

## Epstein-Barr ウイルス関連早期抗原発現誘導系 による尿中膀胱発癌プロモーター検出の試み

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

藤 田 潤  
吉 田 修

### FAILURE TO ACTIVATE EPSTEIN-BARR VIRUS GENOME IN A LATENTLY-INFECTED HUMAN LYMPHOBLASTOID CELL LINE WITH URINE CONTAINING A BLADDER CARCINOGENESIS PROMOTER

Jun FUJITA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University  
(Director: Prof. O. Yoshida)

We assessed the possibility to detect promoters of bladder carcinogenesis by a short-term *in vitro* assay utilizing the activation of Epstein-Barr virus (EBV) expression in EBV genome-carrying human lymphoblastoid cells. This system is composed of EBV-nonproducer Raji cells as the indicator, *n*-butyrate as the EBV-inducer and the test substance. None of eight known bladder carcinogens (2-naphthylamine, 2-acetylaminofluorene, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, N-butyl-N-(3-carboxypropyl) nitrosamine, N-methyl-N-nitrosourea, N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide, benzidine, cyclophosphamide) or five promoters (sodium saccharin, sodium cyclamate, urea, allopurinol, DL-tryptophan) were detected by this system. Normal urine from 20 rats did not activate the EBV genome. Neither the 0.45  $\mu$ m membrane filtrates nor ether extracts of urine obtained from rats given one of 4 bladder carcinogens, 4 promoters or phorbol 12-myristate 13-acetate reacted with this system, whereas those from rats given either vincristine or vinblastine did, although their activity for promoting bladder carcinogenesis is not known. Urine samples from 42 patients with bladder cancers, when tested as filtrates, ether extracts or XAD-2 resin adsorbates, did not activate EBV expression. These results suggest that EBV-activating substances contribute little to promotion of bladder carcinogenesis and that this test might not be applicable for screening of tumor promoters in urine.

**Key words:** EB virus, Bladder carcinogen, Raji cell, Urine, Tumor promoter

#### 緒 言

発癌の二段階説は、1940年代に Berenblum らにより皮膚癌のモデルで確立された概念であり、膀胱癌に関しても適用できることが示唆されている<sup>1)</sup>。その第1段階、イニシエーションは、単独でも十分量を与えれば発癌をみる癌原物質により短期間におこされる不可逆性の過程、続くプロモーションは緩徐で長期間

を必要とし、少なくともその一部は可逆的である発癌の促進過程である<sup>2)</sup>。この説にしたがうならば膀胱発癌のプロモーター（本稿ではプロモーション作用を示す化学物質で、イニシエーション作用を有しないものをさすことにしておく<sup>2)</sup>）を発見し、その作用を抑制することにより早期発見、早期治療が可能になるのではないかと期待される。さらに尿中にプロモーターが検出されれば、尿路悪性腫瘍の多発性、高再発性をも説

明できるであろう。しかし現在腫瘍プロモーターの短期検索法としては、発癌物質イニシエーター検索における Ames 試験<sup>3)</sup>に匹敵するような確立された方法はない。そこでわれわれは一部の腫瘍プロモーターが、Epstein-Barr ウイルス (EBV) 潜在感染ヒトリンパ芽球様細胞における EBV 関連早期抗原 (EA) の発現を促進するという事実に着目し<sup>4-6)</sup>、この系の膀胱発癌プロモーター検索への応用の可能性について検討を加えた。

### 材料および方法

#### 1. 使用化学物質

n-酪酸は和光純薬から、膀胱発癌物質<sup>7)</sup> N-methyl-N-nitrosourea (MNU) および 2-acetylaminofluorene (AAF) は半井化学 (京都), N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT) は Saber Lab. Inc. (U.S.A.), N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (BBN) は泉化学 (横浜), N-butyl-N-3-carboxypropyl-nitrosamine (BCPN) は東京生化学研, 岡田正志博士より, 2-naphthylamine は東京化生販売 (東京), benzidine は Sigma Chemical Co. (U.S.A.), cyclophosphamide (CYC) は塩野義製薬 (大阪) からそれぞれ入手した。膀胱発癌プロモーター<sup>7)</sup> DL-tryptophan は和光純薬 (東京), sodium saccharin は小野薬品 (大阪), sodium cyclamate (チクロ) は武田薬品 (大阪), allopurinol は田辺製薬 (大阪), urea は半井化学 (京都) から購入した。EBV-EA 発現誘導物質<sup>4,8)</sup> である phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) は Consolidated Midland Corp. (U.S.A.), ビンクリスチン (VCR), ビンプラスチン (VLB) は塩野義製薬 (大阪) から購入した。これらを Raji 培養液に加える時は、水、dimethyl sulfoxide (DMSO) またはエタノールに溶解し、ラットに経口投与する時は、水に溶解するかオリーブ油に懸濁した。

#### 2. 細胞培養および EBV-EA 誘発試験 (以下 Raji 誘発試験と称する。)

EBV 潜在感染ヒトリンパ芽球様細胞株 Raji 細胞の培養液として、PRMI 1640 (日水製薬, 東京) に 10% 胎仔血清および抗生物質を加えたものを使用した。この培養条件下で、EBV-EA 自然発現率は、0.01% 以下であった。

Raji 誘発試験は既報のごとく<sup>4)</sup>、 $1 \times 10^6$  細胞/ml の濃度に調整した Raji 細胞に、4 mM n-酪酸とさまざまな濃度の被験物質とを加え、37°C で 48 時間培養、塗抹標本を作製し、上咽頭癌患者血清を用いた間接蛍光抗体法にて、EBV-EA を染色し、陽性細胞の率を算出した。なお、毎回 n-酪酸だけの陰性コントロールと TPA を加えた陽性コントロールとを同時におこない、それぞれ EA 陽性細胞 0.25~2.5%、15~30% であったので、EA 陽性細胞 5% 以上の場合のみ Raji 誘発試験陽性と考えた。

#### 3. 動物および尿処理方法

雌性 Wistar ラット、体重 200~300 g を全実験に使用した。個別に金属性メタボリックケージに入れ、自由に粉末飼料 (日本クレア, 東京) および飲料水を与えたが、尿採取中に飲料水のみとした。Table 1 のごとく化学物質を投与後、48 時間内の尿をすべて採取、半量を 0.45  $\mu$ m ミリポアフィルターで濾過、-20°C に検査時まで保存した。残りの半量はエーテル抽出後、抽出物の濃度が 10 mg/ml となるように DMSO に溶解して使用した。すべてのテスト物質につき 3 匹以上のラットを使用し、2 回以上テストした。

#### 4. 患者および尿処理法

京大医学部付属病院入院中で、内視鏡的に膀胱腫瘍の存在が あきらかな患者 42 例の 24 時間尿から 500 ml を採取した。32 例はエーテル抽出後、抽出物の濃度が 20 mg/ml となるように DMSO に溶解し使用した。10 例は尿 3 ml をそのままフィルターで濾過し、残りを Yamasaki らの方法<sup>9)</sup> に準じて、XAD-2 樹脂に

Table 1. 膀胱発癌物質およびプロモーター投与ラット尿

Carcinogen or promoter	Dose and route of administration (/mouse)	Concentrations of urine tested	
		Whole ( $\mu$ l/ml)	Ether extract ( $\mu$ g/ml)
BBN	400mg, p.o.	20, 2	300, 100, 10, 1
2-Naphthylamine	60mg, p.o.	50, 10	100, 10, 1
Acetylaminofluorene	80mg, p.o.	50, 10	100, 30, 10
Cyclophosphamide	33mg, p.o.	250, 50, 5, 0.5	300, 30, 10, 3
Tryptophan	0.5 g, p.o.	250, 10	300, 30, 1, 0.1
Saccharin	1 g, p.o.	200, 10, 1, 0.2	1000, 300, 50, 10, 1
Cyclamate	0.5 g, p.o.	20, 2	100, 10, 1, 0.1
Allopurinol	50mg, p.o.	20, 2	100, 10, 1

Table 2. EB ウイルス早期抗原 (EA) 誘導物質投与ラット尿による Raji 誘発試験

EBV-EA inducer	Dose and route of administration (/mouse)	Raji induction test	
		Concentration of urine ( $\mu$ l/ml)	% EA positive cells*
TPA	0.3mg, i.p.	30	< 0.1
		10	< 0.1
		1	< 0.1
		1	< 0.1
Vincristine	0.5mg, i.p.	50	14.5
		10	6.0
		1	4.7
		1	4.7
Vinblastine	0.5mg, i.p.	50	12.0
		10	5.7
		1	5.7
		2	6.4

\* The result of one typical experiment. Positive and negative controls gave 24% and 2.1% EA positive cells, respectively

吸着させ、そのアセトン溶出物を 0.3~0.5 ml の DMSO に溶解して使用した。

## 結 果

### 1. 膀胱発癌物質、プロモーター

前記膀胱発癌物質 8 種、プロモーター 5 種すべて最終濃度 300, 100, 10, 1, 0.1 mg/ml では EA 陽性細胞が 2.5% 以下であり、Raji 誘発試験陰性であった。

### 2. 正常ラット尿

濾過尿最終濃度 50, 25, 5, 0.5  $\mu$ l/ml, およびエーテル抽出物濃度 500, 50, 5, 0.5  $\mu$ g/ml では、正常ラット尿 20 例すべて Raji 誘発試験陰性であった。

### 3. 膀胱発癌物質、プロモーター投与ラット尿

Table 1 のごとく、ラットに発癌物質またはプロモーターを投与した後の尿も、濾過尿、エーテル抽出物とも、すべて Raji 誘発試験陰性であった。

### 4. EBV-EA 発現誘導物質投与ラット尿

Table 2 のごとく、TPA 投与ラット尿は Raji 誘発試験陰性であったが、VCR, VLB 投与ラット尿は EA 陽性細胞それぞれ 15%, 12% で陽性であった。

### 5. 膀胱癌患者尿

濾過尿の最終濃度が 50, 20, 2, 0.4  $\mu$ l/ml, エーテル抽出物濃度 300, 100, 10, 10.1  $\mu$ g/ml, XAD-2 抽出物濃度 50, 25, 2.5, 0.5  $\mu$ l/ml で検査したが、42 例すべて Raji 誘発試験陰性であった。

## 考 察

Hicks らは、単独では発癌に不十分な量の MNU でラットを処理したあと、人工甘味料であるサッカリンやチクロを投与しつづけると著明な膀胱癌の発生をみることを報告した<sup>1)</sup>。イニシエーターとして他の膀胱発癌物質を用いても同様に、これらのプロモーター

による発癌促進効果が認められ<sup>9)</sup>、現在までに前記のごとく数種の膀胱発癌プロモーターが追加されている。しかしプロモーションは最初考えられたよりも複雑なようで、メセラインなど単独ではほとんどプロモーション作用を示さない物質が TPA の短期間処理後に投与すると強いプロモーション効果を示すこと、および抗プロモーション物質による研究から、プロモーション過程も少なくとも 2 つ以上に分けられると提唱されている<sup>10)</sup>。また発癌物質のもつプロモーション作用の機序とプロモーターの作用機序とが異なる可能性も示唆されている<sup>11)</sup>。プロモーターの短期検索法、作用機序の研究は、ほとんどが TPA (皮膚発癌プロモータークロトン油中の主成分) を用いてなされているが、TPA が細胞間連絡障害、試験管内発癌促進、細胞分化修飾、リンパ芽球の凝集、オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の誘導など<sup>12)</sup>、あまりにも多くの生物学的、細胞学的、生化学的作用を示すため、本質的なことは不明である。ただある種の遺伝子の増幅を引き起こすという説<sup>13)</sup>は、最近の癌遺伝子の発見との関連から興味深い。

プロモーターの臓器特異性という点からは、癌または正常膀胱上皮細胞での ODC 活性の誘導<sup>14,15)</sup> 異所移植膀胱を利用した *in vitro* プロモーション実験<sup>16)</sup>、イニシエートされた膀胱上皮細胞のコンカナバリン A による凝集性の維持<sup>17)</sup>などがすぐれている。実際これらの方法により、垣添らはロイシン、イソロイシン、パリンの経口投与が<sup>17)</sup>、Oyasu らは正常尿<sup>16)</sup> が膀胱発癌をプロモートする可能性をきらかにしている。いっぽう、われわれの用いた Raji 細胞を利用した EBV 活性化試験は、既報のごとく<sup>4)</sup>、benzpyrene, MNNG などの癌原物質や、サッカリン、アントラリン、tween 60 などのプロモーターは検出できないが、

phorbol ester 類 (TPA, メセライン) indole alkaloid 類 (テレオシジン, リングビアトキシン), polyacetate 類 (アブリシアトキシン, デプロモアブリシアトキシン) に対しては敏感で, そのプロモーター活性の強弱もある程度判定できる<sup>6)</sup>. しかし今回, 既知の膀胱発癌物質, 膀胱発癌プロモーターの検出は不可能であった. プロモーターの代謝活性化機構が本法には欠けていることがこの原因とも考えられるため, 報告されているプロモーターの投与量の2倍以上でできるだけ大量をラットに1回投与し, 48時間尿を採取して検討したが, やはり EBV-EA 発現の誘導はみられなかった. またこれらが尿中 EBV-EA 発現抑制物質によるものでないことは, VCR, VLB 投与尿が陽性であることおよび正常尿が TPA の EA 誘導活性を阻害しないこと (データ略) からあきらかである. 投与方法の問題以外に, 本 Raji 誘発試験が膀胱発癌プロモーターを検出できなかった理由として, 感度が低すぎる. 本法がまったく腫瘍プロモーター活性を反映していない, 膀胱発癌プロモーターは活性化を必要とするが尿中には出ない, プロモーションのメカニズムが数種あって膀胱プロモーターと TPA 類とは異なっているなどが考えられる. さらに尿の抽出方法および最終試験濃度も問題であろう. 今回, 原尿を用いた場合のテスト濃度はもとの尿中濃度の 1/20 以下であったが, これで VCR, VLB 投与尿は十分検出可能であった.

TPA は体内で代謝されてしまうが, この両者は一部がそのまま尿中に排泄されることが知られている<sup>18)</sup> ので理解できる結果である. TPA, クロトン油などの既知 EBV-EA 発現誘導物質はエーテル抽出可能であることから, 尿抽出には主としてエーテルを用いた. 回収率を考慮に入れないければ, ラット尿エーテル抽出物の最終テスト濃度はもとの尿中濃度の 1.5 倍以下であるが, ヒト尿の場合はエーテル抽出物でもとの4倍以上, XAD-2 樹脂抽出物では50倍以上濃縮してテストしたことになる (計算省略). 以上より, 他の抽出法で検出される可能性は残されているものの, EBV-EA 誘導物質がヒト膀胱発癌プロモーターとして, 尿中に存在する可能性は少ないと考えて良いであろう. なお VCR, VLB の膀胱発癌プロモーター活性については, さらに検討が必要である.

## 結 語

EBV 潜在感染ヒトリンパ芽球様細胞 (Raji 細胞) における EBV 関連早期抗原 (EA) の発現誘導を指標として, 膀胱発癌プロモーターの検出を試みたが,

既知の膀胱発癌物質8種, プロモーター5種, これらの投与をうけたラットの尿 (Table 1), および42例の膀胱癌患者尿はすべて EBV-EA 誘導活性を示さなかった.

本法による尿中膀胱発癌プロモーターの検出は容易ではないであろう.

京都大学医学部微生物学教室 伊藤 洋平教授, 菅原 健二博士, 徳田春邦氏の御指導および, 東京生化学岡田正志所長の御厚意に深く感謝致します.

本研究の一部は文部省科学研究費 (一般研究 A・課題番号 57440072) による. なお本論文要旨の一部は1981年第70回日本泌尿器科学会総会にて発表した.

## 文 献

- 1) Hicks RM: Multistage carcinogenesis in the urinary bladder. *Brit Med Bull* 36: 39~46, 1980
- 2) 北川知行: 肝発癌とプロモーション. 代謝 19: (臨時増刊 癌 '82), 977~987, 1982
- 3) Yamasaki E and Ames BN: Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3555~3559, 1977
- 4) Ito Y, Yanase S, Fujita J, Harayama T, Takashima M and Imanaka H: A short-term in vitro assay for promoter substances using human lymphoblastoid cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Cancer Lett* 13: 29~37, 1981
- 5) zur Hausen H, Bornkamm GW, Schmidt R and Hecker E: Tumor initiators and promoters in the induction of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 782~785, 1979
- 6) Eliasson L, Kallin B, Patarroyo M, Klein G, Fujiki H and Sugimura T: Activation of the EBV-cycle and aggregation of human blood lymphocytes by the tumor promoters teleocidin, lyngbyatoxin A, aplysiatoxin and debromoaplysiatoxin. *Int J Cancer* 31: 7~11, 1983
- 7) 垣添忠生・松本恵一・新島端夫: 実験膀胱癌の最近の知見から一発癌の超初期変化の解析. 医学のあゆみ 114: 425~435, 1980

- 8) 藤田 潤・徳田春郎・菅原建二・伊藤洋平・吉田 修：抗癌剤および微小管阻害剤による ED ウィルス関連早期抗原の誘導。日本癌学会総会記事，第42回，p. 56，1983
- 9) Cohen SM, Arai M, Jacobs JB and Friedell GH: Promoting effect of saccharin and DL-tryptophan in urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* **39** : 1207~1217, 1979
- 10) Slaga TL, Fischer SM, Nelson K and Gleason GL Studies on the mechanism of skin tumor promotion: Evidence for several stages in promotion. *Proc Natl Acad Sci USA* **77** : 3659~3663, 1980
- 11) Reddy AL and Fialkow PJ: Papillomas induced by initiation-promotion differ from those induced by carcinogen alone. *Nature* **304** : 69~71, 1983
- 12) 山崎 洋：発癌プロモーター。代謝 **17** : (臨時増刊癌 '80), 1311~1322, 1980
- 13) Barsoum J and Varshavsky A : Mitogenic hormones and tumor promoters greatly increase the incidence of colony-forming cells bearing amplified dihydrofolate reductase genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **80** : 5330~5334, 1983
- 14) Izumi K, Hirao Y, Hopp L and Oyasu R : In vitro induction of ornithine decarboxylase in urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Res* **41** : 405~409, 1981
- 15) Matsushima M and Bryan GT : Early induction of mouse urinary bladder ornithine decarboxylase activity by rodent vesical carcinogens. *Cancer Res* **40** : 1897~1901, 1980
- 16) Oyasu R, Hirao Y and Izumi K: Enhancement by urine of urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* **41** : 478~481, 1981
- 17) Kakizoe T, Komatsu H, Honma Y, Nijima T and Sugimura T Detection of amino acids possible promoters of bladder cancer in rats by measuring their enhancement of agglutination of bladder cells by concanavalin A. *Gann* **73** : 870~873, 1982
- 18) International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents, Vol. 26, pp. 349~384. IARC, Lyon, France, 1981

(1984年3月23日迅速掲載受付)