

ヒト前立腺肥大症組織と Robaveron

I. Robaveron 加組織培養における前立腺組織の変化

鳥取大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 後藤 甫教授)

竹 中 生 昌
池 田 嘉 之
西 本 和 彦“ROBAVERON” AND HUMAN PROSTATIC TISSUE
IN HYPERTROPHY(I) HISTOLOGICAL INVESTIGATION OF THE HUMAN PROSTATE
TREATED WITH ROBAVERON IN TISSUE CULTURE

Ikumasa TAKENAKA, Yoshiyuki IKEDA and Kazuhiko NISHIMOTO

*From the Department of Urology, Tottori University School of Medicine
(Director: Prof. H. Gotō, M. D.)*

The prostatic hypertrophic tissues which were surgically extirpated, were cultured with Eagle's MEM medium containing insulin and testosterone. In order to investigate the direct effect of Robaveron on prostatic tissue, Robaveron in various concentrations were added to the culture medium, and then the effects were examined histologically. Acid phosphatase activity of the cultured prostatic tissues was most prevented by Robaveron in the concentrations of 1.6×10^{-1} to 1.6×10^{-2} mg/ml. On the contrary, alkaline phosphatase activity didn't show any particular influence. Incidentally, morphological changes were observed in the cultured prostatic tissues, when Robaveron in the same concentration was added, that glandular epithelium was flattened out and fell off, and also that acinar folding was decreased. Consequently, it was concluded that Robaveron might have direct effect on prostatic tissue, and also that the result would coincide with clinical results.

緒 言

ブタ前立腺抽出物であるロバベロン (Robaveron) については、実際の前立腺肥大症に投与し優れた成績を得たとする臨床的報告は多いが、その作用機序についての基礎的研究は少なく、膀胱内圧や筋電図など神経生理的な面から検討した報告^{5,6,8,9)}がみられるに過ぎない。ことに前立腺組織そのものに対する影響については、実際の臨床面での検討が困難であるためほとんど報告がなかったが、最近江田ら⁷⁾がラット前立腺を用いて生化学的に組織の酵素活性および組織呼吸の面から本剤の前立腺に対する影響を報告している。

わたくしたちもヒト前立腺組織に対する影響を究明するために、手術で摘出した前立腺肥大症組織をロバベロン添加 Eagle 氏 MEM 培地で組織培養をおこない、その組織片について組織学的ならびに組織化学的に検討したので報告する。ロバベロンはスイス Robapharm 社が開発したもので、成熟した健康なブタ前立腺から抽出した除蛋白水溶性エキス剤で、その構成物質は補酵素前駆物質やペプチドを含む核酸誘導体とアミノ酸、有機リン、炭化水素からなり、性ホルモンは含まれていない。その1筒中には上記エキス0.016gとメタクレゾール0.003gを含有する水溶液である。

実験方法

成績

1. 材料

実験に用いた前立腺組織は72歳男性で、術前身体的異常なく、突然尿閉となって前立腺肥大症の診断のもとに入院、手術的に摘出した前立腺組織は直ちに碎氷上の滅菌シャーレに入れて実験室に運び、無菌的にハサミで2×2×4 mm 大に細切して実験に用いた。

2. 組織培養 (Table 1)

培地はアミノ酸12種、グルコース、生理的塩類、各種ビタミンを含む Eagle 氏 MEM 培地を基本として、子ウシ血清10%、ペニシリン 5 µg/ml、インシュリン 0.5 µg/ml、テストステロン 3.5×10⁻⁵ M 濃度を加えたものを基礎培地とした。ロバベロンは基礎培地に最終濃度が 1.6~1.6×10⁻⁴ mg/ml となるように加えた。これに組織片を入れて、CO₂ 細胞培養器 (池本理化学工業製) を用いて、37°C、95% O₂+5% CO₂ の気相中に24時間培養した。

Table 1. Organ culture technique.

Medium: Eagle's MEM	10 ml
Calf serum	1.0 ml
Testosterone	3.5×10 ⁻⁵ M/ml
Insulin	0.5 µg/ml
Penicillin	5 µg/ml
Robaveron	1.6~1.6×10 ⁻⁴ mg/ml
Material: prostatic tissue (72 y BPH)	
Culture: 37°C, 95% O ₂ +5%CO ₂	

3. 組織学的検査

組織培養開始後、1, 2, 4, 6, 24時間ごとに組織片の一部をとり出し、冷アセトンアルコールで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色をおこなって組織学的に検討するとともに、Gomori 氏変法により、酸フォスファターゼ染色、アルカリフォスファターゼ染色をおこない、組織化学的にも検討した。

1. 組織内酸フォスファターゼ (Ac-P) (Table 2)

培養前立腺組織における Ac-P 反応は、各ロバベロン濃度のどの組織においても、4時間目まではだいたい同程度に反応がみられた。そのうちでもロバベロン 1.6×10⁻³~1.6×10⁻⁴ mg/ml 濃度群でもっとも強くみられたが、1.6×10⁻¹~1.6×10⁻² mg/ml 濃度群では反応は弱かった。しかし培養時間が6時間を過ぎると、Ac-P 反応は低下の傾向を示して、24時間目にはほとんど Ac-P 反応はみとめられなかった。

2. アルカリフォスファターゼ (Al-P) (Table 3)

ロバベロン 1.6×10⁻² 濃度群を除いて、だいたい Ac-P と同じ傾向を示し、培養4時間目まではほとんどの組織に Al-P 反応をみとめた。しかし培養時間が6時間を過ぎると、Al-P 反応は著しい低下の傾向が

Table 2. Acid phosphatase.

Robaveron (mg/ml)	Time of culture (hr)				
	1	2	4	6	24
Control	(+)	(+)	(++)	(-)	(-)
1.6	(++)	(+)	(+)	(±)	(-)
1.6×10 ⁻¹	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)
1.6×10 ⁻²	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
1.6×10 ⁻³	(++)	(-)	(++)	(+)	(+)
1.6×10 ⁻⁴	(+++)	(++)	(++)	(+)	(+)

Table 3. Alkaline phosphatase.

Robaveron (mg/ml)	Time of culture (hr)				
	1	2	4	6	24
Control	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1.6	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)
1.6×10 ⁻¹	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
1.6×10 ⁻²	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
1.6×10 ⁻³	(+++)	(+)	(+)	(-)	(-)
1.6×10 ⁻⁴	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

Table 4. Histological change.

	Robaveron (mg/ml)					
	Control	1.6	1.6×10 ⁻¹	1.6×10 ⁻²	1.6×10 ⁻³	1.6×10 ⁻⁴
Destruction of alveoli	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Decrease of alveolar folding	(±)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
Flatness of epithelium	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Desquamation of epithelium	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(±)
Change of reserve cell	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

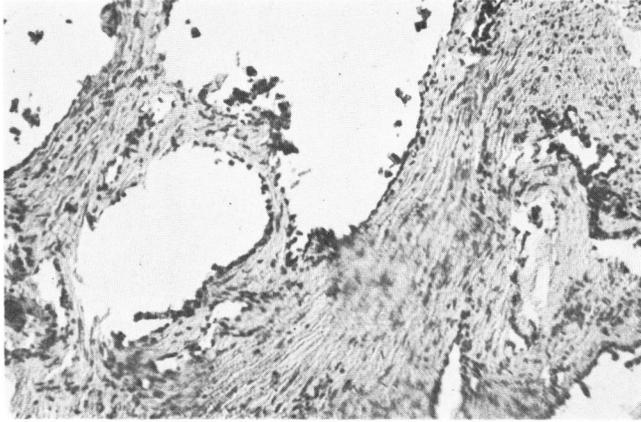


Fig. 1. Rob. 1.6 mg/ml.

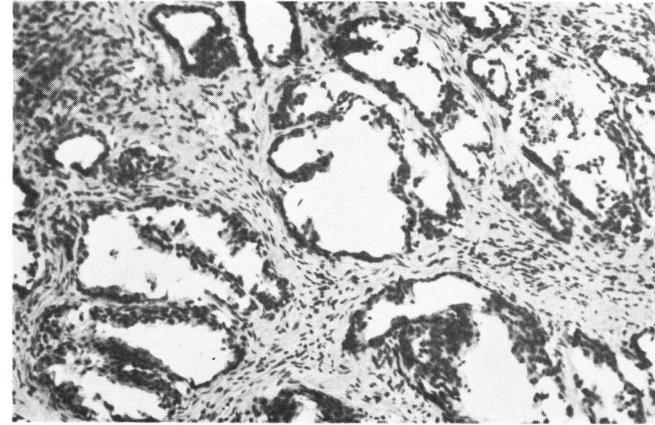


Fig. 3. Rob. 1.6×10^{-3} mg/ml.

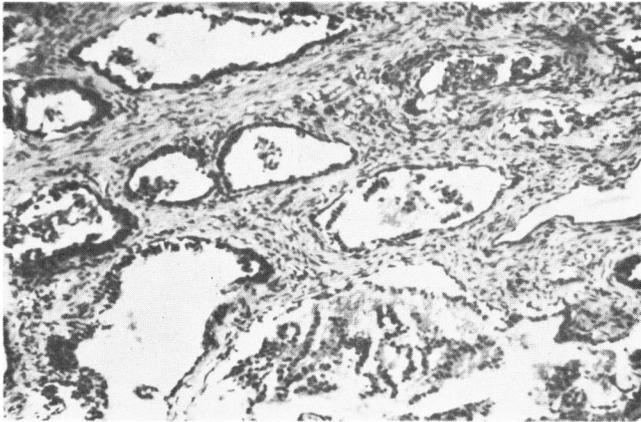


Fig. 2. Rob. 1.6×10^{-2} mg/ml.

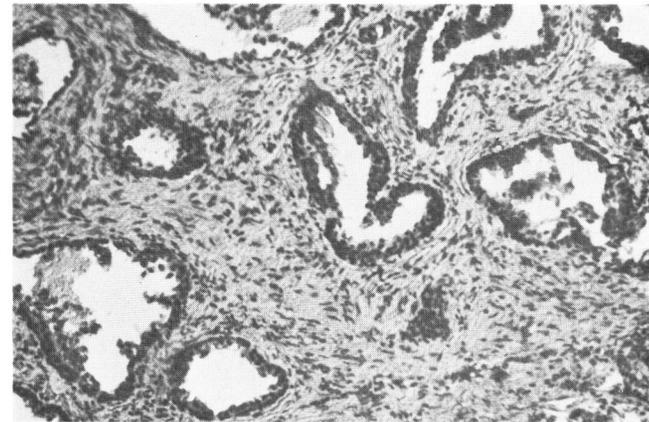


Fig. 4. Rob. 1.6×10^{-4} mg/ml.

みられたが、ロバベロン 1.6 および 1.6×10^{-3} mg/ml 濃度群になお強陽性を示したように、Ac-P ほどロバベロンの濃度差による影響は指摘できなかった。

3. 組織学的変化 (Table 4)

Ac-P, Al-P の組織化学的検査により、培養 4~6 時間目にもっとも強い変化があると思われたので、培養 6 時間目における前立腺組織の腺上皮細胞、腺房形態および間質の変化について検討した。その結果は Table 4 に示したように、間質にはほとんど変化がみられなかった。腺組織では、ロバベロン非添加の対照群には腺房構造に特別な変化がみられなかった。しかしロバベロン 1.6 mg/ml 濃度群では、腺房内上皮突起の中等度減少、腺上皮細胞の扁平化、腺房内への脱落などの変化が著明であった (Fig. 1)。この傾向はロバベロンの 1.6×10^{-1} , 1.6×10^{-2} mg/ml の濃度にもあり、とくに 1.6×10^{-2} mg/ml 濃度では腺上皮の脱落が強くとめられた (Fig. 2)。また本剤 1.6×10^{-3} mg/ml 濃度群では上皮細胞の扁平化、脱落傾向がやや弱いがなお認められた (Fig. 3)。しかし 1.6×10^{-4} mg/ml の低濃度群では対照群と比べてとくに差はみとめられなかった (Fig. 4)。すなわち培養 6 時間目の前立腺組織では、ロバベロンは $1.6 \times 10^{-1} \sim 1.6 \times 10^{-2}$ mg/ml の比較的高い濃度で腺房構造に影響を与えるように思われる。

考 察

前立腺肥大症の保存的治療を目的として、最近植物エキス、アミノ酸製剤、プロゲステロンなどが用いられるようになり、それぞれその有効性が臨床的にも報告されている。しかしそのほとんどは前立腺の大きさ、重量をさらにはレントゲンの所見、自覚症などを指標したものが大部分で基礎的研究は少ない。しかもこれらの成績は *in vivo* での研究でありこれには生体の各種の要因が加わるため、薬剤そのものの影響を検討するには不じゅうぶんといえよう。そこでこのような薬剤の効果を判定するためには、他の因子が加わらない *in vitro* での組織培養法が前者よりも有利であろう。前立腺の組織培養については、Lasnitzski⁷⁾ の一連の研究があり、Röhl¹⁰⁾、Källen ら⁴⁾、本邦でも高谷ら¹²⁾、伊藤ら²⁾ の報告がみられる。

Lasnitzski⁷⁾ は天然培地で成熟ラット前立腺組織を培養したところ、14日目まではほぼ正常の分泌能、上皮細胞形態を維持した。さらにテストステロンを加えると、腺上皮細胞は高さを増し、しかも腺管内のPAS陽性物質の増加がみられたと報告し、高谷ら¹²⁾ はラット前立腺組織を完全合成培地で培養したが、インシュ

リンを加えるとテストステロン濃度は $10^{-7} \sim 10^{-8}$ M 濃度でじゅうぶんその形態を保ったとし、適当な条件下では組織形態の維持は可能である。そこでわたくしたちも Eagle 氏 MEM 培地に、前述のような濃度のテストステロン、インシュリンを加えて基礎培地とし、これにロバベロンを各種濃度に加えて、ヒト前立腺肥大症組織を培養し、細胞レベルで、ロバベロンの前立腺に対する直接の影響を検討した。

前立腺とフォスファターゼの関係については古くからよく知られた事実で、とくに血清 Ac-P 値は前立腺癌の特異的酵素として、診断治療の指標とされている。さらに組織化学的にも糸井³⁾ は細胞の分泌能と関連し、成熟上皮細胞ではその活性が高く、反対に萎縮した細胞では低下がおこると報告しているように、Ac-P は男性ホルモンの支配下にあることがうかがわれる。一方、Al-P は前立腺組織での分泌能とは直接的な関係はなく、特異的な酵素ではないが、組織のエネルギー代謝に関連する酵素である。これらの酵素活性を組織化学的に証明することによって、ロバベロンの前立腺細胞に及ぼす影響を検討してみた。清水ら¹¹⁾ は *in vitro* でヒト前立腺肥大症症例にロバベロン投与したが、投与前後において、Ac-P 値の変動に一定の傾向はなく、しかも症状の改善とは平行していないとのべ、米瀬¹³⁾ も本剤投与によっても正常範囲内での変動に過ぎなかったとしている。また Al-P についても米瀬はあまり著しい変化はみられなかったと報告している。

しかしわたくしたちの *in vitro* の成績では、前述のように、ロバベロン $1.6 \times 10^{-3} \sim 1.6 \times 10^{-4}$ mg/ml 濃度では 4 時間目までは Ac-P, Al-P ともによく反応を示したが、より高濃度の $1.6 \times 10^{-1} \sim 10^{-2}$ mg/ml では Ac-P 活性は低く、前立腺組織の細胞機能を抑制したのではないかと思われる。一方、江田ら¹⁾ はラット前立腺組織の Ac-P, Al-P を *in vivo* で定量的に測定し、Ac-P はロバベロンの 50~300 mg/kg/day という大量投与にもほとんど影響がみられなかったのに対し、Al-P 量は増加を示した。しかしロバベロン 0.2~0.5 mg/kg/day の少量投与ではなんら変動はなかったと報告している。ヒトとラットでは種属差はあるけれども、わたくしたちの成績と一致しており、ロバベロンは濃度差ないし投与量の多少によっては前立腺組織になんらかの変化を与えると考えられる。

培養時間が 6 時間を過ぎると、Ac-P, Al-P の反応は著しく低下し、組織細胞の壊死、破壊が生じたと考えられるので、培養 6 時間目の組織片についてロバベロン投与による組織学的変化を検討した。その結果は

すでに述べたように、ロバベロン $1.6 \times 10^{-1} \sim 1.6 \times 10^{-2}$ mg/ml の比較的高い濃度で、腺房内突出の減少、腺上皮細胞の扁平化、脱落などの変化が強くとめられ、この点からも組織構造に直接影響を及ぼすように思われる。

一方、臨床的に前立腺肥大症患者に本剤を投与し、手術前後の組織像を比較した報告^{6,14)}もあるが、いずれもみるべき変化はなかったとし、清水ら¹⁴⁾は結合組織の疎性化、線維組織の増量など間質の変化が主で、腺上皮には特徴的变化はなかったと報告している。これに対し実験的にロバベロン投与による組織学的研究は少なく、江田ら¹⁾はラットに全身投与し、少量投与では代謝面での賦活のみであるが、大量投与になると腺腔の狭小化、上皮細胞の萎縮があったことを報告し、この点からもわたくしたちの成績と一致すると思われた。

同じ肥大組織においても *in vitro* と *in vivo* の差があり、また、わたくしたちの用いたロバベロン濃度もヒト生体の投与量からみればきわめて大量と思われる量で、これらの成績がすべてロバベロンの影響で治療にあてはめるとすることは困難であるが、本実験の成績の範囲内からは、本剤は直接的に前立腺組織に影響を与えられ、前立腺肥大症の成因がまだ不明の現段階では、ある程度治療剤として期待しえる薬剤と考えたい。

結 語

ロバベロンの前立腺に対する直接作用を検討するため、手術的に摘出した72歳の前立腺肥大組織を、Eagle氏MEM培地にインシュリン、テストステロ

ンを加えて培養し、これにロバベロンを種々の濃度に添加し、組織学的にその影響を検索した。

培養前立腺組織におけるAc-P反応はロバベロン濃度 $1.6 \times 10^{-1} \sim 1.6 \times 10^{-2}$ mg/ml にてもっとも強く抑制された。これに対しAl-P反応では特異的傾向が得られなかった。また組織構造からも同じ高濃度において、腺上皮細胞の扁平化、脱落、および腺房内突起の減少がみられた。以上よりロバベロンは前立腺組織に直接作用をおよぼすと思われ、臨床成績での有効性と一致すると考えられる。

文 献

- 1) 江田昭英・ほか：日薬理誌，**70**：47，1974.
- 2) 伊藤善一・ほか：ホと臨床，**21**：463，1973.
- 3) 糸井壯三：日泌尿会誌，**50**：597，1959.
- 4) Källen, B. and Röhl, L.: Urol. int., **10**: 329, 1960.
- 5) Kuns, A.: Wien Klin. Wschr., **69**: 124, 1957.
- 6) 黒田恭一・ほか：診療，**22**：109，1969.
- 7) Lasnitzski, I.: J. Endocrinol., **12**: 236, 1955.
- 8) 中新井邦夫・園田孝夫：泌尿紀要，**18**：501，1972.
- 9) Rieben, W. et al.: Urol. int., **1**: 440, 1955.
- 10) Röhl, L.: Acta Chir. Scand., Suppl., **240**: 1, 1959.
- 11) 清水圭三・ほか：新薬と臨床，**16**：1349，1967.
- 12) 高谷 治・ほか：ホと臨床，**15**：651，1967.
- 13) 米瀬奉行：診療，**21**：1913，1968.
- 14) 渡辺 決・ほか：新薬と臨床，**16**：727，1967.

(1974年12月26日受付)