Osaka University Knowledge Archive

Title	N－Methyl－N'－nitro－N－nitrosoguanidineによる発癌における生成フリーラジカルの関与に関する研究
Author(s)	三国, 利美子
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36700
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【11】

氏名・(本籍)	三国利美子（みくに　とみこ）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 8398 号
学位授与の日付	昭和63年12月12日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**N－Methyl－N′－nitro－N－nitrosoguanidineによる発癌における生成フリーラジカルの関与に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 岩田平太郎 (副査) 教授 近藤 雅臣　教授 三浦 喜温　教授 枡井雅一郎

論文内容の要旨

N－Methyl－N′－nitro－N－nitrosoguanidine (MNNG) は飲料水に溶解して経口的に投与することにより確実かつ高率に胃癌を発生させることができることが報告され，その後，MNNG は胃以外の消化器のその接触部位にも癌を発生させることが知られ，現在では MNNG による発癌はヒト消化器癌のモデルとして広く用いられている。

MNNG による発癌にグアニンの O^6 位のメチル化が関与するとされてきたが，グアニン O^6 位のメチル化の量と発癌率は必ずしも平行せず，MNNG の発癌にグアニンの O^6 位のメチル化以外の機構が存在することが推測されている。

一方，フリーラジカル（以下ラジカルと略す），特に hydroxyl radical（・OH）は極めて反応性にとみ，DNA 鎖を切断し，脂質を過酸化することにより，癌遺伝子に影響を与え発癌に関与すると考えられているが，現在までに MNNG 発癌にラジカルが関与するとする報告はみられないため，本研究では MNNG による発癌への・OH 生成の関与についての検討を行った。

まず，MNNG によるラット胃の発癌過程ラジカル捕捉剤（radical scavenger）である 2,6－di－ter.－butyl－4－methylphenol(3,5－d－iter.－butyl－4－hydroxytoluene, BHT）を投与し，MNNG による発癌にラジカルが関与するか否かについて検討した。MNNG と BHT を投与した群では，MNNG のみの投与群に比し，胃癌の発生は有意に低下し，MNNG による発癌にラジカルが関与していることが推測された。

次に，MNNG よりの・OH 生成に関する検討を行った。過酸化水素（H_2O_2），MNNG 及び・OH spin trapping 剤，5,5－dimethyl－1－pyrroline－1－oxide（DMPO）を含む pH6.5 以上のリン酸緩

衡液（以下，H_2O_2－MNNG－DMPO反応液と略す）を調製後，直ちにその反応液のＥＳＲスペクトルを測定し，・OHのDMPO adductのシグナルと一致する強度比１：２：２：１の４本線のシグナルを検出した。H_2O_2－MNNG－DMPO反応液へcatalase，または・OH scavengerであるsodium benzoateを添加すると，シグナルが消失し，もう一種の・OH scavengerであるethanol添加によりα－hydroxyethyl radicalのシグナルが生成された。これらの結果はH_2O_2－MNNG－DMPO反応液より・OHが生成されることを示している。

さらにH_2O_2－MNNG－DMPO反応液よりの・OH生成のメカニズムを検討した。反応液のスペクトルについてコンピューター　シミュレーションを行いH_2O_2－MNNG－DMPO反応液より・OHとともに窒素ラジカル（・NR）が生成されることが明らかにされた。・OH及び・NRの生成量はpH6.5以上のpH，H_2O_2濃度及びMNNG濃度に依存したが，pH5.0以下では両ラジカルの生成は認められなかった。また，MNNGの吸収曲線の測定により，MNNGの吸収極大（λ max）はpH6.5以上のpH上昇にともなって低波長側への移動し，そのうえλ maxの移動したMNNGはH_2O_2添加により顕著にニトロソ基を遊離し，ニトロソ基遊離の初速度はpH6.5以上のpHとH_2O_2濃度に依存すること認めた。一方，pH3.5－8.5のMNNG溶液及びpH5.0以下のH_2O_2添加MNNG溶液ではMNNGの顕著な分解は認められなかった。これらの結果はpH6.5以上のリン酸緩衝液中のbaseによる酸解離でイオン化されたMNNGがH_2O_2と反応し，・OHが生成され，また・OH生成にともないMNNGのhomolyticな分裂が生ずることを示している。

次にpH5.0以下のH_2O_2－MNNG－DMPO反応液中での・OHの生成を検討した。反応液を室内灯（0.03mW／㎠）で照射することにより・OHのシグナルが得られ，pH6.5以上の場合と同様の方法にて・OHが生成されていることが確認された。さらにこの・OH生成のメカニズムを検討した。遮光下の反応液からは顕著なシグナルは得られなかった。MNNGよりの・OH生成にはMNNGとH_2O_2が同時に存在する必要があるがH_2O_2を添加しないMNNG－DMPO反応液より光照射により・OHと異なる複雑なシグナルが検出された。このシグナルはH_2O_2－MNNG－DMPO反応液中では・OHシグナルにsuperimposeして認められたがH_2O_2－DMPO反応液の光照射によっては認められなかった。これらの結果は光照射によりMNNGからhomolyticな分裂により生じたラジカルがH_2O_2と反応し・OHを生成したことを示している。

次にH_2O_2存在下のMNNGよりの・OH生成に対するBHTの効果についてESRスペクトルを用い検討した。H_2O_2－MNNG－DMPO反応液を光照射することにより生成される・OHは反応液にBHTを添加することによりその生成量の減少を示し，減少量はBHT濃度に依存した。さらにDMPOに換えてBHTを使用したH_2O_2－MNNG－BHT反応液を0℃で光照射することによりBHTのラジカルのシグナルが検出された。これらの結果はMNNGのhomolyticな分裂生成物より生成された・OHをBHTがscavengeすることを示している。これは先のBHT投与によりラット胃癌の発生が抑制されたことと合わせ考えるとMNNGによる発癌に・OHが関与することを示唆している。

以上，MNNGによる発癌におけるラジカルの関与について検討を行い，１）H_2O_2存在下のMNNGより・OHが生成されること，２）H_2O_2存在下のMNNGよりの・OH生成にはMNNGのイオン化に

よる反応系とMNNGのhomolyticな分裂による反応系の2つの反応系が存在すること，3）MNNGによる発癌には・OH生成が関与していることが示唆されることを明らかにした。

論文の審査結果の要旨

本論文は強力な発癌物質であるMNNGの発癌機構にフリーラジカルの生成が関与していることを明らかにしたもので薬学博士の称号を授与するに値するものである。