

膀胱腫瘍の発生機構にかんする実験的研究

—とくに tryptophan および肝機能の役割について—

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：加藤篤二教授）

原 田 卓

EXPERIMENTAL STUDIES ON TUMORIGENESIS OF THE
URINARY BLADDER WITH SPECIAL REFERENCE TO
THE ROLE OF TRYPTOPHAN AND LIVER FUNCTION

Takashi HARADA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Chairman: Prof. T. Kato, M. D.)*

Young male rats of Wistar strain were divided into several experimental groups, each consisting of 30 animals, and fed on different diet as follows:

Group A: vitamin B₆ deficient basal diet with 0.04% 2-acetylaminofluorene (2-AAF)

Group B: same as group A plus 1.4% *d, l*-tryptophan

Group C: same as group B plus sufficient quantity of vitamin B₆ (pyridoxal phosphate).

The animals of each group were sacrificed at 9, 15 and 30 weeks. Various organs including the bladder and liver were histologically examined. Calculation of labeling index of ³H-TdR(6-nT) uptake by the urinary bladder mucosa as well as measurement of liver function by indocyanine green test (I. C. G. test) was accomplished. Orally given 2-AAF gave typical damages to the liver within 9 weeks, causing cystic formation, hyperplastic nodule and proliferation of tubular duct with fibrosis. Some significant relationships were observed among relative weight of the liver, I. C. G. test and labeling index of the bladder mucosa.

On the other hand, the bladder epithelium turned its nature as time goes on and the epithelial hyperplasia was observed 15 weeks after initiation, then some of them altered to papillary tumor of the bladder. There must be more complicated factors between hyperplasia and cancer formation which is an irreversible process. There was apparently negative correlation between serum retention rates of I. C. G. and labeling indices of the bladder mucosa at 15 and 30 weeks in each group.

This suggests presence of some activation mechanism in the rat which will metabolite carcinogens to more proximate substances by passing through liver cells. The mechanism may be consistent with so-called "liver-bladder axis" which Melicow and others advocated previously.

Although tryptophan-annexed diet in group B and C gave a protecting effect to the liver against 2-AAF, vitamin B₆ seemed not to ensure a role of liver defense.

緒 言

膀胱腫瘍の発生機構において尿中 tryptophan 代謝産物が何らかの役割を果しているであろうことは、多くの研究者の支持するところではあるが、この説を支

持する確定的な根拠はなく、反論も少なくない現在、いまだに未解決の重要な課題であるといえる。また自然発生膀胱腫瘍の発生要因を、tryptophan 代謝に求めることですべてを説明することはできず、さらに多くの要素の集積が腫瘍発生に至らしめるものと考えら

れる。さらに発がん要因となる外的因子、とくに化学発がん物質が生体内で近位発がん物質 (proximate carcinogen) として活性化されたうえ標的臓器に非可逆的变化を与えることが明らかとなっているが、その過程における肝のはたらきは重要な意味をもつものであって、発がん機構を考察するうえにおいても等閑視することはできない。しかし、肝機能の変化が腫瘍発生におよぼす影響についての知見は、膀胱の発がんについてはもとより、一般に化学発がんについてもきわめて乏しいところである。

膀胱腫瘍の発生機構の研究において、この二つの課題——尿中 tryptophan 代謝産物の膀胱腫瘍発生における役割と肝機能の変化の化学発がん物質による膀胱腫瘍発生におよぼす影響——は、とくに重要なものであると考えられる。

これらの課題をさらに解明する目的で、強力な肝発がん物質であると同時に、膀胱その他の臓器に対しても多種多様な腫瘍を発生させることが知られている芳香族炭化水素化合物のうちのひとつである 2-acetylaminofluorene (2-AAF) を用いて実験的研究をおこなった。

ラットに 2-AAF を投与したばあい、尿中 tryptophan 中間代謝産物の排泄にも影響を与え、過剰に排泄された tryptophan 中間代謝産物が膀胱腫瘍発生を促進させる可能性についても指摘されている。こうした腫瘍発生要因の相互関係、とくにラットに対する 2-AAF 投与実験における肝機能が膀胱腫瘍発生に与える影響、および tryptophan 代謝に関して、tryptophan の過剰投与による膀胱腫瘍発生におよぼす影響、またアミノ酸転移酵素の補酵素 (coenzyme) である vitamin B₆ を同時に投与した場合、2-AAF によってうけた代謝のみだれが正常化されるか否かという添加効果の有無につき検討した。

実験方法

生後約 4 週経過、体重約 125 g、Wistar 系雄ラット 30 匹を 1 グループとして、実験食を投与した A、B、および C 群と対照群との合計 4 群を設定した。実験食の内容は Table 1 に示すような献立であって、対照群には日本クレア社 CE-2 固型普通食を与えた。実験食の主体をなす vitamin B₆ 欠乏基礎食餌組成は Table 2 に示す。これは casein を基礎として各種添加物を加えたうえ、Table 2 下段に示した塩類を加えたものである。また実験食に 0.04% の割合で加えられた 2-AAF は GR 標品 (半井化学 KK) を用いた。

実験開始後 9、15 および 30 週経過時に各群の実験動物の一部、おのおの 10 匹ずつを屠殺して病理組織学的

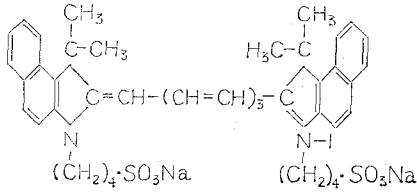
Table 1. 実験食組成

実験食 A.	ビタミン B ₆ 欠乏基礎食餌に 2-AAF 0.04 重量パーセント添加
実験食 B.	上記の A. に <i>d, l</i> -tryptophan 1.4 重量パーセント添加.
実験食 C.	上記の B. に vitamin B ₆ (pyridoxal phosphate) 8 mg/kg 添加.

Table 2. ビタミン B₆ 欠乏基礎食餌組成表

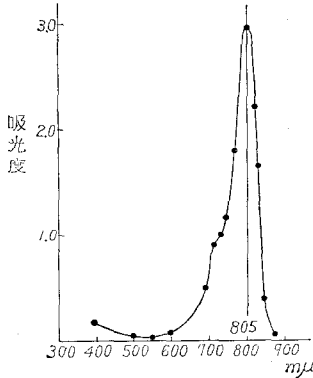
i) Basal diet	
Vitamin-free casein	240gm/kilogram diet
Glucose	570
Salt mixture (McCullum's salt)	40
Soybean oil	100
Niacin	20mg/kilogram diet
Riboflavin	6
Thiamine HCl	4
Ca-pantothenate	20
PABA	50
Biotin	0.1
V. B ₁₂	0.1
Folic acid	0.5
Inositol	0.3gm
Choline-HCl	1.0gm
V. A.	30,000IU
V. D. (D ₂ ~D ₃)	10,000IU
V. E-acetate	90mg
V. K ₃	1mg
ii) Salt mixture (McCullum's salt)	
Na ₂ HPO ₄	2.0 gm/kilogram diet
Fe-citrate	1.0 gm
CaHPO ₄ ·Aq.	5.0 gm
Ca-lactate	13.0 gm
KH ₂ PO ₄	11.0 gm
KCl	1.5 gm
NaCl	0.5 gm
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 gm
KI	0.3 gm

検索をおこなうとともに、肝機能の測定は indocyanine green-test (ICG-test) によりおこなった。(indocyanine green 試薬は第一化学薬品 KK 製を用いた). ICG の構造式、血漿蛋白結合時における吸光度曲線、および血中消失曲線 (ヒトにおける理論曲線) を Fig. 1, 2 に示す。ラット尾静脈より ICG を体重 kg 当り 1.0 mg の割合で水溶液として注入し、経時的に採血したうえ、蛋白結合型 ICG 濃度を波長 805 m μ にて吸光度を測定し、別にあらかじめ用意した検量曲線より求

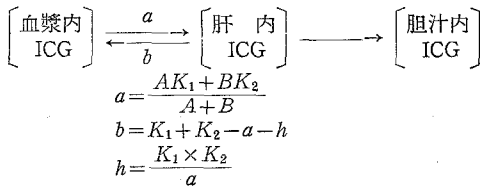


Indocyanine green (ICG) の構造式
分子量: 924.49 (C₄₃H₄₇N₂O₆S₂Na₂I)

血漿中における吸光度曲線



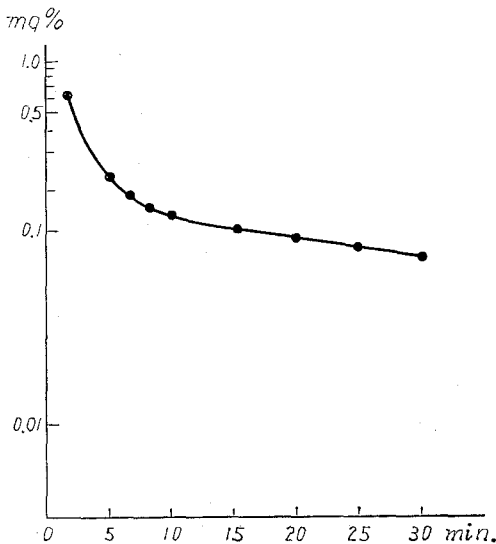
Indocyanine green exchange compartment model



ただし, A, B, K₁, K₂ は常数
理論消失曲線 $C = Ae^{-K_1t} + Be^{-K_2t}$

Fig. 1. Indocyanine green の化学的性状

家兔における血中消失曲線



血中消失曲線の理論式

$$C = Ae^{-K_1t} + Be^{-K_2t}$$

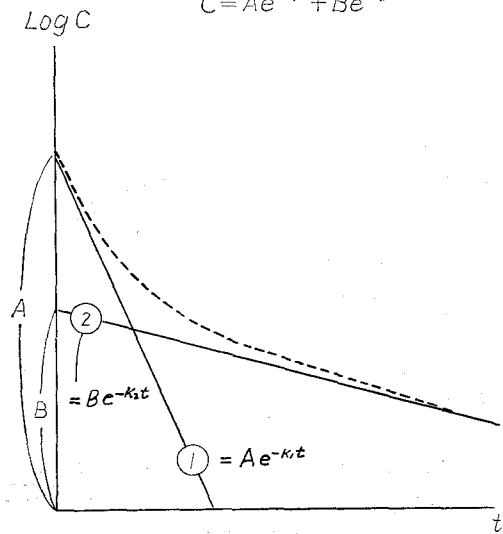


Fig. 2. Indocyanine green 血中消失曲線

めた。(吸光度測定には Shimadzu-Spectronic 20 吸光度計を用いた)。ラットの全血漿量 (total plasma volume) を 50 ml と仮定すると、注入後10分経過時の血中 ICG 停滞率はつぎのように示される。

$$R_{(10)} = \frac{C_{10}}{C_0} \times 100 = \frac{C_{10}}{2.0} \times 100 (\%)$$

ただし C₀, C₁₀ はそれぞれ注入直後および10分経過時の血漿内濃度を示す。

肝および膀胱粘膜上皮細胞への ³H-TdR (tritium thymidine) のとりこみを観察するため、³H-TdR (6-nT) を体重 g 当り 1.0 μC の割合にて生理的食塩水溶液 1.0 ml に溶解し、屠殺60分前に腹腔腔内へ注入した。

ラットは実験当日午後1時—4時の間にエーテル麻醉のうへ、体重測定をおこない、一連の操作として、³H-TdR および ICG の注入をおこない、³H-TdR 注入後60分経過時に採血をおこなった。体内各臓器は摘出後ただちにホルマリン固定をおこなったが、膀胱、睪丸および副睪丸についてはブアン氏固定液を用いた。膀胱および肝組織はパラフィン包埋のうへ組織切片を作成し、Kodak NTB-2, emulsion による dipping 法によってオートラジオグラフィー標本を得た。4°C 冷蔵庫内で3週間露出したのち現像定着操作のうへ、H-E 染色をおこなった。また、その他の組織学的検索のため、体内臓器のうち肝、脾、副腎、腎、肺について染色標本を作成した。H-E 染色のほか肝については Orcein, Van-Gieson, Azan-Marolly および鍍銀染色をおこなった。オートラジオグラフィー標本の観

察は膀胱前後横断切片を作成し、1検体当たり約5,000個の膀胱粘膜細胞について標識細胞数をかぞえて標識指数 (labeling index) を求めた。ただし標識細胞は銀粒子5 μ 以上をみとめるものとした。また膀胱頸部粘膜細胞で5層以上の細胞層が集積して認められる膀胱頸部肥厚層については計数より除外した。

実験結果

1. 実験食投与ラットの体重変化

実験開始時のラット平均体重は Table 3, Fig. 3に示したように約125gであった。実験食AまたはBを投与した群においては実験開始後2~4週間目には体

Table 3. 実験動物平均体重の推移

実験開始時の平均体重 (単位 gm)	
Initial body weight : 125.1 \pm 27.0 (\bar{M} \pm SD) gm	
第9週目	A : 268.7 \pm 55.1
	B : 249.2 \pm 26.4
	C : 271.0 \pm 62.8
	対照群 : 351.6 \pm 30.5
第15週目	A : 384.2 \pm 48.8
	B : 396.6 \pm 36.3
	C : 421.2 \pm 54.8
	対照群 : 463.8 \pm 54.4
第30週目	A : 340.0 \pm 9.9
	B : 353.3 \pm 48.3
	C : 336.0 \pm 56.1
	対照群 : 556.6 \pm 54.3

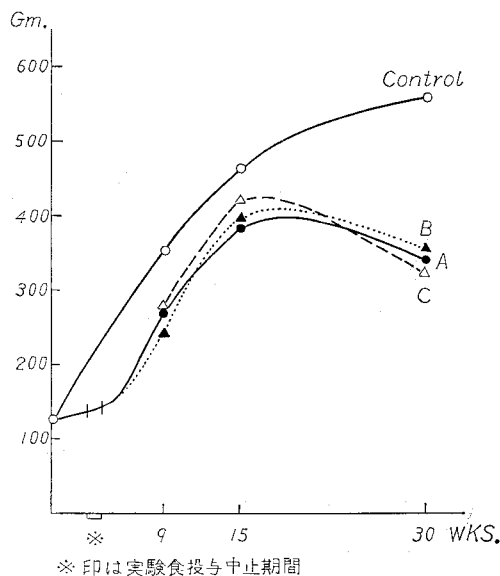


Fig. 3. 実験動物の体重変化

重増加が認められなくなり脱毛などの皮膚症状すなわち vitamin B₆ 欠乏症と考えられる所見がみられた。この時点ではラットの感染症に対する防御能力の低下も著しく、この状態のまま 2-AAF を含む実験食を投与するとさらに肝障害も加わるため死亡する動物が多くなった。そこで第4週目の1週間のみ普通固型飼料を与えておくと上記の諸症状も改善され、以後の実験食継続投与にも耐えることができた。この体重増加の停滞時期をこえると、以後は比較的体重増加が変動なくみとめられる。とくに tryptophan 添加群である B, C 群において、より体重増加がすみやかであった。しかし実験食投与群は対照群に比較すると全期間をとおして体重が軽く、これらの実験食がラットの発育に対して抑制的に作用したことは明らかである。

つぎに摘出した体内臓器のうち精巣、腎臓、脾臓の摘出時重量の各週別、各群平均値は Table 4 に示す。

Table 4. 剖検時臓器重量 (各群平均値)
精巣, 腎, 脾, 左右をふくめた重量 (単位 gm)

	精 巣	腎 臓	脾 臓
第9週目			
A	2.34	2.63	0.65
B	1.85	2.40	0.68
C	2.45	2.35	0.73
対 照 群	2.94	2.52	0.60
第15週目			
A	1.90	2.66	0.72
B	2.30	2.76	1.02
C	2.55	2.95	0.81
対 照 群	2.86	3.60	0.86
第30週目			
A	1.65	3.36	1.01
B	1.74	3.11	1.55
C	1.37	3.94	1.11
対 照 群	2.51	3.51	0.80

2-AAF を含む実験食投与をうけた各群に共通な変化としては肝重量の変化があげられる。肝について比較検討を容易にするため、各群15および30週目の肝重量平均値と対体重比を Table 5 に示す。これらの結果より明らかなことは、実験食投与群においては肝重量が対照群に比して著明に増大していることである。これは 2-AAF 添加によるものと考えられるが Table 5 に示す肝重量の対照比についてみると、BおよびC群において、A群より肝腫大が比較的軽度である場合もみられることから、tryptophan 添加による肝保護作用を考慮すべきである。

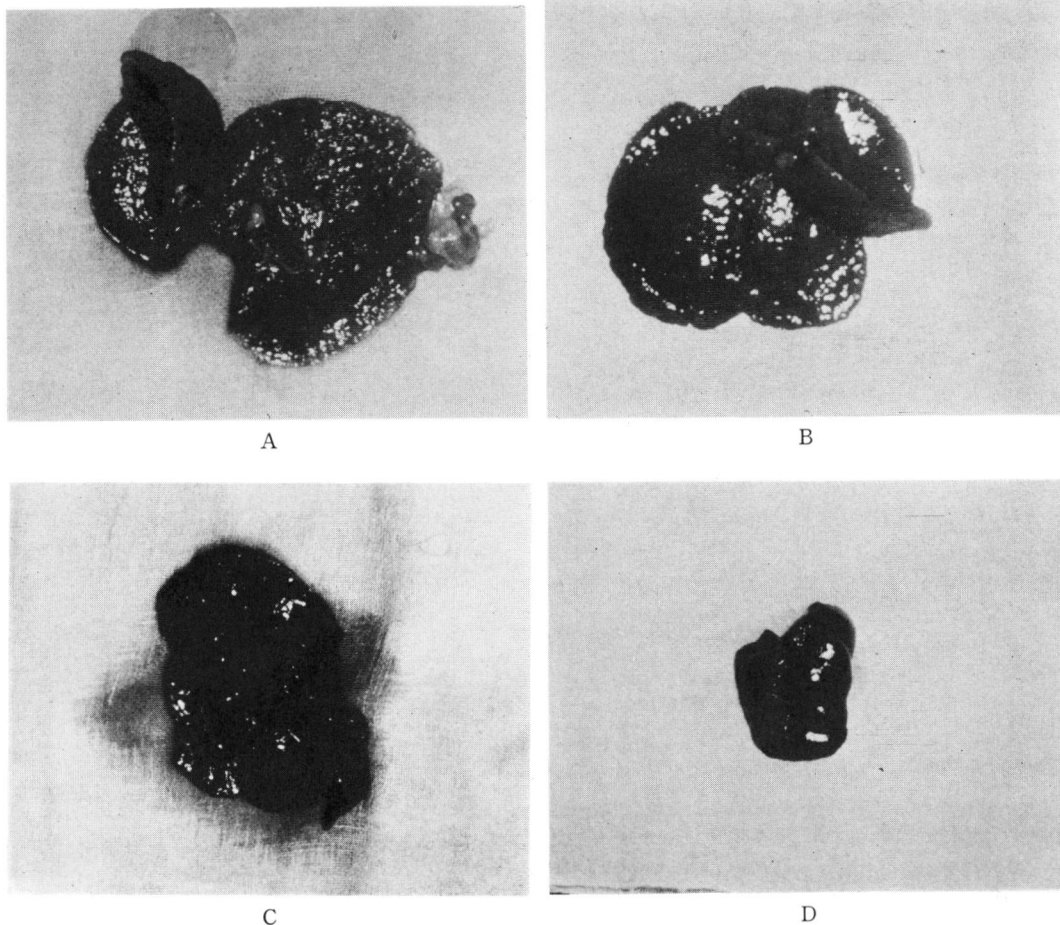


Photo. 1. 第30週目における適出肝にみられた外観上の変化
 Aは実験食Aを与えたもの、B, Cもそれぞれ実験食B, Cを与えたものである。
 Dは対照群の肝であり写真はそれぞれ同一の縮尺にて撮影され、いかに肝腫大
 が著しいかがわかる。

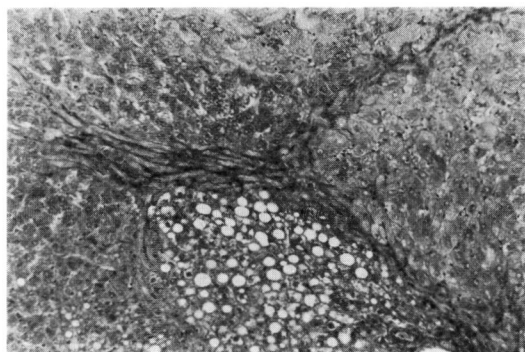


Photo. 2. 結合織増生を伴う細胞管によって肝実質
 細胞は分断されていわゆる hyperplastic nodule
 を形成する。細胞変性も著しい。
 (H-E 染色, ×150)

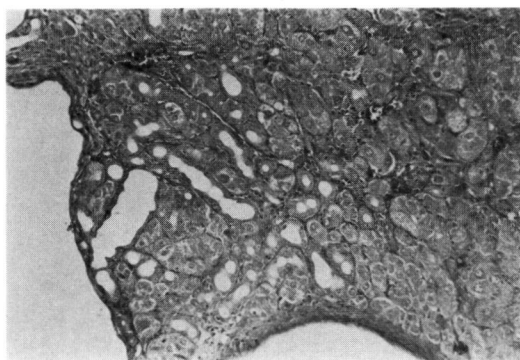


Photo. 3. 腺性化生を示す肝細胞癌がみられる。
 (H-E 染色 ×150)

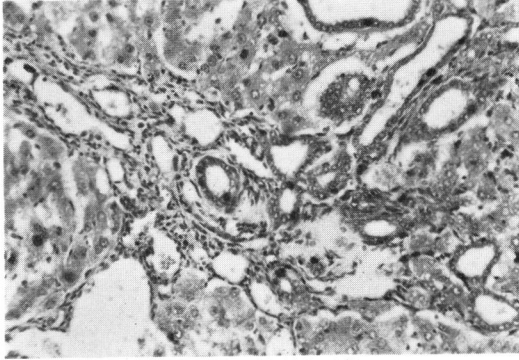


Photo. 4. 細胆管増生が著しい。
(H-E 染色, ×150)

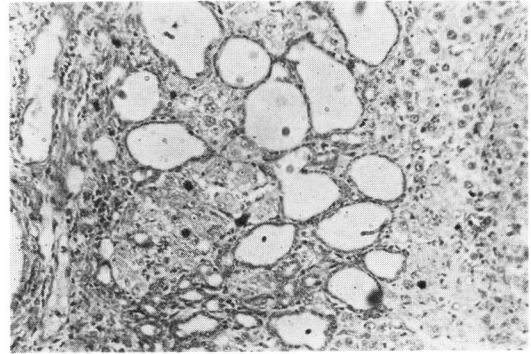


Photo. 5. 肝細胞の変性像と嚢胞形成がみられる。
(H-E 染色 ×150)

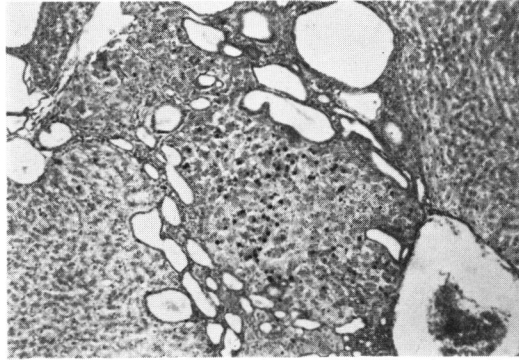


Photo. 6. 再生肝細胞において³H-TdRのとりこみが著明である。一方では細胆管増生の部分に嚢胞形成がみられる。
(H-E 染色 ×60)

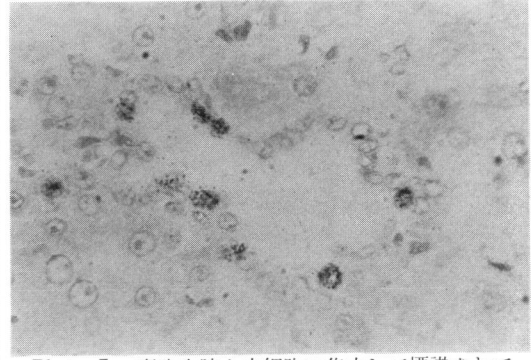


Photo. 7. 嚢胞内腔上皮細胞に集中して標識されている。
(H-E 染色 ×400)

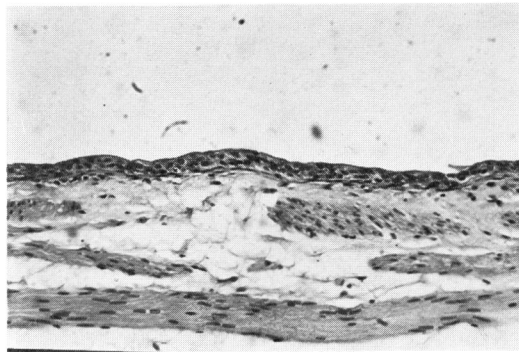


Photo. 8. 正常膀胱粘膜, 対照群30週経過時
(H-E 染色 ×150)

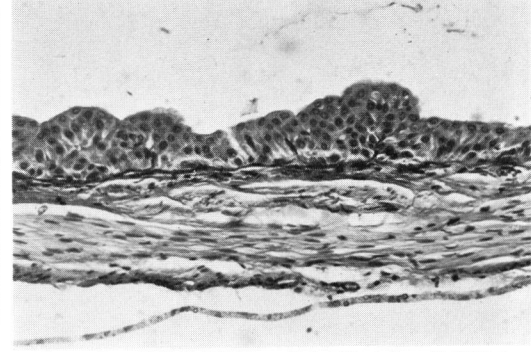


Photo. 9. 膀胱粘膜細胞の増生がみられ, 粘膜面の不規則な凹凸がみられる。
(H-E 染色 ×150)

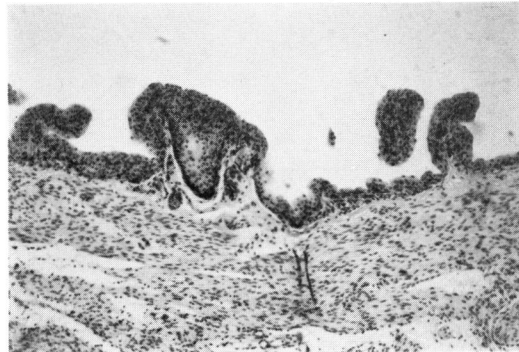


Photo. 10. 膀胱粘膜にみられた乳頭腫
(H-E 染色 ×60)

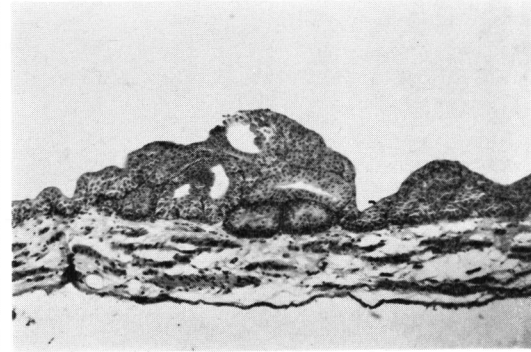


Photo. 11. 移行上皮癌
(H-E 染色 ×60)

Table 5. 肝摘出重量ならびに対体重比
(対照比は各群の対照を1.00とする)

	肝重量 ($M \pm SD$)	対体重比	対照比
第15週経過時			
	gm		
A	19.0 ± 3.9	6.2 × 10 ⁻⁴	2.03
B	20.5 ± 12.1	7.9 × 10 ⁻⁴	2.62
C	21.9 ± 4.2	5.8 × 10 ⁻⁴	1.91
対照群	14.6 ± 0.5	3.0 × 10 ⁻⁴	1.00
第30週経過時			
A	34.3 ± 5.4	10.0 × 10 ⁻⁴	4.13
B	32.4 ± 11.0	9.2 × 10 ⁻⁴	3.78
C	34.5 ± 7.9	10.2 × 10 ⁻⁴	4.19
対照群	13.7 ± 1.7	2.4 × 10 ⁻⁴	1.00

2. 膀胱腫瘍および肝腫瘍の発生状況と病理組織学的所見

Table 6 ならびに Photo. 1~11 に示したように膀胱にみられた変化は第9週目において粘膜上皮細胞の hyperplasia 3例のみであった。第15週目において papillary tumor が2例みとめられるとともに hyperplasia 4例がみとめられた。第30週目には同じく papillary tumor 4例, hyperplasia 4例がそれぞれみとめられた。なお対照群においては実験期間中を通じて膀胱における変化は全くみとめられなかった。

以上を合計すると全実験期間を通じて hyperplasia が認められたもの11例, papillary tumor の発生がみられたもの6例であった。発生した膀胱腫瘍はいずれも移行上皮由来によるものであって、膀胱周囲への浸潤もしくは遠隔転移を示したものはみとめられなかった。肝変化は第9週目以降のA群のラットには必ずみとめられる変化であったが tryptophan の添加および vitamin B₆ 添加をおこなった B および C 群においては、比較的そうした肉眼的変化の少ないものもみられた。しかし第30週目には実験食投与各群において、肝変化は普遍的にみとめられた。Table 6 下段に示すように結節性腫瘤形成、嚢胞形成および線維化を伴った細胆管増生は第15週以後の実験食投与各群に必ずみとめられる変化であった。しかし hepatoma は第9週目、C群に1例みられ、第15週目にはAおよびB群にそれぞれ1例ずつみられた。第30週目ではC群にさらに1例みられているが、cholangioma についても第30週目C群に1例みとめられた。2-AAF 投与によって生ずると思われる肝変化は組織学的には肝実質細胞の変性ならびに壊死あるいは崩壊がみられ、中心静脈周囲の細胞配列の乱れが著明である。また一方では結合織増生も著しく、これら結合織でかこまれた結節性腫

Table 6. 病理組織学的所見

i) 膀胱における変化

実験期間(週)		Hyperplasia	Bladder tumor
9	A	1	0
	B	2	0
	C	0	0
	対照群	0	0
15	A	2	1
	B	2	0
	C	0	1
	対照群	0	0
30	A	0	2
	B	3	1
	C	1	1
	対照群	0	0
Total		11	6

ii) 肝臓における変化

	Hepa- toma	Cholan- gioma	Hyper- plastic nodule	Cystic forma- tion	Ductal hyper- plasia
9	C-1	0	±	+	+
15	A-1	0	++	++	++
	B-1	0			
30	C-1	B-1	++	++	++

iii) 他臓器にみられた変化

Lymphosarcoma; 15weeks C-1
Squamous cell carcinoma of external auditory passage; 30weeks A-2

瘍がみとめられる。sinusoid には著明な細胆管増生がみられ一部には cholangioma とまぎらわしい所見もみられる。

他臓器にみとめられた変化としては、外耳道における扁平上皮癌が2例, lymphosarcoma が1例みられた。

3. オートラジオグラフィによる TdR 取込みの観察

オートラジオグラフィ標本は膀胱および肝の組織切片について作成した。膀胱粘膜細胞における ³H-TdR のとりこみは Table 7 に示すような結果が得られた。ここには観察した細胞数、標識細胞数の群別ならびに期間別の結果を示した。肝細胞へのとりこみは、肝を構成する細胞の絶対数が非常に多いこと、局所的血流分布差によって標識条件が均一にならない等の問題が考えられるため、1検体当たり約5,000個程度の細胞を観察することによって labeling index を

Table 7. ³H-TdR autoradiography による膀胱粘膜細胞の標識指数 (labeling index)

	被検細胞数 a	標識細胞数 b	標識比率 c=b/a	対照比 1/ control
第9週目				
A	13750	60	45×10^{-4}	3.00
B	7440	24	32×10^{-4}	2.13
C	10610	44	41×10^{-4}	2.73
対照群	10130	16	15×10^{-4}	1.00
第15週目				
A	22440	78	34×10^{-4}	1.61
B	25560	121	47×10^{-4}	2.23
C	10200	163	159×10^{-4}	7.57
対照群	10290	22	21×10^{-4}	1.00
第30週目				
A	10240	132	128×10^{-4}	11.65
B	15380	228	148×10^{-4}	13.45
C	10150	66	65×10^{-4}	5.90
対照群	5010	6	11×10^{-4}	1.00

求めることは意義が少ないので、ここでは³H-TdRの局在性のみを観察するにとどめた。これらの所見はPhoto. 7に示すごとくである。増生した細胞管の集合はやがて嚢胞形成にすすむが嚢胞内腔上皮にTdRが集積する傾向がみられた。同様に肝細胞の再生部位にも集積する所見がみられる。

4. ラット肝機能——ICG 停滞率による評価について

本実験の測定方法についてはすでに述べたが、それによってあらかじめ20匹の正常ラットを用いて測定した結果、ICG 注入10分後の血中停滞率正常値としてつぎのような値が得られた。

$$C_{10}; R=21.2 \pm 5.8\% (\bar{M} \pm S.D.)$$

つぎに実験群について第15および30週目に測定した結果は Table 8 に示すとおりである。

Table 8. 実験群 ICG test 結果

第15週目		
A.	ICG 10分血漿中停滞率平均	$=47.0 \pm 18.7$ ($\bar{M} \pm SD$) %
B.	〃	$=39.1 \pm 23.8$
C.	〃	$=16.0 \pm 9.0$
第30週目		
A.	ICG 10分血漿中停滞率平均	$=22.6 \pm 9.2$
B.	〃	$=16.4 \pm 3.9$
C.	〃	$=25.9 \pm 5.3$
15週目における正常ラットの ICG 10分血漿中停滞率 $=21.2 \pm 5.8\%$		

5. ラット肝の対体重比 (relative body weight ratio), ICG 注入10分後血中停滞率および膀胱粘膜細胞における³H-TdR labeling index の相互関係について

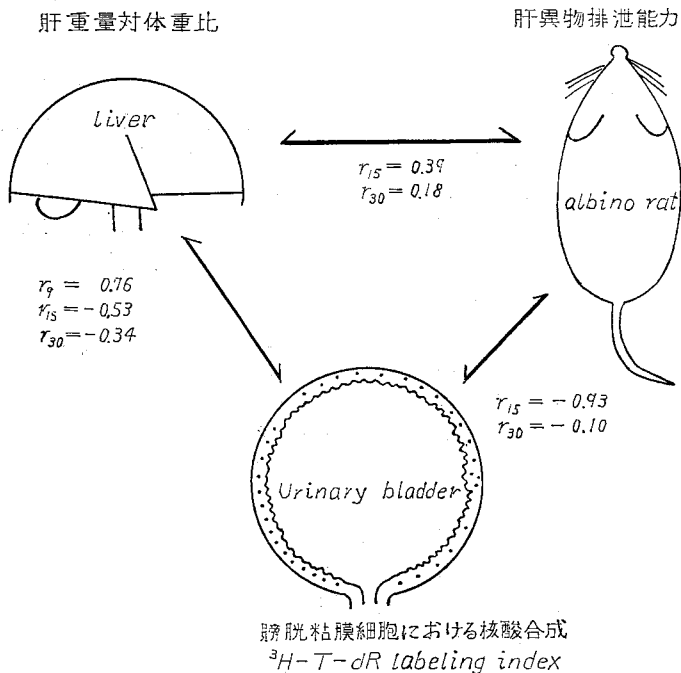


Fig. 4. 各平均値間の比較による相関関係 (r_{15} , r_{30} はそれぞれ15, 30週目における相関係数を示す) (本図の訂正: $r_{30} = -0.34$ を -0.43 に, T-dR を TdR にします)

以上の実験によって得られた形態学上の変化に関する結果と肝機能もしくは TdR とりこみによる 標識指数 (labeling index) としてとらえられた結果の間にはたがいどのような関係が存在するかという問題について検討してみると、いま得られた結果について各期間ならびに各群それぞれの間にみられる関係を相関係数 (correlation coefficient; r) として表わすことが可能である。各週ごとの測定値はいずれもパーセント (%) として示されるのでこれをそのまま無名数として取扱い、測定値間の相関係数を求めることができる。

i) 肝重量の対体重比と 膀胱粘膜標識指数 (labeling index) との関係 (Fig. 5)

- 第9週目相関係数 $r_9 = 0.76$ ($p < 0.10$)
- 第15週目相関係数 $r_{15} = -0.53$ ($p < 0.10$)
- 第30週目相関係数 $r_{30} = -0.43$ ($p > 0.10$)

すなわち肝重量の増加と膀胱粘膜における TdR のとりこみは第15週目以降には負の相関を示す。いいかえるならば、第15週目以後では肝障害の程度が軽いほど膀胱粘膜における核酸合成がさかんであることを示す。

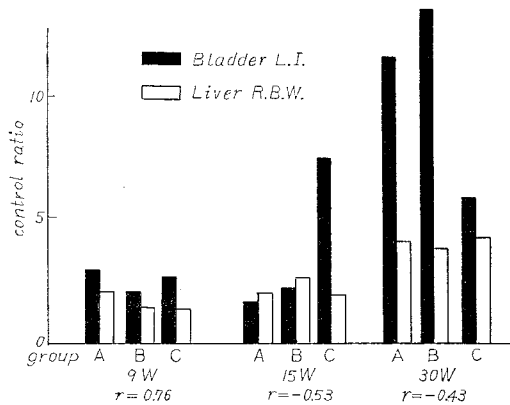


Fig. 5. Bladder mucosal L.I. and relative body weight.

ii) 肝重量の対体重比と ICG 10 分後血中停滞率との関係 (Fig. 6)

- 第15週目相関係数 $r_{15} = 0.39$ ($p > 0.10$)
- 第30週目相関係数 $r_{30} = 0.18$ ($p > 0.10$)

ICG 停滞率が高いことは肝における異物排泄能力が低下していることを意味するから、肝重量の増加と正の相関を示しても当然であるが、ここでは $x = t_n$ (0.10) = 1.796, r_{30} での $t = 1.430$ であって有意水準 0.10 で棄却できない。すなわちこの結果のみでは相関を立証できない。

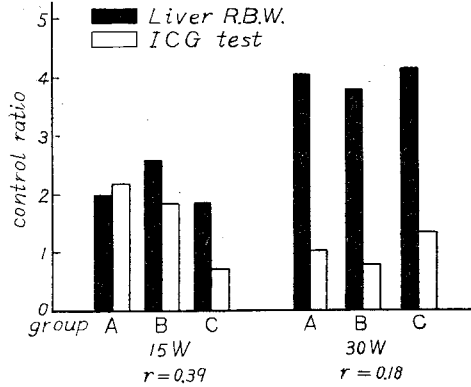


Fig. 6. Liver relative body weight and ICG result.

iii) 膀胱粘膜標識指数 (labeling index) と ICG 10 分後血中停滞率との関係 (Fig. 7)

- 第15週目相関係数 $r_{15} = -0.93$ ($p < 0.05$)
- 第30週目相関係数 $r_{30} = -0.10$ ($p > 0.10$)

変動幅が大きいものの、第15週目および第30週目いずれも負の相関を示している。肝における異物排泄能力が低下しているときには膀胱粘膜における TdR とりこみが減少し、核酸合成がさかんでないことを示している。これは i) にみられた結果と一致する。

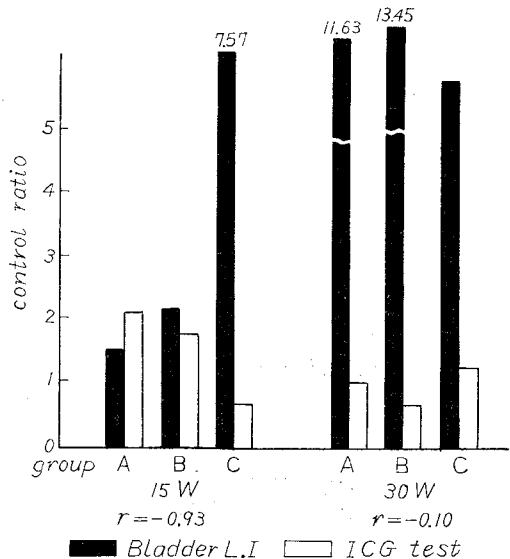


Fig. 7. Bladder mucosal L.I. and ICG result.

考 按

1895年 Rehn の芳香族アミンによると考えられた職業性膀胱腫瘍の報告以来、2-naphthylamine について benzidine, 4-aminodiphenyl といったヒトの膀胱に対

して明らかにがん原性を有している芳香族アミンが相次いで発見され、またその発がん機構が生化学的に詳しく究明されている(1より引用)。しかしヒトの膀胱がんの発生要因のすべてをこれらの芳香族アミンで説明することはできない。膀胱がん発生の機構を求めて数多くの検索がなされたなかで、膀胱あるいは尿路上皮がたえず尿流に接するという事実^{2,3)} から尿中に近位発がん物質 (proximate carcinogen) を求める試みが Bonser⁴⁾, Boyland⁵⁾, Radomski⁶⁾ らによっておこなわれた。そしてこんにち、naphthylamine は生体内において ortho-hydroxylation または n-hydroxylation をうけて近位発がん物質として活性化されることが明らかになっている。そこで、ある種の芳香族アミンが必須アミノ酸である tryptophan の中間代謝産物中にもあることより、膀胱がんの発生要因を tryptophan 代謝の異常として説明せんとする試みがなされた^{7,8)}。そして、tryptophan 中間代謝産物のうち、一部の物質が実験的に膀胱発がんをめぐる因子のひとつであることは明らかである。とくに、3-hydroxy-*l*-kinurenine, xanthurenic acid, 8-hydroxyquinaldic acid, 3-hydroxy-anthranilic acid および 8-methylether of xanthurenic acid が実験動物に対して発がん性を示すといわれるが⁹⁾、これらの物質が標的となる臓器の細胞に直接、間接にどのような相互作用をおこなうのかという問題についてはまだ明確な結果がえられていない¹⁰⁾。しかしこんにち、自然発生膀胱腫瘍の発生要因としてもこれら tryptophan 代謝産物の役割が大きいものであることはいうまでもない¹¹⁾。

芳香族アミンとして、ほかに fluorene 化合物の誘導体である acetylaminofluorene (fluorenylacetamide) があるが、この物質は強力な発がん作用を持つため、おもに放射性同位元素による研究方法の進歩があずかって、多くの知見が現在までに得られている。2-

acetylaminofluorene (2-AAF) は1901年 Diels らによって合成され、当初は殺虫剤としての利用が試みられたが²⁾、のちに Wilson によって発がん物質であることを指摘された¹²⁾より引用)。その後、Miller 夫妻¹³⁾ および Weisburger¹⁴⁾ らがその生体内代謝を追求して n-hydroxylation をうけることが発がん作用を示すうえで不可欠な過程であることを示した。いま、2-AAF が細胞内にとりこまれて、どのような相互作用を示すかをできるかぎり簡潔にまとめてみると Fig. 8 のようになる¹⁵⁻¹⁹⁾。

いずれの場合にも n-hydroxylation をうけたのち、エステル化されて蛋白質もしくは核酸と結合することが明らかになっている²⁰⁾より引用)。

いつぱり、Dunning および Curtis が 2-AAF のみをラットに経口的に投与すると肝腫瘍が多く発生するが、同時に tryptophan または indole を与えると膀胱腫瘍が高率にみられることを報告した²¹⁻²³⁾。それらしい、2-AAF と tryptophan 代謝の関係が追求された結果、Weisburger らは tryptophan と 2-AAF の代謝とが競合する結果として肝腫瘍の発現が遅れて、膀胱腫瘍の発生が前景にあらわれるものと考えた²⁸⁾より引用)。また Dyer および Morris²⁴⁾ は 2-AAF が xanthurenic acid をはじめ tryptophan 中間代謝産物を尿中に多く排泄させるはたらきを示し、これが vitamin B₆ の添加によって是正されることを見いだしている。しかし indole を添加した場合にも膀胱腫瘍発生の頻度が増加する機構については明らかでない。強力な発がん性物質のひとつである 3-methylcholanthrene を 2-AAF および tryptophan と同時にラットに投与しても、2-AAF, tryptophan の二者のみを投与した場合に比較して膀胱腫瘍発生頻度に差がみられないことが報告されている²⁵⁾。さらにニトロソ化合物のうちのひとつである n-nitrosodibutyl-

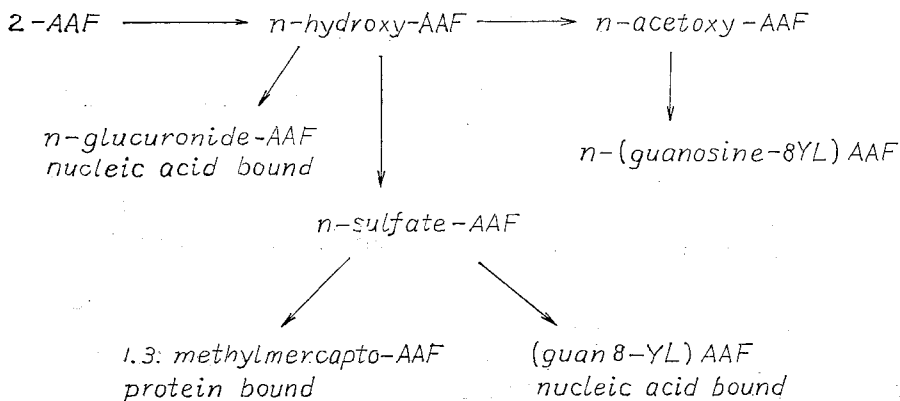


Fig. 8 2-acetylaminofluorene の代謝

amine と tryptophan との同時投与がラット膀胱腫瘍発生に影響を与えないが、ラット肝腫瘍の発生は *n*-nitrosodibutylamine 単独投与の場合に比較して頻度が減少することが報告されている²⁶⁾。

このように実験膀胱腫瘍の発生に関連して発がんの促進あるいは抑制の機構を考えると、たえずそこに介在するのは肝臓の役割である。Melicow ら²⁷⁾は 2-AAF をラットに投与した実験において、肝変化と膀胱腫瘍発生頻度の変化との間に関連性をみとめ、これを“liver-bladder axis”として相互関係の存在を示唆している。Oyasu ら²⁸⁻³⁰⁾は 2-AAF をラットに投与することによって肝にみられる変化のうち、肝嚢胞形成 (cystic lesion) のさいみられる内腔上皮細胞によって 2-AAF が膀胱発がん物質へと変化されると推定している。

こうした形態学上の変化を数量的に裏づけるためには肝における変化を機能面でとらえることが必要である。その意味において Morris ら³¹⁻³³⁾がおこなった実験は、肝における形態学上の変化と放射性ローズベンガル血中消失率よりみた肝異物排泄機能との関係を検討しており、注目に値するものといえる。それによると、2-AAF 投与ラットにおいては、実験開始後 6~8 週目に肝における ¹³¹I-ローズベンガルとりこみはずでほとんどみとめられなくなっている。そしてこの時期は肝腫瘍の発生時期ともほぼ一致している。しかし膀胱腫瘍との関係については全く検討されていないため、いわゆる“liver-bladder axis”について解明する手がかりは得られない。事実 Dunning あるいは Oyasu ら³⁴⁾が指摘するように、tryptophan 添加は肝における変化を抑制し、実験動物の延命効果を招来する結果、膀胱腫瘍の発生頻度が相対的に増加するのであって、2-AAF の作用とは全く別個のものである可能性も考えられる。今回おこなった実験において、2-AAF 投与ラット肝の異物排泄機能を検討したが、方法としては ICG-test を用いた。一般に肝異物排泄機能検査法として bromsulphalein (BSP) が慣用されているが、実験動物を対象として使用する場合には種々の問題点をふくんでいる。とくに血漿中の BSP を定量する場合に、溶血がみられると、ヘモグロビンと BSP の吸光部が一致するため正確な測定結果を得ることが困難である。そういう意味からも、むしろ ICG-test を用いるほうが望ましいものと考えられる³⁵⁾。

ICG の経時的血中消失曲線は家兎以上の大きさの実験動物においては、2つの指数関数の合成されたものに近似式を得ることができる³⁶⁾。しかしラットのような小動物では必ずしも理論曲線に一致しない³⁷⁾。その場合でも血漿中消失曲線は片対数曲線としてあらわす

ことができるから、ラット相互の測定値の比較が可能と考えられる。そこで正常ラットについて ICG 尾静脈より注入後、5分、および10分経過時の血漿中 ICG 停滞率を測定したところ、10分値において、より安定した結果が得られることが明らかとなったため、正常ラット20匹を用いて本法による ICG 10分経過時血漿中停滞率の正常値を求めた。こうして得られた正常値と実験群より得た測定値とを比較してみると、実験群の異物排泄機能は15週より30週目に至っても、完全に失われることはなく、障害をうけながらも肝機能が保持されていることが明らかとなった。この事実は肝の組織学的所見とも一致し、2-AAF 投与によって肝全体にわたって細胞の変性あるいは融解がみられるが、一部では肝細胞の再生像がみとめられた。こうした破壊—再生の過程がくりかえされて、その後の肝重量の著しい増大が招来されると考えられる (Photo. 1~5)³⁸⁻⁴⁰⁾。また、見かけの肝機能は肝細胞の再生がおこなわれている限りにおいて最低限確保されており、少なくとも 2-AAF 長期連続投与に耐えるラットでは Morris ら³¹⁾の指摘したような状態とは異なったものであることが推察される。しかし肝の予備能力と考えられるものはほとんど失われており、これ以上の負荷が加わると、肝細胞の再生によって維持されてきた代償作用の限界を越えて実験動物が死に至ることはいうまでもない。

つぎに、ラットに過剰量の tryptophan と 2-AAF とを同時に投与した場合に、vitamin B₆ を添加すると、tryptophan-niacin pathway に生ずる代謝のかたよりを是正して、ひいては、膀胱に対する変化にもなんらかの影響を与えるか否かの問題については、今回の実験結果より一定の傾向は認められなかった。また、過剰量の tryptophan 添加が膀胱発がんに対してどのような影響を与えるかということについて考察すると、tryptophan はまず、2-AAF による肝変化を防止するように作用する。したがって肝障害によって実験動物の死亡する頻度を減少させ、ひいては、生存日数は延長される結果、見かけの膀胱腫瘍発生頻度は増加するものと考えられる。vitamin B₆ 添加による効果と考えられるものとして、実験開始後早期に肝にみられる変化が tryptophan および vitamin B₆ 添加の C 群ラットにおいて、tryptophan 添加、vitamin B₆ 欠乏状態においた B 群のそれより少ないことは注目すべきことである。

vitamin B₆ は本来アミノ酸転移酵素の補酵素であって、生体内に広く分布するものであるが⁴¹⁾、そのほかの作用についてはまだ充分に解明されたとはいえない。vitamin B₆ 欠乏状態について、Bischoff ら⁴²⁾が

腫瘍に対する vitamin B₆ 欠乏の影響を報告している、基礎的ならびに臨床的⁴³⁾な vitamin B₆ 欠乏実験食の効果について検討されているが、少なくともヒトに関しては vitamin B₆ 欠乏状態が腫瘍細胞増殖抑制効果を示さないことが明らかとなっている。バターイェローによるラット発がん組織中の vitamin B₆ 含有量を測定した Briggs らの報告⁴⁴⁾によっても、他の vitamin と同じ程度の含有量減少がみとめられるのみで、特異的な変動はみとめられていない。

また、抗結核化学療法剤として用いられる isoniazid および cycloserine が deoxypyridoxine (DOP) あるいは penicillamine と同様、vitamin B₆ に対する拮抗作用を有することより⁴⁵⁾、ヒトにおいて結核に膀胱腫瘍を併発する場合の病因のうちの一つとしてさらに検討する余地があるものと思われる⁴⁶⁾。2-AAF によるラット発がん実験において tryptophan 過剰投与のもとに vitamin B₆ 欠乏状態にすると、がん原性を有するものと考えられる tryptophan 中間代謝産物が尿中に異常に増加して排泄される結果、膀胱腫瘍の発生頻度が増加する可能性についてはすでにのべたが、たんに妊娠ラットを vitamin B₆ 欠乏状態におくだけで胎仔に先天性奇形がみられたという Davis ら⁴⁷⁾の報告は、化学発がん物質は催奇形性 (mutagenicity) をもつが、その逆はありえないものとする Miller 夫妻の報告⁴⁸⁾と考えあわせると、まことに興味ぶかいことである。

今回の実験によって膀胱における変化と肝機能とはなんらかの関連性をもつことが明らかとなったが (Fig. 4)、肝の異物排泄能力について検討する以外に hydroxylation, glucuronisation などにも関係した肝機能を、より多面的にとらえる必要があるものと思われる。

結 論

1. 0.06% 2-AAF 経口投与ラットは平均 100 日間しか生存しないといわれるが、0.04% 2-AAF 投与の場合、実験開始後 3~4 週目にかけて 1 週間の休止期間をおくことによって、30 週間にわたる連続投与実験をおこなうことが可能であった。

2. 実験動物の病理組織学的検索によって 30 週間の実験期間中に膀胱腫瘍の発生を確認したものは、A 群 3 匹、B 群 1 匹、C 群 2 匹合計 6 匹であった。また、肝腫瘍を認めたものは A 群に 1 匹、B 群 2 匹、C 群 2 匹、合計 5 匹であった。膀胱腫瘍が tryptophan 添加、vitamin B₆

欠乏食投与の B 群にとくに多くみられるという傾向はみられなかった。肝の組織学的所見は tryptophan 添加が肝保護の役割を果していることを示した。

3. tryptophan および vitamin B₆ (pyridoxal phosphate) を添加した C 群と tryptophan のみを添加した B 群との間には、実験結果から膀胱における変化および肝障害について有意の差をみとめなかった。

4. 異物排泄機能試験による肝機能の成績と膀胱粘膜における ³H-TdR のとりこみ率とは正の相関を示したが、これは肝異物排泄能力が 2-AAF の尿中近位がん原性化学物質を量的に左右することを示唆する。

5. 2-AAF 投与ラットにおける肝重量の対体重比は、肝機能と負の相関を示したが、肝重量の増加は肝細胞の変化と再生、あるいは細胆管増生などの肝障害にもとづく組織学的変化と並行関係を示す。

稿をおえるにあたり、本研究に対し終始ご指導ならびにご教示いただいた加藤篤二教授、吉田修講師に謝意を表するとともに、本実験にご協力いただいた宮川美栄子先生、中村貴代子嬢はじめ教室のみなさんに感謝します。

なお、本論文の要旨は第 29 回日本癌学会総会 (大阪) および第 58 回日本泌尿器科学会総会 (東京) において発表した。

文 献

- 1) Hueper, W. C.: Occupational and Environmental Cancer of the Urinary System, New Haven and London, Yale University Press. 1969.
- 2) Scott, W. W. and Boyd, H. L.: J. Urol., 70: 914, 1953.
- 3) McDonald, O. F. and Lund, R. R.: J. Urol., 71: 560, 1954.
- 4) Bonser, G. M., Clayson, D. B. and Jull, J. W.: Lancet, II: 286, 1951.
- 5) Boyland, E., Dukes, C. E. and Grover, P. L.: Brit. J. Cancer, 17: 79, 1963.
- 6) Brill, E. and Radomsky, J. L.: Biochem. Pharmacology, 14: 743, 1965.
- 7) Brown, R. R., Price, J. M. and Wear, J. B.:

- Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 2: 7, 1955.
- 8) Brown, R. R. and Price, J. M.: J. Biol. Chem., 219: 985, 1956.
 - 9) Bryan, G. T., Brown, R. R. and Price, J. M.: Cancer Res., 24: 582, 1964.
 - 10) Bryan, G. T. and Lower, G. M. Jr.: J. Chromatography, 31: 380, 1967.
 - 11) Yoshida, O., Brown, R. R. and Bryan, G. T.: Cancer, 25: 773, 1970.
 - 12) 宮地 徹・妹尾亘明: 最新医学, 9: 320, 1954.
 - 13) Cramer, J. M., Miller, E. C. and Miller, J. A.: J. Biol. Chem., 235: 885, 1960.
 - 14) Weisburger, J. H., Weisburger, E. K., Grantham, P. H. and Morris, H. P.: J. Nat. Cancer Inst., 22: 825, 1959.
 - 15) Mille, E. C., Miller, J. A. and Hartman, H. A.: Cancer, Res., 21: 815, 1961.
 - 16) Miller, J. A., Cramer, J. W. and Miller, E. C.: Cancer Res., 20: 950, 1960.
 - 17) Bartsch, H., Miller, J. A. and Miller, E. C.: Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 14: 34, 1971.
 - 18) Irving, C. C. and Veazy, R. A.: Cancer Res., 29: 1799, 1969.
 - 19) Debaun, J. R., Smith, J. Y. R., Miller, E. C. and Miller, J. A.: Science, 167: 184, 1970.
 - 20) 永田親義: 蛋白質・核酸・酵素, 15: 826, 1970.
 - 21) Dunning, W. F., Curtis, M. R. and Maun, M. E.: Cancer Res., 10: 454, 1950.
 - 22) Dunning, W. F. and Curtis, M. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99: 88, 1958.
 - 23) Dunning, W. F. and Curtis, M. R.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 99: 91, 1958.
 - 24) Dyer, H. M. and Morris, H. P.: J. Nat. Cancer Inst., 26: 315, 1961.
 - 25) Bradley, H. J. Jr.: J. Urol., 88: 626, 1962.
 - 26) Okajima, E., Hiramatsu, T., Motomiya, Y., Iriya, K., Ijuin, M. and Ito, N.: Gann, 62: 163, 1971.
 - 27) Melicow, M. M., Uson, A. C. and Price, T. D.: J. Urol., 91: 520, 1964.
 - 28) Oyasu, R., Miller, D. A., McDonald, J. H. and Hass, G. M.: Fed. Proc., 20: 290, 1961.
 - 29) McDonald, J. H., Oyasu, R. and Hass, G. M.: J. Urol., 87: 381, 1962.
 - 30) Oyasu, R., Miller, D. A., McDonald, J. H. and Hass, G. M.: Arch. Path. 75: 184, 1963.
 - 31) Morris, H. P., Wagner, B. P. and Lombard, L. S.: J. Nat. Cancer Inst., 20: 1, 1958.
 - 32) Brown, C. H. and Glasser, O.: J. Lab. & Clin. Med., 48: 454, 1965.
 - 33) Lowenstein, J. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 93: 377, 1956.
 - 34) Oyasu, R., Battiforda, N. A. and McDonald, J. H.: Fed. Proc., 25: 291, 1966.
 - 35) Fox, I. J. and Wood, E. H.: Proc. Staff Meet., Mayo Clin., 35: 732, 1960.
 - 36) 榎本浩昌・井上喜美雄・増田武弘・溝口とく子・中沢幸胤: 診療と診薬, 6: 1035, 1968.
 - 37) Hunton, D. B., Bollman, J. L. and Hoffman, H. N. II.: Gastroenterology, 39: 713, 1960.
 - 38) Rutman, R. J., Cantarow, A. and Paschkis, K. E.: Cancer Res., 14: 119, 1954.
 - 39) Wachstein, M.: Gastroenterology, 37: 525, 1959.
 - 40) Reuber, M. D.: J. Nat. Cancer Inst., 43: 445, 1969.
 - 41) Price, J. M., Miller, E. C. and Miller, J. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 71: 575, 1949.
 - 42) Bischoff, F., Ingraham, L. P. and Rupp, J. J.: Arch. Path., 35: 713, 1943.
 - 43) Gailani, S. D., Holland, J. F., Nussbaum, A. and Olson, K. B.: Cancer, 21: 975, 1968.
 - 44) Briggs, M. H.: Nature, 187: 249, 1960.
 - 45) Price, J. M., Brown, R. R. and Yess, N.: Advances in Metabolic Disorders, Vol. 2, p. 159, Academic Press, New York, 1965.
 - 46) 鈴木正貢・元重博文: 癌の臨床, 11: 769, 1956.
 - 47) Davis, S. D., Nelson, T. and Shepard, T. H.: Science, 169: 1392, 1970.
 - 48) Miller, J. A.: Cancer Res., 30: 559, 1970.

(1972年7月11日超特別掲載受付)