

# イヌ膀胱の N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) による発癌過程とその尿中代謝物に関する基礎的研究

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 守殿貞夫教授)

森下 真一, 濱見 学, 守殿 貞夫

## AN EXPERIMENTAL STUDY ON BLADDER CARCINOGENESIS IN DOGS BY N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL) NITROSAMINE (BBN) AND ITS URINARY METABOLITES

Shin-ichi MORISHITA, Gaku HAMAMI and Sadao KAMIDONO

*From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine*

*(Director : Prof. S. Kamidono)*

N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) was administered to beagle dogs to examine the urinary metabolites. After extraction and purification of the urine sample, the urinary metabolites were identified by gas-chromatography mass-spectrometry and measured using a gas chromatograph equipped with a thermal energy analyzer (GC-TEA). Five N-nitroso-compounds (N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine (BCPN), N-butyl-N-(2-hydroxy-3-carboxypropyl)-nitrosamine (BHCPN), N-butyl-N-(carboxymethyl)-nitrosamine (BCMN), N-butyl-N-(2-oxopropyl) nitrosamine (BOPN) and BBN-glucuronide) were detected and identified by comparison with mass spectra of synthetic specimens.

In the quantitative analysis by GC-TEA, BCMN>BHCPN>BCPN were larger part than BOPN and BBN-glucuronide. In early experimental period (0~25 wks) administered BBN (600 mg/day) to two dogs, small tumor was recognized in the urinary bladder of one dog earlier than the other. The former dog excreted larger amounts of BCPN in the urine than the latter. In late experimental period (100 wks~) administered BBN (400 mg/day) to five dogs, the dog that was found initial tumor earliest (103 wk) excreted the largest amounts of BCPN in the urine. Therefore, the excretion of BCPN had correlated with the carcinogenesis.

(Acta Urol. Jpn. 35: 27-38, 1989)

**Key words:** BBN, BCPN, Urinary bladder carcinogenesis

### 緒 言

ヒト膀胱癌のなかには、古くから職業性膀胱癌の存在が指摘され  $\beta$ -naphthylamine, benzidine, 4-aminodiphenyl および 4-nitrodiphenyl の4物質がその主な癌原物質とされている<sup>1)</sup>。また実験膀胱癌の研究成績からヒト膀胱癌の成因には化学発癌の占める割合が多いと推測されている。

ニトロ化合物の1種であるニトロサミンは、種々の動物実験にて肝をはじめ食道、膀胱に発癌性を有することが明らかにされ、ヒトの生活環境中に多量ではないものの広範囲に分布し、環境中で容易に産成されることからヒト膀胱癌の発生との関連が疑われてい

る<sup>2)</sup>。実験発癌剤としての N-butyl-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (以下 BBN と略す) は膀胱を標的臓器とする最も多く用いられている N-ニトロサミンである。この BBN によって作られたラット膀胱癌の発癌条件および病理学的検討成績については、BBN 投与量および投与期間と膀胱粘膜の異型度との関係などの報告<sup>3)</sup>がある。ラットやマウスにおける BBN およびその構造類似体すなわち dialkyl nitrosamine の生体内経路も確立されている<sup>4-6)</sup> (Fig. 1)。しかし、イヌにおける BBN 発癌膀胱腫瘍と BBN の代謝に関する詳細な研究は未だ報告されていない。そこでわれわれはビーグル犬を用いてイヌにおける BBN の種々の尿中代謝ニトロ化合物を gas-chromatography お

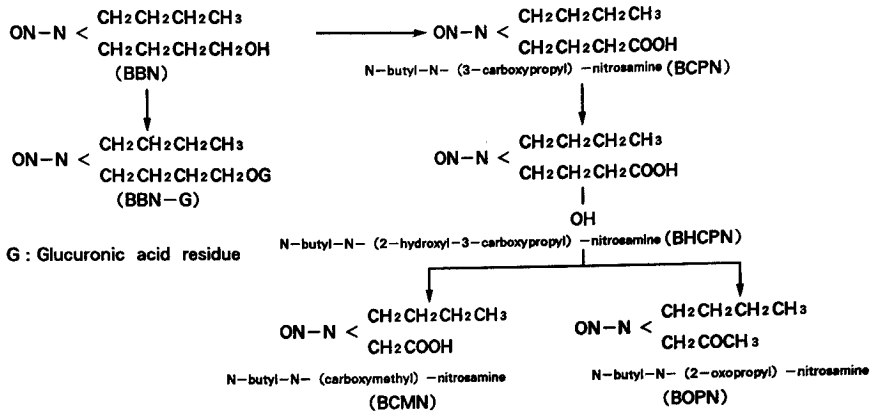


Fig. 1. Metabolism of BBN in rats and mice

よび新しく開発された thermal energy analyzer (以下 GC-TEA と略す) を用いて BBN の尿中代謝物を経目的に定量し、その尿中排泄量と腫瘍発生時期との関連を検討したので報告する。

対象および方法

実験 I : 実験初期における尿中 BBN 代謝物に関する研究

(1) 実験対象

使用動物は体重 11~13 kg (平均 11.6 kg) の 2.5 歳雌ビーグル犬 4 頭 (うち 2 頭はコントロール) で個別ケージにて飼育し飼料はオリエンタル BS 300 g/日を与えた。

(2) 使用薬剤

使用発癌剤は BBN (東京化成, 東京) で、それを Tween 80 (片山化学, 東京) 1 滴とともにカプセル (エランコ, 東京) につめ、経口投与した。

定性、定量分析のための BCPN (N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine), BHCPN (N-butyl-N-(2-hydroxy-3-carboxypropyl) nitrosamine), BCMN (N-butyl-N-(carboxymethyl)-nitrosamine) および BOPN (N-butyl-N-(2-oxopropyl) nitrosamine) の各合成標品は、東京生化研、鈴木恵真子博士より供与を受けた。

(3) BBN 投与方法

雌ビーグル犬 2 頭に BBN 600 mg/日 × 6 日/週を経口投与し、1 日/週の休薬日をもうけた。投与開始から 25 週目までは、5 週おきに休薬日の翌日の全尿を代謝ケージにて採取し、これらを BBN の投与開始から 25 週までの早期の尿中代謝物とした。ビーグル犬は採尿日も飼料摂取および自由飲水させた。これら実験犬は、幼犬時に会陰切開を加え外尿道口を露出し、ほぼ 5 週おきに 30 週まで、全皮下 (GOF) に経尿道的に膀胱粘膜の観察と cold punch biopsy を施行した。

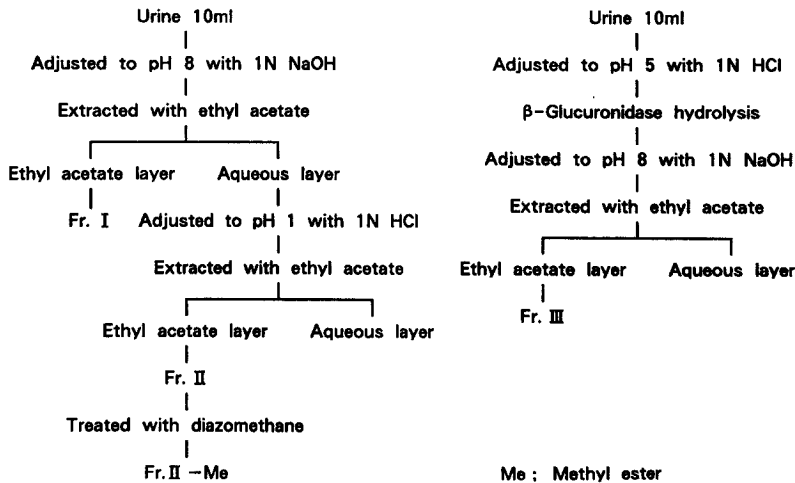


Fig. 2. Extraction of urinary metabolites of BBN

コントロール犬も同条件にて飼育, 観察した。

#### (4) 分析

##### [1] 尿中ニトロ化合物の抽出

岡田ら<sup>4,5)</sup>の方法に準じ Fig. 2 のごとく, 1 日蓄尿中の 10 ml を検体とした。検体は 1 N NaOH により pH 8 に調整され, 酢酸エチル 10 ml を用いて分液ロートにて 3 回液々分配法により抽出され, これを Fr. I とした。次に Fr. I 抽出後の尿を 1 N HCl にて pH 1 に調整し, 酢酸エチル 10 ml を用いて同様に Fr. II を抽出した。この Fr. II にそのつど調整されたジアゾメタン ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) を加え, メチルエステル誘導体とした (Fr. II-Me)。

一方, 別の尿検体 10 ml を pH 5 に調整したものに,  $\beta$ -glucuronidase (bovine, フナコジ) 13,000 Fishman units/ml を 1 ml 加えたものを 37°C で 12 時間インキュベートし, それを Fr. I と同様に 1 N NaOH にて pH 8 として抽出し, Fr. III とした。

##### [2] 尿中ニトロ化合物の定性, 定量分析

得られた各 Fr. に対してまず定性分析のために GC-TEA を用いて選択的にそれらに含まれるニトロ化合物のピークを確認した。さらに gas-chromatography mass-spectrometry (以下 GC/MS と略す) を用いて合成標品と比較することにより分子量の上からニトロ化合物を同定した。その上で定量分析のために再度 GC-TEA で確認されたピーク高と合成標品のピーク高とを比較することにより検体中に含まれる BBN 代謝ニトロ化合物を算出した。GC-TEA による分析法は, まず, 酢酸エチルにより抽出された多くの物質の混合する各 Fr. をマイクロシリンジにて GC に注入し, 高沸点のニトロ化合物を分離し, GC とオンラインした TEA でニトロ化合物のみを選択的に保持時間の差によるピークとして高感度に識別し, 検出するものである。TEA の原理は, まず, GC により分離された N-ニトロ化合物の N-NO 部分を加熱触媒管 (pyrolyzer) の中で切断し, その後  $\text{O}_3$  と衝突した NO が, 励起された  $\text{N}_2\text{O}$  (ニトロシルラジカル) となる。この  $\text{N}_2\text{O}$  が基底状態にもどるとき 600~2,600 nm の発生スペクトルが得られ, これをホトマル (光電子増倍管) で検出することにより各 Fr. 中に含まれるニトロ化合物が測定される。GC-TEA の使用条件は, GC-7A (島津社製) に TEA 543 (Thermo Electron 社製) をオンラインし, 前者のカラムは 5% Thermo 1,000  $\phi 3$  mm  $\times$  1 m を 190°C (恒温) で (BHCPN のみは 230°C), キャリアガスを  $\text{N}_2$  (流量 40 ml/分) とした。後者は, py-

rolyzer 温度 540°C, cold trap 温度  $-80^\circ\text{C}$ , vacuum 2.1 mmHg とした。

GC-MS は JMS-DS 300 (日本電子製) に JMA 5,000 をオンラインし,  $\phi 0.53$   $\mu\text{m} \times 15$  m メガボアカラムを 150~230°C (昇温 8°C/分) で加温し, キャリアガスを He (流量 30 ml/分) とした。質量分析部の条件は, イオン化室温度 250°C, イオン化電流 300  $\mu\text{A}$ , イオン化電圧 70 eV とした。

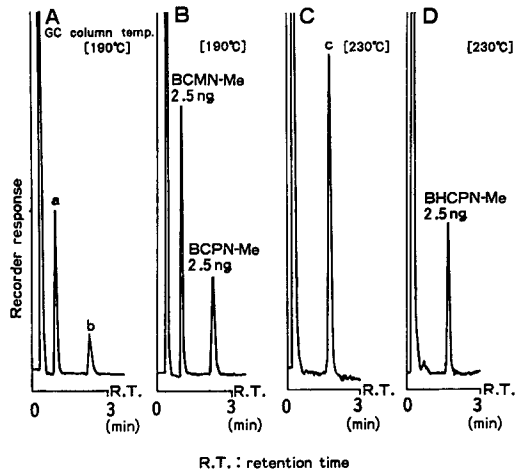


Fig. 3. Chromatogram (CG) of GC-TEA. A: CG of Fr. II-Me from sample, B: CG of BCMN-Me and BCPN-Me as a standard, C: CG of Fr. II-Me from sample, D: CG of BHCPN-Me as a standard.

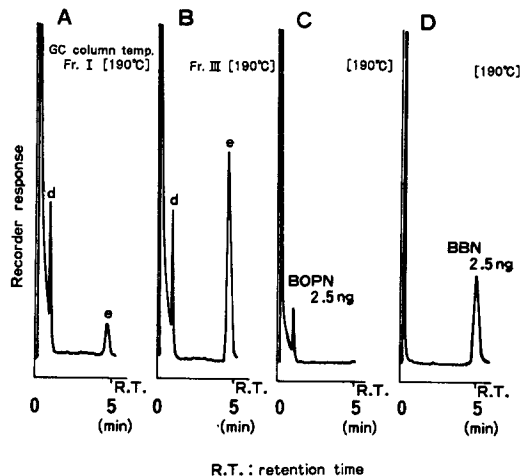


Fig. 4. Chromatogram (CG) of GC-TEA. A: CG of Fr. I from sample, B: CG of Fr. III from sample, C: CG of BOPN as a standard, D: CG of BBN as a standard.

実験Ⅱ：実験後期(103~164週)における尿中 BBN 代謝物に関する研究

幼犬時より BBN 400 mg/日×6日/週を実験Ⅰと同様に経口投与して発癌実験中であるビーグル成犬5頭(雄3頭, 雌2頭)の投与103週から164週までの約10週おきの1日蓄尿を実験Ⅰと同様に経時的に採取し, BBN の長期間投与における尿中代謝物の検討対象とした。

雄犬3頭は, 197週目に尿道を陰茎骨より近位部に

て切断しその近位端を会陰部皮膚と吻合し尿道を形成, 17 Fr. 膀胱鏡外套を挿入できるようにし, ほぼ10週おきに164週まで実験Ⅰと同様に膀胱粘膜を観察した。

## 結 果

実験Ⅰ：実験初期における尿中 BBN 代謝物に関する研究

[1] GC-TEA による定性分析

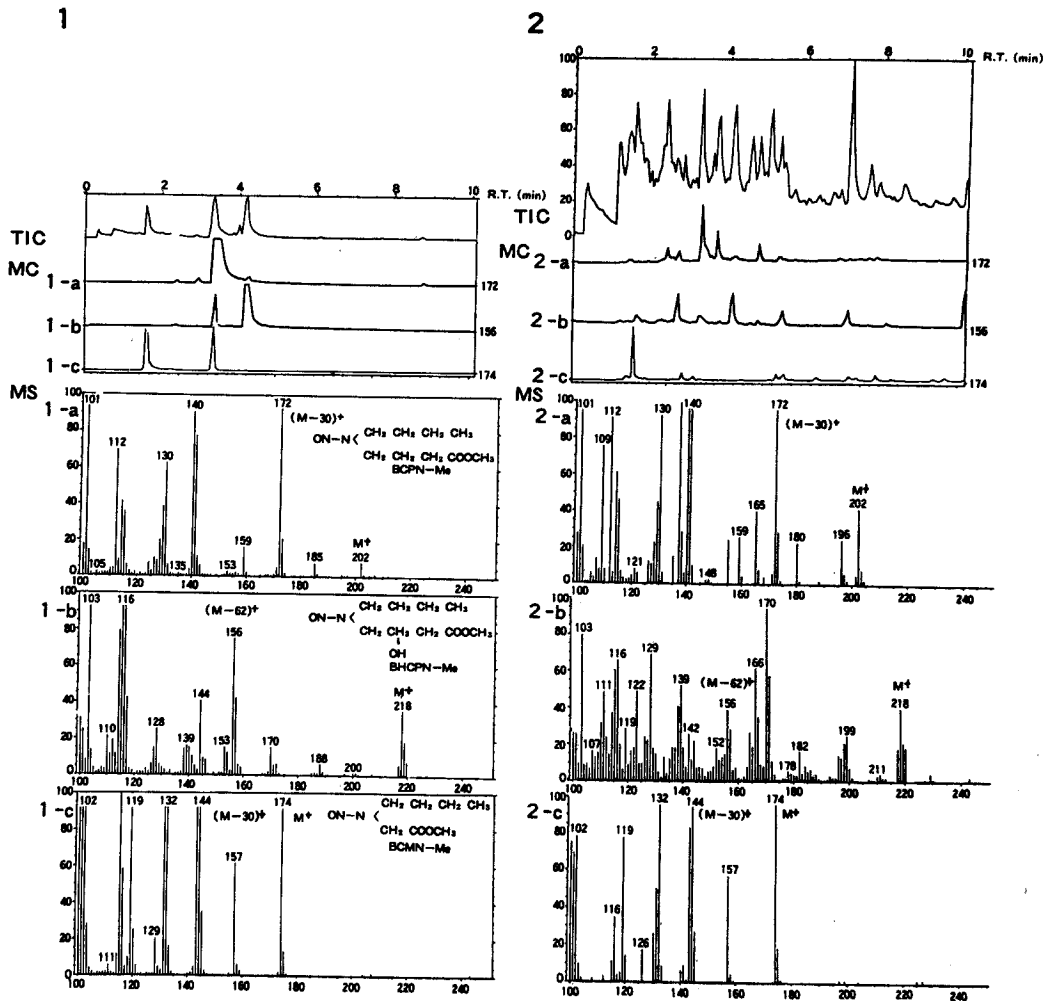


Fig. 5. Total ion concentration, mass chromatograms and mass spectra of standard and sample. 1: standard (a; BCPN-Me, b; BHCNP-Me, c; BCMN-Me), 2: sample (Fr. II-Me). 1-a MC tracing  $m/z$  172 ion, 1-b MC tracing  $m/z$  156 ion and 1-c MC  $m/z$  174 ion show standard compounds (TIC). 1-a and 1-c MS show intensive spectra,  $m/z$  172 and 144 respectively. These spectra, resulting from loss of NO from the primary molecular ions, are often used as an indicator for the presence of a nitrosamine. The mass spectra,  $m/z$  202 and 174 of the primary molecular ions ( $M^+$ ) of BCPN-Me and BCMN-Me are less intensive than the spectra of ( $M-NO$ ) $^+$  ions. 2-a, b, c MC tracing  $m/z$  172, 156 and 174 show the peaks at the same retention time of 1-a, b, c respectively. 2-a, b, c MS show many spectra of the same fragment ions.

Fr. II のメチル誘導体 Fr. II-Me の GC-TEA によるクロマトグラムでカラム温度 190°C における検体 (Fig. 3-A) の保持時間 1.0 分の a および 2.2 分の b のピークは, それぞれ合成標品 (Fig. 3-B) の BCNN-Me および BCPN-Me のピークの保持時間と一致した. またカラム温度 230°C の条件における検体の保持時間 1.8 分のピーク c (Fig. 3-C) と合成標品の BHCPN-Me のピーク (Fig. 3-D) の保持時間が一致した.

次に Fr. I および Fr. III の GC-TEA によるクロマトグラムのカラム温度 190°C における検体 (Fig. 4-A, B) の保持時間 1.0 分の d および 4.7 分の e のピークはそれぞれ合成標品 (Fig. 4-C, D) の BOPN および BBN のピークの保持時間と一致した. 検体より抽出された Fr. I および Fr. III を比較すると, BOPN (d) のピーク高は両 Fr. で一致をみるのに対し, BBN (e) のピーク高に関しては Fr. III (Fig. 4-B) では Fr. I (Fig. 4-A) よりもピークが高かった. これは Fr. III ではグルクロンダーゼ処理された BBN が遊離の BBN に付加されることによると推測

された. Fr. I, II, III とも 100~300°C の範囲でニトロソ化合物のピーク昇温分析によりスクリーニングした結果, それらには BBN と 4 種のニトロソ化合物以外にピークを認めなかった. 以上より Fr. I および III より BBN, BOPN が, Fr. II より BCMN, BCPN および BHCPN が検出された. 次に GC/MS によりそれらを同定した.

[2] GC-MS による同定

GC-TEA により確認された 5 種類のニトロソ化合物を GC/MS で同定した. 合成標品 BCPN-Me, BHCPN-Me および BCMN-Me の mass-chromatogram (以下 MC と略す) の保持時間はそれぞれ 3.3 分, 4.2 分, 1.6 分で BCPN-Me, BHCPN-Me, BCMN-Me の 3 者の混合物の total ion concentration (以下 TIC と略す) ピークと一致した (Fig. 5-1). Fig. 5-1-a と 1-c の mass-spectrum (以下 MS と略す) ではそれぞれの分子イオンピーク  $M^+$  としてのピーク質量数  $m/z$  ( $m$  はイオンの質量,  $z$  はイオンの電荷数で通常は  $z=1$ ) 202 と 174 を認める. その

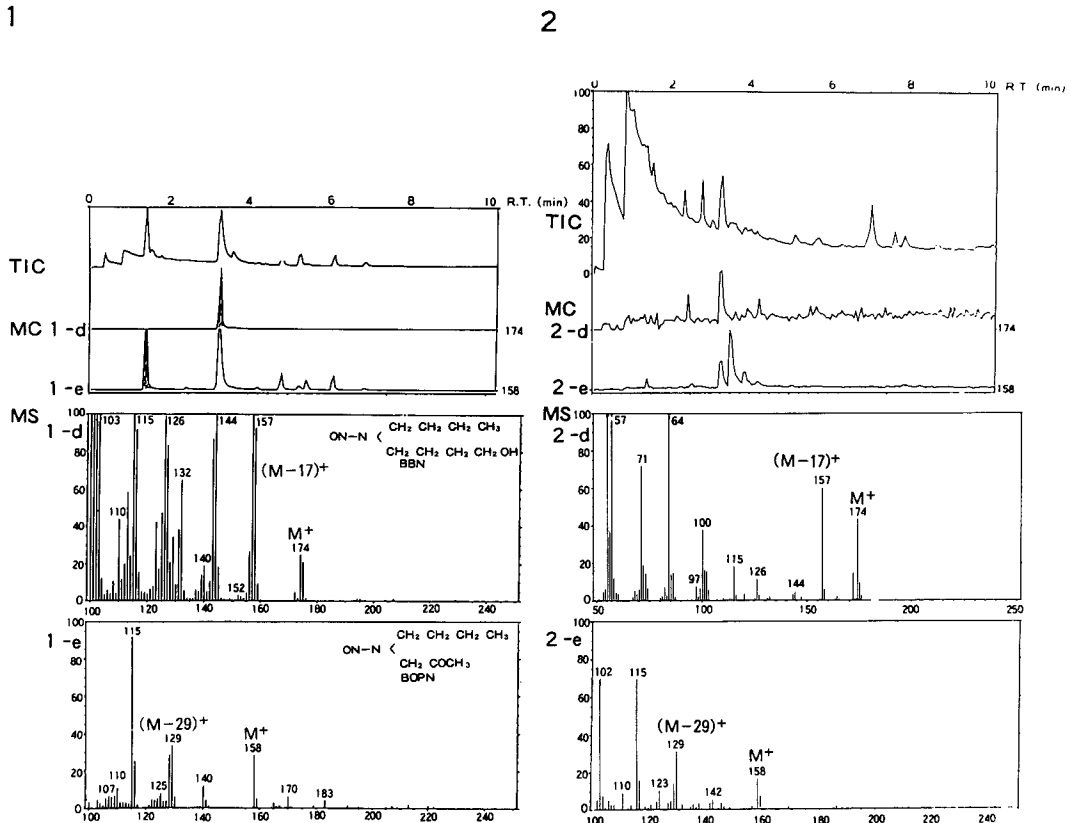


Fig. 6. Total ion concentration, mass chromatograms and mass spectra of standard and sample. 1: standard (d; BOPN, e; BBN), 2: sample (Fr. III).

分子イオンピーク  $M^+$  が開裂してできたフラグメントピークのうちでニトロ化合物に特徴的に認められるとされている<sup>7)</sup>  $(M-NO)^+$  すなわち  $(M-30)^+$  に相当するイオンがそれぞれ172と144に観測され、1-a および 1-c は BCPN および BCMN のメチル誘導体と確認された。Fig. 5-1-b では  $m/z$  218の  $M^+$  と156の  $(M-NO, CH_3OH)^+$  に相当するイオンが観測され BHCN のメチル誘導体と確認された。それに対して検体 (Fig. 5-2) には Fr. II-Me の TIC, MC, MS が示されている。ニトロ化合物以外の多くのピークが TIC に認められるが Fig. 5-2-a, 2-b, 2-c の TIC, MC にはそれぞれ合成標品 (Fig. 5-1) の 1-a, 1-b, 1-c の保持時間と一致したピークが認められ、さらに MS でも 2-a, 2-b, 2-c の開裂様式はそれぞれ 1-a, 1-b, 1-c のそれに一致し、2-a, 2-b, 2-c はそれぞれ BCPN, BHCN, BCMN と同定された。BBN と BOPN の合成標品の GC/MS 分析 (Fig. 6-1) では、1-d および 1-e の MC の保持時間は、それぞれ3.3分、1.5分で TIC のピークと一致した。1-d の MS では、 $m/z$  174の  $M^+$  と157の  $(M-OH)^+$  に相当するイオンが観測され BBN と確認された。1-e の MS では、 $m/z$  158の  $M^+$  と129の  $(M-CH_2CH_3)^+$  に相当するイオンが観測され BOPN と確認された。それに対して Fig. 6-2 には Fr. III の TIC, MC, MS が示されている。2-d, 2-e の TIC, MC にはそれぞれ合成標品 (Fig. 6-1) の 1-d, 1-e の保持時間と一致したピークが認められ、さらに MS でも 2-d, 2-e の開裂様式はそれぞれ 1-d, 1-e のそれに一致し、2-d, 2-e はそれぞれ BBN, BOPN と同定された。以上のようにイヌ尿中においてもラットをはじめ他動物と同様に<sup>4,8)</sup> 投与物質の BBN 以下 BCPN, BHCN, BCMN, BOPN の各代謝ニトロ化合物が確認された。なお、コントロール (無処理) のイヌの尿より抽出された Fr. II-Me および III の TIC, MC およ

び MS では、それぞれ上述の5種のニトロ化合物の特徴的な TIC, MC のピークおよび MS パターンは観測されなかった。

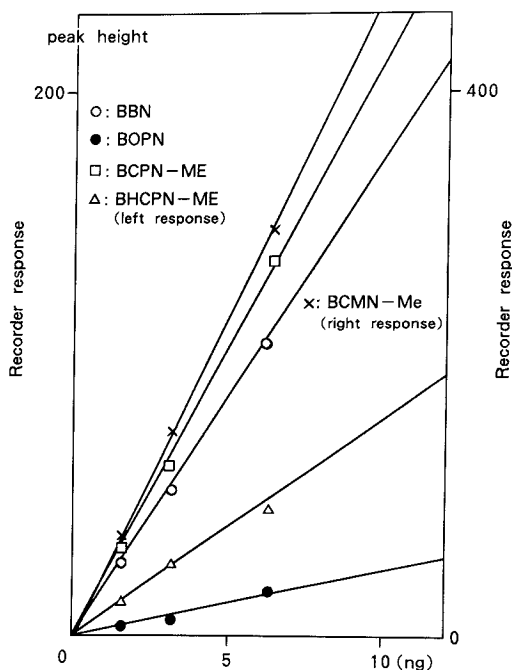


Fig. 7. Standard curves by GC-TEA

### [3] GC-TEA による定量

BBN とその代謝物である BCPN, BHCN, BCMN, BOPN の各ニトロ化合物の濃度と GC-TEA によるピーク値との関係は、1.0~6.0 ng/ml の範囲で直線関係が得られた (Fig. 7)。この標準曲線をもとに検体中に含まれる各ニトロ化合物の5週未満から25週までの5週おきの各代謝物を定量した (Table 1)。1日/週の休業日の蓄尿からは BBN と BCPN, BHCN, BCMN および BOPN の各代謝ニトロ化合物はまったく検出されないことが確認さ

Table 1. Nitroso-compounds in dog A and B's urine (Experiment I)

Nitroso-compounds (mg)	Dog	<5w	5w	10w	15w	20w	25w
BCMn	A	201.6	159.0	120.9	75.4	119.0	99.2
	B	143.8	154.1	81.2	45.5	59.8	110.8
BHCN	A	182.2	128.7	101.4	67.6	127.8	124.0
	B	136.3	92.0	64.4	42.0	49.4	109.2
BCPN	A	14.4	48.0	46.8	39.0	45.5	52.7
	B	67.5	55.2	42.0	28.0	23.4	52.9
BBN+BBN-G	A	2.4	2.9	4.4	4.6	0.6	8.9
	B	2.1	1.0	3.4	1.4	0.8	1.2
BOPN	A	1.8	1.1	0.6	0.5	1.2	1.3
	B	1.4	1.6	0.4	0.2	0.7	1.5

れている。なお、原則として1日の全尿を蓄尿することにしたが、常に正確な1日尿量が得られたとはいえなかったためその一部をサンプリングすることにした。よって、5種のニトロソ化合物すなわち、BBN, BCPN, BHCPN, BCMN, BOPN の各成分を構成比として表示することとし、以下の解析を行った。実験犬2頭をA, Bとすると、イヌAおよびBの各ニトロソ化合物全体の5週おきの構成比 (Fig. 8-1) をみると、両犬とも5週未満では BCMN と BHCPN が多く、次いで BCPN の順であった。これら Fr. II に含まれるニトロソ化合物が BBN の代謝物の90%以上を占め、残りは Fr. I および III に含まれる代謝を受けなかった BBN とグルクロン酸抱合を受けた BBN-G および BOPN である。そしてこれらの構成比は25週目まで大きく変わっていない。これらのニトロソ化合物のうち BCPN が膀胱発癌に深く関係することが従来より報告されており<sup>4,9)</sup>、本実験でもこのBCPNに着目するとイヌBはイヌAに比べ全般的に、BCPN 排泄量の比が大きい傾向にある (Fig. 8-2)。両犬とも少量しか検出されなかった、Fr. I および III に含まれる代謝を受けなかった BBN は微量で、

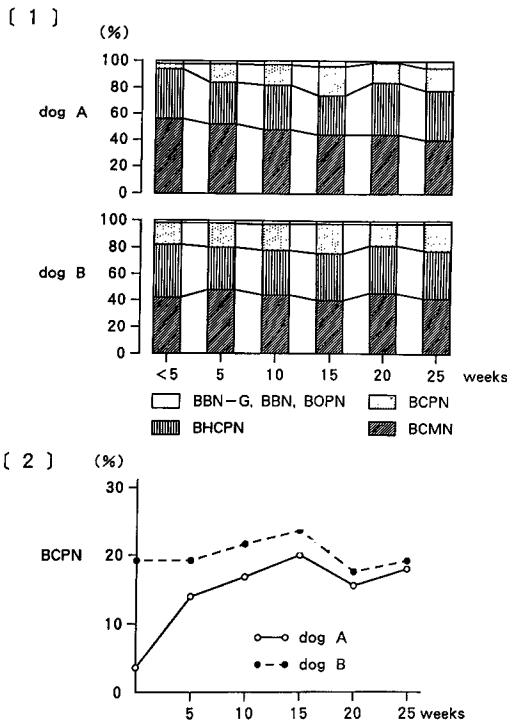


Fig. 8. Composition rate of metabolites in urine of dogs treated with BBN (Exp. I). [1]: BBN-G, BBN, BOPN, BCPN, BHCPN and BCMN, [2] BCPN

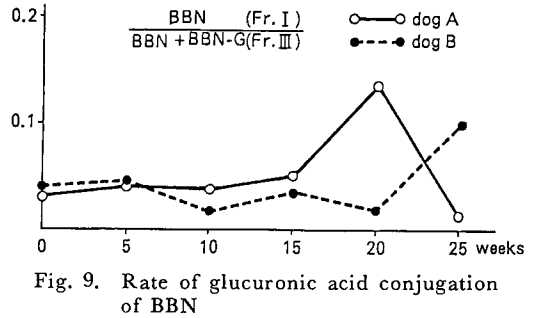


Fig. 9. Rate of glucuronic acid conjugation of BBN

かつ大部分が BBN-G であり、これらのうち、両犬間の非抱合体の経時的変化には著明な差は認められなかった (Fig. 9).

[4] 形態学的観察

膀胱粘膜の経時的変化は、内視鏡観察では2頭の実験犬のうちイヌBでは20週目に膀胱頂部に限局した数個の小腫瘍が認められ、他部位粘膜には発赤、腫瘍などの異常はなかった。その腫瘍の cold punch biopsy による病理学的所見では、内反傾向を示す腫瘍病巣が観察されたが異型性は軽度である (Fig. 10)。それに対し、イヌAでは20週目には膀胱粘膜に何らの肉眼的異常も認められず、30週目に初めてイヌBと同様の小腫瘍が頂部に認められた。これらの初期病変は、BBN の投与を中止すれば可逆的に腫瘍が消失するマウスにおける単純性過形成<sup>10)</sup>に相当するものとかがえられた。

実験 II : 実験後期における尿中 BBN 代謝物に関する研究

5頭のイヌの103週目から164週目までの尿中ニトロソ化合物を実験 I と同様の方法で抽出し、定性および定量したところ BCPN, BHCPN, BCMN, BOPN および BBN-G の各代謝物を認めたがその観察期間中、各犬とも定量値にほとんど変動はなく、その平均値をみると (Table 2), BBN-G, BBN, BOPN は少なく、実験 I と同様に5%以下である。BCMN はもっとも多く50%前後を占め、BCPN は実験 I と比較するとあきらかに多く、BHCPN の割合がより少なくなっている。すなわち長期投与では投与早期とくらべ BCMN および BCPN の割合が増加し、BHCPN の割合が減少していた。5頭のイヌの発癌時期に差がみられたが、もっとも早く103週目において腫瘍の認められたイヌCでは、次第に乳頭状および非乳頭状腫瘍が多発し、120週目頃より肉眼的血尿および頻尿などの症状もみられた。その腫瘍部分の組織所見は transitional cell carcinoma, grade 3 であった (Fig. 11, A)。もっとも遅く164週目に膀胱頂部に肉眼的腫

Table 2. Composition rate of nitroso-compounds in the five dogs' urine (Experiment II)

Nitroso-compounds (%)	Dog	C	D	E	F	G
BCMN		47.9	49.5	49.1	49.7	58.2
BHCPN		24.3	23.7	24.9	22.6	22.5
BCPN		23.7	24.4	23.7	24.6	17.3
BBN+BBN-G		3.2	1.3	1.9	2.5	1.7
BOPN		0.9	1.1	0.4	0.6	0.3
Period of first observed tumors(weeks)		103	127	137	137	164

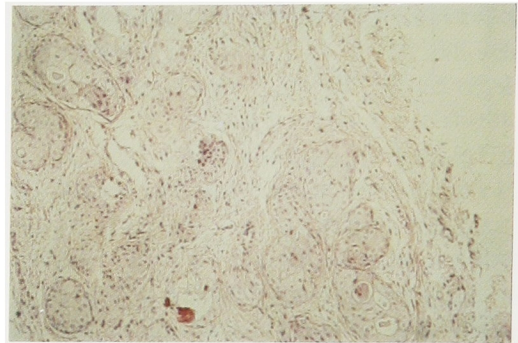
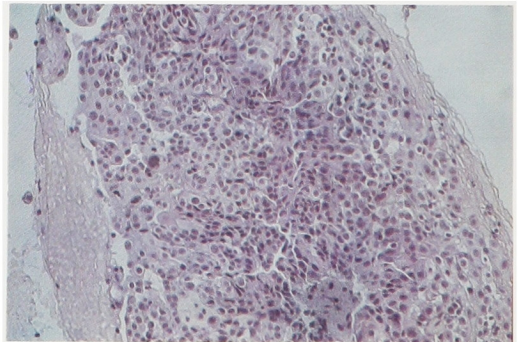
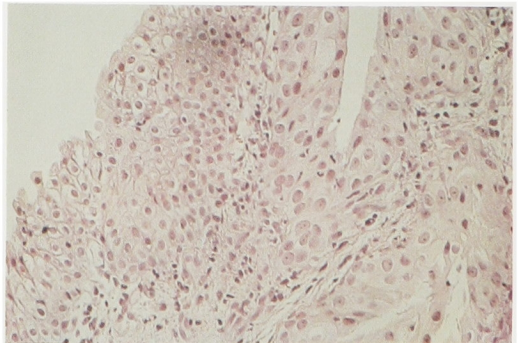
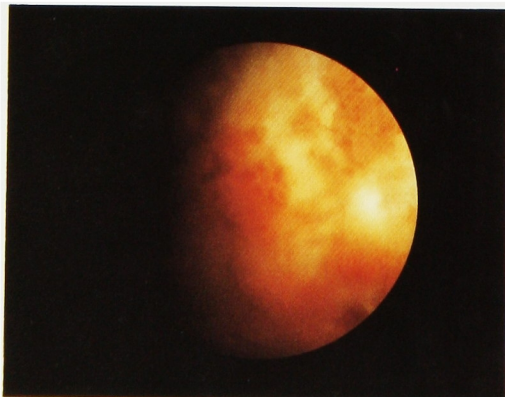


Fig. 10. Cystoscopic (left) and histological (right, H-E stain  $\times 200$ ) findings of dog B (20 weeks)



A



B

Fig. 11. Cystoscopic (left) and histological (right, H-E stain  $\times 400$ ) findings A: dog C (120 weeks), B: dog G (164 weeks).



瘍の初発が認められたイヌGの組織所見は一部内反傾向を示すものの核の異型性に乏しい focal hyperplasia (Fig. 11, B) の状態で、イヌGと残り4頭の各ニトロ化合物の構成比を比較するとイヌGのBCPNは17.3%と少なく、本実験でも腫瘍発生時期に対するBCPNの関与が示唆された。

## 考 察

N-ニトロ化合物の分析法の概要は、抽出、濃縮、測定および確認の4段階からなる。第一段階の抽出は有機溶媒によるものが一般的である。第二段階の濃縮は第一段階で得られた試料に対して行われるが、有機溶媒の留去の際の低沸点のN-ニトロ化合物の損失を考慮しなければならない。第三段階の測定法には、薄層クロマトグラフィー法(以下TLCと略す)、比色法、ガスクロマトグラフィー法(GC)、高速液体クロマトグラフィー法(以下HPLCと略す)などがある。このうちTLC法および比色法は、N-ニトロ化合物の検出の選択性に欠け、あるいは検出感度がきわめて低いため、現在では生体、食品試料の検出にはほとんどもちいられていない。正確な定量値を得るためには、GCあるいはHPLCが最適である。第四段階の確認にはGC/MSが必須である。

BBNとその尿中代謝ニトロ化合物の分析法は、抽出は基本的には有機溶媒を用いた液々分配法で十分である<sup>4)</sup>。分離、測定法として鈴木らは、おもにTLC法を用い<sup>4,5,8,29)</sup>、他にもGCも用いられている<sup>29)</sup>。和田らはHPLCを用いてBCPNを分析している<sup>9)</sup>。N-ニトロ化合物のGCによる分析法の測定感度は、最近、電子捕獲検出器(EGD)によりその測定感度はピコグラムのレベルにまで上がった<sup>11)</sup>。しかしこの方法ではニトロサミンを揮発性の誘導体に変換してから測定するため不揮発性ニトロサミンは分析できない。石橋らは、発癌性を有するN-ニトロサルコンやN-ニトロプロリンなどの不揮発性ニトロアミノ酸をジアゾメタンにて揮発性のメチルエステル誘導体としGCにより定量しえたことを報告している<sup>12)</sup>。われわれの実験でも、Fr. IIに属するBCPN、BCMNおよびBHCPNはいずれもカルボキシル基を有する不揮発性ニトロサミンであることからジアゾメタンにより揮発性ニトロサミンとした。一方、さらに高感度で微量のN-ニトロ化合物の検出器としてGCとオンラインさせたTEA(thermal energy analyzer)が1970年代にFineらにより開発された<sup>13,14)</sup>。TEAはN-ニトロ化合物を選択的に検出するので検体をGCにより分離した際に生じる妨害

成分を除去すること、すなわちクリーンアップの操作を省くことができ<sup>15)</sup>、かつppbレベルの迅速分析に適している。GC-TEAを用いた環境中のニトロ化合物の分析に関する報告は多く、ビール、ベーコン等の食品中<sup>16,17)</sup>を初め、化粧品<sup>18)</sup>、ゴム製品<sup>19)</sup>のそれらの分析に応用され、おもにdimethylnitrosamineが検出されたことが報告されている。このTEAを用いた発癌性ニトロ化合物の分析では垣添らは尿中および糞便中の揮発性ニトロサミンとしてdimethylnitrosamineおよびdibutylnitrosamine(以下DBNと略す)を検出したことを報告している。強力な発癌剤である後者を検出したGC-TEAは注目になる測定法である<sup>20,21)</sup>。AiroldiらはBBN投与ラットにおける尿中BCPNをTMS化しGC-TEAにより分析した成績を報告しているが<sup>22)</sup>、BBNの尿中代謝ニトロ化合物をジアゾメタンでメチル化し分析した報告はなく、今回われわれが用いた尿中ニトロ化合物をジアゾメタンによりメチル化したものをGC-TEAにより分析する方法は、抽出方法の簡略化および検出の迅速性と精度の点で従来のTLC法やGC法などの分析法より優れていると考えられる。N-ニトロ化合物は、N-NO基の開裂による(M-NO)<sup>+</sup>が容易に検出されるのでGC/MSによる同定法のよい対象となっている。CIMF(化学イオン化マスマスフラグメントグラフィー)法<sup>23)</sup>や陰イオンマスマスペクトル法<sup>24)</sup>でもともにdimethylnitrosamineが報告されている。EI(電子衝撃)-MSではその特徴的なNO基のm/z 30を容易に検出できることが確立されておりわれわれも用いた<sup>25)</sup>。

BBNとその2つの側鎖がbutyl基であるDBNは膀胱に対する選択的な発癌物質としてDruckleyにより報告されて以来<sup>26)</sup>、数多くの研究がなされてきた。特に岡田による種々のdialkylnitrosamineの発癌性に関する実験によると、ラットおよびマウスではBBN、BCPNを初め、EHBN(N-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine)、PCBN(N-propyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine)は膀胱にのみ発癌性が認められ、BBNの代謝産物であるBCMN、BOPNには発癌性が認められない<sup>4)</sup>。BBNの膀胱発癌性はそのhydroxybutyl基が $\beta$ -oxidation(Knop's mechanism)によって3-carboxypropyl基に酸化されたBCPNによるとされている<sup>9)</sup>。

今回の実験でイヌにおいてもBBN代謝ニトロ化合物のうち、BCPN、BHCPN、BCMNおよびBOPNの各代謝物が確認され、ラット、マウス等の他動物と同様の代謝経路が想定される<sup>4,9)</sup>。経口投与

の BBN に対する感受性の各動物の種差は伊東らによるとラット、マウスはモルモット、ハムスターよりも感受性が高く<sup>27)</sup>、さらにその代謝経路の種差は鈴木らによると<sup>4,8,28,29)</sup>尿中の BBN 代謝ニトロソ化合物のうち、ラット、マウスでは BCPN 排泄量が多く相対的に BCMN は少ないとされ、モルモット、ハムスターでは逆に BCPN は少なく BCMN が相対的に多いとされている。しかも BBN に対する感受性の差を BCPN の排泄率の差に帰するとしている。モルモット、ハムスターと同様にイヌの投与初期の BCPN の排泄率は投与 BBN の 7% にすぎない<sup>4)</sup>。しかし、われわれの実験では連続投与すると初期 (15週目まで) に 15~20% まで漸増し、以後プラトーになり投与後期 (実験 II) においてもこの割合を維持することがわかる。しかし、ラットの初回投与における 43% にはおおよばず、イヌは BBN に対する感受性の低い動物種と言える。

次に今回の実験で示されたようにイヌの間で腫瘍発生時期に個体差がみられた。実験 I においては膀胱粘膜の初期変化である focal hyperplasia までの BBN 代謝ニトロソ化合物の変動は、粘膜変化の早いイヌの方が BCPN 排泄量が多い。実験 II においても異型性の高い腫瘍をもつイヌの方が BCPN 排泄量が多いことは、BBN から BCPN への代謝の多いものほど、より多くの BCPN が膀胱粘膜に接することによって腫瘍発生時期に関与することが十分にうかがわれる。同時に腫瘍発生時期の個体差も同様に BCPN への代謝の差によるものと考えられる。岡島らによると BBN 投与ビーグル犬において BBN high-dose 群は low-dose 群よりも腫瘍発生時期は早く、しかも異型度は高い<sup>30)</sup>。このことは今回の実験から high-dose 群では尿中 BCPN 排泄量が多いために、腫瘍発生時期が早いものと推測され、BCPN の腫瘍発生時期と BCPN との関与が裏付けられた。グルクロン酸抱合に関しては、発癌物質は一般的に肝において中間体としての N-水酸化体をつくるのが明らかで、Kadlubar は *in vivo* でイヌ、ラットおよびヒトの肝ミクロゾームで N-水酸化 2-ナフチラミンが N-グルクロン酸抱合体を生成することを報告している<sup>31)</sup>。この抱合体は肝から腎へ輸送され尿中に排泄される。尿は pH 5~6 の酸性のため  $\beta$ -glucuronidase により加水分解され、再び N-水酸化体をつくり、膀胱腫瘍患者ではその活性が上昇しているとされている<sup>32)</sup>。BBN に対する尿中代謝物としての BBN-G の比率はラットでは岡田によると 2%<sup>9)</sup>、Airoldi によると 0.05%<sup>22)</sup>との報告であるが、われわれのイヌの成績で

は BBN のほとんどは抱合体 (BBN-G) をつくり 2% 前後とラットの比率とほぼ同じであった。非抱合体の BBN は微量 Fr. I に認められるのみであった。なお、イヌでこの抱合体の形をとるのは原物質の BBN のみであった。すなわち Fr. III を抽出した後の尿を Fr. II と同様の方法で分析したところ Fr. II と一致することが予備実験で確認され、諸家の報告と一致している<sup>4,22)</sup>。ラット、マウスに比べて BBN による膀胱腫瘍の発生が遅いモルモットでは BBN-G は 9% と高い割合で尿中で認められ<sup>9)</sup>、グルクロン酸抱合能が高いことが腫瘍発生時期をおくらせていると考えられた。しかし、われわれのイヌの成績では腫瘍発生時期と BBN-G の比率の間には、特定の傾向は認められず、イヌにおいてはグルクロン酸抱合能は、BCPN のように膀胱腫瘍発生に関与しているとは考えられなかった。

## 結 語

BBN を投与したビーグル犬の尿中代謝ニトロソ化合物を GC-TEA を用いて定性分析し、さらに GC/MS により同定し、以下のような結果を得た。

1. BBN 投与犬の尿中より BCPN, BHCPN, BCMN, BOPN および BBN-G の各代謝物を確認した。
2. それら尿中ニトロソ化合物を再び GC-TEA を用いて定量分析したところ初期投与期間では BCMN がもっとも多く、次いで BHCPN, BCPN の順で、BOPN と BBN および BBN-G は少量であった。後期投与期間では BCMN と BCPN の増加と BHCPN の減少が認められた。
3. 膀胱粘膜の腫瘍発生時期の差は BCPN の尿中排泄量の差によるものと考えられた。
4. BBN のグルクロン酸抱合体と腫瘍発生時期の間には特定の関係は得られなかった。

稿を終えるに際し、実験方法等につき御指導をいただいた神戸大学公衆衛生学教室住野公昭教授ならびに終始種々の協力、助言をいただいた教室員の皆様に感謝致します。

なお、本論文の要旨は第74回日本泌尿器科学会総会および第11回医用マス研究会にて発表した。

## 文 献

- 1) 竹村 望：職業性膀胱腫瘍の研究をかえりみて。住友産業衛生 20 : 2-15, 1984
- 2) Bartsch H and Monteano R: Relevance of nitrosamines to human cancer. Carcinogenesis 5: 1381-1391, 1984
- 3) Ito N, Arai M, Sugihara S, Hirao K, Makiura

- S, Matayoshi K and Denda A: Experimental urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann Monograph* **17**: 367-381, 1975
- 4) Okada M, Suzuki E, Aoki J, Iiyoshi M and Hashimoto Y: Metabolism and carcinogenicity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and related compounds, with special reference to induction of urinary bladder tumors. *Gann Monograph* **17**: 161-176, 1975
  - 5) Suzuki E and Okada M: Metabolic fate of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine of the rat. *Gann* **71**: 856-862, 1980
  - 6) Okada M and Ishidate M: Metabolic fate of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and its analogues. Selective induction of urinary bladder tumors in the rat. *Xenobiotica* **7**: 11-24, 1977
  - 7) Rainey WT, Christie WH and Lijinsky W: Mass spectrometry of N-nitrosamines. *Biomed Mass Spectrometry* **5**: 395-408, 1978
  - 8) Suzuki E, Anjo T, Aoki J and Okada M: Species variation in the metabolism of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine related compounds to urinary bladder carcinogenesis. *Gann* **74**: 60-68, 1983
  - 9) Wada S, Funae Y, Imaoka S, Kawamura M, Kinoshita T, Sugimoto T, Nishio S, Kishimoto T and Maekawa M: Rapid assay of N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine in rat organs and urine by high-performance liquid chromatography after derivatization. *Jpn J Cancer Res* **76**: 192-196, 1985
  - 10) Ohtani M, Kakizoe T, Nishio Y, Sato S, Sugimura T, Fukushima S and Nijima T: Sequential changes mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinomas by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Res* **46**: 2001-2004, 1986
  - 11) Sen NP: Gas-liquid chromatographic determination of dimethylnitrosamine as dimethylamine at picogram levels. *J Chromatogr* **51**: 301-304, 1970
  - 12) 石橋 亨, 松居正巳, 河端俊治: N-ニトロソアミノ酸のガスクロマトグラフィーによる定量. *分析化学* **24**: 107-112, 1975
  - 13) Fine DH, Rufen F and Lieb D: Group analysis of volatile and non-volatile N-nitroso compounds. *Nature* **247**: 309-319, 1974
  - 14) Fine DH, Rufen F, Lieb D and Rounbehler DP: Description of the thermal energy analyzer (TEA) for trace determination of volatile and non-volatile N-nitroso compounds. *Anal Chem* **47**: 1188-1191, 1975
  - 15) Roades JM, Hosenfeld JM, Taylor JM and Johnson DE: Comparison of analysis of waste-waters for N-nitrosamines using various detectors, in "Walker EA, Gričiute L, Castegnaro M, Boezsoenyi M: N-nitroso Compounds: Analysis, Formation and Occurrence", IARC Scientific Publications, No. **31**: pp. 435-443, 1980
  - 16) Sen NP, Seaman S and Tessier L: A rapid and sensitive method for the determination of non-volatile N-nitrosocompounds in foods and human urine: recent data concerning volatile N-nitrosamines in dried foods malt-based beverages. *IARC Sci Publ* **14**: 185-197, 1982
  - 17) Scanlan RA, Barbour JF, Hotchkiss JH and Libbey LH: N-nitrosodimethylamine in beer. *Fd Cosmet Toxicol* **18**: 27-29, 1980
  - 18) Fan TY, Goff U, Song L and Fine DH: N-nitrosodiethylamine in cosmetics, lotions and shampoos. *Fd Cosmet Toxicol* **15**: 423-430, 1977
  - 19) Billedeau ST, Thompson HC and Miller BJ: Volatile N-nitrosamines in infant pacifiers sold in the United States as determined by gas chromatography/thermal energy analyzer. *J Assoc Off Anal Chem* **69**: 31-34, 1986
  - 20) Kakizoe T, Wang TT, Eng VMS, Furrer R, Dion P and Bruce WR: Volatile N-nitrosamines in the urine of normal donors and of bladder cancer patients. *Cancer Res* **39**: 829-832, 1979
  - 21) Wang TT, Kakizoe T, Dion P, Furrer R, Varghese AJ and Bruce WR: Volatile nitrosamines in normal human faeces. *Nature* **276**: 280-281, 1978
  - 22) Airolidi L, Spagone C, Bonfanti M, Pantarotto C and Fanelli R: Rapid method for quantitative analysis N,N-dibutylnitrosamine, N-butyl-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine in rat urine by gas chromatography-thermal energy analysis. *J Chromatogr* **276**: 402-407, 1983
  - 23) 瀬戸 博: 化学イオン化マスフラグメントグラフィーによる尿中N-ニトロソジメチルアミンの分析. *衛生化学* **26**: 181-185, 1980
  - 24) 鈴木 修, Brandenberger H: ニトロソ化合物の陰イオンマスマスペクトル. *医用マス研究会講演集* **7**: 143-144, 1982
  - 25) 森下真一, 原 勲, 濱見 学, 守殿貞夫, 三尾隆弥, 佐野公昭: 発癌過程における N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 尿中代謝物の分析. *医用マス研究会講演集* **11**: 189-192, 1986
  - 26) Druckrey H, Preussman R, Ivankovic S, Schmidt C, Mennel H and Stahl K: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl- und N-Butyl-N-butanol (4)-nitrosamin. *Z. Krebsforschung* **66**: 280-90, 1964

- 27) Ito N, Matayoshi M, Arai M, Yoshioka Y, Kamamoto Y, Makiura S and Sugihara S: Effect of various factors on induction of urinary bladder tumors in animals by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* 64: 151-159, 1973
- 28) Suzuki E, Mochizuki M and Okada M: Relationship of urinary N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine to susceptibility of animals to bladder carcinogenicity by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* 74: 360-364, 1983
- 29) Suzuki E, Aoki J and Okada M: Metabolic fate of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and N,N-dibutyl nitrosamine in the guinea pig, with reference to their carcinogenic effect on the urinary bladder. *Gann* 72: 547-551, 1981
- 30) Okajima E, Hiramatsu T, Hirao K, Ijuin M, Hirao Y, Babaya K, Ikuma S, Ohara S, Siomi T, Hijioka T and Ohishi H: Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in dogs. *Cancer Res* 41: 1958-1966, 1981
- 31) Kadlubar FF, Miller JA and Miller EC: Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* 37: 805-814, 1977
- 32) Hradec E, Petrik R and Pezlarova J: The  $\beta$ -glucuronidase in case of bladder neoplasmas. *J Urol* 94: 430-435, 1965

(1988年2月9日受付)