

学位論文

マウスの酢酸および 5-フルオロウラシルによる
口腔内粘膜炎に対する熟成ニンニク抽出液の治癒効果

氏名 河崎 啓介

所属 山口大学大学院医学系研究科
歯科口腔外科学講座

令和 7 年 1 2 月

目 次

1 . 要 旨	1
2 . 緒 言	1
3 . 方 法	2
3 . 1 実験動物	2
3 . 2 マウス腫瘍モデルの作製	2
3 . 3 口腔粘膜炎の誘発・治療	3
3 . 4 トルイジンブルー染色による粘膜炎の評価	3
3 . 5 舌組織の HE 染色および組織学的検討	3
3 . 6 全トランスクリプトーム解析	4
3 . 7 Ingenuity network analysis	4
3 . 8 統計解析	5
4 . 結 果	5
4 . 1 マウスの体重および腫瘍体積に対する AGE の影響	5
4 . 2 舌背部の創傷部位、潰瘍性病変に対する AGE の影響	5
4 . 3 マウスの唾液腺の大きさおよび重量に対する AGE の影響	6
4 . 4 AGE の創傷治癒作用および抗腫瘍効果の作用機序	6
5 . 考 察	6
6 . 結 語	9
7 . 謝 辞	9
8 . 参考文献	1 0

1. 要旨

目的 酢酸 (acetic acid: AA) および 5-フルオロウラシル (5-FU) によって誘発された口腔粘膜炎に対する熟成ニンニク抽出液 (aged garlic extract: AGE) の効果、ならびに AGE が 5-FU の抗腫瘍活性に影響を及ぼすかを担癌マウスを用いて検討する。

方法 マウスは 4 群 (コントロール群、AA 群、AA+5-FU 群、AA+5-FU+AGE 群) に分けた。コントロール群以外の群において、マウス扁平上皮癌細胞 (SCCVII) を用いて腫瘍を形成した。担癌マウスに対し、5-FU (18 mg/kg) を 9 日間腹腔内投与し、50%酢酸を舌背部に 1 日間局所塗布することで口腔粘膜炎を誘発した。AA+5-FU+AGE 群では、AGE (2.0 g/kg/日) を 10 日間投与して粘膜炎を治療し、その他の群には生理食塩水 (0.2 mL/日) を投与した。AGE の創傷治癒効果および抗腫瘍効果を評価した。舌および腫瘍サンプルを用いた全トランスクリプトーム解析および Ingenuity Pathway Analysis (IPA) により、AGE の創傷治癒作用および抗腫瘍作用の機序を検討した。

結果 AA+5-FU+AGE 群では、AA+5-FU 群と比較して体重が有意に増加し、さらに、腫瘍体積は他の群と比べて有意に減少した。AA+5-FU 群では、舌におけるトルイジンブルー陽性領域 (創傷面積) が最も大きく、唾液腺の大きさおよび重量はいずれも他群と比べて減少していた。一方、AA+5-FU+AGE 群では、AA+5-FU 群と比較して創傷面積が有意に縮小し、唾液腺の大きさおよび重量が増加した。これらの結果から、AGE 投与により、舌潰瘍および唾液腺障害を治癒させることが示唆された。全トランスクリプトーム解析および IPA の結果から、AGE は正常細胞の分化および角化を促進することにより 5-FU 誘発性口腔粘膜炎を治癒し、さらにマウス腫瘍における B 細胞の活性化を介して 5-FU の抗腫瘍効果を増強する可能性が示された。

結論 AGE は、酢酸および 5-FU 誘発性の口腔粘膜炎を軽減しつつ、5-FU の抗腫瘍活性を増強する可能性がある。したがって、AGE は 5-FU を基盤とした治療を受けるがん患者における口腔粘膜炎の治療に有用であることが示唆された。

キーワード : 熟成ニンニク抽出液 (AGE)、口腔粘膜炎、5-フルオロウラシル (5-FU)、酢酸 (AA)、唾液腺

2. 緒言

口腔粘膜炎は、化学療法および放射線療法の主要な有害反応の一つであり、入院期間や医療費の増加を招くとともに、がん患者の生存率に悪影響を及ぼすことが知られている (1, 2)。しかしながら、現在に至るまで重症口腔粘膜炎に対する有効な治療法は確立されていない。すなわち、口腔扁平上皮癌 (OSCC) を含むがん患者にとって、口腔粘膜炎は依然としてアンメット・メディカル・ニーズの一つである。重症の口腔粘膜炎が生じると、患者は急性の口腔痛、感染、出血、菌血症、敗血症、唾液腺萎縮、口腔乾燥など、様々な合併症に苦しむことになる。これらの症状は、唾液腺機能障害や口腔衛生状態の悪化と関連しており、特に免疫抑制状態にある患者では、栄養摂取不良、体重減少、さらには全身状態の悪化を引き起こす可能性がある (1-4)。抗

がん剤は、口腔・咽頭・消化管・皮膚の基底上皮や粘膜上皮、さらには幹細胞にも損傷を与え得る（6-9）。唾液腺機能および唾液分泌量は、口腔および咽頭健康と機能を維持するうえで重要な役割を果たしている（3）。唾液は、免疫グロブリン A（IgA）、ラクトフェリン、リゾチーム、ディフェンシン、ムチンなど多様なタンパク質・ペプチドにより、抗菌・潤滑・保護作用を発揮する（10）。口腔扁平上皮癌治療で一般的に用いられる 5-FU、タキサン系、白金製剤などの化学療法薬は唾液腺組織を障害し、唾液分泌量や唾液タンパク質を減少させることはよく知られており、これが口腔粘膜炎の発症や重症化に寄与している可能性がある（3、11-13）。化学療法に伴う口腔粘膜炎の予防または治療に用いられている既存の治療法は、その有効性が限定的であることが報告されている（14-17）。また、それらの多くは化学療法の有害作用から唾液腺やその機能を保護することを目的としていない。そのため、抗がん薬の副作用を軽減し、口腔粘膜炎に対する新規かつ有効な治療戦略を開発することが喫緊の課題となっている。

熟成ニンニク抽出物（AGE）は広く使用されているニンニク由来製品の一つであり、数多くの研究が行われ、商業的にも利用可能である。AGE は新鮮な刻みニンニクを水性エタノールに浸し、室温で 10 か月以上熟成させることにより調製され、この過程によって有益な成分や抗酸化物質の含量が増加する（18）。AGE は抗酸化（1、20）、抗炎症（21-23）、免疫調節（24-26）、抗がん作用（27）など幅広い健康効果を有することが報告されている。また、複数の臨床研究により、歯周病に対する有効性も示されている（2、29）。本研究では、AGE の抗酸化作用、抗炎症作用、創傷治癒作用が、口腔粘膜炎の軽減や唾液腺およびその機能の保護に有用である可能性があるかと仮定し、酢酸（acetic acid：AA）および 5-FU によって誘発された口腔粘膜炎に対する AGE の治癒効果を検討した。さらに、AGE が 5-FU による腫瘍抑制効果に寄与するかどうかについても検証を試みた。

3. 方法

(1) 実験動物

実験動物には 10 週齢の雌 C3H/HeJJcl マウス（n=16、日本クレア、東京、日本）を用いた。マウスは、山口大学の動物実験ガイドラインに従って、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育した。実験開始前に 1 週間、同環境下で順化させ、飼料と水は自由摂取とした。すべての動物実験は山口大学の動物実験委員会によって承認され（承認番号 55-024）、委員会の動物実験ガイドラインに準拠した。

(2) マウス腫瘍モデルの作製

16 匹のマウスは、偏りが生じないよう無作為に 4 群に割り付けた。すべての群のマウスは年齢および性別が同一であり、研究開始時の平均体重もほぼ同等であった。マウス扁平上皮癌細胞株である SCCVII を用いて、11 週齢の雌性 C3H/HeJJcl マウスに腫瘍を形成した。腫瘍は 12 匹のマウスにのみ形成し、残りの 4 匹は腫瘍を形成しないコントロール群とした。SCCVII 細胞（ 1×10^5 個）を無血清 DMEM 培地 0.1 mL に懸濁し、27 ゲージ針を用いて各マウスの背部皮下に注入した。腫瘍体積が約 1,000 mm³に達した時点で、これらのマウスを口腔粘膜炎実験に供した。腫瘍体積は実験終了まで 2 日ごとに測定し、 $0.5 \times \text{長径} \times (\text{短径})^2$ の式を用いて算出した。

(3) 口腔粘膜炎の誘発・治療

腫瘍保有マウス 12 匹を、day 0 (群分け日) に 3 群 (AA 群、AA+5-FU 群、AA+5-FU+AGE 群 ; 各 n=4) へ無作為に配分した。

コントロール群 (腫瘍なし : n = 4) を含めて、すべての群で平均体重が均等となるようにした。実験スケジュールを図 1 に示す。口腔粘膜炎を誘発するために、AA+5-FU 群および AA+5-FU+AGE 群は、5-FU (18 mg/kg/日、協和キリン株式会社、東京、日本) の腹腔内注射および舌背への 50%酢酸の局所塗布を行った。AA 群およびコントロール群は、5-FU の代わりに生理食塩水 (0.2 ml/日) を腹腔内投与し、AA 群はさらに 50%酢酸局所塗布を行った。5-FU および生理食塩水は 9 日間 (day 0~8) 投与し、酢酸は day 6 に 1 回、舌背へ 30 秒間塗布した。

口腔粘膜炎を治療するために、AA+5-FU+AGE 群には 10 日間 (day 0~9) 経口で AGE (2.0 g/kg/日 : 湧永製薬株式会社、東京、日本) を投与し、一方で、コントロール群、AA 群および AA+5-FU 群のマウスには経口で生理食塩水 (0.2 ml/日) を投与した。体重は 5-FU、生理食塩水または AGE の投与前に day 0~9 まで測定した。腫瘍成長に対する 5-FU の抗腫瘍効果が観察され、接種部位での腫瘍体積を定期的に測定した。実験は day 9 に終了し、すべてのマウスは二酸化炭素吸入により安楽死させた。腫瘍、舌および唾液腺 (顎下腺および舌下腺) は day 9 に採取し、潰瘍長径、重量を測定し、4%中性緩衝ホルムアルデヒドで固定した。唾液腺の体積は次の式で計算した : $0.4 \times \text{長径 (L)} \times \text{短径 (W)}^2$ 。

(4) トルイジンブルー染色による粘膜炎の評価

舌表面に形成された潰瘍性病変および創傷を可視化し、その大きさを評価するため、摘出した舌を 10%酢酸に溶解した 1%トルイジンブルー溶液で 1 分間染色した。染色後、過剰な染料が完全に除去されるまで、1%酢酸で繰り返し洗浄した。トルイジンブルー陽性の創傷は、まず定規を用いて手動で測定し、各舌の創傷面積を以下の式により算出した : $\text{面積 (mm}^2\text{)} = \text{長径 (L)} \times \text{短径 (W)}$ 。その後、デジタルカメラで舌の画像を取得し、ImageJ 1.54m ソフトウェア (米国国立衛生研究所、メリーランド州ロックビル ; <https://imagej.net/ij/>) を用いてトルイジンブルー染色領域を測定・再計算し、得られたデータの確認を行った。

(5) 舌組織の HE 染色および組織学的検討

舌組織サンプルは、室温下で 4%中性緩衝パラホルムアルデヒドにより 24 時間固定した後、パラフィン包埋した。厚さ $4 \mu\text{m}$ の組織切片を作製し、HE 染色を行った。切片はキシレンに浸漬した後、段階的にエタノール (100%~70%) で処理し、室温下で水道水により洗浄した。その後、ヘマトキシリン溶液に 10 分間浸漬し、1%酸性エタノールに 30 秒間、1%アンモニア水に 30 秒間浸漬した後、流水下で十分に洗浄した。次に、エオシン溶液で 1 分間染色し、段階的にエタノール (70%~100%) およびキシレンにより脱水処理を行った。Histoclear (National Diagnostics, Atlanta, 米国ジョージア州アトランタ) で透徹処理を行った後、DPX 封入剤 (Sigma-Aldrich ; Merck KGaA、ドイツ・ダルムシュタット) を用いてガラスカバーガラスで封入した。

その後、各舌組織の潰瘍性病変および創傷を蛍光顕微鏡 (BX51 : Olympus Corporation、東京) 下で観察・評価し、病変の大きさ (長径) を測定した。

(6) 全トランスクリプトーム解析

舌および腫瘍サンプルは凍結保存した後、全トランスクリプトーム解析に用いた。総 RNA は、Maxwell RSC Simply RNA Tissue Kit (Promega 社、米国ウィスコンシン州マディソン) を用いて抽出した。RNA 濃度は Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific 社、米国マサチューセッツ州ウォルサム) により測定し、その後、高感度 RNA キット (Agilent Technologies 社) を用いて TapeStation 4200 (Agilent Technologies 社、米国カリフォルニア州サンタクララ) で RNA の品質を評価した。すべてのサンプルにおいて RNA Integrity Number (RIN) 値は 7.6 以上であった。

総 RNA 100 ng を用い、NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (#E7490; New England BioLabs [NEB] 社、米国マサチューセッツ州イプスウィッチ) および NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (#E7760; NEB) を用いて、poly(A) RNA の回収および断片化を行った。簡潔に述べると、poly(A) RNA はオリゴ dT ビーズを用いて回収され、NEBNext first strand synthesis reaction buffer および NEBNext random primers の存在下、94℃で 15 分間インキュベートすることで断片化した。断片化した poly(A) RNA は、NEBNext first strand synthesis enzyme mix を用いて逆転写し、一本鎖 cDNA が合成した。続いて、NEBNext second strand synthesis enzyme mix を用いて二本鎖 cDNA を合成し、AMPure XP (#A63882, Beckman Coulter, Inc., 米国カリフォルニア州パサデナ) を用いて精製した。

その後、NEBNext adaptor (#E6448, NEB) を用いて cDNA にアダプター配列を付加し、AMPure XP により精製した。cDNA は c1000 Touch サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories, Inc., 米国カリフォルニア州ハーキュリーズ) を用いて PCR 増幅を行った。増幅過程において、NEBNext multiplex oligos for Illumina (#E6448, NEB) を用いてバーコード配列を各サンプルに付加した。増幅後のライブラリーは AMPure XP により精製した。

ライブラリー濃度は Qubit 2.0 fluorometer (Thermo Fisher Scientific) で測定し、ライブラリーのサイズ分布は TapeStation 4200 D1000 (#5067-5582, Agilent Technologies) を用いて解析した。ライブラリーは Illumina NovaSeq 6000 シーケンサー (Illumina, Inc., 米国カリフォルニア州サンディエゴ) により、Illumina NovaSeq 6000 S1 reagent kit ver1.5 (100 サイクル, Illumina) を用いてシーケンスした。各サンプルあたり 5,000 万リード以上が得られ、CLC Genomics Workbench software 22.0.1 (Qiagen, 米国カリフォルニア州サンタクラリタ) を用いてトリミングおよびマウス参照ゲノム GRCm38 release-94 へのマッピングを行った。各サンプルにおけるマッピング率は 97%以上であった。

(7) Ingenuity network analysis

Prism (ver.9.0.3; GraphPad Software, Inc.) を使用して相関分析を実施した。相関分析において有意に増減した遺伝子群は、IPA ソフトウェア (バージョン 8.6, Qiagen GmbH) を使用してネットワーク解析を行った。IPA ソフトウェアにより、データセットに含まれる分子および細胞機能、ならびにデータセットに代表される canonical pathway が明らかにされた。IPA ソフトウェアは、文献で報告されている膨大な分子間相互作用情報を基盤として構築されており、週 1 回更新されている。IPA では、発現変動遺伝子がナレッジベース (QIAGEN Knowledge Base) と比較

して特定のパスウェイと有意に関連しているかどうかを評価するために、Fisher の正確確率検定が用いている。

(8) 統計解析

すべてのデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) として示した。マウスの体重および腫瘍体積のデータは、二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行った後、多重比較のために Tukey-Kramer 法による事後検定を用いて比較した。舌のトルイジンブルー染色 (創傷) 面積および唾液腺重量のデータは、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った後、Tukey-Kramer 法による事後検定を用いて比較した。有意差は $P < 0.05$ と定義した。すべての統計解析は、StatView v.5.0J ソフトウェア (SAS Institute, Inc. 米国ノースカロライナ州ケリー) を用いて実施した。

4. 結果

(1) マウスの体重および腫瘍体積に対する AGE の影響

肉眼的には、各マウス群間で体重や腫瘍サイズに顕著な差は認められなかった (図 2a)。しかし、AA + 5-FU 群のマウスは、他のすべての群と比較して体重が低く、腫瘍体積は 2 番目に大きかった (図 2b、c)。体重については、AA + 5-FU 群とコントロール群との間に有意差が認められたが、AA + 5-FU + AGE 群とコントロール群との間には有意差は認められなかった。AA + 5-FU + AGE 群では、AGE 投与により体重減少がある程度改善したように見受けられた (図 2b)。

腫瘍体積は、AA + 5-FU + AGE 群において、AA + 5-FU 群および AA 群と比較して有意に減少していた。したがって、AGE は 5-FU の抗腫瘍効果を阻害することではなく、むしろ 5-FU の効果をある程度増強することで腫瘍増殖を抑制した可能性が示唆された (図 2c)。

(2) 舌背部の創傷部位、潰瘍性病変に対する AGE の影響

酢酸の局所塗布、5-FU 投与によって誘発された創傷や口腔粘膜炎症は、肉眼では十分な評価が困難であった。染色を行わない場合、AA + 5-FU 群を除くすべての群において、創傷部位や潰瘍性病変は明瞭には観察されなかった (図 3a 左)。一方、トルイジンブルー染色後には、マウス舌上の創傷部位および潰瘍がすべての群で明瞭に可視化された (図 3a 右)。AA + 5-FU 群の舌は強い染色性を示し、AA 群では中等度の染色が認められた。AA + 5-FU + AGE 群における粘膜炎症／創傷 (トルイジンブルー陽性) 面積は、他のすべての群と比較して減少しており、特に AA + 5-FU 群と比較して有意に小さかった (図 3a、b)。

図 3c に示す舌切片の H&E 染色では、舌表面にびらんまたは潰瘍性病変が観察された。AA + 5-FU 群では、極めて萎縮した、あるいは上皮が欠失した領域が認められ、その範囲は他の群よりも著しく大きかった。これに対し、AA + 5-FU + AGE 群および AA 群では、舌背部における上皮化が明瞭に観察された。したがって、AGE 治療は、AA + 5-FU + AGE 群においてマウス舌のびらんまたは潰瘍性病変を減少させ、創傷部位の上皮化を促進する可能性が示された (図 3c)。これらの結果は、AGE が 5-FU および AA によって誘発される舌の損傷を保護・治癒する作用を有することを示唆している。

(3) マウスの唾液腺の大きさおよび重量に対する AGE の影響

唾液分泌量の低下は、がん化学療法を受ける患者における口腔粘膜炎と関連していることが報告されている (35)。本研究では、各マウス群における唾液腺の大きさおよび重量を評価した。唾液腺の大きさは、コントロール群と比較してすべての処置群 (AA 群、AA + 5-FU 群、AA + 5-FU + AGE 群) で小さく、特に AA + 5-FU 群で顕著であった。しかしながら、AA + 5-FU + AGE 群の唾液腺は、AA + 5-FU 群と比較して著しく大きかった (図 4a)。

また、唾液腺の平均重量については、コントロール群と AA 群との間に有意差は認められなかった。一方、AA + 5-FU 群では、5-FU および AA 処置後に唾液腺重量が有意に減少したが、AA + 5-FU + AGE 群では減少量が少なかった (図 4b)。これらの結果から、AGE は 5-FU および AA によって引き起こされる唾液腺の萎縮を抑制することが示唆された。

(4) AGE の創傷治癒作用および抗腫瘍効果の作用機序

AGE の創傷治癒作用および抗腫瘍効果の機序を理解するため、AA + 5-FU 群と AA + 5-FU + AGE 群の舌および腫瘍サンプルを用いて全トランスクリプトーム解析を行った。次世代シーケンシングおよび IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用い、両群間で発現変動が生じた可能性のある特定の遺伝子群を探索した。舌サンプルにおいて最も関連性の高い canonical pathway では、創傷治癒に重要な角化過程に関連する遺伝子群が示された (図 5a)。図 5a の一部 (赤枠で示した部分) を拡大したものを図 5b に示す。AA + 5-FU + AGE 群と AA + 5-FU 群を比較すると、AA + 5-FU + AGE 群において角化過程に関連する遺伝子の活性化が認められた (図 5b)。

ネットワーク解析では、AA + 5-FU + AGE 群において、プロテインキナーゼ B (PKB) または Akt キナーゼの活性化に加え、それに続くセリンプロテアーゼおよびカリクレインの集積が示された (図 5c)。Akt キナーゼは細胞生存の制御に関与しており、Akt はセリンプロテアーゼやカリクレインとともに、創傷治癒および損傷した表皮の修復に関与することが知られている。さらに、ネットワーク 3 では、AA + 5-FU + AGE 群においてケラチン関連タンパク質の顕著な集積が観察された (図 5d)。

図 5e は腫瘍サンプルにおいて最も関連性の高い canonical pathway を示している。図 5e の赤枠で示した部分を拡大したものが図 5f である。AA + 5-FU + AGE 群と AA + 5-FU 群を比較すると、B 細胞受容体 (BCR) および T 細胞受容体 (TCR) の発現上昇が認められた (図 5f)。また、ネットワーク解析 (ネットワーク 2) においても、AA + 5-FU + AGE 群で BCR 複合体および免疫グロブリンの集積が示された (図 5g)。

以上の結果から、AGE は角化や再上皮化を含む正常細胞の分化過程を促進することにより、AA および 5-FU によって誘発される口腔粘膜炎における潰瘍の治癒に寄与することが示唆される。さらに、AGE は B 細胞の活性化を介して、腫瘍における 5-FU の抗腫瘍効果に寄与する可能性があると考えられる。

5. 考察

化学療法あるいは化学放射線療法によって引き起こされる口腔粘膜炎は、摂食や嚥下機能に障害をもたらし、がん患者における低栄養のリスクを高めるとともに、QOL (quality of life) を

著しく低下させる。本予備的研究では、マウスモデルを用いて、AGE が酢酸、5-FU によって誘発される口腔粘膜炎に対して治癒効果を示すかどうかを明らかにすることを目的とした。また、AGE 自体の抗腫瘍特性や、5-FU の抗腫瘍活性に対する影響についても検討した。

本研究の結果、5-FU 投与と AA 塗布を併用した AA + 5-FU 群では広範な口腔粘膜炎病変が誘発されたが、AA + 5-FU + AGE 群では AGE の投与によりこれらの病変が治癒することが示された (図 3)。さらに、唾液腺の大きさおよび重量は、コントロール群と比較して AA + 5-FU 群で減少していたが、AA + 5-FU + AGE 群では AGE 投与により唾液腺の大きさおよび重量が回復した (図 4)。これらの結果から、AGE の投与は、5-FU の副作用を抑制することにより酢酸および 5-FU 誘発性の口腔粘膜炎を軽減し、さらに 5-FU によって引き起こされる唾液腺の萎縮性変化から唾液腺を保護し、その機能を回復させることが示唆された。

急性の口腔粘膜炎は、唾液分泌低下に加え、抗菌因子や粘膜保護因子 (ラクトフェリン、ディフェンシン、糖タンパク質、IgA、上皮成長因子、ムチンなど) の不足によっても引き起こされることが知られている (4, 36)。唾液分泌量の低下は、5-FU 誘発性口腔粘膜炎の発症頻度が高い理由の一つである可能性がある (4)。これらの点を踏まえると、AGE が 5-FU による唾液腺の萎縮性変化に対して示す保護作用は、口腔粘膜炎に対する AGE の治癒効果に直接的に寄与している可能性がある。

本研究では、AGE の治癒効果および抗腫瘍特性の背後にある分子機構を理解するために、マウスの腫瘍および舌を対象として RNA シーケンスおよびパスウェイ解析を行った。AA + 5-FU + AGE 群の舌サンプルを AA + 5-FU 群と比較したところ、IPA 解析により、AA + 5-FU + AGE 群において角化に関連する遺伝子の活性化が示された (図 5b)。セラチノサイトはセラチンタンパク質を産生・貯蔵しており、これらのタンパク質は、損傷した上皮表面を覆うために不可欠な再上皮化過程を通じて、損傷後の表皮の回復に重要な役割を果たす (37)。角化および再上皮化が起こらなければ、創傷は治癒したとは言えない (8)。また、IPA データでは、セラチン関連タンパク質の集積も観察された (ネットワーク 3、図 5d)。

さらに、パスウェイ解析により、AA + 5-FU + AGE 群において Akt キナーゼの活性化が示された (図 5c)。セリン/スレオニンキナーゼである Akt は、表皮の恒常性維持に加え、セラチノサイトの機能、分化、生存の維持に重要であることが知られている (39)。Akt キナーゼおよびホスホイノシチド 3 キナーゼ (PI3K) /Akt 経路は、細胞生存や急性創傷治癒に関与する重要な過程を制御している [40]。加えて、AA + 5-FU + AGE 群では、セリンプロテアーゼおよびカリクレインの集積も認められた (図 5c)。カリクレイン関連ペプチダーゼを含むセリンプロテアーゼは、創傷治癒および損傷した表皮の修復に関与することが報告されている (41, 42)。

以上の結果から、AGE は Akt キナーゼの活性化ならびにカリクレインやその他のセリンプロテアーゼの集積を介して、角化、再上皮化、および正常な細胞分化過程を促進することにより、酢酸および 5-FU によって誘発される口腔粘膜炎に対する創傷治癒を促進することが示唆された。

本研究では、AA + 5-FU + AGE 群において腫瘍体積が AA + 5-FU 群および AA 群と比較して有意に減少していたことから、AGE 治療が 5-FU の有効性をある程度増強したことが観察された (図 2c)。AGE には免疫調節作用があることが既に報告されている (28, 30)。AGE には、S-アリルシステインおよび S-アリルメルカプトシステインといったピルビン酸誘導体が含まれており、これらはがん細胞の増殖や進展を抑制し、がん予防に寄与することが知られている (29-31, 43)。本研究における RNA シーケンスおよびパスウェイ解析の結果、AA + 5-FU + AGE 群では B

細胞受容体（BCR）およびT細胞受容体（TCR）の発現上昇、ならびにBCR複合体および免疫グロブリンの集積が認められた（図 5e-g）。B細胞は複数の免疫経路における主要なエフェクター細胞であり、免疫グロブリンを分泌してT細胞応答を促進することで間接的に、あるいはがん細胞を直接殺傷することで、腫瘍進展を抑制する（44）。したがって、AGEはB細胞の活性化を介して、皮下腫瘍における5-FUの抗腫瘍効果に寄与する可能性があると考えられる。本研究の結果は、AGEが5-FUのような化学療法薬の効果を高める可能性、あるいはAGE自体が抗がん作用を有する可能性を示している。

創傷治癒には、細胞増殖および移動の亢進、血管新生、真皮マトリックスの再生、再上皮化が必須であり（24、45）、AGEはこれらすべての過程を促進することが報告されている（24、26、46）。しかし、がん細胞もまた、細胞増殖、移動、浸潤、血管新生が過剰かつ制御不能に亢進しているという特徴を有する（47、48）。AGEが正常細胞では創傷治癒を促進しつつ、がん細胞では抗腫瘍効果を示すという点は興味深いことである（図 2、3）。この現象については別の研究で検討を行っており、AGEが非がん細胞（ヒト表皮角化細胞および真皮線維芽細胞株）とがん細胞（口腔扁平上皮癌およびヒト歯肉癌由来細胞株）に対して異なる影響を及ぼすことを観察した（46）。すなわち、AGEはPKBまたはAktタンパク質や脳由来神経栄養因子（BDNF）経路の誘導、ならびにフェロトーシスの抑制を通じて正常細胞の増殖および生存を促進する一方で、がん転移におけるシグナル伝達過程を抑制し、食食活性を亢進することにより、がん細胞の増殖を抑制することが示された（46）。これらの結果から、AGEは正常細胞の増殖を促進するが、がん細胞では正常細胞と異なる細胞プロセスおよびシグナル伝達経路を介して、細胞増殖を抑制すると考えられる（46）。

しかしながら、AGEの創傷治癒作用および抗腫瘍作用の基盤となる詳細な機序は、いまだ十分には解明されていない。AGEには機能の異なる複数の活性成分が含まれているため、それぞれの成分が細胞の種類や増殖様式、あるいはその他の特性（正常細胞かがん細胞か、損傷細胞か機能障害細胞か）に応じて異なる影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、AGEには未同定の活性成分や性質がさらに存在する可能性もある。そのため、正常細胞およびがん細胞におけるAGEの役割や、創傷治癒作用および抗腫瘍作用の機序を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

本研究において興味深かった点は、腫瘍を有するマウスが、AGE治療後に5-FUによって誘発された体重減少から回復したことである（図 2b）。すなわち、AGEは粘膜炎に対する治癒効果を示しただけでなく、マウスの全身状態の改善にも寄与した。AGEの抗疲労作用は以前から知られており、多くの研究で検討されている（49、50）。さらに、AGE治療は重度の損傷後であっても唾液腺を治癒させ、その機能を回復させることが示された（図 4a、b）。

本研究にはいくつかの限界があり、ひとつはサンプルサイズが小さいため、データの再現性が低くなる可能性が挙げられる。また、雌マウスのみを使用していることから、性差によるバイアスが生じている可能性も否定できない。さらに、小規模コホートにおける組織サンプルのゲノム解析は、信頼性の低いデータを生み出すリスクを伴う可能性がある。

しかしながら、本研究は、AGEが口腔粘膜炎に及ぼす治癒効果に関する予備的データを得ること、およびAGEの作用機序の候補を同定することを目的として実施された。そのため、倫理的配慮および実験動物の使用数を最小限に抑える目的から、各群4匹の動物を用いた。本研究では盲検化は実施していないが、研究期間中に外部の研究者による結果のモニタリングおよび評価が行

われ、すべてのデータが正確かつ妥当であることが慎重に確認された。

我々は、本研究で用いた *in vivo* 口腔粘膜炎症モデルは、ばらつきの少ない結果を得られる可能性が高いと考えているが、それでもなお、本研究の知見を検証するためには、より大きなサンプルサイズを用いた将来的な研究が必要である。今後の研究では、事前の検出力（パワー）計算に基づいて適切なサンプルサイズを決定し、データの信頼性および再現性を向上させるために、雌雄両方のマウスを用いた大規模な実験を行う予定である。

化学療法を受けるがん患者の約 30～40%、および化学放射線療法を受ける頭頸部がん患者のほぼ 90%が口腔粘膜炎症を発症すると報告されている（51）。口腔粘膜炎症に対する治療選択肢は非常に限られており、これらの治療法の有効性も依然として十分とは言えない（14-17、51）。このような状況において、抗生物質作用、抗菌・抗真菌作用、コレステロール低下作用、抗血栓作用、降圧作用、創傷治癒能、さらには抗がん作用など、幅広い潜在的薬理効果を有し、伝統的に利用・評価されてきたニンニクのような天然物は、がん患者における口腔粘膜炎症の治療において大きな有用性を持つ可能性がある（19-31、51、52）。いくつかの臨床研究では、AGE が末梢組織の血流および微小循環を改善することにより、動脈硬化や心血管疾患患者における創傷治癒を促進することが報告されている（25、26）。一方、他の研究では、前臨床モデルにおける AGE の創傷治癒作用が示されている（4、24、27）。さらに、AGE の歯周病に対する有効性についても臨床的に検討されている（32、33）。AGE は高い抗酸化作用および抗炎症作用を有しており、これらは創傷治癒において重要な役割を果たす（19-23、28、29）。したがって、AGE が有するこれらの有益な特性の総和が、口腔粘膜炎症に対する治癒効果の基盤となっている可能性がある。

本研究の結果は、AGE が口腔粘膜炎症に対して有効である可能性を示すとともに、口腔扁平上皮癌（OSCC）患者において化学療法薬の抗腫瘍活性を増強する可能性も示唆している。したがって、AGE 治療は、特に重度の口腔粘膜炎症や免疫機能低下を伴う 5-FU ベースの治療を受けているがん患者において、がん治療期間中に有益な効果をもたらす可能性があると考えられる。AGE の口腔粘膜炎症およびがんに対する有効性を十分に理解するためには、臨床試験を含むさらなる大規模研究が必要である。本予備的研究は、口腔粘膜炎症に対する AGE 治療の潜在的有用性を理解する一助となり、将来的に OSCC 患者を対象とした新たな臨床試験や、AGE を基盤とした新規治療レジメンの開発につながる可能性がある。

6. 結語

AGE は、酢酸および 5-FU によって誘発されるマウスの口腔粘膜炎症を軽減しつつ、5-FU の抗腫瘍活性を増強する可能性がある。したがって、AGE は 5-FU を基盤とした治療を受けるがん患者における口腔粘膜炎症の治療に有用である可能性が示唆された。

7. 謝辞

山口大学大学院医学系研究科病理形態学講座の崔 丹准教授に技術的なサポートと有益な助言をいただき、心より感謝申し上げます。

本研究は、文部科学省の科学研究費助成事業（研究課題番号 23K09354）により一部支援を受けました。

8. 参考文献

1. Duncan M, Grant G. Oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003;18(9):853-874. doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01784.x.
2. Burdelya LG, Gleiberman AS, Toshkov I, Aygun-Sunar S, Bapardekar M, Manderscheid-Kern P, Bellnier D. et al. Toll-like receptor 5 agonist protects mice from dermatitis and oral mucositis caused by local radiation: implications for head-and-neck cancer radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83(1):228-234. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.05.055.
3. Sonis ST. Oral mucositis. *Anticancer Drugs.* 2011;22(7):607-612. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283462086.
4. McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol.* 1998;34(6):484-490. doi: 10.1016/s1368-8375(98)00068-2.
5. Miyano K, Ueno T, Yatsuoka W, Uezono Y. Treatment for cancer patients with oral mucositis: assessment based on the mucositis study group of the multinational association of supportive care in cancer in international society of oral oncology (MASCC/ISOO) in 2013 and proposal of possible novel treatment with a Japanese herbal medicine. *Curr Pharm Des.* 2016;22(15):2270-2278. doi: 10.2174/1381612822666160219120842.
6. Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am.* 2008;52(1):61-77. doi: 10.1016/j.cden.2007.10.002.
7. Anderson PM, Schroeder G, Skubitz KM. Oral glutamine reduces the duration and severity of stomatitis after cytotoxic cancer chemotherapy. *Cancer.* 1998;83(7):1433-1439. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19981001)83:7<1433::aid-cnrcr22>3.0.co;2-4.
8. Kyllö RL, Anadkat MJ. Dermatologic adverse events to chemotherapeutic agents, part 1: cytotoxics, epidermal growth factor receptors, multikinase inhibitors, and proteasome inhibitors. *Semin Cutan Med Surg.* 2014;33(1):28-39. doi: 10.12788/j.sder.0060.
9. Shou J, Lieberman MD, Hofmann K, Leon P, Redmond HP, Davies H, Daly JM. Dietary manipulation of methotrexate-induced enterocolitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1991;15(3):307-312. doi: 10.1177/0148607191015003307.

10. Campos MI, Campos CN, Aarestrup FM, Aarestrup BJ. Oral mucositis in cancer treatment: Natural history, prevention and treatment. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(3):337-340. doi: 10.3892/mco.2014.253.
11. Keefe DM, Schubert MM, Elting LS, Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, Migliorati CA. et al. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*. 2007;109(5):820-831. doi: 10.1002/cncr.22484.
12. Peterson DE, Bensadoun RJ, Roila F. ESMO Guidelines Working Group. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical recommendations. *Ann Oncol*. 2009;20(Suppl 4):174-177. doi: 10.1093/annonc/mdp165.
13. Quinn B, Potting CM, Stone R, Blijlevens NM, Flidner M, Margulies A, Sharp L. Guidelines for the assessment of oral mucositis in adult chemotherapy, radiotherapy and haematopoietic stem cell transplant patients. *Eur J Cancer*. 2008;44(1):61-72. doi: 10.1016/j.ejca.2007.09.014.
14. Henke M, Alfonsi M, Foa P, Giralt J, Bardet E, Cerezo L, Salzwimmer M. et al. Palifermin decreases severe oral mucositis of patients undergoing postoperative radiochemotherapy for head and neck cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*. 2011;29(20):2815-2820. doi: 10.1200/JCO.2010.32.4103.
15. Bensinger W, Schubert M, Ang KK, Brizel D, Brown E, Eilers JG, Elting L. et al. NCCN Task Force Report. prevention and management of mucositis in cancer care. *J Natl Compr Canc Netw*. 2008;6(Suppl 1):S1-21. quiz S22-24.
16. Svanberg A, Ohrn K, Birgegård G. Oral cryotherapy reduces mucositis and improves nutrition - a randomised controlled trial. *J Clin Nurs*. 2010;19(15-16):2146-2151. doi: 10.1111/j.1365-2702.2010.03255.x.
17. Scully C, Epstein J, Sonis S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: diagnosis and management of mucositis. *Head Neck*. 2004;26(1):77-84. doi: 10.1002/hed.10326.
18. Kadera Y, Kurita M, Nakamoto M, Matsutomo T. Chemistry of aged garlic: Diversity of constituents in aged garlic extract and their production mechanisms via the combination of chemical and enzymatic reactions. *Exp Ther Med*. 2020;19(2):1574-1584. doi: 10.3892/etm.2019.8393.

19. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr.* 2001;131(3s):1010S-1015S. doi: 10.1093/jn/131.3.1010S.
20. Tsuneyoshi T. BACH1 mediates the antioxidant properties of aged garlic extract. *Exp Ther Med.* 2020;19(2):1500-1503. doi: 10.3892/etm.2019.8380.
21. Morihara N, Hino A, Miki S, Takashima M, Suzuki JI. Aged garlic extract suppresses inflammation in apolipoprotein E-knockout mice. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(10):1700308. doi: 10.1002/mnfr.201700308.
22. Suzuki JI, Kodera Y, Miki S, Ushijima M, Takashima M, Matsutomo T, Morihara N. Anti-inflammatory action of cysteine derivative S-1-propenylcysteine by inducing MyD88 degradation. *Sci Rep.* 2018;8(1):14148. doi: 10.1038/s41598-018-32431-0.
23. Miki S, Suzuki JI, Kunimura K, Morihara N. Mechanisms underlying the attenuation of chronic inflammatory diseases by aged garlic extract: Involvement of the activation of AMP-activated protein kinase. *Exp Ther Med.* 2020;19(2):1462-1467. doi: 10.3892/etm.2019.8372.
24. Ejaz S, Chekarova I, Cho JW, Lee SY, Ashraf S, Lim CW. Effect of aged garlic extract on wound healing: a new frontier in wound management. *Drug Chem Toxicol.* 2009;32(3):191-203. doi: 10.1080/01480540902862236.
25. Lindstedt S, Wlosinska M, Nilsson AC, Hlebowicz J, Fakhro M, Sheikh R. Successful improved peripheral tissue perfusion was seen in patients with atherosclerosis after 12 months of treatment with aged garlic extract. *Int Wound J.* 2021;18(5):681-691. doi: 10.1111/iwj.13570.
26. Wlosinska M, Nilsson AC, Hlebowicz J, Malmsjo M, Fakhro M, Lindstedt S. Aged garlic extract preserves cutaneous microcirculation in patients with increased risk for cardiovascular diseases: A double-blinded placebo-controlled study. *Int Wound J.* 2019;16(6):1487-1493. doi: 10.1111/iwj.13220.
27. Ramadan G, El-Beih NM, Ahmed RS. Aged garlic extract ameliorates immunotoxicity, hematotoxicity and impaired burn-healing in malathion- and carbaryl-treated male albino rats. *Environ Toxicol.* 2017;32(3):789-798. doi: 10.1002/tox.22279.
28. Kyo E, Uda N, Kasuga S, Itakura Y. Immunomodulatory effects of aged garlic extract. *J Nutr.* 2001;131(3s):1075S-1079S. doi: 10.1093/jn/131.3.1075S.

29. Suzuki J, Yamaguchi T, Matsutomo T, Amano H, Morihara N, Kodera Y. S-1-Propenylcysteine promotes the differentiation of B cells into IgA-producing cells by the induction of Erkl/2-dependent Xbpl expression in Peyer's patches. *Nutrition*. 2016;32(7-8):884-889. doi: 10.1016/j.nut.2016.01.026.
30. Suzuki JI, Miki S, Ushijima M, Kodera Y. Regulation of immune response by S-1-propenylcysteine through autophagy-mediated protein degradation. *Exp Ther Med*. 2020;19(2):1570-1573. doi: 10.3892/etm.2019.8392.
31. Lv Y, So KF, Wong NK, Xiao J. Anti-cancer activities of S-allylmercaptocysteine from aged garlic. *Chin J Nat Med*. 2019;17(1):43-49. doi: 10.1016/S1875-5364(19)30008-1.
32. Zini A, Mann J, Mazor S, Vered Y. The efficacy of aged garlic extract on gingivitis - a randomized clinical trial. *J Clin Dent*. 2018;29(2):52-56.
33. Zini A, Mann J, Mazor S, Vered Y. Beneficial effect of aged garlic extract on periodontitis: a randomized controlled double-blind clinical study. *J Clin Biochem Nutr*. 2020;67(3):297-301. doi: 10.3164/jcbrn.20-52.
34. Snodgrass MJ, Burke JD, Meetz GD. Inhibitory effect of shark serum on the Lewis lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1976;56(5):981-984. doi: 10.1093/jnci/56.5.981.
35. Saegusa Y, Ichikawa T, Iwai T, Goso Y, Ikezawa T, Nakano M, Shikama N. et al. Effects of acid antiseecretory drugs on mucus barrier of the rat against 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(5):531-537. doi: 10.1080/00365520701811693.
36. Epstein JB, Tsang AH, Warkentin D, Ship JA. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(1):39-44. doi: 10.1067/moe.2002.126018.
37. Konop M, Sulejczak D, Czuwara J, Kosson P, Misicka A, Lipkowski AW, Rudnicka L. The role of allogenic keratin-derived dressing in wound healing in a mouse model. *Wound Repair Regen*. 2017;25(1):62-74. doi: 10.1111/wrr.12500.
38. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB. et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014;3(7):445-464. doi: 10.1089/wound.2013.0473.

39. Roy T, Boateng ST, Uddin MB, Banang-Mbeumi S, Yadav RK, Bock CR, Folahan JT. et al. The PI3K-Akt-mTOR and associated signaling pathways as molecular drivers of immune-mediated inflammatory skin diseases: update on therapeutic strategy using natural and synthetic compounds. *Cells*. 2023;12(12):1671. doi: 10.3390/cells12121671.
40. Jere SW, Houreld NN, Abrahamse H. Role of the PI3K/AKT (mTOR and GSK3beta) signalling pathway and photobiomodulation in diabetic wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2019;50:52-59. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.03.001.
41. Chao J, Shen B, Gao L, Xia CF, Bledsoe G, Chao L. Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing. *Biol Chem*. 2010;391(4):345-355. doi: 10.1515/BC.2010.042.
42. Kishibe M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *J Dermatol Sci*. 2019;95(2):50-55. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.06.007.
43. Thomson M, Ali M. Garlic [*Allium sativum*]: a review of its potential use as an anti-cancer agent. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003;3(1):67-81. doi: 10.2174/1568009033333736.
44. Tokunaga R, Naseem M, Lo JH, Battaglin F, Soni S, Puccini A, Berger MD. et al. B cell and B cell-related pathways for novel cancer treatments. *Cancer Treat Rev*. 2019;73:10-19. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.12.001.
45. Almadani YH, Vorstenbosch J, Davison PG, Murphy AM. Wound healing: a comprehensive review. *Semin Plast Surg*. 2021;35(3):141-144. doi: 10.1055/s-0041-1731791.
46. Harada K, Ferdous T, Kawasaki K, Watanabe K, Mizukami Y. Effects of aged garlic extract may differ between normal cells and cancer cells. *Biomed Rep*. 2025;23(3):150. doi: 10.3892/br.2025.2028.
47. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867. doi: 10.1038/nature01322.
48. Tan Y, Wang Z, Xu M, Li B, Huang Z, Qin S, Nice EC. et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *Int J Oral Sci*. 2023;15(1):44. doi: 10.1038/s41368-023-00249-w.
49. Wakunaga of America Co., Ltd. Aged Garlic Extract. Research Excerpts from Peer

Reviewed Scientific Journals & Scientific Meetings. <https://www.kyolic.ca/wp-content/uploads/2016/03/Aged-Garlic-Research-Excerpts.pdf>. Accessed August 1, 2025.

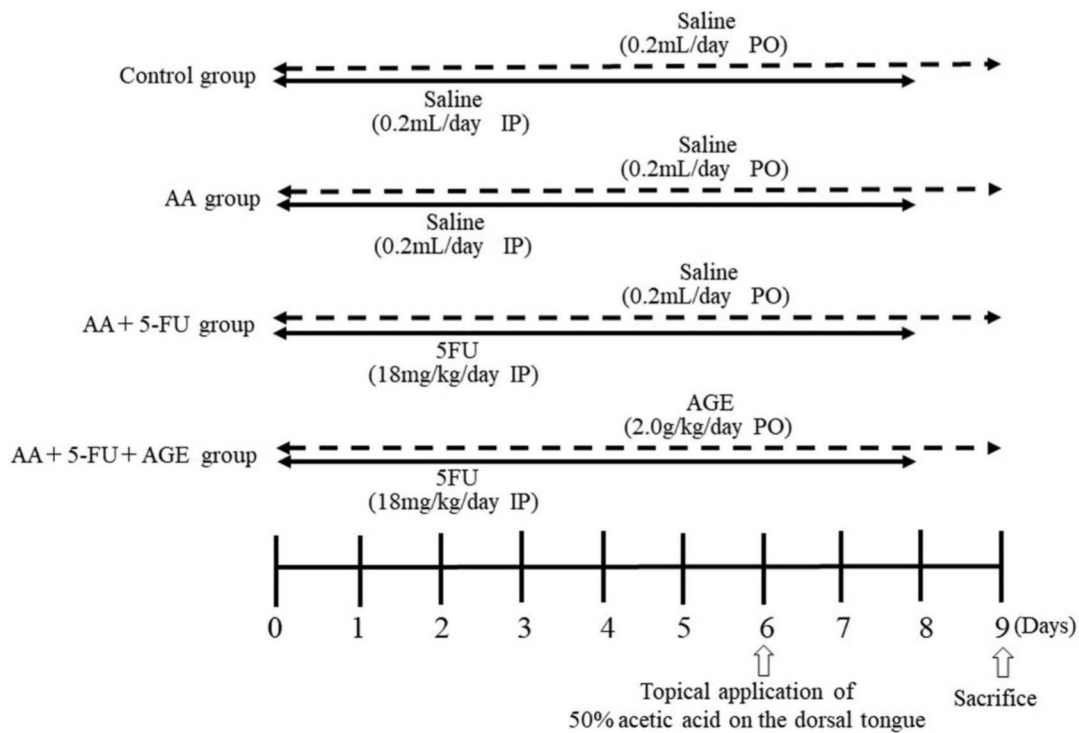
50. Morihara N, Nishihama T, Ushijima M, Ide N, Takeda H, Hayama M. Garlic as an anti-fatigue agent. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(11):1329-1334. doi: 10.1002/mnfr.200700062.

51. Pulito C, Cristaudo A, Porta C, Zapperi S, Blandino G, Morrone A, Strano S. Oral mucositis: the hidden side of cancer therapy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39(1):210. doi: 10.1186/s13046-020-01715-7.

52. Petrovska BB, Cekovska S. Extracts from the history and medical properties of garlic. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(7):106-110. doi: 10.4103/0973-7847.65321.

図 1. 実験プロトコールおよびスケジュール

Figure 1



AA 群、AA+5-FU 群、AA+5-FU+AGE 群の 3 群は、SCCVII 腫瘍担持マウス（各群 n=4）であり、もう 1 群は腫瘍を有さないコントロール群（n=4）である。

AA+5-FU 群および AA+5-FU+AGE 群では、5-FU（18 mg/kg/日）を 9 日間（0 日目から 8 日目）腹腔内投与することにより口腔粘膜炎を誘発した。一方、コントロール群および AA 群には、同期間に生理食塩水（0.2 mL/日）を腹腔内投与した。

コントロール群を除くすべての群のマウスには、6 日目に舌背部へ 50%酢酸を塗布した。

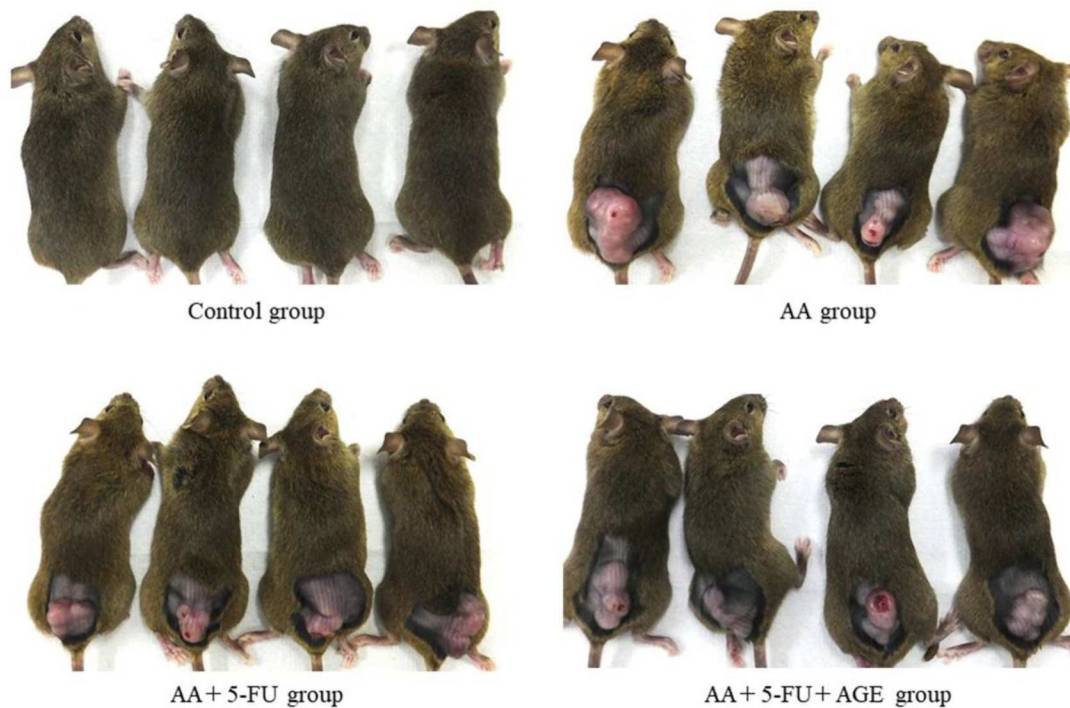
口腔粘膜炎の治療として、AA+5-FU+AGE 群には AGE（2.0 g/kg/日）を 10 日間（0 日目から 9 日目）経口投与し、コントロール群、AA 群、AA+5-FU 群には同期間、生理食塩水（0.2 mL/日）を経口投与した。

すべてのマウスは 9 日目に安楽死させた。

AA：酢酸、AGE：熟成ニンニク抽出物、5-FU：5-フルオロウラシル

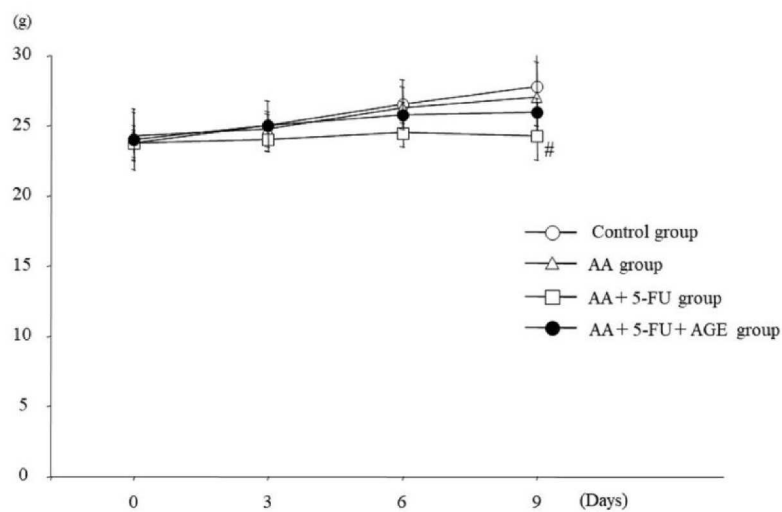
図 2. マウスにおける体重および腫瘍体積に対する AGE の影響

Figure 2A



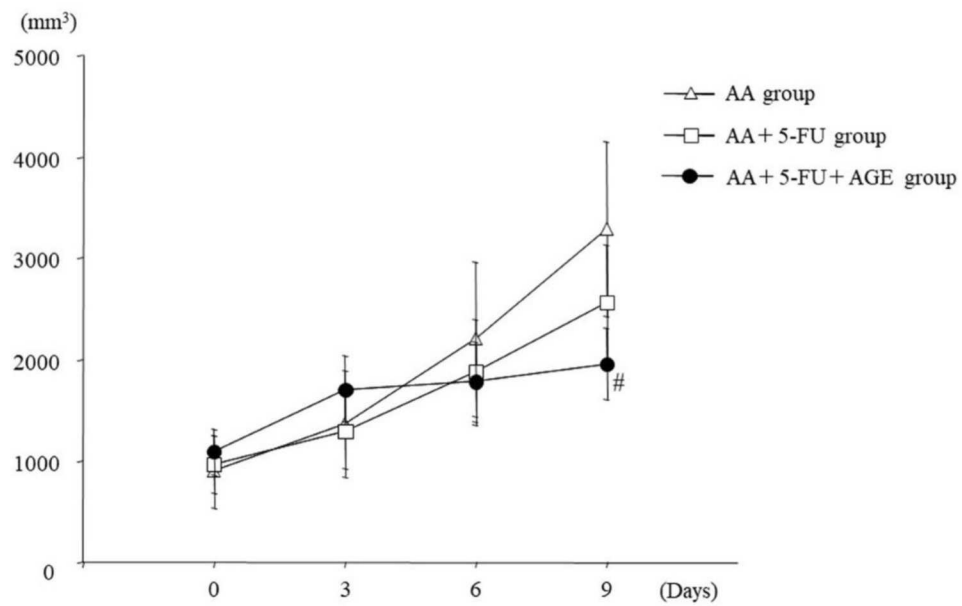
(a) 安楽死直前に撮影した、コントロール群マウスおよび担癌マウスの写真。

Figure 2B



(b) 各群におけるマウスの平均体重 (g) を示すグラフ。5-FU 治療により、コントロール群と比較して AA+5-FU 群および AA+5-FU+AGE 群で体重減少が認められた。しかし、AA+5-FU+AGE 群の平均体重は AA+5-FU 群よりも高かった。すなわち、AGE はマウスの全身状態を改善したことが示唆される。平均値±SEM ; # $P < 0.05$ (二元配置分散分析および Tukey-Kramer 事後検定)。

Figure 2C

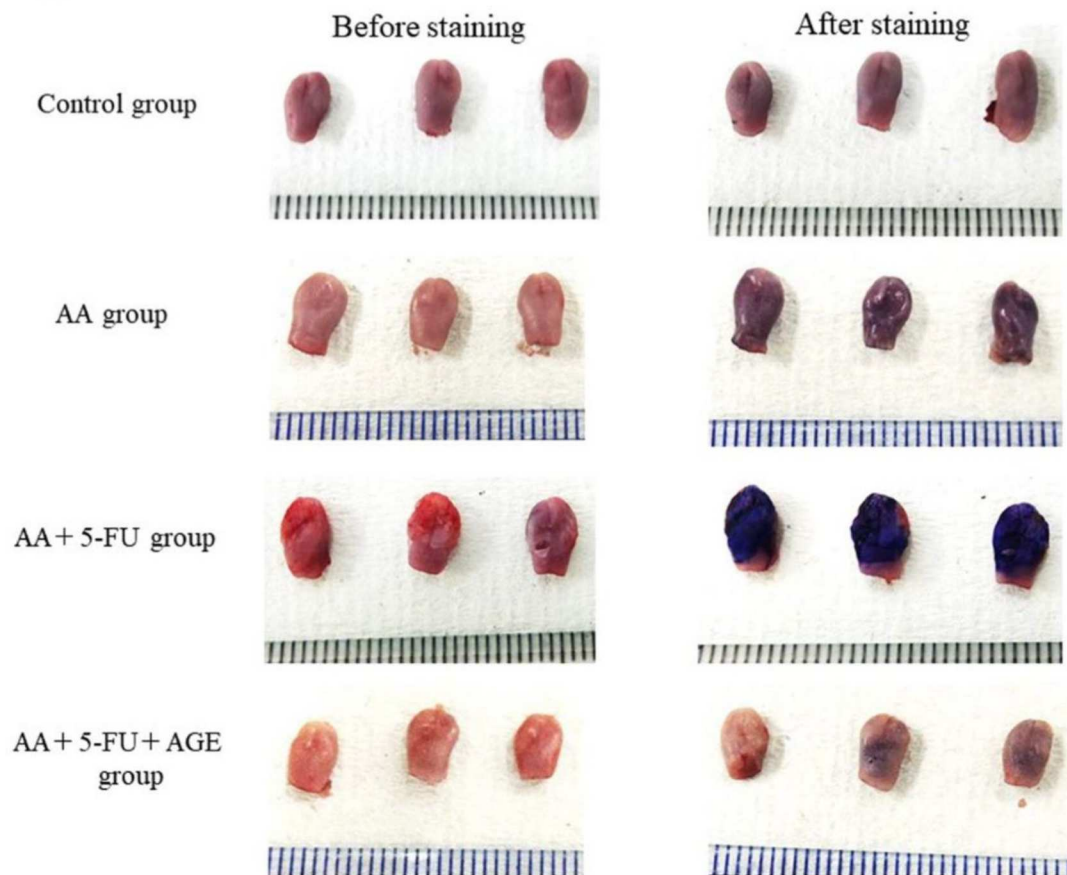


(c) 各群における 5-FU および／または AGE の腫瘍増殖に対する影響を示すグラフ。腫瘍体積 (mm³) は、AA+5-FU 群および AA 群と比較して、AA+5-FU+AGE 群で有意に低下した。AGE は 5-FU の抗腫瘍効果を減弱させることはなく、むしろその効果を増強した可能性がある。平均値±SEM ; #P<0.05 (二元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重事後検定)。

AA : 酢酸、AGE : 熟成ニンニク抽出物、5-FU : 5-フルオロウラシル、SEM : 平均値の標準誤

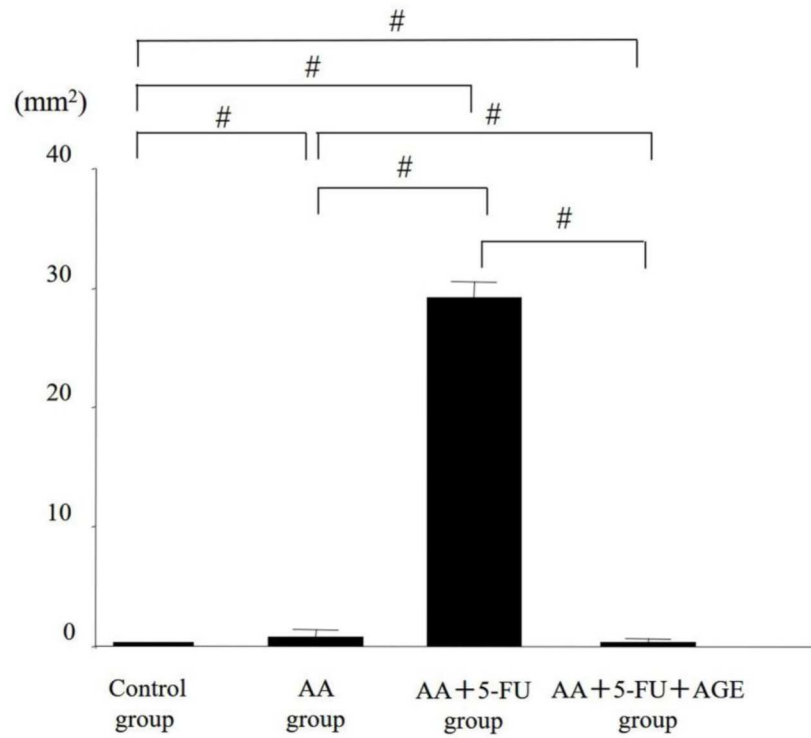
図 3. マウス舌背部における口腔粘膜炎症領域、潰瘍性病変に対する AGE の影響。

Figure 3A



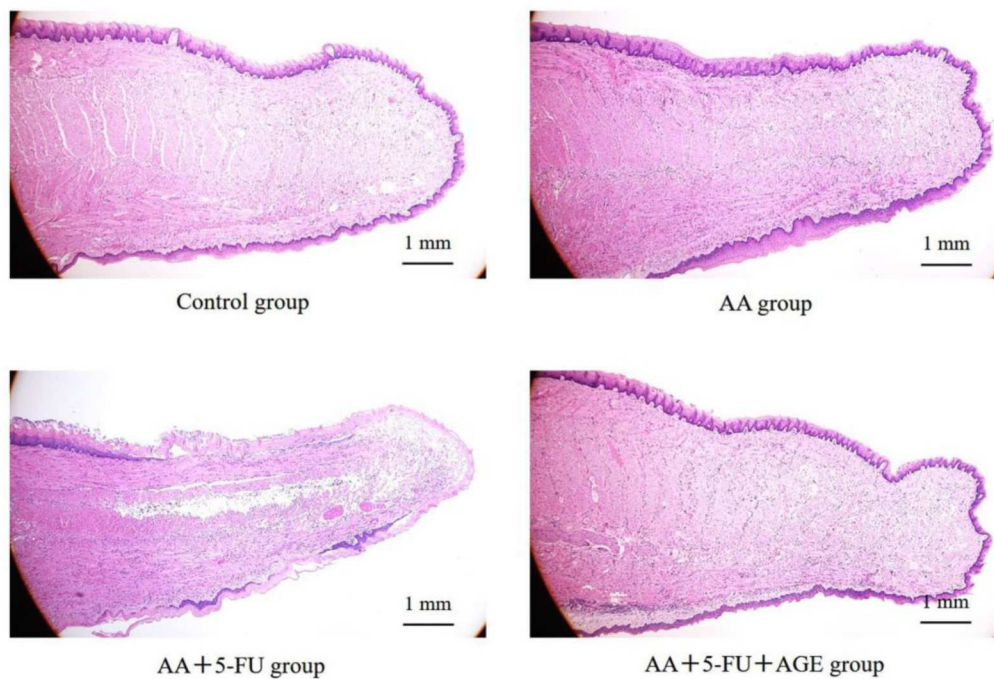
(a) トルイジンブルー染色前（左）および染色後（右）のマウス舌の写真。トルイジンブルー染色により、創傷部位や潰瘍が可視化された。AA+5-FU 群では、最も大きく、強く染色された（トルイジンブルー陽性）創傷領域が認められた。AA 群の舌では、軽度に染色された小さな創傷が観察された。一方、AA+5-FU+AGE 群では、AA+5-FU 群と比較して染色強度が有意に低下し、創傷は比較的小さかった。

Figure 3B



(b) 各群における舌の創傷／口腔粘膜炎面積 (mm²) に対する AGE の影響を示すグラフ。トルイジンブルー陽性の舌創傷面積は AA+5-FU 群で最大であった。AA+5-FU+AGE 群の創傷面積は、他のすべての群と比較して有意に小さかった。AGE 治療は、5-FU および AA によって生じた創傷／潰瘍を治癒し得ることが示唆された。平均値±SEM；# $P < 0.05$ （一元配置分散分析および Tukey-Kramer 事後検定）。

Figure 3C

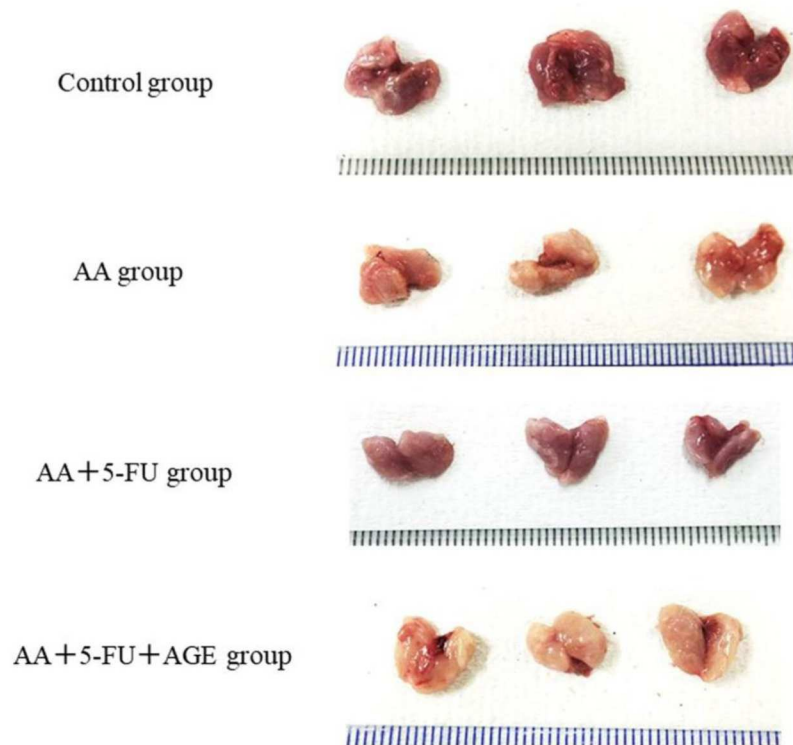


(c) 舌切片の H&E 染色像。AA+5-FU 群では上皮領域に重度の損傷が認められたのに対し、AA+5-FU+AGE 群では上皮損傷はほとんど認められなかった。AGE は、5-FU および AA によって誘発される舌の損傷を保護・修復する可能性が示された。

AA : 酢酸、AGE : 熟成ニンニク抽出物、5-FU : 5-フルオロウラシル、H&E : ヘマトキシリン・エオジン、SEM : 平均値の標準誤差

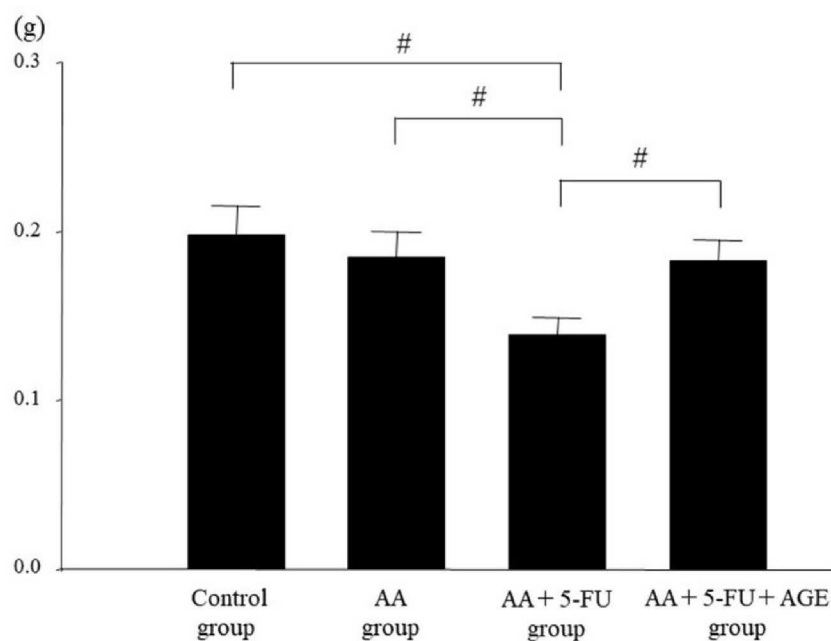
図 4. マウスにおける唾液腺の大きさおよび重量に対する AGE の影響

Figure 4A



(a) 安楽死時に摘出した唾液腺の写真。唾液腺の大きさは、コントロール群と比較してすべての処置群（AA 群、AA+5-FU 群、AA+5-FU+AGE 群）で小さかった。唾液腺の大きさは AA+5-FU 群で最も小さかったが、AA+5-FU+AGE 群では AA+5-FU 群と比較して著明に増大していた。

Figure 4B

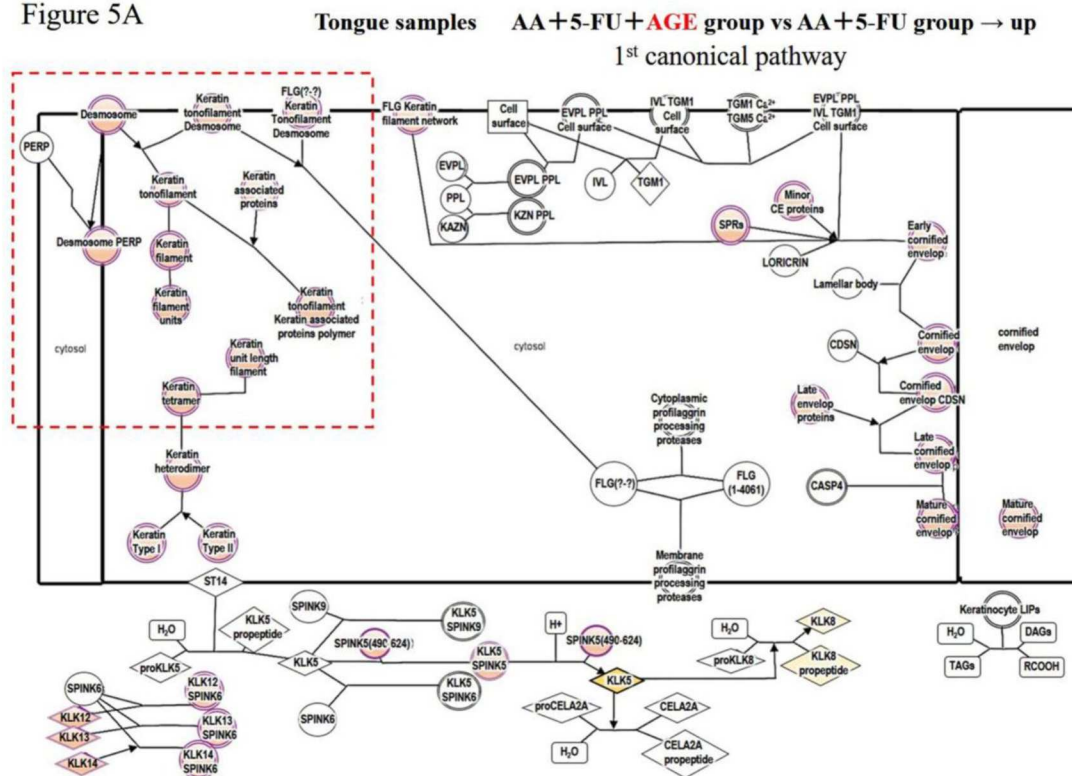


(b) 各群における唾液腺重量 (g) に対する AGE の影響を示すグラフ。唾液腺の平均重量は、コントロール群と AA 群の間で有意差は認められなかった。一方、AA+5-FU 群では唾液腺重量が有意に低下していたが、AGE 治療後の AA+5-FU+AGE 群ではその低下が回復した。平均値±SEM ; # $P < 0.05$ (一元配置分散分析および Tukey-Kramer 事後検定)。

AA : 酢酸、AGE : 熟成ニンニク抽出物、5-FU : 5-フルオロウラシル、SEM : 平均値の標準誤差

図 5. AGE による創傷治癒作用および抗腫瘍効果の作用機序。

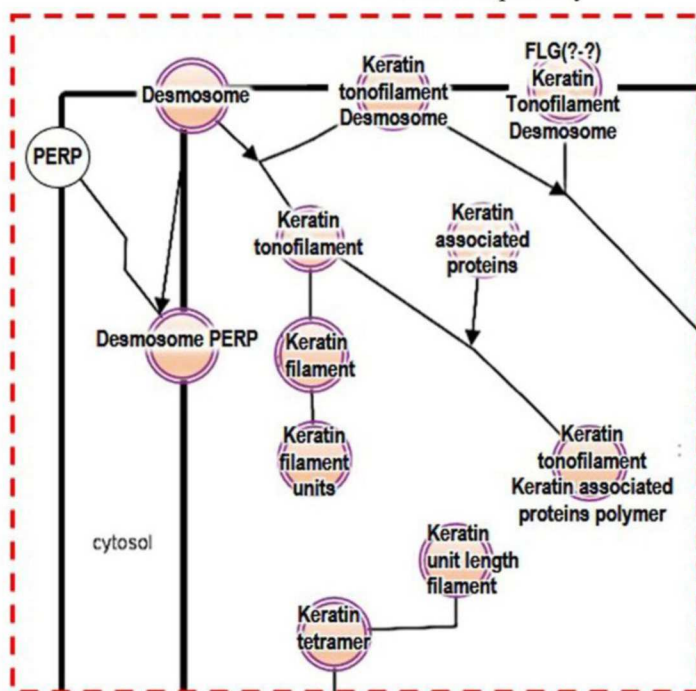
Figure 5A



(a) 舌試料における canonical pathway。AA+5-FU 群と比較して AA+5-FU+AGE 群で発現が上方制御された遺伝子をピンク色で示す。赤枠で示した領域の拡大図を (b) に示す。

Figure 5B

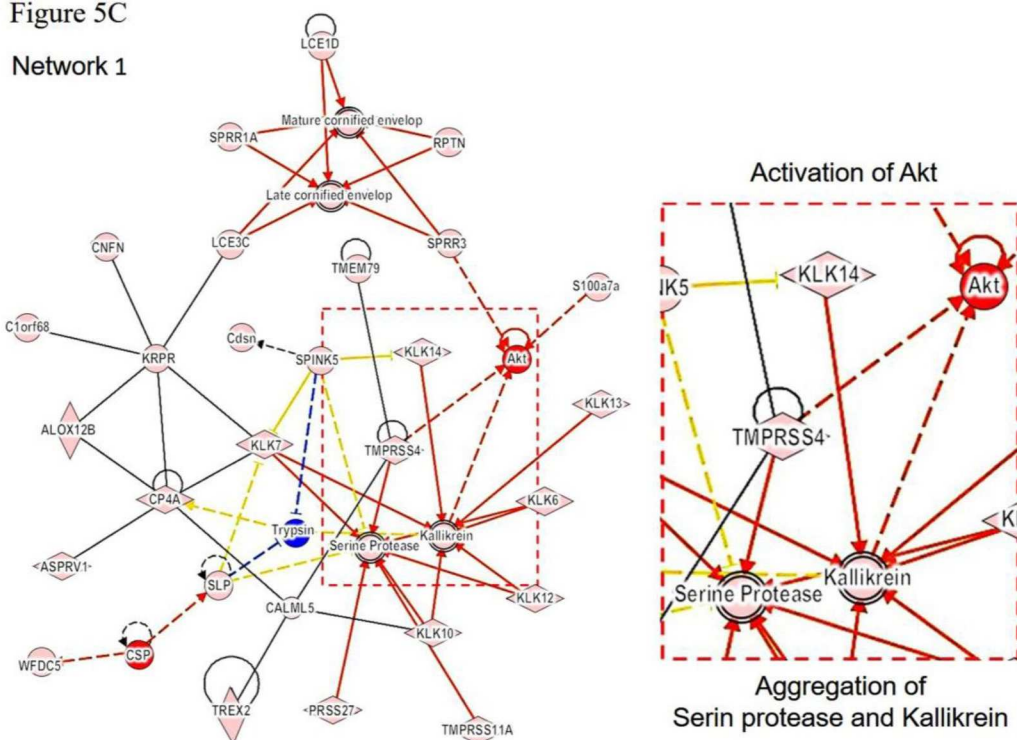
Tongue samples AA+5-FU+AGE group vs AA+5-FU group → up
1st canonical pathway



(b) これらの「ピンク色」の遺伝子は AA+5-FU+AGE 群で上方制御されており、角化の過程に関連している。

Figure 5C

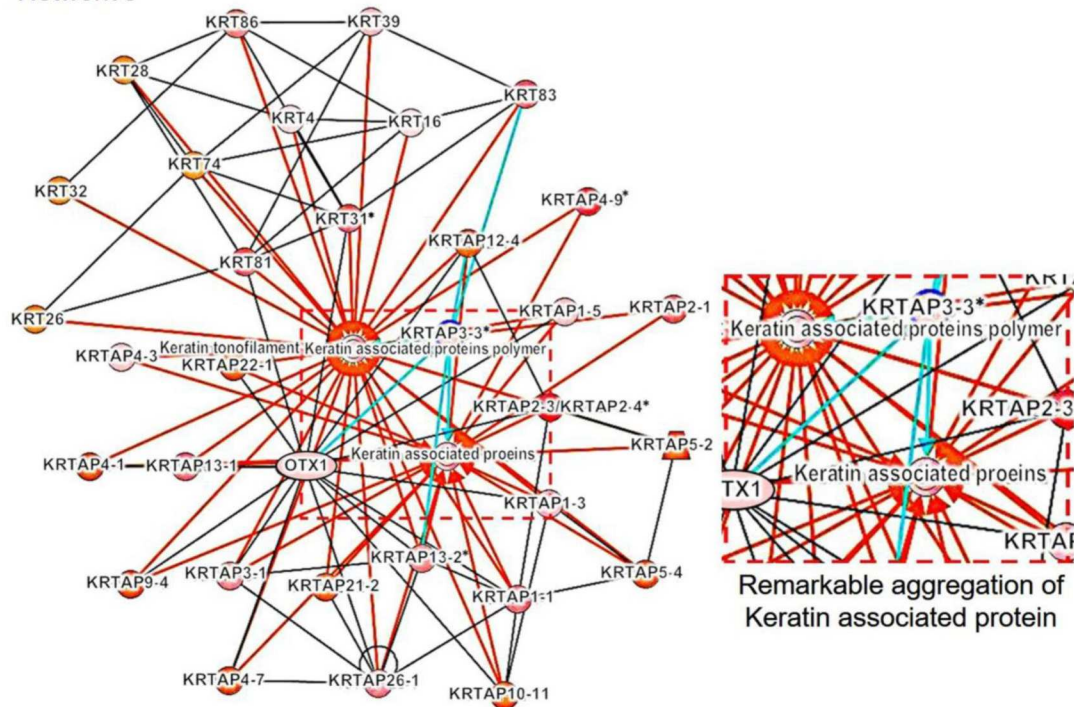
Network 1



(c) ネットワーク 1。赤枠内の領域を右側に拡大して示す。AA+5-FU+AGE 群では、Akt の活性化およびそれに続くセリンプロテアーゼとカリクレインの集積が認められた。

Figure 5D

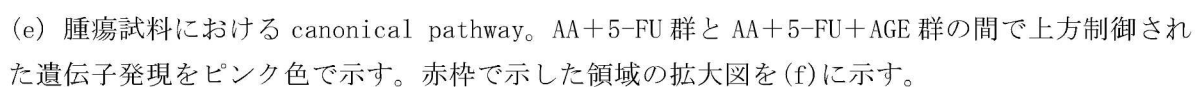
Network 3



(d) ネットワーク 3。赤枠で示した領域の拡大図を右側に示す。AA+5-FU+AGE 群では、ケラチン関連タンパク質の顕著な集積が観察された。

5-FU : 5-フルオロウラシル、AA : 酢酸、AGE : 熟成ニンニク抽出物、BCR : B 細胞受容体、TCR : T 細胞受容体

Tumor samples AA+5-FU+AGE group vs AA+5-FU group → up
1st canonical pathway



Tumor samples AA+5-FU+AGE group vs AA+5-FU group → up
1st canonical pathway

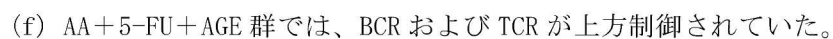
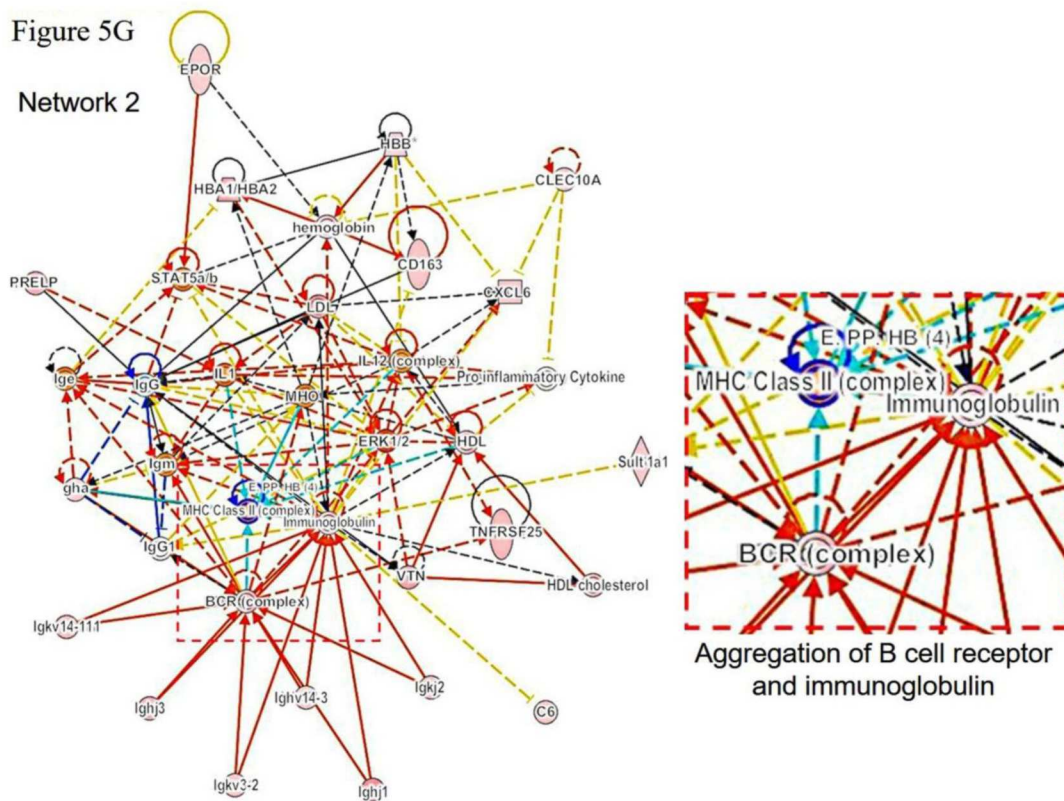


Figure 5G

Network 2



(g) ネットワーク 2。赤枠で示した領域を右側に拡大して示す。AA+5-FU+AGE 群では、BCR (BCR 複合体) および免疫グロブリンの集積が観察された。

5-FU : 5-フルオロウラシル、AA : 酢酸、AGE : 熟成ニンニク抽出物、BCR : B 細胞受容体、TCR : T 細胞受容体