膀胱発癌に対するtryptophan代謝産物の役割に関する研究

第Ⅱ編 FANFT (初発因子), l-tryptophan (促進因子)

によるマウス膀胱発癌実験

東邦大学医学部泌尿器科学教室 松 島 正 浩
(主任: 安藤弘教授)

THE ROLE OF L-TRYPTOPHAN'S PROMOTING FACTOR ON TUMORGENESIS
IN THE URINARY BLADDER

2. URINARY BLADDER CARCINOGENICITY OF FANFT (INITIATING
FACTOR) AND L-TRYPTOPHAN (PROMOTING FACTOR) IN MICE

Masahiro Matsushima

Department of Urology, School of Medicine, Toho University
(Director: K. Ando)

In order to investigate the role of l-tryptophan's promoting factor on tumorigenesis in the urinary bladder, the following experiment was contemplated.

Sixty D-D strain female mice of 7-week-old were fed 0.1% FANFT added CE-2 diet for 4-week duration. Thereafter, these mice were divided into two groups each comprising thirty mice. 0.2% l-tryptophan added CE-2 diet for one group (group-1) and CE-2 diet for another (group-2) were fed for those mice in respective groups for another 56 weeks.

Results:

- 1) There were two cases of bladder tumor among the group-1 mice.
- 2) Both labeling index and hyperplastic index were statistically significant ($t=2.78$, $p<0.05$) in group-1 mice when compared with group-2. From these results l-tryptophan's promoting factor on tumorigenesis in the urinary bladder seemed to be undeniable.

結 言

職業性膀胱癌患者が発癌物質の暴露後発癌に至るまでの潜伏期間は報告者により多少の差違はあるが、平均18年の長期にわたる。そして外因性発癌物質である benzidine や 2-naphthylamine などの芳香族アミンが初発因子として重要な役割を演じていることは疑いもない事実であり、一旦被曝された者はその後再び発癌物質に暴露されなくても平均18年間の潜伏期間を経て発癌することが多くの研究者により認められている^{1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10)}。この発癌に至る過程には、種々の要因が作用するであろうが癌化を促進する一因子として尿中 tryptophan (以下 try. と略す, Fig. 1) 代謝産物が考えられることは過去の膀胱発癌に関する研究結果から見て不自然ではない。

Fig. 1.

l-Tryptophan

Fig. 2.

N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide

(FANFT)

今回、著者は前述の膀胱発癌過程における尿中 try-代謝産物の促進因子としての役割を検討すべく、Ertürkら¹¹⁾ (1967)の報告した FANFT (Fig. 2)を初発因子として投与した小動物発癌実験モデルを計画した。

実験方法

生後7週の D-D 系雌マウスを使用し、Fig. 3 に示すように飼育条件を異にする4群に分け実験した。飼育期間は各群ともに60週である。

Fig. 3. Experimental method

(1) 実験動物群飼育条件

第1群 (30匹) : 0.1% FANFT 添加 CE-2 粉末飼料で4週間飼育後、0.2% l-try. 添加 CE-2 固型飼料 (日本クレア K.K.) 飼育。

第2群 (30匹) : 0.1% FANFT 添加 CE-2 粉末飼料で4週間飼育後、CE-2固型飼料飼育。

第3群 (10匹) : CE-2 固型飼料で4週間飼育後、0.2% l-try 添加 CE-2 固型飼料飼育。

第4群 (12匹) : CE-2固型飼料単独で飼育 (対照群)。飲料水は水道水で各群とも自由に摂取させた。実験動物は1ケージ5匹雑居飼育し、体重測定は週1回行い、ケージ毎の平均値を調べ、かつ脱毛皮膚症状などの観察より実験動物の健康状態を調査し、実験期間中の室温は20℃～25に調整した。

(2) 実験動物の屠殺処理法と ³H-thymidine による膀胱粘膜の autoradiography 標本作製法。

実験動物の処理は、飼育期間終了後体重測定し、1mc/ml 含有の ³H-thymidine (specific activity 11.6Ci/mM) を生食水で10倍に希釈し、1μc/g (body weight) あて腹腔内に注入。1時間後、エーテル麻酔下に頸動脈を切断し脱血屠殺して剖検し、各主要臓器についての変化と腫瘍形成の有無を肉眼的に観察した。ついで、尿道側より直接穿刺法で膀胱内にブアン氏液を注入し、縦径が約1.0cm になるよう膀胱を膨満せしめ固定した。各臓器は10%ホルマリン溶液で固定後、厚さ4～5μmのパラフィン切片を作製し光顕に供した。膀胱は数日固定後正中

面で切半し光顕用切片を作製するとともに、autoradiography 標本作製は Sakura MR-M2 による dipping 法に倣い、これを4℃暗箱中に4週間露光し、レンドールで現像、フジフィックスで定着し、Hematoxylin-Eosin で後染色を行つた。

(3) autoradiography による膀胱粘膜細胞の labeling index 計算法

標本は原則的に光学顕微鏡 (10×100) で観察し、1

Fig. 4. Labeled cells of bladder epithelium

Tab. 1. Hyperplastic index (HPI) の計算法

1) 膀胱粘膜各部の細胞数と記号

記号	a	b	c
膀胱頂部	<u>1-2</u>	3-4	5-
尿管口附近	3-4	5-6	<u>7-</u>
内尿道口附近	5-6	<u>7-9</u>	9-

2) 点数 (Ni) の入れかた

- 0点..... a, a, a
- 1点..... { a, a, b
 a, a, c
- 3点..... { a, b, b
 b, b, b
 a, b, c
- 5点..... { b, b, c
 b, c, c
 c, c, c

たとえば頂部附近が1～2層よりなり、尿管口附近が8～9層、内尿道口附近が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

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

N : 各動物の点数の和 (ΣNi)
n : 動物数

4) 判定

- 50点以上 chemical induced
- 30～50点 indecisive
- 30点以下 inactive

粘膜細胞に銀粒子5個以上認められるものを標識細胞とした。膀胱正中面に現われる膀胱粘膜細胞層のほぼ全体を観察するため、約5,000個の細胞を数え、この中の標識細胞数より labeling index を計算した。第1群の膀胱粘膜上皮の標識細胞を Fig. 4に示した。

(4) hyperplastic index (HPI) の計算法

膀胱粘膜の肥厚程度を数値で表わすために Clayson らの方法を一部改良した宮川¹²⁾の測定方法 (Tab. 1) に準じて HPI を計算した。すなわち、膀胱頂部、尿管口附近と内尿道口附近の3カ所の膀胱粘膜の細胞数を a.b.c. の記号に変え、これに基づき各標本の点数を求め Tab. 1の(3)の計算式より HPI を計算した。

実験結果

(1) 各実験群の死亡率

飼育60週目の各群の死亡率を Tab. 2 に示した。すなわち第1群30.0%、第2群46.6%、第3群10.0%、第4群8.3%であった。

(2) 各実験群の肉眼的剖検結果

剖検所見では各群とも膀胱を除き、心、循環系 呼吸器系、肝、腎、消化器系、性器などいずれの臓器にも腫瘍の発生は確認できなかった。膀胱内面の観察は標本作製の必要上後日行われた。

Tab. 2. Mortality rate

Groups	No. of Mice at Beginnig of Experiment	No. of Mice Sacrificed at End of Experiment	No. of Mice Died During Experiment	Mortality Rate (%)
1	30	21	9	30.0
2	30	16	14	46.6
3	10	9	1	10.0
4	12	11	1	8.3

Fig. 5.

(3) 各実験群の膀胱腫瘍発生率と labeling index

(イ) 第1群; 実験飼育期間60週を経て生存したマウス数は当初30匹中21匹で、うち2匹の膀胱内面(後壁)に乳頭状腫瘍の発生(9.5%)をみた (Fig. 5.6). 腫瘍

Fig. 6.

Tab. 3. Labeling of Bladder Epithelium by ³H-Thymidine (Group-1)

Mouse No.	No. of cells counted	No. of labeled cells	Labeling index (%)
1	5014	55	1.10
2	5008	15	0.30
3	5000	6	0.12
4	5003	80	1.60
5	5000	7	0.14
6	5005	11	0.22
7	5005	10	0.20
8	5096	43	0.85
9	5000	3	0.06
10	5000	8	0.16
11	5014	17	0.34
12	5025	5	0.10
13	5000	11	0.22
14	5005	10	0.20
15	5000	22	0.44
16	5000	32	0.64
17	4312	17	0.39
18	5000	16	0.32
19	5200	26	0.50
20	5100	40	0.78
21	5024	35	0.70
Total	104811	469	0.446 ± 0.375

の大きさは、帽針頭大で比較的広基性の乳頭状腫瘍であり、光顕的には上皮性細胞からなり異型性は軽度であるが、クロマチンに富み濃染した大小不同の核を有する移行上皮癌で、一部は扁平上皮化生の像を示している。labeling index 計算のための計測細胞数104,811 に対する標識細胞数は Tab. 3 に示すごとく469個であり、この群の labeling index は 0.446 ± 0.375 であつた。

(ロ) 第2群；実験飼育期間60週を経て生存したマウス数は当初30匹中16匹で、本群には膀胱腫瘍の発生は見られなかつた。labeling index 計算のための計測細胞数78,923に対する標識細胞数は Tab. 4 に示すごとく132個であり、この群の labeling index は 0.176 ± 0.106 であつた。

(ハ) 第3群；実験飼育期間60週を経て屠殺した9匹のマウスについて調査した結果、膀胱腫瘍の発生はみられず labeling index 計算のための計測細胞数43,669に対する標識細胞数は56個で、Tab. 5 に示すごとく本群の labeling index は 0.127 ± 0.047 であつた。

(ニ) 第4群；対照群で60週を経て屠殺したマウス数は12匹中11匹であつた。本群には膀胱腫瘍発生はみられず、labeling index 計算のための計測細胞数56,448に

Tab. 4. Labeling of Bladder Epithelium by ³H-Thymidine (Group-2)

Mouse No.	No. of cells counted	No. of labeled cells	Labeling index (%)
1	5000	12	0.24
2	5000	7	0.14
3	5290	12	0.23
4	5113	8	0.16
5	5003	6	0.12
6	5160	8	0.16
7	3883	5	0.13
8	5000	10	0.20
9	5000	4	0.08
10	5000	7	0.16
11	4374	7	0.29
12	5000	3	0.06
13	5100	26	0.51
14	5000	3	0.06
15	5000	9	0.18
16	5000	5	0.10
Total	78923	132	0.176 ± 0.106

Tab. 5. Labeling of Bladder Epithelium by ³H-Thymidine (Group-3)

Mouse No.	No. of cells counted	No. of labeled cells	Labeling index (%)
1	5000	2	0.04
2	4000	4	0.10
3	4959	9	0.18
4	4633	8	0.17
5	5000	7	0.14
6	5100	5	0.10
7	5002	9	0.18
8	5025	8	0.16
9	4950	4	0.08
Total	43669	56	0.127 ± 0.047

Tab. 6. Labeling of Bladder Epithelium by ³H-Thymidine (Group-4)

Mouse No.	No. of cells counted	No. of labeled cells	Labeling index (%)
1	5162	1	0.02
2	5000	3	0.06
3	5018	3	0.06
4	5933	3	0.05
5	5214	3	0.06
6	5021	2	0.04
7	5000	1	0.02
8	5000	5	0.10
9	5100	3	0.06
10	5000	2	0.04
11	5000	0	0.00
Total	56448	25	0.04 ± 0.025

する標識細胞数は Tab. 6 に示すごとく25個であり、この群の labeling index は 0.04 ± 0.025 であつた。

(4) 各実験群相互間の膀胱粘膜 labeling index の対比

各実験群の labeling index 計算結果を総括して Tab. 7 に示す。各群と対照群間で t 検定を行つてみると、第1群は対照群に対し $t=3.338$, $p<0.01$ で有意差を示し、第2群は対照群に対し, $t=3.79$, $p<0.01$ で有意差を示し、第3群は対照群に対し, $t=4.80$, $p<0.01$ で有意差を示した。また第1群は第2群に対して $t=2.78$, $p<0.05$ で有意差を示した。

Tab. 7. ^3H -thymidine uptake of bladder mucosa and incidence of vesical tumor in each groups

Groups	No. of Mice	No. of cells counted	No. of labeled cells	Labeling index (%)	Hyperplastic Index	No. of Tumors (%)
1	21	104,811	469	0.446 ± 0.376	43	2 (9.5)
2	16	78,923	132	0.176 ± 0.100	32	0
3	9	33,669	56	0.127 ± 0.047	7	0
4	11	56,448	25	0.046 ± 0.025	0	0

(5) 各実験群相互間の膀胱粘膜 hyperplastic index の対比 (Tab. 7)

膀胱の Hematoxylin-Eosin 染色標本で Tab. 1 に倣い HPI を計算してみると、第1群は43、第2群は32、第3群は7、第4群は0であつた。すなわち第1群と第2群は indecisive の範疇に入るが、第1群は chemical induced に近い値を示し、第2群は inactive に近い値を示した。第3群と第4群は inactive であつた。

考 按

職業性膀胱癌患者の発癌潜伏期間は報告者間の多少の差がみられるが平均18年の長期にわたっている^{1) 2) 3) 4) 5) 6) 7) 8) 9) 10)}。(Tab. 8)。これらの患者は初発因子として ben-zidine や 2-naphthylamine などの暴露を受け引き長期間一職場に従事した者もあるが、一定期間の暴露後は、全く発癌物質に暴露されない者もある。後者において問題となり興味あることは、初発因子としての発癌物質被暴露後長期を経て発癌に到る過程には、他にになにか癌化を促進する因子が存在するであろうことが想像され、その1因子として、try. 代謝異常による尿中 try. 代謝産物の増加が考えられてきた。

Tab. 8. Latent Period of Aromatic Amine Cancers

Author	Range (years)	Mean Value (years)
Rehn (1895)	15~29	21
Oppenheimer (1927)	1~45	18
Müller (1936)	2~28	18
Goldblatt (1947)	4~48	19
Scott (1952)	4~33	16
Case et al (1954)	2~45	18
Scott (1959)	4~41	20
Tsuji (1962)	4~23	9.2
Iki (1970)	3.8~26.9	12.4
Ishizu (1973)	1~45	16.5
Our cases (1974)	8~28	15.5

自然発生膀胱癌の発癌に尿中 try. 代謝産物が関与しているか否かを証明する手段として try. 代謝産物が膀胱発癌を示すか否かを動物実験的に実証することは意味がある。

Rauschenbach¹³⁾ (1963) は、経口的、皮下注射法および経腹膜的に try. とその代謝産物を動物に投与したが、膀胱発癌はみられなかつたと報告している。Bryan¹⁴⁾ (1968) は xanthurenic acid 8-methyl ether を44週マウスに皮下注射してその膀胱発癌実験を試みたが、膀胱発癌はみられずリンパ系悪性腫瘍の発生をみた。また同年彼は、3-hydroxy anthranilic acid をマウスに経口投与して同様の実験を行つたが、膀胱癌の発生はみられず白血病とリンパ系悪性腫瘍を認めた。以上の実験結果にみるごとく try. およびその代謝産物の全身投与方法による膀胱発癌実験の失敗は、try. およびその代謝産物が肝において代謝され非芳香族化合物になるためと考えられた¹⁵⁾。

非経口的膀胱発癌実験では Jull¹⁶⁾ (1951)、Allen¹⁷⁾ (1957) の pellet implantation 法による実験が歴史的に有名であり1実験方法となつた。その方法は発癌実験化合物をコレステロールかパラフィンを基剤として混合し、pellet を作り、直接マウス膀胱内に挿入する方法である。Allen¹⁷⁾ (1957)、Bryan¹⁸⁾ (1964) は pellet implantation 法により xanthurenic acid 8-methyl ether, 3-hydroxy kynurenine, xanthurenic acid, 3-hydroxy anthranilic acid と 3-hydroxy-2 aminoacetophenon の5種類の try. 代謝産物を用い膀胱発癌実験に成功した。しかし、この方法は、pellet 自体の癌化に対する影響の存在が論議されるようになった。Bryan¹⁹⁾ (1964) は pellet 内の発癌実験化合物は6日以内の短期間に pellet より溶出する事を見出した。それ故、Bryan & Springberg¹⁵⁾ (1966) は、膀胱に発癌する機序は、実験化合物が初発因子として作用し pellet は長期膀胱内に残留し促進因子として作用するためと考えた。以上のような諸研究者による膀胱発癌実験成績から、Bryan &

Morris²⁰⁾ (1968) はコレステロール pellet をマウス膀胱内に挿入して xanthurenic acid 8-methyl ether を44週、皮下注射することによつて膀胱の発癌に成功した。このような諸事実から Bryan²¹⁾ (1969) は人間においても、実験動物と同様に膀胱の発癌において、初発因子と促進因子の存在を想定した。

Rodamski ら²²⁾ (1971) は4年間以上にわたつて犬に dl-try. を経口的に摂取させたところ膀胱粘膜に発癌はみられなかつたが、hyperplasia が生ずることを立証し、4-aminodiphenyl を1回経口投与し、その後 dl-try. を引続いて投与する方法で膀胱癌の発生を認めている。この実験は dl-try. の経口投与方法による try. の促進因子の役割を立証した実験として意義がある。

Ertürk ら¹¹⁾ (1967) は第10回国際ガン学会で種族差がなく、膀胱に対して臓器特異的にほぼ100%発癌性を有する nitrofurantoin 化合物である N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide (FANFT) について発表した。

今回、著者は try. の膀胱発癌における促進的役割をより明確に立証すべくマウスを使用し、初発因子として FANFT を投与し、促進因子として通常生体内で代謝される try. 添加食飼で飼育する実験を試みた。その結果、l-try. 添加食飼育群(第1群)において、2例の膀胱発癌に成功し、³H-thymidine による autoradiography を用い膀胱粘膜の labeling index と hyperplastic index を観察したが、そのいずれの値も対照群に比し有意の差をもつて高値であることを立証した。しかし初発因子のみで促進因子の付与されない第2群には発癌をみず、初発因子のない促進因子のみの第3群には当然ながら発癌しなかつた。以上の実験結果から、発癌に至る過程には、初発因子と促進因子併存の必要性が明らかとなつた。

結 語

今回、著者は膀胱発癌過程における l-try. の促進因子的役割を検討すべく小動物発癌実験モデルを計画した。種族差がなく臓器特異的に膀胱に発癌する FANFT を D-D 系雌マウスに短期間(4週)経口摂取させた後、l-try. を長期間(56週)経口摂取させたところ次の結果を得た。

1) 第1群(FANFT 添加 CE-2 粉末飼料で4週飼育後、l-try. 添加 CE-2 固型飼料で56週飼育群)、第2群(FANFT 添加 CE-2 粉末飼料で4週飼育後、CE-2 固型飼料で56週飼育群)および第3群(l-try. 添加 CE-2 固型飼料で60週飼育群)は共に対照群である第4群(CE-2 固型飼料飼育群)に対して、膀胱粘膜の labeling index

計算結果から t 検定で有意差を示した。

2) 第1群と第2群の実験結果を比較すると、第1群では明らかに2例の膀胱腫瘍の発生を認め、labeling index および hyperplastic index においても、第1群は第2群に対して有意差を示した。以上の事実は l-try がマウス膀胱発癌になんらかの促進因子の役割を果しているものと考えられる。

本論文の要旨は、第63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、ご校閲を賜つた恩師安藤弘教授に深甚な謝意を表します。さらに FANFT を提供して下さいました京都大学吉田修教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Rehn, L.: Arch. Klin. Chir., **50**, 588, 1895.
- 2) Oppenheimer, R.: Z. Urol. Chir., **21**, 336, 1927.
- 3) Müller, A.: Schweiz. Med. Wchnschr., **66**, 1031, 1936.
- 4) Goldblatt, M.W.: Brit. Med. Bull., **4**, 405, 1947.
- 5) Scott, T.S.: Brit. J. Indust. Med., **9**, 127, 1952.
- 6) Case, R.A.M. and Hosker, M.E.: Brit. J. Prev. Soc. Med., **8**, 39, 1954.
- 7) Scott, T.S.: Trans. Ass. Indust. Med. off., **9**, 57, 1959.
- 8) Tsuji, I.: Acta Unio, **18**, 662, 1962.
- 9) 志岐太一郎: 久留米医学雑誌, **33**, 363, 1970.
- 10) 石津澄子: 東女医大誌, **43**, 339, 1973.
- 11) Ertürk, E., Price, J.M., Morris, J.E., Cohen, S., Leith, R.S., Von Esch, A.M. and Crovetti, A.J.: Cancer Res., **27**, 1998, 1967.
- 12) 宮川美栄子: 泌尿紀要, **16**, 653, 1970.
- 13) Rauschenbach, M.O., Jarova, E.I. and Protosova, T.G.: Acta Unio. Intern Contra Cancrum, **19**, 660, 1963.
- 14) Bryan, G.T.: Cancer Res., **28**, 183, 1968.
- 15) Bryan, G.T. and Springberg, P.D.: Cancer Res., **26**, 105, 1966.
- 16) Jull, J.W.: Brit. J. Cancer, **5**, 388, 1951.
- 17) Allen, M.J., Boyland, E., Dukes, C.E., Horning, E.S. and Watson, J.G.: Brit. J. Cancer, **11**, 212, 1957.
- 18) Bryan, G.T., Brown, R.R. and Price, J. M.: Cancer Res., **24**, 596, 1964.
- 19) Bryan, G.T., Brown, R.R., Morris, C.R. and Price, J.M.: Cancer Res., **24**, 586, 1964.
- 20) Bryan, G.T. and Morris, P.D.: Cancer Res., **28**, 186, 1968.
- 21) Bryan, G.T.: Am. Indust. Hyg. Ass. J., **30**, 27, 1969.
- 22) Rodamski, J.L., Glass, E.M. and Deichmann, W.B.: Cancer Res., **31**, 1690, 1971.

(1977年4月1日受付、特別掲載)