
原 著

N-Nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine による実験的ラット
肺発癌に対する抗菌薬：clarithromycin と cyclooxygenase-2
inhibitor : etodolac による抑制効果

奈良県立医科大学附属ガンセンター腫瘍病理学教室

村 川 幸 市

INHIBITORY EFFECTS OF CLARITHROMYCIN AND/OR ETODOLAC
ON LUNG CARCINOGENESIS INITIATED BY N-NITROSOBIS
(2-HYDROXYPROPYL)AMINE IN RATS

KOICHI MURAKAWA

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received September 29, 2000

Abstract: The inhibitory effects of antibiotics and a cyclooxygenase(COX)-2 inhibitor on lung carcinogenesis in rats initiated with N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) were investigated. Male Wistar rats were given tap water without BHP or tap water containing 2000 ppm BHP with a basal diet for 12 weeks followed by the basal diet or the diet containing test compounds for 8 weeks. Rats received basal diet or diets containing 0.02 % clarithromycin (CAM), 0.015 % etodolac, 0.02 % CAM plus 0.015 % etodolac, respectively. The incidences of lung lesions were not different but the numbers of lesions including adenocarcinoma (AC), squamous cell carcinoma (SCC) and adenosquamous carcinoma (ASCC) decreased in rats given CAM, etodolac or CAM plus etodolac as compared with those in rats given no drugs. In the lungs of rats which received the drugs, the suppression of chronic inflammation in the alveolar spaces and walls was evident. The labeling index of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) decreased in alveolar hyperplasia (AH) in the lungs of rats which received CAM, etodolac and CAM plus etodolac; however, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) generation studied by immunohistochemistry did not differ between the lungs of rats with or without the administration of drugs. The results indicate that the suppression of chronic inflammation may inhibit the progression of lung carcinogenesis by BHP in rats and possibly provide a chemotherapeutic strategy for controlling advanced lung cancer. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 407~418, 2000)

Key words : chronic inflammation, lung carcinogenesis, chemoprevention, BHP, rat

諸 言

肺癌は、世界的に予後不良の代表的な悪性腫瘍で、わが国では、1999年の癌による死亡の第1位を占め¹⁾、大多数の肺癌患者の治療成績は満足できるものではない²⁾。ヒトにおいて癌の発生率を低下させる最も確かな方法は、タバコ、感染症、多種多様な化学物質への環境的、職業的な曝露などを含む発癌物質からの回避である³⁾。しかしながら、ヒトは生活環境から内因性や外因性の発癌物質に曝露される機会が多く、生活環境中から発癌物質の曝露を実際に阻止することはできない。

近年、持続的な炎症とその制御が、癌に対する化学予防戦略の一つのアプローチとして注目されている。感染や毒素への曝露により生じる慢性炎症は、時に防御的に、またある時には、発癌を促進的に働く分子種を生成する。実験的には、プロスタグランジン合成酵素阻害作用を持つ抗炎症薬が慢性炎症を制御することで肝発癌を抑制し⁴⁾、特に、cyclooxygenase (COX)-2阻害剤の大腸⁵⁻⁷⁾、膀胱⁸⁾における発癌抑制作用が報告されている。そして、近年の家族性大腸腺腫に対するCOX-2阻害剤の大規模臨床試験により、その発癌抑制効果が期待されてきている⁹⁾。

ラットに、N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine (BHP)を経口投与すると、肺に高率に腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌と組織学的に分類可能な癌の発生がみられ、これらの癌は組織学的にヒトの非小細胞癌と類似し、それぞれ前癌病変を経て発生する^{10,11)}。BHPによる肺発癌系においては、種々の遺伝子変化が検出されている¹²⁻¹⁵⁾。

Tsutsumiらは¹⁶⁾、BHPによる実験的ラット肺発癌モデルにおいて、抗菌薬と抗炎症薬の併用投与で慢性炎症を抑制すると癌の進展を抑制し得る可能性について報告した。本研究は、ヒトで感染症の治療薬として用いられている抗菌薬であるclarithromycin (CAM)とCOX-2の阻害剤であるetodolacを用い、これら薬剤のBHPによりイニシエイトされた細胞群の癌への進展に対する影響について検索した。

材 料 と 方 法

1. 動物

動物は、5週齢のWistar系雄ラット(日本SLC株式会社、浜松)を用い、1週間の予備飼育後、実験に供した。動物は、室温24±1℃、湿度60±5%および照明1日12時間に設定した飼育室で、プラスチックケージに4~5匹づつ収容し飼育した。その間、飲料水は水道水を用い、

基礎食はCE-2固形基礎飼料(日本クレア株式会社、東京)を自由に摂取せしめた。

2. 発癌物質および被験物質

(1) 発癌物質

BHP(ナカライテスク株式会社、京都)を2000ppmの濃度で蒸留水に溶解し、遮光容器を用いて投与した。BHP含有飲料水は週に1度の割合で調製した。

(2) 被験物質

被験物質は、それぞれCE-2粉末基礎飼料(日本クレア株式会社、東京)に混合調製した。CAM(大日本製薬株式会社、ダイナボット株式会社、大阪)は、0.02%の濃度で基礎食に混合調製した。etodolac(日本新薬株式会社、京都)は、0.015%の濃度で基礎食に混合調製した。CAMとetodolacの投与量は、ヒトへの投与量(それぞれ1日400mg)とその毒性を考慮し、算出した。

3. 実験方法

実験プロトコルをFig. 1に示す。

Wistar系雄ラット94匹を用い、8群を作製した。第1群はBHPを含まない水道水と基礎食を全実験期間に投与した群、第2、3と4群はBHPを含まない水道水を12週間投与後、それぞれ0.02%CAM、0.015%etodolacと0.02%CAMおよび0.015%etodolacの併用投与を8週間おこなった群とした。第5、6、7と8群は2000ppmBHP含有飲料水を12週間投与した後、それぞれ粉末基礎食、0.02%CAM、0.015%etodolac、0.02%CAMおよび0.015%etodolacの併用投与をおこなった群とした。動物は、連日その状態を観察し、体重、粉末飼料の摂取量は1週間に1度の割合で測定した。全動物は実験開始後20週にてエーテル麻酔下で腹部大動脈より放血安楽死させ、肺を摘出した。

4. 病理組織学的検索

動物の肺は、生体内における肉眼的観察の後、直ちに摘出し、気管より氷冷中性緩衝ホルマリン(ナカライテスク株式会社、京都)を注入後、同液にて浸漬固定した。肺標本は5葉より各切片を切りだし、常法に従いパラフィン包埋し、薄切切片を作製した。肺病変の病理診断はヘマトキシリン-エオジン(H.E.)染色標本によりおこない、さらに連続切片を作製し、免疫組織化学染色に供した。肺における病変は、Konishiらの基準^{10,11)}に従い、肺胞上皮過形成(alveolar hyperplasia: AH)、腺腫(adenoma: AD, Plate 1.)、腺癌(adenocarcinoma: AC, Plate 2.)、扁平上皮化生(squamous metaplasia: SMD)、扁平上皮癌(squamous cell carcinoma: SCC, Plate 3.)、および腺扁平上皮癌(adenosquamous carcinoma: ASCC, Plate 4.)に分類し、それらの発生頻度および個体

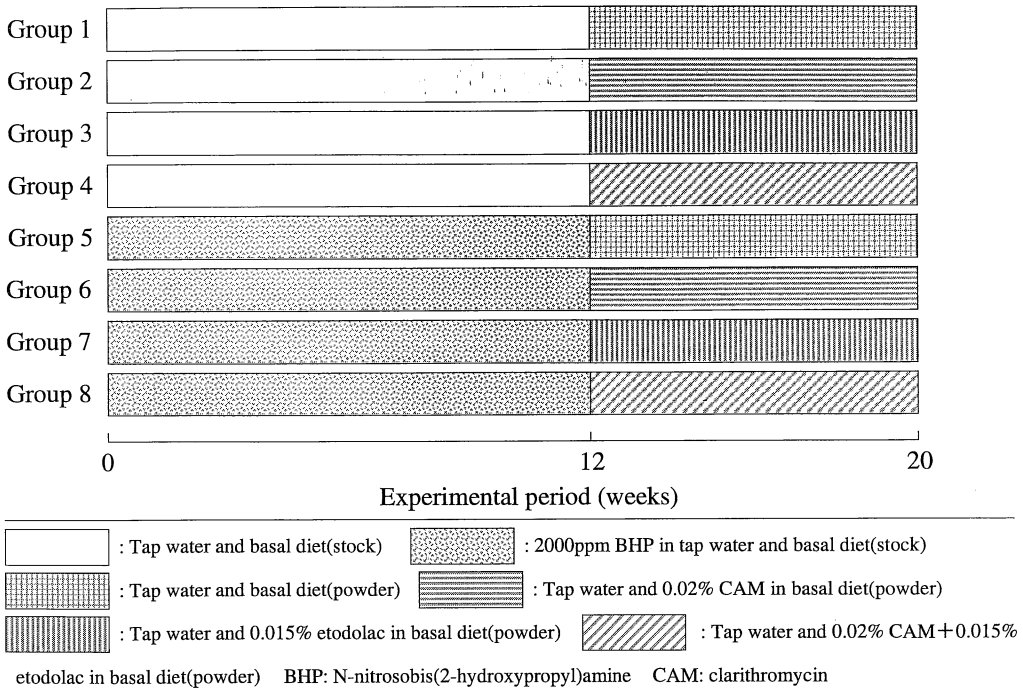


Fig. 1. Experimental design

一匹あたりの発生個数を算出した。

5. 免疫組織化学的検索

AH, AD, AC 各病変における酸化的 DNA 傷害の関与を検索する目的で、8-ヒドロキンドデオキシグアノシン(8-OHdG)染色をおこなった。薄切切片を脱パラフィンした後、抗原賦活化液 H(ダイアトロン株式会社, 東京)中に浸し、100℃で30分間のオートクレーブにて抗原の賦活をおこない、2 μg/ml proteinase K 溶液中で室温5分間、2 N HCl 溶液中で37℃、30分間の核酸変性処理をおこなった。一次抗体は、2 μg/ml の濃度に調整した抗8-OHdG マウスモノクローナル抗体(日本油脂株式会社, 東京)を用い、4℃で16時間反応させた。0.3% H₂O₂ 含有70%メタノール溶液中で内因性ペルオキシダーゼを阻害した後、ユニバーサル LSAB 2 キット(ダコ・ジャパン株式会社, 京都)を用い、3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)で発色操作をおこなった。対比較染色は Mayor's ヘマトキシリンにておこなった。

また、肺における細胞増殖活性を検索する目的で PCNA (proliferating cell nuclear antigen)染色をおこなった。PCNA 染色はパラフィン包埋薄切切片を脱パラ

フィン後 EPOS 抗 PCNA マウスモノクローナル抗体(ダコ・ジャパン株式会社, 京都)を用い、DAB で発色後、Mayor's ヘマトキシリンで対比較染色をおこなった。AH 病変は第5群から20病変、第6, 7, 8群から各10病変、AD 病変は第5群から13病変、第6群から11病変、第7群から10病変、第8群から11病変、AC 病変は第5群から10病変、第6群から6病変、第7群から8病変、第8群から3病変をそれぞれ無作為的に選択し、1病変について300~1000個の細胞における PCNA 陽性細胞を算出し、PCNA 標識率を算出した。

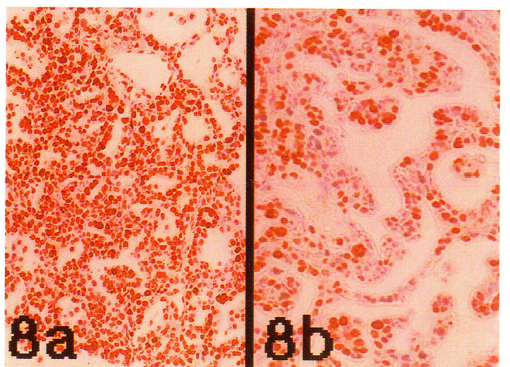
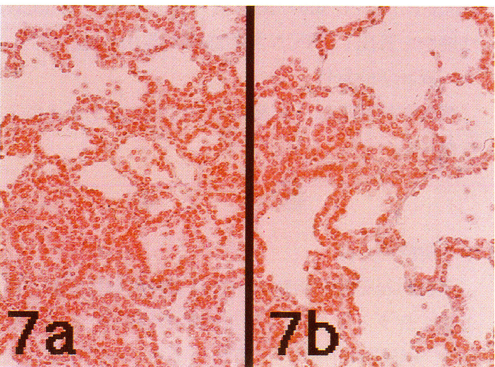
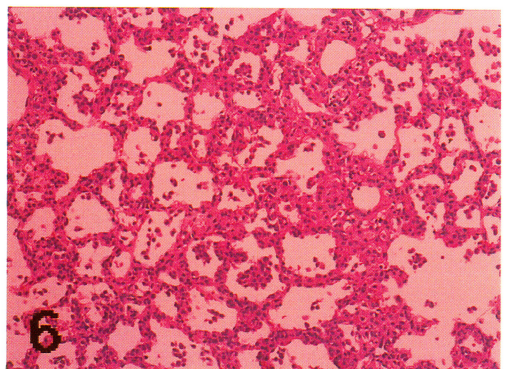
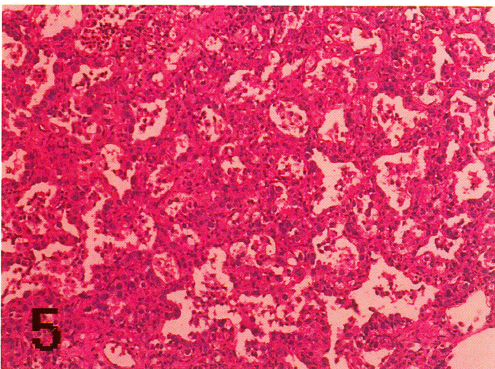
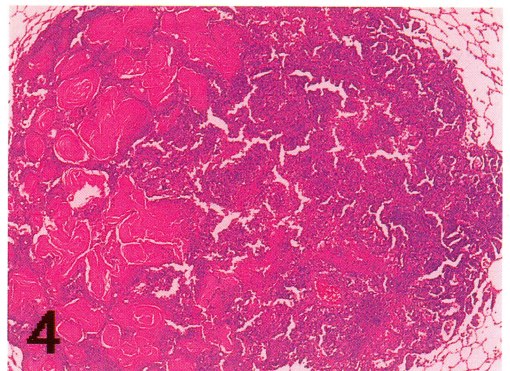
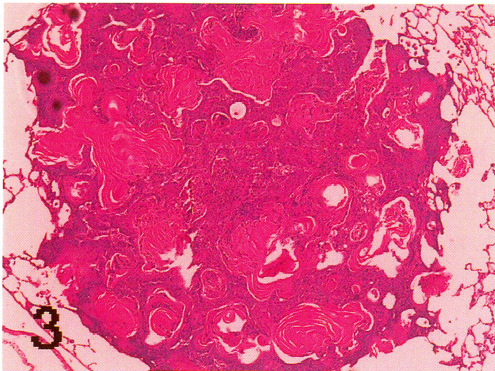
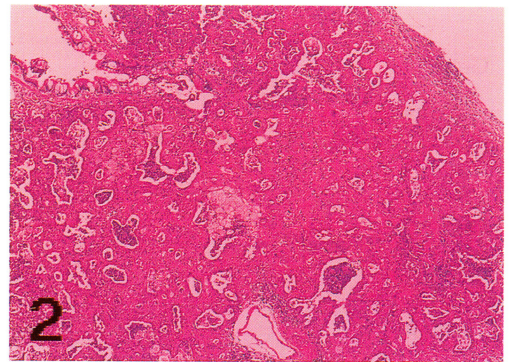
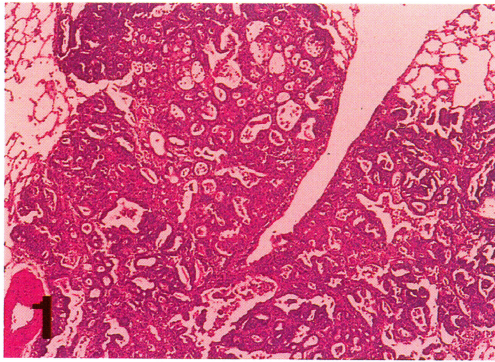
6. 統計学的解析

統計学的解析は、 χ^2 検定と Student's t-test によりおこなった。

結 果

1. 実験の詳細

全動物の実験開始時および終了時の有効匹数と体重および1日ラット1匹当たりの餌の摂取量は Table 1 に示す。実験期間中第1~4群での動物の死亡はみられなかったが、第7群で20匹中10匹、第6群で17匹中1匹、



Plates

第7群で17匹中4匹, 第8群で20匹中3匹が途中死亡した。死亡原因は大部分が食道腫瘍の発生による摂食障害であった。最終体重は, BHP 非処置群である第1~4群に比し, BHP 処置群である第5~8群にて体重の増加抑制が認められた。しかし, 第1~4群間, あるいは第5~8群間では, いずれの被験物質投与群においても, 動物体重に統計学的な有意差はみられず, 被験物質による体重増加の抑制は観察されなかった。摂餌量は, 第1~4群

では1日ラット1匹当たり17.01g~18.16gであり, 第5~8群では1日ラット1匹当たり11.71g~12.21gであった。第1~4群間あるいは第5~8群間において摂餌量に有意差は認めなかった。

各被験物質の摂取量はTable 2に示す。

CAM は第2群と第4群にて1日ラット1匹当たりそれぞれ3.48, 3.44mgで, 第6群と第8群ではそれぞれ2.41, 2.35mgであり, etodolac は第3群と第4群では

Table 1. Body weight and food intake

Group	No. of animals		Body weight(g) ^a		Food intake (g/day/rat)
	Initial	Final	Initial	Final	12-20(W)
1	5	5	146.2±7.1	398.8±14.9	18.16
2	5	5	136.0±5.5	400.4±21.1	17.39
3	5	5	146.4±4.1	388.0±25.9	17.01
4	5	5	151.2±7.6	406.0±19.2	17.18
5	20	10	146.9±7.5	274.0±28.6	11.71
6	17	16		274.4±37.0	12.06
7	17	13		276.2±28.2	12.21
8	20	17		270.7±40.9	11.76

^aValues are means±SD.

Plate 1. Microscopic view of adenoma of the lung in a rat of group 5. H. E. stain×20

Plate 2. Microscopic view of adenocarcinoma of the lung in a rat of group 5. H. E. stain×20

Plate 3. Microscopic view of squamous cell carcinoma of the lung in a rat of group 5. H. E. stain×20

Plate 4. Microscopic view of adenosquamous carcinoma of the lung in a rat of group 8. H. E. stain×20

Plate 5. Representative histological appearance of inflammatory reaction in alveolar hyperplasia of the lung in a rat of group 5. H. E. stain×50

Plate 6. Representative histological appearance of inflammatory reaction in alveolar hyperplasia of the lung in a rat of group 8. H. E. stain×50

Plate 7a. Representative histological appearance of 8-OHdG in alveolar hyperplasia of the lung in a rat of group 5. Anti-8-OHdG antibody stain×50

7b. Representative histological appearance of 8-OHdG in alveolar hyperplasia of the lung in a rat of group 8. Anti-8-OHdG antibody stain×50

Plate 8a. Representative histological appearance of PCNA in alveolar hyperplasia of the lung in a rat of group 5. Anti-PCNA antibody stain×50

8b. Representative histological appearance of PCNA in alveolar hyperplasia of the lung in a rat of group 8. Anti-PCNA antibody stain×50

それぞれ 2.55, 2.58 mg であり, 第 7 群と第 8 群ではそれぞれ 1.83, 1.76 mg であった. ラット 1 匹当たり 1 日の摂取量より実験期間中の総摂取量を算出すると, CAM, etodolac とも BHP を投与した第 6, 7, 8 群において低値であったが, 体重当たりの摂取量には大差はなかった.

2. 肺病変の発生頻度と個数

肺病変は, BHP 処置群である第 5~8 群においてのみ観察された. 第 5~8 群の肺病変の発生頻度は Table 3 に示す. AH, AD, AC, SM, SCC, ASCC, Total ca.

の発生頻度はすべての肺病変において各群間に統計学的な有意差は認めなかったが, AC と Total ca. において第 8 群ではその発生頻度の抑制傾向がみられた.

肺病変の一匹あたりの平均発生個数は, Table 4 に示す. AH, AD, AC, SM, SCC, ASCC 病変においては統計学的な有意差は各群間においては認めなかったが, Total ca. の個数は第 5 群に比し, 第 6, 7 群と第 8 群では有意に抑制された. また, 第 6, 7 群と第 8 群の間では統計学的には有意差は認めなかったが, 第 6, 7 群に比べ, 第 8 群で抑制される傾向を示した.

Table 2. Total chemical intake

Group	No. of animals		Drug intake			
	Initial	Final	Daily intake by a rat (mg)		Total intake by a rat (mg)	
			CAM	etodolac	CAM	etodolac
1	5	5	0	0	0	0
2	5	5	3.48	0	194.9	0
3	5	5	0	2.55	0	142.8
4	5	5	3.44	2.58	192.6	144.5
5	20	10	0	0	0	0
6	17	16	2.41	0	135.0	0
7	17	13	0	1.83	0	102.5
8	20	17	2.35	1.76	131.6	98.6

CAM : clarithromycin

Table 3. Incidence of lung lesions in rats given CAM and/or etodolac after BHP

Group	Test compounds	Incidence of lung lesions per a rat (%)						
		AH	AD	AC	SM	SCC	ASCC	Total ca.
5	basal diet	100	70	60	0	20	0	70
6	CAM	100	50	37.5	0	12.5	0	50
7	etodolac	100	69.2	46.2	0	0	0	46.2
8	CAM+etodolac	100	52.9	17.6	11.8	0	11.8	29.2

CAM : clarithromycin BHP : N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine AH : alveolar hyperplasia
AD : adenoma AC : adenocarcinoma SM : squamous metaplasia SCC : squamous cell carcinoma
ASCC : adenosquamous carcinoma Total ca. : total carcinoma including AC, SCC and ASCC

Table 4. Numbers of lung lesions in rats given CAM and/or etodolac after BHP

Group	Test compounds	Number of lung lesions per a rat ^a						
		AH	AD	AC	SM	SCC	ASCC	Total ca.
5	basal diet	7.8±1.9	1.3±1.1	1.0±1.1	0	0.3±0.7	0	1.3±1.3
6	CAM	5.3±1.9	0.9±0.8	0.4±0.5	0	0.1±0.3	0	0.5±0.5 ^b
7	etodolac	7.3±1.8	0.8±0.6	0.6±0.9	0	0	0	0.6±0.9 ^b
8	CAM+etodolac	6.0±1.8	0.6±0.7	0.2±0.4	0.1±0.3	0	0.1±0.3	0.3±0.5 ^b

^aValues are means±SD. BHP : N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine CAM : clarithromycin
AH : alveolar hyperplasia AD : adenoma AC : adenocarcinoma SM : squamous metaplasia
SCC : squamous cell carcinoma ASCC : adenosquamous carcinoma Total ca. : total carcinoma
including AC, SCC and ASCC ^bP<0.5 against B-1

3. 肺の慢性炎症の解析

肺における慢性炎症性変化を解析した組織所見の要約は Table 5 に示す。BHP を投与していない第 1~4 群では、肺に炎症反応はほとんどみられなかった。第 5~8 群においても非病変部肺にては細胞浸潤と慢性炎症性変化はほとんどみられなかったが、AH 病変では肺胞壁の鬱血、浮腫、好中球浸潤がみられ、肺胞腔内では好中球、マクロファージおよびリンパ球の浸潤と浸出液が認められた(Plate 5)。また AD から AC 病変へと進展するにつれて上記の炎症細胞浸潤や炎症性反応は増強していた。これらの炎症性変化は、第 5 群に比し、第 8 群で明らかに抑制されていた(Plate 6)。

4. 肺における 8-OHdG の発生

8-OHdG 抗体を用いた染色では、陽性反応は核にのみみられ、細胞質と細胞膜系にはみられなかった。BHP 投与、非投与にかかわらず、正常肺組織では、肺胞腔内のマクロファージは陽性所見を呈するが、I 型、II 型肺胞上皮細胞や血管内皮細胞は陰性であった。各群ともに AH 病変では病変内細胞は強陽性であった(Plate 7a, b.)が、AD, AC 病変では AH 病変に比べ、その染色性は低下していた。各群いずれの病変でも、炎症細胞は強陽性であり、各群間で染色性に差はみられなかった。

5. 肺病変における細胞増殖活性

AH, AD, AC の各病変における PCNA 標識率は Table 6 に示す。AH 病変では第 5 群(Plate 8a.)に比し、第 6, 7, 8 群で有意に抑制されていた。さらに、第

Table 5. Histological analysis on inflammatory reactions in the lungs of rats given BHP or BHP followed by CAM and/or etodolac

Group	Test compounds	Lesion	Inflammatory cell infiltration			Inflammatory change		
			Neutrophils	Macrophages	Lymphocytes	Exudate	Edema	Congestion
5	basal diet	Area of non lesions	-	±	-	-	-	-
		AH	±/+	+/++	+	+	+	±/+
		AD	++	++	+/++	+/++	+/++	+
		AC	++	+/+++	+/++	++	+/+++	+/++
6	CAM	Area of non lesions	-	±	-	-	-	-
		AH	±	+	±/+	±	±/+	±
		AD	+	+/++	+	+	+	±/+
		AC	+/++	++	+	+	++	+
7	etodolac	Area of non lesions	-	±	-	-	-	-
		AH	±/+	+	±/+	±/+	±/+	±
		AD	+/++	+/++	+	+	+	±/+
		AC	+/++	++	+	+/++	++	+
8	CAM+etodolac	Area of non lesions	-	±	-	-	-	-
		AH	±	±/+	±	-	±	-/±
		AD	±/+	+	±/+	±/+	±/+	±
		AC	+	+/++	±/+	±	+	±/+

-, absent ; ±, few ; +, mild ; ++, moderate ; +++, severe BHP : N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine CAM : clarithromycin AH : alveolar hyperplasia AD : adenoma AC : adenocarcinoma

Table 6. PCNA labeling indices in the lungs of rats given CAM and/or etodolac after BHP

Group	AH		AD		AC	
	No. of lesions examined	PCNA labeling index (%) ^a	No. of lesions examined	PCNA labeling index (%) ^a	No. of lesions examined	PCNA labeling index (%) ^a
5	20	48.54±6.79	13	60.68±4.06	10	87.30±6.59
6	10	39.51±4.94 ^b	11	59.20±2.33	6	88.03±1.21
7	10	37.83±8.94 ^c	10	58.08±4.12	8	88.14±3.73
8	10	31.41±6.12 ^{c,d}	11	59.14±4.24	3	89.03±0.76

PCNA : proliferating cell nuclear antigen BHP : N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine CAM : clarithromycin AH : alveolar hyperplasia AD : adenoma AC : adenocarcinoma ^aValues are means ± SD. ^bP<0.01 against B-1 ^cP<0.001 against B-1 ^dP<0.05 against B-2 and B-3

8群(Plate 8b.)では、第6、7群に比しても有意に抑制されていた。ADとAC病変における標識率は各群間で有意差は認めなかった。

考 察

本研究は、ヒトで広く臨床に用いられている14員環マクロライド系抗菌薬：CAMとCOX-2阻害剤：etodolacを用いてこれら薬剤のBHPによる肺発癌に対する抑制効果を検索した。両薬剤は、ヒトでの1日の常用量は400mgであり、ヒトの体重を50kgとし、第1~4群のラットの体重をおよそ400g、第5~8群のラットの体重をおよそ270gとし、ヒト体重400g、270gとしてそれぞれ換算すると3.2mg、2.16mgとなり、Table 2で示す薬剤摂取量と大差はなかった。

肺病変では、CAMとetodolacはAH、AD、AC、SCC、SM、ASCCの発生頻度に影響を与えなかったが、AC、SCCとASCCを含む総癌発生個数を減少せしめた。さらにこれら薬剤は、AHにおいてPCNA標識率を減少せしめ、肺腔内の炎症性細胞浸潤と肺胞壁における炎症性変化を抑制した。この事実は、肺における慢性炎症がAHよりAD、ACへの進展に関与し、これら薬剤による慢性炎症抑制が総癌発生個数を減少せしめ、肺の発癌過程のプロモーションを抑制し得ることを示唆している。活性酸素によるDNA障害—8-OHdG発生は、これら薬剤により消去または抑制されなかった。8-OHdGは突然変異をともなう発癌早期のDNA損傷で、本実験においてBHP投与により誘発される肺の変化によるものと考えられ、肺病変の発生頻度は各群間に有意差のないことより、CAMとetodolacは肺発癌早期のDNA障害に対しては無効であった。

ヒトにおける慢性炎症の抑制は、癌の発生と進展の抑制において有望な手段の一つであることが提唱されている。ヒトでは、C型肝炎ウイルスによる慢性肝炎に、抗炎症作用を有する漢方製剤やウルソデオキシコール酸などを投与することにより、肝細胞癌への進展を抑制し得る可能性が報告されている¹⁷⁾。また、1994年WHO/IARCが疫学的データにより*Helicobacter pylori* (*H. pylori*)を確実な胃癌の発生因子に認定し¹⁸⁾、実験的にはスナネズミに*H. pylori*を経口感染させることにより、胃癌が発生し、その除菌により慢性胃炎と胃潰瘍、さらに胃癌発生を阻止し得ることが検証され¹⁹⁻²³⁾、現在日本をはじめ世界各国で人為的介入研究が進行中である。しかしながら、肺の慢性炎症の抑制と肺癌の発生進展の関連性に関する研究は乏しい。

慢性炎症による発癌のメカニズムについては、慢性炎

症により産生される種々のサイトカインやアラキドン酸カスケードに関連する遺伝子の変化²⁴⁾、活性酸素による酸化的DNA損傷とそれにともなう遺伝子変化などが示唆されている²⁵⁾。アラキドン酸代謝における律速酵素はCOXとして知られている酵素によって調節されている。COXはプロスタグランジン類、プロスタサイクリン、トロンボキサン類のような分子の前駆体であるプロスタグランジンH₂の生合成を触媒している。COXには現在COX-1とCOX-2の2つのアイソザイムが知られており、COX-1は生理的に存在する構成酵素であるのに対し、COX-2は炎症に関与する誘導酵素であり、炎症反応にともない発現が誘導されるほか、細胞の増殖刺激にともない発現が誘導される。Kitayamaら¹⁵⁾は、BHPにより誘導されたラットのADやAC病変において強くCOX-2蛋白が発現しており、AH病変では発現が弱く、COX-2はAHがACへと進展していく過程で重要な働きをしている可能性を報告し、ヒトの肺癌においてもCOX-2の発現が報告されている^{26,27)}。また、CAMを含む14員環マクロライド系抗菌薬は、本来の抗菌作用だけではなく、抗炎症作用を持ち²⁸⁻³⁰⁾、サイトカインネットワークの制御作用を持つ³¹⁻³³⁾。臨床的には、抗癌化学療法や放射線療法を施行した切除不能の非小細胞肺癌患者の生存期間を延長させ³⁴⁾、実験的には、ルイス肺癌細胞を皮下接種したマウスに対し、NK細胞活性とCD8+T細胞の細胞障害活性を増強させ、インターフェロン- γ とインターロイキン-4を産生するT細胞を増加させることで腫瘍増殖を抑制するとする報告もある³⁵⁾。これらの報告と今回の実験結果からCAMおよびetodolacはヒトの非小細胞肺癌の臨床においてbiological response modifierとして有望な化学予防のアプローチの一つになり得る可能性が示唆された。

今回の実験でおこなった8-OHdG染色においてAH、AD、AC各病変における酸化的ストレスの関与が示唆されたが、8-OHdGの発生はAHに比べ、AD、AC病変では低下していた。8-OHdGは酸素ラジカルによるDNA損傷の指標であり^{36,37)}、*in vitro*³⁸⁾や*in vivo*³⁹⁻⁴²⁾においてG・CからT・Aへの変異を引き起こすことが報告されているが、今回の染色結果から8-OHdGの発生はAH病変がAD、AC病変へと進展していく過程でより強く関与する可能性が推測された。ヒトでも、非小細胞肺癌患者で、Ki-rasとp53遺伝子においてGからTへの変異が同定され^{25,43)}、肺癌患者の末梢肺組織のDNA中で8-OHdGの産生亢進が報告され⁴⁴⁾、肺発癌における酸化的ストレスの関与が示唆されている。今回用いたCAMとetodolacには酸化的ストレスの抑制作用は認めなか

ったが、その抑制作用を持つ物質に加え、CAM, etodolac を併用することにより、より効果的な肺発癌抑制作用が期待できるのではないかと考えられた。

結 論

BHP 投与によるラット肺発癌モデルを用いて、抗菌薬：CAM と COX-2 阻害剤：etodolac による抑制効果について検索し、以下の結果を得た。

1. 各実験群において、被験物質投与による発育の抑制は観察されず、各被験物質の摂取量は、ヒトでの常用量と大差はなかった。
2. 肺病変の発生頻度は、肺胞上皮過形成、腺腫、腺癌、扁平上皮化生、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、すべての癌の合計において各群間での統計学的な有意差は認めなかったが、腺癌およびすべての癌の合計において基礎食群よりも CAM, etodolac の単独投与群、そして各単独投与群よりも併用投与群の方が抑制される傾向を示した。
3. 肺病変の一匹当たりの平均発生個数では、総癌発生個数において基礎食群に対し、CAM, etodolac のそれぞれ単独、併用投与群にて有意に抑制された。
4. 抗 8-OHdG 抗体による免疫染色において、肺胞上皮過形成では病変のほぼすべての細胞核が強陽性に染色された。腺腫、腺癌でも細胞核は陽性所見を呈したが、肺胞上皮過形成に比べ、染色性は低下していた。いずれの病変でも、炎症にともなう浸潤細胞は強陽性に染色された。また、各病変の BHP 投与群間での染色性の相違は認めず、CAM と etodolac は肺発癌早期の DNA 傷害に対しては無効であると考えられた。
5. PCNA 標識率では、肺胞上皮過形成病変において、基礎食群に比べ、CAM, etodolac の各単独投与群で、さらに、各単独投与群に対し併用投与群で有意に標識率が低下していた。腺腫、腺癌病変においてはこのような差は認めなかった。

以上の結果から、CAM, etodolac の投与による慢性炎症の制御が肺発癌後期の変化を抑制する可能性が示唆され、肺発癌には酸化的 DNA 損傷が関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、厚生省がん研究助成金およびがん克服戦略研究事業による助成金を受けたものであることをここに付記する。稿を終えるにあたり、終始御指導、御助言を賜りました恩師腫瘍病理学教室小西陽一教授に深甚の謝意を申し上げますとともに論文の御校閲、御助言を賜りました第二内科学教室成田亘啓教授ならびに細菌学教室喜

多英二教授に深謝申し上げます。また研究の遂行にあたり終始御指導を戴きました腫瘍病理学教室堤 雅弘講師に心から感謝するとともに、ご協力を賜った腫瘍病理学教室、第二内科学教室の御諸兄姉に感謝いたします。なお、本論文の要旨は、第 40 回日本呼吸器学会総会(2000 年 3 月広島)、第 59 回日本癌学会総会(2000 年 10 月横浜)において発表した。

文 献

- 1) 厚生省：平成 11 年 人口動態統計(確定数)の概況
- 2) 河原正明：非小細胞肺がんのガイドライン。最新医学。54：2539-2543, 2000.
- 3) Goldman, L., Bennett, J. C., editors. "Cancer prevention", chap 190. In: Cecil textbook of medicine. 21st ed. Philadelphia (PA): Saunders; 1032-1035, 2000.
- 4) Denda, A., Endoh, T., Kitayama, W., Tang, Q., Noguchi, O., Kobayashi, Y., Akai, H., Okajima, E., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Nakae, D. and Konishi, Y.: Inhibition by piroxicam of oxidative DNA damage, liver cirrhosis and development of enzyme-altered nodules caused by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats. Carcinogenesis 18: 1921-1930, 1997.
- 5) Takahashi, M., Fukutake, M., Yokota, S., Ishida, K., Wakabayashi, K. and Sugiura, T.: Suppression of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon by nimesulide, a selective inhibitor of cyclooxygenase 2. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 219-222, 1996.
- 6) Reddy, B. S., Rao, C. V. and Seibert, K.: Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. Cancer Res. 56: 4566-4569, 1996.
- 7) Taketo, M. M.: Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II). J. Natl. Cancer Inst. 90: 1609-1619, 1998.
- 8) Okajima, E., Denda, A., Ozono, S., Takahama, M., Akai, H., Sasaki, Y., Kitayama, W., Wakabayashi, K. and Konishi, Y.: Chemopreventive effects of nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary bladder carcinomas initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. Cancer Res. 58: 3028-3031, 1998.

- 9) Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K. S., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L. and Levin, B. : The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* **342** : 1946-1952, 2000.
- 10) Konishi, Y., Kondo, H., Denda, A., Takahashi, S. and Inui, S. : Lung carcinomas induced by oral administration of N-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine in rats. In Severi, L. (ed.) *Tumors of Early Life in Man and Animals*. Pelgia University, Italy, pp. 637-649, 1978.
- 11) Yokose, Y., Yamamoto, K., Nakajima, A., Eimoto, H., Maruyama, H. Mori, Y. and Konishi, Y. : Carcinogenic potency of N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine and other metabolic relatives of N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine by single intraperitoneal injection in the lung of rats. *Jpn. J. Cancer Res* **79** : 698-704, 1988.
- 12) Kitada, H., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Takahama, M., Fukuda, T., Narita, N. and Konishi, Y. : Frequent mutations of Ki-*ras* but no mutations of Ha-*ras* and *p53* in lung lesions induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in rats. *Mol. Carcinog.* **15** : 276-283, 1996.
- 13) Sakitani, H., Tsutsumi, M., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Takahama, M., Iki, K., Tsujiuchi, T., Muramatsu, T., Sakuma, S., Sakaki, T. and Konishi, Y. : Overexpression of midkine in lung tumors induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in rats and its increase with progression. *Carcinogenesis* **20** : 465-469, 1999.
- 14) Takahama, M., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Kido, A., Sakitani, H., Iki, K., Taniguchi, S., Kitamura, S. and Konishi, Y. : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors during lung carcinogenesis by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in rats. *Mol. Carcinog* **24** : 287-293, 1999.
- 15) Kitayama, W., Denda, A., Yoshida, J., Sakaki, Y., Takahama, M., Murakawa, K., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M. and Konishi, Y. : Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in rat lung tumors induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine. *Cancer Letters* **148** : 145-152, 2000.
- 16) Tsutsumi, M., Kitada, H., Shiraiwa, K., Takahama, M., Tsujiuchi, T., Sakitani, H., Sasaki, Y., Murakawa, K., Yoshimoto, M. and Konishi, Y. : Inhibitory effects of combined administration of antibiotics and anti-inflammatory drugs on lung tumor development initiated by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in rats. *Carcinogenesis* **21** : 251-256, 2000.
- 17) Oka, H., Yamamoto, S., Kuroki, T., Harihara, S., Murano, T., Kim, S. R., Monna, T., Kobayashi, K. and Tango, T. : Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with sho-saiko-to (TJ-9). *Cancer* **76** : 743-749, 1995.
- 18) International Agency for Research on Cancer, World Health Organization : Schisosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. **61** : 177, 1994.
- 19) Sugiyama, A., Maruta, F., Ikeno, T., Ishida, K., Kawasaki, S., Katsuyama, T., Shimizu, N. and Tatematsu, M. : *Helicobacter pylori* infection enhances N-methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil. *Cancer Res.* **58** : 2067-2075, 1998.
- 20) Tokieda, M., Honda, S., Fujioka, T. and Nasu, M. : Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Carcinogenesis* **20** : 1261-1266, 1999.
- 21) Shimizu, N., Inada, K., Nakanishi, H., Tsukamoto, T., Ikehara, Y., Kaminishi, M., Kuramoto, S., Sugiyama, A., Katsuyama, T. and Tatematsu, M. : *Helicobacter pylori* infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **20** : 669-676, 1999.
- 22) Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S. and Nakao, M. : *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* **115** : 642-648, 1998.
- 23) Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A. and Nasu, M. : Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in

- Mongolian gerbils. *Cancer Res.* **58**: 4255-4259, 1998.
- 24) **Hursting, S. D., Slaga, T. J., Fischer, S. M., DiGiovanni, J. and Phang, J. M.** : Mechanism-based cancer prevention approaches: targets, examples and the use of transgenic mice. *J. Natl Cancer Inst.* **91**: 215-225, 1999.
- 25) **Dreher, D. and Junod, A. F.** : Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer* **32**: 30-38, 1996.
- 26) **Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T. and Takahashi, T.** : Increased expression of cyclooxygenase-2 occurs frequently in human lung cancers. specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.* **58**: 3761-3764, 1998.
- 27) **Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A. Vainio, H. and Ristimäki, A.** : Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.* **58**: 4997-5001, 1998.
- 28) **Mikasa, K., Kita, E., Sawaki, M., Kunimatsu, M., Hamada, K., Konishi, M., Kashiba, S. and Narita, N.** : The anti-inflammatory effect of erythromycin in zymosan-induced peritonitis of mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**: 339-348, 1992.
- 29) **de Paulis, A., Girillo, R., Ciccarelli, A., de Crescenzo, G., Oriente, A. and Marone, G.** : Characterization of the anti-inflammatory effect of FK-506 on human mast cells. *J. Immunol.* **147**: 4278-4285, 1991.
- 30) **Umeki, S.** : Anti-inflammatory action of erythromycin. *Chest* **104**: 1191-1193, 1993.
- 31) **Kita, E., Sawaki, M., Mikasa, K., Hamada, K., Takeuchi, S., Maeda, K. and Narita, N.** : Alterations of host response by a long-term treatment of roxithromycin. *J. Antimicrob.* **32**: 185-194, 1993.
- 32) **Takehita, K., Yamagishi, I., Harada, M. and Otomo, S.** : Immunological and anti-inflammatory effects of clarithromycin: Inhibition of interleukin 1 production of murine peritoneal macrophage. *Drugs Exp. Clin. Res.* **15**: 527-533, 1989.
- 33) **Takizawa, H., Desaki, M., Ohtoshi, T., Kikutani, T., Okazaki, H., Sato, M., Akiyama, N., Shoji, S., Hiramatsu, N. and Ito, K.** : Erythromycin suppress interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells: A potential mechanism of its anti-inflammatory action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**: 781-781, 1995.
- 34) **Mikasa, K., Sawaki, M., Kita, E., Hamada, K., Teramoto, S., Sakamoto, M., Maeda, K., Konishi, M. and Narita, N.** : Significant survival benefit to patients with advanced non-small-cell lung cancer from treatment with clarithromycin. *Chemotherapy* **43**: 288-296, 1997.
- 35) **Hamada, K., Mikasa, K., Yunou, Y., Kurioka, T., Majima, T., Kita, E. and Narita, N.** : Adjuvant effect of clarithromycin on chemotherapy for murine lung cancer. *Chemotherapy* **46**: 49-61, 2000.
- 36) **Kasai, H. and Nishimura, S.** : Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* **12**: 2137-2145, 1984.
- 37) **Shigenaga, M. K. and Ames, B. N.** : Assay for 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vitro oxidative DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* **10**: 211-216, 1991.
- 38) **Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A. P.** : Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidative-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**: 431-434, 1991.
- 39) **Wood, M., L., Dizdarogul, M., Gajewski, E. and Essigmann, J. M.** : Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxydeoxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* **29**: 7024-7032, 1990.
- 40) **Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M. and Grollman, A. P.** : Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: a study on translation synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutant. Res.* **254**: 281-288, 1991.
- 41) **Kamiya, H., Miura, K., Ishikawa, H., Inoue, H., Nishimara, S. and Ohtsuka, E.** : c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanosine at codon 12 induces point mutations at the modified and

- adjacent positions. *Cancer Res.* **52**: 3483-3485, 1992.
- 42) **Cheg, K., Cahill, D., Kasai, H., Hishimura, S. and Loeb, L. A.** : 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. *J. Biol. Chem.* **267** : 166-172, 1992.
- 43) **Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. C.** : *p53* mutation in human cancers. *Science* **253** : 49-53, 1991.
- 44) **Inoue, M., Osaki, T., Noguchi, M., Hirohashi, S., Yasumoto, K. and Kasai, H.** : Lung cancer patients have increased 8-hydroxydeoxyguanosine levels in peripheral lung tissue DNA. *Jpn. J. Cancer Res.* **89** : 691-695, 1998.