

令和元年6月1日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15917

研究課題名(和文)食道・胃上皮内アセトアルデヒド濃度測定とL-システイン製剤による発癌抑制への試み

研究課題名(英文) The measurement of acetaldehyde in human esophageal and gastric tissue and the effect of L-cysteine for reducing the incidence of esophageal and gastric cancers

研究代表者

八田 和久 (Hatta, Waku)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30706932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アセトアルデヒド脱水素酵素(ALDH)2活性型、不全型それぞれ10名に対して、飲酒後に唾液中のアセトアルデヒド消去作用のあるL-システイン製剤あるいはプラセボ製剤を継続投与し、唾液・血液採取、食道・胃生検を行い、それぞれのエタノール・アセトアルデヒド濃度を測定した。唾液中アセトアルデヒド濃度は、L-システイン製剤投与群でALDH2活性型・不全型共に有意に低下したが、食道組織中アセトアルデヒドについては、L-システイン製剤投与群でアセトアルデヒド検出可能な症例を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにヒト生体内での食道組織からアセトアルデヒドを検出した報告はなく、本研究にてヒト生体内食道組織のアセトアルデヒドが初めて検出されたことは意義深い。L-システイン製剤投与例のみでアセトアルデヒドが検出されたことは意義深い結果である。これらより、食道組織へのアセトアルデヒドの曝露の経路として、これまでに最も有力と考えられてきた唾液の直接曝露とは異なる経路が存在する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We enrolled 10 subjects with active acetaldehyde dehydrogenase-2*1/*1 genotype and 10 subjects with the inactive acetaldehyde dehydrogenase-2*1/*2 genotype. In this study using L-cysteine and placebo lozenges, saliva and blood were collected and esophageal and gastric tissue was obtained after drinking. Then, the acetaldehyde and ethanol concentrations were measured. The acetaldehyde concentration of the saliva was significantly lower in those taking L-cysteine than in those taking the placebo. Acetaldehyde in the esophageal tissue was detected only in those taking L-cysteine lozenges.

研究分野：消化器内科

キーワード：アセトアルデヒド L-システイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

飲酒は食道癌のみならず胃癌の発生においても危険因子とされている。飲酒に関連する癌では発癌に Ach が関与すると考えられており、2009 年に WHO の国際がん研究機関 (IARC) より「飲酒と関連した Ach」は発癌物質と認定された。アルコール飲料を摂取すると、エタノールは口腔内細菌やアルコール脱水素酵素 (ADH) などにより Ach に酸化され、アルコール飲料そのものに含まれる Ach とあわせて容易に唾液内に溶出、唾液の嚥下とともに食道や胃に Ach が直接暴露される。Ach は、DNA や蛋白質と結合して付加体を作り、DNA 修復を阻害し、発癌を誘発すると考えられている (Int J Clin Oncol 2010; 15: 135-44) (図 1)。このため、Ach を無害な酢酸に分解する Ach 脱水素酵素 (ALDH) の存在が重要であるが、ALDH2 には遺伝子多型が存在し、活性が弱い ALDH2-1/2-2 (不全型) の飲酒者では、活性を有する ALDH2-1/2-1 (活性型) の飲酒者に比し、食道癌や胃癌の危険性が高い。アルコール摂取後のヒト体内 Ach 濃度に関しては、これまでに血液中・唾液中に加えて、胃液中での測定がなされ、各々 ALDH2 活性型に比し不全型の濃度が高いことが示されているが、Ach の食道・胃での発癌作用を直接的に証明するには ALDH2 遺伝子多型間での食道・胃上皮内 Ach 濃度の違いを示すことが重要である。しかし、Ach は沸点が 21 と低いことから、これまでは食道・胃上皮内 Ach 濃度は測定されていなかった。一方、L-システインは、唾液中の Ach 消去作用があり、L-システイン製剤投与により、飲酒後口腔内細菌により産生、唾液溶出される Ach の 2/3 まで取り除くことが可能であるが (Int J Cancer 2002; 97: 361-4)、L-システイン製剤投与が食道・胃上皮内 Ach 濃度に影響するかについては、これまでにわかっていない。

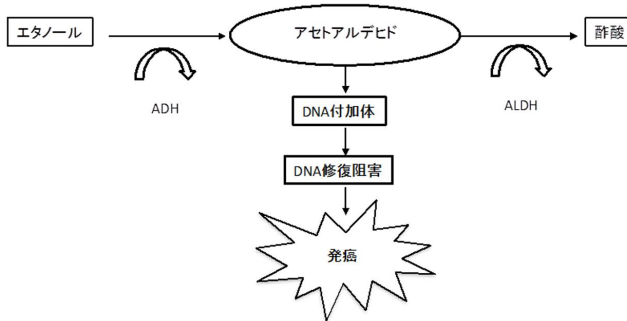


図1.アルコール代謝経路と発癌

2. 研究の目的

これらのことを明らかにするため、本研究では内視鏡下に採取した食道・胃生検検体を用いて食道・胃上皮内 Ach 濃度を測定し、L-システイン製剤が食道・胃上皮内 Ach 濃度に影響するかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 対象・研究デザイン

対象は自由意志による研究参加者で、文書にて同意が得られた 20 歳以上の Helicobacter pylori (H. pylori) 陰性である健常成人日本人男性、ALDH2 活性型 10 名、ALDH2 不全型 10 名を登録した。

2) 研究手順

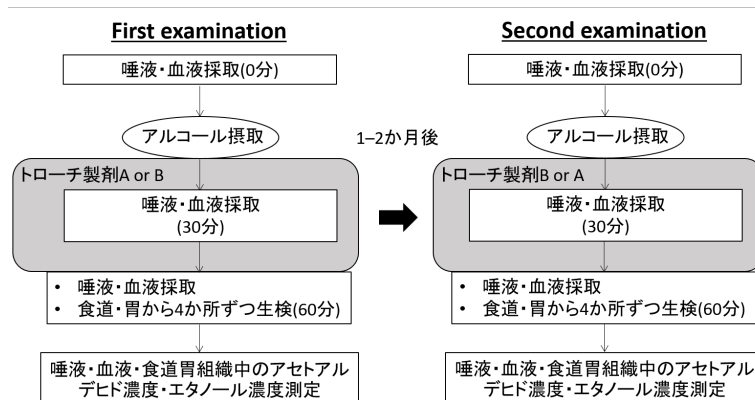


図2.臨床研究手順フローチャート

本研究は、トローチ型 L-システイン徐放製剤と同外形のプラセボ製剤を用いた試験であり、研究手順を図 2 に示す。対象者は、試験の 24 時間前より禁酒、12 時間前より絶食とし、東北大学病院消化器内視鏡センターにて 13 時から 15 時の間に試験開始とした。飲酒前に血液 2 ml 及び唾液 2 ml を採取したが、唾液採取の際には、対象者は 2 分間嚥下を控えるようにして唾液を溜めてから採取した。次に、0.5 g/kg

body weight のエタノール量をオレンジジュースで 15% に希釈したものを 10 分かけて摂取し、飲酒後 30 分、60 分で唾液 2 mL、血液 2 ml を採取し、飲酒後 60 分で内視鏡下に食道下端より約 5 cm 口側の食道粘膜、胃粘膜からそれぞれ 4 個の生検を行った上で 1 回目の試験を終了とした。尚、内視鏡は予め決められた者が行い、生検前には十分量的の水で食道・胃粘膜を洗浄して粘液を除去した。これらにより採取された検体は、アセトアルデヒド濃度、エタノール濃度解析のために用いられた。尚、対象者は、飲酒後から飲酒後 60 分まではトローチ製剤 A (L-シス

テイン or プラセボ)を投与され、トローチ製剤が口腔内より無くなり次第1錠ずつ追加していくことでトローチが常に口の中にある状態を保持した。

対象者に対して、1-2ヵ月後にトローチ製剤B(プラセボ or L-システイン)投与下で同様の試験(2回目)を行い、唾液・血液検体と食道生検検体を採取した。

3) ヒト唾液・血液・食道組織・胃組織中のアセトアルデヒド濃度とエタノール濃度測定

採取された唾液に関しては、このうち450 µLを6 Mの過塩素酸50 µLが入ったガラスバイアル(Chromacol Auto Sampler Headspace Vials 22 mL)に速やかに移した後に密閉し、-80で冷凍保存した。採取された血液に関しては、このうち1 mlを0.6 M過塩素酸6 mlが入ったスピッツに入れ、直ちに攪拌した。その後、遠心分離(4、2300回転、15分)し、上澄み2 mlをガラスバイアル(Chromacol Auto Sampler Headspace Vials 22 mL)に移した後に密閉し、-80で冷凍保存した。一方、採取された食道生検検体に関しては、採取後直ちに濾紙の上で検体表面に付着した血液や粘液を拭き取り、その後0.6 Mの過塩素酸300 µLが入ったエッペンドルフチューブに入れて固定した。食道胃生検検体が入ったエッペンドルフチューブの重さを測定した後に、食道・胃生検検体を過塩素酸ごとガラスバイアル(Chromacol Auto Sampler Headspace Vials 22 mL)に入れ、密閉後に-80で冷凍保存した。また、食道生検検体採取前と採取後のエッペンドルフチューブの重さを測定し、その差から採取した食道組織検体の重量を算出した。

それぞれの検体(唾液・血液・食道・胃組織検体)は、後日東北大学大学院工学系研究科・応用生命化学分野にドライアイスで冷却しながら運送し、同分野に設置されているヘッドスペースガスクロマトグラフィー(Varian CP 3800/Tekmar 7000)にて、Vfmax 19091N-233(Length; 30 m×0.25 mm, Film; 0.5 m)(Agilent, CA, USA)分析カラムを用いてアセトアルデヒド濃度、エタノール濃度を測定した。アセトアルデヒド・エタノール濃度測定の過程としては、検体(唾液・血液・食道胃組織)が入ったガラスバイアルをヘッドスペースオートサンプラーで約200まで加熱し、これにより得られた揮発物質は、ガスクロマトグラフィーにてアセトアルデヒドやエタノールなどの特定の物質に分離される。その後、水素イオン化型検出器で燃焼させることでクロマトグラムが得られ、予め分析しておいた標品(アセトアルデヒドとエタノール)の保持時間のピークから、それぞれの検体中のアセトアルデヒドとエタノールの同定を行った。その後、絶対検量線法を用いて検量線を作成し、検出されたアセトアルデヒドやエタノールのピーク面積を検量線に当てはめて定量化することで濃度の測定を行った。尚、本研究で用いたヘッドスペースガスクロマトグラフィーのアセトアルデヒド濃度測定に関しては、11.35 µMから227 µMの範囲で検量線の直線性が確認されている。また、食道組織中のアセトアルデヒド濃度に関しては、検量線値から得られた食道組織中のバイアル濃度をx(µM)、食道胃組織検体の重量をy(g)として、 $x(y + 0.3) / y$ で補正を行い、濃度を算出した。

4) 評価項目

本研究における主要評価項目は、L-システイン製剤、プラセボ製剤投与の際の飲酒後の食道胃組織中アセトアルデヒド濃度とした。副次評価項目は、ALDH2遺伝子多型ごとに、L-システイン製剤、プラセボ製剤投与における唾液・血液・食道胃組織におけるアセトアルデヒド濃度とした。また、食道胃組織中アセトアルデヒド濃度と飲酒60分後の血液・唾液中アセトアルデヒド濃度との相関を評価した。エタノール濃度に関しては、ADH1B遺伝子多型ごとに、L-システイン製剤、プラセボ製剤投与における唾液・血液・食道胃組織中濃度を比較検討した。

4. 研究成果

1) 対象者背景

対象者の詳細を表1に記載した。ALDH2活性型と不全型の間に年齢、体重の有意な差異は認められなかった。全対象者が飲酒後0分から60分までL-システインもしくはプラセボ製剤を服用し続け、その服用個数はそれぞれ11.7 ± 1.0個、12.3 ± 1.0個であった。なお、本研究に伴う有害事象は認められなかった。

表1. 被験者背景(平均±標準誤差)

	ALDH2*1/*1 (活性型) (n=10)	ALDH2*1/*2 (不全型) (n=10)	p値
年齢(歳)	25.6 ± 1.2	27.9 ± 7.9	0.39
体重(kg)	64.3 ± 2.4	63.3 ± 2.3	0.77
L-システイン製剤内服量(個)	10.5 ± 1.2	12.8 ± 1.4	0.24
プラセボ製剤内服量(個)	11.6 ± 1.2	13.0 ± 1.4	0.48
ADH1B遺伝子多型			0.47
ADH1B*2/*2(高活性型)	8	10	
ADH1B*1/*2(活性型)	2	0	

2) ヒト唾液中アセトアルデヒド濃度・エタノール濃度

唾液中アセトアルデヒド濃度に関しては、プラセボ群でAUCがALDH2活性型と比較して、ALDH2不全型で高い傾向であった(p=0.21)。プラセボ群とL-システイン群の比較では、ALDH2活性型における唾液中アセトアルデヒド濃度は、プラセボ群に比してL-システイン群の方が飲酒後30分、60分にて低く、AUCは有意に低かった(8.8 ± 1.4 vs 1.6 ± 0.8 µM·hr、p=0.002)

(図 3a) ALDH2 不全型における唾液中アセトアルデヒド濃度も同様の結果であり、area under the curve (AUC) はプラセボ群に比し L-システイン群にて有意に低かった (11.5 ± 1.6 vs $6.5 \pm 1.6 \mu\text{M}\cdot\text{hr}$, $p=0.036$) (図 3b)。

唾液中エタノール濃度に関しては、プラセボ群で AUC が ADH1B 高活性型と比較して、ADH1B 活性型で高い傾向であった ($p=0.13$)。プラセボ群と L-システイン群の比較では、ADH1B 高活性型においては AUC がプラセボ群に比し L-システイン群の方が有意に低かったが (10.1 ± 0.7 vs $7.8 \pm 0.7 \text{ mM}\cdot\text{hr}$, $p=0.022$) (図 3c)、ADH1B 活性型の AUC では両群間に有意な差異を認めなかった (11.2 ± 0.1 vs $10.0 \pm 0.9 \text{ mM}\cdot\text{hr}$, $p=0.41$) (図 3d)。

3) ヒト血液中アセトアルデヒド濃度・エタノール濃度

血液中アセトアルデヒド濃度に関しては、プラセボ群において AUC は ALDH2 遺伝子多型間での有意な差は認めなかった。プラセボ群と L-システイン群の比較では、ALDH2 遺伝子多型によらず 2 群間に有意な差異を認めなかった (図 4a、4b)。

血液中エタノール濃度に関しては、プラセボ群で AUC が ADH1B 高活性型と比較して、ADH1B 活性型で有意に高かった ($p=0.045$)。プラセボ群と L-システイン群の比較では、ADH1B 遺伝子多型によらず 2 群間に有意な差異を認めなかった (図 4c、4d)。

4) ヒト食道胃組織中アセトアルデヒド濃度・エタノール濃度

得られた食道組織サンプルの定性・定量は、標準物質の保持時間及び標準物質を用いて作成した検量

線との照らし合わせにより行った (図 5)。

胃組織中のアセトアルデヒドは認められなかった。食道組織中アセトアルデヒドは、ALDH2 活性型では L-システイン群の 3 例、ALDH2 不全型では L-システイン群の 2 例で検出されたが、プラセボ群では ALDH2 活性型・不全型ともに検出されなかった (図 6a、6b)。統計学的には、プラセボ群、L-システイン群の 2 群間には ALDH2 活性型、不全型ともに有意差を認めなかった。また、食道組織中アセトアルデヒド濃度と唾液中・血液中アセトアルデヒド濃度の間には有意な相関関係を認めなかった (それぞれ $r = -0.091$ ・ $p = 0.58$, $r = -0.12$ ・ $p = 0.46$)。

食道組織中エタノールはプラセボ群、L-システイン群ともに全例で検出されたが、ADH1B 遺伝子多型によらず 2 群間に有意な差異を認めなかった (図 6c、6d)。

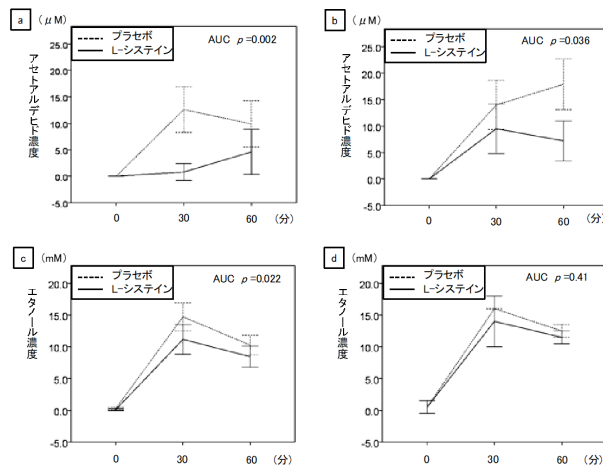


図3.飲酒後の唾液中アセトアルデヒド・エタノール濃度
a. ALDH2*1/*1(活性型)アセトアルデヒド濃度 (n=10)
b. ALDH2*1/*2(不全型)アセトアルデヒド濃度 (n=10)
c. ADH1B*2/*2(高活性型)エタノール濃度 (n=18)
d. ADH1B*1/*2(活性型)エタノール濃度 (n=2)

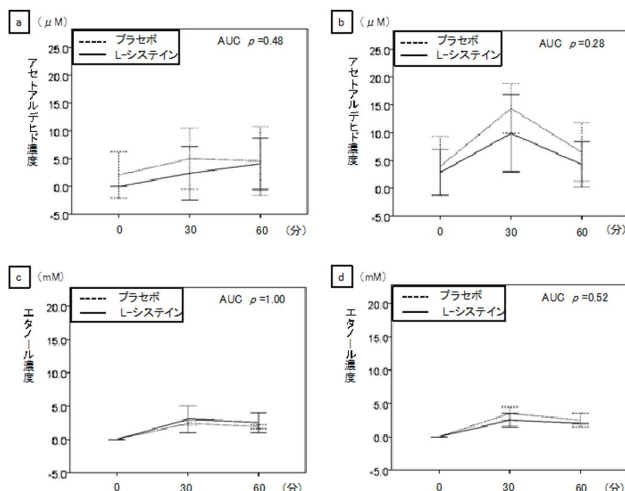


図4.飲酒後の血液中アセトアルデヒド・エタノール濃度
a. ALDH2*1/*1(活性型)アセトアルデヒド濃度 (n=10)
b. ALDH2*1/*2(不全型)アセトアルデヒド濃度 (n=10)
c. ADH1B*2/*2(高活性型)エタノール濃度 (n=18)
d. ADH1B*1/*2(活性型)エタノール濃度 (n=2)

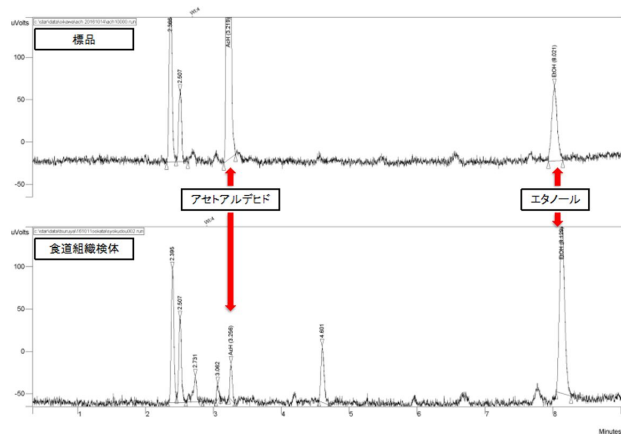


図5.食道組織中のアセトアルデヒド・エタノールのクロマトグラム

食道へのアセトアルデヒドの曝露経路としては、これまでエタノールが吸収されて肝にてアセトアルデヒドに代謝されその後血液などを介して食道に曝露する経路と、飲酒、唾液や食物摂取によるアセトアルデヒドの直接曝露の経路が考えられており、その中でも飲酒後などにおける唾液嚥下を介したアセトアルデヒドの直接曝露が最も有力と考えられてきた。このため、本研究開始時には、唾液中アセトアルデヒドの消去作用のある L-システイン製剤を投与することで唾液とともに食道組織においてもアセトアルデヒド濃度が低下することを予測していた。だが、本研究結果では、L-システイン製剤投与により唾液中のアセトアルデヒド濃度が低下したのとは対照的に、食道ではL-システイン製剤投与例でアセトアルデヒド検出例を認めたと、プラセボ製剤投与ではアセトアルデヒド検出例を認めなかった。さらに、食道組織中にはエタノールが L-システイン製剤投与例、プラセボ製剤投与例とともに同程度に認められた。アセトアルデヒド検出例が少なかったことが本研究の limitation の一つであるが、同様の条件で行ったにも関わらず L-システイン製剤投与例のみでアセトアルデヒドが検出されたことは意義深い結果である。これらより、食道組織へのアセトアルデヒドの曝露の経路として、これまでに最も有力と考えられてきた唾液の直接曝露とは異なる経路が存在する可能性が考えられた。

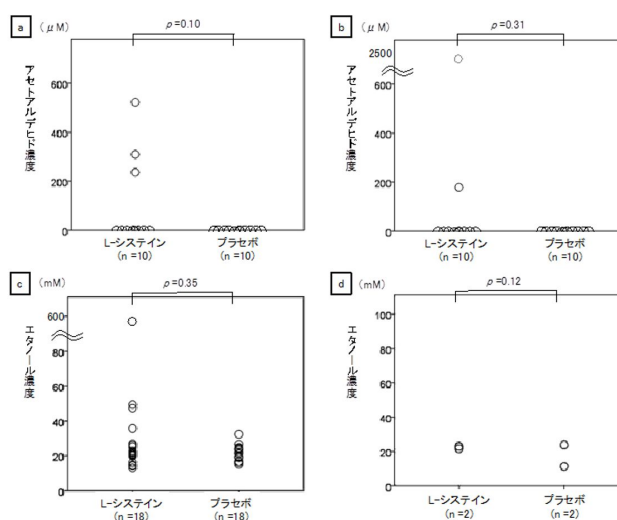


図6. 飲酒後の食道組織中アセトアルデヒド・エタノール濃度
a. ALDH2*1/*1(活性型)アセトアルデヒド濃度(n=10)
b. ALDH2*1/*2(不全型)アセトアルデヒド濃度(n=10)
c. ADH1B*2/*2(高活性型)エタノール濃度(n=18)
d. ADH1B*1/*2(活性型)エタノール濃度(n=2)

5 . 主な発表論文等

Okata H, Hatta W, Iijima K, Asanuma K, Tsuruya A, Asano N, Koike T, Hamada S, Nakayama T, Masamune A, Shimosegawa T. Detection of Acetaldehyde in the Esophageal Tissue among Healthy Male Subjects after Ethanol Drinking and Subsequent L-Cysteine Intake. *Tohoku J Exp Med.* 2018 Apr;244(4):317-325.

〔雑誌論文〕(計1件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大方英樹

ローマ字氏名：Hideki Okata

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。