

膀胱癌の動物モデル —抗癌剤効果判定試験へのアプローチ—

名古屋市立大学医学部第一病理学教室（主任：伊東信行教授）

福島 昭 治

ANIMAL MODELS OF BLADDER CANCER

Shoji FUKUSHIMA

*From the First Department of Pathology, Nagoya City University Medical School
(Director: Prof. N. Ito)*

Treatment with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) or N-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine (EHBN) in the drinking water induces bladder cancer of rats or mice with high incidence. Induced bladder cancers of rats are mostly papillary, non-invasive type, whereas those of mice are non-papillary, invasive type. Histologically, most of BBN-induced bladder cancers are transitional cell carcinoma in both rats and mice. On the other hand, the incidences of squamous cell carcinoma increased in cases of mice, especially in mice treated with EHBN. Metastases and invasions of bladder cancers are more common in mice than in rats. There are strain and species differences in the bladder response to BBN and EHBN. In addition, a putative preneoplastic lesion, papillary or nodular hyperplasia of the epithelium is a good marker for early detection of bladder cancer development.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1923-1927, 1988)

Key words: Bladder cancer, Animal model, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, N-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine

1964年 Druckery ら¹⁾は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、N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) の経口投与によりラットの膀胱に選択的に癌を発生させることを見出した。一方、Bryan ら²⁾は1967年頃よりニトロフラン系化合物の誘導体の発癌性を検索し、そのうち N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide (FANFT) の経口投与がラット膀胱に選択的に発癌性を発揮することを見出した。これらの事実を契機として実験的膀胱癌に関する研究が飛躍的に進展し、今日に至っている。

ここでは、膀胱癌に対する抗癌剤の効果を基礎的に *in vivo* の立場から追究するにあたり、必要な実験的膀胱癌の病理学的特徴をラットとマウスのそれを中心にする。

膀胱発癌物質

BBN (Fig. 1) は代表的な膀胱発癌物質の一つで、これを用いた膀胱癌の研究が広範に進められ、ヒト膀胱癌モデルとしてラット、マウスのみならずイスにお

いても多用されている³⁾。BBN の中間代謝産物である N-butyl-(3-carboxypropyl) nitrosamine (BCPN) もラットやマウスの膀胱癌を発生させ得る⁴⁾。また、BBN のブチル基をエチル基に置き換えた N-ethyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (EHBN) (Fig. 1) もラットやマウス膀胱に選択的に発癌性を発揮し、しかも、BBN より強力である。

FANFT (Fig. 1) の発癌性は BBN よりやや弱いが、それでも比較的短期間に、しかも高率に膀胱癌を発生させることができる。その他、N-methyl-N-nitrosourea (MNU) をはじめとして 2-acetylaminofluorene (2-AAF), N,N-dibutyl nitrosamine などが発癌実験に用いられている。

投与方法

BBN は通常 0.01~0.05% の濃度の飲料水として遮蔽給水瓶にて動物に自由摂取させる方法が一般的である。Tween 80 をそれに少量添加する。0.05% BBN を 12 週投与し、40 週まで観察すれば、100% に癌が発生する。FANFT は通常 0.2% の濃度で、2-AAF は

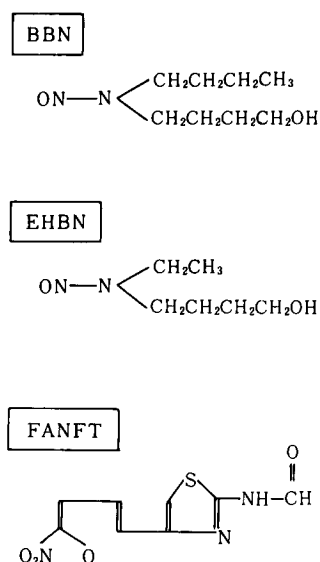


Fig. 1. BBN, EHBN と FANFT の化学構造式

0.02%の割合で粉末飼料に混ぜ、ラットに投与する。Hicks ら⁶⁾は、MNU を経尿道的に膀胱内に注入する方法を用いている。しかし、この方法は注入による膀胱刺激と炎症の発生など副次的要因をもたらす場合がある。

投与量、投与期間と癌発生

BBN によるラットおよびマウス膀胱癌発生と投与濃度ならびに投与期間との間に明瞭な相関関係が認め

られる⁶⁾ (Fig. 2)。このことは FANFT⁷⁾ による膀胱癌の場合も同様である。

また、ラットに低濃度の BBN を2年間経口投与した実験においても乳頭腫を含む膀胱腫瘍の発生には明らかな BBN の用量相関がみられ、5 ppm で膀胱癌が、1 ppm という低濃度でさえ乳頭腫の発生がみられている⁷⁾。

膀胱癌の肉眼像

1) ラット膀胱癌

BBN により発生する腫瘍は多発性である。しかし、低濃度の場合には単発性のことが多い。腫瘍は一般に内腔への増殖を主体とする乳頭状腫瘍で、ヒトの乳頭状・非浸潤型に一致する (Fig. 3)。大半の移行上皮癌はこの型を取り、ヒトの表在性膀胱癌のよいモデルとなる。癌は次第に膀胱内腔を占拠するまで発育し、最終的に乳頭状・浸潤型 (PIT) となる。壁内への浸潤性増殖を主体とする非乳頭状・浸潤型 (NIT) はラットでは比較的少ない。組織学的に移行上皮癌の一部と扁平上皮癌はこの型を取り、膀胱壁は高度に肥厚し、周囲組織に浸潤性増殖を示す。内反型 (IT) が比較的良好にみられるのも実験膀胱癌の特徴である。EHBN, BCPN, FANFT などによる膀胱癌も BBN のそれと同様であるが、EHBN の場合には PIT と NIT のタイプがより目立つ傾向にある。一般にラット膀胱癌の転移はまれである。

2) マウス膀胱癌

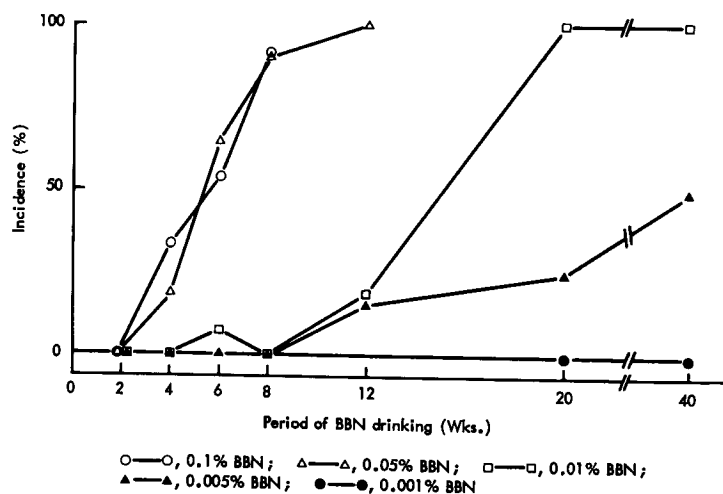


Fig. 2. ラット膀胱癌の発生と BBN の投与量、投与期間との関連
Wistar 系雄ラットに種々の濃度の BBN を投与期間を変えて投与し、実験開始40週後における膀胱癌の発生頻度を示す。



Fig. 3. ラット BBN 膀胱癌；乳頭状・非浸潤型



Fig. 4. マウス EHBN 膀胱癌；非乳頭状・浸潤型

BBN により発生するマウス膀胱癌の発育様式は移行上皮癌でも NIT が最も多い (Fig. 4)。しかも、大谷ら⁹⁾は種々の濃度の BBN を投与しても、発生する癌の発育様式のひとつが NIT であることを報告しており、ヒトの浸潤性膀胱癌のよいモデルとなろう。乳頭状癌も発生するが浸潤癌、すなわち、PIT がラットのそれに比較して多い。また、周囲組織や所属リンパ節への転移がしばしば認められる。

EHBN の場合でも NIT や PIT のタイプが多く、血行性転移ならびに播種も出現する。

膀胱癌の組織像

BBN によるラット膀胱癌の95%は移行上皮癌である⁹⁾ (Table 1)。ヒト膀胱癌とほぼ同様の組織像を示し、組織学的異型度に従って三つに分類することができる。Table 1 のごとく、移行上皮癌では Grade 2 が主体をなしている。さらに、内反性移行上皮癌がヒトの膀胱癌に比較してラットでは多くみられる。その他、扁平上皮癌、未分化癌などが出現する。また、ラット膀胱癌の組織像と癌の組織学的深達度との関連を調べてみると、移行上皮癌の約65%は非浸潤癌であるのに対し、扁平上皮癌では70%、未分化癌ではそのすべてが浸潤癌である。EHBN によるラット膀胱癌では BBN によるそれと比較して、扁平上皮癌が多く

Table 1. ラット BBN 膀胱癌 (611例) の組織像と組織学的異型度との相関関係

病理組織分類	動物数 (%)	組織学的異型度 (%)		
		Grade 1	Grade 2	Grade 3
移行上皮癌	583 (95.4)	136 (23.3)	322 (55.2)	125 (21.5)
扁平上皮癌	20 (3.3)	4 (20)	4 (20)	12 (60)
未分化癌	6 (1.0)	0 —	0 —	6 (100)
癌肉腫	2 (0.3)	0 —	1 (50)	1 (50)

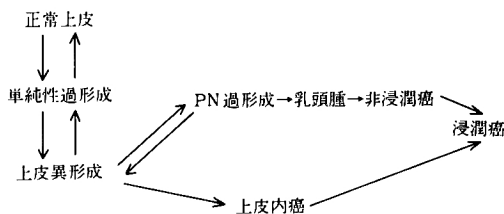


Fig. 5. 実験膀胱癌の組織発生

発生し、浸潤性増殖が強いのを特徴とする。FANFT の膀胱癌は BBN のそれに類似する。

マウスの BBN 膀胱癌は異型性に富む grade 3 の移行上皮癌と扁平上皮癌が主体である。これに対し、EHBN によって発生する膀胱癌の組織像は移行上皮癌と扁平上皮癌の比率が1 : 2と圧倒的に扁平上皮癌が多い。BBN, EHBN によるマウス移行上皮癌、扁平上皮癌、特に扁平上皮癌は浸潤傾向が強く、周囲組織への浸潤を伴った悪性度の高い浸潤癌である。

BBN による膀胱粘膜病変と組織発生

BBN を投与すると正常粘膜はびまん性に肥厚し (単純性過形成, simple hyperplasia)¹⁰⁾、この中には上皮異形成 (dysplasia) と呼ばれる病変がある。乳頭状ないし結節状過形成 (PN 過形成, papillary or nodular hyperplasia) は肥厚・増殖した移行上皮が血管結合組織の新生を伴って内腔に向って乳頭状に発育したり、また、粘膜下に結節状に増殖したものである。この PN 過形成の大部分は異型性を伴っている。乳頭腫 (papilloma) は上皮の乳頭状発育が著明で、異型性が比較的乏しいものをいい、移行上皮癌では細胞異型と構造異型が明らかで、しばしば多数の核分裂像を認める。

実験膀胱癌の組織発生として Fig. 5 のごとくの経路がラットやマウスを用いた研究で明らかにされている^{3, 8, 19)}。ラットでは単純性過形成から上皮異形成、PN 過形成を経て乳頭腫から乳頭状・非浸潤型の移行上皮癌となり、やがて浸潤癌へと移行する経路がほと

んどである。これに対し、マウスでは単純性過形成から上皮異形成を経て、上皮内癌が発生し、それが比較的容易に浸潤癌、すなわち、非乳頭状浸潤癌に移行するものが主体であると考えられている。また、PN 過形成から乳頭状非浸潤癌となり、最終的に乳頭状の浸潤癌になるタイプもみられる。

前癌病変

前述の PN 過形成のなかには発癌要因の消失により正常に復帰するもの（可逆性変化）と、不可逆性で、発癌要因の消失後も引き続き進行し、癌へ移行するもの（不可逆性変化）が存在する。BBN 投与により出現する PN 過形成はしばしば癌に移行し^{3,10)}、前癌病変として重要な変化であると認識されている。走査電顕的に膀胱癌の表層構造とまったく同様の microvilli や microridges が PN 過形成の表面にみられる。

この前癌病変の研究には二つの意義がある。その一つは、臨床に役立つ情報を癌が発生する前に一刻も早く教えてくれることである。もう一つは、前癌病変を利用して環境中の発癌物質を早期に検出できることである。従って、このものを判定の指標とすることによって、発癌性試験の短期化を図ることができよう。現在、発癌の2段階説に基づいて環境中の膀胱発癌物質ないしプロモーターを検出する試みがなされている。その際、PN 過形成という前癌病変をマーカーとすることで、比較的短期間に種々の発癌物質ないしプロモーターが見い出されているので、発癌要因の検出に大いに寄与している。

系統差

BBN による膀胱癌の発生にラットの系統によって著しい差が認められる。血清中にアルブミンを含まない無アルブミンラット；NAR [Sprague-Dawley (SD) ラットを起源] と SD ラットにおける BBN 膀胱癌の発生を比較すると NAR は SD よりも BBN に対して著しく感受性が高い¹¹⁾。中野渡ら¹²⁾も F344, Wistar, ACI, SD および NAR などのラット系統の BBN に対する感受性を検索したところ、Table 2 のごとく、NAR と ACI、とくに NAR では膀胱癌が最も高率に発生したが、SD ラットでは低く、F344 と Wistar ラットでは最も低い感受性を示した。しかも、NAR に発生した膀胱癌は ACI のものよりも一段と大きく、浸潤性発育も高度で、より悪性傾向の強いものであった。また、FANFT でも F344 ラットより SD ラットの方が高感受性で、浸潤性発育が早期

Table 2. BBN による膀胱病変発生に対するラット系統差

系統	動物数	膀胱病変 (%)			癌の面積 (mm ²)
		PN過形成	乳頭癌	癌	
F344	26	19 (73)	15 (57.7)	1 (3.8)	10
Wistar	25	18 (72)	18 (72)	0 (0)	—
ACI	26	25 (96.2)	21 (80.8)	18 (69.2)	35±34
SD	25	20 (80)	16 (64)	5 (20)	66±48
NAR	17	17 (100)	17 (100)	15 (88.2)	138±84

に出現する。このように他の臓器発癌と同様膀胱癌の発生、進展に明らかなラット系統差が認められている。

一方、大谷ら¹³⁾はマウス膀胱癌発生に関する系統差を調べたところ、一部の系を除いてその発生率、発育様式にほとんど差を認めなかったと報告している。しかし、最近、われわれは B6C3F₁ とヌードマウスを用いて EHBN 膀胱癌を比較したところ、B6C3F₁ に比較してヌードマウスの著しい低感受性を見い出し、マウスの発癌性についてもラットと同様のことが言えよう。今後さらに詳細な検討が待たれる。

種差

BBN による膀胱癌の発生をラット、マウス、ハムスターおよびモルモットで比較してみると、ラットとマウスが BBN に対してほぼ同様の感受性を示し、同頻度の腫瘍発生を示すのに対し、ハムスターでは BBN による膀胱癌発生頻度はきわめて低く、モルモットではまったく腫瘍が発生しない¹⁴⁾。FANFT や 2-AAF でもハムスターは低感受性である。ただし、ハムスターに発育した癌は浸潤性発育を示す傾向が強くみられる。

性差

BBN や FANFT では明らかなラット雌雄差は認められず⁶⁾、目的とする発癌実験によって雄雌の選択ができる。

結 語

ラットとマウスにおける実験的膀胱癌についての知見、とくに病理学的知見を要約した。これらのことを十分に認識した上、抗癌剤の *in vivo* スクリーニングの一手段として、膀胱癌の動物モデルが用いられることが期待される。また、岡島ら¹⁵⁾はイフにおいてヒト

に類似する種々のタイプの膀胱癌を作成しており、動物数、実験期間などにやや問題があるにせよ、基礎的な抗癌剤効果判定に利用する価値があると思われる。

文 献

- 1) Druckrey H, Preussmann R, Ivankovic S and Schmähl: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl und N-Butyl-N-butanol(4)-nitrosamine. *Z Krebsforsch* **66**: 280-290, 1964
- 2) Ertürk E, Cohen SM, Price JM and Bryan GT: Pathogenesis, histology, and transplantability of urinary bladder carcinomas induced in albino rats oral administration of N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide. *Cancer Res* **29**: 2219-2228, 1969
- 3) Ito N, Hiasa Y, Tamani A and Okajima E: Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* **60**: 401-410, 1969
- 4) Okada M, Suzuki E, Aoki J, Iiyoshi M and Hashimoto Y: Metabolism and carcinogenicity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine and related compounds, with special reference to induction of urinary bladder tumors. *Gann Monograph* **17**: 161-176, 1975
- 5) Hicks RM, Wakefield JStJ: Rapid induction of bladder cancer in rats with N-methyl-N-nitrosourea. I *Histology Chem Biol Interact* **5**: 139-152, 1972
- 6) Ito N, Arai M, Sugihara S, Hirao K, Makiura S, Matayoshi K and Denda A: Experimental urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Gann Monograph* **17**: 367-381, 1975
- 7) Ito N, Shirai T, Fukushima S and Hirose M: Dose-response study of urinary bladder carcinogenesis in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *J Cancer Res Clin Oncol* **108**: 169-173, 1984
- 8) Ohtani M, Kakizoe T, Nishio Y, 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
- 9) Fukushima S, Murasaki G, Hirose M, Nakanishi K, Hasegawa R and Ito N: Histological classification of urinary bladder cancers in rats induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* **67**: 81-90, 1976
- 10) Fukushima S, Murasaki G, Hirose M, Nakanishi K, Hasegawa R and Ito N: Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Acta Pathol Jpn* **32**: 243-250, 1982
- 11) Kakizoe T, Komatsu H, Honma Y, Niijima T, Kawachi T, Sugimura T and Nagase S: High susceptibility of analbuminaemic rats to induced bladder cancer. *Br J Cancer* **45**: 474-476, 1982
- 12) Nakanowatari J, Fukushima S, Imaida K, Ito N and Nagase S: Strain differences in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine bladder carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res (Gann)* **79**: 453-459, 1988
- 13) Ohtani M, Kakizoe T, Fukushima S et al.: 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
- 14) Hirose M, Fukushima S, Hananouchi M, Shirai T, Ogiso T, Takahashi M and Ito N: Different susceptibilities of the urinary bladder epithelium of animal species to three nitroso compounds. *Gann* **67**: 175-189, 1976
- 15) Okajima E, Hiramatsu T, Hirao K, Ijuin M, Hirao Y, Babaya K, Ikuma S, Ohara S, Shimoi T, Hijioka T and Ohishi H: Urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in dogs. *Cancer Res* **41**: 958-1966, 1981

(1988年7月25日受付)