N-Butyl-N-(4-Hydroxybutyl) Nitrosamine (BBN) による ラット膀胱の初期変化と癌発生における用量相関

福島昭治 今井田克己 萩原昭裕 香川雅孝 名古屋市立大学医学部第一病理
荒井昌之 藤田学園名古屋保健衛生大学衛生学部病理

DOSE-RESPONSE STUDY ON EARLY LESIONS AND CARCINOGENESIS OF RAT URINARY BLADDER INDUCED BY N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL)- NITROSAMINE

Shoji Fukushima, Katsumi Imaida, Akihiro Hagiwara, and Masataka Kagawa
Department of Pathology, Nagoya City University Medical School
Masayuki Arai Department of Pathology, Fujita-Gakuen Health University School of Medical
Technology and Nursing

Abstract: Dose-response studies on early lesions and carcinogenesis of urinary bladder were carried out in male rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN). In experiment 1, BBN was given in 6 different concentrations as solutions in drinking water to examine early lesions of the urinary bladder to F344, 6-week-old rats for up to 12 weeks. Doses of more than 0.01% BBN induced histologically simple hyperplasia and papillary or nodular hyperplasia, and scanning electron microscopically pleomorphic microvilli, short, uniform microvilli, and rosy or leafy microridges. 0.005% BBN treatment also induced rosy or leafy microridges. In experiment 2, BBN was given in 3 different doses to Wistar, 8-week-old rats for up to 82 weeks. The highest dose, 0.005% induced urinary bladder carcinoma and the lowest dose, 0.0005% did not develop any changes of the urinary bladder. (J Toxicol Pathol 1: 25~32, 1988)

Key words: BBN, Rat bladder carcinogenesis, Preneoplastic lesion

序 文

N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) の経口投与によりラットの膀胱のみに選択的に高率に膀胱腫瘍が発生することが見いだされて以来^{1,2}, BBN を用いての実験的膀胱癌に関する研究が病理組織学的, 電顕的, 酵素組織化学的, 生化学的などの多方面から追究され, さらに, 最近では, 膀胱癌発生に及ぼす内的ならびに外的要因の解明, 研究がなされてきている¹⁻¹⁶。

今回, 我々は BBN による膀胱癌の発生過程に

出現する膀胱粘膜の初期変化に関する BBN の dose response (用量効果) について病理組織学的および走査電顕的に検討するとともに, 低濃度の BBN 長期投与による膀胱癌発生の有無を検索し, BBN による初期病変と癌発生との用量相関性を追究した。

材料および方法

実験 1: 使用した動物は 6 週齢の F344 系雄ラット (日本チャールスリバー・神奈川) で, 計 105 匹を用いた。BBN (泉化学研究所・神奈川) の濃度により 7 群に分け, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005, 0.001 および 0.0005% BBN 水溶液を遮光した給水瓶にて 12 週間投与した実験群と BBN を含まない対照群をもうけ, 実験開始後, 4, 8 および 12 週にて

各群 5 匹ずつ屠殺し、膀胱粘膜の初期変化を光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡にて検索した。BBN の摂取量は週 1 回 12 週まで毎週計測した。また、8 および 12 週目に採尿ケージにて 4 時間尿を採取し、尿沈渣、pH、浸透圧の検査も実施した。なお、ラットは実験期間中 MF 固型飼料（オリエンタル酵母株式会社、東京）にて飼育された。

屠殺時にラットをエーテル麻酔下で開腹し、2% グルタルアルデヒド 0.5 ml を膀胱内へ注入した後、尿道を結紮した。取り出した膀胱を光顕用、走査電顕用にそれぞれ 2 分割した。走査電顕の試料作製は常法に従い前固定後、1% オスミウム酸にて後固定し、脱水のあと臨界点乾燥した。続いて金を蒸着し、日立製 HHS-2R 型走査電子顕微鏡にて試料を観察した。さらに光顕用を 10% ホルマリン溶液に再固定し、6 個の切片に細切、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い検索した。

実験 2: 8 週齢の Wistar 系雄ラット（静岡実験動物、浜松）162 匹を用いた。BBN（泉化学研究所）投与群（150 匹）には 0.005、0.001 および 0.0005% BBN 水溶液を実験 1 と同様の給水瓶にて、最大 82 週間投与した。また、無処置対照群（12 匹）は BBN を含まない水道水を 82 週間与えられた。実験開始後、20、40、60 および 82 週にてラットを屠殺し、膀胱の前癌病変ならびに腫瘍の発生を病理組織学的に検索した。なお、MF 固形飼料を実験期間中、自由に摂取させた。

ラットをエーテル麻酔下で開腹し、10% 中性緩衝ホルマリンを約 0.8 ml 膀胱内に注入した後、尿道を結紮した。取り出した膀胱は固定後 8 切片に細切し、病理組織学的検索に供した。なお、実験 1 と 2 とともに室温 23±5°C、湿度 55% の空調動物室にて飼育、管理された。

成績

実験 1: Table 1 は各濃度における BBN の総摂取量を示したものである。4~12 週の各時期におい

Table 1. Cumulative Total Intake of BBN for up to 12 Weeks (mg/rat)

Dose (%)	Weeks		
	4	8	12
0.05	288.5	588.3	793.3
0.025	137.2	283.9	377.3
0.01	58.9	110.5	148.2
0.005	26.3	54.3	72.3
0.001	5.2	10.6	14.3
0.0005	2.6	5.4	7.2
Control	0	0	0

Table 2. Histological Findings of the Urinary Bladder Epithelium of Rats Treated with Various Doses of BBN

Dose (%)	Simple hyperplasia			PN ^a hyperplasia		
	Weeks: 4	8	12	4	8	12
0.05	+	+	+	-	+	+
0.025	+	+	+	-	+	+
0.01	±	+	+	-	-	+
0.005	-	-	-	-	-	-
0.001	-	-	-	-	-	-
0.0005	-	-	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-

^aPN, papillary or nodular.

-, no change; ±, trace; +, slight; +, moderate; +, marked

て、各群の BBN 濃度と摂取量には相関性が認められた。

光顕的に正常の膀胱粘膜は 2~3 層の移行上皮からなる。BBN 投与により Fig. 1 のごとくの膀胱粘膜上皮のびまん性増生からなる単純性過形成 (simple hyperplasia) と Fig. 2 のごとくの血管結合織の新生を伴った乳頭状あるいは結節状過形成 (papillary or nodular hyperplasia, PN 過形成) がみられた。Table 2 は BBN の各用量と時期における上皮過形成の出現程度を示したものである。単

Fig. 1. Simple hyperplasia of the urinary bladder epithelium in a rat treated with 0.025% BBN for 4 weeks. H.E., ×176.

Fig. 2. Papillary or nodular hyperplasia of the urinary bladder epithelium in a rat treated with 0.05% BBN for 12 weeks. H.E., ×88.

Fig. 3. Peaked microridges on the luminal surface of the urinary bladder in a control rat. Scanning electron microscopy. ×8,360.

Table 3. Scanning Electron Microscopic Findings of the Urinary Bladder Epithelium of Rats Treated with Various Doses of BBN

Dose (%)	Pleomorphic microvilli			Short, uniform microvilli			Ropy or leafy microridges		
	Weeks: 4	8	12	4	8	12	4	8	12
0.05	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.025	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.01	-	-	+	-	+	+	+	+	+
0.005	-	-	-	-	-	-	-	-	+
0.001	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.0005	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- , no change ; + , slight ; + , moderate ; + , marked

純性過形成は4週投与で0.025% BBN以上に明らかに認められ、12週になるにつれてより高度となった。また、0.01%投与群では8週で軽度の単純性過形成が出現した。PN過形成はBBN4週投与ではまったく見られなかったが、8週の0.025%以上で出現し、12週になるにつれてその程度は強くなった。また、0.01% BBNでは12週においてPN過形成の出現をみたが、0.05%以下ではまったく認められなかった。

走査電顕的には正常の膀胱表層細胞の表面は均一の大きさの多角形の細胞からなっており、その細胞表面は peaked microridges (Fig. 3) から構成されている。BBN投与により表層細胞の表面には Fig. 4 のごとく長短とりまぜた微絨毛, pleomorphic microvilli と短い均一な微絨毛, short, uniform microvilli (Fig. 5) からなるものが観察され、さらに Fig. 6 のごとくローブ状あるいは葉脈状の microridges からなる ropy or leafy microridges 等が観察された。4週投与で0.025% BBN以上に表層細胞の軽度の数石状配列が認められ、Table 3に示すごとく、表面には多数の ropy or leafy microridges とともに pleomorphic microvilli や short, uniform microvilli がみられた。さらに、これらの変化は0.05% BBNでは0.025% BBNより明瞭に観察された。8週では細胞の大小不同を伴った数

石状配列が4週に比してより強く0.025% BBN以上にみられ、12週では0.01%でも同様の所見が出現した。また、pleomorphic microvilli, short, uniform microvilli, ropy or leafy microridges等の出現がBBNの用量と期間に依存性に増加傾向をもって認められた。0.001%以下ではこれらの変化は全く観察されなかった。

8週における尿沈渣で $MgNH_4PO_4$ の結晶が対照群を含む各群にみられたが、特に投与との関連はなかった。尿 pH、浸透圧も対照群との間に差を見いだせなかった。

実験2: 実験開始後40週までは各群とも順調な体重増加を示したが、それ以後、0.005% BBN投与群では対照群に比し、体重の抑制傾向が認められた。また、各群間における摂水量には差がみられなかった。60週以上に血尿症状を示すラットが0.005%群に認められ、肉眼的に0.005% BBN群の40週以上、特に60と82週において明らかな膀胱腫瘍の形成が認められた。

Table 4に膀胱粘膜の病理組織学的所見を示す。0.005% BBN投与群で膀胱癌 (Fig. 7) が40週で出現し、60、82週になるにつれてその発生は高頻度となった。乳頭腫は20週で既に出現し、実験の長期化とともに増加傾向を示した。0.001% BBNで

Fig. 4. Pleomorphic microvilli on the luminal surface of the urinary bladder in a rat treated with 0.05% BBN for 12 weeks. Scanning electron microscopy. $\times 7,480$.

Fig. 5. Short, uniform microvilli on the luminal surface of the urinary bladder in a rat treated with 0.05% BBN for 8 weeks. Scanning electron microscopy. $\times 7,920$.

Fig. 6. Ropy or leafy microridges on the luminal surface of the urinary bladder in a rat treated with 0.05% BBN for 8 weeks. Scanning electron microscopy. $\times 7,920$.

Table 4. Histopathologic Findings of the Urinary Bladder in Rats Exposed to Various Doses of BBN for up to 82 Weeks

Group	Dose of BBN (%)	Administration period (weeks)	No. of rats	Histopathologic Findings of Bladder Epithelium (%)			
				Simple hyperplasia	PN* hyperplasia	Papilloma	Carcinoma
I	0.005	20	21	20 (95.2)	16 (80.0)	1 (4.8)	0 —
		40	23	17 (73.9)	22 (95.7)	6 (26.1)	1 (4.3)
		60	7	6 (85.7)	6 (85.7)	1 (14.3)	4 (57.1)
		82	5	4 (80.0)	5 (100.0)	2 (40.0)	3 (60.0)
II	0.001	20	21	1 (4.8)	1 (4.8)	0 —	0 —
		40	22	1 (4.5)	2 (9.1)	0 —	0 —
		60	6	2 (33.3)	1 (16.7)	0 —	0 —
		82	8	2 (25.0)	0	2 (25.0)	0 —
III	0.0005	40	4	0 —	0 —	0 —	0 —
		60	7	0 —	0 —	0 —	0 —
		82	4	0 —	0 —	0 —	0 —
IV	—	82	10	0 —	0 —	0 —	0 —

*PN, papillary or nodular.

Fig. 7. Urinary bladder carcinoma of a rat treated with 0.05% BBN for 82 weeks. H.E., $\times 352$.

は癌の発生は全くみられず、乳頭腫が82週で8例中2例に認められた。また、PN過形成が20~60週にかけて出現した。0.0005% BBN群では膀胱粘膜病変は認められず、無処置対照群と同様、正常像を示した。

考 察

実験1において、BBNによる膀胱粘膜の初期変化は光顕的ならびに電顕的にBBN濃度と投与期間に相関して出現した。すなわち、0.05% BBN群

の4週では光顕的に単純性過形成のみでも、明らかな走査電顕所見が出現し、PN過形成の出現とともに走査電顕所見は高度となった。また、0.25%と0.01%のBBN投与群でも程度の差こそあれ、同様の光顕的、走査電顕的所見が認められた。このように、BBNによる初期変化の発生には明らかな用量依存性がみられた。

BBNによる膀胱癌発生過程として、光顕的に単純性過形成、次いでPN過形成が出現し、さらに乳頭腫を経て癌に至ることが知られている^{2,4,13}。な

かでも PN 過形成は膀胱癌の前癌病変として位置づけられており²⁴, この病変の出現をもって長期実験における膀胱癌の発生が強く示唆される。また, 走査電顕的に pleomorphic microvilli や short, uniform microvilli 等がみられたが, 特に pleomorphic microvilli は上皮の可逆性の増殖病変でも出現するが¹⁷, 一方では, その上皮の不可逆性変化の指標といわれていた^{2,18,19}。今回の実験 I より 0.025% BBN 以上の 4 週間投与で既に pleomorphic microvilli がみられたが, この事実は 0.05% BBN の 4 週間投与ののち長期間飼育により膀胱癌発生が認められたという報告¹³ とあわせ考えても興味ある事実である。また, 光顕的に前癌病変のない時期に走査電顕的に pleomorphic microvilli がみられた事実は, 膀胱癌発生の有無の指標として走査電顕の手法が光顕の手法に比して, より有用であることを物語っている。

BBN の発癌実験において, BBN の投与量に相関して前癌病変, 乳頭腫や癌の発生が認められた。ただし, 一つ興味のある事実は 0.005% BBN 群で, 癌の発生が 60 週で急激に高まったことである。同様なことは 0.01% ないし 0.05% BBN で 4 週間処置した後, 無処置で長期にわたって飼育, 観察した実験における PN 過形成の出現についてもいえず, 前癌病変の出現, さらにそれを基盤にした腫瘍, 特に癌の発生ならびに成長過程において, それらは一定のスピードで成長, 発育するのではなく, 同一の腫瘍性病変でも時期により何らかの質的変動が加わり, 成長速度が変わることを示しているよう。

0.001% BBN の 82 週間処置群に 8 匹中 2 例の乳頭腫の発生がみられた。一般に, F344 ラットにおける自然発生膀胱腫瘍の頻度は極めて低率であることから²⁰⁻²², 0.001% BBN, 82 週で発生した乳頭腫は BBN によって発現したとみることができ。また, 今回の実験では, 0.0005% BBN, 82 週間処置群の膀胱に何らの変化もみられなかった。しかし, 我々の行った他の実験¹⁰; 0.0005% BBN, 104 週間投与, では膀胱癌の発生を得ており, 0.0005% という濃度が発癌に対して無影響量であるとはいえないであろう。

BBN 投与 12 週による初期変化では 0.005% 以上に膀胱粘膜の走査電顕所見が出現し, 0.001% 以

下では何らの初期変化もみられなかった。しかし, 82 週にわたる発癌性実験では 0.001% でも, 膀胱の前癌病変や腫瘍が低頻度であるが, 出現している。F344 ラットと Wistar 系ラットにおける BBN 膀胱発癌に対する感受性はほとんど同等であることから²³, 0.001% BBN をさらに投与することにより, BBN による走査電顕所見が出現する可能性が十分示唆された。

本研究は文部省がん特別研究費 (60010076, 61010077, 62010075), 厚生省がん研究助成金 (58-5, 61-23, 62-9) および厚生省科学研究費補助金 (対がん戦略事業) の援助を受けた。

文 献

1. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmidt, CH., Mennel, HD., und Stahl, KU: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl- und N-butyl-N-butanol-(4)nitrosamin. *Z. Krebsforsch.* 66: 280-290, 1964.
2. Ito, N., Hiasa, Y., Tamai, A., Okajima, E., and Kitamura, H: Histogenesis of urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine in rats. *Gann* 60: 401-410, 1969.
3. Arai, M., Kani, T., Sugihara, S., Matsumura, K., Miyata, Y., Shinohara, Y., and Ito, N: Scanning and transmission electron microscopy of changes in the urinary bladder in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* 65: 529-540, 1974.
4. Fukushima, S., Murasaki, G., Hirose, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R., and Ito, N: Histopathological analysis of preneoplastic changes during N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in rats. *Acta Pathol Jpn* 32: 243-250, 1982.
5. Fukushima, S., Shibata, M.-A., Shirai, T., Tamano, S., and Ito, N: Roles of urinary sodium ion concentration and pH in promotion by ascorbic acid of urinary bladder carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 46: 1623-1626, 1986.
6. Fukushima, S., Shibata, M.-A., Tamano, S., Ito, N., Suzuki, E., and Okada, M: Aging and urinary bladder carcinogenesis induced in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *JNCI* 79: 263-267, 1987.
7. Fukushima, S., Hirose, M., Tsuda, H., Shirai, T., Hirao, K., Arai, M., and Ito, N: Histological classification of urinary bladder cancer in rats induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Gann* 67: 81-90, 1976.
8. Ito, N: Early changes by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in the bladder epithelium of different animal species. *Cancer Res* 36: 2528-2531, 1976.

9. 伊東信行：宿題報告Ⅰ。膀胱癌：発生と進展ならびにその修飾。日病会誌 75：3-37, 1986.
10. Ito, N, Shirai, T, Fukushima, S, and Hirose, M: BBN dose-response study of urinary bladder carcinogenesis in rats by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. J Cancer Res Clin Oncol 108: 169-173, 1984.
11. Ito, N, Fukushima, S, Shirai, T, and Nakanishi, K: Effects of promoters on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in the rat. Environ Health Perspect 50: 61-69, 1983.
12. Ito, N, Fukushima, S, Shirai, T, Nakanishi, K, Hasegawa, R, and Imaida, K: Modifying factors in urinary bladder carcinogenesis. Environ Health Perspect 49: 217-222, 1983.
13. Ito, N, Arai, M, Sugihara, S, Hirao, K, Makiura, S, Matayoshi, K, and Denda, A: Experimental urinary bladder tumors induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. GANN Monograph on Cancer Research 17: 367-381, 1975.
14. Nakanishi, K, Hirose, M, Ogiso, T, Hasegawa, R, Arai, M, and Ito, N: Effect of sodium saccharin and caffeine on the urinary bladder of rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. Gann 71: 409-500, 1980.
15. Nakanishi, K, Fukushima, S, Shibata, M, Ogiso, T, and Ito, N: Effect of phenacetin and caffeine on the urinary bladder of rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. Gann 69: 395-400, 1978.
16. Shirai, T, Murasaki, G, Tatematsu, M, Tsuda, H, and Fukushima, S: Early surface changes of the urinary bladder epithelium of different animal species induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine. Gann 68: 203-212, 1977.
17. Fukushima, S, Cohen, SM, Arai, M, Jacobs, JB, and Friedell, GH: Scanning electron microscopic examination of reversible hyperplasia of the rat urinary bladder. Am J Pathol 102: 373-380, 1981.
18. Jacobs, JB, Arai M, Cohen, SM, and Friedell, GH: A long term study of reversible and progressive urinary bladder cancer lesions in rats fed N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide. Cancer Res 37: 2817-2821, 1977.
19. Jacobs, JB, Ari, M, Cohen, SM, and Friedell, GH: Early lesions in experimental bladder cancer scanning electron microscopy of cell surface marker. Cancer Res 36: 2512-2517, 1976.
20. Goodman, DG, Ward, JM, Squire, RA, Chu, KC, and Linhart, MS: Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. Toxicol Appl Pharmacol 48: 237-248, 1979.
21. Fukushima, S, Hagiwara, A, Ogiso, T, Shibata, M, A, Kurata, Y, and Ito, N: Spontaneous tumors in F344 DuCrj rats. Nagoya Med J 29: 163-172, 1984.
22. Maekawa, A, Kurokawa, Y, Takahashi, M, Kokubo, T, Ogiu, T, Onodera, H, Tanigawa, H, Ohno, Y, Furukawa, F, and Hayashi, Y: Spontaneous tumors in F-344/DuCrj rats. Gann 74: 365-372, 1983.
23. 中野渡純一, 柴田道子, 宮田幸忠, 細田勝彦, 福島昭治: BBN による膀胱発癌におけるラット系統差. 第 42 回日本癌学会総会記事, 166, 1983.