近交系 ACI/N ラット移植膀胱腫瘍ならびに 組織培養における化学療法の検討

徳島大学泌尿器科学教室 横 田 武 彦
(主任: 黒川一男教授) 香 川 征

EXPERIMENTAL STUDIES ON EFFECTS OF CARCINOSTATIC AGENTS

Takehiko Yokota and Susumu Kagawa

Department of Urology, University of Tokushima, School of Medicine, Tokushima

(Director: Prof. K. Kurokawa)

Transitional cell carcinomas were produced in the urinary bladder of ACI/N rats by oral administration of N-butyl-N-butanol (4) nitrosamine (BBN). The cells of these carcinomas can multiply in vitro and are iso-transplantable into the urinary bladder. The effect of carcinostatic agents such as mitomycin-C (MMC), triethylen thiophosphoramidate (Thio-TEPA), bleomycin (BLM) and cytosine-arabincide (CA) were tested against these cancer cells in vivo and in vitro.

1. In vivo study

From the 4th day after inoculation of cells into the bladder wall of rats, 0.2 or 0.05 mg of MMC, 1.0 or 0.1 mg of Thio-TEPA, 1.5 mg of BLM, 0.5 mg of CA and 0.05 mg of MMC combined with 0.5 mg of CA were injected intravenously 4 times at 2 day-intervals. Rats were killed on the 12th day from the last inoculation and carcinomas of bladder were weighted and examined histologically. Rats given 1.0 mg of Thio-TEPA died from side effects prior to the last injection. Some inhibitory effects were seen in all carcinostatic agents except BLM, but complete inhibition of development of carcinomas of the bladder was seen in none of them. Combined therapy of MMC and CA showed synergistic effect.

2. In vitro study

Mitomycin-C was the most effective and the next was Thio-TEPA. They showed a complete inhibition. However, no complete inhibition was seen in BLM or CA even at a high concentration. Synergistic effect of combination of MMC and CA was observed as in vivo.

緒 言

膀胱腫瘍に対する各種実験を行うためには、その腫瘍が常に容易に供給される必要がある。共同研究者の野田等は N-butyl-N-butanol (4) nitrosamine (BBN) により近交系 ACI/N ラットに膀胱腫瘍を発生せしめ、その腫瘍が同系ラットに容易に移植可能であることを報告している¹⁾。今回われわれは、その一株である移行上皮癌 BC-35 を用いて抗癌剤の効果を in vitro, in vivo において検討したので報告する。

実験材料ならびに実験方法

ACI/N 系ラットからとりだした腫瘍塊を細切し、約 1 ml をラットの皮下あるいは腹腔内に移植し継代する。また組織培養を行うには 0.5% trypsin 処理を行

い細胞を採集し、15~20%, calf serum+Eagle 液にて Loux 瓶を密栓し 37°C 恒温槽にて静置し、組織培養を行う (CO₂ 培養器は使用しなかつた)。

培養瓶一面に増殖した時期に 0.2% trypsin + 0.02% EDTA の等量混液にて処理を行い、これを遠沈して細胞をとり継代培養する (Fig. 1)。

実験 1

組織培養中の BC-35 を 0.2% trypsin + 0.02% EDTA の等量混合液にて処理し細胞浮遊液を作成し、この浮遊液中の細胞数を血球計算盤を用いて算定する。算定の際、死細胞と思われるものは除外した。この浮遊液を遠沈し注射器において 2×10^6 個 (約 0.05 ~ 0.025 ml) を 150 g 前後の近交系 ACI/N ラット膀胱壁内に移植

Fig. 1 実験材料と実験方法

し、移植後4日目より隔日に4回抗癌剤を尾静脈より注射し移植後12日目に屠殺、膀胱をホルマリン固定ののち腫瘍重量を測定した。使用抗癌剤は、thio-TEPA (以下TEPAと略す)、bleomycin (以下BLMと略す)、mitomycin C (以下MMCと略す)、cytosine arabinocide (以下CAと略す)の4者を用い、1回投与量はTEPAは1mgと0.1mg、BLMは1.5mg、MMCは0.2mgと0.05mg、CAは0.5mgとし、CAの併用効果をみるためMMC 0.05mgとCA 0.5mgの併用群をつくつた。また腫瘍重量測定ののち簡単な組織学的検索も行つた。

実験2

実験1と同様に細胞数を算定し calf-serum+Eagle 液にて稀釈し、 1×10^4 個/2.5ml の細胞浮遊液を作成する。この液を3ml用 Earle 瓶の TD-Flask に2.5ml ずつ分注し密栓して37°C、24時間培養後、Eagle 液で対数稀釈した各種濃度抗癌剤 0.5ml を追加する。各種濃度および control 群を10本ずつ作成した。2時間後、抗癌剤含有培養液をすて、あらためて calf-serum+eagle 液で1回洗浄ののち同液を3ml いれ、48時間培養し培養瓶に生じた4分裂以上の colony 数を求めた。また同様に2分裂した細胞数を求めてみた。

成績

実験1における成績は Table 1 に示した。表中の投与量は1回投与量で示してある。抗癌剤の投与による腫瘍の完全消失は1匹も認められなかつた。MMC 0.2mg 投与群 (Fig. 2)、TEPA 1mg 投与群では、いずれも著明な腫瘍の発育抑制効果を認めたが、副作用がめだち、特に、TEPA 1mg 投与群では4回目の投与をまたず全例死亡した。

MMC+CA の併用群では、それぞれ単独投与群と比較し有効であつた。BLM は control 群と肉眼的に大差なく推計学的にも有意差は認められなかつた。

Table 1

Carcinostatic Agents	Dose (mg)	No. (mg)	Weight of Tumor (mg)
MMC	0.2	5	49.8±1.52
MMC	0.05	4	88.6±8.56
TEPA	1.0	3*	13.9±4.06
TEPA	0.1	3	51.3±4.33
BLM	1.5	3	119.6±34.7
CA	0.5	3	83.9±12.67
MMC+CA	0.05+0.5	5	61.4±2.41
Control		7	172.7±22.7

* died from side effects prior to the last injections

抗癌剤非投与群 (Fig. 3) の腫瘍重量は4日目45.1mg±2.35mg、6日目79.8±5.25mg、12日目172.7±22.7mg となつた。

組織学的所見は BLM では、多くの点で control 群と類似していた。抗癌剤の種類と組織学的所見との間には lymphocyte の浸潤以外、特別な変化はなかつた。リンパ球の浸潤をみると MMC 0.05mg 投与群が最も著明で (Fig. 4) 腫瘍中心部にも辺縁部にも高度にみられた。MMC+CA 併用群がこれにつぎ、TEPA 1mg 投与群では、リンパ球浸潤例はほとんどみられなかつた (Fig. 5)。

実験2の成績を Table 2, 3 にしめた。Table 2 は MMC における 1 cm^2 あたりの平均 colony 数を各濃度ごとにプロットしたものである。MMC では $10/3 \mu\text{g/ml}$ で全く colony をつくりず $1/3 \mu\text{g/ml}$ でわずかに生じ $0.01/3 \mu\text{g/ml}$ で control と有意差がみられなくなつた。

Table 3 は control の平均 colony 数を100%とし、各濃度ごとに10本の平均 colony 数の百分率をもとめてグラフにしたものである。control 群は毎実験ごとに作成した。

Fig. 2 MMC 0.2mg投与例

Fig. 4 MMC 0.05mg投与例 (H.E 染色) リンパ球浸潤が著明 ($\times 50$)

Fig. 3 control (移植後12日目)

Fig. 5 Thio-TEPA 1 mg投与例 (H.E 染色) リンパ球浸潤を認めない. ($\times 100$)

Table 2 MMC濃度と colony 数

Table 3 抗癌剤による発育阻止曲線

4 分裂を完全に阻止した濃度は TEPA 1000/3 μ g/ml, MMC 10/3 μ g/ml であつたが, BLM は 7500/3 μ g/ml で 9%, CA は 1000/3 μ g/ml で 3% の colony を生じた.

control 群と同じ程度に増殖した濃度、すなわち無効濃度は TEPA および MMC が $0.01/3\mu\text{g/ml}$, CA が $10/3\mu\text{g/ml}$ であつた。BLM は $10/3\mu\text{g/ml}$ で 79% の colony を生じた。MMC と CA を 1 : 10 の割合で併用すると MMC 濃度で分裂阻止が $1/3\mu\text{g/ml}$, 無効濃度が $0.001/3\mu\text{g/ml}$ となり, MMC 単独投与より一段階効果をしめし, 併用効果を認めた。

TEPA では $1/3 \mu\text{g/ml}$ よりも $0.1/3 \mu\text{g/ml}$ のほうが効果を示すという逆の現象がみられた。3回の追試で、いずれも同様の現象がみられたが、これがいかなる理由によるものかが不明である。

なお、各抗癌剤とも1時間 incubate したのみでは2時間 incubate したもののよりも1~2段階効果が悪く MMC+CA の併用効果もみられなかつた。また2分裂した細胞数と抗癌剤濃度についても検討してみた。4分裂完全阻止濃度あるいはそれより1段階高濃度では2分裂はほとんどおこらなかつた。これより低濃度のものでは、2分裂がみとめられるが、その数と抗癌剤濃度との間には一定の関係はみとめられなかつた。

考 案

抗癌剤の効果を検討する方法はいろいろ行われているが in vivo では担癌動物に抗癌剤を投与し、腫瘍の増殖抑制あるいは縮小効果を重量測定により判定するのが簡単であるが、腫瘍が単一固形である必要がある。もちろん担癌動物の癌が人癌のモデルとして適当であらねばならない。膀胱癌の実験モデルを使い化学療法の検討は、菅原²⁾の報告がみられるが、これは実験材料として腹水腫瘍 AH130 を用いている点、膀胱壁内移植は組織片を用いている点でわれわれと異っている。われわれは実験方法の項でのべたように膀胱原発の腫瘍を用い、また腫瘍塊でなく、細胞を膀胱壁に移植した。われわれと同じモデルを使い膀胱腫瘍に対する化学療法の検討は、橋本³⁾の報告にみられる。彼らと異なる点は、移植系腫瘍をトリプシン消化をして膀胱壁内に移植しているが、われわれは組織培養を行つた細胞を用い移植している点である。

一方、in vivo では、器官培養や組織培養を行い、これに抗癌剤を接触させ、細胞数や核酸を定量し、効果を見る方法が行われているが³⁾、やや手技が繁雑となる。

著者らは、実験方法の項でのべたように、in vivo における重量法と in vitro における組織培養で細胞数の定量から抗癌剤の効果を検討した。この方法では抗癌剤の宿主側因子の影響等をみることもできるし、また抗癌剤単独の影響をもみることができる。

癌細胞の選択であるが、著者らは、BBN により近交系 ACI/N ラット発生させた膀胱腫瘍の1つである BC-35 を用いた。この腫瘍はラットに容易に移植可能であるし、発育も早く、また組織培養も容易に行えるので実験材料としてすぐれている。

in vivo において、抗癌剤は BLM が無効に近いこと

は膀胱腫瘍の実験材料として適当であるといえる。

MMC+CA 併用群では、MMC 0.05mg 単独投与群と同様著明な副作用も認めず、in vivo, in vitro、ともに併用効果を認めた。MMC は、一度細胞内に摂取されてから酵素によって還元をうけ、不安定な活性中間代謝物となつて DNA と結合する⁴⁾。

一方、CA は CA の triphosphate による DNA polymerase レベルで阻害するといわれ⁵⁾阻害部位が異なることによる効果を認めたのではないかと想像している。一方、橋本³⁾らは、膀胱内注入により BC-47 に対する化学療法の検討を行い、MMC が最も有効であつたとのべている。また、in vitro の実験で、トリチウム-ウリジンによる50%標的細胞破壊効果をみているが、これは BC-35 では、MMC が最も有効であり、われわれと同結果である。

組織学的にみるとリンパ球浸潤は MMC 0.05mg に強く MMC+CA がこれにつづき TEPA 1mg, MMC 0.2mg にはほとんど認められなかつた。

リンパ球浸潤を認めなかつた群は副作用が強かつた群であり、腫瘍縮小は著明なるも生体には相当強い damage をあたえているものと思われる。このことは担癌宿主のもつているリンパ球を主体とする細胞性免疫(抗腫瘍性)に関与しているかもしれない防禦機構をそこなつていないのではないだろうか。

生体においては、宿主の抗腫瘍性をそこなうことなく抗癌剤の投与量決定を行うことがのぞましい。あたりまえのことであるが抗腫瘍性をそこなわず腫瘍縮小効果のある抗癌剤の開発がのぞまれる。われわれは、この点について種々の抗癌剤を検討中である。

われわれは、この実験系が in vivo, in vitro とともに比較的容易に膀胱腫瘍の実験材料として使用できることを強調したい。

結 語

A : in vivo

- 1) 抗癌剤投与により腫瘍の完全消失は認めなかつた。
- 2) 著明な縮小をみとめたものは副作用がつよく途中で死亡した。
- 3) BLM は無効に近かつた。
- 4) 併用療法 (MMC+CA) はそれぞれの単独投与より腫瘍縮小効果をみとめた。

B : in vitro

- 1) MMC が最も有効であつた。

2) *in vivo* と同様併用効果を認めたが、1時間の接触では効果を認めなかった。

3) BLM, CA は、それぞれ相当高濃度にも完全阻止はできなかった。

C:

これらの実験等は膀胱腫瘍モデルとして種々の実験に適している。

(稿をおえるにあたり御助言、御指導をたまわった東京生化学研究所橋本嘉幸先生ならびに高松市民病院泌尿器科野田益弘先生に深謝します。また本論文の要旨は第62回日本泌尿器科学会総会にて発表した。なお、本研究は文部省科学研究費(課題番号967114)の援助を受けた

ことを付記する。

文 献

- 1) 野田益弘, 橋本嘉幸: 日泌尿会誌, 64: 397, 1973.
- 2) 菅原奎二: 日泌尿会誌, 61: 1058, 1970.
- 3) 橋本嘉幸, 北川恒代, 鈴木一喜: 日本癌学会記事, 第31回, 152, 1972.
- 4) W.E. Pricer, Jr., and Weissbach: *Biochemistry*, 4: 200, 1965.
- 5) Akira Inagaki, Toru Nakamura and Gyoichi Wakisaka: *Cancer Reserch*, 29: 2169, 1969.

(1975年1月6日受付)