

イヌの膀胱腫瘍における自然史の病理組織学的検討

II. N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine にて発生したイヌの膀胱腫瘍の 病理組織学的所見の Mapping による検討

奈良県立医科大学泌尿器科学教室

常 深 邦 彦

HISTOPATHOLOGICAL STUDY OF NATURAL HISTORY OF BLADDER TUMOR IN DOGS

II. HISTOPATHOLOGICAL MAPPING STUDY OF THE URINARY BLADDER TUMORS INDUCED BY N-BUTYL-N-(4-HYDROXYBUTYL) NITROSAMINE IN DOGS

KUNIHICO TSUNEMI

Department of Urology, Nara Medical University

Received September 30, 1993

Abstract: Histopathological mapping study was performed on the development and progression of urinary bladder tumor induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) in five adult beagle dogs and four adult mongrel dogs. The results are as follows:

1) Urinary bladder tumors induced by low doses of BBN showed papillary, non-invasive type, G1-2, pTa-1 carcinomas which were similar to human superficial bladder cancer;

2) Microinvasion was occasionally observed in the papillary, non-invasive tumors induced by low doses of BBN, especially in the proliferated cells with atypia in the lamina propria;

3) Urinary bladder tumors induced by high doses of BBN showed non-papillary, invasive type, G2-3, pT3b, and carcinoma in situ (CIS), which were similar to human invasive bladder cancer;

4) No malignant progression was seen in low-grade, low-stage tumors during observation through the whole life of the dogs;

5) The duration and the total dosage of BBN until bladder tumor occurred in beagle dogs were longer and higher than those of BBN in mongrel dogs;

6) Those changes such as mild dysplasia and Brunn's nests-like lesion in lamina propria were seen during the development of low grade, papillary and non-invasive bladder tumors induced by low dose of BBN. On the other hand, those changes such as severe dysplasia and carcinoma in situ were seen during the development of non-papillary, invasive transitional cell carcinomas induced by high dose of BBN. The present study suggests that it contributed to knowledge of the natural history of bladder carcinogenesis in dogs, and is a valuable model of bladder carcinoma in humans.

Index Terms

urinary bladder carcinogenesis, natural history of bladder tumor, histopathological analysis, N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, dog

結 言

ヒト膀胱癌の約2/3は乳頭状・非浸潤性の癌で、残る1/3は非乳頭状・浸潤性の癌である。前者は細胞異型度が低く、臨床的に予後良好で、膀胱温存的に治療されることが多いが、再発を来す難点がある。一方、後者は細胞異型度が高く、転移をとまうこともあり臨床的に予後不良で、治療は膀胱全摘除術を含めた集学的治療が行われる。また、一部にこれらの中間型、すなわち乳頭状・浸潤性の癌が発生する。

このように、発生と進展形式をまったく異にするヒト膀胱癌の自然史の解明のためには、ヒト癌に類似した疾患モデルの確立が必要なことはいうまでもなく、化学発癌の研究のひとつの重要な課題でもある。すなわち、用いる化学発癌物質が膀胱のみを標的臓器としており、その投与方法は経口投与などによる容易で自然な方法であること、膀胱癌発生までの期間が短期間で、かつ発生頻度が高率であること、発生した膀胱癌は病理組織学的にヒト膀胱癌に極めて類似していることなどが重要な条件として挙げられる。

Druckrey ら¹⁾は N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine(以下 BBN)を合成し、ラットにおいて膀胱のみを標的臓器とする発癌物質であることを明らかにした。その後、ラット²⁾およびマウス³⁾の BBN による実験的膀胱癌は、ヒト膀胱癌の疾患モデルとして確立され、膀胱癌の発生ならびに進展に関する要因について詳細に解析が行われてきた。しかし、ラットではおもに乳頭状・非浸潤性の癌が、マウスではおもに非乳頭状・浸潤性の癌が発生するため、同一の動物でこれらヒト膀胱癌に類似した2つのタイプの発癌モデルの開発が望まれた。

Okajima ら⁴⁾はイヌに BBN を経口投与した実験的膀胱癌において、少量投与では乳頭状・非浸潤性の腫瘍が、大量投与では非乳頭状・浸潤性の腫瘍が発生し、病理組織学的にヒト膀胱癌と極めて類似性の高いことを、また、腫瘍の発生は発癌物質の投与量と相関し、高投与量ほど短期間にしかも悪性度が高い傾向を示すことを報告した。さらに、Samma ら⁵⁾は膀胱に N-methyl-N-nitrosourea(以下 MNU)を注入後、BBN を経口投与した場合、比較的少量の BBN の短期間投与で carcinoma *in situ*(以下 CIS)が発生することを報告した。このよう

にイヌにおける実験的膀胱癌はヒト膀胱癌の自然史に類似した組織発生と進展形式を有し、ヒト膀胱癌の疾患モデルとして有用性が高いことが示されている。

今回第1報において、加齢ビーグル犬50頭の膀胱粘膜上皮の変化を病理組織学的に検索したが、腫瘍性病変は観察されず、ブルン細胞巢、扁平上皮化生、リンパ球浸潤、単純性過形成および異型性が散見されるにすぎなかった。この結果は、実験用ビーグル犬が膀胱発癌実験材料として有用性が高いことを示すとともに、ビーグル犬を用いた実験的膀胱癌の基礎的資料を提供したと考えられる。そこで、本研究では、雑種犬において BBN の少量経口投与にて発生する乳頭状・非浸潤性の腫瘍および大量投与にて発生する非乳頭状・浸潤性の膀胱腫瘍について、病理組織学的に発生時の腫瘍型を検索するとともに、ビーグル犬において腫瘍発生後、長期間観察することにより腫瘍の進展経過を病理組織学的に検索し、イヌにおける膀胱腫瘍の発生と進展形式を検討することにより、ヒト膀胱癌の自然史についての研究の基礎資料とすることを目的とした。

実験材料および実験方法

1) 実験動物

実験動物は、体重7.8~10.5 kgの雌の雑種成犬4頭および約8カ月齢のビーグル犬(富士アニマルファーム、東京)5頭(雄:1頭、雌:4頭)を用いた。動物は、空調された専用犬舎で個別にイヌ用固形飼料(オリエンタル飼料DB;オリエンタル酵母、大阪)にて飼育され、飲料水は自由に摂取せしめた。

2) 発癌物質

発癌物質として N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine(以下 BBN, 泉化学・横浜)80, 160 および 500 mg をゼラチンカプセル(山桂産業・大阪)に封入し、1日1回、週6日、経口投与した。

3) 実験計画

全動物を BBN の投与量別に、1)BBN 80 mg/day 投与群: ビーグル犬雄1頭(No.B-3), 2)BBN 160 mg/day 投与群: 雑種犬雌2頭(No.24, 25), ビーグル犬雌2頭(No.B-4, B-5)および3)BBN 500 mg/day 投与群: 雑種犬雌2頭(No.32, 37), ビーグル犬雌2頭(No.B-12, B-13)の3群に分けた。BBN の投与期間および総観

察期間については、各群毎に、イヌの系統により以下のごとく設定した。すなわち、雄性イヌを用いた 80 mg/day 投与群ではX線学的に膀胱腫瘍の発生が認められたときに、経腹壁的に膀胱穿刺により膀胱鏡検査を実施し、膀胱鏡用組織生検鉗子を用いて採取した生検組織により、膀胱腫瘍が確認できた時点で屠殺した。また、雌性イヌを用いた 160 および 500 mg/day 投与群では、膀胱鏡検査ならびに膀胱鏡用組織生検鉗子を用いて採取した生検組織により、膀胱腫瘍が確認できた時点で、各々雑種犬については屠殺し、ビーグル犬については 500 mg/day 投与の No.B-12 および No.B-13 の 2 頭を除き BBN 投与を中止し、生涯観察することとした。動物は実験終了後、イソゾールで深麻酔し、放血にて安楽死させた後、病理解剖を行い、尿路臓器を中心に全身諸臓器の肉眼的変化について観察を行い、膀胱を全摘除した。膀胱は、直ちに 10% 中性ホルマリン液を経尿道的に注入して膨らませた後、尿道部を結紮し同固定液に浸漬固定した。固定後、尿道断端より尿道前壁・膀胱前壁を正中線に沿って頂部まで切開、次に左右の尿管に沿って尿管口まで膀胱壁を切開し、組織学的標本のために両尿管口を結ぶ線に平行に連続切片を作製した。パラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、病理組織学的に検索した。

膀胱粘膜上皮の病理組織学的変化については、「泌尿器科・病理 膀胱癌取扱規程」⁶⁾ および「Atlas of Tumor Pathology (AFIP)」⁷⁾ に基づいて検索した。

実験結果

BBN の経口投与により発生した膀胱腫瘍の病理組織学的結果の概要を Table 1. に示す。

1) BBN 80 mg/day 投与群 (No. B-3)

BBN 投与後 205 週の膀胱鏡検査ならびに生検にて膀胱腫瘍が確認されたため、ただちに屠殺したところ、膀胱の肉眼的所見では粘膜のほぼ全面にわたり、径 4~12 mm の大小さまざまな乳頭状腫瘍が多発していた (Plate 1)。病理組織学的には粘膜全面にわたり乳頭状・非浸潤性、広基性で、組織学的異型度は G 2、深達度は pT1b の移行上皮癌 (Plate 2 & Fig. 1) および粘膜固有層に同様の異型度をもつ移行上皮で構成されるプルン細胞巣状の増殖を呈する非乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌がみられた。その他の粘膜変化として、上皮の異形成および一部に扁平上皮化生が認められ、正常粘膜は認められなかった。

2) BBN 160 mg/day 投与群

雑種成犬の No.24 は、BBN 104 週間投与時、また No.

Table 1. Urinary bladder tumors induced by BBN in dogs

Dose (mg/day)	Dog	No. of dogs	Mean duration at first observed tumors (weeks)	Mean observation period without BBN treatment (wk)	Mean total experimental period (wk)	Mean total dose at first observed tumors (g)	Histopathological finding	
							Histology	Stage
80	Beagle	1	205	0	205	98.4	TCC ^{a)}	II pT1b
160	Mongrel	2	119	16	135	114.22	TCC	II pT1b, pT2
	Beagle	2	137	447	584	131.48	TCC	II pTis, pT1b
500	Mongrel	2	58.5	0.5	59	175.5	TCC	III pTis, pT3b
	Beagle	2	123	0	220	369.0	TCC	III pTis, pT3b

a) : Transitional Cell Carcinoma

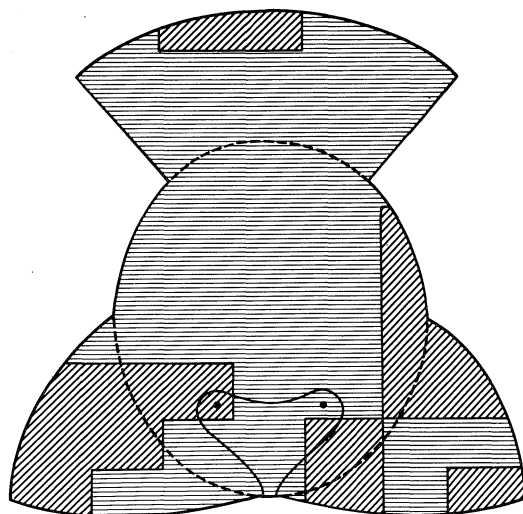


Fig. 1. Male Beagle Dog No. B-3. BBN 80 mg/day for 205 weeks. Sacrificed at 205 weeks. Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, grade 2, stage pT1b, were seen at various parts of the mucosa.

(□: Normal, ▨: No carcinoma, ▩: Hyperplasia, ▪: Dysplasia, ▫: CIS, ▬: Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▮: Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▯: Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma)

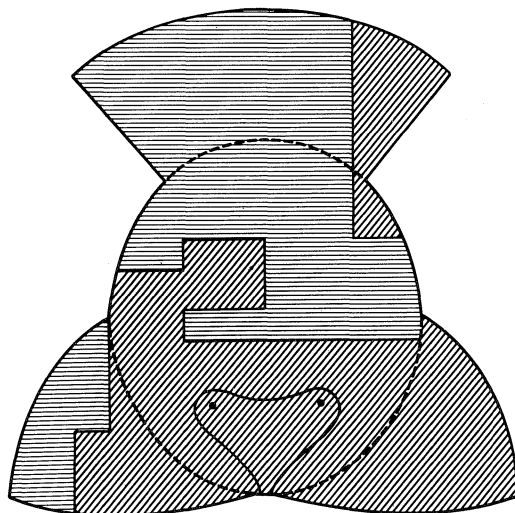


Fig. 2. Female Mongrel Dog No. 25. BBN 160 mg/day for 134 weeks. Sacrificed at 150 weeks. Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, grade 2, stage pT1b, were seen at various parts of the mucosa.

(□: Normal, ▨: No carcinoma, ▩: Hyperplasia, ▪: Dysplasia, ▫: CIS, ▬: Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▮: Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▯: Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma)

25は、BBN 134週間投与時の膀胱鏡検査および生検にて腫瘍の発生が認められたため、No. 24はBBN投与後120週、No.25は150週にて各々屠殺した。No.25の膀胱の肉眼的所見では粘膜のほぼ全面にわたり、径2~10mmの大小さまざまな乳頭状腫瘍の多発が認められた(Plate 3)。病理組織学的には膀胱の前壁、後壁、左右側壁および頂部の一部などに乳頭状・非浸潤性、広基性の移行上皮癌がみられ、組織学的異型度はG 2、深達度はNo.24がpT 2、No.25がpT1bであった(Plate 4 & Fig. 2)。また、No.25の膀胱のmappingでは乳頭状・非浸潤性腫瘍の周囲では粘膜固有層におけるブルン細胞層状の増殖をともなる非乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌(Plate 5)もみられた。非腫瘍部の粘膜では、上皮の異形成がみられ、正常粘膜はほとんど認められなかった。

雌性ビーグル犬No.B-4およびNo.B-5の2頭は、No.B-4においては実験開始後132週、No.B-5は142週において、それぞれ膀胱鏡および生検組織検査で、いずれもG 1~2の多発性の乳頭状移行上皮癌の発生が確認されたため、BBN投与を中止し、無処置にて観察を

行った。実験開始後194週目の膀胱鏡所見はPlate 6に示すごとくであった。その後ビーグル犬は実験開始後No.B-4は11年およびNo.B-5は11年6カ月生存した。No. B-5の実験開始後350週目の膀胱鏡所見では、発生した膀胱腫瘍は腫瘍数の若干の増加はみられたが、浸潤などの進展傾向は認められなかった(Plate 7)。いずれも老齢化による衰弱傾向が認められたので屠殺した。

肉眼的には、後壁および右側壁から前壁にかけて径20mm大の乳頭状腫瘍の発生が認められたが、粘膜全面にわたり小さな乳頭状および結節性変化も観察された(Plate 8)。2頭の病理組織学的所見は、乳頭状・非浸潤性、広基性の移行上皮癌で、いずれも組織学的異型度はG 2 > 3、深達度はpT 1 bであった。No.B-5の病理組織学的所見とmappingをPlate 9, Fig. 3に示した。また、粘膜固有層での結節性増殖をともなる非乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌(Plate 10)もみられ、組織学的異型度、深達度は同じくG 2 > 3, pT 1 bであった。さらに、後壁および前壁、左右側壁、三角部で腫瘍に随伴してCISが認められた。その他の粘膜変化として、多数の

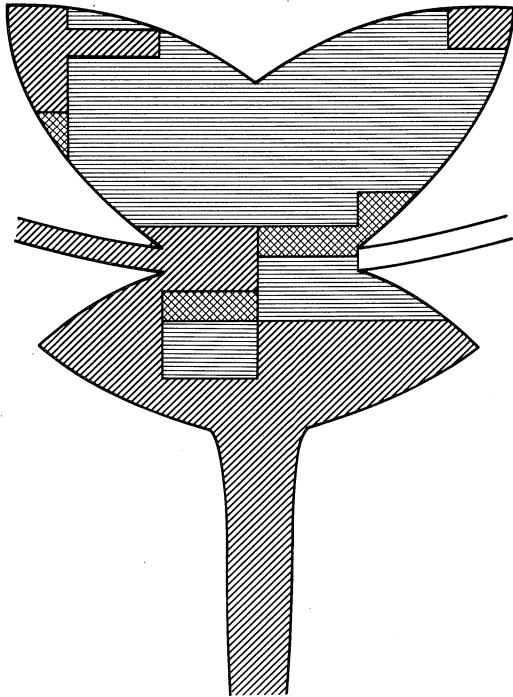


Fig. 3. Female Beagle Dog No. B-5. BBN 160 mg/day for 142 weeks. Sacrificed at 598 weeks. Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, grade 2>3, stage pT1b, were seen at various parts of the mucosa and CIS, were seen at anterior, right and left walls and trigone.

(□ : Normal, ▨ : No carcinoma, ▩ : Hyperplasia, ▧ : Dysplasia, ▦ : CIS, ▤ : Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▥ : Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ■ : Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma)

乳頭腫, 単純性過形成および異形成(Plate 11)がみられ, 正常な粘膜はほとんど認められなかった。

3) BBN 500 mg/day 投与群

雑種成犬の雌2頭のうち, No. 32はBBN投与開始72週時の膀胱鏡および生検にて膀胱腫瘍を認めたため, 73週にて屠殺したが, 病理組織学的には膀胱三角部を除く部位に非乳頭状・浸潤性で, 組織学的異型度G3, 深達度pT3bの移行上皮癌(Plate 12 & Fig. 4)が, また頂部および右側壁を除く部位の粘膜固有層に非乳頭状・浸潤性の移行上皮癌がそれぞれ認められた。腫瘍の周辺部では, 単純性過形成および軽度から重度の異形成がみられ, 正常な粘膜はほとんど認められなかった。一方No.37は, BBN投与45週時の膀胱鏡検査の麻酔時に事故死し

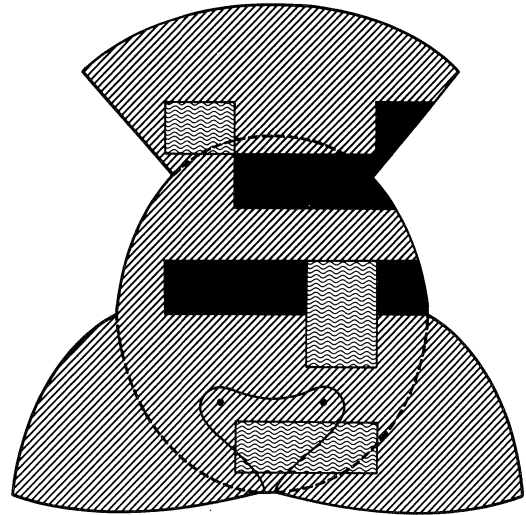


Fig. 4. Female Mongrel Dog No. 32. BBN 500 mg/day for 72 weeks. Sacrificed at 73 weeks. Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma, grade 3, stage pT3b, were seen at various parts of the mucosa and non-papillary, invasive transitional cell carcinoma grade 3, stage pT1b, were seen at anterior, posterior and left walls and trigone.

(□ : Normal, ▨ : No carcinoma, ▩ : Hyperplasia, ▧ : Dysplasia, ▦ : CIS, ▤ : Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▥ : Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ■ : Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma)

た。肉眼的に膀胱粘膜に腫瘍形成は認められなかったが, 病理組織学的検索では粘膜全面にわたり単純性過形成, 重度の異形成(Plate 13)および一部に原発性のCISがみられた(Plate 14 & Fig. 5)。

雌性ビーグル犬の2頭は, BBN投与約1年後より肉眼的血尿の発生がみられ, その後の膀胱鏡検査にて膀胱粘膜上皮にびまん性の充血, 出血性病変および潰瘍の発生などが観察された。BBN投与123週時の各々膀胱鏡および生検組織検査で, 多発性の非乳頭状・結節性移行上皮癌の発生が確認されたが, その後, 餌の摂取減少とともに衰弱がみられBBN投与を一旦中止し, 無処置にて観察を行いながら断続的にBBNを投与した。その間, 血尿は引き続き認められ, 動物の全身状態悪化のため投与開始後約4年で屠殺した。

ビーグル犬No.B-12の220週目の膀胱の肉眼的所見は, Plate 15に示すごとくほぼ粘膜の全面にわたり小さな結節性変化が観察された。病理組織学的には結節性変

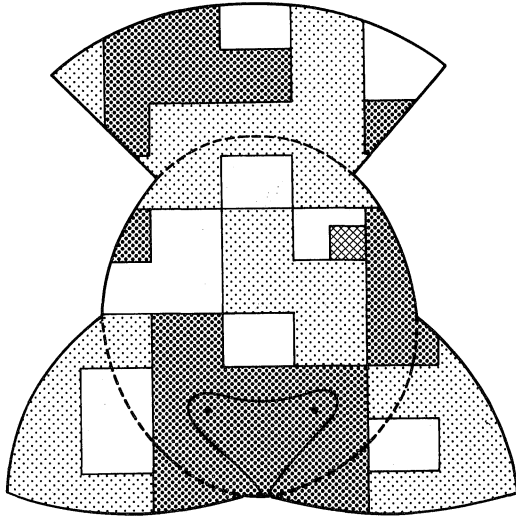


Fig. 5. Female Mongrel Dog No. 37. BBN 500 mg/day for 45 weeks. Sacrificed at 45 weeks. Hyperplasia and severe dysplasia in various parts of the mucosa and CIS, pTis partly.
 (□ : Normal, ▨ : No carcinoma, ▩ : Hyperplasia, ▧ : Dysplasia, ▦ : CIS, ▤ : Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▥ : Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ■ : Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma)

化部位は非乳頭状・浸潤型の移行上皮癌で組織学的異型度はG 3、深達度はpT3であった(Plate 16)。また、粘膜固有層での結節性増殖をともなる非乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌、一部に乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌および原発性のCISもみられたが、他臓器への転移は認められなかった。正常な粘膜はほとんど認められなかった(Fig. 6)。

500 mg/day 投与群で BBN 投与後 45 週で死亡した雑種成犬 No.37 の 1 頭を除く全例の粘膜固有層にはリンパ濾胞が散在性に認められ、上皮直下の粘膜固有層および腫瘍間質に多数の形質細胞浸潤がみられたが、単純性過形成および異形成部ではこのような細胞浸潤はほとんど認められなかった。500 mg/day 投与群で途中死亡した雑種成犬 No.37 では、粘膜固有層にブルン細胞巣はほとんどみられず、粘膜固有層のリンパ濾胞形成および形質細胞の浸潤もほとんど認められなかった。

考 察

ヒト膀胱癌では大きく分けて乳頭状・非浸潤性の癌と非乳頭状・浸潤性の癌が発生する。Okajima ら⁴⁾はイヌに

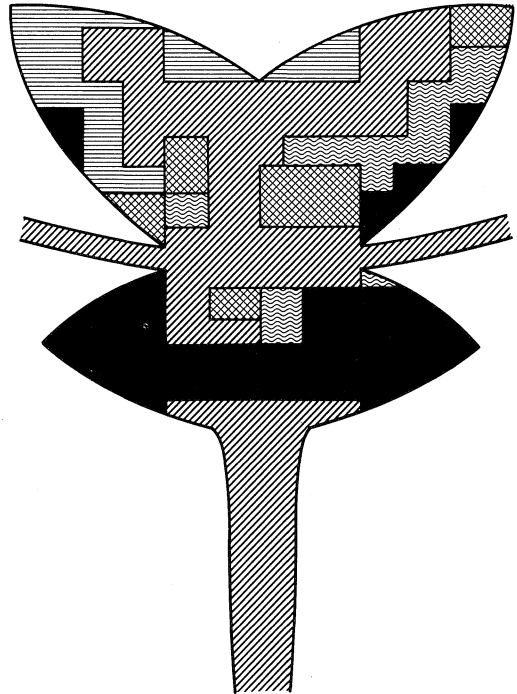


Fig. 6. Female Beagle Dog No. B-12. BBN 500 mg/day for 220 weeks. Sacrificed at 220 weeks. Non-invasive and invasive, non-papillary transitional cell carcinoma, grade 3, stage pT3, papillary, non-invasive transitional cell carcinoma and CIS, were seen at various parts of the mucosa.
 (□ : Normal, ▨ : No carcinoma, ▩ : Hyperplasia, ▧ : Dysplasia, ▦ : CIS, ▤ : Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ▥ : Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, ■ : Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma)

BBN を経口投与した実験的膀胱発癌において、少量投与では乳頭状・非浸潤性の腫瘍が、大量投与では非乳頭状・浸潤性の腫瘍が発生し、病理組織学的所見においてヒト膀胱癌と極めて類似性の高いことを報告し、Samma ら⁵⁾は膀胱にMNUを注入後、BBN を経口投与した場合、比較的少量の BBN の短期間投与で CIS が発生することをそれぞれ報告している。また、Hirao ら⁶⁾はイヌ膀胱腫瘍発生過程の膀胱粘膜上皮の表面微細構造の変化を走査電子顕微鏡にて経時的に観察し、ヒト膀胱癌と同様の変化がイヌ膀胱癌の発生過程においても生じていることを報告した。このようにイヌにおける実験的膀胱癌はヒト膀胱癌の自然史に類似した組織発生と進展形式を有し、ヒト膀胱癌の疾患モデルとして有用性が高い

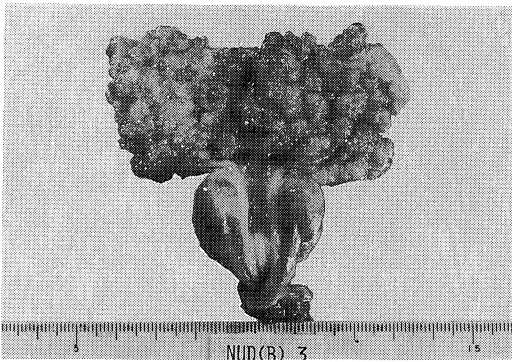


Plate 1.

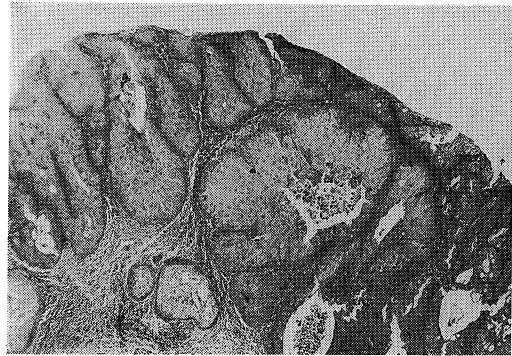


Plate 2.

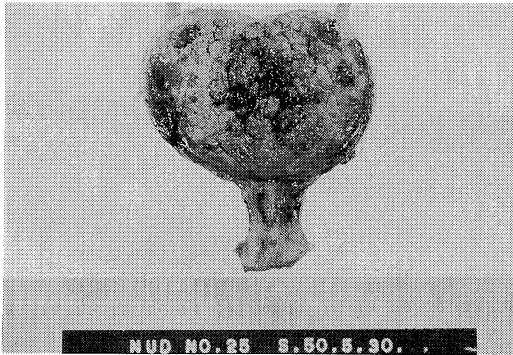


Plate 3.

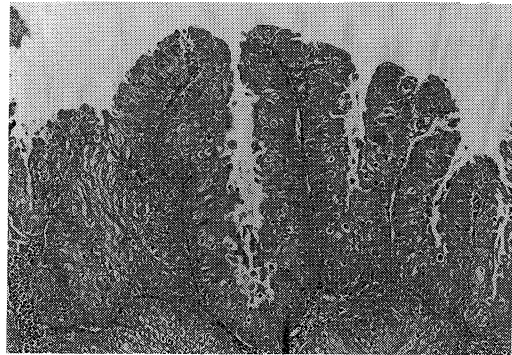


Plate 4.

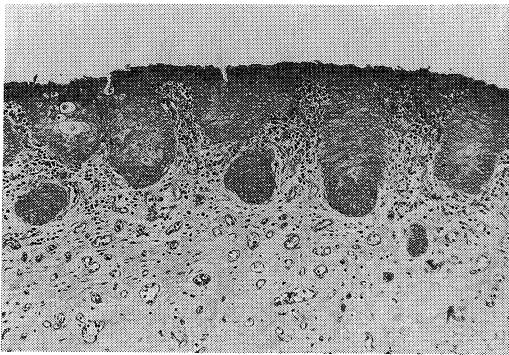


Plate 5.

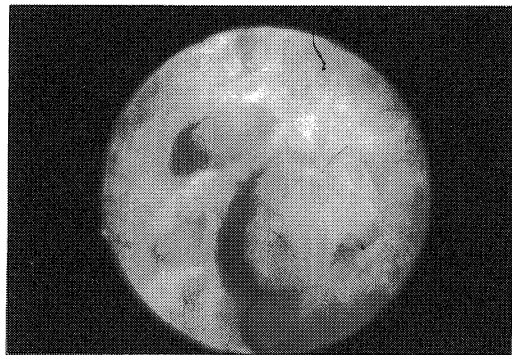


Plate 6.

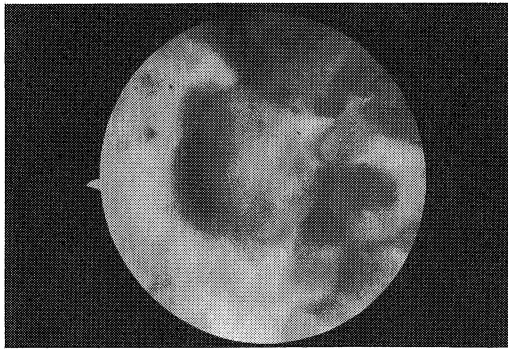


Plate 7.

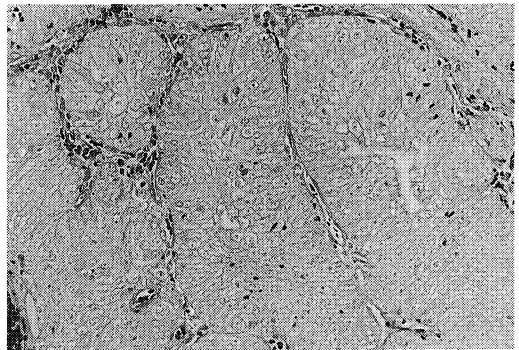


Plate 9.

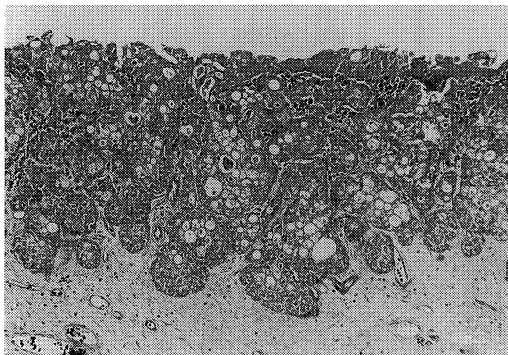


Plate 10.

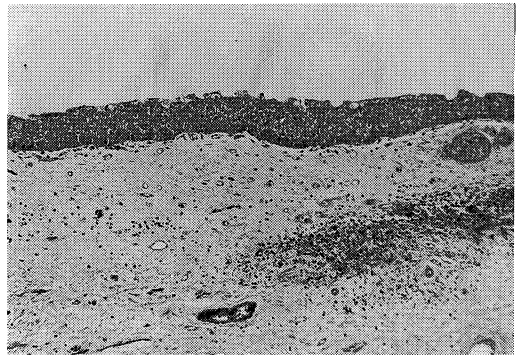


Plate 11.

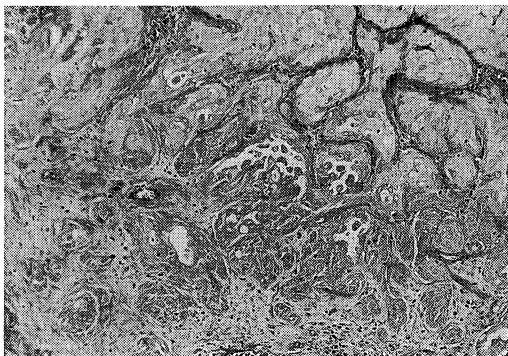


Plate 12.

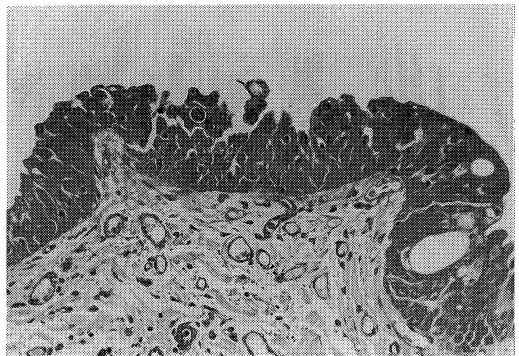


Plate 13.

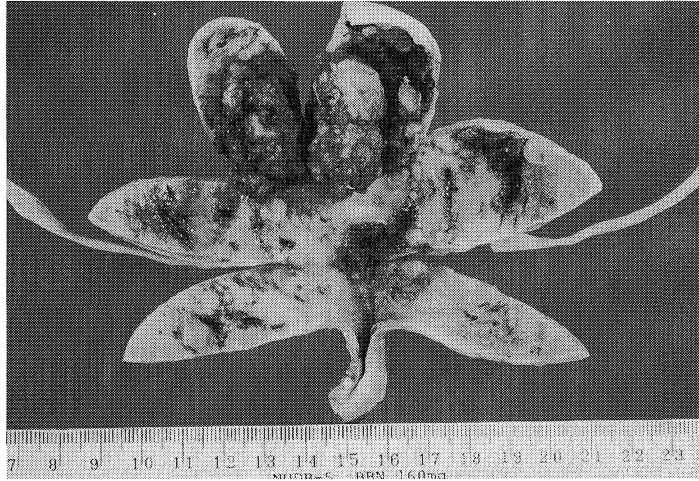


Plate 8.

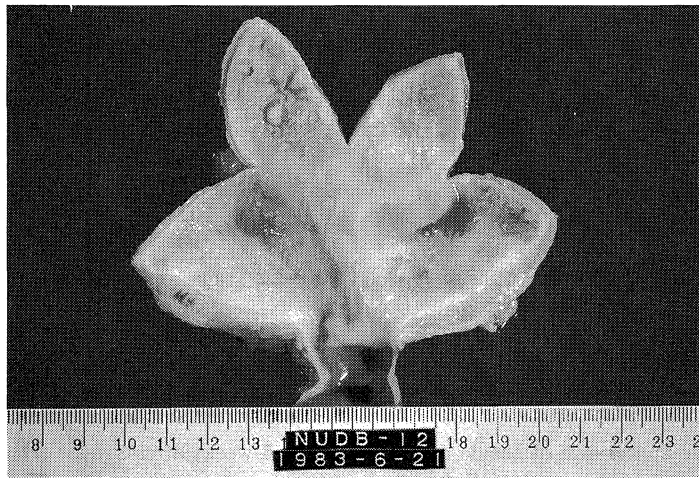


Plate 15.

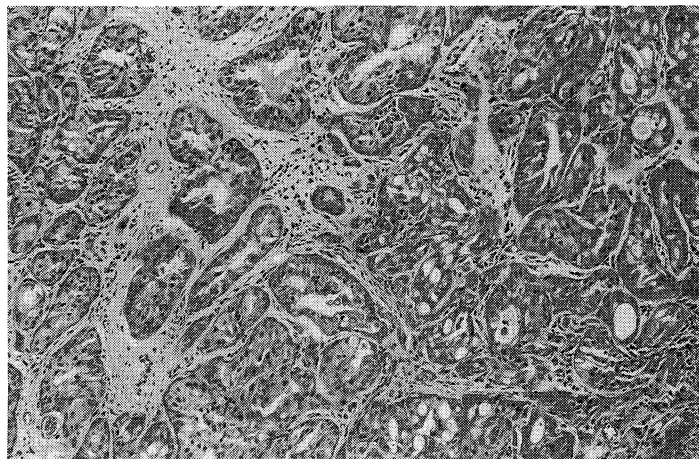


Plate 16.

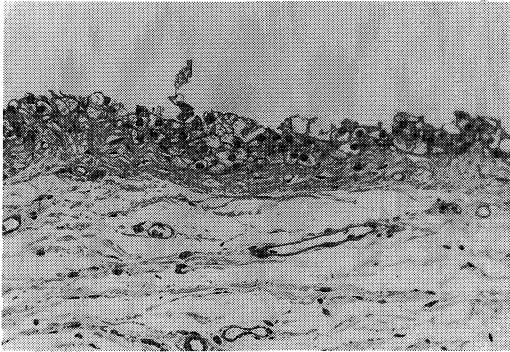


Plate 14.

- Plate 1. Gross finding of the urinary bladder in beagle dog No. B-3 treated with 80 mg/day of BBN for 205 weeks. Multiple variously sized papillary tumors are seen in all areas of the urinary bladder.
- Plate 2. Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, grade 2 in beagle dog No. B-3. H & E. $\times 40$
- Plate 3. Gross finding of the urinary bladder in mongrel dog No. 25 treated with 160 mg/day of BBN for 134 weeks. Multiple variously sized papillary tumors are seen in all areas of the urinary bladder.
- Plate 4. Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma, grade 2 in mongrel dog No. 24 treated with 160 mg/day of BBN for 104 weeks. H & E. $\times 100$
- Plate 5. Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma grade 1 in mongrel dog No. 25. Proliferation of Brunns' nests-like lesions are seen. H & E. $\times 100$
- Plate 6. Cystoscopic appearance of beagle dog No. B-5 at 194 weeks of treatment with 160 mg/day of BBN for 142 weeks. Broad bean and soybean-sized papillary tumors are seen.
- Plate 7. Cystoscopic appearance of beagle dog No. B-5 at 350 weeks after 3 years from Plate 6. Papillary tumors are not seen enlargement and development.
- Plate 8. Gross finding of the urinary bladder in beagle dog No. B-5 treated with 160 mg/day of BBN for 142 weeks. Variously sized papillary or nodular tumors are seen in all areas of the urinary bladder.
- Plate 9. Papillary, non-invasive transitional cell carcinoma grade 2 in beagle dog No. B-5. H & E. $\times 200$
- Plate 10. Non-papillary, non-invasive transitional cell carcinoma grade 3 in beagle dog No. B-5. Proliferation of Brunns' nests-like lesions are seen. H & E. $\times 100$
- Plate 11. Moderate dysplasia of urothelium in beagle dog No. B-5. H & E. $\times 100$
- Plate 12. Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma grade 3 in mongrel dog No. 32 treated with 500 mg/day of BBN for 72 weeks. Note infiltrative growth of cancer cells in the submucosa. H & E. $\times 100$
- Plate 13. Severe dysplasia of urothelium in mongrel dog No. 37 treated with 500 mg/day of BBN for 45 weeks. H & E. $\times 240$
- Plate 14. Carcinoma in situ in mongrel dog No. 37. H & E. $\times 240$

Plate 15. Gross finding of the urinary bladder in beagle dog No. B-12 treated with 500 mg/day of BBN for 220 weeks. Small nodular tumors are seen in all areas of the urinary bladder.

Plate 16. Non-papillary, invasive transitional cell carcinoma grade 3 in beagle dog No. B-12. H & E. $\times 100$

ことが示されている。

今回第1報において加齢ビーグル犬50頭の膀胱粘膜上皮の変化を病理組織学的に検索し、実験用ビーグル犬は膀胱発癌実験材料として有用性が高いことを示すとともに、ビーグル犬を用いた実験的膀胱発癌の基礎的資料を提供した。本研究では、雑種犬においてBBNの少量経口投与にて発生する乳頭状・非浸潤性の腫瘍および大量投与にて発生する非乳頭状・浸潤性の膀胱腫瘍について、腫瘍発生時の腫瘍型を病理組織学的に検索するとともに、ビーグル犬において腫瘍発生後、長期間観察することにより腫瘍の進展過程を病理組織学的に検索し、イヌにおける膀胱腫瘍の自然史について検討した。

本実験の結果、イヌにおいてBBNの経口投与により発生する膀胱腫瘍は、BBNの少量投与(80および160 mg/day)では、多発性の乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌で、ブルン細胞巣状増殖を示す非乳頭状・非浸潤性腫瘍や一部に乳頭状・浸潤性の腫瘍も認められた。BBN 160 mg/dayを投与し、2年6カ月で腫瘍の発生を確認後BBN投与を中止し、その後8年以上にわたり生涯観察したビーグル犬2頭の病理組織所見は、腫瘍発生時に認められた乳頭状・非浸潤性、G1~2の腫瘍と同様の移行上皮癌でG2>3, pT1bであり、その進展が極めて緩慢であることが観察された。ビーグル犬の寿命は環境の良い飼育農場で13~14年とされており、空調室とはいえ実験室での11年生存は、ほぼ寿命といえるもので、ヒトの70歳以上の高齢に相当する。観察期間中は肉眼的血尿の増悪や頻尿などの膀胱刺激症状の軽度の増悪がみられたが、血液所見、血液生化学所見にて異常所見がみられず、経時的に施行した膀胱鏡検査にてBBN投与中止後は腫瘍の著明な増大や進展は認められなかった。一般に乳頭状・非浸潤性で組織学的異型度が低く深達度の浅い腫瘍は、実験的膀胱腫瘍の発生過程において、プロモーターによって膀胱腫瘍の発生が促進されることはよく知られている^{9,10,11,12}。しかし、今回の実験において腫瘍発生後に発癌剤投与を中止して長期間観察した結果、腫瘍の増大や進展がみられなかったのは、食餌および飼育環境が管理された状況下でのことであり、膀胱腫瘍の発生後もとくにプロモーターなどの存在がなければ腫瘍は容易には進展しないことが示唆された。ヒトの乳頭状・非浸潤性移行上皮癌の約10%は、再発を繰り返すうちに浸潤性

の癌となることが報告されている^{13,14}が、これはヒトの場合種々の発癌物質の暴露およびプロモーターの存在下で生活しているため、低異型度で表在性癌の発生後もそれらの影響により、一部異型度を増した部位が浸潤性癌へと進展するのではないかと推察される。また、このビーグル犬2頭(No.B-4, B-5)では多数の乳頭腫が観察されたが、乳頭腫が観察された部位では上皮直下に形質細胞の浸潤をみるも固有層における上皮細胞の増殖は認められなかった。

一方、BBNの大量投与(500 mg/day)群では、非乳頭状・浸潤性の移行上皮癌が発生し、一部に乳頭状・非浸潤性の腫瘍および原発性CISも認められた。その他の変化としては高度の異形成がみられた。BBN 500 mg/dayを投与し、123週で腫瘍の発生を確認後、BBN投与を一旦中止し、無処置にて観察を行いながら断続的にBBNを投与したビーグル犬2頭では、非乳頭状・浸潤性で組織学的異型度G3、深達度pT3bからの進展はみられず、他の臓器への転移は認められなかった。

一般に光学顕微鏡で観察される膀胱組織では、粘膜固有層は疎な結合組織よりなり、粘膜下組織との境界部に存在する粘膜筋板も痕跡的である。病理組織学的には動物種により膀胱上皮組織には多少の差異が見られ、ヒト、イヌでは粘膜固有層が厚く、粘膜筋板は不明瞭とされる¹⁵。老齢ビーグル犬の膀胱粘膜では全例に、しかも粘膜のどの部位においても粘膜固有層にブルン細胞巣を認め、また同様に弱齢犬でも66.7%に認められた¹⁶。ブルン細胞巣は増殖性の変化であるとされているが⁹、今回観察したイヌ膀胱腫瘍はいずれも多発性のもので、少量投与および大量投与ともに、癌化した上皮細胞の多くはブルン細胞巣状増殖を経て、間質・血管をとまない乳頭状・非浸潤性へ、あるいは細胞異型の強い部位では非乳頭状・浸潤性へ進展していく可能性が示唆された。岸¹⁷はヒトの早期膀胱癌の1つの形態としてブルン細胞巣状早期癌を分類しており、乳頭状癌の成り立ちの1つとして、早期においてはブルン細胞巣状増殖を示す上皮内癌から、その発育過程において徐々に乳頭状形態を整えていく癌があるとしている。ブルン細胞巣はイヌの膀胱腫瘍発生および進展に関連する組織変化である可能性が考えられる。また、ブルン細胞巣はヒトにおいてもイヌ同様に高率にしかも粘膜のどの部位にも認められており¹⁸、ヒト

膀胱発癌過程においても癌の進展に関連する組織変化である可能性が示唆された。

移行上皮は哺乳動物の尿路にのみ存在し、一般に哺乳動物の尿は血液より高張であるにもかかわらず、腎臓より出された尿は尿路の通過中はほとんど変化せずに体外へ排泄される。このように高い塩類濃度をもつ尿に対し膀胱粘膜は特徴的な構造を示す腔側表層細胞の形質膜に barrier 機能があるともいわれている^{19,20}。今回観察したイヌの膀胱では、BBN 少量投与で発生・進展してくる乳頭状・非浸潤性腫瘍では表層細胞の残存がみられたが、大量投与でみられた CIS あるいは細胞異型度の高い異形成部では、腔側表層細胞の広範な欠損がみられ、そのような部位では腫瘍は浸潤型へ進展する傾向がうかがえた。

強い発癌物質あるいは多量の発癌物質の暴露により強い損傷を受けた表層細胞の部位では barrier 機能の欠落と共に、継続した発癌物質の暴露により膀胱上皮細胞に強い変化を引き起こすと考えられ、CIS あるいは高度の異形成が惹起されると思われる。そしてこのような CIS あるいは異形成の部位では粘膜固有層での上皮細胞の増殖を待たずに異型度の強い細胞が粘膜下織・筋層へと浸潤していくものと考えられた。

本研究では BBN 大量投与で途中死亡した 1 頭を除き、膀胱粘膜固有層のリンパ濾胞の形成、上皮直下および腫瘍間質への多数の形質細胞浸潤が認められた。実験動物生産施設で飼育・管理された老齢ビーグル犬では、リンパ球浸潤は多くは認められず¹⁶、このような細胞浸潤には何らかの免疫系の関与が示唆されるが、その詳細は不明であった。

BBN 投与による膀胱癌発生に要する期間は、ビーグル犬では少量投与で 137 週、大量投与で 123 週であり、雑種犬では少量投与で 119 週、大量投与で 58.5 週でありビーグル犬で若干長かった。また、BBN の総投与量は、ビーグル犬では少量投与で 131.48 g、大量投与で 369.0 g であり、雑種犬では少量投与で 114.22 g、大量投与で 175.5 g であり、ビーグル犬で多くの投与量が必要であった。このことは年齢不詳で実験前の生活状況が不明の雑種犬と生後より一定の環境下で飼育されてきたビーグル犬の飼育環境の相違であると考えられる。そして投与薬剤の影響を検討するためには、実験用ビーグル犬の使用が極めて有用であることが示唆された。

以上のように、イヌにおける BBN 経口投与にて発生する膀胱腫瘍は多発性であり、少量投与では乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌が見られるが、いずれも径 4~10 mm 程度の小さな腫瘍であり、ヒトの早期膀胱癌の範疇

にはいるものと考えられた。今回、病理組織学的に検索した例数は少ないが、BBN 投与によるイヌ膀胱癌に至る組織発生を推察してみると、BBN の少量投与(80 および 160 mg/day)では、まず粘膜上皮の単純性過形成が起こり、軽度の異形成となり、粘膜固有層でのブルン細胞巢状の結節性増殖をとまらぬ非乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌が形成され、間質および血管の新生にとまらぬ内腔側に結節性に増殖する。その後①乳頭状・非浸潤性癌へと進展する低異型度な腫瘍と②非乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌から若干腔内へ結節状あるいは乳頭状に進展するが、粘膜固有層で増殖するブルン細胞巢状増殖部の上皮が何らかの原因で異型度を増した部位では、浸潤性に移行する 2 種の癌がみられた。上記①と②の 2 通りの進展形式を示す腫瘍では、その発育に比較的長時間を要する。また、粘膜固有層にブルン細胞巢状の増殖のみられない部位では、粘膜の過形成および異形成のまま留まりその後の進展がみられなかった。

一方、BBN の大量投与(500 mg/day)では粘膜の過形成はほとんど認められず、まず高度の異形成が起こり、粘膜固有層で増殖した後、粘膜下組織・筋層へと進展をみせる非乳頭状・浸潤性癌と CIS が認められた。このような進展形式を示す腫瘍では、粘膜固有層にブルン細胞層の形成がみられない部位においても粘膜上皮の腫瘍細胞が粘膜固有層へ浸潤性に進展している部位が認められた。また、CIS の部位では粘膜固有層での腫瘍細胞の結節性増殖などはみられずその後の進展は認められなかった。

膀胱癌の発生機序について、Kakizoe ら²¹)はヒト膀胱全摘標本を stepsectioning により、また Oyasu ら²²、Samma ら²³)はラット同種異所性移植膀胱を用いて検討し、今回の著者が観察したイヌの膀胱腫瘍発生機序と同様の考え方を示している。

イヌに BBN を経口投与し発生する膀胱腫瘍は、少量投与にてヒト膀胱癌の組織学的異型度の低い、深達度の浅い、乳頭状移行上皮癌と、大量投与にてヒト膀胱癌の組織学的異型度の高い、深達度の深い、非乳頭状移行上皮癌とそれぞれ病理組織学的に類似の膀胱癌が発生し、またその進展様式も極めて類似している。したがって、ヒト膀胱癌の発生に際しては癌関連遺伝子の発現、変異および欠損などの変化が重要な因子であるが、今回の実験から膀胱癌の発生に際してイニシエーターの質や量の差によって、膀胱移行上皮細胞の悪性化能がある程度決定付けられることを示唆する結果が得られた。すなわち、膀胱癌の進展形式は、異型度の低い乳頭状型の表在性膀胱癌では悪性化傾向を示さず、表在性膀胱癌として経過し、何らかのプロモーター作用が加われば浸潤癌へと進

展するものであり、発生時から異型度の高い膀胱癌は乳頭状増殖を示さずに早期に浸潤性増殖を示し、非乳頭状浸潤性膀胱癌へと進展すると考えられ、その進展形式はプロモーターの作用や宿主側の因子など多くの因子によって悪性化や進展の程度が影響されるものと考えられる (Fig. 7). 以上、イヌを用いての実験的膀胱腫瘍の発生に関する研究は、ヒト膀胱癌の発生と進展を考える上で極めて有用性が高いと考える。

結 語

ビーグル犬5頭および雑種成犬4頭を用い、BBNの少量および大量投与にて発生した膀胱腫瘍ならびに腫瘍発生後の長期観察による腫瘍の進展過程を病理組織学的 mapping により検索し、イヌにおける膀胱腫瘍の発生および進展につきその自然史を検討した。

1) BBNの少量投与により発生するイヌ膀胱腫瘍は、多発性で乳頭状・非浸潤性で組織学的異型度はG 1~2と低く、深達度もpTaからpT1までのものが多く、ヒトにおける表在性の乳頭状・非浸潤性癌と類似の所見であった。また、膀胱癌の発生までには長期間を要した。

2) BBNの少量投与により発生した組織学的異型度の低い、乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌の中にも、粘膜固有層の増殖細胞内で細胞異型度が高い部位では、浸潤性の進展がみられた。

3) BBNの大量投与により発生するイヌ膀胱腫瘍は、非乳頭状・浸潤性の移行上皮癌で組織学的異型度はG 2

~3と高く、深達度はpT 3bを示し、また原発性の上皮内癌も認められ、ヒトにおける非乳頭状・浸潤性癌や上皮内癌と類似の所見であった。また、比較的短時間で腫瘍の発生がみられた。

4) ビーグル犬では雑種犬に比較して腫瘍発生までに長期間が必要であり、BBNの投与量も多く必要であった。

5) ビーグル犬においてBBNの少量投与によって発生した組織学的異型度の低い、深達度の浅い乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌の生涯観察の結果、一部にG 3の高異型度の膀胱癌(CIS)が随伴して発生しているのがみられたが、その多くは乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌で深部浸潤および転移などの悪性所見は認められなかった。

6) BBNの少量投与により発生するイヌ膀胱腫瘍は、軽度の異形成から粘膜固有層でのブルン細胞巣状の増殖を経て結節状に隆起し、その後、組織学的異型度の低い乳頭状・非浸潤性の移行上皮癌へと進展する。一方、BBNの大量投与により発生してくるイヌ膀胱腫瘍は、高度の異形成から上皮内癌を経て、非乳頭状・浸潤性の移行上皮癌へと進展するものと推察された。

以上、BBNの経口投与により誘発されるイヌ膀胱腫瘍の発生と進展に関する病理組織学的 mapping 検討結果は、イヌにおける膀胱癌の自然史の検討により、ヒト膀胱癌の自然史の解明に寄与するものと考えられ、とくにビーグル犬はヒト膀胱癌の疾患モデルとして極めて有用性の高いことが明らかとなった。

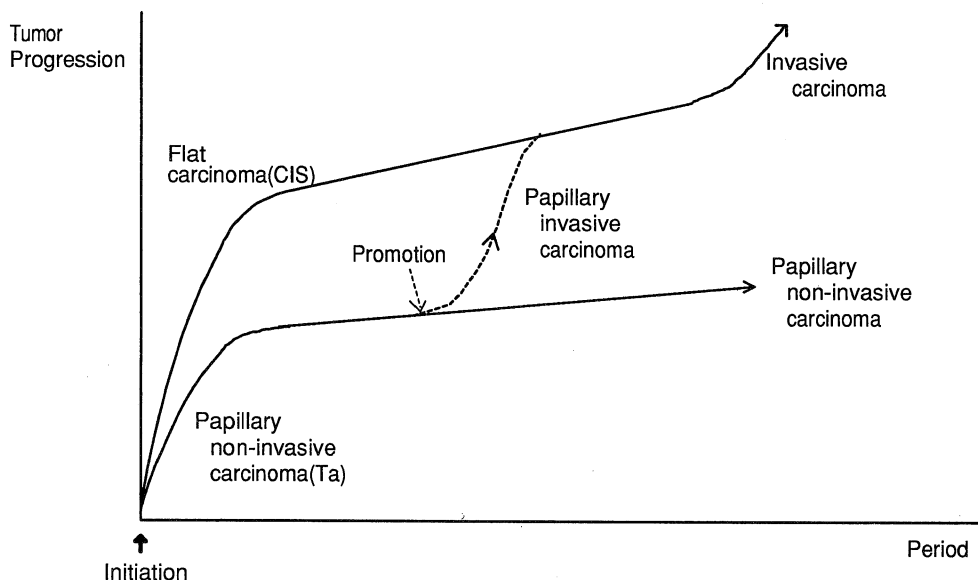


Fig. 7. Natural history of bladder carcinoma in dogs.

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師岡島英五郎教授に深甚なる謝意を捧げると共に、御校閲を賜りました腫瘍病理学教室の小西陽一教授ならびに第2病理学教室の日浅義雄教授に深謝致します。また、本研究を行うにあたり多大なる御協力を頂きました奈良県立医科大学泌尿器科学教室の諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmidt, C. H., Mennel, H. D. und Stahl, K. W. : 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) Ohtani, M., Kakizoe, T., Nishio, Y., Sato, S., Sugimura, T., Fukushima, S. and Niijima, T. : Sequential changes of mouse bladder epithelium during induction of invasive carcinomas by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Res.* **46** : 2001-2004, 1986.
- 4) Okajima, E., Hiramatsu, T., Hirao, K., Ijuin, M., Hirao, Y., Babaya, K., Ikuma, S., Ohara, S., Shiomi, T., Hijioka, T. and Ohishi, H. : Urinary bladder tumors induced by N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in dogs. *Cancer Res.* **41** : 1958-1966, 1981.
- 5) Samma, S., Uemura, H., Tabata, S., Iwai, A., Nakatsuji, F., Matsuki, H., Babaya, K., Hirao, Y. and Okajima, E. : Rapid induction of carcinoma in situ in dog urinary bladder by sequential treatment with N-methyl-N'-nitrosourea and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Gann* **75** : 385-387, 1984.
- 6) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会 : 泌尿器科・病理膀胱癌取扱い規約, 第2版, 金原出版, 東京, 1993.
- 7) Koss, L. G. : Tumors of the urinary bladder. *Atlas of Tumor Pathology, Fascicle 11.* Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1975.
- 8) Hirao, Y., Samma, S., Ozono, S., Babaya, K. and Okajima, E. : Scanning electron microcopy of changes in the urinary bladder in dogs treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine(BBN). *Urol. Res.* **15** : 25-29, 1987.
- 9) Fukushima, S., Thamavit, W., Kurata, Y. and Ito, N. : Sodium citrate: A promoter of bladder carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* **77** : 1-4, 1986.
- 10) Fukushima, S., Kurata, Y., Shibata, M., Ikawa, E. and Ito, N. : Promoting effect of sodium o-phenylphenate and o-phenylphenol on two-stage urinary bladder carcinogenesis in rats. *Gann* **74** : 625-632, 1983.
- 11) Cohen, S. M., Arai, M., Jacobs, J. B. and Friedell, G. H. : Promoting effect of saccharin and DL-tryptophan in urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.* **39** : 1207-1217, 1979.
- 12) 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.
- 13) Greene, L. F., Hanash, K. A. and Farrow, G. M. : Benign papilloma or papillary carcinoma of the bladder?. *J. Urol.* **110** : 205-207, 1973.
- 14) 垣添忠生, 松本恵一, 齋巢賢一, 高井計弘 : 乳頭状・表在性膀胱癌の発育, 進展に関する考察. *日泌尿会誌.* **78** : 1065-1069, 1987.
- 15) Amon, H. und Sancak, B. : Vergleichende morphologische Untersuchungen über die subepithelialen Bindegewebslagen der Harnblase. *Anat. Anz Bd.* **121** : 349-358, 1967.
- 16) 常深邦彦 : イヌの膀胱腫瘍における自然史の病理組織学的検討. I. 加齢イヌの膀胱粘膜上皮の病理組織学的検討. *奈医誌.* **44** : 229-235, 1993.
- 17) 岸紀代三 : 病理, 図説, 臨床癌シリーズ, No. 4, 膀胱癌. メジカルビュー社, 東京, p108-116, 1986.
- 18) Shirai, T., Fukushima, S., Hirose, M., Ohshima, M. and Ito, N. : Epithelial lesions of the urinary bladder in three hundred and thirteen autopsy cases. *Jpn. J. Cancer Res.(Gann)* **78** : 1073-1080, 1987.
- 19) Hicks, R. M. : The permeability of rat transitional epithelium. Keratinization and the barrier to water. *J. Cell Biol.* **28** : 21-31, 1966.
- 20) Warren, R. C. and Hicks, R. M. : Chemical

- dissection and negative staining of the bladder luminal membrane. *J. Ultrastruct. Res.* **64**:327-340, 1978.
- 21) **Kakizoe, T., Tobisu, K., Takai, K., Tanaka, Y., Kishi, K. and Teshima, S.** : Relationship between papillary and nodular transitional cell carcinoma in the human urinary bladder. *Cancer Res.* **48**: 2299-2303, 1988.
- 22) **Oyasu, R., Samma, S., Ozono, S., Bauer, K., Wallemark, C-B. and Homma, Y.** : Induction of high-grade, high-stage carcinomas in the rat urinary bladder. *Cancer* **59**: 451-458, 1987.
- 23) **Samma, S. and Oyasu, R.** : Conversion from low grade to high grade of rat urinary bladder carcinomas. *Cancer Res.* **48**: 1265-1269. 1988.