

抗癌剤投与患者尿の変異原性に関する研究

滋賀医科大学医学部泌尿器科学教室（主任：友吉唯夫教授）

朴 勺

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

宮 川 美 栄 子

吉 田 修

THE STUDY ON THE MUTAGENIC ACTIVITY OF URINE FROM
THE PATIENTS RECEIVING ANTI-CANCER DRUGS

Kyun PAK

From the Department of Urology, Shiga University of Medical Science

(Director: Prof. T. Tomoyoshi, M.D.)

Mieko MIYAKAWA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. O. Yoshida, M.D.)

Mutagenic activity of urines from 43 patients with urogenital cancer was tested in the Salmonella typhimurium TA98 and TA100. All patients were hospitalized and were on usual hospital diets. They were ordered not to smoke during their hospital course and their renal and liver functions were almost normal. None of the patients received antibiotics during this experiment. 200 ml of each urine was concentrated 200-fold by adsorption with the XAD-2 resin. Ninety-four urine samples from 43 patients were divided into four groups: group 1, 18 urine samples from 15 patients receiving no drugs; group 2, 27 urine samples from 24 patients receiving some drugs except for anti-cancer drugs; group 3, 39 urine samples from 16 patients receiving single anti-cancer drug; group 4, 10 urine samples from 5 patients receiving 2 anti-cancer drugs. A 24 hour urine was collected for groups 1 and 2, and a urine from the time of administration to the next early morning was collected for groups 3 and 4. The results are as follows:

- 1) None of urine concentrates of group 1 was mutagenic to either strain TA98 or TA100.
- 2) None of urine concentrates of group 2 was mutagenic to either strain TA98 or TA100.
- 3) Eight urine concentrates of group 3 were mutagenic. Though 5 urine concentrates from 3 patients receiving cyclophosphamide were not mutagenic to either strain TA98 or TA100, the urine concentrate obtained from 1 to 3 hours after administration of 1,500 mg cyclophosphamide was mutagenic to the strain TA100. Four of 9 urine concentrates from 6 patients receiving adriamycin were mutagenic to the strain TA98 and/or TA100 and two of 4 mutagenic urine concentrates were mutagenic to both strain TA98 and TA100. Two of 14 urine concentrates from 6 patients receiving cis-diamminedichloride platinum were mutagenic to the strain TA100. No mutagenic activity was detected in the urine of any of the patients receiving one of 4 anti-cancer drugs; actinomycin D, vinblastine, bleomycin or mitomycin C.
- 4) Four urine concentrates of group 4 were mutagenic. All of 2 urine concentrates from the patients receiving adriamycin and 5-fluorouracil were mutagenic to the strain TA98. One of 3 urine concentrates from the patients receiving mitomycin C and cytosine arabinoside was mutagenic to the

strain TA98. The urine concentrate from the patient receiving vincristine and actinomycin D was mutagenic to the strain TA98. No mutagenic activity was detected in the urine of the patients receiving vincristine and cytosine arabinoside, vincristine and pepleomycin, or methotrexate and pepleomycin.

5) Our results suggest that urinary metabolites of some anti-cancer drugs might act as an initiator on the urothelium. Although at the present time the detection of mutagenic activity in the urine does not necessarily predict carcinogenesis of the urothelium, the physician who uses anti-cancer drugs should be aware of delayed sequelae on the urinary tract.

Key words: Anti-cancer drugs, Urine concentration, Salmonella typhimurium, Mutagenicity

はじめに

発癌物質の大部分が突然変異を指標とする微生物を用いた短期検出法により検出できるようになり、医薬品、農薬、化粧品、食品添加物などの化学物質の変異原性が検討されるようになった¹⁻⁶⁾。医薬品のなかでも抗癌剤はそのおもなものに動物実験で発癌性が認められており⁷⁻²¹⁾、抗癌剤の発癌性と変異原性について高い相関性が報告されている^{22,23)}。また臨床的には抗癌剤の長期投与を受けた患者に新たな癌が発生したという報告²⁴⁻⁴¹⁾がある。癌化学療法法の進歩に伴う長期生存が期待でき、また非腫瘍性疾患、たとえば乾癬^{26,42)}、ネフローゼ症候群^{28,42)}、関節リュウマチ^{39,42,43)}それに全身性紅斑性狼瘡^{39,42)}などの患者にも抗癌剤が使用されている現状では、治療のために用いた抗癌剤による二次的な癌発生の危険性を無視することはできない。抗癌剤投与による早期の副作用についてはよく報告されているが、長期にわたる観察はほとんどなされておらず、とくに小児や若年者に抗癌剤を投与するときは新たな腫瘍発生ということも考慮して長期間経過を観察する必要がある。

いっぽう尿路腫瘍の発生機序において尿中のイニシエーターおよびプロモーターが重要な役割を演じていることは、これまでの多くの研究により支持されることである⁴⁴⁾。イニシエーターの検索には Ames test が簡便で広く用いられているが、ヒト尿が Ames test で検討されるようになってきたのは、1977年 Yamasaki と Ames⁴⁵⁾ が resin を用いてヒトの尿を濃縮する方法を報告してからであり、それ以前はヒトの尿の変異原性に関する報告はほとんどみられなかった。抗癌剤による癌発生報告例のなかでも、最近 cyclophosphamide による膀胱癌の発生報告³⁴⁻⁴¹⁾が増加しており、抗癌剤の尿中代謝産物が尿路上皮に発癌作用を有していると考えられ、抗癌剤投与患者の尿の変異原性を検討することは重要な意義をもつ。

われわれはこれまで *Salmonella typhimurium* TA 98

と TA 100 を用いて27種類の抗癌剤の変異原性を検討し、そのうちの12種類に変異原性がみられたことと、27種類の抗癌剤のうち13種類をラットの頸静脈より投与したときの尿では、そのうちの9種類に変異原性がみられたことを報告した^{46,47)}。今回、抗癌剤投与患者尿について変異原性を検討したので報告する。

対象および実験方法

(1) 対 象

京都大学医学部附属病院および滋賀医科大学附属病院泌尿器科に1980年2月より1981年3月までに入院した腫瘍患者で、膀胱腫瘍33例、精巣腫瘍3例、腎腫瘍2例、尿管腫瘍2例、前立腺癌2例、陰茎癌1例の43例である。これらの患者のうち、精巣腫瘍の2例を除き他の41例は原発巣ないし転移巣を有する患者である。抗癌剤投与を受けたのは15例で、同一患者でも種々の抗癌剤を単独または2種類の併用投与を受けており、そのつど対象とした。単独投与の抗癌剤としては cyclophosphamide, adriamycin, cis-diamminedichloride platinum (CDDP), actinomycin D, vinblastine, bleomycin, それに mitomycin C であり、併用投与の抗癌剤としては、adriamycin と 5-fluorouracil, mytomycin C と cytosine arabinoside, vincristine と cytosine arabinoside, vincristine と actinomycin D, vincristine と pepleomycin, それに methotrexate と pepleomycin の併用であった。

(2) 採尿方法および尿検体

抗癌剤投与を受けていない患者は午前5時または6時から翌日の同時刻の24時間尿を、抗癌剤投与を受けている患者は投与開始後翌朝の5時または6時までの尿を防腐剤を加えず蓄尿し、その約500mlを茶色のポリプロピレン製容器に採取し、No.1 filter paper (東洋濾紙会社)で濾過し、-20°Cの冷凍庫に保存した。尿検体は総数94で、これを4群にわけた。第1群はすくなくとも3日間何ら薬剤投与を受けていない15

例の患者尿（18検体）で、第2群は抗癌剤投与を受けていないが、他の種々の薬剤投与を受けている24例の患者尿（27検体）である。第3群は1種類の抗癌剤投与を受けている16例の患者尿で、抗癌剤以外の薬剤投与を受けている患者尿も含む（39検体）。第4群は2種類の抗癌剤併用投与を受けている5例の患者尿で抗癌剤以外の薬剤投与を受けている患者の尿も含む（10検体）。なお抗菌剤の数種類は Ames test で変異原性をしめしたり、*Salmonella* に殺菌的であるため^{1,48)}、抗菌剤投与を受けている患者尿はすべて除外した。

(3) 尿濃縮方法

Yamasaki と Ames の方法⁴⁵⁾ にしたがった。すなわち XAD-2 resin（東京有機化学工業株式会社）を10倍量の acetone（半井化学薬品株式会社）でかく拌しながら数回洗浄し、10倍量の methanol（半井化学薬品株式会社）で同様に数回洗浄し、最後に蒸留水で数回洗浄して内径 0.7 cm、長さ 10 cm のガラスカラムに 1.5 cm³ 容量（高さ 4 cm）をつめる。蒸留水約 50 ml でカラムを洗浄した後、200 ml の尿を三方括栓（株式会社トップ）にて流量を 2~3 ml/min に調節してカラムを通す。三方括栓より resin を乾燥させないように2~3秒窒素ガスを流して resin に残った尿を除去する。吸着物質は 10 ml acetone で 18×150mm の試験管に溶出させ、60~65°C の恒温槽の中で窒素ガス下に acetone を蒸発させる。試験管底の残留物を完全に乾燥させた後に、-20°C の冷凍庫に保存した。

(4) 菌 株

カリフォルニア大学 Bruce N. Ames 教授より京都大学放射線生物研究センター武部 啓教授へ送られた *Salmonella typhimurium* TA 98 と TA 100⁴⁹⁾ を同教授の御好意により提供をうけ使用した。

(5) 試料調整

1) 尿試料調整：冷凍庫内の試験管を室温にて1~2時間放置し、1 ml の dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck) を加え、試験管底の残留物を完全に溶解する（すなわち200倍濃縮に相当し、これを濃縮尿とする）。濃縮尿を 0.2 μm ミリポアフィルター (Millipore Corporation) に通して滅菌し、その 0.1 ml を試料とした。

2) 対照試料調整：対照1として DMSO 0.1 ml を TA 98 と TA 100 に用い、対照2とし TA 98 には 2-nitrofluorene（半井化学薬品株式会社）を DMSO で溶解し、TA 100 には sodium azide (Merck) を蒸留水で溶解してそれぞれ 0.1 ml を用いた⁵⁰⁾。

(6) 突然変異試験

矢作ら⁵¹⁾の方法にしたがった。すなわち試料に 0.5 ml の Na-リン酸緩衝液を加え、それに菌懸濁液(1~2×10⁹ 生菌数/ml) 0.1 ml を加え、37.0°C の恒温槽内で20分間ゆるく振盪したのち、ソフトアガーを 2ml 加えてアガープレートに展開した。突然変異試験は22回おこない、対照1と2は毎回調べた。なお、今回の突然変異試験には S-9 Mix⁵²⁾ を使用しなかった。

(7) 判 定

37.0°C で72時間インキュベートしてプレート上の復帰コロニー数を数えた。1試料について TA 98 と TA 100 にそれぞれ3枚のプレートを用い、その平均値が対照1における復帰コロニー数の平均値の2倍以上であれば変異原性ありと判定した⁵³⁾。すなわち尿試料による復帰コロニー数をその時の対照1の復帰コロニー数で除したものを変異原性比 (mutagenic ratio⁵⁴⁾ : M.R.) とし、M.R. が 2.00 以上であれば変異原性ありとした。

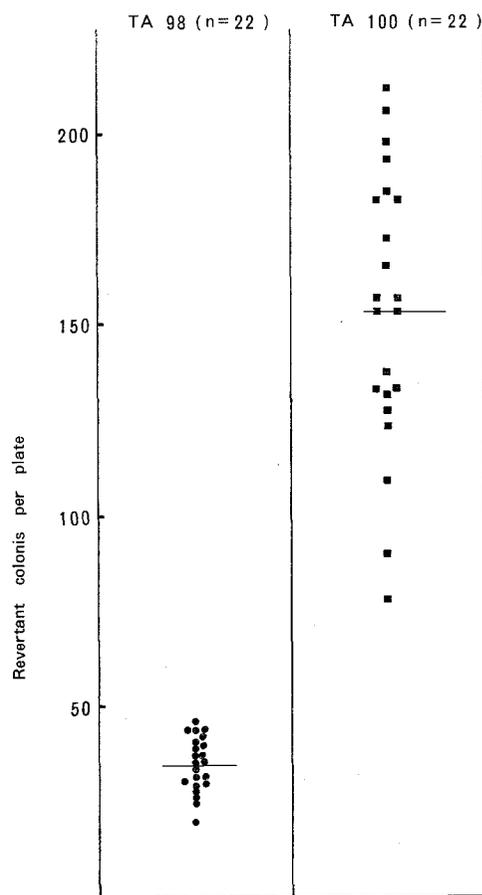


Fig. 1. Variation of revertant colonies on the negative control plates

結 果

(1) 対照1におけるコロニー数の変動

22回の突然変異試験における DMSO 0.1 ml の復帰コロニー数は Fig. 1 にしめすごとく、TA 98 では 20~46 で平均値は 35 ± 7.15 であり、TA 100 では 77~220 で平均値は 153 ± 36.51 であった。各試料の結果を検討するときは DMSO 0.1 ml による復帰コロニー数の何倍であるかを明らかにする必要があり、試料および DMSO の復帰コロニー数と変異原性を併記した。

(2) 対照2における使用薬剤の量とコロニー数との相関

薬剤の量と復帰コロニー数の関係は Fig. 2 にしめすごとく、TA 98 では 2-nitrofluorene は 0.04~40 μg の範囲で、TA 100 では sodium azide は 0.1~100 μg の範囲で直線関係が得られた。この結果より TA 98 には 2-nitrofluorene 40 μg 、TA 100 には sodium azide 100 μg を用い、22回の突然変異試験でこれらの薬剤の変異原性が検出されていることを毎回確認した。

(3) 尿試料各群における変異原性

第1群の18検体の結果は Table 1 のごとくであった。M.R. は TA 98 で 0.28~1.47 で平均値は 1.11 ± 0.29 であり、TA 100 では 0.45~1.59 で平均値は 1.04 ± 0.21 であり、いずれの検体も 2.00 以下であ

り変異原性はみとめられなかった。

第2群の27検体の結果は Table 2 のごとくであった。M.R. は TA 98 で 0.68~1.59 で平均値は 1.01 ± 0.27 であり、TA 100 では 0.43~1.58 で平均値は 1.01 ± 0.29 であり、いずれの検体も 2.00 以下であり変異原性はみとめられなかった。

第3群の1種類の抗癌剤投与患者尿39検体の結果は Table 3 のごとくであった。

cyclophosphamide 投与患者尿の5検体はいずれも M.R. が 2.00 以下であり TA 98 と TA 100 の両者に変異原性がみとめられなかったが、1500 mg の点滴静脈内投与を受けた1例の患者の経時的分割尿3検体について突然変異試験をおこなったところ、その結果は Table 4 のごとくであり、投与後1~3時間の濃縮尿で TA 100 に変異原性がみとめられた。なおこの3検体について cyclophosphamide の代謝産物である nor-mustard 様物質の尿中濃度を比色法で測定⁵⁵⁾したが、投与直後から1時間の尿には 10.9 $\mu\text{g/ml}$ 、1~3時間の尿には 83.1 $\mu\text{g/ml}$ 、3~6時間の尿には 80.8 $\mu\text{g/ml}$ であった。

adriamycin 投与患者尿の9検体では、TA 98 に4検体と TA 100 にも4検体が変異原性をしめし、そのうちの2検体は TA 98 と TA 100 の両者に変異原性をしめた。

CDDP 投与患者尿14検体は TA 98 にはすべて変異原性がみられず、TA 100 に2検体が変異原性をしめた。

actinomycin D, vinblastine, bleomycin, それに mitomycin C の単独投与を受けた患者尿はすべて TA 98 と TA 100 に変異原性がみとめられなかった。

第4群の2種類の抗癌剤投与患者尿10検体の結果は Table 5 のごとくであった。

adriamycin と 5-fluorouracil の併用投与患者尿2検体と、mitomycin C と cytosine arabinoside の併用投与患者尿の1検体、そして vincristine と actinomycin D の併用投与患者尿の1検体が TA 98 に変異原性をしめたが、vincristine と cytosine arabinoside, vincristine と pepleomycin, それに methotrexate と pepleomycin の併用投与患者尿は TA 98 と TA 100 の両者に変異原性がみとめられなかった。

考 察

Salmonella typhimurium TA 98 と TA 100 は histidine 合成酵素の遺伝子に突然変異がおこって His⁻ (histidine 要求性) となっており、細胞表面のリポ

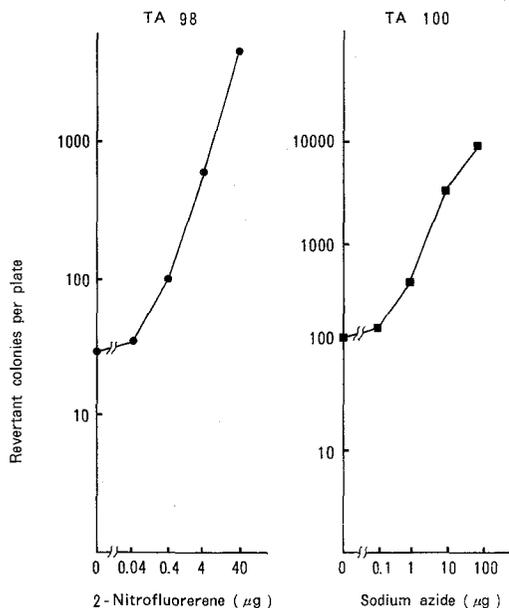


Fig. 2. Dose-response curves of positive control agents

Table 1. Mutagenicity of urine concentrate from the patients receiving no drugs

Diagnosis	Case	Age	Sex	Revertant colonies per plate ^a	
				Urine concentrate / 0.1 ml DMSO (M.R. ^b)	
				TA 98	TA 100
Bladder Tumor	S. I.	79	F	35 / 26 (1.35)	113 / 153 (0.74)
	I. U.	80	M	29 / 26 (1.12)	169 / 153 (1.10)
	M. S.	79	M	40 / 30 (1.33)	206 / 193 (1.07)
	Y. K.	78	F	33 / 29 (1.14)	87 / 90 (0.97)
	T. S.	57	M	34 / 26 (1.31)	69 / 153 (0.45)
	M. S.	71	M	26 / 26 (1.00)	109 / 93 (1.17)
	K. N.	49	M	13 / 46 (0.28)	124 / 153 (0.81)
	T. N.	76	F	53 / 41 (1.29)	189 / 206 (0.92)
	T. M.	38	M	53 / 36 (1.47)	221 / 193 (1.15)
	H. W.	67	M	33 / 33 (1.00)	184 / 173 (1.06)
T. T.	1	M	26 / 43 (0.60)	174 / 158 (1.10)	
			47 / 44 (1.09)	206 / 183 (1.13)	
			49 / 44 (1.11)	195 / 183 (1.07)	
Renal Tumor	M. N.	67	M	48 / 46 (1.04)	186 / 153 (1.22)
Ureter Tumor	S. M.	65	M	55 / 44 (1.25)	204 / 183 (1.11)
Testicular Tumor	M. F.	18	M	36 / 26 (1.38)	129 / 93 (1.39)
	S. K.	28	M	41 / 31 (1.32)	148 / 132 (1.12)
				30 / 33 (0.91)	194 / 173 (1.12)

a : average of 3 plates

b : mutagenic ratio

c : urine concentrate obtained on different dates

多糖類の合成が欠損して (rfa) 膜透過性をよくし、紫外線除去修復能を欠いている (uvrB) ため感受性が高く、さらに薬剤耐性因子 pKM 101 を導入して変異原の検出が容易にできるようになっている⁴⁹⁾。

Ames test はプレート上で His⁻ が His⁺ (histidine 非要求性) となる復帰変異をみるもので、TA 98 は frameshift 型、TA 100 はおもに塩基置換型の変異原により復帰変異をおこすが、benzo[a]pyrene のような frameshift 型の変異原でも復帰変異をおこす。

ヒトの尿を Ames test で検討することは、尿中の histidine が比較的高濃度である⁵⁶⁾ ため復帰コロニー数が多くなることと、尿中変異原濃度が低いため検出できないことが多く、困難であると考えられてきた⁵⁷⁾。1977年 Yamasaki と Ames はヒトの尿を XAD-2 resin に吸着させることにより尿中の histidine を効率よく分離することができ、喫煙者の尿を 250 倍濃縮することにより S-9 Mix 存在下に TA 1538 で変異

原性をみたと報告した⁴⁵⁾。

以来この方法でヒトの尿の変異原性を検討した報告が散見されるようになり、McCoy ら⁵⁸⁾の麻酔科医の非濃縮尿に変異原性がみられたという報告に対して、Baden ら⁵⁹⁾は麻酔科医と手術室の看護婦の尿を 250 倍に濃縮して変異原性を調べたが、これらの尿には変異原性がみられず、McCoy らの報告は尿中の histidine による false positive の結果であろうと報告している。Falck ら⁶⁰⁾は抗癌剤を扱う看護婦の尿を 500 倍に濃縮して変異原性を検討し、木曜日の午後の尿に変異原性がみられたが、月曜日の午前中の尿には変異原性がみられず、抗癌剤投与患者だけでなく、職業上抗癌剤を扱う看護婦にもその影響を考慮すべきであると報告している。また Falck ら⁶¹⁾はゴム工場労働者の尿を濃縮することにより変異原性をみとめ、喫煙はこの変異原性に対して相乗的効果をしめすと報告している。Gelbart と Sontag⁶²⁾は肝硬変患者の尿を 250 倍濃縮

Table 2. Mutagenicity of urine concentrate from the patients receiving medicine except for antibiotic and anti-cancer drugs

Diagnosis	Case	Age	Sex	Revertant colonis per plate*	
				Urine concentrate / 0.1 ml	DMSO (M. R. ^b)
				TA 98	TA 100
Bladder	H. I.	50	F	28 / 26 (1.08)	89 / 93 (0.96)
Tumor	A. K.	55	M	44 / 45 (0.96)	173 / 153 (1.13)
	Y. K.	75	M	31 / 29 (1.07)	87 / 90 (0.97)
	A. K.	40	M	23 / 26 (0.88)	66 / 153 (0.43)
	T. K.	48	M	36 / 43 (0.84)	207 / 158 (1.31)
	M. K.	64	M	44 / 44 (1.00)	159 / 183 (0.87)
	S. K.	70	M	34 / 33 (1.03)	202 / 173 (1.17)
	F. K.	68	M	37 / 37 (1.00)	167 / 183 (0.91)
	K. N.	52	M	38 / 31 (1.23)	208 / 132 (1.58)
	M. N.	55	M	43 / 27 (1.59)	136 / 124 (1.10)
	T. H.	77	M	32 / 44 (0.73)	124 / 183 (0.68)
	T. M.	70	M	42 / 35 (1.20)	189 / 199 (0.95)
	S. M. ^c	57	M	44 / 46 (0.96)	160 / 153 (1.05)
				28 / 20 (1.40)	137 / 109 (1.26)
				39 / 44 (0.89)	163 / 183 (0.89)
	S. Y.	62	F	27 / 26 (1.04)	169 / 153 (1.10)
	T. Y.	70	M	19 / 26 (0.73)	83 / 153 (0.54)
	T. Y.	71	M	41 / 44 (0.93)	140 / 183 (0.77)
	S. Y.	70	M	30 / 43 (0.70)	213 / 158 (1.35)
	S. M.	63	M	39 / 44 (0.89)	88 / 138 (0.64)
Renal	Y. Y.	47	M	31 / 43 (0.72)	204 / 158 (1.29)
Tumor					
Ureter	T. I.	71	M	37 / 38 (0.97)	166 / 158 (1.05)
Tumor					
Prostate	K. K.	49	M	42 / 44 (0.95)	112 / 138 (0.81)
cancer	G. K.	67	M	24 / 33 (0.73)	185 / 185 (1.00)
Testicular	M. Y.	42	M	46 / 29 (1.59)	123 / 90 (1.37)
Tumor				31 / 20 (1.55)	152 / 109 (1.39)
Penile	M. T.	56	M	26 / 38 (0.68)	94 / 158 (0.59)
cancer					

a : average of 3 plates

b : mutagenic ratio

c : urine concentrate obtained on different dates

することにより変異原性をみとめ、肝臓における解毒機構が障害されているからであろうと報告している。

抗癌剤投与患者尿の Ames test による変異原性の報告は Minnich ら⁶³⁾の報告があるのみで、それによると cyclophosphamide と 1,3-bis-(2-chlorethyl)-1-nitrosourea (BCNU) の投与患者尿、それに 5-fluorouracil 投与患者尿に 変異原性がみとめられ、adriamycin や mitomycin C 投与患者尿には変異原性がみとめられていないが、尿を濃縮しておらず、また尿中の histidine の影響も考慮していない。

ヒトの尿の変異原性を検討するにあたっては、化学物質そのものや実験動物を用いて得られる物質を試料とする突然変異試験と異なり、年齢、性、喫煙^{45,61)}、食事^{64~70)}、薬物摂取の有無^{1,3,22,23,46,47,63,71)}、職

業^{60,61)}、肝機能⁶²⁾、腎機能それに尿路感染などの因子を考慮しなければならない。われわれの実験の対象となった入院患者は、禁煙が指示されており、一定の入院食をとり、肝・腎機能の著明な障害はみられず、抗生物質で治療が必要な尿路感染を有する患者は除外してある。抗癌剤以外の薬剤摂取が突然変異試験におよぼす影響に関してであるが、第1群と第2群の尿にはすべて変異原性がみられず、変異原性比について student 't' test による有意差検定で両群に有意な差がみられない ($p < 0.05$) ことより、第2群に投与された抗癌剤以外の薬剤の影響は今回の突然変異試験ではみられなかったと考えられる。抗癌剤投与を受けている第3群と第4群の患者は同時に抗癌剤以外の種々の薬剤投与を受けていることが多かったが、第1群と

Table 3. Mutagenicity of urine concentrate from the patients receiving single anti-cancer drugs

Agent	Case	Age	Sex	Dose (mg)	Route	Urine volume (ml)	Revertant colonies per plate*	
							Urine concentrate / 0.1 ml DMSO (M. R. ^b .)	
							TA 98	TA 100
Cyclophosphamide	G. K. ^c	67	M	300	I. A. ^d	3,000	27 / 33 (0.82)	248 / 185 (1.34)
				300	I. A.	1,310	65 / 44 (1.48)	222 / 211 (1.05)
	K. K. ^c	49	M	1,500	I. V. ^e	2,100	37 / 31 (1.19)	279 / 165 (1.69)
				1,500	I. V.	2,500	44 / 44 (1.00)	233 / 138 (1.69)
	T. H.	53	M	400	I. A.	2,150	62 / 36 (1.72)	251 / 193 (1.30)
Adriamycin	T. N.	52	M	10	I. A.	1,020	191 / 41 (4.66)	1,461 / 206 (7.09)
	T. H.	49	M	70	I. V.	3,000	C ^f	C
	K. N.	52	M	10	I. A.	2,350	50 / 31 (1.61)	181 / 132 (1.37)
	G. K.	67	M	30	I. A.	2,500	61 / 44 (1.39)	1,059 / 211 (5.02)
	S. N. ^g	49	F	10	I. V.	750	259 / 44 (5.89)	215 / 138 (1.56)
				10	I. V.	800	120 / 44 (2.73)	335 / 138 (2.43)
				10	I. V.	600	305 / 40 (7.63)	178 / 128 (1.39)
	U. T. ^h	63	F	20	I. A.	1,700	30 / 40 (0.75)	168 / 128 (1.31)
				20	I. A.	1,050	25 / 40 (0.63)	2,288 / 128 (17.88)
	Cis diamminedichloride platinum	T. H.	53	M	109	I. V.	4,000	45 / 36 (1.25)
G. K. ^c		67	M	60	I. A.	3,310	28 / 33 (0.85)	197 / 185 (1.06)
				30	I. A.	2,820	64 / 44 (1.45)	641 / 211 (3.04)
				30	I. A.	3,420	40 / 41 (0.96)	200 / 206 (0.97)
T. N. ^c		76	F	20	I. A.	1,900	56 / 41 (1.37)	211 / 206 (1.02)
				20	I. A.	2,250	68 / 41 (1.66)	635 / 206 (3.08)
T. K. ^h		48	M	15	I. V.	1,850	36 / 43 (0.84)	208 / 158 (1.32)
				15	I. V.	1,800	39 / 43 (0.91)	203 / 158 (1.28)
S. M.		63	M	40	I. V.	2,840	48 / 44 (1.09)	229 / 221 (1.09)
S. M. ⁱ		65	M	20	I. V.	2,450	26 / 35 (0.74)	148 / 199 (0.74)
				20	I. V.	2,430	28 / 35 (0.80)	116 / 199 (0.58)
				20	I. V.	2,200	29 / 35 (0.83)	151 / 199 (0.76)
				20	I. V.	2,950	33 / 35 (0.94)	191 / 199 (0.96)
			20	I. V.	2,300	35 / 35 (1.00)	218 / 199 (1.06)	
Actinomycin D	T. T.	1	M	0.1	I. V.	610	28 / 43 (0.65)	107 / 158 (0.68)
	M. F. ^j	18	M	0.5	I. V.	800	37 / 26 (1.42)	148 / 93 (1.59)
				0.5	I. V.	1,430	29 / 26 (1.12)	121 / 93 (1.30)
				0.5	I. V.	700	47 / 31 (1.52)	196 / 132 (1.48)
				0.5	I. V.	700	41 / 31 (1.32)	206 / 132 (1.56)
				0.5	I. V.	400	36 / 31 (1.16)	185 / 132 (1.40)
Vinblastine	S. K. ^c	28	M	10	I. V.	800	40 / 31 (1.29)	116 / 132 (0.88)
				10	I. V.	800	37 / 33 (1.12)	160 / 173 (0.92)
Bleomycin	K. F.	71	M	10	I. A.	1,750	C	C
	K. N.	52	M	5	I. A.	1,300	52 / 40 (1.30)	206 / 128 (1.61)
Mitomycin C	U. T.	63	F	10	I. A.	1,800	C	C

- a : average of 3 plates
- b : mutagenic ratio
- c : urine concentrate obtained on different dates
- d : intraarterial
- e : intravenous
- f : clear plate
- g : urine concentrate obtained on administration of 3 successive days
- h : urine concentrate obtained on administration of 2 successive days
- i : urine concentrate obtained on administration of 5 successive days

第2群の結果より両群に投与された抗癌剤以外の薬剤は今回の突然変異試験には影響しなかったものと考えた。厳密には個々の薬剤を投与した時の尿について変異原性を検討すべきであろうが、臨床的には困難である。

各種抗癌剤を患者に投与した時の尿の変異原性についてであるが、cyclophosphamide 投与患者尿の5検体はいずれも TA 98 と TA 100 に変異原性をしめさなかった (Table 3)。しかし、1例ではあるが 1500

mg の投与を受けた患者の経時的尿の変異原性を検討すると、1~3 時間の濃縮尿は TA 100 に変異原性をしめし (Table 4)、また結果にも記したごとく、この間の cyclophosphamide の代謝産物の尿中濃度は最も高かった。このことは変異原性の尿中濃度が変異原性検出に重要であり、変異原性がみられない尿試料であっても濃縮度をかえて検討する必要があることをしめす。cyclophosphamide そのものは変異原性をしめさないが、cyclophosphamide 投与患者尿に変異原性

Table 4. Mutagenicity of urine concentrate from the patient receiving 1500 mg cyclophosphamide

Case	Age	Sex	Hour	Revertant colonies per plate ^a Urine concentrate / 0.1 ml DMSO (M.R. ^b)	
				TA 98	TA 100
K. K.	49	M	0-1	51 / 44 (1.16)	180 / 138 (1.30)
			1-3	55 / 44 (1.25)	333 / 138 (2.41)
			3-6	41 / 44 (0.93)	232 / 138 (1.68)

a : average of 3 plates

b : mutagenic ratio

Table 5. Mutagenicity of urine concentrate from the patients receiving two anti-cancer drugs

Combination of drugs Dose (mg)	Case	Age	Sex	Route	Urine Volume (ml)	Revertant colonies per plate ^a Urine concentrate / 0.1 ml DMSO (M.R.)	
						TA 98	TA 100
Adriamycin + 5-Fluorouracil							
10 500	A. K. ^e	55	M	I. V. ^d	2,540	165 / 44 (3.75)	C ^d
10 500					2,450	202 / 44 (4.59)	C
Mitomycin C + Cytosine arabinoside							
4 80	A. K. ^e	55	M	I. V.	1,400	157 / 29 (5.14)	64 / 84 (0.76)
4 80				I. V.	2,580	C	C
4 80				I. V.	3,000	C	C
Vincristine + Cytosine arabinoside							
1 5	K. N.	52	M	I. A. ^e	1,630	47 / 31 (1.52)	196 / 132 (1.48)
1 10	K. F.	71	M	I. A.	1,510	C	C
Vincristine + Actinomycin D							
0.4 0.1	T. T.	1	M	I. V.	1,480	205 / 43 (4.77)	183 / 158 (1.16)
Vincristine + Pepleomycin							
0.5 2.5	T. H.	53	M	I. V.	2,100	33 / 29 (1.14)	57 / 90 (0.63)
Methotrexate + Pepleomycin							
0.25 2.5	T. H.	53	M	I. V.	1,200	31 / 29 (1.07)	84 / 90 (0.93)

a : average of 3 plates

b : mutagenic ratio

c : urine concentrate obtained from different dates

d : intravenous

e : intraarterial

がみられたことは、*in vitro* での S-9 Mix による代謝活性化をうけた時の結果やラットに投与した時の尿の結果⁴⁶⁾と同じであり、cyclophosphamide がヒト体内で代謝活性化を受けて尿中に排泄されたことをしめす。

adriamycin はそのものでも、またラットに静脈内投与した時の尿でも TA 98 と TA 100 に変異原性がみとめられたが、adriamycin 投与患者尿においても TA 98 と TA 100 に変異原性がみられた (Table 3)。adriamycin 投与患者尿の変異原性と adriamycin の投与量、投与方法、尿量とのあいだには明らかな関

係がみられなかった。

CDDP はそのものでも、またラットに静脈内投与した時の尿でも TA 98 と TA 100 に変異原性がみとめられたが⁴⁷⁾、CDDP 投与患者尿の14検体のうち2検体が TA 100 に変異原性をしめた (Table 3)。CDDP の生体内での代謝については明らかにされていないが、CDDP の変異原性の強さは S-9 Mix の有無に影響されずほとんど同じである⁷²⁾ことから、その変異原性は代謝により不活性化されにくいことが推測される。しかし、われわれの今回の成績では CDDP 投与患者尿の変異原性と、CDDP の投与量、投与方法

法、尿量とのあいだには明らかな関係をもとめることはできなかった。

actinomycin D, vinblastine, bleomycin それに mitomycin C は TA 98 と TA 100 に変異原性をしめさない^{22,23,46)}が、mitomycin C は TA 92 に弱い変異原性がみとめられると報告されている²³⁾。これらの抗癌剤を単独で投与した時の患者尿は TA 98 と TA 100 のいずれにも変異原性がみとめられなかった (Table 3)。

2種類の抗癌剤の併用投与を受けた患者のうち、adriamycin と 5-fluorouracil, mitomycin C と cytosine arabinoside, vincristine と actinomycin D の併用投与患者尿に TA 98 で変異原性がみとめられた (Table 5)。これらの抗癌剤のうち、adriamycin 以外はすべて TA 98 と TA 100 に変異原性がみとめられず、また S-9 Mix による代謝活性を受けても変異原性はみとめられない^{22,23,46)}。adriamycin と 5-fluorouracil の併用投与患者尿の変異原性は adriamycin によると考えられるが、他の併用投与患者尿に変異原性がみとめられたのは、ヒトの体内ではこれらの抗癌剤が *in vitro* における S-9 Mix と異なった代謝活性を受けているか、また両抗癌剤の相互作用による代謝の変化、あるいは comutagenic な作用⁷³⁾によるとも考えられる。最近抗癌剤の多剤併用が癌化学療法の主流をしめており、それらの投与患者尿の変異原性の検討は重要となってくる。

抗癌剤のなかでも adriamycin, bleomycin それに mitomycin C の投与患者尿は *Salmonella* に殺菌的に

作用し、プレート上にコロニー形成のみられないものがあつたが、これらの尿試料については濃縮度を低くして検討する必要がある。また抗生物質は致死効果が強く、*Salmonella* による変異原性検討には適していないと考えられている⁴⁶⁾が、このことは制癌抗生物質のうち bleomycin, actinomycin D それに mitomycin C についてもいえ^{23,46)}、これらの抗癌剤投与患者尿も *Salmonella* に強い致死効果をしめすため変異原性検出は困難であると考えられる。

われわれは抗癌剤投与患者尿を 200 倍に濃縮して変異原性を検討したが、それは Yamasaki と Ames が喫煙者尿を 250 倍に濃縮することにより変異原性をみとめており、200 倍濃縮することにより変異原性検出感度をかなり高めることができると考えたからである。尿の濃縮度決定は尿の変異原性を検出するうえで重要であり、cyclophosphamide 投与患者尿、それに制癌抗生物質投与患者尿の例でもあきらかなように、尿に変異原性がみられない場合は濃縮度をかえて再検討する必要がある。

今回の実験対象に用いた抗癌剤について現在まで報告されている発癌性と Ames test による変異原性の関係は Table 6 にしめすごとくで、発癌性がみとめられている5種類の抗癌剤のうち cyclophosphamide, adriamycin それに mitomycin C に変異原性がみとめられ、actinomycin D と bleomycin には変異原性がみとめられていない。発癌性がみとめられていない vincristine, vinblastine, 5-fluorouracil, cytosine arabinoside, それに methotrexate には変異原性もみと

Table 6. Carcinogenicity and mutagenicity of anti-cancer drugs

Anti-cancer drug	Carcinogenicity	Mutagenicity	Reference
Cyclophosphamide	+	+	1. 11. 14. 18. 19. 22. 23.
Adriamycin	+	+	1. 12. 16. 22. 23.
Mitomycin C	+	+	8. 11. 19. 23.
Actinomycin D	+	-	10. 19. 23.
Bleomycin	+	-	7. 22. 23.
Pepleomycin	N.E.	-	77.
5-Fluorouracil	-	-	11. 23.
Methotrexate	-	-	11. 17. 23.
Cytosine arabinoside	-	-	15. 21. 23.
Vincristine	-	-	15. 21. 23.
Vinblastine	-	-	11. 15. 21. 23.
CDDP	N.E.	+	22. 72.

N.E. : not evaluated

Table 7. Classification of anti-cancer drugs by mutagenicity

Anti-cancer drug	Mutagenicity		
	No S-9 Mix	S-9 Mix	Rat Urine
I-1 CDDP	+	+	+
Adriamycin	+	+	+
Daunomycin	+	+	+
2 Neocarzinostatin	+	-	+
3 BCNU	+	N.E.	+
Thio-TEPA	+	N.E.	+
Nitromin	+	N.E.	+
II-1 ACNU	+	+	-
2 Estramustine phosphate	+	N.E.	-
III Cyclophosphamide	-	+	+
Ifosfamide	-	+	+
IV Mithramycin	-	N.E.	-
Natulan	-	N.E.	-

N.E. : not evaluated

められていない。CDDP は新しい抗癌剤で発癌性について現在明らかにされていないが、変異原性がみとめられることより発癌性を有する可能性が強い。これらの抗癌剤を投与した患者尿の変異原性について、Ames test で検討した報告は Minnich らのものだけであり、CDDP および adriamycin 投与患者尿と adriamycin と 5-fluorouracil, mitomycin C と cytosine arabinoside, vincristine と actinomycin D の併用投与患者尿に変異原性をみとめた報告ははじめてである。

抗癌剤の変異原性についてわれわれはこれまで抗癌剤そのものの変異原性、S-9 Mix による代謝活性化をおこなった時の変異原性、それにラットに投与した時の尿の変異原性について検討してきたが^{46,47)}、ラットに投与した13種類の抗癌剤をそれぞれの条件下での変異原性の有無に着目して分類すると Table 7 のごとくなる。I 群は抗癌剤そのものにも、ラットに投与したときの尿にも変異原性がみられるものであり、II 群は抗癌剤そのものには変異原性がみられるが、ラットに投与したときの尿には変異原性がみられないものである。III 群は抗癌剤そのものには変異原性がみられないが S-9 Mix 存在下やラットに投与した時の尿に変異原性がみられるもので、いわゆる間接変異であり、IV 群は抗癌剤そのものにも、ラットに投与した

時の尿にも変異原性がみられないものである。

S-9 Mix は活性化に関する酵素群のみでなく不活性化に関する酵素群も含んでおり、adriamycin, daunomycin, 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU) の変異原性は S-9 Mix を加えることにより弱められ、neocarzinostatin においては変異原性が消失する^{46,47)}。S-9 Mix 存在下の抗癌剤の変異原性とラットに投与した時の尿の変異原性はほぼ同じ結果であったが、neocarzinostatin と ACNU において Table 7 のごとく反対の結果であった。これはラットに投与した時の尿の変異原性は、投与量、ラット体内での代謝(活性化および不活性化)、尿中排泄速度などの因子が関係するためと考えられる^{47,74)}。

上記の13種類の抗癌剤のうち、cyclophosphamide, adriamycin それに CDDP 投与患者尿に変異原性がみられたが、この結果はラットに投与した時の尿の結果と同じであった。他の10種類の抗癌剤は今回の対象患者に投与されなかったので比較検討できないが、ラット尿における結果はヒトの尿の結果とかなり関連するものと考えられる。

ヒト尿路腫瘍発生過程において、尿中に発癌物質が存在することはこれまでの研究結果より明らかであるが、尿路腫瘍発生機序を研究するうえで、尿の変異

原性を検討することはきわめて重要である。Ames test はイニシエーターの検索に簡便で広く用いられているが、この方法で尿に変異原性がみとめられたとしても、そのことが尿路腫瘍発生の危険性を意味するかどうかは現在では不明であり、今後の研究にまたねばならない。

抗癌剤投与患者に新たな腫瘍発生の報告があり、なかでも chlornaphazine や cyclophosphamide 投与患者に膀胱癌発生が多くみとめられていることより、抗癌剤尿中代謝産物は尿路上皮を標的としている可能性が大きい。抗癌剤投与ラット尿や患者尿に変異原性がみとめられたが、抗癌剤を使用する臨床医にとって、この事実を認識することは重要であり、抗癌剤投与患者の長期にわたる経過観察が必要である。また、変異原性をみとめたことが尿路腫瘍発生にいかに関係してくるかということは、尿中のイニシエーターのみならず、たとえばラット膀胱癌において尿自体がプロモーターとして作用している可能性が報告⁷⁵⁾されているように、尿中のプロモーターについても検討していく必要がある。

われわれは今回の抗癌剤投与患者尿の突然変異試験に S-9 Mix や β -glucuronidase を用いなかった。Durston と Ames⁷⁶⁾ は、投与された薬物は生体内で代謝を受け種々の代謝産物ができるが、その多くはグルクロン酸抱合を受けて尿中へ排泄されるから、S-9 Mix や β -glucuronidase を尿試料に加えることにより尿の変異原性検出感度を高めることができると考え、acetylaminofluorene 投与ラット尿についてその有用性を報告している。今後、これらを突然変異試験に組み入れ、より感度を高めて尿の変異原性を検討する必要がある。

結 語

尿路性器腫瘍患者43例の尿94検体について、XAD-2 resin を用いて尿を200倍濃縮し、*Salmonella typhimurium* TA 98 と TA 100 を用いて変異原性を検討しつぎの結果を得た。

(1)すくなくとも3日間薬剤投与を受けていない15例の患者の18検体尿は、TA 98 と TA 100 のいずれにも変異原性がみとめられなかった。

(2)抗癌剤および抗菌剤以外の薬剤投与を受けた24例の患者の27検体尿は TA 98 と TA 100 のいずれにも変異原性がみとめられなかった。

(3)1種類の抗癌剤投与患者尿の変異原性はつぎのごとくであった。1) cyclophosphamide 投与患者3例の5検体の尿は TA 98 と TA 100 のいずれにも変異

原性がみとめられなかったが、1例の患者の経時的尿のうち投与後1~3時間の尿に TA 100 で変異原性がみとめられた。2) adriamycin 投与患者6例の9検体のうち TA 98 で4検体に、また TA 100 でも4検体に変異原性がみとめられ、そのうちの2検体は TA 98 と TA 100 のいずれにも変異原性がみとめられた。3) CDDP 投与患者6例の14検体尿は、TA 98 には変異原性がみとめられなかったが TA 100 では2検体に変異原性がみとめられた。4) actinomycin D 投与患者2例の6検体尿、vinblastine 投与患者1例の2検体尿、bleomycin 投与患者2例の2検体尿、それに mitomycin C 投与患者1例の1検体尿はすべて TA 98 と TA 100 に変異原性がみとめられなかった。

(4)2種類の抗癌剤投与患者尿の変異原性はつぎのごとくであった。1) adriamycin と 5-fluorouracil の併用投与患者1例の2検体尿は TA 98 に変異原性がみとめられた。2) mitomycin C と cytosine arabinoside の併用投与患者1例の3検体尿のうち1検体は TA 98 に変異原性がみとめられた。3) vincristine と actinomycin D の併用投与患者1例の1検体尿は TA 98 に変異原性がみとめられた。4) vincristine と cytosine arabinoside の併用投与患者2例の2検体尿、vincristine と peplomycin 併用投与患者の1例の1検体尿、methotrexate と peplomycin の併用投与患者1例の1検体尿は TA 98 と TA 100 のいずれにも変異原性がみとめられなかった。

(5)以上の実験結果より尿中の抗癌剤代謝産物が尿路上皮にイニシエーターとして作用している可能性が示唆されたが、このことが尿路腫瘍発生にいかに関係してくるかは、これら尿中のイニシエーターのみならず、プロモーターに関しても検討する必要がある。最近、抗癌剤投与患者に膀胱癌が発生したという報告が多く、抗癌剤投与患者尿に強い変異原性がみられるときは尿路腫瘍発生の危険性も考えられ、とくに小児や若年者に抗癌剤を投与するときは長期にわたる経過観察が必要である。

(本研究の一部は第12回高松宮妃癌研究基金研究助成金による。)

文 献

- 1) McCann J, Choi E, Yamasaki E and Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella/microsome* test: assay of 300 chemicals. Proc Nat Acad Sci USA 72: 5135~5139, 1975

- 2) McCann J and Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Nat Acad Sci USA* **73**: 950~954, 1976
- 3) Rinkus SJ and Legator MS: Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the Salmonella typhimurium system. *Cancer Res* **39**: 3289~3318, 1979
- 4) Fysh JM, Andrews LS, Pohl LR and Nebert DW: Differing degrees of coal-tar shampoo-induced mutagenesis in the Salmonella/liver test system in vitro. *Pharmacology* **20**: 1~8, 1980
- 5) Green MR and Pastewka JV: Mutagenicity of some lipsticks and their dyes. *J Nat Cancer Inst* **64**: 665~669, 1980
- 6) Prival MJ, Mitchell VD and Gomez YP: Mutagenicity of a new hair dye ingredient: 4-ethoxy-m-phenylenediamine. *Science* **207**: 907~908, 1980
- 7) Llmbart A: Tumoral drugs as possible blastogenic agents. *Austrian J Oncol* **3**: 72~77, 1976
- 8) Ikegami R, Akamatsu Y and Haruta M: Subcutaneous sarcomas induced by mitomycin C in mice. *Acta Path Jap* **17**: 495~501, 1967
- 9) Kelly MG, O'Gara RW, Yancey ST and Botkin C: Induction of tumors in rats with procarbazine hydrochloride. *J Natl Cancer Inst* **40**: 1027~1051, 1968
- 10) Svoboda D, Reddy J and Harris C: Invasive tumors induced in rats with actinomycin D. *Cancer Res* **30**: 2271~2279, 1970
- 11) Schmähl D and Osswald H: Experimentelle Untersuchungen über carcinogene Wirkungen von Krebs-Chemotherapeutica und Immunosuppressiva. *Arzneim Forsch* **20**: 1461~1467, 1970
- 12) Bertazzoli C, Chieli T and Solcia E: Different incidence of breast carcinomas or fibroadenomas in daunomycin or adriamycin treated rats. *Experientia* **27**: 1209~1210, 1971
- 13) Sternberg SS, Philips FS and Cronin AP: Renal tumors and other lesions in rats following a single intravenous injection of daunomycin. *Cancer Res* **32**: 1029~1036, 1972
- 14) Prejean JD, Griswold DP, Casey AE, Peckham JH, Weisburger EK and Wood HB Jr: Carcinogenicity studies of clinically used anticancer agents. *Proc Am Asso Cancer Res* **13**: 112, 1972
- 15) Prejean JE, Griswold DP, Peckham JC, Casey AE, Weisburger EK and Weisburger JH: Carcinogenicity of clinically used anticancer agents. *Proc Am Asso Cancer Res* **14**: 79, 1973
- 16) Stoner GD, Shimkin MB, Kniazeff AJ, Weisburger JH, Weisburger EK and Gori GB: Test for carcinogenicity of food additives and chemotherapeutic agents by the pulmonary tumor response in strain A mice. *Cancer Res* **33**: 3069~3085, 1973
- 17) Rustia M and Shubik P: Life-span carcinogenicity tests with 4-amino-N-methylpteroylglutamic acid (methotrexate) in Swiss mice and Syrian golden hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* **26**: 329~338, 1973
- 18) Walker SE and Bole GG: Augmented incidence of neoplasia in female New Zealand Black/New Zealand White (NZB/NAW) mice treated with long-term cyclophosphamide. *J Lab Clin Med* **82**: 619~629, 1973
- 19) Weisburger JH, Griswold DP, Prejean JD, Casey AE, Wood HB and Weisburger EK: The carcinogenic properties of some of the principal drugs used in clinical cancer chemotherapy. *Recent Results Cancer Res* **52**: 1~17, 1975
- 20) Marquardt H, Philips FS and Sternberg SS: Tumorigenicity in vivo and induction of malignant transformation and mutagenesis in cell cultures by adriamycin and daunomycin. *Cancer Res* **36**: 2065~2069, 1976
- 21) Weisburger EK: Bioassay program for carcinogenic hazards of cancer chemotherapeutic agents. *Cancer* **40**: 1935~1949, 1977
- 22) Benedict WF, Baker MS, Haroun L, Choi E and Ames BN: Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella/microsome test. *Cancer Res* **37**: 2209~2213, 1977
- 23) Seino Y, Nagao M, Yahagi T, Hoshi A, Kawachi T and Sugimura T: Mutagenicity of several classes of antitumor agents to Salmonella typhimurium TA98, TA100 and TA92. *Cancer Res* **38**: 2148~2156, 1978

- 24) Thiede T, Chievitz E and Christensen BC: Chlornaphazine as a bladder carcinogen. *Acta Med Scand* **175**: 721~725, 1964
- 25) Kyle RA, Pierre RV and Bayrd ED: Multiple myeloma and acute myelomonocytic leukemia. Report of four cases possibly related to melphalan. *N Engl J Med* **283**: 1121~1125, 1970
- 26) Harris CC: Malignancy during methotrexate and steroid therapy for psoriasis. *Arch Dermatol* **103**: 501~504, 1971
- 27) Fraumeni JF Jr and Miller RW: Drug-induced cancer. *J Natl Cancer Inst* **48**: 1267~1270, 1972
- 28) Bashour BN, Mancer K and Rance CP: Malignant mixed mullerian tumor of the cervix following cyclophosphamide therapy for nephrotic syndrome. *J Pediatr* **82**: 292~293, 1973
- 29) Sieber SM and Adamson RH: Toxicity of anti-neoplastic agents in man: chromosomal aberrations, antifertility effects, congenital malformations, and carcinogenic potential. *Adv Cancer Res* **22**: 57~155, 1975
- 30) Rosner F: Acute leukemia as a delayed consequence of cancer chemotherapy. *Cancer* **37**: 1033~1036, 1976
- 31) Reimer RR, Hoover R, Fraumeni JF Jr and Young RC: Acute leukemia after alkylating-agent therapy of ovarian cancer. *N Engl J Med* **297**: 177~181, 1977
- 32) Krikorian JG, Burke JS, Rosenberg SA and Kaplan HS: Occurrence of non-Hodgkin's lymphoma after therapy for Hodgkin's disease. *N Engl J Med* **300**: 452~458, 1979
- 33) Bergsagel DE, Bailey AJ, Langley GR, MacDonald RN, White DF and Miller AB: The chemotherapy of plasma-cell myeloma and the incidence of acute leukemia. *N Engl J Med* **301**: 743~748, 1979
- 34) Dale GA and Smith RB: Transitional cell carcinoma of the bladder associated with cyclophosphamide. *J Urol* **112**: 603~604, 1974
- 35) Wall RL and Clausen KP: Carcinoma of the urinary bladder in patients receiving cyclophosphamide. *N Engl J Med* **293**: 271~273, 1975
- 36) Weinstein SH, Milleman LA and Schmidt JD: Cyclophosphamide. *J Urol* **114**: 157, 1975
- 37) Ansell ID and Castro JE: Carcinoma of the bladder complicating cyclophosphamide therapy. *Brit J Urol* **47**: 413~418, 1975
- 38) Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD and Gangai MP: The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *J Urol* **122**: 163~164, 1979
- 39) Plotz PH, Klippel JH, Decker JL, Grauman D, Wolff B, Brown BC and Rutt G: Bladder complications in patients receiving cyclophosphamide for systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. *Ann Int Med* **91**: 221~223, 1979
- 40) Durkee C and Benson R Jr: Bladder cancer following administration of cyclophosphamide. *Urology* **16**: 145~148, 1980
- 41) Chasko SB, Keuhnelian JG, Gutowski WT III and Gray GJ: Spindle cell cancer of bladder during cyclophosphamide therapy for Wegener's granulomatosis. *Am J Surg Pathol* **4**: 191~196, 1980
- 42) Steinberg AD, Plotz PH, Wolff SM, Wong VG, Agus SG and Decker JL: Cytotoxic drugs in treatment of nonmalignant diseases. *Ann Int Med* **76**: 619~642, 1972
- 43) Cooperating Clinics Committee of the American Rheumatism Association: A controlled trial of cyclophosphamide in rheumatoid arthritis. *New Engl J Med* **283**: 883~889, 1970
- 44) Hicks RM, Wakefield J St J and Chowanec J: Evaluation of a new model to detect bladder carcinogens or co-carcinogens: results obtained with saccharin, cyclamate and cyclophosphamide. *Chem -Biol Interact* **11**: 225~233, 1975
- 45) Yamasaki E and Ames BN: Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 3555~3559, 1977
- 46) Pak K, Iwasaki T, Miyakawa M and Yoshida O: The mutagenic activity of anti-cancer drugs and the urine of rats given these drugs. *Urol Res* **7**: 119~124, 1979
- 47) 朴 勺・宮川美栄子・吉田 修：抗がん剤および抗がん剤投与ラット尿の突然変異誘起性に関する研究（補遺）. *泌尿紀要* **26**: 813~817, 1980

- 48) Mitchell I deG, Dixon PA, Gilbert PJ and White DJ: Mutagenicity of antibiotics in microbial assays. Problems of evaluation. *Mutation Res* **79**: 91~105, 1980
- 49) McCann J, Spingarn NE, Kobori J and Ames BN: Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc Nat Acad Sci USA* **72**: 979~983, 1975
- 50) Serres FJD and Shelby MD: Recommendations on data production and analysis using the Salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutation Res* **64**: 159~165, 1979
- 51) Yahagi T, Degawa M, Seino Y, Matsushima T, Nagao M, Sugimura T and Hashimoto Y: Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett* **1**: 91~96, 1975
- 52) Ames BN, Durston WE, Yamasaki E and Lee FD: Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat Acad Sci USA* **70**: 2281~2285, 1973
- 53) 吉川邦衛: 代謝活性化からみた Ames 試験の再検討. *変異原と毒性* **6**: 35~45, 1975
- 54) Reddy BS, Sharma C, Darby L, Laakso K and Wynder EL: Metabolic epidemiology of large bowel cancer. Fecal mutagens in high- and low-risk population for colon cancer. A preliminary report. *Mutation Res* **72**: 511~522, 1980
- 55) Friedman OM and Boger E: Colorimetric estimation of nitrogen mustards in aqueous media. Hydrolytic behavior of bis (beta-chloroethyl)amine, nor HN₂. *Anal Chem* **33**: 906~910, 1961
- 56) Nakamura H and Pisano JJ: Fluorescamine derivatives of histamin, and certain related imidazoles: unique fluorescence after heating in acid. *Arch Biochem Biophys* **177**: 334~335, 1976
- 57) McCann J and Ames BN: The detection of mutagenic metabolites of carcinogens in urine with the Salmonella/microsome test. *Ann NY Aca Sci* **269**: 21~25, 1975
- 58) McCoy EC, Hankel R and Rosenkranz HS: Detection of mutagenic activity in the urines of anesthesiologists: a preliminary report. *Environ Health Perspect* **21**: 221~223, 1977
- 59) Baden JM, Kelly M, Cheung A and Mortelmans K: Lack of mutagens in urines of operating room personnel. *Anesthesiology* **53**: 195~198, 1980
- 60) Falck K, Grohn P, Sorsa M, Vainio H, Heinonen E and Holsti LR: Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Lancet* **I**: 1250~1251, 1979
- 61) Falck K, Sorsa M and Vainio H: Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. *Mutation Res* **79**: 45~52, 1980
- 62) Gelbart SM and Sontag SJ: Mutagenic urine in cirrhosis. *Lancet* **I**: 894~896, 1980
- 63) Minnich V, Smith ME, Thompson D and Kornfeld S: Detection of mutagenic activity in human urine using mutant strains of Salmonella typhimurium. *Cancer* **38**: 1253~1258, 1976
- 64) Commoner B, Vithayathil AJ, Dolara P, Nair S, Madyastha P and Cuca GC: Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking. *Science* **201**: 913~916, 1978
- 65) Rappaport SM, McCartney MC and Wei ET: Volatilization of mutagens from beef during cooking. *Cancer Lett* **8**: 139~145, 1979
- 66) Fong LYY, Ton CCT and Koonanuwachaidet P: Mutagenicity of peanut oils and effect of repeated cooking. *Fd Cosmet Toxicol* **18**: 467~470, 1980
- 67) Hoeven JCM and Lecuwen FE: Isolation of a mutagenic fraction from bracken (*Pteridium aquilinum*). *Mutation Res* **79**: 377~380, 1980
- 68) Lu S, Camus A, Tomatis L and Bartsch H: Mutagenicity of extracts of pickled vegetables collected in Linshien county, a high-incidence area for esophageal cancer in northern China. *J Natl Cancer Inst* **66**: 33~36, 1981
- 69) Nagao M, Takahashi Y, Yamanaka H and Sugimura T: Mutagens in coffee and tea. *Mutation Res* **68**: 101~106, 1979
- 70) Nagao M, Takahashi Y, Wakabayashi K and Sugimura T: Mutagenicity of alcoholic beverages. *Mutation Res* **88**: 147~154, 1981
- 71) Legator MS, Connor TH and Stoeckel M: Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of humans and mice. *Science* **118**: 1118~1119, 1975
- 72) Beck DJ and Fisch JE: Mutagenicity of platinum

- coordination complexes in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res* **77**: 45~54, 1980
- 73) Nagao M, Yahagi T, Kawachi T, Sugimura T, Kosuge T, Tsuji K, Wakabayashi K, Mizusaki S and Matsumoto T: Comtagenic action of norharman and harman. *Proc Jap Acad* **53**: 95~98, 1977
- 74) 藤田 浩：Bioassay 法による抗癌剤の体内分布，排泄，不活性化の特性について。 *総合臨床* **20**：1350~1359, 1971
- 75) Oyasu R, Hirao Y and Izumi K: Enhancement by urine of urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res* **41**: 478~481, 1981
- 76) Durston WE and Ames BN: A simple method for the detection of mutagens in urine: studies with the carcinogen 2-acetylaminofluorene. *Proc Nat Acad Sci USA* **71**: 737~741, 1974
- 77) 安部史紀・小結明子・井上 博・山下 巧・江面光・吉沢邦子・高橋克俊・吉岡 修・松田 明：硫酸ペブレオマイシン（NK 631）の特殊毒性。抗原性，免疫抑制作用，眼粘膜刺激性および突然変異原性に関する検討。 *Jap J Antibiotics* **31**：859~871, 1978

(1981年7月31日迅速掲載受付)