

Title	口腔白板症に対する緑茶カテキンの治療効果に関する臨床的検討
Author(s)	片倉, 朗; 右田, 雅士; 与謝野, 明; 野村, 武史; 山内, 智博; 神尾, 崇; 笠原, 清弘; 柴原, 孝彦; 松坂, 賢一; 井上, 勝一; 堤坂, 裕子
Journal	頭頸部癌, 33(1): 11-16
URL	http://hdl.handle.net/10130/398
Right	

第30回 頭頸部癌学会 P-052

座長推薦論文

口腔白板症に対する

緑茶カテキンの治療効果に関する臨床的検討

片倉 朗¹⁾、右田雅士¹⁾、与謝野 明¹⁾、野村武史¹⁾、山内智博¹⁾、

神尾 崇¹⁾、笠原清弘¹⁾、柴原孝彦¹⁾、松坂賢一²⁾、

井上勝一³⁾、提坂裕子⁴⁾

東京歯科大学 口腔外科学講座¹⁾

東京歯科大学 口腔科学センターHRC7・臨床検査学研究室²⁾

札幌徳州会病院 オンコロジーセンター³⁾

(株)伊藤園 中央研究所⁴⁾

キーワード：

口腔白板症・前癌病変・緑茶抽出物・カテキン(EGC)

別刷請求先：

〒261-8502

千葉県千葉市美浜区真砂 1-2-2

東京歯科大学 口腔外科学講座 片倉 朗

和 文 抄 録

(論 文 要 旨)

茶抽出物(緑茶カテキン、GTE と略す)のがん予防への臨床応用に向けて研究が進んでいる。GTE には抗発癌活性(抗発癌プロモーション活性、がん細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導)、抗変異原性(抗イニシエーション活性、抗癌剤と DNA アダクト形成抑制)、血管新生阻害など多様な生物活性があることが基礎的研究で証明されている。今回、我々は GTE を口腔白板症に塗布剤として局所投与し、その有効性ならびに病理組織学的変化を検討したので報告する。**対象ならびに方法**:2005 年 8 月から 2006 年 1 月までに当科を受診し、生検で口腔白板症と診断され本研究に同意を得た患者 10 名である。投与薬剤は 1%GTE を口腔軟膏基材に添加/練合した軟膏で、患部に 1 回量 0.5g を 1 日 4 回塗布し、60 日間以上投与した。肉眼的観察、投与前・中・後で血清中カテキン濃度、投与前・後の標本で H-E 染色ならびに Ki-67 免疫組織化学的染色を行い、組織学的効果と Ki-67 陽性細胞率を比較検討した。**結 果**:肉眼的に 6 例で消失・縮小・白板の菲薄化が認められた。有効例は投与後、病理組織学的に粘膜の正常化を呈し、Ki-67 免疫組織化学染色で上皮の細胞増殖動態の正常化が示唆された。投与中ならびに投与終了後に臨床症状ならびに血液検査で副作用は認めなかった。これらより、口腔白板症に対する GTE の局所投与の有効性期待された。

Therapeutic Effects of Green Tea Catechin on Oral Leukoplakia

Akira KATAKURA¹⁾, Masashi MIGITA¹⁾, Akira YOSANO¹⁾, Takeshi NOMURA¹⁾,
Tomohiro YAMAUCHI¹⁾, Takashi KAMIO¹⁾, Kiyohiro KASAHARA¹⁾,
Takahiko SHIBAHARA¹⁾, Kenichi MATSUZAKA²⁾,
Katsuichi INOUE³⁾, Yuko SAGESAKA⁴⁾

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Tokyo Dental College¹⁾
Oral Health Science Center HRC7, Department of Clinical Pathophysiology,
Tokyo Dental College²⁾
Oncology Center, Sapporo Tokushu-Kai Hospital³⁾
Institute of Ito-en Co.Ltd⁴⁾.

Research is being conducted to clinically utilize tea extracts (green tea catechin, or GTE for short) for cancer prevention. Basic studies have proven that GTE possesses various biological effects such as anticancer activities (promotion of anticarcinogenesis, suppression of cancer cell proliferation, and induction of apoptosis), antimutagenic activities (anti-initiation and suppression of anticancer agent/DNA adduct formation), and anti-angiogenesis activities. Here, we administered GTE as a liniment for oral leukoplakia and investigated efficacy and histopathological changes. **Subjects and Methods:** Subjects were 10 consenting patients who consulted our department and were diagnosed with oral leukoplakia after histopathologic examination of biopsy material between August 2005 and January 2006. For at least 60 days, 0.5 g of a 1% GTE liniment prepared by mixing GET into an oral ointment was applied to the affected area four times a day. Each lesion was monitored macroscopically. The serum concentration of catechin was measured before, during, and after administration. In addition, biopsy was performed before and after administration, and immunohistochemical techniques Ki-67 Labeling Index (LI) was used to ascertain changes in cellular proliferation. **Results:** No clinical or laboratory adverse reactions were seen during or after administration. Macroscopic observations revealed resolution, reduction or thinning of leukoplakia in six patients. In restored case histopathologically, oral mucosa tissue was histologically normalized, and even when leukoplakia did not disappear, favorable changes in Ki-67 LI occurred before and after administration. These findings suggest the effectiveness of local GTE administration in the treatment of oral leukoplakia.

Key Words:

Oral leukoplakia, Precancerous lesion, Green tea extract, Epicatechin gallate (ECG)

はじめに

茶抽出物（緑茶カテキン、以下 GTE と略す）には、ヒト癌に対して、抗発癌活性（抗癌プロモーション活性、がん細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導）、シーリング効果（発癌プロモーター、ホルモン受容体との結合抑制）、抗変異原性（抗イニシエーション活性、抗癌剤と DNA アダクト形成抑制）、血管新生阻害、遺伝子発現の抑制（*c-myc*, *c-H-ras*, 炎症性サイトカイン、TNF、IL-1）など多様な生物活性をもつことが基礎的研究で報告されている^{1),2)}。

口腔癌への効果はヒト口腔癌細胞株による *in vitro* の実験で FAK 回路などへの影響が報告されているが³⁾、臨床的にその効果を検証した報告は見当たらない。私たちは、GTE をヒト口腔扁平上皮癌株（HSC-4, Ca9-22）でその細胞増殖抑制作用を検証し、細胞活性が低下することを確認している。ところで前癌病変である口腔白板症は非侵襲的な治療法は少なく、悪性の傾向が認められる際には切除するのが一般的である。そこで、私たちは GTE の抗発癌活性と抗変異原性に注目し、口腔白板症の治療薬としての可能性について検証した。GTE をその効果を損なわないで口腔粘膜に塗布できる軟膏剤に調製して口腔白板症に塗布し、その有効性を臨床的・病理組織学的に検討した。その結果、治療薬としての有用性が示唆されたので報告する。

研究対象ならびに方法

1. 研究対象ならびに投与方法

2005 年 8 月から 2006 年 2 月までに東京歯科大学千葉病院口腔外科を受診し、生検で口

腔白板症と診断され、本実験について東京歯科大学倫理委員会の承認を得た内容について説明の上、研究に同意を得られた患者 10 名（男性 6 名、女性 4 名 平均年齢 56.0 歳）である。投与薬剤は GTE（テアフラン 30ARG）を 10%含む軟膏で茶ポリフェノールを 4.17%（Epigallocate Catechin :以下 EGC）を含有する。軟膏剤の成分組成を表 1 に示す。用法・用量は 1 回量 0.5g（GTE を 50mg 含む）を患者自身に専用の計量スプーンで取り出してもらい、12 週間にわたり食間に 1 日 3 回患部をよく乾燥させてから塗布しその記録をしてもらった。

2. 効果の判定

（1）肉眼的評価

投与前、投与後 30,60,90 日に 肉眼的観察・病変の長径と短径の計測ならびにデジタルカメラによる記録を行った。判定は「頭頸部癌取り扱い規約（第 3 版）」の治療効果判定基準⁴⁾を基本として CR, PR, NC, PD で判定した。病変に改善傾向がみとめられた症例は投与終了後 30 日後に判定を行った。

（2）病理組織学的評価

全例で投与前・投与後に生検を行った。病変に変化がなかった症例は投与終了後 10 日以内、改善傾向がみられた症例で CR 以外の症例は判定直後に病変を全切除し、いわゆる全切除生検とした。生検標本・切除標本ともに H-E 染色ならびに Ki-67 による免疫組織化学染色を行い鏡検した。

Ki-67 による免疫組織化学染色は、4 μm のパラフィン切片として脱パラフィン後、マイクrowエーブ処理（0.01M クエン酸 Buffer 90 15 分）し、3% H_2O_2 を加メタ

ノールで内因性POD阻止を行った後水洗し、10%ヤギ正常血清でブロッキングを行なった。一次抗体には、抗Ki-67マウスモノクローナルMIB-1抗体(200倍、Dako, Glostrup, Denmark)を用い、4℃で12時間反応させた後、PBSで5分間3回洗浄した。シンプルステイン(MAX PO MULTI, ニチレイ)により抗体反応させ、DABと核染色(Mayer Hematoxyline)を行った。評価は光学顕微鏡400倍視野で検鏡し、ランダムに100個の細胞を観察して核内が茶色に染色されたものを陽性細胞とし、Basal Layer(基底層直上1層)、Parabasal Layer(Basal Layer上の1層)、Prickle Layer(明らかな有棘細胞を認める層)の3層に分けて陽性細胞率(以下、LIと略す)を算出した。

(3) 血中GTE濃度の測定ならびに血液一般検査

1) 血中GTE濃度の変化

投与前、投与後30,60,90日に血清中のカテキン類(エピカテキン:EC, エピガロカテキンガレート:EGCg)濃度を測定した。測定はカラムスイッチング法を用いた液体クロマトグラフに電気化学検出器を接続して行った。

2) 血液一般検査

投与前、投与後30,60,90日に血液一般、生化学検査を行い、肝・腎機能、電解質、血球成分の変化を調べた。

結 果

1. 肉眼的評価

対象症例の一覧とその肉眼的効果についての一覧を表2に示す。いずれも12週間連続

して塗布された。その結果、病変が全く消失し CR と判定した症例が 1 例、投与期間中に病変の縮小が認められ PR と判定した症例が 5 例、病変に変化が認められなかった NC が 4 例で、進行・増悪した症例は認めなかった。CR と判定した 1 例は投与終了後 12 週目においても再発は認めなかった。図 1-1, 図 2-1 に CR ならびに PR と判定した症例を示す。

2. 病理組織学的評価

肉眼的に効果が認められた症例は、H-E 染色ですべての症例で過角化層の菲薄化や釘脚の正常化などの病理組織学的変化が観察された。CR と判定した症例では図 1-2 に示すように、投与後も炎症性細胞浸潤は認められたが、投与前に認められた著明な過角化と釘脚の延長は消退し、正常な形態に回復していた。また、白板が菲薄化あるいは縮小し PR と判定した症例では図 2-2 に示すように、角化層の菲薄化・上皮細胞の極性の回復が観察された。

Ki-67 免疫組織化学染色の細胞陽性率を表 3 に示す。Parabasal Layer での陽性細胞率に投与前後で有意差をもって ($p < 0.05$) 変化が認められ、カテキンの投与によって陽性細胞が Parabasal Layer の集約する傾向が認められた。しかし、Ki-67 陽性率と肉眼的評価結果との関連性は認められなかった。しかし、図 3 に示すように肉眼的に NC と判定した症例でも陽性細胞が Parabasal Layer に集約していた症例が 1 例認められた。

3. 血中 GTE 濃度の測定ならびに血液一般検査

(1) 血中 GTE 濃度の変化

血清中エピカテキン (EC) 濃度は、すべての症例で投与期間中の 10ng/ml 以下で測定は不可能であった。また、血清中エピガロカテキンガレート (EGCg) 濃度は、投与期間

中 3 例で上昇が認められたが、その他はすべて 10ng/ml 以下で測定は不可能であった。上昇した 3 例うち 1 例は 1 ヶ月後に 35ng/ml まで上昇し、その後漸次減少して投与終了時は 18ng/ml であった。他の 2 例はいずれも投与 2 ヶ月後に急に測定域まで上昇し、投与終了時はそれぞれ 55ng/ml、41ng/ml であった。これらの上昇と肉眼的・病理組織学的変化の間に関連性は認められなかった。

(2) 血液一般検査

全例ともに投与期間中、本剤に起因すると考えられる血液学的変化は認められなかった。また、本剤の塗布による悪心、嘔吐、下痢、不眠などの副作用も認めなかった。

考 察

前癌病変である口腔白板症は本邦ではその 3～5%が扁平上皮癌に移行するとされている⁵⁾。しかし、その対応はリスクファクターを除去し、必要であれば Vitamin A 製剤の投与などの非侵襲的治療を行った後に経過観察し、それでも改善がみられず癌化の傾向を認めた際に切除するのが一般的であり、白板症と診断した初期の段階での非侵襲的で効果的な治療手段は少ない。近年、GTE には抗発癌活性、シーリング効果、抗変異原性、血管新生阻害、遺伝子発現の抑制など多様な生物活性があると報告されている^{1),2),6)}。これらは前癌病変から癌への移行を抑制する効果にも共通することから、GTE の白板症の対する効果に注目した。アメリカ MD Anderson Cancer Center では、頭頸部癌の患者に GTE を錠剤として経口投与した Phase study を行ない、その効果と副作用を確認し、頭頸部の固形癌に対して有用性があったと報告されている⁷⁾。今回、我々は局所に直接 GTE を作用

できる軟膏剤を開発し、白板症に塗布した。現在まで GTE を軟膏剤として調製し使用した報告はなく、本剤は GTE の特性を損なわずに軟膏剤に必要な高付着性、低崩壊性、徐放性、風味という条件を具備した軟膏剤である。塗布時の操作性と病変部への停滞性は良好で、被検者から塗布に際しての不都合な訴えはなく全例が投与を完遂できた。また風味についても訴えはなく、GTE 独特の渋みは日頃緑茶に親しんでいる日本人では投与に問題はないと思われた。

臨床的に 10 症例中 6 例で肉眼的効果が認められたが、舌側縁が 3 例、下顎歯肉が 3 例であり、口蓋と上顎歯肉の病変では効果が認められなかった。これは軟膏剤の部位による停滞性の違いによるところが大きいと考える。口蓋部は粘膜が滑沢でかつ安静時には舌背が接触するため停滞性は他の部位より劣ると思われる。

病理組織学的にも、PR 以上の症例では H-E 染色でもその効果は確認でき、いずれも角化層は菲薄化し、細胞の極性が正常化する傾向が認められたことは注目すべきことである。

さらに肉眼的評価との関連性は認められなかったが、Ki-67 免疫組織化学染色は、細胞陽性率が Parabasal Layer で投与前・後で有意差 ($p < 0.05$) をもって変化が認められ、投与により陽性細胞が Parabasal Layer の集約する傾向が認められた。肉眼的に NC と判定し、H-E 染色で投与前・後で変化を認めなかった症例でも陽性細胞が Parabasal Layer に集約していた症例が 1 例あったことは注目すべきである。Ki-67 は正常口腔粘膜上皮では、細胞増殖能が高い Parabasal Layer の細胞が陽性を示すと報告されている^{8),9)}。さらに、Ki-67 は G1,S,G2,M 期全般にわたって発現する核タンパクであり、休止期においては発現しないと報告されている¹⁰⁾。また、GTE をヒト口腔白板症細胞株に対して 24 時間反応さ

せたとき G1 期の Cell population の増加、G2,S 期の Cell population の減少を認め、それは細胞回転を制御する pRB に起因する可能性が報告されている¹¹⁾。同様にヒト白血病細胞株においても GTE を 24 時間反応させたとき G0/G1 の Cell population の減少、アポトーシスの増加を認め、GTE が Cell cycle progression に関与することが報告されている¹²⁾。Ki-67 の上皮内の局在性に塗布前後で変化を生じ、投与終了後に正常な局在性を示した症例も認められた本実験結果から、GTE は口腔白板症に対して塗布剤として投与した場合、細胞回転を制御する pRB などに関与して細胞回転に影響を及ぼし、口腔粘膜上皮を正常化に導く可能性が示唆された。

血清中の GTE 濃度と副作用について、MD Anderson Cancer Center では GTE を 1 回 29.6mg を 1 日 3 回、経口投与し頭頸部癌への効果を検証している。十分な血清中の GTE 濃度を維持するために経口投与を行ったところ、血清中の EGCg 濃度は投与後 1 時間で 150ng/ml に達し 24 時間後でも 35 ng/ml であった。また血清中の Caffeine 値も測定し、投与後 1 時間で 24 µg/ml に達し 24 時間後でも 15 µg/ml であった。その結果、悪心や消化管出血が発生し、多くの症例で不眠の訴えがあった⁷⁾。今回、私達は軟膏剤で 1 回 50mg を 1 日 3 回、局所塗布したところ、血清中の EC ならびに EGCg 濃度の急激な上昇と停滞を来すことはなかった。したがって、不眠や悪心などの不快症状の訴えはなく、肝・腎機能にも障害を認めずに治療効果が得られた。日頃から緑茶を多飲している日本人と人種の違いはあるかもしれないが、軟膏剤として投与することは病変への直接的作用と副作用の軽減という点から効果的方法だと考える。

以上のことから、GTE は塗布剤で直接病変に投与することで、口腔粘膜に局所的に吸収

され、その効果を発現していると考えられた。また、免疫組織化学染色からその効果は GTE が細胞増殖関連因子に何らかの形で作用していることにより発現しているのではないかと示唆された。以上より、本実験で GTE を軟膏剤として調製した本剤は口腔白板症に対する治療薬としての期待が高いと思われる。今後は、GTE が細胞増殖関連因子や細胞回転にどのように関与しているかを解明し、治療薬としての有効性をさらに検討したい。

引用文献

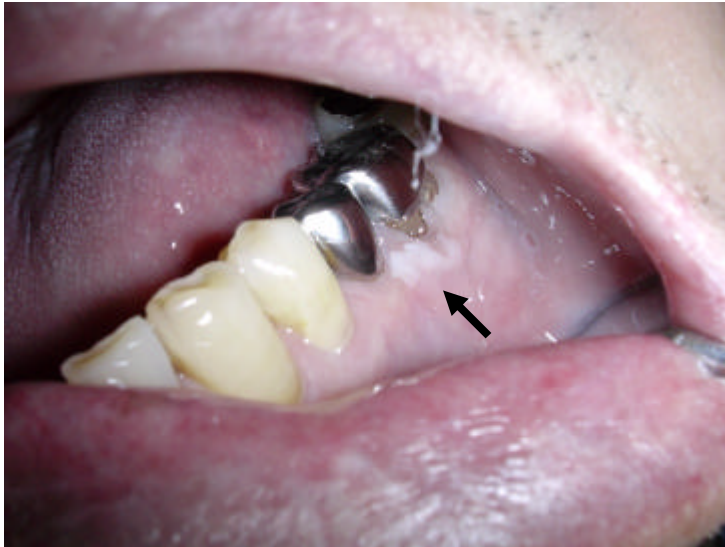
- 1) 菅沼雅美, 藤木博太: 緑茶-実用的ながん予防物質- 最新医学 59(11);2382-2389, 2004
- 2) Fujiki H: Two stages of cancer prevention with green tea, J Cancer Res Clin Oncol 125;589-587,1999
- 3) 鹿野 学, 山本浩貴, 覚道健治: 緑茶カテキンが口腔扁平上皮癌株 HSC-4 細胞の JAK/STAT に及ぼす影響 歯科医学 66:105-111, 2003
- 4) 日本頭頸部癌学会編, 頭頸部癌取扱い規約, 金原出版, 東京, 2001, pp61-62
- 5) 小村 健: 頭頸部腫瘍の病理診断-口腔腫瘍の臨床- 病理と臨床 23:1167-1171, 2005
- 6) Chung S Y., Jee Y C., Guang-yu Y., et al: Tea and tea polyphenols in cancer prevention, J. Nutr. 130:472S-478S, 2000
- 7) Pisters M K., Newman A R., Coldman B., et al: Phase trial of oral green tea

extract in adult patients with solid tumors, J.Clin Oncol 19:1830-1838, 2001

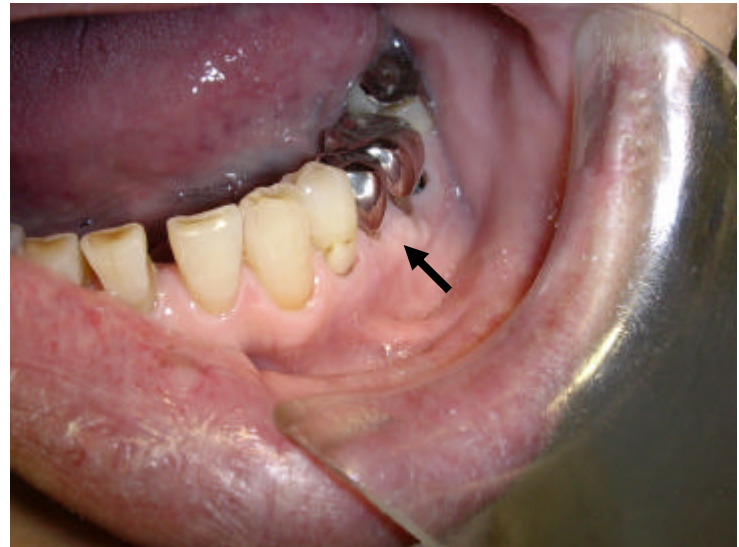
- 8) 佐藤 敦, 友寄泰樹, 山崎慎司 他: 口腔扁平上皮癌における cyclin D1, p16, dependent 4, RB protein, Ki67 および β -catenin の発現 東北大歯誌 20:17-26, 2001
- 9) 斉藤輝海, 長尾 徹, 神谷祐司 他: 口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移に関する p53, PTEN, Ki-67 の免疫組織学的研究 愛院大歯誌 43:627-634, 2005
- 10) Liu S., Sauter E R., Clapper M L., et al: Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of oral cavity, Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 7:597-603, 1998
- 11) Khafif A., Sshantz S., Al-Rawi M., et al: Green tea regulates cell cycle progression in oral leukoplakia, Head Neck 20:528-534, 1998
- 12) Ohta M., Koyama Y., Suzuki T., et al: Effect of tea constituents on cell cycle progression of human leukemia U937 cells, Biomed. Res.26:1-7, 2005

図 1-1

CR 症例 (症例3)



投与前



投与後

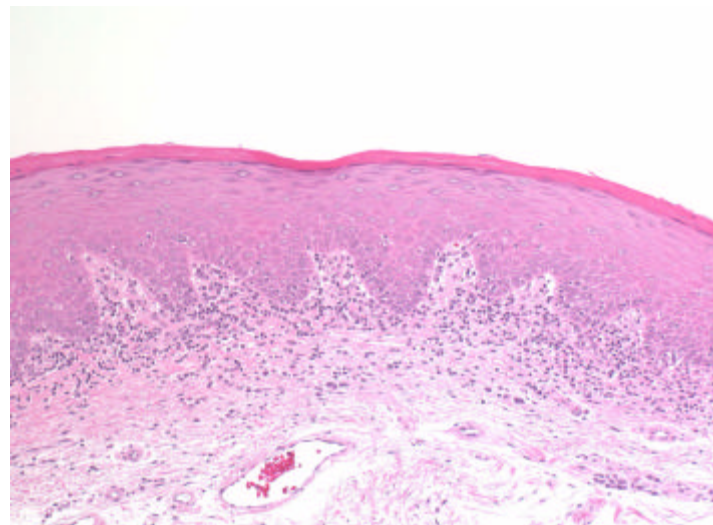
肉眼的には病変は完全に消失

図 1-2

CR 症例 (症例3)



投与前



投与後

角化層の過角化による肥厚は正常化し、炎症性細胞浸潤が認められるが細胞の極性が回復している。

図 2-1

PR症例 (症例5)



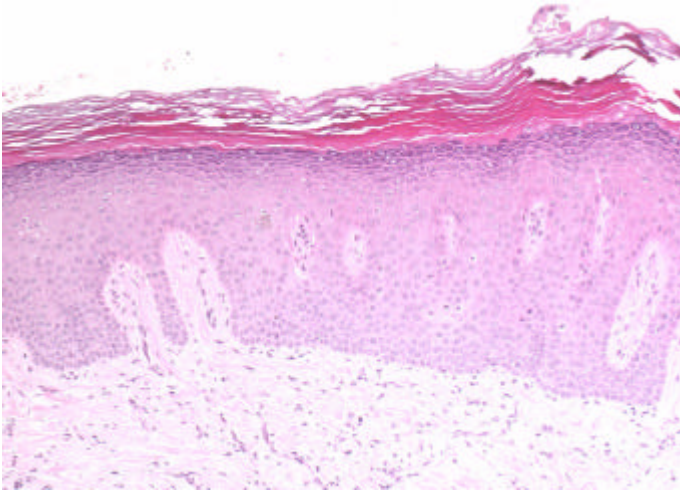
投与前



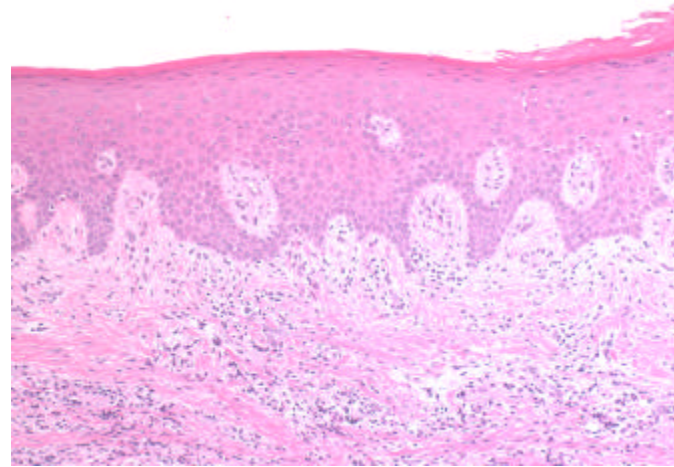
投与後

白板の部分的消失 範囲の縮小 全体に及ぶ菲薄化

図 2-2



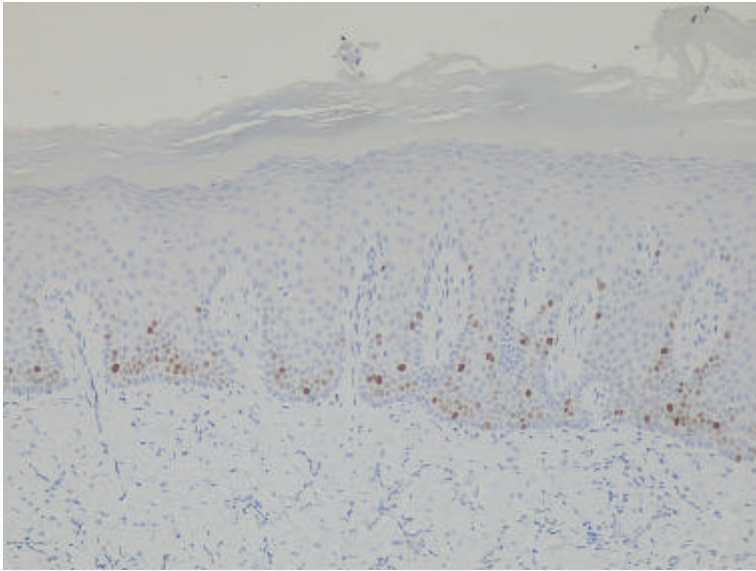
投与前



投与後

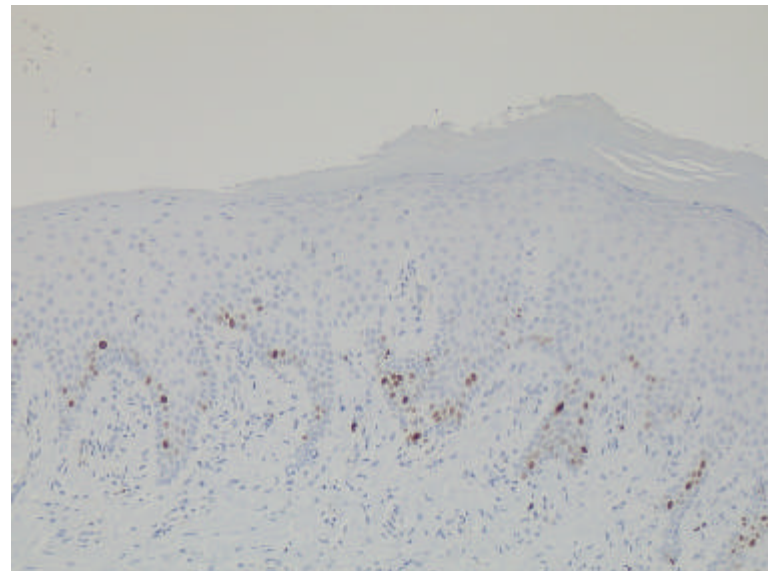
角化層の菲薄化・上皮細胞の極性の回復ならびに釘脚部の正常化が認められる。

PR症例 (症例 1)



投与前

陽性細胞がBasal Layer及びPrickle Layerにも陽性反応が認められる。



投与後

Parabasal Layer以外にも数個の細胞が陽性を示しているが、陽性を示すほとんどの細胞がParabasal Layerである。

表 1

GTE(テアフラン30ARG)を10%含む軟膏剤の組成

成 分	含有量
GTE (テアフラン30ARG)	10.0g
CMCナトリウム	28.8g
流動パラフィン	10.8g
白色ワセリン	28.8g
プラスチックベース	21.6g
計	100.0g

表 2

対象症例と肉眼的評価

症例No.	年齢	性別	部位	投与期間	判定
1	59	M	左上歯肉	05.9.17~12.23	NC
2	56	M	舌	05.9.12~11.30	PR
3	68	M	舌、左下歯肉	05.9.28~12.24	CR 消失
4	56	F	左下歯肉	05.9.30~12.16	PR 一時消失
5	59	F	舌	05.10.5~12.27	PR
6	63	M	口蓋	05.11.7~06.2.12	NC
7	64	M	口蓋	05.11.15~06.2.13	NC
8	37	M	左上歯肉	06.1.10~06.4.15	NC
9	41	F	舌	06.2.5~06.5.7	PR
10	69	M	左上下歯肉	06.2.20~06.5.20	PR

表 3

Ki-67の各層における陽性細胞率の変化

	Basal Layer	Parabasal Layer	Prickle Layer
投与前	4.5±2.7	20.1±7.9	4.2±1.3
投与後	3.9±2.1	28.4±9.8	2.1±0.9

n=9
* ; p < 0.05