

3-メチルコランスレンの代謝と発癌

京都大学結核胸部疾患研究所 病理学部

高 橋 権 也

(1) 緒 言

1915年山極、市川ら¹⁾がタールによる発癌実験に成功して以来、英米を中心としてタール中の発癌物質をとり出す努力が続けられ、その結果 3,4-Benzpyrene (I), 1,2,5,6-Dibenzanthracen (II) が発見された。その後その基本骨格である 1,2-Benzanthracene (III) を核とした多数の誘導体が合成され、そのうち 7,12-Dimethylbenzanthracene (IV), 3-Methylcholanthrene (V) 等が強力な癌原性炭化水素として現在広く用いられている²⁾。3,4-Benzpyrene をはじめとする炭化水素は、タバコの煙³⁾、焼肉⁴⁾、焼魚⁵⁾、汚染大気⁶⁾ 等から検出され、環境汚染物質として現在注目されている。これら癌原性炭化水素の発癌性、化学的性質、代謝等にはお互いに類似点が多い。本著では 3-Methylcholanthrene (以下 3-MC と略す) をマウスに投与した場合の臓器分布、代謝及び排泄を明らかにし、これらとその発癌性との関係を考察した。なお最近、妊娠又は授乳中の母親を通して医薬品、環境汚染物質の子供に及ぼす影響が注目されているが、本著においても胎仔マウスにおける 3-MC の代謝と発癌性について特に詳述した。

(2) 3-MC の発癌性

3-MC は投与局所に腫瘍を作るが、同時に遠隔臓器である肺に腺腫を作りやすい。しかし肝臓にはほとんど発癌的効果がない。3-MC による肺腺腫の発生は、胎盤⁸⁾ 又はミルク⁹⁾ を介しても短期間で容易に達成される事が、我々の

実験より明らかになった。又 3-MC の代謝産物の発癌性の有無は、本著において重要な point である。これについての我々の成績の一部をも併せて紹介したい。

(2-1) 経胎盤、経ミルク発癌

妊娠16日目の DDD マウスに 3-MC を 1mg 静注し、生れた仔をそのまま母親に育てさせる (A群)、生れた仔を無処置の里親に育てさせる (B群)、無処置のマウスの仔を妊娠16日目に 3-MC 1mg を静注した母親に育てさせる (C群)、出産1日以内の母親に 3-MC 1mg を静注しそのまま仔を育てさせる (D群)、と四群にわけ、3カ月、6カ月後に屠殺して、肺に腺腫が1個以上認められた場合を成績陽性とした。その結果は **Table 1** に明らかなように経胎盤発癌が観察された。C群では発癌率0であるが、D群即ちC群よりも高濃度で 3-MC が乳中に現われるような条件では明らかに発癌性がみられる故、授乳を介する 3-MC の乳児移行も肺腺腫発生の充分な条件となる。

ミルク中に 3-MC が分泌される事はすでに知られていた⁹⁾。我々は 3-MC-³H を静注する実験でミルクに現われる放射活性のうち、その 1/3 及び乳児肺に分布する放射活性の 1/6 が未変化の 3-MC によるものである事を確認している⁸⁾。

(2-2) 3-MC の代謝産物による発癌

Sims¹⁰⁾ は 3-MC の酸化物を C57BL マウスの皮下に投与し、局所の発癌性を調べている。そしてその発癌性の強さは、3-MC, 2-keto-3-MC (IX) > 2-hydroxy-3-MC, (VII), 1-

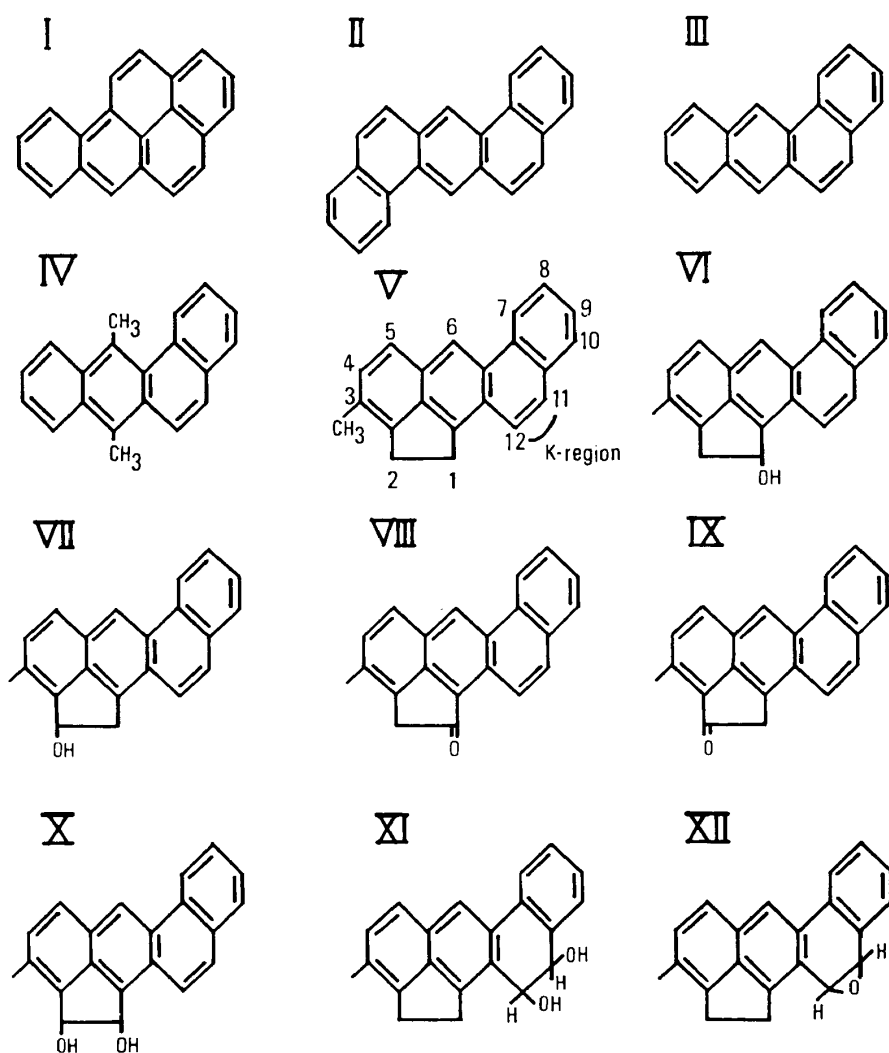


Fig. 1 Structures of Hydrocarbons in the Text.

Table 1 Carcinogenicity of 3-Methylcholanthrene in DDD Mice given via Placenta and/or Milk

Treated	Route	Period (Mo.)	Effective No.	% of tumorbearing mice
(A) Offspring from 3-MC-treated pregnant mice *	Placenta & Milk	3	24	58
		6	30	77
(B) Offspring from 3-MC-treated pregnant mice * and foster-nursed by untreated females	Placenta	3	31	39
(C) Offspring from untreated pregnant mice and foster-nursed by 3-MC-treated females *	Milk	3	12	0
(D) Offspring from 3-MC-treated females at birth	Milk	3	9	33

* Given on the 16th day of pregnancy.

Table 2 Carcinogenicity of 3-Methylcholanthrene and its Derivatives in DDD Newborn Mice

Derivatives [§]	Dose (mg)	Period			
		3 Months		6 Months	
		Effective No.	Tumorbearing Mice	Effective No.	Tumorbearing Mice
3-Methylcholanthrene	0.25	58	49*		
1-Keto-3-MC	0.3	5	3†	2	2*
2-Keto-3-MC	0.3	4	2†	6	5*
2-Hydroxy-3-MC	0.3	4	4*	3	2*
11, 12-Dihydro-11,12-dihydroxy-3-MC	0.3	9	0	7	0
	0.6	5	0	4	0
Vehicle		30	0	10	0

§ Chemicals were dissolved in 0.03 ml of sesame oil and given i.p. into newborn mice.

* Each mouse bears a large number of lung adenomas.

† Each mouse bears a few number of lung adenomas.

keto-3-MC (VIII) > 1-hydroxy-3-MC (VI) > 1,2-dihydroxy-3-MC (X) > 11,12-epoxy-3-MC (XII) > 11,12-dihydro-11,12-dihydroxy-3-MC (XI) であったと述べている。又 *in vitro* の実験では 11,12-epoxide が未変化の 3-MC より発癌性が強いという報告もみられる¹¹⁾。我々は **Table 2** に示された方法で 3-MC 及びその代謝産物を DDD 新生児マウスに腹腔投与し、3 カ月、6 カ月後に屠殺して肺腺腫の発生率を検討した。それによると未変化の 3-MC 及び 2-hydroxy 体が最も強力で keto 体も発癌性は比較的強い 11,12-dihydro-11,12-dihydroxy 体には発癌性がなかった。これらの結果はほぼ Sims¹⁰⁾ のデータと一致している。

(3) 3-MC の臓器分布

(3-1) 全身マクロオートラジオグラフによる観察

3-MC の臓器分布の各種投与方法による差異については、全身マクロオートラジオグラフを用いて検討し既に発表している⁷⁾。即ち 3-MC-¹⁴C を静注した場合、15分後には放射活性の大部分は肺にあり、肝にもわずかにびまん性に分布し、胆嚢に強く現われ、一部腸管に排泄されはじめる。流血中にも点状にみられ、腎での分

布はごくわずかである。投与5時間後では、下部腸管内に大量分布し、2～4日と経るに従って肺での分布量は減少し、併せて肝、腎、腸管内の分布量も減少していく。胎仔における分布は、妊娠マウスのオートラジオグラフではほとんど観察されないが、出産1日前(妊娠18日目)の胎仔をとり出して露出時間を長くして観察すると (**Fig. 2-1, 2**)、放射活性は腸管に強く、肝及び腎にも分布していることが判明する。肺その他の臓器では、ごくわずかにしかも一様に分布している。妊娠15日目の胎仔 (**Fig. 2-3**) では、全身に一様に分布し腸管への排泄はみられない。成獣での胃内、皮下、腹腔内投与では、投与局所以外では代謝及び排泄臓器である肝、腎、胆嚢、腸管、膀胱等に高濃度に放射活性がみられるが、肺をはじめとするその他の臓器での分布量は少ない。

以上要するに癌好発臓器である肺における 3-MC 分布量は、静脈投与の場合をのぞいては、他の臓器に比し特に多いという事はなく、この現象は胎児においても同様に観察された。

(3-2) 定量的観察

3-MC は微量ながら血清の脂質に溶解する。そこで 3-MC-³H 1.1 µg (20 µCi) を牛血清 0.15 ml に溶解し、これをマウスに静注する

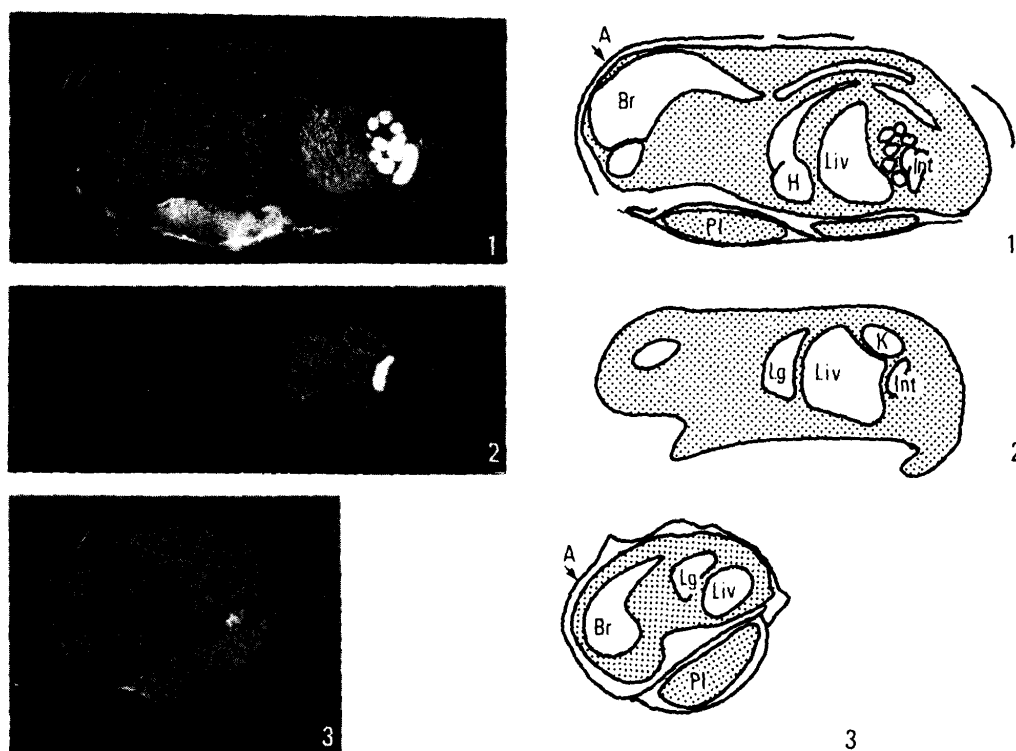


Fig. 2 Macroautoradiography of Fetuses on the 18th and 15th Day of Pregnancy

18日目胎仔胎盤正中矢状断(1)及び右側矢状断(2)。15日目胎仔及び胎盤(3)。いずれも母親に 3-MC- ^{14}C (5 μCi) を静注後5時間目。18日目胎仔では放射性物質は腸管(Int), 胎盤(pl), 肝(Liv) 及び腎(k) に強く分布しているが, 脳(Br) をはじめ, その他の部分は少ない。15日目胎仔では全身に一樣に分布している。

と, 3-MC は肺ではほとんど栓塞を作らない。それ故肺においても肝とほとんど同様な濃度で分布する。臓器 mg 当りの放射活性を経時的に測定すると Fig. 3 に示した如く臓器単位重量当りの 3-MC の半減期は非常に短い。3-MC は肝をはじめとする代謝臓器ですみやかに代謝されて排泄されて行くことが判明する。しかしその減少は半対数グラフで直線にはならない, これは臓器内蓄積を示すものと解して良い。臓器放射活性のアルコール可溶成分の割合は, 投与後次第に減少し, 最後にはほとんど抽出されなくなる。しかし 3-MC は臓器成分と結合した形で少量ながら長く残存している。投与量が多いと臓器中の半減期は長くなる。

3-MC- ^3H 1 mg (20 μCi) を妊娠マウスに投与した場合, 胎仔においては Table 3 に示す如くほぼオートラジオグラフでの観察をうらづける所見である。先のオートラジオグラフによ

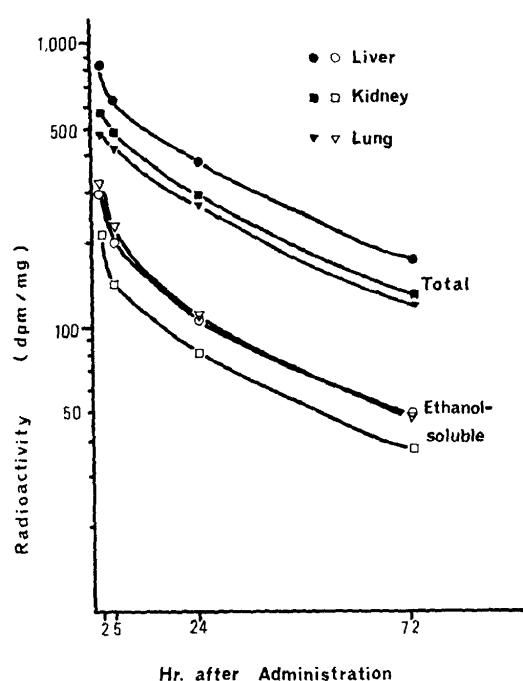


Fig. 3 Disappearance of 3-MC- ^3H from Mice

Table 3 Distribution of 3-Methylcholanthrene in Fetal Mouse †

Tissues *	dpm/mg wet weight of tissues	
	5 hr	24 hr
Whole body	97.6 ± 1.4 [§]	151.4 ± 7.2
Lung	77.0 ± 4.0	126.3 ± 22.6
Liver	111.4 ± 6.2	146.9 ± 28.3
Intestine & Contents	202.7 ± 33.3	340.0 ± 80.5
Other tissues	92.7 ± 2.2	144.9 ± 2.3
Placenta	157.6 ± 1.4	202.4 ± 1.2

† Data published already.⁷⁾* Tissues were taken after the i.v. injection of 1 mg (28 μ Ci) of 3-MC-³H into mice of the 17 th or 18 th day of pregnancy.

§ mean ± S.D. of 5~8 fetuses

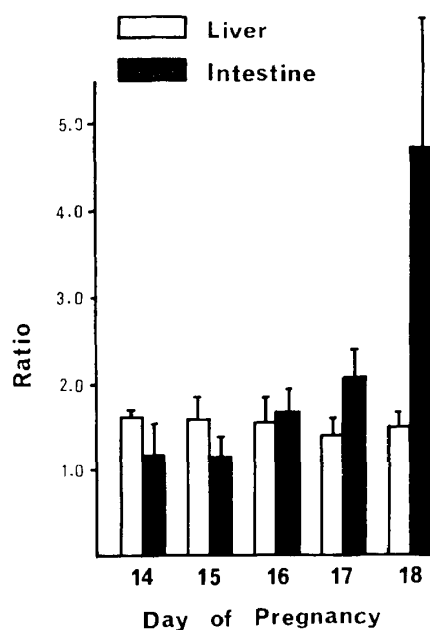
る成績では、妊娠15日目の胎仔では、3-MC の腸管への排泄がみられなかった。そこで妊娠14日目から18日目までの胎仔について肝と腸及びその他の臓器とにわけて mg 当りの dpm を測定し、各々を比較して見ると **Fig. 4** に示す如く肝では全期間を通じてほぼ一定であるのに対して腸管では17日目より急に増加している。こ

れは妊娠末期に胎仔での 3-MC に対する解毒能が急増している事を示している。

(4) 3-MC の代謝^{12,13)}

(4-1) 成熟マウス

成熟マウスに 3-MC-¹⁴C 1 mg (0.5 μ Ci) を投与しその糞便をエタノールで抽出すると、3-MC 代謝産物の約65%が抽出される。これを Sephadex LH-20 のカラムクロマトにかけ、エタノールで溶出すると、3つのピークが得られる。同様の操作を胆汁、小腸、盲腸及び大腸内容物についても行ない得られた成績を **Fig. 5** に示した。又 3-MC-³H 1.1 μ g (20 μ Ci) を静注し、5時間後に肺、肝、腎、腸管壁及び膀胱中の尿をとり出し同様の操作を行なうと、**Figs. 6, 7** に示すクロマトグラムが得られた。3-MC の代謝産物は臓器中においては5~6のピークとして得られる。腎抽出液では5つのピークが認められるが、尿中には主としてその F_I, F_{II}, F_{III} が排泄される。胆汁から排泄される成分は F_{III} のピーク及びこのクロマトには現われないアルコール不溶(水可溶)の成分のみである。胆汁中に排泄された 3-MC 代謝産物(F_{III})は、小腸はそのまま通過し、盲腸に至って4つピークに変換される。大腸では3つのピークとなり、そのまま糞便中に排泄される。

**Fig. 4** Histogram of 3-MC and its Metabolites in the Liver and Intestine of a Fetus.¹³⁾

Ratio

$$\frac{\text{dpm of the liver or intestine of a fetus}}{\text{dpm of the rest body of a fetus}}$$

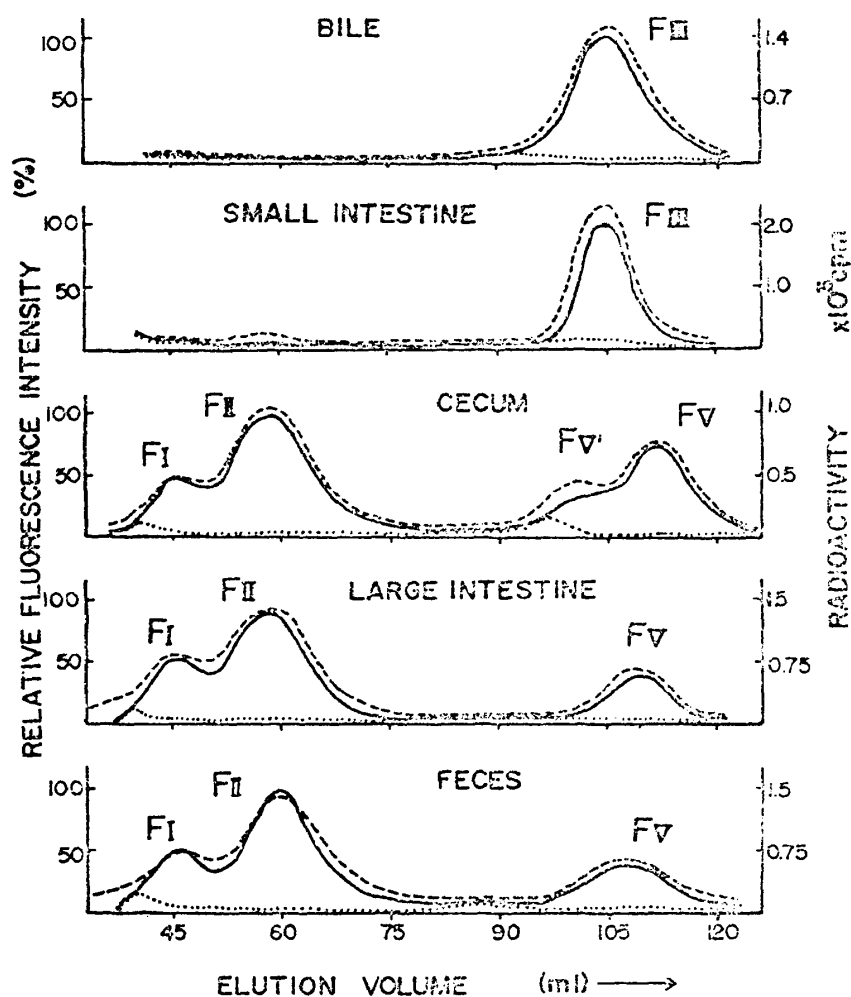


Fig. 5 Column Chromatography of Ethanol Extracts of the Bile, Feces and Contents of the Intestinal Tract.¹²⁾

— fluorescence from mice treated with 3-MC
 --- radioactivity from mice treated with 3-MC-¹⁴C
 fluorescence from mice treated without 3-MC

これは後出するように F_I , F_{II} は未変化の 3-MC 及びその酸化物であり F_{III} は酸化物の抱合体であるが、盲腸以下では抱合体が加水分解される為と思われる。尿においても F_I , F_{II} が観察されるのは同様に膀胱に β -glucuronidase が存在する為である。

臓器中の代謝産物を経時的に観察すると、まず F_I , 次に F_{III} , F_{II} のピークが消失し、 F_a , F_b のピークは最後まで残っているが、やがてこれらも消失してアルコール可溶成分は臓器中から抽出されなくなる。

(4-2) 胎仔マウス

妊娠13~18日目のマウスに 3-MC-³H 1.1 μ g

(20 μ Ci) を投与し、胎仔及び胎盤に移行した 3-MC 代謝産物のエタノール可溶成分をカラムクロマトで分離すると Fig. 8 に示された成績が得られた。それぞれのピークは成熟マウスのそれとほぼ一致する。胎盤では、各妊娠期間を通じてピークの形及び mg 当りの放射活性はほぼ一定であるが、胎仔においては、ピークの形は少しずつ異なり、又放射活性は妊娠が進むにつれて増加した。即ち F_{III} は、13日目ではほぼ一峰性であるが、18日目では明確に 2 峰性で、量も増加している。

(4-3) 3-MC 代謝産物の同定

種々の酸化剤を用いると、抱和環である 1,

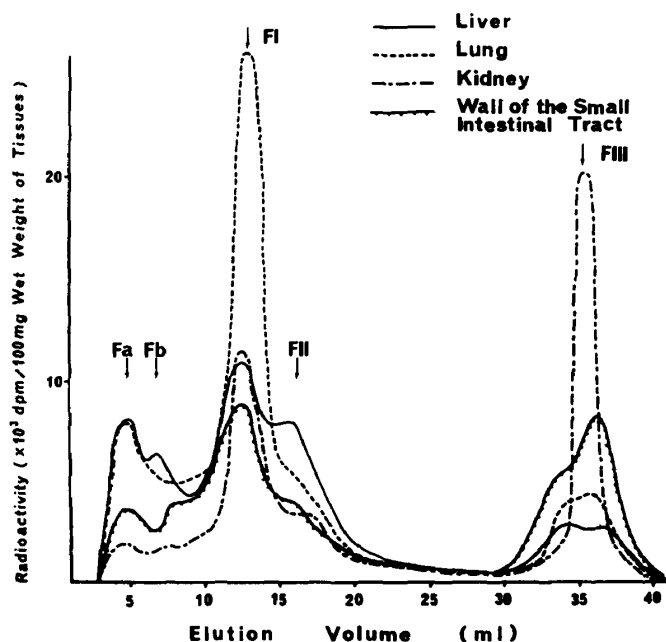


Fig. 6 Column Chromatography of Ethanol Extracts from Certain Organs of a Mouse.¹³⁾

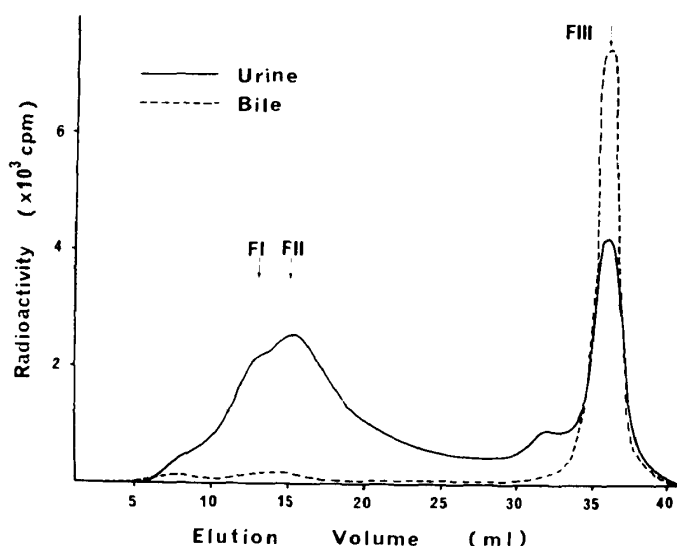


Fig. 7 Column Chromatography of Ethanol Extracts of the Bile and Urine from a Mouse.

2位及びK領域の11,12の位置における3-MCの酸化誘導体の合成が可能である。我々の研究室に於ても次の如き誘導体を合成した^{12,14)}。即ち1又は2-hydroxy-3-MC (VI, VII), 1又は2-keto-3-MC (VIII, IX), *cis*又は*trans* 1,2-dihydroxy-3-MC (X)及び11,12-dihydro-11,12-dihydroxy-3-MC (XI)等である。これらを標準としてシリカゲル薄層クロマトの R_f 値, 紫外線吸収, 螢光曲線等により3-MC代謝産物

の同定を行なった。成熟マウス及び胎仔の肝の F_I のピークから未変化の3-MCと上記のすべての誘導体が同定された¹³⁾。しかし3-MCのketo体は抽出操作の途中で光, 酸素等により人為的に出来る可能性がある。糞便中の F_I からは1-hydroxy体, 11,12-dihydro-11,12-dihydroxy体をのぞく残りの全てが検出された¹²⁾。 F_{II} ピークは合成された誘導体のいずれでもなく, ベンゼン核のその他の位置のmono及びdihydroxy体と推定された¹²⁾。 F_{III} ピークからは, ナフトレゾルシン反応, β -glucuronidase分解によりグルクロン酸抱合体が, $H_2^{35}SO_4$ を用いて, 硫酸抱合体が検出された¹²⁾。

(5) 3-MC と生体高分子との結合

癌原性炭化水素と生体高分子との結合は, 発癌機構を考える上において大変魅力的である。生体高分子としてはDNA, Protein等が考えられる。我々はDNAと核蛋白とから成るクロマチンに注目し, 次のような実験を行なった¹⁵⁾。

3-MC- 3H (300 μ Ci) 0.017 mg を Wistar 系・雄ラット (2ヶ月) に静注し, 24時間後に屠殺し肺と肝の核よりクロマチンを集め, Sephadex G-200, 2.2 M NaCl で DNA と核蛋白を分離し, その放射活性を測定した。結果は肺, 肝共核蛋白にはほとんど放射活性がなく DNA の分画に放射活性がみられた。そこでフェノール法を用いてマウスの DNA を抽出し共有結合の3-MCのみを測定すると **Table 4** に示す如くであった。マウスへの皮下, 静注投与により, 肝と肺の OD_{260} 紫外線吸収1当りの dpm を計算すると, 投与早期をのぞいてほとんど差がみられなかった。3-MC が妊娠中の母体に投与され, 生後2~3日で屠殺された新生児においても, 臓器による差はほとんど見られなかった。

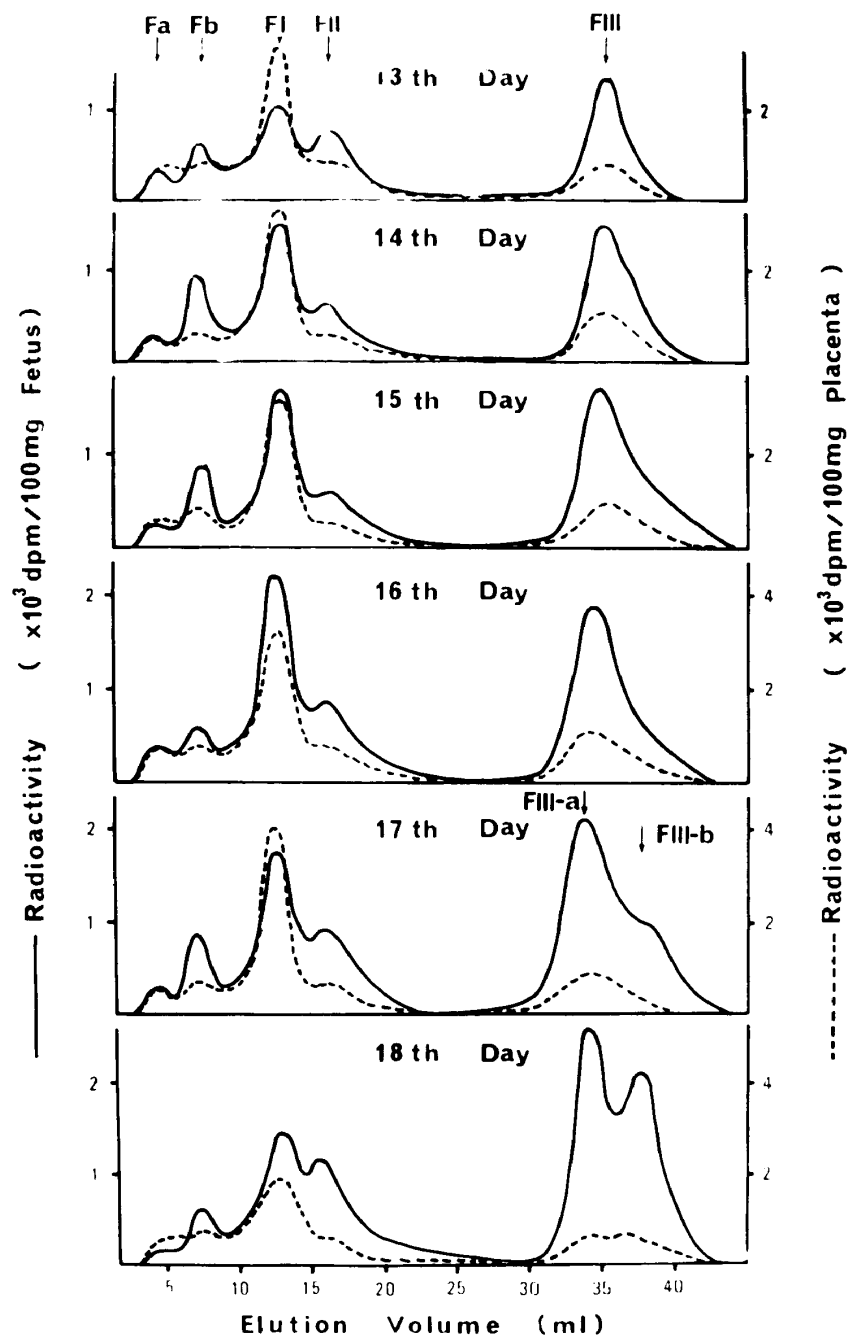


Fig. 8 Column Chromatography of Ethanol Extracts of the Whole Body of a Fetus and Placenta.¹³⁾
 — fetus, --- placenta.

(6) 考 察

3-MC はどのような経路で投与されても、大部分はすみやかに水酸化されて、グルクロン酸、硫酸抱合体として水溶性となって胆汁又は尿中へ排泄される。これらの酸化と抱合体の形成は、一応 3-MC の解毒に役立っているものと解される。又癌好発臓器である肺への分布

は、静脈投与の場合をのぞいては、代謝排泄臓器よりも少なく、その他の臓器と大差はない。又肺における特別な強い 3-MC 蓄積傾向もない。DNA との結合も肺と肝の間に特に差は認められない。ただし肺には 3-MC の代謝能力があり、他の臓器たとえば筋肉などよりも肝に近い高い活性を有している。これらの結果を通して肺と肝の間に発癌に関する特異的な異同を

Table 4 3-Methylcholanthrene Incorporated into DNA

	Route	Dose	No. of animals	Days after administration	dpm/OD ₂₆₀	
					Liver	Lung
Adult	i. v.	30 μ Ci in serum	3	3	23.3	23.4
			2	7	6.7	6.8
Adult	s. c.	50 μ Ci in oil	4	1	34.2	17.7
			3	12	7.6	14.8
Fetus* Newborn	i. v.	30 μ Ci in serum	30	4 or 5	4.7	5.1

* The carcinogen was given into a mother on the 17th day of pregnancy and its members were sacrificed 2 or 3 days after birth.

見出す事は困難であり、今後 3-MC と高分子との結合による高分子の機能の変化等の差違に注目すべきであろう。

一般に 3-MC は、投与局所で発癌を示す傾向が強い。出来るだけ代謝されないで未変化のまま高濃度で長く局所にとどまる事によってその発癌性は高くなる。即ち未変化の 3-MC が発癌に重要である事を示している。一般には、化学発癌物質の多くは生体内で代謝されて、proximate form となり、発癌に直接関与する存在となると云われている。3-MC は、K 領域即ち 11, 12 の位置がカルボキシル基でおきかわった PDA¹⁶⁾ 又は epoxy 体¹⁷⁾ となり、それが生体の高分子と結合して発癌的に働くとする考えはこの流れの一つを示している。又一方、7, 12-DMBA では 7 位のメチル基が水酸化される事が発癌の第 1 の階段であるとする考えもある¹⁸⁾。これらの事から発癌に最も関係の深い化合物として、(a) 未変化の 3-MC, (b) K 領域の epoxy 体、又は PDA, (c) 3 位のメチル基又は 1, 2 位での水酸化体等が考えられる。

Pullman¹⁹⁾ らによって発癌の場における K 領域の重要性が指摘され、Boyland ら²⁰⁾ によって提案された epoxy 体が発癌的代謝の中間代謝産物として注目されたが epoxy 体が parent hydrocarbon よりも発癌性が強いデータはなかった^{10), 21)}。しかし最近 Heidelberg の研究室から epoxy 体は parent hydrocarbon

よりも強く in vitro における cell transformation をひきおこす事が報告された¹¹⁾。現在 K 領域の epoxy が最も有力のように思われる。しかし K 領域以外のベンゼン核での代謝は発癌に無関係なのかどうか現在はまだ知見に乏しい。

3-MC の 1, 2 の位置を構成する cyclopentene 環は発癌に必要な構造であるが、我々の 3-MC 代謝産物の発癌において 2 位の水酸化体は parent hydrocarbon である 3-MC に劣らない発癌性を示している。K 領域水酸化体が発癌性を失うのと対照的で興味深い、この代謝産物が発癌に必要な中間代謝産物であるか否かは今後検討を要するであろう。

(7) 結 論

癌原性炭化水素である 3-MC の臓器分布、代謝、排泄等と発癌との関係を考察した。

3-MC は投与方法によって濃度差はあるがいずれの場合も比較的すみやかに肝にて代謝解毒されて糞便中又は尿中に排泄される。一部は生体成分と結合して長く蓄積する。

妊娠末期又は授乳中に母親に投与された 3-MC は胎盤又はミルクを介して胎仔、乳仔に移行して発癌的な影響を及ぼすが、胎仔へ移行した 3-MC は末期の胎仔の肝にて代謝され胎仔腸管に排泄される。

3-MC の分布、代謝、DNA との結合等に関して癌好発臓器である肺と嫌発臓器である肝

の間に成獣胎仔共, 肺の癌好発性をうらずける特別な差異は認められなかった。

文 献

- 1) 山極勝三郎, 市川厚一: 上皮性腫瘍ノ発生ニ関スル実験的研究, 第一報告, 東京医学会雑誌, 30: 296-328, 1915.
- 2) 吉田富三: 癌ノ発生, 日本医書出版, 東京, 1949. pp. 3-85.
- 3) Whynder, E. L. and Hoffmann, D.: Ein experimenteller Beitrag zur Tabakrauchkarzerogenese. Deusch. Med. Wochschr., 88: 623-628, 1963.
- 4) Lijinsky, W., and Shubik, P.: Benzo (a) pyrene and other polynuclear hydrocarbons in charcoal-broiled meat. Science, 145: 53-55, 1964.
- 5) Masuda, Y., *et al.*: Polycyclic aromatic hydrocarbons in common Japanese foods. I. broiled fish, roasted barley, shoyu, and caramel. Gann., 57: 133-142, 1966.
- 6) Cooper, R. L.: The determination of polycyclic hydrocarbons in town air., Analyst, 79: 573-579, 1954.
- 7) Takahashi, G., and Yasuhira, K.: Macroautoradiographic and radiometric studies on the distribution of 3-methylcholanthrene in mice and their fetuses. Cancer Res., 33: 23-28, 1973.
- 8) 高橋権也, 安平公夫: 肺癌の発生に関する実験的研究(14) ミルクを介してのメチルコランスレンの乳児移行と発癌, 日本胸部疾患学会雑誌, 11: 297, 1973.
- 9) Shay, H. *et al.*: Mammary excretion of 20-methylcholanthrene. Cancer Res., 10: 797-800, 1950.
- 10) Sims, P.: The carcinogenic activities in mice of compounds related to 3-methylcholanthrene. Int. J. Cancer, 2: 505-508, 1967.
- 11) Marquardt, H., *et al.*: Malignant transformation of cells derived from mouse prostate by epoxides and other derivatives of polycyclic hydrocarbons. Cancer Res., 32: 716-720, 1972.
- 12) Takahashi, G., and Yasuhira, K.: Excretion and conversion of 3-methylcholanthrene metabolites in the intestinal tract of the mouse. Cancer Res., 32: 710-715, 1972.
- 13) Takahashi, G., and Yasuhira, K.: Metabolism of 3-methylcholanthrene in mice and their fetuses. Cancer Res., (under contribution.)
- 14) Takahashi, G., and Kato, A.: Mass spectra of 3-methylcholanthrene and some related compounds. Mass spectroscopy, 20: 229-237, 1972.
- 15) 高橋権也, ラットに静脈投与されたメチルコランスレンと肝, 肺の DNA 及び核蛋白との結合について: 第30回日本癌学会総会記事, 42, 1971.
- 16) Oliverio, V. T., and Heidelberger, C.: The interaction of carcinogenic hydrocarbons with tissues. V. Some structural requirements for binding of 1,2,5,6-dibenzanthracene. Cancer Res., 18: 1094-1104, 1958.
- 17) Boyland, E.: Polycyclic hydrocarbons. Br. Med. Bull., 20: 121-126, 1964.
- 18) Flesher, J. W., and Sydnor, K. L.: Carcinogenicity of derivatives of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene. Cancer Res., 31: 1951-1954, 1971.
- 19) Pullman, A. and Pullman, B.: Electronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules, new developments. Advances in Cancer Res., 3: 117-169, 1955.
- 20) Boyland, E. and Sims, P.: Metabolism of polycyclic compounds. Biochem. J., 77: 175-181, 1960.
- 21) Boyland, E. and Sims, P.: The carcinogenic activities in mice of compounds related to benz(a)anthracene. Int. J. Cancer, 2: 500-504, 1969.