

{ 泌尿紀要15巻2号 }
{ 1969年2月 }

実験的腎腫瘍の治療に関する研究

第1報 : Mitomycin C, 5-Fluorouracil, 3-Methylcholanthrene,
 α -Naphthyl-isothiocyanate および Diethylstilbestrol の実験的
腎腫瘍への影響について

奈良県立医科大学泌尿器科学教室 (主任 : 石川昌義教授)

林 威 三 雄
吉 田 宏 二 郎

奈良県立医科大学第一病理学教室 (主任 : 北村 旦教授)

日 浅 義 雄
山 下 昭 夫
吉 川 光 顕
伊 東 信 行

STUDIES ON THE TREATMENT OF EXPERIMENTAL RENAL TUMORS INDUCED BY DIMETHYLNITROSAMINE

I. THE EFFECTS OF MITOMYCIN C, 5-FLUOROURACIL, 3-METHYL- CHOLANTHRENE, ALPHA-NAPHTHYL-ISOTHIOCYANATE AND DIETHYLSTILBESTROL ON EXPERIMENTALLY INDUCED RENAL TUMORS

Isao HAYASHI and Kōjiro YOSHIDA

From the Department of Urology, Nara Medical University
(Chairman : Prof. M. Ishikawa, M.D.)

Yoshio HIASA, Akio YAMASHITA, Kōken YOSHIKAWA and Nobuyuki Itō

From the 1st Department of Pathology, Nara Medical University
(Chairman : Prof. H. Kitamura, M. D.)

The effects of various anti-cancer agents, such as mitomycin C (MMC), 5-fluorouracil (5-FU), diethylstilbestrol (DES) and alpha-naphthyl-isothiocyanate (ANI) on rat kidney tumor induced by dimethylnitrosamine (DMN) were studied.

In rats receiving DES and ANI, the development of kidney tumors was inhibited. Histologically, golden-brown pigments were observed in the cells of renal tubules in the groups of DES-treatment.

No significant effects of the other anti-cancer agents were observed on the DMN-induced rat kidney tumors.

はじめに

実験的に腎腫瘍を作る試みは、かなり古くからいろいろの方法で行なわれている。このうち dimethylnitrosamine (DMN) を rat に経口的に投与することにより腎腫瘍を発生せしめ得ることは Magee & Barnes¹⁾ の報告が最初であり、このことは多くの人びとにより追試確認されている。われわれはこの投与法を改良し、DMN の大量短期投与が少量長期投与に比し、はるかに能率的に腎臓に選択的かつ高率に腫瘍を発生させ得ることを報告し、これにより発生する腫瘍には腎細胞型 (renal cell type) のものと、未分化細胞型 (anaplastic cell type) の2種類があり、前者はヒトの腎細胞癌に、後者は Wilms 腫瘍に類似のものであることを組織学的、組織化学的および電子顕微鏡的にも証明した²⁻⁵⁾。また一方、これらの腫瘍発生におよぼす年令的影響についても実験を行ない、新生児ダイコクネズミに投与した場合には、腫瘍はすべて未分化細胞型腫瘍であることを報告し、実験的腎腫瘍の発生においても、ヒトの腎腫瘍の場合と同様に年令的要因と腫瘍組織像との間に密接な関連のあることを示した⁶⁾。

さて、腎腫瘍の治療法に関しては、多くの研究とともに多数の臨床経験が発表されているが、現在の段階では早期発見のもとに根治手術を

行なうことが唯一最良の方法で、すでにその時期を逸したもの、あるいは遠隔転移の認められるものには十分な治療法がない。近時、小児の Wilms 腫瘍に対しては actinomycin D が用いられ、従来にくらべて治療成績の向上がみられるが、なお未解決の点も多い。われわれは上記の基礎的研究から得た実験成績を応用し、ヒトの腎腫瘍の治療法改善への基礎的データを得ることを目的として種々の実験を行なっている。今回は3つの異なった作用機序の物質、すなわち、われわれが通常用いている抗癌物質の中から mitomycin C および 5-fluorouracil、また実験的肝癌に対して抑制効果のあることが知られている 3-methylcholanthrene⁷⁾ と α -naphthyl-isothiocyanate^{8,9)} および ハムスターの腎腫瘍発生物質として報告されている diethylstilbestrol^{10,11)} をえらび DMN による腎腫瘍の発生に対する影響を検討した。

実験材料ならびに実験方法

動物はすべて Wistar 系雌性ダイコクネズミで、体重 150 g 前後のものをを用い、次の14の実験群を作成した。

第1群：500 ppm dimethylnitrosamine (DMN, 東京化成) 添加食餌を2週間に限って投与し、以後はわれわれが通常用いている基礎食のみを与え、平均32週間飼育観察した。

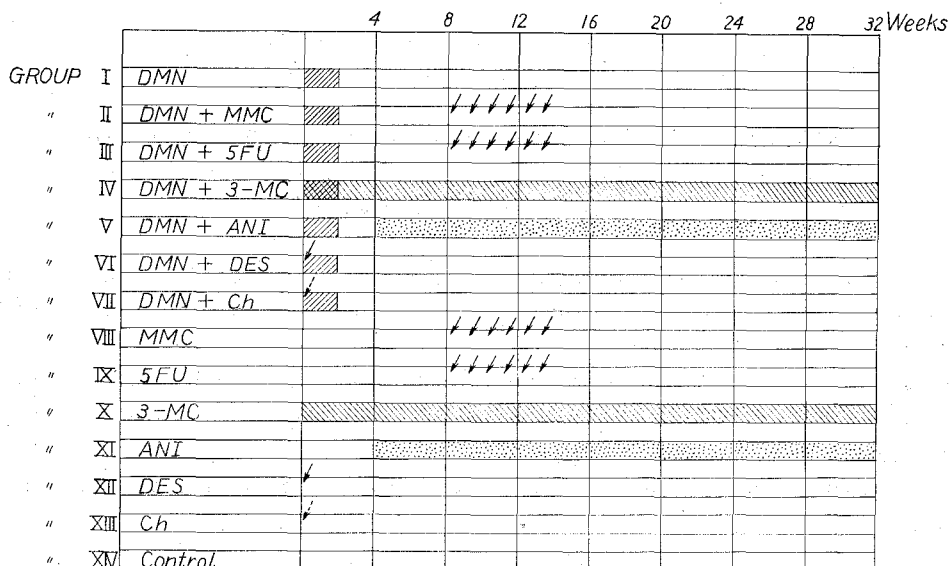


Fig. 1 Experimental design for anti-kidney tumor agents in rat.

第2群：500 ppm DMN 添加食餌を2週間投与後、6週目より mitomycin C (MMC, 協和醗酵) を週1回、体重 kg あたり 500 μ g を腹腔内に連続6週間投与した。

第3群：500 ppm DMN 添加食餌を2週間投与後、6週目より 5-fluorouracil (5-FU, 協和醗酵) を体重 kg あたり 30mg を連続6週間、週1回腹腔内に投与した。

第4群：500 ppm DMN 添加食餌に 0.0067% の割に 3-methylcholanthrene (3-MC, 和光純薬) を混じて2週間投与し、以後は 3-MC 含有食のみを実験終了まで投与した。

第5群：500 ppm DMN 添加食餌投与2週後より、0.1% α -naphthyl-isothiocyanate (ANI, 東京化成) 含有食を実験終了まで投与した。

第6群：diethylstilbestrol (DES, Merck 製) を 50mg, 加温融解せる cholesterol (Merck 製) 50mg 中に溶解後、凝固ペレットとして、背部皮下に手術的に挿入し、500 ppm DMN 添加食餌を2週間投与した。

第7群：cholesterol のみのペレットを挿入後、500 ppm DMN 添加食餌を2週間投与した。

第8群から第13群は、第2群から第7群と同様の実験を行なったが、DMN を投与せず、基礎食のみで飼育したもので、第14群は全く何の処置も行わない対照群である。

以上の動物を 24°C に保たれた飼育室で、平均32週間飼育し、その後屠殺し、腎を中心に各臓器の腫瘍の発生頻度をしらべ、各組織は固定後各種染色を行ない、組織像への影響を病理組織学的に検査した。これらの実験方法の要約は Fig. 1 のとおりである。

実験成績

1. 体重および腎重量の変化

各群の動物数、飼育期間、実験開始および終了時の平均体重ならびに屠殺時の左右腎の平均重量を一括表示した (Table 1)。

腎重量は腫瘍をもつ動物の群において増大の傾向が明らかである。飼育期間は平均32週間であるが、一部のものでは36週間におよぶものもある。

Table 1 Changes of body and kidney weight in rats treated with DMN, MMC, 5 FU, 3-MC, ANI, DES and Ch*

Group	No. of Rats	Duration Average of Weeks	Body Weight (gm)		Kidney Weight(gm)	
			Initial	Final	Left	Right
I DMN	16	34.2 $\pm$ 0.5	170.1	397.0	1.78	1.51
II DMN+MMC	6	32.0 $\pm$ 0.0	150.0	332.0	1.54	1.51
III DMN+5 FU	7	32.0 $\pm$ 0.0	173.3	412.0	1.44	1.60
IV DMN+3-MC	6	32.0 $\pm$ 0.0	170.0	486.0	1.95	9.20
V DMN+ANI	5	32.0 $\pm$ 0.0	180.0	202.0	0.81	0.83
VI DMN+DES	11	32.1 $\pm$ 3.1	153.7	231.0	1.06	1.06
VII DMN+Ch	13	32.0 $\pm$ 1.3	160.0	353.9	1.36	1.61
VIII MMC	6	32.0 $\pm$ 0.0	157.1	403.8	1.31	1.28
IX 5 FU	6	32.0 $\pm$ 0.0	160.3	410.4	1.11	1.30
X 3-MC	8	36.0 $\pm$ 0.0	158.0	390.7	1.18	1.22
XI ANI	7	36.0 $\pm$ 5.0	160.0	388.3	1.22	1.24
XII DES	11	32.5 $\pm$ 0.5	154.7	303.0	1.20	1.23
XIII Ch	6	34.0 $\pm$ 0.0	161.2	418.5	1.20	1.21
XIV Control	6	34.0 $\pm$ 0.0	165.6	419.3	1.21	1.18

* DMN : dimethylnitrosamine, MMC : Mitomycin C, 5 FU : 5 fluorouracil ; 3-MC : 3-methylcholanthrene, ANI : α -naphthyl-isothiocyanate, DES : diethylstilbestrol, Ch : cholesterol.

2. 腎臓の組織学的変化および腎腫瘍の発生

イ. 腎臓の組織学的所見について

すでに報告しているように、腎腫瘍はこれを組織学的に2型に大別している。すなわち第1型はわれわれが腎細胞型 (renal cell type) と呼んでいるもので、腫瘍細胞は明るい原形質をもち、核は円形または類円形を示し、核小体の比較的明瞭なもので、ヒトの腎癌類似の組織像をもつものである (Fig. 2)。その初期像または前癌変化と考えられる変化は尿細管上皮細胞の乳頭状増殖像である (Fig. 3)。

第2の型は未分化細胞型 (anaplastic cell type) と呼んでいるもので、紡錘型あるいはやや類円形の腫瘍細胞が種々の方向に入り乱れて発育し、その中に尿細管上皮が存在し、増生した腫瘍細胞にしばしば核分裂像がみられるものである (Fig. 4)。その初期変化は間質への未分化細胞の浸潤像である (Fig. 5)。

これらの組織学的変化は DMN 添加食餌投与群にみられたが、MMC、3-MC、ANI および DES 投与群においては軽度であった (Table 2)。すなわち、これ

らの群においては前癌変化と考えられる尿細管上皮細胞の乳頭状増殖像や腎間質組織における未分化細胞の浸潤などの変化が乏しかった。特に顕著な変化は第6群の DES 投与群にみられた。この群では DMN の投与にもかかわらず、腫瘍発生が全く抑制されたのみでなく、尿細管上皮細胞内に黄褐色の色素沈着が多数認められた (Fig. 6, 7)。この色素をしらべるために、各種染色を行なった。それらの結果は Table 3 のとおりである。すなわち PAS 反応、脂肪染色はいずれも弱陽性、鉄反応は陰性で、その他各種染色の結果からこの色素を lipofuscin 様物質と考えている。

ロ. 腎腫瘍の発生頻度について

上述の腎腫瘍のいずれかまたは両者の発生率をみると、第1群においては16匹中12匹、75%に腫瘍の発生がみられた。一方、第2群に33.3%、第3群に57.1%、第4群に66.6%、第5群に0%、第6群に0%、第7群に61.5%と DMN 投与群では各種薬剤により、その発生率にかなりの差が認められた。すなわち、DMN と 3-MC との併用投与群では4/6(66.6%)で、DMN

Table 2 Histopathologic findings of the rat kidney treated with DMN, MMC, 5 FU, 3-MC, ANI, DES and Ch*.

Group	Histopathologic Findings of Kidney						Kidney Tumor
	Tubular Ep. Cell Proliferation	Anaplastic Cell Infiltration	Lipofuscin-like Pigments	Renal cell-type Tumor	Anaplastic cell-type Tumor	Incidence %	
I DMN	+	+	—	+	++	12/16	75.0
II DMN+MMC	±	±	—	+	+	2/6	33.3
III DMN+5 FU	+	+	—	+	++	4/7	57.1
IV DMN+3-MC	±	±	—	+	+	4/6	66.6
V DMN+ANI	—	±	—	—	—	0/5	0.0
VI DMN+DES	±	±	++	—	—	0/11	0.0
VII DMN+Ch	+	+	—	+	++	8/13	61.5
VIII MMC	—	—	—	—	—	0/6	0.0
IX 5 FU	—	—	—	—	—	0/6	0.0
X 3-MC	—	—	—	—	—	0/8	0.0
XI ANI	—	—	—	—	—	0/7	0.0
XII DES	—	—	++	—	—	0/11	0.0
XIII Ch	—	—	—	—	—	0/6	0.0
XIV Control	—	—	—	—	—	0/6	0.0

* DMN : dimethylnitrosamine, MMC : mitomycin C, 5 FU : 5-fluorouracil ; 3-MC : 3-methylcholanthrene, ANI : α -naphthyl-isothiocyanate, DES : diethylstilbestrol, Ch : cholesterol.

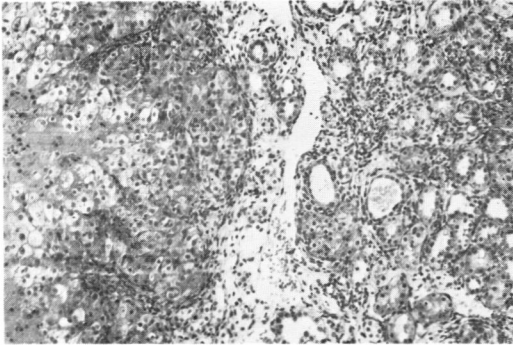


Fig. 2 腎細胞型腫瘍で、大きな明るい腫瘍細胞が正常腎組織に接して発育しているところを示す。（×100）

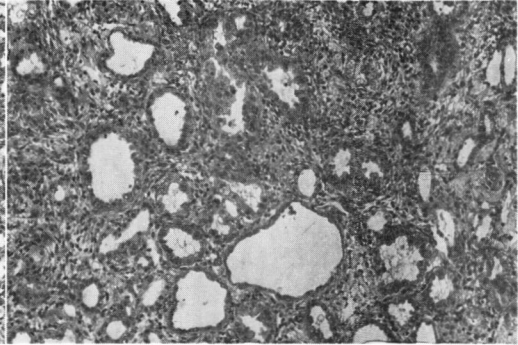


Fig. 5 Fig. 4 の初期変化で、未分化な腫瘍細胞の腎間質組織への浸潤を示す。（×100）

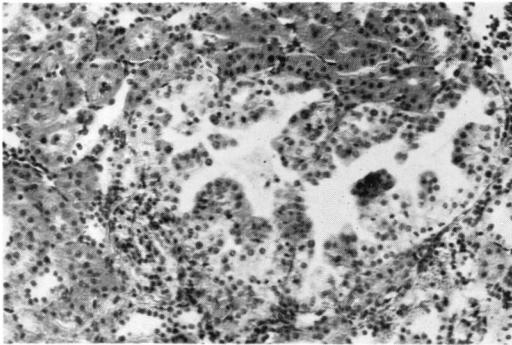


Fig. 3 尿細管の上皮細胞が乳頭状に増殖しているところ（×400）

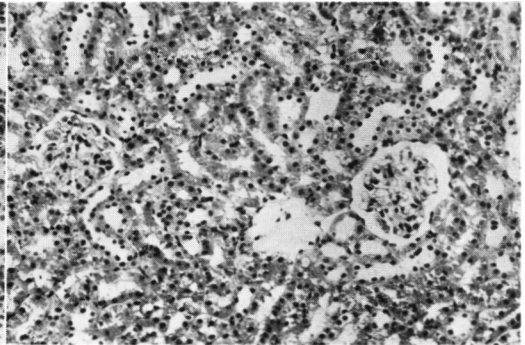


Fig. 6 尿細管上皮細胞内に褐色の色素沈着がみられる。（×100）

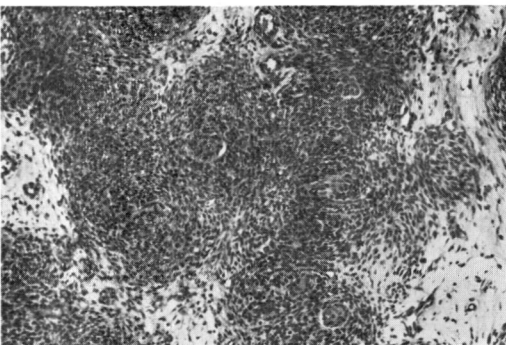


Fig. 4 未分化細胞型腫瘍で、紡錘型あるいはやや類円型の腫瘍細胞が発育して、新しく管腔形成がみられる。（×100）

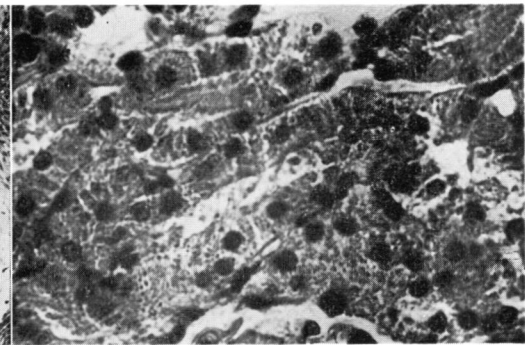


Fig. 7 Fig. 6 の強拡大像（×400）

Table 3 Reactions to chemicals and stains of intracellular pigment in the proximal convoluted tubules of diethylstilbestrol treated rat

Organic solvents (alcohol, ether, xylene)	Insoluble
Aqueous solvents (hydrochloric and sulfuric acid)	Insoluble
Oxidizing agents (hydrogen peroxide 30%, 24hr)	Color fade
Stains	
Sudan IV (frozen and paraffin sections)	Weak
Sudan black B (paraffin sections)	Negative
Hematoxylin	Negative
Eosin	Negative
Periodic acid Schiff reactions	Weak
Lillie's ferrous sulfate test for melanin	Negative
Masson-Fontana method for melanin	Negative
Nile blue sulfate	Positive
Gmelin reaction for bile pigments	Negative
Alkaline phosphatase (frozen sections)	Negative
Acid phosphatase (frozen sections)	Weak
Prussian blue reaction for ferric iron	Negative
Turnbull blue reaction for ferric iron	Negative

単独投与群との間に差がなかった。

Cholesterol ペレット投与群にもかなり高率の腫瘍発生がみられた。また 5-FU や MMC 投与群においても腫瘍の発生がみられたが、これらいわゆる抗癌剤については、他の薬剤も含めて現在さらに検討中であるので、この論文においてはこれら薬剤については結論を述べることを控えたい。

以上のような結果に対して、DMN と ANI および DMN と DES との併用群では前者は 0/5 (0%)、後者では 0/11 (0%) と、ともに腫瘍の発生は全くみられず、ほぼ完全に腫瘍の抑制効果がみられた (Table 2)

考 按

泌尿器科領域において実験的に腎腫瘍を作る試みには、種々の方法があるが、実験的膀胱腫瘍の研究にくらべると比較的少なく、またそれは新しい研究題目といえる。腎腫瘍を作るためには種々の材料が用いられているがことに最近では化学性発癌物質と hormone が注目されている。化学性発癌物質により腫瘍が作られたのは、Ilfeld (1936)¹²⁾ が 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene を腎内に投与したのが始めであるが、Morris ら (1957)¹³⁾ が N-4-(4'fluoro)-diphenyl acetamide を経口的に用い、また Magee & Barnes (1959)¹⁾ および Zak ら (1961)¹⁴⁾ が

dimethylnitrosamine を経口的に用いて腫瘍を作ること成功した。

この DMN 腎腫瘍の最大の利点は、renal cell type と anaplastic cell type と、すなわちヒトの Grawitz 腫瘍と Wilms 腫瘍に類似の2種類の腫瘍ができることである。しかしながら、この物質はかなり毒性が強いので、少量を長期にわたって投与した場合には、Magee ら¹⁵⁾ および Thomas ら¹⁶⁾ も述べているように肝腫瘍が高率に発生し、腎腫瘍を作ることができない。これに対して DMN の大量を投与した場合には腎腫瘍が高率に発生するが、その急性毒性のため死亡するものが多い。そこで、われわれは種々検討の結果、500 ppm を2週間のみ投与するという方法を用い、高率かつ選択的に腎腫瘍を作ることを見いだした。75% という高率に確実に腫瘍ができることは、その腫瘍の組織学的所見がヒトの腎腫瘍と類似したものであるということとともに、以後の実験を行なう上に非常に有利な点といえ、以後われわれはこの方法を用いて、安全かつ高率に腎腫瘍を作ること続けている。

さて一方、腎腫瘍の治療に関しては他のすべての悪性腫瘍と同様に早期診断のもとに根治手

術を行なうことが原則で、これに放射線療法が主として術後に併用されているが、なおその成績はよくない。最近では種々の抗腫瘍物質投与の機会がふえ、中でも Actinomycin D の出現は小児の Wilms 腫瘍の治療にかなり優秀な成績が報告されているが、まだ根治療法とはいえない。しかるに系統的に実験的腎腫瘍を用いて、その治療法の改善に役だたせようとする試みはきわめて微々たる状態である。

著者の報告した DMN 腎腫瘍における実験では、雄のダイコクネズミの腫瘍発生は ANI とともに DES ペレットにより完全に抑制されている。1944年 Vasquez-Lopez¹⁷⁾ が雄の Golden hamster に長期間 estrogen を投与した際、腎腫瘍が発生することを発見し、この事実は以後 Matthews ら¹⁰⁾、および Horning^{18,19)} などにより追試確認されている。一般にホルモンによる治療については Bloom 一派^{20,21)} の progesterone や testosterone を用いた抑制実験がある。Bloom らはこの理論をヒトの腎腫瘍に対して臨床的に応用し、転移のある腎癌20例に使用し、progesterone で3例、testosterone で1例の転移巣の消失を報告している。本邦でも最近少数の人びとが同様の治療成績を報告している。したがって今回の結果は一見 Matthews や Horning らの実験結果とは全く相反する事実であろう。しかし、DES による腫瘍発生への作用については 2-acetylaminofluorene を用いた Morris ら²²⁾ の報告によっても肝癌の発生の抑制されることが報告されている。したがって今回の結果は実験動物の相違による感受性の差異が問題となろう。すなわち、DES は雄のハムスターにおいてのみ発癌性を発揮するが、Wistar 系 rat においてはむしろ退行変性的に働くような感がある。よしんば rat においても多少の発癌性があるとしても、ANI を投与したと同様に発癌性物質を同時に投与したときには、むしろ拮抗的に作用することも予想されるが、いずれにしてもその本態に関しては今後さらに検討を加える必要があろう。次に抑制効果のあった ANI についても、その本態は肝癌抑制効果の場合と同様、明らかでない。

また腎臓は現在では renin, angiotensin の分泌、あるいは erythropoietin の産生などの面から endocrine system にも属する臓器と考えられ泌尿器科領域においても睪丸や前立腺と同様に内分泌学的な面からさらに追及を加えるべきであると考ええる。

われわれはこの実験に引き続いて、抗腫瘍物質の種類をふやし実験を続けているので、本論文では抗腫瘍剤の成績についての結論を述べることを控え、改めて報告することとしたい。

む す び

1) DMN 腎腫瘍から得られた基礎的結果を応用し、ヒトの腎腫瘍の治療法に改善をもたらし得るような基礎的データをを得ることを目的として治療に関する実験を行なった。

2) 用いた薬剤は mitomycin C, 5-fluorouracil, 3-methylcholanthrene, α -naphthyl-isothiocyanate および diethylstilbestrol である。

3) このうち ANI および DES により腫瘍の発生は完全に抑制され、また前癌変化と思われる尿細管上皮細胞の乳頭状増殖や腎間質組織への未分化細胞浸潤などの変化も乏しかった。ことに DES 投与群には DMN の投与の有無にかかわらず、その尿細管上皮細胞内に lipofuscin 様色素の沈着がみられたことは興味ある変化といえよう。

4) いわゆる抗癌剤による影響については、目下さらに実験を継続中であるので、本論文では結論的事項は述べない。

5) 腎臓は内分泌と密接な関連がある臓器であり、今後この方面からもさらに検討を加えるべきであると考ええる。

(泌尿器科学教室の石川昌義教授および第一病理学教室の北村旦教授の御校閲を深謝します。

なお、本論文の要旨は第18回日本泌尿器科学会中部連合地方会シンポジウム (1967, 金沢市) および第56回日本泌尿器科学会総会 (1968, 東京都) において発表した。)

文 献

- 1) Magee, P. N. and Barnes, J. M. : Acta Unio internat. contra Cancrum, 15 : 187,

- 1959.
- 2) Ito, N., Johno, I., Marugami, M., Konishi, Y. and Hiasa, Y. : *Gann*, **57** : 595, 1966.
- 3) 伊東信行・城野逸夫・丸上昌男・小西陽一・日浅義雄 : *日病会誌*, **55** : 147, 1966.
- 4) 城野逸夫 : *日泌尿会誌*, **58** : 17, 1967.
- 5) 伊東信行・丸上昌男・小西陽一・日浅義雄・岡島英五郎・奥村秀弘・井本 卓・北村 旦 : *日病会誌*, **56** : 133, 1967.
- 6) 伊東信行・丸上昌男・小西陽一・日浅義雄・岡島英五郎・山下昭夫・木村郁夫 : *医学のあゆみ*, **63** : 403, 1967.
- 7) Marugami, M., Ito, N., Konishi, Y., Hiasa, Y. and Farber, E. : *Cancer Res.*, **27** : 2611, 1967.
- 8) 佐々木茂 : *奈医誌*, **14** : 101, 1963.
- 9) Sidransky, H., Ito, N. and Verney, E. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **37** : 677, 1966.
- 10) Matthews, V. S., Kirkman, H. and Bacon, R. L. : *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **66** : 195, 1947.
- 11) Horning, E. S. and Whittick, J. W. : *Brit. J. Cancer.*, **8** : 451, 1954.
- 12) Ilfeld, F. W. : *Am. J. Cancer*, **26** : 743, 1936.
- 13) Morris, H. P., Velat, C. A. and Wagner, B. P. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **18** : 101, 1957.
- 14) Zak, F. G., Holzner, J. H., Singer, F. J. and Popper, H. : *Cancer Res.*, **20** : 96, 1960.
- 15) Magee, P. N. and Barnes, J. M. : *J. Path. Bact.*, **84** : 19, 1962.
- 16) Thomas, C. und Schmähel, D. : *Z. Krebsforsch.*, **66** : 125, 1964.
- 17) Vasquez-Lopez, E. : *J. Path. Bact.*, **56** : 1, 1944.
- 18) Horning, E. S. : *Brit. J. Cancer*, **8** : 627, 1954.
- 19) Horning, E. S. : *Brit. J. Cancer*, **10** : 678, 1956.
- 20) Bloom, H. J. G., Dukes, C. E. and Mitchley, B. C. V. : *Brit. J. Cancer*, **17** : 611, 1963.
- 21) Bloom, H. J. G. and Wallace, D. M. : *Brit. Med. J.*, **II** : 476, 1964.
- 22) Morris, H. P. and Firminger, H. I. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **16** : 927, 1956.

(1968年11月28日受付)