

# 表在性膀胱腫瘍に対する各種抗癌剤単剤投与の 効果に関する検討

第1報: N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN)  
ラット膀胱腫瘍発育に対する効果について

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

田 畑 尚 一

## EFFECTS OF SINGLE ADMINISTRATION OF VARIOUS CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ON SUPERFICIAL BLADDER TUMOR: EFFECTS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ON DEVELOPMENT OF URINARY BLADDER TUMOR INDUCED BY N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL) NITROSAMINE (BBN) IN RATS

SHOICHI TABATA

*Department of Urology, Nara Medical University*

Received July 29, 1993

*Abstract:* The present investigation was conducted to examine the effects of various chemotherapeutic agents on development of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) in rats. All rats were given 0.05 %BBN in drinking water for the initial 8 weeks of the experiment. Chemotherapeutic agents evaluated in this investigation were administered as single treatments during the subsequent 12 weeks and rats were sacrificed after 20 weeks of the experiment. The investigation was divided into 3 experimental groups according to animal strains and administration methods of chemotherapeutic agents: (1) intraperitoneal administration in male Wistar rats; (2) oral administration in male Fischer 344 rats; and (3) intraperitoneal administration in male Fischer 344 rats. In experimental group (1), 5-fluorouracil (5-FU), 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT-207), carboquone (CQ), vincristine (VCR) and cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) were effective in suppressing the incidence of bladder tumor. On the other hand, doxorubicin (DXR), mitomycin-C (MMC), neocarzinostatine (NCS), cyclophosphamide (CPM) and bleomycin (BLM) were not effective. In experimental group (2), both UFT, 4:1 mixture of uracil and tegafur, and 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) suppressed the incidence of bladder tumor. In experimental group (3), N, N', N''-triethylene thiophosphoramidate (thiotepa) also suppressed the tumor incidence. These results indicate that 5-FU analogue, CQ, VCR, CDDP and thiotepa may be clinically effective for prophylactic treatment for superficial bladder cancer. In addition, continued use of this murine bladder model is recommended for future screening of chemotherapeutic agents for superficial bladder cancer.

## Index Terms

chemotherapeutic agents, bladder tumor, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine, rat

## 緒 言

膀胱腫瘍は、その発育進展形式によって乳頭状・非浸潤性腫瘍と非乳頭状・浸潤性腫瘍の2型に大別されるが、その両者の間には様々の病態のものが存在する。このうち乳頭状・非浸潤性腫瘍である low grade の表在性膀胱癌は膀胱腫瘍の約 70% を占め、臨床的にもっとも頻度が高く、この low grade の膀胱癌症例に対しては、一般的に経尿道的電気切除術 (Transurethral electroresection, TUR) や局所的化学療法を中心とした保存的治療が行われている<sup>1-4)</sup>。一方、非乳頭状・浸潤性腫瘍は high grade の浸潤性膀胱癌症例がほとんどであり、膀胱全摘除術の対象となるが、手術療法のみでの治療成績には限界がある。したがって、根治的手術療法に加えて補助療法として化学療法、免疫療法および放射線療法などを併用した集学的治療が行われている<sup>1,4,5)</sup>。

このように膀胱癌治療における化学療法の占める位置づけは非常に高く、有効な抗癌剤の選択が必要である。事実、表在性膀胱腫瘍においては、その再発率は 30~90% とその高い再発率が問題で、さらにその再発は多くは初発腫瘍と同じ low grade, low stage であるが、10~40% は high grade に grade up および high stage に stage up するものがあり、表在性膀胱腫瘍の膀胱保存療法においては、その再発予防が最も重要な課題である<sup>1-4)</sup>。一方、浸潤性膀胱癌においては、種々の化学療法の regimen の開発にもかかわらず、その 5 年生存率は 30~50% といまだ満足すべきものではなく<sup>1,5)</sup>、今後さらに有効な抗癌剤の開発とそれを用いた集学的治療体系の確立が望まれるところである。

一般に、癌の化学療法の成績向上には有効かつ副作用の少ない薬剤を選択すべきことはいうまでもないが、近年、多くの抗癌剤やその誘導体が開発されて臨床に供されているにもかかわらず、有効な薬剤の選択・効果判定の方法は未だ確立されていないのが現況である。そこで、今回、膀胱癌に対する有効な抗癌剤を実験的に確認する目的で、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (以下 BBN と略す) によるラットの膀胱発癌実験モデル<sup>6,7)</sup> を用いて種々の抗癌剤の膀胱腫瘍発育に対する効果を検討し、さらに、抗癌剤の効果判定法における in vivo スクリーニング法としてのこのモデルの有用性について考察を加えた。

## 実験材料および実験方法

## I. 実験動物

実験には、体重 150~200 g の Wistar 系雄性ラット (富士アニマル・東京および日本クレア・東京) 702 匹ならびに Fischer 344 の雌性ラット 202 匹 (日本チャールスリバー・神奈川) を用いた。動物は、プラスチックケージにて 1 ケージに 4~5 匹とし、温度 22℃、湿度 77% の空調システム動物室にて飼育し、水および飼料は自由に摂取せしめた。

飼料は繁殖用市販標準飼料 (MF, オリエンタル酵母・東京および CRF-1, 日本チャールスリバー・神奈川) を用い、経口投与実験系ではそれぞれの粉末飼料を用いた。

## II. 発癌物質

BBN (泉化学・横浜および岩井化学薬品・東京) を 0.05% 濃度に水道水に少量の Tween 80 とともに添加、混和して飼料水を作製し、遮光瓶を用いて 8 週間経口投与した。

## III. 抗癌剤

検索した抗癌剤は、doxorubicin (DXR) (協和発酵工業・東京)、mitomycin-C (MMC) (協和発酵工業・東京)、cyclophosphamide (CPM) (塩野義製薬・大阪)、5-fluorouracil (5-FU) (協和発酵工業・東京)、1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT-207) (大鵬薬品工業・東京)、neocarzinostatin (NCS) (山之内製薬・東京)、carboquone (CQ) (三共・東京)、bleomycin (BLM) (日本化薬・東京)、vincristine (VCR) (塩野義製薬・大阪)、cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) (日本化薬・東京)、UFT (FT-207 と uracil を 1:4 のモル比で配合) (大鵬薬品工業・東京)、1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) (三井製薬工業・東京) および N, N', N''-triethylene thiophosphoramidate (thiotepa) (住友製薬・東京) の 13 剤である。

抗癌剤の投与量は、5-FU, NCS, VCR を除いてすべて各投与方法におけるラットの LD<sub>50</sub> の 1/10 量に設定した。5-FU, NCS, VCR は、予備実験にて LD<sub>50</sub> の 1/10 量では毒性が強くみられたため、LD<sub>50</sub> の 1/50 量に設定した。投与スケジュールは、主として臨床に用いられている方法に準じた。

## IV. 実験方法

実験に用いたラットの系統差ならびに抗癌剤の投与方法

法により、1)Wistar系ラットを用いた抗癌剤腹腔内投与実験系、2)Fischer 344ラットを用いた抗癌剤経口投与実験系および3)Fischer 344ラットを用いた抗癌剤腹腔内投与実験系の3群に分けて検討した。

実験群1：抗癌剤腹腔内投与実験系（Wistar系ラット使用）

702匹の雄性Wistarラットを以下の実験計画にしたがい、26群に分けた（Fig. 1）。すなわち、0.05%BBNを8週間投与終了直後より各抗癌剤の投与を行った。用いた抗癌剤はDXR, MMC, CPM, 5-FU, FT-207, NCS, CQ, BLM, VCRおよびCDDPの10剤で、これらはFT-207の経口投与を行った第13群を除いて、生理食塩水に溶解し腹腔内注射にて投与した。数回に分けて行った実験ごとに、15~20匹のBBN投与のみの対照群を設けたが、それぞれの対照群の腫瘍発生頻度には大きな差異はなく、対照群として第1群に包括して記載した。

実験群は、

第1群：77匹のラットを用い、BBN投与のみを行った対照群

第2群：20匹のラットを用い、BBN投与後DXR 1 mg/kg・BWの3日間連日投与を3週間隔で4回投与する群

第3群：20匹のラットを用い、BBN投与後DXR 2 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第4群：24匹のラットを用い、MMC 0.5 mg/kg・BWをBBN投与終了後7日間のみ連日投与する群

第5群：20匹のラットを用い、BBN投与後MMC 0.5 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第6群：30匹のラットを用い、BBN投与後CPM 30 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第7群：15匹のラットを用い、BBN投与後CPM 50 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第8群：16匹のラットを用い、5-FU 20 mg/kg・BWをBBN投与終了後7日間のみ連日投与する群

第9群：20匹のラットを用い、BBN投与後5-FU 20 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第10群：30匹のラットを用い、FT-207 100 mg/kg・BWをBBN投与終了後7日間のみ連日投与する群

第11群：18匹のラットを用い、BBN投与後FT-207 100 mg/kg・BWの7日間連日投与を3週間隔で4回投与する群

第12群：18匹のラットを用い、BBN投与後FT-207 100 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第13群：16匹のラットを用い、BBN投与後FT-207 100 mg/kg・BWを12週間連日経口投与する群

第14群：24匹のラットを用い、BBN投与後NCS 0.05 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第15群：40匹のラットを用い、BBN投与後NCS 0.075 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第16群：27匹のラットを用い、CQ 0.25 mg/kg・BWをBBN投与終了後7日間のみ連日投与する群

第17群：27匹のラットを用い、BBN投与後CQ 0.25 mg/kg・BWを1週間で12回投与する群

第18群：24匹のラットを用い、CQ 0.5 mg/kg・BWをBBN投与終了後7日間のみ連日投与する群

第19群：24匹のラットを用い、BBN投与後CQ 0.5 mg/kg・BWを1週間隔12回投与する群

第20群：20匹のラットを用い、BBN投与後BLM 20 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第21群：20匹のラットを用い、BBN投与後VCR 0.05 mg/kg・BWの2日間連日投与を1週間隔で12回投与する群

第22群：36匹のラットを用い、BBN投与後VCR 0.1 mg/kg・BWを1週間隔で12回投与する群

第23群：36匹のラットを用い、BBN投与後CDDP 0.8 mg/kg・BWの5日間連日投与を利尿負荷せず、3週間隔で4回投与する群

第24群：35匹のラットを用い、BBN投与後CDDP 0.8 mg/kg・BWの5日間連日投与を利尿負荷併用し、3週間隔で4回投与する群

第25群：31匹のラットを用い、BBN投与後CDDP 1.2 mg/kg・BWを利尿負荷せず、1週間隔で12回投与する群

第26群：34匹のラットを用い、BBN投与後CDDP 1.2 mg/kg・BWを利尿負荷併用し、1週間隔で12回投与する群

の26群である。

なお、第24群と第26群においては、0.8 mg furosemide含有生理食塩水20 mlを腹腔内注射することに

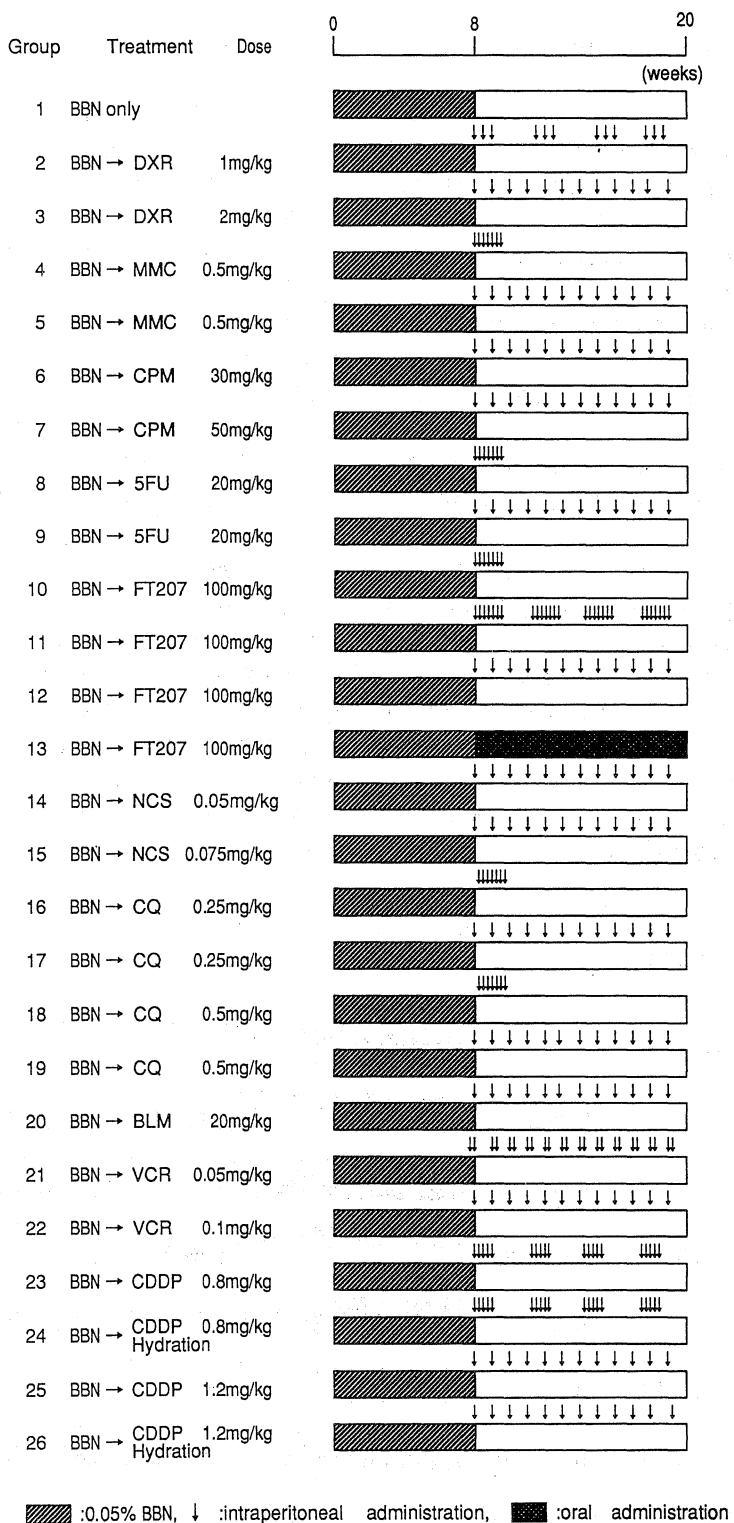


Fig. 1. Experimental design. (groups 1~26)

より利尿負荷を行った。

実験群 2 : 抗癌剤経口投与実験系 (Fischer 344 ラット使用)

160 匹の雄性 Fischer 344 ラットを用い、UFT および HCFU を粉末飼料に混じて経口投与した (Fig. 2)。投与期間中、毎週体重測定ならびに経口摂取量を測定し、抗癌剤の投与が設定量になるように粉末飼料と薬剤の混合比を適時調整した。各実験ごとに BBN 投与のみの対照群を設けたが、それぞれの対照群の腫瘍発生頻度には大きな差異はなく、第 27 群に包括して記載した。

実験群は、

第 27 群 : 40 匹のラットを用い、BBN 投与のみを行った対照群

第 28 群 : 20 匹のラットを用い、BBN 投与終了後に UFT 100 mg/kg・BW/day を 12 週間投与する群

第 29 群 : 20 匹のラットを用い、BBN 投与と同時に UFT 100 mg/kg・BW/day を始め、20 週の全期間投与する群

第 30 群 : 20 匹のラットを用い、BBN 投与終了後に UFT 200 mg/kg・BW/day を 12 週間投与する群

第 31 群 : 20 匹のラットを用い、BBN 投与と同時に UFT 200 mg/kg・BW/day を始め、20 週の全期間投与する群

第 32 群 : 20 匹のラットを用い、BBN 投与終了後に HCFU 100 mg/kg・BW/day を 12 週間投与する群

第 33 群 : 20 匹のラットを用い、BBN 投与と同時に HCFU 100 mg/kg・BW/day を始め、20 週の全期間投与する群

の 6 群である。

実験群 3 : 抗癌剤腹腔内投与実験系 (Fischer 344 ラット使用)

42 匹の F 344 雄性ラットを用い、以下に示す実験群に分けた (Fig. 3)。

実験群は、

第 34 群 : 20 匹の雄性ラットを用い、BBN 投与のみを行った対照群

第 35 群 : 22 匹の雄性ラットを用い、BBN 投与後 thiotepa 1 mg/kg・BW を 1 週間隔で 12 回腹腔内投与する群

の 2 群である。

V. 効果判定および統計処理

各実験群のラットは、20 週目にエーテル深麻酔下に安楽死させた後に開腹し、尿路系および腹腔内臓器における腫瘍の有無などについて肉眼的検索を行った。膀胱は後部尿道において結紮し、膀胱内腔に 10% 中性 formalin 液を約 1 ml 注入して伸展させ、10% 中性 formalin 液内にて固定した。固定後膀胱を正中線で半切し、膀胱

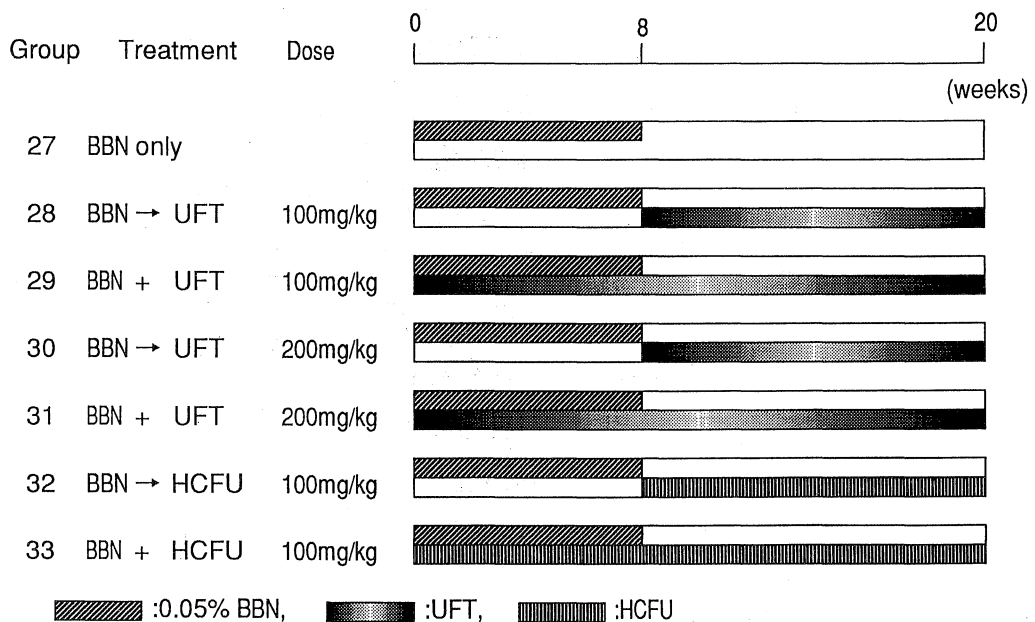


Fig. 2. Experimental design. (groups 27~33)



Table 1. Effects of various chemotherapeutic agents on development of bladder tumors induced by BBN in Wistar male rats

Group	Treatment	Effective No. of rats	Incidence of bladder lesions		P-value <sup>a</sup>
			NPH(%)	Tumor(%)	
1	BBN only	70	58 (83)	62 (89)	—
2	BBN→DXR	15	12 (80)	12 (80)	n. s.
3	BBN→DXR	11	10 (91)	11 (100)	n. s.
4	BBN→MMC	12	8 (67)	9 (75)	n. s.
5	BBN→MMC	16	15 (94)	13 (81)	n. s.
6	BBN→CPM	28	24 (86)	22 (79)	n. s.
7	BBN→CPM	8	7 (88)	6 (75)	n. s.
8	BBN→5-FU	11	6 (55)	5 (46)	0.001
9	BBN→5-FU	18	15 (83)	13 (72)	n. s.
10	BBN→FT-207	29	20 (69)	14 (48)	0.001
11	BBN→FT-207	14	11 (79)	6 (43)	0.001
12	BBN→FT-207	12	10 (83)	5 (42)	0.001
13	BBN→FT-207	16	14 (88)	9 (56)	0.01
14	BBN→NCS	17	11 (65)	14 (82)	n. s.
15	BBN→NCS	23	15 (65)	21 (91)	n. s.
16	BBN→CQ	26	18 (69)	19 (73)	n. s.
17	BBN→CQ	27	13 (48)	17 (63)	0.005
18	BBN→CQ	20	16 (80)	8 (40)	0.001
19	BBN→CQ	22	21 (96)	17 (77)	n. s.
20	BBN→BLM	15	12 (80)	14 (93)	n. s.
21	BBN→VCR	15	13 (87)	10 (67)	n. s.
22	BBN→VCR	31	18 (58)	15 (48)	0.001
23	BBN→CDDP	29	20 (69)	18 (62)	0.005
24	BBN→CDDP+H	31	13 (42)	22 (71)	n. s.
25	BBN→CDDP	29	12 (41)	16 (55)	0.001
26	BBN→CDDP+H	25	23 (92)	20 (80)	n. s.

<sup>a</sup> : Significant difference in the incidence of tumor from rats in group 1.

n. s. : not significant

第14群：24匹中有効ラット数は17匹で、NPHを11匹(65%)に、腫瘍は14匹(82%)に認められた。第1群に比し、差は認められなかった。

第15群：40匹中有効ラット数は23匹で、NPHを15匹(65%)に、腫瘍は21匹(91%)に認められた。第1群に比し、差は認められなかった。

第16群：27匹中有効ラット数は26匹で、NPHを18匹(69%)に、腫瘍は19匹(73%)に認められた。第1群に比し、差は認められなかった。

第17群：27匹中有効ラット数は27匹で、NPHを13匹(48%)に、腫瘍は17匹(63%)に認められたのみで、第1群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた(P<0.005)。

第18群：24匹中有効ラット数は20匹で、NPHを16匹(80%)に、腫瘍は8匹(40%)に認められたのみで、第1群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた(P<0.001)。

第19群：24匹中有効ラット数は22匹で、NPHを21

匹(96%)に、腫瘍は17匹(77%)に認められた。第1群に比し、差は認められなかった。

第20群：20匹中有効ラット数は15匹で、NPHを12匹(80%)に、腫瘍は14匹(93%)に認められた。第1群に比し、差は認められなかった。

第21群：20匹中有効ラット数は15匹で、NPHを13匹(87%)に、腫瘍は10匹(67%)に認めた。第1群に比し、差は認められなかった。

第22群：36匹中有効ラット数は31匹で、NPHを18匹(58%)に、腫瘍は15匹(48%)に認められたのみで、第1群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた(P<0.001)。

第23群：36匹中有効ラット数は29匹で、NPHを20匹(69%)に、腫瘍は18匹(62%)に認められたのみで、第1群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた(P<0.005)。

第24群：35匹中有効ラット数は31匹で、NPHを13匹(42%)に、腫瘍は22匹(71%)に認め

た。第1群に比し、差は認められなかった。

第25群：31匹中有効ラット数は29匹で、NPHを12匹(41%)に、腫瘍は16匹(55%)に認められたのみで、第1群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた( $P < 0.001$ )。

第26群：34匹中有効ラット数は25匹で、NPHを23匹(92%)に、腫瘍は20匹(80%)に認められた。第1群に比し、差は認められなかった。

以上、20週まで観察しえた有効観察率は投与薬剤・投与方法によって異なるが、それぞれ50~100%であった。BBN投与のみの対照群と各群の膀胱腫瘍の発生頻度を比較した結果、統計学的に有意に膀胱腫瘍の発生が抑制された実験群は5-FU(第8群)、FT-207(第10~13群)、CQ(第17, 18群)、VCR(第22群)およびCDDP(第23, 25群)の10群であった。DXR, MMC, CPM, NCSおよびBLMの各群の膀胱腫瘍の発生頻度は、対照群と比較して有意の差はなかった。

実験群2：抗癌剤経口投与実験系(Fischer 344ラット使用)(Table 2)

第27群：40匹中有効ラット数は38匹で、NPHを38匹(100%)に、腫瘍は33匹(87%)に認められた。

第28群：20匹中有効ラット数は20匹で、NPHを20匹(100%)に、腫瘍は14匹(70%)に認められた。第27群の対照群に比し、差は認められなかった。

第29群：20匹中有効ラット数は20匹で、NPHを13匹(65%)に、腫瘍は13匹(65%)に認められた。第27群の対照群に比し、差は認められなかった。

第30群：20匹中有効ラット数は20匹で、NPHを20匹(100%)に、腫瘍は6匹(30%)に認めら

れたのみで、第27群の対照群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた( $P < 0.001$ )。

第31群：20匹中有効ラット数は20匹で、NPHを14匹(70%)に、腫瘍は6匹(30%)に認められたのみで、第27群の対照群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた( $P < 0.001$ )。

第32群：20匹中有効ラット数は19匹で、NPHを12匹(63%)に、腫瘍は4匹(21%)に認められたのみで、第27群の対照群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた( $P < 0.001$ )。

第33群：20匹中有効ラット数は20匹で、NPH6匹(30%)に、腫瘍は0匹(0%)に認められたのみで、第27群の対照群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた( $P < 0.001$ )。

以上、UFT, HCFUのいずれの群においても膀胱腫瘍発生の抑制がみられ、また用量依存的に腫瘍発生の抑制効果がみられた。

実験群3：抗癌剤腹腔内投与実験系(Fischer 344ラット使用)(Table 3)

第34群：20匹中有効ラット数は20匹で、NPHを20匹(100%)に、腫瘍は19匹(95%)に認められた。

第35群：22匹中有効ラット数は22匹で、NPHを22匹(100%)に、腫瘍は12匹(55%)に認められたのみで、第34群の対照群に比し、有意の差で腫瘍発生の抑制が認められた( $P < 0.01$ )。

以上、thiotepa腹腔内投与群において有意に腫瘍の発生が抑制された。

Table 2. Effects of UFT or HCFU on development of bladder tumors induced by BBN in Fischer male rats

Group	Treatment	Effective No. of rats	Incidence of bladder lesions		P-value <sup>a</sup>
			NPH(%)	tumor(%)	
27	BBN alone	38	38 (100)	33 (87)	—
28	BBN→UFT 100mg(12wks)	20	20 (100)	14 (70)	n. s.
29	BBN+UFT 100mg(20wks)	20	13 (65)	13 (65)	n. s.
30	BBN→UFT 200mg(12wks)	20	20 (100)	6 (30)	0.001
31	BBN+UFT 200mg(20wks)	20	14 (70)	6 (30)	0.001
32	BBN→HCFU 100mg(12wks)	19	12 (63)	4 (21)	0.001
33	BBN+HCFU 100mg(20wks)	20	6 (30)	0 (0)	0.001

<sup>a</sup> : Significant difference in the incidence of tumor from rats in group 27.

n. s. : not significant



Table 3. Effects of thiotepa on development of bladder tumors induced by BBN in Fischer male rats

Group	Treatment	Effective No. of rats	Incidence of bladder lesions		P-value
			NPH(%)	Tumor(%)	
34	BBN alone	20	20 (100)	19 (95)	p<0.01
35	BBN→Thiotepa	22	22 (100)	12 (55)	

## 考 察

BBNを用いたラット膀胱腫瘍モデルは、われわれの教室で発癌実験を行い<sup>8)</sup>、Itoらとの共同研究によって教室において確立された実験系である<sup>9)</sup>。このモデルは、膀胱を選択的に標的臓器とする化学発癌剤のBBNをラットに経口投与することにより、比較的短期間で高率に膀胱腫瘍を発生させることが可能である。ラットBBN膀胱発癌実験に関しては、BBNの投与濃度、投与期間および観察期間をはじめ腫瘍発生に影響を及ぼす諸因子に関する詳細な報告がある<sup>10)</sup>。

BBN投与後のラット膀胱粘膜の変化<sup>6,7)</sup>を概観すると、まずびまん性に肥厚し(単純性過形成, simple hyperplasia, SH)、次いで粘膜の結節状あるいはNPHが出現する。このうちSHは、発癌因子の消失によって正常粘膜に復するのに対し、NPHには発癌因子を除去しても可逆性のものであり、不可逆性のものであり、それらのなかにはいずれ癌へと移行する不可逆性前癌病変が混在していると考えられている<sup>9)</sup>。その後、乳頭腫(papilloma)を経て、癌(carcinoma)へと移行し、癌はさらに進行すると次第に膀胱内腔をほとんど占拠するまでに発育し、また一部は膀胱壁への浸潤性癌となる<sup>6,7)</sup>。

0.05% BBNを8週間経口投与させると、SHならびにNPHがほぼ100%に、papillomaが約30%に発生し、その後の観察期間の延長とともに腫瘍発生頻度が増加し、BBN投与中止後12週すなわち実験開始後20週でcarcinomaの発生が87~95%にみられる。したがって、今回の抗癌剤の腫瘍発育に対する影響の検討には、0.05% BBNを8週間投与し、その後12週間観察するラット膀胱発癌実験モデルを用いた。

抗癌剤として用いる薬剤の選択ならびにその効果判定に用いられている研究は、①新たに開発された薬剤の一般的な抗腫瘍効果ならびに毒性のスクリーニングを目的とするもの。②個々の系統の悪性腫瘍を対象として、すでに確立された腫瘍細胞株<sup>11,12)</sup>や動物実験モデル<sup>13,14)</sup>を用いて、in vitroあるいはin vivoで種々の薬剤のスクリ

ーニングを目的とするもの。③個々の症例から抽出した腫瘍細胞を用いて、in vitroもしくはin vivoで薬剤の感受性を検索し、その結果に基づいてそれぞれの症例に最適な薬剤の選択を目的とするもの<sup>15)</sup>。の、3つに大別される。今回検討した化学発癌剤によるラットの実験的膀胱腫瘍モデルを用いた膀胱腫瘍に対する抗癌剤の効果判定法は、上記の②に属するものである。

化学発癌による実験動物膀胱腫瘍モデルについてはすでに多くの報告があり、発癌剤としてBBN<sup>8,9)</sup>やN-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide (FANFT)<sup>16)</sup>の経口投与およびN-methyl-N-nitrosourea (MNU)<sup>17)</sup>の膀胱内注入が用いられてきた。そのうち、膀胱のみを標的臓器とし、短期間で高い頻度の腫瘍が発生すること、さらに入手および手技の容易さから本邦ではBBNが多くの研究者によって用いられている。

BBN投与により発生する膀胱腫瘍には動物種差がみられ、ラットでは乳頭状非浸潤性腫瘍<sup>8,9,10)</sup>が、マウスでは非乳頭状浸潤性腫瘍<sup>18)</sup>が、またイヌでは両者のいずれもが発生する<sup>19)</sup>ことが知られている。今回の実験で用いたラット膀胱腫瘍モデルは、ヒト表在性膀胱癌モデルとしてその発生・進展様式ならびに種々の増殖・抑制因子などの自然史の解明にきわめて優れている<sup>9,10)</sup>。なお、本研究において実験開始当初はWistar系ラットを用いていたが、比較的最近に施行した実験群からは近交系としてより確立し、世界的に広く用いられるようになったFischer系ラットにて行った。しかし、両者の系統差に関係なく、発生した腫瘍のほとんどが乳頭状非浸潤性移行上皮腫瘍であった。

今回検索した抗癌剤の5-FU系剤、CQ、VCR、CCDPおよびthiotepaなどが、この実験系においてもBBNによる膀胱腫瘍の発育を抑制し、臨床成績と一致した有効な成績が得られた。しかしながら、今回用いた抗癌剤の中には臨床成績と矛盾した結果が得られたものもあるが、これらの薬剤は比較的high grade, high stageの膀胱癌を臨床的に適応対象としている。したがって、浸潤性膀胱癌モデルのマウスBBN膀胱発癌モデル<sup>18)</sup>を用いて同

様の検討を行えば異なった結果が得られる可能性もあり、今後検討すべき課題と考える。また、膀胱癌に対する抗癌剤の効果判定には、同一動物種で表在性および浸潤性のいずれの増殖様式も呈する動物モデルを用いて検討することが望ましい<sup>20)</sup>。

教室のOkajimaら<sup>19,21)</sup>が開発した中動物のイヌ膀胱腫瘍モデルでは、BBNの投与量と投与期間を工夫することにより、ヒト膀胱癌と類似した乳頭状膀胱腫瘍および非乳頭状膀胱腫瘍の2つのタイプの腫瘍が発生する。すなわち、BBN 80, 160 mg/日の少量投与群ではlow gradeの乳頭状非浸潤性移行上皮癌が各々約220週、約130週で観察された。また、BBN 500 mg/日の大量投与ではhigh gradeの非乳頭状浸潤性移行上皮癌が約45~120週で観察され、発生までに要した期間は少量投与群に比して短期間であった。さらに、著者らはMNU 50 mgをあらかじめ膀胱内注入した後、BBN 240 mgを経口投与する実験を行った結果、37週の比較的短期間においてcarcinoma in situ (CIS)の発生することを観察している<sup>22)</sup>。

以上より、イヌの膀胱発癌実験モデルは、ヒト膀胱癌の典型的な2つのタイプならびにCISをも観察されることから、ヒト膀胱癌にもっとも類似したモデルと考えられる。しかし、小動物に比較して実験期間が長期間を要することや、動物数に限度があるため、やはり薬剤のスクリーニング検査などに用いるためには、同一の小動物でヒト膀胱癌に類似した2つのタイプの発癌モデルの確立が必要である。

Oyasuら<sup>23)</sup>はdonorのラットの膀胱をrecipientのラット腎筋内に移植する同種異所性移植膀胱モデル(heterotopically transplanted bladder, HTB)を用いた膀胱発癌実験において、MNU 0.05 mg (low dose)をHTBに注入投与すると乳頭状非浸潤性腫瘍が、一方、0.5 mg (high dose)を投与するとhigh gradeの浸潤性腫瘍がみられたことより、発生した腫瘍がMNUのdose dependentに悪性化する傾向のあることを示した。また、BBNを経口投与したdonorのラットを用いてHTBを作製し、MNU (high dose)を投与すると、さらにhigh gradeでhigh stageの傾向が強くみられたことを報告している<sup>24)</sup>。しかし、この実験結果は、あくまでもHTBモデルを利用したものであり、同一の小動物で本来のnatural bladderにおいても同様のモデルの作製が望まれるところである。Ozonoら<sup>20)</sup>は、ラットにMNU膀胱内注入とBBN経口投与を併用して検討した結果、短期観察では乳頭状腫瘍に加えて非乳頭状腫瘍の発生頻度が増加するが、長期観察ではその頻度に差はな

く、また浸潤性腫瘍モデルとはならないことを報告している。したがって、今後小動物のラットにおけるnatural bladderでの浸潤性腫瘍実験モデルの開発が期待される。

今回は膀胱腫瘍に対する短期間での抗癌剤スクリーニング法として、BBN 8週間投与・全実験期間20週間のモデルを用いたが、ラットBBN膀胱発癌モデルを用いて抗癌剤を投与する実験系がいわゆる抗癌剤の感受性試験になり得るかについては異論のあるところである。すなわち、0.05% BBNを8週間投与した時点でのラットの膀胱粘膜には、前癌変化と考えられているNPHがほぼ100%に出現し、やがて20週時までの12週間に腫瘍が発育してくるため、この間に抗癌剤を投与することは、膀胱に発生した粘膜上皮の不可逆性変化のNPHから腫瘍発生への抑制効果を検討したことになる。一般に、表在性膀胱癌を経尿道的膀胱腫瘍電気切除術(TURBT)で完全に切除した術後5年以内にその53~90%が再発することがよく知られており<sup>3)</sup>、Hinman<sup>25)</sup>はその要因として①手術時の遺残腫瘍、②手術時にすでに発現した前臨床癌あるいは前癌病変、③発癌物質への長期間暴露、④手術時の腫瘍細胞の播種、および⑤切除粘膜の修復過程における発癌物質への暴露、などを挙げている。そのうち最も重要な因子は、TUR時にすでに非腫瘍粘膜上皮に発現していた前臨床癌あるいは前癌病変で、これは膀胱腫瘍の多中心性発生に起因すると推察される。したがって、今回のラットのBBN膀胱発癌の実験系は、再発予防的に用いる有効な薬剤の検索モデルとして極めて有用性の高いものと考えられる。

さて、この実験モデルの利点としては、①膀胱のみに腫瘍が発生し、発生頻度に再現性がみられること。②腫瘍の発生・進展様式ならびに病理組織形態がヒト表在性膀胱癌に類似していること。③抗癌剤の代謝・体内分布がヒトに類似していること。④自然な免疫機構を保持していること。などが挙げられ、in vivoの実験モデルとしてヒトの条件と非常に類似している。

一方、このモデルを用いた抗癌剤感受性試験としての問題点は、①in vitroの実験系と比較して、時間と経費を要すること。②抗癌剤の投与量、投与方法、投与間隔ならびに投与期間の臨床への還元には十分な検討を要すること。③浸潤性膀胱癌に対する化学療法の検討には、ラットを用いて浸潤性腫瘍モデルの開発を行うか、あるいはマウスを用いた実験系で検討する必要があること。などが挙げられる。

とくに②の抗癌剤の投与量、投与方法に関する点については、予備実験における毒性の検討結果にしたがって投与量設定を行った。すなわち、原則としてLD<sub>50</sub>の10

%, ただし 5-FU, NCS, VCR は毒性が強いため LD<sub>50</sub> の 2% に設定した。しかし, Freireich ら<sup>26)</sup>の動物における投与量とヒトにおける投与量との関係についての報告にしたがい, 臨床に還元すると, 今回の実験で用いた投与量がかなり臨床での使用量と差があることになる (Table 4)。投与方法については, やはり予備実験にて臨床的に用いる経静脈内投与と条件を合わせるため, 尾静脈より静脈内投与を施行したが, 頻回投与することにより尾に壊死を来し脱落することが多く, したがって腹腔内投与法をおもに用いた。さらに, 臨床的に膀胱内注入にて投与される薬剤については, 腹腔内注射と膀胱内注入の投与方法による比較を行う必要があるが, 膀胱内注入実験には雌性ラットを用いなければならず, 雌性ラットは雄性ラットに比して BBN 単独投与において腫瘍発生率が低いために統計学的有意差の検討に困難なこと, また, 膀胱内注入による抗癌剤の効果を検討する際, 予備実験においてラットの膀胱に対して抗癌剤を頻回に注入操作を加えることにより結石が発生することを観察したため, 発生した結石の器械的刺激による promoter 作

用も無視できず<sup>27)</sup>, 一考を要すると考えられた。Ohtani ら<sup>28)</sup>は雌性のラット BBN 膀胱腫瘍モデルを用いて DXR や MMC などの抗癌剤の膀胱内注入を行い, その効果を検討しているが, むしろ発癌促進作用がみられたと報告している。これらの DXR や MMC は今回の実験でも腫瘍発生抑制効果は認められていない薬剤であり, ことに DXR は発癌作用のあることも知られており, 膀胱内注入投与に関しては, 薬剤の局所作用の有無およびラットの寿命との関連から, 投与間隔ならびに投与期間についても, 今後の検討が待たれる。

今回の実験において 5-Fu, FT-207 などの 5-Fu 系剤や CQ, VCR, CDDP および thiotepa が有効であった。VCR の 2 群では総投与量は同じであったが, 2 日分割投与より 1 回大量投与が有効であり, CDDP では利尿負荷非併用群では CDDP は有効であったが, 利尿負荷併用群では無効であるも, しかし, 前者では腎尿細管の変性と囊胞様変化がみられたのに対して, 後者では腎障害は全くみられなかったものの抗腫瘍効果は得られなかったというきわめて興味深い結果が得られた。また, 5-Fu 系

Table 4. Estimated dose of anticancer drug in human

Anticancer drug	Theoretical dose in rat		Experimental dose in rat		Estimated dose in human	
	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	LD <sub>50</sub> /10 (mg/kg)	single dose (mg/kg)	total dose (mg/kg)	single dose (mg/60kg)	total dose (mg/kg)
ip DXR	13.7	1.37	1	12	11.4	136.8
			2	24	22.8	273.6
MMC	5.0	0.5	0.5	3.5	5.7	39.9
				6.0		68.4
CPM	130	13	30	360	342	4104
			50	600	570	6840
5-FU	1025	103	20	140	228	1596
				240		2736
FT207	780	78	100	700	1140	7980
				2800		31948
				1200		13680
NCS	2.8	0.28	0.05	0.6	0.57	6.84
			0.075	0.9	0.86	10.32
CQ	3.07	0.3	0.25	1.75	0.57	3.99
				3.0		6.84
			0.5	3.5	0.86	6.02
			6.0		12.04	
BLM	252	25	20	240	228	2736
VCR	1.9	0.19	0.05	1.2	0.57	13.86
			0.1	1.2	1.14	13.86
CDDP	8.3	0.8	0.8	16	9.12	182.4
			1.2	14.4	13.7	164.4
			1	12	11.4	136.8
Thiotepa	11.0	1.1	1	12	11.4	136.8
po FT207	1025	103	100	8400	1140	95760
			100	8400	1140	95760
UFT	1580	158	200	16800	2280	191520
			100	8400	1140	95760
HCFU	920	92	100	8400	1140	95760

剤がラット膀胱腫瘍モデルにおいて有効な結果が得られたが、副作用が5-Fuより少なく、長期に継続して経口投与が可能な5-Fu関連物質であるFT-207, UFTおよびHCFUの経口投与の検討では、UFTおよびHCFUで極めて良い成績がえられた。これらの抗癌剤は生体内で5-Fuに活性化され全身的な5-Fuの副作用の発現が低く、また、UFTはより少ないFT-207含量で5-Fu濃度が腫瘍組織内で高く保たれるなどの利点がある<sup>29)</sup>。これらの薬剤のごとく生体内で活性化されて効果の発現する抗癌剤の効果判定には、*in vitro*の実験系よりは*in vivo*の実験系の方が有用性が高いといえよう。

以上、BBNによる実験的ラット膀胱腫瘍モデルを用いた抗癌剤の効果判定法について考察したが、本法は、種々の長所・短所はあるものの、抗癌剤の効果の検討には有用な実験方法の一つであると考えられる。抗菌剤感受性試験と同様に、抗癌剤感受性試験も簡便に施行できて、かつ有用性のある抗癌剤の効果判定できる方法が、究極的な実験的操作と思われるが、副作用や多剤併用などの投与方法の検討などを考慮すると、抗癌剤の効果判定法には*in vitro*のスクリーニングとともに*in vivo*の試験も行うことが必要であろう。したがって、より経済的かつ短期間にスクリーニングができ、ヒト膀胱癌と類似の*in vivo*の実験法の確立が必要であることはいうまでもなく、BBN実験系のマウス膀胱腫瘍モデルへの適用をはじめ、より短期間で膀胱癌の発生がみられるイヌモデルおよびラットの浸潤性膀胱腫瘍モデルの確立など*in vivo*の実験法の確立には今後検討すべき課題は多い。

## 結 語

今回、膀胱癌に対する有効な抗癌剤を実験的に確認する目的で、0.05% BBNを8週間投与し、その後12週間観察して動物の約87~95%に膀胱腫瘍の発生が得られるラットの膀胱発癌実験モデルを用いて、種々の抗癌剤の膀胱腫瘍発育に対する影響を検討した。

実験に用いたラットの系統差ならびに抗癌剤の投与方法により、1)Wistar系ラットを用いた抗癌剤腹腔内投与実験系、2)Fischer 344ラットを用いた抗癌剤経口投与実験系および3)Fischer 344ラットを用いた抗癌剤腹腔内投与実験系の3群に分けて検討した。

1)Wistar系ラットを用いた抗癌剤腹腔内投与実験系では、702匹の雄性Wistarラットを用い、26群に分けたが、BBN投与のみの対照群に比し、有意に膀胱腫瘍の発生が抑制されたのは、第8群の5-Fu 20 mg/kg・BW腹腔内投与群、第10群、第11群、第12群および第13群のFT-207腹腔内投与群、第17群、第18群のCQ 0.25

mg/kg・BWおよび0.5 mg/kg・BW腹腔内投与群、第22群のVCR 0.1 mg/kg・BW腹腔内投与群、そして第23群、第25群の利尿負荷非併用CDDP腹腔内投与群の10群であった。

2)Fischer 344ラットを用いた抗癌剤経口投与実験系では、160匹の雄性Fischer 344ラットを用い、6群に分けたが、対照群に比し、有意に腫瘍発育が抑制されたのは、第30群、第31群のUFT 200 mg経口投与群および第32群、第33群のHCFU投与群の4群であり、また用量依存的に抑制がみられた。

3)Fischer系ラットを用いた抗癌剤腹腔内投与実験系では、第35群のthiotepa腹腔内投与群で、対照群に比し有意に腫瘍発育が抑制された。

以上、ラットBBN膀胱発癌モデルを用いて種々の抗癌剤の膀胱腫瘍発育に対する効果を検討した結果、5-Fu系薬剤、CQ、VCR、CDDPおよびthiotepaの腫瘍発育抑制効果が示された。

本実験モデルは、臨床的に表在性膀胱癌の術後再発予防目的で用いる抗癌剤の選択に有用であると考えられる。

(本論文の一部は第21回および第29回日本癌治療学会総会において報告した。稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導ならびに御校閲を賜りました恩師岡島英五郎教授に心より感謝致します。さらに御助言御指導を頂きました腫瘍病理学教室小西陽一教授、第1外科学教室中野博重教授に感謝致します。また本研究の遂行にあたり御協力頂きました奈良県立医科大学泌尿器科学教室諸兄に厚く感謝申し上げます。)

## 文 献

- 1) 岡島英五郎：膀胱腫瘍の診断・治療の現況。日本医事新報 3031：8-13, 1982。
- 2) Torti, F. M. and Lum, B. L. : The biology and treatment of superficial bladder cancer. J. Clin. Oncol. 2: 505-531, 1984。
- 3) Herr, H. W., Laudone, V. P. and Whitmore, W. F. Jr. : An overview of intravesical therapy for superficial bladder tumors. J. Urol. 138: 1363-1368, 1987。
- 4) 岡島英五郎：膀胱癌 bladder cancerの化学療法の進歩と問題点—膀胱癌治療のoverview。泌尿器がん化学療法の進歩と問題点。第1版、蟹書房、東京、p95-101, 1987。
- 5) Ozono, S., Kawata, Y., Fukui, Y., Fujimoto, K., Iwai, A., Matsuki, H., Samma, S., Hirao, Y.

- and Okajima, E. : Neoadjuvant therapy for locally invasive bladder cancer: Results of randomized trials in 40 patients. *Urol. Int.* **47** (Suppl 1): 116-119, 1991.
- 6) 伊東信行: 膀胱癌一発生と進展並びにその修飾. 日病会誌. **75**: 3-37, 1986.
- 7) 福島昭治, 長谷川良平: 発生と進展—1 ラット図説, 臨床癌シリーズ, No. 4. 膀胱癌. メジカルビュー社, 東京, p117-127, 1986.
- 8) 石川昌義, 岡島英五郎, 井本 卓, 平松 侃, 伊東信行, 小西陽一, 日浅義雄: 膀胱腫瘍に関する実験的研究. 第1報 N-Butyl-N-Butanol (4)-Nitrosamine 投与によるダイコクネズミの膀胱腫瘍発生について. 日泌尿会誌. **60**: 99-108, 1969.
- 9) Ito, N., Hiasa, Y., Tamai, A., Okajima, E. and Kitamura, H. : Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats. *Gann* **60**: 401-410, 1969.
- 10) Fukushima, S., Murasaki, G., Hirose, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R. and Ito, N. : Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Acta Pathol. Jpn.* **32**: 243-250, 1982.
- 11) 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47, KW-103 および HeLa 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. 日泌尿会誌. **74**: 1606-1620, 1983.
- 12) Hamburger, A. W. and Salmon, S. E. : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-463, 1977.
- 13) 井上雄弘, 王 毅, 多田敦彦, 植野克巳, 小島和子, 小川一誠: マウス腎被膜下移植法 (subrenal capsule assay) による制癌剤感受性の検討. 癌と化学療法 **12**: 1644-1650, 1985.
- 14) 山内民男, 岡田謙一郎, 吉田 修, 河合恒雄: 膀胱癌の抗癌剤感受性試験—ヌードマウス実験系による. 泌尿紀要 **32**: 1949-1958, 1986.
- 15) 内藤克輔, 久住治男, 浅利豊紀, 小橋一功, 天野俊康, 打林忠雄: 尿路上皮悪性腫瘍における抗癌剤感受性試験—human tumor clonogenic assay を中心として. 泌尿紀要 **32**: 1959-1966, 1986.
- 16) Ertürk, E., Cohen, S. M., Price, J. M. and Bryan, G. T. : Pathogenesis, histology, and transplantability of urinary bladder carcinomas induced in albino rats by oral administration of N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide. *Cancer Res.* **29**: 2219-2228, 1969.
- 17) Hicks, R. M. and Wakefield, J. ST. J. : Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I. Histology. *Chem. Biol. Interactions* **5**: 139-152, 1972.
- 18) Ohtani, M., Kakizoe, T., Nishio, Y., Sato, S., Sugimura, T., Fukushima, S. and Niijima, T. : Sequential changes of mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinomas by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res.* **46**: 2001-2004, 1986.
- 19) Okajima, E., Hiramatsu, T., Hirao, K., Ijuin, M., Hirao, Y., Babaya, K., Ikuma, S., Ohara, S., Shiomi, T., Hijioka, T. and Ohishi, H. : Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in dogs. *Cancer Res.* **41**: 1958-1966, 1981.
- 20) Ozono, S., Babaya, K., Sasaki, K., Okamoto, S., Momose, H., Fujimoto, K., Tsumatani, K., Yamaguchi, H., Hirao, Y. and Okajima, E. : Rat urinary bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine and N-methyl-N-nitrosourea. *Urol. Res.* **18**: 323-326, 1990.
- 21) 岡島英五郎: 発生と進展—3 イヌ 図説, 臨床癌シリーズ, No. 4. 膀胱癌. メジカルビュー社, 東京, p136-148, 1986.
- 22) Samma, S., Uemura, H., Tabata, S., Iwai, A., Nakatsuji, F., Matsuki, H., Babaya, K., Hirao, Y. and Okajima, E. : Rapid induction of carcinoma in situ in dog urinary bladder by sequential treatment with N-methyl-N'-nitrosourea and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Gann* **75**: 385-387, 1984.
- 23) Oyasu, R., Manning, D. J., Matsumoto, M. and Hopp, M. L. : Heterotopic urinary bladder with a communicating reservoir. *Cancer Res.* **36**: 2261-2267, 1976.
- 24) Oyasu, R., Samma, S., Ozono, S., Bauer, K., Wallemark, C-B. and Homma, Y. : Induction of high-grade, high-stage carcinomas in the rat urinary bladder. *Cancer* **59**: 451-458, 1987.

- 25) **Hinman, F. Jr.** : The recurrence of bladder tumors. *J. Urol.* **83**: 294-300, 1960.
- 26) **Freireich, E. J., Gehan, E. A., Rall, D. P., Schmidt, L. H. and Skipper, H. E.** : Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother. Rep.* **50**: 219-244, 1966.
- 27) **Oyasu, R., Iwasaki, T. and Ozono, S.** : Diffuse papillomatosis of rat urinary bladder occurring in association with vesical calculi. *J. Urol.* **132**: 1012-1015, 1984.
- 28) **Ohtani, M., Fukushima, S., Okamura, T., Sakata, T., Ito, N., Koiso, K. and Nijjima, T.** : Effects of intravesical instillation of antitumor chemotherapeutic agents on bladder carcinogenesis in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer* **54**: 1525-1529, 1984.
- 29) 朝日俊彦, 松村陽右, 屋崎雄治郎, 吉本 純, 金重哲三, 公文裕巳, 津島知靖, 大森弘之: 膀胱腫瘍に対するUFTの臨床効果. *癌と化学療法* **9**: 503-507, 1982.