Bromodeoxyuridine 標識法により観察したラット膀胱前癌病変 における S 期細胞の割合及び分布状態の変化

旭川医科大学泌尿器科学教室 (主任: 八竹 直教授)

橋本 博 佐々木正人 藤沢 真
金子 茂男 徳中 荘平 八竹 直

THE CHANGES OF POPULATION AND DISTRIBUTION OF S-PHASE CELLS IN PRECANCEROUS LESIONS OF RAT BLADDER REVEALED BY THE METHOD OF BROMODEOXYURIDINE LABELING

Hiroshi Hashimoto, Masato Sasaki, Makoto Fujisawa, Shigeo Kaneko,
Sohei Tokunaka and Sunao Yachiku

Department of Urology, Asahikawa Medical College
(Director: Prof. S. Yachiku)

We studied whether bromodeoxyuridine (BrdU)-labeling method showing the population and/or distribution of S-phase cells in tumor tissues is useful to detect the precancerous lesions of bladder.

The bladder lesions were induced by 0.05% N-butyl-N (4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) in drinking water for ten weeks in five male rats (Wister-Imamichi). BrdU (50 mg/kg) was injected to intraperitoneal space two hours before the resection of the bladder. The detection of positive cells (S-phase cells taking BrdU) was performed by peroxidase-antiperoxidase method. From five bladder specimens 144 lesions (simple hyperplasia (S)-73, papillary or nodular hyperplasia (PN)-57, papilloma (Pa)-14) were analysed. The labeling index (the ratio of positive cells to all epithelial cells in one lesion) showed no significant difference among the lesions (S, PN, and Pa).

For analyses of the distribution patterns of S-phase cells, we investigated whether positive cells aside from basal layers and/or the serial positive cells in basal layers were seen or not in each lesion. The ratios of lesions containing positive cells aside from basal layers were 11% (8/73), 60% (34/57) and 100% (14/14) in S, PN and Pa lesions. The serial positive cells in basal layers were observed in 6% (4/73), 25% (14/57) and 50% (7/14) of S, PN and Pa lesions. Those differences were statistically significant.

Above mentioned results suggest that the appearance of S-phase cells aside from basal layers and/or the serial S-phase cells in basal layers is characteristic change in precancerous lesions, which is useful for sooner detection of bladder carcinogenesis.

Key words: bladder carcinoma, precancerous lesion, bromodeoxyuridine

要旨: 膀胱の前癌病変の把握に, bromodeoxyuridine (BrdU) 標識法による, S 期細胞の比率や分布様式の観察が有用であるかを検討した。

雄ラット 5 匹に 0.05% BBN を 10 週間摂取させ 50mg/kg の BrdU を腹腔内に投与した 2 時間後に膀胱を摘出, PAP 法により BrdU 陽性細胞を同定し検討した。組織学的に, 単純性過形成 (S) を 73, 乳頭状あるいは結節状過形成 (PN) を 57, 乳頭腫 (Pa) を 14 病巣観察したが, 陽性細胞 (S 期細胞) の比率での点では, 組織の grade up に比例した有意の増加は認められなかった。

陽性細胞の分布様式の検討では, 基底膜と離れた細胞 (非基底細胞) における陽性所見の有無, 及び, 基底膜上における陽性細胞の連続性の有無を観察した。その結果, 非基底細胞における陽性所見が得られた割合は, S で 11% (8/73), PN で 60% (34/57), Pa で 100% (14/14) であった。また, 基底膜上で

陽性細胞が連続して観察できた病巣の割合は、Sで6% (4/73)、PNで25% (14/57)、Paで50% (7/14)であった。これらはいずれも有意の増加を示していた。

以上の結果より、S→PN→Paと言う発癌の初期の過程で、非基底部分のS期細胞や、基底膜上で連続するS期細胞の出現することが特徴的な所見と考えられ、このような観察が癌化の危険を早期に知る手掛りになると思われた。

キーワード：膀胱癌，前癌病変，ブロモデオキシウリジン

緒 言

膀胱腫瘍の治療・予防を考える場合、発癌の初期変化（いわゆる前癌病変）を適確にとらえることが、主要なポイントの1つであると思われる。このことは、癌の早期発見・早期治療と言う点で、更には、膀胱発癌の機転を考える上で、重要な示唆を与えるものと考えられる。

今回我々は、ラットの膀胱発癌過程を、bromodeoxyuridine (BrdU) 標識法 (thymidine analogueであるBrdUの取り込みによりS期細胞を同定する方法)により観察したところ、発癌の初期の過程で、S期細胞の分布に特徴的な変化が生じることを見出した。この所見は、臨床の場における前癌病変の検出に応用できると思われ、また、発癌過程の細胞動態を示す興味ある知見と考えられたので、以下に報告する。

対象と方法

(1) 実験動物：4週齢の雄ラット (Wistar-Imamichi) 5匹を用いた。

(2) 発癌剤の投与：N-butyl-N (4-hydroxy-butyl) nitrosamine (BBN, 東京化成)を0.05%となるよう、少量のTween 80とともに水道水に溶解し、10週間自由摂取させた。

(3) 膀胱の摘出：上記のBBNを投与後、50mg/kgのBrdU (Sigma)を腹腔内に注射し、その2時間後に膀胱を摘出した。

(4) 膀胱の固定・包埋：摘出した膀胱内に70%アルコールを1ml注入し膀胱頸部を結び、更に同固定液中に24時間浸漬した。包埋は通常のパラフィン包埋を行った。

(5) 組織染色：各膀胱の中央より5 μ mの切片を作製し、以下の手順で組織中に取り込まれたBrdUを染色した。

(*を付した試薬はHISTOGEN PAP System-Bio Genex Labo.による)

1) 通常の方法で脱パラフィン，水洗。

2) phosphate buffer saline (PBS; 0.01M, pH7.2)にて洗浄後，3% hydrogen peroxide*を室温・10分反

応させ，内因性 peroxidase の block を行なった。

3) PBS 洗浄後，2N HCL を37℃・30分反応させDNAの単鎖化を行なった。

4) 0.1M sodium tetraborateにて洗浄，中和し，更にPBS洗浄。

5) 抗体の非特異的付着を阻止するためnormal goat serum*を室温・20分反応させた。

6) anti-BrdU mouse monoclonal antibody (Becton-Dickinson)と0.5%Tween 20 in PBSを2:5に混じた溶液にて切片を覆い，室温・30分反応させた。

7) PBS 洗浄後，goat anti-mouse immunoglobulin*を室温・20分，更に同洗浄後，peroxidase mouse anti-peroxidase*を室温・20分反応させた。

8) PBS 洗浄後，3-amino-9-ethylcarbazole(AEC)-hydrogen peroxide solution*にて室温・15分切片を覆い，反応部位の発色を行なった。

9) 水洗後，hematoxylinでcounter stainを行ない，glyserol geratinにて封入し観察した。

(6) 所見の評価：各組織切片に見られた病変について、これまでの諸家の報告に従い、正常上皮、単純性過形成、乳頭状あるいは結節状過形成、乳頭腫、癌と言う5段階の分類をした¹⁾。これら5段階の中で、いわゆる前癌病変と言える単純性過形成、乳頭状あるいは結節状過形成、乳頭腫の3病変に特に注目しS期細胞の比率(標準率)とS期細胞の分布がどのような変化を生じるかどうかを検討した。分布様式の評価として、第一には、陽性所見が粘膜下組織に接する基底膜上の細胞(基底細胞)にみられるのか、あるいは、それ以外の細胞(非基底細胞)にみられるのかを観察した。第二に、基底膜上におけるS期細胞の連続性の有無を見た。

結 果

(1) 正常膀胱上皮

図1に見るように、正常上皮においては、陽性細胞(S期細胞)は基底膜上のみ孤立性に見られ、連続性や非基底細胞の陽性所見は認められなかった。また、

図1 正常膀胱上皮：赤褐色の陽性細胞が基底膜上に、孤立性に見られている。

図2 単純性過形成：正常上皮と同様に，陽性細胞は基底膜上に孤立性に見られる事が多かった。

図3 結節状過形成：基底膜と離れた細胞の陽性所見が明瞭に認められる。

図4 乳頭腫：この部分では、陽性細胞の半数近くが基底膜と離れた細胞（非基底細胞）であり、また陽性細胞の連続性も見られる（矢印）。

表 1 標識率

病理所見 (病巣数)	標識率 (%)*	P 値**
S*** (73)	199/12680 (1.6)	<0.002 N. S.
P N*** (57)	528/24103 (2.2)	
P a*** (14)	278/13321 (2.1)	

* 検索し得た病巣を形成するすべての上皮細胞に対する、陽性細胞の割合を、各病理所見毎に算出したもの
** 標準正規分布表を用いた検定
*** S : 単純性過形成 (simple hyperplasia)
P N : 乳頭状あるいは結節状過形成 (papillary or nodular hyperplasia)
P a : 乳頭腫 (papilloma)

表 2 非基底陽性細胞の割合

病理所見	非基底陽性細胞数/総陽性細胞数 (%)*	P 値
S	12/199 (6.0)	<0.002
P N	144/528 (27.3)	
P a	131/278 (47.1)	<0.002

* 陽性細胞全体に対する、基底細胞以外の陽性細胞の割合を、各病理所見毎に算出したもの

表 3 非基底陽性細胞の検出率

病理所見	検出率 (%)*	P 値
S	8/73 (11.0)	<0.002
P N	34/57 (59.6)	
P a	14/14 (100.0)	<0.01

* 基底細胞以外に、陽性細胞を検出できた病巣の割合を、各病理所見毎に算出したもの

表 4 連続する陽性細胞の検出率

病理所見	検出率 (%)*	P 値
S	4/73 (5.6)	<0.002
P N	14/57 (24.6)	
P a	7/14 (50.0)	<0.05

* 基底膜上において、陽性細胞の連続を検出できた病巣の割合を、各病理所見毎に算出したもの

5 匹の膀胱より12カ所の正常部分を検討し、標識率は0.9%~1.6% (平均1.4%) であった。

(2) 単純性過形成

この病変においては、非基底細胞の陽性所見や、陽性細胞の連続性が、一部に認められた。しかし大部分の病巣では、正常上皮に以て、基底膜に接する、孤立性の陽性細胞のみがみられた (図 2)。

5 匹の膀胱組織から、73カ所の単純性過形成を観察し得たが、標準率は平均1.6%、陽性細胞全体に占める非基底細胞の割合は6.0%であった。また、73病巣の内、8 病巣 (11.0%) で非基底陽性細胞を、4 病巣 (5.6%) で連続する陽性細胞を検出した (表 1 ~ 4)。

(3) 結節状過形成

図 3 は、上皮が8 ないし10層に肥厚し、内腔への突出傾向や下方増殖を伴う結節状過形成の部分である。標識率はさほど高くないが基底膜と離れた部分の陽性細胞が明瞭に認められる。

結節状過形成は、計57病巣観察でき、標識率は平均2.2%、陽性細胞全体に占める非基底細胞の割合は27.3%であった。57病巣中、非基底陽性細胞及び連続する陽性細胞の検出率はそれぞれ59.6%、24.6%であった (表 1 ~ 4)。

(4) 乳頭腫

図 4 に乳頭腫を示すが、基底膜上以外の陽性細胞や、陽性細胞の連続性が明らかに認められている。

乳頭腫は、計14病巣観察でき、標準率は平均2.1%、陽性細胞全体に占める非基底細胞の割合は47.1%であった。14病巣中、非基底陽性細胞及び連続する陽性細胞の検出率はそれぞれ100%、50%であった (表 1 ~ 4)。

(5) 所見のまとめ (表 1 ~ 4)

5 匹の膀胱より観察し得た病巣数は、単純性過形成 (S) が73、乳頭状あるいは結節状過形成 (PN) が57、乳頭腫 (Pa) が14であった。まず標準率を見ると、S が1.6%、PN が2.2%、Pa が2.1%となった。PN はS に比し、検定上有意に高い標識率であったが、Pa はPN よりもむしろ若干低い結果であり組織の grade up に比例した標識率の増加は明らかではなかった。

陽性細胞全体の中に占める非基底陽性細胞の割合を見ると、S、PN、Pa という過程で、有意差をもって増加していることがわかった。また、S、PN、Pa において、各病巣毎に、基底膜上以外に陽性細胞を検出した率と基底膜上で連続する陽性細胞を検出した率を見ると、やはり有意差をもってそれぞれ増加を示していた。

考 察

悪性腫瘍の最も基本的な性格である増殖という現象は、DNA の活発な合成に由来していると考えられ、S 期細胞の動態を見ることが悪性腫瘍の発生や進展を把握することにつながると思われる。

従来、組織切片上での S 期細胞同定法として、³H-

thymidine を用いる方法が知られていたが²⁾, 放射性物質を用いるという点で, 種々の使用上の制限があった。1982年に, Gratzner が, thymidine analogue である BrdU に対するモノクローナル抗体を開発してからは³⁾, S 期細胞同定として, BrdU 標識法がその簡便さから広く行なわれるようになっていく。この BrdU 標識法を用いて, 悪性腫瘍の細胞動態を検索した報告によると, 腫瘍細胞全体を占める S 期細胞の割合 (いわゆる標識率) が, 腫瘍の悪性度 (いわゆる grade や stage) に比例して高くなるとされており^{4)~6)}, これが悪性度を示す 1 つの指標になると考えられる。

今回の検討では, 癌化の初期に, S 期細胞の動態に何らかの特徴的な変化が現れないかどうかを見るため, 膀胱発癌過程の詳細が明らかとなっている BBN 投与ラットを BrdU 標識法により観察した。

BBN によりラット膀胱に癌が発生する過程では, まず単純性過形成が出現するが, これは BBN の投与を中止することで正常状態に復する可逆性病変と言われる。また, 次に出現する乳頭状あるいは結節状過形成は, BBN 投与を中止しても, 一部は次の乳頭腫を経て癌に至る, 可逆性・不可逆性の接点の病変であり, 乳頭腫は確実に癌に移行する不可逆性の病変と言われる¹⁾。このような一連の過程を BrdU 標識法で観察した結果, 発癌の危険が高まるにつれて, 標識率の増加もさることながら, 非基底部分の陽性細胞や, 基底膜上で連続する陽性細胞の出現することがわかった (表 1~4)。このことより, 基底膜上の不連続な DNA 合成 (その全て, あるいは一部) は正常の代謝におけるもの, いわゆる Scheduled DNA Synthesis であるが, そうでない場合には, 癌化の危険を知らせる, いわゆる Unscheduled DNA Synthesis であるとの推定が可能であると思われた。

Tatematsu らも, 我々と同様の実験系を用いて, 類いの報告をしており, BrdU 陽性細胞が基底部分にとどまらず, 上皮層内全体に分布することが, 不可逆性病変の所見であるとしている⁷⁾。我々の実験と異なるのは, Tatematsu らが, 膀胱摘出前の 4 日間, BrdU を連続皮下投与しているのに比し, 我々は膀胱摘出の 2 時間前に腹腔内に一回投与をしている点である。この点については, BrdU の長時間連続投与を行えば, S 期細胞をより広範に確実に捉えることができると考えられるが, それを実際に取り込んで DNA を合成した S 期細胞 (母細胞) のみならず, その細胞の分裂の結果生じた娘細胞をも認識してしまう可能性があると思わ

れる。Tatematsu らの示している組織像を見ると, 上皮層内全体に陽性細胞が分布する場合も, 基底細胞から表層へと連続性に陽性細胞が分布しており, これら陽性細胞がすべて S 期細胞を示すものではなく, 先に述べた娘細胞を含んでいる可能性が考えられる。非基底細胞の中の, その時点における S 期細胞のみを認識すると言う立場で考えると, 一回投与法が適切であると思われる。いずれにせよ, Tatematsu の結果も我々の結果も, 非基底部分の陽性所見が不可逆性病変の指標として重要であることを示している。

このように, BrdU 標識法において, 陽性細胞の分布に着目することにより, 前癌状態を早期に発見できる可能性が考えられる。更に膀胱発癌の機転を考える上では, まず, 正常状態で基底細胞にのみ DNA 合成を認めることは, 中間層細胞や表層細胞への分化の過程で DNA 合成の switch off が起こっているものと推定される。この switch off が何らかの理由で行なわれず, 基底細胞以外でも DNA 合成が起こることが, 細胞の癌化に関与している可能性が考えられる。隣接する細胞で, 同時に DNA 合成が起きている事 (連続する基底細胞の陽性所見) についても, 組織の grade up に比例して多く見られた事実より, その具体的な機序等については, 現時点では全く不明ながら, 発癌過程での何らかの促進的な役割も予想される。

以上の所見がヒト膀胱の発癌過程でも見られるかどうか, 今後検討されなければならないが, 同様の所見が得られたならば, 発癌の危険をより早期に, また確実に知る手掛かりとなると考えられる。

結 語

1) BBN 投与によるラット膀胱の発癌過程を BrdU 標識法により観察し, S 期細胞の割合 (標識率) と分布を検討した。

2) 単純性過形成→結節状あるいは乳頭状過形成→乳頭腫と言う発癌の初期の過程で, 標識率の増加もさることながら, 非基底部分の S 期細胞や, 基底膜上で連続する S 期細胞の出現することが特徴的と考えられた。

3) このような, 正常状態では見られない S 期細胞の分布は, 癌化の危険を早期に知る上で, 重要な所見である可能性が考えられる。

文 献

- 1) Ito, N., Hiasa, Y., Tamai, A., Okajima, E. and Kitamura, H.: Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N(4-

- hydroxybutyl) nitorosamine in rats. *Gann*, 60, 401—410, 1969.
- 2) Sasaki, K., Takahashi, M., Ogino, T. and Okuda, S.: An autoradiographic study on the labeling index of biopsy specimens from gastric cancers. *Cancer*, 54, 1307—1309, 1984.
 - 3) Gratzner, H.G.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218, 474—475, 1982.
 - 4) Nemoto, R., Uchida, K., Shimazui, T., Hattori, K., Koiso, K. and Harada, M.: Immunocytochemical demonstration of S phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in human prostate adenocarcinoma. *J. Urol.*, 141, 337—340, 1989.
 - 5) 菊山成博: Bromodeoxyuridine および免疫組織化学的手法を用いたヒト癌細胞動態の基礎的, 臨床的研究. *日外会誌*, 90, 355—363, 1989.
 - 6) Tsujihashi, H., Matsuda, H., Uejima, S., Akiyama, T. and Kurita, T.: Cell proliferation of human bladder tumors. *J. Urol.*, 142, 1113—1116, 1989.
 - 7) Tatematsu, M., Fukushima, S., Aoki, T., Mera, Y., Inoue, T. and Ito, N.: Patterns of epithelial proliferation revealed by continuous administration of bromodeoxyuridine during urinary bladder carcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78, 879—882, 1987.

(1990年6月5日受理)