

●原 著

実験膀胱腫瘍に対する化学療法と高圧酸素の治療効果

秋谷 徹* 中田 英浩* 嘉川 宗秀* 梅田 慶一*
 風間 泰蔵* 笹川五十次* 片山 喬* 北川 正信**
 斉藤 春雄*** 太田 幸吉*** 千見 寺勝*** 松下 徳良***

The Effect of Hyperbaric Oxygenation with Chemotherapy on Experimental Bladder Tumor

Bladder tumor were induced by the administration of BBN at high frequency in rats. The therapeutic effects of hyperbaric oxygenation (OHP) together or singly with ADM and ACNU on this tumor were investigated.

OHP therapy decreased the weight of bladder like that of ADM alone. In addition, both treatments reduced it more effectively than that of ADM or OHP only. Opposite of our speculation, these three treatments failed to improve patho-histological findings of bladder neoplasmas.

Indeed, ACNU therapy decreased the weight of bladder and the combination therapy of ACNU and OHP lowered it more enhanced extent. Furthermore, no malignant pictures were histologically confirmed in rats treated with this combination therapy. Similar results were obtained in ACNU-treated rats in lesser extent.

Based on these findings, the OHP therapy associated with antineoplastic drugs appears to be useful for the treatments of experimentally induced bladder tumor.

結 言

高圧酸素療法（以下 OHP と略す）は diving medicine を主たる適応として行われてきたが、近年多くの治療分野でその有用性が認められつつある^{2)~5)}。いまだ決定的な治療法が見い出されていない腫瘍に対しても OHP の有用性が報告される

ようになった⁷⁾。著者等は N-Butyl-N-(4-hydroxy-butyl)nitrosamine (以下 BBN と略す) を用いてラットに膀胱腫瘍を発現せしめ、これに OHP と ADM, ACNU の 2 剤をおのおの併用し若干の治療効果を得たので報告する。

実験対象および方法

実験は I) 実験膀胱腫瘍に対する OHP 単独療法および OHP と ADM の併用療法の効果について、II) 同腫瘍に対する ACNU と OHP の併用療法の効果についておのおの検討した。

〈実験 I〉

実験室の環境に順応した 5 週齢のウイスター系雌性ラット 48 匹を 5 群に分け、以下のごとき操作を行った。第 I 群には水道水のみを与え、何の処置もせず 26 週目に屠殺した (対照群)。第 II 群から第 IV 群までは 0.05% BBN を 20 週間飲料水として ad libitum に投与し、その後 5 週間は与えず 26 週目に屠殺した。すなわち第 II 群は OHP のみで薬剤は投与しなかった (OHP 処置群)。第 III 群は ADM 5mg/kg を腹腔内に注射した (ADM 群)。第 IV 群は OHP と ADM 処置を第 II, III 群と同様に行った (ADM+OHP 群)。第 5 群は BBN 投与のみとし無治療観察とした (無治療群)。OHP 処置は hyperbaric chamber 内にて 30~50% の酸素濃度で絶対圧 2 気圧、1 日 90 分計 50 回施行した。ADM は週 1 回、計 5 回投与した (図 1)。

26 週目にすべてのラットを屠殺し膀胱を摘出した。摘出臓器の肉眼的腫瘍の有無、重量、病理組織学的検索等により、OHP, ADM および両者併用療法の抗腫瘍効果を検討した。

*富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

**富山医科薬科大学第 1 病理学教室

***労働福祉衛生会高圧環境医学研究所斉藤労災病院

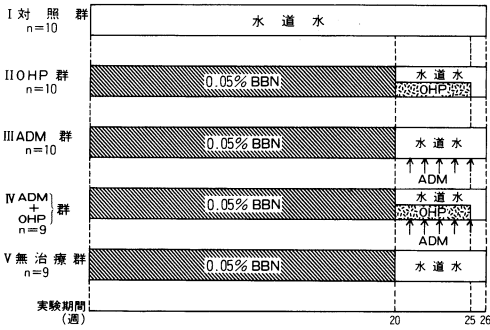


図1 実験方法

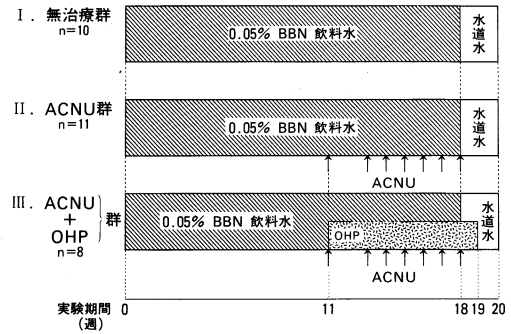


図2 実験方法

表1 各群の肉眼的腫瘍の有無

群	腫瘍	有	無
I 群 (対照群)		0	10
II 群 (OHP群)		9	1
III 群 (ADM群)		6	4
IV 群 (ADM+OHP)		5	4
V 群 (無治療)		6	3

表2 各群の組織型

群	組織型	Normal	Dysplasia	Atypical Papilloma	Carcinoma
I 群 (対照群)		10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
II 群 (OHP群)		0 (0%)	2 (20%)	6 (60%)	2 (20%)
III 群 (ADM群)		0 (0%)	1 (10%)	7 (70%)	2 (20%)
IV 群 (ADM+OHP群)		0 (0%)	0 (0%)	8 (89%)	1 (11%)
V 群 (無治療群)		0 (0%)	1 (11%)	8 (89%)	0 (0%)

〈実験II〉

6週齢のウイスター系雄性ラット39匹を3群にわけた。全群に0.05% BBNを18週間飲料水として ad libitum に投与した。第I群は無治療群とし、第II群はACNU腹腔内注射群、第IV群はACNUとOHPの併用群とした。OHPは開始時期が実験Iと異なり11週目より施行されたが、内容、回数は全く同じである。ACNUは5mgを週1回計6回腹腔内に注射した(図2)。

20週ですべてのラットを屠殺し、実験Iと同じようにACNUおよびACNU+OHP併用療法の抗腫瘍効果を検討した。なお、実験I、II共に第2種高圧酸素治療装置を用いた。

結 果

〈実験I〉

肉眼的腫瘍の有無を表1に示した。BBNを投与しなかったI群には腫瘍は認められなかった。OHP単独群ではむしろ無治療群より腫瘍の出現が多くなる傾向が認められるものの、ADMと併用するとその出現率は低くなった。しかし併用群

と無治療群に有意差は認められなかった。

各群ラットの膀胱重量を図3に示した。対照群に比し、OHP群、ADM群、両者併用群でそれぞれ有意に膀胱重量が増加していた(p<0.05~p<0.01)。無治療群では平均重量は各群中最大であるにもかかわらず標準誤差の値が大きいため有意差は認められなかった。このため無治療群との有意差はなかったものの、膀胱重量はOHP群、ADM群、両者併用群と減少していく傾向にあった。

最後に各群の組織型を検索して表2に示した。第III~第V群間に一定の傾向は認められず、無治療群に認められないCarcinomaがOHP群ADM群に2例ずつ、両者併用群に1例認められたのは意外であった(表2)。

病理組織学的には治療効果は全く認められなかった。

〈実験II〉

肉眼的腫瘍の有無を表3に示した。無治療群の腫瘍出現率は実験Iの結果とほぼ同じであった。これに対しACNU群ACNU+OHP併用群は有

表3 各群の肉眼的腫瘍の有無

群	腫瘍	
	有	無
I 群 (無治療)	6	4
II 群** (ACNU)	1	10
III 群** (ACNU+OHP)	1	7

** : P<0.01

表4 各群の組織型

群	組織型			
	Normal	Dysplasia	Atypical Papilloma	Carcinoma
I 群 (無治療群)	0 (0%)	1 (10%)	7 (70%)	2 (20%)
II 群** (ACNU群)	4 (36%)	6 (55%)	1 (9%)	0 (0%)
III 群** (ACNU+OHP群)	1 (13%)	7 (87%)	0 (0%)	0 (0%)

I 群に対して** P<0.01

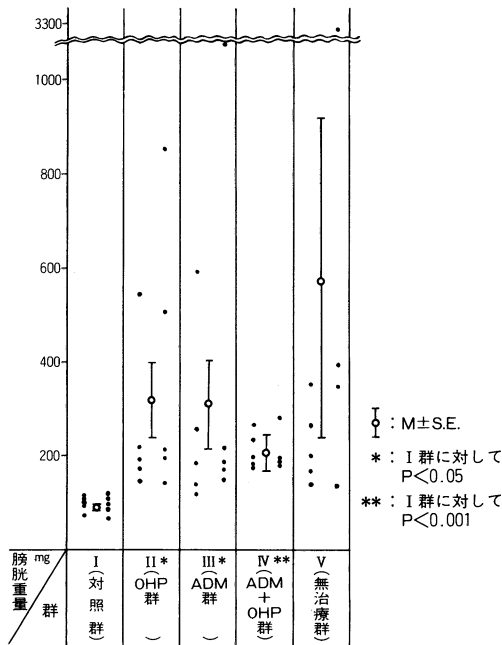


図3 各群ラットの膀胱重量

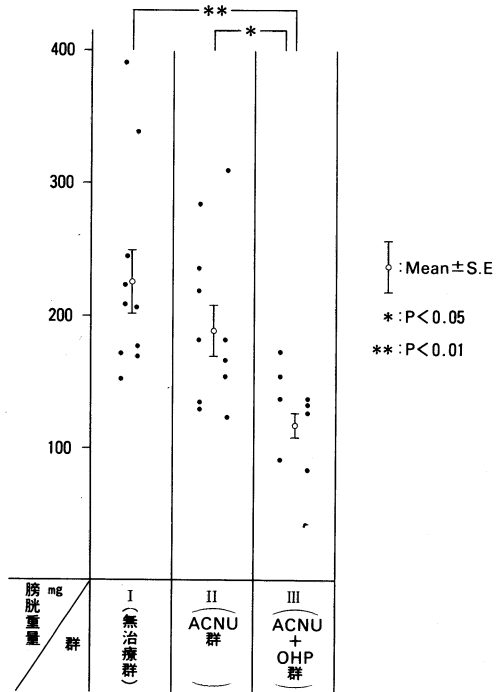


図4 各群ラットの膀胱重量

意に腫瘍の出現が抑えられた(p<0.01)。この2群間に有意差は認められなかった。

各群ラットの膀胱重量を図4に示した。平均膀胱重量は無治療群, ACNU群, ACNU+OHP併用群の順で減少し, ACNU+OHP併用群が他の2群に比し有意に減少しているのが注目された(p<0.01~p<0.05)。

各群の組織型を検索したところ表4のごとくACNU群, ACNU+OHP併用群は無治療群に比し有意にmalignancyが減少していた(p<0.01)。ただし, Normal, Dysplasiaをno malignancy, Atypical papilloma Carcinomaをmalignancyとして計算した

さらに病理組織学的に治療効果を判定した。腫瘍細胞の変性剥離から基底膜の脱落までその程度によりRegression 1, 2, 3, と3段階に分類して判定した。ACNU群ではRegression 1は4例(36%), 同2は4例(36%), 同3では3例(28%)であり, 全例に治療効果を認めた。ACNU+OHP併用群でも全例に治療効果が認められ, そのうちわけはRegression 1は5例(62%), 同2例(25%), 同3は1例(13%)であった。

考 察

今日, 腫瘍に対する唯一絶体的な治療法は見い

出されておらず、手術、化学療法、放射線療法等の集学的治療法が行われている。

腫瘍組織中の酸素分圧を上げれば放射線に対する感受性が増すのではないかという考えのもとに、OHPは主として放射線とともに各種腫瘍の治療に併用されてきた^{2)~4)}。最近ではこの併用療法の効果は肯定的意見が大部分を占め、どのくらいの酸素濃度を何気圧で何時間ぐらいOHPを行えば効果的なのかというところまで議論がすすめられている^{2)~5)}。抗腫瘍剤との併用も試みられつつある。

今回著者等はBBNによって惹起されたラットの膀胱腫瘍に対しOHP単独、それとACNU、ADMとの併用によりOHPの抗腫瘍効果を検討した。BBNは短期間に高率に膀胱腫瘍を発生させる物質として知られ、平松等によれば0.05%の飲料水として8週間投与し、その12週後にはHyperplasia, Papillomaの出現率はおのおの100%となり、20%にCarcinomaの出現がみられるという⁶⁾。我々の例では単純なHyperplasiaがみられなかったためDysplasiaとしたが、実験Iの0.05%BBN20週投与し、その6週間後屠殺例ではDysplasia, Papillomaで100%が占められCarcinomaは認められなかった。実験IIでは0.05%BBNは18週投与し、その2週後に屠殺したところCarcinomaが20%に認められた。病的変化は実験Iと同様100%認められた。平松の報告に比し、BBN投与量のわりには我々の腫瘍の発生率は低いようであるが、Papilloma, Carcinomaを腫瘍として計算すると、実験Iでは89%、実験IIでは90%とすぐれた発生率を示した。すなわち、BBN投与ラットは腫瘍モデルとして充分使用出来ると思われた。実験IIの方が実験IよりBBN投与期間および観察期間が短いにもかかわらずCarcinomaの出現をみた。この理由は不明であるが、性差によるものかも知れず、興味深い。

実験IとIIの成績を較べるに、膀胱重量、病理組織型および病理組織学的治療効果のすべての面でACNUおよびACNU+OHP療法がADMおよびADM+OHP療法より抗腫瘍性がすぐれていた。これはBBNの投与時間や用いたラットの性差等があり単純な比較は出来ない。実験Iに雌性ラットを用いたのは当初ADMを膀胱注入で投与しようとしたためであり、BBNの投与期間

を実験IIで短かくしたのはいわゆる手遅れの時期から治療を開始したのではないかと危惧したためである。将来、同一条件での実験、比較が必要であろう。

ADMは制癌性抗生物質で癌細胞の核酸合成を阻害し、癌細胞の分裂を抑制する。ADMはまたBleomycin, MMC等の制癌性抗生物質と同様に活性酸素増加作用があり⁷⁾、OHPによって生じた活性酸素とあい補って抗腫瘍性が増加するのではないかと推測し、本実験に用いた。

これ等制癌性抗生物質とOHPの併用は培養された腫瘍細胞⁸⁾より動物実験を経て臨床にまで及びつつある^{9)~11)}。同様な課程はOHPと放射線の併用にも見られ、無効であったという報告¹²⁾があり、プレオマイシンと放射線とOHPの三者併用しても無効との報告もある¹¹⁾。しかし大部分は有効であったようである。

実験Iでは我々はOHP単独治療群を設定し、その効果をみてみた。統計的有意差は認められなかったものの、膀胱重量の面で無治療群に比しADM単独投与群と同等の抗腫瘍性を示している。文献的にはOHP単独でも効果があったとする者⁷⁾、一部の腫瘍細胞に効くとする者¹³⁾、臨床的に頭頸部と気管支の腫瘍には効いたが膀胱癌には無効であったとする者¹⁴⁾等、評価はさまざまである。

実験IIで用いたACNUはニトロウレア系の抗腫瘍剤で、DNAのAlkylationと蛋白のCarbamylationによりその作用を示すとされる薬剤である¹⁵⁾。脳、消化器、肺等の腫瘍に広く用いられているが、泌尿器科領域では腎、精巣等に数例報告が散見されるのみである¹⁶⁾¹⁷⁾。今回、著者らはACNUを実験膀胱腫瘍にOHPと併用して使用し、OHPが相乗的にその効果を増強する事がわかった。すなわち、腫瘍重量、組織型、病理組織学的治療効果判定等によりACNU+OHP療法がきわめて有効であった。

OHPの抗腫瘍効果は種々の作用機序が推測されているが、その主たるものは活性酸素の発生であろう⁸⁾。この活性酸素は生体に有害なため、これを除くために生体にはsuper oxide dismutase (SOD)が存在するが、癌細胞ではSODが低下しており⁹⁾、ためにOHPの抗腫瘍効果が発揮されると考えられている。さらにOHPはDNA合成や細

胞分裂を妨げる作用があり⁸⁾, このために先に述べた抗生剤系の抗癌剤ばかりでなく ACNU 等の他系統の抗癌剤とも相乗的に作用するのではないかと、推測されている。なお、OHP を施行すると正常組織より腫瘍組織の酸素分圧の方が高い事が観察されており²⁰⁾, これが細胞膜の透過性等に影響し抗癌剤の吸収等が選択的に行われ、相乗効果をもたらすのかも知れない。

本実験により OHP と抗癌剤の併用が実験膀胱腫瘍に有効であることが明白となった。OHP の腫瘍に対する adjuvant therapy としての有効性をさらに追求するとともにその作用機序の解明が待たされる場所である。

結 語

ラット実験膀胱腫瘍に対し OHP 単独療法, ADM 単独療法, OHP+ADM 併用療法, ACNU 単独療法, ACNU+OHP 併用療法を2つの実験にわけて試みた。OHP 単独療法群の平均膀胱重量は無治療群の55.7%であった。同様に ADM 単独治療群は53.3%, ADM+OHP 併用療法群は36.1%であった。また ACNU 単独群は84.5%, ACNU+OHP 併用療法群は57.4%であった。ACNU+OHP 群に12.5%に病理組織学的に Intact mucosa が認められ, 全例に Regression が認められたが ADM+OHP 群ではこのような効果は認められなかった。

膀胱重量(膀胱腫瘍重量)を減少させるという点では ADM+OHP 群がまさり, 病理組織学的には ACNU+OHP 群がまさっていた。OHP 単独でも ADM と同等の効果が認められたことは注目すべきであろう。

OHP はその抗腫瘍効果の作用機序の解明とともにさらにその効果を実験的に追求し, 臨床に応用されるべきものと考えられる。

本論文の要旨は第19回日本高気圧環境医学会総会で発表した。

【参 考 文 献】

- 1) Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S. and Scott, O.C.A.: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as factor in radiotherapy. *Brit. J. Radio.*, 26: 638-648, 1953.
- 2) Chang, C.H.: Hyperbaric oxygen and radiation therapy in the management of glioblastoma. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 46: 163-169, 1977.
- 3) Kapp, J.P., Rauth, A. and Cotton, D.: Hyperbaric oxygen as a Radiation sensitizer in the treatment of brain tumors. *Surgical Neurology*, 17: 233-235, 1982.
- 4) Brady, L.W., Plenk, H.P., Hanley, J.A., Glassburn, J.R., Krawer, S. and Parker, R.G.: Hyperbaric oxygen therapy for Carcinoma of the cervix--stage 11B, 111A, 111B and IVA: Results of a randomized study by the radiation therapy oncology group. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 7: 991-998, 1981.
- 5) Mueller-Kleiser, W. and Vaupel, P.: Tumor oxygenation under normobaric and hyperbaric conditions. *Brit. J. Radio.*, 56: 559-564, 1983.
- 6) 平松 侃: 膀胱癌に関する実験的並びに臨床的研究. *泌尿器科紀要*, 28: 1553-1569, 1982.
- 7) 杉山弘行, 池田彰宏, 久保俊明, 西川亮, 滝沢潤, 川田彰得, 西山喜一: 高圧酸素と制癌作用. *日本高気圧環境医学会雑誌*, 19: 141-143, 1984.
- 8) Wheeler, R.H., Dirks, J.W., Lunardi, I. and Nemirow, M.J.: Effect of hyperbaric oxygen on the cytotoxicity of adriamycin and nitrogen mustard in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Research*, 39: 370-375, 1979.
- 9) Takenaka, S., Arimura, T., Higashi, M., Nagayama, T. and Ito, E.: Experimental study of bleomycin therapy in combination with hyperbaric oxygenation. *J. Jap. Soc. Cancer Ther.*, 15: 864-875, 1980.
- 10) 永山 孝: プレオマイシンと高圧酸素併用療法に関する基礎的臨床的研究. *医学研究*, 52: 233-242, 1982.
- 11) Shanta, V., Krishnamurthi, S. and Sharwa, M.: Irradiation, bleomycin and hyperbaric oxygen in the treatment of oral Carcinoma. *Acta Radiologica Oncology*, 22: 13-16, 1983.
- 12) Sause, W.T., Sweeney, R.A., Plenk, H.P. and Thomson, J.W.: Radiotherapy of bronchogenic carcinoma.--Analysis of a treatment schedule designed for use with hyperbaric oxygen. *Radiology*, 140: 209-212, 1981.
- 13) Shewell, J. and Thompson, S.C.: The effect of hyperbaric oxygen treatment of pulmonary metastasis in the C3H mouse. *Europ. J. Cancer*, 16: 253-259, 1980.
- 14) Dische, S.: Hyperbaric oxygen: the medical research council trials and their clinical significance. *Brit. J. Radio.*, 51: 888-894, 1979.
- 15) 中村 徹, 笹田昌孝, 田嶋政郎, 山本孝吉, 内田三千彦, 沢田博義, 内野治人: 白血病細胞における 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) me-

- thyl-3 (2-chloroethyl) -3-nitrosourea (ACNU) の作用機序. 癌と化学療法, 5:991-1000, 1978.
- 16) 斉藤達雄, 横山正和, 檜森 巽, 氏家重紀, 菅原伸夫, 杉山善助, 北田一浩: Nitrosourea 系新抗癌剤 ACNU [1-(4-Amino-2-methyl-5-pyrimidinyl) methyl-3-(2-chlorethyl) -3-nitrosourea hydrochloride] の Phase I および Phase II Study. 癌と化学療法, 4:991-1004, 1977.
 - 17) 木村郁郎, 原田英雄, 大熨泰亮, 占部康雄, 藤井昌央, 町田健一, 村上直樹: ACNU: 1-4(4-amino-2-meohyl-5-pyrimidinyl) cethyl-3-(2-chlorethyl) -3-nitrosourea hydrochloride の臨床治験. 癌と化学療法, 4:767-772, 1978.
 - 18) Gershman,R., Gilbert,D.L., Nye,S.W., Dwyer,P. and Fenn W.O.: Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. Science, 119:623-626,1954.
 - 19) Yamanaka,N. and Deamer,D.: Superoxide dismutase activity in WI-38 cell cultures. Effects of age, trypsinization and SV-40 trans formation. Phys., 6:95-106,1974.
 - 20) Jamieson,D. and Van Den Breuk, H.A.S.: Oxygen tension in human malignant disease under Hyperbolic conditions. Brti.J.Cancer, 17:70-79,1963.