

BBN Rat における膀胱癌とヒト膀胱癌の組織学的検討

名古屋大学医学部泌尿器科学教室（主任：三矢英輔教授）

村	瀬	達	良
小	林		収
青	田	泰	博
三	矢	英	輔

名古屋大学医学部第1病理学教室

越	川	卓
---	---	---

HISTOLOGICAL STUDY OF URINARY BLADDER TUMOR :
DNA IN URINARY BLADDER IN RATS BY N-BUTYL-N
(4 HYDROXYBUTYL) NITROSAMINE AND
IN HUMAN BLADDER TUMOR

Tatsuro MURASE, Osamu KOBAYASHI, Yasuhiro AOTA and Hideo MITSUTA

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

Takashi KOSHIKAWA

From the Department of First Pathology, School of Medicine Nagoya University

Male Fisher rats were treated with 0.5% BBN, and the appearance of cancer in the rat's bladder was observed successively. The quantities of DNA in the normal and tumorous tissues were compared with those in the bladder cancer excised from man; and, the bladder cancer produced in the rat and that occurring in man were compared. 96 rats were divided into 4 groups, and given 8, 16, 24 or 32 weeks of treatment with BBN. Papillomas appeared after administration for 8 weeks, and with subsequent increase in the period of administration the rate of canceration increased. The cancerous tissue proliferated papillarily, the malignancy was grade 1 to 2, no case showed infiltration into the muscle layer, and the quantity of DNA scarcely changed with time, always showing a peak near 2c. In the papillary type of bladder cancer in man, the quantity of DNA showed little change at any stage, and little tendency of infiltration; and, the growth pattern was similar to that of the BBN-induced cancer in rats. On the other hand, non-papillary cancer in man showed a flat histogram of DNA, had a strong tendency of infiltration, and showed a growth pattern different from that of the BBN-induced cancer in rats, thus the BBN-induced cancer in the rat cannot be used as a model of non-papillary infiltrative cancer.

Key words: BBN rat, DNA value, Grade, Growth pattern

はじめに

1964年 Druckrey¹⁾によりニトロソ化合物, および
その誘導体の発癌の実験を系統的におこなわれ N-

butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamin (BBN) が膀胱
に強い選択的発癌性を有することが見出された。これ
まで BBN を使用した膀胱発癌過程の病理学的検討は
伊東らの多くの研究があり, ヒト膀胱癌のモデルとし

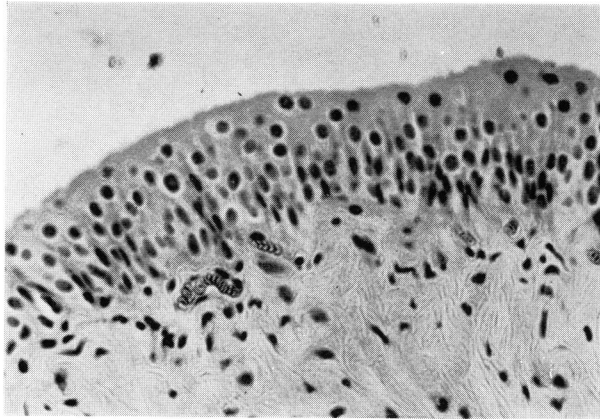


Fig. 1. コントロールのラットの移行上皮

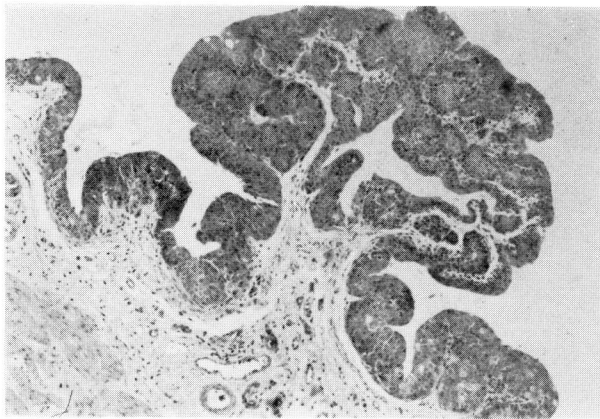


Fig. 2. 0.05% BBN 8週投与の papilloma

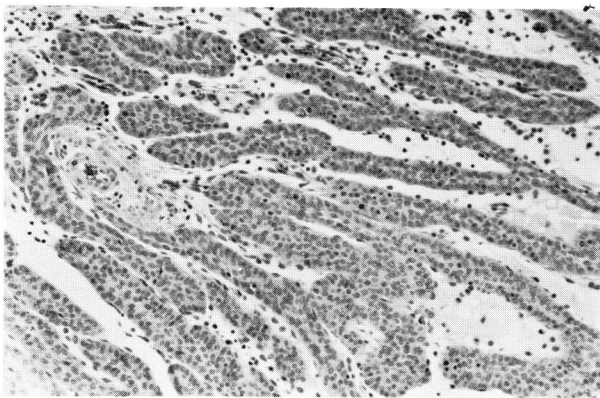


Fig. 3. 0.05% BBN 16週投与の TCC.
grade II papillary に増生する

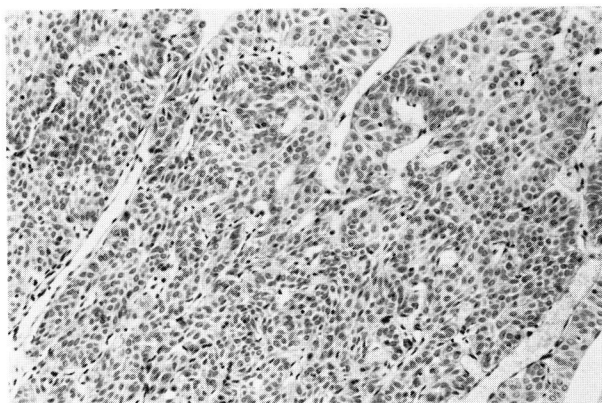


Fig. 4. 0.05% BBN 24週投与の TCC.
grade II papillary に増生している

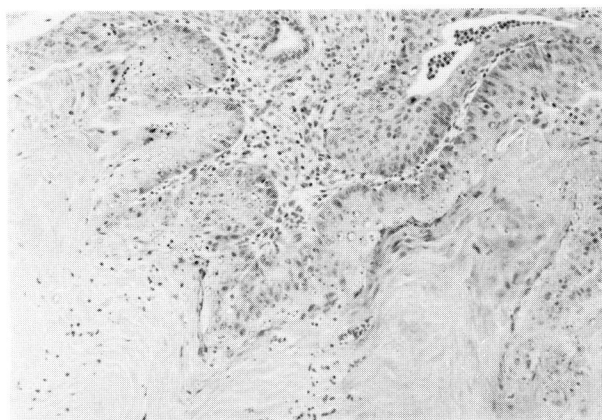


Fig. 5. 0.05% BBN 32週投与の TCC.
grade II 1部 squamous metaplasia を認める

て BBN の優秀性があきらかにされた。しかし BBN をラットに投与した場合の膀胱癌は比較的浸潤する例が少なく、ヒト膀胱癌との差が問題となる。今回われわれは BBN ラットの膀胱発癌の過程とヒトの膀胱癌の全摘標本を組織学的に検討し、あわせて細胞核の DNA 量の測定をおこない、ヒト膀胱癌の発癌モデルとしての BBN ラットの意義を考察した。

材料および方法

6 週齢の雄の Fisher 系ラット (日本ケアリー KK) 平均体重に 150 g BBN (Izumi chemical co.) を水道水に溶解し 0.05% 溶液としてラットに自由飲水させることにより発癌実験をおこなった。

96匹のラットを 6 群にわけ、それぞれの群に対し、

0.05% の BBN を第 1 群には 4 週間、第 2 群には 8 週間、第 3 群には 16 週間、第 4 群には 24 週間、第 5 群には 32 週間、第 6 群には水道水のみを投与した。36 週目に全部屠殺し、膀胱の組織学的検索を施行した。また各群の組織にフオイルゲン染色を施行し、顕微分光光度計 (オリパス製 MMSP) を用い、腫瘍組織の細胞核の DNA 量を測定した。腫瘍細胞の DNA 量の対照として、間質のリンパ球 20 個の DNA 量を測定し、その平均値を 2 C と定めた。腫瘍細胞 100 個の DNA 量を測定し、2 C に対する相対値で示し、DNA 量の分布をヒストグラムで示した。

いっぽう膀胱癌患者で膀胱全摘した標本を Koss²⁾らの方法に従い病巣マッピングを作製し組織学的に検討し、1 部の標本についてフオイルゲン染色を施行

Table 1

group	0.05%BBN の投与週	水の投与週	hyperplasia	papilloma	cancer
I	0	32	0	0	0
II	8	24	2	12	0
III	16	16	2	9	4
IV	24	8	0	1	11
V	32	0	0	0	11

し、各浸潤度について分類し、BBN ラットの膀胱腫瘍と比較した。

結 果

Table 1 は各群の BBN ラットの組織像の状態を示

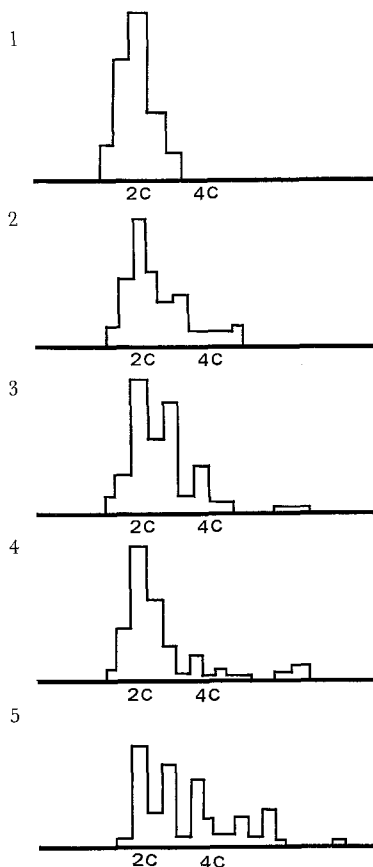


Fig. 6-1. control, Fig. 1 DNA ヒストグラム
 Fig. 6-2. 0.5% BBN 8週投与の DNA ヒストグラム
 Fig. 6-3. 0.5% BBN 16週投与の DNA ヒストグラム
 Fig. 6-4. 0.5% BBN 24週投与の DNA ヒストグラム
 Fig. 6-5. 0.5% BBN 32週投与の DNA ヒストグラム

す、伊東³⁾らの方法に従い3種の組織像に分けた。すなわち、過形成、乳頭腫および癌である。(Fig. 1~5)

第I群では、全例7例とも正常な移行上皮を示した。第II群では、過形成のみ2匹、乳頭腫の生じているもの12匹、癌のもの0匹、第III群では、過形成のみ2匹、乳頭腫を認めるもの9匹、癌を認めるもの4匹であった。第IV群では、過形成のものは0匹、乳頭腫のもの1匹、癌のもの11匹となり、第V群では全例11匹とも癌化していた。なおあきらかな筋層への浸潤を認めたものは全例とも認められなかった。

Fig. 1~5 に示す組織について DNA のヒストグラムは Fig. 6 に示す。BBN の投与期間の増加によりヒストグラムは対照に比し少しずつピークは右方へ偏位してゆくが、ピークの著しい右方への変化は認められなかった。

Fig. 7, Fig. 8 は、ヒトの多発性の膀胱癌で腫瘍組織のマッピングとその癌細胞の DNA 量をみたものであり、low stage より high stage に並べたものである。乳頭状の癌である Fig. 7 は P₂ までの例が存在している。DNA のヒストグラムは 2C を越えた部位にピークを認め、stage が進んだ Fig. 7-4 ではややヒストグラムは偏位を示すが、著しい偏位は認められない。

このタイプの腫瘍は BBN ラットの経時的変化および DNA のヒストグラムは似ており、low stage の状態で長期間とどまるタイプと思われる。

Fig. 8 は非乳頭状癌あるいは非乳頭状癌と乳頭状癌の混在する多発性の浸潤性の癌についての low stage から high stage へと並べてみたものである。このタイプは P₁ より P₄ までの連続的な浸潤性の変化がうかがわれる。

DNA の分布のパターンは 4C 以上の細胞の方が多く、分散が著しい。このタイプは BBN ラットとは異なった組織と growth pattern を持っている。

考 察

BBN は選択的に膀胱癌を発生させ、膀胱癌のきわめて有用な実験モデルとして確立されている。伊

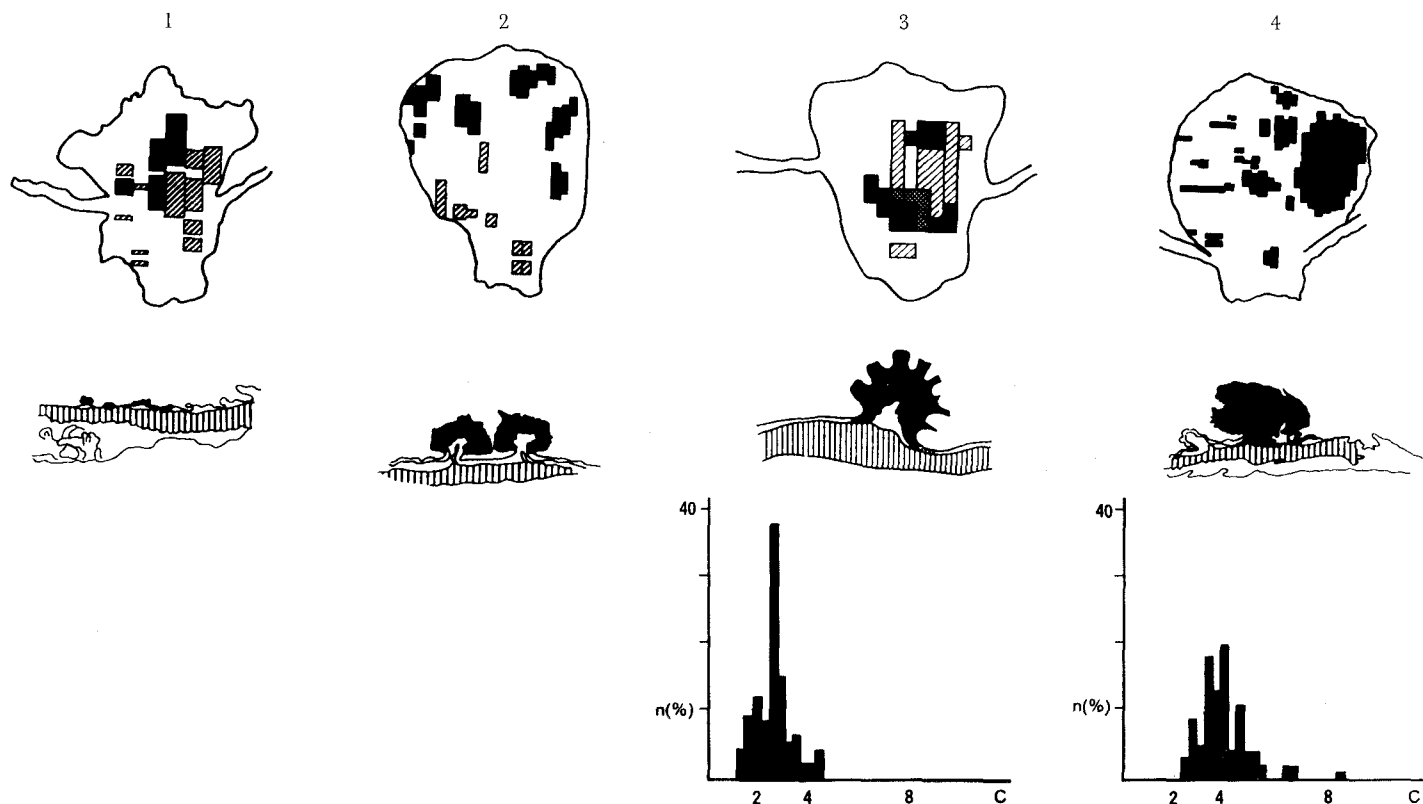


Fig. 7-1. 小さな乳頭状の腫瘍が多発している症例で、ATP や microscopic な papillary elevation が多発している。DNA ヒストグラムは3C 付近に mode を認める

Fig. 7-2. Stage A (PT₁), grade 2, Fig. 2-1 の成長した型と考えられ、papillary tumor が多発している

Fig. 7-3. Stage A (PT₁), grade 2, 巨大な乳頭状腫瘍と、小さな papillary tumor が混在している。腫瘍から離れた部位にも ATP や microscopic な papillary elevation が認められた

Fig. 7-4. Stage B₁ (PT₂), grade 2, 1個の巨大な乳頭状の腫瘍と多数の乳頭状腫瘍からなる膀胱癌。巨大な乳頭状腫瘍は一部が筋層へ浸潤を開始している。DNA ヒストグラムは 3C 付近に mode がある

Fi 7-1→F 7-2→F 7-3→F 7-4 へと連係的变化を類推させる。Fig. 7 の症例はいずれもリンパ節転移はない

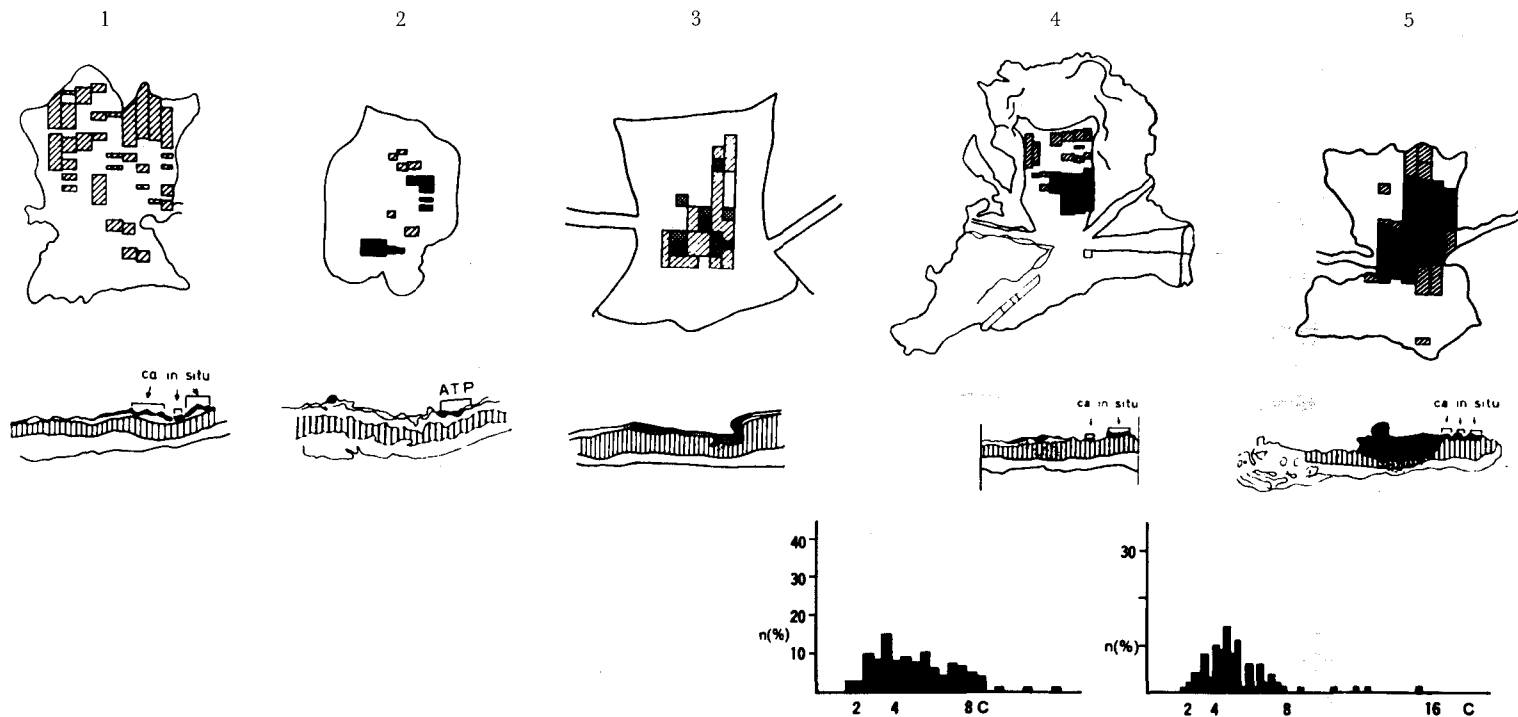


Fig. 8-1. Ca in situ の状態で全摘した症例, Ca in situ が多発している

Fig. 8-2. Stage A (PT₁), grade 2-3, 非乳頭状の腫瘍が多発し, 一部の癌巣は部分的に粘膜下に浸潤している. Ca in situ や ATP が腫瘍から離れた部位にも存在している. DNA ヒストグラムは 5C 付近に mode を認めた. mode の分散がある

Fig. 8-3. Stage B₁ (PT₂), grade 2, 3, 非乳頭状の腫瘍と乳頭状の腫瘍が混在している. Ca in situ が多発している. 非乳頭状腫瘍の部位の筋層のリンパ管に cancer cell が認められた. DNA ヒストグラムは mode の分散があり, 5C 付近に mode がある

Fig. 8-4. Stage B₂ (PT₃), grade 3, 非乳頭状の腫瘍が筋層をつらぬいて浸潤している. Ca in situ が多発している. 膀胱全摘後1年で尿道再発を認めた

Fig. 8-5. Stage C (PT₃), Ca in situ が多発し, リンパ節転移を認める

Fig. 8-1~8-5 までの連係的な変化をうかがわせる

東ら⁴⁾は BBN ラット膀胱癌の多数の検索により BBN の投与期間が6週の単純性過形成をきたし、8週の投与で乳頭状腫瘍および癌が発生し、20週の投与で85%に癌が発生すると報告している。われわれも伊東らの方法に準じて BBN ラットの発癌課程を観察したが、BBN 8週投与では癌は発生しなかったが、16週投与で30.7%，24週投与で79%，32週投与で100%の膀胱癌の発生をみた。

これらの発癌の過程での膀胱腫瘍の組織像と腫瘍組織の DNA 量を経時的に検討したが、DNA の分布の pattern は grade とよく関連し客観的な異型性の判定に有用であるとの報告は多い^{6,7)}。

0.05 % BBN 投与後の組織の異型性はほとんど grade II (Koss)⁷⁾ に相当し、BBN 32週投与例で一部に癌組織が squamous metaplasia をきたし、浸潤の傾向が認められた組織像もあったが筋層へ浸潤した例はなかった。

DNA のヒストグラムは BBN の投与週が増加するにつれてわずかであるがヒストグラムは右方へ偏位するが、BBN 32週投与でもヒストグラムの主軸は 2 C に留まっている。福島ら⁸⁾は BBN ラット膀胱癌の多数の検索により95%は移行上皮癌で、64%の例で浸潤性の発育を認めず、浸潤例も粘膜固有層までのものが多いと報告している。

この BBN ラットの膀胱癌とヒトの膀胱癌の類似性が問題となるが、ヒトの膀胱癌の自然経過は必ずしもあきらかではない。一般に乳頭状の腫瘍は、著者の mapping で示したごとく小さな papillary projection が増生したり、あるいは融合して増生し、多発性あるいは巨大な乳頭状の癌になり、組織の異型性は grade 1 ないし grade 2 であり、DNA の分布は 3 C の辺にピークを認め、長期にわたれば浸潤すると思われるが浸潤する傾向は弱いと考えられる。

いっぽう非乳頭状の癌の場合 ca in situ より発生し、短い間に浸潤傾向を示し、異型性は多くは grade 3 であり、DNA の分布は平坦化し腫瘍組織の活発な活動がうかがわれる。山田ら⁹⁾はヒト乳頭状腫瘍の場合増殖性の変化が主体であり浸潤化（悪性化）の変化が少なく、非乳頭状の浸潤する腫瘍とは違い、腫瘍は発生当初よりそれぞれの増殖様式で出発し1つの型よりほかの型へ転化することはないと述べている。

膀胱癌の進行について Pugh¹⁰⁾ あるいは WHO¹¹⁾ の示す growth pattern は、乳頭状の腫瘍が連続的に浸潤癌になる shema が示されているが、人の場合、papillary invasive と分類される癌は存在するものの、臨床的にはそのほど多いとは思われない。

膀胱癌の治療の場合、Skinner ら¹²⁾が述べているごとく、随伴性に ca in situ を含む多発性の非乳頭状癌は、早期に膀胱全摘をしないと予後不良となることが多く、乳頭状の腫瘍の場合、follow up の途中で急激な悪性化のため膀胱全摘の期を逸することはなく、乳頭状のタイプが他型への転化することなく進行する。

BBN ラットの場合も、BBN の投与期間が増加するにつれて、増生は著しくなるが、浸潤性の変化はほとんどなく、DNA ヒストグラムも、BBN の投与期間が増しても著しい変化をみせず、ヒト乳頭状の膀胱腫瘍の growth pattern とよく似ている。

BBN ラットは人の乳頭状腫瘍の有用なモデルと考えられるが、非乳頭状の癌の早期に浸潤するタイプとはあきらかに違う。

BBN はニトロソアミンの1種であるが、たばこにも含まれており、また膀胱癌患者の尿中にもニトロソ化合物が含まれているという報告もあり¹³⁾、BBN によるラットの発癌が人の乳頭状腫瘍といかなる関係があり、また異なった growth pattern を示す非乳頭状の浸潤癌とは異なった etiology なのかを検討する必要がある。

結 語

BBN ラットの膀胱発癌の経時的变化を病理組織学のおよび発癌した組織の DNA 量について経時的变化を調べた。ヒト膀胱癌と比較するために膀胱全摘標本の多発性乳頭状癌と非乳頭状の浸潤癌についての病理組織および DNA 量を比較検討した結果、BBN の膀胱発癌の過程はヒト乳頭状癌と発育様相が似ており、乳頭状腫瘍の有効なモデルとなるが、非乳頭状浸潤癌の growth pattern とは著しい違いが見られた。

本論文の要旨は第135回日本泌尿器科学会東海地方会にて発表した。

文 献

- 1) Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S, Schmidt CH, Mennel HD and Stahl KW: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl- und N-Butyl-N-butanol (4)-nitrosamin. Z Krebsforsch 66: 280~290, 1964
- 2) Koss LG, Tiamson EM and Robbins MA: Mapping cancerous and precancerous bladder changes. JAMA 227: 281~286, 1974
- 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) Ito N, Mtayoshi K, Arai M, Yoshioka Y, Kamamoto Y, Makiura S and Sugihara S: Effect of various factors on induction of urinary bladder tumors in animals by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamin. *Gann* **64**: 151~160, 1973
- 5) Lederer B, Mikuz G, Gutter W and zur Neiden G: Zytrophotometrische Untersuchungen von Tumoren des Ubergangsepithels der Harnblase. Vergleich zytrophotometrischer Untersuchungsergebnisse mit dem histologischen Grading. *Beitr Pathol* **147**: 379~389, 1972
- 6) Levi PE, Cooper EH, Anderson CK and Williams RE: Analyses of DNA content, nuclear size and cell proliferation of transitional cell carcinoma in man. *Cancer* **23**: 1074~1085, 1969
- 7) Koss LG: Tumors of the urinary bladder Atas of tumor pathology, Second series Fascicle, A.F.I.P. Washington D.C. 1975
- 8) Fukushima S, Hirose M, Tsuda H, Shirai T, Hirao K, Arai M and Ito W: Histological classification of urinary bladder cancer in rats induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* **67**: 81~90, 1976
- 9) 山田 喬・横川正之・稲田俊男・三谷玄悟・大和田文雄: 膀胱腫瘍の臨床病理・その分類と進展のテンポ. *癌の臨床* **21**: 184~193, 1975
- 10) Pugh RCB: The pathology of cancer of the bladder. *Cancer* **32**: 1267~1274, 1973
- 11) W.H.O.: International histological classification of tumors-Histological typing of urinary bladder tumors. F.K. Mostofi ed. Geneva, W.H.O., 1973
- 12) Skinner DG, Richie JP, Cooper PH, Waisman J and Kaufman JJ: The clinical significance of carcinoma in situ of the bladder and its association with overt carcinoma. *J Urol* **112**: 68~71, 1974
- 13) Kakizoe T, Wang TT, Eng VWS, Furrer R, Dion P and Bruce WR: Volatile N-nitrosamines in the urine of normal donors and of bladder cancer patients. *Cancer Res* **39**: 829~832, 1979

(1982年10月8日受付)