N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) nitrosamine によるマウス 膀胱癌の進展に対する陽子線照射の効果

筑波大学臨床医学系泌尿器科 (主任: 小磯謙吉教授)

大谷 幹伸 宮永 直人 野口 良輔 小磯 謙吉

筑波大学陽子線医学利用研究センター

辻 比呂志 有本 卓郎* 稲田 哲雄

北川 俊夫** 辻井 博彦

国立がんセンター泌尿器科

田中 良典 鷺巣 賢一 垣添 忠生

INHIBITION BY PROTON IRRADIATION ON THE DEVELOPMENT OF INVASIVE BLADDER CARCINOMAS INDUCED BY N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL) NITROSAMINE IN MICE

Mikinobu Ohtani, Ryousuke Noguchi, Naoto Miyanaga and Kenikichi Koiso

Department of Urology, Institute of Clinical Medicine, Tsukuba University

(Director: Prof. K. Koiso)

Hiroshi Tsuji, Takurou Arimoto, Tetsuo Inada, Yosio Kitagawa and Hirohiko Tsujii

Proton Medical Research Center, Tsukuba University

Yoshinori Tanaka, Ken-ichi Tobisu and Tadao Kakizoe

Division of Urology, National Cancer Center Tokyo

Fifty-five female C3H/He mice were given 0.05% N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in their drinking water for 18 weeks. In week 19, eleven mice (group 3) were sacrificed to confirm that they all had bladder carcinoma. The remaining mice were divided into two groups. Group 1 received 20 Gy of proton irradiation over the whole pelvis, while group 2 received no treatment as a control. After 3 weeks all the animals were sacrificed and their bladders were resected to weigh and to examine histologically. The average weight of the bladder, as an index of the tumor volume, was 67.7 mg in group 1, 120.6 mg in group 2 and 106.5 mg in group 3. There was a significant differences ($p<0.05$) between group 1 and group 2. The incidences of superficial (pT1) and deeply invasive (pT2-3) bladder carcinomas were [10/18 (56%) and 8/18 (39%)] in group 1, [3/17 (18%) and 14/17 (82%)] in group 2 and [2/11 (18%) and 9/11 (82%)] in group 3, respectively. These rates of incidence were significantly different ($p<0.05$) between group 1 and group 2. However, there was no significant difference ($p=0.068$) between group 1 and group 3. These results indicate that proton irradiation is effective for treatment of invasive bladder carcinoma in mice.

Key words: proton irradiation, bladder carcinoma, mouse

要旨: C3H/He 雌マウスに対し, 0.05%の N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) を飲料水として18週間与えた, 19週目に11頭のマウス (第3群) を屠殺して, 全てに膀胱癌が発生していることを確認した。残りのマウスは二つの群に分け, 第1群は骨盤全体に20Gyの陽子線を照射した。一方第

* 現, 北海道大学放射線科

** 現, 栃木県立がんセンター放射線科

2群は、照射を行わない対照群とした。照射の3週間後全てのマウスを屠殺し、膀胱を切除した。膀胱はホルマリン固定後に重量（≒癌の重量）の測定と、組織学的検索を行なった。膀胱の平均重量（≒癌の重量）は、第1群で67.7mg、第2群で120.6mg、第3群で106.5mgであって、第1群との間にそれぞれ有意な差が認められた（ $p < 0.05$ ）。また表在癌（pT1）と深部浸潤癌（pT2~3）の頻度は、第1群で10/18（56%）と8/18（39%）であった。また第2群のそれは、3/17（18%）と14/17（82%）、第3群のそれは2/11（18%）、9/11（82%）であった。第1群と2群間に有意な差（ $p < 0.05$ ）が認められた。しかし第1群と第3群との差は有意ではなかった（ $p = 0.068$ ）。これらの結果はマウスの膀胱癌に対して、陽性線照射が有効な治療法であることを示唆している。

キーワード：陽性線照射，膀胱癌，マウス

緒 言

浸潤性膀胱癌は急速に進行して極めて予後の悪い疾患である。このため手術療法に放射線療法や化学療法を併用して、治療成績の向上を図ることが通常行なわれている。しかし既に転移がある場合や合併症等で手術が不可能な場合、放射線療法が単独あるいは化学療法との併用でしばしば行なわれる^{1)~4)}。また近年膀胱を保存し得る治療方法として、放射線療法と化学療法の併用が試みられている⁵⁾。この放射線療法の一つである陽子線は、従来の放射線に比較して病巣に高い線量分布を得ることができる特徴がある⁶⁾⁷⁾。今回、この陽子線の効果の基礎的検討を、マウスの浸潤性膀胱癌に対して行なったので報告する。

方 法

動物：

合計55頭の4週齢の雌性C3H/Heマウス（チャールズリバー）を用いた。マウスは、23℃で湿度50%、12時間毎に明暗をくり返す一定環境内で飼育した。1ケージ当たりのマウス飼育数は6~8頭である。

薬剤：

N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine, 以下BBNは東京化成工業より購入した。BBNはコールドルーム内で24~48時間、スターラーで蒸留水と1%のエマルジョンにした。そしてこの1%のエマルジョンを、週2回の割合で0.05%の濃度に水道水で調整して、飲料水としてマウスに与えた。

陽子線：

高エネルギー物理学研究所の500MeV ブースターシンクロトロンより供給され、減速器で250MeVに減速して用いた。そして補正フィルターを用いて、2cmの幅に平坦な線量分布になるように調整した。そして照射は、マウスを麻酔下に5ないし6頭1列に並べ、20mm×16mmの範囲の骨盤部に、1.5Gy/分の割合で一週に合計20Gy行なった。

図1 実験計画

↓：20Gyの陽子線照射，S：Sacrifice，■：0.05% BBN 飲料水中，wks：週

実験計画（図1）

黒色瓶に入れた0.05%のBBNを、全てのマウスに18週間飲料水として与え、膀胱癌を発生させた。実験開始より19週目に、マウスを11頭ないし22頭よりなる3群に無作為に分けた。そして第3群の11頭は、照射前の対照群として屠殺し、膀胱を切除した。残りの第1群には前述の如く、20Gyの陽子線を一度に照射した。第2群は対照として麻酔のみとした。そして照射終了の3週間後に全てのマウスを屠殺して、膀胱癌の大きさの指標としての膀胱重量の測定と、膀胱の病理組織学的な検索を行なった。

膀胱重量（≒癌重量）と病理組織学的検討：

膀胱は10%中性ホルマリンを約0.1ml膀胱内に注入して固定した。膀胱は固定後に判割し、重量を測定した。ついで、半割した膀胱をそれぞれ3つの切片にし、合計6つの連続切片とした。そしてパラフィン包埋の後にH.E染色した。膀胱癌の浸潤度は膀胱癌取り扱い規約に準じてpT1~pT3に分類した⁸⁾（図2）。

統計処理：

膀胱の重量の比較はStudent's t-testで行い、膀胱癌の浸潤度は χ^2 testで比較した。

結 果

体重：（図3）

16週頃より第1群、第2群共に体重増加の鈍化がみ

図2 pT2の浸潤性膀胱癌：筋層の浅い部分までへの浸潤を示す移行上皮癌

図3 右：正常腎，左：膀胱癌の進展により尿管が閉塞され、腎盂の拡張を認める。(いずれもホルマリン固定後の剖面)

られた。この原因は膀胱癌の浸潤による水腎症の進展と思われた(図4)。実験開始より22週目の第1群の平均体重は $24.8 \pm 3.3\text{g}$ であり、第2群のそれは $26.5 \pm 2.7\text{g}$ であって、有意な差は認められなかった。

肉眼所見と膀胱の重量：(図5、表1)

膀胱のホルマリン固定後の半割所見では、陽子線を照射した第1群の膀胱癌の大きさが、第2群の対照に比べて明らかに小さかった。このことは膀胱の重量(≒癌の重量)を比較することで確かめられた。すなわち第1群の膀胱の重量は $67.7 \pm 40.0\text{mg}$ であり、第2群のそれは $120.6 \pm 99.5\text{mg}$ であって、有意な差($p < 0.05$)が認められた。また治療時の対照である第3群の膀胱の重量は $106.5 \pm 39.7\text{mg}$ であって、第3群との間に有意な差($p < 0.05$)を認めた。尚、他の実験で体重28g前後のC3H/He雌マウスのホルマリン固定後の正常膀胱重量は、 $28.4 \pm 3.6\text{mg}$ ($n=8$)であって、担癌膀胱よりはるかに軽かった。また腸管、腎、

図4 体重の変化

図5 膀胱癌の肉眼所見

左側：第1群の陽子線照射群，右側：第2群の対照群

肝などの膀胱以外の組織に、陽子線の影響は肉眼的に認めなかった。

表1 膀胱の重量と癌の浸潤度

群	動物数	膀胱重量 mg	浸潤癌の頻度 (%)			
			pT 1	pT 2	pT 3	合計
1. 陽子線照射	18	67.7±40.0 ^{a,b}	10 (56)	1 (6)	7 (39)	18 (100)
2. 対 照	17	120.6±99.5 ^b	3 (18)	3 (18)	11 (65)	17 (100)
3. 照射時の対照	11	110.0±60.7 ^b	2 (18)	2 (18)	7 (64)	11 (100)

^a: 平均±標準偏差^b: $p < 0.05$ (第1群と第2群間, 第1群と第3群間)^c: $p < 0.05$ (第1群と第2群間)

病理組織学的所見 (表1)

陽子線照射時の対照である第3群の膀胱癌の浸潤度は, pT1: 2 (18%), pT2: 2 (18%), pT3: 7 (64%)であった。そして22週目における浸潤度の分布は, 第1群でpT1: 10 (56%), pT2: 1 (6%), pT3: 7 (39%)であり, 第2群はpT1: 3 (18%), pT2: 3 (18%), pT3: 11 (65%)であった。すなわち第1群の方が第2群に比べて浸潤度の低い割合が高く, 統計学的に有意な差 ($p < 0.05$) が認められた。第1群と第3群との間では有意な差 ($p = 0.068$) ではなかったが, 第1群のほう浸潤度が低い傾向が認められた。

考 察

従来用いられてきたX線電子線に比べて, 速中子線, 陽子線, 重イオン線, 負 π 中間子などの重粒子線は, 線量分布に特徴がある。中でも陽子線は優れた線量分布を示し, 与えられたエネルギーに応じた深さに高線量分布領域 (Bragg peak) を組織内に生ずる (図6)⁶⁾。したがって陽子線は補正フィルター (リッジ・フィルター) を用いることにより周囲の正常組織への障害を避けつつ, 深部の病巣に一致して大線量を照射することが可能である⁶⁾⁷⁾。この特徴を利用して前立腺などの癌に陽子線の治療が試みられている⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹⁰⁾。だが膀胱癌に対してはまだ我々が報告したのみであるが, その単独療法の結果はあまり良好とは言えなかった¹⁰⁾。その理由は, 症例が既に進行した膀胱癌であって, 適切な症例選択でなかったためと思われた。まだ適応症例の選択や治療方法の改良などの検討すべき事例が多いと思われる。したがって膀胱癌に関しては, 陽子線の効果の基礎的検討を行なう必要があると思われる。今回の実験をおこなった。

BBNあるいはN-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazol]-formamide 以下 FANFT, をマウスに投与してできる

図6 陽子線の線量分布

膀胱癌は, ヒト浸潤癌の良いモデルであると報告されている¹¹⁾¹²⁾。このモデルは, 浸潤癌の発生までに時間がかかるもの。移植癌と異なり当該臓器にのみほぼ100%癌を得られるため, Soloway ら Marphy やは, マウスの浸潤性膀胱癌は, ヒトのより効果的な治療法の開発に有用であると報告している¹²⁾¹³⁾。

今回の実験では, BBN で発癌させたマウスの浸潤性膀胱癌に対し, 20Gy の単回照射のみで有意な癌の進展抑制, ならびに弱いながらも治療効果が認められた。しかし, Soloway らの報告では, FANFT で発生させたマウスの膀胱癌に対して, 8回分割による20ないしは48Gy の⁶⁰Co (X線) 照射では有意な治療効果を認めなかった¹³⁾。この理由は, 単回の照射は多分割照射の2~3倍程度効果に相当すると言われるので¹⁴⁾, それによる効果の違いかも知れない。また陽子線と⁶⁰Co (X線) の生物学的効果, あるいは線量分布の違いのためとも考えられる。しかし陽子線は他の重粒子線と異

なり、生物学的効果比は1.0前後であってX線と比べてあまり変わりがない⁷⁾。よって線量分布の違い、あるいは分割照射と単回照射の違いのためと思われるが、さらに今後の検討が必要である。

本実験では、陽子線の線量分布の特徴をマウスがあまりにも小さいために膀胱部に均一な線量を照射することのみ利用できて、他の利点は十分に活かせなかった。それでもマウス膀胱癌に対して、20Gyのみの照射で効果を認めた。臨床においては局所浸潤性膀胱癌の治療は、化学療法と放射線療法を併用して、治療効果の向上のみならず膀胱保存が図られるようになってきている⁵⁾。この意味で、その線量分布の特性から限局的に大線量を照射可能な陽子線は、化学療法や従来の放射線療法と組み合わせることにより、有用な治療手段に成りうると思われる。今後は、この実験系を用いて化学療法など他の治療法との併用を検討する予定である。

結 語

BBNで発癌させたマウスの浸潤性膀胱癌に対して、陽子線の効果を膀胱癌の重量と浸潤度で比較検討した。その結果、陽子線20Gyの単回照射は、膀胱癌の進展抑制のみならず治療効果を示した。

本研究の一部は厚生省癌助成金および文部省科研費の助成を得た。

文 献

- 1) Droller, M.J.: The conventional role of radiation therapy as adjunctive treatment of bladder cancer. *J. Urol.*, 129, 897—903, 1983.
- 2) Jakes, G., Frommhold, H. and Marberger, H.: Combined cis-platinum and radiation therapy in patients with stage pT3 and pT4 bladder cancer: A pilot study. *J. Urol.*, 129, 502—504, 1983.
- 3) Laramore, G.E., Davis, R.B., Hussey, D.H., Griffin, T.W., Maor, M.M., Henderickson, F.R., Davis, L.W. and Dupre, A.E.: Radiation therapy oncology group phase I-II study on fast neutron teletherapy for carcinoma of the bladder. *Cancer*, 54, 432—439, 1984.
- 4) Shipley, W.U., Rose, M.A., Perrone, T.L., Manix, C.M., Hennry, N.M. and Prout, G.R.:

Full-dose irradiation for patients with bladder carcinoma: Clinical and histological factors prognostic of improved survival. *J. Urol.*, 134, 679—683, 1985.

- 5) Shipley, W.U., Prout, G.R. and Kaufman, D.S.: Advances in laboratory innovations and clinical management, with emphasis on innovations allowing bladder-sparing approaches for patients with invasive tumors. *Cancer*, 65, 675—683, 1990.
- 6) 北川俊夫: 陽子線照射療法. 産科と婦人科, 45, 393—398, 1989.
- 7) 辻井博彦: 陽子線治療—世界と日本. 医学のあゆみ, 150, 1044—1047, 1989.
- 8) 日本泌尿器科学会・日本病理学会編: 泌尿器科・病理. 膀胱癌取り扱い規約, 第1版, p. 69—70, 金原出版, 東京, 1980.
- 9) 宮永直人, 阿弥良浩, 大谷幹伸, 小磯謙吉, 辻比呂志, 有本卓郎, 辻井博彦, 稲田哲雄, 北川俊夫: 泌尿器癌に対する陽子線照射の臨床的検討. 日泌尿会誌, 81, 251—257, 1990.
- 10) Duttenhaver, J.R., Shipley, W.U., Perrone, T., Verhey, L.J., Goitein, M., Munzenrider, J.E., Prout, G.R., Parkhurst, E.C. and Suit, H.D.: Protons or megalovoltage X-rays as boost therapy for patients irradiated for localized prostatic carcinoma. *Cancer*, 51, 1599—1604, 1983.
- 11) Ohtani, M., Kakizoe, T., Nishio, T., Sato, S., SLugimura, T., Fukushima, S. and Nijima, T.: Sequential changes of mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinoma by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. *Cancer Res.*, 46, 2001—2004, 1986.
- 12) Soloway, M.S., S.: Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. *Cancer*, 36, 333—340, 1975.
- 13) Soloway, M.S., Morris, C.R. and Sudderth, B.: Radiation therapy and cis-diaminedichloroplatinum (II) in transplantable and primary murine bladder cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 5, 1355—1360, 1979.
- 14) 菱川良夫: 術中照射療法の理論的背景. 医学のあゆみ, 150, 963—966, 1989.

(1991年1月28日受理)