

氏 名（本籍） きた がわ ひさ よ
北 川 恒 代

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 9 0 9 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 5 0 年 9 月 1 0 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 3 6 年 3 月 1 5 日
共 立 薬 科 大 学 卒 業

学 位 論 文 題 目 ラ ッ ト 膀 胱 癌 移 植 系 ， 培 養 系 の 樹 立 と そ の 抗
悪 性 腫 瘍 剤 の ス ク リ ー ニ ン グ へ の 応 用

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 佐 藤 春 郎 教 授 齋 藤 達 雄

教 授 山 根 績

論文内容要旨

北川 恒代

抗悪性腫瘍剤のスクリーニングを行うに当って、目的とする臓器または組織の腫瘍と同じ臓器または組織由来の実験動物腫瘍を用いることが望ましいと考えられる。

膀胱癌は泌尿器科系での代表的な癌であるが、膀胱に限局し、外科的な処置も容易で、実験モデルが得難いためか、現在まで治療の開発は、直接臨床実験で始められるものが多かった。膀胱癌の治療法の開発のためには、客観的に観察結果の解析が行い得る実験モデルが必要とされていることは明かである。本報では、近交系動物に誘発した膀胱癌の移植系および培養系の樹立経緯樹立した系を用いてのスクリーニングの実験モデル系への応用性を報告する。

実験動物は腫瘍宿主間の免疫遺伝学的な背景が、明確なものを得るために、純系度の高いラットを用いた。膀胱癌はN-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN)およびBBN acetateを飲料水に混じて投与し、発生した腫瘍を用いて、移植系ならびに培養系を樹立した。

実験方法

I 膀胱癌の移植系ならびに培養系の樹立

上述の発生した膀胱腫瘍を膀胱ごと無菌的に摘出して、腫瘍部分を細かくさざみ移植針で動物の皮下または腹腔内に移植した。8例中7例の膀胱腫瘍について皮下移植が成立した。得られた系の継代は同系動物の皮下または腹腔内へ、それぞれの増殖速度に応じて行った。樹立した移植系は、BC-31, BC-37, BC-39, BC-41, BC-43, BC-47, BC-50であった。さらに培養系の戻し移植からBC-12, BC-35を得た。

培養系は、移植系と同じようにして得た膀胱の腫瘍部分から細片を10%仔牛血清加EagleMEM培地中で、37℃、密栓、静置培養した。5例中3例が増殖した。培地交換は、10%仔牛血清加EagleMEM培地で3~5日ごとに行い、継代はトリプシンとEDTAで平均10~14日ごとに行った。培養細胞を 10^6 個同系ラットに戻し移植を行って腫瘍由来であることをたしかめた。得られた培養系は、BC-12TC, BC-35TC, BC-50TCと移植系から得たBC-47TCの4系であった。

実験結果

移植系について、いずれも原発が移行上皮癌と判定されたもので、皮下移植では、移植後14~60日でクルミ大の腫瘤を形成し、36~60日で腫瘍死する。この移植腫瘍は、組織学的には原発腫瘍と同じ像を呈した。ただ一つ原発が乳頭腫のBC-12では移植腫瘍も乳頭腫であった。

樹立した移植系中、増殖のはやいBC-47を腹腔内に移植すると、3~4週間で腫瘍死する。同様に、BC-47を 10^6 個、 0.02 ml 中に浮遊して膀胱壁内に移植すると、10~14日で拇指頭大の腫瘍が膀胱腔内に向かって形成された。

培養系について、4系の樹立した培養細胞系はすべて 10^6 、腹腔内移植が可能であった。その組織所見は原発腫瘍と一致した。染色体はBC-12TCが2倍体であり、他の3系は低4倍体であった。

移植系、培養系細胞中の β -グルクロニダーゼ活性を他の癌ならびに正常臓器と比較すると、必ずしも高い値を示さなかった。同じ細胞でも移植系と培養系では活性が異った。

II 移植系、培養系を用いたスクリーニングへの応用

1 培養系細胞の化学療法剤に対する感受性：Mitomycin C, Thio-TEPA, Nitrogen Mustard, およびBleomycinを用いて、 ^3H -ウリジン法による細胞障害性、ならびにコロニー形成阻止効果で検討した。培養細胞4系について比較した。

2 膀胱壁内移植癌に対する化学療法剤の膀胱内直接注入法による効果：移植系膀胱癌BC-47を $10^6/0.02\text{ ml}$ 、雌ラットの膀胱壁内に移植し、ポリエチレンチューブで尿道から薬剤を注入し、連続7日間治療して、移植14日目に動物を殺して、腫瘍の重量を測定し、また組織像を観察した。用いた薬剤はMitomycin C 0.1 mg/day , 0.2 mg/day , Thio-TEPA 0.3 mg/day , 生理食塩水(対照群)である。

3 溶連菌製剤OK-432の移植膀胱癌に対する効果：BC-47をラットの皮下に一定量移植し、溶連菌製剤OK-432を腫瘍移植前、前後、後処置の三群に分けて連続7日間投与し、腫瘤を観察した。

実験結果：薬剤感受性は行った2法で異った結果を示し、全体的にコロニー形成阻止効果の方が感度が高かったが、いずれの細胞でもMitomycin Cに対する感受性が高かった。

膀胱腔内注入法では未処置群以外は、腫瘍の表面の壊死がみられたが、薬剤投与群では、明かに効果が認められる例が多かった。

溶連菌製剤OK-432に対する効果は、後投与群において2週目より急激な退縮がおこり、完全治癒がみられた。この効果は直接効果より宿主媒介作用と推定される。

結 論

樹立した移植系、培養系は移植動物に対して同系の関係にあり、移植腫瘍を用いて抗悪性腫瘍剤のスクリーニングを行う場合には、腫瘍特異抗原以外の関与がないので、適切なシステムと思われる。膀胱内薬剤注入法は、臨床的に実際に用いられている方法のモデル実験として使用しうる結果を得た。さらにOK-432の効果は免疫賦活と思われ、治療作用は宿主媒介免疫反応に関連していることが認められた。

今後、さらに免疫学的、細胞学的特性を考慮しながら、膀胱癌に対する薬剤のスクリーニング法、および適切な治療法の検討を行ってゆきたい。

審査結果の要旨

本研究は標的臓器発癌剤として近年注目をあびているニトロサミン系化合物の一つである N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (BBN) および BBN の Acetate 投与によって発生させた膀胱腫瘍の移植系 (7 系) と培養系 (4 系) を先ず樹立し、これらの特性を種々比較検討した。次にこれらを用いて化学療法剤スクリーニングへの応用を探るために、Mitomycin C, Thio-TEPA, Nitrogen Mustard および Bleomycin を用いてその効果を検している。方法としては培養細胞系では ^3H ウリジン法による細胞障害性とコロニー形成阻止効果を指標とし、Mitomycin C が最も有効という結果を得た。又移植系の細胞を膀胱壁内に移植し、薬剤を膀胱内直接注入する方法で効果を検討することを試み、スクリーニングの方法として用いられることを知った。この方法で宿主中介性の効果を示すと思われる溶連菌製剤 OK-432 の効果が著しく見られるという成績をえている。

本研究に用いた実験動物は、純系度の高い A C I / N ラットであり、腫瘍宿主間の免疫遺伝学的な背景を明確にするべく配慮を行っている。

膀胱癌は泌尿器科系の代表的な癌であるが、比較的膀胱に限局し、外科的処置も容易なものが多いようであり、これまで実験モデルが得難く、薬剤の効果等の検討に適当な材料はなかったと思う。本材料は、膀胱癌の化学療法の開発のために応用しうる資料としてその諸特性が検討されている。

以上本研究は膀胱癌の実験的作成からその細胞の移植系と培養系の樹立、その特性の検討から、これらを制癌剤スクリーニングへの応用並びに膀胱癌実験モデルの作製にいたる過程で、多くの新しい知見と今後の膀胱癌化学療法その他への貢献が含まれている。

よって本研究は学位授与に値するものと考えらる。