

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	三 国 利 美 子
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 8 3 9 8 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 栞井雅一郎

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 O⁶ 位のメチル化が関与するとされてきたが、グアニン O⁶ 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 O⁶ 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 ($\cdot\text{OH}$) 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 $\cdot\text{OH}$ 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-tert-butyl-4-methylphenol (3,5-di-tert-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 $\cdot\text{OH}$ 生成に関する検討を行った。過酸化水素 (H_2O_2)、MNNG 及び $\cdot\text{OH}$ 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、 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ とともに窒素ラジカル ($\cdot\text{NR}$) が生成されることが明らかにされた。 $\cdot\text{OH}$ 及び $\cdot\text{NR}$ 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, $\cdot\text{OH}$ が生成され, また $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ の生成を検討した。反応液を室内灯 (0.03mW/cm²) で照射することにより $\cdot\text{OH}$ のシグナルが得られ, pH6.5 以上の場合と同様の方法にて $\cdot\text{OH}$ が生成されていることが確認された。さらにこの $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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°C 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ が生成されること, 2) H_2O_2 存在下の MNNG よりの $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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。