

ラットの生体内で生成された  
N-nitrosobis(2-hydroxypropyl) amine の  
発癌性に関する研究

奈良県立医科大学口腔外科学教室

山 本 一 彦

ENDOGENOUSLY SYNTHESIZED  
N-NITROSOBIS(2-HYDROXYPROPYL)AMINE  
AND  
ITS CARCINOGENIC POTENTIAL IN RATS

KAZUHIKO YAMAMOTO

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Nara Medical University*

Received March 26, 1991

*Summary* : Carcinogenic activity of endogenously synthesized N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine (BHP) from bis (2-hydroxypropyl) amine (BHPA) and tris (2-hydroxypropyl) amine (THPA) in the presence of sodium nitrite (SN) was investigated in male Wistar rats.

The following results were obtained.

- 1) The synthesis of BHP from BHPA and THPA in the presence of SN was demonstrated in vitro and in vivo in the preliminary experiment and also confirmed by the urinary excretion of BHP in rats treated with 1% BHPA and 2% THPA in diet together with 0.3% SN in drinking water.
- 2) Tumors in nasal cavity and lung were induced in rats treated with 1% BHPA in diet together with 0.3% SN in drinking water for 94 weeks, the incidences of which reached 74% and 58%, respectively. However, no tumors were found in the target organs of BHP in rats treated with 2% THPA in diet and 0.3% SN in drinking water for 102 weeks.
- 3) The initiation activity for liver by endogenously synthesized BHP was observed in rats treated with 1% BHPA in diet together with 0.15% and 0.3% SN in drinking water by the quantitative analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive foci but was not observed in rats treated with 2% THPA in diet together with 0.15% and 0.3% SN in drinking water.

These results indicate that endogenously synthesized BHP has a carcinogenic activity similar to that of exogenously administered BHP, and that BHPA is more important as the precursor for endogenous BHP synthesis.

Since the precursors of nitrosamines are widely distributed in the environment, endogenously synthesized nitrosamines may play an important role in the development of

human cancer.

## Index Terms

N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine, bis (2-hydroxypropyl) amine, sodium nitrite, endogenous nitrosation

## I. 緒 言

癌による死亡者数は年々増加し、本邦では全死亡者数の約4分の1を占め、死亡原因の1位となっている<sup>1,2)</sup>。ヒト癌の原因としては主に環境中に存在する化学発癌物質が指摘されている<sup>3,4)</sup>。なかでもニトロソ化合物は重要な位置を占め<sup>5-8)</sup>、1956年にdimethylnitrosamineの発癌性が証明されて以来<sup>9)</sup>、200種類以上のニトロソ化合物について40種余の動物を用いた発癌実験でその発癌性が証明されている<sup>9)</sup>。さらにヒトの生体内にニトロソ化合物のDNA付加体の存在が示され<sup>10)</sup>、ヒトにおいても癌発生の重要な要因であることが強く疑われるようになった。それゆえ、環境中に存在するニトロソ化合物のヒトへの曝露を避けるため、多くの努力がはらわれてきた。しかしながら、近年、環境中に存在するニトロソ化合物の前駆物質とsodium nitrite (SN)とが酸性条件下において反応し、発癌性を有するニトロソ化合物が生成され得ることが明らかとなった<sup>11,12)</sup>。現在までいくつかの前駆物質についてSNとの同時投与により、ラット、ハムスターおよびマウスなどを用いた実験において腫瘍の発生が報告されているが<sup>13-23)</sup>、未だ十分な情報は得られていない。

N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine (BHP) は、1974年にKrüger et al.<sup>24)</sup>によって合成されたニトロソ化合物であり、そのラットにおける発癌性は、Konishi et al.<sup>25,26)</sup>Mohr et al.<sup>27)</sup>やPour et al.<sup>28)</sup>によって証明されており、鼻腔、肺、食道、肝臓、甲状腺、膀胱や腎臓と広い発癌スペクトルを有することが知られている。BHPの前駆物質である bis (2-hydroxypropyl) amine (BHPA) および tris (2-hydroxypropyl) amine (THPA) は、ゴム、写真乳剤、洗剤、化粧品、防腐剤、織物などの製造過程で広く使用されており<sup>29-31)</sup>、これらへの曝露によりBHPAおよびTHPAがヒト生体内でSNと反応しBHPが生成され、発癌剤としてヒトに作用する可能性がある。本研究はこれらの知見を重要視し、予備実験をおこない、in vitro および in vivo における前駆物質からのBHPの生成を証明した上で、ラットにBHPAおよびTHPAをSNと同時に投与することにより生体内でBHPを生成せしめ、その発癌性について

検索することを目的としておこなった。

## II. 材料と方法

1. 予備実験 (in vitro および in vivo における BHP の生成)

(1) 胃液の採取および in vitro における反応

動物は静岡県実験動物農業協同組合 (静岡) より購入した体重180~240gのWistar系雄性ラットを用いた。ラットは48時間絶食せしめ、エーテル麻酔下にて胃幽門部の結紮手術をおこなった。ラットは術後6時間で屠殺し、胃内容物より胃液を採取した。ヒト胃液は4人の患者より採取した。患者は75才、32才および34才の男性と66才の女性でそれぞれ大腸癌、イレウス、胆石および直腸癌の患者であった。ラットおよび胃液は1500gで10分間遠心して使用した。また、対照としてformate buffer (pH 2~4)を用いた。このようにして得られた胃液0.5mlに蒸留水中に溶解したBHPAまたはTHPA (10 $\mu$ mol/0.25ml) (東京化成株式会社, 東京) とSN (40 $\mu$ mol/0.125ml) (和光純薬株式会社, 大阪)を加え最終容量を1.0mlに調整した。また、ascorbic acid (和光純薬株式会社) およびthiocyanate (和光純薬株式会社) による効果を調べるためにascorbic acid (80 $\mu$ mol/0.125ml) およびthiocyanate (20 $\mu$ mol/0.125ml)を加え最終容量を1.0mlとした群も作製した。これらの反応液は37°Cで4時間インキュベートした後、2Mのsulfamic acid (0.25ml)を加えて反応を停止し、その後2Nの水酸化カリウム溶液を加えてpHを7.0に調整した。1.0mlのformate buffer (100mM)を胃液のかわりに用いた時にはすべて2倍容量で同様に処理した。

(2) In vivo における反応

ラットは18時間の絶食後実験に供した。BHPAおよびTHPAそれぞれ100 $\mu$ molとSN400 $\mu$ molを1mlの蒸留水中に溶解し、胃ゾンデを用いラット胃内に強制投与した。また、同時に800 $\mu$ molのascorbic acidを投与した群も作製した。これらを30分間胃内で反応させた後ascorbic acid (0.25g) および $\alpha$ -tocopherol (0.25g)を含む1.15%塩化カリウム溶液20mlにて胃内容物を採取した。

(3) BHPの定量

In vitro および in vivo の反応混液は2倍量の酢酸エチルにて抽出を10回おこなった。この際澄明な抽出液を得るためにそれぞれ1500gで10分間遠心した。抽出液は無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で濃縮後40℃以下でエバポレートした。残渣は酢酸エチルに溶解し、Silica Gel 60 F<sub>254</sub>プレート(E. Merk, Darmstadt, Germany)にスポットした。本プレートを酢酸エチルで展開後、標品BHPと一致するバンド(Rf=0.22)をかき取りアセトンで溶出した。この溶出液を40℃以下でN<sub>2</sub>気流中で濃縮し、その残渣をアセトニトリルに溶解し、最終容量を1.0mlとし、40μmのメンブランフィルター(type TM-2P, 東洋濾紙株式会社, 東京)で処理後、高速液体クロマトグラフ(HPLC)の試料とした。HPLC装置はJasco TRIPOTOR II(日本分光工業株式会社, 東京)でJusco Finepak PILC<sub>18</sub>(4.6mm×25cm)カラムを使用した。BHPは239nm(0.16AUFS)でモニターした。アセトニトリル試料は1~2μlをHPLCに注入し、流速1ml/minのアセトニトリルで溶出した。各条件におけるBHPの添加回収率はほぼ一致し、95.1±3.7%(mean±SE)であった。

2. 発癌実験

(1) 動物および飼育条件

動物は静岡県実験動物農業協同組合(静岡)より購入した5週齢Wistar系雄性ラット274匹を用いた。動物は室温24℃, 湿度60%前後に空調された飼育室にて5~6匹ずつwire cageに入れて飼育し、1週間この条件に慣らした後に実験に供した。

(2) 化学物質と投与方法

BHPAとTHPAは東京化成株式会社(東京)より、SNは和光純薬株式会社(大阪)より購入したものをを用いた。BHPAとTHPAは、それぞれ1%および2%の濃度で市販の粉末飼料オリエンタルM(オリエンタル酵母株式会社, 東京)に混じて動物に投与した。BHPAおよびTHPA含有食は、2~3週に一度の割合で調整し、室温にて保存したものを2~5日毎に新しいものと取りかえた。SNは、0.15%および0.3%の濃度で蒸留水中に混じて動物に投与した。SN含有飲料水は2日に1度調整し、4℃の冷暗所に保存したものを連日(週末は2日に1度)ガラス製の給水管のついた遮光ボトルに新しいものを入れて投与した。

(3) 発癌実験デザイン

実験はBHPAを前駆体とする1と、THPAを前駆体とする2の2種類を行った。実験1には動物135匹を用い、Fig. 1に示すごとく次の6群を作製した。第1群は基礎食と蒸留水を投与した無処置群、第2および第3群は基礎食とともにそれぞれ0.15%および0.3% SN含

有飲料水を投与した群、第4群は1% BHPA含有食と蒸留水を投与した群、第5および第6群は1% BHPA含有食とともにそれぞれ0.15%および0.3% SN含有飲料水を投与した群とした。実験2には動物139匹を用い、Fig. 2に示すごとく実験1と同様に6群を作製し、1% BHPA含有食のかわりに2% THPA含有食を投与した。食餌および飲料水は実験終了まで動物に自由に摂取せしめた。実験期間中は連日動物の状態について観察をおこない、体重、摂餌量および摂水量を実験開始より12週までは毎週、それ以降は2週に1度の割合で測定した。実験期間は実験1が94週、実験2が102週とした。動物は

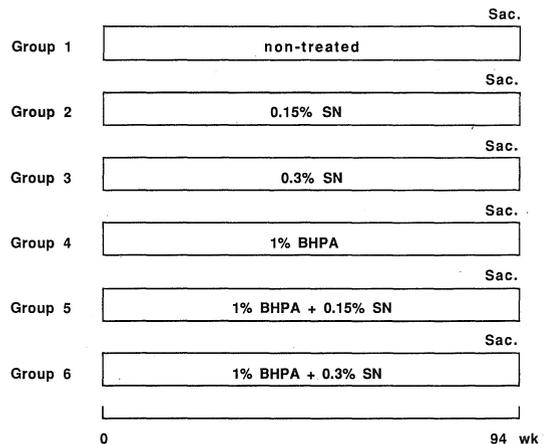


Fig. 1. Experimental design of experiment 1. SN: Sodium nitrite, BHPA: Bis(2-hydroxypropyl) amine

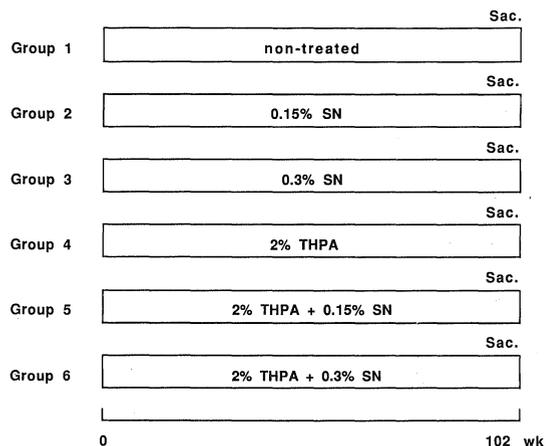


Fig. 2. Experimental design of experiment 2. SN: Sodium nitrite, THPA: Tris(2-hydroxypropyl) amine

エーテル麻酔下に腹部大動脈より脱血することにより屠殺し、注意深く完全解剖をおこなった。実験期間中に死亡した動物や瀕死状態のために途中屠殺した動物も同様に完全解剖をおこなった。

(4) 尿中 BHP およびその代謝関連物質の同定

実験期間中尿中に排泄された BHP およびその代謝関連物質の量を測定することによってラット体内での BHP 生成の確認をおこなった。測定は実験 1 および 2 の第 1, 3, 4 および 6 群の動物各 3~5 匹を用い、実験開始後 24~25 週にておこなった。実験 1 の第 6 群については 34 および 80 週にて同様の測定をおこなった。動物は 1 匹ずつ代謝ケージに入れ、各群と同様の食餌および飲料水を自由に摂取せしめ、その間の 24 時間尿を採取した。採尿ボトル中には尿中でのニトロ化を防ぐため、0.125% の濃度で ascorbic acid を含有する蒸留水約 100 ml を入れ、採尿後 200 ml に調製した。これらは ADVANTEC メンブランフィルター (0.45 $\mu$ m, cellulose type, アドバンテック株式会社, 東京) で濾過後、蒸留水を加えて 200 ml とし、酢酸エチル (200 ml) で 3 回抽出した。抽出液は予備実験と同様の処理をおこない HPLC により BHP およびその代謝関連物質の定量をおこなった。標品 BHP を未処置ラットの尿に添加して求めた回収率は 68.0 $\pm$ 2.4% (mean $\pm$ SE) であり、したがって得られた結果はこの回収率で補正した。

(5) 病理組織学的検索

解剖後全臓器について注意深く肉眼的観察をおこない、主要臓器の重量を測定した。肝臓は各葉より一切片ずつ切り出し、1% 酢酸含有 95% エタノールにて 4 $^{\circ}$ C で 2 時間固定後、通法に従い軟パラフィンブロックを作製し、5 $\mu$ m の連続薄切標本を作製した。hematoxylin-eosin 染色にて病理組織学的観察をおこなうとともに、その連続標本を後に述べる免疫組織化学的検索に供した。肺、気管、心臓、胸腺、甲状腺、唾液腺、食道、胃、肝臓、十二指腸、空腸、回腸、結腸、直腸、膀胱、脾臓、腎臓、副腎、大脳、小脳、下垂体、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、皮膚、乳腺、鼻腔および脊椎については 10% ホルマリンにて固定をおこなった。鼻腔および脊椎は固定後 Plank u Rychlo<sup>32)</sup> の方法に準じ急速脱灰をおこない、鼻腔はその後、Popp et al.<sup>33)</sup> の方法に従い前頭断にて 4 つの異なる部分を切り出した。これらの臓器は通法に従いパラフィンブロックを作製し、5 $\mu$ m の薄切標本とし、hematoxylin-eosin 染色をおこない、光学顕微鏡にて病理組織学的観察をおこなった。腫瘍発生頻度については  $\chi^2$  検定を用いて有意差検定をおこなった。

(6) 肝臓の酵素偏異巢の定量的分析

肝臓の酵素偏異巢の定量的分析には、指標酵素として glutathione S-transferase placental form (GST-P) を用いた。GST-P 免疫組織化学染色は一次抗体として弘前大学第 2 生化学教室の佐藤清美教授より提供されたウサギ抗ラット GST-P 抗体を用い<sup>34,35)</sup> Vectastain ABC Kit (Vector Labs., Burlingame, USA) にて ABC 法<sup>36,37)</sup> によりおこなった。単位面積あたりの GST-P 陽性巢の数、平均面積および肝臓標本面積に占める GST-P 陽性巢の割合は Desktop Computer System 45 (Hewlett-Packard Co., USA) に接続した Image analyzer HTB-C995 (浜松テレビ株式会社, 静岡) を用いて分析した。また、単位体積あたりの GST-P 陽性巢の数は Campbell et al.<sup>38)</sup> の方法により計算した。各群間の GST-P 陽性巢の統計学的有意差検定には Student's *t* test を用いた。

### III. 結 果

1. 予備実験における BHP の生成

(1) In vitro における BHP の生成

Formate buffer, ラットおよびヒト胃液中における BHPA および THPA と SN との反応による BHP の生成結果を Fig. 3 に示した。Formate buffer 中では pH 2~4 の範囲内で BHPA と SN より BHP の生成がみられた。BHP の生成率は pH 3 で最も高く BHPA の約 55% がニトロ化され BHP が生成された。また、pH 2 及び 4 においても 10%~25% の BHP の生成がみられた。ラット胃液中では pH は 2~4.5 の間であった。BHPA からの BHP 生成は pH 2.4~3.2 の間でみられ、最高が約 20% であった。4 人の患者から得られたヒト胃液中の pH は 1.6~1.8 であった。得られたすべての胃液中で約 35~40% の BHPA がニトロ化され BHP の生成がみられた。一方 THPA と SN からの BHP の生成は formate buffer 内で約 0.5%, ラット胃液中では、0.1% 以下でヒト胃液中でも最高 0.5% と BHPA からの生成に比して著しく低かった。

Table 1 は BHP 生成における ascorbic acid と thiocyanate の効果を示したものである。Formate buffer, ラットおよびヒト胃液中のいずれにおいても BHPA からの BHP の生成は 80mM ascorbic acid によって formate buffer 中では 54.4% が 2.9% へ、ラット胃液中では 13.3% が 0.6% へ、そしてヒト胃液中では 39.2% が 5.0% へと著しく抑制された。一方 20mM の thiocyanate の存在下ではそれぞれ 68.8%, 20.8%, 65.4% と促進された。THPA からの BHP の生成は BHPA からのものに比して著しく低かったが、ascorbic

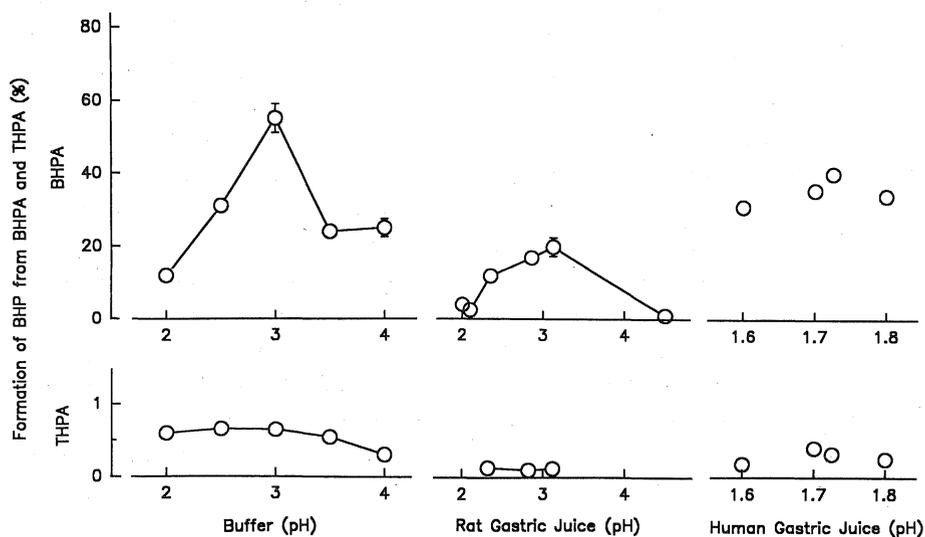


Fig. 3. Formation of BHP in buffer and in the gastric juice of rat and human. BHPA (10mM) and THPA (10mM) were incubated in the presence of SN (40mM) at 37°C for 4 hours. BHP was extracted with ethylacetate and determined by HPLC.

Table 1. Effect of ascorbic acid and thiocyanate on formation of BHP from BHPA and THPA with SN in buffer and gastric juice

Addition	Percentages of BHP synthesized	
	BHPA	THPA
Buffer (pH 3.0)		
Control	54.4(100)	0.58(100)
+80mM Ascorbic acid	2.9(5)	0.04(7)
+20mM Thiocyanate	68.8(125)	0.90(155)
Rat gastric juice (pH 2.3)		
Control	13.3(100)	0.12(100)
+80mM Ascorbic acid	0.6(5)	<0.01
+20mM Thiocyanate	20.8(156)	0.29(242)
Human gastric juice		
Control	39.2(100)	0.31(100)
+80mM Ascorbic acid	5.0(13)	0.02(6)
+20mM Thiocyanate	65.4(167)	0.50(16)

BHPA (10mM) and THPA (10mM) together with SN (40mM) were incubated at 37°C for 4 hours. BHP was extracted with ethyl acetate and determined by HPLC. Values in parentheses show the percentages of the control.

acidおよびthiocyanateによって同様の抑制および促進効果がみられた。

## (2) In vivoにおけるBHPの生成

ラットの胃内に投与したBHPAおよびTHPAとSNとの反応により生成されたBHPの量およびascor-

bic acidによる影響についてTable 2に示した。BHPA 100 $\mu$ molの単独投与ではBHPの生成はほとんど認められなかったが、400 $\mu$ molのSNと同時に投与すると4.02%のBHPAがニトロソ化されBHPが生成された。また、800 $\mu$ molのascorbic acidを同時に投与すると

BHPの生成は0.51%と抑制された。一方100 $\mu$ molのTHPAでは400 $\mu$ molのSNと同時に投与によっても0.0115%のTHPAしかニトロ化されずBHPの生成は非常に低かった。また、ascorbic acidの存在下ではさらに低くわずか0.0011%であった。

2. 発癌実験

(1) 体重変化, 摂餌量および摂水量

実験1および2における動物の体重, 摂餌量および摂水量をTable3および4に示した。実験1および2において実験期間中の体重増加は0.3% SNを投与した第3および第6群において抑制され, 最終体重では実験1の第3および第6群で他群と比して有意な低下が, また, 実験2においては第6群で第1, 2群と比して有意な低下が認められた。一方, BHPAおよびTHPAのみを投与した実験1および2の第4群では, 体重増加抑制傾向

は認められなかったが, 実験2の第4群では最終体重がやや低下していた。摂餌量および摂水量は実験1および2とも実験期間中を通じてほぼ一定であった。摂餌量では実験1の第6群で第1群に比して有意な低下を示しているものの, その他の群間では差は認められず, また, 実験2においても各群間には差は認められなかった。一方摂水量では, SN濃度に依存して低下する傾向が見られ, 実験1および2とも0.3% SNを投与した第3群および第6群において他群と比して有意な低下を, また, 実験2の第2群で第1および第4群に比して有意な低下を示していた。BHPA, THPAおよびSNの摂取量に換算すると, 実験1ではBHPAが第4~6群でおおよそ151~158mg/rat/day, SNが第2および第5群でおおよそ29~30mg/rat/day, 第3, 第6群でおおよそ51mg/rat/dayであった。実験2ではTHPAが第4~6群で

Table 2. Formation of BHP in the stomach of rats administered BHPA and THPA together with SN

Amines	SN	Ascorbic acid	No. of rats	Formation of BHP in the stomach of rats	
				BHP( $\mu$ g)	% of amines nitrosated
BHPA	-	-	2	<3	
	+	-	3	651 $\pm$ 46	4.02 $\pm$ 0.28
	+	+	2	83 $\pm$ 6	0.51 $\pm$ 0.04
THPA	+	-	3	1.87 $\pm$ 0.20	0.0115 $\pm$ 0.0022
	+	+	2	0.18 $\pm$ 0.03	0.0011 $\pm$ 0.002

Rats were fasted overnight before treatment. Thirty minutes after intragastric administration of 100 $\mu$ mol of amines plus 400 $\mu$ mol of SN with or without 800 $\mu$ mol of ascorbic acid, stomach contents were taken out, extracted with ethyl acetate and analyzed for BHP by HPLC. Values are mean  $\pm$  SD.

Table 3. Detail of experiment 1

Groups Treatment	No. of rat		Body weight (g)		Daily intake per rat	
	Initial	Effective	Initial	Final	Diet (g) [BHPA (mg)]	Water (ml) [SN (mg)]
1 non-treated	20	19	189.5 $\pm$ 7.9	404.7 $\pm$ 65.2	16.8 $\pm$ 2.0 [0.0 $\pm$ 0.0]	20.8 $\pm$ 1.6 [0.0 $\pm$ 0.0]
2 0.15%SN	20	18	189.5 $\pm$ 7.7	401.3 $\pm$ 27.8	16.1 $\pm$ 1.7 [0.0 $\pm$ 0.0]	19.7 $\pm$ 1.4 [29.6 $\pm$ 2.3]
3 0.3%SN	20	16	185.6 $\pm$ 5.8	358.9 $\pm$ 36.8 <sup>a</sup>	15.6 $\pm$ 1.5 [0.0 $\pm$ 0.0]	17.1 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup> [51.3 $\pm$ 4.3]
4 1%BHPA	20	16	185.1 $\pm$ 6.6	398.2 $\pm$ 48.2	15.6 $\pm$ 1.4 [156 $\pm$ 14]	20.9 $\pm$ 2.1 [0.0 $\pm$ 0.0]
5 1%BHPA+ 0.15%SN	27	19	183.5 $\pm$ 6.5	387.1 $\pm$ 29.3	15.8 $\pm$ 1.3 [158 $\pm$ 13]	19.4 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup> [29.1 $\pm$ 6.2]
6 1%BHPA+ 0.3%SN	28	19	185.7 $\pm$ 8.6	337.1 $\pm$ 35.5 <sup>b</sup>	15.1 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup> [151 $\pm$ 12]	17.0 $\pm$ 1.8 <sup>d</sup> [51.0 $\pm$ 5.3]

a : Significantly different from groups 1, 4 and 5 (p<0.05) and group 2 (p<0.01)  
 b : Significantly different from group 1 (p<0.05), group 4 (p<0.02), group 5 (p<0.01) and group 2(p<0.001)  
 c : Significantly different from group 1 (p<0.02)  
 d : Significantly different from groups 1, 2, 4 and 5 (p<0.001)  
 e : Significantly different from groups 1 and 4 (p<0.05)

よそ 324~332mg/rat/day, SN が第 2 および第 5 群  
 でおよそ 30~31mg/rat/day, 第 3 および第 6 群で  
 およそ 54mg/rat/day であった.

(2) 生体内での BHP の生成量

尿中に排泄された BHP およびその代謝関連物質の量  
 を Table 5 および 6 に示す. 実験 1, 2 とも BHPA また  
 は THPA と 0.3% SN を投与した第 6 群とそれらの対  
 照群にあたる第 1, 3 および 4 群の動物 3~5 匹を用い  
 て分析した. 実験 1, 2 とも無処置群である第 1 群, 0.3%  
 SN を投与した第 3 群, 1% BHPA または 2% THPA を

投与した第 4 群では尿中に排泄された BHP およびその  
 代謝関連物質の量は検出限界以下であった. 一方, 実験  
 1 の第 6 群では実験開始後 24, 34 および 80 週の各時期  
 においてラット尿中に BHP が 0.69~2.20 $\mu$ mol/rat/  
 day とその代謝関連物質の 1 つである N-nitroso(2-  
 hydroxypropyl) (2-oxopropyl) amine (HPOP) が微  
 量検出され, ラット体内で BHP が生成されていること  
 が確認された. また, 実験 2 の第 6 群においても実験開  
 始後 24 週にて 0.16~0.54 $\mu$ mol/rat/day の BHP が検  
 出され実験 1 の第 6 群に比して少量ではあるが, ラット

Table 4. Detail of experiment 2

Groups	Treatment	No. of rats		Body weight (g)		Daily intake per rat	
		Initial	Effective	Initial	Final	Diet (g) [THPA (mg)]	Water (ml) [SN (mg)]
1	non-treated	21	17	182.0 $\pm$ 6.8	384.7 $\pm$ 48.9	15.7 $\pm$ 1.4 [0.0 $\pm$ 0.0]	21.0 $\pm$ 1.4 [0.0 $\pm$ 0.0]
2	0.15%SN	21	17	189.6 $\pm$ 6.0	368.9 $\pm$ 37.2	15.7 $\pm$ 1.4 [0.0 $\pm$ 0.0]	19.9 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup> [29.9 $\pm$ 1.8]
3	0.3%SN	21	17	188.2 $\pm$ 8.0	342.4 $\pm$ 52.5	16.5 $\pm$ 1.5 [0.0 $\pm$ 0.0]	18.0 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup> [54.0 $\pm$ 4.5]
4	2%THPA	21	19	184.1 $\pm$ 7.6	348.9 $\pm$ 77.2	16.2 $\pm$ 2.3 [324 $\pm$ 46]	21.5 $\pm$ 1.6 [0.0 $\pm$ 0.0]
5	2%THPA+ 0.15%SN	28	26	183.8 $\pm$ 6.3	363.6 $\pm$ 46.7	16.6 $\pm$ 1.6 [332 $\pm$ 32]	20.6 $\pm$ 1.6 [30.9 $\pm$ 4.8]
6	2%THPA+ 0.3%SN	28	26	186.6 $\pm$ 9.8	344.7 $\pm$ 23.9 <sup>a</sup>	16.4 $\pm$ 1.7 [328 $\pm$ 34]	18.0 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup> [54.0 $\pm$ 4.5]

a : Significantly different from group 1 ( $p < 0.01$ ) and group 2 ( $p < 0.05$ )

b : Significantly different from group 1 ( $p < 0.05$ ) and group 4 ( $p < 0.01$ )

c : Significantly different from groups 1, 2, 4 and 5 ( $p < 0.001$ )

Table 5. Urinary excretion of endogenously synthesized BHP in experiment 1

Groups	Treatment	No. of rats examined	Experimental weeks	Urinary excretion of BHP ( $\mu$ mol/rat/day)	
				Average	Range
1	non-treated	3	24	ND <sup>a</sup>	—
2	0.3% SN	3	24	ND	—
3	1% BHPA	3	24	ND	—
6	1% BHPA+ 0.3% SN	3	24	1.51	1.04-2.20
		3	34	0.97	0.69-1.47
		5	80	1.51	1.11-2.20

a : Not detectable

Table 6. Urinary excretion of endogenously synthesized BHP in experiment 2

Groups	Treatment	No. of rats examined	Experimental weeks	Urinary excretion of BHP ( $\mu$ mol/rat/day)	
				Average	Range
1	non-treated	3	25	ND <sup>a</sup>	—
3	0.3% SN	3	25	ND	—
4	2% THPA	3	25	ND	—
6	2%THPA+ 0.3% SN	3	25	0.32	0.16-0.54

a : Not detectable

体内での BHP 生成が示された。今回の実験においては、BHP および HPOP 以外の BHP 代謝関連物質は検出されなかった。

(3) 腫瘍発生頻度

1) 実験 1

実験 1 の BHP の標的臓器における腫瘍発生頻度を Table 7 に示す。BHPA と SN を同時に投与した群に鼻腔、肺、食道、肝臓、膀胱および甲状腺に腫瘍の発生がみられた。鼻腔腫瘍の発生率は第 6 群で 74% に達し、腫瘍発生のみられなかった第 1 ~ 5 群に比して有意な増加を示していた。これらの腫瘍は乳頭腫と癌腫に分類した。肺腫瘍の発生率は第 5 群で 16%、第 6 群で 58% であり、第 6 群では第 1 ~ 5 群に比して有意な増加を示し

ていた。これらの腫瘍は細気管支肺胞領域の腺腫、腺癌および扁平上皮癌と気管支領域の乳頭腫に分類した。食道では第 6 群に 2 例 (11%) の乳頭腫が、肝臓では第 6 群に 1 例 (5%) の肝細胞癌が、膀胱では第 5 群に 1 例 (5%) の移行上皮癌の発生がみられたが、いずれも腫瘍発生のみられなかった他群との有意差は認められなかった。甲状腺では第 5 群に 1 例 (5%) の腺腫がみられたが、対照群にも第 1、2 群に 1 例 (5 および 6%)、第 3 群に 2 例 (13%) の腫瘍発生がみられた。腎臓には、いずれの群にも腫瘍は認められなかった。その他の臓器における腫瘍発生頻度を Table 8 に示す。各群とも比較的高頻度に観察されたのは副腎の褐色細胞腫と精巢の Leydig 細胞腫であり、それぞれ 5 ~ 32%、32 ~ 63% の発

Table 7. Incidences of BHP target organ tumors in experiment 1

Groups	Treatment	Effective No. of rats	No. of tumors (%)													
			Nasal cavity				Lung				Esophagus		Liver	Urinary bladder	Thyroid	Kidney
			CA	PAP	Total	AC	A	SCC	PAP	Total	PAP	HCC	TCC	A	—	
1	non-treated	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(5)	0
2	0.15% SN	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(6)	0
3	0.3% SN	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2(13) <sup>c</sup>	0
4	1% BHPA	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	1% BHPA + 0.15% SN	19	0	0	0	0	0	0	3(16)	3(16)	0	0	1(5)	1(5)	0	0
6	1% BHPA + 0.3% SN	19	10(53)	11(58)	14(74) <sup>a</sup>	1(5)	2(11)	2(11)	10(53)	11(58) <sup>b</sup>	2(11)	1(5)	0	0	0	0

CA : Carcinoma, PAP : Papilloma, AC : Adenocarcinoma, A : Adenoma, SCC : Squamous cell carcinoma, HCC : Hepatocellular carcinoma, TCC : Transitional cell carcinoma

a : p < 0.01 compared with groups 1-5

b : p < 0.01 compared with groups 1-4, p < 0.05 compared with group 5

c : Including 1 adenocarcinoma

Table 8. Incidences of BHP non-target organ tumors in experiment 1

Groups	Treatment	Effective No. of rats	No. of tumors (%)						
			Stomach	Pancreas	Adrenal gland	Testis	Pituitary gland	Mammary gland	Others
			LMS	ICA	PCC	LCT	A	AC	—
1	non-treated	19	0	0	4(21)	9(47)	1(5)	0	0
2	0.15% SN	18	1(6)	2(11)	1(6)	10(56)	1(6)	1(6)	0
3	0.3% SN	16	0	0	5(31)	10(63)	0	0	0
4	1% BHPA	16	0	0	2(13)	6(38)	0	0	0
5	1% BHPA + 0.15% SN	19	0	3(16)	1(5)	7(37)	0	0	1(5) <sup>a</sup>
6	1% BHPA + 0.3% SN	19	0	0	6(32)	6(32)	0	0	0

LMS : Leiomyosarcoma, ICA : Islet cell adenoma, PCC : Pheochromocytoma, LCT : Leydig cell tumor,

A : Adenoma, AC : Adenocarcinoma

a : Squamous cell carcinoma of skin

生率を示していたが、各群間の有意差は認められなかった。その他臓器の島細胞腫、下垂体腺腫、胃の平滑筋肉腫、乳腺腺腫および皮膚の扁平上皮癌が観察された。

2) 実験 2

実験 2 の BHP の標的臓器における腫瘍発生頻度を Table 9 に示す。THPA と SN を同時に投与した群に腫瘍発生が認められたのは肝臓のみであった。しかし、肝臓における腫瘍も第 5 群で過形成結節が 1 例 (4%)、第 6 群で肝細胞癌が 1 例 (4%) と極めて少なく、他群との有意差は認められなかった。また、甲状腺では対照群である第 1, 2 群に 1 例 (6%)、第 3 群に 2 例 (12%)

の腺腫がみられたのみである。その他の臓器における腫瘍発生頻度を Table 10 に示す。実験 1 と同様に副腎の褐色細胞腫の発生率は 12~42% であるが、第 6 群では 11 例 (42%) と他群に比して有意に上昇していた。また、精巢の Leydig 細胞腫の発生率は 46~82% であり、第 1 群では 14 例 (82%) と第 5, 第 6 群に比して有意に上昇していた。その他実験 1 と同様、膵臓の島細胞腫および下垂体の腺腫が観察された他、前胃の乳頭腫や奇形腫、膵臓の腺房細胞腺腫、腹膜の中皮腫、皮下の神経鞘腫や線維腫、皮膚の基底細胞癌、リンパ腫、白血病、脾臓の血管内皮肉腫、右足の骨肉腫や口蓋の乳頭腫が観察

Table 9. Incidences of BHP target organ tumors in experiment 2

Groups	Treatment	Effective No. of rats	No. of tumors (%)							
			Nasal cavity	Lung	Esophagus	Liver		Urinary bladder	Thyroid	Kidney
						HN	HCC			
1	non-treated	17	0	0	0	0	0	0	1(6)	0
2	0.15% SN	17	0	0	0	0	0	0	1(6)	0
3	0.3% SN	17	0	0	0	0	0	0	2(12)	0
4	2% THPA	19	0	0	0	0	0	0	0	0
5	2% THPA + 0.15% SN	26	0	0	0	1(4)	0	0	0	0
6	2% THPA + 0.3% SN	26	0	0	0	0	1(4)	0	0	0

HN : Hyperplastic nodule, HCC : Hepatocellular carcinoma, A : Adenoma

Table 10. Incidences of BHP non-target organ tumors in experiment 2

Groups	Treatment	No. of rats	No. of tumors (%)							
			Stomach	Pancreas		Adrenal gland	Testis	Pituitary gland	Mammary gland	Others
				PAP	ACA					
1	non-treated	17	0	0	1(6)	5(29)	14(82) <sup>b</sup>	0	0	3(18) <sup>c</sup>
2	0.15% SN	17	0	0	3(18)	3(18)	12(71)	1(6)	0	3(18) <sup>d</sup>
3	0.3% SN	17	1(6)	0	1(6)	2(12)	12(71)	0	0	2(12) <sup>e</sup>
4	2% THPA	19	0	0	0	5(26)	10(53)	1(5)	0	2(11) <sup>f</sup>
5	2% THPA + 0.15% SN	26	0	0	4(15)	4(15)	12(46)	0	0	3(12) <sup>g</sup>
6	2% THPA + 0.3% SN	26	1(4)	1(4)	2(8)	11(42) <sup>a</sup>	12(46)	0	0	1(4) <sup>h</sup>

PAP : Papilloma, ACA : Acinar cell adenoma, ICA : Islet cell adenoma, PCC : Pheochromocytoma, LCT : Leydig cell tumor, A : Adenoma.

a : p < 0.01 compared with groups 1-5.

b : p < 0.05 compared with groups 5 and 6.

c : Lymphoma 1, Mesothelioma 1

d : Neurinoma of skin 2, mesothelioma 1

e : Fibroma of skin 1, Hemangioendothelial sarcoma of spleen 1

f : Leukemia 1, Osteosarcoma of right leg 1.

g : Hamaltoma of stomach 1, Basal cell carcinoma of skin 1, Papilloma of palate 1

h : Papilloma of skin 1

された。

(4) 病理組織学的所見

鼻腔に発生した乳頭腫と癌腫は主に呼吸上皮領域にみられ、一部が前方の扁平上皮領域にみられたが、嗅上皮領域にはまったく認められなかった。乳頭腫は異型性の乏しい呼吸上皮または扁平上皮により構成されており、わずかの間質を伴い乳頭状の増殖を示し、同一個体の鼻腔に多数の乳頭腫が認められるものもあった。癌腫は鼻腔粘膜の構造を破壊しつつ、結節状あるいは鼻腔壁をはうように増殖し、上皮下の鼻腺の破壊や中には骨への浸潤を示しているものもみられた(Plate 1)。組織学的には腺様構造を示す部分や、角化を伴わない扁平上皮様構造が混在する像を呈していた(Plate 2)。肺腫瘍は組織学的に気管支領域の乳頭腫と細気管支肺泡領域の腺腫、腺癌および扁平上皮癌に分類し得た。乳頭腫は異型性の乏しい立方上皮または円柱上皮より構成されており、わずかな間質を伴い気管支腔内に乳頭状に発育していた(Plate 3)。腺腫は比較的境界明瞭な結節性病変で、既存の肺泡構造を破壊して充実性に増殖しているが、間質の発育や異型性を示す細胞に乏しく、周囲組織への浸潤はみられなかった。腺癌は中等度の異型性を示す立方上皮または円柱上皮より構成されており、豊富な間質を伴った腫瘍細胞が肺泡構造を破壊して充実性に増殖していた(Plate 4)。扁平上皮癌は著明な角化を伴った異型性の強い腫瘍細胞が周囲組織に浸潤性に発育していた(Plate 5)。食道の乳頭腫は、異型性の乏しい扁平上皮細胞が線維性結合組織を伴い食道腔内に乳頭状発育を示していた(Plate 6)。肝臓の肝細胞癌は肝小葉の破壊と肝細胞索の多層化を呈し、周囲肝組織に浸潤性に増殖してい

た(Plate 7)。膀胱の移行上皮癌は、極性の消失を伴い、多層化した癌細胞が膀胱腔内に充満していた(Plate 8)。

(5) 肝臓における GST-P 陽性巣

GST-P 陽性巣の定量的分析は屠殺時まで生存した動物についておこなった。また、腫瘍発生のみられた動物は除外した。実験1における GST-P 陽性巣の分析結果を Table 11 に示す。1 cm<sup>2</sup>あたりの GST-P 陽性巣の数は第5群で9.6±4.0個、第6群で17.8±6.9個と第1群の4.0±1.8個、第2群の5.6±3.0個、第3群の3.4±2.3個および第4群の3.9±2.6個と比較して有意に増加していた。また、第6群では第5群と比較しても有意に増加しており、用量相関性を示していた。1 cm<sup>2</sup>あたりに換算した値や肝臓標本面積に占める GST-P 陽性巣の割合も同様の結果を示していた。GST-P 陽性巣の平均面積は、第1群で第5群と比較し有意な上昇を示していたが、その他の群間には差は認められなかった。実験2における GST-P 陽性巣の分析結果を Table 12 に示す。1 cm<sup>2</sup>あたりの GST-P 陽性巣の数は第5群で5.1±2.0個、第6群で5.6±6.4個と第1群の4.2±1.8個、第2群の4.7±3.1個、第3群の4.9±2.7個および第4群の4.4±2.7個と比較してやや増加しているものの、有意な増加は認められなかった。また、1 cm<sup>2</sup>あたりに換算した値や肝臓標本面積に占める割合や平均面積についても各群間に有意差は認められなかった。実験1および2の第6群に発生した肝細胞癌と実験2の第5群に発生した過形成結節においても同様に GST-P 免疫組織化学染色を施したが、ともに GST-P 陽性を示していた。

Table 11. Induction of GST-P-positive liver foci in experiment 1

Groups	Treatment	No. of rats		No. of foci (/cm <sup>2</sup> )	No. of foci (/cm <sup>2</sup> )	Mean area of foci (mm <sup>2</sup> )	% area occupied by foci (%)
		Initial	Effective				
1	non-treated	20	14	4.0±1.8	52.9±25.0	0.25±0.16 <sup>e</sup>	0.98±0.48
2	0.15% SN	20	15	5.6±3.0	100.0±51.4 <sup>c</sup>	0.15±0.15	0.84±0.55
3	0.3% SN	20	14	3.4±2.3	55.6±41.9	0.19±0.17	0.66±0.41
4	1% BHPA	20	11	3.9±2.6	59.4±46.2	0.20±0.19	0.78±0.49
5	1% BHPA+0.15% SN	27	15	9.6±4.0 <sup>a</sup>	182.4±79.5 <sup>a</sup>	0.13±0.14	1.31±0.74 <sup>f</sup>
6	1% BHPA+0.3% SN	28	7	17.8±6.9 <sup>b</sup>	274.9±111.5 <sup>d</sup>	0.21±0.32	3.73±1.37 <sup>g</sup>

a : Significantly different from groups 1, 3 and 4 (p<0.001) and group 2 (p<0.01)

b : Significantly different from groups 1, 2, 3 and 4 (p<0.001) and group 5 (p<0.01)

c : Significantly different from group 1 (p<0.01) and groups 3 and 4 (p<0.01)

d : Significantly different from groups 1, 2, 3 and 4 (p<0.001)

e : Significantly different from group 5 (p<0.05)

f : Significantly different from groups 3 and 4 (p<0.05)

g : Significantly different from groups 1, 2, 3, 4 and 5 (p<0.001)

Table 12. Induction of GST-P-positive liver foci in experiment 2

Groups	Treatment	No. of rats		No. of foci (/cm <sup>2</sup> )	No. of foci (/cm <sup>3</sup> )	Mean area of foci (mm <sup>2</sup> )	% area occupied by foci (%)
		Initial	Effective				
1	non-treated	21	14	4.2±1.8	79.2±31.6	0.17±0.23	0.72±0.49
2	0.15% SN	21	14	4.7±3.1	100.1±64.1	0.12±0.22	0.56±0.46
3	0.3% SN	21	12	4.9±2.7	97.9±53.3	0.11±0.09	0.54±0.38
4	2% THPA	21	7	4.4±2.7	74.3±45.5	0.25±0.55	1.07±1.24
5	2% THPA+ 0.15% SN	28	18	5.1±2.0	96.9±34.1	0.14±0.13	0.69±0.39
6	2% THPA+ 0.3% SN	28	19	5.6±6.4	106.9±127.4	0.14±0.17	0.79±0.85

#### IV. 考 察

BHPは1974年 Krüger et al.<sup>24)</sup>によって合成されたニトロ化合物で、その発癌性はラット、マウス、ハムスターなどを用いた動物実験で証明されている<sup>24-28,39-42)</sup>。BHPのヒトへの曝露については、その前駆物質であるBHPAおよびTHPAがゴム、洗剤、写真乳剤、化粧品、防腐剤および織物などの製造過程に広く使用され<sup>29-31)</sup>、これらに微量のBHPが含まれていることによるとされてきた<sup>31)</sup>。しかし最近の研究により<sup>11,12)</sup>、BHPAとTHPAがヒト生体内でSNと反応し、BHPが生成される可能性が示唆されるようになった。BHPAとTHPAは広く環境中に存在すること、SNが野菜や貯蔵肉の中に存在し<sup>43-46)</sup>、また唾液中に含まれているnitrateの還元によっても生ずることにより<sup>47,48)</sup>、ヒト生体内で生成されたBHPがヒト発癌に関与するのではないかと考えられるようになった。本研究はこれらの知見をもとにまず予備実験をおこない、in vitroおよびin vivoにおいてBHPAおよびTHPAからBHPが生成されることを示し、さらにラットを用い、BHPAおよびTHPAをSNと同時に投与し、飼育条件下における生体内でのBHPの生成を確認するとともに、それが従来報告されているBHPと同様な発癌性を有するか否かを検索する目的でおこなった。

一般に酸性条件下における前駆物質とSNとの反応によるニトロ化合物の生成は純粋な化学反応によって起こり、その反応速度はSNの濃度の2乗と前駆物質の濃度の積に比例し、SNと前駆物質とのモル比は4:1が理想と考えられている<sup>11)</sup>。それゆえ本研究の予備実験はすべてSNと前駆物質とのモル比を4:1としておこなった。In vitroにおけるBHPの生成は、formate bufferおよびラット胃液中ではpH 3付近が至適pHと考えられ、それぞれ55%、20%のBHPAがニトロ化され、BHPが生成された。4人の患者から採取したヒト

胃液中ではpHは1.6~1.8の間であったが、35~40%のBHPAがニトロ化された。一方THPAのニトロ化はBHPAに比べ著しく低く、formate buffer中で約0.6%、ラット胃液中で約0.1%、ヒト胃液中で約0.3%であり、THPAはBHPAに比べニトロ化されにくいことが示された。また、いずれの前駆体からのBHPの生成はascorbic acidにより著しく抑制され、thiocyanateにより促進されることが示された。また、in vivoでのBHPの生成率はin vitroに比べ低く、BHPAからの生成率が4.0%、THPAからの生成率が0.01%であった。In vivoにおけるBHPの生成率が低かった理由として、反応時間が短かったことがあげられるが、さらにin vivoにおいては投与されたSNが速やかに吸収されたことによるのではないと思われる。SNの胃内での吸収速度はラットで約1.4時間と報告されている<sup>49)</sup>。

今回の発癌実験におけるdoseの設定は予備実験におけるin vivoでのBHPの生成率、前駆物質とSNの濃度と反応速度の関係およびそれぞれの毒性を考慮した上でおこなった。まずSNの濃度は従来報告<sup>50)</sup>より長期間飼育可能な最高の濃度0.3%をhigh doseとして設定し、low doseを0.15%として飲料水中に混じて投与した。食餌中に混入した前駆物質の濃度は反応速度を上げるため理想比より高くしかもSNとの同時投与においても毒性の見られない濃度に設定し、BHPAが1%、THPAは2%とした。SNを混じた飲料水は室温ではやや不安定なため4℃の暗所に保管し<sup>51)</sup>、連日(週末は2日に1回)新しいものと取り換えて投与した。実験1および2において0.3% SNを投与した第3および第6群において体重の増加抑制および摂水量の低下が認められたが、これはSNの毒性によるものと考えられる。しかしこれらの条件下において約2年の飼育が可能であり、dose設定は適切であったと考えられる。

胃内でのBHP生成については予備実験において、絶食したラットにSNとBHPAおよびTHPAを強制胃

内投与することによってBHPAの約4%が、THPAの約0.01%がニトロソ化され、BHPが生成されることが示された。実験1および2においてBHPAおよびTHPAとSNの摂取量と予備実験における生成率から計算したBHPの予想生成量は、実験1の第6群で155 $\mu$ mol/rat/day、実験2の第6群で0.72 $\mu$ mol/rat/dayであった。今回尿中に検出されたBHPおよびその代謝関連物質の量は、これらの計算値と比較すると低く、特に実験1においてきわめて少量であった。今回尿中に検出されたのはBHPおよびその代謝関連物質のひとつであるHPOPであった。BHPの代謝排泄物については<sup>14</sup>CでラベルしたBHPを経口投与することにより、その約80%が尿中に排泄されることが示されている<sup>52</sup>。中でもBHPおよびそのグルクロン酸抱合体が大部分を占め、HPOP、N-nitrosomethyl(2-hydroxypropyl)amine (MHP)等がわずかに検出される<sup>52</sup>。今回の結果は生体内でのBHPの生成が少量であったためBHPおよび微量のHPOPのみが検出されたが、ほぼBHPと同様の排泄パターンを示し、生体内でBHPが生成されたものと考えられた。尿中へのBHP排泄量は1% BHPA含有食と0.3% SN含有飲料水を投与した実験1の第6群で0.69~2.20 $\mu$ mol/rat/day、2% THPA含有食と0.3% SN含有飲料水を投与した実験2の第6群で0.16~0.54 $\mu$ mol/rat/dayであったが、10ppm BHP含有飲料水を1日20ml摂取するとそのBHP尿中排泄量は約1.0 $\mu$ mol/rat/dayと計算されることよりBHPへの曝露はかなり少量であったと考えられる。また、BHPAを投与されたラットにおいてその前駆物質濃度が低いにもかかわらずBHPの生成量は多く、予備実験の結果と同様にBHPAの方がニトロソ化されやすいことが示された。しかし予想生成量と比較するとBHPAでは尿中排泄量は著しく低く、同時強制胃内投与と食餌および飲料水中に混じり自由に摂取せしめた場合と胃内の条件が異なっているためではないかと考えられた。

実験1においてBHPAとSNを同時に投与した第5および第6群において鼻腔、肺、食道、肝臓、膀胱および甲状腺に腫瘍の発生がみられ、生体内で生成されたBHPが以前の報告<sup>25-28</sup>)と同様の臓器に腫瘍の発生をひきおこすことが明らかとなった。しかし、鼻腔および肺以外の臓器では対照群と比較して有意な上昇は認められなかった。これは鼻腔および肺以外の臓器は過去の報告においても腫瘍発生率は低く、今回の実験で生成されたBHPの量では有意な腫瘍発生をひきおこすことができなかったものと考えられる。鼻腔に発生した腫瘍は、乳頭腫と癌腫に分類し得たが、これらの大部分は呼吸上皮

領域に、一部が扁平上皮領域に発生し、嗅上皮領域には全く認められなかった。この結果はBHPおよびその代謝関連物質によって誘発される鼻腔腫瘍の部位と一致している<sup>27,53</sup>。また、肺についても、細気管支肺泡領域の腺腫、腺癌および扁平上皮癌と気管支領域の乳頭腫がみられ、病理組織学的所見でもBHPを用いた動物モデルで誘発される腫瘍とよく一致していた<sup>25,26</sup>。それゆえ、これらの腫瘍発生臓器、分布および病理組織学的所見からも生体内で生成されたBHPが体外からのBHP投与によるのと同様の発癌作用を有するものと考えられる。一方実験2において、THPAとSNを同時に投与した第5および第6群においてBHPの標的臓器に発生した腫瘍は、肝臓において第5群に1例の過形成結節、第6群に1例の肝細胞癌がみられたのみであり、対照群との有意差は全く認められなかった。また、実験1でみられた鼻腔および肺には全く腫瘍発生は認められなかった。これはBHPAと比較してTHPAとSNとの反応により生成されるBHPの量が少ないために、有意な腫瘍発生に至らなかったためと考えられる。

その他の臓器における腫瘍発生は実験1および2において散見され、自然発生腫瘍と考えられた。なかでも高い発生率を示していたのは精巢のLeydig細胞腫と副腎の褐色細胞腫である。これらの腫瘍は老齢のWistar系雄性ラットでは高頻度に発生し、その発生率はそれぞれおよそ93%、および33%と報告されており<sup>54</sup>、今回の結果もほぼ同様と思われた。精巢のLeydig細胞腫は実験1、2とも対照群にやや多く認められるが、これはLeydig細胞腫は100週齢ごろより多くみられるようになり、第5および第6群では60週以降死亡する動物が対照群に比して多かったため、その発生に至らなかった動物が含まれているためであると考えられる。一方、副腎の褐色細胞腫は第6群に多く、実験2においては有意に上昇している。しかしBHPによる褐色細胞腫の発生を報告した例はなく、今回の実験における第6群での発生率の増加に関して詳細は不明である。また、この系のラットに比較的高率に発生するものとして白血病が報告されている<sup>54</sup>。しかしながら、今回観察されたのは実験2の2例のみである。Lijinsky et al.<sup>55</sup>)の報告によるとSN投与により白血病の発生率が低下するという報告がなされているが、本実験においてはSNを投与していない群においてもほとんど発生せず、詳細は不明である。

今回の実験では肝臓における有意な腫瘍発生は認められなかったが、putative preneoplastic lesionと考えられているGST-P陽性巢の定量的分析により、肝臓に対するinitiation作用を有しているか否かを検索すること

が可能であった。実験1においては単位面積および単位体積あたりのGST-P陽性巣の数と肝全体の面積に占めるGST-P陽性巣の割合が第5および第6群において対照群である第1～4群と比較して用量相関性を示し有意に増加しており、BHPAとSNを同時に投与することによって、肝腫瘍の発生には至らないものの、肝臓に対してinitiation作用を有することが示された。一方、実験2においては第5および第6群において単位面積あたりのGST-P陽性巣の数の増加傾向が認められたものの、第1～4群の対照群と比較して有意な増加は認められず、今回の実験において生体内で生成されたBHPの量では肝臓に対するinitiationの成立には不十分と考えられた。さらに注目すべき所見は、無処置群を含めて第1～4群においても約4～5/cm<sup>2</sup>のGST-P陽性巣が観察されたことである。これは発癌物質の投与がなくとも100週齢をこえたラットの肝臓には少量のinitiationが起こっていることを示しており、自然発生肝腫瘍との関連が注目されることである。GST-Pは肝臓の短期および中期発癌物質検索法の指標酵素<sup>34,35</sup>)として用いられているが、100週齢をこえた無処置ラットの肝臓に対する検索はなされておらず、今後strainや週齢とGST-P陽性巣発生との関係を明らかにする必要がある。一方、他のputative preneoplastic lesionの指標として用いられているgamma-glutamyl transpeptidase<sup>56,57</sup>)の形質発現は今回観察された大部分のGST-P陽性巣で認められず、GST-Pがよりsensitiveなマーカーであることが示された。

現在までSNと前駆物質を同時に投与し、生体内で生成されたニトロソ化合物によりラット、マウス、ハムスター等に腫瘍の発生がみられたという報告は、1968年Sander et al.<sup>13)</sup>がmorpholineとbenzylamineをSNと同時にラットに投与することにより肝癌の発生を報告して以来いくつかの前駆物質について検索がなされている<sup>13-23</sup>)。生体内で発癌物質生成による腫瘍の発生にはnitrosationの率と生成した物質の発癌性の強さに影響される。それゆえ比較的ニトロソ化されやすく、また生成した物質の発癌性が強ければ、その前駆物質は癌の発生に関して重要な物質である。また、ヒトへの影響を考えるならば、環境中に存在する前駆物質の量を無視するわけにはいかないだろう。このような要因を考慮すると、今回実験で用いた前駆物質であるBHPAおよびTHPAは広く環境中に存在していることより<sup>29-31</sup>)ヒトへの暴露量が多く、またそのニトロソ化合物であるBHPが広い発癌スペクトルを有する物質であることにより<sup>35-28</sup>)、ヒト癌発生に関与していると考えられる。それゆえ今回ラットにおいて鼻腔および肺に有意な腫瘍発

生が、また肝臓に対してinitiation効果が認められたことはその可能性を裏付ける結果といえ、意義深い。

一方ヒトを含めて動物の生体内でのニトロソ化反応には様々な要因が関与することが考えられ、in vitroやin vivoにおいて種々の研究が行われている<sup>58-64</sup>)。一般にnitrosationを抑制する代表的物質としてascorbic acid<sup>49,58,59</sup>)が知られており、また促進物質としてthiocyanate<sup>59,63,64</sup>)が報告されている。これらの物質の効果は本研究の予備実験においても確認されたが、生体内で生成されたニトロソ化合物によるヒト癌発生のリスクを評価する上で重要な因子となる。たとえばthiocyanateはヒト唾液中に含まれているが<sup>65</sup>)、とりわけ喫煙者の唾液中に多いことが知られ<sup>66</sup>)、生体内での発癌物質生成における面からも喫煙はヒト癌発生の重要な危険因子であるといえる。逆にascorbic acidは適量の摂取により生体内での発癌物質の生成を抑制し、ヒト癌発生のリスクを低下させることができると考えられる。一方、生体内でニトロソ化されるが、その生成物が発癌性を有していない物質としてprolineが知られており<sup>67,68</sup>)、ヒトを用いたnitrosationの実験によく用いられている。prolineは他の前駆物質と比較して非常にニトロソ化をうけやすく、他の前駆物質と同時に投与すると、早期にnitrosoprolineを生成してSNを消費し、発癌性を有するニトロソ化合物の生成を競合的に抑制する。それゆえprolineはSN scavengerとして働き、生体内での発癌物質生成による暴露から生体を保護していると考えられる点で興味深い。

今回の実験結果より、環境中に存在する前駆物質であるBHPAからラット生体内で生成したBHPにより鼻腔および肺に腫瘍が発生することが明らかとなった。それゆえ本研究結果は、生体内での発癌物質生成によるヒト癌発生に関して重要な示唆を与えるものである。生体内での発癌物質生成には様々な要因が複雑にからみあっており、その詳細を明らかにするため今後さまざまな研究が必要であると思われる。

## V. 結 語

BHPの前駆物質であるBHPAおよびTHPAとSNからのBHPの生成をin vitroおよびin vivoにおいて検索し、次の結果を得た。

1. 10mMのBHPAおよびTHPAと40mMのSNをformate buffer中、ラットおよびヒト胃液中で反応させることにより、BHPの生成がみられた。BHPAおよびTHPAからのBHPの生成率はそれぞれ最高で54.4%、13.3%、39.2%および0.58%、0.12%、0.31%であ

り, ascorbic acid により抑制され, thiocyanate により促進された。

2. 100 $\mu$ mol の BHPA および THPA と 400 $\mu$ mol の SN をラット胃内に投与することによって BHP の生成がみられた。BHPA および THPA からの BHP の生成率はそれぞれ 4.02%, 0.0115% であり 800 $\mu$ mol の ascorbic acid の同時投与によって著しく抑制された。

以上の結果より in vitro, in vivo において BHPA および THPA が SN と反応し, BHP が生成されることが判明した。

次にラットの生体内で生成された BHP により腫瘍の発生がみられるか否かを検索する目的で BHPA および THPA と SN を同時にラットに投与し, BHP の生成を確認するとともに腫瘍の発生について検索をおこない以下の結果を得た。

3. 発癌実験において 1% BHPA 含有食および 2% THPA 含有食と 0.3% SN 含有飲料水を同時に投与したラット尿中に BHP がそれぞれ 0.69~2.20 $\mu$ mol/rat/day および 0.16~0.54 $\mu$ mol/rat/day が検出されたが, 無処置ラット, 1% BHPA 含有食および 2% THPA 含有食のみ投与したラット, 0.3% SN 含有飲料水のみを投与したラット尿中には検出されず, 実験条件下において BHPA および THPA と SN よりラット生体内で BHP が生成されていることが確認された。

4. 1% BHPA 含有食と 0.3% SN 含有飲料水を同時に投与した実験 1 の第 6 群において BHP の標的臓器である鼻腔および肺にそれぞれ 74% および 58% と他群に比して有意な腫瘍の発生がみられ, その分布や病理組織学的所見も BHP により誘発されるものと一致していた。しかし, 2% THPA 含有食と 0.3% SN 含有飲料水を同時に投与した実験 2 の第 6 群においては BHP の標的臓器に有意な腫瘍発生は認められなかった。

5. 実験 1 および 2 における自然発生腫瘍の頻度は, 副腎および精巣において高く, Wistar 系雄性ラットにおける自然発生腫瘍の頻度とはほぼ一致していた。しかし, 白血病の発生頻度は著しく低下していた。

6. 1% BHPA 含有食と 0.15% および 0.3% SN 含有飲料水を投与した実験 1 の第 5 および第 6 群において有意な肝腫瘍の発生は認められなかったが, その putative preneoplastic lesion である GST-P 陽性巢の単位面積および単位体積あたりの数は他群に比して有意に増加し, 用量相関性を示していた。しかし 2% THPA 含有食と 0.15% および 0.3% SN 含有飲料水を投与した実験 2 の第 5 および第 6 群においては, GST-P 陽性巢の単位面積および単位体積あたりの数はやや増加傾向にあるもの

の, 他群に比して有意な増加は認められなかった。

7. 実験 1 および 2 において, 無処置群である第 1 群のラット肝臓にも 1 cm<sup>2</sup>あたりおよそ 4 個の GST-P 陽性巢が認められ, 100 週齢前後のラットにおいては発癌物質投与なしに肝臓の initiation が若干生じていることが示された。

以上の結果より 1% BHPA 含有食と 0.3% SN 含有飲料水をラットに同時に投与することにより, 生体内で生成された BHP はその標的臓器である鼻腔および肺に有意な腫瘍発生を, また肝臓に対しては有意な腫瘍発生はみられないものの, initiation 効果を有することが明らかとなった。しかし, 2% THPA 含有食と 0.3% SN 含有飲料水をラットに同時に投与することにより, 生体内で生成された BHP はその量が少なく, BHP の標的臓器に有意な腫瘍発生や肝臓に対する initiation 効果は認められなかった。このことにより, 生体内で生成された BHP により腫瘍が発生することが証明され, その前駆物質として BHPA が重要であると思われた。

本研究の成果の一部は, 昭和 63 年 9 月第 47 回日本癌学会総会(東京)において発表した。なお本研究は, 厚生省がん助成金, 厚生省対がん 10 ヶ年総合戦略研究の援助による。

稿を終えるにのぞみ, 本研究の機会を与え, 御校閲を賜った恩師杉村正仁教授, 本研究の遂行に終始ひとかたならぬ御指導と御校閲を賜った腫瘍病理学教室小西陽一教授ならびに岐阜薬科大学森幸雄助教授に心から感謝致します。また御校閲を賜った耳鼻咽喉科学教室松永喬教授に深謝致します。あわせて研究を御援助下さった腫瘍病理学教室伝田阿由美講師をはじめ, 教室諸兄弟に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) 富永祐民: 癌予防戦略. Oncologia 12: 17, 1985.
- 2) 平山 雄: 予防ガン学. メディサイエンス社, 1987.
- 3) 杉村 隆: 発癌物質. 中公新書, 1982.
- 4) Miller, J. A.: Cancer Res. 30: 559, 1970.
- 5) Lijinsky, W.: Nature 225: 21, 1970.
- 6) Mirvish, S. S.: J. Toxicol. Environ. Health 2: 1267, 1977.
- 7) Bartsch, H. and Montesano, R.: Carcinogenesis 5: 1381, 1984.
- 8) Reed, P. I.: Biblthca Nutr. Dieta 37: 130, 1986.
- 9) Magee, P. N. and Barnes, J. M.: Br. J. Cancer 10: 114, 1956.

- 10) **Montesano, R., Bresil, H., Degan, P., Martel-Planche, G., Serres, M. and Wild, C. P.** : *in* Methods for detection of DNA damaging agents in humans: Applications in cancer epidemiology and prevention (Bartsch, H., Hemminki, K. and O'Neil, I. K., eds.). IARC Scientific Publication No. 89, Lyon, p75, 1988.
- 11) **Mirvish, S. S.** : Toxicol. Appl. Pharmacol. **31** : 325, 1975.
- 12) **Lijinsky, W., Keefer, L., Conrad, E. and Bogart, R. V.** : J. Natl. Cancer Inst. **49** : 1239, 1972.
- 13) **Sander, J. and Burkle, G.** : Z. Krebsforsch. **73** : 54, 1969.
- 14) **Greenblatt, M., Mirvish, S. S. and So, B. T.** : J. Natl. Cancer Inst. **46** : 1029, 1971.
- 15) **Mirvish, S. S., Greenblatt, M. and Kommineni, V. R.** : J. Natl. Cancer Inst. **48** : 1311, 1972.
- 16) **Greenblatt, M. and Mirvish, S. S.** : J. Natl. Cancer Inst. **50** : 119, 1973.
- 17) **Lijinsky, W., Taylor, H. W., Snyder, C. and Nettesheim, P.** : Nature **244** : 176, 1973.
- 18) **Taylor, H. W. and Lijinsky, W.** : Int. J. Cancer **16** : 211, 1975.
- 19) **Lijinsky, W. and Reuber, M. D.** : Fd. Cosmet. Toxicol. **18** : 85, 1980.
- 20) **Bergman, F. and Wahlin, T.** : Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A **89** : 241, 1981.
- 21) **Lijinsky, W.** : Fd. Chem. Toxic. **22** : 715, 1984.
- 22) **Ernst, H., Ohshima, H., Bartsch, H., Mohr, U. and Reichart, P.** : Carcinogenesis **8** : 1843, 1987.
- 23) **Thamavit, W., Moore, M. A., Hiasa, Y. and Ito, N.** : Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **79** : 909, 1988.
- 24) **Krüger, F. W., Pour, P. and Althoff, J.** : Die Naturwissenschaften **61** : 328, 1974.
- 25) **Konishi, Y., Kondo, H., Ikeda, T., Kawabata, A., Shoji, Y. and Denda, A.** : Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **69** : 573, 1978.
- 26) **Konishi, Y., Ikeda, T. and Yoshimura, H.** : Cancer Lett. **6** : 115, 1979.
- 27) **Mohr, U., Reznik, G. and Pour, P.** : J. Natl. Cancer Inst. **58** : 361, 1977.
- 28) **Pour, P., Salmasi, S., Runge, R., Wallcave, L., Nagel, D. and Stepan, K.** : J. Natl. Cancer Inst. **63** : 181, 1979.
- 29) **Konishi, Y., Yokose, Y., Mori, Y., Yamazaki, H., Yamamoto, K., Nakajima, A. and Denda, A.** : *in* Relevance of N-nitroso compounds to human cancer: Exposure and mechanism (Bartsch, H., O'Neill, I. K. and Schülte-Hermann, R., eds.). IARC Scientific Publication No. 84, Lyon, p250, 1987.
- 30) **Mori, Y., Yamazaki, H., Yamamoto, K., Nakajima, A., Yokose, Y. and Konishi, Y.** : Life Sci. adv. **7** : 35, 1988.
- 31) **Issenberg, P., Conard, E. E., Nielson, J. W., Klein, D. A. and Miller, S. E.** : *in* N-nitroso compounds: Occurrence, biological effects and relevance to human cancer (O'Neill, I. K., Borstel, V. C., Miller, C. T., Long, J. and Bartsch, H., eds.). IARC Scientific Publication No. 57, Lyon, p43, 1984.
- 32) **Planku Rychlo, A.** : Zbl. allg. Path. **89** : 252, 1954.
- 33) **Popp, J. A. and Monterio-Riviere, N. A.** : *in* Respiratory system. Monograph on pathology of laboratory animals (Jones, T. C., Mohr, U. and Hunt, R. D., eds.). The International Life Science Institute, Springer-Verlag, Berlin, p3, 1985.
- 34) **Sato, K., Kitahara, A., Satoh, K., Ichikawa, T., Tatematsu, M. and Ito, N.** : Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **75** : 199, 1984.
- 35) **Kitahara, A., Satoh, K., Nishimura, K., Nishikawa, T., Ruike, K., Sato, K., Tsuda, H. and Ito, N.** : Cancer Res. **44** : 2698, 1984.
- 36) **Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H.** : J. Histochem. Cytochem. **29** : 577, 1981.
- 37) **Yamamoto, K., Yokose, Y., Nakajima, A., Eimoto, H., Shiraiwa, K., Tamura, K., Tsutsumi, M. and Konishi, Y.** : Carcinogenesis **9** : 399, 1988.
- 38) **Campbell, H. A., Pitot, H. C., Potter, V. P. and Laishes, B. A.** : Cancer Res. **42** : 465, 1982.
- 39) **Konishi, Y., Kondo, H., Inui, S., Denda, A., Ikeda, T. and Kojima, K.** : Jpn. J. Cancer Res. (Gann) **69** : 77, 1978.
- 40) **Kondo, H., Ikeda, T., Yoshimura, Y., Hoshimura, H. and Konishi, Y.** : Cancer Lett. **5** : 339, 1978.
- 41) **Pour, P. M. and Wilson, R. B.** : *in* Tumors of the pancreas (Moossa, A. R., ed.). Williams &

- Wilkins, Baltimore, p37, 1980.
- 42) **Lijinsky, W.** : J. Cancer Res. Clin. Oncol. **108** : 46, 1984.
- 43) **Doll, R.** : Gastroenterologia **86** : 320, 1956.
- 44) **Weisburger, J. H.** : Nitroso compounds (Scanlan, R. A. and Tannenbaum, S. R., eds.) . American Chemical Society Symp Ser 174, Washington D. C., Am. Chem. Soc., p305, 1981.
- 45) **National Academy of Science.** The Health effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds. Part 1. Washington, D. C. : Natl. Acad. Sci., 1981.
- 46) **Hartman, P. E.** : Environ. Mutagen **5** : 111, 1983.
- 47) **Spiegelhalter, B., Eisenbrand, G. and Preussmann, R.** : Food Cosmet. Toxicol. **14** : 545, 1976.
- 48) **Eisenbrand, G., Spiegelhalter, B. and Preussmann, R.** : Oncology **37** : 227, 1980.
- 49) **Mirvish, S. S., Patil, K., Chadirian, P. and Kommineni, V. R.** : J. Natl. Cancer Inst. **54** : 869, 1975.
- 50) **Mirvish, S. S., Pelfrene, A. F., Garcia, H. and Shubik, P.** : Cancer Lett. **2** : 101, 1976.
- 51) **Maekawa, A., Ogiu, T., Onodera, H., Furuta, K., Matsuoka, C., Ohno, Y. and Odashima, S.** : Fd. Chem. Toxicol. **20** : 25, 1982.
- 52) **Mori, Y., Takahashi, H., Yamazaki, H., Toyoshi, K., Makino, T., Yokose, Y. and Konishi, Y.** : Carcinogenesis **5** : 1443, 1984.
- 53) **Lijinsky, W. and Reuber, M. D.** : Cancer Lett. **22** : 83, 1984.
- 54) **Maekawa, A., Onodera, H., Tanigawa, H., Furuta, K., Kodama, Y., Horiuchi, S. and Hayashi, Y.** : J. Toxicol. Sci. **8** : 279, 1983.
- 55) **Lijinsky, W., Kovatch, R. and Riggs, C. W.** : Carcinogenesis **4** : 1189, 1983.
- 56) **Farber, E. and Cameron, R.** : Adv. Cancer Res. **31** : 125, 1980.
- 57) **Pitot, H. C. and Sirica, A. E.** : Biochim. Biophys. Acta **605** : 191, 1980.
- 58) **Mimvish, S. S. and Wallcave, L.** : Sci. **177** : 65, 1972.
- 59) **Mirvish, S. S., Cardesa, A., Wallcave, L. and Shubik, P.** : J. Natl. Cancer Inst. **55** : 633, 1975.
- 60) **Pignatelli, B., Castegnaro, M. and Walker, E. A.** : *in* Environmental N-nitroso compounds: Analysis and formation (Walker, E. A., Bogovski, P., Griciute, L. and Davis, W., eds.). IARC Scientific Publication, Lyon, p173, 1976.
- 61) **Pignatelli, B., Berezziat, J. C., Descotes, G. and Bartsch, H.** : Carcinogenesis **3** : 1045, 1982.
- 62) **Kuenzig, W., Chau, J., Norkus, E., Holowaschenko, H., Newmark, H., Mergens, W. and Conney, A. H.** : Carcinogenesis **5** : 309, 1984.
- 63) **Fan, T. Y. and Tannenbaum, S. R.** : J. Agr. Food Chem. **21** : 237, 1973.
- 64) **Boyland, E. and Walker, S. A.** : Arzneimittelforsch **24** : 1181, 1974.
- 65) **Forman, D., Al-Dabbagh, S. and Doll, R.** : Nature **313** : 620, 1985.
- 66) **Ladd, K. F., Newmark, H. L. and Archer, M. C.** : J. Natl. Cancer Inst. **73** : 83, 1984.
- 67) **Hoffmann, D. and Brunemann, K. D.** : Cancer Res. **43** : 5570, 1983.
- 68) **Ohshima, H. and Bartsch, H.** : Cancer Res. **41** : 3658, 1981.

## Explanation of plates

- plate 1. Carcinoma in the respiratory region of the nasal cavity in a rat from group 6 of experiment 1. H & E,  $\times 15$ .
- plate 2. High power view of plate 1, illustrating invasion into bone tissue. H & E,  $\times 80$ .
- plate 3. Papilloma in the bronchial region of the lung in a rat from group 6 of experiment 1. H & E,  $\times 60$ .
- plate 4. Adenocarcinoma of the lung in a rat from group 6 of experiment 1. H & E,  $\times 150$ .
- plate 5. Squamous cell carcinoma of the lung in a rat from group 6 of experiment 1. H & E,  $\times 80$ .
- plate 6. Papilloma of the esophagus in a rat from group 6 of experiment 1. H & E,  $\times 40$ .
- plate 7. Hepatocellular carcinoma of the liver in a rat from group 6 of experiment 1. H & E,  $\times 120$ .
- plate 8. Transitional cell carcinoma of the urinary bladder in a rat from group 6 of experiment 1. H & E,  $\times 150$ .



plate 1



plate 2

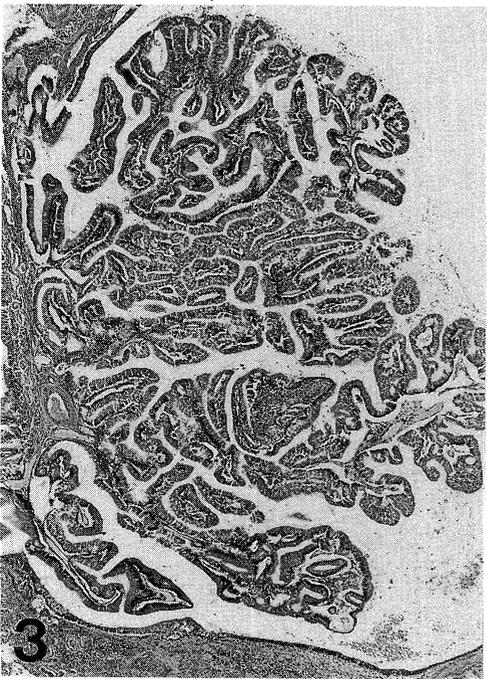


plate 3

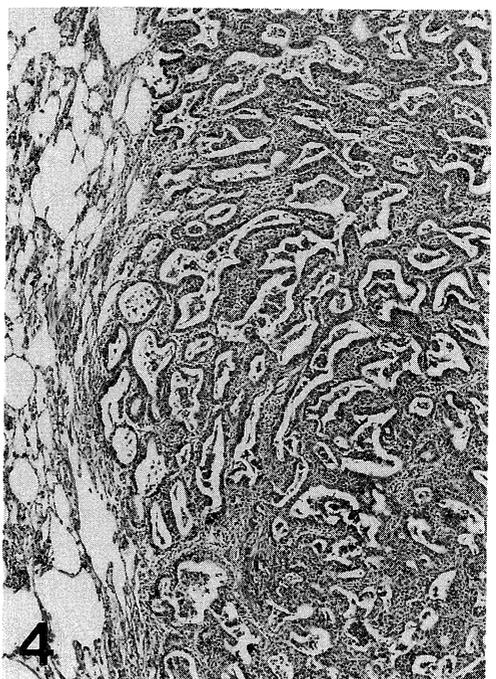


plate 4

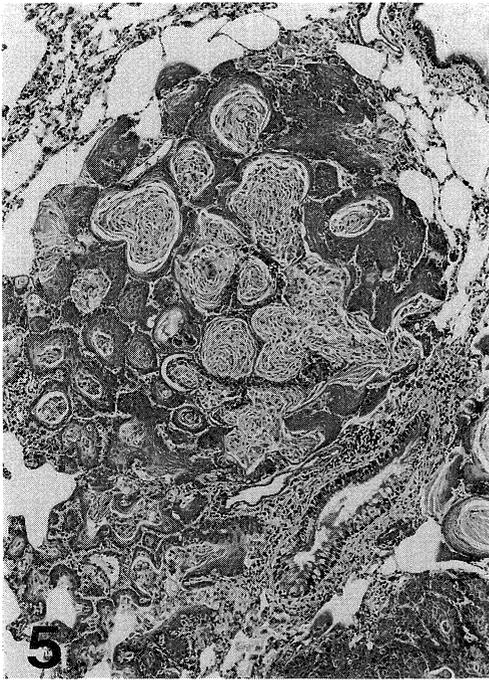


plate 5



plate 6

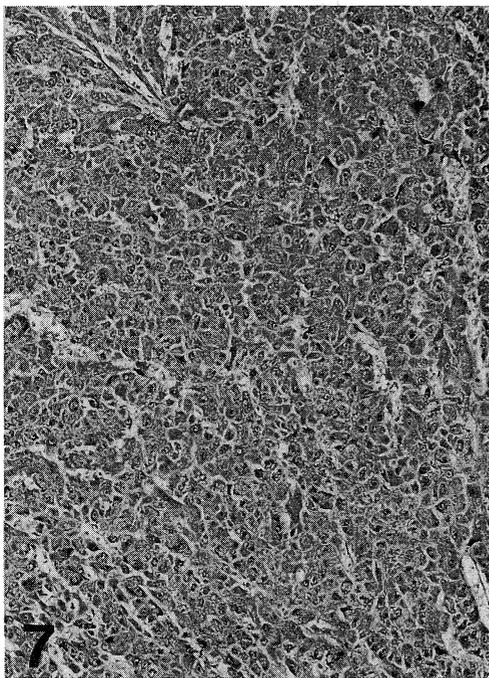


plate 7

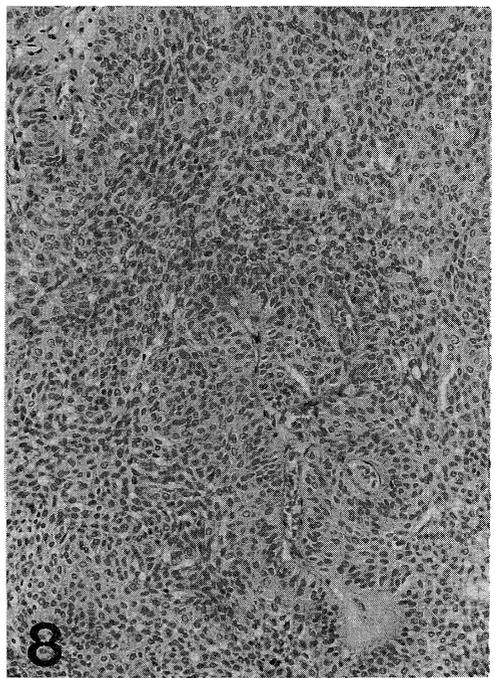


plate 8