VX2 移植膀胱癌への水中衝撃波の影響

—透過型電子顕微鏡による観察—

東北大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 折笠精一教授)

斎藤 敏典* 折笠 精一 星 宣次 鈴木 謙一
庵谷 尚正 田口 勝行 白井 修一 稲葉 康雄

宮城県立がんセンター (部長: 桑原正明)

桑 原 正 明

ULTRASTRUCTURAL CONSEQUENCE OF SHOCK WAVE EXPOSURE ON VX2 CANCER IMPLANTED TO THE URINARY BLADDER

Toshinori Saitoh, Seiichi Orikasa, Senji Hoshi, Kenichi Suzuki, Naomasa Ioritani,

Katsuyuki Taguchi, Shuuichi Shirai and Yasuo Inaba

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine

(Director: Prof. S. Orikasa)

Masa-aki Kuwahara

Miyagi Cancer Center

(Director: Masa-aki Kuwahara)

In order to clarify the ultrastructural consequence of the VX2 cancer cell exposed to underwater shock waves. The VX2 cancer implanted to the urinary bladder of rabbit was received the shock waves (1000 shots, 100 MPa, 5/sec.) generated by the piezo-ceramics. Damage to the cancer cell were manifested by the three kind of findings: the one was the cell junction failure which caused the isolated cells; the second was the destruction of organelle which seemed to form the vacuole in cytoplasm; and the last finding was the emergence of moth eaten appearance in the exposed cell. We conclude that underwater shock wave exposure induces lethal injury in VX2 implanted cancer.

Key words: underwater shock wave, neoplasms, ultrastructure

要旨: VX2癌細胞の水中衝撃波による影響を細胞レベルで明らかにするために, VX2癌細胞を家兎の膀胱に移植し, ピエゾ素子より発生させた衝撃波を照射した(1,000shots, 100MPa, 5/sec). 照射後の細胞では大きく3つの変化が観察された. 1つは孤立細胞を惹起した細胞間接合の破綻であり, 2つめには破壊された細胞内小器官が形成したと思われる空胞が観察されたことであった. 3つめには虫喰い像を伴った被照射細胞も観察された. これらの結果より, VX2移植膀胱癌細胞においては, 水中衝撃波照射は致命的な損傷を惹起するものと考えられた.

キーワード: 水中衝撃波, 新生物, 超微細構造

緒 言

我々は従来より, 水中衝撃波照射による腎組織への影響を報告してきた^{1)~3)}. また, 当教室の星らは VX2

移植膀胱癌を用いて, 水中衝撃波による殺細胞効果について報告してきた⁴⁾⁵⁾. これらの検討より衝撃波照射による癌治療は, 現在行われている治療と比較して less invasive surgery と位置付け得る, 新しい治療法として期待できるものと思われた. 今回, 星らと同じ移植膀胱癌モデルにおける水中衝撃波の影響を, 透過

*現 クリニック斎藤泌尿器科 (〒983 仙台市宮城野区
鶴ヶ谷 2-8-7)

型電子顕微鏡により観察したので報告する。

対象と方法

2. 1. 実験装置

衝撃波の発生源には piezo 素子を用いた。24 枚の piezo 素子を直径 30 cm の半球面に扇型凹画状に緻密に貼り、その中央部には超音波診断装置の探触子を設置した。高電圧駆動回路から高電圧パルス波を piezo 素子に印加し、衝撃波を発生させた。衝撃波の最大圧力は約 100 MPa であり、その圧力の半値巾は $1 \times 1 \times 20$ mm である。衝撃波発生装置の焦点方向前方には半球状の膜型アプリーケーターが取り付けられており、その内部には脱気水が満たしてある。すなわち、piezo 素子より発生した衝撃波は、アプリーケーター内の脱気水、アプリーケーター膜、生体へと伝播し、移植膀胱腫瘍に収束する。この腫瘍への衝撃波照射は、すべてリアルタイム超音波画像で監視しながら行った。

2. 2. 実験方法

実験には約 3 kg の日本白色家兎雄 3 羽を用いた。腫瘍の移植は、ペントバルビタール静脈麻酔下で膀胱を切開、膀胱後型に生理食塩水に溶解した VX2 癌細胞浮遊液を約 1×10^7 個注入することにより行った。約 12 日後静脈麻酔下に超音波断層法により移植腫瘍生育の確認を行った。その後、約 100 MPa、5/sec の衝撃波を 1,000 回照射した。照射終了後、直ちに膀胱を摘出し、被照射部の癌組織を 2.5% グルタルアルデヒド (緩衝液: 0.1 M カコジル酸ナトリウム) 内に浸して、約 1 mm^3 に細切、同液にて浸透固定した。1% オスミウム酸にて再固定後、段階アルコール系にて脱水、エポンに包埋した。そして 50 nm の超薄切片を作製し、ウラン鉛染色後、日本電子 JEM100C にて観察した。さらにコントロールとして、衝撃波照射を行わない VX2 移植膀胱癌担癌家兎を作製し、この癌組織も同様の方法で固定観察した。

結 果

3. 1. 肉眼的所見

超音波断層法により確認された移植膀胱癌は、肉眼的には隆起性病変として観察された。衝撃波照射後の腫瘍表面には点状の小さな出血がみられ、その部を標本とし以下の所見を得た。

3. 2. 光学顕微鏡による所見 (図 1)

照射後の組織には間質性出血が認められ、一部溶血もみられた。観察された範囲での癌組織は細胞間隙が開大し、凝固壊死に陥っていた。これらの変化は被照射部の中心近くで著しく観察された。細胞は核崩壊や

Fig. 1 The VX2 cancer immediately after the exposure showed coagulative necrosis with interstitial hemorrhage (H & E, $\times 100$).

Fig. 2 The VX2 cancer cells without exposure were seen ($\times 1,201$).

Fig. 3 The VX2 cancer cell without exposure was noticed ($\times 3,050$).

核融解を伴っており、均一な好酸性の細胞質を呈する細胞として観察された。

Fig. 4 After the exposure, the failure of cell junction induced the cellular isolation ($\times 1,201$).

Fig. 5 The exposed cells contained vacuoles in the cytoplasm ($\times 2,403$).

3. 3. 電子顕微鏡による所見

衝撃波非照射のコントロール (図 2, 3) と比較して、特に衝撃波照射による変化の著しい部位で以下の所見を得た。

腫瘍細胞の間隙は開大し、そこには赤血球や、破壊された細胞内小器官とみられる debris が観察された。腫瘍の組織構築は著しく破壊され、腫瘍細胞は各々孤立して存在していた (図 4)。また細胞内の変化として、細胞膜の破壊や、細胞内小器官自体の判別が困難な程度までの細胞内小器官の損傷が観察された。さらに、細胞質内には多数の空胞が存在し、その空胞内容の電子透過性も種々であった (図 5)。この空胞は、限界膜周囲にリボゾームを伴っているものと伴っていないものが観察された。また、限界膜を伴っていない虫喰い像を主に核内に認めた (図 6 矢印 1, 2)。核膜の断裂を伴った虫喰い像も観察された (図 6 矢印 1)。

Fig. 6 The exposed cell showed “moth-eaten appearance” in the nucleus. Arrow 1 indicates the round type, and arrow 2 exhibits the cigar type ($\times 7,670$).

考 察

生体への衝撃波の影響について、当教室では1985年より種々の報告を行ってきた^{6)~10)}。一方、1987年に Russo らは衝撃波照射による抗腫瘍効果を発表し¹¹⁾、その後、種々な衝撃波発生装置と培養浮遊細胞を用いた検討が報告されている¹²⁾¹³⁾。これらのうち、最も衝撃波の影響が少なかったとする報告でも、ミトコンドリアの腫脹等なんらかの変化は報告されている。当教室では星らが、家兎の移植膀胱癌モデルへの衝撃波の影響について検討してきた⁴⁾⁵⁾。このモデルに用いられた VX2 癌は Shope virus により発生する未分化な扁平上皮癌であるが¹⁴⁾、光学顕微鏡により衝撃波被照射部では壊死に陥ることが観察された。今回我々は、同じモデルにおける衝撃波の影響を電子顕微鏡を用いて検討した。

照射後の組織では細胞間接合の破綻が観察された。その原因として細胞接着装置を含めた細胞膜の破壊が考えられた。すなわち、衝撃波は圧力波、膨張波、剪断応力、microjet, cavitation 等様々な現象を惹起するといわれているが、これら衝撃波に伴う剪断応力や micro-jet が細胞間隙の開大を惹起したものと思われた。孤立した細胞はほぼ全て壊死に陥っており、水中衝撃波照射による殺細胞効果を示唆するものであると考えられた。事実、田中らは透過型電子顕微鏡を用いた観察で、BBN 誘発膀胱癌モデルの膀胱内 BCG (Bacillus Calmette Guerin) 注入後の変化として癌細胞間隙の開大を報告しており¹⁵⁾、本実験においても同様の所見が得られたことは、衝撃波照射による殺細胞

効果を強く示唆しているものと考えられた。

細胞内小器官でも種々の程度の損傷が観察された。すなわち、ミトコンドリアのクリスタの消失程度から、細胞内小器官の判別自体が困難なものまでの広い範囲での損傷である。この中で、リポゾームを伴っている空胞は、変性した粗面小胞体であると思われた。この空胞内容の染色性は中等度かつ均一であることより、粗面小胞体内の生成途中のアミノ酸等であると類推された。また、リポゾームの伴わない中等度染色性の空胞は、ゴルジ装置や滑面小胞体等の膜型細胞内小器官であると考えられた。損傷を受けた細胞内小器官は debris として細胞外にも観察された。このことは細胞膜の損傷の発生も示唆している。

また、虫喰い像を伴った被照射細胞も観察された。この虫喰い像は主に核内に存在し、濃縮クロマチンを辺縁の一部に伴うことが多かった。この非染色性の虫喰い像は限界膜を伴っておらず、明らかに空胞とは異なっていた。この発生機序については衝撃波の性質上、様々な物理化学的現象が関与しているものと考えられた。核膜の断裂を伴った虫喰い像（図6矢印1）もみられたことから、何等かの flow が細胞内を貫通した可能性があると思われた。図6において、flow が写真面と垂直方向に発生した場合、ほぼ円形の虫喰い像となり（矢印1）、平行に近い場合は矢印2のような葉巻型に観察されたものと思われた。なお、矢印1で示す虫喰い像の直径は約 $0.6\mu\text{m}$ であった。この発生機序を含めた詳細な医学的、物理学的解明については、今後の検討を待たねばならない。

さらに、このような flow の存在する可能性が高ければ、衝撃波により抗癌剤の細胞内到達性が高められると考えられ、その薬理学的効果を増強されるものと考えられた。すなわち、衝撃波による癌治療は他の治療法と併用することにより、非常に効果的なものになる可能性が示唆された¹⁶⁾¹⁷⁾。一方、衝撃波照射による癌の浸潤転移促進の危険性については、今回の実験結果からは不明であったが、星らはその危険性は少ないと述べていることも付け加えておきたい⁵⁾。

現在、less invasive といえる癌治療法として温熱療法や、ガンマナイフを用いた治療が行われている。温熱療法では、血管壁の断裂と局所血流の減少が、抗腫瘍効果をもたらすと報告されている¹⁸⁾。一方のガンマナイフは、1回に高線量の放射線を照射する治療法である¹⁹⁾。この組織学上の変化は、急性期の血管内皮細胞の変性と、慢性期における血管内腔の閉塞であると報

告されている。以上の2つの治療法は組織学的には局所の血流障害による抗腫瘍効果をもたらしているが、庵谷らは衝撃波照射による非可逆性の血流障害を報告しており²⁾、さらに衝撃波照射では血流障害より早く発生する殺細胞効果も得られることから³⁾、温熱療法やガンマナイフと同等以上の治療効果を期待することができる。

水中衝撃波の癌治療応用への課題は、適切な領域に、適切な種類の衝撃波を、適切な回数照射することと、壊死に陥った組織のドレナージである。そのためには殺細胞効果において最も効果的な衝撃波の種類の追求や照射方法の検討が必要である。そしてMRIのように詳細に腫瘍の状態が把握でき、さらにリアルタイムで腫瘍を観察できる照準装置を搭載した衝撃波照射装置の開発が必要であると考えている。

本論文の要旨は第81回泌尿器科学会総会（於京都）において発表した。

文 献

- 1) 折笠精一：体外衝撃波碎石術と水中衝撃波の生体に及ぼす影響。日泌尿会誌, 82, 1027—1044, 1991.
- 2) Ioritani, N., Orikasa, S., Kuwahara, M., Kambe, K., Taguchi, K., Saitoh, T., Shirai, S. and Arai, M.: The Correct Targeting Rate in ESWL Treatment Measured by An Anti-Miss-Shot Controled Device. Jpn. J. Endurol., 3, 179—186, 1990.
- 3) 斎藤敏典, 折笠精一, 庵谷尚正, 神部廣一, 桑原正明, 田口勝行, 白井修一, 目時利林他：衝撃波照射による腎組織損傷—超微細構造からの観察—。日泌尿会誌, 83, 23—32, 1992.
- 4) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Yoshikawa, K., Saitoh, S., Ohyama, C., Satoh, M., Kawamura, S. and Nose, M.: The Effect of High-Energy Underwater Shock Waves on Implanted Urinary Bladder Cancer in Rabbits. Jpn. J. Cancer. Res., 81, 317—319, 1990.
- 5) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Yoshikawa, K., Saitoh, S., Ohyama, C., Satoh, M. and Nose, M.: High Energy Underwater Shock Wave Treatment on Implanted Urinary Bladder Cancer in Rabbits. J. Urol., 146, 439—443, 1991.
- 6) Kambe, K., Kuwahara, M., Orikasa, S. and Takayama, K.: Mechanism of fragmentation of urinary stones by underwater shock wave. Urol. Int., 43, 275—281, 1988.
- 7) 桑原正明, 黒須清一, 神戸廣一, 景山鎮一, 折笠精

- 一, 高山和喜: 水中衝撃波のフォーカシングに関する研究. 体外からの腎, 尿管結石破碎を目的として, 日泌尿会誌, 76, 174—182, 1985.
- 8) Kuwahara, M., Kageyama, S., Kambe, K., Kurosui, S., Ioritani, N., Orikasa, S. and Takayama, K.: Clinical application of extracorporeal shock wave lithotripsy using microexplosions. *J. Urol.*, 137, 837—840, 1987.
- 9) 黒須清一, 庵谷尚正, 神部廣一, 景山鎮一, 桑原正明: 爆薬を用いた体外腎結石破碎. 日泌尿会誌, 78, 1252—1259, 1987.
- 10) 神戸廣一, 桑原正明, 景山鎮一, 黒須清一, 庵谷尚正, 田口勝行, 斎藤敏典, 折笠精一, 伊勢和久, 光川史郎: 爆薬による体外腎結石破碎. 日泌尿会誌, 79, 1011—1018, 1988.
- 11) Russo, P., Mies, C., Huryk, R., Heston, W. D. W. and Fair, W. R.: Histopathologic and Ultrastructural Correlates of Tumor Growth Suppression by High Energy Shock waves. *J. Urol.*, 137, 338—341, 1987.
- 12) Bäuner, T., Brümmer, F. and Hülser, D. F.: Histopathology of shock wave treated tumor cell suspensions and multicell tumor spheroids. *Ultrasound in Med. & Biol.*, 15, 451—460, 1989.
- 13) Kohri, K., Uemura, T., Iguchi, M. and Kurita, T.: Effect of high energy shock waves on tumor cells. *Urol. Res.*, 18, 101—105, 1990.
- 14) Nemoto, R., Mori, H., Iwata, K., Kato T. and Harada, M.: A Model of Malignant Urinary Bladder Tumor in Rabbits. *Tohoku J. exp. Med.*, 134, 257—263, 1981.
- 15) 田中 聡, 工藤試治, モーリック・アスラフ・ウーデイン, 工藤達也, 古川利有, 鈴木唯司: BBN 誘発ラットの BCG および Adriamycin 膀胱内注入療法による組織変化. 日泌尿会誌, 83, 368—373, 1992.
- 16) Hoshi, S., Orikasa, S., Kuwahara, M., Suzuki, K., Shirai, S., Yoshikawa, K. and Nose, M.: Shock Wave and THP-Adriamycin for Treatment of Rabbit's Bladder Cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 248—250, 1992.
- 17) 鈴木謙一, 折笠精一, 星 宣次, 桑原正明, 吉川和行, 大山 力, 佐藤 信, 川村貞文: 高エネルギー水中衝撃波による家兎 VX2 膀胱癌の治療—衝撃波と THP-ADM 併用後の THP-ADM 組織内濃度について—. 日泌尿会誌, 投稿中.
- 18) Badylak, F.S., Babbs, F.C., Skojac, M.T., Voorhees, D.W. and Richwadson, C.R.: Hyperthermia-induced Vascular Injury in Normal and Neoplastic Tissue. *Cancer.*, 56, 991—1000, 1985.
- 19) 河本俊介, 佐々木富男, 松谷雅生, 高倉公朋, 寺原敦朗: Gamma knife による定位的放射線照射療法. 脳神経, 44: 205—217, 1992.
(1994年3月14日受付, 6月16日受理)