

膀胱腫瘍の発生に關与する尿路感染症起炎菌の役割 に関する実験的研究

加治, 慎一
国立病院九州医療センター泌尿器科

<https://doi.org/10.15017/7329775>

出版情報：福岡醫學雜誌. 85 (10), pp.294-308, 1994-10-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



膀胱腫瘍の発生に関与する尿路感染症起炎菌の 役割に関する実験的研究

国立病院九州医療センター 泌尿器科 (指導教授: 熊澤浄一)

加 治 慎 一

Experimental Study on the Role of Bacteria from Urinary Tract Infections on the Bladder Carcinogenesis

Shin-ichi KAJI

(Director: Prof. J. Kumazawa)

Department of Urology, National Kyushu Medical Center Hospital, Fukuoka 810

The role of bacteria isolated from patients with urinary tract infection (UTI) was studied with a view to the possibility that such bacteria are an etiological factor in the development of bladder cancer.

The bacterial strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*, isolated from patients with UTI at the Kyushu University Hospital, were tested for their nitrate-reducing activity after 1 hr of incubation with sodium nitrate (3.57 mM) in a growth medium (pH 7.2) at 37°C. Of 35 strains tested, 27 strains (77%) showed the ability to reduce nitrate to nitrite with yields ranging from 2 to 310 $\mu\text{M NO}_2^-/\text{hr}/10^7$ bacterial cells, but in 8 strains (23%) including all the 7 strains of *E. faecalis* no elevated activity (0.0-0.3 μM) could be detected. Various kinetic profiles were observed for the nitrate-reducing bacteria, at various rate ranging from rapidly to slowly, during 5 hr of incubation.

The effect of nitrate-reducing bacteria on mutagen formation in the human urine was examined. The mutagenic activity of smokers' or non-smokers' urine incubated with or without bacteria for 72 hr at 37°C was assayed by the Ames Salmonella/microsome test (using TA100 or TA98 with S9-mix). The mutagenic activity increased in urine incubated with the nitrate-reducing *S. marcescens* or *P. aeruginosa*, compared to controls which were incubated without bacteria.

Potent mutagenic activity could be induced when the urine concentrate prepared from smokers' urine with an XAD-2 resin column was incubated with sodium nitrite (40 mM) at pH 3 for 4 hrs. The potent mutagenic activity observed here seems to be due to the class of direct-acting mutagen(s), because no metabolic activation was required. The mutagen formation at an optimal pH 4 proceeded rapidly during 4 hrs of incubation, but decreased thereafter. It was noted that even at a physiological pH 6 of human urine, a lower but significant level of mutagenic activity could still be detected.

The mutagenic activity of individual urine concentrate from 14 male smokers and from 6 male non-smokers was assayed after 30 min of incubation with or without sodium nitrite (40 mM) at pH 6. Mutagenic activity increased in most of these urine concentrates incubated with sodium nitrite. The levels were variable between individuals with a 1.3- to 53-fold increase compared with the controls incubated without sodium nitrite.

These results suggest that UTI's caused by bacteria which possess nitrate-reducing ability could be a causative factor in the development of bladder cancer in terms of the formation of presumably novel direct-acting mutagen(s)/carcinogen(s).

はじめに

わが国の平成3年度(1991)における膀胱腫瘍死亡者数は3,173人(男2,165人,女1,008人)で,悪性新生物による死亡者総数223,727人の中の1.4%を占めている²³⁾。膀胱腫瘍の発生には性差があり,いずれの国においても男性の方が女性より多い²⁵⁾。わが国の膀胱腫瘍による死亡率は,今のところ欧米諸国に比べると男女共低い状況にある²⁵⁾が,人口の高齢化さらには生活スタイルの変化に伴って,がん患者の増加が懸念される。1993年に出版された「がん・統計白書」によれば2015年の膀胱腫瘍は,罹患者数は22,629人⁵⁰⁾,死亡者数は8,282人²⁶⁾と現在より2~3倍の増加を予測しており,その予防は重要な課題となっている。

膀胱腫瘍の原因については,芳香族アミノ化合物への職業的暴露,喫煙,ビルハルツ住血吸虫への感染,尿路感染症の既往,さらにはコーヒーや人口甘味料等食生活との関連など多方面からの調査,研究⁴⁾¹⁴⁾²²⁾³²⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁵⁵⁾がなされてきた。しかしながら,これまでの疫学的調査研究あるいは動物実験による研究の結果から,ヒトの膀胱腫瘍の危険因子として広く認められているものは,ベンチジン, β -ナフチルアミンなどの芳香族アミノ化合物への職業的暴露と喫煙だけである⁴⁾⁴⁵⁾。芳香族アミノ化合物の発癌性については動物実験でも確認され³⁾,その作用機序についても詳細な生化学的検討がなされている⁵³⁾。喫煙もタバコ煙中に多種多様な芳香族アミノ化合物が含まれており¹⁵⁾,これらの化合物が作用しているものと考えられ,喫煙が膀胱腫瘍の発生に寄与することは確かなものとなっている。ビルハルツ住血吸虫感染も危険因子として強く疑われてはいる⁴⁾⁴⁵⁾が,ビルハルツ住血吸虫は局地的に生息しているものであり,わが国も含め多くの国の膀胱腫瘍の危険因子とはならない。職場環境の改善などによって職業的暴露が減ぜられた先進国での膀胱腫瘍の原因は喫煙が主要因子となっている。喫煙が原因と考えられる膀胱腫瘍患者は,Wynderら⁵⁵⁾によれば男子で48%,女子で31%と報告されている。しかしながら,喫煙や職業的暴露では説明できない原因不明の患者が数多く残されている。殊に,女性の膀胱腫瘍では原因不明のものの方がむしろ多いと言われており,膀胱腫瘍の予防という観点からも,その危険因子の探索は重要である。

近年,膀胱腫瘍の危険因子として,尿路感染症の既往を取り上げている疫学的調査研究の報告⁹⁾¹⁴⁾¹⁹⁾²⁰⁾²²⁾⁴¹⁾⁵¹⁾が散見される。因果関係は認められな

かったとしている報告²²⁾もあるが,尿路感染症既往者群の相対危険度が上昇または上昇傾向を示している報告が数多くあり危険因子の一つではないかと注目されている。Kantorら²⁰⁾の患者-対照研究によれば,尿路感染症の既往が3回以上ある人の膀胱腫瘍の相対危険度(Relative Risk, RR)は,既往の無い人にくらべ約2倍(男性:2.0,女性:2.1)であったと報告されている。しかしながら,これらの疫学的調査結果に対して,その因果関係を疑問視する意見も出されている²²⁾⁴⁵⁾。即ち,膀胱腫瘍発症時に尿路感染症を合併している症例は臨床的にしばしば認められるところであり,膀胱腫瘍の発症時期を明確に把握できていないこれまでの疫学調査では,尿路感染症が膀胱腫瘍の発症より先行していたと確信させるには不十分であるという意見である。しかし,その一方では,尿路変更術を受けた人の中に,尿管の吻合部位周辺に腫瘍(大腸癌)が多発しているという報告¹⁸⁾が出されている。これらの事例は腸内細菌と尿がこの発癌に関与しているのではないかとすることを強く示唆するものであり,発癌部位は異なっているが,尿路感染症による膀胱腫瘍も同じ機序で発症しているのではないかという可能性を抱かせるものである。

尿路感染症による膀胱腫瘍発症のメカニズムとしては,尿路感染症起炎菌介在によりニトロソ化合物(癌原性物質)が,生成するという説¹⁾²⁾⁴³⁾⁴⁶⁾⁴⁸⁾や尿路感染症に伴う炎症組織が癌の母地を提供しているという説¹³⁾などが提示され検討されてきたが,尿路感染症患者尿から検出されているニトロソ化合物を膀胱内に注入しても膀胱腫瘍はできなかったという報告²⁸⁾が出されるなど,まだこれらの説だけでは十分に説明しきれない点も出てきている。このように尿路感染症による膀胱腫瘍の発症という関係は,疫学的調査研究あるいは発症機序の研究からも,まだ明確にされているとは言い難い状況である。

そこで尿路感染症と膀胱腫瘍との因果関係を明確にするには,発症機序を解明することが重要であると考え,化学発癌の観点より尿路感染症起炎菌の介在によって,尿中に発癌物質が生成される可能性の有るかを検討することにした。本研究では,尿路感染症患者から分離された種々の起炎菌について,その硝酸還元能を定量的に測定し亜硝酸の生成状況を明確にすると共に,発癌物質のPrescreening法として広く利用されているAmes test²⁹⁾を用い,人の尿濃縮物に亜硝酸を反応させた場合に,尿の変異原性にいかなる変化がもたらされるかを調べ,発癌物質生成の可能性を探っ

た。

実 験 方 法

1. 尿路感染起炎菌

本研究で用いた 35 株の細菌は、九州大学医学部附属病院検査部の竹森紘一主任のご好意により提供されたもので、九州大学医学部附属病院の尿路感染症患者尿から得られ、いずれの菌も菌数は 10^4 /ml 以上で、細菌学的に分離同定されたものである。これらの内訳は *Escherichia coli* (*E. coli*) 13 株, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 4 株, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) 4 株, *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) 3 株, *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) 4 株, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) 7 株である。

2. 尿路感染起炎菌の硝酸還元能の測定

凍結保存されている各細菌株のバイアル瓶から滅菌スパーテルにて極少量の細菌を掻爬採取し 10 ml の培養液 (Oxoid Nutrient Broth 5 g を水 1 L に溶解し滅菌したもの) に播種し、37°C にて 14 時間培養した。増殖した細菌は冷凍遠心機を用い、 $10,000 \times g$, 10 分間 5°C の条件下で分離し、ペレット (菌凝集塊) を採取した。ペレットは無菌生理食塩水で 3 回洗浄した。このペレットを Vogel-Bonner Medium E (硝酸マグネシウム七水和物 0.2 g, クエン酸一水和物 2 g, リン酸二カリウム 10 g, リン酸水素アンモニウムナトリウム四水和物 3.5 g を蒸留水に溶解し 1 L としたもの) にブドウ糖を 2 w/v% の割合で加えた培養液にて懸濁させた。この際、菌懸濁液中の菌数濃度を一定 (10^7 cells/ml) にする目的で、懸濁液の 550 nm の吸光度が 0.5 となるよう調製した。この菌懸濁液 (5~8 ml) に等量の 7.14 mM 硝酸ナトリウム水溶液を加え、37°C の恒温水槽にて振盪させながら 1~5 時間反応させた。硝酸還元を経時的推移をみる実験では、経時的にこの反応液から一定量が無菌的に採取し、亜硝酸測定用試料とした。なお、反応開始時の反応液中に含まれる硝酸イオンの濃度は $3,570 \mu\text{M}$ と試算される。

3. 亜硝酸の測定³⁴⁾

適宜希釈した試料液 (亜硝酸性イオンの濃度として $7.14 \mu\text{M}$ 以下) 10 ml にスルファミン溶液 (スルファミン 0.1 g を 10% 塩酸数滴を加えた水で溶解し 100 ml としたもの) 1 ml を加え、15 分間放置した後ナフチルエチレンジアミン溶液 (N- (1-ナフチル) エチレンジアミン・二塩酸塩 0.1 g を水に溶かして 100 ml としたもの) 1 ml を加えて混和し、20 分静置した後に波長 540 nm の吸光度を測定した。別途、亜硝酸性窒素標準

溶液を用いて作成された検量線より試料液中の亜硝酸濃度を算出した。各菌の硝酸還元能は 37°C で恒温処理した各時点での試料液中に生成された亜硝酸イオン量を μM 単位で表した。

4. 尿試料の採集と尿濃縮物の調製

本研究で使用した尿試料は、薬剤などを服用していない健康な成人男子 (30~42 歳) から採集したものである。尿採取の依頼に際し、食事などの制限は一切行っていない。集められた尿試料は、分析時まで -20°C 下で凍結保存した。分析時には、室温 (約 22°C) 下にて融解し、綿栓濾過にて沈殿物を除去した清澄な濾液を尿濃縮物調製用試料とした。

XAD-2 カラムによる尿濃縮物の調製には、Yamasaki & Ames⁵⁷⁾ によって報告された方法を一部変更して用いた。即ち、精製した XAD-2 樹脂を 40 mm の高さに充填したガラスカラム (10×300 mm) に尿試料 100 ml 流下させた後、2 ml の蒸留水を流下させ滞留している尿を押し出した。さらに、カラム上部より窒素ガスにて加圧し樹脂間隙に残存する液体を完全に押し出した後、アセトン 20 ml で樹脂に吸着されている物質を溶出させた。以上の操作過程における流下速度は、カラムコックによって 2~3 ml/min に調節した。溶出液は 30°C の水溶液中で窒素ガスを吹き付けながら、溶媒を完全に留去し得られたタール様残留物を尿濃縮物とした。

なお、XAD-2 樹脂 (オルガノ K. K., 東京) は不純物を除去するため、Junk ら¹⁷⁾ の方法に準じ精製した。即ち、ソックスレー抽出器を用いメタノール、アセトニトリル、ジエチルエーテルの順に、それぞれ 8 時間の還流抽出を行い、精製された樹脂はメタノール中に保存し、使用時には精製水を流してメタノールを除去し水に置換したものをを用いた。

その他の試薬は、すべて試薬特級品以上の品質のものをを用いた。

5. 模擬感染尿の変異原性試験

健康な成人で喫煙している人と喫煙をしていない人に採尿を依頼し、得られた尿を喫煙者、非喫煙者別に混合した尿試料を用いて以下の実験を行った。

喫煙者尿と非喫煙者尿をそれぞれ Membrane filter (マイレクス HA 25, 孔径 $0.45 \mu\text{m}$, Millipore, 日本ミリポアリミテッド) にて濾過除菌した尿 100 ml に、別途 Nutrient Broth 溶液にて 14 時間培養した尿路感染症起炎菌の菌懸濁液を 1 ml 加え、72 時間、37°C 水溶液中にて振盪させた。増殖した菌を除くために、再度 Membrane filter にて濾過した。得られた清澄な菌培

養尿試料を、前述の XAD-2 樹脂カラムにより処理し濃縮物を調製した。濃縮物の変異原性試験は、試験菌として *Salmonella typhimurium* TA 98 及び TA 100 を用い代謝活性化系 (S 9 mix) を加えた条件下でのみ行った。本実験では、尿路感染起炎菌として *E. coli*, *S. marcescens* および *P. aeruginosa* を用い、単一菌による感染尿について実施した。なお比較対照用として、菌懸濁液を加えない尿について同様に処理し変異原性を測定した。また、喫煙者尿を用い、*S. marcescens* および *P. aeruginosa* を作用させた尿の変異原性について、その用量を 20~160 μ l (原尿 4~32 ml に相当) まで変化させたときの変異原性の変化を TA 100+S 9-mix の試験系にて検出し菌によって生成された変異原性物質の用量-反応関係を調べた。

6. 亜硝酸ナトリウムによる尿濃縮物の処理

健康な成人男子から採取された尿を XAD-2 樹脂カラムにより吸着濃縮して得られた尿濃縮物を亜硝酸処理した。即ち、原尿 100 ml 相当の尿濃縮物に、40 mM 亜硝酸ナトリウム溶液 1 ml を加えて溶解し、1 N 塩酸または 1 N 水酸化ナトリウムにて pH 調整 (pH 1~pH 8) を行った。この溶液を membrane filter (孔径 0.45 μ m, Sartorius GmbH, Gottingen, West Germany) にて濾過滅菌を行い、37°C の恒温水槽中に 30 分~8 時間反応させた。反応は等量の 40 mM 硫酸アンモニウム溶液を添加して停止させた。比較対照用として、亜硝酸ナトリウムの代わりに水を加え同様に処理した試料を作製した。

7. 変異原性試験

Maron and Ames の報告²⁹⁾に記載された方法に準拠し、*Salmonella typhimurium* TA 98 および TA 100 (Dr. Ames, B. N., University of California, Berkley, USA より供与) を試験菌として、標準的なプレート法により実施した。代謝活性化を行った実験で用いた S 9 は、KC-500 (PCB) (鐘淵化学, 大阪) を 500 mg/kg. body weight の割合いで一回腹腔内に前投与し薬物代謝酵素の誘導を行ったラット (Wister-King rats, 体重 250~300 g) から無菌的に調製した肝臓ホモジネートを 9000 $\times$ g で遠心分離した上清分画である。試験に用いた S 9-mix. 0.5 ml 中には S 9 が 50 μ l 含まれている。変異原性試験は 1 検体当たり 2~3 枚のプレートにて試験し、その平均値を求め、別途対照プレートによって得られた自然復帰変異数を差し引いた数をその検体の変異原性とした。各テスト系の自然復帰変異体数は、TA 98+S 9: 31 $\pm$ 7 revertants/plate (n=12), TA 98-S 9: 27 $\pm$ 9 revertants/

plate (n=10), TA 100+S 9: 135 $\pm$ 23 revertants/plate (n=20), TA 100-S 9: 128 $\pm$ 17 revertants/plate (n=15), であった。

また、テスト系の信頼性を確認するために、試験時に並行して行った変異原性陽性物質である Benzo (a) pyren (5 μ g/plate) による復帰変異体数は、TA 98+S 9: 475 $\pm$ 49 revertants/plate (n=4), TA 100+S 9: 1993 $\pm$ 158 revertants/plate (n=10), であった。

実験結果

1. 尿路感染症患者尿から分離された細菌の硝酸還元能

尿路感染症起炎菌の硝酸還元能の実態を把握する目的で、尿路感染症患者尿から分離された 6 種類、35 株の細菌 (*E. coli* 13 株, *P. aeruginosa* 4 株, *P. mirabilis* 4 株, *S. marcescens* 3 株, *S. epidermidis* 4 株, *E. faecalis* 7 株) を 3.57 mM の硝酸イオンを含む培養液中で培養し、1 時間後の亜硝酸イオン生成量を測定することにより、各細菌の硝酸還元能を調べた。その結果が Table 1 である。37°C 1 時間処理により 1 μ M 以上の亜硝酸イオン濃度が検出されたものを硝酸還元能陽性とすれば、6 菌種のうち *E. faecalis* を除く 5 菌種に硝酸還元能が観察された。*E. coli* および *P. mirabilis* では、ほぼすべての菌株が他の菌種に比して強い硝酸還元能を示した。グラム陽性菌である *E. faecalis* は 7 株調べたがすべて陰性であった (0.0~0.3 μ M NO₂⁻)。 *P. aeruginosa*, *S. marcescens* および *S. epidermidis* では硝酸還元能が、菌株の違いによってかなり変動することが観察された。硝酸還元能の差はかなり大きく、今回の調査で陽性を示した菌株の中でも、最小値と最大値の間には約 160 倍もの開きが見られた (PA-1: 1.9 μ M NO₂⁻/hr, EC-4: 309.6 μ M NO₂⁻/hr)。次に細菌の硝酸還元能に基づく生成とその蓄積状況を見るために、硝酸還元能を示した各菌種の中から 1~4 株を用い、培養液中の亜硝酸イオン量を経時的に測定した。その結果が Fig. 1 である。亜硝酸生成のパターンは菌種、菌株によって異なるが、大きく 3 型に分けられる。1) インキュベーション開始後 3 時間までは、亜硝酸イオン量が急速に増加するが、その後亜硝酸イオン量が減少する型 (EC-7, EC-13, SM-3)。2) インキュベーション開始後 5 時間まで亜硝酸イオン量が連続的に増加する型 (EC-10, PM-4, SM-2, SE-1)。3) インキュベーション 5 時間まで亜硝酸イオン量の増加は見られるが、その増加速度はきわめ

Table 1 Nitrate reducing activity of bacterial strains isolated from patients with urinary tract infections

Species	*Strains	Nitrate-reducing activity ($\mu\text{M NO}_2^-/\text{hr}/10^7$ cells)
<i>E. coli</i>	EC-1	268.6
	EC-2	247.1
	EC-3	278.6
	EC-4	309.6
	EC-5	223.8
	EC-6	193.4
	EC-7	234.6
	EC-8	234.6
	EC-9	245.5
	EC-10	44.0
	EC-11	172.7
	EC-12	8.1
	EC-13	180.4
<i>P. aeruginosa</i>	PA-1	1.9
	PA-2	22.9
	PA-3	7.9
	PA-4	26.3
<i>P. mirabilis</i>	PM-1	198.6
	PM-2	191.4
	PM-3	178.6
	PM-4	111.9
<i>S. marcescens</i>	SM-1	161.4
	SM-2	66.6
	SM-3	18.3
<i>S. epidermidis</i>	SE-1	80.0
	SE-2	17.9
	SE-3	7.0
	SE-4	0.3
<i>E. faecalis</i>	EF-1	0.2
	EF-2	0.1
	EF-3	0.0
	EF-4	0.1
	EF-5	0.3
	EF-6	0.1
	EF-7	0.2

*EC, strain of *E. coli*; PA, *P. aeruginosa*; PM, *P. mirabilis*; SM, *S. marcescens*; SE, *S. epidermidis*; and EF, *E. faecalis*, isolated from patients with UTI at Kyushu University Hospital. Bacteria (1×10^7 cells/ml) were incubated for 1 hr at 37°C with sodium nitrate (3.57 mM) in Vogel-Bonner medium E (pH 7.2) containing 2% glucose. Nitrate-reducing activity was assayed as described in Materials and Methods, and is presented as $\mu\text{M NO}_2^-/\text{hr}/10^7$ cells.

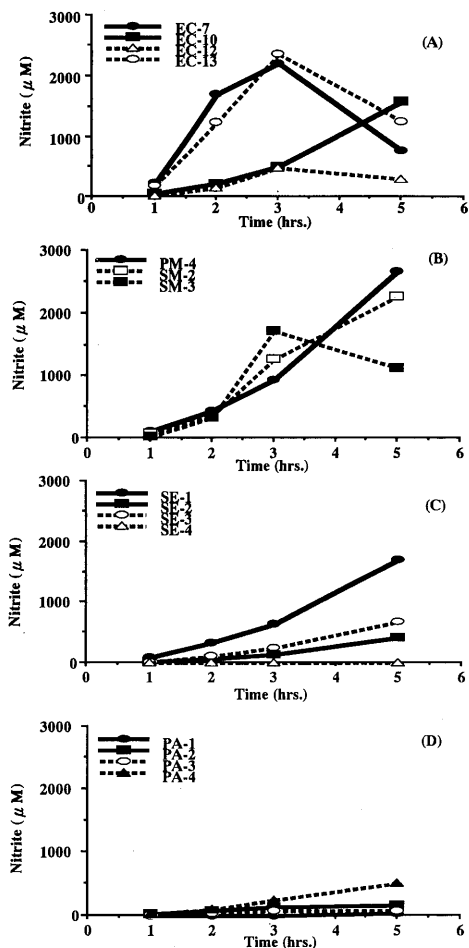


Fig. 1 Time course of nitrite formation from nitrate in nitrate-reducing bacteria. (A), *E. coli* (EC); (B), *P. mirabilis* (PM) and *S. marcescens* (SM); (C), *S. epidermidis* (SE); and (D), *P. aeruginosa* (PA). Treatments and assays were the same as described for Table 1, except for the indicated times of assaying during 5 hr of incubation.

て緩やかな型(SE-2, SE-3, PA-4)。この実験の中で最も高い亜硝酸イオン濃度が測定された *P. mirabilis* (PM-4) の5時間インキュベーション時点での値は $2.662 \mu\text{M}$ で、当初加えられた硝酸イオン量が $3,570 \mu\text{M}$ であったことを勘案すれば、その約75%が亜硝酸に還元されたことになる。

2. 模擬感染尿の変異原性試験

尿路感染起炎菌の介在により予想される尿の変異原性変化が Ames test により検出できるか否かを確認

する目的で、予試験的に喫煙者および非喫煙者の尿に、3種の尿路感染症起炎菌 (*E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*) をそれぞれ播種し増殖させた模擬的な感染尿を作製し、membrane filter にて除菌濾過し、得られた清澄な尿についてその変異原性を調べる実験を行った。これまでの報告から、ヒト尿の変異原性は、代謝活性化系 (S9-mix) を加えた試験系でよく検出されていることから、本実験の変異原性試験は S9-mix を加えた条件下でのみ行った。その結果が Fig. 2 である。細菌感染による尿の変異原性は非感染尿の場合に比べ、*S. marcescens* や *P. aeruginosa* の感染で約 20~80% の変異原性の増加が観察された。しかし、*E. coli* による感染では非感染尿より約 60~80% 低い変異原性が検出される結果となった。非喫煙者尿を用いた実験でも TA100 による試験系ではこの傾向がみられた (99% 低下)。

Fig. 3 (A) および (B) は変異原性の増強が見られた *S. marcescens* および *P. aeruginosa* を作用させた喫煙者尿および菌を作用させていない対照尿の変異原性について、その用量-反応関係を示したものである。変異原性試験に用いる尿濃縮物の溶液量を 20~160 μ l (原尿 4~32 ml に相当) まで変化させその変異体数の変化を調べたが、この範囲では両者ともほぼ直線的な比例関係を示し、また菌を作用させた尿の方が対照尿より高い活性を示した。この結果は、少なくとも感

染菌の作用により新しい変異原物質が追加的に生成された可能性を示唆している。また両者とも試験菌に対する致死作用は調べた濃度範囲では認められなかった。

3. 亜硝酸で処理された尿濃縮物の変異原性

尿路感染症患者から分離された細菌の硝酸還元能に関する以上の実験結果から、多くの尿路感染症起炎菌が硝酸を亜硝酸に還元する能力を有していることが判明した。そこで、ヒト尿の中に存在する種々多様な化学物質と亜硝酸との反応生成物がいかなる変異原性を示すかを知る目的で、WHO が提唱した方法⁵⁾ に準拠し、尿濃縮物に亜硝酸ナトリウムを化学的に作用させる実験を行った。最初に、XAD-2 樹脂による吸着濃縮法を用いて得られ喫煙者尿の尿濃縮物に 40 mM の亜硝酸ナトリウムを、pH 3 の条件下で反応させ、その変異原性の変化を調べた。その結果が、Fig. 4 である。原尿 5 ml 相当の尿濃縮物単独では、いずれの試験系でも 50 revertants/plate 以下であるが、亜硝酸処理により尿濃縮物の変異原性はいずれの試験系でも顕著な増加が観察された。とくに、-s9 の試験系すなわち代謝活性化を行わない試験系で高い変異原性が検出され、いわゆる direct-acting mutagen が亜硝酸処理によって生成することが明白に示された。この尿濃縮物の亜硝酸処理により生成した direct-acting mutagen の活性は、尿濃縮物単独での活性にくらべ TA 98 では約 120 倍、TA 100 でも約 10 倍強力な変異原活性を示した (Fig.

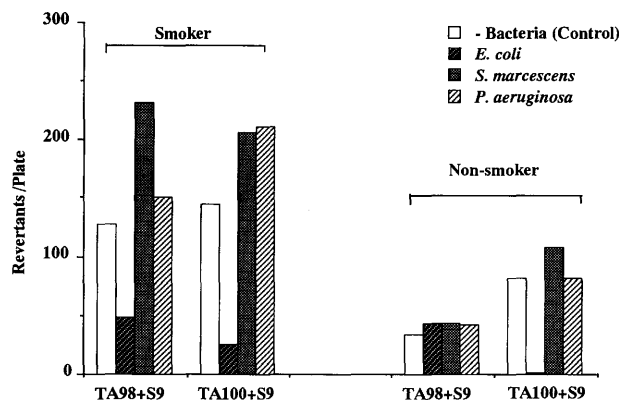


Fig. 2 Effect of nitrate-reducing bacteria on the mutagenic activity of smokers' and non-smokers' urine after 72 hr of incubation. The pooled urine (100 ml) from smokers or non-smokers was incubated for 72 hr at 37°C with or without the addition of bacteria (10^5 cells/ml) in Vogel-Bonner medium E containing 2% glucose (pH 7.2). After incubation, the mixtures were concentrated by adsorbing mutagens to an XAD-2 resin column as described in Materials and Methods. Each concentrate equivalent to 40 ml of original urine was assayed for mutagenic activity to *Salmonella* strains TA100 and TA98 in the presence of S9-mix. Activities are shown as the number of revertants per plate.

4). 次に、この変異原物質生成に及ぼす pH の影響を調べたところ、この生成反応の至適 pH は 4.0 付近にあることが確認された (Fig. 5)。いずれの試験系でも、pH 4 での反応生成物が最も高い変異原性を示し、pH 4 から離れるに従ってその生成量は減少して行くことが観察された。しかしながら、TA 100-S9 の試験系では、ヒトの尿の生理的 pH の範囲である pH 4.7~8 の条件下でも有意の変異原性 (自然復帰変異体数の 2 倍以上) が検出され注目された。この変異原物質の生成速度ならびにその安定性をみるために、尿濃縮物に亜硝酸を加えた溶液を pH 4, 37°C の条件下でインキュベーションを行い、経時的に反応液の変異原性の変化を 8 時間にわたり追跡した。その結果は Fig. 6 に示されるように TA 100-S9 での試験成績で見ると、亜硝酸を添加して最初に採取した 30 分後の試料の変異原性が最も高く、それ以降は徐々に減少する

傾向を示し、8 時間後の活性は、30 分後の活性に比べ約 50% 低下した。

4. 一般健康成人の尿濃縮物の亜硝酸処理による変異原性の変化

尿濃縮物に亜硝酸が作用して direct-acting mutagen が生成されることの普遍性をみるために、一般の健康な成人男子 (喫煙者 14 名、非喫煙者 6 名) から採取された尿の濃縮物を、pH 6 の条件下で亜硝酸処理しその変異原性変化を最も感度良く検出できる TA 100-S9 の試験系で調べた。その結果が Fig. 7 である。すべての検体において亜硝酸処理による変異原性の上昇が認められたが、その上昇率は 1.3 倍 (subject No 15) から 53 倍 (subject No 14) と大きな個人差が見られた。原尿の変異原性を平均値±標準偏差でみると喫煙者群で 100.7 ± 72.4 revertants/100 ml 尿、非喫煙者群で 105 ± 70.9 revertants/100 ml 尿と両群

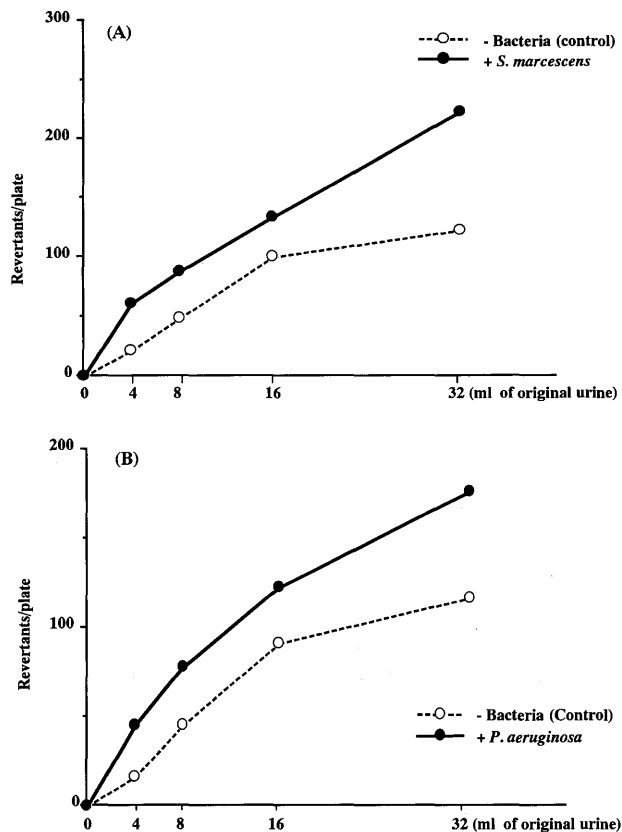


Fig. 3 Dose-response curves for mutagen formation in the smokers' urine after 72hr of incubation with nitrate-reducing *S. marcescens* (A) and *P. aeruginosa* (B). Treatments and assays were the same as described in Fig. 2, except that varying amounts of samples were assayed in the case of smokers' urine. Assays were performed with TA100 in the presence of S9mix.

間に差は見られなかった。しかし亜硝酸で処理することにより、喫煙者群で 358.6 ± 119.7 revertants/100 ml 尿、非喫煙者群で 288 ± 151.6 revertants/100 ml 尿と、いずれの群もそれぞれ原尿の変異原性に比べ有意な上昇を示した (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.05$)。個人間の上昇率でみると、非喫煙者では 1.3~9.8 倍であったのに対し、喫煙者では 1.7~53 倍

と非喫煙者に比べ高い上昇率を示す傾向が見られ、10 倍以上の上昇を示す人 (No. 11, 12, 13, 14) も見られた。亜硝酸処理後の変異原性をみると喫煙者群の方が非喫煙者群に比べ 70 revertants/100 ml 尿ほど高い平均値を示したがその差は統計学的に有意なものではなかった (Wilcoxon rank-sum test)。また、亜硝酸による処理前後の変異原性についてその相関関係を調

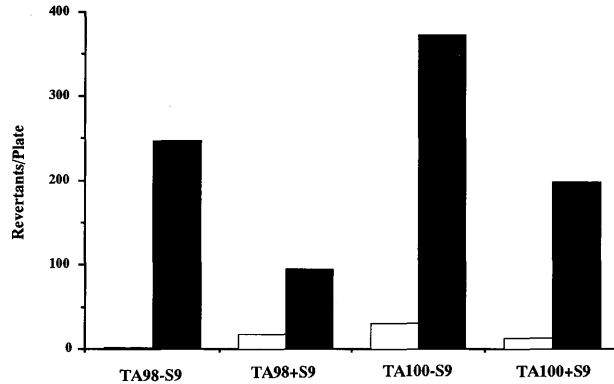


Fig. 4 The mutagen formation in the smokers' urine concentrate after 4 hr of incubation with sodium nitrite (40mM) at pH 3. The concentrate (equivalent to 125 ml of original urine) from pooled smokers' urine was incubated at 37°C for 4hr at pH 3, with or without sodium nitrite (40mM) and reactions were stopped by the addition of ammonium sulfate. The samples were assayed for mutagenic activity to *Salmonella* strains TA100 and TA98, in the presence or absence of S9 mix. Activities are expressed as the number of revertants per equivalent to 5 ml of original urine. Black and white bars represent the mutagenic activities of urine concentrates incubated with or without sodium nitrite, respectively.

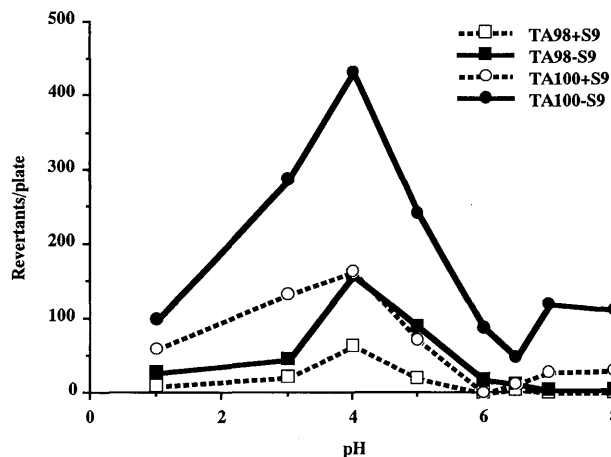


Fig. 5 The effect of pH on the mutagen formation in the smokers' urine concentrate after 4 hr of incubation with sodium nitrite (40mM). Treatments and assays were the same as described in Fig. 4, except that samples were assayed at varying pHs. Activities are shown as the numbers of revertants per equivalent to 5 ml of original urine.

べてみたが有意な関係は認められなかった ($R=0.009$).

考 察

膀胱腫瘍の危険因子の一つとして尿路感染症の既往を示唆する疫学的調査研究の報告が1963年 Wynderら⁵⁰⁾によって出された。以来、尿路感染症の既往と膀胱腫瘍との関係に関する疫学的調査研究が各地で実施され、また一方では尿路感染症による膀胱腫瘍発症の機序解明に関する多くの実験的研究がなされてきた。

しかし、いまだにこの尿路感染症による膀胱腫瘍の発症という因果関係は確証されたとは言い難い。

これまでになされた膀胱腫瘍に関する疫学的調査研究の報告を概観してみると、尿路感染症既往者群の無既往者群に対する相対危険度 (RR) は1.0~4.9の範囲であり、必ずしも強い関連性を示す結果ばかりではないが、総じて尿路感染症の既往が膀胱腫瘍の発症に関連していることを示唆する報告の方が多い。唯一、Kjaer らが行ったコペンハーゲンでの調査²²⁾では、RR は1.0であり尿路感染症の既往と膀胱腫瘍の発症

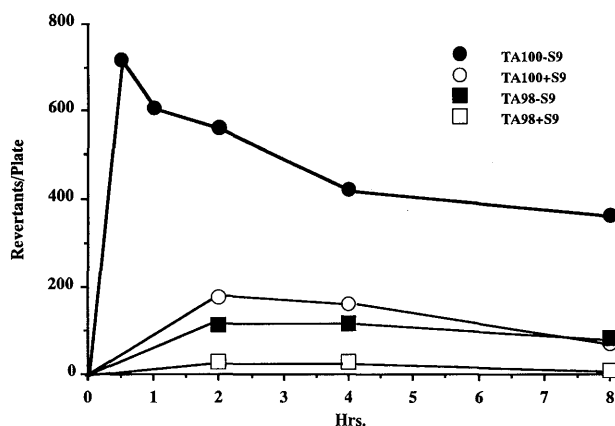


Fig. 6 Time course of mutagen formation in the smokers' urine concentrate during 8 hr of incubation with sodium nitrite (40mM) at pH 4. Treatments and assays were the same as described in Fig. 4, except that samples were taken at various intervals and then assayed.

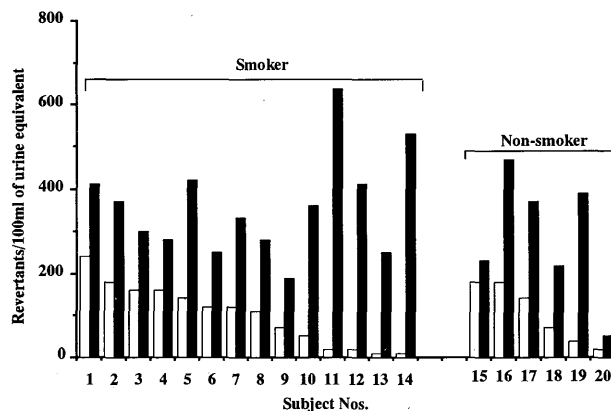


Fig. 7 Comparison of mutagenic activity of individual smokers' and non-smokers' urine concentrate after 30 min of incubation with sodium nitrite (40 mM) at pH 6. Individual urine concentrates from 14 male smokers and 6 male non-smokers were used. Treatments and assays were similar to those described in Fig. 4, except that assays were made only with TA100 in the absence of S9 mix. Black and white bars represent the mutagenic activities of urine concentrates incubated with or without sodium nitrite, respectively.

との間に関連性は認められなかったと報告している。Kjaer らはその論文²²⁾の中で、これまでの疫学調査には尿路感染症既往者の相対危険度を上昇させるような情報の偏り (Bias) があるのではないかと指摘している。即ち、膀胱腫瘍の初期時に尿路感染症を併発している例が臨床的にしばしば経験されるところから、膀胱腫瘍の初期段階であるにも拘わらず、併発している尿路感染症のみを診断し、後年腫瘍が顕在化して始めて膀胱腫瘍と診断している場合があるのではないか。もしそういう例が調査対象者のなかに混在しているとすれば、尿路感染症と膀胱腫瘍発症との関連性はより強められた結果となるであろうということである。これと同様な意見は、Silverman ら⁴⁵⁾による「膀胱腫瘍の疫学」という最近の総説の中でも述べられている。尿路感染症が膀胱腫瘍の危険因子の一つであることが、広く一般に認められるためには、原因と結果の時間的関係を明確に示す必要がある。しかし従来のような回顧法 (Retrospective study) による疫学調査では、正確な情報収集にも限度があり、尿路感染が膀胱腫瘍の発症より先行していたということを実証することはきわめて難しいことと思われる。

もし、実験的に尿路感染症による膀胱腫瘍発症の機序が解明出来れば、この因果関係を論ずる場合の有力な証拠になると考えられる。尿路感染症は下部尿路系の細菌感染によって起こり膀胱粘膜などに炎症を伴っている場合が多い。したがってこれらの臨床的特徴をふまえ、膀胱腫瘍発症への機序に関する研究の焦点も、細菌の持つ生化学的作用を中心に置いているものと、炎症組織がもつ特異的な組織学的性質を重要視しているものがある。後者の研究では、炎症を伴った組織は正常組織と比較して発癌物質の発癌刺激を受けやすく癌の母地になり易いという見地に立ったものである。尿路感染症による炎症組織が、癌の母地になり易いということであって、遺伝子に変異を起こさせる発癌物質のような作用物質が存在していなければならない。

尿路感染症起炎菌である腸内細菌は本来周囲の物質に対して多彩な代謝能力を有している。その中で、膀胱腫瘍との関連から、注目すべき作用として、細菌が有している Nitroreductase による硝酸の亜硝酸への還元や β -glucuronidase によるグルクロン酸抱合体の加水分解⁴⁶⁾などが取り上げられてきた。なかでも発癌物質であるニトロソアミン類の NO 供与体の一つである亜硝酸の生成は、尿中に多量の硝酸塩と共にもう一方の前駆物質であるジメチルアミン、ピロリジン、ピペリジンなどの二級アミン類が存在していることか

ら最も注目されてきた⁴⁸⁾。尿中の硝酸塩量は、食事の内容に大きく影響を受けるが、硝酸塩の主たる供給源は野菜である。Mizutani ら³⁰⁾は、73 人の尿路感染症患者、47 人の尿路感染症でない一般患者および 25 人の一般健康人から採取した尿について、硝酸イオン量ならびに亜硝酸イオン量を調査した。その結果によれば、尿路感染症でない一般患者および一般健康人の尿中硝酸イオン量は、それぞれ、 $1510 \pm 1110 \mu\text{mol/l}$ 、 $1560 \pm 760 \mu\text{mol/l}$ で、亜硝酸イオンは検出されていない。しかし、尿路感染症患者 73 人のうち 18 人 (25%) の尿から亜硝酸が検出されその濃度は $334 \pm 274 \mu\text{mol/l}$ であり、個々人の亜硝酸イオン量が、硝酸イオン量と統計学的に有意の相関関係にあることから、亜硝酸イオンの生成量は、感染時前の尿中硝酸イオン量に依存すると報告している。尿路感染症患者の尿中亜硝酸量を測定した他の報告の中から、亜硝酸が検出された人の割合をみると、イギリス Hick ら¹²⁾の報告では 64%、フランス Ohshima ら³⁷⁾の報告では 48% であり、日本における Mizutani ら³⁰⁾の報告 25% と大きな差が見られる。もし尿路感染症起炎菌による亜硝酸の生成が膀胱腫瘍の発症に関与しているとするれば、これらの差は尿路感染症と膀胱腫瘍との因果関係を調査する場合に、亜硝酸生成の有無に拘わらず、一律に尿路感染症として取り扱うことには、問題があることを示唆しており、その原因を探る必要がある。一般にグラム陰性菌は硝酸還元能を有しており、グラム陽性菌では硝酸還元能を有しないか、弱いといわれていることから、調査地域あるいは調査施設などの違いによって、尿路感染症患者の起炎菌の菌種あるいは菌株に偏りがあるために上記のごとき差が出てきている可能性が考えられる。

尿路感染症患者からは種々の菌が分離されるが、菌種あるいは菌株の違いによる硝酸還元能の差異を検討した報告は、きわめて少ない。そこで、九州大学医学部附属病院の尿路感染症患者から分離された、4 種のグラム陰性菌 (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*) および 2 種のグラム陽性菌 (*S. epidermidis*, *E. faecalis*)、計 6 種の菌について、その硝酸還元能を比較した。その結果、*E. faecalis* を除く 5 菌種で硝酸還元能が確認され、菌種間だけでなく、菌株間でもその能力に大きな差がみられ、最大値と最小値との間には約 160 倍もの開きがあった。硝酸還元能を有しないか、弱いとされているグラム陽性菌である *E. faecalis* については 7 株調べすべて陰性であったが、*S. epidermidis* では 4 株中 3 株が、硝酸還元能を有して

いた。 *E. coli*, *P. mirabilis* については、それぞれ 13 株と 4 株について調べたがすべて陽性であり、高い硝酸還元能が観察された (Table 1)。 *E. coli* は、急性単純性膀胱炎患者に最も高頻度に検出される菌種であり、九州大学医学部附属病院泌尿器科外来での尿路感染分離菌調査⁹⁾でも全体の 17.6% を占め最も高い検出率となっている。因みに、同調査報告の中から今回調べた他の菌種の検出率状況を見てみると *Enterococcus* 属 17.3%, *P. aeruginosa* 10.3%, *Streptococcus* 属 9.2%, *Proteus* 属 5.4%, *Serratia* 属 1.6% となっており、硝酸還元能を有しない *Enterococcus* 属の高い検出率が注目された。またこの *Enterococcus* 属は、反復する尿路感染症を起こしやすい慢性複雑性尿路感染症が中心となる同施設の入院患者での尿路感染分離菌調査では 19.6% と一番多く、外来で最も検出率の高かった *E. coli* は 6.1% にとどまっていた。以上のことから、尿路感染症患者の中には硝酸還元能を有しない起炎菌による尿路感染症患者が、無視できない頻度で混在していることが本調査研究によって明白にされた。しかしながら、多くの起炎菌が硝酸還元能を有しており、中には添加した硝酸量の 60~70% を 3~5 時間のインキュベーションで亜硝酸に還元する強力な菌株が存在していることも確認された (EC-13, PM-4 in Fig. 1)。

亜硝酸が二級あるいは三級アミノ化合物と酸性域で容易に反応し、ニトロソ化合物を生成する事はかなり以前から知られていたが、Suzuki ら⁴⁶⁾ や Calmels ら²⁾ は、腸内細菌の中にはその酵素的触媒作用によって、中性域でもニトロソ化反応を進行させる菌が存在している事を実証している。尿路感染症患者の尿中ニトロソアミンの分析は、1972 年 Brooks ら¹⁾ がガスクロマトグラフィー (GC) を用いて行い、尿 1 ml 当たり 0.5 μmol ものジメチルニトロソアミン (NDMA) が検出されたと報告し大いに注目された。しかし、その後ニトロソアミン類の分析値には artefact としての誤差が含まれている²⁷⁾ ことが判明し、分析法の改良が重ねられた。現在最も信頼できる方法と言われているものは、GC を TEA (Thermal Energy Analyzer) 装置に連結させたものである。この装置を使った、Tricker ら⁴⁸⁾ の、最近の報告では、尿中 NDMA 量は最高でも一日尿当たり 18.9 nmol であり、1 日尿を 1 L として計算すれば尿 1 ml 当たりの NDMA 量は、18.9 μmol と Brooks らの報告値 (0.5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$) に比べると約 26000 分の 1 ときわめて微量なものになっている。NDMA 以外のジエチルニトロソアミン (NDMA)、ニ

トロソピロリジン (NPYR)、ニトロソピペリジン (NPIP) の定量もこの GC-TEA 装置を使って行っているが、NDMA の量と同レベルの量である。NDMA をはじめとして、多くのニトロソアミンは強力な発癌物質であり、尿路感染症患者からこれらのニトロソアミン類が検出されたということは、極く微量であるとはいえず、膀胱腫瘍発症のイニシエーターとして作用している可能性を否定することは出来ない。しかし、最近 Lijinsky ら²⁸⁾ は、ラットの膀胱内に NDMA や NDEA など 15 種のニトロソ化合物を注入し、その発癌性を観察する実験を行ったところ、NDMA 注入群では、腎臓や肺に、NDEA 注入群では、肝臓や食道に腫瘍が発生し、膀胱には腫瘍の発生は認められなかったという報告をした。この動物実験結果は、尿路感染症による膀胱腫瘍の発症機序として最も高い可能性を秘めていた尿路感染症起炎菌による亜硝酸の生成とそれに続く癌原性ニトロソ化合物の生成という考えを大きく混乱させることになった。

そこでわれわれは、亜硝酸との反応生成物の中にはニトロソアミン以外の癌原性物質も生成しているのではないかと考え、感染尿の癌原性という観点から再検討することにした。

一般に、発癌物質の検索には多くの労力と時間を必要とするが、発癌物質の Prescreening 法として、Ames らは特別な工夫を施した *Salmonella* 菌による変異原性試験 (Ames test) を開発²⁹⁾ した。以来、この Ames test は多方面で利用され多くの成果をあげてきた。尿の変異原性については、Yamazaki ら⁵⁷⁾ が、XAD-2 樹脂による尿中物質の吸着濃縮法を報告して以来、喫煙や食事による変異原物質 (発癌物質) の摂取、あるいは有害化学物質への暴露指標として、この Ames test による尿の変異原性試験が有用であることを示唆する多くの報告¹¹⁾¹⁶⁾²¹⁾²⁴⁾³⁹⁾⁴²⁾⁵⁴⁾ がなされてきた。

そこで、予備試験としてこの Yamazaki ら⁵⁷⁾ の方法に準拠して、健康な成人男子からえられた尿に起炎菌を接種し増殖させた模擬感染尿を作製し、その変異原性試験を試みた。その結果、*S. marcescens* および *P. aeruginosa* を感染させた尿にわずかではあるが、変異原性の増強が観察され、感染菌の介在によって新たな変異原物質が生成していることを示唆する結果が得られた (Fig. 2, Fig. 3 (A) & 3 (B))。しかし、*E. coli* による感染尿では、逆に非感染尿より低い変異原性を示す結果となり、本実験方法の中に尿中変異原物質の一部を除去する操作過程が含まれているのではないか

と考えられた。腸内細菌のなかには変異原物質を吸着するものがあるという報告³¹⁾があることから、感染尿では尿中の変異原物質の一部が菌体に吸着されている可能性が最も強く疑われた。感染尿の変異原性をYamazakiらの前処理方法を用いAmes testで調べるには、感染尿中に混在している菌を除く処理は必要不可欠であり尿中に生成された変異原物質の活性を定量的に測定するには、他の実験系による検討が必要と考えられた。

近年、アミノ化合物を含む飲食品や薬品を亜硝酸処理し、その反応生成物をAmes testによって調べること⁷⁾¹⁰⁾³³⁾³⁶⁾³⁸⁾⁴⁷⁾⁴⁹⁾⁵²⁾が盛んに行われ、亜硝酸処理によってニトロソアミン以外の変異原物質も生成されることが判明してきた。そこで、WHOが提唱している標準的な方法⁵⁾を用い、XAD-2樹脂で吸着濃縮された尿濃縮物を亜硝酸で処理し、その反応生成物をAmes testで調べ、変異原物質が生成しているか否かを検討することにした。その結果、著明な変異原性の増強が見られ、その強い変異原性は代謝活性化の有無に拘わらず、またTA 98, TA 100 いずれの試験菌でも認められた。とくに注目されたのは、TA 98, TA 100 いずれの試験菌でも代謝活性化を行わない試験系の方が、代謝活性化を行った試験系より高い変異原性が認められたことである。一般にヒトの尿の変異原性は、代謝活性化を行った試験系で高感度に検出される¹¹⁾²¹⁾³⁹⁾⁵⁷⁾ところから、尿中の変異原物質はPromutagenが主体と考えられてきた。前述したNDMAやNDEAなどのニトロソ化合物も代謝活性化を必要とするPromutagenであり、本実験で検出された尿濃縮物の亜硝酸処理により生成した変異原物質の主体は、従来注目されていたNDMAやNDEAのようなニトロソ化合物ではないと考えられた。この代謝活性化を必要としない変異原物質、いわゆるdirect-acting mutagenの生成は、pH 4.0で最高となり、量的には少なくなるがヒト尿の生理的pH範囲であるpH 4.7~8.0の条件下でも生成することが確認された (Fig. 4)。この変異原性が単一物質に因るものなのかそれとも複数物質によるものなのか、現時点では不明であり今後詳細な検討をする必要がある。一般成人男子の健康人20名の尿試料について同様な実験を行った結果でも、亜硝酸処理により顕著な変異原性の増強がすべての試料で見られた。今回の実験では100 mlの尿から得られた尿濃縮物に40 μ molの亜硝酸イオンを作用させた。実際の感染尿では尿中物質はもっと希薄な濃度状態で存在しているが、尿100 ml中40 μ molの亜硝酸イオン量は、尿路感染

症患者の尿では考えられ得る量であり、本実験で示された新しいタイプと推定されるdirect-acting mutagenの生成は尿路感染症患者の膀胱内でも進行し得ると思われる。このdirect-acting mutagenの正体は現時点では不明であるが、本研究で示された亜硝酸処理による変異原性の上昇率が非喫煙者群の尿より喫煙者群の尿の方が高い傾向を示したという結果は、喫煙由来の物質がこのdirect-acting mutagenの前駆物質として関与している可能性を示唆している (Fig. 7)。また、これまでになされた日常飲食品の亜硝酸処理で種々のdirect-acting mutagenが検出⁷⁾¹⁰⁾³⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁹⁾⁵²⁾されており、飲食品由来のnitrosatable compoundが尿中に排泄されてきている可能性も考えられる。Ochiai ら³⁵⁾は醤油の亜硝酸処理によって生成されるdirect-acting mutagenとして3-diazo tyraminを同定している。またFujita ら⁶⁾はこの3-diazo tyraminを飲料水に混ぜラットに投与したところ、高頻度 (28匹中19匹)に口腔癌が発生したと報告している。

本研究によってはじめて明かにされた尿濃縮物と亜硝酸との反応によってdirect-acting mutagenが生成するという結果は、尿路感染症によって従来考えられてきたニトロソアミン類とは異なる変異原物質 (発癌物質)が生成されることを示唆するものできわめて注目すべき知見である。今後尿路感染症と膀胱腫瘍との因果関係を追究する上からも、このdirect-acting mutagenの正体を明かにし、その癌原性を検討していく必要がある。

総 括

1. 尿路感染症患者から分離された起炎菌の多くが、硝酸を還元し亜硝酸を生成させる能力を有しているが、硝酸還元能を有しない起炎菌も存在することが実証された。

2. 硝酸還元能を有する起炎菌の菌種間でも、また同一菌種の菌株間でも、その硝酸還元能には大きな差が観察された。

3. ヒトの尿濃縮物に亜硝酸を作用させると、尿の変異原性が著しく高まることを見いだした。

4. ヒトの尿濃縮物と亜硝酸との反応によって生成された変異原物質の主体は、代謝を必要としないDirect-acting mutagenであった。

5. Direct-acting mutagenの生成は、pH 4で最高値を示すが、ヒト尿の生理的pH範囲においても生成することが明らかにされた。

6. 本研究により、従来考えられていたニトロソア

ミン類とは異なる変異原物質（発癌物質）が尿路感染症によって、膀胱内に生成されている可能性が強く示唆され、膀胱腫瘍発症の癌原物質という観点からも注目される。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導いただきました熊澤淨一教授、石西伸九州大学名誉教授に深甚なる感謝の意を表します。また、技術的援助、御助言、御校閲をいただきました稲益建夫先生（現在、福岡大学医学部公衆衛生学教室助教授）、石澤實先生（現在、東京理科大学生命化学研究所客員研究所員）に心より感謝の意を表しますと共に、技術的援助、御助言をいただきました河野博巳先生（現在、筑豊労災病院泌尿器科部長）に深謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり、細菌をご提供頂きました九州大学医学部附属病院中央検査部竹森紘一先生、試料の採取にご協力を頂きました九州大学医学部泌尿器科教室ならびに衛生学講座の教室員各位に深謝いたします。

なお、本研究の一部は、文部省科学研究費（奨励研究 A、課題番号 63771205）によるものである。

文 献

- 1) Brooks JB, Cherry WB, Thacker L and Alley CC: Analysis by gas chromatography of amines and nitrosamines produced in vivo and in vitro by proteus mirabilis. *J. Infect. Dis.* 126: 143-153, 1972.
- 2) Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM and Bartsch H: Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains. *Carcinogenesis* 6: 911-915, 1985.
- 3) Clayton DB and Cooper EH: Cancer of the urinary tract. *Adv. Cancer Res.* 13: 271-381, 1970.
- 4) Cohen SM and Johansson SL: Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Urol. Clin. North Am.* 19: 421-428, 1992.
- 5) Coulston F and Olajos EJ: Toxicology of N-nitroso compounds. in Gibson GG and Ioannides C (Eds.); Safety evaluation of nitrosatable drugs and chemicals. pp. 104-117, Taylor and Francis, London, 1981.
- 6) Fujita Y, Wakabayashi K, Takayama S, Nagao M and Sugimura T: Induction of oral cavity cancer by 3-diazotyramine, a nitrosated product of tyramine present in foods. *Carcinogenesis* 8: 527-529, 1987.
- 7) Gatehouse D and Wedd D: The bacterial mutagenicity of three naturally occurring indoles after reaction with nitrous acid. *Mutat. Res.* 124: 35-51, 1983.
- 8) 原岡正志, 松本哲朗, 江頭稔久, 高野徳昭, 津江裕昭, 橋谷光, 横溝晃, 尾形信雄, 水之江義充, 田中正利, 高橋康一, 久保周太, 熊澤淨一: 尿路感染分離菌の年次的変遷 (第 16 報). *西日泌尿* 55: 1333-1344, 1993.
- 9) Hartge P, Harvey EB, Linehan WM, Silverman DT, Sullivan JW, Hoover RN and Fraumeni JF Jr: Unexplained excess risk of bladder cancer in men. *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 1636-1640, 1990.
- 10) Hayatsu, H and Hayatsu, T: Mutagenicity arising from boiled rice on treatment with nitrous acid. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 1021-1023, 1989.
- 11) Hayatsu H, Hayatsu T and Ohara Y: Mutagenicity of human urine caused by ingestion of fried ground beef. *Jpn. J. Cancer Res.(Gann)* 76: 445-448, 1985.
- 12) Hicks RM, Gough TA and Walters CL: Demonstration of the presence of nitrosamines in human urine: preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infection. *IARC Sci. Publ.* 19: 465-475, 1978.
- 13) 本田正幸: 膀胱腫瘍のリスク要因としての膀胱炎に関する実験的研究—N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) 誘発ラット膀胱発癌に及ぼす炎症の影響—. *日衛誌*. 41: 851-869, 1986.
- 14) Howe GR, Burch JD, Miller AB, Cook GM, Esteve J, Morrison B, Gordon P, Chambers LW, Fodor G and Winsor GM: Tobacco use, occupation, coffee, various nutrients, and bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 64: 701-713, 1980.
- 15) IARC: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Tobacco smoking. pp. 107-108, 1986.
- 16) 稲益建夫, 北森成治, 石澤実, 久永明, 石西伸: 某精練工場における従業員の尿の突然変異原性テスト. *産業医学* 23: 640-641, 1981.
- 17) Junk GA, Richard JJ, Grieser MD, Witiak D, Witiak JL, Arguello MD, Vick R, Svec HJ, Fritz JS and Calder GV: Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants. *J. chromatogr.* 99: 745-762, 1974.
- 18) Kälble T, Möhring K, Tricker AR, Ovelgönne HR and Schlag P: Adenocarcinoma of the colon following ureterosigmoidostomy. *Akt. Urol.* 20: 173-178, 1989.
- 19) Kantor AF, Hartge P, Hoover RN and Fraumeni JF Jr: Epidemiological characteristics of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the bladder. *Cancer Res.* 48: 3853-3855, 1988.
- 20) Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW and Fraumeni JF Jr: Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am. J. Epidemiol.* 119: 510-515, 1984.
- 21) Kawano H, Inamasu T, Ishizawa M, Ishinishi N and Kumazawa J: Mutagenicity of urine from young male smokers and nonsmokers. *Int.*

Arch. Occup. Environ. Health 59: 1-9, 1987.

22) Kjaer SK, Knudsen JB, Sørensen BL and Jensen OM: Copenhagen case control study of bladder cancer—Review of the role of urinary tract infection. Acta Oncologica 28: 631-636, 1989.

23) 勸厚生統計協会: 国民衛生の動向, 厚生指標, 40(9) pp. 427, 1993.

24) Krøkje Å, Tiltne A, Mylius E and Gullvåg B: Testing for mutagens in an aluminium plant—The results of *Salmonella typhimurium* tests on urine from exposed workers. Mutat. Res. 204: 163-172, 1988.

25) 黒石哲生, 早川式彦, 栗原登, 青木國雄: 世界各国のがん死亡の動向, 青木國雄, 栗原登, 富永祐民, 花井彩 編集, 「がん・統計白書—罹患/死亡/予後—1993」第1版, pp. 187-276, 篠原出版, 東京, 1993.

26) 黒石哲生, 広瀬加緒瑠, 富永祐民, 小川浩, 田島和雄: 日本のがん死亡の将来予測, 青木國雄, 栗原登, 富永祐民, 花井彩 編集, 「がん・統計白書—罹患/死亡/予後—1993」第1版, pp. 171-185, 篠原出版, 東京, 1993.

27) Lijinsky W: Chemistry and biology of N-nitroso compounds. pp. 50-54, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1992.

28) Lijinsky W, Thomas BJ and Kovatch RM: Local and systemic carcinogenic effects of alkylating carcinogens in rats treated by intravesicular administration. Jpn. J. Cancer Res. 82: 980-986, 1991.

29) Maron DM and Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. 113: 173-215, 1983.

30) Mizutani T, Akinaga N and Takatera H: Urinary nitrite in Japanese patients with urinary tract infection. Sci. Total Environ. 80: 161-165, 1989.

31) Morotomi M and Mutai M: In vitro binding of potent mutagenic pyrolyzates to intestinal bacteria. J. Natl. Cancer Inst. 77: 195-201, 1986.

32) Morrison AS, Buring JE, Verhoek WG, Aoki K, Leck I, Ohno Y and Obata K: An international study of smoking and bladder cancer. J. Urol. 131: 650-654, 1984.

33) Münzner, R and Wever J: Mutagenic activity in the stomach and small intestine of rats after oral administration of nitrosated beef extract. Cancer Letters. 25: 225-230, 1984.

34) 日本薬学会編: 衛生試験法・注解 1973, pp. 705-707, 金原出版, 東京, 1973.

35) Ochiai M, Wakabayashi K, Nagao M and Sugimura T: Tyramine in a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by a nitrite. Gann 75: 1-3, 1984.

36) Ochiai M, Wakabayashi K, Sugimura T and Nagao M: Mutagenicities of indole and 30 deriva-

tives after nitrite treatment. Mutat. Res. 172: 189-197, 1986.

37) Ohshima H, Calmels S, Pignatelli B, Vincent P and Bartsch H: N-nitrosamine formation in urinary-tract infection. IARC Sci. Publ. (No 84), pp. 384-390, 1987.

38) Ohta T, Oribe H, Kameyama T, Goto Y and Takitani S: Formation of a diazoquinone-type mutagen from acetaminophen treated with nitrite under acidic conditions. Mutat. Res. 209: 95-98, 1988.

39) Ohya S, Inamasu T, Ishizawa M, Ishinishi N and Matsuura K: Mutagenicity of human urine after the consumption of fried salted salmon. Fd. Chem. Toxic. 25: 147-153, 1987.

40) Paigen K, Peterson J and Paigen B: Role of urinary β -glucuronidase in human bladder cancer. Cancer Res. 44: 3620-3623, 1984.

41) Piper JM, Matanoski GM and Tonascia J: Bladder cancer in young women. Am. J. Epidemiol. 123: 1033-1042, 1986.

42) Putzrath RM, Langley D and Eisenstadt E: Analysis of mutagenic activity in cigarette smokers' urine by high performance liquid chromatography. Mutat. Res. 85: 97-108, 1981.

43) Radomski JL, Greenwald D, Hearn WL, Block NL and Woods FM: Nitrosamine formation in bladder infections and its role in the etiology of bladder cancer. J. Urol. 120: 48-50, 1978.

44) Risch HA, Burch JD, Miller AB, Hill GB, Steele R and Howe GR: Dietary factors and the incidence of cancer of the urinary bladder. Am. J. Epidemiol. 127: 1179-1191, 1988.

45) Silverman DT, Hartge P, Morrison AS and Devesa SS: Epidemiology of bladder cancer. Hematol. Oncol. Clin. North Am. 6: 1-30, 1992.

46) Suzuki K and Mitsuoka T: N-nitrosamine formation by intestinal bacteria. IARC Sci. Publ. (No 57), pp. 275-282, 1984.

47) Tomita I, Kinai N, Nakamura Y and Takenaka H: Mutagenicity of various Japanese foodstuffs treated with nitrite. II. Directly-acting mutagens produced from N-containing compounds in foodstuffs. IARC Sci. Publ. (No 57), pp. 33-41, 1984.

48) Tricker AR, Pfundstein B, Kalble T and Preussmann R: Secondary amine precursors to nitrosamines in human saliva, gastric juice, blood, urine and faeces. Carcinogenesis 13: 563-568, 1992.

49) Tsuda M, Nagao M, Hirayama T and Sugimura T: Nitrite converts 2-amino- α -carboline, an indirect mutagen, into 2-hydroxy- α -carboline, a non-mutagen, and 2-hydroxy-3-nitroso- α -carboline, a direct mutagen. Mutat. Res. 83: 61-68, 1981.

50) 津熊秀明, 北川貴子, 花井彩, 藤本伊三郎, 黒石哲生, 富永祐民: 日本のがん罹患の将来の予測, 青木國雄, 栗原登, 富永祐民, 花井彩 編集, 「がん・統計白書—罹患/死亡/予後—1993」第1版, pp. 153-170, 篠原出版, 東京, 1993.

51) Vecchia CL, Negri E, D'Avanzo B, Savoldelli R and Franceschi S: Genital and urinary tract diseases and bladder cancer. *Cancer Res.* 51: 629-631, 1991.

52) Wakabayashi K, Nagao M, Chung TH, Yin M, Karai I, Ochiai M, Tahira T and Sugimura T: Appearance of direct-acting mutagenicity of various foodstuffs produced in Japan and Southeast Asia on nitrite treatment. *Mutat. Res.* 158: 119-124, 1984.

53) 渡辺烈, 発癌性, 吉村英敏編 毒性学 pp. 306-318 講談社 (東京), 1983.

54) Willems MI, Raat WK, Wesstra JA, Bakker GL, Dubois G and Dokkum W: Urinary and faecal mutagenicity in car mechanics exposed to diesel exhaust and in unexposed office workers. *Mutat. Res.* 222: 375-391, 1989.

55) Wynder EL and Goldsmith R: The epidemiology of bladder cancer—a second look. *Cancer* 40: 1246-1268, 1977.

56) Wynder EL, Onderdonk J and Mantel N: An epidemiological investigation of cancer of the bladder. *Cancer* 16: 1388-1407, 1963.

57) Yamasaki E and Ames BN: Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 3555-3559, 1977.

(受付 1994-8-12)