

HydroFerrate溶液MRN-100はWistarラットにおいて化学物質誘発性胃癌および食道癌に対する防護を提供*

Mamdooh Ghoneum^{1*}, Nariman K. Badr El-din², Salma M. Abdel Fattah³, Deyu Pan⁴,
and
Lucilene Tolentino⁵

*データの一部は、第14回国際会議「慢性炎症における機能食品および生理活性化合物」(カリフォルニア大学ロサンゼルス校[UCLA]、2013年8月20～22日)にて発表したものである。

*代表著者：Eメール：mghoneum@ucla.edu、電話番号：(310) 474-6724、代理番号：(323) 562-5953

キーワード：MRN-100、胃癌、異形成、浸潤

抄録

本研究ではラットを用いて、メチルニトロニトロソグアニジン (MNNG) 誘発性胃癌および食道癌の進行に対する HydroFerrate 溶液 MRN-100 の防護効果について調べた。ラットを (1) 対照群、(2) MRN-100 投与群、(3) MNNG 投与群、(4) MNNG + MRN-100 投与群の 4 群に分けた。MNNG を 2 週間毎日投与した後、経口 NaCl を 4 週間 3 日毎に投与することにより胃癌を誘発した。化学的誘発と同時に、計 33 週間にわたり MRN-100 をラットに投与した。ラットの胃・食道組織の組織病理学的変化と体重および臓器重量の変化について調べた。さらに、MRN-100 がその抗癌性を発揮すると考えられる機序として、酸化ストレスおよび抗酸化バイオマーカーについても調べた。MNNG のみを投与したラットの胃または食道の組織 20 例中 17 例 (85%) に癌/異形成が生じたことが結果より明らかになった。これらのうち、異形成の発生は 20 例中 14 例 (65%)、癌の発生は 20 例中 4 例 (20%) であった。逆に、MNNG + MRN-100 投与群のラットで胃または食道に癌/異形成が発生したのは 20 例中 8 例 (40%) のみであった。これらのうち、異形成の発生が認められた組織は 20 例中 7 例 (35%) で、胃癌または食道癌が発生したラットは 20 例中 1 例 (5%) であった。また、MRN-100 の投与により新生物のマーカーである γ -GT 活性の劇的な変化が生じた。さらに、MRN-100 の投与により MNNG への曝露による体重および臓器重量の減少に対する防護も得られた。それに加えて、グルタチオン (GSH) 量および内因性抗酸化酵素 (スーパーオキシドジスムターゼ[SOD]、カタラーゼ [CAT]、グルタチオンペルオキシダーゼ[GPx]) の増加から実証されるように、MRN-100 の抗酸化能も血液中および胃組織において確認された。これは総フリーラジカルの減少を伴った。MRN-100 は組織への酸化ストレス損傷に対する防護を伴う機序により顕著な癌化学防御活性を示すと結論を下す。本研究は MRN-100 が胃癌および食道癌治療において有効な補助療法となる可能性があることを示唆している。

序論

胃癌および食道癌は世界全体において癌関連死の2つの主たる原因となっている (de Martel et al, 2013)。米国において2013年に食道癌または胃癌と診断される患者は約40,000例となり、治療オプションの進歩にもかかわらず、これらの癌患者における5年生存率はそれぞれ、17%、27%と依然として低いままである (Howlader et al, 2013、de Martel et al, 2013)。いずれの癌とも、*H. pylori* (Yakirevich and Resnick, 2013) が原因となる慢性炎症または胃食道逆流性疾患 (GERD) より発生すると考えられている。食道癌に関連する炎症は、胃酸が逆流する疾患であるGERDにより誘発されると考えられており、米国では成人の14~20%がGERDに罹患している (Lagergren et al, 1999、Camilleri et al, 2005)。この炎症は消化管の内壁に存在する上皮細胞の萎縮および変質、または化生を招く。疾患が進行するにつれ、化生組織はさらに変質し、複数の細胞型 (未成熟、成熟とも) が生じて異形成、そして最終的には癌性病変を引き起こす (Yakirevich and Resnick, 2013)。

胃癌および食道癌に対する最も有効な治療は癌性病変の外科的切除であるが、これは数多くの進行期にとって姑息的治療であり、新たな病変の発生を招くおそれがある原因となる慢性炎症に対処するものではない (Blakely and Miner, 2013)。これまでに胃・食道癌の治療において予防療法となりうる候補がいくつか検討されており、これらには化学予防、抗炎症剤、*H. pylori*の根絶などがある。しかし、これらの製剤がヒトにおいて有効であるというエビデンスは、臨床試験の実施件数が十分でないことから今もなお不足している (Tan and Wong, 2013、Bathaie et al, 2013)。したがって、食道癌および胃癌の治療における新規の予防製剤は依然として需要が高い状態にある。

HydroFerrate溶液MRN-100 (ACM社、日本) は、ファイトシンから分離された2価および3価の鉄酸塩からなる鉄分を基礎とする飲料である。ファイトシンは鉄分および中性脂肪化合物を含む植物抽出物であり、一般にコメ、コムギ、ハツカダイコン種子に認められる。MRN-100の生成中、脂肪は除去され、鉄化合物のみが水に分散されたままとなる。過去のMRN-100に関する研究では、加齢関連酸化ストレス (Badr El-Din et al, 2010) に対する防護剤として、また γ 線照射 (Ghoneum et al, 2013) に対する防護剤としての可能性、そして抗HIV活性 (Ghoneum and Shaheen, 2008) が示されている。し

かし、MRN-100の抗癌活性に関する研究はこれまでに行われていない。本研究はラットを用いて化学的に誘発された胃癌および食道癌に対する防護効果を調べることにより、MRN-100の抗癌活性を検討し、その作用の背後にあると考えられうる機序を解明することを目的として実施した。本研究の結果は、組織への酸化ストレス損傷に対する防護を伴う機序により、MRN-100が胃癌および食道癌治療における有効な補助療法となりうる可能性を示唆している。

材料および方法

1- メチルニトロニトロソグアニジン (MNNG) ラットに200mg/kg体重のMNNG (Sigma-Chemical社、ミズーリ州セントルイス) を2週間毎日経口投与した。

2- MRN-100 MRN-100はファイトシンから分離された2価および3価の鉄酸塩からなる鉄分を基礎とする飲料である。ファイトシンは鉄分および中性脂肪化合物を含む植物抽出物であり、一般にコメ、コムギ、ハツカダイコン種子に認められる。MRN-100を既報の通り、水中で調製した (Ghoneum et al, 2013)。ラットには経口液体摂取器よりMRN-100を自由に摂取させた。MRN-100は株式会社エイ・シー・エム (日本) が提供した。

本研究はラットを用いて化学的に誘発された胃・食道癌に対する防護効果を調べることにより、MRN-100の抗癌活性を検討し、その作用の背後にあると考えられうる機序を解明することを目的として実施した。

3- 実験動物 本研究では4月齢の雄Wistarラット (体重120 g以下) を用いた。ラットは眼科学研究所 (Research Institute of Ophthalmology、エジプト ギザ) から入手し、本研究の開始前1週間順応させた。ラットは1匹ずつ、照明および温度 (20±2°C) が管理されたケージに収容し、標準実験動物用角ペレットを与えた。

4- 実験デザイン 40匹のラットを (1) 非投与対照群、(2) MRN-100投与群、(3) MNNG投与群、(4) MNNG + MRN-100投与群の4群に分けた。胃癌および食道癌の誘発に関する標準プロトコールを用いて、ラットに発癌物質MNNGを200 mg/kg体重の用量で2週間1日1回強制経口投与した後、4週間3日毎にNaCl (1ml/ラット) を経口投与した。化学誘導と同時に、ラットに水 (第1群および第3群) またはMRN-100 (第2群および第4群) を計33週間与えた。毎月、ラットの体重変化を調べた。投与期間後 (33週間)、ラットを????? (頸椎脱臼、ガスチャンパー…など…) により安楽死させた。胃・食道組織をHE染色し、顕微鏡下で組織病理学的変化を調べた。ラットの肝臓および脾臓重量の変化を調べ、血液中および胃組織における抗酸化活性を調べた。

5- 抗酸化活性の評価

5.1. 試料採取 ラットを16時間の断食後に安楽死させた。浅麻酔後、ヘパリン処理シリリングを用いて心穿刺により血液をヘパリン処理試験管に採取した。一部を総フリーラジカル測定に使用した。溶血血液を調製し、グルタチオン (GSH)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 量の測定に使用した。ヘパリン処理血液から分離した血漿は、脂質過酸化反応の最終産物 (マロンジアルデヒド、MDA) および一酸化窒素 (NO) の濃度測定に使用した。さらに、総チオール (TSH)、総蛋白、カルボニル化蛋白 (PCO)、鉄プロファイルを評価した。

5.2. 分析手順 血漿中の脂質過酸化反応 (LPx) はMDAの形成により確認し、記述のように測定した (Yoshioka et al, 1979)。赤血球中のGSH量減少 (Beutler et al, 1963)、SOD活性 (Minami and Yoshikawa, 1979)、CAT活性 (Luck, 1963)、GPx活性 (Lawrence et al. 1974)、NO (Miranda et al, 2001)、TSH (Ellman, 1959)、PCO (Levine et al, 1990)、総蛋白濃度 (Lowry et al, 1951)。

5.3. 電子スピン共鳴法 (ESR) による血中総フリーラジカルの測定 凍結乾燥法を用いて、凍結組織からの昇華により水分を除去した。Edwards Pirani 501 Freeze dryer Super Modulyo (Edwards社、英国クローリー) を使用して試料の凍結乾燥を行った。Bruker EMX 分光計 (Xバンド、Bruker社、ドイツ ラインシュテッテン) を使用して、ESR信号を室温で記録した。作動条件はマイクロ波パワー=1.008 mW、変調振幅=4 G、変

調周波数=100 kHz、掃引幅=200 G、マイクロ波周波数=9.717 GHz、時定数=327.68 ms、掃引時間=41.943 sとした。ESR法の検出限度は試料の材料、試料のサイズ、検出器の感度、入射放射線の周波数、装置の電子回路によって決まる。試料をESRの石英製試料管に入れ、適切な装置パラメータを用いて測定を行った。各試料において照射誘導ESR信号のピーク高さを調べた。測定強度を各試料の試料重量によって分け、基準化値を計算した (Heckly, 1979)。

5.4. ESRデータの分析 ESR信号のピーク高さの変動を磁場の関数として観察するため、強度を記録された一次導関数の最高点と最低点の距離として測定した (Pascual et al, 2002)。しかし、フリーラジカル濃度の定量評価は以下の式に従って行った。

$$Nd=K[Ho (\Delta H)^2 / [Hm \times Ge \sqrt{PH}]]$$

上式において、Nd：ラジカルの数、K：分光光度計の実験条件に依存する係数=103/cm、Ho：ピークにおける磁場（ガウス）、 ΔH ：ピークとピーク間の幅、Hm：変調磁場、PH：パワー（mW=1.008）、Ge：検出器のゲイン=3.17×10⁵、濃度=不対電子/凍結乾燥血液（g）またはスピン/凍結乾燥血液（g）、A=信号のピーク高さ/重量。

6- 組織病理学的分析 MNNG投与から33週間後、各群から採取した胃および食道組織の組織病理学的変化を調べた。組織を10%ホルマリン溶液で固定し、容器内で一晩固定した。パラフィン包埋組織をマイクロトームを用いて厚さ4 μmに薄切し、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色後、過形成、異形成、癌性病変の徴候がないか光顕下で観察した。

7. 統計解析 数値は各群ラット6匹の平均値±SEM（平均値の標準誤差）として報告した。また、一元配置分散分析（ANOVA）とニューマン・クルス多重比較検定の併用により、平均値間の差の有意性を調べた。p<0.05の数値を有意とみなした。MNNG投与群とMNNG + MRN-100投与群の間、または非投与対照群とMRN-100投与群の間で、体重変化および臓器重量変化に関する差の統計学的有意性を適宜、カイ二乗検定またはフィッシャ一の直接検定により評価した。P<0.05を統計学的に有意とみなした。

結果：

1- 組織病理学的検査

1. 異形成および癌の発生率 33 週後、発癌物質 MNNG 投与ラットの組織病理学的検査に行ったところ、胃・食道（前腸）組織の 20 例中 17 例（85%）に異形成および癌が認められた。これらの組織のうち、20 例中 13 例（65%）で異形成、20 例中 4 例（20%）で癌が認められた。逆に、MNNG + MRN-100 投与ラットにおいて異形成および癌が認められた組織は 20 例中 8 例（40%）しかなかった。これらの組織のうち、20 例中 7 例（35%）で異形成が生じ、20 例中 1 例（5%）で癌が生じた（図 1）。表 1 に記す結果から MRN-100 の投与により、軽度の異形成、小病巣、または多くの小病巣を有するラットの割合が低下することがわかった。さらに、MRN-100 投与ラットでは異形成の各ステージ（軽度、中等度、重度）につき、病巣の重症度が低かった（表 2）。

2. 組織病理学的検査

食道組織 食道粘膜の HE 染色組織における組織病理学的変化を調べた。非投与対照群では全ラットの扁平上皮において、食道粘膜の角化および扁平上皮過形成が認められた（図 2A および図 B）。さらに、発癌物質 MNNG 投与群の全ラットから採取した扁平上皮において、角化および軽度扁平上皮異形成（図 2C）および重度扁平上皮異形成（図 2D）の斑状部位が認められた。それに加えて、浸潤性高分化型角化型扁平上皮細胞癌の稀な小さい部位が確認された（図 2E および図 F）。

胃組織 非投与対照群では、いずれのラットにおいても胃体および胃洞から採取した胃粘膜は正常範囲内である（図 3A および図 B）。対照群の組織において、扁平上皮過形成、異形成、癌は認められない。それに対照的に、MNNG 投与ラットから採取した胃粘膜では粘液腺の過形成および軽度扁平上皮異形成（図 3C および図 D）および高度扁平上皮異形成（図 3E）が認められた。さらに、浸潤性高分化型角化型扁平上皮細胞癌も確認された（図 3F）。逆に、発癌物質を投与し、MRN-100 を与えたラットから採取した組織において、軽度扁平上皮異形成の小さな斑状部位が認められたのは 20 例中 7 例

のみであった。したがって、MRN-100 投与により食道の異形成および扁平上皮細胞癌の重症度が低下するように思われた。胃の異形成および腺癌についても同様の所見が認められた。

図 1. 異形成担持ラットの割合。異形成担持ラットの割合 (65% VS 35%)

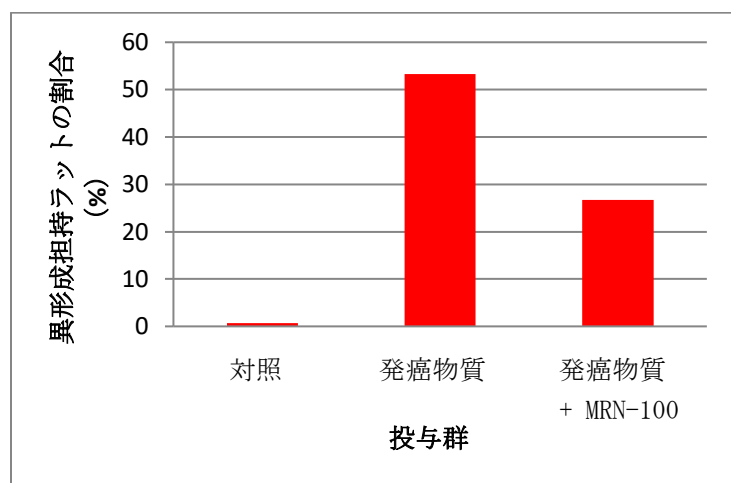


図 1. 説明文

表 1. 軽度異形成担持ラットにおける病巣の重症度

病巣数	発癌物質投与 (9 匹)		癌物質 + MRN-100 投与 (10 匹)	
	ラット数	罹患率 (%)	ラット数	罹患率 (%)
病巣なし	0	0	4	40
1 病巣	6	66.7	5	50
2 以上の病巣	3	33.3	1	10

表 2. さまざまなステージの異形成を担持するラットにおける病巣の重症度

異形成のステージ	発癌物質投与 (9 匹)		発癌物質 + MRN-100 投与 (10 匹)	
	病巣数	ラット数	病巣数	ラット数
軽度	25	3	12	1
中等度	9	2	1	1
重度	6	2	0	0

図 2

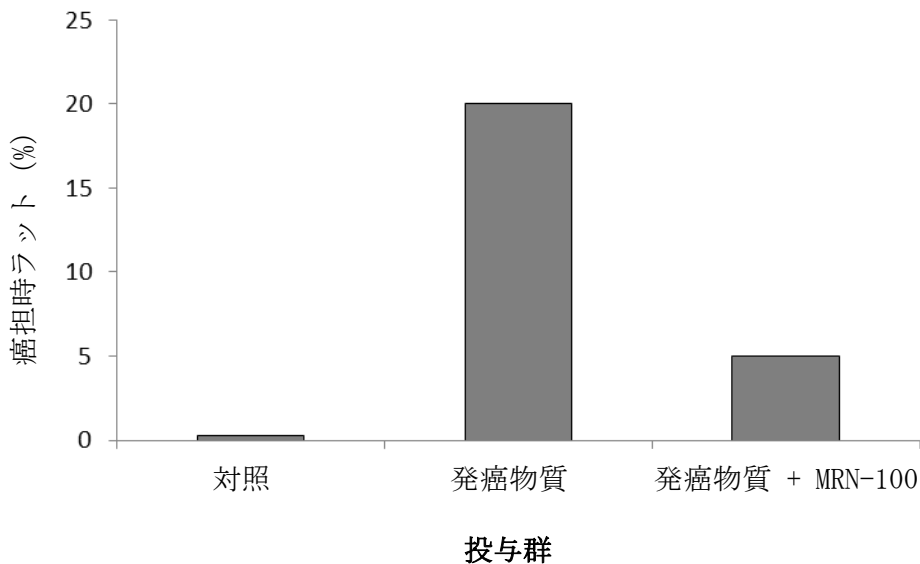


図 1 説明文

投与群	癌					異形成				
	陽性癌	陰性	対照群と発癌物質投与群間のP値	対照群と発癌物質 + MRN-100投与群間のP値	発癌物質投与群と発癌物質 + MRN-100投与群間のP値	陽性癌	陰性	対照群と発癌物質投与群間のP値	対照群と発癌物質 + MRN-100投与群間のP値	発癌物質投与群と発癌物質 + MRN-100投与群間のP値
対照	0	21				0	21			
発癌物質	5	25	0.0693			16	14	<0.0001		
発癌物質 + MRN-100	0	30		N/A	0.0522	8	22		0.0150	0.0350

図 2. 食道組織の組織病理学的検査

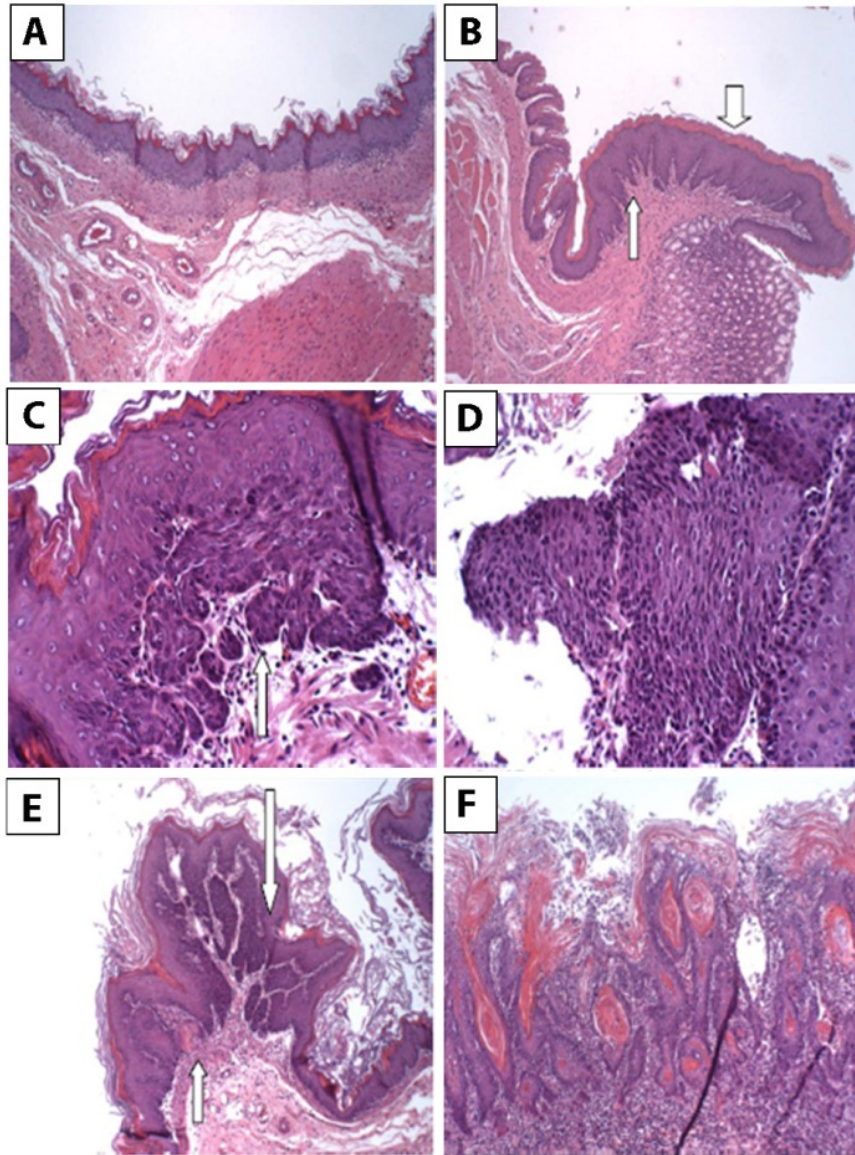


図 2. 発癌物質 MNNG を投与したラットの食道組織の HE 染色による組織病理学的検査 A. 正常食道の切片（4 倍）。B. 正常反応性食道の切片。角化（下向き矢印）および扁平上皮過形成（上向き矢印）が認められる。扁平上皮異形成は認められない（4 倍）。C~F は MNNG 投与ラットから採取した食道粘膜の切片である。C. 軽度扁平上皮異形成の病巣を示す食道の切片（10 倍）。D. 重度扁平上皮異形成を示す食道の切片（10 倍）。E. 軽度、中等度、重度扁平上皮異形成（下向き矢印）の病巣および扁平上皮細胞癌（上向き矢印）の病巣を示す食道の切片（4 倍）。F. 浸潤性高分化型角化型扁平上皮細胞癌を示す食道の切片（10 倍）。

図3. 胃組織の組織病理学的検査

図3. 発癌物質 MNNG を投与したラットの胃組織の HE 染色による組織病理学的検査 A. 正常胃体の切片 (4 倍)。B. 正常胃洞の切片 (4 倍)。C~F は MNNG 投与ラットから採取した食道粘膜の切片である。C. 腺の軽度異形成および粘膜腺の過形成を示す胃洞の切片 (4 倍)。D. 腺の軽度異形成および粘膜腺の過形成を示す胃洞の切片 (4 倍)。E. 角化、扁平上皮過形成、高度扁平上皮異形成を示す胃粘膜 (4 倍)。F. 高度腺異形成および浸潤性腺癌を示す胃体の切片 (4 倍)。

図4. 対照ラット、MNNG 投与ラット、MNNG + MRN-100 投与ラットから採取した胃の肉眼的所見 MNNG 投与ラットに関する明白な写真を参照されたい。



2- 血漿中 γ -GT 新生物マーカーである γ -GT 活性の変化を調べた。図5のデータから MNNG 投与ラットでは非投与対照ラットに比べて、 γ -GT 活性が 2.5 倍上昇したことがわかる。一方、MRN-100 の投与により γ -GT 活性の上昇が阻止され、その数値は対照群の範囲内であった。

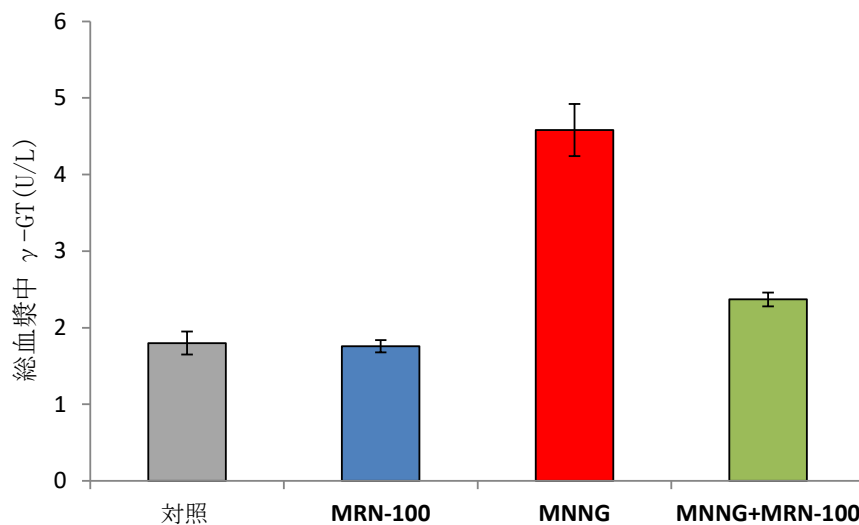


図5. MNNG + MRN-100投与後の γ -GT活性 33週間後、ラットの γ -GT活性の変化について調べた。・・・を使用して

4- 体重 図6にさまざまな投与条件下におけるラットの体重変化を示す。MNNGのみを投与した場合、2ヵ月で初期の体重減少が確認されたが、その後増加し、5ヵ月後に有意となった ($p < 0.01$)。対照的に、MRN-100を投与したラットでは体重減少が阻止された。これらのラットでは8ヵ月の投与期間を通して正常体重が維持された。

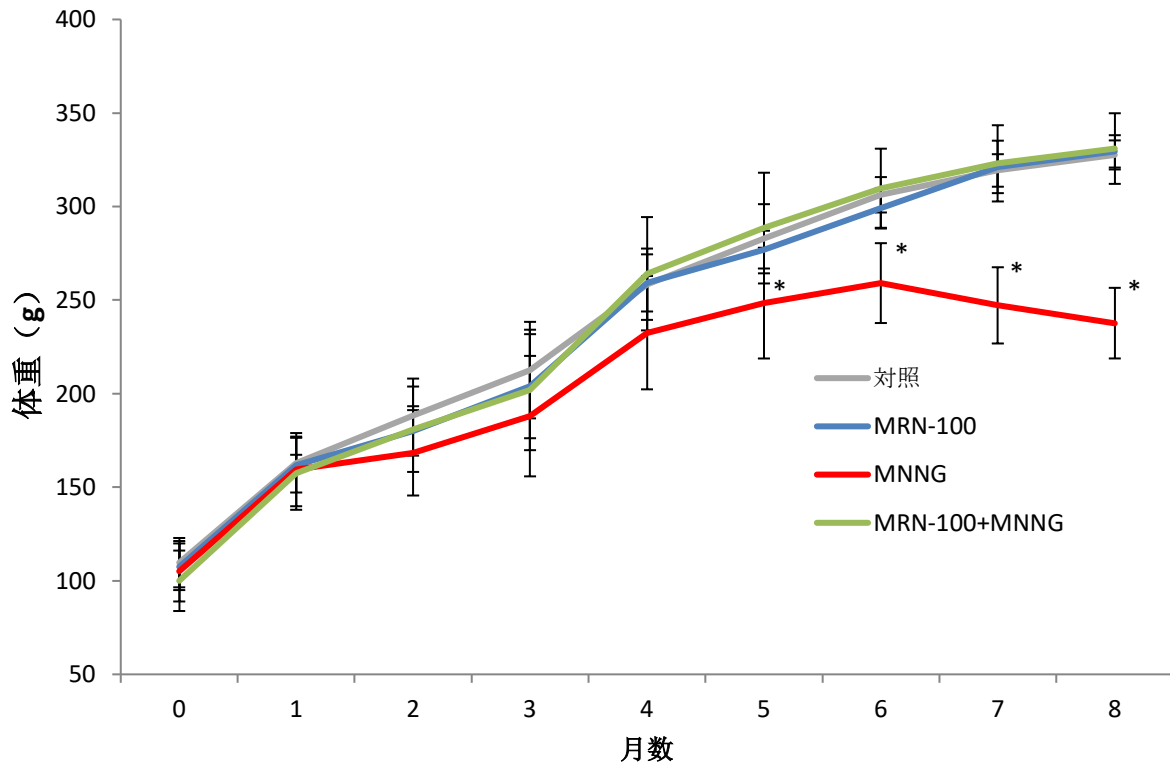
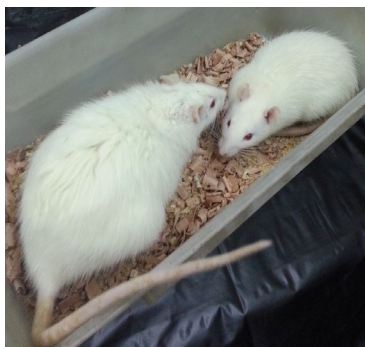


図6. さまざまな投与条件下における体重の変化。MRN-100の有無でラットに発癌物質MNNGを投与した。8ヵ月間毎月、4群のラットの体重変化を調べた。*対照群およびMRN-100 + MNNG投与群に比較して $p < 0.01$ 。各棒線はラット10匹/群の平均値 \pm SEを示す。



5- 臓器重量の変化 33 週間後、さまざまな投与条件下におけるラット肝臓および脾臓重量の変化の結果を調べた。図 7A および B から胃癌担持ラットでは非投与対照ラットと比較して、肝臓 (35%) および脾臓 (45%) の重量の有意な減少が認められたことがわかる。対照的に、MRN-100 の投与により両臓器の重量減少が阻止され、対照ラットの数値内に維持された。これらの変化は図 8A および B に示す臓器の肉眼的性状に一致している。MNNG + MRN-100 投与ラットから採取した脾臓が必要。

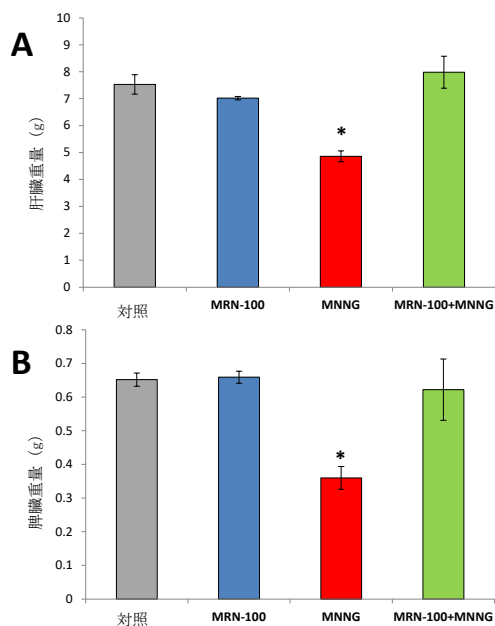


図 7

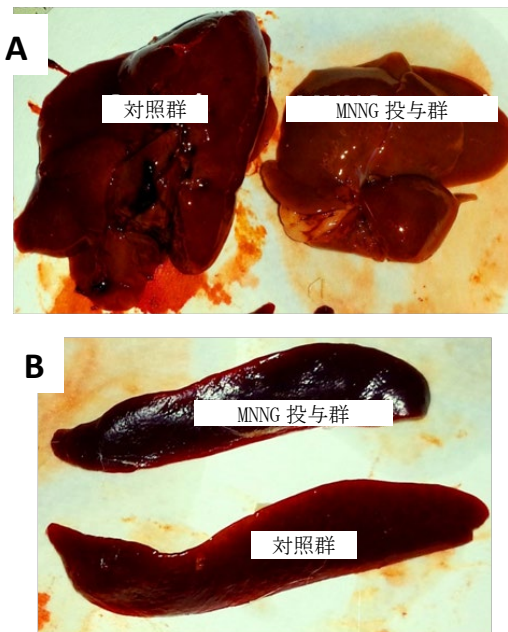


図 8

図 7A および B 臓器重量の変化。MRN-100 の有無でラットに発癌物質 MNNG を投与した。33 週間後、肝臓および脾臓の体重変化を調べた。*0.01 の水準で MNNG + MRN-100 投与群と有意に差がある。各棒線はラット 10 匹/群の平均値 ± SE を示す。

図 8A および B 臓器の肉眼的性状。対照群および MNNG 投与群の肝臓および脾臓

6- 血液中の抗酸化

抗酸化活性について、さまざまな投与条件下におけるラットのさまざまなパラメータを調べた。パラメータは総フリーラジカル濃度、MDA濃度、グルタチオン (GSH) 量、内因性抗酸化酵素 (スーパーオキシドジスムターゼ[SOD]、カタラーゼ[CAT]、グルタチオンペルオキシダーゼ[GPx])、総抗酸化能とした。

MDA濃度 図9AのデータはMNNG単独投与群では非投与対照群に比較して、MDA濃度が著しく上昇したことを示している (40.80%、 $p < 0.01$)。しかし、MNNGとMRN-100を併用投与したラットではMDA濃度が非投与対照群の範囲内に維持された。

GSH濃度 さまざまな投与条件下における赤血球中のGSH濃度を図9Bに示す。MNNG投与ラットでは非投与対照ラットに比較し、GSH濃度の非常に有意な低下が認められた (-30.11%、 $p < 0.01$)。しかし、MNNG投与ラットにMRN-100を補給することにより、血中GSH量の減少が妨げられた。また、MRN-100投与ラットではGSH量の顕著な増加が認められた。

SOD、CAT、GPx活性 MRN-100が血漿中における抗酸化酵素SOD、CAT、GPxの活性に与える影響を図9C~Eに示す。MNNG投与群では非投与対照群に比較し、抗酸化酵素SOD、CAT、GPxの活性が有意に低下した ($p < 0.01$ 、SOD活性: -45.13%、CAT: -34.04%、GPx: -48.09%)。一方、MNNG + MRN-100投与群ではこれら抗酸化酵素の有意な活性上昇が認められた。これらの酵素の減少率はSODが-9.71%、CATは-10.72%、GPxが-13.20%であった。MRN-100を毎日摂取することにより、CATおよびGPxの活性低下が有意に阻止され、対照ラットの数値に達した。

総抗酸化能 MNNG投与群では非投与対照群に比較し、総抗酸化能の有意な低下が認められた ($p < 0.01$ 、-70.35%) (図9F)。しかし、MNNG投与ラットにMRN-100を補給することにより、低下の程度が有意に減少した (-17.59%)。

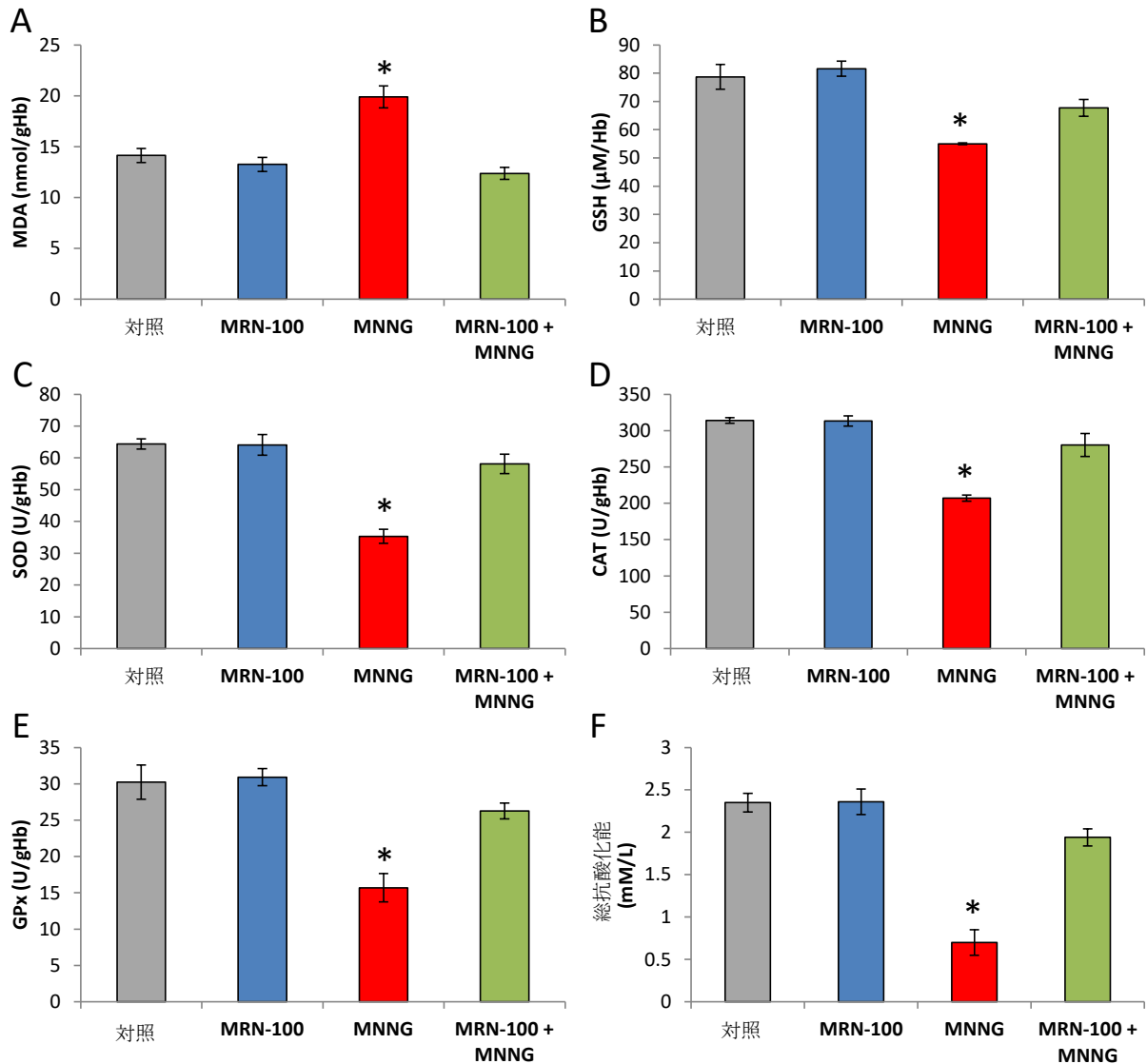


図9. 33週間のMNNG単独投与およびMNNG + MRN-100投与が血中MDA (A)、GSH (B)、SOD (C)、CAT (D)、GSH-Px (E)、総抗酸化能 (F)に与える影響。* $p < 0.01$ で対照群およびMRN-100 + MNNG投与群と有意に差がある。各棒線はラット10匹/群の平均値±SEを示す。

総フリーラジカル濃度 血中総フリーラジカル濃度をESRにより測定した。データを図10に示す。MNNG投与ラットでは非投与対照ラットに比較して総フリーラジカルの有意な上昇が認められた (28.2%、 $p < 0.01$)。しかし、MNNG投与ラットにMRN-100を投与することにより低下が阻止され、対照ラットの範囲内の濃度になった。

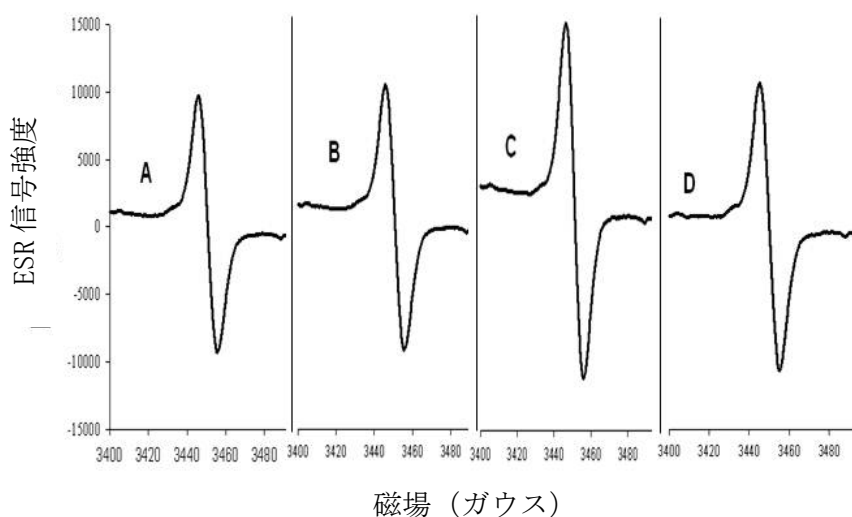


図10. 凍結乾燥血液試料のESRスペクトル。ラットにMRN-100または水道水のみ（対照）を33週間投与した。浅麻酔後、ヘパリン処理シリンジを用いて心穿刺により全血を採取し、ESRにより総フリーラジカル濃度を分析した。A：対照（非投与）群、B：MRN-100投与群、C：MNNG投与群、D：MNNG + MRN-100投与群

7- 胃組織における抗酸化

MDA濃度 表3にさまざまな投与条件下におけるMDA濃度の結果を示す。胃異形成または胃癌担持ラットでは非投与対照ラットに比較し、MDA濃度の有意な上昇が認められた（40.80%、 $p < 0.01$ ）。対照的に、MRN-100を投与した場合、MNNGによるMDA濃度上昇に対する防護が得られ、数値は対照群の範囲内となった。

GSH濃度 表3に示す結果から胃異形成または胃癌担持ラットでは非投与対照ラットに比較し、GSH濃度の有意な低下が認められたことがわかる（40.80%、 $p < 0.01$ ）。一方、MNNG投与ラットにMRN-100を投与した場合、胃組織内のGSH量が維持され、対照群の範囲内となった。

CATおよびGPx活性 表3に胃組織における抗酸化酵素CATおよびGPxの濃度を示す。胃異形成または胃癌担持ラットでは非投与対照ラットに比較し、CAT活性（-34.04%）およびGPx活性（-48.09%）の有意な低下が認められた（ $p < 0.01$ ）。対照的に、MRN-100を毎日摂取することによりこれら抗酸化酵素の活性低下が阻止され、非投与対照ラットの数値に達した。

TAC 胃異形成または胃癌担持ラットでは非投与対照ラットに比較し、TAC濃度の有意な低下が認められた ($p < 0.01$, -70.35%) (表3)。しかし、MNNG投与ラットにMRN-100を補給した場合、TAC濃度の低下は妨げられた。TACを定義されたい。

γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GT) 胃異形成または胃癌における γ -GTの総濃度は非投与対照群の胃組織の濃度よりも有意に高かった。しかし、MRN-100を毎日摂取することにより、MNNGによる γ -GTの活性上昇が阻止され、数値が対照ラットの範囲内に維持された。

表3 : MNNG 投与ラットにおいて MRN-100 投与が胃組織の MDA 濃度、GSH 濃度、TAC 濃度、CAT 濃度、GSH-Px 濃度、 γ -GT 濃度、総抗酸化能 (TAC) に与える影響

投与群 パラメータ	対照	MRN-100	MNNG	MNNG+ MRN-100
MDA ($\mu\text{M}/\text{mg}$ 蛋白質)	18.27 \pm 2.10	16.70 \pm 1.54 (-8.56%)	28.46 \pm 1.09**,**,## (55.78%)	20.76 \pm 1.50† (13.63%)
GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ 蛋白質)	1.39 \pm 0.05	1.44 \pm 0.18 (3.73%)	0.83 \pm 0.03**,**,## (-39.90%)	1.27 \pm 0.07†† (-8.65%)
SOD(U/mg 蛋白質)	25.28 \pm 1.36	24.75 \pm 0.51 (-2.11%)	7.63 \pm 2.00**,**,## (-69.81%)	22.6 \pm 2.21†† (-10.61%)
CAT (U/mg 蛋白質)	132.37 \pm 1.83	126.63 \pm 7.26 (-4.33%)	87.38 \pm 3.29**,**,## (-33.98%)	116.00 \pm 4.81†††,* (-12.36%)
GPx (U/mg 蛋白質)	43.68 \pm 1.66	42.22 \pm 1.33 (-3.36%)	27.88 \pm 2.54**,**,## (-36.17%)	38.32 \pm 1.33†††,* (-12.29%)
TAC (U/mg 蛋白質)	3.12 \pm 0.14	2.76 \pm 0.19 (-11.43%)	0.91 \pm 0.10**,**,## (-70.73%)	2.50 \pm 0.15†††,** (-19.87%)
γ GT (U/mg 蛋白質)	5.9 \pm 0.28	6.1 \pm 0.41 (2.83%)	11.28 \pm 0.59**,**,## (91.78%)	7.5 \pm 1.25†† (26.63%)

各数値はラット 6 匹/群の平均値 \pm SE を示す

*& **それぞれ 0.05、0.01 の水準で対照群と有意に差がある。

#& ##それぞれ 0.05、0.01 の水準で MRN-100 投与群と有意に差がある。

†& ††それぞれ 0.05、0.01 の水準で MNNG 投与群と有意に差がある。
(対照群の変化率[%])

考察

胃癌および食道癌は世界全体において癌関連死の2つの主たる原因となっている。予防や防御の治療オプションは限られており、この疾患を効果的に抑制する新規製剤が求められている。本研究の結果は胃・食道癌の増殖抑制におけるMRN-100の有効性を示すものである。このことは、異形成担持ラットの割合および異形成の各ステージ（軽度、中等度、重度）ごとの病巣の重症度の低下からわかるように、異形成発生率の有意な低下を示す組織病理学的検査によって実証された。さらに、データは胃腺癌および食道癌担持ラットの割合の有意な低下を示した。これらのデータは新生物のマーカである γ -GT活性の劇的な変化と関連している。

本研究において、異形成または胃癌/食道癌担持ラットの有意な体重減少が認められた。これらのデータは固形癌の特徴として体重減少を呈した癌患者に関する最近の所見に一致している。上部消化管癌および肺癌の患者では診断時に著しい体重減少が認められる (Huggett et al, 2010 ; Spina et al, 2013)。さらに進んだ研究においても、体重は化学療法、放射線療法、ホルモン療法の施行の影響を受けることが明らかにされている。発癌物質への曝露から2ヵ月後、MRN-100の補給により体重減少に対する防護が得られ、それが8ヶ月間継続したことは興味深い。

胃癌および食道癌は両組織の上皮内壁を破壊する慢性炎症から生じると考えられている。炎症組織で生成されるスーパーオキシドアニオン、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素種はDNA損傷を引き起こし、腫瘍の発生の一因となる (Ohshima and Bartsch, 1994)。肺炎症のメディエータ産生および発癌機序の開始または促進におけるROSおよび酸化ストレスの役割についてはすでに十分確立されている (Valavanidis et al, 2013)。他の研究では胃腺癌を引き起こす胃粘膜の慢性活動性炎症を誘発するROSおよび活性窒素種 (RNS) の産生をヘリコバクター・ピロリが亢進することが示唆されている (Correa, 2006; Farinati et al, 2008; Handa et al, 2011)。

本研究の結果は胃癌の増殖が酸素由来フリーラジカルの蓄積、顕著なMDA濃度の上昇、GSH量ならびに抗酸化酵素SOD、CAT、GSH-Pxの著しい減少と関連があることを示している。この知見は腫瘍担持動物を用いた他の研究と一致するものである (Wong et al,

2001; Badr El-Din, 2004; Gupta et al, 2004)。Bader Eldin et alの研究ではエールリッヒ腹水腫瘍担持マウスの血液中でグルタチオン酸化還元 (GSH/GSSG) の顕著な低下が認められたが、これは主として酸化ストレスの結果として生じた血中GSSG濃度の上昇が原因であった (Badr El-Din, 2004)。同様の結果が胃癌 (Bakan et al, 2002)、喉頭癌 (Samir and el Kholy, 1999; Seven, 1999)、その他の種類の悪性腫瘍 (Cameron et al, 2003; Huang and Sheu, 1999; de Cavanagh et al, 2002) の患者でも確認された。

MRN-100がMNNG誘発性胃癌および食道癌を阻止する機序は、MRN-100が強力な抗酸化剤として機能する能力に起因すると考えることができる。MRN-100の投与により腫瘍担持ラットにおいて抗酸化活性のさまざまなパラメータが維持され、非投与対照ラットの範囲内になった。これらのパラメータはMDA濃度、GSH量、抗酸化酵素、総抗酸化能などである。MRN-100は酸化ストレスのバイオマーカーである脂質過酸化反応 (LPx) および総フリーラジカルを低下させた。MRN-100の抗酸化剤としての役割はラットを用いた加齢によるROSのモデルでも確認されている。高齢ラットにMRN-100を投与したところ、脂質過酸化反応およびフリーラジカル濃度の低下を伴う、GSHおよび抗酸化酵素の濃度上昇が認められた (Badr El-Din et al, 2010)。

HydroFerrate 溶液 MRN-100 はファイトシンから分離された 2 価および 3 価の鉄酸塩からなる鉄分を基礎とする飲料である。ファイトシンは鉄分および中性脂肪化合物を含む植物抽出物であり、一般にコメ、コムギ、ハツカダイコン種子に認められる。MRN-100 は胃および食道における異形成ならびに扁平上皮細胞癌および胃腺癌の程度を軽減したように思われる。鉄は酸化ストレスに対する防護能を有することから、MRN-100 は細胞中遊離鉄濃度の調節を介して (Badr El-Din et al, 2010)、組織への酸化ストレス損傷を防止するという機序により、その効果を発揮する可能性がある (Latifi et al, 2005; Udipi et al, 1992; Balla et al, 1992)。また、MRN-100 はフェリチンやトランスフェリンのような鉄結合化合物の蛋白質濃度の上昇を刺激することにより、過剰な鉄分がフェントン反応に関与しないよう阻害することにより、効果を発揮する可能性がある。このプロセスでは蛋白質の金属触媒酸化の主要産物である蛋白質カルボニル基の

ような反応性ラジカルの蓄積が妨げられる (Badr El-Din et al, 2010)。GSHは主として内因性抗酸化系としてのその重要な役割により、新生物形成プロセスの強力な阻害剤として知られている (Sinclair et al, 1990)。SOD、CAT、GPxはスーパーオキシドおよび過酸化水素の除去に関与している。SODはスーパーオキシドの H_2O_2 への還元を触媒し、 H_2O_2 はGPxまたはCATにより排除される必要がある (Rushmore and Picket, 1993)。

MRN-100による免疫調節作用は、MRN-100がMNNG投与ラットにおいて胃癌および食道癌の増殖を抑制するもう一つの機序を示している可能性がある。MRN-100を健康な被験者と癌患者に経口投与したところ、ナチュラルキラー (NK) 細胞の活性亢進が認められたが、これはMRN-100投与から1ヵ月後に検出された (Ghoneum and Kijima, 1996; Ghoneum et al, 1997; Ghoneum, 1998)。NK細胞は癌およびウイルス感染細胞に対する初期宿主防御において重要な役割を果たすことがわかっている (Whiteside and Herberman, 1995; Badr El-Din et al, 2008; Ames and Murphy, 2013)。

MRN-100の生体安全性については、ラットへの投与 (33週間) による研究が行われたが、ラットの行動、体重、生存率に識別可能な変化は認められなかった。さらに、MRN-100を最高10ヵ月間経口投与された癌患者ではNK細胞活性の亢進が認められた (Ghoneum and Kijima, 1996; Ghoneum et al, 1997; Ghoneum, 1998)。

結論：ラットにおける異形成および胃癌または食道癌に対する著しい防護から実証されるように、MRN-100は顕著な癌化学予防効果を示した。本研究はMRN-100が胃癌または食道癌の治療において有効な補助療法となりうる可能性を示唆している。

謝辞

本研究は株式会社エー・シー・エム ファーマセティカル (日本 東京) の支援を受けた。

参考文献

- 1- de Martel C, Forman D, Plummer M, PhD. Gastric Cancer : Epidemiology and Risk Factors Gastroenterology Clinics of North America, 42 (2), 2013, 219–240.
- 2- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/, based on November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2013.
- 3-Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic gastroesophageal reflux disease as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 1999;340:825–31.
- 4- Camilleri M, Dubois D, Coulie B, Jones M, Kahrilas PJ, Rentz AM, Sonnenberg A, Stanghellini V, Stewart WF, Tack J, Talley NJ, Whitehead W, Revicki DA. Prevalence and socioeconomic impact of upper gastrointestinal disorders in the United States: results of the US Upper Gastrointestinal Study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3(6):543-52.
- 5- Yakirevich E, Resnick MB. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions Gastroenterology Clinics of North America. 2013; 42, 261–284.
- 6- Blakely AM, Miner TJ. Surgical Considerations in the Treatment of Gastric Cancer. Pages 337-357, 2013.
- 7-Tan VP, Wong BC. Gastric cancer chemoprevention: the current evidence. *Gastroenterol Clin North Am.* 2013;42(2):299-316.
- 8- Bathaie SZ, Miri H, Mohagheghi MA, Mokhtari-Dizaji M, Shahbazfar AA, Hasanzadeh H. Saffron aqueous extract inhibits the chemically-induced gastric cancer progression in the Wistar Albino rat. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(1):27-38.
9. Badr El-Din NK, Noaman E, EL-Banna SM et al. Reversal of age-associated oxidative stress in rats by MRN-100, a hydro-ferrate fluid. *In Vivo* 2010;24:525–34.
10. Ghoneum M, Elbaghdady HA, El-Shebly AA, Pan D, Assanah E, Lawson G. Protective effect of hydroferrate fluid, MRN-100, against lethality and hematopoietic tissue damage in γ -

radiated Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Radiat Res*. 2013;54(5):852-62. doi: 10.1093/jrr/rrt029. Epub 2013 Apr 14.

11. Ghoneum M, Shaheen M. MRN-100, an Iron-based Compound, Possesses Anti-HIV Activity In Vitro. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2010;7(4):427-32. doi: 0.1093/ecam/nen019. Epub 2008 Mar 20

12- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T and Mori M: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 135: 372-376, 1979.

13- Beutler E, Duron O and Kelly BM: Improved method of the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 61: 882-888, 1963.

14- Minami M and Yoshikawa HA: Simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* 92: 337-342, 1979.

15- Luck H: Catalase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HW (ed.). New York: Academic Press, pp. 885-894, 1963.

15- Lawrence RA, Sunde RA, Schwartz GL and Hoekstra WG: Glutathione peroxidase activity in rat lens and other tissues in relation to dietary selenium intake. *Exp Eye Res* 18: 563-569, 1974.

17- Miranda KM, Espey MG and Wink DAA: Rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5: 62-71, 2001.

18- Ellman GL: Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77, 1959.

19- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Anh B-W, Shaltiel S and Stadtman ER: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 186: 464-478, 1990.

20- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951

21- Heckly RJ: Free Radicals in Dry Biological Systems. In: *Free Radicals in Biology*, vol. 2. Pryor WA (ed.). New York: Academic Press, pp. 135-158, 1976.

22- Pascual EC, Goodman BA and Yeretizian C: Characterization of free radicals in soluble coffee by ESR. *J Agric Food Chem* 50: 6114-6122, 2002

- 23-Huggett MT, Ghaneh P, Pereira SP. Drainage and bypass procedures for palliation of malignant diseases of the upper gastrointestinal tract. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010;22(9):755-63.
- 24- Spina R, Chu SY, Chatfield M, Chen J, Tin MM, Boyer M. Outcomes of chemoradiation for patients with locally advanced non-small-cell lung cancer. *Intern Med J*. 2013;43(7):790-7.
- 25- Levin J, Conley CL. Thrombocytosis associated with malignant disease. *Archives of Internal Medicine*. 1964;114:497–500.
- 26- Vannella L, Lahner E, Osborn J, Annibale B. Systematic review: gastric cancer incidence in pernicious anaemia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;37(4):375-82.
- 27- Varlotto J, Stevenson MA. Anemia, tumor hypoxemia, and the cancer patient. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 ;1;63(1):25-36.
- 28- Crawford J, Kosmidis PA, Hirsch FR, Langer CJ. Targeting anemia in patients with lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006;1(7):716-25.
- 29- Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas and lymphomas. *Cancer Res* 2009; 69: 5383–5391.
- 30- Sasaki K, Kawai K, Tsuno NH, Sunami E, Kitayama J. Impact of preoperative thrombocytosis on the survival of patients with primary colorectal cancer. *World J Surg*. 2012 ;36(1):192-200.
- 31- Haddad LB, Laufer MR. Thrombocytosis associated with malignant ovarian lesions within a pediatric/adolescent population. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2008 ;21(5):243-6.
- 32- Stone RL, Nick AM, McNeish IA, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2012;366(7):610–618
- 33- Maráz A, Furák J, Varga Z, Kahán Z, Tiszlavicz L, Hideghéty K. Thrombocytosis has a negative prognostic value in lung cancer. *Anticancer Res*. 2013 ;33(4):1725-9.
- 34- H. Ohshima, H. Bartsch, Chronic infections and inflammatory process as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis, *Mutat. Res*. 305 (1994) 253–264.

- 35- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(9):3886-907.
- 36- Correa P. Does *Helicobacter pylori* cause gastric cancer via oxidative stress? *Biol Chem*. 2006;387(4):361-4.
- 37- Farinati F, Cardin R, Cassaro M, Bortolami M, Nitti D, Tieppo C, Zaninotto G, Rugge M. *Helicobacter pylori*, inflammation, oxidative damage and gastric cancer: a morphological, biological and molecular pathway. *Eur J Cancer Prev*. 2008;17(3):195-200.
- 38- Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of *Helicobacter pylori*. *Redox Rep*. 2011;16(1):1-7
- 39- Wong HK, Riondel J, Ducros V, Ballester B, Mathieu J, Favier A. Effects of selenium supplementation on malignant lymphoproliferative pathologies associated with OF1 mouse ageing. *Anticancer Res*. 2001;21(1A):393-402.
- 40- N.K. Badr El-Din, Protective role of sanumgerman against-cirradiation induced oxidative stress in Ehrlich carcinomabearing mice, *Biochem. Stud. Nutr. Res*. 24 (2004) 271–291.
- 41- M. Gupta, U.K. Mazumder, R.S. Kumar, T.S. Kumar, Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice, *Acta Pharmacol. Sin*. 25 (8) (2004) 1070–1076.
- 42- E. Bakan, S. Taysi, M.F. Polat, S. Dalga, Z. Umudum, N. Bakan, M. Gumus, Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer, *Jpn. J. Clin. Oncol*. 32 (5) (2002) 162–166.
- 43- M. Samir, N.M. el Kholy, Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer, *Clin. Otolaryngol*. 24 (1999) 232–234.
- 44- A. Seven, S. Civelek, E. Inci, N. Korkut, G. Burc_ak, Evaluation of oxidative stress parameters in blood of patients with laryngeal carcinoma, *Clin. Biochem*. 32 (1999) 369–373.
- 45- I.L. Cameron, J. Munoz, C.J. Barnes, W.E. Hardman, High dietary level of synthetic vitamin E on lipid peroxidation, membrane fatty acid composition and cytotoxicity in breast cancer xenograft and in mouse host tissue, *Cancer Cell Int*. 3 (1) (2003) 3–10.

- 46- Y.L. Huang, J.Y. Sheu, T.H. Lin, Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer, *Clin. Biochem.* 1999; 32, 131–136.
- 47- E.M. de Cavanagh, A.E. Honegger, E. Hofer, R.H. Bordenave, E.O. Bullorsky, N.A. Chasseing, C. Fraga, Higher oxidation and lower antioxidant levels in peripheral blood plasma and bone marrow plasma from advanced cancer patients, *Cancer* 2002;94 (12) 3247–3251.
- 48- Latifi A, Jeanjean R, Lemeille S et al. Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 2005;187:6596–8.
- 49- Udipi S, Ghugre P, Gokhale C. Iron, Oxidative Stress and Health. In: Lushchak V, Semchyshyn HM (eds). *Oxidative Stress Molecular Mechanisms and biological effects*. Open Access: INTECH, 2012, 147–8.
- 50- Balla G, Jacob HS, Balla J et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992;267:18148–53.
- 51- A.J. Sinclair, A.H. Barnett, J. Lunie, Free radical and autooxidant systems in health and disease, *Br. J. Hosp. Med.* 43 (1990) 334–344.
- 52- T.H. Rushmore, C.D. Picket, Glutathione-S-transferase, structure, regulation, and therapeutic implication, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 11475–11478.
- 53- Ghoneum M, Kijima Y. Induction of human natural killer (NK) cell activity by pi-water (MRN-100). Annual Conference on Clinical Immunology, New Orleans, LA, 1996.
- 54- Ghoneum M, Namatalla G, Kijima Y. Phenotypic analysis of human lymphocyte sub-populations post treatment with pi-water (MRN-100). In: Abstracts and Proceedings of the Eighty-eighth Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, San Diego, CA, 1997.
- 55- Ghoneum M. NK immunorestitution in cancer patients by MRN-100, an iron based compound derived from bivalent and trivalent ferrate. Fourth International Symposium on Predictive Oncology and Therapy, Nice, France, 1998.
- 56- Whiteside TL, Herberman RB. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol.* 1995 Oct;7(5):704-10
- 57- Van De Velde AL, Anguille S, Berneman ZN. Immunotherapy in leukaemia. *Acta Clin Belg.* 2012;67(6):399-402

58-Badr El-Din NK, Noaman E, Ghoneum M. In vivo tumor inhibitory effects of nutritional rice bran supplement MGN-3/Biobran on Ehrlich carcinoma-bearing mice. Nutr Cancer. 2008;60(2):235-44

59-Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2013 Aug 30. [Epub ahead of print]

ダンピング

共同著者: Nariman Badr El-din: na_ri_eg@yahoo.com

Salma M. Abdel Fattah: salmaelbanna@gmail.com

Lucilene Tolentino: lftolentino@dhs.lacounty.gov

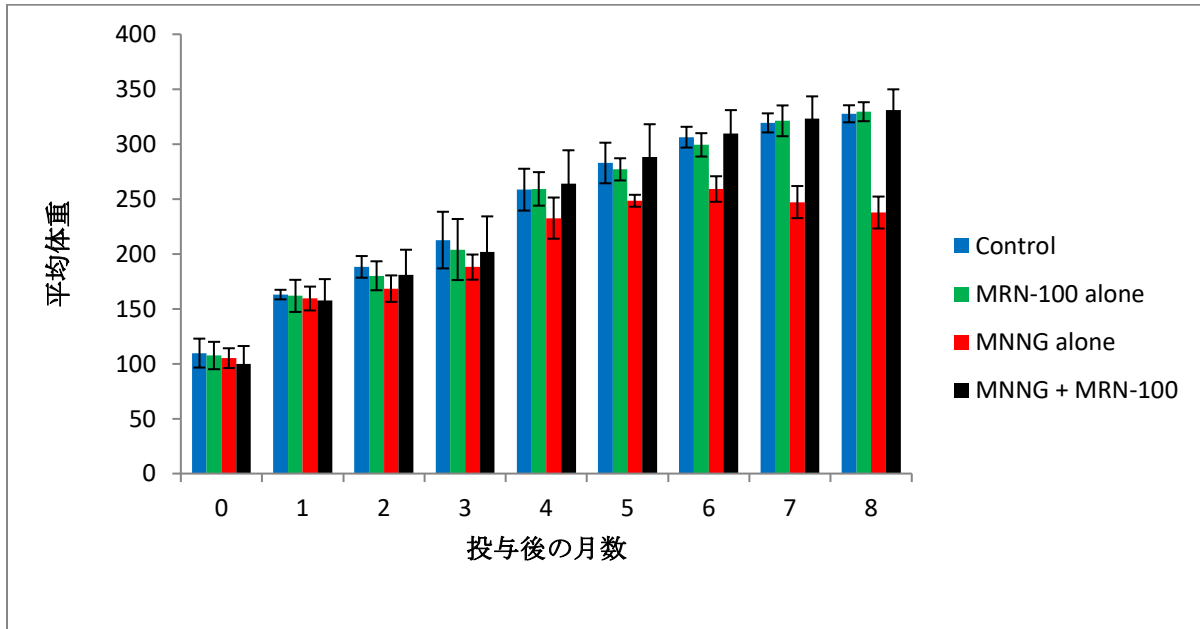


表 1- MRN-100 および/または MNNG 投与から 33 週間後の臓器重量 (g)

臓器	投与群			
	対照	MRN-100	MNNG	MNNG+ MRN-100
胃	1.73±0.042	1.71±0.043 (-0.81%)	1.69±0.117 (-2.03%)	1.76±0.052 (2.03%)
肝臓	7.53±0.360	7.02±0.065 (-6.81%)	4.86±0.202 ^{*,#,†} (-35.48%)	7.98±0.594 (5.93%)
脾臓	0.652±0.196	0.659±0.018 (1.07%)	0.360±0.339 ^{*,#,†} (-44.79%)	0.622±0.911 (-4.60%)

各数値はラット10匹/群の平均値 ± SEを示す。

*0.01の水準で対照群、MRN-100投与群と有意に差がある。

#0.01の水準でMRN-100投与群と有意に差がある。

†0.01の水準で MNNG + MRN-100投与群と有意に差がある。

(対照群の変化率[%])。

表2：MNNGを33週間投与したラットにおいてMRN-100が血液中のMDA濃度、総フリーラジカル濃度、GSH濃度、SOD濃度、CAT濃度、GSH-Px濃度、 γ -GT濃度、総抗酸化能に与える影響

パラメータ	対照	MRN-100	MNNG	MNNG+ MRN-100
MDA(nmol/gHb)	14.13±0.69	13.25±0.69 (-6.25%)	19.90±1.08**,,#,†† (40.80%)	12.37±0.59 (-12.5%)
総フリーラジカル (gx10 ¹⁷)	3.14±0.27	3.35±0.81 (6.94%)	3.35±0.719**,,#,†† (101.96%)	3.73±0.38 (23.67%)
GSH(μM/Hb)	78.70±4.35	81.59±2.66 (3.67%)	55.00±0.30**,,#,†† (-30.11%)	67.71±2.95*,,# (-13.96%)
SOD(U/gHb)	64.37±1.58	64.08±3.23 (-0.45%)	35.32±2.21**,,#,†† (-45.13%)	58.12±3.04 (-9.71%)
CAT(U/gHb)	314.00±3.80	313.20±6.95 (-0.25%)	207.12±4.38**,,#,†† (-34.04%)	280.34±15.77*,,# (-10.72%)
GPx(U/gHb)	30.24±2.34	30.92±1.18 (2.23%)	15.70±1.96**,,#,†† (-48.09%)	26.25±1.09 (-13.20%)
総抗酸化能 (mM/L)	2.35±0.11	2.36±0.15 (0.25%)	0.70±0.15**,,#,†† (-70.35%)	1.94±0.10*,,# (-17.59%)
γ GT				

各数値はラット6匹/群の平均値± SEを示す。

*& **それぞれ0.05、0.01の水準で対照群と有意に差がある。

#& #それぞれ0.05、0.01の水準でMRN-100投与群と有意に差がある。

† † 0.01の水準でMNNG + MRN-100投与群と有意に差がある。

(対照群の変化率[%])。

表 3 - MRN-100 および/または MNNG 投与中の体重変化 (g)

時間 (月)	第 1 群	第 2 群	第 3 群	第 4 群
0	109.7±13.18	107.5±12.46 (-2.01%)	105.1±9.01 (-4.19%)	100±16.15 (-8.84%)
1	163.0±4.34	161.8±14.62 (-0.74%)	159.4±10.86 (-2.21%)	157.5±19.56 (-3.37%)
2	188.2±19.87	180.1±13.20 (-4.3%)	168.4±12.04* (-10.52%)	181±22.82 (-3.83%)
3	212.6±25.79	204.0±27.81 (-4.05%)	188.0±11.46* (-11.57%)	202.0±32.19 (-5.93%)
4	258.5±19.06	259.2±15.27 (0.27%)	232.6±18.76* ^{###,††} (-10.02%)	264.1±30.28 (2.17%)
5	282.8±18.48	277.0±10.10 (-2.05%)	248.4±5.44* ^{###,††} (-12.16%)	288.5±29.59 (2.02%)
6	306.3±9.46	299.3±10.64 (-2.29%)	259.1±11.63* ^{###,††} (-15.41%)	309.6±21.34 (1.08%)
7	319.3±8.69	321.2±14.02 (0.60%)	247.2±14.62* ^{###,††} (-22.58%)	323.1±20.37 (1.19%)
8	327.6±7.76	329.5±8.64420 (0.58%)	237.7±14.53* ^{###,††} (-27.44%)	331±18.87 (1.04%)

各数値はラット10匹/群の平均値±SDを示す。

*0.05の水準で対照群、MRN-100投与群と有意に差がある。

**0.01の水準で対照群、MRN-100投与群と有意に差がある。

##0.01の水準でMRN-100投与群と有意に差がある。

††0.01の水準で MNNG + MRN-100投与群と有意に差がある。

(対照群の変化率[%])

考察

本研究では異形成または胃癌/食道癌担持ラットにおいて、顕著な体重減少、貧血、リンパ球減少症、血小板増加症という4つの主要な特徴が認められた。これらのデータは癌患者で収集された同様のデータに一致している。体重減少は固形腫瘍の特徴であり、上部消化管癌 (Huggett et al, 2010) や肺癌の患者では診断時、著しい体重減少が認められる (Spina et al, 2013)。貧血は癌患者で非常に多く認められ (Levin and Conley, 1994)、胃癌 (Vannella et al, 2013)、前立腺癌 (Varlotta and Stevenson, 2005)、肺癌 (Crawford et al, 2006) などさまざまな種類の悪性腫瘍と関連している。リンパ球減少症は癌、肉腫、リンパ腫のようなさまざまな種類の癌悪性腫瘍において、患者の生存に関する予後因子となる可能性があることが報告されている (Ray-Coquard et al, 2009)。さらに進んだ研究では血小板数の増加は腫瘍の進行と相関関係にあることが証明され、血小板増加症は消化管 (Sasaki et al, 2012)、卵巣 (Haddad and Laufer, 2008; Stone et al, 2012)、肺の (Maráz et al, 2013) 悪性疾患患者において有用な指標となりうることが示唆されている。

癌患者における悪性度の指標であることに加え、貧血、血小板増加症、体重の発生率は化学療法、放射線療法、ホルモン療法の施行によっても上昇する。したがって、癌患者ではこれらの作用を補正する別の方法を見出すことが必要である。MRN-100を補給することにより、前記の変化に対する防護が得られることは興味深い。腫瘍担持ラットにおいて、発癌物質への曝露から2ヵ月以内に体重減少の阻止が確認され、8ヵ月後まで時間の経過とともに顕著になった。MRN-100投与ラットでは貧血は認められず、リンパ球数および血小板数は対照 (非投与) ラットの範囲内に維持された。また、われわれの最近の研究では、ナイルティラピアにMRN-100を投与することにより、赤血球系がγ線照射から防護されるという知見が得られている (Ghoneum et al, 2013)。

図 2. 食道組織の組織病理学的検査。

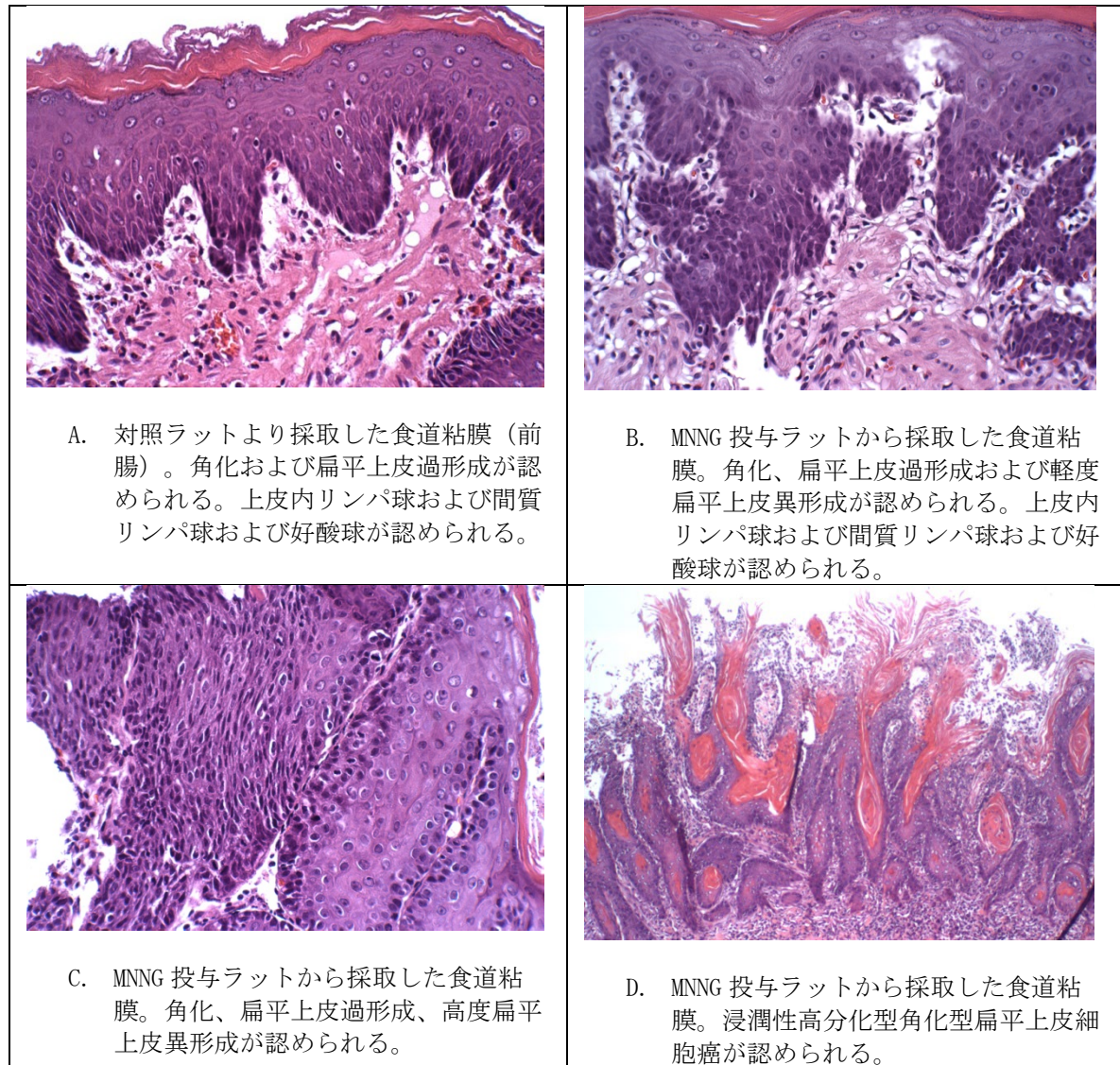
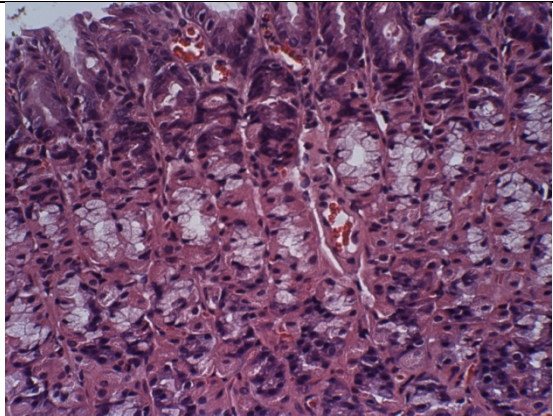
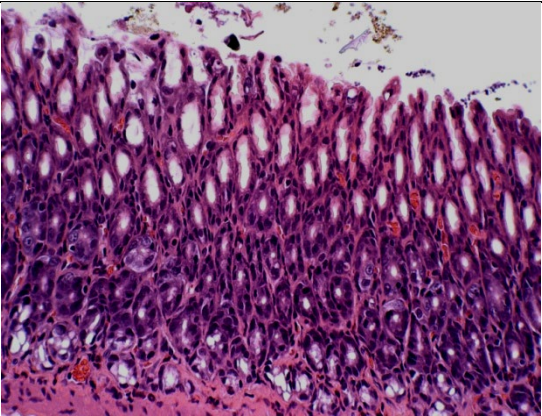
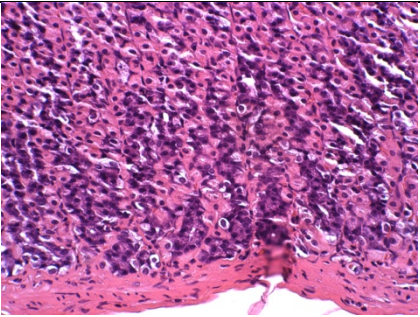


図 3. 胃組織の組織病理学的検査

	
<p>A. 対照ラットの胃体から採取した粘膜は正常範囲内にある。</p>	<p>B. 対照ラットの胃洞から採取した粘膜は正常範囲内にある。</p>
	 <p>D. MNNG 投与ラットから採取した胃粘膜に浸潤性高分化型角化型扁平上皮細胞癌が認められる。</p>

MRN-100 MRN-100は Fe^{2+} 鉄および Fe^{3+} 鉄の濃度を約 2×10^{-12} mol/Lとし、蒸留水で調製した。MRN-100はファイトシンから生成されるが、ファイトシンは鉄分および中性脂肪化合物を含む植物抽出物であり、コメ、コムギ、ハツカダイコン種子に認められる。まず始めに、1単位のファイトシンを100 mLの蒸留水に分散させ、塩化第二鉄を $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ として添加する。分液漏斗を用いて、液液抽出により脂肪化合物を除去する。残った液体を5番の濾過紙で濾過し、濾液を水浴で蒸発濃縮させる。MRN-100を生成するため、得られた鉄化合物に対し2価鉄酸塩と3価鉄酸塩について分別定量を行う (Ghoneum et al, 2013) [13、21]。簡潔に述べると、o-フェナントロリン法を用いてサンプルのFe (II)の量を測定する。ヒドロキシルアミン-HCl 10%溶液をサンプル液に添加し、事前にFe (III)をFe (II)に還元する。その後、すべての鉄酸塩の量を測定してから、Fe (III)の量を測定する。かくして、その結果、得られた鉄化合物は2価および3価の鉄酸塩であることがわかった。MRN-100は株式会社エイ・シー・エム (日本) が提供した。