

N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine による ラット膀胱発癌における細胞増殖の解析

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

岡 本 新 司

ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION IN RAT BLADDER CARCINOMA INDUCED BY N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL)NITROSAMINE

SHINJI OKAMOTO

Department of Urology, Nara Medical University

Received September 29, 1995

Abstract: Histopathological examination, flowcytometry (FCM) study and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) analysis were serially performed during the induction of carcinogenesis by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) in the rat bladder, which is known to be an experimental model of human non-invasive papillary bladder cancer. Histological malignancy of the induced tumors was compared with the degree of cell proliferation by these three methods. FCM analysis revealed substantial differences of DNA change in bladder epithelial cells between the 4-week and 8-week treatment groups. These findings coincided with the changes observed in the histopathological examination concurrently performed. In the analysis of ploidy, tetraploid did not appear in the bladder of rats treated with BBN for 4 weeks. In PCNA analysis of epithelial cells in BBN-induced rat bladder carcinoma, PCNA-positive cells in the carcinoma increased with the severity of histopathological change. In addition, the PCNA index tended to be higher in the bladder of rats treated with BBN, which appeared to be histopathologically normal. These findings suggest that the PCNA index serves as one useful parameter to predict the progression and proliferation of bladder carcinoma.

Index Terms

bladder carcinoma, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, flowcytometry, proliferating cell nuclear antigen

緒 言

膀胱癌は職業病の一つとして古くから知られており、後の疫学的検索が膀胱の化学発癌に関する研究の基礎となった。その後、今日まで数多くの研究によりヒト膀胱発癌の実験モデルが開発された。ヒトの膀胱癌は少なくとも2つのタイプに大別される。ひとつは、しばしば多

発の傾向を示す表在性乳頭状の膀胱癌、もうひとつのタイプは非乳頭状の癌で、急速に浸潤し極めて予後の悪いものである。

この際だった2つのタイプの膀胱癌の発生と進展に関しては未だ十分に解明されていないのが現状である。そこで、ヒトの膀胱癌の詳細な検討がなされるとともに、ヒトの材料のみでは困難な、膀胱癌の発生、進展の様々

な要因の検索が動物実験にて行われてきた。

膀胱発癌に関する動物実験には、芳香族アミン、ニトロフラン誘導体、ニトロソ化合物などが発癌物質として使用され、動物はマウス、ラット、イヌなどが使用されている¹⁾。

我が国ではニトロソ化合物のN-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN)を小動物であるラット、マウスに投与する発癌実験がよく用いられてきた²⁾³⁾。ラットにBBNを経口投与すると、多発性の乳頭状非浸潤性膀胱腫瘍が発生し、そのほとんどがlow grade, low stageの移行上皮癌で、ヒトの表在性膀胱癌に類似している。しかし同じ小動物のマウスにBBNを経口投与すると、ラットと異なり、非乳頭状浸潤性膀胱腫瘍が発生し、病理組織学的に核の異型性や組織構築の乱れを伴うhigh gradeで筋層まで浸潤した移行上皮癌が多く、ヒトの浸潤性膀胱癌に類似している。またしばしば上皮内癌(carcinoma in situ, CIS)の組織像を呈することがある。マウスの実験膀胱癌の研究では, Bertramら⁴⁾やAkagiら⁵⁾が膀胱上皮の経時的変化を過形成ないし異形成のある膀胱上皮から直接的に発生すると推定し, Ohtaniら⁶⁾がこれを裏付けている。臨床においては表在性癌が浸潤性癌となるのは稀で、むしろ上皮内癌から直接浸潤性癌が発生する可能性が報告されている⁷⁾。このことからマウスの膀胱癌を研究することはヒトの浸潤性膀胱癌の発生と進展を解明するのに有力な手掛かりをあたえるものと思われる。一方ラットの膀胱発癌の過程はItoら³⁾のBBNによる実験で単純性過形成(simple hyperplasia SH), 乳頭状結節状過形成(papillonodular hyperplasia PNH), 乳頭腫(papilloma), 乳頭状癌の順で発生し, SHは発癌因子が除去されると正常上皮に復するが, PNHは発癌因子を除去しても不可逆性に乳頭腫を経て癌に移行するものもあれば, 可逆性に正常上皮に移行するものがあることが明らかにされている。すなわちPNHには前癌病変が混在していると考えられている。またラットの浸潤性癌は乳頭状癌が相当大きくなった状態ではじめて認められ上皮内癌は同定されない⁸⁾。この前癌病変を研究することは癌の発生直前の情報を提供し、臨床的に早期発見、早期治療に大きく寄与すると思われる。またこの前癌病変をマーカーとして発癌物質あるいはpromoterを早期に同定出来る可能性がある。

今回ヒトの表在性膀胱癌のモデルであるラットのBBNおよびN-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(EHBN)膀胱発癌実験系を用いて、経時的に膀胱の病理組織学的検索とともにflowcytometry(FCM)によ

る膀胱粘膜上皮のDNA ploidy測定を行い、また免疫組織学的にproliferating cell nuclear antigen(PCNA)により細胞の増殖性、腫瘍細胞の組織学的悪性度の比較検討を行った。

材料と方法

実験1

ラット BBN, EHBN 膀胱発癌における経時的病理組織学的変化とFCMによるDNA ploidyの変化

動物は6週齢雌性F344ラット(日本チャールスリバー, 神奈川)252匹を用いた。全動物は6匹ずつプラスチックケージにいれ、22°Cの空調動物舎にて飼育した。飼料は繁殖用市販標準飼料(CRF-1, 日本チャールスリバー)を用い、BBN, EHBN(岩井化学, 横浜)は少量のTween 80とともに0.05%の濃度で水道水に混じり遮光瓶より自由摂取させた。各々実験開始後4週, 8週, 12週, 16週および20週間投与する群を作成し、その後28週まで観察した。観察期間中、経時的に一群あたり3匹を病理組織学的の検索用に、3匹をFCM用に、計6匹の動物をエーテル麻酔下に安楽死させ膀胱を摘出した(Fig. 1)。

病理組織学的検索

膀胱を後部尿道で結紮し膀胱内腔に10%中性ホルマリンを1.0 ml 注入し固定の後、膀胱の正中線で切開し膀胱内腔を肉眼的に観察した。膀胱はHematoxyline-Eosine(H&E)染色を行って従来よりわれわれが用いている組織分類⁹⁾¹⁰⁾によって分類した。組織分類の判定は個々の膀胱でみられた最も進展した変化をもってその膀胱の病理組織学的変化とし、下記の診断基準に従った。

病理組織診断基準

正常膀胱上皮 3層の細胞よりなる移行上皮で表層細胞、間層細胞、基底細胞に区別される(Fig. 2)。

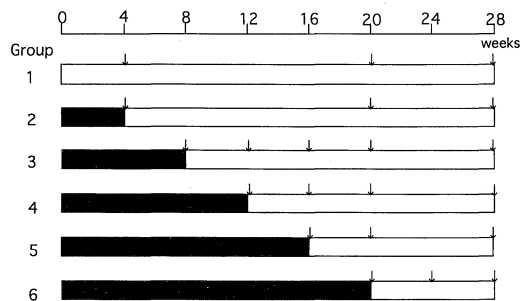


Fig. 1. Experimental design.

■ 0.05% BBN or EHBN

□ Tap water

↓ Sacrifice

単純性過形成(SH) 粘膜がびまん性に6—8層に多層化した変化。過形成をきたした細胞には、異形成や分裂像も全く認められない。毛細血管や結合織の侵入も認められない(Fig. 3)。

乳頭状結節状過形成(PNH) 移行上皮の一部が局所的、あるいは多発的に多層化する変化で一部は内腔へ乳

頭状に突出し、その中心部にわずかな結合織を伴う毛細血管がみられる。また下方に結節状に発育を示すものもみられる(Fig. 4)。

carcinoma

高分化型 G 1: 上皮の異型に乏しく、移行上皮としての特徴を明らかに示す(Fig. 5)。

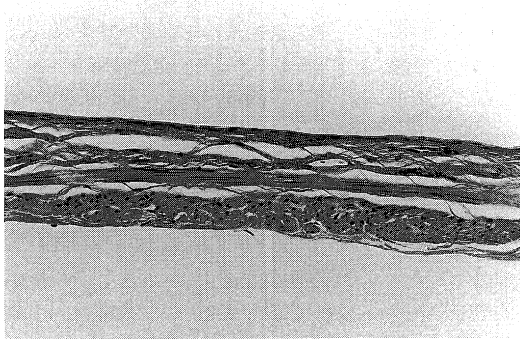


Fig. 2. Normal epithelium of the rat urinary bladder (H-E, ×100).

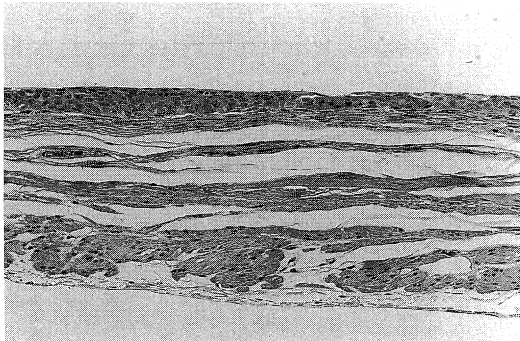


Fig. 3. Simple hyperplasia of the rat urinary bladder (H-E, ×100).

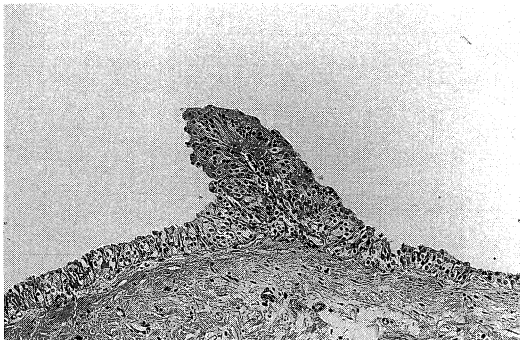


Fig. 4. Papillonodular hyperplasia of the rat urinary bladder (H-E, ×100).

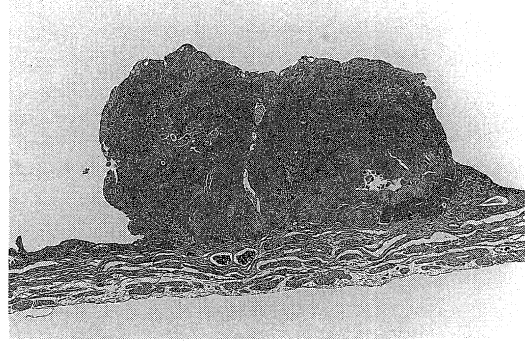


Fig. 5. Transitional cell carcinoma grade 1 of the rat urinary bladder (H-E, ×40).

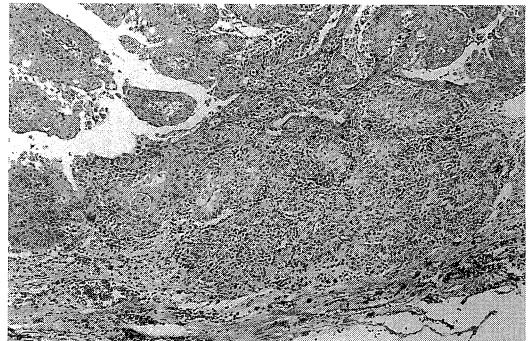


Fig. 6. Transitional cell carcinoma grade 2 of the rat urinary bladder (H-E, ×40).

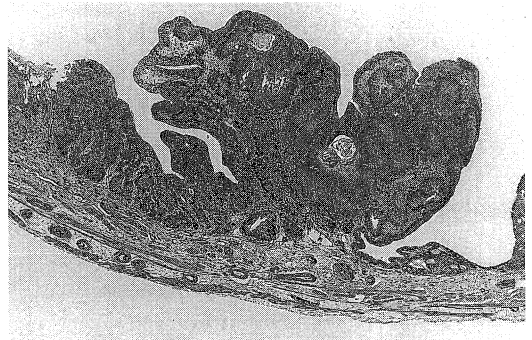


Fig. 7. Squamous metaplasia of the rat urinary bladder (H-E, ×40).

中間型 G2 : G1, G3 の中間型 (Fig. 6).

低分化型 G3 : 異形成が著しくしばしば移行上皮としての形態を失っている.

扁平上皮化生 (squamous metaplasia ; Sq)

膀胱上皮の一部または全体が分化した扁平上皮によって置き変わっている (Fig. 7).

FCM 用サンプルの作成および DNA ploidy の測定

a) ラット膀胱上皮細胞単離手順 (Fig. 8)

摘出した膀胱に直ちにリザーバー (ジェイムス, 広島) を接続, 0.25 % trypsin + 0.05 % EDTA 含有 PBS を注入した. 37°C で 30 分間 incubation した後, 膀胱を milking し, 内容を回収, 単離細胞を採取した. 大きな腫瘍形成が認められた場合は腫瘍を切除し, ハサミでさらに細

切し, 0.25 % trypsin + 0.05 % EDTA 含有 PBS を加え, 37°C で 30 分間 incubation し, 単離細胞を採取した. 採取した細胞は PBS で洗浄後, 70 % エタノールを添加し -20°C で保存した.

b) DNA ploidy の測定

70 % エタノールを添加し -20°C で保存した単離細胞を PBS で洗浄後 RNase (500 μg/ml) (Sigma Chemical Co., USA) で処理し propidium iodide (PI) (50 μg/ml) (Sigma) で 4°C, 20 分間暗所にて染色し FACScan で解析を行った. ラット末梢血リンパ球を対照として FCM 測定の際に, その G0/G1 のピークを 50 チャンネルに合わせ, それ以外に 2 峰性にピークを認めたものを aneuploid とした. なお DNA index は

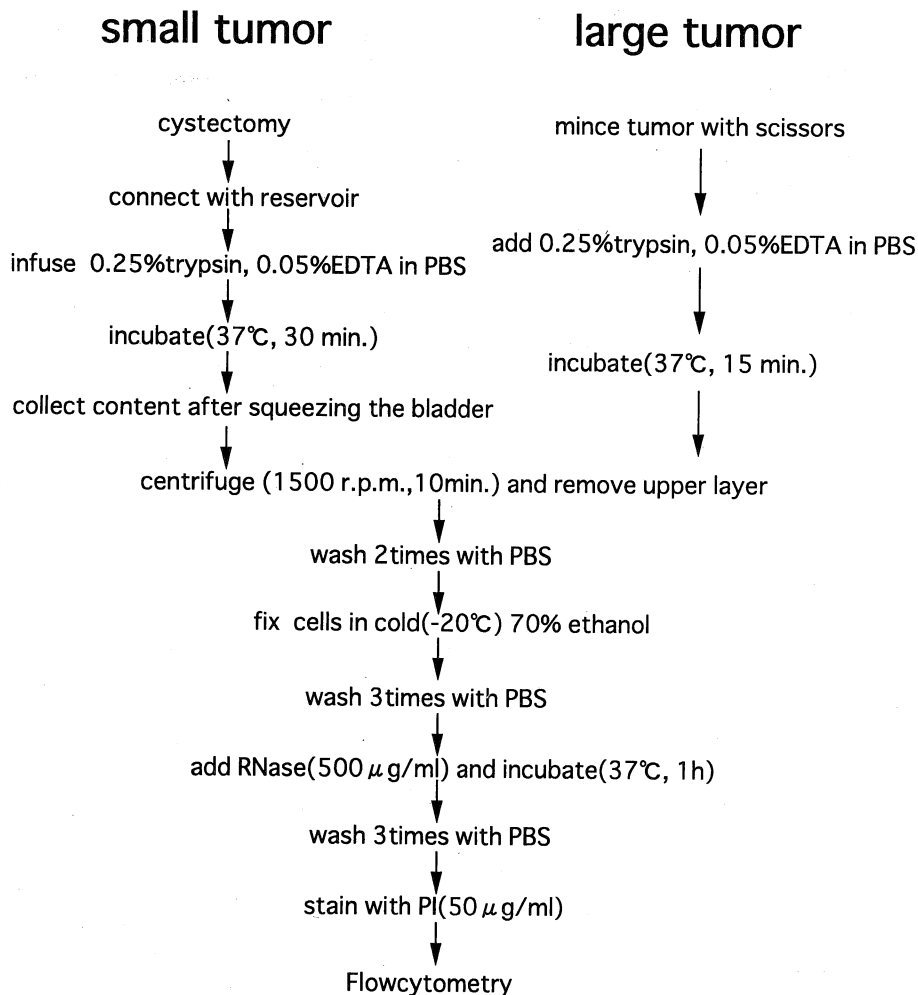


Fig. 8. Technique of single cell suspension of the rat urinary bladder epithelium.

$$\text{DNA index} = \frac{\text{G 0/G 1 以外のピークチャンネル数}}{\text{G 0/G 1 ピークチャンネル数}}$$

で求めた。

実験 2

0.05%BBN 投与による雌性ラット膀胱発癌における病理組織学的検索と PCNA の出現頻度との関係

動物は6週齢雌性 F 344 ラット 114 匹を用いた。飼育方法、飼料は実験 1 に準じ、BBN は少量の Tween 80 とともに 0.05% の濃度で水道水に混じ遮光瓶より自由摂取させた。実験開始後 BBN を 4 週、8 週、12 週、16 週および 20 週間投与する群を作成し、さらに各群で投与期間終了後直ちに屠殺する群を各 8 匹と、BBN 投与期間終了後実験開始から 20 週まで観察する群各 12 匹に分けた。動物はエーテル麻酔下に安楽死させ、直ちに膀胱を摘出し、10%ホルマリンにて固定後、PCNA の抗原性を保つため摘出から 48 時間以内にパラフィン包埋を行い、H&E 染色で病理組織学的検索と、抗 PCNA 抗体を用いて免疫組織学的検索を行った(Fig. 9)。

免疫組織学的染色(DAKO 社の方法に準じる)

10%ホルマリンで固定後 48 時間以内にパラフィン包

埋した組織検体にて厚さ 5 μm の切片を作成し、poly-L-lysine コーティングを施したスライドグラスに乗せ十分乾燥させた。キシレン、アルコール列にて型通り脱パラフィンし水洗後、5 分間 3%過酸化水素水溶液で内因

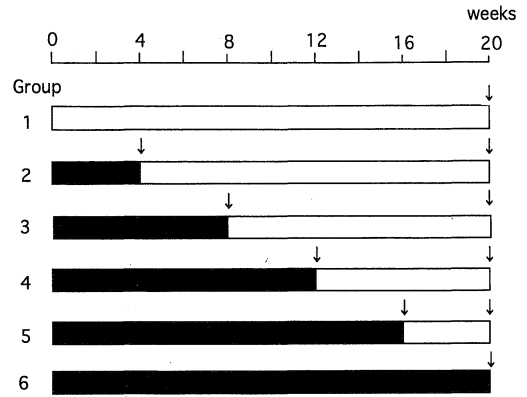


Fig. 9. Experimental design.

■ 0.05% BBN
□ Tap water

↓ Sacrifice

Table 1. Light microscopic findings of the urinary bladder in rats treated with BBN

Group	Subgroup	Period(wks)		Effective No. of rat	SH	PNH	No. of rat with carcinoma	Carcinoma						
		BBN→Control						CIS	G1	G2	G3	Sq	Inv.	
1	1	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	20	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	28	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	4	16	3	3	3	2	0	2	0	0	0	0	0
	3	4	24	3	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	1	8	0	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	8	4	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	8	8	3	3	3	1	0	0	1	0	0	1	
	4	8	12	3	3	3	3	0	2	1	0	0	0	
	5	8	20	3	3	3	3	0	0	3	0	1	1	
4	1	12	0	3	3	3	3	0	1	2	0	0	0	
	2	12	4	3	3	3	3	0	2	1	0	0	0	
	3	12	8	3	3	3	3	0	0	3	0	2	1	
	4	12	16	3	3	3	3	0	1	2	0	2	2	
5	1	16	0	3	3	3	3	0	3	0	0	1	0	
	2	16	4	3	3	3	3	0	2	1	0	1	0	
	3	16	12	3	3	3	3	0	0	1	2	2	2	
6	1	20	0	3	3	3	3	0	0	3	0	1	2	
	2	20	4	3	3	3	3	0	0	3	0	0	1	
	3	20	8	3	3	3	3	0	2	1	0	3	1	

wks : weeks

BBN : N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine

CIS : Carcinoma in situ

Sq : Squamous metaplasia

Inv : Invasive transitional cell carcinoma

SH : Simple hyperplasia

PNH : Papillonodular hyperplasia

性ペルオキシダーゼを阻害した。

蒸留水で洗浄後、tris-buffered saline(TBS: 0.05 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.6)で5分間処理し、DAKO EPOS Anti-PCNA/HRPを数滴(1滴は約50 μL)切片に滴下し、60分間室温で反応させた。5分間TBSで洗浄後、発色基質にdiaminobenzidine(DAB)を用い、10分間のincubation後、十分に洗浄しマイヤーのヘマトキシリンで核染色を施した。

免疫組織学的染色性の判定

光学顕微鏡400倍下で、PCNA染色が最も高い領域を選択し、異なる数視野で、腫瘍細胞核1000個を観察し、全観察細胞に対する陽性細胞の割合よりPCNA index (%)を算出した。なお、有意差検定にはWilcoxon testの両側検定またはχ²検定を用いた。

結 果

実験1

1) ラットBBN, EHBN膀胱発癌における病理組織学的所見

BBN投与群でのSHの発生は4週投与群で66.7%

(9匹中6匹)に、8週投与群では93.3%(15匹中14匹)に、12週(12匹)、16週(9匹)、20週(9匹)の各投与群では全例に認められた。またPNの発生が4週投与群では55.6%(9匹中5匹)に、8週投与群では80.0%(15匹中12匹)に、12週(12匹)、16週(9匹)、20週(9匹)の投与群では全例に認められた。癌の発生は4週投与群で22.2%(9匹中2匹)に、8週投与群で46.7%(15匹中7匹)に、12週(12匹)、16週(9匹)および20週(9匹)の各投与群で全例に認められた。BBN4週投与群で投与終了後直ちに屠殺した群ではSH, PNHおよび癌の発生は認められなかったが、全観察期間が20週以上の群ではSH, PNHおよび癌の発生がみられた。8週投与群でも全観察期間が12週までの群では癌の発生をみられなかったが、12週投与群では投与終了後直ちに屠殺した群でも癌の発生が認められた(Table 1)。

一方、EHBN投与群では、SHの発生が4週投与群では44.4%(9匹中4匹)に、8週投与群では93.3%(15匹中14匹)に、12週(12匹)、16週(9匹)、20週(9匹)の各投与群では全例に認められ、またPNHの発生が4週投与群では44.4%(9匹中4匹)に8週投与群では80.0%

Table 2. Light microscopic findings of the urinary bladder in rats treated with EHBN

Group	Subgroup	Period(wks)		Effective No. of rat	SH	PNH	No. of rat with carcinoma	Carcinoma					
		EHBN→Control						CIS	G1	G2	G3	Sq	Inv.
1	1	0	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	20	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	28	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	4	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	4	16	3	2	1	0	0	0	0	0	0	0
	3	4	24	3	2	3	1	0	1	0	0	0	0
3	1	8	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	8	4	3	3	3	2	0	2	0	0	0	0
	3	8	8	3	3	3	3	0	2	1	0	0	0
	4	8	12	3	3	3	3	0	2	1	0	1	1
	5	8	20	3	3	3	3	0	2	0	1	0	3
4	1	12	0	3	3	3	3	0	2	1	0	0	0
	2	12	4	3	3	3	3	0	1	2	0	1	0
	3	12	8	3	3	3	3	0	1	2	0	1	2
	4	12	16	3	3	3	3	0	1	2	0	0	1
5	1	16	0	3	3	3	3	0	3	0	0	0	0
	2	16	4	3	3	3	3	0	1	2	0	0	1
	3	16	12	3	3	3	3	0	2	1	0	0	2
6	1	20	0	3	3	3	3	0	1	2	0	1	0
	2	20	4	3	3	3	3	0	1	2	0	1	2
	3	20	8	3	3	3	3	0	0	2	1	3	2

wks : weeks EHBN : N-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine
 CIS : Carcinoma in situ Sq : Squamous metaplasia
 Inv : Invasive transitional cell carcinoma
 SH : Simple hyperplasia PNH : Papillonodular hyperplasia

Table 3. DNA index and ploidy of the urinary bladder in rats treated with BBN

Group	Exp. period		DNA index		DNA ploidy	
	BBN	Water	Group	Mean±SD	Diploid	Aneuploid
1-1	0	4	group 1	1.04±0.03	3	0
-2	0	20			3	0
-3	0	28			3	0
2-1	4	0	group 2	1.07±0.03	3	0
-2	4	16			3	0
-3	4	24			3	0
3-1	8	0	group 3	1.07±0.07	3	0
-2	8	4			2	1
-3	8	8			2	1
-4	8	12			0	3
-5	8	20			2	1
4-1	12	0	group 4	1.23±0.12	0	3
-2	12	4			1	2
-3	12	8			0	3
-4	12	16			0	3
5-1	16	0	group 5	1.18±0.05	1	2
-2	16	4			0	3
-3	16	12			0	3
6-1	20	0	group 6	1.21±0.08	2	1
-2	20	4			0	3
-3	20	8			0	3

Table 4. DNA index and ploidy of the urinary bladder in rats treated with EHBN

Group	Exp. period		DNA index		DNA ploidy	
	EHBN	Water	Group	Mean±SD	Diploid	Aneuploid
1-1	0	4	group 1	1.04±0.04	3	0
-2	0	20			3	0
-3	0	28			3	0
2-1	4	0	group 2	1.07±0.07	3	0
-2	4	16			2	1
-3	4	24			2	1
3-1	8	0	group 3	1.10±0.11	3	0
-2	8	4			2	1
-3	8	8			2	1
-4	8	12			0	3
-5	8	20			1	2
4-1	12	0	group 4	1.12±0.05	1	2
-2	12	4			1	2
-3	12	8			1	2
-4	12	16			1	2
5-1	16	0	group 5	1.12±0.08	2	1
-2	16	4			1	2
-3	16	12			0	3
6-1	20	0	group 6	1.15±0.08	2	1
-2	20	4			1	2
-3	20	8			0	3

(15 匹中 12 匹)に, 12 週(12 匹), 16 週(9 匹), 20 週(9 匹)の各投与群では全例に認められた. 癌の発生は 4 週投与群で 11.1%(9 匹中 1 匹)に, 8 週投与群で 73.3%(15 匹中 11 匹)に, 12 週(12 匹), 16 週(9 匹)および 20 週(9 匹)の各投与群では全例に認められた. EHBN 4 週投与群では BBN 投与群と同様, 投与終了後直ちに屠殺した群では SH, PNH および癌の発生は認められなかったが, 全観察期間が 20 週以上の群では SH, PNH および癌の発生がみられた. EHBN 8 週投与群でも BBN 投与群と同様の傾向がみられた(Table 2).

なお BBN, EHBN 投与の両群ともに全期間を通じて CIS は観察されなかった.

2) BBN および EHBN ラット膀胱発癌での FCM による膀胱上皮の DNA ploidy の変化

BBN 投与を受けたラット膀胱上皮の DNA ploidy についてみると 4 週投与群に aneuploid は出現しなかったが, 8 週投与群では 40.0%(15 匹中 6 匹), 12 週投与群では 91.7%(12 匹中 11 匹), 16 週投与群では 88.8%(9 匹中 8 匹), 20 週投与群では 77.8%(9 匹中 7 匹)の頻度で aneuploid pattern がみられた. 各群の DNA index の平均値は, BBN 非投与群が 1.04 ± 0.03 , 4 週投与群が 1.07 ± 0.07 , 8 週投与群が 1.07 ± 0.07 , 12 週投与群が 1.23 ± 0.12 , 16 週投与群が 1.18 ± 0.05 , 20 週投与群では 1.21 ± 0.08 であった(Table 3).

EHBN 投与を受けたラット膀胱上皮の DNA ploidy は, 4 週投与群で 22.2%(9 匹中 2 匹), 8 週投与群で 46.7%(15 匹中 7 匹), 12 週(12 匹), 16 週(9 匹), 20 週(9 匹)の各投与群ではそれぞれ 66.7%に aneuploid pattern がみられた. また各群の DNA index の平均値は

EHBN 非投与群が 1.04 ± 0.04 , 4 週投与群 1.07 ± 0.07 , 8 週投与群 1.10 ± 0.11 , 12 週投与群 1.12 ± 0.05 , 16 週投与群が 1.12 ± 0.08 で, 20 週投与群では 1.15 ± 0.08 であった(Table 4). なお BBN 投与群, EHBN 投与群ともに tetraploid はまったくみられなかった.

実験 2

1) 雌性ラットの BBN 投与による膀胱病理組織学的検索

膀胱の病理組織分類の判定は実験 1 での基準に準じて行い, その結果を Table 5 に示した. BBN 4 週投与群で投与終了直後の屠殺群では正常粘膜が 12.5%(8 匹中 1 匹), SH が 87.5%(8 匹中 7 匹)にみられたが, PNH は観察されなかった. BBN 4 週間投与 20 週屠殺群では正常粘膜が 25.0%(12 匹中 3 匹), SH が 50.0%(12 匹中 6 匹), PNH が 16.7%(12 匹中 2 匹)の頻度でみられた. BBN 8 週以上の投与群では SH, PNH がともに全膀胱上皮にみられた. また癌の発生は BBN 投与後直ちに屠殺した群で 4 週投与群ではみられず, 8 週投与群で G1 のみ 42.9%(7 匹中 3 匹)にみられ, 12 週投与群でも G1 のみ 50.0%(8 匹中 4 匹)にみられ, 16 週投与群では G1 75.0%(8 匹中 6 匹), G2 25.0%(8 匹中 2 匹)に, 20 週投与群では全例に認められた. BBN 投与後水道水を投与し観察した群の癌の発生は, 4 週投与 20 週屠殺群では G1 のみ 8.3%(12 匹中 1 匹)に, 8 週間投与 20 週屠殺群では G1 25.0%(12 匹中 3 匹), G2 25.0%(12 匹中 3 匹)に, 12 週投与 20 週屠殺群では G1 41.7%(12 匹中 5 匹), G2 41.7%(12 匹中 5 匹), 16 週投与 20 週屠殺群では G1 25.0%(12 匹中 3 匹), G2 50.0%(12 匹中 6 匹)にみられた. また全期間を通じて CIS は観察されず,

Table 5. Light microscopic findings and PCNA index of the urinary bladder in rats treated with BBN

group	Sub-group	Period(wks)		Effective No. of rat	Nor	SH	PNH	No. of rat with carcinoma	Carcinoma					PCNA index	
		BBN	Control						G1	G2	G3	Sq	inv		
group 1		0	20	12	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.21
group 2	1	4	0	8	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1.79
	2	4	16	12	3	6	2	1	1	0	0	0	0	0	1.43
group 3	1	8	0	7	0	0	4	3	3	0	0	0	0	0	0.74
	2	8	12	12	0	0	6	6	3	3	0	0	0	0	3.45
group 4	1	12	0	8	0	0	4	4	4	0	0	1	0	0	5.05
	2	12	8	12	0	0	2	10	5	5	0	2	0	0	8.76
group 5	1	16	0	8	0	0	0	8	6	2	0	0	0	0	3.73
	2	16	4	12	0	0	3	9	3	6	0	3	2	0	5.24
group 6		20	0	22	0	0	1	21	19	2	0	3	1	0	11.07

wks : weeks Nor : normal SH : Simple hyperplasia PNH : papillodulary hyperplasia
 Sq : Squamous metaplasia inv : Invasive BBN : N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine

浸潤性癌はBBN 16週投与20週屠殺群およびBBN 20週投与群にのみ認められた。

2) ラット BBN 膀胱発癌における膀胱上皮の PCNA の発現

BBN 非投与の対照群での PCNA index は 0.21 %、BBN 投与終了後直ちに屠殺した群で 4 週投与群では

1.79 %、8 週投与群で 0.74 %、12 週投与群で 5.05 %、16 週投与群で 3.73 %、20 週間投与群では 11.07 %であった。

BBN 投与後水道水投与による観察群では 4 週投与 20 週屠殺群で 1.43 %、8 週投与 20 週屠殺群では 3.45 %、12 週投与 20 週屠殺群では 8.76 %、16 週投与 20 週屠殺

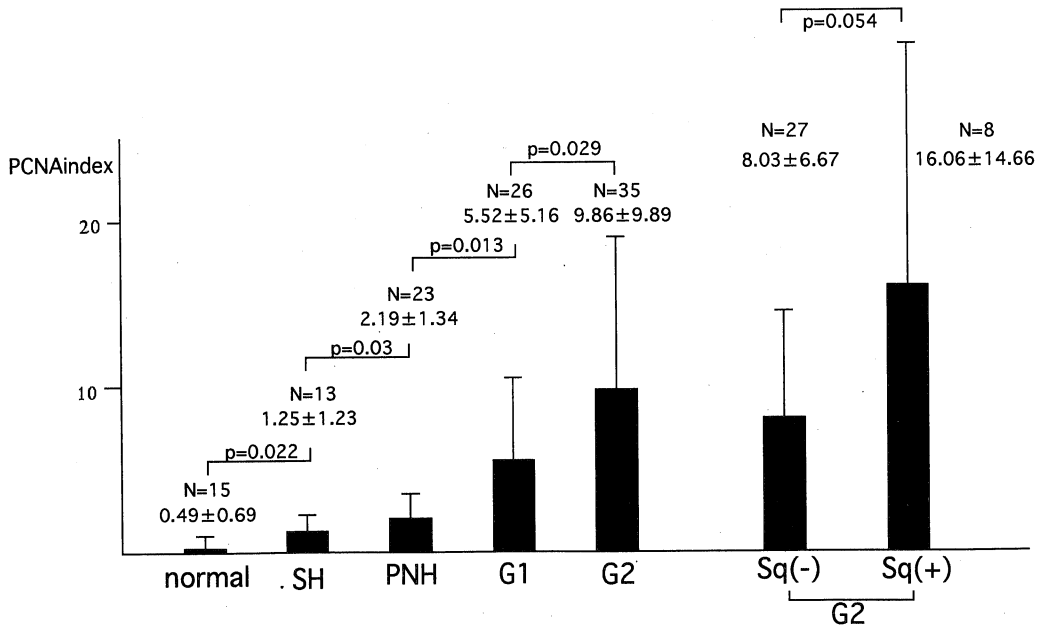


Fig. 10. Correlation between histopathological findings and PCNA index.

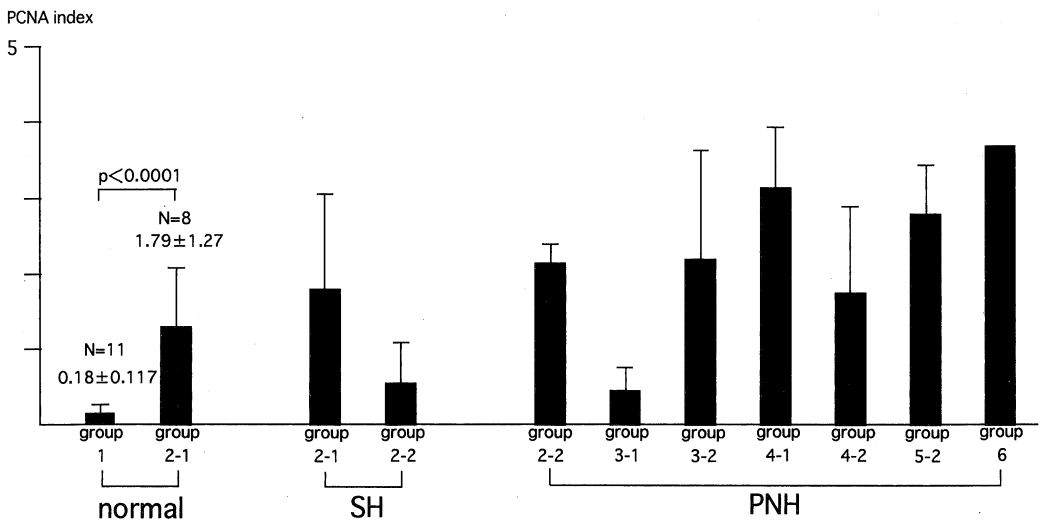


Fig. 11. Correlation between histopathological findings and PCNA index according to BBN treatment periods.

群では5.24%であった(Table 5)。病理組織学的変化とPCNA indexとの関係では病理組織学的変化が高度になるに従ってPCNA indexが高くなる傾向がみられた(Fig. 10)。またTCC-G2の群で扁平上皮化生がある群と無い群では、扁平上皮化生のある群のほうがPCNA indexが高い傾向がみられた($p=0.054$) (Fig. 10)。さらに病理組織学的な変化では正常膀胱上皮と判断されたものでもBBNの投与群と非投与群との比較で、投与群の方がPCNA indexが有意に高い結果が得られた($p<0.0001$) (Fig. 11)。

考 察

膀胱癌の発癌実験の初期では比較的大きな実験動物(家兎, モルモット, 犬)の膀胱に手術的に薬剤を挿入して行われていたが、本邦においてYoshida¹⁰⁾が1935年o-amidoazotoluolをラットに投与して膀胱腫瘍の発生を報告して以来、芳香族アミン、アゾ化合物などの化学物質の発癌性につき種々の動物を用いて研究されてきた。また、1964年Druckreyら¹¹⁾が多数のニトロソ化合物およびその誘導体の発癌性を検索し、BBNを経口的にラットに投与することにより選択的に膀胱に発癌させることを見いだした。またErtürkら¹²⁾はニトロフラン系化合物の発癌性を研究し、N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]fomamide(FANFT)の経口投与も膀胱を標的臓器として短期間に、確実に腫瘍を発生せしめることを見いだした。これらを契機としてBBN, FANFTが膀胱発癌の実験にもっともよく用いられるようになった。

ヒト膀胱癌はその発育様式から乳頭状表在性癌と非乳頭状浸潤性癌に大別される。前者は内視鏡的手術等により保存的に治療されるが、その再発も高率に見られる。一方、後者はしばしば急速に進行し、膀胱全摘除術を行っても救命しえない場合のあることも事実である。この同一臓器において全く異なる発育様式の癌のnatural historyが未だ十分解明されておらず、膀胱腫瘍の治療を困難なものにしている一因でもある。そこで、これらの膀胱腫瘍の動物実験モデルを作成し、そのnatural historyに類似する組織型、進展形式を解明することは重要である。教室のOkajimaらが開発したイヌにおけるBBN膀胱発癌実験系では、BBN少量投与により組織学的異型度の低い、深達度の浅い、乳頭状移行上皮癌が発生し、BBN大量投与により組織学的異型度の高い、深達度の深い、非乳頭状移行上皮癌が発生した。^{13),14)} すなわち、病理組織学的にヒト膀胱癌の典型的な2つのタイプが観察されることから、イヌBBN膀胱発癌実験系はヒトの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こと等に難点がある。

BBNをマウスに投与すると非乳頭状腫瘍が発生し、未分化で浸潤性の移行上皮癌が多く発生する。これはヒト膀胱癌の非乳頭状浸潤性癌に類似している。またしばしばCISの組織像を呈することも報告されている。このマウスの膀胱発癌実験についてはBBNの濃度、投与期間を変えてさまざまな実験が行われてきた^{6),15),16)}。教室の過去の実験ではC3H/He雌性マウスに0.05%BBNを8週投与し、その後BBNを投与せず8-20週観察しても浸潤性癌の発生頻度は10-20%にすぎないが、BBNを12週投与しその後28週まで経時的に観察すると、20-80%のCIS、20-60%の浸潤性癌がみられたことにより、マウスのBBN8週投与実験で膀胱発癌のpromoterの検索に、12週投与でinhibitorの検索に有用であることを報告した¹⁷⁾。

一方ラットにBBNを経口投与すると多発性の乳頭状腫瘍が発生し、そのほとんどが高分化で非浸潤性移行上皮癌で、ヒトの表在性膀胱癌に類似する。このラット膀胱腫瘍発生までの過程での膀胱上皮の変化は、先ず粘膜の肥厚(SH)が発生し、続いて結節性あるいは乳頭状過形成(PNH)の発生をみる。SHは発癌因子が除去されると正常粘膜に復するが、PNHは発癌因子を除去しても不可逆性に乳頭腫を経て癌に移行するものもあれば、可逆性に正常上皮に移行するものがある。すなわちPNHには前癌病変が混在していると考えられている⁸⁾。

このような発癌剤投与によるラット膀胱上皮の可逆的、不可逆的变化のturning pointでの膀胱上皮細胞の変化を病理組織学的検査、細胞のDNA量を測定するFCM、および細胞のG1後期からS期細胞にかけて合成されるDNA polymerase- δ の補助蛋白でDNAの合成に密接な関係のあるPCNA¹⁸⁾を用い、経時的にその変化を観察した。

ラットの匹数を増やして多数例で検討した実験2において、0.05%BBN4週投与群で投与終了直後の屠殺群ではPNHがみられず、また4週投与20週屠殺群でもPNHは16.7%、癌の出現は8.3%であったのに対し、BBN8週投与群では全例PNHまたは癌がみられた。このことは雌性ラットを用いた実験系において0.05%BBN経口投与の4週投与群と8週投与群の間でラット膀胱粘膜上皮の変化に大きな違いがあることが示唆された。すなわちラット膀胱発癌モデルでは0.05%BBN経口投与で4週投与では膀胱上皮の変化はほとんど可逆性の変化にとどまるが、8週以上の投与では可逆性の変化と不可逆性の変化が混在していることを示している。

このことはラット膀胱発癌では0.05%BBN経口投与で4週の投与ではpromoterの実験モデルに、8週の投与ではinhibitorの実験モデルとなりうることが示唆された。またBBN8週投与群で投与終了直後の屠殺群ではPNHが57.1%、癌が42.9%に、8週投与20週屠殺群ではPNHが50.0%、癌が50.0%であったのに対し、BBN12週の投与群で投与終了直後の屠殺群ではPNHが50.0%、癌が50.0%、12週投与20週屠殺群ではPNHが16.7%、癌が83.3%と、8週投与群では観察期間に違いがあっても膀胱上皮の変化にほとんど変化が無いのに比して、12週投与群では観察期間が長い群で癌の発生率が増加した。このことよりBBN8週投与での膀胱上皮の変化は可逆性的変化と非可逆性的変化が混在し、12週投与では非可逆性的変化が主体となっていることが推察される。

これまでの多くの膀胱発癌実験ではほとんど雄性ラットを使用したものであったが、今回の検討では雌性のラットを用いた。すなわち、雌性ラットの場合、種々の薬物の膀胱内注入が可能であり臨床での治療に則した実験が可能で、教室でも過去において注入実験¹⁹⁾に使用している。今回の実験より雌性ラットでもほぼ雄性のラットと同様の結果が得られ、Fukushimaら⁸⁾の結果を裏付けるものであった。

齧歯類を使った膀胱発癌が短期間にかつ確実に発生せしめることが可能なことから種々の研究に用いられてきた。しかしFCMを用いDNA ploidyの変化をみる場合、膀胱上皮、膀胱腫瘍の単離細胞のみの採取が必要であり、多数の動物を経時的に観察し、そのDNA ploidyを確実に求めることは至難であった。今回使用したリザバーによる膀胱上皮単離細胞の採取方法はWangら²⁰⁾の方法に準じた方法で、確実に多数の上皮の単離細胞を採取することが可能で今後の小動物を使った種々の実験に応用できると考える。

BBN投与を受けたラット膀胱上皮のDNA ploidyは、4週投与群にaneuploidは出現せず、8週投与群では40.0%、12週投与群では91.7%、16週投与群では88.9%、20週投与群では77.8%のaneuploid patternがみられた。同時に行ったBBN投与群の病理組織学的検索で4週投与群ではPNHが55.6%、癌が22.2%発生し、8週投与群ではPNHが80.0%、癌が46.7%に、12-20週投与群では全ラットに癌が発生し、やはり4週以下の投与群と8週の投与群の間の腫瘍発生に違いがみられた。同時に行った病理組織学的変化と同様に8週投与群では不可逆性変化が混在し膀胱癌発生のpromoterの実験モデルに適しており、4週の投与群はinhibitorの

実験モデルに適していることが示唆された。

EHBN投与を受けたラット膀胱上皮のDNA ploidyは4週投与群で22.2%、8週投与群で46.7%、12週、16週、20週投与群ではそれぞれ66.7%にaneuploid patternがみられBBN投与群、EHBN投与群ともにDNA indexが1.30を越えるaneuploidは極くわずかであり、tetraploidの出現は見られなかった。これに対し教室において過去に行ったマウスにBBNを投与し、膀胱上皮細胞のDNA ploidyの変化を観察した実験において、BBN4週投与群からすでに高率にtetraploidが出現していた。これが種による違いであるのと同時にマウスBBN膀胱発癌がヒト膀胱の非乳頭状浸潤性癌に類似し、ラットBBN膀胱発癌がヒト膀胱癌の乳頭状表在性癌に類似していることを併せて考えると、ヒト膀胱癌の発育、進展を予測する場合FCMによる検索もひとつの手掛かりとなりうると思われる。

PCNAは1978年Miyachiら²¹⁾によって全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus; SLE)患者の自己抗体に反応する増殖細胞核抗原(PCNA)として見いだされ、その後Bravoらによって見いだされていた増殖細胞内に発現し¹⁸⁾、約36kdの分子量を有するcyclinと同じ性質を有する蛋白で、DNA polymerase- δ の補助蛋白であることが知られている。また細胞回転同調細胞を用いた実験では、休止期細胞ではPCNAの合成が極めて低く、G1後期から合成が増加しはじめS中期で頂点に達したのちS後期にかけて初期状態に回復すると報告されており、細胞増殖能と密接な関係が示唆されている²²⁾。

今回検討した病理組織学的変化とPCNA indexとの関係で病理組織学的変化が高度になるに従ってPCNA indexが高くなる傾向がみられ、またTCC-G2の群で扁平上皮化生がある群と無い群では、扁平上皮化生のある群のほうがPCNA indexが高い傾向がみられたことはPCNA indexが膀胱腫瘍でその進展、増殖を予想するひとつの補助手段となりうることを示唆していると思われる。

さらに病理組織学的な変化では正常膀胱上皮と判断されたものでもBBNの投与群と非投与群との比較で、投与群の方がPCNA indexが有意に高かったことは膀胱上皮細胞の変化をPCNA indexを調べることによってより早く感知出来る可能性を示しているものと思われる。

ラット膀胱発癌はヒトの表在性膀胱癌の実験モデルとして種々のpromoter, inhibitorを加味しながらヒトの膀胱癌のnatural historyを解明すべく数々の実験が行われてきた。今回BBN雌性ラット膀胱発癌実験で、細胞

増殖能をより鋭敏に反映するFCMおよびPCNAの有
用性について検討を加え、これがヒトの膀胱癌の natu-
ral history の解明の一助となることが示唆された。

結 語

ヒトの表在性膀胱癌のモデルであるラットにBBNお
よびEHBN膀胱発癌実験系を用いて、経時的に膀胱の
病理組織学的検索とともにFCMによる膀胱上皮の
DNA ploidy 測定を行ない、また免疫組織学的にPCNA
より細胞の増殖性、腫瘍細胞の組織学的悪性度を比較検
討を行い以下の結果が得られた。

1. ラット BBN 膀胱発癌における病理組織学的変化で
は0.05%BBNの経口投与が4週間の膀胱上皮細胞の
変化はほとんどが可逆性的変化であるのに対し8週
の投与群では可逆性的変化と不可逆性的変化が混在して
いた。すなわち、BBN 4週投与群は発癌実験において pro-
moterの実験モデルとしてまたBBN 8週投与群は in-
hibitorの実験モデルとなることが示唆された。

2. ラット BBN, EHBN 膀胱発癌においてFCMによ
る膀胱上皮のDNA ploidyの変化をみる実験で、今回使
用したリザバーによる膀胱上皮単離細胞の採取方法は確
実に多数の上皮の単離細胞採取できることが確認された。

BBN投与群で4週以下の投与群と8週以上の投与群
ではDNA ploidyに違いが出現し、同時に行ったBBN
投与群の病理組織学的検索でも4週以下の投与群と8週
以上の投与群の間に違いがあった。すなわち0.05%
BBN経口投与によるラット発癌では4週投与群と8週
投与群との間に腫瘍発生過程に違いがあることが示唆さ
れた。また膀胱上皮細胞のDNA ploidyの検索では
tetraploidは出現しなかった。

3. ラット BBN 膀胱発癌における膀胱上皮のPCNA
の発現の検索で、病理組織学的変化とPCNA indexとの
関係では病理組織学的変化が高度になるに従って
PCNA indexが高くなる傾向がみられた。病理組織学的
な変化では正常膀胱上皮と判断されたものでもBBN投
与群と非投与群との比較群のほうがPCNA indexが高
い傾向がみられた。このことはPCNA indexが膀胱腫瘍
でその進展、増殖を予想するひとつの補助手段となりう
ることを示唆していると思われる。

以上よりFCM, PCNAをラット膀胱発癌に応用する
ことによりヒトの表在性膀胱癌の natural history を解
明する一助となり得ることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、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深謝致します。
さらに御校閲を賜りました第1病理学教室市島國雄教
授、腫瘍病理学教室小西陽一教授に深謝致します。また
種々の御援助を頂いた平尾佳彦助教授、大園誠一郎講師
をはじめ泌尿器科学教室の諸兄姉に謝意を表します。

本論文の要旨は第10回毒性病理学会および第83回日
本泌尿器科学会総会に於て発表した。

文 献

- 1) 岡島英五郎, 大園誠一郎: 実験的膀胱腫瘍. 日泌尿
会誌. 82: 705-715, 1991.
- 2) 伊東信行, 荒井昌之: ヒトの癌と動物モデル. 癌の
科学 4: 353-402, 1979.
- 3) 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.
- 4) Bertram, J. S. and Craig, A. W.: Specific induc-
tion of bladder cancer in mice by butyl-(4-
hydroxybutyl)nitrosamine and the effects of hor-
monal modifications on the sex difference in
response. Europ. J. Cancer 8: 587-594, 1972.
- 5) Akagi, G., Akagi, A., Kimura, M. and Otsuka,
H.: Comparison of bladder tumors induced in
rats and mice with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)
nitrosoamine. Gann 64: 331-336, 1973.
- 6) Ohtani, M., Kakizoe, T., 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.
- 7) Brawn, P. N.: The origin of invasive carcinoma
of the bladder. Cancer 50: 515-519, 1982.
- 8) Fukushima, S., Murasaki, G., Hirose, M.,
Nakanishi, K., Hasegawa, R. and Ito, N.: His-
topathological analysis of preneoplastic changes
during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine
induced urinary bladder carcinogenesis in rats.
Acta Pathol. Jpn. 32: 243-250, 1982.
- 9) 伊東信行, 岡島英五郎: 膀胱がん. 日本臨牀 30:
450-453, 1972.

- 10) **Yoshida, T.** : Uber die nebensächlich beobachteten Harnblase-nepitheliome der mit o-Amidoazotoluol gefütterten Hepatomratten. *Gann* **29** : 295-300, 1935.
- 11) **Druckrey, H., Preussmann, R., Ivakovic, S., Schmidt, C. H., Mennel, H. D. and Stahl, K. W.** : Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl-und N-Butyl-N-butanol (4)-nitrosamin. *Z. Krebsforsch.* **66** : 280-290, 1964.
- 12) **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** : 2219-2229, 1969.
- 13) **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.
- 14) **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.
- 15) **Ohtani, M., Kakizoe, T., Sato, S., Sugimura, T., Fukushima, T. and Fukushima, S.** : Strain differences in mice with invasive bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **112** : 107-110, 1986.
- 16) **大谷幹伸** : 発生と進展—2 マウス. 図説, 臨床癌シリーズ, No. 4, 膀胱癌. メジカルビュー社, 東京, p129-134, 1986.
- 17) **Yamaguchi, H., Ozyno, S., Matsuki, H., Yoneda, T., Takashima, K., Hayashi, Y., Yoshikawa, M., Kitagawa, H., Hirao, Y. and Okajima, E.** : Inhibitory effects of combination chemotherapeutic regimens on mouse bladder carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Urol. Res.* 投稿中
- 18) **Bravo, R., Frank, R., Blundell, P. A. and Macdonald-Bravo, H.** : Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* **326** : 515-517, 1987.
- 19) **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.
- 20) **Wang, C. Y., Linsmaier-Bedner, E. M., Garner, C. D. and Lee, M.-S.** : Induction of unscheduled DNA synthesis in primary culture of dog, rat, and mouse urothelial cells by arylamine and nitrofur-an derivatives. *Cancer Res.* **42** : 3974-3977, 1982.
- 21) **Miyachi, K., Fritzler, M. J. and Tan, E. M.** : Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol.* **121** : 2228-2234, 1978.
- 22) **Bravo, R. and Macdonald-Bravo, H.** : Changes in the nuclear distribution of cyclin(PCNA)but not its synthesis depend on DNA replication. *EMBO J.* **4** : 655-661, 1985.