膀胱癌の局所治療に関する実験的研究

1. 家兎移植腫瘍 (V₂ carcinoma) を用いた膀胱癌実験モデルの確立

	根	本	良	介*
	森			久
秋田大学医学部泌尿器科学教室	岩	田	克	夫
(主任: 土田正義教授)	加	藤	哲	郎
	阿	部	良	悦
秋田大学医学部病理学教室	原	田	昌	興
(主任: 所沢剛教授)				

EXPERIMENTAL STUDIES ON REGIONAL THERAPY OF URINARY
BLADDER CANCER

1. A Model of Urinary Bladder Carcinoma in the Rabbit Using
Transplantable V₂ Carcinoma

Ryosuke Nemoto, Hisashi Mori, Katsuo Iwata, Tetsuro Kato and Ryoetsu Abe

Department of Urology Akita University School of Medicine
(Director: Prof. Seigi Tsuchida)

Masaoki Harada
Department of Pathology Akita University School of Medicine
(Director: Prof. Takeshi Shozawa)

An experimental model of bladder carcinoma was established in the rabbit using transplantable V₂ carcinoma. Submucosally inoculated V₂ carcinoma cells were successfully transplanted into the bladder wall with an incidence of 96% (78/81) with the first experimental week. Significant correlation was demonstrated between the growing tumor size and inoculated tumor cell numbers. Nodullary growing submucosal tumor progressed to mucosal ulceration followed by invasive growth to the muscle layers with relatively restrictive boundary. About 4 weeks after inoculation, lymphatic metastases to the lungs were evidently observed with a high frequency. The extremely high transplantability of the tumor and short experimental periods of this model system might be advantageous for practical studies of bladder carcinoma.

要旨: 家兎の膀胱に同種の移植腫瘍 (V₂ carcinoma) を用いた膀胱癌の実験モデルを確立したので報告した。腫瘍の生着は81頭中78頭 (96%) にみられ, すべて膀胱腔内に突出し各実験群ではほぼ均等な大きさであつた。転移経路は膀胱より傍総腸骨動脈リンパ節を経て肺に至るリンパ行性転移が主体で, 転移巣の増大とともに一部肝への血行性転移も認められた。

本実験モデルには手技が簡便なこと, 腫瘍生着率が高く再現性に富むことならびに実験期間が短いこと等の利点が指摘された。組織学的には自然発生膀胱癌とは異なるが, 増殖形態, 成育速度および転移様式が悪性腫瘍としての条件を満たしており, 膀胱癌に関する局所治療の基礎的研究に幅広い応用が期待できた。

緒 言

膀胱癌の治療には膀胱の解剖学的特徴と臓器特異性を

* 現在, 筑波大学臨床医学系泌尿器科

考慮した方法がいくつか施行されている。たとえば膀胱支配動脈である内腸骨動脈を用いた抗癌剤の動脈内注入法¹⁾ や腫瘍動脈塞栓術²⁾, また膀胱が管腔臓器で経尿道

的操作が容易なことを利用して、抗癌剤の膀胱内注入法³⁾、水圧療法⁴⁾あるいは温熱療法⁵⁾などが施行されている。しかし、これら膀胱癌に対する治療法に関しては担癌動物を用いた基礎的な研究はほとんどなく、客観的な抗腫瘍効果の判定や抗腫瘍機序について解明すべき点が多に残されている。その最大の理由は膀胱に対する操作が可能な大きさの動物に適当な腫瘍モデルがなかったためと思われる。

今回、著者らは家兔の膀胱に同種の移植腫瘍 (V_2 carcinoma) を用いた膀胱癌の実験モデルを確立したので、その概要について報告する。

材料および方法

1. 家兔：日本白色種、雄、体重2.5~3kgを使用し、市販の飼料 (CR₃, 日本クレハ) で飼育した。

2. 腫瘍：家兔大腿部に継代した V_2 carcinoma (VX₂ carcinoma と同義) を用いた。 V_2 carcinoma は1937年 Kidd & Rous により確立された家兔の移植悪性腫瘍で、組織学的には扁平上皮癌に類するものとされている⁶⁾。

3. 腫瘍細胞の移植：家兔大腿部より摘出した腫瘍をはさみで細切して糊状にした後、Hanks buffered saline で希釈してガーゼで2回濾過し、所定の細胞密度の細胞浮遊液を調整した。この間、トリプシン処理は行わず抗生物質も添加しなかった。腫瘍を移植する家兔は pentobarbital (25mg/kg) で麻酔し、下腹部正中切開により開腹して膀胱を露出した後、細胞浮遊液0.3~0.5ml を膀胱の漿膜側から壁内に注入した。細胞移植後、創を縫合して硫酸アミカシン5mg/kg を筋注した。

4. 腫瘍生着率：51頭の家兔を用いて4回の実験を行なった。各回とも所定の濃度に調整した細胞浮遊液0.3ml を膀胱壁に注入した後、一定期間において屠殺して腫瘍の大きさと肺転移の有無を観察した。

5. 移植細胞数と腫瘍生着：24頭の家兔を4群に分け、膀胱壁にそれぞれ 10^3 、 10^4 、 10^5 、および 10^6 個の細胞浮遊液0.3ml を移植して、2週後の腫瘍の大きさを測定した。

6. 腫瘍の増殖と転移：12頭の家兔膀胱壁に 2×10^6 個の細胞浮遊液0.5ml を注入した後、1週おきに2頭づつ屠殺して腫瘍の大きさと形態を観察した。また肺、肝、および傍総腸骨動脈リンパ節への転移の有無を調べ、摘出臓器のホルマリン固定標本による組織学的検索を行なった。

なお、いずれの実験も腫瘍の大きさは長径×短径で表わし、重量はホルマリン固定標本で測定した。また5週

目まで経過観察することができた3頭については、各週毎に体重測定を行ない、腫瘍の発育と転移が家兔の成長に及ぼす影響を検討した。

結果

1. 腫瘍生着率 (Table 1)：51頭の家兔のうち腫瘍が生着したのは49頭 (96%) で、腫瘍は全例とも膀胱腔内に突出していた。腫瘍生着不成功例の2頭は主に初期の実験群で、細胞を膀胱壁に注入する際、誤って膀胱腔内に細胞浮遊液を流出させたためと考えられた。各実験群で生着した腫瘍の大きさ (長径×短径, mm²) の平均は、 28.9 ± 3.0 (Mean $\pm$ S.E., $n=14$)、 43.5 ± 6.6 ($n=18$)、 67.3 ± 8.0 ($n=10$) および 485.1 ± 56.3 mm² ($n=7$) で各群ともほぼ一定の大きさの腫瘍を生着させることができた。腫瘍細胞移植後3週間追跡した群では、7頭中6頭に粟粒大の多発性肺転移をほぼ同程度に認めた。

2. 移植細胞数と腫瘍生着 (Fig. 2)：24頭の家兔を用いて、4段階の濃度に調節した細胞浮遊液を膀胱に移植し、2週後の腫瘍の生着を観察した。その結果、細胞数 10^3 個を注入した群で6頭中2頭に腫瘍の生着が認められなかったのみで、他の群ではすべての膀胱に腫瘍の生着をみた (Fig. 1)。生着した腫瘍の平均サイズは 10^3 群； 15.0 ± 3.8 mm² ($n=4$)、 10^4 群； 88.9 ± 13.7 mm² ($n=6$)、 10^5 群； 150.8 ± 25.9 mm² ($n=6$)、および 10^6 群； 421.7 ± 25.6 mm² ($n=6$) で各群ともほぼ均等大きさの腫瘍生着がみられ、とくに 10^6 群での再現性が顕著であった。

3. 腫瘍の増殖と転移：Table 2. は12頭の家兔に細胞

Fig. 1 Tumor size of the urinary bladder in rabbits transplanted with various number of V_2 carcinoma cells. Tumor size was calculated using the formula, length x width = mm².

Tacble 1 Tumor frequency and reproducibility of V₂ carcinoma transplanted into the urinary bladder of rabbits.

	Inoculated Cell Number	Period (day)	Tumor Size (length×width, mm)			Mean Tumor Size (l. × w. , mean ± S.D. , mm ²)	Tumor Frequency (%)	Lung Metastasis
Exp. 1 (n = 14)	10 ⁶	7	8 × 5	6 × 5	5 × 4	6.5 ± 0.3 × 5.5 ± 0.4	14/14 (100)	0/14
			7 × 5	7 × 7	7 × 5			
			8 × 8	6 × 5	7 × 7			
			7 × 4	8 × 7	7 × 6			
			5 × 4	5 × 4				
Exp. 2 (n = 20)	2 × 10 ⁶	7	7 × 6	7 × 6	8 × 6	7.6 ± 0.6 × 6.8 ± 0.4	18/20 (90)	0/18
			8 × 7	6 × 6	—			
			5 × 5	7 × 7	10 × 9			
			15 × 12	3 × 3	7 × 7			
			8 × 8	7 × 6	7 × 7			
Exp. 3 (n = 10)	5 × 10 ⁶	9	7 × 7	12 × 11	9 × 9	9.3 ± 0.6 × 8.9 ± 0.6	10/10 (100)	0/10
			8 × 7	8 × 7	10 × 10			
			9 × 9	7 × 7	11 × 11			
			12 × 11					
Exp. 4 (n = 7)	10 ⁷	21	19 × 17	16 × 15	23 × 22	22.6 ± 1.4 × 21.0 × 1.4	7/7 (100)	6/7
			23 × 22	25 × 23	25 × 25			
			27 × 23					

Table 2 Tumor growth and metastasis of V₂ carcinoma transplanted into the urinary bladder of rabbits.

Period (week)	Tumor Size (length×width, mm ²)	Tumor Weight (g)	Ulceration	Central Necrosis	Metastasis		
					liver	lung	lymph node
1	8 × 6	0.2	—	—	—	—	—
	7 × 6	0.2	—	—	—	—	—
2	20 × 19	0.8	+	—	—	—	—
	23 × 20	1.4	+	—	—	—	—
3	26 × 25	3.2	+	+	—	† ^a	—
	26 × 25	3.8	+	+	—	+	† ^c
4	33 × 27	3.8	+	+	+	† ^b	+
	33 × 28	4.0	+	+	+	+	+
5	45 × 30	7.6	+	+	+	†	† ^d
	50 × 45	9.2	+	+	—	†	†
8	— ^f	— ^f	+	+	+	†† ^c	†† ^e

a, miliary size. b, rice-grain size. c, pea size. d, little finger's headsize. e, thumb's head size. f, too large to measure.

を移植した後、1週間ごとに2頭ずつ屠殺して腫瘍の大きさと転移の様子を観察した結果で、11頭に腫瘍の生着を認めた。腫瘍の大きさは1週後には約10mm×10mmに成長し、以後直線的に増大して、3週目には約26mm×25mmとなり、その後の増殖は緩慢になった(Fig. 2)。しかし、8週を経過すると膀胱腫瘍は隣接臓器や腹壁に浸潤し、腫瘍の大きさを測定するのが不可能な程に増大した。腫瘍の形態は1週目には膀胱壁の粘膜下に結節状腫瘤を形成していたが(Fig. 3)、2週目には膀胱粘膜を破って膀胱粘膜面に潰瘍を形成するようになり(Fig. 4)、3週目には潰瘍の中央に壊死による陥凹とそれを囲む結節状隆起を認めた。腫瘍の増殖は主に平面的に拡がり、各時期の腫瘍面積を長径×短径で求めて、腫瘍重量との関係を見るとほぼ相関していた($r=0.964$, Fig. 5)。転移の様子を肺、肝、および傍総腸骨動脈リンパ節の

Fig. 2 Growth curve of bladder tumor in rabbits.

Fig. 3 One week after inoculation. Tumor growth restricted in submucosa to muscle layer.

Fig. 4 Two weeks after inoculation. Mucosal layer was invaded by tumor growth showing erosion.

Fig. 5 Correlation between tumor weight and size. Tumor size was calculated using the formula, $\text{length} \times \text{width} = \text{mm}^2$.

3カ所で検索すると、肺とリンパ節には3週目より肉眼的転移が認められ、以後時間の経過とともに段階的に増大するのが観察された。8週目には両肺野は小豆大の無数の転移巣で埋めつくされ、リンパ節は小指頭大～拇指頭大に腫大していた。それに反して肝には4週目に米粒大の転移巣が数個認められたものの、8週を経過しても増大する傾向はなかつた(Table 2)。以上の転移様式は家兎の体重をよく反映しており、細胞移植後2週目、3週目と順調に体重が増加したのが4週目には横ばいとなり、5週目からは体重が減少し始めた(Fig. 6)。

4. 病理組織像：腫瘍組織は血管に乏しい薄い結合組織にとり囲まれて巣状をなしており、その中に円形の核

を有する多形性の上皮性腫瘍細胞が密集し、リンパ球と好酸球を主体とする炎症性細胞浸潤が認められた (Fig. 7). 腫瘍細胞内の核の大きさはほぼ均等で、いくつかの核には分裂が認められ、核クロマチンも明瞭に識別できた. リンパ節 (Fig. 8) および肺 (Fig. 9) には、結節状の転移巣が散在し、とくに肺ではリンパ管内に腫瘍が塞栓状に増殖している所見を得た (Fig. 10).

Fig. 6 Weight of rabbits after inoculation of V_2 carcinoma into the urinary bladder. Average weight of three rabbits (Mean $\pm$ S.E.).

Fig. 7 V_2 carcinoma transplanted into urinary bladder of rabbits. Inoculated tumor cells growing solid sheets or nests with thin septal fibrous stroma. Lymphocytic infiltration intermingling in the stroma and relatively prominent mitotic figures are seen ($\times 100$, HE stain).

Fig. 8 Multiple metastasis nodules in the lung 4 weeks after inoculation ($\times 100$, HE stain).

Fig. 9 Metastatic involvement of the lymph node 3 weeks after inoculation ($\times 100$, HE stain).

Fig. 10 Perivascular lymphatic invasion of the lung resembling lymphangitic carcinomatosis.

考 案

膀胱腫瘍の実験モデルとして最も一般的なものはラットに BBN⁷⁾ や FANFT⁸⁾ などの化学発癌物質を投与して作成したもので、これらを用いた移植腫瘍実験系も報告されている⁹⁾。しかし、ラットの膀胱腫瘍モデルを膀胱癌の局所治療法の実験モデルにするには膀胱そのものがあまりに小さく、局所操作が極めて困難である。そのため現在のところラットを用いた膀胱癌の局所治療法の実験モデルとしては抗癌剤の膀胱内注入法に関する報告が散見されるにすぎない⁸⁾⁹⁾。

その点、膀胱の操作が容易な家兎に膀胱腫瘍を作ることが出来れば申し分ないが、家兎の膀胱腫瘍に関しては自然発生癌の報告はない。化学発癌物質による方法も再現性に乏しく、不確実で腫瘍発生までに時間がかかりすぎて実用には程遠い状態である¹⁰⁾¹¹⁾。そこで著者らは、家兎の同種移植腫瘍 (V₂ carcinoma) に着目し、これを膀胱に移植、生着させて膀胱腫瘍を作り、膀胱癌の局所化学療法に関するモデル実験としての可能性を示した¹²⁾。

今回は、V₂ carcinoma を用いた家兎の移植膀胱腫瘍に関する基礎的実験を系統的に行なつた。その結果、2 × 10⁴個以上の腫瘍細胞を家兎の膀胱壁に移植してから1週間でほぼ100%に近い確率で膀胱腫瘍を作ることができ、しかも各実験系により腫瘍の大きさや転移の発現がほぼ一定した再現性のある移植膀胱腫瘍モデルを確立することができた。腫瘍の大きさは長径×短径で表わすことにより腫瘍重量とよく相関することが示され、各種の治療効果を判定するのに非常に都合なモデルと思われた。また生着した腫瘍の大きさは移植細胞数と密接な関係があり、細胞数を調整することによって目的にかなった成長速度の実験系を作ることも可能である。

腫瘍の転移は3週目に肺と傍総腸骨動脈リンパ節に認められた。これらの転移巣は時間の経過とともに増大し、8週目になると両肺野は小豆大の腫瘍で埋めつくされた。肺転移巣の組織学的所見では、主にリンパ管内に腫瘍細胞が集中しているのが認められた。しかし肝転移は極めてわずかで、時間の経過とともに増大する傾向もなかつた。以上のことから本実験モデルの転移形式は、リンパ行性に肺に至ると考えられ、膀胱癌のリンパ節転移に関する実験モデルとしての有用性も示唆された。

最近、Harzmann らも家兎の陰のうに発生した Brown Pearce carcinoma を用いた移植膀胱腫瘍の実験モデルを報告した¹¹⁾。しかし、著者らが V₂ carcinoma を用い

て作成した実験モデルとの間には幾つかの相違点を指摘することができる。その1つは Harzmann らのモデルでは膀胱腫瘍を膀胱腔内に生着させるにあつて、膀胱の粘膜に搔傷を作るか、粘膜下層に選択的に細胞を注入する必要がある点である。著者らのモデルでは膀胱壁への細胞移植は全く無選択かつ無雑作に行なわれたが、結果的には再現性のある均一な腫瘍を膀胱に生着させることができた。腫瘍は移植1週後に粘膜下に結節状に生着し、2週後には粘膜面に潰瘍を形成しながら膀胱腔内に突出する浸潤性発育を示した。この点、本法は Harzmann らのモデルに比べて移植操作がはるかに簡単で、膀胱粘膜に対する不必要な浸襲もなく、より自然な形で腫瘍を生着させ得る利点がある。もう一つの大きな相違点は、Harzmann らの実験モデルでは腫瘍の転移形式が血行性で主に肝臓が浸されるのに対し、著者らのモデルはリンパ行性に肺に転移する点である。この両者の転移形式のちがいは、今後の実験モデルの選定にあつて興味ある問題を提起しそうである。

以上の点から本実験モデルは短期間に、簡単な操作で家兎の膀胱に再現性のある悪性腫瘍を作ることができ、化学発癌等による実験系に比べて極めて経済的といえる。V₂ carcinoma を用いた移植腫瘍は組織型が本来の膀胱腫瘍である移行上皮癌と異なる点を除けば、増殖形式や転移様式は膀胱原発の悪性腫瘍と同等の条件を十分に満足しているため、膀胱癌の治療とくに局所治療に関する実験モデルとして抗腫瘍効果の判定や抗腫瘍機序の解明など幅広い応用が期待される。

結 語

家兎移植腫瘍 (V₂ carcinoma) を用いた膀胱癌の実験モデルを確立するため、基礎的実験を行ない以下の結果を得た。

1. 2 × 10⁴ 個以上の V₂ 腫瘍細胞を移植した81頭中、78頭に腫瘍の生着がみられ、生着率は96%であつた。腫瘍はすべて膀胱腔内に突出し、各実験群でほぼ均等大きさの腫瘍が得られた。
2. 腫瘍はまず粘膜下層に結節状に生着し、その後粘膜面に潰瘍を形成して中心壊死を伴いながら増殖する形をとつた。
3. 転移経路は膀胱より傍総腸骨動脈リンパ節を経て肺に至るリンパ行性転移が主体で、転移巣の増大とともに一部肝への血行性転移も認められた。
4. 本実験モデルには手技が簡便なこと、腫瘍生着率が高く再現性に富むこと、ならびに実験期間が短いこと

等の利点が指摘された。

5. 本実験モデルは組織学的に自然発生膀胱癌とは異なるが、増殖形態、成育速度および転移様式が悪性腫瘍としての条件を満たしており、膀胱癌治療に関する基礎的研究に幅広い応用が期待できる。

(本論文の要旨は第68回日本泌尿器科学会総会において発表した。また、本研究の一部は厚生省がん研究助成金(53～19)および文部省科学研究費(56570537)により行なった。)

文 献

- 1) Nevin, J.E. and Hoffman, A.A.: Use of arterial infusion of 5-fluorouracil either alone or in combination with supervoltage radiation as a treatment for carcinoma of the prostate and bladder. *Am. J. Surgery*, **130**, 544—549, 1975.
- 2) 加藤哲郎, 根本良介: 泌尿器悪性腫瘍に対する化学塞栓療法. *臨床外科*, **35**, 379—386, 1980.
- 3) Kato, T., Nemoto, R., Nishimoto, T., Kumagai, I. and Miura, K.: Chemosensitivity of human bladder cancer cells in long-term culture and clinical responses to the selected anticancer drugs. *Cancer*, **44**, 58—63, 1979.
- 4) 広瀬欽次郎, 加納勝利, 瀬戸輝一: 膀胱腫瘍に対する水圧療法について. 第1報, *日泌尿会誌*, **64**, 324—337, 1973.
- 5) 岸本 孝, 岡田清己, 滝本至得, 北島清彰, 熊谷振作, 新井律夫, 中村洋三, 広田米造, 清水伸一, 森田博人: 膀胱腫瘍に対する温水療法(Hyperthermic Treatment)の研究. 第1報. *臨床的経験*. *日泌尿会誌*, **66**, 485—492, 1975.
- 6) Kidd, J.G. and Rous, P.: A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *J. Exper. Med.*, **71**, 813—838, 1940.
- 7) 野田益弘, 橋本嘉幸: N-butyl-N-butanol (4) nitrosamine およびそのアセチル体による近交系 ACI/N ラット膀胱腫瘍の発生と発生腫瘍の移植性について. *日泌尿会誌*, **64**, 397—401, 1973.
- 8) Pontes, J.E., Izicki, R., Silberberg, B., Baker, L. and Pierce, J.M.: The effects of topical instillation of adriamycin in bladder tumors of rats fed with FANT. *Invest. Urol.*, **15**, 278—279, 1978.
- 9) 横田武彦, 香川 征: 近交系 ACT/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を検討. *日泌尿会誌*, **66**, 249—253, 1975.
- 10) 上領頼啓: 各種抗癌剤の膀胱癌再発予防に関する実験的研究. 第27回日本化学療法学会総会, 抄録集, 57, 1979.
- 11) Soloway, M.S.: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res.*, **37**, 2918—2929, 1977.
- 12) Cohen, A.E., Weisburger, E.K., Weisburger, J.H., Ward, J.M. and Putman, C.L.: Cystoscopy of chemically induced bladder neoplasms in rabbits administered the carcinogen di-butyl nitrosamine. *Invest. Urol.*, **12**, 262—266, 1975.
- 13) Harzmann, R., Gericke, D., Bichler, K.H. and Altenar, E.: A transplantable tumor of the urinary bladder in rabbits. *Invest. Urol.*, **17**, 181—185, 1979.
- 14) Kato, T., Nemoto, R., Mori, H., Unno, K., Goto, A., Harada, M. and Homma, M.: Preparation and characterization of ferromagnetic mitomycin C microcapsules as a mean of magnetic control of anticancer drugs. *Proc. Japan Acad.*, **55**, 470—475, 1979.

(1981年1月16日受付)