

^3H -Thymidine による早期膀胱癌の 臨床病理学的研究

岡山大学医学部泌尿器科学教室（主任：大村順一教授）
大学院学生 松 村 陽 右

CLINICAL STUDIES ON THE EARLY STAGE OF URINARY BLADDER CARCINOMA WITH ^3H -THYMIDINE RADIOAUTOGRAPHY

Yosuke MATSUMURA

*From the Department of Urology, Okayama University Medical School
(Director : Prof. J. Oomura)*

Bladder carcinoma arising from a transitional epithelium is the particular kind of carcinoma, which in early stage is proliferative with papillary form and then is apt to develop multiple and malignant characters with chronic reparative proliferation.

Therefore, for the planning of the treatment of bladder carcinoma in its early stage it is important to examine the potentially malignant distribution and degree of the papillary-formed cells.

In order to distinguish the malignitude of hyperplasia from carcinoma in situ, observations were made on the clinicopathological change of the constituent cell of the bladder carcinoma in early stage and papilloma not only with hematoxylin-eosin stained specimen but also by means of ^3H -thymidine radioautography following in vivo and in vitro labelings determining the distribution of labeled cells, labeling index and grain count.

The results obtained are summarized as follows.

1) With papillary proliferation, ^3H -thymidine labeled cells were more frequently found in the intercellular layer than in the basal cell layer.

2) Labeling index was found to be 1-2% in papilloma, 0.6-3.1% in carcinoma of early stage and 10-20% in multiple cases. The labeled cells in such situations distributed in the upper area of the intercellular layer. It was suggested that there may exist a generation zone in the upper layer rather than the basal layer.

3) ^3H -thymidine radioautography of bladder carcinoma with in vivo labeling brought a better clinical results than with in vitro method.

目 次

緒 言

I 早期乳頭状腫瘍の臨床病理学的変貌

- 1) 研究材料ならびに研究方法
- 2) 研究成績
- 3) 小括

II ^3H -Thymidine による膀胱癌細胞の増殖動態

1. 初期癌の In-vivo における実験的研究

- 1) 実験材料
- 2) 実験方法
- 3) 実験成績
- 4) In-vivo 小括

2. 初期癌の In-vitro における実験的研究

- 1) 実験材料
- 2) 実験方法

3) 実験成績

4) In-vitro 小括

総括ならびに考按

結 論

文 献

結 言

膀胱癌の治療成績をより以上に向上しようとする場合、癌である以上当然早期癌(low grade low stage)と進行癌(high grade high stage)の2期に、それぞれ区別して治療対策を考える必要がある。この中進行癌については従来から多数の研究があり、積極的にあらゆる手段ないしは根治的手術術式の改善が加えられ、今日では驚くべき成果をあげているが、一方早期癌についてみると予想以上の複雑な条件があるために、必ずしも充分な検討の下に治療がなされているとはいえない。殊に、膀胱癌の早期といえ、移行上皮細胞を発生母地とする他の臓器には見られない特異性がある上に常に尿の浸漬からまぬがれない一種独特な病態生理の上に成立つ癌腫であるだけに、他の臓器癌の初期とは、あらゆる意味で異った事項があり、この条件を無視して漫然と治療対策にのぞむわけにはいかないことを充分考えねばならない。

そこで先づ最初に膀胱粘膜にあらわれる初期病像、すなわち乳頭状の増殖を示しつつあるが、まだ粘膜下層まで浸潤を見ない粘膜のみの増殖の段階、あるいは少しく進んだ粘膜癌の時期での病像に研究の焦点をしばって検討を加え、そしてこれに対する治療法を考慮することは、膀胱癌治療上重要な事項の1つと考えざるを得ない。事実癌の早期発見早期治療が強調され始めた現在、膀胱癌においても、血尿を初発症状とするだけに、患者は早期受診の傾向になりつつあり、われわれ日常の臨床面でも、このような早期の乳頭状腫瘍として膀胱鏡的に発見される機会が多くなっており、しかもこの初期の乳頭状腫瘍の時期において、その腫瘍の将来の経過を予め推測しての診断がどうしても必要な場合がたびたび生じつつあることはいうまでもない。そこで膀胱鏡所見とともに、当然生検材料を得て、検討が加えられるわけであるが、

Melicow¹⁾ (1952) や Masina²⁾ (1952) のいう粘膜の hyperplasia の段階で、将来を予測しようとしてもある程度の限界が確にある。しかし詳細に観察すると、少くとも増殖した粘膜層は、基底層、中間層および上層には区別し得られるし、その各層の細胞の大きさ、配列、核質の大きさ、染色性などによってある程度の差異が認められ、せめてものより処がないことはない。唯膀胱癌の初期像の研究で残念な点は、それが何らかの治療法で処置を受けるために、充分な臨床経過(極言すれば、これをそのまま放置すれば最初の生検所見から出た予測が果して的中するかの問題)を追究することが出来にくいことである。

以上のようなことから著者は、最初の乳頭状腫瘍の病理組織像を再検討することによって、乳頭腫を含めての初期の乳頭状腫瘍は、そもそもの層の細胞を中心に増殖し、また癌化するのだろうか、それによって、少くともその腫瘍の今後の経過の予想は出来ないだろうか、ということを教室の症例で検討を試みてみた。またこの結果に加えてさらに増殖細胞のエネルギーとしての DNA 合成能を³H-Thymidine によって標識する実験を応用したところ、乳頭腫および早期癌において得られた病理組織学的所見を腫瘍細胞増殖能の点で裏付けできる興味ある成績を得たので報告する。

I 早期乳頭状腫瘍の臨床病理学的変貌

膀胱癌の初期病像を検討する場合、先づ問題となるのは乳頭腫である。従来乳頭腫は癌化する傾向が大であるとするものと³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、長期間比較的良性に経過して癌化することが少いとする⁷⁾⁸⁾⁹⁾両説があるが、臨床的には、先を見越して癌化する傾向を憂慮して癌と同義的に解釈して、処置されているが、今もしこのような乳頭腫を、自然の経過に従って長期間詳細に観察するなれば、如何なる変貌を示すかの事実を追求し、あるいは癌化するとすれば如何なる細胞がどんな経過で進むかその過程を検討することができれば、初期像の解釈が可能となり、ひいては膀胱癌の癌化過程にあづかる細胞の追究の鍵ともなる基礎的事項が、ある程度判明するやも

知れないと考え、次の興味ある症例をもとに検討を試みた。

1) 研究材料ならびに研究方法

研究の対象は1957年より1962年までの岡山大学泌尿器科教室での膀胱癌入院患者の中、無処置長期観察のできた5例の患者である。研究方法は、たまたま初診時の膀胱鏡検査で、大きい米粒大ないし小豆大まで、

単発有茎性乳頭状腫瘍であり、生検像で乳頭腫と断定出来た症例であって、初診時の生検は得られたものの、その後患者の都合で、何等の処置を受けることなく(この間ほとんど無症候であった)、全く自然の経過にまかせ、一定期間後再来、膀胱鏡検査および生検が幸に得られた5症例(第1表)があり、各症例の初診時の所見、再来時の所見を対比することができたもの

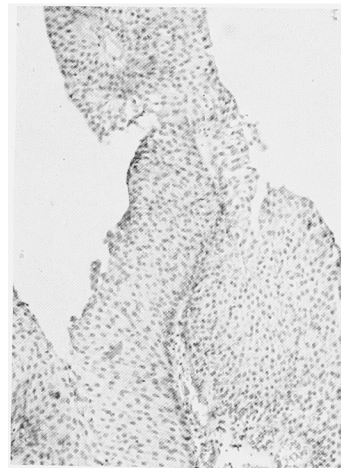
第1表 乳頭腫の臨床経過

症 例	氏 名	年 令・ 性 別	初年 月 診日	膀胱鏡所見			再の 来期 迄間	再年 月 来日	膀胱鏡所見			生 検 診 断
				部 位	大 い さ	性 状			部 位	大 い さ	性 状	
i	河 ○	52 ♂	33.11.24	右側壁	米粒大	乳頭状	3 年 5 カ月	37. 4. 5	右側壁	小豆大	乳頭状	Ⅱ度 乳 移 癌
2	山 ○	52 ♂	31.11.14	後壁	超米粒大	有茎乳頭	2 年 11 カ月	34.10. 9	後壁	小指頭大	有茎乳頭	Ⅱ度 乳 移 癌
3	佐○木	69 ♂	32. 8.11	左側壁	小豆大	有茎乳頭	4 年	36. 8.20	左側壁	小指頭大	乳頭状	乳頭腫
4	内 ○	47 ♂	37.11.13	後壁	米粒大	有茎乳頭	2 年 1 カ月	39.12.10	後壁	母指頭大	有茎乳頭	Ⅱ度 移 癌
5	安 ○	38 ♀	35. 6.18	右側壁	小豆大	有茎乳頭	3 年 11 カ月	39. 5.18	右側壁	小指頭大	乳頭状	乳頭腫

である。生検材料は Young 氏異物用膀胱鏡および Buerger 氏手術用膀胱鏡で採取、10% Formalin 液固定後、paraffin 切片作製後(固定、包埋条件を極力一定にして)、主として H. E 染色を、また用にのぞみ、Van-Gieson 染色、鍍銀法あるいは PAS 染色を併用して、比較検討した。

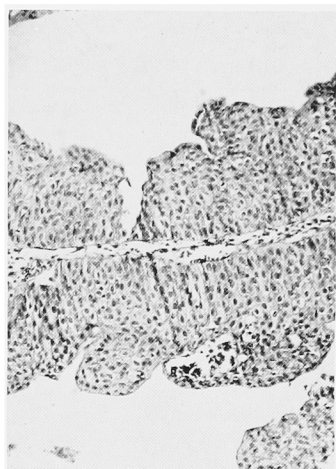
2) 研究成績

症例1 河○某 52才 ♂ 1958年11月24日初診時の内視鏡所見は右側壁に単発性で有茎性乳頭状の小腫瘍があり、基底部の粘膜は正常であった。生検像は(第1図)、かなり増殖した上皮細胞の重積があるが、個々の細胞には核質の染色性は一定で、また、異型性、核分裂などは見られず、ただ基底細胞層の核よりも中間層の核がやや大型に認められる程度で乳頭腫と診断した。ところが、1962年4月5日の膀胱鏡所見では、3年5カ月を経て、かなりの悪化を予想したが、右側壁の腫瘍は依然単発で有茎性乳頭状、小豆大にやや増



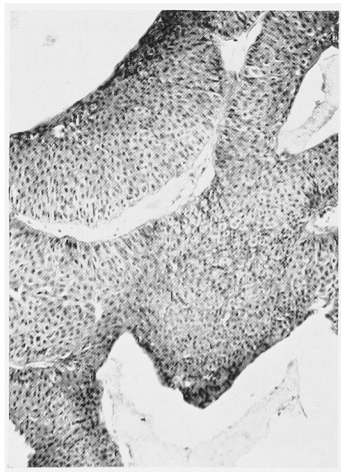
第1図 初診時生検像
乳頭腫(症例1)

大を見る状態で、この間自覚症状はほとんどない。生検像では（第2図）重積した細胞は、核が全般にやや腫大し、クロマチンに濃淡があり、胞体も境界が明瞭であるが、配列は不規則化しているか、核分裂像が僅かながら見られた。すなわち、Ⅱ度乳頭状移行上皮癌の像といえる。



第2図 3年5ヵ月後の生検像
異型性を認め乳頭状癌となる

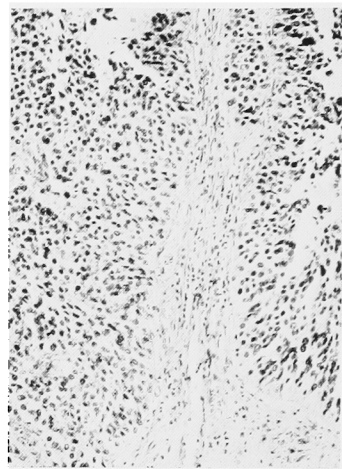
症例2 山○某 52才 ♂ 1956年11月14日肉眼的血尿の主訴で来院、膀胱鏡検査で、後壁に超米粒大の周囲粘膜に無関係の有茎性乳頭状腫瘍1個を発見、その一部に血塊を附着するのを認めた。生検像では（第3図）細胞の重積はかなり著しく乳頭状の増殖は著明で



第3図 初診時生検像
乳頭腫（症例2）

あるが、基底層の細胞の配列は正しく、核のクロマチンの濃淡もなく胞体の空胞化が散見されるが、核分裂像も全くない。すなわち乳頭腫であった。その後肉眼

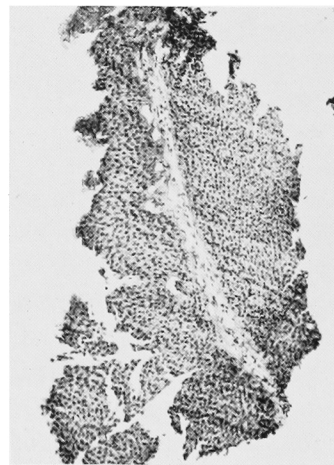
的血尿は自然消退し、自覚症を欠いたので来院せず、1959年10月9日尿意頻数、顕微鏡的血尿で再来した。膀胱鏡的には後壁の腫瘍は小指頭大に増大し、乳頭状で周囲粘膜には肉眼的な浸潤像は見られない。やはり2年11ヵ月の間に変化を来したといえる。生検像では（第4図）すでに核の大小不同、染色の濃淡、配列の



第4図 2年11ヵ月後の生検像
完全な癌化を見る

不規則化が明瞭となり、核分裂像も随所に散見されるが、基底膜の破壊浸潤像はない。間質支持組織の膠原線維はやや増殖像を示し、Ⅱ度乳頭状移行上皮癌で、完全な癌化が見られた。

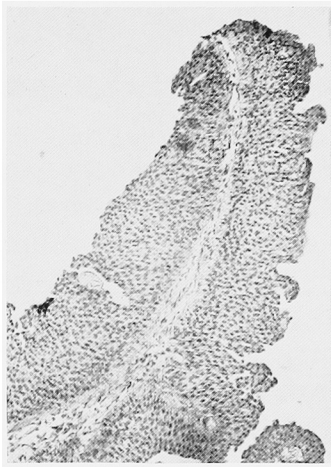
症例3 佐○木某 68才 ♂ 1957年8月11日肉眼的血尿で受診、膀胱鏡的に左側壁に有茎性乳頭状の小豆大単発の腫瘍を発見した。生検像では（第5図）著明に延長した間質の表面に増殖した細胞が規則正しく重積し、均等な核の染色性と大いさがあり、核分裂像は



第5図 初診時生検像
乳頭腫症（症例3）

見られない。よって乳頭腫と診断した。癌化を考えて処置をすすめたが、家庭の都合で治療を受けず、再来することなく放置した。ところが、満4年後の1961年8月20日1週間前より排尿痛とともに肉眼的血尿で再来した。膀胱鏡検査をしたところ、左側壁の腫瘍は依然有茎性乳頭状腫瘍で、初診時の小豆大より小指頭大に増大はしているが周囲粘膜には、肉眼的浸潤はない。生検像では（第6図）核の腫大はあるが、基底層の細

腫瘍細胞の重積は中等度で、細胞の大きさも均一であって、配列も規則正しく、核分裂像も見られない。唯一部の上層において核の腫大を認めるところもあるが、乳頭腫であった。その後受診することなく、2年1カ月目の1964年12月10日の膀胱鏡所見では、初診時の後壁の米粒大腫瘍は母指頭大に増大し、乳頭状ではあるが、細血管の充盈がやや目立って認められた。生検像では（第8図）腫瘍細胞の配列はやや乱れ始め、



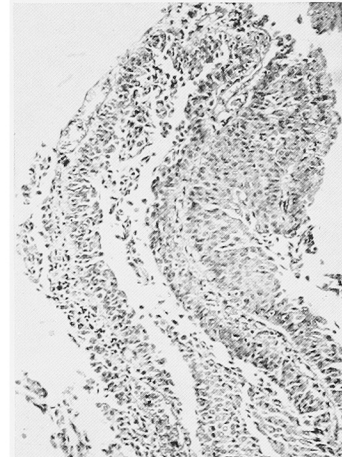
第6図 4年後の生検像
先ず癌化は認められない

胞配列は比較的正しく、胞体の境界も明瞭で、核分裂像は未だに判然としたものは見られない。すなわち、本症例は、満4年を経てなおかつ、乳頭腫の域を脱することなく経過した稀有な例である。

症例4 内○某 47才 ♂ 1962年11月13日膀胱鏡的に、後壁に米粒大単発の周囲粘膜とは関係の乏しい有茎性乳頭状腫瘍を1個認めた。生検像では（第7図）



第7図 初診時生検像
乳頭腫（症例4）
中間層より上層に核の腫大



第8図 2年1カ月目の生検像
癌化を見る

核も腫大を来し殊に中間層から上層に向っての大小不同が認められ、Ⅱ度乳頭状移行上皮癌であった。

症例5 安○某 38才 ♀ 1960年6月18日突然肉眼的血尿を来し、膀胱鏡的には右側壁に小豆大の有茎性乳頭状腫瘍を見出した。基底部の粘膜には肉眼的に変化を認めない単発腫瘍であった。生検像では（第9図）基底層の配列は極めて正しく、累積した腫瘍細胞



第9図 初診時生検像
乳頭腫（症例5）

はクロマチンに均等で、核分裂像はなく、乳頭腫と診断した。病変が少なく治療を受けず、3年11ヵ月後の1964年5月18日の膀胱鏡所見では、右側壁の腫瘍は小指頭大に腫大はしているが、乳頭状で周囲粘膜には浸潤像は見られない。生検像では(第10図)基底細胞の



第10図 3年11ヵ月目
ほとんど癌化は見られない

配列は規則正しく、核の大小不同も著しくはない。ただ中間層および上層部において、配列の乱れが若干見られるが、核分裂像はほとんど見られず、乳頭腫の段階を保持している。すなわち、本例のごとく基底細胞の変化の乏しい型例は長期間を経過しても比較的变化の少ないことを示している。

3) 小括

以上の5症例を総括すると、いずれの症例も初診時の膀胱鏡所見ならびに生検所見で悪性像と断定し得る所見のない乳頭腫であったものが、自然の経過にまかせて2年ないし4年の時日を経た後の観察で、3例は癌化の傾向を明らかに認め、また2例は比較的長期間の経過にもかかわらず、判然とした癌化を認めず、単に膀胱鏡的に腫瘍自体の増大を見たに過ぎない例を得たことである。このことは、通常、良性乳頭腫は癌化の傾向が大であるので、癌と同義的に解釈して処置する。すなわち、良性乳頭腫という名称の存否の問題において、乳頭腫は必ずしも短時日の中に急速に癌化するとは限らないことを、また逆に、癌化する危険性がないとは断言できないことを示すもので、乳頭腫—前癌状態—初期癌の経過過程からみて、乳頭腫という名称は臨床的にも病理学的にも保存すべきであることを示唆するものと考えらる。

ここで重要なことは、癌化するまでの期間、速度、癌化の型が意義をもつということである。初診時の生

検像で、基底細胞層の確然と保持されている例(症例3, 5)は比較的癌化に長期間を要しており、中間層から上層にかけての細胞の腫大、配列の乱れの見られる症例は、癌化の傾向が強い場合が多い所見と考えられる。しかしながら、H. E 染色を中心とした標本のみでは、将来この腫瘍が如何なる増殖を示すか、増殖するならば、どの層の細胞かについて、先ず解決できない問題である。すなわち、初期乳頭状腫瘍の有する potentially malignant は再検討を要するところと考えられる。

II ^3H -Thymidine による膀胱癌細胞の増殖動態

前述のごとく未だ基底膜を破らない乳頭腫ないしは初期癌あるいは粘膜癌の時期において、今後の進展経過を予測することは H. E 染色を主体とする通常染色のみでは、極めて至難であるといえる。殊に、今もし膀胱粘膜の早期癌化過程を追及しようとするれば、かかる初期での増殖した細胞における増殖能自体に対して、何らかの裏付けが必要であり、もしそれが少しでも突現するならば、早期の膀胱癌の治療方針の決定、ひいては癌化の解決の鍵の一つともなり得ると考えられる。そこで著者は、教室において最近手術によって得られた乳頭腫あるいは初期癌に ^3H -Thymidine を用いて Radioautography を試みた。

さて、Radioautography は LaCassagne(1925)により創始されたわけであるが、従来、腫瘍組織に潜在するエネルギー・DNA 合成能は Feulgen 染色などにより検索されてきたに過ぎないが、最近では Radioautography によって、さらに鋭敏でかつ動的な観察を可能にしたわけである。さらに、Hughes (1955) によって ^3H -Thymidine が新に合成されて以来、細胞レベルあるいはそれ以下の細胞内部構造の Radioautography を可能にした。

Thymidine は DNA の特異的前駆物質として、急速に DNA に合成されその後は細胞分裂か、核崩解がないかぎり、ふたたび他の代謝過程に取り入れられることはなく、特殊な type の film との組合せにより著しく高い鮮鋭度(最大解像力 0.2μ) の Radioautogram が得られ、これにより細胞の DNA 合成能、増殖過程の機

序を動的に追究することができる。そこで本法を膀胱腫瘍の細胞増殖形態の特殊性を利用することによって、第1部に記述した重積した腫瘍細胞の増殖能の存在部位、分布層の変貌について検討すると共に、従来施行されてきた in-vitro labeling method とは趣を異にした in-vivo labeling method を試案して膀胱腫瘍にあらわれる成績を検討しこの両者をも比較吟味を試みた。

1. 初期癌の In-vivo における実験的研究

さて膀胱癌細胞の増殖しつつある場における DNA 合成能を観察しようとする場合の ³H-Thymidine の投与法は通常、生体と切り離されないのが最善の条件

であるので、静脈注射によって癌組織に直接到達させるべきであるが、静脈注射による全身投与は人体に対して12.5年の長い半減期をもつ放射性物質が、あまねく核酸に取り込まれることとなり、また、投与量も必然的に大量となるために、生体に対して somatic ならびに genetic とともに好ましからぬ影響をおよぼす危険がある。そこで、³H-Thymidine を在来の in-vitro における実験もさることながら、極力癌組織を生理的環境下に置きつつ、選択的にその部位に ³H-Thymidine を到達させる 目的で内視鏡下で直接局所に注入する in-vivo による実験方法を新に試みた。

1) 実験材料

第2表のごとく当科膀胱癌（40才より72才にわたる）入院患者の中、乳頭腫2例、単発性初期癌2例、

第2表 In-vivo labeling

症 例	氏 名	年令・性別	膀 胱 鏡 所 見		病理組織所見	治 療
			部 位	数		
1	国 ○	53 ♀	右 側 壁	単	乳 頭 腫	経尿道的電気切除術
2	高 ○	40 ♂	左 側 壁	〃	〃	〃
3	原 ○	65 ♀	左側壁・左尿管口	多	Ⅱ 度 乳・移・癌	〃
4	中 ○	36 ♂	右 側 壁 後 壁	〃	〃	〃
5	合 ○	59 ♂	左 側 壁	単	〃	膀胱部分切除術
6	松 ○	67 ♂	右 側 壁	〃	〃	〃
7	児 ○	54 ♀	後 壁	多	〃	〃
8	森 ○	60 ♀	後 壁	〃	〃	〃
9	本 ○	48 ♀	後 壁・両 側 壁	〃	Ⅲ 度 乳・移・癌	膀胱全剔除術
10	池 ○	63 ♂	後 壁 頸 部	〃	〃	〃
11	太 ○	68 ♂	後 壁・両 側 壁	〃	Ⅳ 度 乳・移・癌	〃
12	小 ○	67 ♂	後 壁	〃	Ⅲ 度 乳・移・癌	〃
13	小 ○ 田	43 ♀	頂 部 後 壁	〃	Ⅳ 度 乳・移・癌	〃
14	奥 ○	72 ♂	後 壁・三 角 部	〃	Ⅲ 度 乳・移・癌	〃

多発性初期癌4例および対照として浸潤癌6例、計14例であって、この中4例は経尿道的電気切除術を、また4例には部分剔除術を施したものであり、浸潤癌症例の6例は全例とも膀胱全剔除術兼両側尿管皮膚吻合術を施した症例によるものである。また、癌組織とは無関係の正常粘膜は、前立腺肥大症患者5例の手術中の膀胱粘膜を実験に供した。これら腫瘍の病理組織学的診断は全例、定型的な移行上皮癌Ⅱ～Ⅳ度である。

2) 実験方法

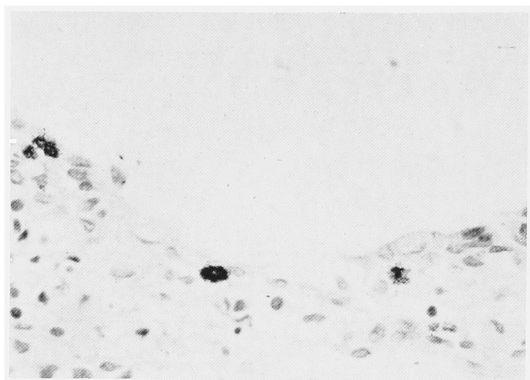
³H-Thymidine は specific activity 5.0 curies/mM で The Radiochemical Center 製のものを日本放射性同位元素協会を通じて購入した。投与方法は、³H-Thymidine を生理食塩水を用いて 10 μ c/ml の稀釈

とし、これを先きに教室の大村ら（1962）が膀胱癌に制癌剤を局所投与した方法にならって恥骨直上で経腹壁的に長針を穿刺し、膀胱鏡下に観察しつつ腫瘍実質、腫瘍基部さらにその周辺部に1回 5～10 μ c、5～8回局所注入し、総量 50～80 μ c となるごとく投与した。なお、最近の症例には、手術用膀胱鏡を用い局所注入用カテーテルを用いてその尖端の細長な針を通じて ³H-Thymidine 稀釈液の局所注入を経腹壁的と同様に行なった。そして局所注入後1時間を経て経尿道的あるいは手術的に局所注入した腫瘍およびその周辺組織を剔除した。直ちに 10% Formalin 固定、約5 μ の薄切 paraffin section とし脱 paraffin した後に London Kodak AR 10 stripping film で被覆乾燥

後、 4°C 、4 週間暗室にて露光した。露光後、現像液 Kodak D 19b により現像を行ない、しかるのちに Hematoxylin による後染色をやや薄目に（標識細胞および顆粒を明らかにするために）施し検鏡した。

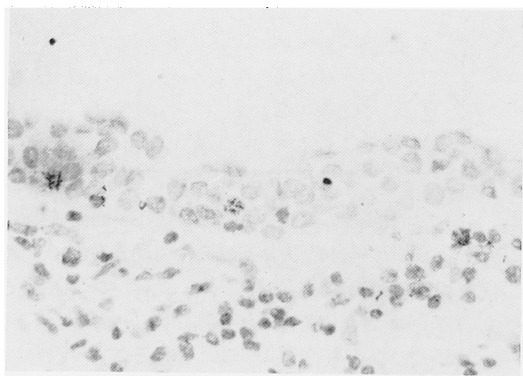
3) 実験成績

(i) 正常粘膜 腫瘍と無関係の移行上皮細胞層では、 ^3H -Thymidine の取り込みは基だ少なく、標識されても殆んどが基底層に一致して散見される程度である（第11図）。また、粘膜下に好中球を主とする炎症



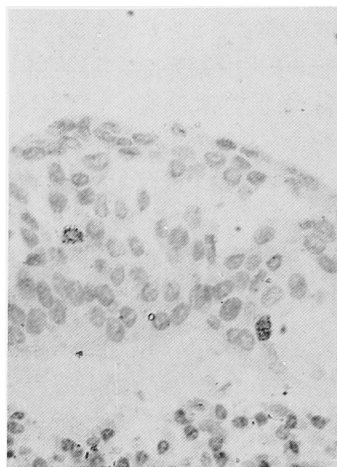
第11図 正常粘膜上皮の取り込み
（第15図まで in-vivo labeling）

性細胞の浸潤を伴う反応性の粘膜増殖においては（カテーテル留置による）僅かながら取り込みは増加の傾向を認めるようである（第12図）。なお、顆粒は疎な場合と緻密なものとは相半ばする。



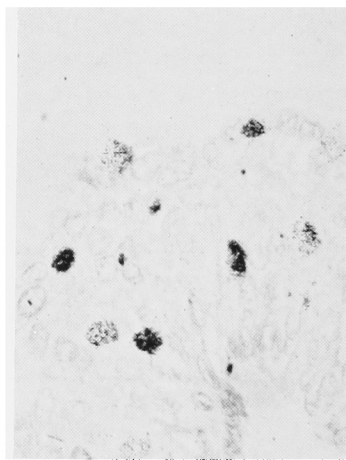
第12図 やや増殖した粘膜
取り込みは基底細胞に見られる

(ii) 乳頭腫 前節記載のごとく単に細胞層の重複のみで、異型性あるいは核分裂像の見られない乳頭腫の場合は（第13図）概して大いさの均一な核の配列にもかかわらず、意外と標識数が少なく、この場合正常粘膜とは異って、基底細胞層よりやや離れた中間層に向って散在性に認められる。



第13図 乳頭腫 中間層に散見される（症例2）

(iii) 初期癌 腫瘍細胞は全般的に大型となり、配列の不規則化が見られるのが特徴のごとくであるが、その中間層の大型細胞に大部分の取り込みが認められ、一部のもののみ基底層に極少数の標識が認められる。全体としての標識率は3～5%である（第14図）。

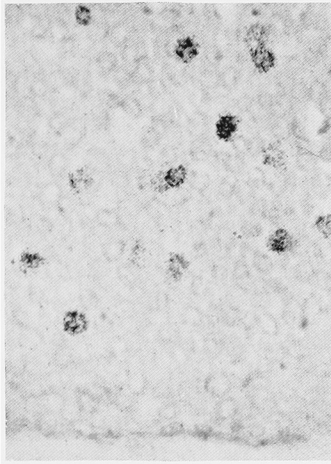


第14図 初期癌 中間層の大型細胞に散見される（症例7）

すなわち、このことから DNA 合成は基底層よりもむしろ中間層におけるそれが優位にあることが知られた。

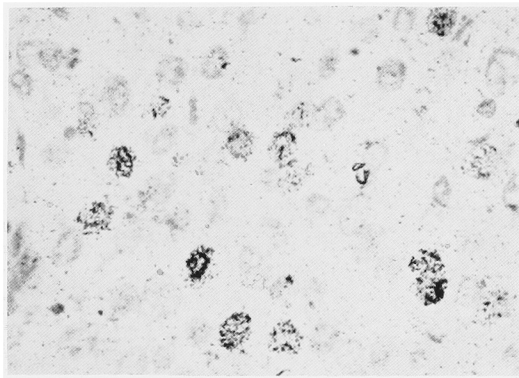
(iv) 多発傾向例（乳頭腫症例）最も興味ある多発例においては、 ^3H -Thymidine の取り込み部位および標識率は各個腫瘍の進展状況に一致し、増殖形態の著しい所見を呈する中間層およびそれより上層において著明に認められ、単に腫瘍細胞が同一形態であっても意外に標識率が高いことが知られるほか、基底層の

取り込みは甚だ少ないことが目立つ（第15図）。



第15図 多発傾向例
基底層には少なく広汎に分布する（症例14）

（v）浸潤癌（進行癌） 一部に基底層において取り込みの少ないこともあるが、大部分のものでは全層にわたり平等な多数の標識細胞を認める。標識率は2.6%～11.2%程度で、殊に筋層内に向っての浸潤先進部ではより高率に達する（第16図）。



第16図 浸潤癌（進行癌）
多数の標識をみる（症例10）

4) In-vivo 小括

In-vivo labeling には、 ^3H -Thymidine 溶液の局所注入法による浸潤の不均一性という疑点がある。したがって、その組織における顆粒数の算定には慎重を要すると思われるが、比較的大量を単位体積内に十分に細い穿刺針を用い、注入量を多くすることにより、まず解決できるものと考えたが実験成績からみると、注入量が十分に施された部位はほぼ一定の標識率で認められるが、注入を受けない部位では標識率は完

全に0であって、両者の差は判然と認められた。

正常粘膜および乳頭腫では粘膜層が薄く、そのこと自体より ^3H -Thymidine の取り込みを基底層、中間層および表層と部位別に観察することは困難であるが、基底細胞に、あるいはそれに近く見られることは、正常の粘膜代謝を意味するものと考えられる。

初期癌では、基底層に取り込みを認める割合は非常に低く、これをやや離れた部あるいは中間層にその大部分を認める。

多発傾向例では、初期癌よりもやや多く標識が認められ単発の初期癌とはやや趣を異にするごとくであり、腫瘍進展状況に応じた取り込みの様相を認めた。

浸潤癌では、標識率は急速に上昇し、取り込みも全域にわたって広範囲に認められた。

2. 初期癌の In-vitro における実験的研究

In-vivo labeling は生体における腫瘍生存環境に最も近い状態での実験であるが、操作のやや複雑性と実験条件の一定化の困難性があるので in-vivo と対応させる意味で、in-vitro labeling の実験も併せ試みた。

1) 実験材料

第3表のごとく、単発乳頭腫2例、単発初期癌5例、多発性初期癌6例および対照例として浸潤癌1例を資料とした。

12例においては、Young 氏異物用膀胱鏡を用いて、予め腫瘍を摘除し、その後電気切除を、また1例は膀胱部分切除術によって、さらに1例は全剝術によったもので、多発例では一部を in-vivo labeling に、一部を in-vitro labeling のための材料とした。これらは、病理組織学的には全例とも移行上皮癌Ⅱ～Ⅲ度のものである。なお、部分切除、全剝除例の腫瘍遠隔部（腫瘍より5cm隔った部）の正常粘膜をも実験材料に加えた。

2) 実験方法

採取した腫瘍片は極力凝血塊を除去して可及的速かに3～5mm立方の細片として第4表に示す溶液中に、37°C、2時間、incubateした。

Radioautogram の作製は、前述の in-vivo の場合と同様に行ない検鏡した。なお、標識率の算定は極力均一な取り込み分布のみられる細胞集団を選択した。

3) 実験成績

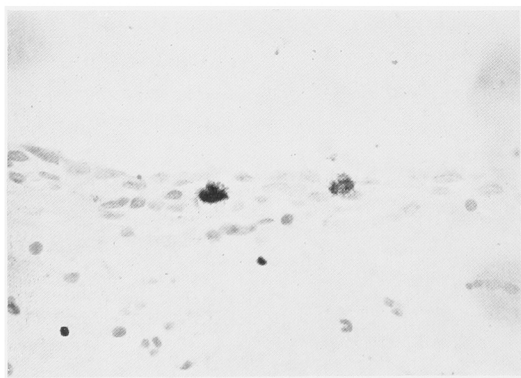
（i）正常粘膜 腫瘍遠隔部ではあるが、上皮細胞の重積は1～2層であり一部には、やや大型の細胞として標識される部位もある（第17図）。

第3表 In-vitro labeling

症例	氏 名	年令・性別	膀胱鏡所見		病理組織所見	治 療
			部 位	数		
1	赤 ○	37 ♂	後 壁	単	乳 頭 腫	経尿道的電気切除術
2	山 ○	51 ♂	右 尿 管 口	〃	〃	〃
3	平 ○	64 ♂	左 尿 管 口	〃	Ⅱ度 乳・移・癌	〃
4	大 ○	85 ♂	後 壁	〃	〃	〃
5	今 ○	51 ♂	後壁・左尿管口	多	〃	〃
6	宗 ○	55 ♂	後 壁	単	Ⅲ度 乳・移・癌	〃
7	森 ○	61 ♂	左 尿 管 口	〃	〃	〃
8	右 ○ 林	63 ♀	後 壁	〃	〃	〃
9	大 ○	59 ♂	後壁・左尿管口	多	Ⅱ度 乳・移・癌	〃
10	石 ○	67 ♀	両 側 尿 管 口	〃	〃	経膀胱的電気切除術
11	光 ○	80 ♂	後 壁	〃	Ⅲ度 乳・移・癌	〃
12	内 ○	54 ♂	後 壁・左 側 壁	〃	Ⅱ度 乳・移・癌	〃
13	嶋 ○	46 ♂	左 側 壁	単	〃	膀胱部分切除術
14	本 ○	48 ♀	右 側 壁・後 壁	多	Ⅲ度 乳・移・癌	膀胱全切除術

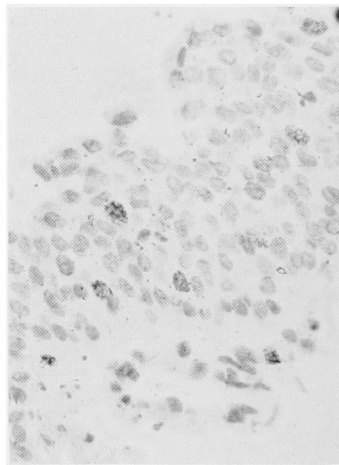
第 4 表

1) 剔出腫瘍細片	3~5mm立方
2) 0.85% Saline	2
TC Medium 199	4
Calf Serum	4
^3H -Thymidine 添加 (最終濃度 $1\mu\text{C}/\text{cc}$)	
3) Incubate 37°C	2時間



第17図 腫瘍より遠隔の正常粘膜 やや大型の標識細胞を見る (症例14)

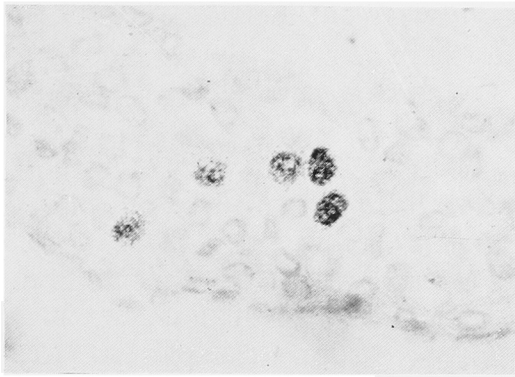
(ii) 乳頭腫 ほぼ均一な核をもつ細胞の集積層からなっているが、標識率は低く、主として基底層より中間層に ^3H -Thymidine の取り込みが見られる。標識率は1.6%から5.2%におよぶ。しかし、その1例に意外に高い標識率で取り込みが全層にわたり認められた例があった (第18図)。

第18図 乳頭腫
全域に比較的多く標識されている (症例2)

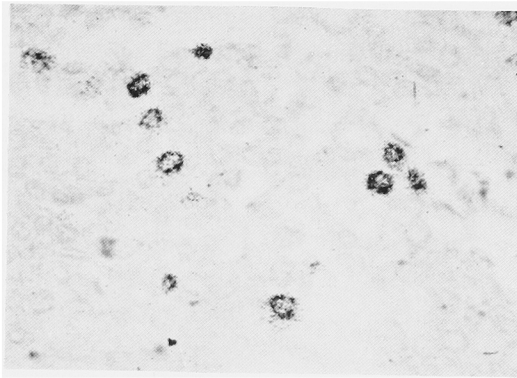
(iii) 単発初期癌 概して腫瘍細胞は大型で、核小体の明らかなもの、あるいは核分裂像の見られる所見であるが、標識される細胞も大型で選択的に比較的多く中間層より上層に向って、散在性にあるいは集簇性に見られる (第19図)。

(iv) 多発傾向例 腫瘍によって、大小種々、構成細胞も重積の多いもの、少ないものと雑多であるが、 ^3H -Thymidine の標識は中間層、上層部に随所に認められ、乳頭腫あるいは初期癌に比して一般に分裂能の高いことが明らかに示されている (第20図)。

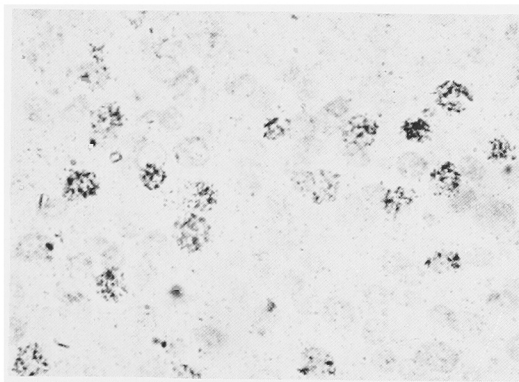
(v) 浸潤癌 多型性の著しい腫瘍構成細胞の核に、全層にほぼ均一に取り込みが見られ、その核自体



第19図 単発初期癌
中間層より上層に向っての大型細胞に見られる(症例4)



第20図 多発傾向例
広範囲に標識されている(症例9)



第21図 浸潤癌
In-vivo と相異はない(症例14)

の大きさも大小種々である(第21図)。

4) In-vitro 小括

単発の乳頭腫および初期癌においては基底層から中間層に取り込みを認めるものと、中間層から上層に向

って認めるものがあったが、大部分は後者であった。

標識率は1.6%から5.2%におよび、in-vivo labelingの値と大差ない標識状態を示したといえる。なお、興味あることは、単発例の中で膀胱鏡所見およびH.E染色で全く同一の所見を呈しながら、甚だ高率な標識率とその分布の広範囲なものを認めたことである。このことは、従来悪性度I度ないしII度として処理されていた乳頭腫あるいは乳頭状癌の中には、頭初より極めて分裂増殖能の強い傾向をもつ型の腫瘍型が存在するのではないかということを示唆する成績であった。さらに多発傾向例では、標識率はやや高く、DNA合成層は単発例よりもさらに上層に向って拡がっているのを認める。

以上を総括した標識率および銀粒子数、その分布は第5表のごとくである。

第5表 腫瘍型による識別

D. N. A. 形態別	標 識 率 Labeling Index	銀粒子数 Grain Count	分 布		
			基層 底	中間層 深	上層 表
正 常 粘 膜	0~1	20>			
良 性 乳 頭 腫	1~2	20>			
初 期 癌	3~5	20>			
多 発 例	主腫瘍	10~20			
	娘腫瘍	2~3			
浸 潤 癌	8~10	30<			

総括ならびに考按

膀胱癌で、すでに基底膜を破壊して著しい増殖を示す浸潤癌の場合は、その病理組織像において一定の細胞分化度と浸潤度があり、これによって癌の悪性度ひいては治療法あるいは予後の推定が可能であることはいうまでもない。しかし、膀胱癌の早期では、膀胱内に乳頭状有茎性の増殖をまず最初に招来しその増殖した細胞の重積—粘膜癌—乳頭状癌—の状態で腫瘍の将来性、治療法の選択が是非必要である。また一方、膀胱に発生する乳頭腫と乳頭状移行上皮癌との形態学的な差異についても議論の多いところ⁴⁾⁵⁾⁹⁾であって、臨床的にはその区別が判然としないままに、止むなく癌として同義的に解釈し処置すべきとするむきが多い現状である。すなわち、早期の膀胱癌では、普通染色標本によって得られた病理組織学的所見のみでは、診断

はもとよりその腫瘍の将来性、予後の判定については甚だ困難であるといえる。そこで何等かの型でさらに一步進んだ判定資料があれば、すなわちその組織に潜在するエネルギーを分別する方法として、dynamic な組織像ともいえるものを併せ用いるならば、一步進んだ判定資料となり議論を進めることができる^{13) 14) 18)}であろう。というのは近年は悪性腫瘍組織と非悪性組織との相異の究明は、単に病理形態学的な面のみからではなく、さらに生物化学的方向に転換しつつあるかの感があるからでもある。

さて、細胞活動の中心的存在は申すまでもなく核であり、そしてその核酸が生命現象の重要な役割を果している。核酸の内分布は従来、Feulgen 反応 (DNA)、Methylengreen and Pyronin 染色 (RNA) などにより組織化学的に究明されてはいたが、ここに新に放射性同位元素により標識された核酸 DNA の特異的前駆物質とされる ^3H -Thymidine の合成により Radioautography の technique が急速に進展し、DNA 合成の動的観察を細胞レベル、電顕的レベルにまで引き下げたものである。 ^3H -Thymidine を用いる Radioautography による cyto-kinetics の解析として²⁶⁾は、細胞系全体に ^3H -Thymidine を持続的に同濃度で接触させ、経時的に sample をとり、Radioautography を作製する cumulative labeling method と、単一の標本でより多くの情報を得るために ^{14}C -Thymidine で labeling したのち、もう一度 ^3H -Thymidine で labeling を行う double labeling method、さらに人体あるいは実験動物に単回注射を行なう single pulse labeling、これに grain count の減少状態をみる dilution chase method、 ^3H -DNA を合成した細胞の動きを直接読みとる migration chase method、細胞系を ^3H -Thymidine で pulse label してから分裂像にラベルの現われてくる様子を時間的に chase する mitosis chase method、 ^3H -Thymidine を短時間接触させ、細胞集団の Labeling index と細胞あたりの grain count よりその増殖能を推定する flash labeling method などがある。

人体においては、組織を経時的に採取することの困難さより、flash labeling method の採用を余儀なくされるので、著者もこの方法を用いることとした。

人体への直接の応用は、Cole et al. (1961), (1963) により一部試みられたが、人の悪性腫瘍に直接応用することは、半減期が長く (12.5 年)、somatic ならびに genetic に悪影響を与える危険があることから避けられてきたが、最近外科の手術に際し腫瘍組織剔除前に ^3H -Thymidine の局所注入を行ない、一定時間後その腫瘍を剔除し Radioautogram を作製することが試みられている^{22) 23) 24)}。著者はこの点に着目するとともに、膀胱癌の特異性を利用して、腹壁より経皮的に腫瘍および腫瘍基部に局所注入すること、また、経尿道的に手術用膀胱鏡を用いて、腫瘍および腫瘍基部に局所注入して in-vivo labeling 法をも試みた。

in-vivo 法においては、 ^3H -Thymidine は 1 ～ 2 分の極めて短時間の間に DNA 合成期にある細胞に取り込まれることが知られており¹⁸⁾、著者は組織内への均等な拡散を期待し、穿刺個所を多くし、また剔除までの時間を 1 時間として、人体に影響をおよぼさず、可及的自然の状態における ^3H -Thymidine の取り込みを期待し、術前局所注入なる方法を採用した。

さて、尿路腫瘍における ^3H -Thymidine Radioautography の実験は Veenema et al. (1962) によって始めて試みられている。彼らは、主に膀胱腫瘍の生検材料および手術時採取の腫瘍組織片を用いて in-vitro flash labeling method により Radioautogram を応用して、H・E 染色組織所見との一致を指摘しこの治療法選択への応用を唱えている。

さて、Veenema et al. (1963) の実験成績では、39例の膀胱腫瘍患者の中、high activity (標識率 6% 以上のもの) 18例中 4例、variable and moderate activity (3～6%) を示したものの 16例中 9例、low activity (1～2%) を示したものの 5例中 2例においては、組織の grade and stage と Radioautogram との間に有意の相関関係を示さなかったとしている。すなわ

ち、この実験からは high grade and high stage のものは当然相関は明かであるが、初期のものでは相関は低いことが知られる。

さて、著者の研究の眼目とするところは、むしろ彼が相関関係の乏しいとする初期 low grade and low stage における病変、すなわち、乳頭腫—前癌状態—初期癌の過程あるいは段階での標識如何が問題であって、彼らのいう H・E 染色組織像と標識細胞の不一致こそが、膀胱粘膜の癌化過程の重要な point を占めるものであり、このような膀胱粘膜における初期癌の病像を、増殖経過に従って区別して Radioautogram で追究せんとした報告は未だ見られない。

著者の実験成績では、乳頭腫あるいは初期癌における標識細胞の分布は、基底細胞層には少く、むしろ中間層に主として認められる。Büchner (1964) は、Radioautography の実験より、マウスの表皮、舌粘膜あるいは前胃の重層扁平上皮に限定するならば、基底細胞層が未分化層であることを示し、これの癌化に際し未分化層での著明な DNA 2 倍化細胞の増加を伴った粘膜の増生がみられ、後に発生する乳頭腫においても DNA の 2 倍化は、未分化層に限定されているとし早期癌ともなると、DNA 2 倍化の扁平上皮全層への拡大が認められるという。また、加来ら (1963) は、正常人の表皮の ³H-Thymidine Radioautography で標識された細胞はほとんど最深層に存在するが、Psoriasis vulgaris に罹患した人体表皮では、標識された細胞の数が著明に増加し、最深層のすぐ上の層に最も多く存在しているとしている。このことは、著者の成績においても膀胱の乳頭腫では、最深部の基底層に標識を見るものもあるが、大部分は基底層よりやや上方であり、また、初期癌においては中間層より上方に向けて標識細胞が多く見られることは、乳頭腫・初期癌の細胞増殖のエネルギー源すなわち generation zone が膀胱の場合はこの層にあると考えざるを得ない。腫瘍細胞の分裂速度は正常細胞のそれよりも低いということは、これまでの多くの文献により明かであり、腫瘍細胞の集積

は細胞除去率の低下にあると結論されることより、中間層に分化能の障害を有する generation zone をもつ上皮の乳頭状化が試案される。

良性乳頭腫と初期癌の Radioautogram 上に見られる差異をさらに標識率および顆粒数においてみるに、両者の差は著明でない。顆粒数の算定は、臨床例より得られる材料を用いる場合観察条件の同一化は、一層に困難であり有意の差を求めるには、かなりの危険性があることを考慮しなければならないが、やはり、初期癌において標識率、顆粒数ともにやや高い値を認めた。Veenema et al. (1963) の観察結果を stage A, grade 2 までのものに限ってみれば 13 例中 9 例 (69%) に H・E 染色組織像と Radioautogram よりみた activity は不一致をみている。すなわち、69% は予期に反し high activity および moderate activity を示したのである。すなわち、乳頭腫と考えられる病巣の中にも異常に高い標識率を示すものがあるということは、H・E 染色標本による診断の限界を示すものと思われる。対照として用いた浸潤癌では、いずれも高い標識率および顆粒数を示した。これは Veenema らの成績と全く一致する。多発傾向例の主腫瘍および異所性再発巣においても、generation zone はほぼ同様の部位、すなわち、中間層に認められた。

なお、中間層に発生した 1 個の腫瘍細胞が増殖分裂を繰り返し、generation zone としての性格を得るに至るには、その増殖速度が速いものでないと考えられるかぎり、多発した各個の腫瘍巣の発展段階には、かなりの相違があっていると思われる。

多発傾向例での娘腫瘍あるいは異所性再発巣においても、基底細胞層の標識はほとんどなくて、generation zone が中間層に認められた。このことは、多発性乳頭状腫瘍が上皮損傷部に着床した腫瘍細胞より発展したものでなく、また、すでに処理された主腫瘍より播種 (implant) されたものでもないことを明らかに示している。

結 論

膀胱癌が移行上皮細胞を発生母地として、乳

頭状の増殖型をとり、それが何らかの機序に従って浸潤癌に進展することを基本形態像として

1) その初期の病像を臨床病理学的に追究する目的で、極めて初期の症例に検討を加えると共に、2) さらに増殖能の裏付けとして、乳頭腫および初期癌を材料に ^3H -Thymidine を in-vivo labeling, in-vitro labeling により Radio-autogram を作製して増殖能を有する標識細胞の分布部位、標識率、顆粒数などの諸点について検討を試み、次の結論を得た。

1) 乳頭腫は癌化の前段階ではあるが、直に癌と断定すべきでなく、乳頭腫なる名称は将来の発育に種々の可能性を含めての治療対策上必要なことで、この意味からすれば保存すべきである。

2) 乳頭状増殖を示す細胞集団では、 ^3H -Thymidine の標識細胞は基底細胞層には少く、中間層より上方に多く分布する。

3) 乳頭腫では、標識率は1～2%で基底細胞層およびそれよりやや上方に見られる。

4) 初期癌では、0.6～3.1%で、中間層の大型細胞に散在性に見られる。

5) 多発傾向例の乳頭状腫瘍細胞では、標識率は主腫瘍では10～20%に見られるが娘腫瘍では2～3%前後で、いずれも基底層には少く、中間層に多く見られる。

6) 以上のことから、初期膀胱癌ではその generation zone は基底層より上方にあることが知られた。

7) 普通染色標本で、ほぼ同一の細胞構成像の所見を呈する症例でも、甚だ標識率の高く、かつ、分布の広範囲な例が見られることは、generation zone の分布帯あるいはその活性化の変動のありうることを示すもので、このことから、従来乳頭腫あるいは乳頭状癌と考えられてきた症例の中には、あるいは発癌様式の別な型の癌があるのではないかということを考えさせられる。

8) 膀胱癌の Radioautography では in-vivo labeling はむしろ in-vitro labeling より生体に対してより实际的であり、良好な成績を示すものである。

(本研究は文部省科学研究費による)

(本論文の要旨は第24回日本癌学会総会および第53回日本泌尿器科学会総会にて口演した。)

摘筆するにあたり、御指導、御校閲をいただいた大村教授・大北助教授に深謝する。

文 献

- 1) Melicow, M. M. : J. Urol., **68** : 261, 1952.
- 2) Masina, F. : Brit. J. Urol., **24** : 344, 1952.
- 3) Hinman, F. : The principles and practice of Urology, W. B. Saunders, 1936.
- 4) Ash, J. E. : J. Urol., **44** : 135, 1940.
- 5) Dean, A. L. : J. Urol., **60** : 92, 1948.
- 6) Stirling, W. C. & Ash, J. E. : J. A. M. A., **141** : 1036, 1949.
- 7) Kretschmer, H. L. & Stika, E. A. : J. A. M. A., **141** : 1039, 1949.
- 8) Deming, C. L. : J. Urol., **63** : 815, 1950.
- 9) Marshall, V. F. : Cancer, **9** : 543, 1953.
- 10) 市川・辻・石井 : 日泌尿会誌, **44** : 180, 昭28.
- 11) 長谷川 : 日泌尿会誌, **46** : 296, 昭30.
- 12) 楠・伊藤・長谷川 : 臨床皮泌, **8** : 509, 昭29.
- 13) LaCassagne, A. & Lattes, J. : Compt. Rend. Soc. de Biologie, Paris, **90** : 487, 1924.
- 14) Hughes, W. L. et al. : Proc. Nat. Acad., **44** : 476, 1958.
- 15) Friedkin, M. et al. : J. Biol. Chem., **220** : 627, 1956.
- 16) Amano, M. et al. : J. Histochem. Cytochem., **7** : 153, 1959.
- 17) Hughes, W. L. : The kinetics of cell proliferation, 83, Grune & Stratton, New York-London, 1959.
- 18) 津屋・他 : 最新医学, **15** : 902, 昭35.
- 19) 大村・他 : 日泌尿会誌, **53** : 402, 昭37.
- 20) Kodak Data Sheet SC-10.
- 21) Royce, R. K. & Spjut, H. J. : J. Urol., **82** : 486, 1959.
- 22) Cole, J. W. & McKalen, A. : Gastroenterology, **41** : 122, 1961.
- 23) Cole, J. W. & McKalen, A. : Cancer, **16** : 998, 1963.
- 24) 神前・他 : 第23回日本癌学会総会記事, 昭39.
- 25) 原田・他 : 第23回日本癌学会総会記事, 昭39.

- 26) 田中・他：第23回日本癌学会総会記事，昭39.
- 27) 藤田：新細胞学，妹尾・高木編，朝倉書店，東京，昭40.
- 28) Veenema, R. J. et al. : Surg. Forum., **13** : 510, 1962.
- 29) Veenema, R. J. et al. : J. Urol., **90** : 736, 1963.
- 30) Büchner, F. : Büchner 教授日本講演記録，p. 138, 医歯薬出版，東京，1964.
- 31) 佐藤：日本内科学雑誌，**45** : 563, 昭31.
- 32) 佐藤：第20回日本癌学会特別講演，昭36.
- 33) 佐藤：第12回日本老年学会，シンポジウム，昭36.
- 34) 大江：日泌尿会誌，**50** : 813, 昭34.
- 35) Würst, G. : Geschwurstforsch., **16** : 324, 1960.
- 36) Burger, M. & Würst, G. : Münch. Med. Wschr., **101** : 1941, 1959.
- 37) 天野：診療，**15** : 24, 昭37.
- 38) Johanson, H. A. & Bond, V. P. : Cancer, **14** : 639, 1962.
- 39) Thomas, E. D. : The kinetics of celllural proliferation, 118, Grune & Stratton, New York-London, 1959.
- 40) Rubini, J. R. & Bond, V. P. Proc. 8th Congr. European Soc. Haem., **1** : 64, Karger, New York, 1962.
- 41) 谷口・他：日本血液学会雑誌，**26** : 442, 昭38.
- 42) Killman, A. et al. : Proc. 8th Congr. European Soc. Haem., **1** : 63, Karger, New York, 1962.
- 43) Gavosto, F. et al. : Nature, **187** : 611, 1960.
- 44) Hale, A. J. & Cooper, E. H. : Acta haematol., **29** : 257, 1963.
- 45) Lajtha, L. G. & Oliver, R. : Lab. Invest., **8** : 214, 1959.
- 46) Veenema, R. J. et al. : J. Urol., **93** : 202, 1965.

(1967年1月21日特別掲載受付)

尿石症の内科的治療に

テルペン製剤による内服根本療法

- 尿路平滑筋の痙れん 緊張を緩解して疼痛を除き、管口を拡大して石の排出を促進します。
- 血行を促進して腎機能を賦活、利尿作用を示します。
- 抗菌作用、消炎作用で尿路を浄化し感染症を除きます。
- 尿中の保護膠質を増して安定化し、結石生成を原因的に防止します。

《健保採用》

液	1 ml	173円00
カプセル	1 球	27円50

— 文献謹呈 —



西独ロワ・ワクナー社製

ロワチン

(包装) : (液) 5ml 10ml / (カプセル) 30球 100球 500球



扶桑薬品工業株式会社

大阪市東区道修町2の50