

# N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) による ラット肺と食道発癌に対する bovine lactoferrin の影響

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

吉 田 順 一

## EFFECTS OF BOVINE LACTOFERRIN ON LUNG AND ESOPHAGEAL CARCINOGENESIS BY N-NITROSOBIS (2-HYDROXYPROPYL)AMINE (BHP) IN RATS

JUNICHI YOSHIDA

*Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University*

Received August 16, 1999

**Abstract:** Effects of bovine lactoferrin (bLF) on lung and esophageal carcinogenesis by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) were studied in rats. Male Wistar rats received 2000 ppm BHP in drinking water for 12 weeks, followed by 0.5 % or 2 % bLF for 8 weeks or the same doses of bLF for the entire experimental period of 20 weeks. Lung and esophageal lesions were histopathologically analyzed. No toxic signs including growth retardation and decreased amount of food intake of bLF were observed. The diet containing 0.5 % bLF given after BHP inhibited lung adenoma development and the diets containing 0.5 or 2 % bLF given with BHP for 12 weeks followed by without BHP for 8 weeks reduced the numbers of alveolar hyperplasias and of lung lesions including alveolar hyperplasia, squamous metaplasia, adenoma, adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma. The diets containing two doses of bLF did not affect esophageal carcinogenesis. No promoting effects of bLF on lung and esophageal carcinogenesis by BHP in rats were observed.

These results suggest that bLF is a possible candidate as a chemopreventive agent for lung carcinogenesis. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 366~374, 1999)

**Key words:** bovine lactoferrin (bLF), N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP), rats, lung, esophagus

### 緒 言

Lactoferrin(LF)は、乳汁から見い出された鉄結合性糖蛋白 transferrin の一種であり<sup>1)</sup>, bovine lactoferrin (bLF)は Groves<sup>2)</sup> により、また human lactoferrin (hLF)は Johanson<sup>3)</sup> により、それぞれ 1960 年に同定された。bLF は、分子量 80 kDa で 3 価の鉄イオンと可逆的に結合できる 2 箇所の部位を有する鉄親和性蛋白であり、hLF と 69 % の相同性を有している<sup>4)</sup>。LF は、乳汁とくに初乳に多く含まれているが、涙、精液、唾液、消化液、

胆汁液などの生体分泌液のほか、血液細胞である好中球にも含まれている<sup>5-7)</sup>。

LF は、抗菌作用および生体の防御反応に関連する多機能免疫調節蛋白であることが知られている<sup>8,9)</sup>。抗菌作用の主な機序は、細菌が増殖するのに必要な栄養成分供給に関与する鉄イオンを細菌から取り除くことである<sup>8,9)</sup>。グラム陰性菌では膜に必須の機能を崩壊させることにより細胞致死効果を示すとの報告もある<sup>10)</sup>。免疫能に関しては、多核白血球や単球の運動性と superoxide 産生量を増加させたり<sup>11)</sup>, natural killer 細胞(NK 細胞)

および lymphokine-activated killer 細胞(LAK 細胞)を活性化させ<sup>12)</sup>, NK 細胞に対しては低濃度では細胞毒性を亢進せしめるが, 高濃度では逆に NK 細胞を死滅させる免疫調整作用も有している<sup>13)</sup>.

近年, LF には抗腫瘍効果も有する可能性についての研究がなされている. *In vitro* では, bLF はウシ乳腺細胞株の成長を抑制し<sup>14)</sup>, hLF はヒト乳癌上皮細胞株 HBL-100 細胞と結腸腺癌細胞株 HT-29-18 C の DNA 合成を抑制したとの報告がある<sup>15)</sup>. 一方, *In vivo* でも Bezault et al.<sup>15)</sup> は, hLF が移植可能な線維肉腫細胞株 MCA4-P 5 の成長を抑制し, またメラノーマ細胞株 B16-F 10 の実験的肺転移を抑制することを報告した. その他にもヒト肝癌細胞株(SPA)に対する hLF の増殖抑制作用が報告され<sup>16)</sup>, 転移抑制についても, bLF はげっ歯類のリンパ腫細胞株である L 5178Y-ML 25 細胞の肝および脾への転移を, またメラノーマ細胞株である B16-BL 6 細胞の肺転移をそれぞれ抑制し, 血管新生も抑制することが報告されている<sup>17)</sup>.

LF の化学発癌に及ぼす影響については, ラットに結腸癌を発生せしめる azoxymethane(AOM)と bLF を同時投与することにより, NK 活性が上昇し, 大腸癌の前癌病変と考えられている aberrant crypt foci(ACF)が用量相関的に減少することを Sekine et al.<sup>18)</sup> が報告した. さらに長期にわたる bLF の効果を検索した結果, 大腸の腫瘍が減少し, 特に結腸では腺癌の出現率と平均個数が抑制された<sup>19)</sup>. また Ushida et al.<sup>20)</sup> は, 家族性大腸腺腫症のモデル動物である Apc<sup>Min</sup> マウスを用い, bLF はポリープ数を減少させることを見い出した. 最近, ラットを用いた中期多臓器発癌モデルにおいて, bLF を癌発生のプロモーション期に投与すると, 肺および食道癌の発生を抑制したとの報告がなされ<sup>21)</sup>, bLF は種々の癌に対する有望な化学予防の候補物質であると考えられている. しかし, ヒトの癌の予防に用いるためには, いくつかの異なる発癌実験系において, 化学予防候補物質の有効性および毒性のないことを確認することが必須である. 本研究は, 腫瘍病理学教室で開発された N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine(BHP)によるラット肺および食道癌発生系を用いて, bLF を発癌のプロモーション期のみならずイニシエーション期を含む全実験期間中投与し, bLF の肺および食道発癌に対する抑制作用を検索した.

## 材 料 と 方 法

### 1. 化学物質

BHP は, ナカライテスク株式会社(京都)から購入し

た. bLF は, 国立がんセンター研究所化学療法部の津田洋幸博士から提供を受けた.

BHP は, 蒸留水で 2,000 ppm の濃度に調製し, 遮光給水瓶を用いて動物に投与した. bLF は, 2 週間毎に粉末基礎飼料(CE-2: 日本クレア株式会社, 東京)に混合し, 0.5 %または 2 %濃度に調製した.

### 2. 動物

動物は, 5 週齢の Wistar 系雄ラット(日本エスエルシー株式会社, 浜松)87 匹を購入し, 1 週間の馴化ののち実験に用いた. 動物は, 木製チップを床敷にしたプラスチックケージに 3 匹ずつ収容し, 粉末基礎飼料または bLF 混合試料および BHP または水道水を自由に摂取させた. 動物飼育室の環境条件は, 温度 24℃, 相対湿度 60 %, 明暗サイクル 12 時間であった.

### 3. 実験プロトコール

実験プロトコールは, Table 1 に示す. 第 1 群と 2 群は, BHP を投与することなく基礎飼料または 2 % bLF をそれぞれ投与した群, 第 3 群は 2,000 ppm の BHP を 12 週間投与し, 実験期間中を基礎食で飼育した群, 第 4 群と 5 群は 2,000 ppm の BHP を 12 週間投与し, その期間を基礎食で飼育したのち, 12 週目より 0.5 または 2 %の bLF をそれぞれ投与した群, 第 6 群と 7 群は 2,000 ppm の BHP を 12 週間投与し, 実験期間中に 0.5 %または 2 % bLF をそれぞれ投与した群とした. 各群の動物数は, 第 3 群が 15 匹, その他の群が 12 匹とした. 実験期間中は, BHP 摂取量は 1 週間に一度, 体重および摂餌量は 2 週間に一度の頻度で測定し, 死亡動物はすべて剖検した. 全生存動物は, 実験開始後 20 週でエーテル深麻酔下にて腹部大動脈より放血屠殺し, 肺と食道を摘出した. 肺は, 10 %中性緩衝ホルマリン液を注入したのち, 同ホルマリン液で固定した. 食道は, 生体内で長軸方向に切開し, 肉眼的に腫瘍を観察した後に取り出し, 同ホルマリン液で固定した.

Table 1. Experimental design

| Group | BHP<br>(0-12W) | Test compound<br>(0-12W) | Test compound<br>(12-20W) |
|-------|----------------|--------------------------|---------------------------|
| 1     | (-)            | Basal diet               | Basal diet                |
| 2     | (-)            | 2% bLF                   | 2% bLF                    |
| 3     | (+)            | Basal diet               | Basal diet                |
| 4     | (+)            | Basal diet               | 0.5% bLF                  |
| 5     | (+)            | Basal diet               | 2% bLF                    |
| 6     | (+)            | 0.5% bLF                 | 0.5% bLF                  |
| 7     | (+)            | 2% bLF                   | 2% bLF                    |

bLF: bovine lactoferrin

#### 4. 病理組織学的検索

採取した臓器は固定終了後、肺は5葉より1切片を、また食道は長軸方向に1切片を切り出し、常法に従いパラフィン包埋し、薄切切片とした後、hematoxylin・eosin (H&E)染色を施した。

肺の腫瘍性病変は、堤ら<sup>22)</sup>およびBoorman<sup>23)</sup>に従い肺胞上皮過形成、腺腫、腺癌、腺扁平上皮癌、扁平上皮癌および扁平上皮癌に分類した。食道はCardesa & Ovelar<sup>24)</sup>に従い、扁平上皮過形成、乳頭腫、扁平上皮癌に分類した。なお、5群の1匹の肺は悪性リンパ腫の浸潤があり、検索が困難であったため肺の病理組織学的検査から除外した。

#### 5. 統計処理

体重、摂餌量、肺重量、各臓器の病変出現数、食道の肉眼腫瘍数についてはStudent's *t*-testを用い、一方、生存率、病変発生率はFisher's exact testを用い、無処置対照群またはBHP対照群と各群の間で有意差検定を行った。なお、統計処理はIBM パーソナルコンピュータ上で、Yukms社の統計ソフトStatlight®を用いて実施した。

## 結 果

#### 1. 実験の詳細

各群の体重と摂餌量の推移は、Fig. 1および2に示す。さらに、各群の有効匹数、最終体重、1匹1日あたりの摂餌量とBHP摂取量および肺重量は、Table 2に示す。体重の推移は、第1群と2群では実験開始より経時的増加がみられ、第3群～7群では、第1群に比べて体重増加の抑制がみられた。摂餌量の推移は、第1群と2群においては、第3群～7群に比べ増加していたが、各群ともに実

験期間中における摂餌量の変動はなく、一定量が摂取されていた。第7群の1匹が投与16週で最初に死亡し、第3群は3匹、第4群は3匹、第5群は3匹、第6群は3匹が、第7群は2匹が死亡したことにより、組織学的検索に基づく有効匹数は9～12匹であった。最終体重は、第3群～7群において第1群と比較すると有意に減少していた。1日1匹あたりの摂餌量は、第1群と2群でそれぞれ17.2 gと17.1 gで、第3～7群においては11.5 g以下と有意に減少していた。BHPの摂取量は、第3～7群において18.8～18.9 gで均一に摂取されていた。肺重量では、絶対重量で第3群と7群が増加し、相対重量は第3～7群が第1群と比べて増加していた。

#### 2. 肉眼的検索

剖検時に肺と食道について肉眼的観察を行った。肺の腫瘍性病変は、表面に白斑として認められ、食道ではFig. 3-1に示すように結節性の病変が多発していた。食道の結節数を検索した結果は、Table 3に示す。結節の直径を1 mm 間隔で7 mm までに分けて算出した。第1群と2群では、全く結節の発生はみられなかった。1 mm 未満の結節数は、第5群と7群において第3群に比べ増加していたが、直径1～2 mmの結節数は第4群において、また3～4 mmの結節数は第4群と6群において、それぞれ第3群に比べ減少していた。直径1 mm以上の総結節数を算出すると、第4群と6群において第3群に比べ減少していた。

#### 3. 組織学的検索

肺においては、肺胞上皮過形成(Fig. 3-2)、扁平上皮化生、腺腫(Fig. 3-3)、腺癌(Fig. 3-4)、腺扁平上皮癌と扁平上皮癌が観察された。各群におけるそれらの頻度はTable 4に、個数はTable 5に示す。第1と2群に全く肺

Table 2. Body weight, food intake, BHP intake and lung weight in Wistar male rats treated with BHP and/or bLF

| Group | No. of animals |          | Body weight (g) |          | Food intake<br>(g/animal/day) | BHP intake<br>(ml/animal/day) | Lung weight  |                        |
|-------|----------------|----------|-----------------|----------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|------------------------|
|       | Initial        | Terminal | Initial         | Terminal |                               |                               | Absolute (g) | Relative <sup>a)</sup> |
| 1     | 12             | 12       | 166             | 408      | 17.2                          | 0                             | 2.01         | 0.49                   |
| 2     | 12             | 12       | 165             | 409      | 17.1                          | 0                             | 2.08         | 0.51                   |
| 3     | 15             | 12       | 165             | 254**    | 10.8**                        | 18.8                          | 2.24*        | 0.88**                 |
| 4     | 12             | 9        | 165             | 263**    | 11.0**                        | 18.8                          | 2.13         | 0.82**                 |
| 5     | 12             | 9        | 165             | 265**    | 10.6**                        | 18.8                          | 2.22         | 0.87**                 |
| 6     | 12             | 9        | 164             | 251**    | 10.8**                        | 18.8                          | 2.29         | 0.95**                 |
| 7     | 12             | 10       | 166             | 287**    | 11.5**                        | 18.9                          | 2.26*        | 0.81**                 |

a): Lung weight/body weight at autopsy×100

\*: Significantly different from the control (group 1),  $p < 0.05$  (Student's *t*-test).

\*\*: Significantly different from the control (group 1),  $p < 0.01$  (Student's *t*-test).

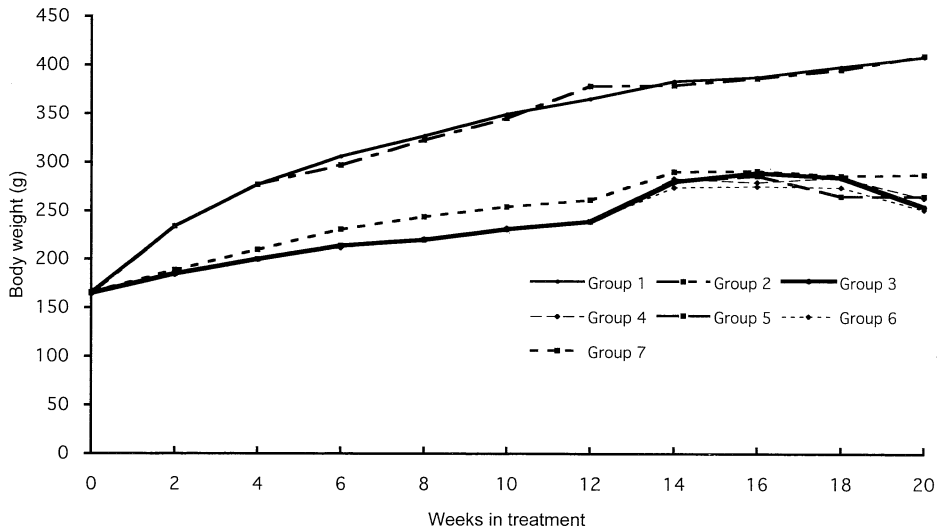


Fig. 1. Body weight in Wistar male rats treated with BHP and/or bLF.

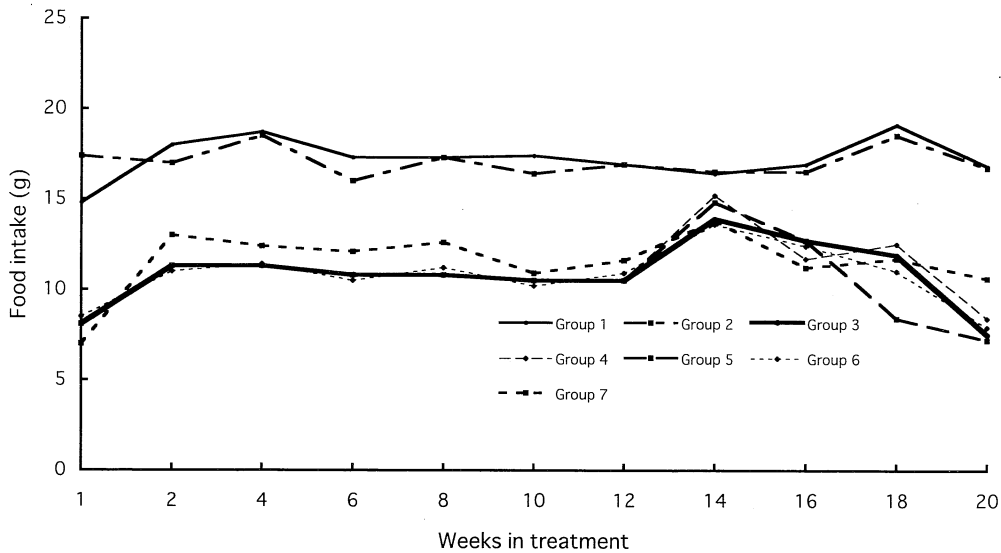


Fig. 2. Food intake in Wistar male rats treated with BHP and/or bLF.

病変は認められず、第3～7群において肺胞上皮過形成は100%に発生した。扁平上皮化生は低頻度ながら第5と第7群にみられ、腺腫は第3群～7群でみられ、第4群においては第3群に比べ有意に減少していた。腺癌と腺扁平上皮癌は第3群、4群、5群および7群にみられたが、扁平上皮癌は第7群の1匹のみにみられた。これらの病変の総発生頻度は、第3群～7群において100%であった。肺胞上皮過形成の発生個数は、第5～7群において第

3群に比し有意に減少し、また総病変個数は、第4～6群において第3群に比べ有意に減少していた。

食道においては、扁平上皮過形成(Fig. 3-5)、乳頭腫、扁平上皮癌(Fig. 3-6)が観察された。各群におけるそれらの頻度はTable 6に、個数はTable 7に示す。第1群と2群に食道病変は認められず、扁平上皮過形成は第3群で92%、第4～7群で100%に発生した。乳頭腫は第3群～7群で100%にみられ、扁平上皮癌は第4群で11

Table 3. Numbers of esophageal nodules counted macroscopically in rats treated with BHP and/or bLF

| Group | Effective No. | Diameter (mm) <sup>a)</sup> |       |      |      |      |      |      | Total No. of tumor (>1 mm)/animal |
|-------|---------------|-----------------------------|-------|------|------|------|------|------|-----------------------------------|
|       |               | 1                           | 2     | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |                                   |
| 1     | 12            | 0                           | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0                                 |
| 2     | 12            | 0                           | 0     | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 0                                 |
| 3     | 12            | 1.8                         | 4.0   | 2.8  | 2.5  | 0.7  | 0.4  | 0.5  | 10.9                              |
|       |               | ±1.1                        | ±1.4  | ±1.8 | ±1.3 | ±0.5 | ±0.5 | ±0.7 | ±2.7                              |
| 4     | 9             | 2.0                         | 1.8** | 1.8  | 1.4* | 1.0  | 0.4  | 0.1  | 6.6**                             |
|       |               | ±1.5                        | ±1.5  | 0.8  | ±1.0 | ±0.7 | ±0.5 | ±0.3 | ±2.1                              |
| 5     | 9             | 4.3*                        | 2.9   | 2.6  | 1.8  | 0.9  | 0.7  | 0    | 8.8                               |
|       |               | ±3.0                        | ±2.2  | ±1.7 | ±1.6 | ±0.8 | ±0.7 |      | ±3.3                              |
| 6     | 9             | 2.2                         | 2.9   | 2.8  | 1.1* | 0.9  | 0.1  | 0.4  | 8.2*                              |
|       |               | ±2.2                        | ±2.0  | ±1.9 | ±1.1 | ±0.9 | ±0.3 | ±0.5 | ±2.4                              |
| 7     | 10            | 3.2*                        | 2.6   | 2.1  | 2.0  | 1.2  | 0.5  | 0.3  | 8.7                               |
|       |               | ±2.0                        | ±2.3  | ±1.7 | ±1.5 | ±1.2 | ±0.5 | ±0.7 | ±3.3                              |

a): Data represent mean value ± SD.

\*: Significantly different from the BHP control (group 3),  $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test).\*\*: Significantly different from the BHP control (group 3),  $p < 0.01$  (Student's  $t$ -test).

Table 4. Incidences of Lung lesions in rats treated with BHP and/or bLF

| Group | No. of animals examined | Incidence of lung lesions (%) |        |         |        |        |        |          |
|-------|-------------------------|-------------------------------|--------|---------|--------|--------|--------|----------|
|       |                         | HP                            | SM     | A       | AC     | ASC    | SCC    | Total    |
| 1     | 12                      | 0                             | 0      | 0       | 0      | 0      | 0      | 0        |
| 2     | 12                      | 0                             | 0      | 0       | 0      | 0      | 0      | 0        |
| 3     | 11                      | 11 (100)                      | 0      | 7 (55)  | 2 (18) | 2 (18) | 0      | 11 (100) |
| 4     | 9                       | 9 (100)                       | 0      | 1 (11)* | 2 (22) | 1 (11) | 0      | 9 (100)  |
| 5     | 8                       | 8 (100)                       | 1 (13) | 4 (50)  | 1 (13) | 1 (13) | 0      | 8 (100)  |
| 6     | 9                       | 9 (100)                       | 0      | 3 (33)  | 0      | 0      | 0      | 9 (100)  |
| 7     | 10                      | 10 (100)                      | 1 (10) | 5 (50)  | 3 (30) | 1 (10) | 1 (10) | 10 (100) |

HP: Hyperplasia, SM: Squamous metaplasia, A: Adenoma, AC: Adenocarcinoma, ASC: Adenosquamous carcinoma, SCC: Squamous cell carcinoma

\*: Significantly different from the BHP control (group 3),  $p < 0.05$  (Fisher's exact test).

Table 5. The numbers of lung lesions in rats treated with BHP and/or bLF

| Group | No. of animals examined | Numbers of lung lesions <sup>a)</sup> |         |         |         |         |         |          |
|-------|-------------------------|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|
|       |                         | HP                                    | SM      | A       | AC      | ASC     | SCC     | Total    |
| 1     | 12                      | 0                                     | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0        |
| 2     | 12                      | 0                                     | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0        |
| 3     | 11                      | 8.9±3.8                               | 0       | 0.9±0.8 | 0.3±0.7 | 0.2±0.4 | 0       | 10.3±4.3 |
| 4     | 9                       | 6.1±2.0                               | 0       | 0.2±0.7 | 0.2±0.4 | 0.1±0.3 | 0       | 6.7±2.2* |
| 5     | 8                       | 4.9±2.4*                              | 0.1±0.4 | 0.6±0.7 | 0.1±0.4 | 0.1±0.4 | 0       | 5.9±3.3* |
| 6     | 9                       | 5.3±3.0*                              | 0       | 0.3±0.5 | 0       | 0       | 0       | 5.7±3.1* |
| 7     | 10                      | 5.8±2.9*                              | 0.1±0.3 | 0.5±0.5 | 0.4±0.7 | 0.1±0.3 | 0.1±0.3 | 7.0±2.9  |

HP: Hyperplasia, SM: Squamous metaplasia, A: Adenoma, AC: Adenocarcinoma, ASC: Adenosquamous carcinoma, SCC: Squamous cell carcinoma

a): Data represent mean value±SD.

\*: Significantly different from the BHP control (group 3),  $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test).

%, 第7群で10%にみられた。これらの病変の総発生頻度は第3群~7群において100%であった。食道病変の発生個数は扁平上皮過形成, 乳頭腫, 扁平上皮癌いずれ

の病変においても第4~7群の個数は第3群に比べ有意な差はみられなかった。また総病変個数にも, 第4群~7群と第3群との間に有意な差はみられなかった。

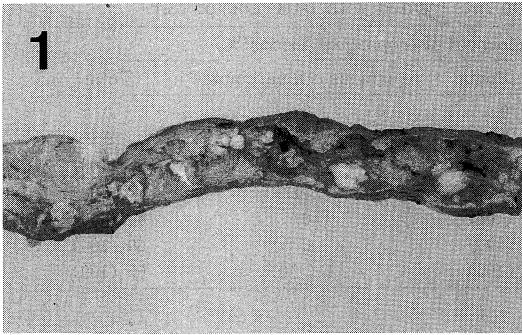


Fig. 3-1. Macroscopic view of the esophagus in a rat from group 3. Multiple nodules in various sizes on mucosal surface.

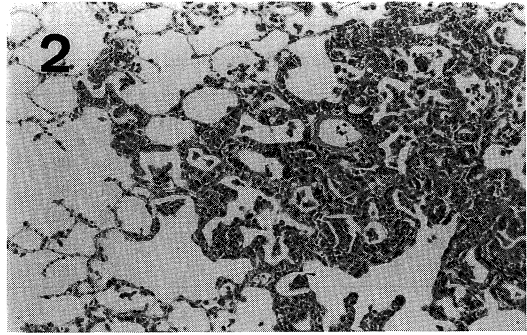


Fig. 3-2. Microscopic view of alveolar hyperplasia of the lung in a rat from group 4. H&E stain  $\times 40$ .

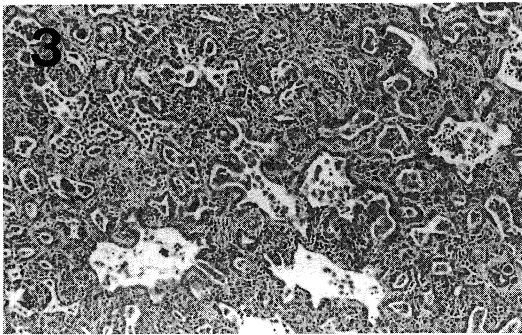


Fig. 3-3. Microscopic view of adenoma of the lung in a rat from group 3. H&E stain  $\times 40$ .

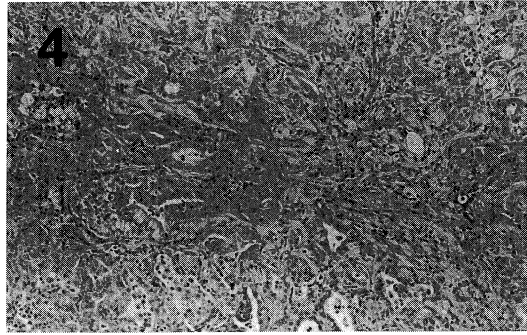


Fig. 3-4. Microscopic view of adenocarcinoma of the lung in a rat from group 3. H&E stain  $\times 40$ .

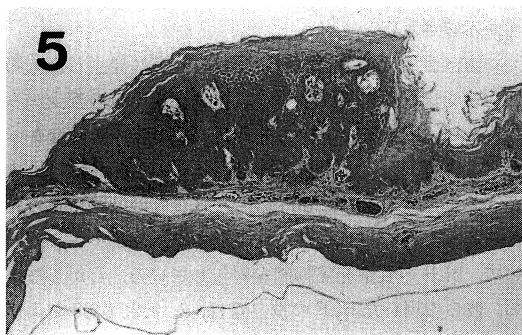


Fig. 3-5. Microscopic view of squamous cell hyperplasia of the esophagus in a rat from group 4. H&E stain  $\times 40$ .



Fig. 3-6. Microscopic view of squamous cell carcinoma of the esophagus in a rat from group 7. H&E stain  $\times 40$ .

Table 6. Incidences of esophageal lesions in rats treated with BHP and/or bLF

| Group | No. of animals examined | Incidences of esophageal lesions(%) |           |                         |          |
|-------|-------------------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------|----------|
|       |                         | Hyperplasia                         | Papilloma | Squamous cell carcinoma | Total    |
| 1     | 12                      | 0                                   | 0         | 0                       | 0        |
| 2     | 12                      | 0                                   | 0         | 0                       | 0        |
| 3     | 12                      | 38 ( 92)                            | 54 (100)  | 0                       | 92 (100) |
| 4     | 9                       | 31 (100)                            | 35 (100)  | 1 ( 11)                 | 67 (100) |
| 5     | 9                       | 32 (100)                            | 37 (100)  | 0                       | 69 (100) |
| 6     | 9                       | 25 (100)                            | 35 (100)  | 0                       | 60 (100) |
| 7     | 10                      | 24 (100)                            | 41 (100)  | 1 ( 10)                 | 66 (100) |

Table 7. The numbers of esophageal lesions in rats treated with BHP and/or bLF

| Group | No. of animals examined | Numbers of esophageal lesions <sup>a)</sup> |           |                         |         |
|-------|-------------------------|---------------------------------------------|-----------|-------------------------|---------|
|       |                         | Hyperplasia                                 | Papilloma | Squamous cell carcinoma | Total   |
| 1     | 12                      | 0                                           | 0         | 0                       | 0       |
| 2     | 12                      | 0                                           | 0         | 0                       | 0       |
| 3     | 12                      | 3.2±1.6                                     | 4.5±1.6   | 0                       | 7.7±2.5 |
| 4     | 9                       | 3.4±1.7                                     | 3.9±1.2   | 0.1±0.3                 | 7.4±1.6 |
| 5     | 9                       | 3.6±1.5                                     | 4.1±1.8   | 0                       | 7.7±1.6 |
| 6     | 9                       | 2.8±1.3                                     | 3.9±1.5   | 0                       | 6.7±2.0 |
| 7     | 10                      | 2.4±1.1                                     | 4.1±2.1   | 0.1±0.3                 | 6.6±2.8 |

a): Data represent mean value±SD.

## 考 察

本実験は、BHPによる肺と食道発癌に対するbLFの影響について、BHP投与後のプロモーションに対する影響およびBHPと同時・継続投与のイニシエーション・プロモーションに対する影響について検索した。対照群としてBHPを投与せず2% bLFを投与した群を作製した。この群においては、基礎食を投与した対照群に比し、体重増加の抑制はみられず、摂餌量に差はなく、最終体重にも差がなかったことより、bLF自体の毒性は否定された。BHP投与後bLFを投与した群においては、0.5%濃度で肺腺腫の発生を抑制した。BHPによる肺発癌系は、肺胞上皮過形成より段階的に腺腫を経て腺癌へと進展することが示されている<sup>25-27)</sup>。本実験において、BHPを投与後0.5% bLFを投与した群においては、肺胞上皮過形成の頻度に影響を与えることなく腺腫の発生頻度を抑制した。また病変数で検討すると、BHP投与後、0.5%と2%濃度のbLFは肺胞上皮過形成を含む肺の総病変数を減少せしめ、BHP投与と同時に、またはBHP投与後にbLFを投与した群においても肺胞上皮過形成が抑制された。これらの結果は、bLFはBHPのイニシエーションに対する抑制作用とプロモーションに対する抑制作用を共に有していることを示唆している。BHPによる肺発癌において、発生する癌は高頻度なKi-

rasの突然変異を伴うが、Ha-rasとp53の変異はみられない<sup>28)</sup>。また、midkine(MK)の過剰発現<sup>29)</sup>、vascular endothelial growth factor(VEGF)とそのreceptorの発現<sup>30)</sup>等の遺伝子変化が報告されている。bLFの遺伝子変化に対する修復作用についての報告はなく、その抑制作用を免疫能の側面から解明せんとされている。LFの発癌抑制に関する機序の解明については、今後、遺伝子異常の修復に関する研究が必要と考えられる。いずれにせよ本実験結果は、Ushida et al.<sup>21)</sup>が報告した結果と類似し、bLFの肺腺癌発生と進展に対する予防効果の可能性が示唆された。

一方、食道発癌に対する影響は、食道に発生した結節性病変を肉眼的に算出することにより結節数の減少がみられたが、組織学的検索ではbLFの影響はみられなかった。食道癌は、扁平上皮過形成、乳頭腫を経て扁平上皮癌へと進展する。Ushida et al.<sup>21)</sup>は複数の標的臓器の異なる発癌物質を用いたラット中期多臓器発癌モデルにおいて、bLFの食道発癌抑制を報告している。しかしながら、彼らの用いたbLFの投与量は、2, 0.2, 0.02および0.002%で食道癌の抑制は0.2%で示されている。彼らの用いた2%濃度では、食道発癌の抑制はみられず、本実験においても2% bLFは食道発癌に対し影響を与えなかった。bLFの発癌抑制効果については、肺発癌においても用量依存性はみられず、抑制作用に対しては至適

な用量が存在するものと考えられる。

LF は、乳汁中に含まれ、乳児の生体防御に働き、様々な疾病予防に貢献しているものと考えられ、今後、癌のみならず種々の疾病の予防の観点から LF を用いた基礎的研究の成果の蓄積が望まれる。

## 結 語

ラットにおける BHP による肺および食道発癌に対する bLF の影響について検索し、以下の結果を得た。

1. bLF は、ラットの体重増加に影響を与えず、毒性所見もみられなかった。
2. 0.5 % bLF 含有食は、BHP による肺腺腫の発生頻度を減少させた。
3. 0.5 および 2 % bLF 含有食は、BHP による肺上皮過形成の発生個数と肺の総病変個数を減少させた。
4. 0.5 % bLF 含有食は、食道における 1 mm 以上の結節性病変数を減少させたが、組織学的に扁平上皮過形成および食道癌の発生頻度および個数に影響を与えなかった。
5. bLF は、BHP による肺および食道発癌に対して、プロモーターとしての作用は示さなかった。

以上の結果より、bLF は肺および食道癌に対する化学予防物質の候補となりうる事が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なるご指導とご校閲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ささげるとともに、論文のご校閲、御助言を賜りました第 1 病理学教室、市島國雄教授ならびに第 2 内科学教室、成田亘啓教授に深謝申し上げます。また研究の遂行にあたり直接ご指導、ご助言、ご校閲を賜りました腫瘍病理学教室、堤 雅弘講師に深く感謝いたします。また bovine lactoferrin のご提供を頂きました国立がんセンター研究所、化学療法部の津田洋幸博士に深謝いたします。加えて本研究の遂行にあたり、動物実験、組織標本作製等に多大なご尽力を頂きました腫瘍病理学教室の諸兄姉に深謝いたします。なお、本論文の要旨は、第 58 回日本癌学会総会(広島、1999 年)において発表した。

## 文 献

- 1) Aisen, P. and Listowsky, I. : Iron transport and storage proteins. *Ann. Rev. Biochem.* **49** : 357-393, 1980.
- 2) Groves, M.L. : The isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.* **82** : 3345-3350, 1960.
- 3) Johanson, B. : Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta. Chem. Scand.* **14** : 510-512, 1960.
- 4) Pierce, A., Colavizza, D., Benaissa, M., Maes, P., Tartar, A., Montreuil, J. and Spik, G. : Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin. *Eur. J. Biochem.* **196** : 177-184, 1991.
- 5) Levay, P.F. and Viljoen, M. : Lactoferrin: a general review. *Haematologica* **80** : 252-267, 1995.
- 6) Masson, P. L., Heremans, J. F. and Dive, C. : An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta* **14** : 735-739, 1966.
- 7) Masson, P. L., Heremans, J. F. and Schonne, E. : Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J. Exp. Med.* **130** : 643-658, 1969.
- 8) Brock, J. H. : Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Arch. Dis. Child* **55** : 417-421, 1980.
- 9) Brock, J. : Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol. Today* **16** : 417-419, 1995.
- 10) Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. : Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1121** : 130-136, 1992.
- 11) Gahr, M., Speer, C. P., Damerau, B. and Sawatzki, G. : Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **49** : 427-433, 1991.
- 12) Shau, H., Kim, A. and Golub, S. H. : Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin. *J. Leukoc. Biol.* **51** : 343-349, 1992.
- 13) Damiens, E., Mazurier, J., Yazidi, I. E., Masson, M., Duthille, I., Spik, G. and Boilly-Marer, Y. : Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1402** : 277-287, 1998.
- 14) Hurley, W. L., Hegarty, H. M. and Metzler, J. T. : In vitro inhibition of mammary cell growth

- by lactoferrin : a comparative study. *Life Sci.* **55** : 1955-1963, 1994.
- 15) **Bezault, J., Bhimani, R., Wiprovnick, J. and Furmanski, P.** : Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res.* **54** : 2310-2312, 1994.
  - 16) 坂本信之 : ヒト脾癌細胞株(SPA)の樹立と鉄結合性糖蛋白, ヒトラクトフェリンの増殖抑制作用. 癌と化学療法. **25** : 1557-1563, 1998.
  - 17) **Yoo, Y. C., Watanabe, S., Watanabe, R., Hata, K., Shimazaki, K. and Azuma, I.** : Advances in lactoferrin reseach (Spik, G. ed.) Plenum Press, New York, pp.285-291, 1998.
  - 18) **Sekine, K., Ushida, Y., Kuhara, T., Iigo, M., Baba-Toriyama, H., Moore, M. A., Murakoshi, M., Satomi, Y., Nishino, H., Kakizoe, T. and Tsuda, H.** : Inhibition of initiation and early stage development of aberrant crypt foci and enhanced natural killer activity in male rats administered bovine lactoferrin concomitantly with azoxymethane. *Cancer Lett.* **121** : 211-216, 1997.
  - 19) **Sekine, K., Watanabe, E., Nakamura, J., Takasuka, N., Kim, D. J., Asamoto, M., Krutovskikh, V., Baba-Toriyama, H., Ota, T., Moore, M. A., Masuda, M., Sugimoto, H., Nishino, H., Kakizoe, T. and Tsuda, H.** : Inhibition of azoxymethane-initiated colon tumor by bovine lactoferrin administration in F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.* **88** : 523-526, 1997.
  - 20) **Ushida, Y., Sekine, K., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M. and Tsuda, H.** : Inhibitory effects of bovine lactoferrin on intestinal polyposis in the *Apc<sup>Min</sup>* mouse. *Cancer Lett.* **134** : 141-145, 1998.
  - 21) **Ushida, Y., Sekine, K., Kuhara, T., Takasuka, N., Iigo, M., Maeda, M. and Tsuda, H.** : Possible chemopreventive effects of bovine lactoferrin on esophagus and lung carcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.* **90** : 262-267, 1999.
  - 22) 堤 雅弘, 辻内俊文, 小西陽一 : 毒性実験講座 5 毒性病理学(前川昭彦, 林裕造編), 地人書館, 東京, pp.253-266, 1991.
  - 23) **Boorman, G. A.** : Monographs on pathology of laboratory animals sponsored by the International Life Science Institute(T. C. Jones, U. Mohr and R. D. Hunt, eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp.99-127, 1985.
  - 24) **Cardesa, A. and Ovelar, M. Y.** : Monographs on pathology of laboratory animals sponsored by the International Life Science Institute (T. C. Jones, U. Mohr and R. D. Hunt, eds.). Springer-Verlag, Berlin, pp.261-272, 1985.
  - 25) 中島 啓 : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine によるラット肺発癌過程における細胞形質発現の推移とその安定化, 奈良医学雑誌 **39** : 697-709, 1988.
  - 26) **Konishi, Y., Denda, A., Kondo, H. and Takahashi, S.** : Lung carcinomas induced by oral administration of N - bis(2- hydroxypropyl) nitrosamine in rats. *Jpn. J. Cancer Res. (GANN)* **67** : 773-780, 1976.
  - 27) **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* : Tumors of early life in man and animals. (Severi, L., ed.), Perugia Quadrennial International Conferences on Cancer, Perugia, Italy, pp.637-649, 1978.
  - 28) **Kitada, H., Tsutsumi, M., Tsujiuchi, T., Takahama, M., Fukuda, T., Narita, N. and Konishi, Y.** : Frequent mutation of *Ki-ras* but no mutations of *Ha-ras* and *p53* in lung lesions induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Mol. Carcinogen.* **15** : 276-283, 1996.
  - 29) **Sakitani, H., Tsutsumi, M., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Takahama, M., Iki, K., Tsujiuchi, T., Muramatsu, T., Sakuma, S., Sasaki, 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.
  - 30) **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. Carcinogen.* **24** : 287-293, 1999.