BBN 誘発マウス膀胱癌に関する研究

Freund Complete Adjuvant の発癌抑制効果と 宿主免疫能の変化について

北海道大学泌尿器科学教室 (主任: 小柳知彦教授)

斉藤文志郎 大橋 立彦 富樫 正樹 小柳 知彦

THE STUDY OF BBN INDUCED BLADDER CANCER IN MICE

Influence of Freund Complete Adjuvant and Associated Immunological Reactions in Mice

Bunshiro Saito, Tatsuhiko Ohashi, Masaki Togashi and Tomohiko Koyanagi

Department of Urology, Hokkaido University, School of Medicine

(Director: Prof. T. Koyanagi)

To evaluate the genetic difference in induction of bladder cancer by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN), BBN was given to two different strains of mice, i.e. A/J (BCG resistant) strains and C57BL/6 (BCG susceptible) strains. The influence of Freund complete adjuvant (FCA), which includes BCG, was similarly examined along with associated cellular immunity as evaluated by footpad reaction (FPR).

The results were as follows:

1. The incidence of bladder cancer was significantly higher in C57BL/6 strains (90.0%) than A/J strains (54.5%).
2. FCA reduced the incidence of bladder cancer significantly in C57BL/6 strains.
3. FPR, which reflects the delayed type hypersensitivity, was activated significantly in FCA treated C57BL/6 strains.

These data suggest that the strain differences in mice probably explains the inhibition of carcinogenesis by FCA and cellular immunity.

Key words: bladder cancer, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine, freund complete adjuvant

要旨: BCG に対し感受性が低い A/J 系マウスと感受性が高い C57BL/6 系マウスに対し, BBN 誘発膀胱発癌実験を行ない, BCG 死菌を含む Freund の完全アジュバント (FCA) による発癌抑制効果と宿主免疫能の変化を検討し, 以下の結果を得た.

1. FCA 非投与群の発癌率は A/J 系 54.5%, C57BL/6 系 90.9% と, 2 系統間で発癌率に有意差を認めた.
2. FCA 投与群の発癌率は A/J 系 45.5%, C57BL/6 系 18.2% であり, C57BL/6 系で発癌抑制効果を認めた.
3. 細胞性免疫能の指標である Footpad 反応は, A/J 系において FCA 投与群・非投与群各々 $11.3 \pm 1.27\%$, $10.2 \pm 0.99\%$ と有意差を認めなかったが, C57BL/6 系では $46.2 \pm 6.01\%$, $11.1 \pm 1.29\%$ と FCA 投与群で有意に亢進していた.

以上よりマウス BBN 誘発膀胱癌の発癌率は系統間差があり, FCA による発癌抑制効果・宿主免疫能変化も異なることが判明した.

キーワード: 膀胱癌, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine,

フロイドの完全アジュバント

結 言

膀胱腫瘍に対する非特異的免疫療法として Bacillus Calmette-Guerin (BCG) の膀胱内注入療法は臨床的に広く試みられている。しかしその抗腫瘍効果に関する機序は必ずしも明確ではなく、BCG 療法に抵抗し進行する症例も経験する。この BCG に対する宿主抵抗性に関し Skamene ら¹⁾は抗酸菌に対するマウス宿主抵抗性の遺伝学的研究を行ない、BCG gene が重要な遺伝子の一つであることを発見した。また Pelletier ら²⁾もこれらマウスの系統により BCG に対する免疫反応が異なることを証明した。大橋らは³⁾BCG 死菌を含む免疫アジュバントである Freund Complete Adjuvant (FCA) が N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) 誘発によるマウス膀胱粘膜上皮の重層化を低下させると報告した。今回われわれは BCG に対する反応が異なる 2 系統のマウスを用い、FCA が BBN 誘発膀胱発癌に及ぼす発癌抑制効果を光顕的に、また FCA による宿主免疫能の変化を遅延型アレルギー反応により検討したので報告する。

材料および方法

1. BBN 誘発膀胱癌に対する FCA の効果

1) 実験動物

実験に使用したマウスは 7 週齢雌の A/J 系 22 匹、C57BL/6 系 22 匹で静岡動物実験センターより供給されたものである。

2) BBN 誘発膀胱癌と発癌判定

これらのマウスに BBN (東京化成) 0.05%, Tween-80 (Sigma), acromycin (250mg/200ml) を水溶液として経口的に自由摂取とした。10 週間の BBN 投与に続き水道水を自由摂取として、BBN 投与開始 16 週目に屠殺した。摘出した膀胱はホルマリン固定後パラフィン包埋し、各膀胱につき 6 カ所の切片を作り、Hematoxylin Eosin (HE) 染色を行ない光顕的に検索し、1 カ所でも癌病巣が認められたものを発癌陽性とした。

3) FCA 投与と実験群

BBN 発癌に対する FCA の発癌抑制効果を見るために、BBN 投与直前に FCA 200 μ l (BCG 死菌 0.2mg) を下腹部・大腿部に皮下注射した。各群の内訳は Table 1 のごとくである。

2. FCA 投与による宿主免疫能の変化

同じく 2 系統マウス (各群 3 匹) に対し、FCA 投与による宿主免疫能の変化を Footpad 反応 (FPR) による delayed type hypersensitivity (DTH) にて検討し

た。すなわち 20% ヒツジ赤血球 (SRBC) 0.1ml のみを背部に皮下注射した群と 20% SRBC 0.1ml と FCA 200 μ l を背部に皮下注射した 2 群を作成した。1 週間後、足蹠に 20% SRBC 0.02ml を皮下注射し、24 時間後の足蹠の肥厚率を以下の式で求めた。

$$\% \text{Swelling} = \frac{b-a}{a} \times 100$$

a : 注射前の足蹠厚

b : 注射後の足蹠厚

コントロール群 (各群 3 匹) として生食を 0.1ml 皮下注射、1 週間後に SRBC を同量惹起注射した。

結果の検定は χ^2 検定と t 検定を行なった。

結 果

1. 発癌率

摘出膀胱の光顕像を Fig. 2 に示す。発癌が見られたものは、ほとんどが低分化型の移行上皮癌であった。各群別の発癌率は Table 1 のごとくであり、FCA 非投与群の A/J 系マウスの発癌率は 6/11 (54.5%) であったのに対し、C57BL/6 系マウスでは 10/11 (90.9%) と有意に高い発癌率を示した ($p < 0.01$)。

Fig. 1 The effect of FCA on the Footpad reaction (%swelling of pre-and post-immunized footpad thickness). Group A' : A/J strain, FCA was not given. Group B' : A/J strain, 200 μ l of FCA was given subcutaneous root. Group C' : C57BL/6 strain, FCA was not given. Group D' : C57BL/6 strain, 200 μ l of FCA was given subcutaneous root. Control : A/J or C57BL/6 strain, not-immunized.

Table 1 The incidence of bladder cancer induced by BBN

Group	Strain	FCA 200 μ l	Rate of Ca (%)	
A	A/J	(+)	5/11 (45.5)	] n.s.
B		(-)	6/11 (54.5)	
C	C57BL/6	(+)	2/11 (18.2)	] P < 0.01
D		(-)	10/11 (90.9)	

Fig. 2 Histology of BBN treated bladder epithelium. ($\times 200$ H.E. staining) A : Group A : A/J strain, FCA (+). B : Group D, C57BL/6 strain, FCA (-).

一方 A/J 系マウスにおける FCA 投与・非投与群の発癌率は各々 45.5%, 54.5% で有意差を認めなかった ($p < 0.1$). それに対し C57BL/6 系マウスでは各々 18.2%, 90.9% と FCA 投与群が有意差を持って発癌率の低下を認めた ($p < 0.01$).

2. DTH 反応

SRBC に対する FPR の結果は Fig. 1 のごとくであり, SRBC 免疫群はコントロール群に対して全て有意に高い反応を認めた ($p < 0.01$). また A/J 系マウスでは FCA 非投与群の足蹠肥厚率が $10.2 \pm 0.99\%$ であったのに対し, FCA 投与群では $11.3 \pm 1.27\%$ であり両群間に有意差を認めなかった ($p > 0.1$). 一方, C57BL/6 系マウスでは FCA 非投与群の足蹠肥厚率が $11.1 \pm 1.29\%$ であったのに対し, FCA 投与群では $46.2 \pm 6.01\%$ と有意に高い肥厚率を示した ($p < 0.01$).

考 察

BBN は膀胱に特異的な発癌物質で発癌率も高く, マウスにおいては結節型・浸潤型の発癌形態をとり, ヒトの浸潤型膀胱腫瘍モデルとして適するとされている⁴⁾. ラットやマウスでは発癌率に系統間差があり, A/J 系で 40~50%, C57BL/6 系で 80~100% とされている^{5)~7)}. 今回の実験でも BBN 投与による発癌率は A/J 系で 54.5%, C57BL/6 系で 90.9% と諸家の報告と同様, 系統間差を認めた.

膀胱腫瘍に対する BCG 膀胱内注入療法は, Morales ら⁸⁾の報告以来, 臨床的に確立された治療法となっており, すぐれた腫瘍縮小効果・再発予防効果をあげている⁹⁾. その抗腫瘍効果発現機序については, 膀胱粘膜局所における直接的な炎症惹起作用が挙げられるが, 臨床的に BCG の大量経口投与で膀胱腫瘍縮小効果を

認め¹⁰⁾, 強力な炎症惹起物質である Dinitrochloride benzene (DNCB) の膀胱内注入では抗腫瘍効果を示さなかった¹¹⁾とする報告, あるいはヌードマウスの膀胱内注入では効果を認めなかった¹²⁾など BCG の直接的な腫瘍接触効果のみでは抗腫瘍効果発現の説明は困難であり, 何らかの免疫反応を介した二次的効果が中心であると考えられている¹³⁾¹⁴⁾.

また FCA は mineral oil とダタージェントである Arlacel A の混合液に BCG 死菌を加えたものであり, 各種抗原に対する抗体を作成する際のアジュバントとして用いられる強力な免疫系の activator である. 今回の実験では異なる系統マウスで FCA 投与による発癌抑制効果と宿主免疫能変化を検討した. その結果, A/J 系マウスでは発癌抑制効果, DTH 反応の変化ともに認められなかったが, C57BL/6 系マウスでは FCA 投与による発癌抑制効果と DTH 反応の亢進を認めた. Skamene ら¹⁾は BCG を投与した際, 脾臓内で著明な菌増殖をおこすマウス系統を BCG susceptible (BCG^s), 増殖しない系統を BCG resistant (BCG^r) と分類し, マウスでは 1 番目の染色体上にマップされる BCG gene がこの反応に関与しており, BCG 菌をはじめ各種好酸菌に対する宿主の免疫反応を支配するとした¹⁵⁾. また Pelletier ら²⁾は, これらのマウスの BCG 感作に対するリンパ球系の検討より, BCG^sに属する系統は T-リンパ球系の活性が亢進していることを報告した. 前者に属する C57BL/6 系のみで FCA 投与による発癌抑制効果を認め, 細胞性免疫能の指標である DTH 反応が亢進していたことは興味深い.

今回の実験では FCA を用いたが, 必ずしも FCA 内の BCG 菌が発癌抑制の主役とは断定できないまでも

宿主の BCG に対する感受性の違い, 言い換えれば BCG 遺伝子の違いが FCA の発癌抑制効果に影響すること, また効果の発現に細胞性免疫能の亢進が関与していることを示唆するデータであると考えた。ヒトにおける BCG 遺伝子は染色体 2q 上に強いマーカーホモロジーがある¹⁵⁾とされるが, 遺伝子クローンも未完成であり不明な点が多い。しかし今後の研究により, その実体が明確となり遺伝子の違いが容易に判定可能となれば, BCG 療法の効果を予測する指標の 1 つになり得ると考えた。

結 語

BCG に対し感受性が異なる A/J 系・C57BL/6 系マウスに対し BBN 誘発膀胱発癌実験を行ない, FCA に投与による発癌抑制効果ならびに宿主免疫反応の変化を検討し, 以下の結果を得た。

1. 無処置群の発癌率は C57BL/6 系 90.9%, A/J 系 54.5% と 2 系統間に有意差を認めた。

2. BCG に対し感受性が高い C57BL/6 系では FCA 投与により発癌率 18.2% と発癌抑制効果を認めたが, 感受性が低い A/J 系では 45.5% と発癌抑制効果を認めなかった。

3. 細胞性免疫反応を表わす Footpad 反応は, C57BL/6 系において FCA 投与群・非投与群各々 $46.2 \pm 6.01\%$, $11.1 \pm 1.29\%$ と FCA 投与群で有意に亢進していたが, A/J 系では $11.3 \pm 1.27\%$, $10.2 \pm 0.99\%$ と有意差を認めなかった。

4. 以上の結果よりマウスにおける BBN 誘発膀胱癌の発癌率は系統間に差があり, FCA 投与による発癌抑制効果・宿主免疫能変化も異なることが判明した。

本報告の要旨は, 第 297 回日本泌尿器科学会北海道地方会にて発表した。

文 献

- 1) Skamene, E., Gros, P., Forget, A., Kongshaven, P.A.L., Charles, C.S. and Taylor, B.A.: Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature*, 297, 506—509, 1982.
- 2) Pelletier, M., Forget, A., Bourassa, D., Gros, P. and Spamene, E.: Immunopathology of BCG infection in genetically resistant and susceptible mouse strains. *J. of Immunol.*, 129, 2179—2185, 1982.
- 3) 大橋立彦, 松井 傑, 山田智二, 大橋伸生, 斯波光生, 平野哲夫, 小柳知彦: 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. 日泌尿会誌, 79, 1824—1828, 1988.

- 4) 垣添忠生: 現状の概観と問題点. 図説臨床癌シリーズ 4, 第 1 版, 6—12, メジカルビュー社, 東京, 1986.
- 5) 伊東信行: 実験的尿路系腫瘍についての最近の知見. 臨泌, 31, 7—23, 1977.
- 6) Ohtani, M., Kakizoe, T., Sato, S., Sugimura, T. and Fukushima, S.: Strain difference in mice with invasive bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxy buty 1) nitrosamine. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 112, 107—110, 1986.
- 7) Nakanowatari, J., Fukushima, S., Imaida, K., Ito, N. and Nagase, S.: Strain differences in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine bladder carcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 453—459, 1988.
- 8) Morales, A., Eidinger, D. and Bruce, A.: Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin of superficial bladder tumors. *J. Urol.*, 116, 180—183, 1976.
- 9) Herr, H.W., Badalament, R.A., Amato, D.A., Laudon, V.P., Fair, W.R. and Whitmore, Jr. W. F.: Superficial bladder cancer treated with Bacillus Calmette-Guerin: A multivariate analysis of factors affecting tumor progression. *J. Urol.*, 141, 22—29, 1989.
- 10) Netto, Jr. N.R. and Lemos G.C.: Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of infiltrating bladder cancer. *J. Urol.*, 132, 675—677, 1984.
- 11) Lamm, D.L., Hariss, S.C. and Gittes, R.F.: Bacillus Calmette-Guerin and dinitrochloride benzene: Immunopathy of chemically-induced bladder tumor. *Invest. Urol.*, 14, 369—372, 1977.
- 12) Ratliff, T.L., Gillen, D. and Catarona, W.J.: Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J. Urol.*, 137, 155—158, 1987.
- 13) Koga, S., Kiyohara, T., Taniguchi, K., Nishikido, M., Kubota, S., Sakuregi, T., Shindo, K. and Saitoh, Y.: BCG induced killer cell activity. *Urol. Res.*, 16, 351—355, 1988.
- 14) 徳永 徹: 結核の免疫学. *Kekkaku*, 64, 43—55, 1989.
- 15) Skamene, S.: Genetic control of susceptibility to mycobacterial infection. *Rev. Infect. Dis.*, 11, Suppl., 2, S394—S399, 1989.

(1990年 3月14日受理)