

尿路上皮腫瘍患者および健康人における N-acetyltransferase phenotype についての検討

和歌山県立医科大学泌尿器科学教室（主任：大川順正教授）

曾 根 正 典

DETERMINATION OF N-ACETYLTRANSFERASE PHENOTYPE IN UROTHELIAL CANCER PATIENTS AND HEALTHY CONTROLS

Masanori SONE

From the Department of Urology, Wakayama Medical College

(Director: Prof. T. Ohkawa)

Several arylamines can act as human urothelial carcinogen and N-acetyltransferase, human liver enzyme, might play a role in the detoxication of these carcinogenic substances. N-acetyltransferase phenotype in man is genetically regulated and divided into the rapid type and the slow type. The N-acetyltransferase phenotype was determined to investigate the susceptibility for bladder cancer in the slow acetylator phenotype using the method reported by Weber and Brenner. The frequency of the slow acetylators was 16 of the 144 subjects (11.1%); 1 of the 25 controls (4.0%), 10 of the 57 chemical workers (17.5%), 3 of the 42 spontaneous urothelial cancer patients (7.1%) and 2 of the 20 occupational urothelial cancer patients (10.0%).

These results showed no significant association between the slow acetylator phenotype and the urothelial cancer. These results seemed to be caused by the low ratio of the slow acetylator in Japanese people.

Key words: N-acetyltransferase phenotype, Slow acetylator, Urothelial cancer

緒 言

厚生省の人口動態統計¹⁾によれば、本邦の悪性新生物による死亡数は年々増加の一途を辿り、1983年には176,206人にも達し、全死亡者中23.8%を占めるに至っている。そのうち泌尿器および男性生殖器の悪性新生物による死亡数は6,878人、約4%であり、中でも膀胱悪性新生物による死亡者は2,496人で尿路性器におけるその1/3以上におよんでおり、またその死亡率においても、1960年に人口100,000人当たり1.2人であったものが1983年には2.1人と増加し、特に男子ではその傾向が著明で2.9人であると集計されている。本来、腫瘍を初めとする各種疾患の発生頻度はその罹患率によるのが妥当であるが、本邦における膀胱癌患者数は、全国集計が1982年に始まったばかりで未だその傾向を出すには至っていないため死亡率による検討がな

されざるを得ないところである。しかしながら、この死亡率も欧米に比較してみると極めて低値であり、アメリカ合衆国の1/2以下でイギリスの1/4程度にすぎず²⁾、更に、これを訂正死亡率に換算すると厚生省の統計では1960年以降1.0人前後ではほぼ横這い状態であり増加はみられていない。死亡率による検討が本症の罹患状況を意味するものではないことは明らかであり、かつ、近年における本症の増加は、日常臨床、十分に認識出来るものであるが、それでも文化水準が欧米の域に達している現在の本邦においてさえ尚、この様な差が現れていることは、環境因子による影響以外に何らかの人種的要因も考えられるのではないかとと思われる。

Benzidine や 2-naphthylamine などの arylamine の曝露により尿路上皮腫瘍が惹起され得ることは実験的あるいは臨床的にもよく知られているが、肝に存在

する arylamine acetyltransferase [(EC 2. 3. 1. 5.), 以後 N-acetyltransferase と略す] は, これらの arylamine をアセチル化することにより尿路上皮発癌物質として活性化されるのを防ぎ尿路上皮腫瘍の発生を抑制し得るであろうといわれて来ている³⁾. ヒトにおけるこの酵素活性の強弱は, 遺伝学的に決定されアセチル化能の強い rapid acetylator phenotype と活性の弱い slow acetylator phenotype の2型に分類されている⁴⁾. 従って, 尿路上皮腫瘍患者, 殊に膀胱癌患者における acetylator phenotype に関する検討は, 既知の発癌物質への曝露による職業性の発癌のみならず, 種々の環境因子が関与しているとされている自然発生の膀胱癌の発癌機序を考える上でも極めて興味深いところである.

今回, 著者は正常健康人を対照とし, 自然発生尿路上皮腫瘍患者および benzidine 又は 2-naphthylamine の曝露により発生したと思われる職業性尿路上皮腫瘍患者において N-acetyltransferase phenotype を測定した結果を記載し, それぞれの群における phenotype の分布に差が認められるかどうか, そして, これが本邦における膀胱癌の頻度が欧米より低い理由の解明となるかどうかを検討した.

対象および方法

尿路上皮腫瘍患者群は全て組織学的に移行上皮癌と診断が確定し得たものを対象とした. これらは自然発生尿路上皮腫瘍患者42例(膀胱癌41例, 腎盂癌1例)及び職業性尿路上皮腫瘍患者20例(膀胱癌18例, 尿管癌2例)であった. 尚, 職業性尿路上皮腫瘍患者群では19例が benzidine に, 1例のみが 2-naphthylamine に曝露されたものであった.

正常対照群は和歌山県立医科大学付属病院泌尿器科に入院した良性疾患患者および healthy volunteers の25名とした. この他, benzidine あるいは 2-naphthylamine などの発癌物質に曝露された職業歴をもつ健康人で, 現在, 定期的に尿細胞診によるスクリーニングを受けている染料工場の従事者(以下, 検診群とする)57名についても同様の検討を加えた.

対象は, 全例, 肝および腎機能が正常の者に限ったが, 手術歴の有無および手術方法などについては今回の検討では考慮しなかった.

N-acetyltransferase の測定は, サルファ剤の1種である sulfamethazine (Sigma 社製, 以下 SMZ) を用いる Weber and Brenner⁵⁾ の方法に準じて行なった.

被検者は検査前日の24時以降絶食とした. 当日は午

前7時から水分摂取を禁じ, 午前9時に1gのSMZを服用させた. 午前12時に排尿させ, 服薬後4.5時間の午後1時30分に採血, 採尿を行ない, その血清および尿を検体として -20°C で凍結保存し測定時には自然解凍させて使用した. 最初の8例については, 検体採取直後と -20°C に冷凍保存後の2度にわたって測定を行ない, その値に変動がないかどうかを確認した.

負荷方法を決定するにあたり, まず5例の患者でSMZ負荷後経時的に血清および尿中のtotal SMZ濃度を測定し, 服薬後4.5時間の時点で測定することの妥当性についても検討した.

血清および尿中のSMZ濃度の測定は, Fig. 1の如く行なった. 血清および尿の各0.2mlを検体とし, これに20% trichloroacetic acid 1.0ml, 更に3.0mlの蒸留水を加えた. これらを3,000回転で10分間遠沈し, その上清を1検体につき1.0mlずつ2本の試験管に分取し free (unacetylated) および total (unacetylated & acetylated の両者) のSMZ濃度を測定した. free SMZ 測定用の検体は蒸留水0.2mlを加えたのみで後述の反応を行なった. 他方, total SMZ の測定は 4N-hydrochloric acid 0.2mlを加え1時間煮沸した後, 同様の反応を行なった. 呈色反応は0.1% sodium nitrite 0.1ml, 0.5% ammonium sulfamate 0.1ml および 0.05% N-1-(naphthyl) ethylene diammine dihydrochloride 0.4ml を順次添加して行ない, その後3,500回転で10分間遠沈し, その上清を分光光度計(日光分光 K. K. UVIDEC

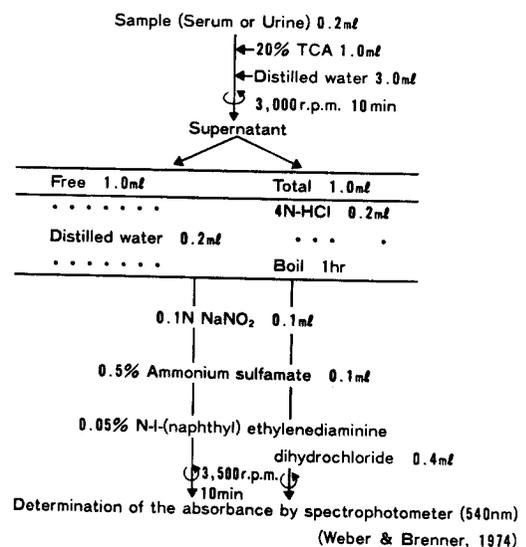


Fig. 1. Methods

Table 1. Recovery rate of sulfamethazine added to serum or urine

Conc. of SMZ ($\mu\text{g/ml}$)	Standard(O.D)	Serum		Urine	
	Mean \pm SD	Added(O.D)	Recovery rate(%)*	Added(O.D)	Recovery rate(%)*
0	0	Mean \pm SD		Mean \pm SD	
49.7	0.253 \pm 0.06	0.194 \pm 0.014	76.7	0.255 \pm 0.019	100.8
124.4	0.610 \pm 0.011	0.539 \pm 0.020	87.9	0.567 \pm 0.009	93.0
248.7	1.245 \pm 0.105	1.171 \pm 0.008	94.1	1.140 \pm 0.027	91.6

$$* : \text{Recovery rate} = \frac{\text{Added}}{\text{Standard}} \times 100$$

70) を用い、540 nm での吸収により測定した。

アセチル化率は total SMZ から free SMZ を減じた差、つまり acetylated SMZ の値を total SMZ の値で除して求めた。即ち、次の様な式で求められることになる。

$$\text{Acetylation ratio} = \frac{\text{total SMZ} - \text{free SMZ}}{\text{total SMZ}} \times 100$$

測定はすべて duplicate assay で施行された。

尚、9人の患者では少なくとも1週間以上間隔をあけて2度の検体採取を行ない acetylation ratio の変動の有無を検討した。

各群間での有意差の検定には Fisher の直接確率計算法を用いた。

結 果

(1) SMZ の検量線

SMZ 標準液の検量線は Fig. 2 の如くとなり、SMZ 濃度と吸光度との間には極めて良好な直線関係が得られた。

(2) 既知量添加時の SMZ 回収率

血清または尿に SMZ を添加して 49.7, 124.4 および 248.7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度とし標準液との間で回収率を求めた。回収率は 76.7~100.8% であり、それらの平均は、血清では 86.2%，尿では 95.1% であった (Table 1)。

(3) 検体の保存方法

8例において -20°C で冷凍保存前後の acetylation ratio を測定した。この結果、その値に変動はほとんどみられず冷凍保存後の測定は十分に可能であると思われた (Fig. 3)。

(4) SMZ 負荷後の経時的濃度変化

SMZ 負荷後の血清および尿中濃度を経時的に測定した結果、血清中の濃度は3時間でやや高値となったものの全経過中ほとんど変化がみられなかった。尿中の濃度は3時間以降ほぼ plateau となった (Fig.

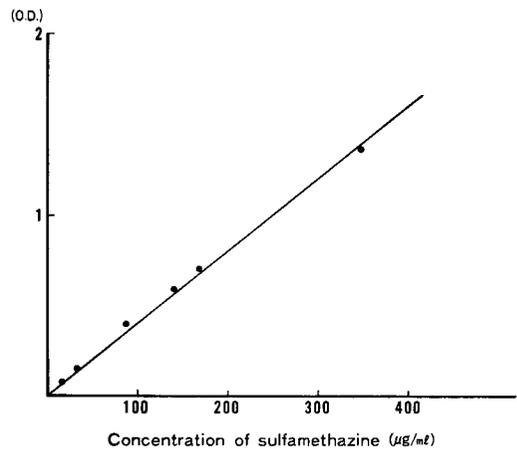


Fig. 2. Standard curve for sulfamethazine

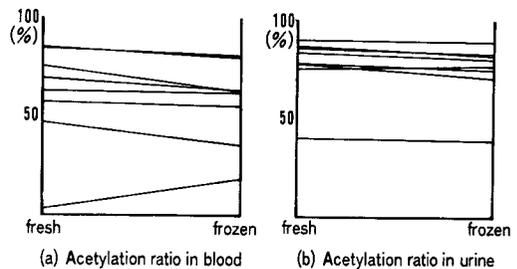


Fig. 3. Differences of acetylation ratio between fresh and frozen samples in the same cases (N=8)

4). 以上の結果より、Weber and Brenner の方法と同様に SMZ 負荷後 4.5 時間で検体を採取することとした。

(5) Phenotype の分布

全症例 144 例の測定結果を Fig. 5 に示した。

横軸に血清中、縦軸に尿中のアセチル化率をとりグラフ上にプロットすると回帰直線 $y = 0.59x + 45.27$,

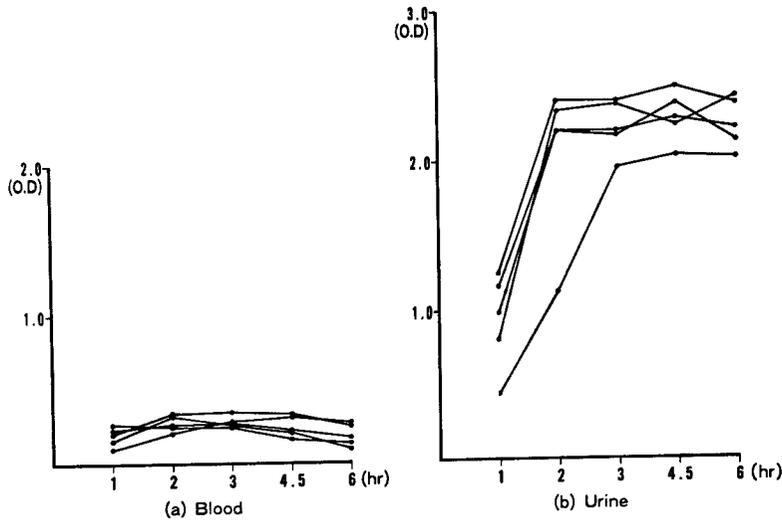


Fig. 4. Total sulfamethazine values in blood and urine after administration (N=5)

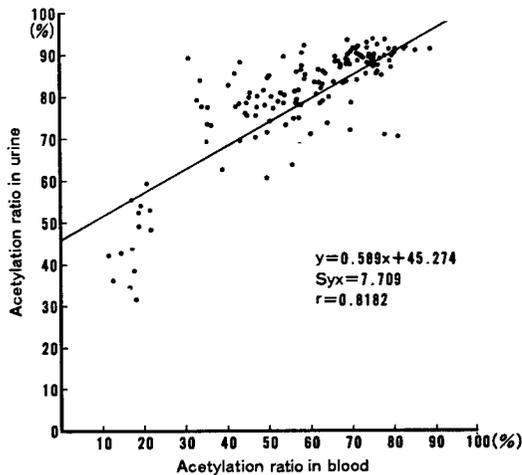


Fig. 5. Acetylation ratio of blood and urine in whole subjects (N=144)

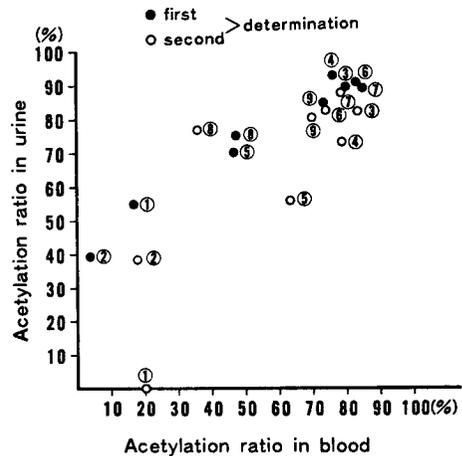


Fig. 6. Re-evaluation of N-acetyltransferase phenotype (N=9)

相関係数 $r=0.82$ となり、両者の間には比較的良好な相関関係が認められた。これらはグラフ上より2群に大別することが可能であると考えられた。すなわち、血清および尿中の値が共に低いものを slow type、両者が高値を示すものを rapid type とした。

このうち9例で1週間以上間隔をあけてアセチル化率を2度測定した。その結果、若干の変動はみられるものの slow type と rapid type との間を移行する例はみられず、測定方法および phenotyping に問題は無いと思われた (Fig. 6)。

個々の群における phenotype の分布を Fig. 7a~d に示したが、これらをまとめると Table 2 の如くと

なった。slow type の頻度は全症例 144例中では16例、11.1%を占めており、個別にみると正常対照群25例中1例(4.0%)、検診群57例中10例(17.5%)、自然発生尿路上皮腫瘍患者群42例中3例(7.1%)、職業性尿路上皮腫瘍患者群20例中2例(10.0%)であった。

その頻度は、自然発生および職業性尿路上皮腫瘍患者群の方が正常対照群に比し高い傾向がみられたものの、これら間およびその他の各群間で統計学的に有意な差は認められなかった。

考 察

Benzidine, 2-naphthylamine や 4-aminobiphenyl

などの arylamine の曝露による尿路腫瘍、いわゆる職業性尿路腫瘍の発生については、1895年の Rehn の提唱以来、種々の疫学的調査がなされてきている。また、1938年、Hueper ら⁹⁾ は犬に 2-naphthylamine を皮下注射および経口投与し16匹中13匹で膀胱内に前癌あるいは癌病変を作り得たと報告している様に、これらの化学物質の発癌性に関しては、既に、種々の動物実験でも確められているところである。

しかしながら、未だその発癌機序については不明な点が多く残されている。Radomski ら⁷⁾ は N-hydroxy-2-naphthylamine を犬の膀胱内に注入することにより4匹中3匹に papillary transitional cell carcinoma の発生を認めたが、2-naphthylamine 自体を注入し

ても腫瘍の発生を認め得なかったことから arylamine の発癌 step において、N-hydroxylation が重要であることを示唆した。

更に、これに尚 esterification が必要である^{8,9)} との考え方が述べられるなどその詳細に関しては今後の研究を待たねばならないところである。

翻って、肝の N-acetyltransferase enzyme system は arylamine による膀胱発癌の過程でその発癌物質の活性化を防ぐなど解毒機構の一環として働きうると考えられ、膀胱癌患者におけるそれらの関連性についての報告もみられる。

Lower ら⁶⁾ は、arylamine や isoniazid と同様に

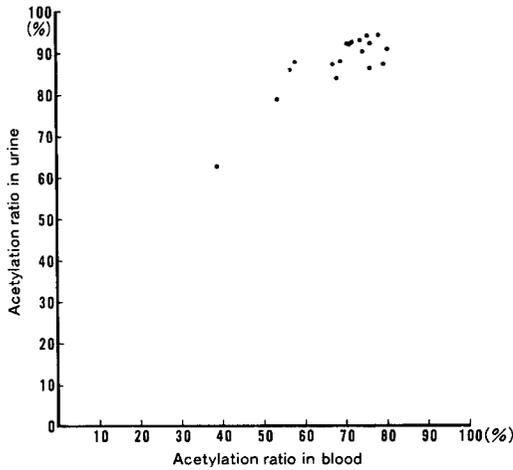


Fig. 7a. N-acetyltransferase phenotype distribution in normal subjects (N=25)

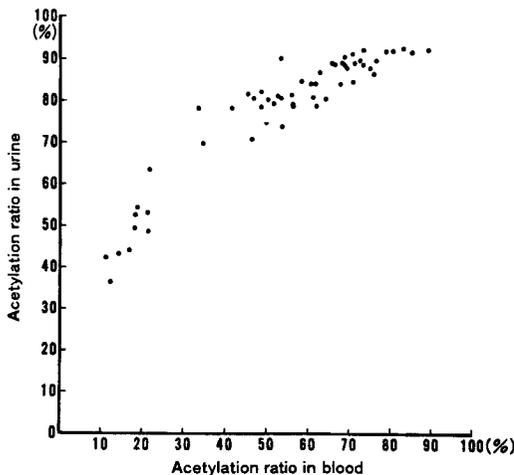


Fig. 7b. N-acetyltransferase phenotype distribution in chemical workers (N=57)

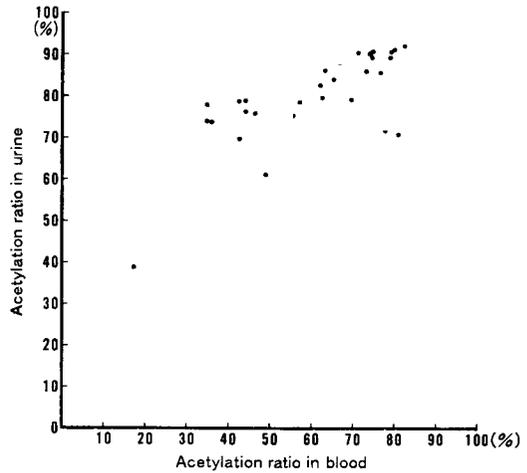


Fig. 7c. N-acetyltransferase phenotype distribution in patients with spontaneous urothelial cancer (N=42)

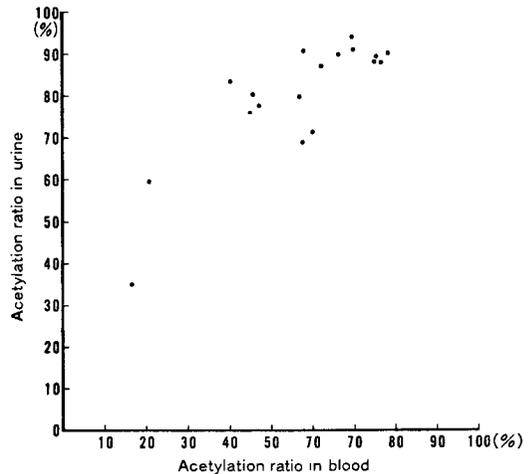


Fig. 7d. N-acetyltransferase phenotype distribution in patients with occupational urothelial cancer (N=20)

Table 2. N-acetyltransferase phenotype distribution

Population	Number	Age (Mean)	Acetylation ratio in Blood % (Mean \pm SD)	Acetylation ratio in Urine % (Mean \pm SD)	Slow acetylator phenotype (%)
Control	25	37.2			
Slow	1		16.9 \pm 0	55.2 \pm 0	4.0
Rapid	24		64.3 \pm 13.5	86.6 \pm 6.6	
Chemical worker	57	59.8			
Slow	10		18.2 \pm 3.5	48.3 \pm 7.2	17.5
Rapid	47		62.3 \pm 12.7	83.4 \pm 5.9	
Spont. urothelial ca.	42	65.7			
Slow	3		21.4 \pm 4.2	41.4 \pm 9.5	7.1
Rapid	39		59.9 \pm 15.5	79.8 \pm 6.0	
Occup. urothelial ca.	20	58.4			
Slow	2		19.2 \pm 3.0	46.8 \pm 17.4	10.0
Rapid	18		60.5 \pm 11.7	82.4 \pm 7.5	
Total	144				11.1

N-acetyltransferase でアセチル化される SMZ を用いデンマークの Copenhagen とスウェーデンの Lund において膀胱癌患者の acetylator phenotype を調べ、slow acetylator の占める割合は Copenhagen では正常対照群74例中38例 (51%) であるのに対し、膀胱癌患者では71例中46例 (65%) であり両者間に有意差があったと報告し、膀胱癌の発生には arylamine が関与しており、かつ slow acetylator がそれらの arylamine により誘発される膀胱癌に罹患しやすい危険性を有することを示唆している。

Cartwright ら¹⁰⁾の報告では、111人の膀胱癌患者における slow type の頻度は対照群に比し高いものの有意差はみられなかったが、その患者群を職業別に分けると染料工場に従事したことのある膀胱癌患者23例のうち22例 (96%) は slow type であり、他の患者群および対照群との間には著明な差が認められ、slow type のものは arylamine の被曝による影響が大きいと考えられる興味深い結果が示されている。

また、逆に、Miller and Cosgriff¹¹⁾ は26人の膀胱癌患者と26人の正常対照群について検討し、各々の slow type の頻度は46%と69%であり、むしろ前者の方が低く、職業上、発癌物質に被曝したと思われる15人においても6人 (40%) が slow type であったにすぎず、Cartwright らとはいささか異なる結果を報告している。このように各報告者の結果には相違がみられるが、最近、Mommsen ら¹²⁾はこれまでの報告を集計し、膀胱癌患者681例における slow acetylator の頻度は65%であり、対照群991例におけるその頻度が59%であるのに比し有意に高く、この分野での更なる検討の重要性を強調している。

更に、Das ら¹³⁾は表在性膀胱腫瘍を有する患者を追跡した結果、slow type のものが、将来、浸潤性になり易い傾向があるという興味深い報告を記載している。

著者の今回の検討では、slow type の頻度は、144例中16例で11.1%にすぎず、各群別にみると正常対照群では25例中1例、4.0%で、最も高かった検診群でも17.5%であった。これは Harris ら¹⁴⁾によりなされた日系人とヨーロッパ系人種にわたっての検討、更には Sunahara ら¹⁵⁾の isoniazid を用いた日本人全般についての研究において slow acetylator phenotype を呈する頻度が、日本人では欧米人に比し低く、10%強であるとしているのとよく一致するところである。

Slow type の頻度は腫瘍患者群の方が対照群に比して高かったものの有意差はみられず、最も高値が予測された職業群でさえも10%と低かったのは本邦における slow type の頻度が欧米人に比し著しく低いためにその差が生じ難かったのであろうと考えられるが、他方、acetyltransferase は arylamine を解毒する因子であるといわれているものの膀胱癌の発生には、尚、複雑な種々の環境因子の関与がより大きいことを物語っているのかも知れない。

著者は Weber and Brenner に準じた方法で SMZ を用い服薬4.5時間後の血清および尿中のアセチル化率を測定し両者の値をグラフ上にプロットして phenotype を分類したが、両者の値は比較的良好に相関しており、血清中の値のみで type を分けることも可能であると思われる。

Cartwright らや Das らは Dapson を投与し薄層クロマトグラフィーで、Whelpton ら¹⁶⁾は SMZ を用

い液体クロマトグラフィーで、血清中のアセチル化率のみを測定することにより phenotype を決定しているが本邦のような slow type の頻度が少ない場合には出来るだけ多くの症例での検討が必要のために測定法の簡便化がより重要なことと思われる。

結 語

尿路上皮腫瘍患者及び健康人において、SMZ を用いる Weber and Brenner の方法に準じて N-acetyltransferase phenotype を検討し次の結果を得た。

1. Slow acetylator phenotype の頻度は、全体では 144 例中 16 例 (11.1%) であり、各群別にみると正常対照群 25 例中 1 例 (4.0%)、検診群 57 例中 10 例 (17.5%)、自然発生尿路上皮腫瘍患者群 42 例中 3 例 (7.1%) および職業性尿路上皮腫瘍患者群 20 例中 2 例 (10.0%) であった。

2. Slow type の頻度は、腫瘍患者群の方が正常対照群より高い傾向がみられたものの有意な差は認められなかった。これは本邦における slow type の頻度が 10% 前後と欧米人に比して極めて低いことに起因すると考えられた。

3. N-acetyltransferase は arylamine を解毒する因子であるといわれているものの膀胱癌の発生には、尚、複雑な種々の環境因子が関与しているであろうと推察された。

尚、本論文の要旨は第 72 回日本泌尿器科学会総会、第 113 回日本泌尿器科学会関西地方会において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師大川順正教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導をいただいた戎野庄一講師、中村順講師、貴重な検体を提供していただいた和歌山労災病院泌尿器科藤永卓治部長に深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生大臣官房統計情報部：昭和 58 年人口動態統計，上巻，1：p196～211
- 2) 厚生統計協会：厚生 の 指 標，国民衛生の動向。昭和 59 年特集号，p58～61
- 3) Lower GM Jr, Nilsson T, Nelsen CE, Wolf H, Gamsky TE and Bryan GT: N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: Approaches in molecular epidemiology. preliminary results Sweden and Denmark. *Env Health Perspect* **29**: 71～79, 1979
- 4) Drayer DE and Reidenberg MM: Clinical

consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. *Clin Pharmacol Ther* **22**: 251～258, 1977

- 5) Weber WW and Brenner W: A filter paper method for determining isoniazid acetylator phenotype. *Am J Hum Genet* **26**: 467～473, 1974
- 6) Hueper WC, Wiley FH and Wolfe HD: Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of beta-naphthylamine. *J Ind Hyg Toxicol* **20**: 46～84, 1938
- 7) Radomski JL, Brill E, Deichmann WB and Glass EM: Carcinogenicity testing of N-hydroxy and other oxidation and decomposition products of 1- and 2-naphthylamine. *Cancer Res* **31**: 1461～1467, 1971
- 8) Miller JA and Miller EC: The metabolic activation of carcinogenic aromatic amines and amides. *Progr exp Tumor Res* **11**: 273～301, 1969
- 9) Clayson DB and Cooper EH: Cancer of the urinary tract. *Adv Cancer Res* **13**: 271～381, 1970
- 10) Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E and Kahn MA: Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: A pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* **2**: 842～846, 1982
- 11) Miller ME and Cosgriff JM: Acetylator phenotype in human bladder cancer. *J Urol* **130**: 65～66, 1983
- 12) Mommsen S, Barfod NM and Aagaard L: N-acetyltransferase phenotypes in the urinary bladder carcinogenesis of a low risk population. *Carcinogenesis* **6**: 199～201, 1985
- 13) Das G, Buxton NJC and Glashan RW: Invasive potential of superficial bladder cancer. A study of the relative merits of predictive parameters. *Brit J Urol* **57**: 32～36, 1985
- 14) Harris HW, Knight RA and Selin MJ: Comparison of isoniazid concentrations in the blood of people of Japanese and European descent. Therapeutic and genetic implications. *Am J Tuberc Pulm Dis* **78** :

944~948, 1958

15) Sunahara S, Urano M and Ogawa M: Ge-
netical and geographic studies on isoniazid
inactivation. Science 134: 1530, 1961

16) Whelpton R, Watkins G and Curry SH :

Bratton-Marshall and liquid-chromatographic
methods compared for determination of
sulfamethazine acetylator status. Clin Chem
27: 1911~1914, 1981

(1986年4月1日迅速掲載受付)



アレルギー性疾患 慢性肝疾患に……

■グリチルリチン製剤

強力ネオミノファーゲン

健保略称 強ミノC

●作用
抗アレルギー作用、抗炎症作用、解毒作用、インターフェロン誘起作用、および肝細胞障害抑制・修復促進作用を有します。

●用法・用量 1日1回、1管(2ml, 5ml, または20ml)を皮下または静脈内に注射。
症状により適宜増減。
慢性肝疾患には、1日1回、40mlを静脈内に注射。年齢、症状により適宜増減。

●適応症
アレルギー性疾患(喘息、蕁麻疹、湿疹、ストロフルス、アレルギー性鼻炎など)。食中毒。薬物中毒、薬物過敏症、口内炎。
慢性肝疾患における肝機能異常の改善。

包装 20ml 5管・30管, 5ml 5管・50管, 2ml 10管・100管
*使用上の注意は、製品の添付文書をご参照下さい。

●内服療法には



錠二号

包装 1000錠, 5000錠

健保適用


 合資会社 ミノファーゲン製薬本舗 (〒160) 東京都新宿区四谷3-2-7