N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine 誘発

マウス膀胱癌に関する研究

—形態学的変化と核 DNA 量変化の関係について—

北海道大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 小柳知彦教授)

斎藤 文志郎

A STUDY OF BBN INDUCED BLADDER CANCER IN MICE

The Time Differences in Changes of Histopathology and Nuclear DNA Content

Bunshiro Saito

Department of Urology, Hokkaido University, School of Medicine (Director: Prof. T. Koyanagi)

To evaluate the process of tumor progression in BBN induced bladder cancer, BBN was administered to C57BL/6 mice for 10 weeks. The mice were sacrificed every week from the 5th week to the 22nd week.

The urinary bladder was embedded in paraffin block for histopathological examination and was sampled for DNA content analysis by flow cytometry.

The results were as follows:

1. In the histopathological findings, the incidence of atypical hyperplasia of the urinary bladder, indicative of a precancerous state, was 29% 7 weeks after the initiation with BBN. And the cancer was found in 74% of the mice 9 weeks after the initiation.

2. In the analysis of nuclear DNA content, the atypical hyperplasia and the incipient cancer of the urinary bladder were all DNA diploid, and the DNA aneuploid was found in 50% of the cancer group 11 weeks after the initiation.

3. These data suggest that the change of nuclear DNA content is an occurrence after the completion of the carcinogenesis in BBN induced bladder cancer of mice.

Key words: N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine, bladder cancer, nuclear DNA ploidy

要旨: N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (以下 BBN) 誘発による C57BL/6系マウス (108匹) の膀胱発癌実験において, 経時的な形態学的変化と flow cytometry (以下 FCM) による核 DNA 量の変化を検討し, 以下の結果を得た。

1. 形態学的前癌状態とされる異型過形成は BBN 投与開始 7 週目以降の 96 匹中 28 匹 (29%) に認められ, 発癌は 9 週目以降の 84 匹中 62 匹 (74%) に認められた。

2. FCM の評価が可能であったのは全経過を通じて 93 匹であり, 核 DNA の ploidy 変化の推移では, 異型過形成および発癌初期例は全て DNA diploid であり, DNA aneuploid は 11 週目以降の発癌例 56 匹中 28 匹 (50%) に認められた。

3. 以上の結果より BBN 誘発マウス膀胱癌における核 DNA 量変化は発癌後の変化であると考えた。

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

結 言

癌細胞における核 DNA 量の変化, すなわち DNA aneuploid の出現は生物学的悪性度の指標とされている。また flow cytometry (以下 FCM) は個々の細胞

の核 DNA 量を短時間で測定し, 細胞集団の DNA 分布をヒストグラムとして表記することが可能であり, 癌細胞の生物学的特性を知る上で有用である¹⁾。一方核 DNA の ploidy 変化が発癌あるいは癌増殖のいか

なる過程において出現するのかは必ずしも明確ではない。今回われわれはN-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (以下 BBN) 誘発マウス膀胱癌において、発癌過程における経時的な形態学的変化と核 DNA 量の変化の関係を検討したので報告する。

材料および方法

1. 実験動物

実験に用いたのは7週齢雌の C57BL/6系マウス108匹であり、日本クレア社より供給されたものである。

2. BBN 投与方法と処置 (Fig. 1)

これらのマウスに BBN (東京化成) 0.05%, Tween 80 (Sigma 社), acromycin (250mg/200ml) を水溶液として最長10週間経口的に自由摂取とし、その後水道水を自由摂取とした。

Fig. 1 Schematic presentation of the protocol for the induction of bladder carcinoma.

経時的変化を観察するために BBN 投与開始 5 週目より毎週 6 匹ずつ屠殺し、膀胱を摘出した。

3. 形態学的判定

摘出した膀胱は10%中性ホルマリンにて固定後パラフィン包埋、各包埋ブロックにつき6カ所の切片を作成し、Hematoxylin Eosin (以下 HE) 染色を行い光顕的に検索した。形態学的判定は大谷²⁾の分類に基づき、粘膜上皮に過形成を認めるが細胞核異型を認めないものを単純性過形成、細胞核異型を呈するものを異型過形成 (Fig. 2A, 右) とし、また1カ所でも癌病巣が認められたものを発癌陽性 (Fig. 2B, 右) とした。

4. 核懸濁液の調整

核懸濁液の調整は永森の手法³⁾に準じ、HE 染色用組織切片と連続する面でパラフィン包埋組織を50 μ で薄切し、1検体につき薄切標本3~4枚をキシレンで脱パラフィンした。次に100%, 80%, 60%, 40%エタノールにて再水和後、pHを1.5に調整した0.5% pepsin (Sigma 社) 溶液3mlを加え37 $^{\circ}$ C、15分間反応させた。次いで Vindel ϕ v の方法⁴⁾に準じ、RNase (Sigma 社, type I-A) 処置後、propidium iodide (以下 PI, Sigma 社) にて DNA 染色を行った。

5. flow cytometry

DNA 染色後の核懸濁液を43 μ のナイロンメッシュで濾過後、Coulter 社の Epics-C を用い核 DNA 量を

Fig. 2 Histology of BBN treated bladder epithelium (H & E staining, $\times 200$ original magnification) and its histogram.

A : Dysplasia and DNA diploid pattern of nuclear DNA histogram. B : Invasive carcinoma and DNA aneuploid pattern of nuclear DNA histogram.

Fig. 3 Schematic presentation of the histopathological changes of the bladder after treatment with BBN.

Fig. 4 Schematic presentation of the comparing nuclear DNA ploidy distribution with histopathological diagnosis.

測定した。

6. DNA ヒストグラムの解析

DNA ヒストグラムの解析はヒストグラム上の最初の G0/G1ピークを DNA diploid ピークとみなし、単一の G0/G1ピーク有するものを DNA diploid pattern

Table 1 Incidence of bladder carcinoma and nuclear DNA ploidy pattern

Weeks after BBN (case)	Case of bladder carcinoma			
	Rate of Ca. (%)	DNA diploid	DNA aneuploid	
5-6 (5)	0(0)	0	0	p<0.04
7-8 (7)	0(0)	0	0	
9-10 (11)	5(45.5)	5	0	
11-12 (12)	7(58.3)	5	2	
13-14 (11)	6(54.5)	4	2	
15-16 (11)	10(90.9)	6	4	
17-18 (12)	11(91.7)	6	5	
19-20 (12)	11(91.7)	3	8	
21-22 (12)	11(91.7)	4	7	

(Fig. 2A, 左) とし、このピークが50チャンネルに一致する様に調節した。またこのピークより右側に逸脱して出現する第2ピークを有するものを DNA aneuploid pattern (Fig. 2B, 左) とした⁴⁾。

7. 結果の検定

結果の検定は χ^2 検定を行った。

結 果

1. 形態学的判定 (Fig. 3)

形態学的変化の推移では形態学的前癌状態とされる異型過形成が BBN 投与開始 7 週目より出現し、7 週目以降の96匹中28匹 (29%) に認められた。発癌は 9 週目以降に出現し、9 週目以降の84匹中62匹 (74%) に認められ、組織学的には移行上皮癌57匹、移行上皮癌に扁平上皮癌を伴うもの 5 匹であった。なお 9 週目以降では全例に異型過形成または発癌を認めた。

2. FCM による評価 (Fig. 4)

FCM による評価が可能であったのは全経過を通じて93匹であり、G0/G1ピークにおける変異係数 (coefficient of variation, CV) は殆どが6.5~9.0%であった。また核 DNA の ploidy 変化の推移では単純性過形成・異型過形成および 9 週目・10 週目までの発癌例は全て DNA diploid であり、DNA aneuploid は11 週目以降に出現し全発癌膀胱61匹中28匹 (46%)、11 週目以降では56匹中28匹 (50%) に認められた。

3. 発癌率と DNA ploidy の変化 (Table 1)

これら FCM による判定が可能であった集団において 2 週毎の発癌率と発癌膀胱における DNA ploidy の変化を比較すると、BBN 投与を終了した10週目以降も発癌率は上昇しており、15 週目以降でいずれも 90% 以上とプラトーに達していた。また発癌率の推移

がプラトーに達した15週目以降と14週目以前において DNA ploidy の分布を比較すると、14週目以前では DNA diploid 14匹、DNA aneuploid 4匹であったのに対して15週目以後では各々19匹、24匹 ($\chi^2=4.49$, $p<0.04$) であり、癌化の過程と DNA aneuploid の出現は15週前後で並行して進んではいなかった。

考 察

癌の発生過程における第一段階は BBN などの発癌物質との接触等による initiation であり、続いて癌化完成への不可欠条件である第二段階すなわち発癌促進段階 promotion である⁵⁾。またこうして完成された癌が発育、さらに浸潤・転移へと進行する状況すなわち“真の悪性”への変化の段階が progression である⁶⁾。発癌過程において正常細胞が癌化するまでの機序の解明は重要であり、また広く研究されている⁷⁾⁸⁾。しかし完成された癌細胞が生体を死に至らしめるのは癌の増殖あるいは転移であり、癌細胞の progression の過程もまた極めて重要であると言える。癌細胞の progression の指標としては癌増殖性の上昇・浸潤性の増加などの組織学的変化があげられるが、近年癌細胞の染色体変化との関係についても数多く報告されている。すなわち progression を起こした癌細胞の多くに染色体異常が認められる⁹⁾¹⁰⁾ほか、核 DNA 量の増加や DNA ploidy の変化も認められ、一般的にこれら染色体の変化が著しいほど癌の悪性度が高いとされている¹¹⁾¹²⁾。

臨床的にも膀胱癌における FCM での検討は数多く行われており、核 DNA 量変化と細胞異型度・浸潤度とは相関し、DNA aneuploid を有する症例は癌の再発・転移を高率に認めるともされている¹³⁾¹⁴⁾。

一方 BBN 誘発マウス膀胱癌の発生過程は単純性過形成より異型過形成を経て発癌し、完成された癌は急速に浸潤癌に移行するとされている²⁾。われわれは C57BL/6 系マウスは BBN により高率に膀胱発癌を認めることを報告しており¹⁵⁾、今回の実験における発癌にいたる膀胱の形態学的所見の推移では、発癌は BBN 投与開始 9 週目より確認され BBN 投与終了後も発癌は進行、15週目以降で90%以上と発癌率はプラトーとなり BBN 誘発膀胱発癌の完成には BBN 以外の内因性因子の関与が示唆された。

また核 DNA の ploidy 変化出現の時期に関しては、単純性過形成・前癌状態とされる異型過形成及び BBN 投与開始10週目までの発癌初期例は全て DNA diploid であり、DNA aneuploid は発癌確認後である11週目以降に初めて認められ、発癌率がプラトーに達

した15週目前後の比較でも癌化の過程とは並行して進行してはいなかった。すなわちマウスにおける BBN 誘発膀胱癌は DNA diploid で発癌し、その後 aneuploid cell clone が発生すると推測された。FCM による DNA 量測定はあくまでも相対的な判定であり、その測定精度には自ずと限界があるが、本実験結果は発癌過程における核 DNA の ploidy 変化は発癌完成後に進行し、DNA aneuploid の出現が癌の悪性化進展の指標の1つであるとするれば、progression は癌化完成後の変化であることを裏付けるデータであると考えた。

結 語

BBN による C57BL/6 系マウス膀胱発癌実験において、経時的な形態学的変化と核 DNA 量変化の関係を検討し、以下の結果を得た。

1. 形態学的前癌状態とされる異型過形成は BBN 投与開始 7 週目以降の96匹中28匹 (29%) に認められ、発癌は 9 週目以降の84匹中62匹 (74%) に認められた。
 2. FCM による核 DNA の ploidy 変化では、異型過形成および発癌初期例は全て DNA diploid であり、DNA aneuploid は11週目以降に出現、全発癌例61匹中28匹 (46%)、11週目以降の発癌例56匹中28匹 (50%) に認められた。
 3. 以上の結果より BBN 誘発マウス膀胱癌における核 DNA 量の変化は発癌後の変化であると考えた。
- 本論文の要旨は第49回日本癌学会総会において発表した。

文 献

- 1) Vindeløv, L.L., Chrisensen, I.J. and Nissen, N. I.: A detergent-trypsin method for preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*, 3, 323—327, 1983.
- 2) 大谷幹伸：発生と進展—2. マウス。図説、臨床癌シリーズ、第1版, p. 129—134, メディカルビュー社、東京、1986.
- 3) 永森 聡：Flow Cytometry による腎細胞癌の Heterogeneity の検討。日泌尿会誌, 81, 593—600, 1990.
- 4) Grignon, D.J., El-Naggar, A., Green, L.K., Ayala, A.G., Ro, J.Y., Swanson, D.A., and Troncoso, P.: DNA flow cytometry as a predictor of outcome of stage 1 renal cell carcinoma. *Cancer*, 63, 1161—1165, 1989.
- 5) 小林 博：がんの Promotion と Progression, オンコロジー, 20, 125—126, 1987.
- 6) Nowell, P.C.: Mechanism of tumor progression. *Cancer Res.*, 46, 2203—2207, 1986.

- 7) Yoshida, T.H.: Karyotype evolution and tumor development. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 8, 153—179, 1983.
 - 8) 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, 853—869, 1977.
 - 9) Fujita, J.: Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 3849—3853, 1985.
 - 10) Kerbel, R.S., Lagarde, A.E., Dennis, J.W. and Donoghue, T.P.: Spontaneous fusion in vivo between normal host and tumor cells: Possible contribution to tumor progression and metastasis studied with a lectin-resistant tumor. *Mol. Cell. Biol.*, 3, 523—538, 1983.
 - 11) Farsund, T., Hosetmark, J.G. and Laerum, O. D.: Relation between flow cytometric DNA distribution and pathology in human bladder cancer. *Cancer*, 54, 1771—1777, 1984.
 - 12) Merkel, D.E. and Mcguire, W.L.: Ploidy proliferative activity and prognosis. *Cancer*, 65, 1194—1205, 1990.
 - 13) Norming, U., Nyman, C.R. and Tribukait, B.: Comparative flow cytometric deoxyribonucleic acid studies on exophytic tumor and random mucosal biopsies in untreated carcinoma of the bladder. *J. Urol.*, 142, 1442—1447, 1989.
 - 14) Gustafson, H., Tribukait, B. and Esposti, P.L.: The prognostic value of DNA analysis in primary carcinoma in situ of the urinary bladder. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 16, 141—146, 1982.
 - 15) 斎藤文志郎, 大橋立彦, 富樫正樹, 小柳知彦: 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—. *日泌尿会誌*, 81, 993—996, 1990.
(1991年4月18日受理)
-