還元型グルタチオンの *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine によるラット膀胱癌に対する効果

三楽病院泌尿器科	小	松	秀	樹
国立がんセンター病院泌尿器科	垣	添	忠	生
	西	尾	恭	規
三井記念病院泌尿器科	本	間	之	夫
東京大学医学部泌尿器科学教室	新	島	端	夫

EFFECT OF REDUCED GLUTATHIONE ON *N*-BUTYL-*N*-(4-HYDROXYBUTYL)-NITROSAMINE-INDUCED URINARY BLADDER CANCER IN RATS

Hideki Komatsu

Urology Division, Sanraku Hospital

Tadao Kakizoe and Yasunori Nishio

Urology Division, National Cancer Center Hospital

Yukio Honma

Urology Division, Mitsui Memorial Hospital

Tadao Nijima

Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

Effect of reduced glutathione (GSH) on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BHBN)-induced urinary bladder cancer in rats was studied. F344 male rats at the age of 6 weeks old were used. BHBN was dissolved in the drinking water at a concentration of 0.05%. GSH was mixed with powdered diet at a concentration of 0.5%. Rats were treated with or without BHBN for 6 weeks from the 4th experimental day, and were also treated with or without GSH from the start of experiments to the 3d day after the end of BHBN treatment. All the animals were killed 40 weeks after the start of BHBN treatment.

The incidences of papilloma and carcinoma were 60% (6/10) and 20% (2/10) respectively in the group treated with BHBN and GSH, and 47% (7/15) and 7% (1/15) in the group treated with BHBN alone. There was no statistically significant difference between these two groups.

In this experiment, GSH failed to inhibit BHBN-induced bladder carcinogenesis in rats. Application of GSH at higher doses or during promotion step of BHBN-carcinogenesis appears important.

要旨:還元型グルタチオン (GSH) の *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BHBN) 誘発ラット膀胱癌に対する効果を検討した。6週齢の F344雄性ラットに0.05%BHBNを飲料水として6週間投与した。GSHは0.5%の濃度で粉末飼料に混入し、BHBN投与開始3日前から、BHBN投与終了後3日目まで与えた。BHBN投与開始後40週で全動物を屠殺、剖検し、膀胱を組織学的に検索した。BHBNとGSHを投与した群のpapillomaとcarcinomaの発生頻度は、それぞれ60% (6/10)、20% (2/10)であり、BHBNのみを投与した群では47% (7/15)、7% (1/15)であった。両群間に統計学的有意差はなく、GSHによる膀胱発癌抑制効果は認められなかった。GSHをさらに増量する実験、あるいは、BHBN膀胱発癌のpromotion期にGSHを投与する実験が、今後必要であろう。

結 言

ヒトの表在性膀胱癌はTUR後数年間のうちに、

70~80%に再発をみる¹⁾²⁾。再発部位は、TUR時正常と思われた粘膜に異所性に起ることが多い。ヒトの膀胱

癌は多中心性に発生するとする議論も多く³⁾, この異所性に再発する膀胱癌は内視鏡的に認識しえない病変が, TUR 後一定期間たつて腫瘍性に増殖するためと考えられている。ただ, 癌細胞の implantation の可能性が完全に否定された訳ではない。この TUR 後の高率の再発は膀胱癌治療上の最大の問題の 1 つである。再発防止の試みとして現在頻用されているのは, 抗癌剤の膀胱内注入療法である。しかし, TUR 後短期の再発率を減少させることはできるが, 長期的な再発予防には成功していない⁴⁾。確実な再発防止手段の開発は, 泌尿器科医にとって切望するところであり, 重要な課題である。

N-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BHBN) は選択的膀胱発癌物質で, 経口投与により, ラットにヒトの表在性膀胱癌に類似した癌を発生させることができる⁵⁾。この化学発癌過程を抑制する物質は, ヒト膀胱癌の再発予防に利用できる可能性がある。

Irving 等は antioxidant である disulfiram を用い, BHBN による膀胱発癌を抑制した⁶⁾。他の種々の antioxidant にも化学発癌の抑制効果が報告されている⁷⁾。しかし, disulfiram は毒性が強くヒトには用いられない。

還元型グルタチオン (GSH) は生体に自然に存在する antioxidant である。最近, GSH が aflatoxin B₁ により発生したラットの肝細胞癌を褪縮させることが報告された⁸⁾。また, GSH はすでに肝庇護剤として広く用いられており, その安全性は十分に確認されている。そこで, GSH の BHBN によるラット膀胱発癌に対する効果を検討した。

材料と方法

日本チャールズ・リバー社より 5 週齢の F344 雄性ラットを購入し, 6 週齢より実験を開始した。12 時間毎の明暗周期を与え, 温度調節下に, 1 ケージに 4 頭ずつ動物を飼育した。飲料水, 飼料は自由に与えた。BHBN は東京化成工業製のものを使用した。あらかじめ, 1% の水溶液を作製し, これを 4℃ 暗所に保存しておき, 随時脱イオン水で 0.05% に希釈し, 飲料水として遮光ビンより投与した。GSH は山之内製薬より提供された原末を粉末飼料に 0.5% の濃度で混入して投与した。飼料は日本クレア社の CE-2 を使用した。GSH 投与時のみ CE-2 粉末飼料を使用し, その他のときは CE-2 固型飼料を使用した。BHBN 投与中の飲水量, GSH 投与中の摂餌量を測定した。

実験計画を Fig. 1 に示した。動物を 4 群に分け, A

群には BHBN と GSH, B 群には BHBN のみ, C 群には GSH のみを投与し, D 群は無処置対照群とした。BHBN は実験開始後 4 日目より, 飲料水に混じて 6 週間投与した。GSH は実験開始時より飼料に混じて投与しはじめ, BHBN 投与終了後もさらに 3 日間投与した。BHBN 投与開始後 40 週で全動物を屠殺し, 剖検した。膀胱は 10% 緩衝ホルマリンを 0.5ml 注入し, ふくらませた状態で膀胱頸部を結紮して摘出した。固定後, 縦に切半して肉眼所見をとり, パラフィンに包埋した。薄切後 H.E. 染色を施し, 組織学的に検討した。実験途中で死亡した動物はその都度剖検し, 最初に膀胱腫瘍が観察された時点以後の動物を有効動物数とした。膀胱の病変は Ito 等に従い, simple hyperplasia, papillary or nodular hyperplasia, papilloma, transitional cell carcinoma⁹⁾¹⁰⁾ に分類した。

Fig. 1 Experimental protocol for evaluation of the effect of GSH on BHBN-induced bladder cancer.

結果と考察

BHBN 投与量は, A 群では 10.9mg/day/rat, B 群では 11.4mg/day/rat であった。GSH 投与量は, A 群では 70.7mg/day/rat, C 群では 70.3mg/day/rat であった。Fig. 2 に体重曲線を示した。BHBN あるいは GSH 投与による体重の減少は観察されなかつた。

Table 1 に実験結果を示した。papilloma, carcinoma は, A 群ではそれぞれ, 6 例 (60%), 2 例 (20%) に見られ, B 群ではそれぞれ, 7 例 (47%), 1 例 (7%) に見られた。A 群では B 群に比べ, papilloma, carcinoma 共に発生頻度が少し高かつたが有意差はなかつた。膀胱の前癌病変とされる papillary or

Table 1 Histological findings of the urinary bladder in rats.

Group	BHBN	GSH	Effective No. of rats	Simple hyperplasia No. (%)	P. N.* hyperplasia No. (%)	Papilloma No. (%)	Carcinoma No. (%)
A	+	+	10	8(80)	7(70)	6(60)	2(20)
B	+	—	15	14(93)	11(73)	7(47)	1(7)
C	—	+	20	0	0	0	0
D	—	—	12	0	0	0	0

*papillary or nodular hyperplasia.

Fig. 2 Change of body weight of rats.

nodular hyperplasia¹⁰⁾は、A 群 7 例(70%), B 群 11 例(73%)で差はなかつた。C, D 群では共に膀胱の病変は全く認められなかつた。

今回の実験では GSH を BHBN と同時投与したが、BHBN-膀胱発癌の抑制効果はまったく見られなかつた。Novi は約 300g のラットに 1 日 100mg の GSH を投与し (0.33mg/gB.W/day), aflatoxin B₁ 誘発肝細胞癌の縮小をみたと報告している⁸⁾。我々はこの実験に依拠して GSH の投与量を決めたが、1 日、単位体重あたりの投与量は 0.40mg/gB.W/day と我々の方がむしろ多い。この量は 60kg のヒトに単純に換算すると 1 日あたり 24g もの量となる。しかし、GSH 投与群のラットに体重の減少は見られていないので、増量することは可能であり、さらに検討する必要がある。

Novi の実験では腫瘍ができた段階から GSH の投与を開始している。我々は GSH の量と可能な実験規模に制限があるため、今回は同時投与の実験にとどめた。ヒト膀胱癌再発抑制のモデルとしては、発癌物質投与後の promotion 期に被験物質を投与し、その抑制効果をみる方が有用と思われる。この時期の GSH 投与実験も今後行なう必要がある。

現在までに膀胱化学発癌の抑制物質として、disulfiram⁶⁾, aspirin¹¹⁾, retinoic acid とその関連物質^{12)~14)}, 選択的肝毒性物質である 4, 4'-diaminodiphenylmethane¹⁵⁾, 免疫賦活剤である maleic anhydride-divinyl ether copolymer¹⁶⁾等が知られている。しかし、いずれもヒトの膀胱癌再発予防法として実用化されるに至っていない。この実験は negative に終わったが、この方向の努力は今後とも執念深く続ける必要があると思われる。

結 語

1) GSH の BHBN によるラット膀胱発癌に対する効果をみるため、同時投与実験を行なった。0.05% BHBN を飲料水として 6 週間投与した。GSH は粉末飼料に 0.5% 濃度で混じ、BHBN と同時投与した。

2) 上記条件下では、GSH は BHBN によるラット膀胱発癌を抑制することはできなかった。

本研究の一部は、厚生省がん研究助成金 (56—32) と文部省癌特別研究費によつた。

文 献

- Greene, L.F., Hanash, K.A. and Farrow, G.M.: Benign papilloma or papillary carcinoma of the bladder? J. Urol., 110, 205—207, 1973.
- Althausen, A.F., Prout, G.R. Jr. and Daly, J.J.: Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ. J. Urol., 116, 575—580, 1976.
- 垣添 指生, 新島 端夫: 膀胱発癌。代謝, 19, 959—966, 1982.
- 齊藤 清, 福島 修司, 高橋 俊博, 高井 修造: 膀胱腫瘍の保存的治療の再発について。第 2 報 再発防止に対する腔内注入療法について。日泌尿会誌, 71, 449—457, 1980.
- Ito, N., Arai, M., Sugihara, S., Nirao, K., Makiura, S., Matayoshi, K. and Denda, A.: Experimental urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. Gann Monogr., 17, 367—381, 1975.
- Irving, C.C., Tice, A.J. and Murphy, W.M.:

- Inhibition of N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancer in rats by administration of disulfiram in the diet. *Cancer Res.*, **39**, 3040—3043, 1979.
- 7) Wattenberg L.W.: Inhibitors of chemical carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.*, **26**, 197—226, 1978.
  - 8) Novi, A.M.: Regression of aflatoxin B₁-induced hepatocellular carcinomas by reduced glutathione. *Science*, **212**, 541—542, 1981.
  - 9) Ito, N., Hiasa, Y., Tamai, A., Okajima, E. and Kitamura, H.: Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats. *Gann*, **60**, 401—410, 1969.
  - 10) Fukushima, S., Murasaki, G., Hirose, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R. and Ito, N.: Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Acta Pathol. Jpn.*, **32**, 243—250, 1982.
  - 11) Cohen, S.M., Zenser, T.V., Murasaki, G., Fukushima, S., Mattammal, M.B., Rapp, N.S. and Davis, B.B.: Aspirin inhibition of N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-formamide-induced lesions of the urinary bladder correlated with inhibition of metabolism by bladder prostaglandin endoperoxide synthetase. *Cancer Res.*, **41**, 3355—3359, 1981.
  - 12) Sporn, M.B., Squire, R.A., Brown, C.C., Smith, J.M., Wenk, M.L. and Springer, S.: 13-cis-Retinoic acid: Inhibition of bladder carcinogenesis in the rat. *Science*, **195**, 487—489, 1977.
  - 13) Murasaki, G., Miyata, Y., Babaya, K., Arai, M., Fukushima, S. and Ito, N.: Inhibitory effect of an aromatic retinoic acid analog on urinary bladder carcinogenesis in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *GANN*, **71**, 333—340, 1980.
  - 14) Moon, R.C., McCormick, D.L., Bocci, P.J., Shealy, Y.F., Frickel, F., Paust, J. and Sporn, M. B.: Influence of 15 retinoic acid amides on urinary bladder carcinogenesis in the mouse. *Carcinogenesis*, **3**, 1469—1472, 1982.
  - 15) Fukushima, S., Hirose, M., Hagiwara, A., Hasegawa, R. and Ito, N.: Inhibitory effect of 4,4'-diaminodiphenylmethane on liver, kidney and bladder carcinogenesis in rats ingesting N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine or N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Carcinogenesis*, **2**, 1033—1037, 1981.
  - 16) McCormick, D.L., Becci, P.J. and Moon, R.C.: Inhibition of mammary and urinary bladder carcinogenesis by a retinoid and a maleic anhydride-divinyl ether copolymer (MVE-2). *Carcinogenesis*, **3**, 1473—1477, 1982.

(1983年3月29日受付)