置	125 ± 2	321 ± 5 *	16.9 ± 0.5 *
3	DEN処置 + YHK 50mg/kg/日投与	126 ± 1	349 ± 8 §	15.0 ± 0.6 §

* $p < 0.05$ 対YHK同時投与群及び対健康な対照群

§ $p < 0.05$ 対DEN処置のみのラット

表 II DEN誘発肝癌形成における肝GST-P陽性病変の数と大きさ：YHK同時投与の効果

群	2 DEN処置	3DE処置 + YHK 50mg/kg/日投与
個数/cm ²	12 ± 4	6 ± 3 *
平均面積 (mm ²)	0.32 ± 0.04	0.25 ± 0.03 *
数/cm ³	2,012 ± 133	1,545 ± 109 *
平均容積 (mm ³)	0.17 ± 0.03	0.14 ± 0.02 *
細胞巣/肝実質 %	28.2 ± 2.5	21.7 ± 2.1 *

* $p < 0.05$ 対 DEN処理のみのラット

表 III DEN誘発肝細胞癌の発生頻度、数、大きさおよび容積：YHK同時投与の効果

群	2 DEN処置	3 DE処置 + YHK 50mg/kg/日 投与
---	---------	------------------------------

養生片仔癆の研究内容：

HCCラットの数 (%)	96 ± 4	71 ± 4
平均面積 (mm ²)	1.40 ± 0.47	0.17 ± 0.09 *
個数/cm ³	1.3 ± 0.3	0.8 ± 0.2 *
平均容積 (mm ³)	0.79 ± 0.28	0.02 ± 0.01 *
HCC/肝実質 %	0.7 ± 0.2	0.2 ± 0.1 *

*p<0.01 対 DEN処理のみのラット

図 1 DEN誘発肝病変のGST-P陽性染色 (x400)。標準飼料投与群では、大量の陽性細胞巣が群れをなした状態にあるのが見えるが、YHK同時投与群では、点在する細胞巣の数が際立って少なく、染色強度は弱い。

[考察]

肝細胞癌 (HCC) は破壊的な影響をもたらす疾患であり、ますます一般的になりつつある。この癌の疾患管理の進歩が遅々としており、また再発率の高いことが、依然として手術による患部切除の成功を妨げる大きな要因となっている (25)。C型肝炎およびB型肝炎ウイルス、一部の地域ではアフラトキシンがHCCの主な原因であるが、生体異物が癌形成により広範に関わっていることに対して一段と懸念が高まっている。実際、環境中には、大グループの複素環アミン突然変異原など、数多くの遺伝毒性発癌物質が自然に発生している (1,2)。遺伝毒性発癌物質は初代細胞のDNAに不可逆性の損傷を与え、それが促進物質の存在下で、自律増殖能を獲得するまで成長するところから、最近では実験的にそうした状況を作り出すために数多くの科学物質が使用されている。肝化学発癌は、イニシエーション(起始)、プロモーション(促進)、プログレッション (進行) の少なくとも三段階からなる多段階プロセスからなると考えられており、各段階それぞれに宿主生化学的、内分泌学的、免疫学的、ミクロレベルの環境的制御システムが関与している。実際、DNAは、発癌物質の体内吸収から、感受性の最も高い組織への分布、更なるDNA反応型を生じる代謝、解毒、排泄に至るプロセス全体を通じて損傷を受ける可能性がある。癌を含め、多くの疾患の予防には食事が大きな役割を果たしていることは確たる証拠があることから考えると、この場合、食事による予防的アプローチを取ることが理想的な戦略といえるだろう (26)。

こうしたことを受けて、今日では、1980年代初頭に日本で「機能性食品」と名づけられた特定栄養食品の効用を裏付ける論文が数多く見られるようになっている。著者らの本研究では、漢方養

養生片仔癯の研究内容：

生サプリメントYHKを使用した。YHKはいくつかの肝損傷実験モデルにおいて強力な肝保護性を有することが立証されている（10~12）。しかし、ヒトへの臨床試験に適用できない、あるいは時に重篤な有害事象を引き起こすことが知られ（27,28）、長期投与には安全でないとされる（29）他の天然治療薬とは異なり、YHKは通常の食事に安全に組み入れることが可能で、長期研究では、HCV関連肝硬変患者（13）や、直近では、非アルコール性脂肪性肝炎患者（14）のトランスアミナーゼ値を有意に低下させる効果があることが証明されている。

本研究ではYHKを肝有害化学物質とともに経口投与した場合、GST-P実験からも明らかなように、癌形成の初期段階を抑制する効果のあることが裏付けられた。GST-Pは、ラットの肝癌形成を通じて、蛋白質レベルだけではなく、mRNAレベルにおいても、持続性前腫瘍性細胞や腫瘍性細胞を検出できる安定したマーカーである（30,31）。全体としてGST類は、疎水性分子の細胞内移動と有毒物質の代謝の両面に重要な役割を果たしている二量体蛋白質系統群(α 、 μ 、 π 、 θ 、 Σ 、 κ 、 ζ として表示)である（32）。ラットの正常な肝臓ではGST-P蛋白質が検出されることは滅多にないが、過形成性結節や肝細胞癌においては、用いる発癌物質の種類と関係なく発現し、検出されるようになる。GST陽性細胞は通常、DNA複製の亢進とGST-P陽性単一細胞の増殖によって特徴づけられる、肝GST-P陽性細胞巣は、そうしたDNAの複製と、細胞死によって決まるその平衡力との間で生じた結果と考えられている（33,34）。しかし、上述の通り、多くの化学有毒物質及び/または食物由来の有毒物質は、進行性の細胞損傷を誘発する腫瘍促進剤として作用することも考えられる。こうした意味において、非常に興味深いのがMatsuiらによるデータで、それらは、HCC手術後の予後の改善に機能性食品によるアプローチがもつ有益な効果を示している（35）。このことにより、そうした複合的な問題に取り組むためには十分な計画の下での研究が必要であることを強調する思慮深い論評が生まれた（36）。特に、本研究はGST-P陽性細胞巣と明らかなHCCの数、大きさ、容積が、YHKを同時投与することにより有意に減少することが。特に後者の、有意差は前者よりも高いことを示した。一般に、化学予防剤の効果、脂質過酸化反応もしくはDNA付加体形成の抑制、それらの間に存在するI相もしくはII相酵素の調節には幾多のメカニズムが関わっている。著者らは、先般、YHKが、I相およびII相発癌物質代謝酵素の調節はいうまでもなく、肝実質細胞やリソソーム分画を金属誘発酸化ストレスから有意に保護する作用を持つ可能性があることを立証した（12）（Marotta他。私的データ、論文作成中）。

YHKが肝癌形成を有意に抑制するメカニズムについては、今のところ解明されてはいない。しかし、すべてを勘案すると、YHKは、杜仲や三七人參など、強力な抗酸化性/抗炎症性のある成分（37,38）や、没食子酸や甘草など、抗増殖性やアポトーシス促進性効果を発揮する成分に富んでおり（39,40）、これらがYHKの前癌病変形成阻害効果を説明するために役立つと考えられている。

養生片仔癯の研究内容：

一方、慢性肝疾患のHCCへの転換を上手に抑制できる方法を模索するにあたり、YHKはその安全性から、大規模臨床応用が可能な機能食品としての可能性を有している（41）。「数多くの自称保護活性天然成分」にあがっている予防効果のある天然成分の多くが、癌形成プロセスを悪化させないまでも（44,45）、YHKと同様の効果を発揮できずにいることを考えると（42,43）、これは大変興味深いことである。