膀胱部分切除, 偏側尿管結紮, および経尿道生理食塩水注入のラット膀胱粘膜上皮細胞増殖におよぼす影響

立松正衛 小木曾正 務台 衛 田中 光 福島昭治

名古屋市立大学医学部第1病理学教室

EFFECTS OF PARTIAL CYSTECTOMY, UNILATERAL URETERIC LIGATION, AND URETHRAL INJECTION OF PHYSIOLOGICAL SALINE ON URINARY BLADDER EPITHELIAL PROLIFERATION IN RATS

Masae Tatematsu, Tadashi Ogiso, Mamoru Mutai, Hikaru Tanaka, and Shoji Fukushima
First Department of Pathology, Nagoya City University Medical School

Abstract: The effects of partial cystectomy, unilateral ureteric ligation, and transurethral injection of physiological saline on the induction of DNA synthesis in urinary bladder epithelium were studied in a total of 130 male F344 rats. DNA synthesis was evaluated by autoradiography and by immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine labeled cells. DNA synthesis began to increase 12 hours after each treatment and reached a maximum at 24 to 48 hours with a mean labeling index of 15.8% (partial cystectomy; 48 hrs), 1.9% (unilateral ureteric ligation; 24 hrs), 2.5% (1 injection of physiological saline; 24 hrs), and 5.2% (2 times injections of physiological saline; 36 hrs). The proliferative activity of bladder epithelial cells returned to normal 2 weeks after partial cystectomy, and 1 week after unilateral ureteric ligation or physiological saline injection. (J Toxicol Pathol 1: 179~184, 1988)

Key words: Partial cystectomy, Unilateral ureteric ligation, Transurethral injection of physiological saline, DNA synthesis, Urinary bladder epithelium

序 文

膀胱粘膜上皮は正常な状態では、極めて増殖率の低い上皮であるが、凍結潰瘍²⁰, 結石を形成する uracil²¹ や melamine¹⁴ さらに膀胱粘膜障害作用を示す cyclophosphamide⁴⁰ により急激な細胞増殖が誘導されることが知られている。しかし、こうした要因の多くには、局所的な潰瘍, 結石の存在, 化学物質のもつ膀胱粘膜に対する種々の影響など, 検索を複雑にする因子が存在し⁵, 発癌を含めた膀胱粘膜の病理組織学的変化と膀胱粘膜上皮の増殖との相関関係の解析は困難である。そこで可能な限りこうした因子を少なくした膀胱粘膜上皮

の増殖法として膀胱部分切除^{11,17}, 偏側尿管結紮^{4,7}, および膀胱内への経尿道生理食塩水注入¹² を用い, これらによる膀胱粘膜上皮細胞増殖に対する影響を検討した。

細胞増殖の検索には, 従来は ³H-thymidine が用いられていたが, 近年 thymidine の analog である bromodeoxyuridine (BrdU) のモノクローナル抗体が開発され, DNA 合成細胞の検出が免疫組織化学的に可能となった¹⁶。そこで, 膀胱部分切除実験群では ³H-thymidine, 経尿道生理食塩水注入群は BrdU, 偏側尿管結紮群では ³H-thymidine および BrdU 両者により検索を行い, ³H-thymidine および BrdU の細胞増殖解析に対する有効性も併せて検討した。

Accepted for publication: August 31, 1988

Mailing address: Masae Tatematsu, First Department of Pathology, Nagoya City University Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467, Japan.

材料および方法

130 匹の 6 週齢雄 F344 ラットを日本チャール

スリバー株式会社(厚木)より入手し、2週間予備飼育した後8週齢にて実験に供した。飼料としてオリエンタル酵母株式会社(東京)製のオリエンタルMF固形飼料を用いた。

ラットは以下のごとく8群に分けた。

第1群: エーテル麻酔下で下腹部を切開し、膀胱を露出させ、膀胱頸部より同頂部に至る1/3の所で結紮し切除した。この位置での結紮により約75%の膀胱を切除したことになる。切除後、すみやかにオートクリップにより切開部の縫合を行った。

第2群: 第1群の偽手術操作を行った。

第3群: エーテル麻酔下で腹部を正中切開し左尿管と左腎臓を露出させ、尿管の下1/3を綱糸を用いて結紮し、その後すみやかに腹部の縫合を行った。

第4群: 第3群の偽手術を行った。

第5-A群: 軽いエーテル麻酔下でカテーテルにより尿道より0.6 mlの生理食塩水を1回注入した。

第5-B群: Aと同様にして第1回の注入後、24時間後に2回目の注入を行った。

第6群: 第5-B群と同様にして偽注入を行った。

第7群: 手術、偽手術、注入および偽注入いずれも行わない対照群とした。

実験開始後、第1および2群は、12, 24, 48時間、7日、14日で、第3~6群(5-Bと6群は36時間より)は、12, 24, 36, 48時間、7日、14日で、第7群は12時間および14日でそれぞれ3~4匹のラットを屠殺した。屠殺の50分前に ^3H -thymidine, $1 \mu\text{Ci/g body weight}$, を1および2群のラットに腹腔内投与し、Bromodeoxyuridine (BrdU), $100 \text{ mg/body weight}$, は同様にして3~7群のラットに腹腔内投与を行った。なお3群および5-B群の36時間で屠殺したラットには、 ^3H -thymidine ($1 \mu\text{Ci/body weight}$) を併せて投与した。

膀胱は、尿道を結紮し、10%中性緩衝ホルマリンを注入して24時間固定後、矢状断に8切片に細切し常法に従いパラフィンブロックを作製した。薄切の後 ^3H -thymidineを投与した群はNR-M2エマルジョン(サクラ)を用いてオートラジオグラフを作製した。BrdU投与群は、染色前に4N塩酸

で20分間、 37°C で処理しその後、0.04%アクチナーゼ(科研化学、東京)で3分間、 37°C で処理したのち、抗-BrdUマウスモノクローナル抗体(Becton Dickinson, U.S.A.)を用いて通常のABC法により免疫組織化学染色を行った。 ^3H -thymidineとBrdU同時投与群では、初めにBrdUの免疫組織化学染色を行ったのちオートラジオグラフを作製した。

成績

膀胱の肉眼および病理組織学的所見

膀胱部分切除群では、結紮部位にわずかに周囲組織との癒着を認めた以外には、著変は認められなかった。膀胱は部分切除後、徐々に大きくなり、2週間後には対照群の膀胱とほぼ同じ程度まで回復した。組織学的には、結紮部位の粘膜下に浮腫と軽い好中球の浸潤を認めたが、7日までに消失した。上皮細胞の増殖性変化は結紮部位において4~6層の単純過形成が2および7日に認められたが、乳頭状過形成は認められなかった。

偏側尿管結紮群では結紮した尿管の腎臓側および腎盂の拡張を示した以外、肉眼的な変化はなく、また組織学的にも膀胱粘膜には著変を認めなかった。

生理食塩水注入群では、肉眼的に膀胱には変化がなかった。組織学的にも、1回注入群には膀胱粘膜にほとんど変化がなく、2回注入した5-B群の36時間で屠殺したラットに軽い粘膜下出血を1例認めた。また、2日および7日に屠殺したラットに、3~4層の軽度の膀胱上皮単純過形成を認めた。

膀胱粘膜上皮細胞の増殖

膀胱部分切除群では、標識細胞は12時間後より24時間後までに急速に増加し48時間後まで高い標識率が保たれ、以後急激に低下した。偏側尿管結紮群では、12時間後ではほとんど標識細胞の変化は認めず、24時間後にわずかに増加し、48時間後にはすでに対照群と同じレベルに戻っていた。生理食塩水注入群では、1回投与群では24時間後に標識細胞が増加し、2回投与群では36時間後まで標識率が維持されたが2回目の投与後24時間では(Fig. 1)、すでに標識率の低下が認められた。 ^3H -thymidineとBrdUを同時に投与し2重標識を行った3および5-B群では、 ^3H -thymidineによる

Fig. 1. S-B 群, 第 2 回目の生理食塩水注入後 24 時間の膀胱上皮 (全経過 48 時間)。上皮の基底層に BrdU 標識細胞が認められる。

Fig. 2. S-B 群, 第 2 回目の生理食塩水注入後 12 時間の膀胱上皮 (全経過 36 時間)。 ^3H -thymidine と BrdU の 2 重標識例。上皮の基底層には 2 重標識された細胞が, また間質には ^3H -thymidine のみで標識された細胞が認められる。

標識と BrdU による標識はほとんど一致し (Fig. 2), 同一の細胞が標識され, 双方の標識率の一致率は, 95~100% の範囲であった。まれに認められる単独標識細胞の多くは ^3H -thymidine により標識されていた (Fig. 2)。各実験群における標識率を表 1 にまとめた。

考 察

一般に, 刺激による細胞の DNA 合成は, 一定の時間の経過後急激に開始され, 刺激の消失に伴い急激に低下することが報告されている¹³。肝部分

切除後の肝細胞では, 12 時間後までは, ほとんど DNA 合成は認められず, 以後急激に亢進し, 25 時間で 44% の肝細胞が標識され 64 時間後にはすでに正常レベルまで低下する²。モルモットの総胆管の結紮による胆嚢上皮の DNA 合成では 24 時間後に最高値に達して 4 日で正常レベルにもどることが観察されている⁹。今回の検索より, 膀胱部分切除, 偏側尿管結紮, 膀胱内生理食塩水注入いずれも膀胱上皮細胞の増殖に効果的であることが明らかとなった。偏側尿管結紮群および生理食塩水注入群では, 12 時間後ではまだ DNA 合成は始

表 1. 膀胱部分切除, 側尿管結紮および生理食塩水注入による膀胱粘膜上皮細胞標識率の経時変化^a

群	処置	観 察 期 間					
		12 時間	24 時間	36 時間	48 時間	7 日	14 日
1	膀胱部分切除	5.1±1.9 ^b	12.0±2.3 ^c		15.8±7.0 ^c	1.0±0.9	0.1±0.1
2	膀胱部分切除偽手術	0.2±0.1	1.1±0.6		0.6±0.4	0.2±0.1	0.2±0.1
3	側尿管結紮	<0.1	1.9±0.3	0.2±0.1 (0.2±0.1) ^a	<0.1	<0.1	<0.1
4	側尿管結紮偽手術	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
5-A	生理食塩水注入 1 回	<0.1	2.5±0.4	0.9±0.3 ^d	0.1±0.1 ^d	<0.1	<0.1
5-B	生理食塩水注入 2 回			5.0±1.3 (5.2±1.4) ^a	1.3±0.4	<0.1	<0.1
6	生理食塩水偽注入 2 回	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
7	無処理						<0.1

^a 1, 2 群は ³H-thymidine, 3~7 群は BrdU による標識率 ^b 平均±S.D. ^c P<0.01 (対; 3, 5 群)^d P<0.01 (対; 5-B 群) ^e ³H-thymidine による標識率

まっていなかったが、24 時間でいずれも DNA 合成ピークに達し、以後急激に低下した。ただし生理食塩水 2 回注入群では 36 時間(2 回目注入より 12 時間)でも高い DNA 合成率を維持していた。一方、膀胱部分切除群では 12 時間で、すでに DNA 合成が観察され 24~48 時間までそのピークが維持された。これらのデータは、膀胱上皮細胞の刺激に対する反応は、他の組織の刺激に対する細胞増殖と基本的に同一であることを示している¹⁸。さらに生理食塩水 2 回注入により上皮細胞増殖が維持されたことは、刺激の持続が上皮細胞増殖に不可欠な要素であることを示している。今回の検索から、膀胱部分切除が尿管結紮や生理食塩水注入より 3~5 倍の標識率を示したことから、膀胱上皮細胞の増殖に対して膀胱部分切除が最も効果的(p<0.01)であることが明らかになった。これは膀胱切除による増殖刺激が他の場合より長く作用したためと考えられる。

各群における上皮増殖は単純過形成までであり、乳頭状過形成は認められなかった。肝部分切除術においても、残った肝臓は約 1 週間で元の大きさまで回復するが、組織学的に過形成結節などは形成されない²。病理組織学的に膀胱上皮に乳頭状増殖が認められれば何らかの継続する病理学的要因の関与を考えるべきかもしれない。実際、凍結潰瘍による乳頭状過形成には潰瘍²⁰、ウラシルによる乳頭状過形成には結石²¹が認められる。したがって、膀胱部分切除、側尿管結紮、生理食

塩水注入による膀胱粘膜増殖は、それぞれの刺激にたいして 1 対 1 に近い対応を示している。

細胞増殖と発癌促進の研究は肝癌発生過程において多くの研究がなされており、肝部分切除による肝細胞増殖は促進的に作用することが明らかとなっている⁸。さらに胃¹⁸、脾¹、腎臓⁸、など多くの臓器発癌においても同様な促進効果が認められている。一方、膀胱発癌では、凍結潰瘍¹⁹と膀胱部分切除⁸には、いずれも促進効果が認められず、膀胱部分切除は抑制効果すら示した。しかし、細胞増殖が膀胱に限って例外的に発癌に対して抑制的に作用すると考えるより、膀胱において他臓器にない特殊な要因が作用したと考える方が妥当と思われる。すなわち、膀胱発癌物質は肝臓で代謝され尿中に近位発癌物質または究極発癌物質として最終的に排泄されるので、膀胱上皮との接触時間はきわめて重要な要因と考えられる。潰瘍や膀胱部分切除後の膀胱は収縮しており、尿の貯留が正常膀胱と比べ不十分であり、結果的に発癌物質との接触時間が短かったものと推察される。側尿管結紮による細胞増殖刺激は、膀胱部分切除と比べ有意に低い値を示したが、膀胱発癌に対して促進効果を示している¹⁸。これは側尿管結紮では膀胱自身にはほとんど障害がないため、正常膀胱と同様に尿が貯留されたためと考えられる。生理食塩水注入の膀胱発癌過程への影響は報告されていないが、膀胱の組織障害がほとんどないことから、促進的に作用することが考えられる。膀胱疾患の

治療として膀胱部分切除、尿管摘出、抗癌剤の膀胱内注入等が行われているが、こうした治療行為が膀胱上皮にいかなる増殖刺激を与え、疾患の進展にいかなる影響を与えているかは、今後さらに検索すべき研究分野と考えられる。

BrdUは最近、細胞DNA合成の免疫組織化学的検出に広く用いられるようになってきた。しかし、免疫組織化学においては、必ずしも存在する物質全てを検出できるとは限らない。特にBrdU検出はDNAの2重鎖を1重鎖にして取り込んだBrdUを露出させねばならず、正確な標識率が求められるか否か実際に検定する必要がある。今回の検索より、BrdU標識と³H-thymidine標識の間に95%以上の一致率が認められ、膀胱上皮の細胞増殖の検索には³H-thymidineのみならずBrdUも有効であることが示された¹⁶。³H-thymidineの使用にはRI施設が必要であるが、BrdUはその必要はなく簡単な設備で多くの研究施設において検索可能となる。そのため、今後、BrdUを用いた実験はますます盛んになるものと考えられるが、BrdUの免疫組織化学の染色結果に対して染色されていない細胞の存在を念頭において解析する必要があると考えられる。

文 献

1. Denda, A., Inui, S., Sunagawa, M., Takahashi, S., and Konishi, Y.: Enhancing effect of partial pancreatectomy and ethionine-induced pancreatic regeneration on the tumorigenesis of azaserine in rats. *Jpn J Cancer Res (Gann)* **69**: 633-639, 1978.
2. Fabrikant, JI.: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* **36**: 551-565, 1986.
3. Fukushima, S., Hirose, M., Okuda, M., Nakanowatari, J., Hatano, A., and Ito, N.: Effect of partial cystectomy on the induction of pre-neoplastic lesions in rat bladder initiated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine followed by bladder carcinogens and promoters. *Urol Res* **10**: 115-118, 1982.
4. Herbertson, BM., Steele, PRM., and Allen, J.: DNA synthesis in the urinary tract epithelium of the rat induced by ureteric ligation. *Lab Invest* **45**: 285-294, 1981.
5. 伊東信行: 膀胱癌・発生と進展並びにその修飾。日病会誌 **75**: 3-37, 1986.
6. Ito, N., Hiasa, Y., Tamai, A., and Yoshida, K.: Effect of unilateral nephrectomy on the development of kidney tumor in rats treated with N-nitrosodimethylamine. *Jpn J Cancer Res (Gann)* **60**: 319-327, 1969.
7. Ito, N., Makiura, S., Yokota, Y., Kamamoto, Y., Hiasa, Y., and Sugihara, S.: Effect of unilateral ureter ligation on development of tumors in the urinary system of rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Jpn J Cancer Res (Gann)* **62**: 359-365, 1971.
8. Ito, N., Tatematsu, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R., Takano, T., Imaida, K., and Ogiso, T.: The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitrosodiethylamine or N-2-fluorenylacetamide. *Jpn J Cancer Res (Gann)* **71**: 832-842, 1980.
9. Jacoby, F.: Mitotic activity in the gall bladder epithelium of the guinea pig after ligation of the common bile duct. *J Physiol (London)* **119**: 21-22, 1953.
10. Koss, LG.: A light and electron microscopic study of the effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs of the rat. I. The urinary bladder. *Lab Invest* **16**: 44-46, 1967.
11. Kunze, E., Albrecht, H., Wöltjen, HH., and Schauer, A.: Die Reparative Regeneration des Rattenurothels nach partieller Cystektomie nut ihre Bedeutung für die Carcinogenese. *J Cancer Res Clin Oncol* **95**: 159-175, 1979.
12. Martin, BF.: Cell replacement and differentiation in Transitional epithelium: a histological and autoradiographic study of the guinea-pig bladder and ureter. *J Anat* **112**: 433-455, 1972.
13. Mcminn, RMH.: *Tissue Repair*. pp. 320-329, New York, Academic Press, 1969.
14. Melnick, RL., Boorman, GA., Haseman, JK., Montali, RJ., and Huff, J.: Urolithiasis and bladder carcinogenicity of melamine in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol* **72**: 292-303, 1984.
15. Miyata, Y., Fukushima, S., Imaida, K., and Ito, N.: Promoting effects of unilateral ureteric ligation on two-stage urinary bladder carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* **23**: 265-272, 1984.
16. Tatematsu, M., Fukushima, S., Aoki, T., Mera, Y., Inoue, T., and Ito, N.: Patterns of epithelial proliferation revealed by continuous administration of bromodeoxyuridine during urinary bladder carcinogenesis in rats. *Jpn J Cancer Res (Gann)* in press, 1987.
17. Tatematsu, M., Imaida, K., Fukushima, S., Arai, M., Mizutani, M., and Ito, N.: Cytopathological effect of partial cystectomy of rats. *Acta Pathol Jpn* **31**: 535-543, 1981.
18. Tatematsu, M., Takahashi, M., Fukushima, S., Hananouchi, M., and Shirai, T.: Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine or 4-Nitroquinoline-1-oxide. *JNCI* **55**: 101-106, 1975.
19. Shirai, T.: Lack of enhancing effect of mucosal regeneration following ulceration of the urinary bladder on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine carcinogenesis in rats. *Cancer Res* **40**: 3709-3712, 1980.
20. Shirai, T., Cohen, SM., Fukushima, S., Hananouchi,

- M, and Ito, N: Reversible papillary hyperplasia of the rat urinary bladder. *Am J Pathol* **91**: 33-48, 1978.
21. Shirai, T, Ikawa, E, Fukushima, S, Masui, T, and Ito, N: Uracil-induced urolithiasis and the development of reversible papillomatosis in the urinary bladder of F344 rats. *Cancer Res* **46**: 2060-2067, 1978.