

# N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT) の膀胱発癌機構についての研究

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

林 田 重 昭

## EXPERIMENTAL STUDIES ON THE MECHANISM OF URINARY BLADDER CARCINOGENICITY OF N-[4-(5-NITRO-2- FURYL)-2-THIAZOLYL] FORMAMIDE

Shigeaki HAYASHIDA

*From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Yamaguchi University*

*(Chairman : Prof. J. Sakatoku, M. D.)*

The urinary bladder carcinogenicity of N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide (FANFT) was investigated by feeding a diet containing 0.188% FANFT to female Fisher rats. Urinary bladder carcinoma incidences of 0% (0/5), 10% (3/30) and 16% (7/44) were observed in rats killed immediately after receiving FANFT for 10, 15 and 20 weeks respectively as compared to bladder carcinoma incidences of 0% (0/8), 50% (4/8) and 33% (9/27) for rats fed FANFT at the same dose and time period but placed on a control diet for up to 30 weeks. Severe hyperplasia of the bladder epithelium including papillomas were observed in almost all the animals fed FANFT for 15 or 20 weeks.

The mutagenic activity in the urine of rats and mice administered FANFT or 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl)thiazole (ANFT), one of the metabolites of FANFT, was assayed with spot and plate tests for mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA100. The mutagens excreted into the urine were also analyzed by methods combining TLC and mutation tests. The data thus obtained clearly demonstrated that the mutagenicity of the urine of rats and mice administered FANFT was significantly greater than that of the animals administered ANFT, and that ANFT excreted into the urine was mainly responsible for the mutagenicity of the urine of the animals administered FANFT or ANFT. It was also demonstrated that the concentration of ANFT in the urine of rats and mice administered FANFT was more than 8 and 6 times higher respectively than that of the animals administered ANFT. Radioisotopic studies showed that the amount of ANFT excreted into the urine for 24 hours after oral administration of FANFT comprised less than 5% of all the urinary metabolites of FANFT in mice, despite the fact that ANFT excreted into the urine was mainly responsible for the strong mutagenic activity of the urine.

The results were discussed and it was concluded that FANFT has a potent carcinogenicity for the urinary bladder of rats, and that ANFT excreted into the urine after administration of FANFT may be responsible for the urinary bladder carcinogenicity of this compound.

## 緒 言

1895年 L. Rehn<sup>41)</sup> による染料 fuchsin の生産従事者に膀胱癌の多発がみられるとの報告以来、尿中における発癌物質およびその代謝産物の同定定量が比較的容易なことや、膀胱癌が形態的機能的に単純であることもあってこの方面の研究が急速に開発されつつある。ゆえに膀胱癌の研究はただ単に泌尿器科領域における尿路上皮腫瘍の克服を意味するにとどまらず、近代医学界の最大目標の1つである発癌機構解明上きわめて重要な意義を有している。

近年 N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide<sup>47)</sup> (以下 FANFT と略記する) や N-butyl-N-butanol(4) nitrosamine<sup>16)</sup> (以下 BBN と略記する) など膀胱に対する特異的発癌物質の発見は種々の実験動物を使った膀胱癌研究の実験モデルに大きく寄与している。このうち BBN についてはその尿中発癌性代謝物質を主とした代謝の面より proximate な発癌物質の研究<sup>39,40)</sup> や *in vitro* における成熟ラット膀胱上皮細胞の発癌の研究<sup>25)</sup> など非常な進歩を示している。一方、FANFT はラットに 100% の高率で特異的に膀胱癌を発生させることが明らかにされ<sup>17,19)</sup>、イヌ<sup>23)</sup>、ハムスター<sup>14)</sup>、マウス<sup>9,21,58)</sup> にも強力な膀胱発癌性を有することが Wisconsin 大学 Clinical Oncology を中心に研究されてきており、本邦にもすでに広く紹介されている。とくに FANFT による膀胱癌はヒトの膀胱癌にその形態が非常に似ていることもあり、その移植性<sup>19,57)</sup> や膀胱癌発生要因に関する研究<sup>52,53)</sup> や癌の化学療法の実験モデル<sup>43,44)</sup> としてさらに広く研究されつつある。

本来 FANFT は尿路感染症の化学療法剤として開拓されたもので、したがってその尿中代謝産物の検討は膀胱に特異的に癌を発生させるという面からも非常に興味ある研究テーマとして検討されていたのである。しかし最近までに *in vitro* におけるラット、マウス、ハムスター、モルモットの肝、腎、小腸、胃に FANFT formamidase の存在が明らかにされ<sup>47)</sup>、また *in vivo* において FANFT の deformylation が明らかにされ<sup>31)</sup>、マウスにおける FANFT の第 1 次代謝産物として 2-amino-4-(5-nitro-2-furyl) thiazole (以下 ANFT と略記する) の存在が推定されてはいるものの、尿中発癌性代謝産物の確認はもとより尿中の FANFT 代謝産物についての報告はほとんどない。

最近著者らは FANFT のラットにおける特異的膀胱発癌性を再認する<sup>52)</sup> とともに J. McCann ら<sup>33)</sup> によって最近改良された *Salmonella typhimurium* TA100 による mutation test と薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略記する) を応用した TLC 分画 mutation

test を考案して FANFT のラットにおける尿中発癌性代謝産物の検討をおこなってきた<sup>26,27)</sup>。著者らはこれらの検討により FANFT のラット膀胱に対する発癌性はその代謝産物として尿中に排泄される ANFT に起因するものであると推定し ANFT の代謝ならびにその発癌性の検討の必要性を強調した。

今回著者は FANFT ならびに ANFT をラット、マウスに経口投与した時の尿の mutagenic activity を検討し、ANFT の尿中濃度を比較するとともに現在までの著者らの報告で不じゅうぶんであった点にも再検討を加えさらに 2, 3 の新しい知見をえたので報告する。

## 実験材料

1. 化学物質：FANFT, [<sup>14</sup>C]FANFT, ANFT, [<sup>14</sup>C]ANFT の化学名と構造式は Fig. 1 に示す。このうち FANFT は Saber Laboratories, Inc., (Morton Grove, Ill.) より購入した。 [<sup>14</sup>C] FANFT, ANFT, [<sup>14</sup>C] ANFT はそれぞれ合成した<sup>42)</sup>。なおこれらの化学物質は実験にあたり前もって TLC でその純粋性を検査した。

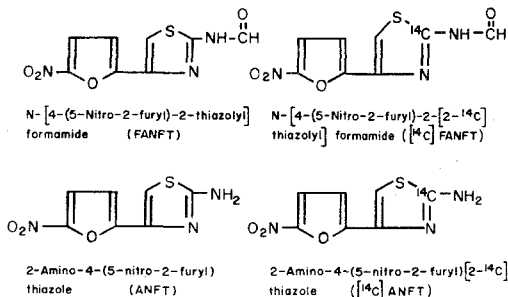


Fig. 1. Structures of FANFT, [<sup>14</sup>C]FANFT, ANFT and [<sup>14</sup>C]ANFT.

2. 実験動物：FANFT 発癌実験にもちいた雌 Fisher ラット (45~60 g) は A. R. Schmidt Co. (Madison, Wis.) より入手した。それ以外の一連の mutation test および FANFT ならびに ANFT の尿中代謝産物の検討には雌 Sprague-Dawley ラット (200 g) および雌 Swiss マウス (25 g) を使用し、いずれも A. R. Schmidt Co. より入手した。

3. mutation test の準備：mutation test に使用した *Salmonella typhimurium* TA100 は California 大学 B. N. Ames 教授の好意で入手した。minimal base agar 作成のための Minimal Broth Davis および Bacto Agar は DIFCO Laboratory, (Detroit, Mich.) より購入した。top agar 作成のための L-histidine monohydrochloride は Nutritional Biochemical Co.,

(Cleveland, Ohio), Biotin は Sigma Chemical Co., (St. Louis, Mo.) より入手した。なお plate は 1001 Optilux Petri Dish (100×15 mm Style) を使用し Falcon (Oxnard, Calif.) より購入した。

4. その他：尿分析に使用した TLC 用 sheet は CHROMAGRAM sheet, 13254 cellulose であり, Eastman Kodak Co. (Rochester, N. Y.) より購入, radioactivity の測定はすべて Mark II Liquid Scintillation System, Nuclear Chicago, (Chicago, Ill.) を用いておこなった。

### 実験 1 発癌実験

前述したように FANFT の長期発癌実験によるラット膀胱に対する発癌性はすでに明らかにされている<sup>17, 19)</sup>。したがって著者は FANFT のラット膀胱に対する発癌性を再認する意味を含めて最長30週という比較的短期の膀胱発癌実験をおこなった。

#### 方法

雌 Fisher ラット (45~60 g) は入手すると速やかに前もって1週間消毒されたうえ当実験に準備された部室に入れられた。部室の条件は恒温度 24°C, 恒湿度15%, 照光時間10時間/日である。

ラットはそれぞれ4匹ずつ screen bottomed metal cage に入れ, さらに4群に分けた。第1群59匹は control として Powder Lab-blox (Allied Mills Inc., Chicago, Ill.) を control 食として, 第2~4群は 0.188% FANFT diet (0.188% FANFT+99.812% Powder Lab-blox) を自由摂取させた。第2群13匹は FANFT diet を10週間, 第3群38匹は15週間, 第4群73匹は20週間それぞれ FANFT diet で飼育し, 以後いずれも control 食で飼育した。それぞれの群は早期膀胱粘膜の変化をみるため一部 FANFT diet 投与を中止とともに屠殺し病理学的検査をおこない, 残りのラットもすべて30週で屠殺し同様病理学的検査をお

こなった。なお食餌消費量は各 cage ごとに毎週記録し, 体重測定は1匹ずつ0, 2, 4, 6週, 以後5週間に1回ずつ施行した。

病理学的検査としてはエーテル麻酔下に屠殺し, 頸部以外の全臓器の肉眼的検査をおこない全胸腔・腹腔臓器を10% formalin 液に入れ保存した。膀胱は10% formalin 液 1.5 ml でふくらませ固定したうえで正中面で2半して paraffin 包埋し, それぞれ5枚の薄片をつくり hematoxylin-eosin 染色によって組織学的検査をおこなった。

#### 成績

実験は実験終了時まで生存した動物のみをもちい, それ以前に死亡した動物は除外した。各群の動物の食餌摂取量, 体重の増加, 発育などについては特記すべき差はなく, FANFT 投与による全身的影響は認めなかった。

##### a) 膀胱所見

1) 肉眼的変化：第1, 2群はすべて肉眼的に異常は認められず, 第3, 4群の FANFT 投与群では膀胱粘膜がび漫性に微細な不整を示すほぼ類似した肉眼的変化を示した。腫瘤発育を示すものでは単発性あるいは数コ散在性に非常に小さな粟粒大腫瘤を認めるものから豌豆大まで種々であるが全体的に FANFT 長期投与, 長期観察にしたがって大きな腫瘤を形成する傾向にあった。しかし膀胱周囲への浸潤やリンパ節の腫大はまったく認められず, 膀胱内への著明な出血も2, 3の例に認めたにすぎなかった。なお第3群の1例に 6×7×13 mm の膀胱結石が発生し例外的に著明な膀胱壁の肥厚と粘膜面の不整, 膀胱内出血を認めた。

2) 顕微鏡的所見：A. J. Tiltman らの報告<sup>46)</sup>を参考にして分類を試みた。すなわち大きく hyperplasia と癌に分類し, かれらの提唱したごとく, たとえ著明な乳頭状あるいは広期性増殖を示すものでも膀胱粘膜内に限局しているものは, 細胞および組織異型性が極

Table 1. Incidence of bladder cancer by feeding a diet containing 0.188% FANFT to rats.

Group	Number of rats	Administration of FANFT*		Survival (weeks)	Hyperplasia	Bladder cancer		
		duration (weeks)	cumulative dose (g/rat)			stage 1	stage 2	incidence (%)
1	59	0	0	10~30	4	0	0	0
2	5	10	1.55	10	3	0	0	0
	8	10	1.55	30	4	0	0	0
3	30	15	2.56	15	29	2	1	10
	8	15	2.56	30	8	4	0	50
4	44	20	3.50	20	44	7	0	16
	27	20	3.50	30	26	8	1	33

\* The diet containing 0.188% FANFT was fed.

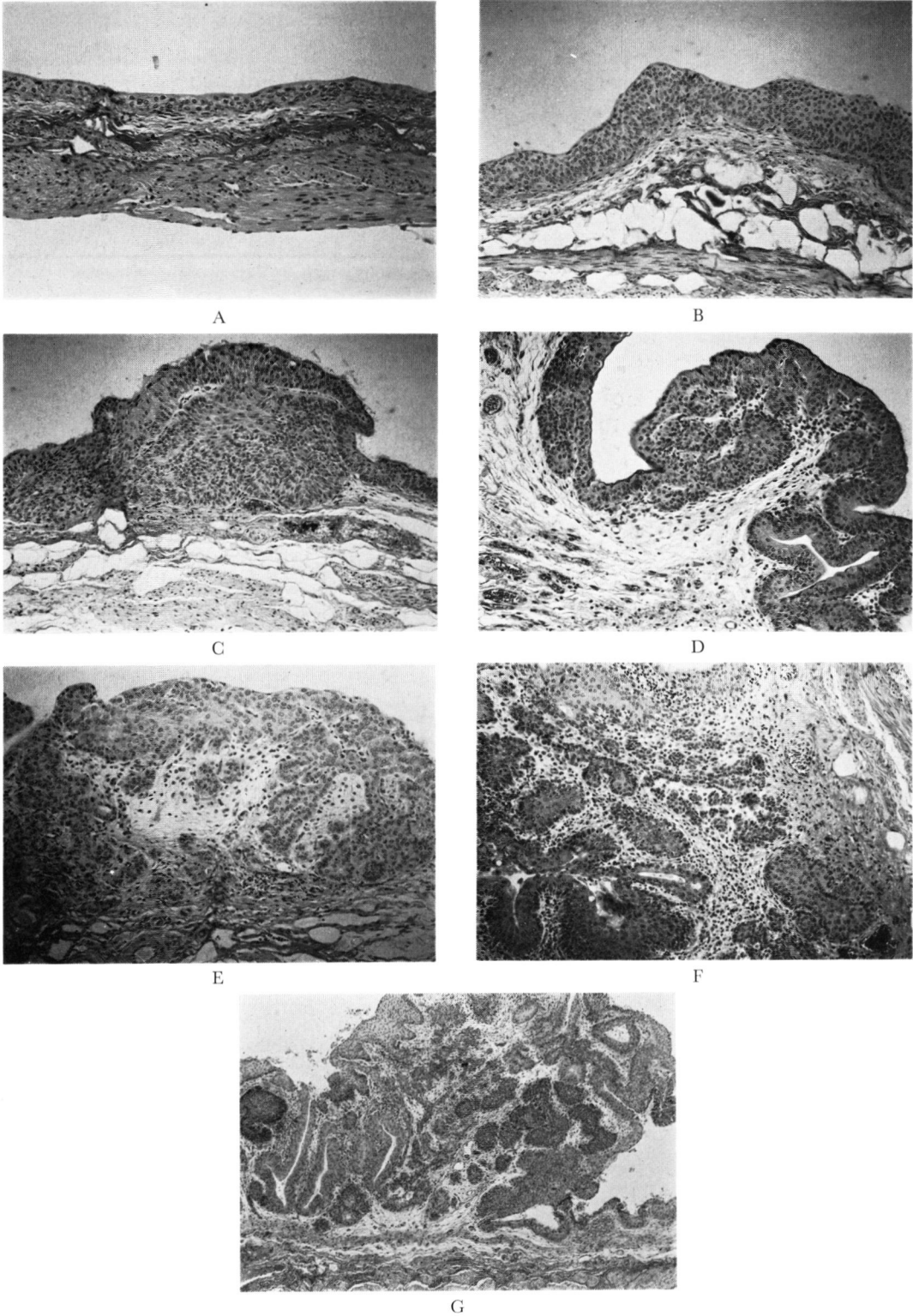


Fig. 2. Photomicrographs of urinary bladder of rats fed control diet or 0.188% FANFT diet. A: normal rat urinary bladder, B: hyperplastic bladder epithelium, C: severe nodular hyperplasia, D: polypoid nodular hyperplasia, E: transitional cell carcinoma, F: transitional cell carcinoma, G: papillary transitional cell carcinoma.

端に強いもの以外は実際 “pre-malignant” かまたは “in situ” stage かの区別が困難であり一括して hyperplasia とした。そして粘膜下結合織への癌細胞浸潤を重視し、かつ明確な細胞あるいは組織異型性を有するもののみを癌と診断した。stage は粘膜下結合織以内に限局するものおよび筋層に浸潤するものをそれぞれ stage 1 および 2 とした。なお筋層をこえて浸潤するものおよび膀胱以外への転移例は認めなかった。組織学的所見はまとめて Table 1 に示し若干の例を Fig. 2 に供覧する。

#### b) 他臓器所見

第 1 群および第 4 群に各 1 例ずつ強い肺化膿症を認めたにすぎず、腎、尿管を含めて他臓器に FANFT 投与に関係あると考えられる腫瘍性病変はまったく認めなかった。

#### 小括

以上の成績により FANFT がラットに対して特異的膀胱発癌性を有することが再確認された。その発癌頻度は FANFT の長期投与、長期観察をするほど高くなる傾向にある。しかし 0.188% FANFT diet の 20 週投与でその後 10 週の観察期間をもうけても 100% の発癌は認められず、10 週間の投与では発癌は証明されなかった。この実験は最長 30 週間と発癌実験としては比較的短期であり、またはっきりと癌とは診断しえないかといわゆる乳頭腫ともいふべき腫瘍形成は FANFT diet 15 週投与群および 20 週投与群ではほとんど全例に近く認められたことから考えても FANFT のラットに対する膀胱発癌性はかなり強力であると思われる。

## 実験 2 spot および plate mutation test

最近発癌物質のマスキリング法として mutation test の値が提唱されている<sup>2-4, 32-35, 51, 54-56</sup>。これは被検物質によってひきおこされる微生物の突然変異を検討することによりその物質の mutagenic activity を明らかにし、ひいてはその carcinogenic activity を推定するものである。とくに最近 J. McCann<sup>33</sup>によって報告された *Salmonella typhimurium* TA100 は非常に感度が高く、従来困難であった FANFT および一連の類似構造を有する発癌性 nitrofuran 化合物の mutagenic activity も容易に検出することが可能となってきた<sup>33, 34, 51, 55, 56</sup>。

従来 mutation test は定性を主とした spot test と mutagenicity をよりよく反映するといわれる plate test にわけられているが著者の目的は FANFT の発癌機構の検討であり、より手軽でかつ後述する TLC 分画 mutation test への応用など幅広く利用できる点

から *Salmonella typhimurium* TA100 を使った spot mutation test をおもに利用し一部 plate test も合わせ検討した。

#### mutation test の準備

spot mutation test に関する手技はすでに B. N. Ames<sup>2)</sup> および矢作ら<sup>56)</sup> によって詳しく報告されている。著者もほぼこれに準じておこなった。しかし前述したように発癌物質のスクリーニングではなく、FANFT の尿中代謝性発癌物質を中心とした FANFT の発癌性の検討への利用であることから、使用する *Salmonella typhimurium* TA100 の菌数を従来の一般的な方法<sup>2, 56)</sup>にかえて 1 plate あたり 0.03 ml inoculum/2 ml top agar の spot mutation test 用 agar plate を使用するなど若干の変法をもちいた。すなわち top agar としては凍結保存した *Salmonella typhimurium* TA100 の少量を nutrient broth で 37°C 24 時間新しく培養したものをもちい、前述したように各 plate あたり *Salmonella typhimurium* TA100 を含む nutrient broth 0.03 ml を 0.1 m mole L-histidine および 0.1 m mole biotin を含む minimal top agar 2 ml に加え手早く振盪したのち、前記の base agar plate 上に注ぎ水平に固定し spot mutation test 用 agar plate を作成し、以下に述べる spot test ならびに TLC 分画 mutation test などの一連の実験に供した。また plate mutation test も同様な agar plate を利用したが *Salmonella typhimurium* TA100 を agar plate に加える前に検体を top agar に加えた。

#### A) FANFT および ANFT の *Salmonella typhimurium* TA100 に対する mutagenicity

FANFT および ANFT の *Salmonella typhimurium* TA100 に対する mutagenic activity を spot mutation test で検討し、後述する FANFT あるいは ANFT のラット、マウス尿中発癌性代謝産物の検索のための基礎的検討をおこなった。

#### 方法

FANFT および ANFT はそれぞれ dimethyl sulfoxide (以下 DMSO と略記する) に溶解し 0.0001, 0.0002, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  DMSO の検体を希釈法にて作成した。control は DMSO をもちい前述した 0.03 ml inoculum *Salmonella typhimurium* TA100 を含む spot mutation test 用 agar plate 中央に micropipet をもちいて 1  $\mu\text{l}$  spot し速やかに plate を裏返して光をさけ 37°C, 48 時間 incubate した。なおそれぞれの spot mutation test は各検体につき 3 回ずつ施行した。

#### 成績

control plate に成長阻止円はまったくみられず散在性に約 62/plate の spontaneous His<sup>+</sup> revertant colony がみられたにすぎなかった。一方 FANFT ならびに ANFT による spot mutation test においては spot した周囲に透明帯として菌の成長阻止円がみられ、その外周にリング状に乳白色の多数の His<sup>+</sup> revertant colony が認められ mutagenicity の有無の判定には困難はなかった。しかし微量の 0.0005  $\mu\text{g}$  の FANFT および ANFT には成長阻止円がほとんど認められないものもあったが、この際においてもその spot 点を中心に明らかな His<sup>+</sup> revertant colony の集中が観察された。したがってたとえ成長阻止円がじゅうぶん明らかでなくとも多数の revertant colony が spot 点に集中的に認められる場合 mutation test は陽性であるといえる。一方さらに微量、すなわち FANFT あるいは ANFT の量が 0.0002  $\mu\text{g}$  以下では His<sup>+</sup> revertant colony の集中も数の増加も観察されず、したがってこれらの量以下ではそれぞれのもつ mutagenic activity を検出することは不可能であった。著者の施行した FANFT および ANFT の *Salmonella typhimurium* TA 100 に対する spot mutation test の結果は Fig. 3, 4

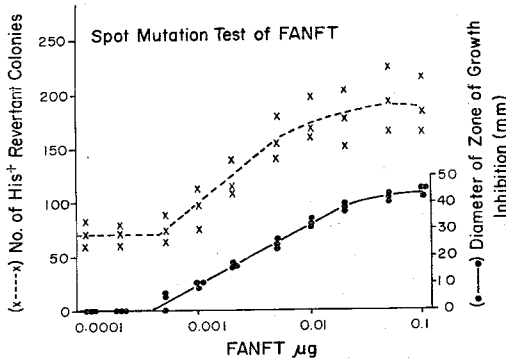


Fig. 3. Spot mutation tests of FANFT in *Salmonella typhimurium* TA100.

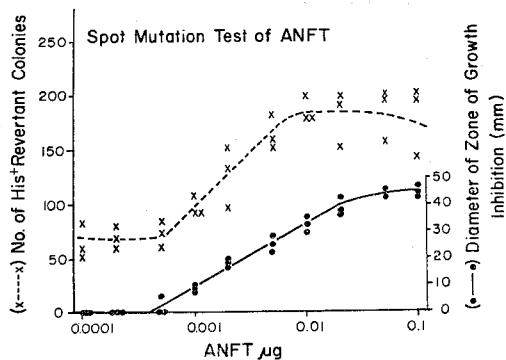


Fig. 4. Spot mutation tests of ANFT in *Salmonella typhimurium* TA100.

に図示する。

FANFT および ANFT の *Salmonella typhimurium* TA100 に対する mutagenicity はきわめて類似したものであり FANFT ならびに ANFT とともにその検査量は 0.0005  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DMSO より 0.02  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DMSO においてはその成長阻止円の直径と semi-logarithmic な相関を示した。また mutagenicity を反映する His<sup>+</sup> revertant colony 数は 0.0005 より 0.005  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DMSO の比較的狭い範囲すなわち His<sup>+</sup> revertant colony 数 70/plate より 160/plate の範囲で同様の相関を認め、さらに revertant colony の spot 点集中度などを考慮に入れると、かなりの程度の mutagenic activity の比較検討も可能であると考えられる。なお 2, 3 の spot mutation test の例を Fig. 5 に供覧する。

### B) FANFT および ANFT 投与時のラット、マウス尿の spot mutation test

実験 2. A) により *Salmonella typhimurium* TA100 の spot mutation test において mutagen の有する antibacterial effect である成長阻止円とその mutagen の量とに強い相関があり、したがって成長阻止円を測定することによってその検体の有する mutagen の量を推定しうる。また検体の有する mutagenic activity についても spot mutation test の His<sup>+</sup> revertant colony 数を算定することによりある程度の推察が可能であることが明らかとなった。著者は前報<sup>26, 27)</sup>で FANFT を同時に経口および腹腔投与した時のラット尿の mutagenic activity および antibacterial effect を検討して、それがほとんど FANFT の尿中代謝産物 ANFT に起因することを明らかにした。したがって FANFT および ANFT をラット、マウスに経口投与した場合にもそれぞれの尿中に ANFT の存在が強く想定される。したがって著者は 0.188% FANFT および 0.166% ANFT の同モル比 diet をそれぞれ自由摂取しているラット、マウス尿中に存在すると考えられる ANFT の量を定量しかつこれらの尿の有する mutagenicity と FANFT ならびに ANFT のラット、マウスに対する膀胱発癌性との関連性について検討すべく、それらを投与したラット、マウス尿を spot mutation test にて検討した。

### 方法

ラットおよびマウスはそれぞれ 2 群にわけ、同モル比 diet となるように 0.188% FANFT diet あるいは 0.166% ANFT diet を自由摂取させ、第 3 日目に試験管に直接排尿させて尿を採集した。FANFT diet を摂取させた 6 匹のラットの尿はそれぞれ 2 匹の尿を同量ずつ混じて 1 尿検体とし、結局 3 尿検体を *Salmonella*

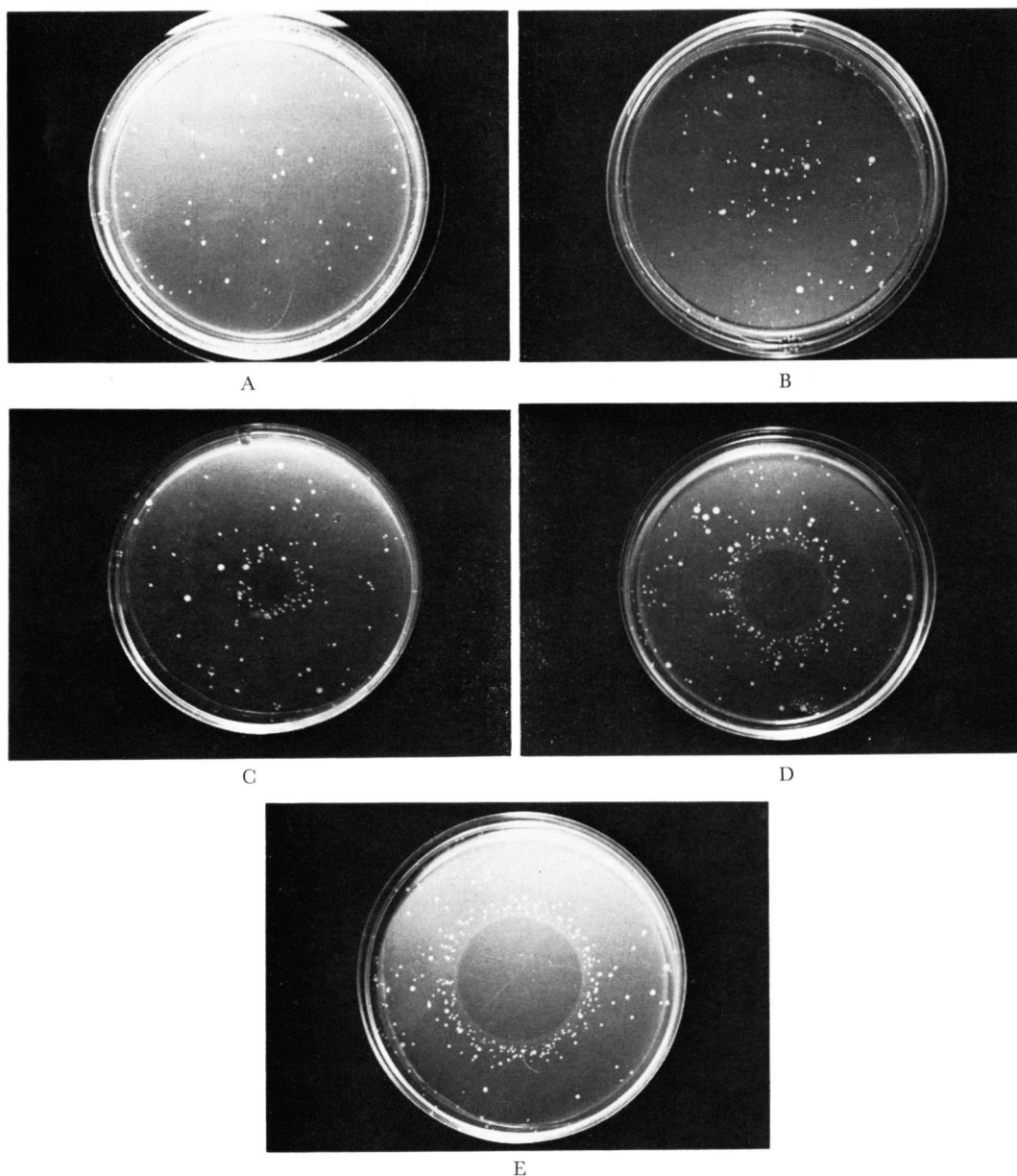


Fig. 5. Spot mutation tests of ANFT in *Salmonella typhimurium* TA100. A: control, B: ANFT 0.0005  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DMSO, C: ANFT 0.001  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DMSO, D: ANFT 0.005  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DMSO, E: ANFT 0.02  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  DMSO.

*typhimurium* TA100 による spot mutation test に供した。ANFT diet を摂取させたラットも同様に処理して3尿検体をえた。また、マウスの場合は1尿検体をそれぞれ3匹の尿を混じて作成し、FANFT あるいはANFT diet を摂取させたマウスよりそれぞれ3尿検体ずつをえた。control として control diet で飼育しているラットの尿をもちいた。

以上のようにしてえられた尿検体を前述した *Salmo-*

*nella typhimurium* TA100 の spot mutation test 用 agar plate 中央に micropipet をもちいてそれぞれ 1  $\mu\text{l}$  および 5  $\mu\text{l}$  を spot した。これらの plate は実験 2, A) と同様に 37°C 48時間暗所で incubate した。

#### 成績

成績は Table 2 にまとめて表示し、その数例を Fig. 6 に紹介する。すなわちラットならびにマウスともに FANFT diet を摂取した場合のほうが ANFT diet を

摂取した場合よりその尿で誘発される *Salmonella typhimurium* TA100 の His<sup>+</sup> revertant colony 数および成長阻止円ははるかに大である。すなわち FANFT diet を摂取した群のほうが ANFT diet を摂取した群よりラットならびにマウス尿ともにより強力な mutagenic および antibacterial activity を有している。さらに前述したように FANFT を同時に腹腔および経口投与

したときのラットの尿における mutagenicity の主因が FANFT の尿中代謝産物 ANFT によることから考えて、両群間の尿のもつ mutagenic および antibacterial effect の違いも尿へ排泄される ANFT の濃度の違いによると推定される。これらを実験2, A) でもとめた ANFT の spot mutation test における成長阻止円の standard curve を基礎として比較定量すると

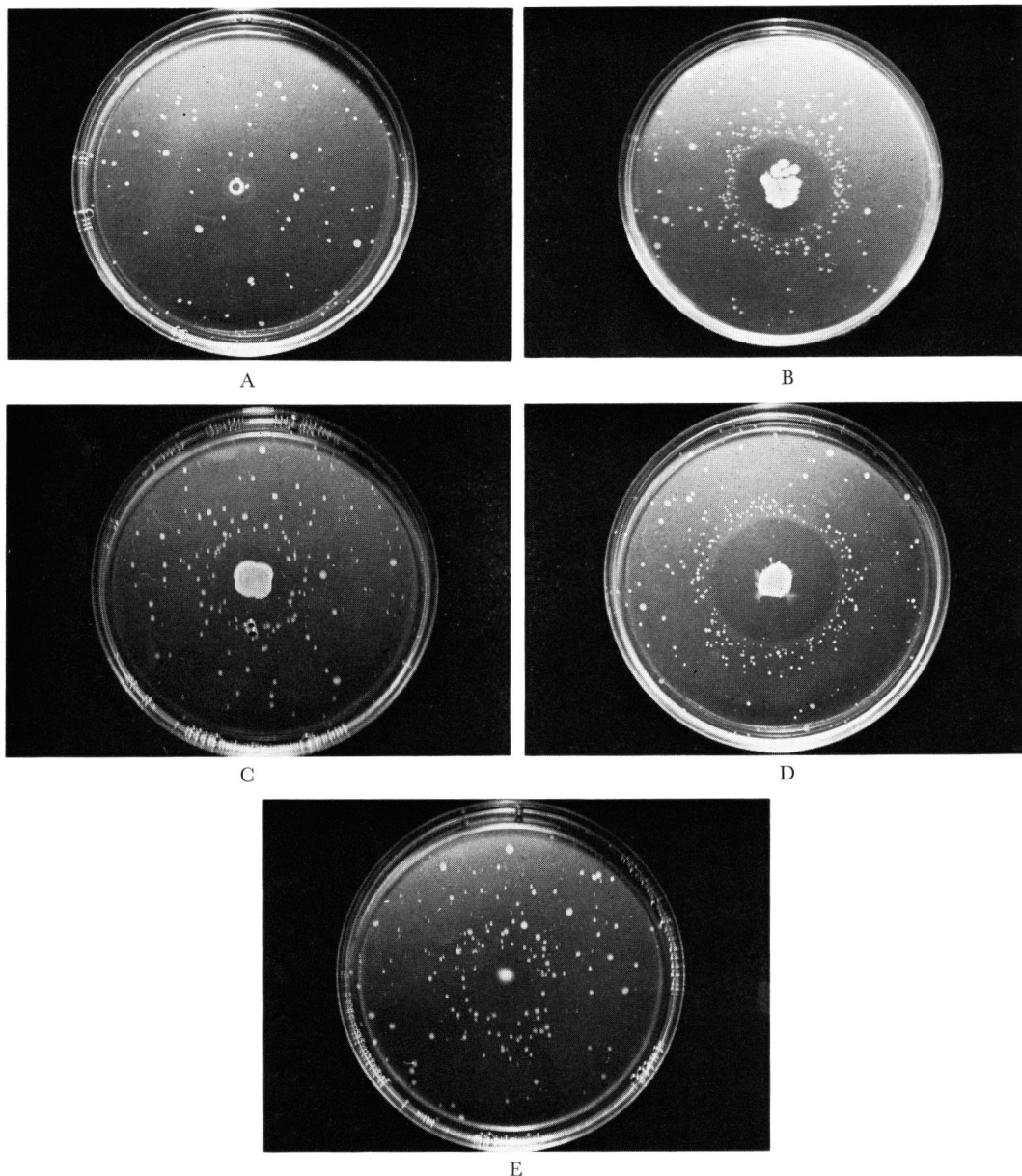


Fig. 6. Spot mutation tests of urine of rats and mice fed 0.188% FANFT diet or 0.166% ANFT diet in *Salmonella typhimurium* TA100. A: 5  $\mu$ l control urine, B: 5  $\mu$ l urine of rats fed FANFT, C: 5  $\mu$ l urine of rats fed ANFT, D: 5  $\mu$ l urine of mice fed FANFT, E: 5  $\mu$ l urine of mice fed ANFT.



Table 2. The results of spot mutation tests of urine of rats and mice fed FANFT or ANFT in *Salmonella typhimurium* TA100.

Animal	Fed compound*	Urine ( $\mu$ l)	Number of revertant colonies/plate (diameter of inhibition zone (mm))	Mean $\pm$ S.D.
Rat	Control	5	64 (0), 52 (0), 82 (0)	63 $\pm$ 31 (0)
Rat	FANFT	1	172 (14), 152 (12), 112 (12)	145 $\pm$ 31 (12.7 $\pm$ 1.2)
Rat	FANFT	5	204 (26), 168 (23), 218 (27)	197 $\pm$ 26 (25.3 $\pm$ 2.1)
Rat	ANFT	1	112 (0), 88 (0), 48 (0)	82 $\pm$ 32 (0)
Rat	ANFT	5	164 (0), 152 (7), 164 (8)	160 $\pm$ 7 (5.1 $\pm$ 4.3)
Mouse	FANFT	1	180 (22), 216 (23), 232 (23)	209 $\pm$ 27 (22.6 $\pm$ 0.7)
Mouse	FANFT	5	204 (35), 224 (34), 192 (33)	207 $\pm$ 17 (34.0 $\pm$ 1.0)
Mouse	ANFT	1	136 (0), 128 (9), 104 (0)	123 $\pm$ 17 (3.0 $\pm$ 5.2)
Mouse	ANFT	5	176 (15), 208 (18), 224 (16)	203 $\pm$ 24 (16.3 $\pm$ 1.5)

\* The diet containing 0.188% FANFT or 0.166% ANFT was fed for 3 days.

0.188% FANFT diet あるいは 0.166% ANFT diet を摂取させた場合、前者の場合のほうが後者の場合に比較してラットで約8倍、マウスで約6倍の濃度のANFTを含む尿を排泄すると思われる。

### C) FANFT および ANFT 投与時のラット、マウス尿の plate mutation test

単なる spot mutation test よりも plate mutation test のほうが mutagenicity をよりよく反映するといわれている。したがって著者は FANFT および ANFT を投与した時のラット、マウスの24時間尿の mutagenicity を比較しかつ実験2, B) の所見を再確認するため同じく *Salmonella typhimurium* TA100 を使った plate mutation test を試みた。

#### 方法

ラットおよびマウスはそれぞれ2群にわけ 0.188% FANFT diet あるいは ANFT diet を48時間自由摂取させたのち、metabolic cage をつかいラットは1匹ずつ、マウスは3匹を一組として24時間尿を採集した。尿採集にあたっては diet による尿の汚染を防止するため水分のみを投与した。採集した尿はラットの場合総量 15 ml になるように、またマウスの場合総量 10

ml になるように蒸留水で希釈し、汚染物をのぞくため minipore filter で濾過し plate mutation test の尿検体とした。control として control diet を投与しているラット尿を同様処理してもちいた。以上のようにしてえたそれぞれの尿検体の 10  $\mu$ l をもちいて前述した方法で plate mutation test agar plate を作成し 137°C 48時間暗所で incubate した。

#### 成績

成績はまとめて Table 3 に表示する。control 尿は平均 72/plate の spontaneous His<sup>+</sup> revertant colony が認められたにすぎなかったが、FANFT diet を摂取したラットならびにマウス尿は2倍以上の平均 192, 156/plate の His<sup>+</sup> revertant colony が観察された。反面 ANFT diet を摂取したラット、マウス尿はともに平均 98, 88/plate と FANFT diet の場合に比較し半減しており control 尿との差がわずかに認められる程度であった。これらの所見は FANFT diet を摂取した場合のほうが ANFT diet を摂取した場合に比較してラット、マウスともにその後の24時間に尿へ排泄される mutagenicity の総量は大であることを示している。

Table 3. The results of plate mutation tests of urine of rats and mice fed FANFT or ANFT in *Salmonella typhimurium* TA100.

Animal	Compound*	Urine sample ( $\mu$ l/plate)	Number of His <sup>+</sup> revertant colonies (/plate)	Mean $\pm$ S.D.
Rat	Control	10	86, 81, 72, 51	72 $\pm$ 16
Rat	FANFT	10	190, 140, 176, 180, 216, 248	192 $\pm$ 37
Rat	ANFT	10	96, 100, 140, 92, 65, 96	98 $\pm$ 24
Mouse	FANFT	10	144, 124, 140, 172, 170, 184	156 $\pm$ 23
Mouse	ANFT	10	75, 88, 71, 91, 85, 117	88 $\pm$ 16

\* The diet containing 0.188% FANFT or 0.166% ANFT was fed for 3 days.

\*\* Comparison between the groups of animals fed FANFT and ANFT.

## 小括

以上の実験2の所見より FANFT および ANFT はともに同程度の mutagenic ならびに antibacterial activity を有することが明らかとなった。しかしこれらがラットあるいはマウスに経口投与された場合の尿のもつ mutagenic ならびに antibacterial activity には大きな違いがある。すなわち 0.188% FANFT diet と同モル比の 0.166% ANFT diet をそれぞれラットに自由摂取させた場合に排出される尿中 mutagen, すなわちこの場合 ANFT が強く推定されるのであるが、その尿中濃度は FANFT diet 摂取群のほうが ANFT diet 摂取群に比較し約8倍の濃度で、またその後の24時間に排泄される mutagenicity の総量も大であると推定される。またマウスの場合も同様で FANFT diet を摂取したときのほうが ANFT diet を摂取した場合より約6倍の濃度であると推定される。

## 実験3 TLC 分画 mutation test

実験1, 2より FANFT はラット膀胱に強い発癌性を有していることが確認され、また 0.188% FANFT diet を摂取しているラット、マウス尿は強力な mutagenic activity をもつことが明らかになった。前述したようにこの mutagenic activity はラットに FANFT を同時に経口および腹腔投与した場合の尿分析を基礎

としておもにその尿中代謝産物 ANFT によるものであると推定されている。一方ラット、マウスに同モル比の 0.166% ANFT diet を投与した場合、尿のもつ mutagenic activity は FANFT 投与の場合に比較して極端に少ないことが観察され、したがって ANFT を経口投与した場合の尿にはきわめて少量の ANFT が排泄されているにすぎないと推定された。しかし現在までマウスはもとよりラットにおいても FANFT あるいは ANFT を経口投与した時の尿へ排泄される mutagen の分析はなされておらず実験2でえた推定はさらに実験的に証明の必要がある。したがって著者はこれらの点を明らかにすべく FANFT あるいは ANFT をラットおよびマウスに経口投与したときの尿中 mutagen を分析し、かつその時の mutagenic activity を比較検討する目的でそれぞれの尿の TLC ならびに TLC 分画 mutation test をおこなった。

## 方法

実験に使用した動物はラット10匹、マウス10匹である。ラットおよびマウスは5匹ずつ2群にわけ実験2, B) と同じく 0.188% FANFT diet あるいは 0.166% ANFT diet を自由摂取させた。実験3日目試験管に直接排尿させて採尿し、各群ごとに5尿検体をえた。つぎに FANFT diet を摂取したラットの5つの尿検体より各 1  $\mu$ l を micropipet にとり cellulose TLC

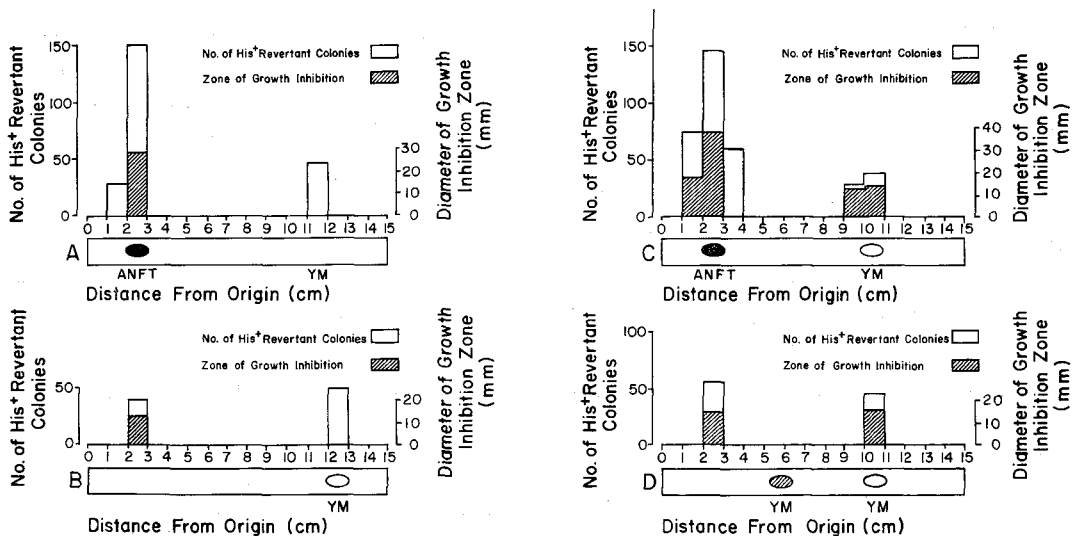


Fig. 7. TLC and TLC mutation tests of urine of rats or mice fed FANFT or ANFT in *Salmonella typhimurium* TA100. The diameter of the clear zone produced by growth inhibition was inclusive of 1-cm square cellulose sheet placed on the petri dish. It was scored as 0 in no inhibition zone was produced. The number of His<sup>+</sup> revertant colonies was exclusive of the spontaneous revertants. A: Urine of rats fed 0.188% FANFT diet. B: Urine of rats fed 0.166% ANFT diet. C: Urine of mice fed 0.188% FANFT diet. D: Urine of mice fed 0.166% ANFT diet.

sheet の一点に重ねて径 5 mm になるように小さく spot した。ラット ANFT 投与群、マウスの FANFT ならびに ANFT 投与群も全く同様な方法で TLC sheet に spot し 2% methanol solvent system で 15 cm まで展開した。このようにしてえられた4つの chromatogram を visible ならびに UV light 下で検

討した。

TLC 分画 mutation test をおこなうため、以上のようにしてえられた TLC sheet の chromatogram の部分を 1 cm 平方に切り15コの TLC 分画切片をえた各分画切片は実験2で述べた *Salmonella typhimurium* TA100 の spot mutation test 用 agar plate 中央に

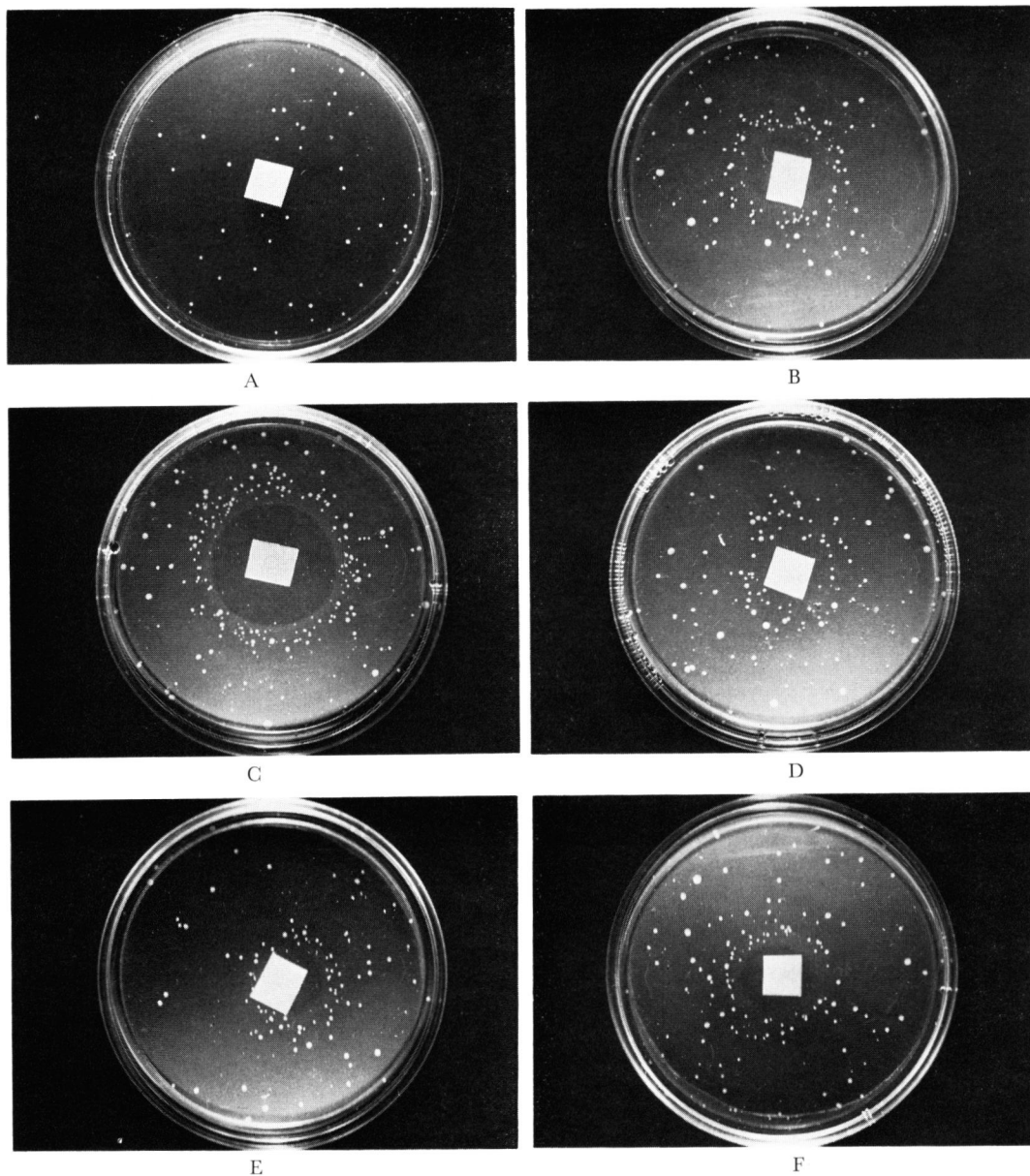


Fig. 8. TLC mutation tests of urine of mice fed 0.188% FANFT or 0.166% ANFT diet in *Salmonella typhimurium* TA100. A: control, B: 2 cm fraction of TLC of urine of mice fed FANFT, C: 3 cm fraction of TLC of urine of mice fed FANFT, D: 3 cm fraction of TLC of urine of mice fed FANFT, D: 4 cm fraction of TLC of urine of mice fed FANFT, E: 10 cm fraction of TLC of urine of mice fed FANFT, F: 3 cm fraction of TLC of urine of mice fed ANFT.

おき 37°C 48時間暗所で incubate した。なお control として control diet 投与中のラット尿をもちいた。

#### 成績

TLC の成績は Fig. 7 に TLC 分画 mutation test と平行して図示する。この図からも明らかなように FANFT を投与したラット尿の 2% methanol-cellulose TLC で Rf 0.18 の正常尿に認められない黄色のスポットを認めた。これは UV light のもとでは dull orange の蛍光を認めるもので対照とした合成 ANFT とまったく一致し ANFT であると断定した。一方、ANFT を投与したラット尿ではこの ANFT を認めることができなかった。また FANFT および ANFT を投与したラット尿にはそれぞれ Rf 0.77, 0.83 の部に黄色の spot を認め、これは UV light 下では同様に dull brown の蛍光が認められた。これらの物質が何であるか同定できていないが、後述する TLC 分画 mutation test で明らかなように、mutagenic activity を有する物質であることなどより nitrofurantoin であるか同一あるいは非常に類似した物質であると推定しうるかもしれない。

FANFT および ANFT を投与したマウス尿の TLC もほぼ同様な所見であり、FANFT 投与群のほうでは ANFT が肉眼で黄色スポットとして認められ、逆に ANFT 投与群ではまったく ANFT は TLC 上に認めることができず、むしろ Rf 0.39 の部に黄色のスポットが認められ UV light 下では dull brown の蛍光を示した。これは後述するように mutagenic activity は認められないが、正常尿に認められないことから ANFT の代謝産物であるのは確実であろう。

TCL 分画 mutation test は control に成長阻止円はまったく認められず、わずかに約 68/plate の His<sup>+</sup> revertant colony を散在性に認めたにすぎないのに反し、FANFT が投与されたラット、マウス尿の 2% methanol-cellulose TLC 3 cm 分画、すなわち Rf 0.18 の ANFT を含む分画切片には大きな成長阻止円と多数の His<sup>+</sup> revertant colony が認められた。反面 ANFT 投与群では TCL sheet 切片も含めて径 13 mm, 15 mm と小さな成長阻止円を認めたにすぎず、これらのことから ANFT をラットあるいはマウスに投与した場合、ANFT はそのまま尿へ排出されないわけではないがその量はきわめて微量であることが明らかとなった。また図でも明らかなように ANFT を投与したマウス尿 TLC で Rf 0.39 に認められた黄色スポット部にはまったく mutagenicity は認められず、他の黄色スポット部にはそれぞれわずかの成長阻止円あるいは His<sup>+</sup> revertant colony の集中があり、これ

らは mutagen であることが明らかとなったが、それはきわめて少量かまたは非常に弱い mutagenic activity を有するにすぎない物質であろうと推定された。なお TLC 分画 mutation test の数例を Fig. 8 に供覧する。

#### 小括

以上の成績より 0.188% FANFT diet を自由摂取しているラット、マウス尿には ANFT の排泄があり、かつこの時のそれぞれの尿のもつ mutagenic activity は成長阻止円の大きさや圧倒的な His<sup>+</sup> revertant colony の TLC 分画 mutation test における ANFT 分画への集中などよりそのほとんどが ANFT に起因することが明らかとなった。反面、同モル比の 0.166% ANFT diet を摂取しているラット、マウス尿には ANFT の排出はあるがきわめて微量であることが明らかとなり、それらの尿のもつ mutagenic activity もすべてこの微量の ANFT に起因するとはいえず、spot あるいは plate mutation test でみられた mutagenic activity は ANFT と他の一部の代謝産物に起因するものであると推定される。そしてこれらの所見は全体的にみて実験 2 の推察とよく一致するものであるが、前述の理由のため尿の spot mutation test における成長阻止円の大きさをもととした尿中 ANFT の比較定量においては FANFT の場合はほぼあてはまるが、ANFT 投与の場合実際の尿中 ANFT 濃度はさらに少ないと考えられる。すなわち実験 2 でもとめた 0.188% FANFT diet と 0.166% ANFT diet を自由摂取しているラット、マウス尿の ANFT 濃度はラットの場合前者のほうが後者に比較して 8 倍以上、マウスの場合も 6 倍以上の濃度であると考えべきであろう。

### 実験 4 radiochromatography

実験 2, 3 でえられた成績は FANFT のラットならびにマウスに対する膀胱発癌性が FANFT の尿中代謝産物 ANFT に起因することを強く示唆するものである。また ANFT をマウスに経口投与した場合には FANFT を投与した場合に比較してきわめて少量しか ANFT として尿中に排泄されないことを明らかにした。前記したように FANFT と ANFT の化学構造はきわめて類似したものであり、また FANFT の第 1 次の代謝が FANFT の deformilation による ANFT への代謝であるとの推定もなされている<sup>27,31,47)</sup>が、なおこれらの 2 つの化合物の尿中代謝産物には ANFT をはじめとしていくつかの違いがあると推定される。またマウスに対する FANFT ならびに ANFT の発癌

性とくにその標的臓器の違いは proximate あるいは ultimate carcinogen の臓器分布との関連において興味ある問題である。しかし、おどろくべきことにこの ANFT がマウスに経口投与された場合、同モル FANFT diet ではほぼ 100% 膀胱癌を発生させるのに反し、まったく膀胱癌の発生がみられず、むしろ約 90% のマウスの胃に腫瘍の発生をみている<sup>9)</sup>。著者はこれらの面を明らかにする目的で radioisotope [<sup>14</sup>C] FANFT ならびに [<sup>14</sup>C] ANFT を経口投与してそれらのマウス尿中代謝産物ならびに臓器分布について検討した。

#### 方法

実験にもちいたマウスは各群それぞれ 3 匹である。 [<sup>14</sup>C] FANFT を corn oil に混入し、さらに non-radioactive FANFT を加え homogenizer で均一な FANFT 2 mg (約  $3 \times 10^5$  DPM)/0.2 ml の [<sup>14</sup>C] FANFT-corn oil 混合液を作成し、また ANFT の場合も 2 mg (約  $3 \times 10^5$  DPM)/0.2 ml の [<sup>14</sup>C] ANFT-corn oil 混合液を準備した。胃管をもちいてこれらの混合液 0.2 ml ずつをそれぞれのマウスに経口投与したのち、尿採集は metabolic cage をもちいて 24 時間おこなった。その後エーテル麻酔下に屠殺して肝、胃、腎、膀胱を摘出した。肝以外の胃、腎、膀胱はその内容物に強い radioactivity が認められることより水洗のうえ ethyl acetate で洗浄した。重量測定後 1 N NaOH 4 ml に入れ 50°C で完全に消化したあとそれぞれの消化溶液が総量 5 ml になるように蒸留水で希釈し、その 0.5 ml<sup>50)</sup> を counting vial に入れ、さらに ANPO/5 ml を加え振盪したのち Mark II scintillation system でそれぞれの radioactivity を測定した。

尿の radiochromatography による検討のため、それぞれの尿を cellulose TLC sheet に約 10  $\mu$ l, 幅 5 mm, 長さ 20 mm に spot し 2% methanol solvent system で 15 cm まで展開した。乾燥後 visible および UV light 下で検討したのち、それぞれの chromatogram は幅 1 cm, 長さ 3 cm の細長い切片に切り 15 コ

の分画切片として counting vial に入れ、同様 ANPO 15 ml を加え分画のもつ radioactivity を測定した。なお残りの尿はそれぞれ 15 ml に蒸留水で希釈し、そのうち 0.1 ml を counting vial に入れ同様にして radioactivity を測定した。

#### 成績

成績は Table 4 および Fig. 9 に示す。 [<sup>14</sup>C] FANFT および [<sup>14</sup>C] ANFT の [<sup>14</sup>C] 尿中回収率はほぼ等しく 50% 前後であった。そしてこれらの尿の radiochromatography では ANFT の部すなわち 3 cm 分画のもつ radioactivity は比較的少ないものであり、

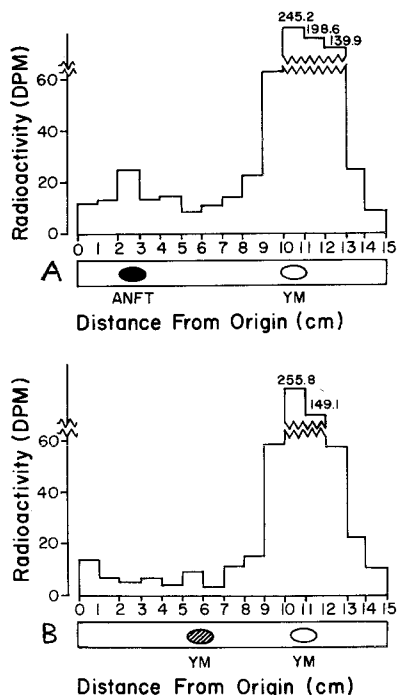


Fig. 9. Radiochromatographies of urine of mice administered [<sup>14</sup>C] FANFT or [<sup>14</sup>C] ANFT. A: Urine of mice administered [<sup>14</sup>C] FANFT, B: Urine of mice administered [<sup>14</sup>C] ANFT.

Table 4. Disposition of [<sup>14</sup>C] FANFT or [<sup>14</sup>C] ANFT after oral administration to mice.

	Mice administered [ <sup>14</sup> C] FANFT %	dpm/mg	Mice administered [ <sup>14</sup> C] ANFT %	dpm/mg
Liver		12.06 ± 0.63		14.91 ± 0.72
Stomach	1.05 ± 0.15	28.39 ± 4.83	1.31 ± 0.19	36.09 ± 2.19
Kidney	0.63 ± 0.10	7.41 ± 0.23	0.67 ± 0.08	7.86 ± 0.42
Bladder	0.18 ± 0.01	42.00 ± 3.00	0.14 ± 0.01	54.00 ± 3.00
Urine	47.87 ± 6.65		46.50 ± 3.76	

The data expressed in terms of percentage of radioactivity distributed to organs and urine and dpm/mg of tissue at 24 hours after administration, with mean ± S.D. of 3 mice.

FANFT を投与したマウス尿でさえ ANFT 分画すなわち 3 cm 分画の radioactivity は 5% 前後にすぎず、さらに全体的にみられるそれぞれの back ground を考えると実際にはさらに少ないものであると考えられる。しかしこの 3 cm 分画には明らかに周囲の分画より大で radioactivity の集中が認められる。一方、ANFT 投与時のマウス尿では 6 cm 分画に若干の radioactivity の集中が認められ、これは実験 3 でも述べた ANFT の尿中代謝産物のうち、黄色のスポットとして認められたものに一致している。そして全体的にみて FANFT が投与された場合のマウス尿中の ANFT の量がきわめて少ない、すなわち FANFT の尿中代謝産物の 5% 以下という少量であるにかかわらず、その尿のもつ強力な mutagenic activity の主因となっている。

[<sup>14</sup>C] の肝、胃、腎、膀胱への distribution については、Table 4 に示したごとく [<sup>14</sup>C] FANFT と [<sup>14</sup>C] ANFT 投与群において顕著な差を認めなかった。これは [<sup>14</sup>C] FANFT が投与された場合でも尿中に存在する [<sup>14</sup>C] ANFT の量がその代謝産物中 5% 以下という少量で、たとえ ANFT が膀胱粘膜あるいは胃粘膜などの ANFT の標的発癌部位に取込まれてもその差を識別することは困難かもしれない。しかし [<sup>14</sup>C] FANFT および [<sup>14</sup>C] ANFT を投与したときの g 当りの胃、膀胱に取込まれる [<sup>14</sup>C] の量は肝、腎に比較しかなり多いことを示しており、さらに検討すべきであろうと考えられる。

#### 小括

以上の成績より [<sup>14</sup>C] FANFT および [<sup>14</sup>C] ANFT がマウスに経口投与された場合、ほぼ同量すなわち約 50% の [<sup>14</sup>C] が 24 時間以内に尿中へ排泄され、radiochromatography の所見も巨視的には非常に似たものであった。しかし [<sup>14</sup>C] FANFT がマウスに投与された場合、明らかにその代謝産物 [<sup>14</sup>C] ANFT による radioactivity の集中があるが量的には比較的少なく、[<sup>14</sup>C] FANFT 尿中代謝産物中 5% 以下であった。また [<sup>14</sup>C] ANFT が投与された場合には radiochromatography では尿中に [<sup>14</sup>C] ANFT は確認しえなかった。以上のように FANFT と ANFT をマウスに投与した場合の尿中代謝産物は radiochromatography 上で巨視的には非常に似たものであったが、発癌にもっとも深く関与すると推定される尿中 ANFT の量などいくらかの点で違いがあることが明らかとなった。

[<sup>14</sup>C] FANFT ならびに [<sup>14</sup>C] ANFT を経口投与したあと 24 時間後の [<sup>14</sup>C] の臓器分布も両方とも類似したものであり、その差を認めなかった。これは

FANFT ならびに ANFT の代謝産物が大部分は似かよったものであり、ANFT の量的な違いによってその分布に生ずると期待された差も ANFT の量じたいが非常に少ないこともあって明らかにしえなかった。

## 考 察

著者のおこなった実験結果の検討はすでに小括をはじめ実験の項でも述べている。したがってここでは従来報告されてきた FANFT を中心とした nitrofuran 化合物の発癌性についての文献的考察をおこない、加えて著者のえた実験成績をもとにその問題点について検討する。

966年 R. J. Stein ら<sup>45)</sup>は 5-nitrofuran 化合物である formic acid 2-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] hydrazide (以下 FNT と略記する) に発癌性があると報告し、以後 5-nitrofuran あるいはそれに類似構造をもつ化合物の強い発癌性がつぎつぎと明らかにされてきた<sup>9-14, 17-24, 37)</sup>。このうち FANFT は 1967年 E. Ertürk ら<sup>17)</sup>によってラット膀胱に強力な発癌性を有することが報告され、その 100% という高い発癌率と膀胱以外にはほとんどみらるべき影響をあたえない特異的膀胱発癌性、加えてその癌の形態がきわめてヒト膀胱癌に類似することより非常に興味深い発癌物質であるとしてラット<sup>19)</sup>はもとよりイヌ<sup>23)</sup>、ハムスター<sup>14)</sup>、マウス<sup>9, 21, 58)</sup>などによる発癌実験がなされ、これらに対してもともに強力な膀胱発癌作用があることが報告されてきた。一方 5-nitrofuran 化合物は 1944年 M. C. Dodd ら<sup>15)</sup>の報告いらい医薬、獣医薬あるいは農業関係に広く使用されてきたものであり<sup>30, 36, 38, 59)</sup>、前述した FNT や FANFT の発癌性が明らかにされていらい、5-nitrofuran 化合物はもとより、これに類似構造を有する化合物は発癌性を有する可能性があるとしてその再検討がなされるにいたったものである<sup>12)</sup>。周知のように従来化学療法剤として使用されてきた N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] acetamide はすでにその発癌性が確認され<sup>9-14, 20, 23)</sup>、また日本で大きな問題となった 2-(2-furyl)3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2) も強い mutagenic activity を有することが報告され<sup>29, 51, 54, 55)</sup>、現在食品防腐剤としての使用が禁止されている。しかし現在なお 5-nitrofuran 化合物は nitrofurantoin など広く尿路感染症治療剤として使用されているものもある。これらは動物試験においていちおうその発癌性は認められなかった<sup>10, 37)</sup>ものではあるが、それのもつ化学構造あるいは強い mutagenic activity を考えるとき医薬品として問題があるばかりでなく、一般的 mutagen としてはもとより発癌物質

である可能性があるとしてさらに検討されており<sup>12,53)</sup>, nitrofuran 化合物の発癌性についての研究は単に発癌物質としての興味にとどまらず現在早急に取り組むべき重大な問題の1つとなっている。

ひるがかって、現在まで FANFT をはじめとする nitrofuran あるいはその類似化合物の発癌機序に関しては *in vitro* における nitroreductase enzyme system や FANFT formamidase などの生化学的研究<sup>47-50)</sup> や FANFT の発癌性における内分泌の条件の検討<sup>58)</sup>, あるいは nitroreductase inhibitor, allopurinol の FANFT の発癌性に対する影響<sup>52)</sup> など FANFT の膀胱発癌に影響をあたえる内的あるいは外的因子, さらに FANFT を含めた一連の nitrofuran あるいはその類似化合物の化学構造学的検討<sup>9-13)</sup> がなされてはきたが, その発癌機構はほとんど解明されていず, その根本的要因である代謝についてもじゅうぶん明らかにされたとはいいがたい。とくに FANFT についてはその特異的膀胱発癌性を有することより尿中に何らかの発癌性代謝産物が排泄されているであろうとの推定にもかかわらず, 現在までほとんど FANFT の尿中代謝産物についての報告はみられず, わずかに G. M. Lower, Jr. ら<sup>31)</sup> が radioisotope を使用して FANFT の尿中代謝産物について検討を試み [2-<sup>14</sup>C] FANFT をマウスに投与した場合, 24時間尿に50%の [<sup>14</sup>C] が検出されるのに反し, [formyl-<sup>14</sup>C] FANFT を投与した場合速やかに呼気中に62%の [<sup>14</sup>C] が排出され, 尿中にはほとんど検出されないことより, FANFT をマウスに経口投与したときの第1次の代謝が ANFT の形成であろうと推定したにとどまり, radiochromatography による尿分析においては ANFT の証明は不成功に終わっている。

前述したように著者ら<sup>26,27)</sup> は最近 FANFT を同時に経口および腹腔投与したラットの尿中代謝産物の検索をおこない, その尿中に FANFT の代謝産物 ANFT の存在を証明し, また *Salmonella typhimurium* TA100 を使ったこれらの尿の TLC 分画 mutation test よりラットの FANFT 尿中代謝産物のうちほとんど ANFT にのみ mutation が集中することより, FANFT の膀胱発癌の主因となる proximate あるいは ultimate carcinogen は ANFT であると推定してきた。そして今回著者は FANFT のラットに対する短期, 中期の発癌実験をおこない FANFT の特異的膀胱発癌性を確認するとともに, 従来これらの発癌実験にもちいられた投与方法と同じように FANFT あるいは ANFT をラット, マウスに自由摂取させたときの尿を *Salmonella typhimurium* TA100 を使った spot, plate および TLC

分画 mutation test で検討し, またマウスには radioisotope [<sup>14</sup>C] FANFT および [<sup>14</sup>C] ANFT を併用して検討した。成績はすでに述べたように FANFT を経口投与したときのラット, マウス尿には強力な mutagenic activity が認められ, これがおもに FANFT の代謝産物 ANFT によるものであることを明示した。さらに ANFT をラット, マウスに投与した場合, それぞれの尿の mutagenic activity は FANFT 投与時に比較してきわめて小さくかつその主因となる尿中 ANFT 濃度もそれぞれ 1/8 以下, 1/6 以下と極端に小さいものであることも明らかにした。mutagenicity と carcinogenicity の関連性についての考察は後述するとして, 以上の所見は ANFT が FANFT の deformilation しただけの非常に類似した化学構造をもち, また前述したように ANFT が FANFT のラットやマウスにおける第1次の代謝産物であり, かつ FANFT の尿中へ排泄される proximate carcinogen と推定され, したがってマウスに経口投与された場合においても FANFT と同じく強い膀胱発癌性が予期されたにもかかわらず, マウスの発癌実験においては FANFT が膀胱癌を 100% 発生させるのに反し ANFT の場合はまったく膀胱に癌発生がみられず, むしろ胃に90%の腫瘍発生がみられた S. M. Cohen ら<sup>9)</sup> の報告とよく一致するものである。すなわち FANFT をマウスに投与した場合には尿中にその発癌性代謝産物として強い mutagenic activity をもつ ANFT が排出されこれが膀胱癌の主因となると考えられるが, 半面 ANFT が投与された場合は同モル量の FANFT の場合に比較してきわめて少量しか尿中には証明されない, したがってきわめて少量の ANFT にしか接しない膀胱上皮は癌化にはいたらずむしろ大量の ANFT が飼料とともに常に胃内にあつてこれが胃腫瘍を発生させる原因となっていると推定される。また以上のことから FANFT じたいには直接の発癌作用はなく, これが代謝されて ANFT へと代謝されてはじめて発癌作用をもついわゆる代謝性発癌物質であり, 癌原性の本態はあくまで ANFT によることが強く推定される。さらに実験4の成績を考えあわせると FANFT を投与された場合の尿中 ANFT 量も FANFT の尿中代謝産物中けりして大量ではないが, 比較的小量でもその発癌性は強力であると考えられる, 半面その限界はまだ明らかでないがある程度の濃度以下では膀胱上皮を癌化に導くことはできないものであると思われる。

すでに報告<sup>27)</sup> したように FANFT の代謝は前述した G. M. Lower, Jr. らの報告<sup>31)</sup>, C. Y. Wang ら<sup>47-50)</sup> の種々の実験動物のもつ formamidase, また nitro-

reductase enzyme system の確認、さらに著者らの FANFT 投与時のラット尿中代謝産物の検討による尿中 ANFT の確認<sup>26, 27)</sup>などより、FANFT は体内でまず第1次の変化として deformilation され ANFT へと代謝を受け、さらにその大半は nitroreductase enzyme system あるいは他の metabolic system でさらに代謝されると推定されるが、反面その部は比較的少量であるがそのまま何らの代謝を受けず尿へ排泄されるものであろう。

一方 ANFT をラットあるいはマウスに経口投与した場合の代謝は今回の著者の成績から次のごとく考えられる。すなわち摂取された ANFT は体内で吸収される前に、おそらく胃あるいは腸管内でかなりの量が reduction されるのであろう。なぜなら実験4で明らかのごとく [<sup>14</sup>C] ANFT と [<sup>14</sup>C] FANFT の尿中総 [<sup>14</sup>C] 量はほぼ同量であるし、一方、体内に吸収された FANFT はさらに ANFT へと代謝を受けたあとそのまま一部が尿中へ排泄されるにかかわらずその尿中 ANFT の量は同量の ANFT を経口投与した時と比較して極端に大である。もし ANFT がまったく reduction を受けずに体内に吸収されると仮定すれば、FANFT が胃、腸管内で reduction を受けるかどうかにかかわらず同量の FANFT が投与された場合と同量かあるいはそれ以上の ANFT が尿へ排出されるのが期待されるのであるが、著者の成績はまったく逆に極端に少量の ANFT が観察されたにすぎなかった。そしてこれらの問題は単に FANFT および ANFT の代謝としての興味があるだけでなく発癌物質の代謝性活性化、また逆に発癌物質に対する生体防御機構の解明という意味からもさらに検討されるべき興味ある問題であろう。

さて著者が FANFT および ANFT の発癌性の検討に利用した *Salmonella* をつけた mutation test であるが、従来 B. N. Ames を中心におもに発癌物質のマススクリーニング法として発達してきたものである<sup>2-4, 33, 34)</sup>。そして最近 J. McClann ら<sup>35)</sup>によって紹介された *Salmonella typhimurium* TA100 は従来広く使われていた *Salmonella typhimurium* TA1535<sup>2-4)</sup> の菌株に R 因子プラスミッド・PKM 101 を組み込み mutagen 検出の感度をさらに高め従来困難であった種々の carcinogen のもつ mutagenicity の検出を可能にしている<sup>33, 34, 51, 55, 56)</sup>。 *Salmonella typhimurium* TA100 の mutagenic mechanism は histidine 合成酵素の遺伝子に突然変異がおこって histidine 要求性 (His<sup>-</sup>) となったものが塩基置換型あるいは frameshift 型の mutagen などにより histidine 非要求性 (His<sup>+</sup>) となる reverse

mutation である。さらに同株は除去修復システム (uvr B) の欠如、細菌の表面構成分子であるリポ多糖類の欠脱など発癌物質の検索を目的とした mutation test 用の菌株として非常に優れている<sup>33, 56)</sup>。そしてこれを利用した mutation test は該当する遺伝子の DNA の変化を直接みるものであって、その結果えられる His<sup>+</sup> revertant colony 数を算定することによりその物質のもつ mutagenic activity ひいては carcinogenic activity を推定するものである。現在のところこれらの mutation test はほとんど発癌物質のマススクリーニングとして利用される程度でその mutagenicity と carcinogenicity との間に100%の一致をみていない<sup>34, 56)</sup>が、mutagenicity を有するものは carcinogen である可能性がたつと、また carcinogen は mutagenic activity をもつ可能性がきわめて強い<sup>35)</sup>。とくに最近の報告では *Salmonella typhimurium* TA100 に対する nitrofuran あるいはその類似化合物の mutagenicity と carcinogenicity とはきわめてよく一致している<sup>34, 51, 55)</sup>。著者はこれらの点に着目して FANFT を投与したラット、マウス尿に排泄されるであろう発癌性代謝産物の mutagenicity を検討することにより逆にその発癌性代謝産物を検索し、さらに ANFT を投与した場合との比較定量をもおこない、これらのもつ発癌性の解明を試みたものである。

従来発癌物質の確認あるいは証明として該当物質を実験動物に投与してその発癌性を証明することがおこなわれており、また *in vitro* で直接発癌させうる場合や細胞小器官への影響をみることによりその発癌性を推定することもその一つの方法であろう。しかしなおこれには経済的、技術的また種属特異性などの信頼性に問題が多いのも事実である。さらに代謝性発癌物質の proximate あるいは ultimate carcinogen の決定あるいは証明にはさらに多くの問題がある。とくに膀胱癌の場合、膀胱内への implantation technique<sup>1, 5-8, 28)</sup> あるいは *in vitro* における膀胱上皮細胞の直接発癌実験<sup>25)</sup>などきわめて興味ある方法であるとはいえ、その技術的、経済的あるいはその信頼性、さらに proximate あるいは ultimate carcinogen の単離・抽出などさらに困難な問題であるといわざるをえない。前述したように著者はこれらの困難な問題を解決する手段の一つとして発癌物質をスクリーニングする方法として発達してきた spot および plate mutation test を導入し、加えて TLC 分画 mutation test を考案した。そして、これらの方法をもちいた膀胱発癌物質 FANFT およびその尿中代謝産物 ANFT の発癌性についての検討は前述したように FANFT の膀胱発癌性



はその代謝産物 ANFT によると推定されるなどきわめて有意なものであった。とくに TLC 分画 mutation test は尿中代謝産物のもつ mutagenicity を比較定量することも可能であり、これらの化学発癌物質あるいは自然環境にある発癌物質の検索やその代謝性発癌物質の検討への導入は単に尿中に代謝される場合に限らず、血液あるいはその他の体液などにも応用が可能であり、その技術的容易さ、経済的にも廉価で、短期間に多数の検体を処理できるなどの有利さもあいまって今後さらに広く利用しうるものと考えられる。

現在 FANFT あるいは ANFT などの nitrofuran 化合物の代謝あるいはその発癌性についての研究はまだその緒についたばかりである。したがって今後さらに検討を加えられるべき点も多く、また現在 nitrofurantoin など mutagenic activity を有する化合物も広く薬品として日常臨床で使われておりその再検討の必要性は痛感されている。そしてまた現在あるいは将来にわたりつぎつぎと合成されるであろう各種化合物はもとより自然界に存在する諸物質を検討し、それらについて発癌性の有無を明らかにすることによってヒトを外因性発癌より防止することが私たち医学、薬学あるいは化学に携わっているもの大きな使命の一つであろう。

## 結 語

FANFT の膀胱発癌性の検討を目的としてラットに FANFT を経口投与して短期、中期の膀胱発癌実験をおこなった。また FANFT とその発癌性代謝産物である ANFT の同モル比 diet を投与したときの尿のもつ mutagenic activity およびその主因である尿中 ANFT 量を *Salmonella typhimurium* TA100 をもちいた mutation test system にて測定し、加えてマウスに  $[^{14}\text{C}]$  FANFT,  $[^{14}\text{C}]$  ANFT を投与した時の  $[^{14}\text{C}]$  の臓器分布ならびに尿の radiochromatography による分析を試み次の成績ならびに結論をえた。

1) 0.188% FANFT diet をラットに10~20週投与して最長30週間と比較的短期の発癌実験で、10週の投与では発癌に至らず、15週以上の投与では10~50%に明確な膀胱発癌が観察され、いわゆる乳頭腫ともいべきものは大多数の動物に認められその強い膀胱発癌性が確認された。

2) FANFT ならびに ANFT の *Salmonella typhimurium* TA100 に対する mutagenic activity を検討して、それらがほぼ同程度の mutagenic activity を有することを明らかにした。

3) しかし 0.188% FANFT diet と同モル比の

0.166% ANFT diet をラットならびにマウスに自由摂取させた場合、それぞれの尿のもつ mutagenic activity には大きな差があり、さらに TLC 分画 mutation test でこれらの mutagenic activity の差は尿中の ANFT 濃度が主因となっていることが明らかとなった。

4) 0.188% FANFT diet と 0.166% ANFT diet を投与した場合のラット、マウスの尿へ排泄される ANFT の尿中濃度は前者のほうが後者に比較してラットの場合8倍以上、マウスの場合6倍以上高かった。

5)  $[^{14}\text{C}]$  FANFT と  $[^{14}\text{C}]$  ANFT をマウスに経口投与した場合、 $[^{14}\text{C}]$  の臓器分布に差を認めなかったが尿の radiochromatography では前者の場合、尿中代謝産物のうち5%以下ではあるが明らかに ANFT 分画に  $[^{14}\text{C}]$  の集中があるのに反し後者の場合 ANFT 分画に  $[^{14}\text{C}]$  の集中を認めなかった。

6) 以上の成績に文献の考察を加え、FANFT は代謝性発癌物質であり、その proximate carcinogen は ANFT であり、FANFT の膀胱発癌性も尿中に排泄されるその発癌性代謝産物 ANFT によるものであると結論した。

7) 本研究をとおして TLC 分画 mutation test を含む mutation test system の導入が化学発癌物質あるいは自然環境下にある発癌物質の代謝ならびに発癌性の検討にきわめて有用であることを確認し、今後さらに広く応用されるべきであろうと強調した。

## 謝辞

稿をおえるにあたり恩師酒徳治三郎教授のご指導、ご校閲に深甚の謝意を表します。本研究をとおし終始変らない暖いご援助をして下さいました Wisconsin 大学 George T. Bryan 教授ならびに京都大学医学部泌尿器科学教室 吉田修教授に深く感謝致します。また適切など教示をいただいた桐山菅夫助教授、心からの協力をいただいた Wisconsin 大学 Ching Y. Wang 博士ならびに同大学 Clinical Oncology の各位に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Allen, M. J., Boyland, E., Dukes, C. E., Horning, E. S. and Watson, J. G.: Cancer of the Urinary Bladder Induced in Mice with Metabolites of Aromatic Amines and Tryptophan. *Brit. J. Cancer*, **11**: 212~228, 1957.
- 2) Ames, B. N.: The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. In: A. Hollaender (ed.), *Chemical Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*. Vol. 1, pp. 267

- ~282. New York: Plenum Press, 1971.
- 3) Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E.: An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)*, **70**: 787~786, 1973.
  - 4) Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. and Lee, F. D.: Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)*, **70**: 2281~2283, 1973.
  - 5) Bryan, G. T., Brown, R. R. and Price, J. M.: Incidence of Mouse Bladder Tumors Following Implantation of Paraffin Pellets Containing Certain Tryptophan Metabolites. *Cancer Res.*, **24**: 582~585, 1964.
  - 6) Bryan, G. T., Brown, R. R., Morris, C. R. and Price, J. M.: In Vitro Elution of Tryptophan Metabolites and Other Aromatic Nitrogen Compounds from Cholesterol Pellets Implanted into Mouse Bladders. *Cancer Res.*, **24**: 586~595, 1964.
  - 7) Bryan, G. T., Brown, R. R. and Price, J. M.: Mouse Bladder Carcinogenicity of Certain Tryptophan Metabolites and Other Aromatic Nitrogen Compounds Suspended in Cholesterol. *Cancer Res.*, **24**: 596~602, 1964.
  - 8) Clayson, D. B. and Cooper, E. H.: Cancer of the Urinary Tract; *Advances in Cancer Research*, Vol. 13, (ed. Klein, G. and Weinhouse, S.), pp. 351~362, Academic Press, New York and London, 1970.
  - 9) Cohen, S. M., Lower, Jr. G. M., Ertürk, E. and Bryan, G. T.: Comparative Carcinogenicity in Swiss Mice of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-acetamide and Structurally Related 5-Nitrofurans and 4-Nitrobenzenes. *Cancer Res.*, **33**: 1593~1597, 1973.
  - 10) Cohen, S. M., Ertürk, E., Von Esch, A. M., Crovetto, A. J. and Bryan, G. T.: Carcinogenicity of 5-Nitrofurans, 5-Nitroimidazoles, 4-Nitrobenzenes, and Related Compounds. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**: 403~417, 1973.
  - 11) Cohen, S. M., Ertürk, E. and Bryan, G. T.: Comparative Carcinogenicity of 5-Nitrothiopenes and 5-Nitrofurans in Rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**: (in press), 1976.
  - 12) Cohen, S. M., and Bryan, G. T.: Carcinogenesis Caused by Nitrofurans Derivatives. In: *Pharmacology and the Future of Man. Proceedings of the 5th International Congress on Pharmacology*, Vol. 2, pp. 164~170, Basel, Switzerland: S. Karger, A. G., 1973.
  - 13) Cohen, S. M., Ertürk, E., Von Esch, A. M., Crovetto, A. J. and Bryan, G. T.: Carcinogenicity of 5-Nitrofurans and Related Compounds with Aminoheterocyclic Substituents. *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**: 841~850, 1975.
  - 14) Croft, W. A. and Bryan, G. T.: Production of Urinary Bladder Carcinomas in Male Hamsters by N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide, N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]acetamide, or Formic acid 2-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]hydrazide. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**: 941~949, 1973.
  - 15) Dodd, M. C. and Stilman, W. B.: The In Vitro Bacteriostatic Action of Some Simple, Furan Derivatives, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **82**: 11 18, 1944.
  - 16) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmidt, D. H., Mennel, H. D. and Stahl, K. M.: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl- und N-Butyl-N-butanol (4)-nitrosamin. *Z. Krebsforsch.*, **6**: 280~290, 1964.
  - 17) Ertürk, E., Price, J. M., Morris, J. E., Cohen, S., Leith, R. S., Von Esch, A. M. and Crovetto, A. J.: The Production of Carcinoma of the Urinary Bladder in Rats by Feeding N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide. *Cancer Res.*, **27**: 1998~2002, 1967.
  - 18) Ertürk, E., Cohen, S. M., Price, J. M., Von Esch, A. M. and Bryan, G. T.: The Production of Hemangioendothelial sarcoma in Rats by Feeding 5-Acetamido-3-(5-nitro-2-furyl)-6H-1, 2, 4-oxadiazine. *Cancer Res.*, **29**: 2212~2218, 1969.
  - 19) Ertürk, E., Cohen, S. M., Price, J. M. and Bryan, G. T.: Pathogenesis, Histology and Transplantability of Urinary Bladder Carcinomas Induced in Albino Rats by Oral Administration of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]for-

- amide. *Cancer Res.*, **29**: 2219~2228, 1969.
- 20) Ertürk, E., Cohen, S. M. and Bryan, G. T.: Carcinogenicity of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]acetamide in Female Rats. *Cancer Res.*, **30**: 936~941, 1970.
- 21) Ertürk, E., Cohen, S. M. and Bryan, G. T.: Urinary Bladder Carcinogenicity of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-formamide in Female Swiss Mice. *Cancer Res.*, **30**: 1309~1311, 1970.
- 22) Ertürk, E., Morris, J. E., Cohen, S. M., Price, J. M. and Bryan, G. T.: Transplantable Rat Mammary Tumors induced by 5-Nitro-2-furaldehyde semicarbazone and by Formic acid 2-[4-(5-nitro-2-thiazolyl) hydrazide. *Cancer Res.*, **30**: 1409~1412, 1970.
- 23) Ertürk, E., Atassi, S. A., Yoshida, O., Cohen, S. M., Price, J. M. and Bryan, G. T.: Comparative Urinary and Gall Bladder Carcinogenicity of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide and N-[4-(5-Nitro-2-thiazolyl)-acetamide in Dog. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**: 535~542, 1970.
- 24) Ertürk, E., Morris, J. E., Cohen, S. M., Von Esch, A. M., Crovetti, A. J., Price, J. M. and Bryan, G. T.: Comparative Carcinogenicity of Formic acid 2-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] hydrazide and Related Chemicals in the Rat. *J. Natl. Cancer Inst.*, **47**: 437~445, 1971.
- 25) Hashimoto, Y. and Kitagawa, H. S.: In Vitro Neoplastic Transformation of Epithelial Cells of Rat Urinary Bladder by Nitrosamines. *Nature*, **252**: 497~499, 1974.
- 26) Hayashida, S., Wang, C. Y. and Bryan, G. T.: A Simple Method for Detection and Analysis of Carcinogens and Their Metabolites by Combining Chromatography and Spot Mutation Tests, in press. *Gann*, 1976.
- 27) 林田重昭, Wang, C. Y. and Bryan, G. T.: 特異的膀胱発癌物質 N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-formamide のラット尿中代謝産物の検討. *泌尿紀要*, **22**: 845 1976.
- 28) Jull, J. W.: The Induction of Tumors of the Bladder Epithelium in Mice by the Direct Application of a Carcinogen. *Brit. J. Cancer*, **5**: 328~330, 1951.
- 29) Kada, T.: *Escherichia coli*: Mutagenicity of Furfurylformamide. *Japan J. Genetics*, **48**: 301~305, 1973.
- 30) Kuemmerle, H. P., Preziosi, P. and Rentchnick P. (eds.): *Proc. 2nd Int. Symp. of Chemotherapy*, Naples, 1961, Part VI. Nitrofurans (Karger, Basel, 1963).
- 31) Lower, Jr. G. M. and Bryan, G. T.: Metabolic Activation of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide (FANFT): A Bladder Carcinogen. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **12**: 3, 1971.
- 32) McCalla, D. R., Voutsinos, D. and Olive, P. L.: Mutagen Screening with Bacteria: Niridazoles and Nitrofurans. *Mutation Res.*, **31**: 31~37, 1975.
- 33) McCann, J., Spingarn, N. E., Kobori, J. and Ames, B. N.: Detection of Carcinogens as Mutagens: Bacterial Tester Strain with R Factor Plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. (US)*, **72**: 979~983, 1975.
- 34) McCann, J., Choi, E., Yamashaki, E. and Ames, B. N.: Detection of Carcinogens as Mutagens in the Salmonella/microsome Test: Assay of 300 Chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**: 5135~5139, 1975.
- 35) Miller, J. A. and Miller, E. C.: Metabolic Activation and Reactivity of Chemical Carcinogens. *Mutation Res.*, **33**: 25~26, 1975.
- 36) Miura, K. and Reckendorf, H. K.: The Nitrofurans. *Progr. Med. Chem.*, **5**: 320~381, 1967.
- 37) Morris, J. E., Price, J. M., Lalich, J. J. and Stein, R. J.: The Carcinogenic Activity of Some 5-Nitrofurans Derivatives in Rats. *Cancer Res.*, **39**: 2145~2156, 1969.
- 38) Murray, C. C. (Chairman): *Proc. 2nd Natl. Symp. on Nitrofurans in Agriculture*, 1956.
- 39) Okada, M., Suzuki, E., Aoki, J., Iiyoshi, M., Kurashima, C., Miyajima, K., and Hashimoto, Y.: Studies on the Correlation of Structure and Metabolism with Organotropic Carcinogenicity to the Urinary Bladder of N-Nitrosodialkylamines and Related Compounds. The 5th Symp. on Drug Metabolism and Action, in Shizuoka, Japan, Nov. 9 to 10, 1973.
- 40) Okada, M. and Hashimoto, Y.: Carcinogenic Effect of N-Nitrosoamines Related to Butyl(4-hydroxybutyl) nitrosoamine in ACI/N Rats, with Special Reference to Induction of Urinary

- Bladder Tumors. *Gann*, **65**: 13~19, 1974.
- 41) Price, J. M.: Benign and Malignant Tumors of the Urinary Bladder, (Ed., Maltry, E.), pp. 189~261, Medical Examination Publishing Co., Inc., New York, 1970. より引用
  - 42) Sherman, W. R. and Dickson, D. E.: 4-(5-Nitro-2-furyl)-thiazoles. *J. Org. Chem.*, **27**: 1351~1355, 1962.
  - 43) Soloway, M. S.: Single and Combination Chemotherapy for Primary Murine Bladder Cancer. *Cancer*, **36**: 333~340, 1975.
  - 44) Soloway, M. S. and Martino, C.: Long Term Chemotherapy and/or Immunotherapy of Primary Murine Bladder Cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **17**: 9, 1976.
  - 45) Stein, R. J., Yost, D., Petrolunas, F. and Von Esch, A.: Carcinogenic Activity of Nitrofurans. A Histologic Evaluation, *Federation Proc.*, **25**: 291, 1966.
  - 46) Tiltman, A. J. and Friedell, G. H.: The Histogenesis of Experimental Bladder Cancer, *Invest. Urol.*, **9**: 218~226, 1971.
  - 47) Wang, C. Y. and Bryan, G. T.: Deacetylation of Carcinogenic 5-Nitrofurans Derivatives by Mammalian Tissues. *Chem. Biol. Interact.*, **9**: 432~428, 1974.
  - 48) Wang, C. Y., Behrens, B. C., Ichikawa, M. and Bryan, G. T.: Nitroreduction of 5-Nitrofurans Derivatives by Rat Liver Xanthine Oxidase and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Cytochrome c Reductase. *Biochem. Pharmac.*, **23**: 3395~3403, 1974.
  - 49) Wang, C. Y., Chiu, C. W. and Bryan, G. T.: Nitroreduction of Carcinogenic 5-Nitrothiophenes by Rat Tissues. *Biochem. Pharmac.*, **24**: 1563~1568, 1975.
  - 50) Wang, C. Y., Chiu, C. W. and Bryan, G. T.: Metabolism and Disposition of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-Acetamide in the Rat. *Drug Met. Dispo.*, **3**: 89~95, 1975.
  - 51) Wang, C. Y., Muraoka, K. and Bryan, G. T.: Mutagenicity of Nitrofurans, Nitropyrroles, Nitroimidazoles, Aminothiophenes, and Amino-thiazoles In *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, **35**: 3611~3617, 1975.
  - 52) Wang, C. Y., Hayashida, S., Pamucku, A. M. and Bryan, G. T.: Enhancing Effect of Allopurinol on the Induction of Bladder Cancer in Rats by N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide. *Cancer Res.*, **36**: 1551~1555, 1976.
  - 53) Wang, C. Y., Benson, Jr. R. C. and Bryan, G. T.: Mutagenicity for *Salmonella typhimurium* of Urine Obtained from Humans Receiving Nitrofurantoin, in press.
  - 54) Yahagi, T., Nagao, M., Hara, K., Matsushima, T., Sugimura, T. and Bryan, G. T.: Relationships Between the Carcinogenic and Mutagenic or DNA-modifying Effects of Nitrofurans Derivatives, Including 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, A Food Additive. *Cancer Res.*, **34**: 2266~2273, 1974.
  - 55) Yahagi, T., Matsushima, T., Nagao, M., Seino, Y., Sugimura, T., and Bryan, G. T.: Mutagenicity of Nitrofurans Derivatives on a Bacterial Tester Strain with an R Factor Plasmid. *Mutation Res.*, **40**: 9~14, 1976.
  - 56) 矢作多貴江：環境中の発ガン物質を微生物を使ってスクリーニングする実験法について。蛋白質・核酸・酵素, **20**:1178~1189, 1975.
  - 57) Yalciner, S., Tiltman, A. J. and Friedell, G. H.: In vivo Transplantability of Urinary Bladder Epithelia from Rat Ingesting N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-thiazolyl]formamide. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51**: 1177~1185, 1973.
  - 58) Yoshida, O., Ertürk, E., Bryan, G. T. and Lower, G. M.: The Effect of Gonadectomy and Hormone Administration on the Urinary Bladder Carcinogenicity of N-[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide in Male and Female Swiss Mice. *Invest. Urol.*, **11**: 216~220, 1973.
  - 59) Zindel, H. C. (chairman), *Proc. 1st Nat. Symp. on Nitrofurans in Agriculture*, 1956.

(1976年8月20日受付)