膀胱腫瘍に対するインターフェロン膀胱腔内注入療法の基礎的研究

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

原 雅 弘

FUNDAMENTAL STUDIES ON INTRAVESICAL INSTILLATION OF INTERFERONS FOR TREATMENT OF BLADDER CANCER

Masahiro Hara

Department of Urology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. H. Ohmori)

The cytotoxic effect of interferons on T24 cells, the established cell line from human urinary bladder cancer, the distribution of the drugs in blood, urine and tissues of various organs and histopathological change in the bladder mucosa in dogs following intravesical instillation of the drugs, were studied. These studies were conducted to investigate the possible application of each type of interferons to intravesical treatment of superficial bladder cancer.

1) The cytotoxicity of Ro22-8181 (recombinant human interferon α), GKT- β (recombinant human interferon β) and KW2202 (recombinant human interferon γ) on T24 cells was examined by colony formation method and growth inhibition assay. Cytocidal effects of interferons were dependent on dose and exposure time, and GKT- β is most effective (GKT- β >Ro22-8181>KW2202). Cytostatic effects of GKT- β were also dependent on dose and exposure time.

2) The interferon levels in blood, urine and tissues were measured by FL-Sindbis system following bladder instillation of GKT- β or KW2202 in beagle dogs with bilateral cutaneous ureterostomy. No interferons were detected in blood and urine. Bladder mucosa and submucosal layer were observed through a microscope 6 and 10 hours after bladder instillation of GKT- β or KW2202 in beagle dogs with bilateral cutaneous ureterostomy. Degeneration of bladder mucosa and submucosal layer was scarcely observed.

The above results suggest that GKT- β is a suitable drug for intravesical treatment of bladder cancer.

要旨: 表在性膀胱腫瘍に対するインターフェロンの膀胱腔内注入療法への導入を目的として、インターフェロンのヒト膀胱癌由来培養細胞株 T24 に対する細胞障害作用、ならびに犬膀胱内インターフェロン注入によるインターフェロンの血中、尿中移行、臓器内濃度と、膀胱粘膜に及ぼす病理組織学的影響について検討を行った。

1) T24細胞を用い、各種インターフェロンの濃度別、添加時間別効果を colony formation method、および growth inhibition assay で検討した。インターフェロン α 、 β 、 γ 共に濃度依存性、時間依存性の殺細胞効果を示した。尚、殺細胞効果は β が最も強く、 α 、 γ の順であった。インターフェロン β の細胞増殖抑制効果もまた、濃度依存性、時間依存性に認められた。

2) ビーグル犬を用い、両側尿管皮膚瘻を造設、空置した膀胱内にインターフェロン β または γ を注入し、血中、尿中移行、臓器内濃度を FL-sindbis 系により測定した結果、インターフェロンの膀胱腔内注入による血中、尿中移行は認められなかった。さらに、正常膀胱粘膜、粘膜下層に対する影響を検討したが、病理組織学的変化は極めて軽微であった。

以上の結果より、インターフェロン β の膀胱内注入療法の臨床への導入が可能であることが示唆された。

緒 言

制癌剤の膀胱腔内注入療法は表在性膀胱腫瘍に対し効果的な治療法のひとつである。Adriamycin (ADM)¹⁾, Mitomycin-C (MMC)²⁾および4'-epi-adriamycin (Epi-ADM)³⁾などの膀胱腔内注入療法は、有効率が高い半面、副作用として正常膀胱粘膜が障害されて膀胱刺激症状を起こすことが比較的多い。そこで著者は、有効かつ副作用の少ない薬剤として、インターフェロン (IFN) を膀胱腔内注入療法へ応用することを企図し、基礎的検討を試みたので若干の文献的考察を加えて報告する。

材料並びに方法

I. 人膀胱癌培養細胞株 T24 に対するインターフェロンの殺細胞効果および細胞増殖抑制効果

1. 細胞並びに培養方法

使用した T24 細胞は、1970 年に Bubenik 等⁴⁾により Sweden で初代培養され、その後 Czechoslovakia で樹立株化された人膀胱癌培養細胞株である。岡山大学泌尿器科には、1979 年 12 月に日本医科大学附属第一病院泌尿器科、中神義三助教授の御好意により提供された。その生物学的ならびに形態学的性状については教室の吉本⁵⁾が原著として報告しているのでその詳細は本論文では省略するが、今回の実験時における single cell ratio は 95% 以上 plating efficiency は 90% 以上であり colony formation method に適した細胞株である。培養液は、10% calf serum (Gibco) 添加 Eagle's MEM (水産薬品株式会社) を用い、pH は NaHCO₃ を加え約 7.2 となるように調整した。培養はプラスチックシャーレ (3003 dish, Falcon Co. USA) を用い開放系とし、37℃、5%CO₂ 下で静置培養を行った。継代は 0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液にて行った。

2. 実験方法

人膀胱癌培養細胞株 T24 に対するインターフェロンの殺細胞効果を colony formation method にて検討した。dish 内に semiconfluent monolayer に発育している T24 細胞を前述のごとく剥離分散し、10⁵個/ml の細胞浮遊液を 10ml ずつ Falcon 3003 dish に inoculate し、48 時間培養を行った。ついで、0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液を加え、pipetting を行い、single cell suspension とした。これを前述の培養液にて希釈し、生細胞数 100 個/dish を含む 3ml の細胞浮遊液を作成し、Falcon 3002 dish に分注した。37℃、5%CO₂ 下で 24 時間培養の後、培養液を除去し、

各種インターフェロンを含む培養液で 24 時間、あるいは 48 時間、同様に incubate しインターフェロンに接触させた。その後、再びインターフェロンを含む培養液を除去し、Hanks 液にて 2 回洗浄し、新鮮な培養液を 3ml 加えた。計 12 日間 incubate 後にメチルアルコールにて固定し、ギムザ液にて染色後、細胞数 20 個以上よりなるコロニー数を計算した。実験は各薬剤、各濃度あたり 3 枚のシャーレを用い平均値を求めた。また、この実験は 3 回繰り返し行った。インターフェロンは蒸留水で溶解後、培養液で 500, 2000, 8000 U/ml の濃度に希釈し使用した。インターフェロンは、recombinant human interferon α である Ro22-8181 (日本ロッシュ株式会社, 東京), recombinant human interferon β である GKT- β (協和発酵工業株式会社, 東京), recombinant human interferon γ である KW2202 (協和発酵工業株式会社, 東京) を用いた。尚、インターフェロンの調製は添加直前に行った。培養液のみの場合の colony 数を solvent control とし、さらにインターフェロンを添加した場合の colony 数を求め、relative plating efficiency を各濃度別に計算し、グラフより LD50 (U/ml) を求めた。

さらに人膀胱癌培養細胞株 T24 に対するインターフェロンの細胞増殖抑制効果は growth inhibition assay にて検討した。前述のごとく T24 細胞を剥離分散し、10⁵個/ml の細胞浮遊液を 10ml ずつ Falcon 3003 dish inoculate し、48 時間培養を行った。ついで、0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液を加え、pipetting を行い、single cell suspension とした。これを前述の培養液にて希釈し、生細胞数 10⁴個/ml の細胞浮遊液を作成し、Falcon 3047 dish に 0.5ml 分注した。37℃、5%CO₂ 下で 24 時間培養の後、培養液を除去し、各濃度のインターフェロンを含む培養液で 4 日連続 (インターフェロン添加培養液は 24 時間毎に交換) 同様に incubate しインターフェロンに接触させた。その後、再びインターフェロンを含む培養液を除去し、Hanks 液にて 2 回洗浄し、新鮮な培養液を 0.5ml 加えた。インターフェロンは、colony formation method で最も強い殺細胞効果を示した GKT- β を用い、蒸留水で溶解後、培養液で 10², 10³, 10⁴ U/ml の濃度に希釈し使用した。培養 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 日目に、0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液を加え、pipetting を行い single cell suspension とし、細胞数を Coulter 社製の coulter counter にて計測した。

さらに、前述のごとく生細胞数 10⁴個/ml の細胞浮遊

液を作成し、Falcon 3047 dish に0.5ml 分注した。37℃, 5%CO₂ 下で24時間培養の後、培養液を除去し、10³U/ml の濃度のインターフェロン β を含む培養液で2日, 4日, 6日, あるいは8日連続(インターフェロン添加培養液は24時間毎に交換) incubate しインターフェロン β に接触させた。その後、再びインターフェロン β を含む培養液を除去し、Hanks 液にて2回洗浄し、新鮮な培養液を0.5ml 加えた。incubation は計12日間行い、培養1, 2, 4, 6, 8, 10, 12日目に0.2%trypsin および0.04%EDTA の等量混合液を加え、pipetting を行い single cell suspension とし、細胞数を coulter counter にて計算した。実験に際しては各濃度あたり3枚のシャーレを用い、平均値を求めた。

II. ビーグル犬を用いたインターフェロン膀胱腔内注入後の血中、尿中移行、臓器内濃度、および正常膀胱粘膜に与える影響

1. 材料

生後7～9カ月、体重8～12kg の雌性ビーグル犬(富士アニマルファームより購入)を用いた。

2. 実験方法

ケタラル(10～13mg/kg) 筋肉内麻酔、およびネンブタール(10～15mg/kg) 静脈内麻酔下に仰臥位に固定した後、経腹膜的に両側尿管を露出、カテーテル(アトム栄養チューブ4号)を挿入し尿管皮膚瘻を作成した。ついで、膀胱および尿道を露出し尿道に切開を加え、空置した膀胱腔内にカテーテル(アトム栄養チューブ6号)を挿入し、インターフェロンを注入し膀胱頸部を結紮した。インターフェロンは、GKT- β (recombinant human interferon β)、および control として KW2202 (recombinant human interferon γ) を用い、膀胱壁の病理組織学的検索および血中、尿中、各種臓器への移行の検討には合計9頭のビーグル犬を使用し、5群にわけて検討した(Table 1)。第1群、2群と5群は GKT- β 1 $\times$ 10⁸U を蒸留水10ml に溶解、第3群と4群は KW2202 1 $\times$ 10⁸U を蒸留水10ml に溶解した。第1群、3群は、6時間把持、第2群、第4群は、10時間把持、第5群は、2時間把持とした。血中濃度については、注入前、注入後2時間ごとに採血し血清を分離し、-70℃にて凍結保存の後測定に供した。尿中濃度については注入前、注入後2時間ごとの尿を採取し、同様に-70℃にて凍結保存の後、測定に供した。臓器内濃度は、膀胱(三角部、側壁の粘膜および筋層)腎、肝、心について測定した。第1群、3

Table 1 Experimental method using dogs

Group	Drug	Retained Time (hrs.)	No. of Dogs
1	GKT- β 10 ⁷ U/ml	6	2
2	GKT- β 10 ⁷ U/ml	10	2
3	KW2202 10 ⁷ U/ml	6	2
4	KW2202 10 ⁷ U/ml	10	2
5	GKT- β 10 ⁷ U/ml	2	1

GKT- β : Human recombinant interferon β

KW2202 : Human recombinant interferon γ

群は6時間、第2群、4群は10時間、第5群は2時間把持後屠殺し、速やかに臓器摘出し、生塩水にて洗浄し、-70℃にて凍結保存の後測定に供した。尚、測定は協和発酵工業株式会社、医薬研究開発部に委託し、FL-sindbis 系による抗ウイルス活性を測定した。

正常膀胱粘膜に対するインターフェロンの影響については、第1群、3群は、6時間、第2群、4群は、10時間把持後屠殺し、速やかに膀胱を摘出し光顕的に検討した。

結 果

I. 人膀胱癌培養細胞株 T24 に対するインターフェロンの効果

1. 人膀胱癌培養細胞株 T24 に対するインターフェロンの殺細胞効果

Fig. 1 に interferon α , β , γ の24時間接触後、Fig. 2 に48時間接触後の relative plating efficiency を示した。インターフェロン α , β , γ 共に濃度依存性の殺細胞効果を示し、かつその効果は時間依存性でもあった。尚、殺細胞効果は β が最も強く、一方 α , γ の殺細胞効果は軽度であった。T24細胞に対するインターフェロンの LD50 はグラフよりインターフェロン α , γ は24時間、48時間接触ともに8000U/ml 以上、インターフェロン β は24時間接触では5900U/ml, 48時間接触では480U/ml であった (Table 2)。

2. 細胞増殖抑制効果

T24 に対する殺細胞効果が最も強力であったインターフェロン β を用いた。Fig. 3 に各濃度別の、Fig. 4 に各接触時間別の growth inhibition curve を示した。濃度依存性および時間依存性細胞増殖抑制効果が認められた。しかし、インターフェロン β 除去後、10² U/ml では、1日目より、10³U/ml では2日目より、10⁴

Fig. 1 Effects of Various Interferons on the Plating Efficiency of T24 Cells

Fig. 2 Effects of Various Interferons on the Plating Efficiency of T24 Cells

Table 2 LD50 (U/ml) of various interferons on T24 cells

Interferon	Exposed Time (hrs.)	
	24	48
Ro22-8181	>8000	>8000
GKT- β	5900	480
KW2202	>8000	>8000

U/ml では、3 日目より regrowth が認められ、その後の増殖は control と同様の傾向を示した。

II. ビーグル犬を用いたインターフェロンの膀胱腔内注入後の血中、尿中移行、臓器内濃度、および正常膀胱粘膜に与える影響

1. 血中濃度および尿中濃度

血中濃度は GKT- β (recombinant human interferon β), KW2202 (recombinant human interferon γ) とともに膀胱腔内注入後、各時間いずれも

Fig. 3 Effects of GKT- β on the Proliferation of T24 Cells

Fig. 4 Effects of GKT- β (1000U/ml) on the Proliferation of T24 Cells

測定限界以下であった (Table 3)。また、尿中濃度も同様に GKT- β , KW2202 とともに、各時間いずれも測定限界以下であった (Table 4)。

2. 組織内濃度

膀胱以外の臓器内濃度は、GKT- β 膀胱腔内注入 2 時間後に腎皮質に 126U/g.t.w. および髄質に 138U/g.t.w. と微量検出された以外はいずれも測定限界以下であった。膀胱壁の組織内濃度は三角部、および側壁の粘膜、筋層について検討したが、GKT- β 膀胱注後 2 時間

Table 3 Plasma levels of GKT-β and KW2202 in dogs

	GKT-β (U/ml)*	KW2202 (U/ml)*
Before	< 6	< 6
2 hrs.	< 6	< 6
4	< 6	< 6
6	< 6	< 6
8	< 6	< 6
10	< 6	< 6

* Antivirus activity by FL-sindbis system

Table 4 Urinary levels of GKT-β and KW2202 in dogs

	GKT-β (U/ml)*	KW2202 (U/ml)*
Before	< 6	< 6
0- 2 hrs.	< 6	< 6
2- 4	< 6	< 6
4- 6	< 6	< 6
6- 8	< 6	< 6
8-10	< 6	< 6

* Antivirus activity by FL-sindbis system

Fig. 5 Light microscopic view of the bladder treated with GKT-β and KW2202

Table 5 Tissue levels of GKT-β and KW2202 in dogs killed after 6 and 10 hours retention of interferons (10⁸U)

		GKT-β (U/g.t.w.)*			KW2202 (U/g.t.w.)*	
		2 hrs.	6 hrs.	10 hrs.	6 hrs.	10 hrs.
Bladder	trigone mucosa	5850	24500	2870	29800	870
	muscle	4300	14320	7970	25900	1310
	lateral mucosa	4770	3650	3070	6030	1240
	muscle	3200	4600	2220	6110	1380
Kidney	coltex	126	<60	<60	<60	<60
	medulla	132	<60	<60	<60	<60
Liver		<60	<60	<60	<60	<60
Heart		<60	<60	<60	<60	<60

* Antivirus activity by FL-sindbis system

Table 6 Histological findings of bladder wall after intravesical instillation of various interferons

	GKT-β		KW2202	
	6 hrs.	10 hrs.	6 hrs.	10 hrs.
Mucosa				
Exfoliation	—	— ~ ±	—	—
Necrosis	—	—	—	—
Submucosa				
Edema	—	— ~ ±	—	—
Inflammation	—	—	—	—
Necrosis	—	—	—	—

— : no change, ± : slight change

では膀胱三角部粘膜が最も高く、GKT-β 膀胱注後 6 時間では、三角部粘膜、筋層の濃度はさらに上昇したが、側壁の濃度は同様であった。GKT-β 膀胱注後10時間では 6 時間に比して三角部粘膜、筋層の濃度は、著明に低下した。KW2202膀胱注後 6 時間では、膀胱三角部粘

膜、筋層の順に濃度が高く、KW2202膀胱注後10時間では、膀胱組織内濃度は著明に低下した (Table 5)。

3. 膀胱粘膜に対する影響

膀胱粘膜に対する GKT-β および KW2202の影響を病理組織学的に検討したが、粘膜上皮の剥離、壊死、粘膜下の浮腫、好中球の浸潤、壊死等の炎症所見はほとんど認められなかった (Table 6) (Fig. 5)。このことよりインターフェロンの正常膀胱粘膜への刺激性は

極めて軽度であることが示唆された。

考 察

膀胱腫瘍は、表在性腫瘍と進行癌にわけられ、表在性膀胱腫瘍に対してはTURを主体とした治療が施行されその予後は良好である。しかし、多中心性に発生する性質をもち再発を繰り返す傾向が強く、またその都度TURを施行することにより萎縮膀胱となり、膀胱全摘除術を余儀なくされることもある。萎縮膀胱を防ぐために、我々は再発性の多発性表在性膀胱腫瘍に対し抗癌剤の膀胱腔内注入療法⁶⁾⁷⁾を施行、腫瘍数あるいは腫瘍の占拠面積を減少させた後にTURを行ってきた。しかし完全寛解例が少ないこと、および副作用として膀胱刺激症状が認められることが問題となっている。膀胱腔内注入療法は、1948年 Semple⁸⁾が podophyllin を用いたのが最初であり、1961年 Jones and Swinney⁹⁾、1962年 Vennema¹⁰⁾により thio-TEPA が、low stage の膀胱腫瘍に適応とされた。その後、Ethoglucid¹¹⁾、MMC²⁾、ADM¹⁾、Carboquone(CQ)¹²⁾、Acracinomycin (ACR)¹³⁾、Bleomycin (BLM)¹⁴⁾、CDDP¹⁵⁾¹⁶⁾、BCG¹⁷⁾、Epi-ADM³⁾¹⁶⁾などが検討されている。膀胱腔内注入療法のための条件として、尾崎は¹⁹⁾、1) 移行上皮癌に感受性があること、2) 短時間の接触で殺細胞効果を有すること、3) 血中への移行が低率であること、4) 正常膀胱粘膜への刺激性が少ないことを挙げている。現在では上記の条件の1)～3)を充たす薬剤として、ADM、MMCが膀胱腔内注入療法に用いられ、比較的良好な治療成績が報告されているが、正常膀胱粘膜への刺激性が問題となっている。近年になりBCGの膀胱腔内注入療法が、表在性膀胱腫瘍に対し有効であるとの報告もされているが²⁰⁾²¹⁾、やはり膀胱刺激症などの副作用が強い様である。

一方、インターフェロン(IFN)は、1954年、Nagano and Kojima²²⁾によってウイルス抑制因子として発見され、1957年に Isaacs and Lindenmann²³⁾によってウイルスの干渉現象を引き起こすものとして、インターフェロン(interferon)と命名された。その後、インターフェロンは抗ウイルス作用の他に、抗腫瘍作用を含めて種特異性の多面的生物活性物質として認識されるようになった。最近になり、細胞から産生される天然のインターフェロン(natural interferon)の他、遺伝子工学の手法を用いた人工の遺伝子組換えインターフェロン(recombinant interferon)が生産可能となり、精製法も確立され、高純度のIFN製剤が大量に生産されるようになってきている。

インターフェロンの臨床的治療効果には、1970年前半の Strander ら²⁴⁾の骨肉腫に対する有効性の報告以来、インターフェロンの細胞増殖抑制作用は、癌治療薬として臨床応用がされてきている。インターフェロンの全身投与による各種悪性腫瘍に対する有効性については、多くの報告がなされている^{25)～29)}が、脳腫瘍³⁰⁾³¹⁾、皮膚悪性腫瘍³²⁾に対してはインターフェロンの局所投与の方が有効性が高いという報告も認められる。

著者は、表在性膀胱腫瘍に対して、尾崎の条件を充たす抗腫瘍剤を検討していたが、インターフェロンにその可能性を考慮し、インターフェロンの膀胱腔内注入療法への応用のため基礎的検討を試みた。

インターフェロンの抗腫瘍作用には直接作用^{33)～35)}と宿主の免疫担当細胞を介する間接作用^{36)～38)}が報告されている。膀胱腔内注入療法は局所投与であるため in vitro でインターフェロンの直接作用について検討した。直接作用として、インターフェロンは抗細胞作用があることは知られているが、その作用は静細胞的³⁹⁾に作用する場合と殺細胞的⁴⁰⁾に作用する場合があることが報告されている。著者は、ヒト膀胱癌培養細胞株 T24 を用い、各種インターフェロンの殺細胞効果については colony formation method にて検討した。インターフェロンはその抗原型の違いにより interferon α 、interferon β 、interferon γ の3種類に大別されているため、recombinant type の interferon α (Ro22-8181) interferon β (GKT- β)、interferon γ (KW2202) を本実験に使用した。T24細胞は今回の実験時において single cell ratio は95%以上、また plating efficiency は90%以上であり colony formation method に適した細胞株である。colony formation method は薬剤に接触した後に真に増殖能力を有する腫瘍細胞数を、ほぼ正確に把握することができる方法としてすぐれた薬剤感受性試験⁴¹⁾とされている。著者の実験では24時間インターフェロンを接触させた時の LD50値は、Ro22-8181、KW2202は、8000U/ml 以上であったが、GKT- β は、5900U/ml、48時間接触させた時の LD50値は、Ro22-8181、KW2202は8000U/ml 以上であったが、GKT- β は480U/ml であった。即ち、T24細胞は Ro22-8181、KW2202 に対し低感受性を示したが、GKT- β は T24細胞に対し濃度依存性、時間依存性の最も強い殺細胞効果を持つことが示された。

そこで、T24に対する殺細胞効果が最も強力であった GKT- β を用い、細胞増殖抑制効果を Growth inhi-

bition assay で検討したが、T24細胞に対し濃度依存性および時間依存性の強い細胞増殖抑制効果が認められた。即ち、GKT- β は T24 に対し殺細胞的及び静細胞的に抗腫瘍効果を発揮することが認められた。

インターフェロンの抗腫瘍活性は、濃度依存性よりも時間依存性であるという報告が多いが、我々の実験結果でもその傾向が認められる様である。この理由を考えるに、インターフェロンの生物学的活性は細胞膜のレセプターと結合し細胞内に侵入した後に発揮されるといわれ⁴²⁾、インターフェロンに対する腫瘍細胞の感受性は腫瘍細胞のレセプターの数とその親和性によるともいわれている⁴³⁾。しかし、各腫瘍細胞のレセプター数は限られているために、濃度依存性効果には限界があると推察される。このことについては、各種インターフェロンに対する腫瘍細胞の receptor assay を行い検討する予定である。

インターフェロンは時間依存性の抗腫瘍効果を示すが、半減期が短く、数時間で活性の低下をきたすため、臨床的に膀胱腔内注入療法を行う際には、腫瘍細胞への接触時間を長くするために投与回数を増やす必要性があると思われ、これに依って有効性を高めることが可能と考える。

次に、膀胱腔内注入療法における安全性および副作用について、尾崎の方法¹⁹⁾を参考に検討を行った。ビーグル犬を用い、両側尿管皮膚瘻を造設し、空置した膀胱腔内にインターフェロンを注入し、血中、尿中移行、臓器濃度、および膀胱粘膜に与える影響について検討した。

膀胱粘膜からの薬剤の吸収については、動物実験あるいは臨床的に種々の薬剤で検討されている。膀胱粘膜からの吸収は、薬剤の脂溶性あるいは分子量に左右され⁴⁴⁾、都田ら⁴⁵⁾は、FT207と5-FUを膀胱腔内に注入し吸収効率を検討したところ、FT207は5-FUの23倍であり、これは薬剤の脂溶性の差によると述べており、中川ら⁴⁶⁾は、さらに検討したところ、pH6~7における非イオン型存在率、即ちイオン化定数の差によるものと述べている。薬剤の分子量に関してはYeates⁴⁷⁾は200以下の物質は経膀胱的に吸収されるとしている。インターフェロンは分子量約20000と非常に大きく経膀胱的に吸収されにくいものと考えられるが、著者のインターフェロンの膀胱腔内注入に際しての実験でも、血中尿中にインターフェロンは検出されず、全身的な副作用は極めて少ないものと考えられた。

膀胱腔内に注入した薬剤の膀胱粘膜および粘膜下組

織に及ぼす影響については、各種抗癌剤、ADM、CQ⁴⁸⁾、CDDP⁴⁹⁾、MMC⁵⁰⁾、Epi-ADM等にて、動物実験あるいは臨床的に検討が行なわれている。教室の津島は、ビーグル犬を用いたADM、Epi-ADM¹⁸⁾の膀胱腔内注入実験で、高濃度では粘膜の剝離、粘膜下浮腫等の強い変化が認められたと報告している。著者はインターフェロンの膀胱腔内注入による膀胱正常粘膜、粘膜下組織の変化についてビーグル犬を用いて病理組織学的に検討したが、粘膜上皮の剝離、粘膜下浮腫、好中球の浸潤等の炎症所見等は、ほとんど認められなかった。このことはインターフェロンが標的細胞としない正常膀胱上皮細胞には、生物学的活性（抗細胞効果）を発揮しないことによると考えられた。

以上の実験結果より、GKT- β は膀胱癌培養細胞株T24に対し強い殺細胞効果および細胞増殖抑制効果を示し、また高濃度のGKT- β の膀胱腔内注入によるGKT- β の血中ならびに尿中への移行はほとんど無く、かつ高濃度、長時間でも膀胱粘膜への刺激性は極めて少ないことが示唆された。これによりGKT- β は膀胱腔内注入療法として高濃度、長時間投与が可能であり、臨床的にもその有効性は高いことが予想され、臨床的研究を行いたいと考えている。

結 語

表在性膀胱腫瘍に対するインターフェロンの膀胱腔内注入療法への導入を目的としての基礎的研究を行った。

1) ヒト膀胱癌由来培養細胞株T24を用い、各種インターフェロンの濃度別、添加時間別効果をcolony formation methodで検討した。Ro22-8181 (recombinant human interferon β)、GKT- β (recombinant human interferon β)、KW2202 (recombinant human interferon γ) 共に濃度依存性の殺細胞効果を示し、かつその効果は時間依存性でもあった。殺細胞効果はGKT- β が最も強く、一方Ro22-8181、KW2202の殺細胞効果は軽度であった。

2) 人膀胱癌培養細胞株T24に対する殺細胞効果が最も強力であったGKT- β を用い、細胞増殖抑制効果を、growth inhibition assayで検討した。GKT- β はT24細胞に対し強い細胞増殖抑制効果が、濃度依存性および時間依存性に認められた。

3) ビーグル犬を用い、両側尿管皮膚瘻を造設し空置した膀胱内にGKT- β 、KW2202を注入し、血中、尿中移行、臓器内濃度をFL-sindbis系により測定した結果、インターフェロンの膀胱腔内注入による血中、尿

中移行は認められず、臓器内移行は膀胱壁には認められたが、他臓器にはほとんど認められなかった。さらに正常膀胱粘膜、筋層に対する影響を検討したが、病理組織学的変化はほとんど認められなかった。

GKT- β は人膀胱癌培養細胞株 T24 に対し殺細胞効果および細胞増殖抑制効果があり、膀胱腔内注入による GKT- β の血中並びに尿中への移行は認められず、また膀胱粘膜刺激性は、極めて少ないことが示され、GKT- β の膀胱腔内注入療法の臨床への導入が可能であることが示唆された。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師大森弘之教授に深く感謝致します。さらに、貴重な御助言を賜った松村陽右助教授、直接本実験を御指導下さいました吉本純講師に深謝致します。また、本学癌源研究施設病理学部門、佐藤二郎教授に感謝致します。最後に、T24細胞を御提供下さいました日本医科大学付属第一医院泌尿器科、中神義三助教授ならびに実験助手をつとめられた守谷由美子、小坂 民、原淵尚子女史に謝意を表します。

本論文の要旨は、第76回日本泌尿器科学会総会（新潟）、および第46回日本癌学会総会（東京）にて報告した。

文 献

- 1) 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.
- 2) 志田圭三, 他：膀胱腫瘍に対するマイトマイシン C の膀胱腔内注入療法（第 1 報）。新薬治験, 21, 1057—1058, 1967.
- 3) 津島知靖：表在性膀胱腫瘍に対する 4'-epiadrinycin の膀胱腔内注入療法（Randomized）。泌尿紀要, 31, 2215—2218, 1985.
- 4) Bubenik, J., et al.: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumor-specific antigen. Int. J. Cancer, 11, 765—773, 1973.
- 5) 吉本 純：人膀胱癌培養細胞株の性ホルモン感受性に関する研究。日泌尿会誌, 72, 192—199, 1981.
- 6) 大森弘之：表在性膀胱腫瘍に対する膀胱腔内注入療法。癌と化学療法, 11, 1557—1562, 1984.
- 7) Matumura, Y., Ozaki, Y., Ohmori, H. and Okayama Urological Cancer Collaborative Group (OUCCG): Intravesical adriamycin chemotherapy in bladder cancer. Cancer Chemo. Pharm., 11(Suppl.), S69—S73, 1983.
- 8) Semple, J.E.: Papilloma of bladder treated with podophyllin. Preliminary report. Brit. Med. J., 1, 1235—1237, 1948.
- 9) Jones, H.C. and Swinney, J.: Thiotepa in the treatment of tumors of the bladder. Lancet, 2, 615—618, 1961.

- 10) Vennema, R.J., et al.: Bladder carcinoma treated by direct instillation of thio-TEPA. J. Urol., 88, 60—63, 1962.
- 11) Abbassian, A. and Wallace, D.M.: Intracavitary chemotherapy of diffuse non-infiltrating papillary carcinoma of the bladder. J. Urol., 96, 461—465, 1966.
- 12) 土田正義, 熊谷郁太郎：膀胱腫瘍に対する Carboquone の膀胱内注入療法。泌尿紀要, 22, 263—272, 1976.
- 13) 高井修道, 他：Aclacinomycin 膀胱内注入による膀胱腫瘍の治療。新薬と臨床, 29, 21—25, 1980.
- 14) 窪田吉信, 他：膀胱癌の Hyperthermia 療法：Bleomycin および放射線との併用について。日癌治療会誌, 13, 394—405, 1978.
- 15) 平尾佳彦, 他：膀胱腫瘍に対する cis-diamminedichloroplatinum (II) の膀胱内注入に関する基礎的研究。泌尿紀要, 31, 1565—1573, 1985.
- 16) 田中正利, 他：表在性膀胱腫瘍に対する Cisplatin の膀胱内注入療法。西日泌尿, 48, 117—121, 1986.
- 17) Morales, A., Edinger, D. and Brice, A.W.: Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment superficial bladder tumor. J. Urol., 116, 180—183, 1976.
- 18) 津島知靖：膀胱腫瘍に対する 4'-epiadrinycin の膀胱腔内注入療法に関する基礎的研究。泌尿紀要, 31, 1945—1956, 1985.
- 19) 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 2. 実験的研究。日泌尿会誌, 69, 817—827, 1978.
- 20) Morales, A., Ottenhof, P. and Emerson, L.: Treatment of residual, non-infiltrating bladder cancer with bacillus Calmette-Guerin. J. Urol., 125, 649—651, 1981.
- 21) de Kernion, J.B., Huang, M., 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.
- 22) Nagano, Y. and Kojima, Y.: Immunity et interference dans la vaccine. Inhibition de infection determinee par le virus inactif. C. R. So. Biol., 148, 750—752, 1954.
- 23) Isaacs, A. and Lidenmann, J.: Virus interference: I. The interferon. Proc. Roy. Soc. B., 147, 258—267, 1957.
- 24) Strander, H., Cantel, K. and Caristrom, G.: Clinical and laboratory investigations on man, systemic administration of potent interferon to man. J. Natl. Cancer Inst., 51, 733—742, 1973.
- 25) Gutterman, J.U., et al.: Leukocyte interferon induced tumor regression in human metastatic

- breast cancer, multiple myeloma, and malignant lymphoma. *Ann. Int. Med.*, 93, 399—406, 1980.
- 26) Mellstedt, H., et al.: Interferon therapy in myelomatosis. *Lancet* 1, 245—247, 1979.
 - 27) Kimura, K.: Overview of phase study of human lymphoblastoid interferon (HLBI) for solid tumor and blood cancer in Japan. In: *Interferons* (ed. Kishida, T.), p. 157—162, 1983.
 - 28) 新島端夫: 組替え型ヒト白血球インターフェロン A (rIFN α A) の泌尿器系悪性腫瘍に対する臨床効果の検討. *癌と化学療法*, 12, 921—927, 1985.
 - 29) 丸茂 健, 他: 進行腎細胞癌に対するヒト α 型インターフェロンの抗腫瘍効果とその免疫学的検討. *日泌尿会誌*, 76, 965—973, 1985.
 - 30) 永井政勝: 悪性脳腫瘍に対する human fibroblast interferon の臨床的検討. *日癌誌会誌*, 18, 60—68, 1983.
 - 31) 高倉公朋: インターフェロン- β (MR-21) の悪性脳腫瘍に対する臨床効果の検討. *日癌治会誌*, 22, 801—808, 1987.
 - 32) 石原和之: Human fibroblastoid interferon (HuIFN β) による皮膚悪性腫瘍に対する臨床的研究—一局所投与を中心とした検討—. *日癌治療会誌*, 18, 41—53, 1983.
 - 33) Gresser, I., Bandu, M.T., et al.: Interferon and cell division VII. Inhibitory effect of highly purified interferon preparations on the multiplication of leukemia L1210 cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142, 7—10, 1973.
 - 34) Yamada, H. and Shmoyama, M.: Growth inhibitory activity of human lymphoblastoid and fibroblast interferons in vitro. *Gann*, 74, 1983.
 - 35) 下山正徳, 他: インターフェロンの直接作用的抗腫瘍活性と臨床治験. *癌の臨床*, 29, 589—597, 1983.
 - 36) Gidlund, M., Orn, A., et al.: Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature*, 237, 759—761, 1978.
 - 37) Herbermann, R.R., Ortaldo, J.R. and Bonnard, G.D.: Augmentation by interferon of human natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Nature*, 277, 221—223, 1979.
 - 38) Scultz, R.M., Papamatheakis, J.D. and Chirigos, M.A.: Interferon, an inducer of macrophage activation by polyanions. *Science*, 197, 674—676, 1977.
 - 39) Gresser, I., Tovey, M.G.: Antitumor effects of interferon. *Biochim. Biophys. Acta*, 561, 231—247, 1978.
 - 40) 山田 尚, 下山正徳: ヒト線維芽細胞由来インターフェロンの各種造血管腫瘍由来培養株細胞に対する増殖抑制作用に対する解析. *癌の臨床*, 28, 1688—1694, 1982.
 - 41) 関口 浩: 培養ヒト膀胱癌細胞株による制癌剤感受性試験. *日泌尿会誌*, 74, 25—31, 1983.
 - 42) 米原 伸: インターフェロンのレセプターシステム. *癌と化学療法*, 11, 44—52, 1984.
 - 43) 原口惣一, 他: 組替えインターフェロン α -2b による in vitro 抗腫瘍活性の多面的検討. *癌と化学療法*, 9, 3236—3243, 1986.
 - 44) 三品輝男: 膀胱腔内注入療法の基礎と臨床. *日泌尿会誌*, 73, 1516—1522, 1982.
 - 45) 都田慶一, 三品輝男: FT-207 と 5FU の経膀胱吸収に関する比較. *泌尿紀要*, 28, 949—952, 1982.
 - 46) 中川修一, 他: FT-207 と 5-FU の経膀胱的吸収に関する比較. *泌尿紀要*, 31, 1227—1231, 1985.
 - 47) Yeates, W.K.: 文献⁹⁾より引用.
 - 48) 岡島英五郎, 伊集院真澄, 他: 膀胱腫瘍に対する Calboquone の膀胱腔内注入療法に関する基礎的研究—正常 Beagle 犬に対する Calboquone の膀胱腔内注入による影響について—. *泌尿紀要*, 29, 1061—1074, 1983.
 - 49) 平尾佳彦, 他: 膀胱腫瘍に対する cis-Diamminedichloroplatinum (に) の膀胱腔内注入療法に関する基礎的研究. *泌尿紀要*, 31, 31—38, 1985.
 - 50) 小川秀爾, 平岡保紀, 河合 博: 膀胱腫瘍に対する抗腫瘍の膀胱腔内注入療法. 第5報. Mitomycin C の正常膀胱と膀胱腫瘍とに対する作用の相違 (基礎的臨床的研究). *日泌尿会誌*, 74, 596—607, 1983.
(1988年11月8日受理, 特別掲載)