膀胱内ブレオマイシン注入療法およびブレオマイシン加温 水灌流療法後の膀胱腫瘍の光顕的, 電顕的变化

森 山 信 男
伊 藤 一 元
自衛隊中央病院泌尿器科

LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPIC CHANGES IN BLADDER TUMOR CELLS AFTER INTRAVESICAL INSTILLATION AND HYPERTHERMIC VESICAL IRRIGATION OF BLEOMYCIN

Nobuo Moriyama and Kazumoto Ito

Department of Urology, The Self-Defence Forces Central Hospital

The light and electron microscopic changes were studied in ten cases of bladder tumor before and after hyperthermic vesical irrigation of bleomycin. Three of the 10 cases were previously treated by intravesical instillation of bleomycin. These specimens were also studied. Clinically hyperthermic vesical irrigation of bleomycin caused tumor disappearance in 4 cases, tumor decrease in 4 and no change in 2. The tumors recurred in 2 of 4 cases with complete disappearance.

Ultrastructural changes of the tumor cells in intravesical instillation and hyperthermic irrigation of bleomycin were essentially similar. The changes, however, were more striking in the latter therapy. Ultrastructural changes of the well differentiated tumors after treatment were as follows: The cell appeared swollen and cytoplasmic matrix became electron lucent with a decrease of cytoplasmic organelles especially of rough endoplasmic reticulum and of Golgi apparatuses. The swollen mitochondria and vesicles of various sizes were scattered. Nuclear matrix became electron lucent and a decrease of chromatin granules was apparent. The nucleolus either disappeared or enlarged with prominent reticular nucleolonema. Enlarged nuclear bodies were also observed. There were cells with an increased number of lysosomes and bundles of microfilaments. The cells with very dense cytoplasm and nucleus were often encountered and considered as degenerating cells. Intercellular spaces appeared to be dilated and the separation of tumor cells became evident. Bleb formations were observed at the free cell surfaces. When a tumor grossly disappeared after treatment, TUR of bladder mucosa was performed in the area of the original tumor site. The luminal cell surfaces in these regions failed to show the scaphoid plaques of asymmetric unit membranes, which featured the normal vesical superficial cells. One poorly differentiated tumor did not respond to the treatment, although similar ultrastructural changes were observed.

The results indicated that hyperthermic vesical irrigation of bleomycin induced a condensation and degeneration of the tumor cells. The suggested mechanism of tumor reduction was clinically supported by the fact that the treatment was effective in small papillary tumors less than 10 mm in diameter.

要旨: 膀胱腫瘍患者10例に膀胱内ブレオマイシン加温水灌流療法(温水ブレオ療法)を施行し, 治療前後に腫瘍を生検し, その光顕的, 電顕的变化を検索した。内視鏡による臨床効果は腫瘍消失4例, 縮小4例, 無効2例であった。内3例は以前に膀胱内ブレオマイシン注入療法(ブレオ注入療法)が施行されており, 全例腫瘍の縮小をみているが, その時の電顕的变化も本研究に含めた。

温水ブレオ療法およびブレオ注入療法後の電顕的变化は程度の差はあるが, 質的にはほぼ同様であった。細胞体は膨化し, 電子密度が低下した。細胞内小器官, とくに粗面小胞体やゴルジ装置は減少し, 膨化したミトコンドリアや空胞状小器官が胞体内に散見された。ライソゾームや微細線維束は増加していた。核のクロマチン

ン顆粒が減少し、核質が明るくなり、核小体は消失するか、逆に腫大を示した◎○仁糸 (nucleolonema) は主に線維成分からなり網状に発達していた。腫大した nuclear body もみられた。濃縮した胞体・核をもつた細胞も散見された。細胞間隙は拡大し、細胞の剝離もみられた。bleb 形成が細胞の遊離表面に存在した。低分化型腫瘍では治療後の腫瘍細胞の電顕的变化は同様であつたが、臨床的には無効であつた。温水ブレオ療法による腫瘍の縮小は、腫瘍細胞の退行性変性と剝離によるものと推定された。これは本治療法が径10mm 以下の小乳頭状腫瘍に有効であるという臨床的経験に一致する。

結 言

最近膀胱腫瘍の治療に抗癌剤の膀胱内注入療法、膀胱の温水灌流療法、さらに灌流水に化学療法剤を添加するなどの工夫が行なわれ、表在性、多発性、再発性腫瘍ですぐれた臨床的効果が報告されている^{1)~3)}。またその際の電顕的变化も若干報告されている⁴⁾⁵⁾。われわれは今回、膀胱内ブレオマイシン加温水灌流療法(以下温水ブレオ療法と略す)を10例に施行し、それらの変化を光顕的、電顕的に観察した。またこのうち3例は以前に膀胱内ブレオマイシン注入療法(以下ブレオ注入療法と略す)を施行したが、その時の形態学的変化も調べたので、その所見と比較検討した。

症例の概要と方法

ブレオ注入療法は3例(症例2, 4, 5)に行なつた。方法はブレオマイシン(以下ブレオと略す)30mgを生理食塩水40mgに溶解し、これを膀胱内に2時間注入留置した。15分ごとに仰位、右側臥、腹臥、左側臥位と体位変換を行なつた。週2回、計10回(1クール)注入したが3例とも腫瘍の縮小を認めたにすぎず、次の機

会に温水ブレオ療法を行なつた。

温水ブレオ療法は10例(症例1~10)に行なつた。方法は膀胱内に3ways catheterを留置して、ブレオ90mgを生理食塩水400mlに溶解し、自動温水灌流装置(Bionix Feeder, 杉山元医理器)を用いて灌流した。膀胱内注入温度は45~46°C、流出温度は40~43°Cにセットし、毎時2lの流量で1時間灌流し、隔日に10回施行して1クールとした。腫瘍多発例では15分ごとにブレオ注入療法時と同様の体位変換を行なつた。1~2クール施行後残存腫瘍に対し手術療法を施行した。その内容はTUR-Bt 5例、膀胱全摘1例である。

症例の概要は表1に示した。年齢は43歳から70歳までである。腫瘍の分類はTNM分類によつた。G1, G2を高分化型、G3を低分化型とした。高分化型は9例で、うち再発例は5例であつた。低分化型は1例で、これは再発例であつた。

臨床効果は膀胱鏡による観察で判定した。10例中4例消失、4例縮小、2例無効であつた。無効例は低分化型で深層まで浸潤していた1例と、径20mm以上(膀胱

表1 症例

症 例	TNM分類	方法	効果	副作用	備 考
1. N.O. 43,男	rT1(m),N0,M0,G1	1クール	消失	膀胱刺激症状	5ヵ月目再発
2. T.T. 50,男*	rT1(m),N0,M0,G1	1クール	消失	膀胱刺激症状	9ヵ月再発なし
3. Y.O. 48,男	T1, N0,M0,G1	1クール	消失	膀胱刺激症状 テタニー様痙攣	7ヵ月再発なし
4. H.T. 68,男*	rT1(m),N0,M0,G1	1クール	消失	膀胱刺激症状	6ヵ月目再発
5. H.F. 48,男*	rT1(m),N0,M0,G1	2クール	縮小	膀胱刺激症状 メニエル症候群	
6. S.T. 66,男	rT1(m),N0,M0,G2	2クール	縮小	膀胱刺激症状	
7. U.N. 63,男	T1, N0,M0,G2	1クール	縮小	なし	
8. N.A. 70,男	T1, N0,M0,G2	1クール	縮小	なし	
9. N.K. 50,女	T2, N0,M0,G2	1クール	不変	なし	
10. K.M. 53,男	rT3, NX,M0,G3	2クール	不変	膀胱刺激症状	

* ブレオ注入療法時電顕的观察を行なつた症例

造影時のフィルム上での腫瘍直径)の大きな乳頭状腫瘍1例であつた。消失例では同じく10mm以下であり、縮小例では10~20mmであつた。

ブレオ注入療法および温水ブレオ療法開始前と、1クールまたは2クールの治療終了約1週間後に腫瘍の一部を内視鏡的 cold punch 法により採取し観察に供した。標本は一部を2.5%グルタルアルデヒド液内で小切片とし、数時間~数日間前固定し電頭標本とした。残りは10%ホルマリン固定し、パラフィン包埋し、光頭標本とした。電頭標本は洗滌後2%オスミウムで1時間、後固定したのち、エタノール系列で脱水し、エポン812に包埋した。超薄切片標本は酢酸ウラン・クエン酸鉛で二重染色したのち、日立-12A電子顕微鏡で検鏡し写真撮影を行なつた。

結 果

1) 光頭所見

高分化型腫瘍は乳頭状に配列する10層前後の上皮細胞からなり、最表層には随所で表面を被う扁平な細胞が認められた。核は楕円形で異形性はなく極性もよく保たれており、核小体はめだたない。所々にクロマチン顆粒がみられた。胞体内には空胞が散見された。細胞間隙は狭く、基底膜はよく保たれていた。粘膜下には毛細血管の増生をみるが、細胞浸潤は軽度であつた(図1)。

ブレオ注入後の変化: 症例2, 4, 5の3例の高分化型腫瘍について光頭と電頭の検診を行なつた。臨床的に3例とも腫瘍は縮小した。光頭的には治療前とはほぼ同じ層構造であつたが、最表層には扁平な細胞はほとんどみられなかつた。核は濃縮したり、逆に淡明になつており、核小体はめだたない。胞体内には主に核周囲に空胞が認められた。細胞間隙はやや拡大していた。粘膜下の細胞浸潤は軽度であつた(図2)。

温水ブレオ療法後の変化: 腫瘍消失をみた症例1~4では上皮層が5~6層に減少していた。表面およびその数層下までの細胞は随所で硝子変性を呈していた。他の部位では胞体の膨化や空胞の存在、核の淡明化、細胞間隙の拡大などが散見された。核小体はめだたないが、時にやや腫大していた(図3)。腫瘍縮小をみた症例5~8ではブレオ注入療法後の変化と似ていたが、その程度が強かつた。最表層に扁平な細胞はほとんどなく、上皮層は所々で数層に減少し、上皮細胞の剝離や細胞間隙の増大が顕著であつた。核は濃縮したり、逆に淡明になつていた。核小体は認め難いが、時に腫大していた。胞体内空胞も著明であつた。これらの変化は1クール施行例

よりも2クール施行例の方が程度が強かつた(図4, 5)。腫瘍縮小をみなかつた症例9では最表層に扁平な細胞がよく保たれており、腫瘍消失例、縮小例に比べて、核の濃縮や淡明化、胞体内空胞化、細胞間隙の拡大の程度が軽度であつた(図6)。なお温水ブレオ療法後の共通変化として、粘膜下に毛細血管の増生や細胞浸潤がみられた。

低分化型腫瘍は異形性に富む細胞巢がびまん性に存在し、核は大小不整であり、核小体は腫大し、明瞭であつた。クロマチン顆粒は粗大で増加していた。胞体は随所で空胞状を呈した。細胞間隙は拡大した所が多く、基底膜は破壊されていた(図7)。

温水ブレオ療法後の変化: 1クール後の低分化型腫瘍では核膜が明瞭となり、核質が淡明化し、核小体は腫大していた。また胞体内空胞も多くみられた(図8)。

2) 電頭所見

高分化型腫瘍細胞は卵型の細胞からなり、その長軸は基底膜に垂直に配列する。表層に行くにつれて細胞は球形に近くなる。核も胞体とはほぼ同様の形と傾向を示し、鋸歯状変化や切れ込みはほとんどなかつた。核小体は1~2個で小さく、仁糸(nucleolonema)とpars amorphaからなる。仁糸は網目状で細線維と顆粒の両成分が認められた。また微細な線維構造をもつnuclear bodyがみられ、その周囲を電子密度の低い暈輪がとりまいていた。クロマチン顆粒は核内に均一にみられた。ミトコンドリア、粗面小胞体(r-ER)、空胞状小器官、ゴルジ装置が胞体内にみられた。また多数の微細線維も認められた。所々にグリコーゲン顆粒やポリゾームも観察されたがそれほど多くはない。なお滑面小胞体(s-ER)はあまり明かではなかつた。細胞間隙は狭く、細胞間結合装置はtight junctionやdesmosomeで結合していた。膀胱内腔に面する細胞にはmicrovilliが存在した(図9)。

ブレオ注入時の変化: 腫瘍細胞(図10~12)は胞体が膨化し、電子密度が非常に低下した細胞が多い。これらの細胞では小器官は減少しており、r-ER、ゴルジ装置においてそれが顕著であつた。胞体内にはやや膨化したミトコンドリア、大小の空胞状小器官や二次ライソゾームが散見された。ポリゾームは時に核周囲に集合してみられたが全体的には減少していた。s-ERやグリコーゲン顆粒は不明であつた(図10)。またミトコンドリアの変性と思われるdense materialも散見された(図11)し、核周囲には拡張したr-ERと考えられる多数の空胞状小器官の集合もみられた(図12)。核は全体的に腫大

し卵形を呈した(図10)が、時に鋸歯状輪廓や切れ込みを示した(図10, 12). クロマチン顆粒は少なく、核質は全体に電子密度が低下していた。核小体はほとんど認められないか、またはやや腫大を示した。腫大した核小体には線維成分からなる網状の仁糸がみられたが、pars amorpha や仁糸の顆粒成分は不明瞭であつた。nuclear body は1~2個で腫大していない(図10)。これらの細胞群では細胞間隙は一般に狭いが所々で拡張していた(図10)。随所に核・胞体とも電子密度が異常に高い濃縮した細胞もみられ、これらの胞体は微細線維、空胞状小器官、dense material を有し、核もほとんど無構造であつた(図11)。膀胱内腔に面する細胞のみならず細胞表面の microvilli は所々で膨化し、bleb を形成していた。bleb 内部は一般に様な電子密度をもち小器官に乏しく(図11, 星印)、時には空胞化し形質膜が断裂していた(図12, 星印)。

温水プレオ療法後の変化：高分化型腫瘍に温水プレオ療法を施行した際は内視鏡的に腫瘍の縮小程度にかかわりなく、電頭的には、程度差はあるが同様な質的变化を示した(図13~18)。またプレオ注入後の変化とほぼ同様の变化を示したが、その程度が強かつた。すなわち細胞は膨化したものが多く、胞体内小器官の減少、とくにr-ER やゴルジ装置の減少がみられた(図13~15)。ミトコンドリアはやや膨化し、時に濃縮し、所々空胞化を呈した。また大小の空胞状小器官や顆粒も散見された(図13, 14, 16)。時に大きな二次ライソゾームも認められた(図16, L)。核周囲には随所でr-ER の囊胞状拡張と思われる所見が得られた(図14)。s-ER やグリコーゲン顆粒は不明であつた。ポリゾームは全体に減少しているが、時に核周囲を中心に塊状の集合を認めた(図14)。胞体内微細線維はほとんど消失するが、束状に増加した微細線維を有する細胞も散見された(図16)。胞体内基質は電子密度が低くなり、所々空胞状にぬけてくる。さらに進むと胞体内に核や一部小器官が浮いているように見える(図14, 15)。核はほぼ卵形で軽度鋸歯状を呈した。核小体はほとんど認められないが、腫大したものもみられた。腫大した核小体には pars amorpha がなく、主に線維成分からなる電子密度の高い仁糸が網状にからみあつていた。全般にクロマチン顆粒は認められず、核質は電子密度が低下していた(図13~15)。所々で、中心部に数珠状顆粒を有するやや腫大した nuclear body がみられた(図14, 細い矢印)。細胞間隙は膨化した細胞間では一般に狭いが、細胞間隙の拡大や細胞の剝離・

遊離も随所に認めた(図14)。細胞表面には各所に bleb がみられた(図17, a, b)。また核・胞体とも電子密度の高い細胞も観察された(図18)。これらの細胞は濃縮するために隣接細胞との細胞間隙が時に拡大していた。なお内視鏡的に腫瘍消失をみた例でも膀胱内腔に面する細胞群には、正常膀胱粘膜最表層細胞にみられるような scaphoid plaque はほとんど認められなかつた(図13)。

低分化型の腫瘍細胞は細胞配列に極性がない。細胞は大小不同で、核は鋸歯状を呈し腫大していた。核小体も同様に腫大し2~3個認められ、その微細構造は高分化型腫瘍細胞と同様であつた。クロマチン顆粒は核内にほぼ均一に凝集しかつ増加していた。胞体内にはミトコンドリア、r-ER、空胞状小器官が認められた。またミトコンドリアの大小不同がめだつた。ポリゾームも散見されたが、s-ER ははつきりしなかつた。細胞間隙は一般に狭い。間質にはコラーゲン線維を主とする線維が多数みられた(図19)。

温水プレオ後の変化：低分化型腫瘍に温水プレオ療法を施行した際の諸変化は高分化型腫瘍にみられた変化とほぼ同様であつた。すなわち膨化した胞体内には大小の空胞状小器官、ライソゾームや膨化したミトコンドリアが散見された。核は腫大し、核質は電子密度が低下し、クロマチン顆粒や nuclear body はほとんど認めなかつた。核小体は腫大し、主に線維成分からなる仁糸が網状に配列しており、pars amorpha もほとんど消失していた(図20)。以上の変化があるにもかかわらず肉眼的に腫瘍の縮小は明らかではなかつた。

今回腫瘍のほぼ全層にわたつて電頭的に観察したが、その結果上記の変化は一般に表層近くの細胞の方が基底膜近くの細胞より変化が強かつたし、プレオ注入療法例よりは温水プレオ療法例の方が程度が著しかつた。また温水プレオ療法を施行した例では内視鏡的に腫瘍消失例の方が縮小例よりも、さらに、縮小例の方が無効例よりも、程度が強かつた。また縮小例の中では2クール施行後の方が1クール施行後よりも程度が顕著であつた。なお腫瘍縮小例では所々で上皮層が数層に減少しており、細胞剝離もより多く観察された。

考 察

人膀胱腫瘍に対する温水灌流療法の有効性について、Hall ら²⁾は32例中4例に腫瘍の完全消失を、19例に50%以上の減少をみており、岡田ら³⁾は58例中15例に完全消失を、28例に50%以上の縮小を認めている。膀胱腫瘍に対する抗癌剤の膀胱内注入療法も広く行なわれており、

附図説明

図1～6 高分化型腫瘍 H.E. 染色

図1 (症例5) 治療前, 10層前後の上皮細胞層からなり, 最表層には随所で表面を被う扁平な細胞が認められる。

図2 (症例2) ブレオ注入療法後, 最表層には扁平な細胞はほとんどみられない, 細胞内空胞が増加している。

図3 (症例2) 温水ブレオ療法1クール施行後, 腫瘍消失例。上皮層が5～6層に減少している。表面附近の細胞は硝子変性を示す。胞体の膨化や空胞化も強い。

図4 (症例5) 同1クール施行後, 腫瘍縮小例。核の淡明化, 胞体内空胞が顕著である。

図5 (症例5) 同2クール施行後, 腫瘍縮小例。所々で上皮層が4～5層に減少している。核濃縮, 胞体内空胞が著しい。

図6 (症例9) 同1クール施行後, 腫瘍不変例。最表層に扁平な細胞がみられる。核の濃縮や淡明化, 胞体内空胞化が軽い。

図7, 8 低分化型腫瘍 H.E. 染色

図7 (症例10) 治療前, 異形性に富む細胞巢が認められる。核は大小不同で, 核小体, クロマチン顆粒は明瞭である。

図8 (症例10) 温水ブレオ療法1クール施行後, 腫瘍不変例。明瞭な核膜, 淡明な核質, 腫大した核小体をもつ細胞が多い。

図9～18 高分化型腫瘍

図9 (症例5) 治療前, 胞体内には微細線維, 空胞状小器官, ミトコンドリア, r-ER ゴルジ装置がみられる。核は卵形で核小体はめだたない, nuclear body が散見される。細胞間隙は狭い。×3,600。挿入図(症例2) 膀胱内腔に面する部分にはほぼ均一な microvilli が存在する。×7,200。

図10～12 ブレオ注入療法後, 腫瘍縮小例

図10 (症例2) 胞体, 核とも膨化し, 電子密度が低下している。胞体内には, r-ER, ゴルジ装置が少く, ミトコンドリア, 空胞状小器官, 二次ライソゾームが散見される。所々核周囲にポリゾームの集合をみる。核質は電子密度が低く, クロマチン顆粒は少い。核小体はほとんどみられないか, やや腫大している。細胞間隙は軽度拡大している。×3,600。

図11 (症例4) 膨化した細胞内にはミトコンドリアの変性と思われる dense material が散見される。細胞表面には bleb を認める (*), 濃縮した細胞もみられる。×6,000。挿入図(症例4) 濃縮した細胞の胞体は dense material や微細線維を認める。×42,000。

図12 (症例5) 核周囲には拡張した r-ER と考えられる多数の空胞状小器官の集合を認める。核は鋸歯状輪廓や切れ込みを示す。bleb の破壊もみられる (*), 細胞間隙は拡大している。×4,800。

図13～18 温水ブレオ療法後

図13 (症例3) 腫瘍消失例。胞体は膨化し, 空胞状小器官, ミトコンドリア, 顆粒が散見される。r-ER や ゴルジ装置はみられない。クロマチン顆粒はほとんどなく, 核小体はやや腫大している。細胞表面には sca-phoid plaque はない。×3,100。

図14 (症例6, 2クール施行後) 腫瘍縮小例。核周囲に小胞状に拡大した基質欠損部を認める。またポリゾームの集合を核周辺にみる。核は軽度鋸歯状で明るく, クロマチン顆粒は乏しい。核小体はやや腫大している。nuclear body には数珠状顆粒をみる(小矢印)。細胞表面には bleb を認める(大矢印)。×4,800。

図15 (症例6, 2クール施行後) 腫瘍縮小例。胞体内基質はほとんど消失しているが, 細胞膜や核膜は明瞭である。×6,200。

図16 (症例8) 腫瘍縮小例。胞体内には大きな二次ライソゾーム(L), ミトコンドリア, 微細線維の集合をみる。細胞表面の microvilli は所々で腫大し, bleb を形成しつつある(矢印)。×12,000。

図17a (症例8) 腫瘍縮小例。大きな bleb を認める。内部は細胞質とほぼ同じであるが, 所々電子密度が低い。×7,200。

図17b (症例5, 2クール施行後) 腫瘍縮小例。bleb の内部は脱出し, 基質がぬけてみえる。×7,000。

図18 (症例5, 1クール施行後) 腫瘍縮小例。核, 胞体とも電子密度の高い濃縮した細胞がみられ, 胞体内には空胞状小器官が多い。×4,800。

図19, 20 低分化型腫瘍

図19 (症例10) 治療前, 核は鋸歯状で腫大しており, クロマチン顆粒は増加し, 均一に凝集している。核小体も腫大しており, pars amorpha と網状の仁糸からなる。ミトコンドリアの大小不同がめだつ。×3,600。

図20 (症例10, 温水ブレオ療法1クール施行後) 腫瘍不変例。核は膨化し, 核質は明るく, クロマチン顆粒はほとんどない。核小体は腫大しており, 線維成分からなる仁糸が網状に配列している。pars amorpha は消失している。胞体内には多数の空胞状小器官, ライソゾームやミトコンドリアを認める。×3,600。

小川⁷⁾はマイトマイシンCを、尾崎⁸⁾はアドリアマイシンをそれぞれ膀胱内に注入し、満足な結果を得ている。Smith ら⁹⁾はブレオ注入で5例中1例に腫瘍消失を認め、窪田³⁾は温水療法にブレオを併用し、温水療法単独よりはよい結果を得ている。われわれは温水ブレオ療法を10例に行ない、臨床的には膀胱造影時のフィルムでの腫瘍直径10mm以上の乳頭状腫瘍4例で腫瘍消失をみた。同じく径10~20mmの乳頭状腫瘍4例で腫瘍が縮小し、径20mm以上の乳頭状腫瘍1例と低分化型腫瘍1例は無効であつた。

今回われわれが温水ブレオ療法の影響を観察した結果は下記の如くまとめることができる。すなわち光顕的には、1) 細胞の膨化、2) 上皮層の減少、3) 最表層の扁平な上皮細胞の消失であり、電顕的には、1) 胞体の膨化、電子密度の低下、2) 細胞内小器官の減少、3) ミトコンドリアの膨化およびこれの変性と考えられるdense materialの出現、4) 二次ライソゾームの出現、5) 核クロマチン顆粒の減少、核質電子密度の低下、6) 核小体の消失、または腫大、7) blebの出現およびその破壊、8) 細胞間隙の拡大、9) 細胞の剝離・脱落、10) 胞体・核ともに電子密度の異常に高い濃縮した細胞の出現などであつた。ブレオ注入療法後の変化も質的にはほぼ同様であつたが、その程度が軽いといえる。温水ブレオ療法例のうちでは腫瘍消失例の方が縮小例よりも、さらに縮小例の方が無効例よりも程度が強かつた。縮小例の中では1クール施行後よりも2クール施行後の方が程度が著しかつた。また表層近くの細胞の方が基底膜近くの細胞より変化が強かつた。低分化型腫瘍は高分化型腫瘍よりも効果がわるく、特に細胞間隙の拡大はほとんどみられなかつた。

ブレオの作用機序としてはDNA合成阻害、DNA鎖切断および細胞分裂阻止などが知られている¹⁰⁾。一方温熱処理の作用機序としてはDNAに会合(association)している染色体あるいは特定の修復酵素がDNA複製時に高温処理で障害をうけることが考えられる¹¹⁾。その他DNA、RNA合成、蛋白質合成に対する阻害作用、腫瘍細胞の選択的な呼吸阻害およびライソゾームの活性化などが知られている¹¹⁾。また高温とブレオの併用は相乗効果が期待できる。Braun ら¹²⁾はチャイニズハムスター細胞を用いたin vitroの実験で、水野¹⁰⁾はエーリッヒ腹水癌細胞をブレオ存在下の培地で加温処理した後、マウス腹腔内に接種する実験でそれぞれ相乗効果を示している。

形態学的にみるとブレオ使用時の電顕的变化として、

安澄¹³⁾は人舌癌でブレオ作用後に、クロマチンの著しい減少、明るい核質、核萎縮、核融解、核小体の腫大、念珠構造をもつnuclear bodyなどを報告している。同じく安澄¹⁴⁾は舌癌患者に浅側頭動脈よりブレオを局注し、腫瘍細胞のpyknosis、変性、角化を認めている。なお核小体の変化として、DNA依存RNA合成阻害剤のアクチノマイシンDを投与すると、1) 核小体の大きさが縮小し、全体として小さくなり円形となる。2) 仁糸が消失して核小体は密に、コンパクトになる。3) 核小体成分の分離がおこることが多種類の細胞で観察されている¹⁵⁾。すなわち抗癌剤の作用部位によつて核小体の形態が異なる。

膀胱腫瘍に対する抗癌剤投与時の電顕的観察として、荻須¹⁶⁾はカルボコン、マイトマイシン、5-フルオウラシルを人膀胱腫瘍培養組織に作用させ、ミトコンドリアやリボゾームの減少、胞体内空胞の増加傾向などを報告している。また和志田¹⁷⁾はカルボコン膀胱注入例でライソゾームの減少などを観察している。しかしブレオ注入療法時の観察例は見出しえなかつた。

温熱処理の電顕的報告は若干認められる。Overgaard¹⁸⁾はマウス乳癌をin vivoで観察し、41~43°Cで60分間処理後にライソゾーム活性の亢進、ミトコンドリアの破壊、ポリゾームの分離、細胞の縮小(shrinkage)、胞体の融解などを認めている。また初期にヘテロクロマチンの縮小、凝縮がみられ、核小体は線維成分のみが残ると報告している。中村⁴⁾は人膀胱腫瘍に温水療法を施行し、最も特徴的な所見として細胞質の融解変性現象、核質の稀薄化をあげている。さらにリボゾームの増加、核クロマチンの減少、核小体の顆粒成分の消失なども記載し、上記の変化は低分化型に比べて高分化型の方が強いと述べている。核小体の変化としてSimard ら¹⁹⁾もハムスター腎線維芽細胞培養を用い、核小体は42°Cにすると顆粒成分が消失し線維成分だけになり、正常温度にもどすと顆粒成分が再び出現することを報告している。

温水ブレオ療法後の膀胱腫瘍の変化として岸本⁵⁾は細胞膜の不明瞭さ、核質の菲薄化、核クロマチンの減少、核小体不明、細胞質破壊、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置の減少などをあげている。

われわれの観察では温水ブレオ療法例の方がブレオ注入療法例より変化が強かつた。各々の変化について考察すると、核・胞体が膨化し電子密度が低下する所見は中村⁴⁾、岸本⁵⁾のいう細胞質の融解変性、核質の稀薄化現象とほぼ同じである。濃縮した細胞もみられたが、これ

は膀胱腫瘍に通常みられるいわゆる dark cell が変性したのか、Overgaard⁸⁾ の認めた細胞縮小に一致するのかわからないが、おそらくプレオや温水処理に起因すると思われる。われわれの例では大きな二次ライソゾームは細胞質の変化が乏しい細胞に多く、胞体の電子密度が低い細胞にはあまりみられなかつた。温熱処理時にライソゾーム内の分解酵素が活性化し、細胞を破壊する¹⁸⁾ので変化の強い細胞にはライソゾームが少ないと考えられる。胞体内空胞状小器管の増加の由来および機序は不明であるが、核周囲ではゴルジ装置や r-ER の拡張したものも存在すると思われる。またこれらはおそらく蛋白合成阻害による二次産物として増えたのであろう。ポリゾームは核周囲に一部集合をみたが、全体的には減少していた。中村⁴⁾ はリボゾームの増加を報告しているが、温水プレオ療法(われわれ)と温水療法(中村)の相異によるのかもしれない。

核質電子密度の低下、核クロマチン顆粒の減少、核小体の消失および腫大は温水プレオ療法でもプレオ注入療法でも観察された。腫大した核小体では pars amorpha は消失し、仁糸は主に線維成分からなっていた。Overgaard¹⁹⁾ や中村⁴⁾ の温熱療法時の論文に記載のない核小体の腫大は主にプレオによるものであろう。仁糸の顆粒成分の消失は Simard ら¹⁹⁾、Overgaard¹⁹⁾、中村⁴⁾ も記載しており温熱療法に起因するが、今回プレオ注入療法例にも観察されたので、その一因はプレオにもあると思われる。核小体の消失は温水プレオ療法例にもプレオ注入療法例にも共通に認められた。おそらくプレオ、温熱の両因子がこれに関与しているのだろう。nuclear body の腫大や数珠状変化の本態は不明であるが安澄¹³⁾ もプレオ投与舌扁平上皮癌で観察しており、薬剤による変化が示唆される。

bleb 形成や一部にみられた bleb の破壊は温水プレオ療法例にもプレオ注入療法例にもみられた。これははまだ膀胱腫瘍治療では、中村⁴⁾ の温水療法時の論文や、岸本⁵⁾ の温水プレオ療法時の報告でも記載されていないし、乳癌細胞に in vivo で温熱を作用させた Overgaard¹⁹⁾ も報告していない。Trump ら²⁰⁾ によると bleb 形成は遊離細胞のみならず種々の細胞が障害を受けた時に普通にみられる反応であるという。膀胱腫瘍に対するプレオおよび温熱の作用による細胞障害の一指標と考えられる。

細胞間隙の拡大は電子密度が高い濃縮した細胞の周囲ではより著明であつたが、膨化した細胞間でもみられ

た。温熱およびプレオは細胞内変化を生じるのみならず、細胞間の結合解離にも作用を及ぼすのではないだろうか。腫瘍の縮小の要因は腫瘍細胞の変性・破壊に加えて、細胞間結合の解離に伴う細胞の剝離・脱落も一因と考えられる。

なお内視鏡的に腫瘍消失をみた例では膀胱内腔に面する表面細胞に microvilli を認めたが、正常膀胱粘膜最表層細胞にみられる scaphoid plaque はほとんど観察されなかつた。したがって今回腫瘍消失例で観察した表面細胞は全く正常部分とはいきれない。すなわち尿路移行上皮癌の多発性、前癌状態、腫瘍細胞の残存などが考慮されねばならない。温水プレオ療法やプレオ注入療法の結果、細胞濃縮、変性および剝離・脱落が生じるので、臨床的には径10mm以下の小さな乳頭状腫瘍が消失したのであろう。

結 語

われわれは温水プレオ療法を10例に施行し、腫瘍消失4例、縮小4例、無効2例の成績を得た。消失例のうち2例は約半年で再発した。10例中3例は以前にプレオ注入療法を行ない、全例腫瘍の縮小を認めた。温水プレオ療法例とプレオ注入療法例の変化はほぼ共通であつたが、前者の方が程度が強かつた。すなわち胞体の膨化、淡明化、やや膨化したミトコンドリア、大小の空胞状小器管の存在に加え、核ではクロマチン顆粒が減少し、核質も淡明化していた。時に核小体は腫大し、仁糸は主に線維成分から形成されていた。ライソゾームや微細線維の増加した細胞もみられたし、胞体、核とも電子密度が高い濃縮した細胞も観察された。細胞間隙は拡大し、さらに細胞の剝離・脱落も認められた。細胞表面とくに膀胱内腔に面する部分には bleb 形成を認めた。以上より温水プレオ療法の作用機序は腫瘍細胞の退行性変性と剝離によるものと推定された。これは本治療法が径10mm以下の小乳頭状腫瘍に有効であるという臨床的経験に一致する。しかし腫瘍消失例も電顕的には完全に正常ではなく、尿路移行上皮癌の多発性、前癌状態、腫瘍細胞の残存などが考慮されねばならず、この療法の限界を示唆している。

本稿を終るにあたり、御校閱を賜った東大泌尿器科新島端夫教授ならびに横山正夫分院助教授に感謝いたします。

なお本論文の要旨は第44回日本泌尿器科学会東部連合総会で発表した。

文 献

- 1) Cockett, A.T.K., Kazmin, M., Nakamura, R., Fingerhut, A. and Stein, J.J.: Enhancement of regional bladder megavoltage irradiation in bladder cancer using local bladder hyperthermia. *J. Urol.*, **97**, 1034—1039, 1967.
- 2) 岡田清己, 清滝修二, 川添和久, 佐藤安男, 田原亮一, 木下正之, 熊谷振作, 北島清彰, 尾上泰彦, 滝本至得, 岸本 孝: 膀胱腫瘍に対する温水療法の研究 (第2報). *日泌尿会誌*, **66**, 485—492, 1975.
- 3) 窪田吉信, 西村隆一, 高井修道, 福島修司: 膀胱癌の Hyperthermia 療法: Bleomycin および放射線との併用療法について. *日癌治療会誌*, **13**, 20—31, 1978.
- 4) 中村洋三: 膀胱腫瘍に対する温水療法. 第Ⅲ報 電子顕微鏡的研究. *日泌尿会誌*, **70**, 410—422, 1979.
- 5) 岸本 孝: 膀胱癌の温水療法およびブレオマイシン加温水療法について. 第1回尿路悪性腫瘍研究会記録, 12—20, 1978.
- 6) Hall, R.R., Schade, R.O.K. and Swinney, J.: Effects of hyperthermia on bladder cancer. *Brit. Med. J.*, **15**, 593—594, 1974.
- 7) 小川秀弥: 膀胱腫瘍に対する抗腫瘍剤マイトマイシンCおよび放射性同位元素 ^{32}P の膀胱内注入療法. (IV) M.M.C. 膀胱内注入に関する臨床的研究 (血中濃度と臨床成績). *日泌尿会誌*, **60**, 746—755, 1969.
- 8) 尾崎雄治郎: 膀胱腫瘍に対する Adriamycin の膀胱腔内注入療法. その1. 主として臨床成績の検討. *日泌尿会誌*, **68**, 934—944, 1977.
- 9) Smith, P.H. and McCollum, C.N.: Intravesical bleomycin in bladder cancer. *J.A.M.A.*, **235**, 906—907, 1976.
- 10) 水野左敏: 動物細胞蛋白質合成開始の温度感受性. 第1回 尿路悪性腫瘍研究会記録, 7—11, 1978.
- 11) 水野左敏: 癌温熱療法最近の進歩. *臨泌*, **32**, 1101—1111, 1978.
- 12) Braun, J. and Hahn, G.M.: Enhanced cell killing by bleomycin and 43° hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res.*, **35**, 2921—2927, 1975.
- 13) 安澄権八郎: 核の電顕像の診断的価値. *細胞*, **6**, 220—237, 1974.
- 14) Yasuzumi, G., Hyo, Y., Hoshiya, T. and Yasuzumi, F.: Effect of bleomycin on human tongue carcinoma cells revealed by electron microscopy. *Cancer Res.*, **39**, 4645—4652, 1979.
- 15) 鶴沼直雄: 核小体の構造と機能, 細胞生物学 IV. 第1版, 208—239, 朝倉書店, 東京, 1962.
- 16) 荻野文一: 人膀胱腫瘍の培養及び抗癌剤感受性試験に関する研究. *日泌尿会誌*, **70**, 504—522, 1979.
- 17) 和志田裕人, 上田公介, 渡辺秀輝, 渡 仲三: 膀胱腫瘍に対する carboquone の膀胱内注入療法—組織学的ならびに電子顕微鏡的検討—. *泌尿紀要*, **23**, 567—583, 1977.
- 18) Overgaard, J.: Ultrastructure of a murine mammary carcinoma exposed to hyperthermia in vivo. *Cancer Res.*, **36**, 983—995, 1976.
- 19) Simard, R. and Bernhard, W.: A heat-sensitive cellular function located in the nucleolus. *J. Cell. Biol.*, **34**, 61—76, 1967.
- 20) Trump, B.F., Penttilä, A. and Berezsky, I.K.: Studies on cell surface conformation following injury. I. Scanning and transmission electron microscopy of cell surface changes following p-chloromercuribenzenesulfonic acid (PC-MBC)-induced injury of Ehrlich ascites tumor cells. *Virchows Arch. B. Cell Path.*, **29**, 281—296, 1979.

(1980年5月20日受付)