BBN による膀胱腫瘍誘発実験に及ぼす Freund Complete Adjuvant の影響について

市立札幌病院泌尿器科

大橋 立彦 松井 傑 山田 智二

大橋 伸夫 斯波 光生

市立札幌病院腎移植科

平 野 哲 夫

市立札幌病院中検病理

吉 木 敬 伊 藤 哲 夫

北海道大学泌尿器科

小 柳 知 彦

THE EFFECT OF COMPLETE FREUND ADJUVANT ON THE DEVELOPMENT OF BLADDER TUMOR INDUCED BY N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL) NITROSAMINE

Tatsuhiko Ohashi, Suguru Matsui, Tomoji Yamada, Nobuo Ohashi and Teruo Shiba

Department of Urology, Sapporo City General Hospital

Tetsuo Hirano

Department of Renal Transplantation, Sapporo City General Hospital

Takashi Yoshiki and Tetsuo Ito

Department of Pathology, Sapporo City General Hospital

Tomohiko Koyanagi

Department of Urology, Hokkaido University, School of Medicine

To study the mechanism of prohibition for the recurrence of bladder tumors by intravesical Bacillus Calmette-Guerin (BCG) treatment, we made a mice system using Freund Complete Adjuvant (FCA) as an immunoactivator and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) as a carcinogen. C57BL/6 mice were treated with BBN and FCA simultaneously, and it was found that the FCA treated group revealed a significantly lowered number of piled layer (NPL) in the bladder epithelium. The FCA which is composed of Bacillus Calmette-Guerin and mineral oil is used to enhance the immune activity in several system. The result obtained in this experiment seemed correlated with the clinical efficiency of intravesical BCG treatment to prohibit the recurrence of superficial bladder carcinoma. The result and the resistance of MRL/lpr mice to BBN treatment give us an idea the presence of hyperimmune state at the early phase of development to malignant change is a factor to protect the host from carcinoma.

But when we increase the number of FCA treatment, the NPL values also increased, which gave us a caution to determine the dose and number of BCG treatment in the patient.

We suspect the efficiency of BCG may be something like chemopreventing agents (Retinoid etc.), but further experiment is necessary to confirm it.

要旨：BCG 膀胱内注入療法の再発予防効果を実験的に検討する為に、フロインドの完全アジュバンドと発癌剤として N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を C57BL/6 マウスに同時に投与すると FCA 投与群では膀胱粘膜の重層性 (NPL) に著大な低下を認めた。FCA 内の BCG 死菌が免疫能力

を高める事が判明しており、臨床的に使用している BCG の膀胱内注入療法の再発予防効果と類似の現象と思われた。既に報告した MRL/lpr マウスで見られる BBN への抵抗性を考えると、発癌早期に過免疫状態が存在する事で宿主の抵抗性が増大し腫瘍の出現が妨げられるものとおもわれた。しかし FCA の投与回数を増やすとむしろ NPL に増加がみられ臨床的に用いる際、慎重な投与スケジュールの決定が必要と思われた。我々はレティノイドに似た chemopreventing な作用がこのシステムに存在する事を推定しているが、これを確かめるには更に実験が必要である。

結 言

抗腫瘍療法の中で免疫療法の意義は既に確立されており臨床的に種々の腫瘍で治療法の一つとして利用されている。しかしその機序に関しては必ずしも明らかではなく、抗体又は細胞 (T cell, LAK cell) を直接腫瘍細胞にあて効果を期待する effector level での治療は抗腫瘍剤による化学療法と同一に論ぜられる所もあり理解しやすいが、生体の免疫能を特異的、非特異的に高める active immunotherapy は免疫亢進状態の治療効果の判定がはっきりせずその実践の効果の裏付けにも苦勞することが多い。

膀胱腫瘍に限ってみると実際に効果が確認され使用されている治療法として BCG の膀胱内注入療法が Morales らの報告¹⁾以来試みられているが、その機序については、BCG が直接的に腫瘍細胞に働いて抗腫瘍効果を表す以外に間接的にマクロファージを活性化して抗腫瘍効果を表す事が示されている。しかし特に臨床的に認められている再発予防効果についての機序は明確に示されていない。我々は前論文で示したように自己免疫疾患を自然発症する MRL/lpr 系マウスに発癌剤 BBN を投与すると他系統マウスに比べて膀胱粘膜上皮の重層化が乏しく、この系統のマウスに特有の抵抗性(抗腫瘍性)が存在している事を推定し lpr-gene に規定される抵抗性を実験的に証明した²⁾。

今回はその抵抗性が過免疫状態に由来するとの仮定から、通常マウスに一時的な免疫亢進状態を BCG 死菌投与で人工的につくり、発癌剤である BBN を投与し膀胱粘膜の変化を光顕的に検討した。早期の膀胱粘膜上皮の変化を調べる為に前論文と同じく number of piled layer (NPL) を指標にして解析した。

材料と方法

BBN 投与による膀胱粘膜の変化；実験に用いたマウスは 7 週齢雌の C57BL/6 系で静岡実験動物センターより購入した。このマウスに BBN (東京化成) 0.05%, Tween 80 (Sigma), 抗生剤 acromycin (250 mg/200ml) を水溶液として経口的に自然摂取させた。約 70 日間の BBN 投与後、屠殺し、膀胱はホルマリン固

定の上 1 個の膀胱につき 6 切片の輪切りを作り、Hematoxylin Eosin 染色 (H.E. 染色) を行い、光顕的に粘膜の変化を観察した。この実験でも膀胱粘膜の重層の程度 (number of piled layer=NPL) でデータをまとめている。膀胱の両端の切片は対象から外し、中間のリング状切片でのみ判定した。またその重層化の程度が少なくとも 2 カ所以上見られる時、NPL 値として採用した。

BBN 投与時期に、一時的な過免疫状態をもたらす目的で Freund Complete Adjuvant (FCA), この中には Bacillus Calmette-Guerin の死菌と mineral oil が含まれているが、総量 200 μ l (BCG 菌 0.2mg) を下腹部、大腿部に分けて皮下及び筋肉内に投与した。

実験群は、A) FCA 無投与群 (BBN のみ), B) BBN 投与開始後に FCA を投与した群, C) BBN 投与開始前に FCA を投与した群, FCA の投与回数による影響についても、D) 群にて BBN 投与後 18 日目, 33 日目に FCA を投与し (2 回投与), E) 群では BBN 投与 3 日

Fig. 1 The effectiveness of BCG treatment on the number of piled layer (NPL) of bladder epithelium. Group A: 0.05%BBN was given for 70 days. Group B: 200 μ l of FCA was given subcutaneous or intramuscular root at the 14days after BBN treatment began. Group C: 200 μ l of FCA was given 4days before BBN treatment began. t test: Group A vs. B ($p<0.001$), Group A vs. C ($p<0.001$)

Fig. 2 Histology of BBN treated bladder epitheliums from group A ($\times 200$, H.E. staining). upper: (No. 53), lower: (No. 156)

前, 18日後, 33日後にそれぞれ FCA を投与して(3 回投与)検討した。各グループの NPL 値は t 検定を用い有意差を検定した。

結 果

BBN を連続投与した群では $NPL = 8.67 \pm 0.53$ ($n=8$) となるのに対し, FCA を C57BL/6 系に BBN 投与開始14日後に 1 回投与すると $NPL = 6.25 \pm 0.37$ ($n=8$) となり, BBN 投与開始前4日目に FCA を与えると, $NPL = 5.78 \pm 0.67$ ($n=9$) とコントロールに比べ有意の低下が生じた (t test, A vs. B or C, $p < 0.001$) (Fig. 1, 2, 3). 一方 Fig. 4, 5 に示したように, FCA の投与回数を増やしても NPL 値の低下は生じず, 2 回投与で $NPL = 9.13 \pm 0.58$ ($n=8$), 3 回投与で $NPL = 8.6 \pm 0.98$ ($n=7$) と, むしろ有意の増加が認められた (C vs. D or E, $p < 0.001$).

考 察

泌尿器科領域で免疫能に抗腫瘍性を期待する治療に関し最近では Soloway らが表在性膀胱腫瘍と BCG

Fig. 3 Histology of CFA and BBN treated bladder epitheliums from group B (upper, No. 158) and group C (lower, No. 72). ($\times 200$, H.E. staining). upper: FCA-(4d)-BBN (total BCG, $200\mu g$). lower: BBN-(14d)-FCA (total BCG, $200\mu g$).

について述べているが³⁾, TUR-BT 後の BCG 投与による再発予防の効果については, Lamm らの報告⁴⁾, Brossman らの報告⁵⁾, Herr らの報告⁶⁾, Dekernion らの報告⁷⁾から臨床的に, すでに確立した治療法の一つになっている。その機序として BCG の腫瘍に対する直接作用の他にマクロファージを活性化し, 又それによってキラー T 細胞の活性化が生じ腫瘍が除かれる事が明らかにされているが, より興味深い腫瘍の発生レベルへの影響及び再発予防の機序に関しては不明である。

Old らは Swiss Ha/ICR マウスと発癌剤として 3-methylcholanthrene を用い BCG 生菌の投与が fibrosarcoma の出現を遅らせる事⁸⁾, Nilsson らは Sr⁹⁰ で誘発される骨腫瘍の頻度が BCG 投与にて減少する事⁹⁾ また Old らは BCG 投与で, マウス乳腺癌の発生率に減少をみる事¹⁰⁾ を報告している。

Fig. 4 The effect of repeated FCA treatment on the NPL score. Group C: FCA (1×) total BCG 200 μ g, Group D: FCA (2×) total BCG 400 μ g, Group E: FCA (3×) total BCG 600 μ g. t test: Group C vs. D ($p < 0.001$), Group C vs. E ($p < 0.001$)

Fig. 5 Histology of bladder epithelium from group D (upper, No. 133) and E (lower, No. 135). (× 200, H.E. staining)

以上の BCG による癌発生時点で抑制を見る実験と、既に発生した腫瘍あるいは移植腫瘍に対する効果

を期待する免疫療法とは区別して考える必要がある。Collins らの実験で¹⁰⁾NK 細胞に感受性を持つ細胞は正常細胞と癌細胞の中間型であると示された事等は、腫瘍の発生の時点での免疫能の持つ役割を示唆してくれて興味深い。

今回の実験で正常マウス C57BL/6 系に Freund Complete Adjuvant (FCA) を BBN 投与開始後又は前に皮下及び筋肉内に投与すると、NPL 値に明らかな低下がみられた (Fig. 1, 2, 3). FCA は結核菌 (BCG) を主成分とし、各種抗原に対して抗体を作るときのアジュバントとして又は autoimmune disease を実験的に作成するのにも使われる非常に強力な免疫系の activator である。この FCA 内の (BCG + mineral oil) が何らかの機序により粘膜の腫瘍化を免疫学的に押さえ得る可能性を示すデータと言える。表在性の膀胱腫瘍、特に Ca. in situ で効果の見られると云われる、BCG 療法の作用機序は、免疫担当細胞を通じて直接発生した腫瘍に対して働く以外に、再発予防という点から非常に早期の段階で粘膜の腫瘍化を防御する何らかの影響を与えるのかもしれない。

またこの BCG の投与時期に関して移植腫瘍で Piessens ら¹¹⁾, Amiel ら¹²⁾, Pearson ら¹³⁾ が BCG 単独又は抗癌剤と併用するときの BCG の投与時期の重要性についてのべているように残存腫瘍の質、量の正確な把握、その生体の状態に関する客観的な評価をふまえて行うべきである。

今回の実験で 200 μ l (0.2mg の BCG) 投与群 (B, C 群) により効果が見られたことから至適量の存在が伺え、D, E 群に示したように BCG の投与量、投与回数の増加は抵抗性の上昇につながらず、むしろ NPL 値の増加を認めた。実際に Chee らは 0.005mg の BCG 投与でマウスメラノーマ移植腫瘍に最大効果を示しているが¹⁴⁾、その至適量は画一には決められず、おそらく、その個体の免疫状態に依存していることが推定される。それゆえに Soloway らはマウスのシステムで¹⁵⁾BCG を用いた実験ではむしろ膀胱腫瘍の発生に増加をみとめ臨床上的効果と一致しないと報告しているが量的、時間的に至適ではない可能性が考えられる。

この投与量、回数問題は BCG だけにすぎず Biologic Response Modifier と総称されている薬剤に基本的に共通することと考えられ、臨床的に用いる場合慎重に投与スケジュールを決める必要がある。

我々はこの BCG の作用につき、既に報告されている chemopreventing agent (Retinoid, Vitamin A,

MESNA, Aspirin 等)¹⁶⁾¹⁷⁾様の作用機序を考えているが、この事を確かめる為にはより長期的に immune modifier が腫瘍形成時点まで及ぼす影響を調べる事、他系統マウス、あるいは他動物を用いて、同時にその他の発癌剤での検索も含めての幅広い解析が必要と思われる。

本論文の一部は第75回泌尿器科総会にて発表した。

文 献

- 1) Morales, A., Eidinger, D. and Bruce, A.W.: Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.*, 116, 180—183, 1976.
- 2) 大橋立彦, 松井 傑, 平野哲夫, 山田智二, 大橋伸生, 斯波光生, 吉木 敬, 伊藤哲夫, 小柳知彦: BBN による膀胱腫瘍誘発実験に抵抗性を示した MRL/lpr 系マウスについて. *医学のあゆみ*, 143, 553—554, 1987.
- 3) Soloway, M.S.: Selecting initial therapy for bladder cancer. *Cancer*, 60, 502—513, 1987.
- 4) Lamm, D.L., Thor, D.E., Winters, W.D., Pac, V. D. and Radwin, H.M.: BCG immunotherapy of bladder cancer: Inhibition of tumor recurrence and associated immune response. *Cancer*, 48, 82—88, 1981.
- 5) Brosman, S.A.: Experience with Bacillus Calmette-Guerin in patients with superficial bladder carcinoma. *J. Urol.*, 128, 27—30, 1982.
- 6) Herr, H.W., Pinsky, C.M., Whitmore, W.F., Oettgen, H.F. and Melamed, M.R.: Effect of intravesical Bacillus Calmette-Guerin on carcinoma in situ of bladder. *Cancer*, 51, 1323—1326, 1983.
- 7) Dekernion, J.B., Huang, M.Y., Lindner, A., Smith, R.B. and Kaufman, J.J.: The management of superficial bladder tumors and carcinoma in situ with intravesical Bacillus Calmette-Guerin. *J. Urol.*, 133, 598—601, 1985.
- 8) Old, L.J., Banacerraf, B., Clarke, D.A., Carswell, E.A. and Stockert, E.: The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. *Cancer Res.*, 21, 1281—1300, 1961.
- 9) Nilsson, A., Revesz, L. and Stjernsward, J.: Suppression of Strontium-90-induced development of bone tumors by infection with Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Radiation Res.*, 26, 382, 1965.
- 10) Collins, J.L., Patek, P.Q. and Cohn, M.: In vivo surveillance of tumorigenic cells transformed in vitro. *Nature*, 299, 169—170, 1976.
- 11) Piessens, W.F., Heimann, R., Legros, N. and Heuson, J.C.: Effect of Bacillus Calmette-Guerin on mammary tumor formation and cellular immunity in dimethylbenz(a) anthracene-treated rats. *Cancer Research*, 31, 1061—1065, 1971.
- 12) Amiel, J.L. and Berardet, M.: Factor time for active immunotherapy after cytoreductive chemotherapy. *Europ. J. Cancer*, 10, 89—91, 1974.
- 13) Pearson, J.W., Chirigos, M.A., S.D. and Sher, N. A.: Combined drug and immunostimulation therapy against a syngeneic murine leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 52, 463—468, 1974.
- 14) Chee, D.C. and Bodurtha, A.J.: Facilitation and inhibition of B16 melanoma by BCG in vivo and by lymphoid cells from BCG-treated mice in vitro. *Int. J. Cancer*, 14, 137—143, 1974.
- 15) Soloway, M.S.: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res.*, 37, 2918—2929, 1977.
- 16) Becci, P.J., Thompson, H.J., Strum, J.M., Brown, C.C., Sporn, M.B. and Moon, R.C.: N-butyl-M-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder cancer in C57BL/6xDBA/2 mice as a useful model for study of chemoprevention of cancer with retinoids. *Cancer Research*, 41, 927—932, 1981.
- 17) Malone, W.F., Kelloff, G.J., Person, H. and Greenwald, P.: Chemoprevention of bladder cancer. *Cancer*, 60, 650—657, 1987.

(1988年7月12日受理)