

Effects of High Dietary Fat and Prostaglandin Synthetase Inhibitor, Indomethacin, on Tumorigenesis, Development, Cell Kinetics and Receptor Contents of 7, 12-Dimethylbenz [a]-anthracene-induced Mammary Carcinoma in Sprague-Dawley Rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8270

7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発ラット乳癌の 発生, 増殖, 細胞動態およびホルモンレセプターに及ぼす 高脂肪食およびプロスタグランディン合成酵素阻害剤 インドメタシンの影響

金沢大学医学部外科学第二講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

谷屋 隆 雄

(平成3年3月25日受付)

7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発ラット乳癌の発生, 増殖, 細胞動態およびホルモンレセプターに及ぼす高脂肪食ならびにプロスタグランディン合成酵素阻害剤であるインドメタシンの影響について検討した. 生後50日の雌 Sprague-Dawley 系ラットに 5mg の DMBA を一回胃内投与し, その一週後より任意に4群に分け, 総カロリーの等しい, 20%コーン油含有の高脂肪食, 0.5%コーン油含有の低脂肪食, およびそれぞれに0.005%のインドメタシンを添加した4種類の食餌を与えた. その結果, 高脂肪食群では, 低脂肪食群に比較し, 有意に腫瘍の発生および増殖が促進された. 一方, 高脂肪食にインドメタシンを添加した群は, 高脂肪食群と比較すると, 有意に腫瘍の発生率と発生個数の低下及び腫瘍発生までの潜伏期間の延長を認めた. しかし, 一旦発生した腫瘍においては, 各担癌ラットの平均腫瘍個数の増加, 初発腫瘍の平均腫瘍径の増加, Bromodeoxyuridine 標識率の増加および潜在的倍加時間の短縮を認めた. なお, 腫瘍組織内のエストロゲンレセプター値, プロゲステロンレセプター値には, 有意差を認めなかった. 以上より, DMBA 誘発ラット乳癌において, 高脂肪食はその発生と増殖をともに促進させる作用があり, 一方, インドメタシンは, 腫瘍の発生段階では高脂肪食の発生促進作用を抑制するが, 腫瘍の増殖段階では脂肪摂取量にかかわらずその増殖を促進する作用があると考えられた.

Key words DMBA 誘発乳癌, 高脂肪食, インドメタシン, flow cytometry, 細胞動態

本邦と欧米における乳癌を比較すると, その発生頻度と予後は著しく異なり, 欧米の乳癌は発生頻度が高く, その予後も悪いことが知られている^{1)~3)}. この原因は, 日本食と欧米食との違い, すなわち, 脂肪摂取量の違いにあるとされ^{4)~6)}, 実験的にも高脂肪食に含まれる多価不飽和脂肪酸が, 乳癌の増殖を促進させることが確認されている. すなわち, 発癌物質を投与する以前から高脂肪食を与えても, 乳癌の増殖は促進され

ず, 発癌物質投与後に高脂肪食を与えた場合に乳癌の増殖が促進されることから, 高脂肪食は, 乳癌の増殖促進因子 (promoter) であると考えられている^{7)~9)}. また, この高脂肪食には多価不飽和脂肪酸が多く含まれ, その乳腺腫瘍発生に対する促進作用は, プロスタグランディン (prostaglandin) の合成が増加することによると考えられている. Carter らによれば, 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) 誘発雌

Abbreviations: BUdR, bromodeoxyuridine; DCC, dextran coated chacoal; DMBA; 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene; ER, estrogen receptor; FITC, fluorescein isothiocyanate; H.F., high fat; Ind., indomethacin; L.F., low fat; NK, natural killer; PBS, phosphate-buffer saline; PgR, progesterone receptor

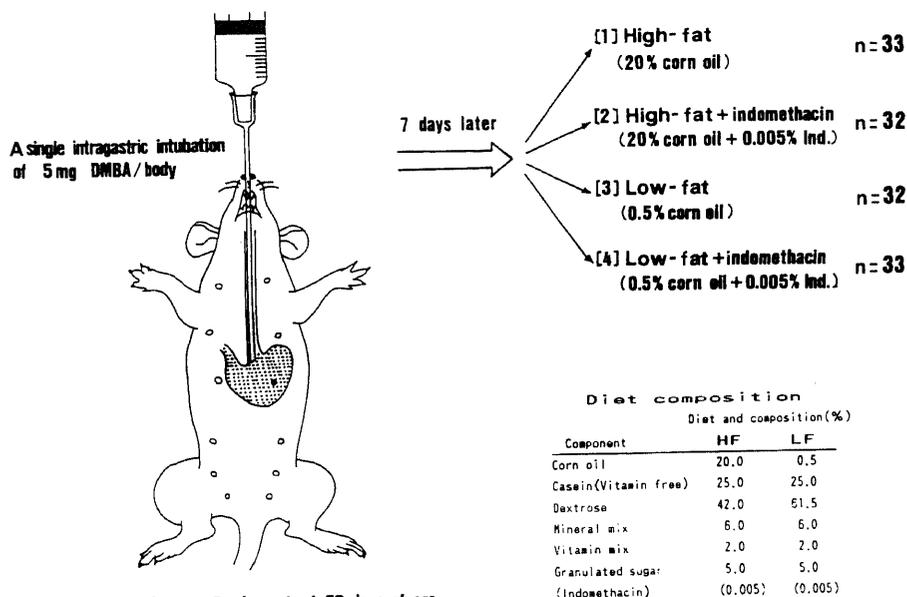
Sprague-Dawley 系ラット乳癌において、高脂肪食の発癌促進作用が、プロスタグランジン合成酵素阻害剤であるインドメタシン (indomethacin, Ind) の投与により完全に抑制されたと報告している¹⁰⁾。プロスタグランジンは、免疫監視機構の役割を果たしているナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞の働きを抑制し、腫瘍の免疫的逃避を引き起こすと報告されている¹¹⁾。しかし、多価不飽和脂肪酸には、このような免疫機構を介した間接的な作用のほかに、腫瘍細胞に対する直接的な作用も報告されている¹²⁾¹³⁾。さらに、最近、Tanaka らはインドメタシンがマウス皮下移植大腸腺癌 Colon 26 移植後早期における増殖を抑制するが、進行した状態では、その増殖を促進すると報告している¹⁴⁾。一方、高脂肪食は、ホルモンレセプター (hormone receptor) 値に影響を及ぼさないと報告されているが¹⁵⁾¹⁶⁾、一般的には、ホルモンレセプター値と乳癌の増殖能は逆相関にあり^{17)~24)}、高脂肪食のホルモンレセプターに及ぼす影響に関しても不明な点が多い。このように、腫瘍細胞の増殖に及ぼす、高脂肪食

とインドメタシンの影響^{7)~10)12)~14)}、およびホルモンレセプターに及ぼす高脂肪食の影響^{15)~24)}に関しては、なお一定の見解が得られていないと考えられる。そこで、雌 Sprague-Dawley 系ラットに、DMBA を投与し乳癌を発生させ、高脂肪食あるいは低脂肪食を摂取させるとともに、インドメタシンを投与し、それらの、乳癌の発生、増殖、細胞動態ならびにホルモンレセプターに及ぼす影響を検討した結果、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

I. 実験動物と腫瘍誘発

生後50日の雌 Sprague-Dawley 系ラット (静岡実験動物センター、浜松) に DMBA (Shigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 5mg を一回胃内投与し、その1週後より任意に4群に分け、総カロリーの等しい高脂肪食 (コーン油 20%) (high fat (H.F.) 群: n=32)、低脂肪食 (コーン油 0.5%) (low fat (L.F.) 群: n=33)、0.005% のインドメタシンを含む高脂肪食



Female Sprague-Dawley rat, at 50 days of age

Fig. 1. Experimental schema of tumor induction in rats and diet composition. This experiment was designed to determine whether the administration of indomethacin would abrogate the stimulatory effect of fat on the tumorigenesis, and inhibit tumor development. Fifty-day-old virgin female Sprague-Dawley rats were given a single dose of 5mg of DMBA through an intragastric intubation. Seven days after the DMBA administration, the rats were divided into four groups: a high-fat (20% corn oil) group, an indomethacin-treated high-fat group, a low-fat (0.5% corn oil) group, and an indomethacin-treated low-fat group. The diet for one half of the rats of each group was supplemented with 0.005% (w/w) indomethacin.

(H.F.+Ind. 群: n=33),あるいは低脂肪食(L.F.+Ind. 群: n=32)を与えた(オリエンタル酵母社, 東京). なお, 飼料単位重量当たりの成分(%)は, 高脂肪食で, コーン油20.0; カゼイン25.0; デキストロース42.0; 混合ミネラル6.0; 混合ビタミン2.0; グラニュー糖5.0とし, 低脂肪食で, コーン油0.5; カゼイン25.0; デキストロース61.5; 混合ミネラル6.0; 混合ビタミン2.0; グラニュー糖5.0とした(図1).

II. 腫瘍計測と Bromodeoxyuridine (BrdR) 投与 DMBA 投与後, 経時的に体重を測定するとともに,

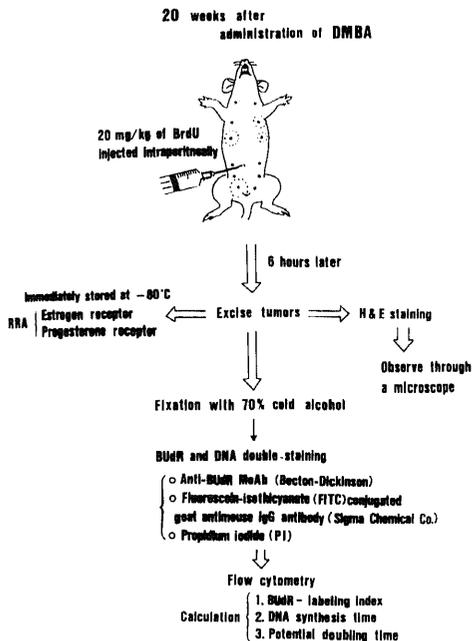


Fig. 2. BUdR administration and handling of the excised tumors at 20 weeks after the DMBA administration. Twenty weeks after the DMBA administration, 20mg/kg of BUdR was intraperitoneally injected. The rats were sacrificed 6 hrs later, and the tumors were extirpated. Then, a part of each tumor was immediately stored at -80°C prior to examination for estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) by the radio-receptor assay. Another part of each tumor mass was immediately cut into small pieces, and fixed in 70% ethanol for over 30 min. Then BUdR and DNA were stained and analyzed by flow cytometer. The data was calculated for BUdR-labeling index, DNA synthesis time and potential doubling time. Another part of each tumor tissue was fixed in 10% formalin, sectioned, and stained with hematoxyline-eosin for routine histological examination.

発生してくる腫瘍の個数および腫瘍径を測定した。なお, 腫瘍径は, エーテル麻酔下で触診し, ノギスを用い長径と短径を計測し, その平均値として算出した。20週後, BUdR (RADIBUD[®]; Takeda Chemical Ltd, Osaka, Japan) 20mg/kg を腹腔内投与し, その6時間後に屠殺し, 腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍の一部は, エストロゲンレセプター (estrogen receptor, ER) ならびにプロゲステロンレセプター (progesterone receptor, PgR) の測定のため, 直ちに液体窒素下で -80°C に凍結保存した。他の一部はハサミで5mm角に細切りし, 70%エタノールで30分以上固定後, 0.5%ペプシン (pepsin) 含有生食水 (pH0.5) で 37°C , 2時間酵素処理し, 単離細胞浮遊液を作成した。40 μm ナイロン (nylon) 網で濾過後, 1,500rpm で5分間遠沈し, 再度, 70%エタノールで固定し 4°C に保存した。さらに, 一部は10%ホルマリン (formalin) で固定し, 組織切片を作成後, ヘマトキシリン-エオジン (hematoxylin-eosin, HE) 染色を行い病理組織学的に検討した(図2)。

III. 蛍光染色

70%エタノールで固定した単離細胞は, Dolbearらの方法²⁹⁾に準じ, 蛍光染色を行った。まず, 0.5%のTween-20 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) を加えたリン酸塩緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) で2回洗浄し, 2規定塩酸で20分間反応させた後, 0.1規定ホウ酸ナトリウムで10分間中和した。PBS で2回洗浄後, 癌細胞 1×10^6 当たり, PBS で50倍に希釈したマウスの抗 BUdR モノクローナル抗体 (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) $20 \mu\text{l}$ を加え, 室温で60分間反応させた。さらにPBS で2回洗浄した後, 同様のPBS で50倍に希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスヤギ IgG 抗体 (Cappel Laboratories Inc., CA, USA) $10 \mu\text{l}$ と室温で30分間反応させ, BUdR を染色した。 37°C で30分間, リボヌクレアーゼ (RNase) (1mg/ml) による酵素処理を行った後, propidium iodide (PI) (Sigma Chemical CO) $20 \mu\text{l}/\text{ml}$ で DNA を染色した。

IV. 細胞動態解析

フローサイトメーターとして EPICS profile (Coulter Electronics Inc. Hialeah, FL, USA) を使用した。1検体につき約2万個の細胞を測定し, Beggらの方法²⁹⁾により BUdR 標識率 (BUdR-labeling index), 潜在的倍加時間 (Potential doubling time), DNA 合成時間 (DNA synthesis time) を算出した(図3)。

V. 組織内 ER, PgR の測定

1. エストロゲンレセプター (ER)

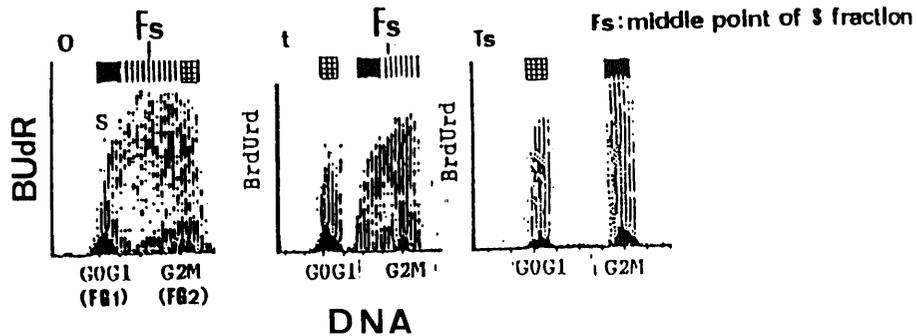
凍結組織を均質化 (homogenize) した後, 超遠心分離 (45,000rpm, 0°C) を行い, 上精液 (cytosol) を得た. 上精液に各種濃度の標識 E_d ($[H^3]$ -estradiol) を加え, 0°C で 12~24 時間静置し反応させた後, dextran coated charcoal (DCC) 液を加え, 遠心分離 (3,000rpm, 0°C) によりレセプター結合型の標識 E_2 と遊離型に分離した. 上精液のレセプター結合型標識 E_2 を液体シンチレーションカウンターを用いて 5 分間計測した. Lowry 法²⁷で上精液のタンパク質濃度を求めた. 以上の測定結果をスカッチャードプロット (Scatchard plot)²⁸を用いて解析し, 組織内 ER 量を求めた.

2. プロゲステロンレセプター (PgR)

凍結組織を均質化した後, 超遠心分離 (45,000rpm, 0°C) により得た上精液に, 各種濃度の標識 R5020 ($[H^3]$ -progesterone) を加え, 0°C で 14~24 時間静置し反応させた. 次に, DCC 液に加え, 遠心分離 (3,000rpm, 0°C) によりレセプター結合型標識 R5020 と遊離型に分離した. 上精液のレセプター結合型標識 R5020 を液体シンチレーションカウンターで 5 分間計測した. 一方, Lowry 法で上精液のタンパク質量を求めた. 以上の測定結果をスカッチャードプロットを用いて解析し, 組織内 PgR 量を求めた (図 4).

VI. 統計学的処理

腫瘍発生率に関しては, カイ二乗 (χ^2) 検定を用い,



$$\text{DNA synthesis time} = \frac{0.5}{RM - 0.5} \cdot t \quad (\text{hrs})$$

$$\left(RM = \frac{F_s - F_{G1}}{F_{G2} - F_{G1}} \right)$$

$$\text{BUdR labeling index} = \frac{S}{G_0G_1 + S + G_2M} \cdot 100$$

$$\text{Potential doubling time} = \frac{T_s}{\text{BrdU-L.I.}} \cdot \frac{100}{24} \quad (\text{days})$$

Fig. 3. Method for the evaluation of DNA synthesis time and calculation of BUdR-labeling index and potential doubling time. Assumptions are that at time 0, the mean DNA content of BUdR-labeled S-phase cells is in the middle of the interval between the G_0G_1 and G_2M peaks, with their relative movement (RM) at 0.5 and that the rate of progression of cells through the S phase is constant. At the time of tumor sampling (t), S-phase cells have progressed toward G_2 , and some have already recycled. The new position of the S-phase cells is measured from their mean DNA content, and their relative movement (RM2) at this time is calculated according to the above formula. All S-phase cells are expected to have reached G_2 at a time corresponding to DNA synthesis time. The DNA synthesis time is hence calculated with the formula. Furthermore, BUdR-labeling index and potential doubling time are calculated with the formula.

他の測定値は平均値±標準偏差値 (mean±S.D.) をもって示し、対応のない場合の t 検定を行った。いずれの場合も、危険率 5% 以下を有意差ありと判定した。

成 績

I. 体重の経時的変化

DMBA 投与後20週間のラット平均体重の推移は、高脂肪食群と低脂肪食群の間で差はなく、また、インドメタシンの有無でも体重の推移に差を認めなかった (図5)。

II. 腫瘍の組織学的検討

発生した乳腺腫瘍は全て腺癌であり、腺腫を認めなかった。しかし、各群における腫瘍の組織像を検討すると、高脂肪食群は低脂肪食群に比較し、管腔を形成する細胞の多層化が強く、充実性に増殖する傾向にあり、核分裂像も多く認めた。この傾向は、インドメタシン非添加群に比較し、インドメタシン添加群でさらに強く認めた (図6)。

III. 腫瘍発生率、個数及び潜伏期間

腫瘍発生率を経時的にみると、高脂肪食は低脂肪食に比較し、有意 ($p < 0.01$) に腫瘍発生率を増加させた。一方、インドメタシンは高脂肪食による腫瘍発生率の増加を完全に抑制したが、低脂肪食に対してはその効果を認めなかった (図7)、DMBA 投与20週後の腫

瘍発生率は、高脂肪食群、高脂肪食+インドメタシン群、低脂肪食群、低脂肪食+インドメタシン群でそれぞれ81.2%、30.3%、27.3%、34.4%であり、高脂肪食群で有意 ($p < 0.01$) に高く、他の3群間で有意差を認めなかった。また、ラット一匹当たりの平均腫瘍個数は、高脂肪食群、高脂肪食+インドメタシン群、低脂肪食群、低脂肪食+インドメタシン群でそれぞれ 2.3 ± 2.8 個、 0.9 ± 1.9 個、 0.5 ± 0.9 個、 0.7 ± 1.4 個で

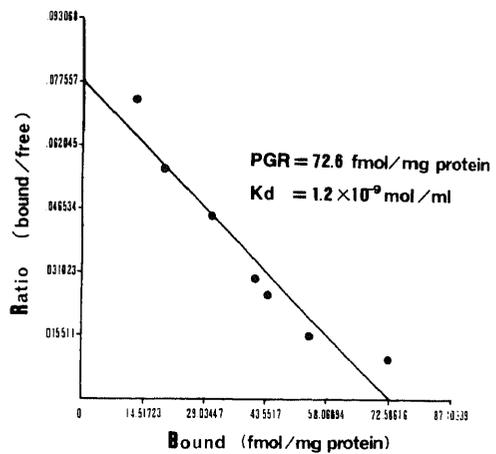


Fig. 4. Scatchard plot of binding of R5020 to PgR from a DMBA-induced mammary carcinoma sample.

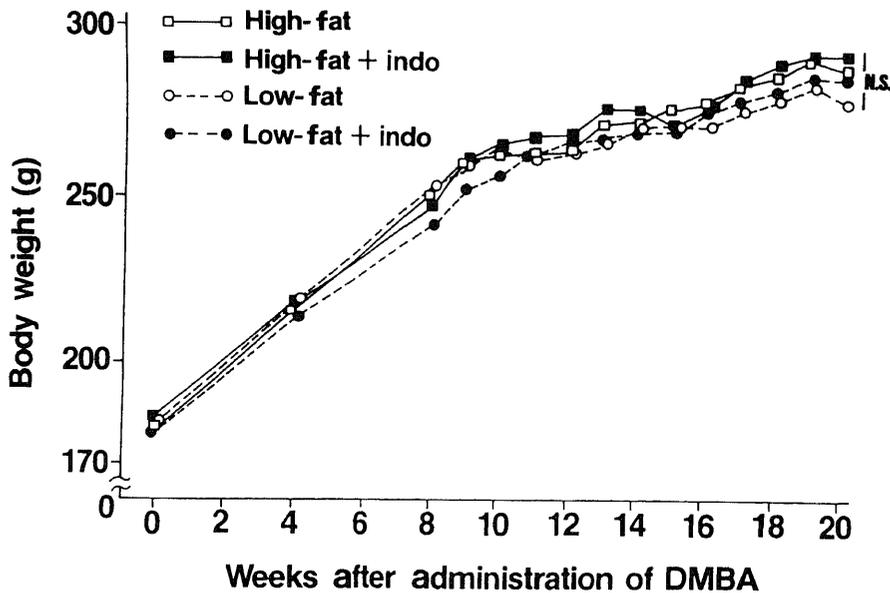


Fig. 5. Effect of dietary fat and indomethacin on body weight. Total body weights did not differ significantly between the high-fat and low-fat diet groups of rats. Indomethacin exerted no effect on the body weight of the rats.

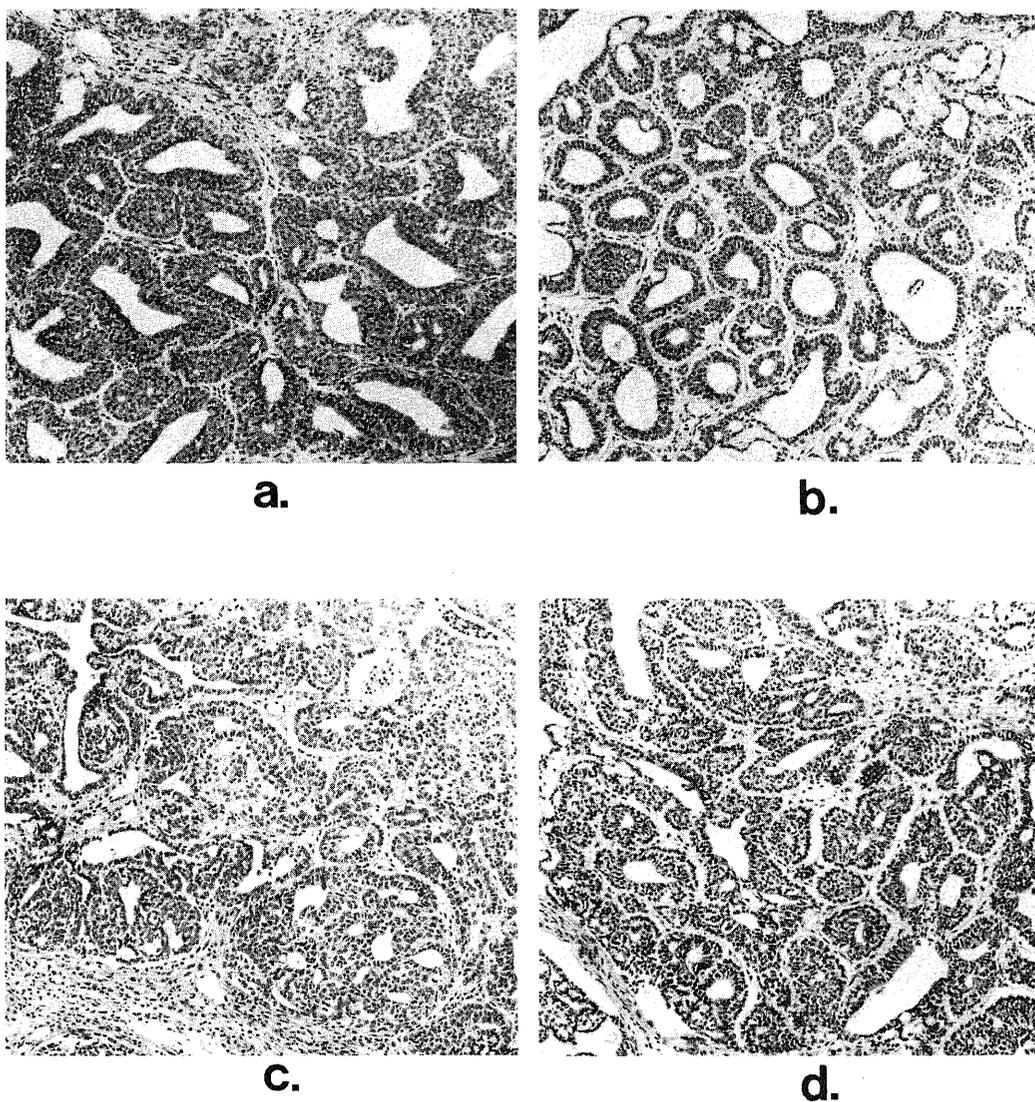


Fig. 6. Histology of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinoma in Sprague-Dawley rats. The induced mammary tumors were histologically adenocarcinomas. No fibroadenoma was found. a. High-fat diet group: Mammary tumors from the high-fat diet group showed a dense proliferation of ductal cells. The ductal cells localized along the solid cell nests and glandular structures were intermingled within the solid tumor cell nests. Some mitotic figures of the nuclei were also observed. b. Low-fat diet group: In the tumors from the low-fat diet group were detected histologically well developed glandular structures of ductal cells. In their lumina, mucinous materials were contained. The density of tumor cells was low, and mitoses were infrequent. c. Indomethacin-treated high-fat diet group: In the tumors from the indomethacin-treated high-fat diet group, a more extensive proliferation of ductal cells was noted than that in the high-fat diet group, tumor cells arranged with large and small solid cell nests and central necrosis of the nests. The frequent mitoses of tumor cells were also noted. Only small lumina were occasionally associated with the nest. d. Indomethacin-treated low-fat diet group: In the tumors from the indomethacin-treated low-fat diet group, proliferation of ductal cells slightly more extensive than that from the low-fat diet group was seen. However, the degree of proliferation was far lower than that observed in the high-fat diet group. Well developed glandular structures and moderate degree of ductal cells were also observed.

あり、高脂肪食群は低脂肪食群に比較し4倍以上、発生個数が高く、有意差 ($p < 0.01$) を認めた。一方、インドメタシンは高脂肪食群の平均腫瘍個数を50%以下に低下させた。さらに、腫瘍発生までの平均潜伏期間は、高脂肪食群、高脂肪食+インドメタシン群、低脂肪食群、低脂肪食+インドメタシン群でそれぞれ 12.6 ± 2.1 週、 15.3 ± 2.6 週、 15.3 ± 2.6 週、 15.0 ± 2.7 週であり、高脂肪食群で有意 ($p < 0.05$) に短く、他の3群間で差を認めなかった。すなわち、高脂肪食は、DMBA 誘発ラット乳癌の発生を促進し、一方、イン

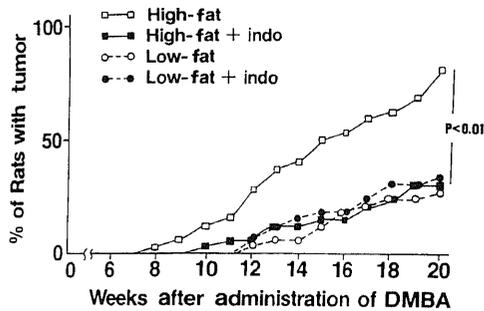


Fig. 7. Effect of dietary fat and indomethacin on tumor incidence. The feeding of rats on a high-fat diet stimulated significantly ($p < 0.01$) the tumor incidence, compared with the low-fat diet group. The administration of 0.005% indomethacin mixed in the high-fat diet resulted in the complete blocking of this effects. However, indomethacin had no effect on the low-fat diet groups. Fig. 7 shows also that first mammary tumors appeared in the high-fat diet group approximately 8 weeks after the DMBA administration, whereas the first tumors appeared in the indomethacin-treated, high-fat diet, the low-fat diet or the indomethacin-treated, low-fat diet group between 10 and 12 weeks after the DMBA administration.

ドメタシンは、高脂肪食による腫瘍発生促進作用を低脂肪食のレベルにまで抑制したが、低脂肪食に対しては影響を認めなかった (表 1)。

IV. 腫瘍の増殖及び細胞動態

担癌ラット一匹当たりの平均腫瘍個数は、高脂肪食群、高脂肪食+インドメタシン群、低脂肪食群、低脂肪食+インドメタシン群でそれぞれ 2.5 ± 2.6 個、 3.0 ± 2.5 個、 1.4 ± 0.9 個、 2.1 ± 1.7 個であり、高脂肪食群は低脂肪食群に比較して多く、また、高脂肪食+インドメタシン群及び低脂肪食+インドメタシン群は、それぞれ高脂肪食群、低脂肪食群に比較して多い傾向にあった。各担癌ラットにおける初発腫瘍の20週後の平均腫瘍径は、高脂肪食群、高脂肪食+インドメタシン群、低脂肪食群、低脂肪食+インドメタシン群でそれぞれ 16.3 ± 4.4 mm、 25.4 ± 7.9 mm、 11.6 ± 2.4 mm、 17.2 ± 4.5 mm であり、高脂肪食群が低脂肪食群に比較して有意 ($p < 0.01$) に大きく、また、高脂肪食+インドメタシン群および低脂肪食+インドメタシン群は、それぞれのインドメタシン非添加群に比較して有意 ($p < 0.01$) に大きかった。さらに、BUdR 標識率は、高脂肪食、高脂肪食+インドメタシン群、低脂肪食群、低脂肪食+インドメタシン群でそれぞれ 6.7 ± 3.3 、 11.9 ± 1.9 、 2.4 ± 0.4 、 8.4 ± 3.3 であり、高脂肪食群は低脂肪食群に比較して有意 ($p < 0.01$) に高く、また、インドメタシン添加群は、インドメタシン非添加群に比較して有意 ($p < 0.01$) に高かった。DNA 合成時間では4群間に差を認めなかったが、潜在的倍加時間では、高脂肪食群、高脂肪食+インドメタシン群、低脂肪食群、低脂肪食+インドメタシン群で、それぞれ 14.6 ± 6.0 日、 7.2 ± 1.5 日、 35.0 ± 4.0 日、 9.9 ± 3.0 日であり、高脂肪食群は低脂肪食群に比較して有意 ($p < 0.01$) に短く、また、高脂肪食+インドメタシン群および低脂肪食+インドメタシン群は、それぞれ

Table 1. Effect of high dietary fat and prostaglandins synthetase inhibitor, indomethacin, on formation of DMBA-induced mammary carcinoma in rats

(20 weeks after administration of DMBA)

	No. of rats	No. of rats with tumors	Tumor incidence (%)	No. of tumors in a rat	No. of tumors in a tumor-bearing rat	Latency (W)
H.F.	32	26	81.2 ^{a)}	2.3±2.8 ^{a)}	2.5±2.6	12.6±2.1 ^{b)}
H.F.+Ind.	33	10	30.3	0.9±1.9	3.0±2.5	15.3±2.6
L.F.	33	9	27.3	0.5±0.9	1.4±0.9	15.3±2.6
L.F.+Ind.	32	11	34.4	0.7±1.4	2.1±1.7	15.0±2.7

(mean ± S.D.)

H.F., High-fat group; H.F.+Ind., Indomethacin-treated high-fat group; L.F., Low-fat group; L.F.+Ind., Indomethacin-treated low-fat group.
a): $P < 0.01$ in comparing H.F. versus L.F., L.F.+Ind. or H.F.+Ind.
b): $P < 0.01$ in comparing H.F. versus L.F., L.F.+Ind. or H.F.+Ind.

高脂肪食群, 低脂肪食群に比較して有意 ($p < 0.01$) に短かった。すなわち, 高脂肪食とインドメタシンは, いずれも一旦発生した腫瘍の増殖を促進する作用が認められた (表 2)。

V. 組織内 ER 値, PgR 値

腫瘍組織内エストロゲンレセプター値, プロゲステロンレセプター値は 4 群間で有意差を認めなかった (表 3)。

考 察

高脂肪食に含まれる多価不飽和脂肪酸は実験的乳腺腫瘍の発生と増殖を促進することが報告されている⁷⁻⁹。また, この多価不飽和脂肪酸による乳腺腫瘍発生に対する促進作用は, プロスタグランジンの合成が増加することによると考えられている¹⁰。さらに,

ある種のプロスタグランディンは宿主の免疫応答を抑制し, 腫瘍の免疫的逃避を引き起こすことが知られている¹¹。しかし, 多価不飽和脂肪酸は, このような免疫機構を介した間接的な作用の他に, 腫瘍細胞の増殖に直接に作用することも報告されている。Kidwell らは, 生体外 (in vitro) において, 多価不飽和脂肪酸がラット乳腺の正常および悪性上皮細胞の増殖を促進したと報告している¹²。Wicha らは, DMBA で誘発したラットの乳癌細胞を培養し, その培養液中にオレイン酸, リノール酸, あるいはリノレイン酸などの不飽和脂肪酸を加えたところ, 培養乳癌細胞の分裂活性が増加したと報告している¹³。多価不飽和脂肪酸は, このような生体外の実験において, 明らかに免疫機構に関与しておらず, 直接的に作用していると考えられる。最近, フローサイトメトリーの技術が進歩し, 細

Table 2. Effect of high dietary fat prostaglandins synthetase inhibitor, indomethacin, on tumor development and cell kinetics of DMBA-induced mammary carcinoma in rats (20 weeks after administration of DMBA)

Groups	No. of samples	Means of initial tumor diameter (mm)	No. of samples	BUdR labeling index	DNA synthesis time (hrs)	Potential doubling time (days)
H.F.	26	16±4 ^{a)}	20	6.7±3.1 ^{a)}	19.8±4.0	14.6±6.0 ^{b)}
H.F.+Ind.	10	25±8	12	11.9±1.9	20.5±5.2	7.2±1.5
L.F.	9	12±2 ^{c)}	5	2.4±0.4 ^{c)}	21.6±8.6	35.0±4.0 ^{d)}
L.F.+Ind.	11	17±5	8	8.4±3.3	19.2±2.4	9.9±3.0

(mean±S.D.)

H.F., High-fat group; H.F.+Ind., Indomethacin-treated high-fat group;
L.F., Low-fat group; L.F.+Ind., Indomethacin-treated low-fat group.
a): $P < 0.01$ in comparing H.F. versus H.F.
b): $P < 0.01$ in comparing H.F. versus L.F.
c): $P < 0.01$ in comparing L.F. versus L.F.+Ind.

Table 3. Effect of high dietary fat and prostaglandins synthetase inhibitor, indomethacin, on receptor contents of DMBA-induced mammary carcinoma in rats (20 weeks after administration of DMBA)

Groups	No. of samples	Receptor contents (fmol/mg protein)	
		ER	PgR
H.F.	12	9.2±4.2	40.9±16.3
H.F.+Ind.	5	10.3±4.7	68.7±38.5
L.F.	5	12.2±5.0	29.6±24.1
L.F.+Ind.	5	12.0±5.0	51.5±10.1

(mean±S.D.)

H.F., High-fat group; H.F.+Ind., Indomethacin-treated high-fat group;
L.F., Low-fat group; L.F.+Ind., Indomethacin-treated low-fat group;
ER, Estrogen receptor; PgR, Progesterone receptor.

胞動態の解析により、予後と関連した乳癌の悪性度が予測されるようになってきているが¹⁷⁾、教室の Kumaki らは、高脂肪食が、DMBA で誘発したラット乳癌の発生と増殖を促進するのみならず、フローサイトメトリーによる細胞動態の解析から、悪性度も増加させると報告しており¹⁸⁾、高脂肪食が、生体内 (in vivo) においても直接的に乳腺腫瘍の悪性度を増加させ、その発生と増殖に影響を及ぼしていることが示唆される。したがって、多価不飽和脂肪酸の腫瘍細胞に対する影響は、免疫学的な機構以外の機構がより重要であると考えられる²⁹⁻³¹⁾。Trosko らは、細胞相互間の情報交換の欠如こそが、腫瘍の発生と増殖において本質的な役割を果たしており、イニシエート (initiate) された細胞の分裂が促進され、さらにプロモーター (promoter) により増殖・伸展し続けるのは、細胞相互間の接合部位における成長を規制するシグナル (signal) の伝達が阻害されているためであると延べている³²⁾。一方、プロスタグランジンの腫瘍発生および増殖に及ぼす作用についても十分解明されているわけではない。Carter らは、雌 Sprague-Dawley 系ラットに 5mg の DMBA を投与し、その3日後より 0.004% のインドメタシンを添加した高脂肪食を与え、高脂肪食による発癌促進作用に対するインドメタシンの効果について検討した。その結果、プロスタグランジン合成酵素阻害剤であるインドメタシンは、高脂肪食による腫瘍の発生及び増殖に対する促進作用を完全に抑制したことから、高脂肪食の作用はプロスタグランジン合成の増加により細胞性免疫が低下したためであると報告している¹⁰⁾。しかし、このような化学発癌物質を用いた乳腺腫瘍発生に対するインドメタシンの効果については、より複雑な機構の関与が考えられる。Abou-El-Ela らは、雌 Sprague-Dawley 系ラットに 10mg の DMBA を投与し、その3週後より 0.004% のインドメタシンを添加した20%コーン油含有高脂肪食を与えたところ、腫瘍内プロスタグランジンの産生は45%に減少したが、高脂肪食による腫瘍発生促進作用は抑制しなかったと報告している³³⁾。高脂肪食の作用に対するインドメタシンの効果は、Carter らの実験¹⁰⁾と Abou-El-Ela らの実験³³⁾でも認められるように、腫瘍の種類やインドメタシンの投与時期により異なっていると考えられる。Ordman らは、マウスを用いた腫瘍発生モデルにおいて、低用量の DMBA はイニシエーション (initiation) のみの作用しか認められないが、高用量の DMBA はイニシエーションとプロモーション (promotion) の両方の作用を有したことから、腫瘍発生モデルにおいて、イニシ

エーションと第一段階のプロモーションのみが腫瘍発生の本質であり、発生した腫瘍の増殖を促進するのは、第二段階のプロモーションであると延べている³⁴⁾。したがって、Abou-El-Ela らの実験³³⁾に用いられた DMBA は高用量 (10mg) であり、0.004% のインドメタシンでは腫瘍発生を抑制しえなかった可能性がある。一方、インドメタシンは、DMBA 誘発乳癌の発生と増殖を、その初期と後期において、抑制することが示されてきた。すなわち、初期の発生段階においては、インドメタシンはプロスタグランジン H の合成を抑制し、細胞性免疫を高めることによると報告され³⁵⁾、また、後期の増殖段階におけるインドメタシンの作用に関しては、生体外において種々の正常ないし乳腺腫瘍細胞の増殖を抑制するという事実により説明されている。しかし、この生体外におけるインドメタシンの作用に関しては、なお議論があり、Bayer らは、0.2% 以下のインドメタシンを加えた培養液でラット肝癌細胞とヒト2倍体線維芽細胞を培養したところ、特に細胞周期の G₁期での成長が抑制されたが、この細胞増殖に対する抑制作用は、インドメタシンの毒性によると報告している³⁶⁾。Fulton らは、インドメタシンの乳腺腫瘍細胞に対する直接的な作用として、生体外における増殖促進作用を報告している³⁷⁾。さらに、Feldman らは、移植可 R3230AC 乳癌を用い、その移植3日前より0.004% のインドメタシンを添加した20%コーン油含有高脂肪食を与えたところ、血中や組織内プロスタグランジン E₂は減少し、高脂肪食による腫瘍発生促進作用も抑制されたが、腫瘍の増殖は抑制されなかったと報告している³⁸⁾。著者の実験において、インドメタシンは腫瘍発生に対する高脂肪食の促進作用を完全に抑制したが、一旦発生してきた腫瘍に対しては、高脂肪食群、低脂肪食群のいずれにおいても、腫瘍の増殖を促進した。すなわち、初発腫瘍の20週後の平均腫瘍径が、高脂肪食群に比較して有意に高脂肪食+インドメタシン群で大きく、このインドメタシン添加の効果は低脂肪食群においても認められ、さらに、生体内におけるインドメタシンの腫瘍増殖に対する促進作用は、インドメタシン添加群における BUdR 標識率 (S 期細胞率) の増加と潜在的倍加時間の短縮によっても明らかとなった。前述したように、イニシエーションと第一段階のプロモーションのみが腫瘍発生と関係し、発生した腫瘍の増殖を促進するのは第二段階のプロモーションであると報告されている³⁹⁾。著者の実験において、第一段階の腫瘍発生に関しては、インドメタシンがプロスタグランジンの合成を阻害することにより抑制作用を示したが、第二

段階の腫瘍増殖に関しては、インドメタシンが促進的に働いたものと考えられる。最近、Tanaka らも、インドメタシンがマウス皮下移植大腸腺癌 Colon 26 の移植後、早期における増殖は抑制したが、進行した状態における増殖に対してはむしろ促進作用を示したと報告している¹⁴⁾。

高脂肪食による内分泌学的な変化が関与しているという報告があるが^{17,18)}、最近では、高脂肪食による増殖促進作用はホルモンレセプターと関係しないとする報告もあり¹⁹⁾、このエストロゲン値に及ぼす高脂肪食の影響にはなお議論が多い。最近、Kumaki らは、雌 Sprague-Dawley 系ラットに、DMBA を用いて乳癌を誘発し、0.5%と20%の脂肪食を摂取させた結果、両群間で腫瘍内エストロゲンレセプター値とプロゲステロンレセプター値に有意差を認めず¹⁹⁾、Ip らも、雌 Sprague-Dawley 系ラットに、DMBA を用いて乳癌を誘発し、5%と20%の脂肪食をそれぞれ摂取させた結果、両群間で血清エストロン値とエストロゲンレセプター値に有意差を認めず、脂肪食は腫瘍のエストロゲンレセプターにほとんど影響を及ぼさないと結論している¹⁶⁾。著者の実験においても、脂肪摂取量の違いやインドメタシンの有無による腫瘍組織内のエストロゲンレセプター値とプロゲステロンレセプター値に有意差を認めなかった。しかし、一般的に、ホルモンレセプター値と乳癌の増殖率とが逆相関の関係にあることが認められており¹⁷⁻²⁰⁾、高脂肪食とホルモンレセプターとの相互関係についてはさらに研究が必要である。

結 論

DMBA 誘発ラット乳癌の発生、増殖、細胞動態並びにホルモンレセプターに及ぼす、高脂肪食並びにプロスタグランジン合成酵素阻害剤であるインドメタシン (0.005%) の影響について検討した。

1. DMBA 投与20週間のラット平均体重の推移は、高脂肪食群 (20%) と低脂肪食群 (0.5%) との間で差はなく、また、インドメタシン添加による影響も認めなかった。

2. 発生した腫瘍は全て腺癌であり、腺腫は認めなかった。また、腫瘍の組織像は、高脂肪食群が低脂肪食群に比較し、さらに、インドメタシン添加群は非添加群に比較し、管腔を形成する細胞の多層化が強く、充実性に増殖する傾向にあり、核分裂像も多く認められた。

3. DMBA 投与20週後の乳癌発生率は高脂肪食群で有意に高く、他の3群間で有意差を認めなかった。

4. DMBA 投与20週後のラット一匹当たりの平均腫瘍個数は、高脂肪食群が低脂肪食群に比較し4倍以上と有意に高く、一方、インドメタシンは高脂肪食群の平均腫瘍個数を50%以下に低下させた。

5. 腫瘍発生までの潜伏期間は、高脂肪食群で有意に短く、他の3群間で差を認めなかった。しかし、DMBA 投与20週後の担癌ラット一匹当たりの平均腫瘍個数では、高脂肪食群が低脂肪食群に比較して多く、さらに、インドメタシン添加群は非添加群に比較して多い傾向を認めた。

6. 初発腫瘍の20週後の平均腫瘍径は、高脂肪食群が低脂肪食群に比較して有意に大きく、さらに、インドメタシン添加群は非添加群に比較して有意に大きかった。

7. BUdR 標識率では、高脂肪食群は低脂肪食に比較して有意に高く、さらに、インドメタシン添加群は非添加群に比較して有意に高かった。

8. DNA 合成時間では4群間に有意差を認めなかったが、潜在的倍加時間では、高脂肪食群は低脂肪食群に比較して有意に短く、さらに、インドメタシン添加群は非添加群に比較して有意に短かった。

9. 腫瘍組織内エストロゲンレセプター値、プロゲステロンレセプター値は、4群間で有意差を認めなかった。

10. 以上より、DMBA 誘発ラット乳癌において、高脂肪食はその発生と増殖をとともに促進し、一方、インドメタシンは腫瘍の発生段階においては、高脂肪食の促進作用を抑制する作用を示したが、一旦発生してきた腫瘍に対してはその増殖を促進する作用を示した。乳癌患者に対する高脂肪食あるいはインドメタシンの投与はその増殖を促進させる可能性がある。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました金沢大学第二外科宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接御指導頂きました金沢大学手術部野口昌邦助教授に深謝致します。さらに終始御助言頂きました中検病理部水上勇治講師に深謝するとともに本研究に御協力頂きました第二外科学教室の諸先生に心から感謝致します。

本論文の要旨は 12th BREAST CANCER symposium (1989, San Antonio) 第49回日本癌学会総会 (1990, 札幌)、および 15th International Cancer Congress (1990, Hamburg) において発表した。

文 献

- 1) Wyder, E. L., Kajitani, T., Kuno, J., Lucas, J. C., Palo, A. D. & Farrow, J.: A comparison of survival rates between American and Japanese

- patients with breast cancer. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **117**, 196-200 (1963).
- 2) **Nemoto, T., Tominaga, T., Chamberlain, A., Iwasa, Z., Koyama, H., Hama, M., Bross, I. & Dao, T.**: Differences in breast cancer between Japan and the United States. *J.N.C.I.*, **58**, 193-197 (1977).
 - 3) **Morrison, A. S., Black, M. M., Lowe, C. R., MacMahon, B. & Yuas, S.**: some international difference in history and survival in breast cancer. *Int. J. Cancer*, **11**, 261-267 (1973).
 - 4) **Hirayama, T.**: Epidemiology of breast cancer with special reference to the role of diet. *Prev. Med.*, **7**, 173-195 (1978).
 - 5) **Wynder, E. L., Rose, D. P. & Cohen, L. A.**: Diet and breast cancer in causation and therapy. *Cancer*, **58**, 1804-1813 (1986).
 - 6) **Hill, P. & Wynder, E. L.**: Comparison of mammary adipose fatty acid composition in Japanese and American breast cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **23**, 407-410 (1987).
 - 7) **Carrol, K. K. & Knor, H. T.**: Effects of dietary fat and dose level of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene on mammary tumor incidence in rats. *Cancer Res.*, **30**, 2260-2264 (1970).
 - 8) **Hopkin, G. J., West, C. E. & Hard, C. C.**: Effect of dietary fats on the incidence of 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene-induced tumors in rats. *Lipids.*, **11**, 328-333 (1976).
 - 9) **Ip, C.**: Ability of dietary fat to overcome the resistance of mature female rats to 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res.*, **40**, 2785-2789 (1980).
 - 10) **Carter, C. A., Miholland, R. J., Sheaa, W. & Ip, M. M.**: Effect of the prostaglandin synthetase inhibitor indomethacin on 7, 12-dimethylbenz [a]anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats fed different levels of fat. *Cancer Res.*, **43**, 3559-3562 (1983).
 - 11) **Brunda, M. J., Herberman, R. B. & Holden, H. T.**: Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. *J. Immunol.*, **124**, 2682-2687 (1980).
 - 12) **Kidwell, w. R., Monaco, M. e., Wicha, W. S. & Smith, G. S.**: Unsaturated fatty acid requirements for growth and survival of a rat mammary tumor cell line. *Cancer Res.*, **38**, 4091-4100 (1978).
 - 13) **Wicha, M. S., Liotta, L. A. & Kidwell, W. R.**: Effects of free fatty acids on the growth of normal and neoplastic rat mammary epithelial cells. *Cancer Res.*, **39**, 426-435 (1979).
 - 14) **Tanaka, Y., Tanaka, T. & Ishitsuka, H.**: Antitumor activity of indomethacin in mice bearing advanced colon 26 carcinoma comoaded with early transplant. *Cancer Res.*, **49**, 5935-5939 (1989).
 - 15) **Kumaki, T. & Noguchi, M.**: effects of high dietary fat on the total DNA and receptor contents in rats with 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary carcinoma. *Oncology*, **47**, 352-358 (1990).
 - 16) **Ip, C. & Ip, M. M.**: Serum estrogens and estrogen responsiveness in 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced mammary tumors as influenced by dietary fat. *J.N.C.I.*, **66**, 291-295 (1981).
 - 17) **McGuire, W. L. & Dressler, L. G.**: Emerging impact of flow cytometry in predicting recurrence and survival in breast cancer patients. *J.N.C.I.*, **75**, 405-410 (1985).
 - 18) **Meyer, J. S., Rao, B. R., Stevens, S. C. & White, W. L.**: Low incidence of estrogen receptor in breast carcinomas with rapid rates of cellular replication. *Cancer*, **40**, 2290-2298 (1978).
 - 19) **Meyer, J. S. & Lee, J.**: Relationship of S-phase fraction of breast carcinoma in relapse to duration of remission, estrogen receptor content, therapeutic responsiveness, and duration of survival. *Cancer Res.*, **40**, 1890-1896 (1980).
 - 20) **Moran, R., Black, M., and Alpert, L.**: Correlation of cellcycle kinetics, hormone receptors, histopathology, and nodal status in human breast cancer. *Cancer*, **54**, 1586-1590 (1984).
 - 21) **Dressler, L. G., Seamer, L. c., Owens, M. A., Clark, G. M., and McGuire, W. L.**: DNA flow cytometry and prognostic factors in 1331 frozen breast cancer specimen. *Cancer*, **61**, 420-427 (1988).
 - 22) **Kute, T. E., Muss, H. B., Anderson, D., Crumb, K., Miller, B., Burns, D., and Dube, L. A.**: Relationship of steroid recetor, cell kinetics, and clinical status in patients with breast cancer. *Cancer Res.*, **41**, 3524-3529 (1981).

- 23) **McDivitt, R. W., Stone, K. R., Craig, R. B., and Meyer, J. S.**: A comparison of human breast cancer cell kinetics measured by flow cytometry and thymidine labeling. *Lab. Invest.*, **52**, 287-291 (1985).
- 24) **McDivitt, R. W., Stone, K. R., Craig, R. B., Palmer, J. O., Meyer, J. S., and Bauer, W. C.**: A proposed classification of breast cancer based on kinetic information -Derived from a comparison of risk factors in 168 primary operable breast cancers. *Cancer*, **57**: factors in 168 primary operable breast cancers. *Cancer*, **57**, 269-276 (1986).
- 25) **Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M. G. & Gray, J. W.**: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 5573-5577 (1983).
- 26) **Begg, A. C., McNally, N. J., Shrieve, D. C. & Karcher, M.**: A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample. *Cytometry*, **6**, 620-626 (1985).
- 27) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.**: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **19**, 265-275 (1951).
- 28) **Scatchard, G.**: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY. Acad. Sci.*, **51**, 660-672 (1949).
- 29) **Aylsworth, C. F., Jone, C., Trosco, J. E., Meites, J. & Welsch, C. W.**: Promotion of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis by high dietary fat in the rat: possible role of intercellular communication. *J.N.C.I.*, **72**, 637-645 (1984).
- 30) **Carroll, K. K. & Hopkins, G. J.**: Dietary polyunsaturated fat versus saturated fat in relation to mammary carcinogenesis. *Lipids*, **14**, 155-158 (1979).
- 31) **Hopkins, G. J., Hard, G. C. & West, C. E.**: Carcinogenesis induced by 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in C3H-AvylfB mice: Influence of different dietary fats. *J.N.C.I.*, **60**, 849-853 (1978).
- 32) **Trosko, J. E., Yotti, L. P., Warren, S. T., Tsushimoto, G., and Chang, C. C.**: Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters; *In* E. Hecker, N. E. Fusenig, W. Kunz, F. Marks & H. W. Thielmann (eds.), *Carcinogenesis-a comprehensive survey*, vol.7, *Cocarcinogenesis and Biological Effects of Tumor Promoters*, p565-585, Raven Press, New York 1982.
- 33) **Abou-El-Ela, S. H., Prasse, K. W., Farrell, R. L., Carroll, R. W., Wade, A. E. & Bunce, O. R.**: Effects of d, 1-2-difluoromethyl-ornithine and indomethacin on mammary tumor promotion in rats fed high n-3 and/or n-6 fat diets. *Cancer Res.*, **49**, 1434-1440 (1989).
- 34) **Ordman, A. B., Cleaveland, J. S. & Boutwell, R. K.**: 12-0-tetra-decanoylphorbol-13-acetate promotes tumors prior to initiation in two-stage promotion. *Cancer Lett.*, **29**, 79-84 (1985).
- 35) **Mccormick, D. L., Madigan, M. J. & Moon, R. C.**: Moduration of rat mammary carcinogenesis by indomethacin. *Cancer Res.*, **45**, 1803-1808 (1985).
- 36) **Bayer, B. M., Kruth, H. S., Vaughan, M. & Beaven, M. A.**: Arrest of cultured cell in the G₁ phase of the cell cycle by indomethacin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **210**, 106-111 (1979).
- 37) **Fulton, A. M.**: Effect of indomethacin on the growth of cultured mammary tumors. *Int. J. Cancer*, **33**, 375-379 (1984).
- 38) **Feldman, J. M., and Hilf, R.**: Failure of indomethacin to inhibit growth of R3230AC mammary tumor in rats. *J.N.C.L.* **75**, 751-756 (1985).
- 39) **Ip, c., Yip, P. & Bernardis, L. L.**: Role of prolactin in the promotion of dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors by dietary fat. *Cancer Res.*, **40**, 374-378 (1980).

Effects of High Dietary Fat and Prostaglandin Synthetase Inhibitor, Indomethacin, on Tumorigenesis, Development, Cell Kinetics and Receptor Contents of 7, 12-Dimethylbenz [a]-anthracene-induced Mammary Carcinoma in Sprague-Dawley Rats Takao Taniya, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **100**, 411—423 (1991)

Key words DMBA-induced mammary carcinoma, high dietary fat, indomethacin, flow cytometry, cell kinetics

Abstract

The effects of high dietary fat and indomethacin on the tumorigenesis, development, cell kinetics and hormone receptor contents of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma were examined in female Sprague-Dawley rats. The rats were fed either with a high fat diet (20% corn oil) or low fat diet (0.5% corn oil) with or without 0.005% indomethacin after a single intragastric administration of 5 mg DMBA. The results demonstrated that indomethacin abrogated completely the stimulatory effect of high dietary fat on tumorigenesis, as represented by a decreased tumor incidence, a decreased number of tumors per group and an increased latency. Contrary to what was expected, however, it promoted the tumor development in either the high-or low-fat diet group, as evidenced by an increased tumor size per tumor-bearing rat of each group, an increased BUdR-labeling index and a decreased potential doubling time of the tumor. But the difference in either the ER or PgR content of tumor was not statistically significant between the groups. It was therefore, concluded that indomethacin reduced significantly the tumorigenesis in the high-fat diet group, but it promoted significantly the tumor development in both the high-or low fat diet groups.