

N-NITROSOBIS(2-HYDROXYPROPYL)AMINE による
実験的ラット肺発癌に対する抗生物質, 非ステロイド系抗炎症薬
および生薬の併用投与による効果

奈良県立医科大学附属がんセンター腫瘍病理学教室

白 岩 和 己

EFFICACY OF COMBINED ADMINISTRATION OF ANTIBIOTICS,
NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG AND HERBAL MEDICINES
ON LUNG CARCINOGENESIS BY N-NITROSOBIS(2-HYDROXYPROPYL)
AMINE IN RATS

KAZUMI SHIRAIWA

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical University

Received June, 16, 1999

Abstract: The efficacy of combined administration of antibiotics, nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and herbal medicines on lung carcinogenesis were investigated in rats treated with N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine (BHP). This study consisted of two experiments. In both experiments, 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. In experiment 1, rats received basal diet alone or diets containing 0.02% erythromycin (EM), 0.04% ampicillin (ABPC), 1.5% sho-saiko-to, 0.02% EM plus 1.5% sho-saiko-to or 0.04% ABPC plus 1.5% sho-saiko-to, respectively. The incidences of adenocarcinoma (AC) and non-small cell carcinomas including AC were completely inhibited in rats given ABPC plus sho-saiko-to, and the numbers of alveolar hyperplasia (AH) and total lung lesions including AH, adenoma (Ad) and AC, squamous metaplasia, squamous cell carcinoma (SqC) and adenosquamous carcinoma (ASqC) were decreased in rats given ABPC plus sho-saiko-to or EM plus sho-saiko-to. In experiment 2, rats received basal diet alone or diets containing 0.04% ABPC, 0.006% piroxicam, 0.04% ABPC plus 0.006% piroxicam or 0.04% ABPC plus 0.75% ogon, respectively. The incidences and numbers of AC and non-small cell carcinomas including AC were decreased in rats given ABPC plus piroxicam or ABPC plus ogon. The inflammatory reactions in lung lesions were reduced in rats given ABPC plus sho-saiko-to or ABPC plus piroxicam in experiment 1 or 2. These results suggest that combined administration of antibiotics and NSAID or herbal medicines inhibits the progression of lung carcinogenesis in rats initiated with BHP as a result of suppression of chronic inflammation. Therefore, the continuous inflammatory reaction may exert itself as a promoting factor. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 303~315, 1999)

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

緒 言

近年、種々の細菌、ウイルスや寄生虫などの感染による慢性炎症の発癌に対する関与が指摘されている¹⁾。ヒトにおいては、胃癌、肝癌、子宮頸癌や悪性リンパ腫の発生とこれら臓器における慢性炎症との密な関連が疫学的研究より示され²⁻⁷⁾、実験的にも検証されんとしている。肺は、経気道的に環境化学物質に暴露を受け易い臓器であり、また、感染に対しても受動的な臓器であることから、肺癌の発生と進展における慢性炎症の関与は十分に考えられる。しかしながら、これに関する基礎的知見は乏しい。

ラットに N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) を経口または腹腔内へ投与すると、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⁸⁻¹⁰⁾。BHP による肺発癌における遺伝子変化では、Ki-ras の点突然変異は検出されるも、Ha-ras と p 53 の変異は検出されず¹¹⁾、また、p 16 の変異と欠失、midkine 遺伝子¹²⁾ と血管新生に関与する vascular endothelial growth factor (VEGF)¹³⁾ の発現増強が検出されている。さらに、この系の肺発癌過程を組織学的に詳細に観察すると、肺泡領域における好中球とマクロファージの浸潤がみられる。

本研究は、BHP によるラット肺発癌系を用いて、BHP によりイニシエートされた細胞群が癌へ進展する過程における慢性炎症の関与を検索する目的で、抗生物質、非ステロイド系抗炎症薬および生薬をそれぞれ単独または併用投与し、慢性炎症阻止の発癌に対する影響を検索した。

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% および照明一日 12 時間に設定した飼育室で、プラスチックケージに 5 匹ずつ収容し飼育した。その間、飲料水は水道水を用い、基礎食は CE-2 粉末基礎飼料 (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、2000 ppm の濃度で蒸留水に溶解し、遮光容器を用いて投与した。BHP 含有飲料水は週に二度の割合で調製した。

(2) 被験物質

Erythromycin (EM, 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。Aminobenzylpenicillin (ampicillin) (ABPC, 明治製菓株式会社、大阪) は、0.04% の濃度で基礎食に混合調製した。小柴胡湯 Sho-saiko-to (ツムラ株式会社、東京) は、1.5% の濃度で基礎食に混合調製した。Piroxicam (シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社、東京) は、0.006% の濃度で基礎食に混合調製した。黄ごん Ogon : Scutellariae Radix (ツムラ株式会社、東京) は、0.75% の濃度で基礎食に混合調製した。

3. 実験方法

実験は、実験-1 および実験-2 から成り、その基本となるプロトコールは、Fig. 1 に示す。

実験-1

Wistar 系雄ラット 131 匹を用い、12 群を設定した。第 1 群から第 6 群は BHP を含まない飲料水を実験期間中連続投与した。第 1 群は基礎食を実験期間中連続投与した。第 2 群は 0.02% EM 含有食を、第 3 群は 0.04% ABPC 含有食を、第 4 群は 1.5% 小柴胡湯含有食を、第 5 群は 0.02% EM と 1.5% 小柴胡湯含有食を、第 6 群は 0.04% ABPC と 1.5% 小柴胡湯含有食を、実験開始後 12 週より 8 週間連続投与した。第 7 群から第 12 群は 2000 ppm の BHP 含有飲料水を 12 週間投与後、第 1 群から第 6 群と同様の被験物質を同様に濃度で実験開始後 12 週より 8 週間投与した。

実験-2

Wistar 系雄ラット 130 匹を用い、10 群を設定した。第 1 群から第 5 群は BHP を含まない飲料水を実験期間中連続投与した。第 1 群は基礎食を実験期間中連続投与した。第 2 群は 0.04% ABPC 含有食を、第 3 群は 0.006% Piroxicam 含有食を、第 4 群は 0.04% ABPC と 0.006% Piroxicam 含有食を、第 5 群は 0.04% ABPC と 0.75% 黄ごん含有食を、実験開始後 12 週より 8 週間連続投与した。第 6 群から第 10 群は 2000 ppm の BHP 含有飲料水を 12 週間投与後、第 1 群から第 5 群と同様の被験物質を同様に濃度で実験開始後 12 週より 8 週間投与した。

実験-1 と実験-2 の動物は毎日 1 回以上観察し、摂餌量と体重を 1 週間に一度の割合で測定した。実験開始

後 20 週に全ての動物を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。各群の有効動物数は、Table 1 に示す。

4. 病理組織学的検索

実験一 1 および実験一 2 の動物の肺は、生体内における肉眼的観察の後、直ちに摘出し、気管より 100 % 冷エタノールあるいはアセトンを注入後、同液にて浸漬固定した。その後、常法に従いヘマトキシリン-エオジン(H. E.)染色標本を作製し鏡検に供した。なお、肺における病変は Konishi らの基準^{8,10)}に従い、肺胞上皮過形成(alveolar hyperplasia)、腺腫(adenoma)、腺癌(adenocarcinoma)、扁平上皮化生(squamous metaplasia)、扁平上皮癌(squamous cell carcinoma)および腺扁平上皮癌(adenosquamous carcinoma)に分類し、それらの発生頻度および個体一匹当たりの発生個数を算出した。

5. 免疫組織化学的検索

肺における細胞増殖を検索する目的で、実験一 1 の第 7 群と第 12 群および実験一 2 の第 6 群と第 9 群の冷エタノール固定標本を EPOS 抗 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)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、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)で発色後、メチルグリーンで対比核染色をおこなった。上記の実験群から肺胞上皮過形成 15 病変を任意に選択し、一病変について 100 から 1500 個の細胞における PCNA 陽性細胞をカウントし、標識率を算出した。

また、実験一 2 では、肺胞上皮過形成における酸化的ストレスの関与を検索する目的で、第 6 群の冷アセトン固定標本を抗 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)マウスモノクローナル抗体(日本油脂株式会社、東

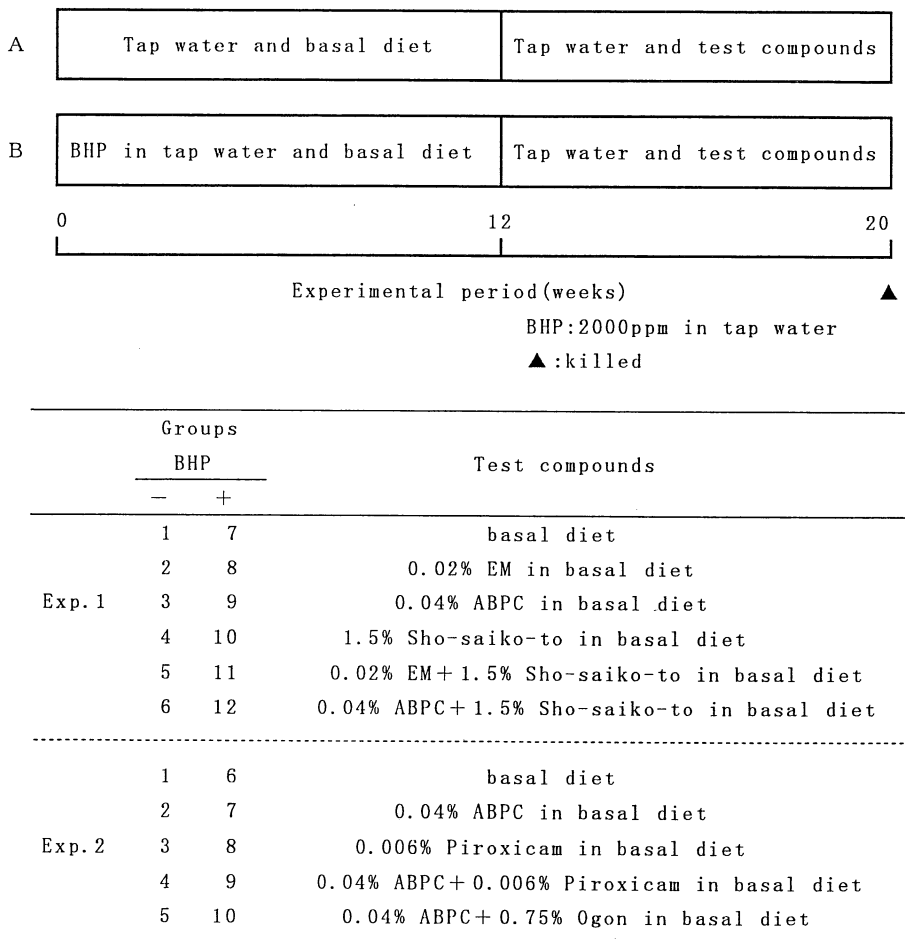


Fig. 1. Experimental design

京)とユニバーサル LSAB 2 キット(ダコ・ジャパン株式会社, 京都)を用い, DAB で発色後, メチルグリーンで対比核染色をおこなった。

6. 肺胞洗浄液中の細菌の同定

実験-2において, 第1群から第10群の各群3匹を任意に選択し, 生理食塩水を気管より注入し肺胞洗浄をおこなった。採取した洗浄液を5%馬血液加トリプトン-ヤ寒天培地(ニッスイ株式会社, 東京)にて37°C, 24時間培養し, 肉眼的に形態の異なるコロニーを分離し純培養した。純培養して得られた菌株についてグラム染色, アピ20Eキットとアピスタフキット(共にBioMerieux, France)による培養, およびカタラーゼ試験やオキシダーゼ試験をおこない菌種の同定をした。

7. 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

実験-1

有効匹数と体重は, Table 1 に示す。実験期間中, BHP 処置群である第7群から第12群において, 第8群で16匹中5匹, 第9群で16匹中2匹, 第11群で16匹中3匹, 第12群で16匹中4匹が途中死亡した。

最終体重は, BHP 非処置群である第1群から第6群に比し, BHP 処置群である第7群から第12群で体重の増加抑制が認められた。しかし, BHP 非処置群の第1群から第6群あるいはBHP 処置群の第7群から第12群

のいずれの被験物質投与群においても, 統計学的に有意な差はみられず, 被験物質投与による発育の抑制は観察されなかった。

摂餌量は, 第1群から第6群では一日平均14.0±0.5gで, 第7群から第12群では一日平均10.5±0.5gであった。BHP 非処置群あるいはBHP 処置群内において摂餌量に差は認められなかった。

病理組織学的所見では, 肺病変は, BHP 処置群である第7群から第12群においてのみ観察され, BHP 非処置群である第1群から第6群では観察されなかった。肺病変の発生頻度は, Table 2 に示す。第7群から第12群では肺胞上皮過形成が全ての群で100%にみられた。腺癌は第7群で33.3%であったのに対し, 第12群では0%であり, 第7群に比し統計学的に有意な差が認められた。また, 腺癌, 扁平上皮癌および腺扁平上皮癌を含めた肺癌の発生頻度は, 第7群で40.0%であったのに対し, 第12群では0%であり, 第7群に比し有意な抑制がみられた。

肺病変の一匹当たりの平均発生個数は, Table 3 に示す。肺胞上皮過形成は, 第7群で19.7±6.0個, 第8群で14.2±4.7個, 第9群で14.1±4.6個, 第10群で17.8±6.6個, 第11群で12.8±4.6個および第12群で13.1±3.9個であった。第8, 9, 11および12群では, 第7群に比し統計学的に有意な減少がみられた。また, 一匹当たりの平均総肺病変発生個数は, 第7群で21.7±6.9個, 第8群で16.0±5.8個, 第9群で16.3±5.1個, 第10群で19.6±6.7個, 第11群で14.7±4.0個および第12群で13.9±4.6個であった。第11群と第12群は, 第7群

Table 1. Experimental Details from Experiment-1 and Experiment-2

Experiment 1					Experiment 2				
Groups	No. of animals		Body Weight (g) ^{b)}		Groups	No. of animals		Body Weight (g) ^{b)}	
	Initial	Effective ^{a)}	Initial	Final		Initial	Effective ^{a)}	Initial	Final
1	6	6	131.3±9.9	355.5±15.2	1	10	10	146.2±6.9	393.0±37.7
2	6	6	135.0±5.5	358.7±23.3	2	10	10	144.6±8.7	377.0±44.0
3	6	6	133.3±5.2	328.0±31.7	3	10	10	145.4±9.5	378.5±23.1
4	6	6	133.3±5.2	359.0±28.6	4	10	10	148.4±7.5	364.0±32.0
5	6	6	131.7±4.1	356.0±15.5	5	10	10	147.6±7.2	383.0±38.9
6	6	6	131.7±4.1	344.0±15.1					
7	15	15	129.3±4.6	263.5±27.9	6	16	16	145.5±4.6	311.3±23.9
8	16	11	133.1±7.9	273.3±24.2	7	16	15	144.4±4.3	302.0±29.1
9	16	14	136.9±7.0	272.7±25.0	8	16	16	149.5±7.7	301.9±25.1
10	16	16	133.1±7.0	258.5±28.2	9	16	16	148.6±5.3	295.6±22.8
11	16	13	136.3±8.9	264.3±22.9	10	16	14	144.9±5.7	291.4±30.8
12	16	12	131.9±7.5	252.5±18.9					

a) Based on histological examinations

b) Each value represents mean±S.D.

に比しいずれも有意な発生個数の減少がみられた。

肺病変部の内、BHP 処置群である第7群と第12群における肺胞上皮過形成病変の組織学的所見とPCNAの標識率は、Table 4に示す。過形成病変においては、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みられた。この様な所見は、肺胞上皮過形成のみならず、腺腫と腺癌においても同様にみられたが、非病変部の肺では肺胞腔内のマクロファージの僅かな浸潤のみであった。この様な炎症性変化は、第7群に比し、

Table 2. Incidences of Lung Lesions in Rats Given BHP Followed by EM, ABPC and/or Sho-saiko-to from Experiment-1

Groups	BHP +/-	Test compounds	Incidence of lung lesions (%)						
			alveolar hyperplasia	adenoma	adenocarcinoma	squamous metaplasia	squamous cell carcinoma	adenosquamous carcinoma	total carcinoma
1	-	—	0	0	0	0	0	0	0
2	-	EM	0	0	0	0	0	0	0
3	-	ABPC	0	0	0	0	0	0	0
4	-	Sho-saiko-to	0	0	0	0	0	0	0
5	-	EM+Sho-saiko-to	0	0	0	0	0	0	0
6	-	ABPC+Sho-saiko-to	0	0	0	0	0	0	0
7	+	—	100	80.0	33.3	0	6.7	20.0	40.0
8	+	EM	100	63.6	18.2	0	0	9.1	27.3
9	+	ABPC	100	92.9	28.6	21.0	0	14.3	42.9
10	+	Sho-saiko-to	100	50.0	31.3	31.3	0	0	31.3
11	+	EM+Sho-saiko-to	100	71.4	35.7	14.3	7.1	0	35.7
12	+	ABPC+Sho-saiko-to	100	50.0	0 ^{a)}	14.2	0	0	0 ^{a)}

BHP : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine

EM : Erythromycin

ABPC : Aminobenzylpenicillin (ampicillin)

a) Significantly different from Group 7 (p<0.05)

Table 3. Numbers of Lung Lesions in Rats Given BHP Followed by EM, ABPC and/or Sho-saiko-to from Experiment-1

Groups	BHP +/-	Test compounds	Number of lung lesions (/rats)							
			alveolar hyperplasia	adenoma	adenocarcinoma	squamous metaplasia	squamous cell carcinoma	adenosquamous carcinoma	total carcinoma	total lesion
1	-	—	0	0	0	0	0	0	0	
2	-	EM	0	0	0	0	0	0	0	
3	-	ABPC	0	0	0	0	0	0	0	
4	-	Sho-saiko-to	0	0	0	0	0	0	0	
5	-	EM+Sho-saiko-to	0	0	0	0	0	0	0	
6	-	ABPC+Sho-saiko-to	0	0	0	0	0	0	0	
7	+	—	19.7±6.0	1.2±0.9	0.5±0.7	0	0.1±0.3	0.2±0.4	0.7±1.2	21.7±6.9
8	+	EM	14.2±4.7 ^{a)}	1.5±2.0	0.3±0.7	0	0	0.1±0.3	0.4±0.7	16.0±5.8
9	+	ABPC	14.1±4.6 ^{a)}	1.5±1.0	0.4±0.8	0.1±0.3	0	0.2±0.6	0.6±0.8	16.3±5.1
10	+	Sho-saiko-to	17.8±6.6	1.2±1.8	0.3±0.5	0.3±0.5	0	0	0.3±0.5	19.6±6.7
11	+	EM+Sho-saiko-to	12.8±4.6 ^{b)}	1.2±1.0	0.5±0.7	0.2±0.4	0.1±0.3	0	0.5±0.8	14.7±4.0 ^{a)}
12	+	ABPC+Sho-saiko-to	13.1±3.9 ^{b)}	0.7±0.7	0	0.2±0.4	0	0	0	13.9±4.6 ^{a)}

Each value represents mean±S.D.

BHP : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine

EM : Erythromycin

ABPC : Aminobenzylpenicillin (ampicillin)

a) Significantly different from Group 7 (p<0.05)

b) Significantly different from Group 7 (p<0.01)

第12群では抑制されていた。さらに、肺胞上皮過形成におけるPCNAの標識率は、第7群の44.3±3.0%に対し第12群では38.8±4.1%で、両群間に統計学的な有意差がみられた。

実験-2

有効匹数と体重は、Table 1に示す。実験期間中、BHP処置群である第6群から第10群において、第7群で16匹中1匹、第10群で16匹中2匹が途中死亡した。

最終体重は、BHP非処置群である第1群から第5群に比し、BHP処置群である第6群から第10群では体重の増加抑制が認められた。しかし、BHP非処置群の第1

群から第5群あるいはBHP処置群の第6群から第10群のいずれの被験物質投与群においても、統計学的に有意な差はみられず、被験物質投与による発育の抑制は観察されなかった。

摂餌量は、第1群から第5群に比し、第6群から第10群で減少していたが、BHP非処置群あるいはBHP処置群内において摂餌量に差はみられなかった。

病理組織学的所見では、肺病変は、第6群から第10群においてのみ観察され、第1群から第5群では観察されなかった。肺病変の発生頻度は、Table 5に示す。第6群から第10群では、肺胞上皮過形成が全ての群で100%に

Table 4. Histological Findings of Inflammatory Reactions and PCNA Labeling Indices in Alveolar Hyperplasia in the Lung of Rats Given BHP Followed by Combined Administration of ABPC and Sho-saiko-to from Experiment-1

Groups	Test compounds	Lesion	Alveolar space				Alveolar wall			PCNA labeling index(%) ^{a)}
			neutrophil	macrophage	lymphocyte	exudate	neutrophil	edema	congestion	
7	—	normal	—	±	—	—	—	—	—	44.3±3.0
		hyperplasia	+~++	+++~++++	±	±	+	+	-~±	
12	ABPC+ Sho-saiko-to	normal	—	—	—	—	—	—	—	38.8±4.1 ^{b)}
		hyperplasia	±~+	±~+	±	—	±	±	—	

BHP : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine — : absent
 ABPC : Aminobenzylpenicillin (ampicillin) ± : few
 PCNA : Proliferating cell nuclear antigen + : mild
 a) Each value represents mean±S.D. ++ : moderate
 b) Significantly different from Group 7 (p<0.01) +++ : marked

Table 5. Incidences of Lung Lesions in Rats Given BHP Followed by ABPC, Piroxicam and/or Ogon from Experiment-2

Groups	BHP +/—	Test compounds	Incidence of lung lesions (%)						
			alveolar hyperplasia	adenoma	adenocarcinoma	squamous metaplasia	squamous cell carcinoma	adenosquamous carcinoma	total carcinoma
1	—	—	0	0	0	0	0	0	0
2	—	ABPC	0	0	0	0	0	0	0
3	—	Piroxicam	0	0	0	0	0	0	0
4	—	ABPC+Piroxicam	0	0	0	0	0	0	0
5	—	ABPC+Ogon	0	0	0	0	0	0	0
6	+	—	100	100	56.3	12.5	6.3	12.5	62.5
7	+	ABPC	100	73.3 ^{a)}	60.0	33.3	0	0	60.0
8	+	Piroxicam	100	75.0	37.5	18.8	0	6.3	43.8
9	+	ABPC+Piroxicam	100	75.0	12.5 ^{a)}	25.0	0	0	12.5 ^{b)}
10	+	ABPC+Ogon	100	92.9	14.3 ^{a)}	28.6	0	0	14.3 ^{b)}

BHP : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine

ABPC : Aminobenzylpenicillin (ampicillin)

a) Significantly different from Group 6 (p<0.05)

b) Significantly different from Group 6 (p<0.01)

みられた。腺腫は第6群で100%であったのに対し、第7群で73.3%、腺癌は第6群で56.3%であったのに対し、第9群で12.5%、第10群で14.3%といずれも第6群に比し、統計学的に有意な差が認められた。また、腺癌、扁平上皮癌および腺扁平上皮癌を含めた肺癌の発生頻度も同様に、第6群で62.5%であったのに対し、第9群で12.5%、第10群で14.3%と第6群に比し、有意な抑制がみられた。

肺病変の一匹当たりの平均発生個数は、Table 6に示す。肺胞上皮過形成は、第6群で11.4±2.9個、第7群で9.7±2.9個、第8群で10.2±2.8個、第9群で14.3±5.8個および第10群で14.4±4.2個であった。第10群

は第6群に比し、統計学的に有意に増加していた。腺腫は第6群で2.5±1.3個、第7群で1.6±1.3個、第8群で1.3±1.0個、第9群で1.5±1.3個および第10群で1.6±1.1個であった。第8群と第9群は、第6群に比し有意な減少がみられた。腺癌は第6群で1.0±1.0個、第7群で0.9±0.9個、第8群で0.5±0.7個、第9群で0.1±0.3個および第10群で0.1±0.4個であった。第9群と第10群は、第6群に比し有意に減少していた。また、腺癌、扁平上皮癌および腺扁平上皮癌を含む肺癌の一匹当たりの平均発生個数は、第6群で1.2±1.1個、第7群で0.9±0.9個、第8群で0.6±0.7個、第9群で0.1±0.3個および第10群で0.1±0.4個であった。第9群と

Table 6. Numbers of Lung Lesions in Rats Given BHP Followed by ABPC, Piroxicam and/or Ogon from Experiment-2

Groups	BHP +/-	Test compounds	Number of lung lesions (/rats)							
			alveolar hyperplasia	adenoma	adenocarcinoma	squamous metaplasia	squamous cell carcinoma	adenosquamous carcinoma	total carcinoma	total lesion
1	-	—	0	0	0	0	0	0	0	0
2	-	ABPC	0	0	0	0	0	0	0	0
3	-	Piroxicam	0	0	0	0	0	0	0	0
4	-	ABPC+Piroxicam	0	0	0	0	0	0	0	0
5	-	ABPC+Ogon	0	0	0	0	0	0	0	0
6	+	—	11.4±2.9	2.5±1.3	1.0±1.0	0.2±0.5	1.0±0.3	0.1±0.3	1.2±1.1	15.3±3.6
7	+	ABPC	9.7±2.9	1.6±1.3	0.9±0.9	0.3±0.5	0	0	0.9±0.9	12.5±3.2 ^{a)}
8	+	Piroxicam	10.2±2.8	1.3±1.0 ^{b)}	0.5±0.7	0.2±0.4	0	0.1±0.3	0.6±0.7	12.2±3.6 ^{a)}
9	+	ABPC+Piroxicam	14.3±5.8	1.5±1.3 ^{a)}	0.1±0.3 ^{b)}	0.3±0.5	0	0	0.1±0.3 ^{b)}	16.2±7.0
10	+	ABPC+Ogon	14.4±4.2 ^{a)}	1.6±1.1	0.1±0.4 ^{b)}	0.4±0.6	0	0	0.1±0.4 ^{b)}	16.5±4.8

Each value represents mean±S.D.

BHP : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine

ABPC : Aminobenzylpenicillin (ampicillin)

a) Significantly different from Group 6 (p<0.05)

b) Significantly different from Group 6 (p<0.01)

Table 7. Histological Findings of Inflammatory Reactions and PCNA Labeling Indices in Alveolar Hyperplasia in the Lung of Rats Given BHP Followed by Combined Administration of ABPC and Piroxicam from Experiment-2

Groups	Test compounds	Lesion	Alveolar space				Alveolar wall					PCNA labeling index(%) ^{a)}
			neutrophil	macrophage	lymphocyte	exudate	neutrophil	macrophage	lymphocyte	edema	congestion	
6	—	normal	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
		hyperplasia	+~++	++~+++	±	±	+	±	±~+	+	-~±	43.7±4.1
9	ABPC+ Piroxicam	normal	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
		hyperplasia	±~+	±~+	±	-	±	-	±	±	-~±	36.1±2.3 ^{b)}

BHP : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine

ABPC : Aminobenzylpenicillin (ampicillin)

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

a) Each value represents mean±S.D.

b) Significantly different from Group 6 (p<0.01)

- : absent

± : few

+

++ : moderate

+++ : marked

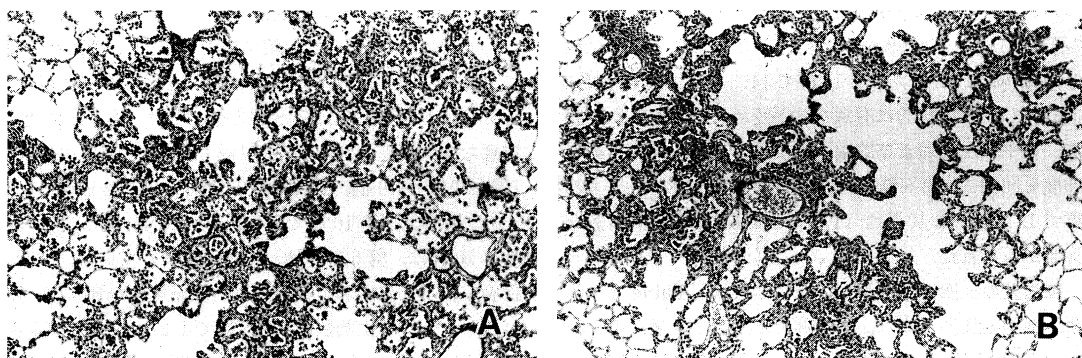


Fig. 2. Representative histological appearances of inflammatory reaction in alveolar hyperplasias. The lung of a rat of group 6 (A) and that of a rat of group 9 (B) from experiment-2. Inflammatory reaction was reduced in B compared with A. H. E. stain $\times 25$

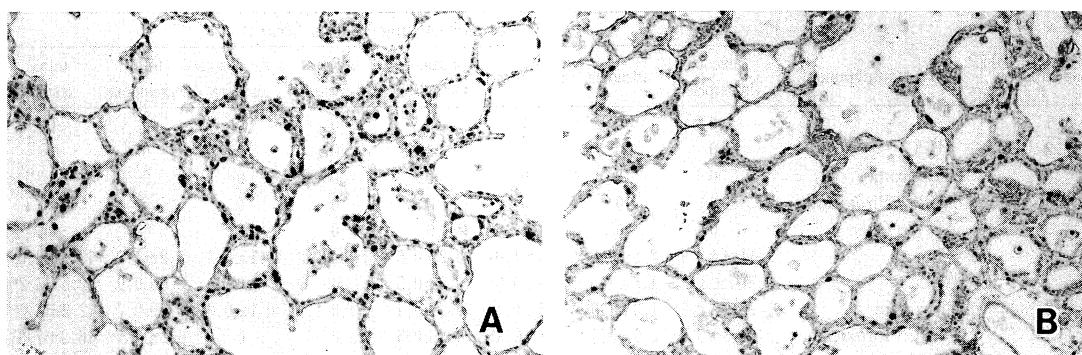


Fig. 3. Representative histological appearances of PCNA in alveolar hyperplasias. The lung of a rat of group 6 (A) and that of a rat of group 9 (B) from experiment-2. PCNA labeling of alveolar epithelial cells was decreased in B compared with A. Anti-PCNA antibody stain $\times 60$

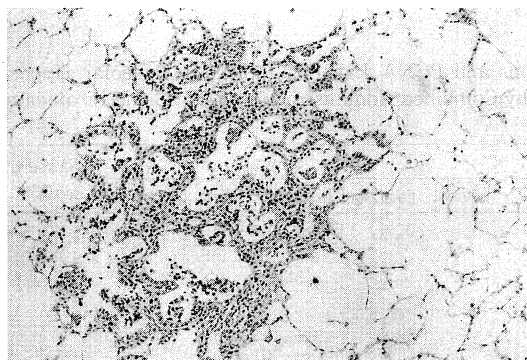


Fig. 4. Representative histological appearance of 8-OH-dG in alveolar hyperplasia. The lung of a rat of group 6 from experiment-2. Nuclei of alveolar epithelial cells and inflammatory cells were positive. Anti-8-OH-dG antibody stain $\times 40$

第10群は、第6群に比し有意な減少がみられた。さらに一匹当たりの平均総肺病変発生個数は、第6群で 15.3 ± 3.6 個、第7群で 12.5 ± 3.2 個、第8群で 12.2 ± 3.6 個、第9群で 16.2 ± 7.0 個および第10群で 16.5 ± 4.8 個であった。第7群と第8群は、第6群に比し有意な減少がみられた。

肺病変部の内、BHP 処置群である第6群と第9群における肺胞上皮過形成病変の組織学的所見と PCNA の標識率は、Table 7 に示す。過形成病変においては、肺胞壁の鬱血、浮腫と好中球、マクロファージおよびリンパ球の浸潤がみられ、肺胞腔内にも好中球、マクロファージおよびリンパ球の浸潤と浸出液がみられた。このような所見は、肺胞上皮過形成のみならず、腺腫と腺癌においても同様にみられたが、非病変部の肺では肺胞腔内のマクロファージの僅かな浸潤をみるのみであった。このような炎症性変化は、第6群に比し、第9群で抑制され

Table 8. Bacterial Identification in Aspirated Broncho-Alveolar Lavage from Experiment-2

Groups	BHP +/-	Test compounds	No. of rats	Identified bacteria species						
				Escherichia coli	Aerococcus sp.	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus haemolyticus	Proteus mirabilis	Klebsiella pneumoniae	Bacillus sp.
1	-	—	3	-	-	-	1	-	-	-
2	-	ABPC	3	-	1	-	-	-	-	-
3	-	Piroxicam	3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	ABPC+Piroxicam	3	-	-	-	-	-	-	1
5	-	ABPC+Ogon	3	-	-	-	-	-	-	1
6	+	—	3	2	1	-	-	-	-	-
7	+	ABPC	3	2	-	-	-	-	-	-
8	+	Piroxicam	3	2	-	1	-	-	-	-
9	+	ABPC+Piroxicam	3	2	-	-	-	1	-	-
10	+	ABPC+Ogon	3	1	-	-	-	-	1	-

- : not identified

BHP : N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine

ABPC : Aminobenzylpenicillin (ampicillin)

ていた(Fig. 2 A and 2 B)。さらに、肺胞上皮過形成におけるPCNAの標識率は、第6群の43.7±4.1%に対し第9群では36.1±2.3%と、有意に低下していた(Fig. 3 A and 3 B)。

8-OH-dG染色では、第6群の肺胞上皮過形成は、周囲の肺組織がほとんど染色されないのに比べ、過形成の上皮細胞と浸潤炎症性細胞の核は陽性を示した(Fig. 4)。

肺胞洗浄液中の細菌の同定結果は、Table 8に示す。第6群から第10群において大腸菌(*Escherichia coli*)が認められたほか、第1群から第5群を含め、アエロコッカス属(*Aerococcus sp.*)、ブドウ球菌属(*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*)、プロテウス属(*Proteus mirabilis*)、クレブシエラ属(*Klebsiella pneumoniae*)、バチルス属(*Bacillus sp.*)が同定された。菌の分布は、各被験物質投与群間に一定の傾向はみられなかった。

考 察

近年、細菌やウイルスまたは寄生虫などにより誘発される慢性炎症は、種々の情報伝達分子などを誘導し、これら分子は感染因子の除去に作用する一方、発癌のイニシエーターまたはプロモーターとしても作用する可能性が知られてきた。ヒトにおいては疫学的に、胃の*Helicobacter pylori* 菌²⁾、肝臓のB型およびC型肝炎ウイルス^{3,4)}や寄生虫であるタイ肝吸虫⁵⁾、子宮頸管のPapillomaウイルス⁶⁾あるいはリンパ組織のEpstein-Barrウイルス⁷⁾などの感染因子は、慢性炎症を介してこれら臓器における悪性腫瘍の発生に深く関わっていることが報告されている¹⁾。実験的には、プロスタグランディン生

成経路における酵素活性阻害、とくにシクロオキシゲナーゼ(Cox)-2阻害剤の大腸^{14,15)}、肝臓¹⁶⁾および膀胱¹⁷⁾における発癌抑制効果が報告され、これら臓器における発癌に対する慢性炎症の関与が示唆されている。

肺は細菌感染を含む環境因子に最も暴露を受け易い臓器であり、肺を含む呼吸器系において、慢性炎症の腫瘍発生に対する関与の研究は重要な課題であるが、これを検索した報告は極めて乏しい。

実験-1および実験-2の結果から、BHPのラット肺発癌モデルにおいて、抗生物質と非ステロイド系抗炎症薬あるいは生薬との併用投与は、肺胞腔内および肺胞壁における慢性炎症性細胞浸潤を抑制することにより、肺発癌を抑制することが判明した。ABPCおよびEMは広スペクトラムの抗生物質として広く使用され、また、7つの成分から構成される小柴胡湯は、免疫調整作用、抗酸化作用や抗炎症作用など種々の薬理作用を有し¹⁸⁻²⁵⁾、肝癌に対する化学予防効果が報告されている²⁶⁾。PiroxicamはCoxの阻害作用を有する非ステロイド系抗炎症薬として、結腸²⁷⁾、舌²⁸⁾および膀胱²⁹⁾発癌に対する抑制効果が報告され、黄ごんは小柴胡湯の7つの成分の一つで、強い抗炎症作用と抗酸化作用を有している³⁰⁻³²⁾。BHPによるラット肺発癌過程では、肺胞上皮過形成や扁平上皮化生においてKi-ras遺伝子コドン12のsecond positionのG→A transitionによる突然変異が証明されているが¹¹⁾、肺胞上皮過形成に炎症性細胞の浸潤が目立つことから、さらに慢性炎症に起因した何らかの分子種が直接的あるいは間接的に作用し、他の遺伝子の変異などを誘発している可能性が考えられる。組織傷害と慢性炎症に伴い食細胞が活性化されることにより

生成される Nitric oxide は、DNA 障害と細胞分裂活性を刺激することが報告されている³³⁾。炎症場における白血球やマクロファージより産生される活性酸素種は、原因の排除をする一方で、過度な反応あるいは持続する反応が逆に正常組織まで傷害し、突然変異、染色体異常あるいは鎖切断などの DNA 障害や同時に細胞分裂の増加および DNA 修復の遅延を引き起こす。また、細胞増殖、分化、細胞死および代謝酵素などに関わる遺伝子や蛋白の機能を修飾し、正常な機能を変化させることも報告されている³⁴⁻³⁹⁾。本実験-1 および実験-2 においても、前癌病変と考えられている肺胞上皮過形成で、炎症性細胞浸潤の少ない過形成と比較し、炎症性細胞浸潤の著しい過形成において高い細胞増殖活性が認められた。このことは、BHP による遺伝子の変化に加え、炎症性細胞により生成された活性酸素を初めとする種々のフリーラジカルが、前癌病変の癌への進展に関与している可能性が推察された。8-OH-dG は、酸素ラジカルによる DNA 損傷時に見いだされる塩基修飾で⁴⁰⁾、発癌プロモーターの処理によって白血球やマクロファージより産生された酸素ラジカルによる DNA 損傷の指標として細胞核中に検出される⁴¹⁾。近年、8-OH-dG が喫煙者の肺組織で、非喫煙者と比較しより高いレベルを示していることが報告され⁴²⁾、肺癌発生における酸素ラジカルによる酸化的 DNA 損傷との関連が注目されている。実験-2 において実施した肺胞上皮過形成における 8-OH-dG 染色による酸化的ストレスの関与を検索した結果、過形成周囲の非過形成部に比べ、過形成で明らかに染色性の増強がみられ、過形成における酸化的ストレスの関与が判明した。

BHP のラット肺癌モデルにおいて、BHP 処置により誘発された肺癌、とくに腺癌は、抗生物質と非ステロイド系抗炎症薬あるいは生薬との併用投与により、肺胞上皮過形成における慢性炎症性細胞浸潤を抑制せしめることにより、発生頻度ならびに一匹当たりの平均発生個数を抑制した。この事実、局所に浸潤してきた炎症性細胞より生成される活性酸素を初めとする種々のフリーラジカルに加えて、プロスタグランジンおよびサイトカインなどの産生が抑制された結果、発癌過程の進展を修飾したものと推察しうる。この知見に関してはさらに詳細な研究が必要である。

本実験では、慢性炎症の発癌に関する起炎菌を特定することはできなかったが、抗生物質の抗菌活性のみならず、これらの好中球浸潤の抑制⁴³⁾、一酸化窒素ラジカルの産生抑制やインターフェロン- γ 誘導の抑制⁴⁴⁾ による免疫調節作用と、非ステロイド系抗炎症薬あるいは生薬

によるフリーラジカルや種々のプロスタグランジンおよびサイトカインの産生抑制および抗酸化作用などの複合作用が、肺の非小細胞癌の発生と進展に影響を与えたものと考えられる。

結 論

BHP 投与によるラット肺癌モデルを用いて、肺の非小細胞癌の発生・進展過程における慢性炎症の関与を検索する目的で、抗生物質、非ステロイド系抗炎症薬および生薬をそれぞれ単独または併用投与し、慢性炎症阻止の発癌に対する影響を検索し、以下の結果を得た。

1. ABPC と小柴胡湯、ABPC と Piroxicam または ABPC と黄ごんの併用投与は、BHP 投与による腺癌とこれを含む非小細胞癌の発生頻度を低下せしめた。
2. EM と小柴胡湯または ABPC と小柴胡湯の併用投与は、肺胞上皮過形成とこれを含む肺病変、また、ABPC と Piroxicam または ABPC と黄ごんの併用投与は、腺癌とこれを含む非小細胞癌の一匹当たりの発生個数を減少せしめた。
3. ABPC と小柴胡湯または ABPC と Piroxicam の併用投与は、肺胞上皮過形成と腺腫、腺癌を含む肺病変における炎症性細胞浸潤を抑制した。
4. 上記薬剤の併用投与は、肺胞上皮過形成における細胞増殖を低下せしめた。
5. 肺胞上皮過形成の上皮細胞と浸潤炎症性細胞の核に、8-OH-dG 陽性所見がみられた。
6. BHP 投与ラットの肺胞洗浄液に、大腸菌やアエロコッカス属、ブドウ球菌属、プロテウス属またはクレブシエラ属が検出された。

以上の結果より、抗生物質と非ステロイド系抗炎症薬あるいは生薬の併用投与は、肺病変における炎症性細胞浸潤を抑制し、前癌病変から非小細胞癌への進展を阻止することが判明し、肺の非小細胞癌の発生と進展に慢性炎症の関与することが示唆された。

謝 辞

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るとともに、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第三外科学教室谷口繁樹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、御協力を賜った腫瘍病理学教室の御諸姉姉に感謝いたします。なお、本論文の要旨は、第 14 回日本毒性病理学会において発表した。

文 献

- 1) **Jones, S.** : Cancer research for cancer control, the major causes of cancer. The International Agency for Research on Cancer, France, pp. 12-23, 1997.
- 2) **The Eurogast Study Group** : An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The Lancet **341** : 1359-1362, 1993.
- 3) **Okuda, K., Fujimoto, I., Hanai, A. and Urano, Y.** : Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. Cancer Res. **47** : 4967-4972, 1987.
- 4) **Takano, S., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tagawa, M. and Omata, M.** : Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: A prospective study of 251 patients. Hepatology **21** : 650-655, 1995.
- 5) **Srivatanakul, P., Parkin, D. M., Jiang, Y. Z., Khlatt, M., Kao-Ian, U. T., Sontipong, S. and Wild, C.** : The role of infection by opisthorchis viverrini, hepatitis B virus, and aflatoxin exposure in the etiology of liver cancer in Thailand. Cancer **68** : 2411-2417, 1991.
- 6) **Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W. and Kurman, R. J.** : Human papilloma virus infection of the cervix : relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet. Gynecol. **79** : 328-337, 1992.
- 7) **Weiss, L. M., Movahed, L. A., Warnke, R. A. and Sklar, J.** : Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. N. Engl. J. Med. **320** : 502-506, 1989.
- 8) **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. Perugia Quadrennial International Conference on Cancer, Division of Cancer Research, Perugia University, Perugia, pp. 637-649, 1978.
- 9) **Yokose, Y., Yamamoto, K., Nakajima, A., Eimoto, H., Maruyama, H., Mori, Y. and Konishi, Y.** : Carcinogenic potency of N-nitrosomethyl(2-hydroxypropyl)amine and other metabolic relatives of N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine by single intraperitoneal injection on the lung of rats. Jpn. J. Cancer Res. **79** : 698-704, 1988.
- 10) **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. **67** : 773-780, 1976.
- 11) **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 p 53 in lung lesions induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. Mol. Carcinogenesis **15** : 276-283, 1996.
- 12) **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.
- 13) **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 carcinogenesis by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. Mol. Carcinogenesis **24** : 287-293, 1999.
- 14) **Takahashi, M., Fukutake, M., Yokota, S., Ishida, K., Wakabayashi, K. and Sugimura, 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.
- 15) **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.
- 16) **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.
- 17) **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.
 - 18) **Shimizu, K., Amagaya, S. and Ogihara, Y.** : Combination effects of Shosaikoto (Chinese traditional medicine) and prednisolone on the anti-inflammatory action. *J. Pharmacobiodyn.* **7** : 891-899, 1984.
 - 19) **Yoshida, K., Mizukawa, H., Honmura, A., Uchiyama, Y., Nakajima, S. and Haruki, E.** : The effect of sho-saiko-to on concentration of vitamin E in serum and on granuloma formation in carrageenin cotton pellet-induced granuloma rats. *Am. J. Chin. Med.* **22** : 183-189, 1994.
 - 20) **Fujiwara, K., Mochida, S., Nagoshi, S., Iijima, O., Matsuzaki, Y., Takeda, S. and Aburada, M.** : Regulation of hepatic macrophage function by oral administration of xiao-chai-hu-tang (sho-saiko-to, TJ-9) in rats. *J. Ethnopharmacol.* **46** : 107-114, 1995.
 - 21) **Komatsu, M., Hiramatsu, M., Yokoyama, H. and Willmore, L. J.** : Effect of TJ-960 (a Japanese herbal medicine) on free radical changes within an iron-induced focal epileptogenic region in rat brain measured by in vivo L-band electron spin resonance. *Neurosci. Lett.* **205** : 189-192, 1996.
 - 22) **Matsumoto, T. and Shibata, T.** : The ex vivo effect of the herbal medicine sho-saiko-to on histamine release from rat mast cells. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **255** : 359-364, 1998.
 - 23) **Kakumu, S., Yoshioka, K., Wakita, T. and Ishikawa, T.** : Effects of TJ-9 sho-saiko-to (kampo medicine) on interferon gamma and antibody production specific for hepatitis B virus antigen in patients with type B chronic hepatitis. *Int. J. Immunopharmacol.* **13** : 141-146, 1990.
 - 24) **Kaga, H., Ochiai, H., Kurokawa, M. and Sakuragawa, N.** : Effects of kampochozais (sho-saiko-to, Ninjin-to, hochu-ekki-to and juzentaiho-to) on immune responses in mice. *Acta Medica. et. Biologica.* **39** : 161-167, 1991.
 - 25) **Sakaguchi, S., Furusawa, S., Yokota, K., Sasaki, K. and Takayanagi, Y.** : Depressive effect of a traditional Chinese medicine (sho-saiko-to) on endotoxin-induced nitric oxide formation in activated murine macrophage J 774 A. 1 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **18** : 621-623, 1995.
 - 26) **Oka, H., Yamamoto, S., Kuroki, T., Harihara, S., Marumo, 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.
 - 27) **Reddy, B. S., Maruyama, H. and Kelloff, G.** : Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development. *Cancer Res.* **47** : 5340-5346, 1987.
 - 28) **Tanaka, T., Nishikawa, A., Mori, Y., Morishita, Y. and Mori, H.** : Inhibitory effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs, piroxicam and indomethacin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male ACI/N rats. *Cancer Lett.* **48** : 177-182, 1989.
 - 29) **Okajima, E., Ozono, S., Endo, T., Majima, T., Tsutsumi, M., Fukuda, T., Akai, H., Denda, A., Hirao, Y., Okajima, E., Nishino, H., Nir, Z. and Konishi, Y.** : Chemopreventive efficacy of piroxicam administered alone or in combination with lycopene and β -carotene on the development of rat urinary bladder carcinoma after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine treatment. *Jpn. J. Cancer Res.* **88** : 543-552, 1997.
 - 30) **Satomi, N., Sakurai, A., Imura, F., Haranaka, R. and Haranaka, K.** : Japanese modified traditional Chinese medicines as preventive drugs of the side effects induced by tumor necrosis factor and lipopolysaccharide. *Mol. Biother.* **1** : 155-162, 1989.

- 31) 中山貞男, 小泉久仁弥, 飯島宏治, 真柳 誠, 小口勝司: ラット肝の薬物代謝酵素と脂質過酸化に及ぼすシソ科和漢薬の影響. 日薬理誌 **101**: 327-336, 1993.
- 32) Kyo, R., Nakahata, N., Sakakibara, I., Kubo, M. and Ohizumi, Y.: Effects of Sho-saiko-to, San'o-shashin-to and Scutellariae Radix on intracellular Ca²⁺ mobilization in C6 rat glioma cells. Biol. Pharm. Bull. **21**: 1067-1071, 1998.
- 33) Ohshima, H. and Bartsch, H.: Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. Mutation Res. **305**: 253-264, 1994.
- 34) Grisham, M. B., Hernandez, L. A. and Granger, D. N.: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. Am. J. Physiol. **251**: G 567-574, 1986.
- 35) Troll, W. and Wiesner, R.: The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **25**: 509-528, 1985.
- 36) Zimmerman, R. and Cerutti, P.: Active oxygen acts as a promoter of transformation in mouse embryo C3H/10T 1/2/C18 fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 2085-2087, 1984.
- 37) Weitzman, S. A., Weitberg, A. B., Clark, E. P. and Stossel, T. P.: Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. Science **227**: 1231-1233, 1985.
- 38) Lewis, J. G., Hamilton, T. and Adams, D. O.: The effect of macrophage development on the release of reactive oxygen intermediates and lipid oxidation products, and their ability to induce oxidative DNA damage in mammalian cells. Carcinogenesis **7**: 813-818, 1986.
- 39) Freeman, B. A. and Crapo, J. D.: Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab. Invest. **47**: 412-426, 1982.
- 40) 葛西 宏: 酸素ラジカルによるDNA損傷と突然変異. 環境変異原研究. **10**: 73-83, 1988.
- 41) Floyd, R. A., Watson, J. J., Harris, J., West, M. and Wong, P. K.: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. Biochem. Biophys. Res. Commun. **137**: 841-846, 1986.
- 42) Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H. and Kasai, H.: Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. Carcinogenesis **18**: 1763-1766, 1997.
- 43) Miyajima, M., Suga, M., Nakagawa, K., Ito, K. and Ando, M.: Effects of erythromycin on experimental extrinsic allergic alveolitis. Clin. Exp. Allergy **29**: 253-261, 1999.
- 44) Sato, K., Suga, M., Akaike, T., Fujii, S., Muranaka, H., Doi, T., Maeda, H. and Ando, M.: Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. Am. J. Respir. Crit. Care Med. **157**: 853-857, 1998.