

2-acetylaminofluorene によるラット膀胱腫瘍発生 に対する β -glucuronidase 阻害剤の影響について

京都大学医学部泌尿器科学教室

宮 川 美 栄 子

THE EFFECT OF ADDED DIETARY β -GLUCURONIDASE INHIBITOR ON THE OCCURRENCE OF 2-ACETYL- AMINOFLUORENE INDUCED BLADDER TUMORS IN RATS

Mieko MIYAKAWA

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

The effect of 2, 5-di-O-acetyl-D-glucosaccharo-(1 $\rightarrow$ 4)(6 $\rightarrow$ 3)-dilactone (SLA: β -glucuronidase inhibitor) on tumorigenesis of 2-acetylaminofluorene was experimentally studied by observation of the early changes in the rat vesical mucosa.

1) Hyperplastic index was compared in the various diet groups after 20 weeks of experimental feeding.

a) Pyridoxine-deficient food group.

Hyperplastic index was somewhat lower in the SLA-added group.

b) Tryptophan-added group.

There was no difference of hyperplastic index between the SLA-added and non-added group.

2) The bladder mucosa was studied by ^3H -thymidine autoradiography and labeling index was calculated. Occurrence rate of the bladder tumor within 25 weeks was also compared.

a) Pyridoxine-deficient food group.

Significant difference was observed between the SLA-added and non-added group. This might be explained by Boyland's hypothesis.

b) Tryptophan-added group.

The effect of SLA was shown in labeling index but not in tumor occurrence rate. This suggests the presence of carcinogenesis not explained by Boyland's hypothesis and not inhibited by SLA.

緒 言

芳香族 アミノ化合物による膀胱発癌の研究は、1895年 Rehn による職業性膀胱腫瘍の報告に端を発している¹⁾より引用)、aniline をはじめ、その誘導体の発癌性に関する多くの実験は、いずれも不成功におわったが、約40年後、Hueper²⁾によりはじめて 2-naphthylamine の発癌

性が証明された。この発見によりはじめて、化学あるいは生化学レベルでの膀胱発癌の研究が可能となった。

1951年には、Bonser³⁾より引用) によって、2-naphthylamineが代謝され 2-amino-1-naphthol となり、尿中に排泄されて proximate carcinogen として膀胱粘膜に作用するのであろう、と

いう芳香族アミンの代謝と発癌作用に関する最初の報告が出されている。かれらはさらにイヌでは尿中 2-amino-1-naphthol の量が、血清中のその200倍もあることを示し²⁸より引用¹、これが特異的に膀胱に腫瘍を発生する理由の一つになると考えている。1952年には、Bonser らが pellet implantation⁴³⁾ (マウス膀胱内ペレット挿入実験)の方法を用いて、2-naphthylamineには直接発癌作用はなく 2-amino-1-naphthol が発癌物質であることを示している^{4,5,6)}。そのご Clayson^{24,25)}は、2-naphthylamine が 2-amino-1-naphthol になる代謝過程を他の発癌性の芳香族アミンにも適応させ、ortho-hydroxylation 説を提唱している。1957年には、Allen, Boyland ら¹⁾ が 2-naphthylamine を投与したイヌの新鮮尿中に 2-amino-1-naphthol glucosiduronic acid があることを認め、この物質が pellet implantation によって発癌するのは、尿中の β -glucuronidase で hydrolyse されるためであると説明している。さらに 1960 年に Miller ら^{29,53,54)}によって、2-acetylaminofluorene は代謝されて N-hydroxyamine になることが示されたが、Boyland¹⁴⁾ はこの arylhydroxylamine もまた、sulfate, phosphate および glucuronide⁴¹⁾ として排泄され、そのうちの glucuronide が β -glucuronidase で hydrolyse されて発癌物質となると考えている。

当時 Boyland は、2-naphthylamine の代謝物質である 2-amino-1-naphthol または 2-naphthylhydroxylamine を proximate carcinogen と考え、肝で種々の抱合体となって尿中に排泄される物質のうち、glucuronide として尿中に排泄されたものが、尿中の β -glucuronidase によって hydrolyse されて発癌物質が遊離され、これが尿路上皮に作用して発癌する。したがってもし、尿中 β -glucuronidase 活性を抑制することができれば、発癌をおさえることが可能であろうと、2-naphthylamine による膀胱発癌機構に対する一つの考えかたを発表している^{13,14)}。かれはこの考えのもとに、イヌに 2-naphthylamine と β -glucuronidase 活性阻害剤である 1 $\rightarrow$ 4 saccharolactone を投与する

実験をおこなっているが、その結果、発癌を遅らせることはできたが、防止することはできなかった、と報告している¹⁵⁾。

現在では一般に、芳香族アミンの発癌機構において、N-hydroxylation がより重要なカギになっているものと考えられているが^{30,45,64)}、膀胱に特異的に腫瘍を生ずる 2-naphthylamine の proximate carcinogen が、orthoaminophenol か、N-hydroxyamine なのか、またはそれらの代謝物質なのか、あるいは全く別の形のものであるのか、いずれともまだ決定しえない。しかし、それが何であるにせよ、発癌物質の代謝過程に、尿中 β -glucuronidase が、はたして関与しているかどうかという点は、興味あるひとつの問題点であると考えられる。そこで、2-acetylaminofluorene および強力な β -glucuronidase 阻害剤として最近発見された 2,5-di-O-acetyl-D-glucaro-(1 $\rightarrow$ 4)(6 $\rightarrow$ 3)-dilactone (以下 SLA と略す) をラットに投与し、2-acetylaminofluorene による膀胱発癌に対する β -glucuronidase 阻害剤の影響を検討したので、その結果を報告する。

研究 方 法

生後 7~8 週 (平均体重約 150 g) の Wistar 系雄ラット (富士アニマル) を使用し、つぎのような実験をおこなった。

実験 I

日本クレア K. K. CE-2 粉末飼料に 1.2% の 2,5-di-O-acetyl-D-glucaro-(1 $\rightarrow$ 4)(6 $\rightarrow$ 3)-dilactone (SLA) を添加した飼料投与群 (5 匹)、および SLA を添加しない対照群 (8 匹) の 2 群に分け、1 週間飼育後、エーテル麻酔下に膀胱を露出し、膀胱直接穿刺により尿を採取し、 β -glucuronidase 活性を測定した。

測定法：

- | | | |
|-----|----------------------------------|--------|
| (1) | 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) | 0.8 ml |
| | 0.01 M phenolphthalein- | |
| | monoglucuronide | 0.1 ml |
| | 尿 | 0.1 ml |
| | 全量 | 1.0 ml |
| (2) | (1) を 37°C 24 時間 incubation | |
| (3) | 0.5 M glycine-NaOH 緩衝液 (pH 10.5) | 4.0 ml |
| (4) | 蒸留水 1.0 ml を加え、全量 6.0 ml とする。 | |
| (5) | 分光光度計 550 m μ の波長で比色 | |

(6) 標準曲線より、遊離した phenolphthalein の $\mu\text{g/ml}$ を計算する。

なお blank として phenolphthalein-mono-glucuronide の代りに蒸留水を等量使用する。

実験 II :

Table 1 のごとき組成よりなる vitamin B₆ (以下 V.B₆ と略す) 欠乏食および 1.4 % D, L-tryptophan 添加食をつくり、これに 0.04 % の 2-acetylaminofluorene (以下 2-AAF と略す) および 1.2 % の β -glucuronidase 活性阻害剤 SLA を加え、つぎのような 5 群に分けて飼育した (Table 2)。

- 1) 2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏食飼育群, 64 匹
- 2) 2-AAF および SLA 添加 V. B₆ 欠乏食飼育群, 65 匹
- 3) 2-AAF, D, L-tryptophan 添加食飼育群, 51 匹
- 4) 2-AAF, SLA および D, L-tryptophan 添加食飼育群, 50 匹
- 5) 日本クレア K. K. CE-2 固形飼料飼育の対照群, 7 匹

Table 1 V・B₆ 欠乏食および 1.4 % tryptophan 添加食組成

(1) Vitamin B₆-deficient diet; 60 kg

Choline chloride	120gr.
Thiamine HCl	240 mg
Riboflavin	480 mg
Niacin	240mg
Ca-pantothenate	1200 mg
Tocopherol acetate	9 g
Liver oil	240 g
Na ₂ HPO ₄	120 g
Fe-citrate	60 g
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	370 g
Ca-lactate	780 g
KH ₂ PO ₄	660 g
KCl	90 g
NaCl	30 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300 g
KI	18 g
Dextrin	31.8 kg
Vitamin-free casein	15.6 kg
Cellulose powder	1.2 kg
Lard	9.0 kg

(2) Tryptophan-added diet; 60 kg

D, L-Tryptophan	840 g.
-----------------	--------

Choline chloride	120 g.
Thiamine HCl	240 mg
Riboflavin	480 mg
Niacin	240 mg
Ca-pantothenate	1200 mg
Pyridoxine HCl	240 mg
Tocopherol acetate	9 g
Liver oil	240 g
Na ₂ HPO ₄	120 g
Fe-citrate	60 g
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	370 g
Ca-lactate	780 g
KH ₂ PO ₄	660 g
KCl	90 g
NaCl	30 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	300 g
KI	18 g
Dextrin	31.8 kg
Vitamin-free casein	15.6 kg
Cellulose powder	1.2 kg
Lard	9.0 kg

Table 2 実験群および使用動物数

実験 I	1) 1.2 % SLA 添加, CE-2 粉末飼料飼育群	8 匹
	2) 対照群 (CE-2 粉末飼料飼育)	5 匹
実験 II	1) 0.04 % 2-AAF 添加, VB ₆ 欠乏食飼育群	64 匹
	2) 0.04 % 2-AAF および 1.2 % SLA 添加 VB ₆ 欠乏食飼育群	65 匹
	3) 0.04 % 2-AAF, 1.4 % tryptophan 添加食飼育群	51 匹
	4) 0.04 % 2-AAF, 1.2 % SLA, 1.4 % tryptophan 添加食飼育群	50 匹
	5) 対照群 (CE-2 固型飼料飼育)	7 匹

水は、いずれの群もじゅうぶん、自由に摂取させた。なお、実験開始後、最初の 68 日間のうち計 14 日間は、実験動物の試験食による中毒症状が顕著であったため普通食を授与した。

実験動物は 1 ケージ 3 ~ 5 匹とし、体重測定は 1 週間に 1 度、各個体別ではなく、各ケージごとの平均値を計算した。

実験期間中の室温は最低 10.5°C, 最高 27.0°C であった。

1) ~ 4) の各実験群について、経時的 (1, 2, 3, 5,

10, 15, 20, 25, 30~35週)におおの3~5匹ずつ屠殺し, 膀胱粘膜の組織学的変化を, H-E 染色標本では hyperplasia の程度 (hyperplastic index を計算) および腫瘍の有無について, 同時に作製した ^3H -thymidine による autoradiography 標本では, ^3H -thymidine のりこみの程度を観察し, labeling index を計算した.

通常, 実験動物の処理は午後1時~1時半におこなった. 体重測定後, 1 mc/ml の ^3H -thymidine を生食水を用いて10倍に希釈し, 1 $\mu\text{C/g}$ (body weight) を腹腔内に注入した. 1時間後, エーテル麻酔のもとに頸動脈を切開して脱血をじゅうぶんにおこなったうえ解剖し, 各臓器について変化の有無を肉眼的に観察した. ついで膀胱には, 縦径約 1.5 cm になるようにブアン氏液を膀胱直接穿刺で注入し, 固定した. 各臓器は10%ホルマリン固定後, 型どおりに約 4 μ のパラフィン切片とした. 膀胱は正中面で2半して切片を作製

した. 脱バラ後, H-E 染色標本とともに, 膀胱については, Kodak NTB 2 Emulsion を用い, dipping 法で autoradiography 標本作製した. これを 4°C, 暗箱中で3週間露光後, 現像, 定着し, さらに H-E で後染色をおこない観察した.

Hyperplastic index (HPI) : Clayson²⁶⁾ の方法に準じた (Table 3).

ただし, ラットの場合, 膀胱粘膜の細胞層は部位により異なり, 対照群での観察結果は, 膀胱頂部を中心に最も薄く, 通常1~2層の細胞よりなり, 尿管通過部分付近でやや厚く3~4層となり, 内尿道口に向かってしだいにその層を増し5~6層になっている. しかも, 膀胱粘膜の肥厚は全体に平等に生ずることはむしろ少なく, 限局性に生じている場合が多い. したがって, 観察部位の差による混乱をより少なくするために, Fig. 1 に示すごとく, 膀胱頂部付近, 尿管付近および内尿道口付近の3カ所について, おおの観察した結果より, Table 3 のように点数を与え, Clayson の式にあてはめて, HPI を計算した.

Table 3 Hyperplastic index (HPI) の
計算方法

1) 膀胱粘膜層各部の細胞数と記号

記号	a	b	c
観察部位			
膀胱頂部	1—2	3—4	5—
尿管口付近	3—4	5—6	7—
内尿道付近	5—6	7—9	9—

2) 点数 (Ni) の入れかた

0点……………a, a, a,

1点…………… $\begin{cases} a, a, b, \\ a, a, c, \end{cases}$

3点…………… $\begin{cases} a, b, b, \\ b, b, b, \end{cases}$

5点…………… $\begin{cases} a, b, c, \\ b, b, c, \\ b, c, c, \\ c, c, c, \end{cases}$

たとえば頂部付近が1~2層よりなり, 尿管口付近が8~9層, 内尿道口付近が7~9層の標本ではa, c, b, であるから5点となる.

(3) 計算式

$$\text{HPI} = \frac{20N}{n}$$

N : 各動物の点数の和 ($\sum \text{Ni}$)

n : 動物数

(4) 判定

50点以上……………chemical induced

30—50点……………indecisive

30点以下……………inactive

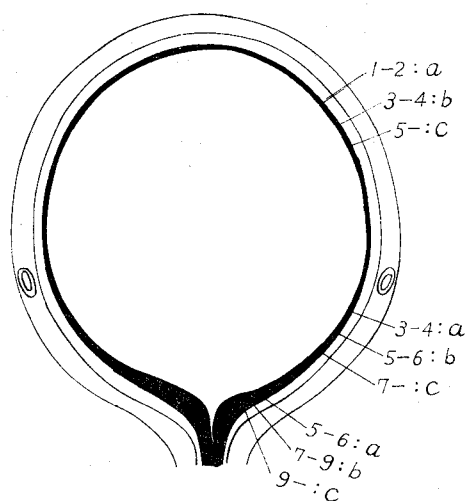


Fig. 1 HPI 計算方法

Labeling index : 前述のごとき方法で作製した ^3H -thymidine in vivo 標識法による膀胱の autoradiography 標本について観察した.

標本は原則的に強拡大で観察し, 1細胞に銀粒子5コ以上認められるものを標識細胞とした. 膀胱粘膜における標識細胞は, 限局性に認められる場合が多いので, 観察部位による誤差をより少なくする目的で, 膀胱正中面に現われる膀胱粘膜細胞層のほぼ全体をみるために5,000~10,000コの細胞をかぞえ, この中の標識細胞数より labeling index を計算した.

実験結果

実験 I

尿中 β -glucuronidase 活性測定値

対照群の尿中 β -glucuronidase 活性値は平均 $38.1 \pm 14.2 \mu\text{g/ml}$ であるのに対し、1.4% SLA 添加群ラットのそれは、 $0.86 \pm 0.05 \mu\text{g/ml}$ となり、対照群の約 1/44 の値を示した。これは明らかな有意差である ($F_1^4 = 80656$)。

この実験結果より、1.4% SLA 添加により、ラットの尿中 β -glucuronidase 活性は、著しく抑制されることが認められた (Table 4, Fig. 2)。

Table 4 実験群および対照群の尿中 β -glucuronidase 活性測定値

実験群	動物 No.	β -Glucuronidase 活性値 $\mu\text{g/ml}$
対照群	1	30.6
	2	53.4
	3	53.6
	4	27.6
	5	25.4
平均値		38.1 ± 14.2
1.4%SLA添加群	1	1.0
	2	0.5
	3	0.8
	4	0.5
	5	0.5
	6	1.9
	7	0.4
	8	0.8
平均値		0.86 ± 0.05

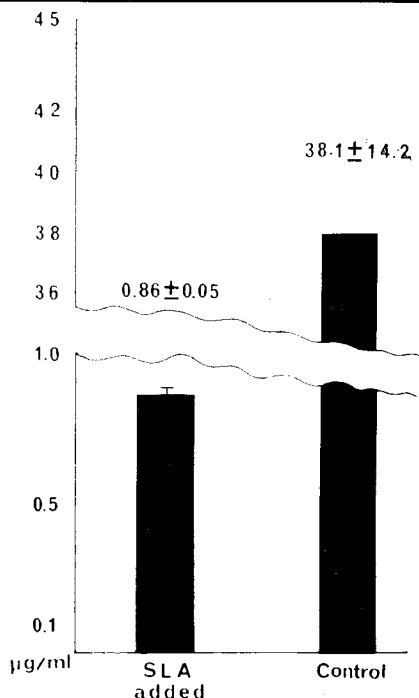


Fig. 2 尿中 β -glucuronidase 活性値

実験 II

1) Hyperplastic index (Table 5)

膀胱の H-E 染色標本を経時的に観察し、おのおの HPI を計算した。1)~4) の各グループとも、2-AAF の投与期間が長いものほど、高い HPI を示す傾向が認められた。

Table 5 各実験群における HPI 値

実験群	観察期間	動物数	HPI
2-AAF 添加, V・B ₆ 欠乏食投与群	20週以前	23	36
	20週以後	10	67
2-AAF, SLA 添加 V・B ₆ 欠乏食投与群	20週以前	23	13
	20週以後	15	50
2-AAF, tryptophan 添加食投与群	20週以前	22	17
	20週以後	23	66
2-AAF, SLA tryptophan 添加食投与群	20週以前	22	22
	20週以後	18	70
対照群		7	0

各グループとも、全観察期間のほぼ中間にあたる20週前後でまとめて HPI を計算した。結果は、Table 5 に示すごとくで、いずれのグループも、20週以前と以後の HPI には、かなりの差が認められ、前半がすべて inactive~indecisive であるのに対し、後半はすべて、chemical induced と判定された。chemical induced と判定された20週以後についての HPI を各グループごとに比較すると、V・B₆ 欠乏群では、SLA 添加群のほうが HPI はやや低い傾向を示している。しかし、tryptophan 添加群では、SLA 添加と非添加の間に、ほとんど差を認めない。また、V・B₆ 欠乏群と tryptophan 添加群の間にも HPI の差を認めない。このように、HPI ではどのグループについても SLA の明らかな影響はみとめられなかった。

2) 膀胱粘膜の labeling index (Table 6)

対照群の平均値 $0.06 \pm 0.06\%$ に対し、他の試験食飼育ラットの labeling index の平均値はいずれも非常に高い値を示し、2-AAF 投与期間が長くなるほど、その値も高くなる傾向がある。

全期間を通じての平均値を比べると、Table 6 のごとくで、V・B₆ 欠乏、2-AAF 添加群が 4.09 ± 2.57 、V・B₆ 欠乏、2-AAF, SLA 添加群が 1.95 ± 1.48 、tryptophan、2-AAF 添加群が 2.40 ± 1.57 、tryptophan、2-AAF, SLA 添加群が 1.34 ± 1.21 となる。対照群を 1 として比べた結果は、Fig. 3 で示されるごとくである。V・B₆ 欠乏群の分散 $\sigma^2 = 6.61$ 、V・B₆ 欠乏、SLA 添加群の分散は $\sigma^2 = 2.20$ 、したがって分散比 $F_{36}^{31} = 3.00$ で $P < 0.01$ となり、SLA 添加群と非

Table 6 ^3H -thymidine in vivo autoradiography による膀胱粘膜の labeling index.

実験群	動物数	計測細胞数	標識細胞数	labeling index (%)
2-AAF 添加 VB_6 欠乏食投与群	32	214,482	8,963	4.09 ± 2.57
2-AAF, SLA 添加 VB_6 欠乏食投与群	37	233,287	4,419	1.95 ± 1.48
2-AAF, tryptophan 添加食投与群	44	285,963	6,716	2.40 ± 1.57
2-AAF, SLA, tryptophan 添加食投与群	40	255,104	3,026	1.34 ± 1.21
対照群	7	39,799	24	0.06 ± 0.06

Table 7 膀胱腫瘍発生頻度

実験群	動物数	腫瘍発生数	%	25週以前の腫瘍発生数(%)
2-AAF 添加 VB_6 欠乏食投与群	33	6	18.2	6 18.2
2-AAF, SLA 添加 VB_6 欠乏食投与群	38	2	5.3	0 0
2-AAF, tryptophan 添加食投与群	45	9	20.0	2 4.4
2-AAF, SLA, tryptophan 添加食投与群	40	11	27.5	6 15.0
対照群	7	0	0	0 0

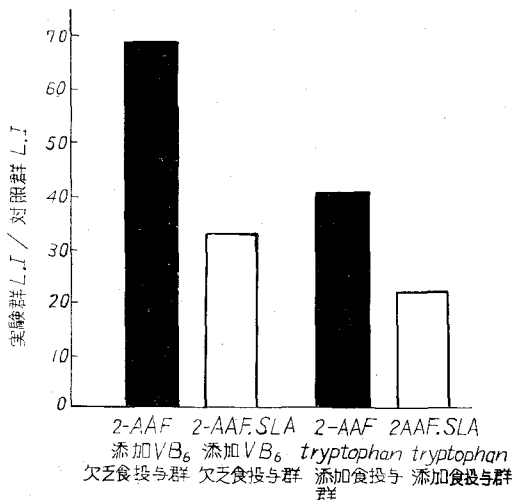


Fig. 3 対照群に対する実験群膀胱粘膜の labeling index

添加群の間の有意差が示された。

tryptophan 添加群の分散 $\sigma^2=2.47$, tryptophan, SLA 添加群の分散 $\sigma^2=1.46$, したがって分散比 $F_{39}^{43}=1.69$, VB_6 欠乏群と tryptophan 添加群の間は $F_{39}^{21}=2.68$, $P<0.01$ で有意差がある。

3) 膀胱腫瘍発生頻度 (Table 7)

腫瘍は、乳頭腫および粘膜下に浸潤傾向を示すもの

を一括して計算した。

ただし、 VB_6 欠乏, 2-AAF, SLA 添加群で2週目に屠殺した1匹は、膀胱結石を伴い、典型的な扁平上皮癌の像を示したが、この発癌は、結石の影響を無視できぬので、省略した。

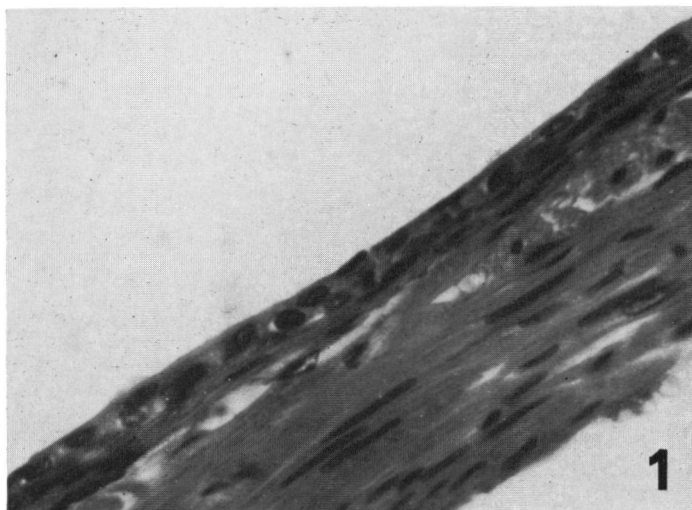
遠隔転移を伴うものは1例もなかった。

VB_6 欠乏群は33例中6例, 18.2%, VB_6 欠乏, SLA 添加群は38例中2例で5.3%, tryptophan 添加群は45例中9例, 20.0%, tryptophan, SLA 添加群は40例中11例27.5%であった。

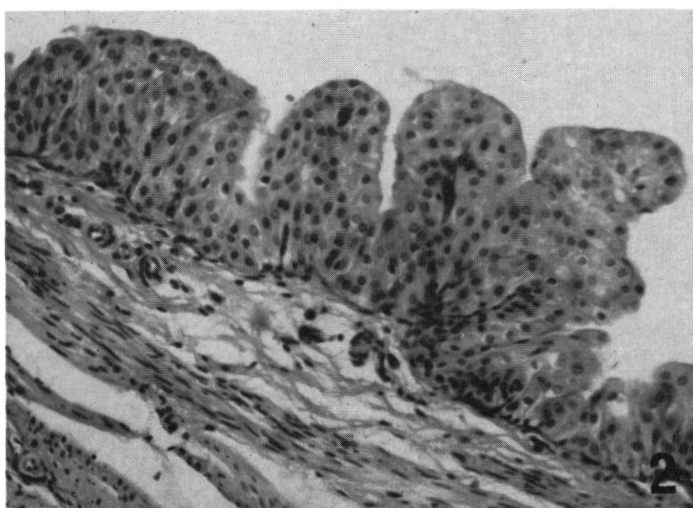
VB_6 欠乏群においては、SLA 投与群の腫瘍発生頻度が低く、一見 SLA の影響をうけているかのごとくであるが、推計学的な有意差は証明されなかった。

VB_6 欠乏群と tryptophan 添加群を比べると、labeling index において観察した結果と異なり、tryptophan 添加群のほうが、腫瘍の発生頻度が高い。ただし平均生存日数 (Table 8) でも示されるように、また、30週以上生存したラット数の比較 (Table 9)、あるいは、死亡率 (Table 10) からみても、いずれも tryptophan 添加群のほうが長期生存例が多く、すなわち、2-AAF 摂取量の多いものが多数含まれていることになる。

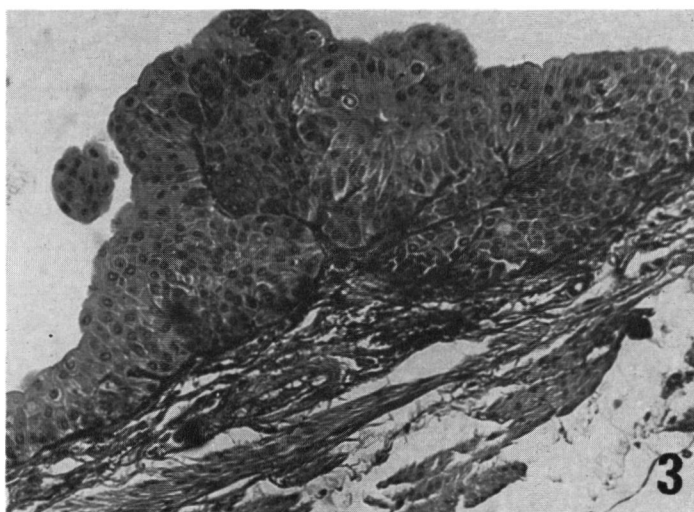
そこで、同一時点での腫瘍発生率を比較するため、25週以前のものについてまとめた。その結果は、 VB_6



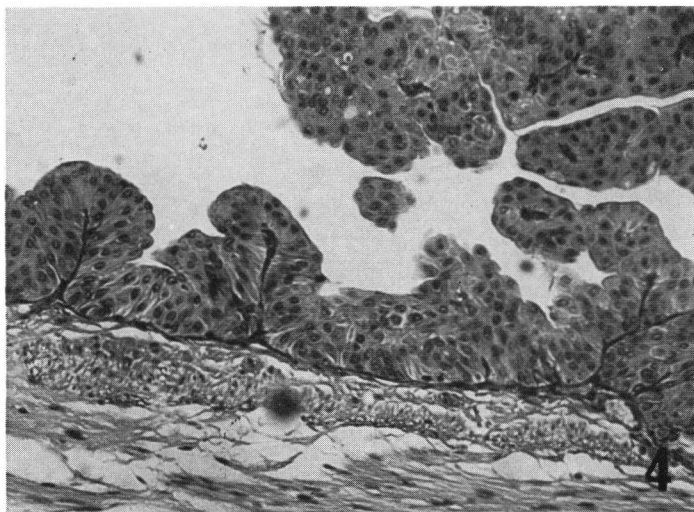
対照群ラットの正常膀胱粘膜



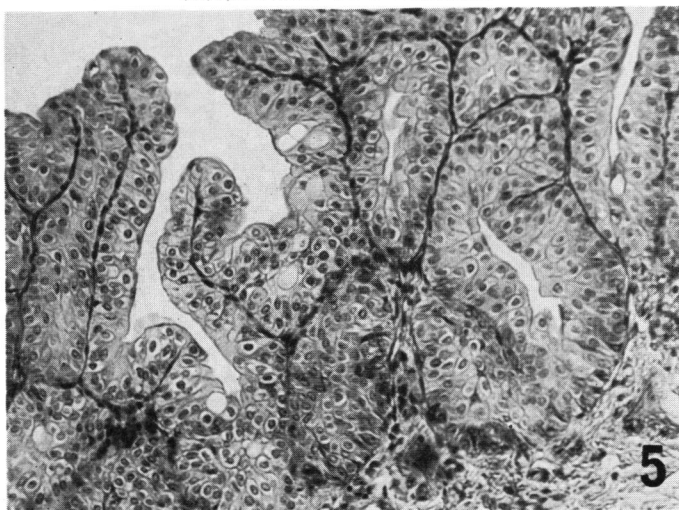
2-AAF によるラット膀胱乳頭腫



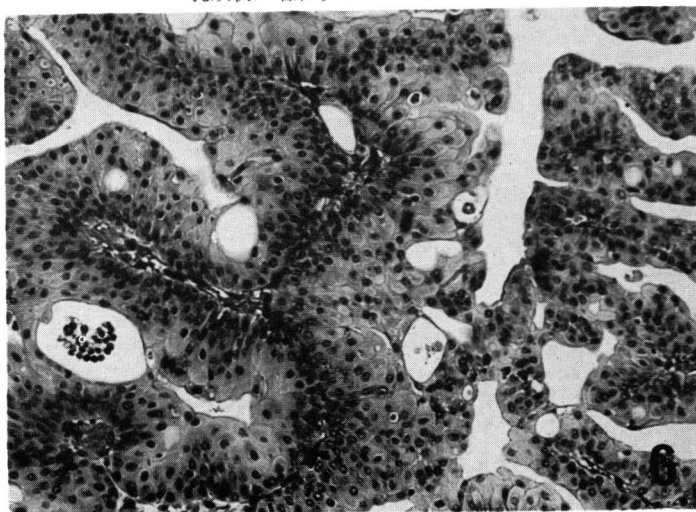
広基性に増殖するラット膀胱腫瘍



乳頭状に増殖するラット膀胱腫瘍



乳頭状に増殖するラット膀胱腫瘍



ラット膀胱腫瘍

欠乏群は6例, 18.2%, V. B₆ 欠乏, SLA 添加群は0, tryptophan 添加群2例, 4.4%, tryptophan, SLA 添加群6例, 15%となり, V. B₆ 欠乏群では SLA 投与と非投与群の間は $\chi^2=4.65$, $0.01 < P < 0.05$ で有意差が示された. また, V. B₆ 欠乏群と tryptophan 添加群の間の差は有意差ではない. tryptophan 添加群では, SLA 添加群の発生頻度が高値を示すが, 推計学的有意差は証明されない.

Table 8 平均生存日数

2-AAF 添加, V.B ₆ 欠乏食投与群	56.8	} 67.3日
2-AAF, SLA 添加 V.B ₆ 欠乏食投与群	77.7	
2-AAF, tryptophan 添加食投与群	106.7	} 98.5日
2-AAF, SLA, tryptophan 添加食投与群	90.1	

Table 9 30週以上生存した動物数の比較

実験群	動物数	生存率%
2-AAF 添加 V.B ₆ 欠乏食投与群	1 } 9	7 (9/129)
2-AAF, SLA 添加 V.B ₆ 欠乏食投与群		
2-AAF, tryptophan 添加食投与群	12 } 19	19 (19/101)
2-AAF, SLA, tryptophan 添加食投与群		

$$\chi^2=6.36, 0.01 < P < 0.05$$

Table 10 実験動物死亡率

実験群	実験開始時動物数	解剖動物数	実験途中死亡動物数	死亡率(%)
2-AAF 添加 V.B ₆ 欠乏食投与群	64	32	32	50.0
2-AAF, SLA 添加 V.B ₆ 欠乏食投与群	65	37	28	43.1
2-AAF, tryptophan 添加食投与群	51	44	7	13.7
2-AAF, SLA, tryptophan 添加食投与群	50	40	10	20.0

Vitamin B₆ 欠乏食投与群の死亡率: 46.5%

tryptophan 添加食投与群の死亡率: 16.8%

$$(\chi^2=21.09, P < 0.01)$$

考 按

尿中に存在するある種の発癌物質が, 膀胱腫瘍発生原因の一つとして関与しているであろうということは, イヌに内腔が主膀胱と連続していない膀胱憩室をつくり, 2-naphthylamine を経口投与すると, 腫瘍は本来の膀胱にのみ生じ, 完全に尿路から隔離されている憩室のほうには腫瘍の発生を認めなかったという結果や⁴⁷⁾, イヌに S 状腸膀胱をつくり, 2-naphthylamine を投与すると, 膀胱に腫瘍発生を認めず, 腎盂, 尿管腫瘍を認めたという報告⁶⁸⁾からも, ほぼ確実と思われる.

通常, 膀胱粘膜の上皮細胞は非常に安定した, 静止的なものであるが, 感染や過剰伸展, 外科的外傷, 放射線, そして尿中に存在する化学物質などの刺激によって, 早期に増殖性反応を起こすといわれている²⁷⁾.

膀胱粘膜の増殖性変化に, carcinoma in situ を伴う症例を報告した Blake³⁾ や, 発癌物質投与により早期にみる膀胱粘膜の hyperplasia と長期投与の結果生ずる腫瘍が, 密接な関係にあることを示した Clayson²⁶⁾ や McDonald⁴⁸⁾ も, 正常膀胱粘膜より腫瘍を生ずる一つの方向として, 正常粘膜→肥厚→腫瘍と仮定した Melicow⁵⁰⁾ や Row⁶⁵⁾, Mostofi⁵⁶⁾, Johnson⁴²⁾ などの考えを支持している. さらに, Boyland と Kinder は¹⁶⁾, 2-naphthylamine を投与したイヌに経時的膀胱鏡検査をおこない, 腫瘍を生ずる前段階に粘膜の肥厚があることを認めている.

このように, 膀胱発癌の前過程として, あるいは前癌状態として, 膀胱粘膜の肥厚は無視できない現象である. しかし, なんらかの因子が膀胱粘膜に作用して肥厚をきたしたとしても, 肥厚のすべてが癌化への方向にあるとは考えられず, もしこの肥厚が可逆性の変化であるならば, 発癌という経過をたどらないはずである. しかし, 肥厚の段階で, これが可逆性の変化なのか, 不可逆性変化であるのかを判断することは不可能なことである. HPI にみる今回の実験結果では, どのグループも20週以後に, 投与薬剤の影響があると判定されたが, SLA 投与と非投与の間の差は, 2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏食投与群

でも、2-AAF, tryptophan 添加食投与群でもみとめられなかった。しかし、25週以前に発生した腫瘍の頻度のうでは、2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏食投与群で SLA 投与の影響が明らかに現われている。この発癌結果と HPI の結果とを考え合わせると、HPI のみで発癌物質の影響を判定する場合には、非常に注意が必要であると思われる。またこの両者の結果の差は、肥厚のすべてが癌化するのではないという事実をよく示しているものといえよう。

ところで、Bonser, Clayson, Jull により、2-naphthylamine を投与したイヌの尿中に存在する metabolite として、最初に確認されたのは 2-amino-1-naphthol sulphate であったが、pellet implantation では、この物質に発癌性はなく、水解されて生ずる 2-amino-1-naphthol に発癌性がみとめられた^{14,28)}。しかし、この sulphate を hydrolyse すると考えられていた尿中の arylsulphatase は、この sulphate を hydrolyse しないことがわかった¹⁾。Allen は 2-naphthylamine のいくつかの metabolites のうち、2-amino-1-naphthol-glucuronide のみが腫瘍を生ずることを明らかにし、この glucuronide は尿中の β -glucuronidase によって hydrolyse され、発癌性の 2-amino-1-naphthol を生ずることを示した^{12,14)}。

Boyland は 2-naphthylamine が代謝されて carcinogen を生ずる経路をつぎのように考えている (Fig. 4)¹⁴⁾。すなわち、体内にはいった 2-naphthylamine は肝で酸化されて 2-amino-1-naphthol, または 2-naphthylhydroxylamine になる。これらの発癌物質はただちに肝で、glucuronic acid, sulphuric acid, phosphoric acid, glutathione などと抱合することにより不活性化された状態で、胆汁および尿中に排泄される。これらのうち、尿中に排泄された glucuronide が尿中 β -glucuronidase によって hydrolyse され、proximate carcinogens を生ずる。これが尿路粘膜に作用して発癌する。したがって尿中 β -glucuronidase の活性を抑制できるならば、発癌を抑えることができるかもしれないとしている。

Boyland¹⁾ はまた、膀胱腫瘍患者の尿中 β -

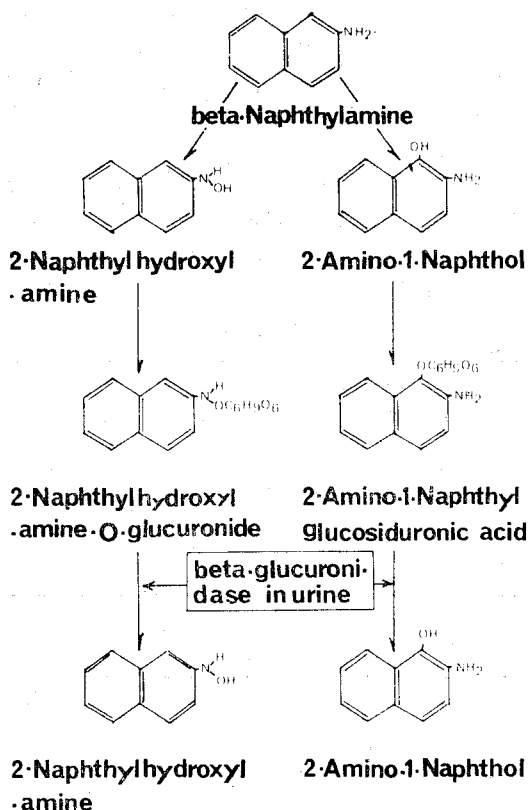


Fig. 4

glucuronidase の活性値が、術前術後を問わず、正常人に比べ非常に高いとのべ、膀胱腫瘍発生と β -glucuronidase の関係に注目し、この β -glucuronidase 活性値を下げることによって、腫瘍の再発をおさえることができるかもしれないと臨床的応用の可能性をのべている。

尿中 β -glucuronidase と膀胱腫瘍との関係については、数多くの報告がみられるが^{8,9,10,51)}、Boyland が考えたように、尿中 β -glucuronidase 活性値の上昇が、膀胱腫瘍発生になんらかの影響をもつのか、腫瘍が存在するために、尿中 β -glucuronidase 活性値が高くなるのか^{2,40,58,67,68,69)} 明らかではない。しかしいずれにせよ、2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏食投与群では、25週以前の早期の腫瘍発生が、 β -glucuronidase 阻害剤投与群で明らかに抑制されているということは膀胱腫瘍の発生に尿中 β -glucuronidase の存在が全く無関係ではないことを示しているといえよう。

β -glucuronidase 活性に対して, 1, 4-saccharolactone が特異的な阻害剤であることは, 1952年に Levvy によって示された^{14, 46)}。Boyland は, イヌに 2-naphthylamine と 1, 4-saccharolactone を投与したところ, saccharolactone 投与群では腫瘍の発生時期がいくらかおくれたが, 結局15カ月以内に全例, 膀胱腫瘍を発生したと報告し^{6, 12, 16)}, 実験の失敗原因は, 投与した 1, 4-saccharolactone の β -glucuronidase 阻害作用が弱く, 持続性ではないため, 尿中 β -glucuronidase 活性をじゅうぶんに抑制できなかったか, あるいは 2-naphthylamine が 1, 4-saccharolactone の量に対して多量すぎたかであるとのべ, この実験結果から, β -glucuronidase が膀胱腫瘍の発生に関与しているかどうかを結論することはできないが, 1, 4-saccharolactone 投与群で, 腫瘍の発生時期がいくらかおけているということは, β -glucuronidase が腫瘍発生になんらかの関係をもっていることを示している¹⁶⁾と推論している。

そのご glucosaccharolactone のいくつかの誘導体の中から, β -glucuronidase 活性阻害作用のより強いものを見いだすために研究が重ねられ, 1964年には, β -glucuronidase 活性阻害作用のより強い glucosaccharo 1:4, 3:6, -dilactone が合成されているが^{35, 36, 37)}, この水溶液は非常に不安定で, 作用の持続性がなかった。1965年になり Iida ら³⁹⁾によって, より安定な, しかもより強い β -glucuronidase 阻害作用が持続する物質として, 2,5-di-O-acetyl-D-glucosaccharo-(1→4) (6→3)-dilactone が見いだされた。実験 I の結果も, この物質によってラット尿中の β -glucuronidase 活性がじゅうぶんに抑制されていることを示している。

さて, 2-AAF と D, L-tryptophan とを用いて膀胱腫瘍を発生させた Dunning (1950³¹⁾, 1958³²⁾ の実験は, 2-AAF の経口投与のみではほとんどが肝腫瘍を生じ, 膀胱腫瘍を生じないのに対し, D, L-tryptophan または indole を同時に投与したものでは, 約 100 %に膀胱腫瘍を発生したことで注目された。そのご Boyland (1954)⁷⁾ や Morris (1960)⁵⁵⁾ も同様の実験で,

tryptophan または indole の添加によって 2-AAF による膀胱腫瘍発生頻度が高くなることを示し, これは 1) tryptophan に発癌作用があるのか, 2) 2-AAF と tryptophan に由来する発癌物質の summation によるのか, 3) 2-AAF の代謝が tryptophan 添加によって変化し, より強力な発癌物質を生じたのか, 4) tryptophan の代謝が 2-AAF によって変化し, 発癌物質を生じたのか, であろうと説明しているが, 2-naphthylamine または benzidine に tryptophan を投与した場合には, 膀胱腫瘍を生じなかったという結果からは⁷⁾, 2-AAF が tryptophan 代謝異常をひき起こし, その結果生じた代謝物質が膀胱腫瘍発生に関与していると考えられることもできる。Dyer (1961)³³⁾も, ラットに 2-AAF とともに tryptophan を投与すると, 尿中 xanthurenic acid, kynurenic acid, 3-hydroxykynurenine が増加することを示し, さらにこれに V. B₆ を投与すると, これらの物質の排泄が減少することを示した。かれはこれを V. B₆ 欠乏ラットでは xanthurenic acid を大量に排泄する⁵²⁾ことから, 2-AAF と V. B₆ とが反応する結果, V. B₆ 欠乏状態を生じ, tryptophan 代謝に異常をきたし, これらの物質が尿中に増加するものと考えている。

しかし Dunning ら³²⁾は, indole が 2-AAF による肝障害を保護し, 動物の延命をきたす結果, 膀胱腫瘍が増加すると考えており, McDougal^{48, 49)} (1961, 1962) も, Oyasu⁶⁰⁾ (1963) も同様に, indole が膀胱腫瘍の発生頻度を高める一つの要素として, indole 投与ラットでの延命効果をあげている。

今回の実験結果でも, 腫瘍発生頻度は 2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏群よりも, 2-AAF, tryptophan 添加群で高く, しかも腫瘍発生率は 30 週以後急に増加している。2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏群を 25 週以上生存させることはほとんど不可能であったが, 2-AAF, tryptophan 添加群は, 平均生存日数, 30 週以上生存しえた動物の割合, 実験動物の死亡率 (Table 8, 9, 10) のいずれにも示されたように長期生存が可能であり, tryptophan の延命効果も考えられる。

臨床的にはすでにEkmanとStrömbeck(1947)によって³⁸⁾より引用), 自然発生膀胱癌の患者尿中には, 多量の芳香族アミンが排泄されていることが示されており, Dunning らの実験によって, 患者尿中の芳香族アミンが tryptophan に由来するものである可能性もあるということが示されたことになる³⁸⁾. その Price ら⁶²⁾も, 自然発生膀胱癌患者の約半数に異常に多量の芳香族アミンが尿中に排泄されていることを認め, Brown¹⁷⁻²⁰⁾, Quagliariello ら⁶³⁾, はおのおの尿中の, 3-hydroxykynurenine, 3-hydroxy-anthranilic acid, kynurenine, anthranilic acid などの値が非常に高くなっていることを示している. これは, tryptophan を負荷することによって, さらに強調されるだけでなく, 正常の排泄を示した膀胱腫瘍患者の中にも, tryptophan を投与すると, kynurenine, acetylkynurenine, kynurenic acid の排泄量が急に増加するものがあることから, Brown らは¹⁷⁾, 膀胱癌患者は投与された tryptophan に対し, これを正常

の状態で代謝できない何かがあるのではないかと述べている. このように, 膀胱癌患者ではしばしば, 異常に多量の tryptophan 代謝物を尿中に排泄するということが明らかではあるが, 膀胱腫瘍患者でも正常の tryptophan 代謝を示すものもあり, 逆に膀胱癌は認められず他の部の腫瘍の場合, あるいは腫瘍と全く関係のない疾患の場合^{34, 45, 57, 59)}, ときには正常の人にも, 異常の tryptophan 代謝を示す場合があること⁶¹⁾ などから, tryptophan metabolites が膀胱に対する発癌物質であるとするのはなお早計であるとする人も多い^{28, 70)}.

2-AAF の代謝は, 2-naphthylamine の場合と同様に明らかではないが, 2-naphthylamine に対する Boyland らの考えに準じて, Fig. 5 のように考えることができる. すなわち, 経口投与された 2-AAF は, 主として肝で 2AA-1-hydroxyfluorene または N-hydroxy-2-AAF に代謝され, ただちに 2-AA-1-hydroxyfluorene-O-glucuronide または N-hydroxy-2-AAF-

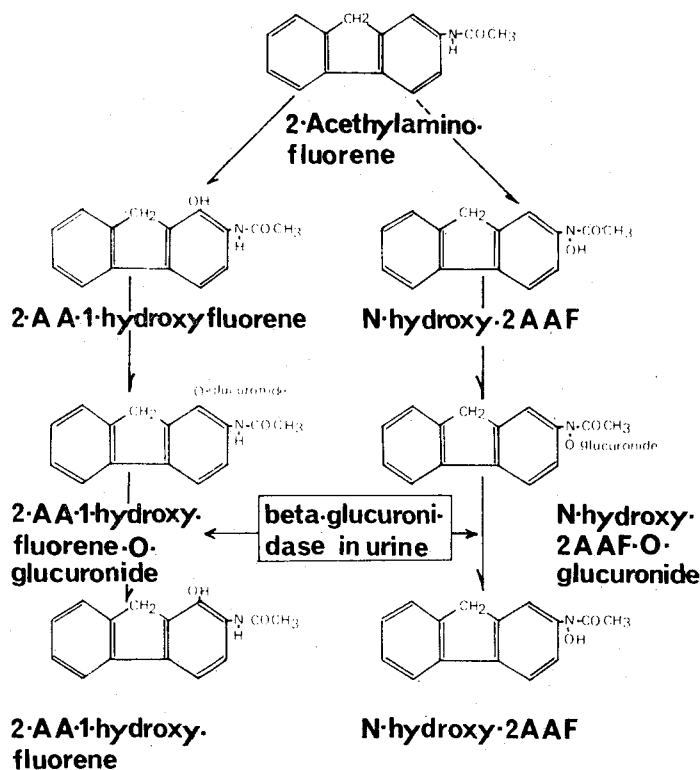


Fig. 5

O-glucuronide となり、尿中に排泄される。これらの glucuronides は尿中の β -glucuronidase によっておのおの free の orthohydroxyamine または N-hydroxyamine となり、これが尿路上皮に作用して腫瘍発生をみるのではないかということになる。したがって、尿中 β -glucuronidase 活性を抑制すれば、2-AAF による腫瘍発生が抑えられるかもしれない。

^3H -thymidine autoradiography の labeling index に示された結果は、2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏群においては明らかに SLA 投与の影響があることを示している。早期の膀胱粘膜にみるこの結果は Boyland の考えかたにもとづいて説明することができる。hyperplasia の場合と同様に、labeling index の増加上昇が、そのままだちに発癌に移行し、 ^3H -thymidine とりこみの減少が、膀胱腫瘍発生阻止と直結しているとは考えないが、少なくとも 2-AAF の metabolites に起因すると考えられるものが、尿路上皮の細胞増殖を亢進しているのに対して、2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏群では、SLA がこれを抑制していることがうかがわれる。25週以前に発生した腫瘍についてみた結果にも、labeling index に示されたと同様に、2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏群においては、SLA 投与の影響がはっきりと示された。すなわち25週以前の早期の腫瘍発生を SLA が抑制している。

いっぽう 2-AAF, tryptophan 添加群でも、labeling index のうえでは、SLA の影響が示されているが、SLA 投与群と非投与群の間の差が、2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏群の場合ほど顕著ではなく、腫瘍発生頻度のうえでは、SLA が発癌を抑制してはいない。この結果は Boyland の考えかたでは説明できない。すなわち β -glucuronidase の関与しない発癌物質が膀胱粘膜に作用していることを示しているといえ、非常に興味あるところである。従来より tryptophan または indole を投与することによって、2-AAF による膀胱発癌は強調されることが示されているし、いっぽう tryptophan metabolites の中のいくつかは pellet implantation で、発癌性が証明されている^{21, 22)}。またその中

のあるものは、glucuronides として尿中に排泄されると考えられている¹⁰⁾、tryptophan metabolites の中には、肝で抱合されることなく、free のまま尿中に排泄されるものがあると考えられるならば、 β -glucuronidase もしたがって β -glucuronidase 阻害剤も tryptophan metabolites による発癌に対して、なんら影響しないことになり、この現象を説明することが可能であるかもしれない。

結 語

2-acetylaminofluorene および SLA (β -glucuronidase 阻害剤) をラットに投与し、2-acetylaminofluorene 代謝に対する β -glucuronidase inhibitor の影響を、膀胱粘膜の比較的早期の変化で観察し、つぎのような実験結果を得た。

1. 20週以後の hyperplastic index (HPI) を比較すると、V. B₆ 欠乏食投与群では、SLA 添加群のほうが、HPI はやや低い傾向を示しているが、tryptophan 添加食投与群では、SLA 添加と非添加の間にほとんど HPI の差を認めない。

2. 膀胱粘膜の ^3H -thymidine autoradiography の labeling index (LI) は、対照群 $0.06 \pm 0.06\%$ に対して他のグループの LI はいずれも非常に高い値を示し、2-AAF 投与期間が長くなるほど、高い値を示す傾向がある。各グループの LI は、2-AAF 添加 V. B₆ 欠乏食投与群： 4.09 ± 2.57 ；2-AAF, SLA 添加 V. B₆ 欠乏食投与群： 1.95 ± 1.48 ($F_{3,8}^{81} = 3.00$, $P < 0.01$)；2-AAF, tryptophan, 添加食投与群： 2.40 ± 1.57 ；2-AAF, SLA, tryptophan 添加食投与群： 1.34 ± 1.21 ($F_{3,8}^{43} = 1.69$, $P \leq 0.05$)；V. B₆ 欠乏食投与群と tryptophan 添加食投与群の差も有意差であった ($F_{4,8}^{81} = 2.68$, $P < 0.01$)。

3. 膀胱腫瘍発生頻度を、25週以前のものについてみると、V. B₆ 欠乏 2-AAF 添加群：18.2% (6/33)；V. B₆ 欠乏, 2-AAF, SLA 添加群：0% (0/33) ($\chi^2 = 4.65$, $0.01 < P < 0.05$)；tryptophan, 2-AAF 添加群：44% (2/45)；tryptophan, 2-AAF, SLA 添加群：15.0% (6

/40) ($P>0.05$) であった。

4. 以上の結果で示されるように、V. B₀ 欠乏食投与群においては、膀胱粘膜の labeling index および25週以前の腫瘍発生頻度のいずれにも、SLA 投与の影響が示された。これは Boyland の考えにあてはめて説明できる。

いっぽう tryptophan 添加食投与群でも、labeling index においては SLA 投与の影響がみられるが、腫瘍発生頻度のうへでは SLA 投与の影響は示されず、その発癌機序のうへで、Boyland の考えにあてはまらない、すなわち β -glucuronidase の関与しない発癌物質の作用が推定された。

(本論文の要旨は、第57回日本泌尿器科学会総会において発表した。)

稿を終るにあたり、ご指導、ご校閲を賜った恩師加藤篤二教授に衷心より感謝いたします。

さらに、終始ご懇切、多大のご教示を頂いた、吉田修講師に、心からなる感謝の意を表します。

また、ご協力いただいた東京生化学研究所、岡田正志所長および、中外製薬株式会社平坂義信氏、中外製薬総合研究所 生物研究部 鈴木成生氏に深謝いたします。

また、ご協力いただいた原田卓学士に感謝いたします。さらに、動物飼育、標本作製にご協力くださった中村貴代子嬢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 tryptophen. Brit. J. Cancer, 11: 212-230, 1957.
- 2) 東 国雄: 泌尿器科領域における尿中 β -glucuronidase の研究. 日泌尿会誌, 49: 50—73, 1958.
- 3) Blake, J.: Proliferative changes in bladder mucosa and carcinoma in situ. Brit. J. Urol., 39: 181-185, 1967.
- 4) Bonser, G. M., Clayson, D. B., Jull, J. W. and Pyrah, L. N.: The carcinogenic properties of 2-amino-1-naphthol hydrochloride and its parent amine 2-naphthylamine. Brit. J. Cancer, 6: 412-424, 1952.
- 5) Bonser, G. M., Bradshaw, L., Clayson, D. B. and Jull, J. W.: A further study of the carcinogenic properties of ortho-hydroxy amines and related compounds by bladder implantation in the mouse. Brit. J. Cancer, 10: 539-546, 1956.
- 6) Bonser, G. M.: Factors concerned in the location of human and experimental tumours. Brit. Med. J., 2: 655-660, 1967.
- 7) Boyland, E., Harris, J. and Horning, E. S.: The induction of carcinoma of the bladder in rats with acetylaminofluorene. Brit. J. Cancer, 8: 647-654, 1954.
- 8) Boyland, E., Wallace, D. M. and Williams, D. C.: Urinary enzymes in bladder cancer. Brit. J. Urol., 27: 11-14, 1955.
- 9) Boyland, E., Wallace, D. M. and Williams, D. C.: Activity of the enzymes sulphatase and β -glucuronidase in the urine, serum and bladder tissue. Brit. J. Cancer, 9: 62-79, 1955.
- 10) Boyland, E. and Watson, G.: 3-Hydroxy-anthranilic acid, a carcinogen produced by endogenous metabolism. Nature, 177: 837-838, 1956.
- 11) Boyland, E., Wallace, D. M. and Williams, D. C.: Enzyme activity in relation to cancer. Inhibition of urinary β -glucuronidase of patients with cancer of the bladder by oral administration of 1:4-saccharolactone and related compounds. Brit. J. Cancer, 11: 578-589, 1957.
- 12) Boyland, E.: The biochemistry of cancer of the bladder. Brit. Med. Bulltin, 14: 153-158, 1958.
- 13) Boyland, E., Dukes, C. E. and Grover, P. L.: Carcinogenicity of 2-naphthylhydroxylamine and 2-naphthylamine. Brit. J. Cancer, 17: 79-84, 1963.
- 14) Boyland, E.: The Biochemistry of Bladder Cancer, Charles C. Thomas Publisher, 1963.
- 15) Boyland, E., Wallace, D. M., Avis, P. R. D. and Kinder, C. H.: Attempted prophylaxis of bladder cancer with 1→4 glu-

- cosaccharolactone. *Brit. J. Urol.*, **36** : 563-569, 1964.
- 16) Boyland, E., Kinder, C. H., Mauson, D. and Wallace, D. M. : An attempt to prevent the induction of bladder cancer in dogs with 1 $\rightarrow$ 4 glucosaccharolactone. *Inv. Urol.*, **2** : 439-445, 1965.
- 17) Brown, R. R., Price, J. M. and Wear, J. B. : The metabolism of tryptophan in bladder tumor patients. *Proc. Am. Assoc. Can. Res.* **2** : 7, 1955.
- 18) Brown, R. R. : The isolation and determination of urinary hydroxykynurenine. *J. Biol. Chem.* **227** : 649-652, 1957.
- 19) Brown, R. R., Price, J. M., Satter, E. J. and Wear, J. B. : The metabolism of tryptophan in patients with bladder cancer. *Acta Unio Intern. Contra Cancrum.* **16** : 229-303, 1960.
- 20) Brown, R. R., Price, J. M., Friedell, G. H. and Burney, S. W. : Tryptophan metabolism in patients with bladder cancer : geographical differences. *J. Nat. Can. Inst.* **43** : 295-301, 1969.
- 21) Bryan, G. T., Brown, R. R. and Price, J. M. : Incidence of mouse bladder tumors following implantation of paraffin pellets containing certain tryptophan metabolites. *Can. Res.*, **24** : 582-585, 1964.
- 22) 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. *Can. Res.*, **24** : 596-602, 1964.
- 23) Bryan, G. T. : Role of tryptophan metabolites in urinary bladder cancer. *Amer. Industr. Hyg. Ass. J.*, **30** : 27-34, 1969.
- 24) Clayson, D. B. : A working hypothesis for the mode of carcinogenesis of aromatic amines. *Brit. J. Cancer.* **7** : 460-471, 1953.
- 25) Clayson, D. B., Jull, J. W. and Bonser, G. M. : The testing of ortho-hydroxyamines and related compounds by bladder implantation and a discussion of their structural requirements for carcinogenic activity. *Brit. J. Cancer*, **12** : 222-230, 1958.
- 26) Clayson, D. B., Lawson, T. A., Santana, S. and Bonser, G. M. : Correlation between the chemical induction of hyperplasia and of malignancy in the bladder epithelium. *Brit. J. Cancer*, **19** : 297-310, 1965.
- 27) Clayson, D. B. and Cooper, E. H. : The immediate response of bladder epithelium to injury by chemical carcinogens. *Brit. J. Urol.*, **16** : 710-713, 1969.
- 28) Clayson, D. B. : Chemical Carcinogenesis, J. and A. Churchill LTD. 1962.
- 29) Cramer, J. W., Miller, J. A. and Miller, E. C. : N-hydroxylation : A new metabolic reaction observed in the rat with the carcinogen 2-AAF. *J. Biol. Chem.* **235** : 885-888, 1960.
- 30) DeBaun, J. R., Smith, J. Y. R., Miller, E. C. and Miller, J. A. : Reactivity in vivo of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene : increase by sulphate ion. *Science*, **167** : 184-186, 1970.
- 31) Dunning, W. F., Curtis, M. R. and Maun, M. E. : The effect of added dietary tryptophane on the occurrence of 2-acetylaminofluorene induced liver and bladder cancer in rats. *Can. Res.*, **10** : 454-459, 1950.
- 32) Dunning, W. F. and Curtis, M. R. : The role of indole in incidence of 2-AAF induced bladder cancer in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99** : 91-95, 1958.
- 33) Dyer, H. M. and Morris, H. P. : An effect of N-2-fluorenylacetamide on the metabolism of tryptophan in rats. *J. Nat. Can. Inst.*, **26** : 315-329, 1961.
- 34) Garvie, W. H. H. : The influence of alloxan diabetes on experimental cancer. *Brit. J. Cancer*, **22** : 128-132, 1968.
- 35) Harigaya, S. : Studies on glucosaccharolactones II. Glucosaccharo-1 : 4, 3 : 6-dilactone and its inhibitory effect on β -glucuronidase. *J. Biochem.*, **56** : 392-399, 1964.

- 36) Harigaya, S. : Studies on glucosaccharolactones III. Inhibition of β -glucuronidase in vivo by glucosaccharo-1:4, 3:6-dilactone and other lactones. *J. Biochem.*, **56** : 400-407, 1964.
- 37) Hirasaka, Y. and Umemoto, K. : Structure of D-glucosaccharodilactone. *Chem. Pharm. Bull.*, **13** : 325-329, 1965.
- 38) Hueper, W. C. : Occupational and Environmental Cancer of the Urinary System, New Haven and London, Yale University Press. 1969.
- 39) Iida, R., Nagata, S., Kakimoto, M., Aka-ike, H., Watanabe, H. and Shioya, A. : 2, 5-di-O-acetyl-D-glucosaccharo (1 $\rightarrow$ 4), (6 $\rightarrow$ 3)-dilactone, a new potent β -glucuronidase inhibitor. *Jap. J. Pharmacol.*, **15** : 88-90, 1965.
- 40) 今村一男 : 尿中 および 血清中の β -glucuronidase の研究, 日泌尿会誌, **53** : 613—654, 1962.
- 41) Irving, C. C. and Wiseman, R. : Metabolism of the glucuronide of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in the rat. *Can. Res.*, **29** : 812-816, 1969.
- 42) Johnson, F. R. : Some proliferative and metaplastic changes in transitional epithelium. *Brit. J. Urol.*, **29** : 112-120, 1957.
- 43) Jull, J. W. : The induction of tumours of the bladder epithelium in mice by the direct application of a carcinogen. *Brit. J. Cancer*, **5** : 328-330, 1951.
- 44) Kerr, W. K. and Barkin, M. : A hypernephroma associated with elevated levels of bladder carcinogens in the urine: case report. *Brit. J. Urol.*, **35** : 263-266, 1963.
- 45) King, C. M. and Phillips, B. : Enzyme catalyzed reactions of the carcinogen N-hydroxy-2-fluorenylacetamide with nucleic acid. *Science*, **159** : 1351-1353, 1968.
- 46) Levvy, G. A. : The preparation and properties of β -glucuronidase and inhibition by sugar acid and their lactones. *Biochem. J.*, **52** : 464-472, 1952.
- 47) McDonald, O. F. and Lund, R. R. : The role of the urine in vesical neoplasm. I. Experimental confirmation of the urogenous theory of pathogenesis. *J. Urol.*, **71** : 560-570, 1954.
- 48) McDonald, J. H., Oyasu, R. and Hass, G. M. : The relation of liver neoplasms to bladder tumors produced by 2-acetylaminofluorene. *Trans. Am. Assoc. Genito-urinary Surg.* **53** : 19-26, 1961.
- 49) McDonald, J. H., Oyasu, R. and Hass, G. M. : The relation of liver neoplasms to bladder tumors produced by 2-AAF. *J. Urol.*, **87** : 381-390, 1962.
- 50) Melicow, M. M. : Histological study of vesical urothelium intervening between gross neoplasms in total cystectomy. *J. Urol.*, **68** : 261-279, 1952.
- 51) Melicow, M. M., Uson, A. C. and Lipton, R. : β -glucuronidase activity in the urine of patients with bladder cancer and other conditions. *J. Urol.*, **86** : 89-94, 1961.
- 52) Melicow, M. M., Uson, A. C. and Price, T. D. : Bladder tumor induction in rats fed 2-AAF and a pyridoxine deficient diet. *J. Urol.*, **91** : 520-529, 1964.
- 53) Miller, J. A., Cramer, J. W. and Miller, E. C. : The N-and ring-hydroxylation of 2-AAF during carcinogenesis in the rat. *Can. Res.*, **20** : 950-962, 1960.
- 54) Miller, E. C., Miller, J. A. and Hartmann, H. A. : N-hydroxy-2-acetylaminofluorene: A metabolite of 2-AAF with increased carcinogenic activity in the rat. *Can. Res.*, **21** : 815-824, 1961.
- 55) Morris, H. P., Sidransky, H. and Wagner, B. P. : Bladder tumors in rats ingesting diets low in vitamin B₆ and containing N-2-fluorenylacetamide. *Proc. Am. Assoc. Can. Res.*, **3** : 136, 1960.
- 56) Mostofi, F. K. : Potentialities of bladder epithelium. *J. Urol.*, **71** : 705-714, 1954.
- 57) Musajo, L., Benassi, C. A. and Parpajola, A. : Isolation of kynurenine and 3-hydroxykynurenine from human pathological urine. *Nature*, **175** : 855-856, 1955.
- 58) 任成元 : 尿路腫瘍における β -glucuronidase の研究, 千葉医学会誌, **39** : 569—590, 1964.

- 59) 大沼英太郎：小児期トリプトファン代謝に関する臨床的研究，東北医誌，**73**：97—107，1966.
- 60) Oyasu, R., Miller, D. A., McDonald, J. H., and Hass, G. M. : Neoplasms of rat urinary bladder and liver rat fed 2-AAF and indole. Arch. Path. **75** : 184-190, 1963.
- 61) Price, J. M. and Dodge, L. W. : Occurrence of the 8-methylether of xanthurenic acid in normal human urine. J. Biol. Chem., **223** : 699-704, 1956.
- 62) Price, J. M., Wear, J. B., Brown, R. R., Satter, E. J. and Olson, C. : Studies on etiology of carcinoma of urinary bladder. J. Urol., **83** : 376-382, 1960.
- 63) Quagliariello, E., Tancredi, F., Fedele, L. and Saccone, C. : Tryptophan-Nicotinic acid metabolism in patients with tumors of the bladder. Changes in the excretory products after treatment with nicotinamide and vitamin B₆. Brit. J. Can., **15** : 367-372, 1961.
- 54) Radomski, J. L. and Brill, E. : Bladder cancer induction by aromatic amines : role of N-hydroxymetabolites. Science, **167** : 992-993, 1970.
- 65) Roe, F. J. C. : An illustrated classification of the proliferative and neoplastic changes in mouse bladder epithelium in response to prolonged irritation. Brit. J. Urol., **36** : 238-253, 1964.
- 66) Scott, W. W. and Boyd, H. L. : A study of the carcinogenic effect of β -naphthylamine on the normal and substituted isolated sigmoid loop bladder of dogs. J. Urol., **70** : 914-924, 1953.
- 67) 園田孝夫： β -glucuronidase の生化学的ならびに組織化学的研究. 日泌尿会誌, **50** : 163—178, 1959.
- 68) Sorrentino, F. and Romano, C. : Actual urinary β -glucuronidase activity and cancer of the bladder. Urol. int., **11** : 232-239, 1961.
- 69) 米瀬泰行：泌尿器科領域における β -glucuronidaseの研究, 日泌尿会誌, **54** : 211-238, 1963.
- 70) Yoshida, O., Brown, R. R. and Bryan, G. T. : Relationship between tryptophan metabolism and heterotopic recurrences of human urinary tumors. Cancer, **25** : 773-780, 1970.

(1970年10月6日超特別掲載受付)