

# 研 究 成 果 報 告 書

---

胆嚢がん多発国ハンガリーにおける本症の成因に関する疫学的国際比較研究

---

(15406025)

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金(基盤研究(B))研究成果報告書

平成 18 年 3 月

研究代表者 山本 正治  
(新潟大学医歯学系)

新潟大学附属図書館



2060005793

W120.7  
U031  
2003-05

## はしがき

本研究の目的は、胆嚢がん多発国・ハンガリー（死亡率は世界第2位）における本症発生に関わる環境及び遺伝特性を調査し、世界における他の多発国チリ及び日本における知見と比較検討することによって、本症の成因を明らかにし、その発生予防を具体化することである。

具体的目標として、環境要因については、胆嚢がんの症例－対照研究を行い、本症発生に係わる環境リスクファクターを明らかにする。一方、遺伝要因については、遺伝的疾患感受性の解明のために *CYP1A1* 遺伝的多型の分析を行う。また本症の *p53* がん抑制遺伝子等についても分析し、国際間比較を行う。

## 研究組織

研究代表者：山本 正治（新潟大学医歯学系・教授）

研究分担者：味岡 洋一（新潟大学医歯学系・教授）

研究分担者：中平 浩人（新潟青陵大学・教授）

研究分担者：土屋 康雄（新潟大学医歯学系・助手）

（研究協力者：Dr. Istvan Lang, Dr. Zoltan Geza Szentirmay）

## 交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	3,400	0	3,400
平成16年度	7,100	0	7,100
平成17年度	2,000	0	2,000
平成 年度			
平成 年度			
総計	12,500	0	12,500

## 研究発表

### (1) 口頭発表

Tsuchiya Y, Serra I, Calvo A, Villegas R, Yamamoto M, Profiles of biliary free fatty Acids in the patients with gallstones in Kochi, Niigata, and Santiago, XXXII Chilean Congress of Gastroenterology, November 25, 2005.

Shibuya N, Tsuchiya Y, Serra I, Yamamoto M, Mutagenicity of extract from red chili pepper with special reference to gallbladder cancer in Chile, XXXII Chilean Congress of Gastroenterology, November 25, 2005.

土屋康雄、清原千香子、中村和利、山本正治、薬物代謝酵素と細胞周期制御に関わる遺伝子多型と胆嚢がん発生リスクとの関連性、第76回日本衛生学会総会、2006年3月26日。

### (2) 学会誌等

Masaharu Yamamoto, Epidemiological studies on the distribution and determinants of biliary tract cancer, *Environ Health Prev Med*, 7(6),223-229,2003.

Toshifumi Wakai, Yoshio Shirai, Naoyuki Yokoyama, Yoichi Ajioka, Hidenobu Watanabe, Katsuyoshi Hatakeyama, Depth of subserosal invasion predicts long-term survival after resection in patients with T2 gallbladder carcinoma, *Annals of Surgical Oncology*, 10(4),447-454,2003.

土屋康雄、清原千香子、中村和利、山本正治、胆嚢癌の遺伝的感受性、膵癌・胆道癌の診断と治療－最近の研究動向－、*日本臨床*、64巻増刊号1、336-338、2006年1月28日発行。

Yasuo Tsuchiya, Iván Serra, Yasushi Hori, Alfonso Calvo, Rodrigo Villegas, Norio Shibuya, Kazutoshi Nakamura, and Masaharu Yamamoto, Free fatty acids concentrations in gallbladder bile collected from Chilean patients with gallstones, *Clin Biochem*, in Press.

## 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

特になし

## 研究の概要

### はじめに

WHO による胆嚢がんに関する世界 40 カ国の人口動態統計結果をもとにその標準化死亡比 (SMR) を分析した結果、ハンガリーは南米チリについて胆嚢がんの SMR が高かった。そのあと日本が多発国として続いている。胆嚢がんは、ほとんどの国では一般的ではなく、世界的には減少傾向を示しているが、ハンガリーでは本症の発症頻度が依然として高く、詳細な本症発症メカニズム解明と具体的な予防対策を立てることが必要となっている。

これまでに、日本、及びチリにおける本症の成因解明研究から以下の点を明らかにしてきた。

- (1) チリにおける胆嚢がん発症に関する環境疫学的研究により、低社会-経済的状況の女性では胆石存在下で赤唐辛子摂取が本症の環境危険因子であることが示された。
- (2) 新潟県における胆嚢がん死亡率と農薬使用量との間に正の地域相関関係が認められ、日本では胆嚢がん発症に農薬などの環境化学物質の曝露が関与していることが示された。
- (3) 日本における胆嚢がん発症に関する分子疫学的研究で、農薬などの環境化学物質に対する遺伝的感受性を調べた結果、女性胆嚢がん患者群では *CYP1A1 MspI*C 型の頻度が *MspI*A 型に比べ有意に高かった。*MspI*C 型は *MspI*A 型に比べ、芳香族炭化水素水酸化酵素の高い誘導性を示すことから環境中に排泄された農薬などの化学物質(がん原性物質)に対する感受性が高いために胆嚢がんを発症しやすいことが明らかとなった。
- (4) チリと日本における遺伝要因の検討から、チリではインディオに本症の発症頻度が高く、インディオと日本人の間の HLA ハプロタイプが類似していることから、本症の疾病感受性に民族的共通性が示唆された。
- (5) さらに、*p53* 遺伝子変異を調べた結果、チリでは Transition 型のみであったが、日本では Transition 型と Transversion 型の両型が約半々に存在し、病理組織診断は胆嚢がんであっても遺伝子変異には両国間で差異が認められた。
- (6) 胆石症患者の胆摘胆汁中の突然変異原性の有無を Ames テストにより分析した結果、日本の胆嚢がん多発国である新潟では稀発国である高知に比べ突然変異誘発率が高く、チリの変異原性の高さと同程度であった。

これらの事実に基づいて、我々はハンガリーにおける胆嚢がんの成因解明研究をスタートさせた。本研究において、ハンガリーを選択した理由は、チリに次ぐ胆嚢がん多発国であること。ハンガリー人は民族的にオリエンタルの血が混じっていること。胆石症が多いこと。パプリカ(唐辛子)の摂取頻度が高いことなどによる。具体的には、チリ及び日本で得られた上記の知見とハンガリーで得られた知見を比較し、食事特性などの環境要因と、遺伝的発がん感受性やがん遺伝子変異などの遺伝要因の両面からハンガリーにおける胆嚢がんの成因解明を行う。

## 研究の項目

### I. ハンガリーにおける胆嚢がんに関する症例－対照研究

#### 1. はじめに

本研究の目的は、すでに、胆嚢がんの危険因子として知られている胆石症と複合して働く未知の危険因子を探ることである。作業仮説は「複合要因説」である。

これまでに我々は、南米の胆嚢がん多発国であるチリにおいて、胆嚢がんの症例－対照研究を行った。この研究では、性・年齢をマッチングだけでなく、胆石症の有無についてもマッチングを行っている。分析の結果、胆石に加えて唐辛子の摂取がリスクファクターとして上がってきた。オッズ比には容量依存性も確認されている。その解釈としては、真のリスクファクターとしての可能性のほかにも、民族(インディオ)、貧困、その他の要因と交絡している可能性がある。また真の危険因子として考える場合も、唐辛子の辛味成分であるカプサイシン自体に原因を求める場合と、唐辛子中の他の化学物質(未知物質の場合も想定)や付着するカビ類(例えばアフラトキシン)の可能性も捨てきれない。

本研究では、日本、南米チリと並んで胆嚢がん死亡率が高く認められているハンガリーにおいて、胆嚢がんの症例－対照研究を行って、そのリスクファクターについて分析し、日本及び南米チリの胆嚢がんリスクファクターとの相違点を検討した。

#### 2. 対象及び方法

この症例－対照研究は、2003年4月～2006年3月まで実施した。症例群は、ハンガリー国内の病院で胆嚢がんと診断された41例で、全例が女性で、胆石症の既往がある。対照群として、胆石症と診断され、かつ悪性新生物の既往がない女性をGeneral populationより募り、最終的に31例が本研究の趣旨に同意し参加した。したがって、本研究では、胆石症と性をマッチングした。

訓練を受けたハンガリー国立がん研究所スタッフが、全症例及び対照のインタビューを担当した。ただし、ハンガリーではがん患者への接触は主治医以外厳しく制限されており、そのため、各症例とも主治医の許可を得る必要があり、そのためマスキングは実施できなかった。質問内容は、Socioeconomic status、Family history、Past history、及びLifestyle habits (Cigarette、alcohol intake、diet habits、intestinal habits) についてであった。Socioeconomic status は、Graffar index をより評価した。Family history 及び Past history は、感染症、胆石症、がんについて、1等身以内の親族と本人の状況を質問した。Diet habits に関しては、各食品の摂取頻度を質問した。Intestinal habits は、普通便、下痢及び便秘に分類して尋ねた。

統計処理は、SPSS 14.0J for Windows を用いて、質問票の内容を解析した。注目する主要な暴露要因は、唐辛子及び新鮮野菜等の摂取である。解析方法としては、ロジスティック回帰を用いて、胆嚢がん和各要因との関連を検討した。まず、各要因について個別に、症例－対照とクロス表

を作成し、オッズ比(95% 信頼区間)を算出し、そのうち統計学的有意性が認められた要因を用いて、多変量解析を実施した。有意水準は5%に設定した。

### 3. 結果

まず、健常者群と患者群の年齢分布を Table 1 に示す。対照群と患者群との間で年齢分布に差が認められ、平均年齢も有意な差が認められた。したがって、年齢を主要な要因として、他の暴露要因と同様に扱った。

次に、Table 2 に、胆嚢がんと主要要因との関連を示す。有意な関連が認められたのは、Education、Socioeconomic status、Consumption of red hot Hungarian pepper 及び Fresh fruits であった。これらの要因を、年齢とともにロジスティック回帰分析にて分析した。その結果を Table 3 に示す。最も高くかつ有意なオッズ比が得られたのは、Consumption of red hot Hungarian pepper で、次いで年齢であった。

### 4. 考察

ハンガリーの胆嚢がん症例－対照研究により、Red hot Hungarian pepper の摂取が最大の暴露要因として浮かび上がってきた。Hot pepper 摂取は、チリで実施した同様の症例－対照研究でも検出された要因である。今後はさらに症例数を増やして確認調査を行い、Red hot Hungarian pepper と胆嚢がんとの関連のメカニズムを明らかにする必要がある。

本研究により、ハンガリーにおける胆嚢がん発症にかかわる要因が、チリのそれと類似し、一方、日本の胆嚢がん発症にかかわる要因とは異なる可能性が示唆された。

## II. ハンガリーにおける *CYP1A1* 遺伝子多型の検討

### 1. はじめに

新潟県における胆嚢がんの地域集積性を規定する要因を検討した研究から、胆嚢がん死亡率と農薬使用量との間に正の地域相関関係が認められ、胆嚢がん発症と環境中に排泄されたジフェニールエーテル系農薬(クロルニトロフェンなど)やその不純物として含まれていたダイオキシン類などの汚染物質(がん原性物質)による曝露との関係が明らかにされた。

環境中には多種多様の化学物質が放出されており、その曝露は微量かつ長期継続的であることから生体に及ぼす影響は重要であり、胆嚢がんの成因を考えるうえで無視することができない。しかし、新潟県における近年の胆嚢がんの粗死亡率は8.1/10万人(男性2.7/10万人、女性5.4/10

万人)と低率であることから、環境化学物質曝露に加えて環境中のがん原性物質に対する遺伝的  
個体感受性も胆嚢がん発症に重要な役割を果していると考えられる。

一般に、環境中に存在する多くのがん原性物質は前発がん物質であり、生体内で第1相の薬  
物代謝酵素により代謝的活性を受けて、近接発がん物質、究極発がん物質となり、化学的に不安  
定で反応性が高い中間代謝物となったこれらが生体内高分子や蛋白質および核酸などと共有結  
合を作り遺伝子を損傷することが発がんのイニシエーションになると考えられる。

第1相薬物代謝酵素の一つである芳香族炭化水素水酸化酵素 (Aryl hydrocarbon  
hydroxylase: AHH) は生体内に摂取された前がん物質である芳香族炭化水素などを代謝的に活性  
化するため、発がんに関与する酵素として注目されている。AHH は農薬成分であるクロロニトロフェ  
ンなどの塩素化芳香族炭化水素を代謝的に活性化するので、個体の胆嚢がん発症感受性を知るう  
えで重要な遺伝的要因のひとつと考えられる。しかし、AHH 活性は種々の環境要因の影響を受ける  
ため、胆嚢がんとの因果関係を調べることは難しい。AHH 活性を支配する Cytochrome P450 1A1  
(*CYP1A1*) 遺伝子での非翻訳領域の *Msp*I (A型(野生型)、B型、C型) やエクソン7での Ile-Val (Ile/  
Ile 型(野生型)、Ile/Val 型、Val/Val 型) 遺伝子多型とその表原型を検討した研究から、高 AHH 誘  
導性には C 型、高い非誘導の AHH 活性には Val/Val 型が関与していることが分かった。胆嚢がん  
発症には、農薬などの環境化学物質の関与が指摘されていることから、*CYP1A1* 遺伝子多型との関  
わりが注目される。

以上の新潟県における検討で、農薬などの環境化学物質の曝露が胆嚢がん発症に関与して  
いることが示されたが、ハンガリーにおける本症発症の環境危険因子はまだ明らかにされていない。  
これを明らかにするため実施した本研究によれば、チリ同様に唐辛子摂取が関与している可能性  
が示唆されている。しかし、日本同様に環境中の環境化学物質の曝露がその要因である可能性も  
否定できないことから、日本で明らかにされた *CYP1A1* 遺伝子多型との関係を調べた。

## 2. 材料及び方法

2000 年から 2004 年までにハンガリーで胆嚢がんと診断された患者 43 名(男性 6 名、72.7 ±  
7.1 歳、女性 37 名、70.3 ± 7.1 歳)を対象とした。対照者として健常者 100 名(男性 52 名、38.9  
± 10.3 歳、女性 48 名、37.2 ± 12.1 歳)を用いた。

患者からの DNA はパラフィンブロック標本から市販の専用キット (DEXPAT、タカラバイオ株式  
会社) を用いて抽出した。血液から抽出された健常者の DNA はハンガリーの共同研究者から提供  
を受けた。

検討に用いた試薬は、Brilliant QPCR Master Mix (Stratagene 社)、TaqMan SNP Genotyping  
Assays (Applied Biosystems Japan 社) であり、装置、Stratagene Multiplex Real Time QPCR System  
Mx 3000P (Stratagene 社) を用いて *CYP1A1 Msp*I、*CYP1A1* Ile-Val 遺伝子多型を分析した。

患者群と健常者群間の各々の多型の出現頻度からオッズ比、95% 信頼区間を求め、胆嚢が  
ん発症との関連を検討した。

### 3. 結果

健常者群と患者群における *CYP1A1 MspI* 遺伝子多型の頻度を Table 4 に示す。男性では、健常者群、患者群ともに *MspI* C 型を有するものはいなかった。女性では健常者群に 2 名 (4.2%) 認められたが、患者群にはいなかった。男女合計でも、患者群には *MspI* C 型を有するものはいなかった。*MspI* B 型のオッズ比、95% 信頼区間の結果は男女ともに胆嚢がん発症リスクとの関連を示すものではなかった。

健常者群と患者群における *CYP1A1 Ile-Val* 遺伝子多型の頻度を Table 5 に示す。男性患者群の Val/Val 型の頻度 16.7% は健常者群の 1.9% に比べ高く、オッズ比も 10.8 であったが、95% 信頼区間は 0.6-206 と有意ではなかった。女性では、健常者群と患者群の各遺伝子型の頻度は近似しており、有意な両群間差は認められなかった。

なお、本研究に用いた健常者群、及び患者群における Hardy-Weinberg 平衡の検定を行った結果、いずれの群でも Hardy-Weinberg の法則が成立した。

### 4. 考察

ハンガリーの胆嚢がん患者群における第 1 相薬物代謝酵素の遺伝子変異の頻度は健常者群と近似しており、胆嚢がんの発症リスクとの関連は男女とも認められなかった。このことは、日本で明らかにされたような環境化学物質曝露以外の環境リスクファクターの存在が示唆される。従って、今後、環境疫学的研究で環境要因を同定し、その結果をもとに形成した仮説を遺伝疫学的研究によって再検討する必要がある。

## Ⅲ. 新潟及びハンガリーの胆嚢がんの遺伝子異常の比較・検討

### 1. はじめに

*p53* がん抑制遺伝子は多くのヒトのがんでその発生もしくは進展に関与していると言われている。これまで本研究者は、胆嚢がん多発国である日本とチリの胆嚢がんの *p53* 遺伝子異常について検討し、両国間で以下の違いがあることを明らかにしてきた。

- (1) チリの胆嚢がんの変異パターンは全て Transition 型であったのに対し日本の胆嚢がんでは Transition 型と Transversion 型の変異が約半々であった。
- (2) チリの胆嚢がんでは CpG site の変異が 1/3 に存在していたのに対し日本の胆嚢がんではそれらがみられなかった。

一般に、*p53* 遺伝子の Transversion 型変異は外因性発がん、CpG site の変異は内因性発



がんに、それぞれ関与していると考えられている。両国間の変異パターンの違いは、それぞれの胆嚢がん発生因子の違いを反映している可能性がある。

一方、大腸がんをモデルとしたがん発生の遺伝子異常経路には、*APC*, *p53*, *DCC*などのがん抑制遺伝子の異常による LOH pathway と、ミスマッチ修復遺伝子の異常による MSI (Microsatellite instability: 遺伝子不安定性) pathway の 2 つが知られている。また、胆嚢がんの発生には胆石症による慢性持続性炎症の存在が重視されているが、炎症を背景に発生するがんでは(肝吸虫感染と肝内胆管癌、潰瘍性大腸炎と大腸がん)、がん遺伝子 *K-ras* の変異が極めて低頻度であることも報告されている。

以上のことを踏まえ本研究では、ハンガリー胆嚢がんの発生要因を解明するため、*p53* 遺伝子、*K-ras* 遺伝子の異常およびその変異パターンと MSI の頻度を、日本の胆嚢がんと比較検討した。

## 2. 材料及び方法

外科切除されたハンガリー(ブタペスト)の胆嚢がん 20 例と、日本(新潟)の胆嚢がん 22 例を対象とした。全例ともホルマリン固定され、パラフィン包埋後 HE 染色切片で胆嚢がんの病理組織診断がなされている。遺伝子検索は以下の方法で行った。なおいずれの症例も、ミスマッチ修復遺伝子の Germ line mutation のある HNPCC (遺伝性非ポリポーシス型大腸がん)は併存していない。

### (1) DNA の抽出

10  $\mu$  m パラフィン切片 3 枚を用い、Microdissection 法で腫瘍部を切り取り、DNA isolator PS kit (Wako, Osaka, Japan)で DNA の抽出を行った。DNA は腫瘍部と対照としての正常部からそれぞれ抽出し、腫瘍部については腫瘍細胞成分が 50%以上になる部位を選択した。また、遺伝子変異の腫瘍内 Heterogeneity の可能性を考慮し、DNA 抽出は3箇所以上から行った。

### (2) *p53* 遺伝子変異の検索

Nested PCR 法と Direct sequence 法で Exon 5~8 の変異および変異塩基のパターンを検索した。Direct sequence 法には、AutoLoad Solid Phase Sequencing Kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden)と DNA sequencer (ALF, Pharmacia)を用いた。

### (3) *K-ras* 遺伝子変異の検索

Nested PCR-RFLP 法で codon 12 の変異の有無を検索した。

### (4) MSI

国際癌学会ワークショップで推奨されている5つの Microsatellite marker (BAT25, D2S123, BAT26, D17S250, D5S346)を PCR 法で増幅した。正常部と腫瘍部とで増幅されたマーカーの塩基数のピークを比較し、腫瘍部に(正常部で認められない)新たなピークが出現したときに

Microsatellite 不安定 (MSI)とした (Fig. 1)。5つのマーカーの2つ以上に MSI が出現した場合に MSI-high、1つの場合に MSI-low、MSI がみられなかった場合を MSS (Microsatellite stable)とした。

#### (5) 統計検定

統計検定には  $\chi^2$  二乗または Fisher の直接確率計算 [SPSS 11.5 J (SPSS Japan, Tokyo, Japan)] を用い、 $P < 0.05$  を有意差ありとした。

### 3. 結果

解析結果は Table 6 の通りであるが、以下に詳述する。

#### (1) *p53* 遺伝子変異

*p53* 遺伝子異常は新潟例で 55% (11/20 例、12 部位)、ブタペスト例で 33% (6/18 例、10 部位) にみられ、両者間で有意差はなかった。22 変異部位はいずれも単一塩基変異であり、17 部位で (新潟 11 部位、ブタペスト 6 部位) はミスセンスまたはナンセンス変異で、残りの 5 部位 (新潟 1 部位、ブタペスト 4 部位) はアミノ酸配列の変化のないサイレント変異であった。

変異パターンは、有意差はなかったものの、新潟例で 4/11 が Transversion 型であったのに対し、ブタペスト例で Transversion 型は 1/6 のみであり、ブタペスト例の 2 例で CpG site の変異が認められたのに対し、新潟例で CpG site 変異を示したものはなかった ( $P=0.110$ )。

#### (2) *K-ras* 遺伝子変異

新潟、ブタペスト例いずれも *K-ras* 変異を示したものはなかった。

#### (3) MSI

MSI-high は新潟例の 42% (8/19 例)、ブタペスト例の 7% (1/15) にみられ、両者間には有意差があった ( $P=0.047$ )。

### 4. 考察

今回の検討結果から、ハンガリーと日本の胆嚢がんではその発生に異なる機構・因子が存在することが想定された。すなわち、ハンガリーの胆嚢がんでは外因性因子による発がんが日本に比べ少なく (Transversion 型変異の頻度がチリの胆嚢がんでは低い)、他方日本の胆嚢がんでは内因性因子の関与は少なく (CpG site の変異がない)、ミスマッチ修復遺伝子異常を背景に発生するものの頻度が高いことが推定された。ハンガリー胆嚢がんの *p53* 遺伝子異常の結果はチリと同様であり、このことは、胆嚢がん多発国の中でも日本の胆嚢がんが特異的な発がん因子の存在により発生した可能性を示唆するものといえる。一方、ハンガリー、日本ともに *K-ras* 変異は認められなかった

が、これは両者ともに共通して、その発生の背景には胆石による慢性持続性炎症が存在しているためと考えられる。しかし今回 *p53* 遺伝子異常を示した胆嚢がんは日本で 55%、ハンガリーで 33%であり、残りの *p53* 遺伝子異常陰性の癌に関しては、その発がん機構を比較・推定することはできない。今後はこれらのがんの発生因子についても、新たな遺伝子パラメーターを追加して検討する必要があると考えられた。

## まとめ

本研究の目的は、過去 19 年間にわたる日本(女性死亡率で世界第 5 位)及び南米チリ(1 位)での胆嚢がんの成因研究の成果を踏まえ、次の多発国ハンガリー(2 位)で本症の成因を環境と遺伝の両面から明らかにし、その研究結果を日本及びチリと比較することである。

本研究により以下の点が明らかとなった。

- (1) ハンガリーの共同研究者とともに、既に収集した胆石を有する胆嚢がん群に対する胆石でマッチングした対照群の調査票データを収集し、残りのデータを確実に収集する方法を検討してきた。胆嚢がん群 42 例と対照群 30 例のロジスティック回帰分析の結果、胆嚢がんの有無に有意な重みを持つ因子は、唐辛子摂取、年齢の順であった。
- (2) 胆嚢がん発症における遺伝的感受性の有無を明らかにするため、患者 42 例と健常人 100 例を対照として *CYP1A1 MspI* (A, wild type; B; C)と *CYP1A1 Ile-Val* (Ile/Ile, wild type; Ile/Val; Val/Val)遺伝子多型を解析し、胆嚢がん発生リスクへの関与を検討した。男女の患者と健常者群間の B 型、C 型及び Ile/Val 型、Val/Val 型の頻度には有意差は認められず、これらの遺伝子多型との関連はなかった。
- (3) ハンガリーの胆嚢がん 20 例と日本の胆嚢がん 22 例を用いて、*p53* 遺伝子変異、*K-ras* codon 12 遺伝子変異、MSI (Microsatellite instability)を比較した結果、ハンガリー例(6/18)と日本例(11/22)の *p53* 遺伝子変異の変異頻度には差は認められなかった。*p53* 遺伝子の変異はハンガリー例と日本例とでそれぞれ 10 箇所と 13 箇所にみられたが、そのパターンは、日本例の 4/13 が外因性発がんを示唆する Transversion 型であったのに対し、ハンガリー例では 1/10 のみであった。逆に内因性発がんを示唆する Transition 型の CpG site の変異は日本例にはなく、ハンガリー例には 2/10 認められた。*K-ras* 遺伝子変異は、ハンガリー例、日本例いずれにも認めなかった。日本例では MSI-H の頻度がハンガリー例に比べ有意に高かった(8/19, 1/15,  $p=0.047$ )。以上の結果から、ハンガリーと日本の胆嚢がんではその発がん機構が異なることが明らかとなった。

以上の結果から、ハンガリーの胆嚢がんの成因として、環境因子ではチリと同様の唐辛子摂取が検出された。遺伝要因では日本と異なる結果であった。

Table 1 Characteristics of study subjects by age

Variable	Cases (% , n=41)	Controls (% , n=30)	<i>p</i>
Gender			
Female	100	100	
Age (years)			
<40	0	10.0	
40 – 49	0	20.0	
50 – 59	24.4	43.3	
60 – 69	36.6	20.0	
>70	39.0	6.7	<i>p</i> < 0.001*
Average age	67.1 ±9.0 years	54.0 ±11.6 years	<i>p</i> < 0.001#

\* *p* value for chi-square test

# *p* value for t- test

Table 2 Risk factors for gallbladder cancer in Hungary

Variable	Cases	Controls	OR	95%CI
Education (years)	<i>n</i> =41	<i>n</i> =29		
≥ 16	3	8	Ref	
11–15	15	16	2.5	0.5–11.2
≤ 10	23	5	12.3	2.3–63.4
Socioeconomic status	<i>n</i> =39	<i>n</i> =23		
High	25	22	Ref	
Low	14	1	12.3	1.5–101.4
Length of biliary colic (years)	<i>n</i> =15	<i>n</i> =18		
≤ 12	11	17	Ref	
> 12	4	1	6.2	0.6–62.8
Parity	<i>n</i> =39	<i>n</i> =27		
≤ 5 pregnancies	36	25	Ref	
> 5 pregnancies	3	2	1.0	0.2–6.7
Intestinal habit	<i>n</i> =37	<i>n</i> =17		
Diarrhea/normal	36	14	Ref	
Constipation	1	3	0.1	0.0–1.4
Obesity (BMI)	<i>n</i> =41	<i>n</i> =30		
≤ 24.9	19	13	Ref	
25.0–29.9	13	11	0.8	0.3–2.4
≥ 30.0	9	6	1.0	0.3–3.6
Typhoid fever	<i>n</i> =41	<i>n</i> =30		
Negative self-report	40	30	Ref	
Positive self-report	1	0	1.0	0.9–1.0
Cigarette	<i>n</i> =41	<i>n</i> =30		
Non smokers	30	20	Ref	
Smokers/ex-smokers	11	10	0.7	0.3–2.0
Intake of pepper	<i>n</i> =41	<i>n</i> =30		
No	6	10	Ref	
Yes	35	20	2.9	0.9–9.2
Intake of red hot Hungarian pepper	<i>n</i> =41	<i>n</i> =30		
No	11	24	Ref	
Yes	30	6	10.9	3.5–33.8
Fresh fruit	<i>n</i> =40	<i>n</i> =30		
1–3 days per week	29	28	Ref	
4–7 days per week	11	2	5.3	1.1–26.1

Table 3 Adjusted odds ratios (ORs) in a conditional logistic regression multivariate analysis\*

Risk factor	OR	(38 cases and 23 controls)	
		95%CI	<i>p</i>
Age (years)	1.1	1.0–1.2	0.006
Hot Hungarian pepper consumption	10.3	1.8–57.7	0.008
Education (10 years or less)	15.7	0.8–318.4	0.073
Fresh fruits (four days or more/week)	5.0	0.6–40.8	0.135
Low socioeconomic status	0.8	0.0–29.0	0.895

\*Based on the variables that demonstrated significance in univariate analyses.

Table 4 Distribution of *CYP1A1* *MspI* polymorphism

	Controls	P <sub>HWE</sub>	Cases	P <sub>HWE</sub>	OR	95% CI
<b>Men</b>						
A	42 (80.8)		4 (66.7)		1.0	
B	10 (19.2)		2 (33.3)		2.1	0.3-13.1
C	0		0			
		0.44		0.62		
<b>Women</b>						
A	37 (77.1)		31 (83.8)		1.0	
B	9 (18.7)		6 (16.2)		0.8	0.3-2.5
C	2 ( 4.2)		0			
		0.17		0.59		
<b>Total</b>						
A	79 (79.0)		35 (81.4)		1.0	
B	19 (19.0)		8 (18.6)		1.0	0.4-2.4
C	2 ( 2.0)		0			
		0.51		0.50		

P<sub>HWE</sub>: p value for Pearson's chi square test (Hardy-Weinberg equilibrium),

OR: odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

Numbers in parentheses represent percentage.

Table 5 Distribution of *CYP1A1* Ile-Val polymorphism

	Controls	P <sub>HWE</sub>	Cases	P <sub>HWE</sub>	OR	95% CI
<b>Men</b>						
Ile-Ile	43 (82.7)		4 (66.7)		1.0	
Ile/Val	8 (15.4)		1 (16.7)		1.3	0.1-13.6
Val/Val	1 ( 1.9)		1 (16.7)		10.8	0.6-206
		0.41		0.17		
<b>Women</b>						
Ile-Ile	34 (70.8)		26 (70.3)		1.0	
Ile/Val	13 (27.1)		10 (27.0)		1.0	0.4-2.7
Val/Val	1 ( 2.1)		1 ( 2.7)		1.3	0.1-21.9
		0.85		0.97		
<b>Total</b>						
Ile-Ile	77 (77.0)		30 (69.8)		1.0	
Ile/Val	21 (21.0)		11 (25.6)		1.3	0.6-3.1
Val/Val	2 ( 2.0)		2 ( 4.6)		2.6	0.4-19.1
		0.69		0.46		

P<sub>HWE</sub>: p value for Pearson's chi square test (Hardy-Weinberg equilibrium),

OR: odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

Numbers in parentheses represent percentage.



Table 6 Genetic alterations observed in gallbladder carcinoma from Niigata and Budapest

cas No.	Histology <sup>a</sup>		<i>p53</i> mutation			K- <i>ras</i> mutation <sup>b</sup>	Microsatellite instability
	Type	Grade	Exon/codon	Base change	Amino acid change		
N-1	pap	G1	wild	-	-	wild	BAT25, BA26
N-2	adeno	G1	5/32	AAG→GAG	Lys→Glu	wild	BAT25, D2S123
N-3	pap	G1	wild	-	-	wild	BAT25
N-4	adeno	G1	6/193	CAT→AAT	His→Asn	wild	BAT25, BAT26
N-5	adeno	G2	5/140	ACC→ATC	Thr→Ile	wild	nd
			5/166	TCA→ACA	Ser→Thr	wild	
N-6	adeno	G1	8/276	GCC→CCC	Ala→Pro	wild	none
N-7	adeno	G1	wild	-	-	wild	BAT25, D2S123
N-8	adeno	G1	wild	-	-	wild	none
N-9	pap	G1	wild	-	-	wild	none
N-10	pap	G1	wild	-	-	wild	none
N-11	pap	G1	wild	-	-	wild	BA26
N-12	pap	G1	8/294	GAG→GAA	Glu→Glu	wild	BAT25, BAT26
N-13	pap	G1	wild	-	-	wild	D2S123
N-14	adeno	G2	8/280	AGA→AAA	Arg→Lys	wild	BAT25, D2S123
N-15	adeno	G1	7/238	TGT→CGT	Cys→Arg	wild	nd
N-16	adeno	G1	wild	-	-	wild	none
N-17	adeno	G3	8/271	GAG→AAG	Glu→Lys	wild	none
N-18	adeno	G2	6/205	TAT→TGT	Tyr→Cys	wild	none
N-19	adeno	G1	wild	-	-	wild	D17S250, D2S123
N-20	adeno	G2	7/231	ACC→ATC	Thr→Ile	wild	BAT25, D17S250
N-21	adeno	G2	5/160	ATG→GTG	Met→Val	wild	nd
			6/220	TAT→AAT	Tyr→Asn	wild	
N-22	adeno	G3	wild	-	-	wild	none
B-1	adeno	G2	7/249	AGG→ACG	Arg→Thr	wild	BAT26
B-2	adeno	G3	6/213	CAG→CGG	Gln→Arg	wild	none
B-3	adeno	G2	wild	-	-	wild	none
B-4	adeno	G2	wild	-	-	wild	none
B-5	adeno	G2	wild	-	-	wild	none
B-6	adeno	G2	wild	-	-	wild	BAT25
B-7	adeno	G2	wild	-	-	wild	none
B-8	pap	G1	wild	-	-	wild	none
B-9	adeno	G3	wild	-	-	wild	none
B-10	adeno	G1	6/219	CCC→TCC	Pro→Ser	wild	nd
B-11	adeno	G3	wild	-	-	wild	nd
B-12	pap	G1	5/138	GCC→GCT	Ala→Ala	wild	BAT25, D17S250
			5/167	CAG→CAA	Gln→Gln	wild	
			5/170	ACG→ACA	Thr→Thr	wild	
B-13	pap	G1	5/158	CGC→TGC	Arg→Cys	wild	nd
			6/223	CCT→TCT	Pro→Ser	wild	
B-14	adeno	G3	6/210	AAC→AAT	Asn→Asn	wild	nd
			7/228	GAC→AAC	Asp→Asn	wild	
B-15	adeno	G2	wild	-	-	wild	nd
B-16	adeno	G3	wild	-	-	wild	none
B-17	adeno	G1	wild	-	-	wild	none
B-18	adeno	G1	wild	-	-	wild	BAT26
B-19	adeno	G1	wild	-	-	wild	none
B-20	adeno	G1	wild	-	-	wild	BAT25

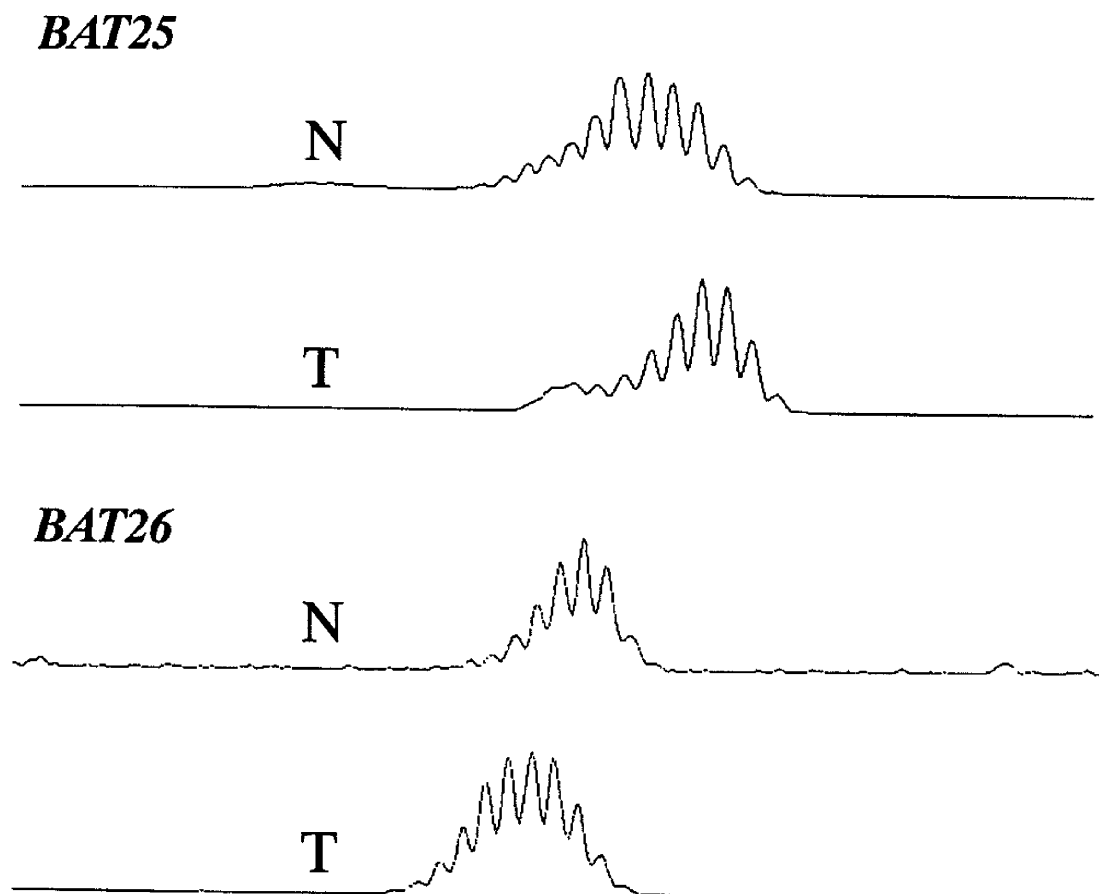
N- : Niigata case, B- : Budapest case,

<sup>a</sup>: According to the tumor-node-metastasis (TNM) staging system; pap: papillary carcinoma, adeno: adenocarcinoma

<sup>b</sup>: codon 12

nd: not detected

Fig. 1 Fragment pattern of case no. 1 (Table 6) showing microsatellite instability at two loci ( *BAT25*, *BAT26*).



## 資 料

次項以降に発表済みの別刷を添付する。