

〈原著〉

F344雌ラットにおけるN-ニトロソジメチルアミン 腎腫瘍発生のアスコルビン酸塩による影響

柳田 隆正、舟橋 正範

Effect of sodium L-ascorbate on kidney tumorigenesis induced by N-Nitrosodimethylamine in F344 female rats.

Takamasa Yanagida and Masanori Funahashi

Summary N-Nitrosodimethylamine (NDMA) is suspected to be a human carcinogen and highly toxic. In the present study we examined the effect of sodium L-ascorbate (Na-AsA) of kidney tumorigenesis induced by an oral dose of NDMA in F344 female rats. Twenty-one 6 week-old F344 female rats were divided into 3 groups. Group 1 of 7 rats were intragastrically given a dose of NDMA alone.

Group 2 of 10 rats was intragastrically given a single dose of 40 mg/kg NDMA, and 1 week later 1% of Na-AsA in drinking water was administered. Group 3 of 4 rats were intragastrically given a dose of saline alone.

Result: Histologically, the percentage of rat renal cell carcinoma was 40.0% in Group 1 and 42.9% in Group 2.

Conclusion: These results may indicate that Na-AsA with a clear promotor action was not observed in NDMA kidney tumorigenesis of F344 female rat.

Key words: F344 female rat, kidney tumor, N-Nitrosodimethylamine, sodium L-ascorbate

I. 諸言

N-Nitrosodimethylamine (NDMA) は、腎を標的とする化学発癌物質のひとつで、ジアルキルニトロソアミンの中で最も簡単な構造をしている^{1)~5)}。このNDMAはヒトの体内で食肉、魚肉、野菜などに含まれる2級アミンとハム、ソーセージなどの保存料として用いられる亜硝酸塩が反応して生ずることが知られている^{6),7)}。

日比野らは6週齢のSprague-Dawley (SD) 系

雄ラットとFischer (F344) 系雄ラットにNDMAを40 mg/kg体重用量の1回胃内投与を行った。SD系雄ラットはクローズドコロニーで、F344系雄ラットは近交系であり繁殖方法が異なる。また腎発癌物質に対する感受性もF344系雄ラットはSD系雄ラットより低く、腫瘍発生には系統差があることを報告している⁸⁾。またMuraiらはイニシエーターとしてN-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)、プロモーターとしてL-アスコルビン酸ナトリウム (Na-AsA)

藤田保健衛生大学医療科学部・臨床検査学科
〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98
受領日：平成27年9月12日
受理日：平成27年11月18日

Faculty of Medical Technology, School of Health
Science, Fujita Health University.
Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

をSD/cShiラットに投与し、Na-AsAは膀胱癌、腎盂癌の発生にプロモーターとして作用することを報告している⁹⁾。

我々は、F344雌ラットにイニシエーターとしてMDMA、プロモーターとしてNa-AsAを投与して腎腫瘍発生に対するNa-AsAの影響を検討した。

II. 材料と方法

動物はチャールズリバー社（神奈川県）より購入した6週齢の平均体重100gのF344雌ラット21匹を3群に分けた。ラットは1ゲージあたり2匹収容し、基礎飼料MF（オリエンタル酵母、東京）、床敷にはホワイトフレーク（日本チャールズリバー、神奈川県）を用いた。

第I群の7匹のラットはNDMA（東京化成、東京）を体重kgあたり40mgの割合で生理食塩水（大塚製薬、大阪）0.5mlに溶解し、ラット用胃ゾンデを用いて1回胃内投与した。

第II群の10匹のラットはNDMAを体重kgあたり40mgの割合で生理食塩水0.5mlに溶解後、同様に1回胃内投与した。通常飲料水を1週間自由摂取させた後に1% Na-AsA含有飲料水を実験終了まで自由に摂取させた。

第III群の対照群として4匹のラットは生理食塩水のみをラット用胃ゾンデを用いて0.5mlを1回胃内投与した。対照群は環境省の動物愛護及び管理に関する法律¹⁰⁾によりできる限り供される動物の数を少なくすることが提言されてい

ることから実験群より少ない匹数を用いた。基礎飼料MF、飲料水は実験終了まで自由に摂取させた。

なお、第I群、第III群は通常飲料水を実験終了の40週まで自由に摂取させた。

ラットの体重測定は週1回ケージ交換の際に行った。ラットは実験開始後40週でイソフルラン麻酔下で安楽死させ、臓器を摘出し重量を測定した。20%緩衝ホルマリン液で固定後、通常の方法にてパラフィン包埋標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。動物飼育は12時間の明暗サイクル、室温は24℃±2℃、湿度50±5%で行った。体重、肝重量、左右腎重量、腎腫瘍発生頻度についてt検定を行った。P<0.05を有意差ありとした。

III. 結果

実験終了時の平均体重は、NDMA投与の第I群240.6g、NDMAとNa-AsA投与の第II群は256.9g、対照の第III群231.5gで、有意差は第I群(0.168)では認められなかったが、第II群(0.035)では認められた。

平均肝重量および左右腎重量は第I群が7.54g、0.76g、0.75g、第II群が7.79g、0.80g、0.78g、第III群7.01gで、各群での肝重量、左右腎重量の有意差は第I群(0.114)(0.131)(0.108)では認められなかったが、第II群(0.022)(0.018)(0.037)では認められた。(Table 1)

腎腫瘍の発生は、小型で周囲への圧迫像が軽

Table1 Average of body, liver and kidney weights of F344 rats treated with NDMA

Group	Treatment	No. of rats	Body weight (g)	Liver g (%B.W.)	Kidney (left) g (%B.W.)	Kidney (right) g (%B.W.)
I	NDMA	7	240.6±12.00	7.54±0.56 (3.13)	0.76±0.03 (0.31)	0.75±0.06 (0.31)
II	NDMA + Na-AsA	10	256.7±16.76*	7.79±0.45* (3.08)	0.80±0.05* (0.31)	0.78±0.06* (0.30)
III	control	4	231.5±7.94	7.01±0.42 (3.03)	0.71±0.05 (0.31)	0.68±0.07 (0.29)

NDMA: N-Nitrosodimethylamine, Na-AsA: Sodium L-ascorbate

: Means±standard deviation Significantly different from III at *P<0.05

度な腺腫は第Ⅰ群7匹中2匹(28.6%)、第Ⅱ群10匹中4匹(40.0%)であった。嚢胞状で、細胞異型を示す腎細胞癌は第Ⅰ群7匹中4匹(57.1%)、第Ⅱ群10匹中6匹(60.0%)であった。未分化な間葉系細胞の腎芽細胞腫は第Ⅰ群でのみ7匹中1匹(7.1%)に認められた。第Ⅰ群と第Ⅱ群では腫瘍発生に有意差(0.914)は認められなかった。(Table 2)

第Ⅰ、Ⅱ群の腎細胞癌は充実性に増殖し核クロマチンが豊富で、乳頭状、柵状などの構造を形成していた。腎芽細胞腫は間葉型で平滑筋細胞、および未分化間葉系細胞の増殖が認められた。(Fig.1)

Ⅳ. 考察

NDMAは浄水処理又は下水処理での塩素処理によって生成することが報告されており、国際がん研究機関(IARC)ではグループ2A(ヒトに対しておそらく発がん性がある)に分類されている。WHOのホームページ(HP)¹¹⁾では飲料水水質ガイドライン値として0.1 µg/L、日本では厚生労働省のHPで0.1 µg/Lと算定している¹²⁾。またタバコの煙、食品中ではチーズ、ベーカリ、加工肉製品、麦芽製品、酢漬けや塩漬け食品等に含まれている身近な物質である⁶⁾。

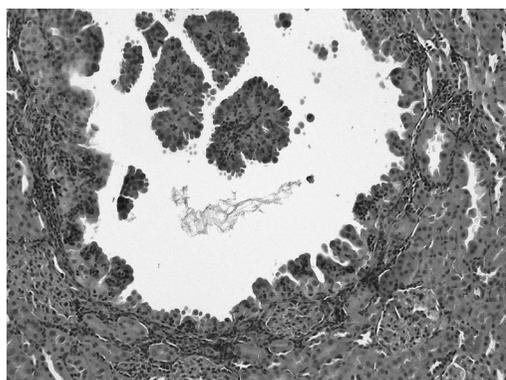
実験動物へのNDMA投与では、腎腫瘍、肝腫瘍などの発生が報告されている^{1)~5)}。Muraiら

Table 2 Histological findings of F344 rat kidneys

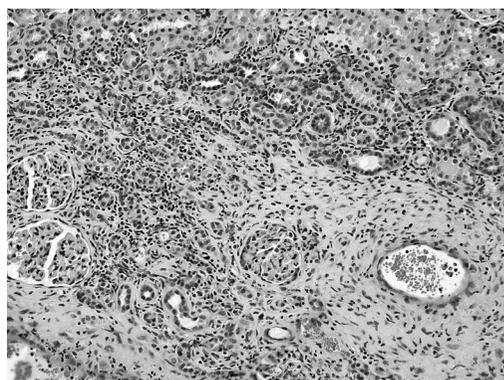
Group	Treatment	No. of rats	Kidney tumor (%)		
			Adenoma	Renal cell carcinoma	Nephroblastoma
I	NDMA	7	2 (28.6)	4 (57.1)	1 (7.1)
II	NDMA+Na ⁺ -AsA*	10	4 (40)	6 (60)	0
III	Control	4	0	0	0

NDMA: N-Nitrosodimethylamine, Na⁺-AsA: Sodium L-ascorbate

Significantly different from I at *P<0.05



Renai cell carcinoma



Nephroblastoma

Fig.1 Histological findings of the kidney in F344 rats treated with NDMA

は水腎症を自然発症するSD/cShiラットに膀胱癌発癌物質のBBNと5% Na-AsAを投与し、BBNと5% Na-AsA投与群はBBN単独投与群に比して膀胱癌、腎盂癌ともに有意に発生し、Na-AsAは膀胱発癌物質に対してはプロモーターとなる可能性がある⁹⁾と報告している⁹⁾。発癌物質は異なるが、我々はNDMA投与群とNDMAとNa-AsA投与群では腫瘍発生に有意差は認められなかった。これらはNa-AsA投与期間やラット系統差、週齢の違いによると考えられた。

我々はNDMA投与F344ラットについて検討し、Na-AsAは明らかなプロモーターを示さなかったが、ラットの系統差や種々の発癌物質によるNa-AsAのプロモーターについて検討する必要があると考えられる。このような実験動物を使用して発癌への促進作用を検討することは、人へのリスクを予測するのに重要と考えられる。

実験は本学疾患モデル教育研究センター内のラット飼育室にて行った。(藤田保健衛生大学実験動物委員会の承認の基、実験指針に従って行った：承認番号C03-61)

文献

- 1) Hard GC, Butler WH: Cellular analysis of renal neoplasia: induction of renal tumors in dietary-conditioned rats by dimethylnitrosamine, with a reappraisal of morphological characteristics. *Cancer Res*, 30: 2796-2805, 1970.
- 2) Hard GC, Butler WH: Cellular analysis of renal neoplasia: light microscope study of the development of interstitial lesions induced in the rat kidney by a single carcinogenic dose of dimethylnitrosamine. *Cancer Res*, 30: 2806-2815, 1970.
- 3) Hard GC, Butler WH: Morphogenesis of epithelial neoplasms induced in the rat kidney by dimethylnitrosamine. *Cancer Res*, 31: 1496-1505, 1971.
- 4) Ito N, Sugihara S, Makiura S, Arai M, Hirao K, Denda A, Nishio O: Effect of *N*-(3,5-Dichlorophenyl)succinimide on the histological pattern and incidence of kidney tumors in rats induced by dimethylnitrosamine. *Gann*, 65: 131-138, 1974.
- 5) Arai M, Aoki Y, Nakanishi K, Miyata Y, Mori T, Ito N: Long-Term experiment of maximal non-carcinogenic dose of dimethylnitrosamine for carcinogenesis in rats. *Gann*, 70: 549-558, 1979.
- 6) Jakszyn P, Agudo A, Berenguer A, Ibáñez R, Amiano P, Pera G, Ardanaz E, Barricarte A, Chirlaque MD, Dorronsoro M, Larrañaga N, Martínez C, Navarro C, Quirós JR, Sánchez MJ, Tormo MJ, González CA: Intake and food sources of nitrites and *N*-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutr*, 9: 785-791, 2006.
- 7) Florin THJ, Neale G, Cummings JH: The effect of dietary nitrate on nitrate and nitrite excretion in man. *Br J Nutr*, 64: 387-397, 1990.
- 8) 日比野勤, 山本直樹, 仙波英雄: ラットDimethylnitrosamine腎腫瘍における系統差. *実験動物技術*, 33: 57-62, 1998.
- 9) Murai T, Koida A, Miyauchi H, Inoue S, Maruyama T, Makino S, Mori S, Wanibuchi H, Mori Y, Fukushima S: Promoting effect of sodium L-ascorbate on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced renal pelvic carcinogenesis in SD/cShi rats of both sexes. *J Toxicol Pathol*, 16: 231-236, 2003.
- 10) 動物の愛護及び管理に関する法律 law.e-gov.go.jp/htmldata/S48/S48HO105.html
- 11) World Health Organization Guidelines for Drinking-Water Quality, 3rd edition including 1st and 2nd addenda, 2008
- 12) www.mhlw.go.jp/shingi/2010/02/dl/s0202-8e.pdf 9-10