

Hydroferrate 溶液 MRN-100 はウイスターラットにおける
化学物質誘発性胃癌および食道癌に対し防護

Mamdooh H. Ghoneum¹, Nariman K. Badr El-Din², Salma M. Abdel Fattah³, Deyu Pan⁴,
Lucilene Tolentino⁵

¹ チャールズ・ドリュー医科大学耳鼻咽喉科、1731 E. 120th Street, Los Angeles, CA 90059, USA. ² マンスーラ大学理学部動物学科、Mansoura 35516, Egypt. ³ エジプト国立放射線・技術センター薬物・放射線研究科、P. O. Box 29 Nasr City, Cairo, Egypt. ⁴ チャールズ・ドリュー医科大学内科、1731 E. 120th Street, Los Angeles, CA 90059, USA. ⁵ チャールズ・ドリュー医科大学病理学科、1731 E. 120th Street, Los Angeles, CA 90059, USA.

責任著者に関する情報：

Mamdooh H. Ghoneum 医学博士 住所:1731 E 120th Street, Los Angeles, CA 90059
Email: mghoneum@ucla.edu 電話番号:(310) 474-6724/(323) 562-5953
Fax: (310)474-6724

キーワード： hydroferrate、胃癌、異形成、抗酸化物質

抄録

本研究では発癌物質メチルニトロニトロソグアニジン (MNNG) 誘発性胃癌・食道癌に対する hydroferrate 溶液 MRN-100 の防護効果をラットで調査した。MRN-100 は 2 価および 3 価の鉄酸塩からなる鉄系化合物である。MNNG による処置後 33 週目にラットを殺処分し、胃・食道の組織病理、肝臓・脾臓・全身の重量、血液・胃組織中の抗酸化物質濃度を調査した。試験結果は、胃食道組織に異形成と癌を発生した割合が、発癌物質 MNNG による処置を受けたラットの場合 17/20 匹 (85%) であるのに対し、MNNG と MRN-100 による処置を受けたラットの場合 8/20 匹 (40%) であることを示すものであった。また MRN-100 は GSH および抗酸化酵素の SOD、CAT、GPx の濃度、総抗酸化能 (TAC) を上昇させることで血液および胃組織の両方で抗酸化作用を示した。同作用は総フリーラジカルおよびマロンジアルデヒドの濃度低下を伴うものであった。さらに MRN-100 は体重および臓器重量の減少に対する防護も示した。このように MRN-100 はラットで酸化障害から組織を防護することで癌に対する有意な化学的予防効果を示したが、それは胃・食道癌の治療における同溶液の補助剤としての有効性を示している可能性がある。

緒言

胃癌と食道癌は世界中で癌と関連した死亡の2つの主要な原因となっている(1)。米国では2014年に約40,000人が食道癌・胃癌と診断される見通しであるが、治療選択肢の進歩にもかかわらず、これら癌患者の5年生存率は依然として低く、それぞれ17%および27%である(1)。これらの癌は、いずれもヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) (2) または胃食道逆流症 (GERD) を原因とする慢性炎症が引き起こすと考えられている。食道癌と関連した炎症はGERDに誘発されると考えられている(3)。米国の成人集団の推定28%はGERD様症状を患っている(4)。この炎症は消化管表層における上皮細胞の萎縮と変容、または化生をもたらし、それが異形成とそれに続く癌病変をもたらす(2)。

胃・食道癌の最も有効な治療法は癌部位の外科的除去であるが、この治療法は進行期では多くの場合緩和的なものとなり、新しい病変の発生をもたらす原因となり得る慢性炎症に対応していない(5)。胃・食道癌の治療法として数種類の有力な予防療法、すなわち化学予防療法、抗炎症剤、ピロリ菌の根絶が検討されてきた。ただし臨床試験の数が不十分なため、これらのアプローチがヒトで有効であるという証拠はまだ不十分で(6)、食道・胃癌治療のための新しい予防剤に対する需要は依然として高い。

Hydroferrate 溶液のMRN-100はファイトシン由来の2価および3価の鉄酸塩からなる鉄系化合物である。MRN-100を対象とした先行する研究では、同溶液の加齢関連酸化ストレス(7)、 γ -放射線(8)、HIV活性(9)に対する防護剤としての可能性が示されている。本研究は、ラットでMRN-100の食道・胃癌抑制能力の有無を調べる予備研究である。結果は、MRN-100が酸化ストレスによる組織損傷に対する防護を含む機序により食道・胃における異形成および癌の広がりを抑制することを示すものである。

材料および方法

***N*-メチル-*N*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン (MNNG)** 発癌物質 MNNG (Sigma-Chemical、ミネソタ州セントルイス) を体重 1 kg 当たり 200mg の濃度で使用し、ラットに 2 週間にわたり毎日経口投与した。

Hydroferrate 溶液 (MRN-100) MRN-100 は蒸留水 (DW) を使用して Fe²⁺ および Fe³⁺ イオンの濃度が約 2×10^{-12} mol/l となるように準備した。MRN-100 はファイトシンと呼ばれる植物抽出液から得た。ファイトシンは鉄分および中性脂肪化合物を含み、大根種子、米、麦などの植物に含まれる。MRN-100 の抽出法は次のとおりである。ファイトシン (1 単位) を蒸留水 100mL で希釈した後、FeCl₃·6H₂O を添加する。続いて液液抽出法を使用して脂質化合物を除去する。その後濾紙 No. 5 を使用して残液を濾過する。濾過液を蒸発させ、水浴にて凝縮させる。MRN-100 を生成させるため、得られた鉄化合物を 2 価および 3 価の鉄酸塩に関し分別定量に付す。塩酸ヒドロキシルアミン (10%) を試料液に添加して Fe (III) を Fe (II) に還元する。o-フェナントロリン法を使用して Fe (II) の量を測定する。その後すべての鉄酸塩、および Fe (III) を定量する。最終的に得られた鉄系化合物は 2 価および 3 価の鉄酸塩である (8)。MRN-100 は株式会社エイ・シー・エムが提供した。

動物 本研究では雄のウィスターラット (4 カ月齢、体重 ~120 g を使用した。ラットは Research Institute of Ophthalmology (エジプト・ギザ) が提供し、実験開始前の 1 週間馴化させた。ラットは照明および温度コントロール (20 ± 2 °C) の下で 1 匹ずつ檻に入れ、標準的な実験動物用角ペレット (Misr Oil & Soap Company、エジプト・カイロ) を与えた。ペレットの成分は小麦粉 (80%)、ふすま (3.3%)、カゼイン (12.5%)、オリーブ油 (2.3%)、脂質 (1.0%)、ビタミン・塩類混合物 (0.2%)、d1-メチオニン (0.5%)、水分 (0.2%) である。総カロリーに占める割合はおよそタンパク質 (18%)、炭水化物 (73%)、脂質 (9%) である。動物に関するプロトコルはエジプト・マンスーラ大学の Guide for the Care and Use of Laboratory Animals を順守するものであった。

実験デザイン ラット 40 匹を無作為に次の 4 群に分けた。対照群 (発癌物質または MRN-100 による処置なし)、MRN-100 処置群 (MRN-100 による処置のみ)、MNNG 処置群 (発癌物質による処置のみ)、MNNG+MRN-100 処置群 (MRN-100 および発癌物質による処

置)。胃・食道癌を誘発する目的でラットに発癌物質のMNNGを体重1kg当たり200mgの用量にて1日1回、2週間にわたり強制経口投与し、その後NaCl（ラット1匹当たり1ml）を3日ごとに4週間にわたり経口投与した。化学物質による誘発と同時に、ラットにMRN-100を含まない水（第1群および第3群）またはMRN-100を含む水（第2群および第4群）を33週間にわたって投与した。さまざまな時間間隔で全動物の体重を測定した。実験期間（33週間）終了時に動物を殺処分し、以下の内容を調べた：食道および胃の組織における組織病理学的変化、肝臓および脾臓の重量変化、血液および胃組織における酸化還元状態。

試料採取と食道・胃組織準備 33週間後、動物を絶食させた後に頸椎脱臼により殺処分した。ヘパリン付きキャピラリーガラス管を使用して眼窩静脈叢を穿刺して血液試料を採取した。血液は総フリーラジカルの測定に使用した。溶血液は次のパラメーターの濃度測定に使用した：マロンジアルデヒド（MDA）、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）を含む内因性抗酸化酵素。また血漿を使用して総抗酸化能（TAC）を測定した。

胃の酸化還元を示すバイオマーカーと組織病理学的検査に関しては、胃を切除して大彎および小彎に沿って対称な2つの部分に切断した。1つの部分は酸化還元のバイオマーカーの評価を目的とし、Potter-Elvehjemホモジナイザーを使用して氷温のリン酸塩緩衝液（0.1 mol/l、pH 7.4）にて洗浄・均質化して10% w/vのホモジネートを準備した。もう一つの部分は組織病理学的検査を目的とし、食道組織とともに10%ホルムアルデヒドで固定した。

分析手順 脂質過酸化（LPx）の程度、GSH量、SOD・CAT・GPxの各活性度を赤血球と胃組織で調べた。LPxの程度はMDAの形成により確認して(10)の方法、GSH量は(11)の方法、SOD活性は(12)の方法、CAT活性は(13)の方法、GPx活性は(14)の方法、血漿および胃組織におけるTAC濃度はRandox総抗酸化能測定キット(英国)を使用して(15)の方法に従い、胃タンパク質量は(16)の方法で測定した。

電子スピン共鳴 (ESR) による血中総フリーラジカル検出 1979年にHecklyが記述した方法に従い血中総フリーラジカルの量を検出した(17)。試料は前述の方法(7、17)にて処理・測定した。

ESR データの分析 ESR 分析の初期段階の方法を記載の通り使用した(18)。飽和度を最初の派生物のトップおよびボトムポイント間の距離として測定し、磁場の関数として ESR 信号のピーク高さの変化をモニタリングした。フリーラジカル濃度の定量評価を次の方程式に従って実施した。

$$Nd = K [Ho (\Delta H)^2 A / 2] / [Hm \times Ge \sqrt{PH}]$$
、ただし Nd = ラジカルの数、 $K = 103/cm$ 、 Ho = ピーク磁場 (ガウス)、 ΔH = ピーク間の幅、 Hm = 変調場、 $PH = 1.008mW$ 、 Ge = 検出器の利得 = 3.17×10^5 、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

組織病理学的解析 MNNG への曝露から 33 週間後に胃および食道の組織の組織病理学的変化を調べた。ラット 36 匹のそれぞれから採取した 2 枚の組織切片を含むスライドを作成した(表 1)。組織は 10%ホルマリン溶液に固定し、カセットに入れて一晩固定した。各組織片の大きさは平均して $1.5 \times 0.3 \times 0.1$ cm であった。パラフィン包埋組織からマイクロトームで $4 \mu m$ の薄片を作成した。薄片組織をヘマトキシリン・エオジン (H&E) で染色し、光学顕微鏡で異形成および癌に関する検査を行った。また癌の発生率と癌性病変につき、各群におけるラット数のパーセントとして算出した。

統計解析 体重の値は平均 \pm SD、その他の値は平均 \pm SE として報告し、平均値間の差の有意性は一方向の分散分析 (ANOVA) とニューマン・コイルス多重比較検定の組み合わせにより判定した。さまざまな病理学的病変に対し、適宜フィッシャーの正確確率検定またはカイ二乗検定による評価を行った。 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした。

結果

異形成および癌の割合 4種類の処置条件におけるラットのH&E染色スライド36枚を光学顕微鏡下で調べ、異形成および癌の確認を行った(表1)。対照群およびMRN-100処置群で異形成または癌を発症したラットは1匹もいなかった。一方、発癌物質処置群と発癌物質+MRN-100群のラットでは異形成および癌が発生した。発癌物質のみの処置を受けたラットの100%(ラット9/9匹)で単一ないし複数(≥ 2)の病巣が示された。対照的に発癌物質+MRN-100による処置を受けたラットでは6/10匹(60%)のみが病巣を示した。また複数の病巣が示されたのはMRN-100による処置を受けたラットの10%(1/10匹)のみであったのに対し、発癌物質の群では33%(3/9匹)であった(表2)。

表1. 組織病理学検査スライド内訳

群	対照	MRN-100	発癌物質	発癌物質 + MRN-100
ラット数	7	9	10	10
スライド数(ラット1匹当たり1枚)	7	9	10	10
組織切片総数	14	18	20	20

食道組織 発癌物質処置群では、ラット10匹中9匹(90%)でさまざまな程度(軽度～重度)と範囲(上皮の長いセグメントを含む)扁平上皮の異形成が発生した。ラット10匹中1匹(10%)で食道の長いセグメントを含む扁平上皮細胞癌が発生した。一方、発癌物質+MRN-100処置群では発癌物質単独の処置を受けた群と比較して少ない数のラット、すなわち10匹中4匹(40%)で扁平上皮異形成が発生し、異形成の程度も低く範囲も狭かった。ラット10匹中1匹(10%)で扁平上皮癌が発生したが、罹患範囲は発癌物質処置群より狭いものであった(表2)。

表 2. 食道組織に扁平上皮異形成または扁平上皮癌の病巣を示したラットの割合

実験群	ラット 1 匹当たりの病巣数			異形成／癌を発症したラットの割合 (%)
	軽度異形成	重度異形成	扁平上皮細胞癌	
対照群	0	0	0	0%
MRN-100 群	0	0	0	0%
発癌物質群				
ラット#1	0	0	0	90%
ラット#3	10	2	3	
ラット#4	8	5	0	
ラット#2、5、6、7、8、9、10	1	0	0	
発癌物質+MRN-100 群				
ラット#5				40%
ラット#1、2、4	2	6	1	
ラット#3、6、7、8、9、10	1	0	0	
	0	0	0	

胃組織 発癌物質による処置を受けた群では、ラット 10 匹中 2 匹 (20%) で腺癌が発生した。またラット 10 匹中 6 匹 (60%) で粘膜腺過形成が観察された。粘膜腺過形成は慢性胃炎で見られる良性の生理学的変化である。対照的に発癌物質+MRN-100 による処置を受けた群で粘膜腺過形成、腺異形成、腺癌は観察されなかった (表 3)。

表 3. 胃組織に腺異形成および腺癌の病巣を示したラットの割合 (%)

実験群	ラット 1 匹当たりの病巣数		異形成／癌を示したラットの割合 (%)
	腺異形成	腺癌	
対照群	0	0	0%
MRN-100 群	0	0	0%
発癌物質群			
ラット#3	1	1	20%
ラット#4	1	1	
ラット#1、2、5、6、7、8、9、10	0	0	
発癌物質+MRN-100 群	0	0	0%

図1は発癌物質および発癌物質+MRN-100による処置に関する組織病理学的検査結果を要約したものである。発癌物質による処置を受けたラットは胃および食道(前腸)組織の17/20(85%)で異形成または癌が発生した。13/20(65%)で異形成が示され、4/20(20%)で癌が発生した。MRN-100の存在下で発癌物質による処置を受けたラットでは逆に異形成および癌の発生率(それぞれ7/20、35%および1/20、5%)が有意に低いものであった($p < 0.01$) (図1および表2)。

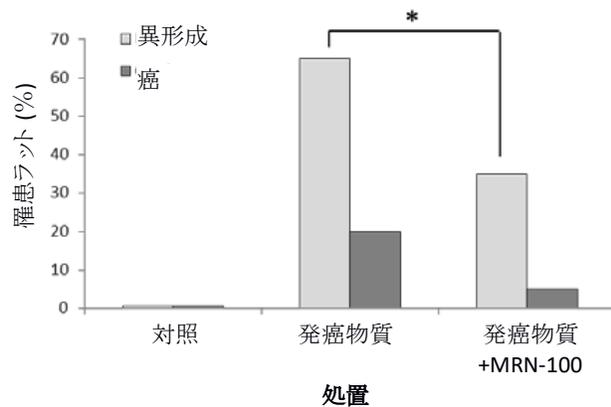


図1. 発癌物質 MNNG および MRN-100 投与後に異形成または癌が発生したラットの割合(%). ラットは MNNG 単独または MNNG+MRN-100 による処置を受け、処置 33 週後に異形成および癌の割合を調べた。対照群で扁平上皮異形成および癌は 1 例も検出されなかった。各群のラット数は 9~10 匹である。
*MNNG+MRN-100 群と比較して $p < 0.01$ 。

食道組織の組織病理学的検査 食道粘膜の H&E 染色組織における組織病理学的変化を調べた。非処置対照群のラットすべての扁平上皮が食道粘膜に過角化および扁平上皮過形成を示した(図 2A)。発癌物質による処置を受けたラットすべての扁平上皮が過角化と、軽度扁平上皮異形成のまだらな領域(図 2B)、および重度扁平上皮異形成(図 2C)を示した。さらに高分化型の角化扁平上皮癌が検出された(図 2D および E)。

胃組織の組織病理学的検査 非処置対照群のすべてのラットの胃体および幽門洞から採取した胃粘膜が正常範囲内であった(それぞれ図 2F および G)。対照組織で扁平上皮過形成、異形成、癌は観察されなかった。対照的に発癌物質による処置を受けたラットの胃粘膜は、過形成粘液腺および軽度扁平上皮異形成を示した(図 2H)。さらに浸潤

性腺癌が検出された(図 2I)。発癌物質+MRN-100 による処置を受けたラットの組織では逆に、7/20 の組織のみが軽度扁平上皮異形成のまだらで小さな領域を示した。従って MRN-100 が食道異形成および扁平上皮癌の範囲を抑制したと考えられる。胃異形成および腺癌についても同様の結果が観察された。

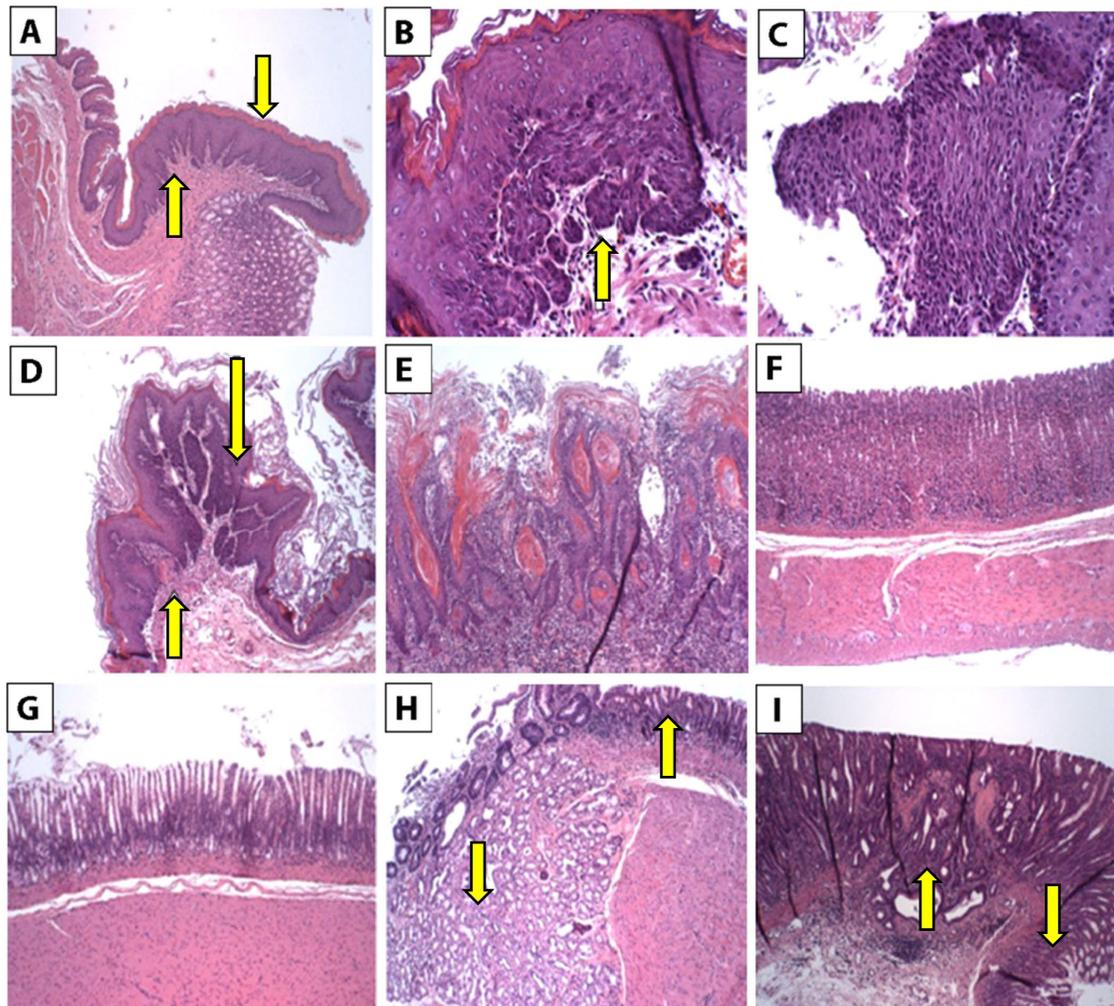


図 2. 食道および胃組織の H&E 組織病理学的染色。異形成および癌の病巣はまだらで、組織切片の 1~2mm に及ぶものであった。(A) 対照ラットの食道組織切片。過角化(下向き矢印)と扁平上皮過形成(上向き矢印)が見られる(2X)。(B-E)発癌物質による処置を受けたラットから採取した食道粘膜の切片。(B)軽度扁平上皮異形成の病巣を示す食道の切片(上向き矢印)(10X)。(C)重度扁平上皮異形成を示す食道の切片(10X)。(D)軽度、中等度、重度の扁平上皮異形成の病巣(下向き矢印)および扁平上皮細胞癌の病巣(上向き矢印)を示す食道切片(4X)。(E)浸潤性高分化型角化扁平上皮癌を示す食道切片(10X)。(F)対照ラットの胃体切片(4X)。(G)対照ラットの胃幽門洞切片(4X)。(H, I)発癌物質による処置を受けたラットの胃組織切片。(H)軽度腺異形成(上向き矢印)および過形成粘液腺(下向き矢印)を示す幽門洞領域の切片(4X)。(I)高度の腺異形成(下向き矢印)および浸潤性腺癌(上向き矢印)を示す胃体切片(4X)。

体重変化 図3は体重変化を示す。発癌物質のみによる処置は早期の体重減少をもたらし、同変化は2カ月目に検出され、5カ月目に有意なものとなった ($p < 0.01$)。発癌物質+MRN-100による処置を受けたラットは対照的に、発癌物質による処置を原因とする体重減少を経験しなかった。

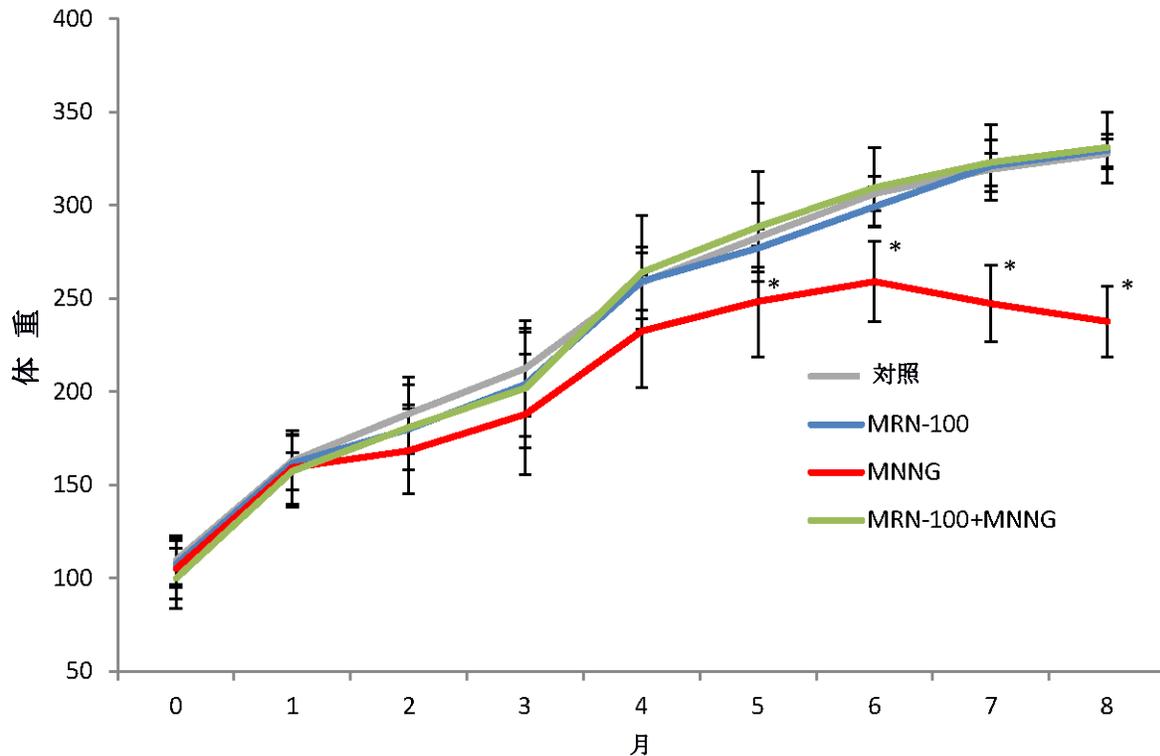


図3. 処置条件ごとの体重変化。ラットにはMRN-100の存在下および不在下で発癌物質MNNGを投与した。33週間にわたり毎月、4群の動物の体重変化を調べた。*対照およびMRN-100+MNNG群と比較して $p < 0.01$ 。棒はそれぞれ群当たり10匹のラットの平均±SDを表す。

臓器の重量変化 33週目における肝臓と脾臓の重量変化の結果を図4に示した。対照群と比較して腫瘍を持つラットは肝臓(35%)および脾臓(45%)の重量が有意に減少した。肝臓重量の減少率は体重の減少率とほぼ同等であったのに対し、脾臓重量は有意に大きな減少を示した。対照的にMRN-100による処置を受けたラットは対照群と同等の臓器重量を示した。

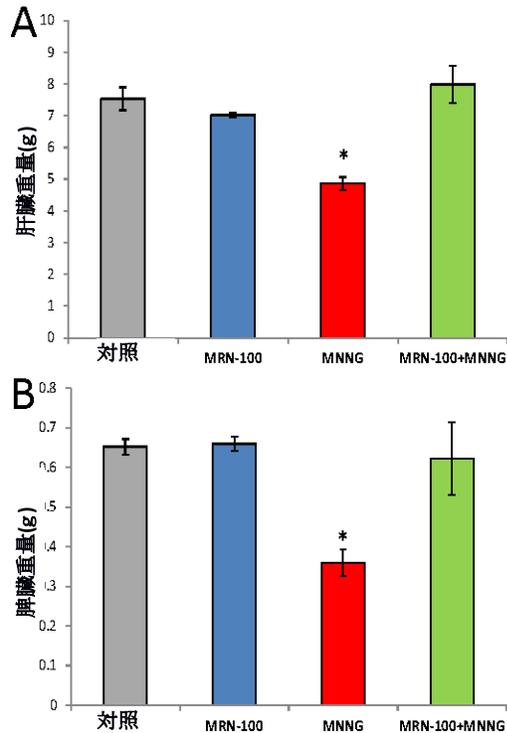


図 4. 肝臓および脾臓の重量変化。33 週間にわたり MRN-100 の存在下および不在下でラットに発癌物質 MNNG を投与し、肝臓(A)および脾臓(B)の重量変化を調べた。*対照群およびその他の群と 0.01 の水準で有意差。棒はそれぞれ群当たり 10 匹のラットの平均± SD を表す。

抗酸化作用

血液で抗酸化作用を調べた。MDA、GSH、抗酸化酵素の濃度は赤血球で測定したのに対し、TAC 濃度は血漿で測定した。これらのパラメーターは胃組織でも調査した。

MDA 濃度 図 5 のデータは、発癌物質による処置を受けた群で血中および胃の MDA 濃度が対照ラットと比較してそれぞれ 40.8%および 55.8%と顕著に上昇したことを示している ($p < 0.01$)。対照的に MRN-100 による処置はいずれの組織においても、MNNG 誘発 MDA 値上昇に対する防護を提供した。

GSH濃度 データはMNNGによる処理を受けたラットが、対照群と比較して血中GSH(-30.1%)および胃GSH(-39.9%)が有意に減少した($p < 0.01$)ことを示している。一方、これらの組織におけるGSH含有量の減少は、MRN-100による処置後ほとんど防ぐことができた(図5)。

抗酸化酵素 発癌物質MNNGは抗酸化酵素の血液(SOD: -45.1%、CAT:-34.0%、GPx:-48.1%)および胃組織(SOD: -69.8%、CAT:-34.0%、GPx: -36.2%)における濃度を、非処置対照ラットと比較して激減させた($p < 0.01$)。対照的にMRN-100の補充は血液および胃組織における抗酸化酵素の濃度を、ほぼ正常値に達するまで顕著に上昇させた(図5)。

総抗酸化能 (TAC) レベル MNNGおよびMRN-100による処置後のTACレベルの測定結果を(図5)に表した。MNNGによる処置は血液(-70.4%- $p < 0.01$)および胃組織(-70.7% ($p < 0.01$))におけるTACレベルの対照ラットと比較した減少をもたらした。しかしMRN-100による処置は両組織におけるTACレベルの低下を抑制した。

総フリーラジカル(TFR)量 フリーラジカルの総量をESRにより全血で測定した(図6AおよびB)。フリーラジカル濃度の定量評価を実施し、平均値間の差の有意性を判定した。MNNGによる処置を受けたラットは非処置ラットと比較してTFRの顕著な増大を示した。しかしMRN-100による処置で同値は正常範囲内となった。

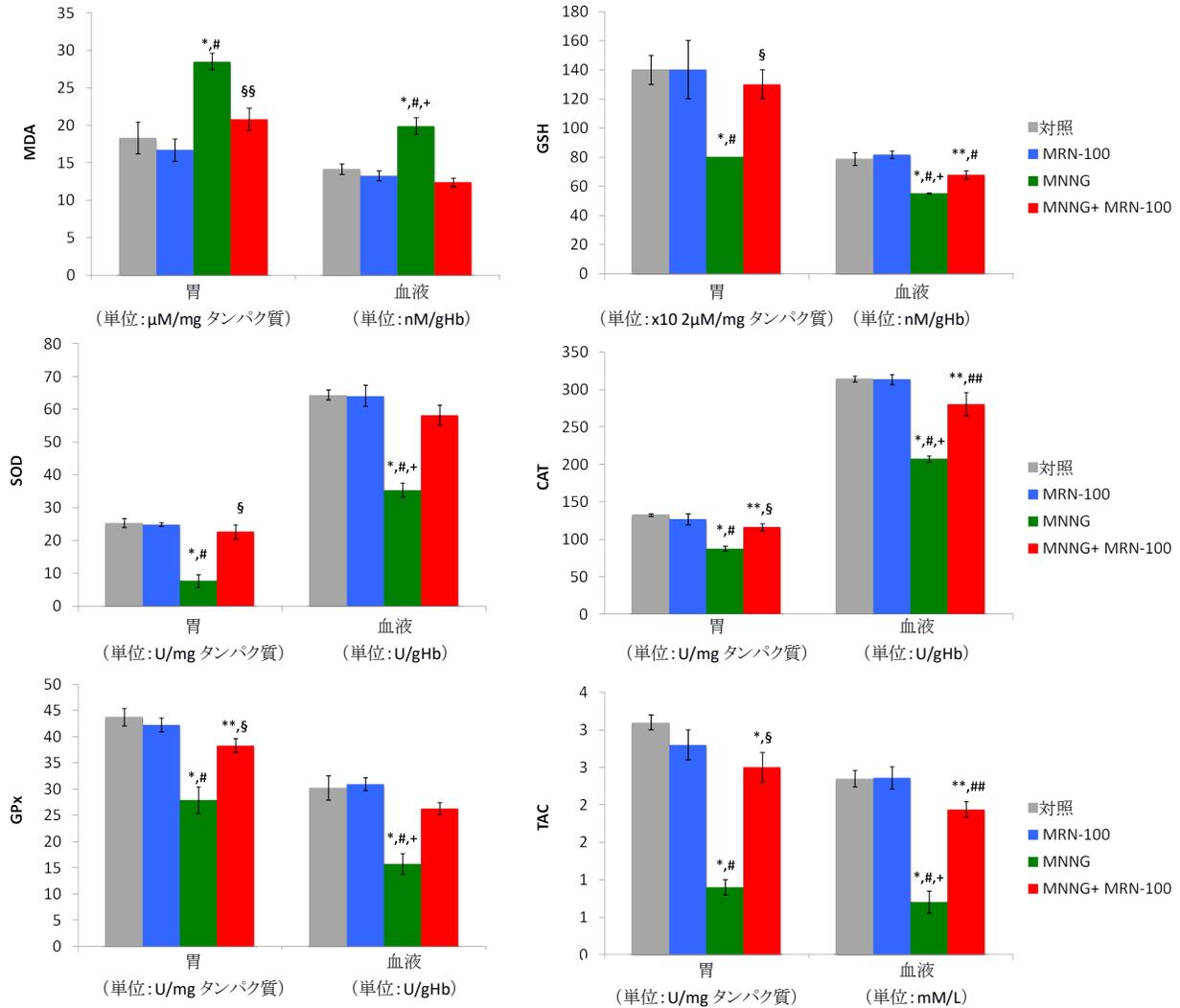


図5. 胃および血中MDA、GSH、SOD、CAT、GSH-Px、TACに対する発癌物質MNNG単独およびMNNG+MRN-100による33週間にわたる処置。各値は1群当たり6匹の平均±SEを表す。**および* それぞれ0.05、0.01の水準で対照群と有意差。##および# それぞれ0.05、0.01の水準でMRN-100群と有意差。§ §および§ それぞれ0.05、0.01の水準でMNNG群と有意差。+ 0.01の水準でMNNG+MRN-100群と有意差。

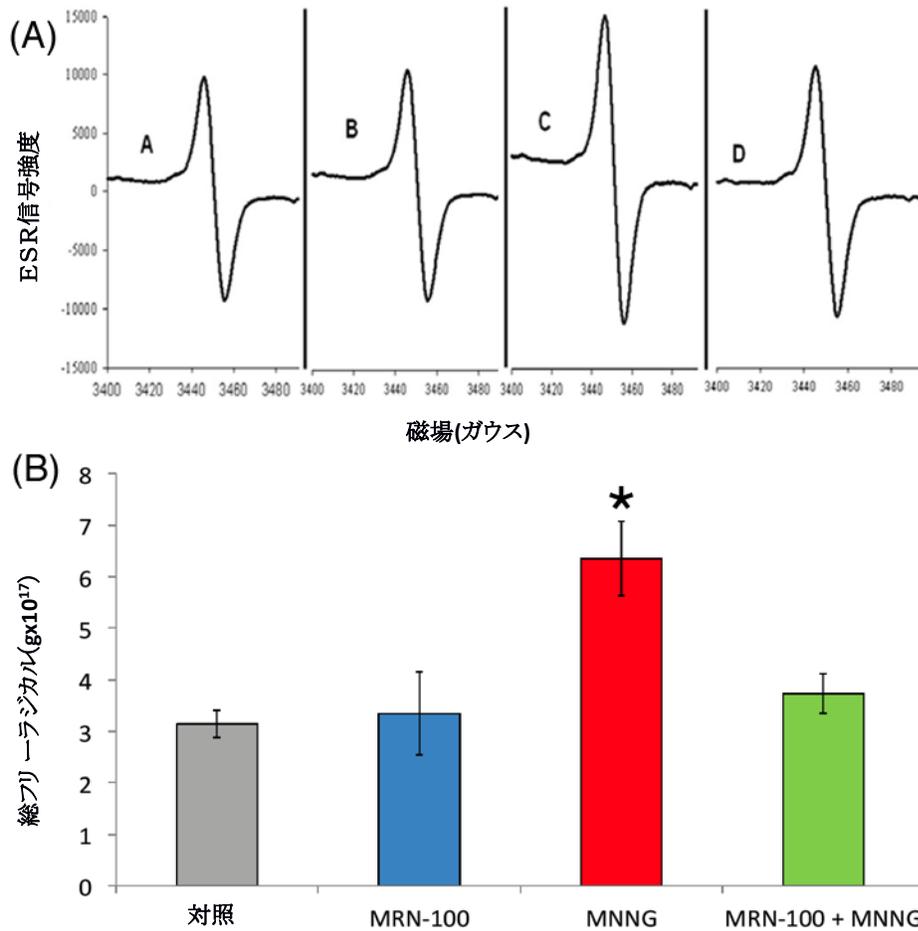


図6. MNNGまたはMNNG+MRN-100による処置を33週間にわたり受けたラットの血中総フリーラジカル。(A)凍結乾燥した血液試料のESRスペクトルにより総フリーラジカル量を分析した。(B)処置条件別のラットにおける総フリーラジカル量。* $p < 0.01$ の水準で対照群およびその他の群と有意差。棒はそれぞれ群当たり6匹のラットの平均 \pm SEを表す。

考察

胃・食道癌の予防的および防護的治療選択肢は限られ、この疾患と有効に戦うための新しい製品が求められている。本試験では異形成および癌を罹患したラット数の有意な減少が示すように、ラットにおける胃・食道癌の増殖を抑制する MRN-100 の有効性が明らかにされた。MRN-100 による処置は異形成 (35%) および癌 (5%) の発生率を、発癌物質単独の処置の場合 (それぞれ 65% および 20%) と比較して減少させることを示した (図 2)。この減少は上皮における長いセグメントの罹患不在と、異形成の各段階における病巣数の顕著な減少を伴うものであった。

本試験の結果はまた胃・食道癌を罹患したラットにおける有意な体重減少を示した。これらのデータは胃食道癌患者が有意な体重減少を示すという最近の研究結果 (19, 20) と一致するものである。特筆すべきこととして、発癌物質による処置を受けた動物で MRN-100 の補充が体重減少に対する有意な防護を提供した。

本試験の結果は胃癌の増殖が、酸素由来のフリーラジカル蓄積、MDA 濃度の顕著な上昇、GSH 量と抗酸化酵素の有意な減少と関連していることを示した。この観察結果は担癌動物を対象としたほかの試験と一致するものである (21, 22)。エールリッヒ腹水癌を担癌したマウスの血液で、癌が増殖する際にグルタチオンの酸化還元 (GSH/GSSG) が減少し、その原因は血中 GSSG の増加と考えられた。この減少は赤血球内における GSH 酸化をもたらす腫瘍細胞の過酸化産物増加と、それに続くさまざまな組織から血液に向けた GSSG 放出が原因となっている (22)。同様の結果が胃癌 (23) および喉頭癌 (24) の患者で発見されている。

活性酸素種 (ROS) の発生は脂質過酸化、DNA 変質、タンパク質変性をもたらす。ROS の濃度上昇は癌 (25, 26)、加齢 (27, 28)、糖尿病 (29) などの疾患の始まりに起因すると考えられている。我々が以前実施した試験では MRN-100 がラットで血液、肝臓、脳組織におけるタンパク質酸化、抗酸化状態、脂質過酸化の調整を通じ、加齢誘発 ROS から防護する可能性が示された (7)。本試験では MRN-100 が、発癌物質誘発胃・食道癌で有効な抗酸化剤としても機能することが示された。MRN-100 は血液および胃組織の抗酸化レベルにおける発癌物質誘発性障害に対する防護を示した。この作用は GSH および抗酸化酵素の濃度上昇と、それに伴う総フリーラジカルおよびマロンジアルデヒド濃度の

減少によって容易となった。MRN-100 による ROS の減少は、同剤がラットにおける胃・食道癌増殖を抑制する機序を表していると考えられる。

酸化ストレスから組織を防護する MRN-100 の能力は、細胞内の遊離鉄濃度の調節と関連している可能性があり (7)、その理由は鉄が酸化ストレスから防護することが判明しているからである (30, 31)。フェリチンおよびトランスフェリンなどの鉄結合性物質の濃度の MRN-100 による上昇が、フェントン反応に参加する鉄が過剰になることを防ぎ、結果的に反応性ラジカルの蓄積を防いでいる可能性がある (7)。本試験で我々は MRN-100 が、発癌物質による処置に起因する血液および胃組織における GSH 濃度の低下を防ぐことを観察した。この点が特に興味深いのは、GSH が腫瘍形成過程を阻害する内因性抗酸化系の主要な寄与因子だからである (32)。MRN-100 はさらに血液および胃組織における抗酸化酵素 SOD、CAT、GPx の減少を防いだ。超酸化物および過酸化水素のクリアランスはこれら抗酸化酵素の存在を必要とする (33)。

MRN-100 による免疫調節作用は、発癌物質が誘発する胃・食道癌の増殖を抑制する別の機序を示している可能性がある。先行する試験では健康な被験者と癌患者に対する MRN-100 の経口投与が、ナチュラルキラー (NK) 細胞活性の最長 12 カ月間の増強をもたらすことが示された (34-36)。NK 細胞は癌およびウイルス感染細胞に対する一次生体防御で重要な役割を果たすことが示されている (37-39)。

結論として MRN-100 は、ラットで異形成および胃・食道癌に対する有意な防護により証明される、癌の有意な化学的予防効果を示した。我々の試験は MRN-100 が胃癌または食道癌の治療に有効な補助剤となり得ることを示している。

謝辞

本試験は株式会社エイ・シー・エム (日本、東京) の補助金 # C0030300 (Ghoneum M) および NIH-NIMHD 補助金 U54MD007598 (前 U54RR026138) (Pan D) により支えられている。後援者は試験デザイン、データの収集・分析・解釈、原稿執筆、発表に向けた原稿の提出判断に一切関与していない。

参考文献

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Neyman N, et al.: 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, April 2013.
2. Yakirevich E and Resnick MB: Pathology of gastric cancer and its precursor lesions, *Gastroenterol Clin North Am.* **42**, 261-84, 2013.
3. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, and Nyrén O: Symptomatic gastroesophageal reflux disease as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med* **340**, 825–831, 1999.
4. Camilleri M, Dubois D, Coulie B, Jones M, Kahrilas PJ, et al.: Prevalence and socioeconomic impact of upper gastrointestinal disorders in the United States: results of the US Upper Gastrointestinal Study. *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**, 543-552, 2005.
5. Blakely AM and Miner TJ: Surgical considerations in the treatment of gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **42**, 337-357, 2013.
6. Tan VP and Wong BC: Gastric cancer chemoprevention: the current evidence. *Gastroenterol Clin North Am* **42**, 299-316, 2013.
7. Badr El-Din NK, Noaman E, Fattah SM, and Ghoneum M: Reversal of age-associated oxidative stress in rats by MRN-100, a hydro-ferrate fluid. *In Vivo* **24**, 525–534, 2010.
8. Ghoneum M, Elbaghdady HA, El-Shebly AA, Pan D, Assanah E, et al.: Protective effect of hydroferrate fluid, MRN-100, against lethality and hematopoietic tissue damage in γ -radiated Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J Radiat Res* **54**, 852-862, 2013.
9. Ghoneum M and Shaheen M: MRN-100, an Iron-based Compound, Possesses Anti-HIV Activity. *In Vitro Evid Based Complement Alternat Med* **7**, 427-432, 2010.
10. 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.
11. Beutler E, Duron O, and Kelly BM: Improved method of the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* **61**, 882-888, 1963.
12. Minami M and Yoshikawa HA: Simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin Chim Acta* **92**, 337-342, 1979.
13. Luck H: Catalase, Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer HW (ed.), New York, Academic Press, 1963, pp 885-894.
14. 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.
15. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, and Milner A: A novel method for measuring antioxidant capacity and its application for monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* **84**, 407-412, 1993.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275, 1951.
17. Heckly RJ: Free Radicals in Dry Biological Systems, Free Radicals in Biology, vol. 2., Pryor WA(ed), New York, Academic Press, 1976, pp 135-158.

18. Pascual EC, Goodman BA, and Yeretzian C: Characterization of free radicals in soluble coffee by ESR. *J Agric Food Chem* **50**, 6114-6122, 2002.
19. Huggett MT, Ghaneh P, and Pereira SP: Drainage and bypass procedures for palliation of malignant diseases of the upper gastrointestinal tract. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **22**, 755-763, 2010.
20. Spina R, Chu SY, Chatfield M, Chen J, Tin MM, et al.: Outcomes of chemoradiation for patients with locally advanced non-small-cell lung cancer. *Intern Med J* **43**, 790-797, 2013.
21. Badr El-Din NK: Protective role of sanumgerman against-cirradiation induced oxidative stress in Ehrlich carcinomabearing mice. *Nutr Res* **24**, 271-291, 2004.
22. Navarro J, Obrador E, Carretero J, Petschen I, Avino J, et al.: Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth in vivo. *Free Radic Biol Med* **26**, 410-418, 1999.
23. Bakan E, Taysi S, Polat MF, Dalga S, Umudum Z, et al.: Nitric oxide levels and lipid peroxidation in plasma of patients with gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* **32**, 162-166, 2002.
24. Seven A, Civelek S, Inci E, Inci F, Korkut N, et al.: Evaluation of oxidative stress parameters in blood of patients with laryngeal carcinoma. *Clin Biochem* **32**, 369-373, 1999.
25. Giannoni E, Parri M, Chiarugi P. EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy. *Antioxid Redox Signal.* **16**, 1248-63m, 2012.
26. Nikitovic D, Corsini E, Kouretas D, Tsatsakis A, Tzanakakis G. ROS-major mediators of extracellular matrix remodeling during tumor progression. *Food Chem Toxicol.* **61**,178-86. 2013.
27. Hayakawa M, Sugiyama S, Hattori K, Takasawa M, Ozawa T. Age-associated damage in mitochondrial DNA in humans hearts. *Mol Cell Biochem.* **119**,95-103, 1993.
28. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-47,2000.
29. Fridlyand LE, Philipson LH. Reactive species, cellular repair and risk factors in the onset of type 2 diabetes mellitus: review and hypothesis. *Curr Diabetes Rev.* **2**,241-59, 2006.
30. Latifi A, Jeanjean R, Lemeille S, Havaux M, Zhang CC: Iron starvation leads to oxidative stress in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **187**, 6596-6598, 2005.
31. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, et al.: Vercellotti, Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* **267**, 18148-18153, 1992.
32. Sinclair AJ, Barnett AH, and Lunie J: Free radical and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med* **43**, 334-344, 1990.
33. Rushmore TH and Picket CD: Glutathione-S-transferase, structure, regulation, and therapeutic implication. *J Biol Chem* **268**, 11475-11478, 1993.
34. Ghoneum M and Kijima Y: Induction of human natural killer (NK) cell activity by pi-water (MRN-100). *Annual Conference on Clinical Immunology, New Orleans, LA, 1996* (abstr).
35. Ghoneum M, Namatalla G, and 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* (abstr).
36. 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* (abstr).

37. Whiteside TL and Herberman RB: The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* **7**, 704-710, 1995.
38. Badr El-Din NK, E. Noaman E, and Ghoneum M: In vivo tumor inhibitory effects of nutritional rice bran supplement MGN-3/Biobran on Ehrlich carcinoma-bearing mice. *Nutr Cancer* **60**, 235-244, 2008.
39. Ames E and Murphy WJ: Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **63**, 21-28, 2014.