

内分泌環境変化に伴うラット乳癌のエストロゲンレセプター(ER)値およびER陽性細胞の組織内分布の変動

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9006

内分泌環境変化に伴うラット乳癌のエストロゲン レセプター (ER) 値および ER 陽性細胞の 組織内分布の変動

金沢大学医学部外科学第二講座 (指導: 宮崎逸夫教授)

松 葉 明

(昭和57年9月2日受付)

卵摘やエストラジオール (Estradiol) 投与等の内分泌環境変化に伴う乳癌のエストロゲンレセプター (Estrogen receptor, 以下 ER と略) 値および ER 陽性細胞の組織内分布の変動を 7, 12-ジメチルベンズアントラセン (7, 12-dimethylbenz(a)anthracene) 誘発ラット乳癌をモデルとしてデキストランチャーコール (Dextran-coated charcoal) 法による ER 測定と著者らの開発した凍結切片の³H-エストラジオールオートラジオグラフィにより検討した。腫瘍の卵摘効果は有効, 中間, 無効の 3 群に分けられた。卵摘時に切除 (部分切除) された腫瘍 (初回腫瘍) では有効群と中間群の両者間に ER の有意差は認められなかったが, ER 陽性細胞分布に若干の相違が認められた。即ち, 前者の腫瘍は ER 強陽性および弱陽性細胞からなり, 後者の腫瘍にはこれらの ER 陽性細胞の他, ER 陰性細胞の混在が認められた。卵摘後 1 週では有効群および中間群の ER 値は有意に低下し, 組織学的に多発性の壊死や嚢胞形成が認められた。ER 強陽性細胞はこれらの変性組織周辺にのみ限局して観察され, ER 強陽性細胞集団が卵摘により壊死に陥ったと考えられた。また, 卵摘後 10 週迄に有効群の大部分の腫瘍は消失し, 中間群の腫瘍は再増大を示したが, その ER 値は更に低下する傾向を示し, 初回 ER 陽性腫瘍の 64% が卵摘後 10 週迄に ER 陰性へと変化した。これらの ER 陰性化した腫瘍組織の殆んどが ER 陰性細胞で占められたが, なお少数の ER 強陽性細胞の残存が観察され, 更にエストラジオール (10 μ g/週 \times 4 週) 投与後 1 週では腫瘍の ER 値の有意な上昇と共に ER 強陽性細胞分布の増加が認められた。一方, 無効群の腫瘍には ER 陽性細胞は殆んど認められず, その ER 値も卵摘やエストラジオール投与の影響を受けず初回より低値のまま推移した。以上より, ER 陽性腫瘍は卵摘により ER 陽性細胞が壊死に陥り一旦縮少するが, 混在した ER 陰性細胞が残存, 増殖する為腫瘍の陰性化および再増大が起こることが明らかになり, 更に腫瘍の ER 陽性細胞の組織内分布を検索することが乳癌の内分泌療法の効果を予測する上に有用であることが示唆された。

Key words Mammary cancer, Estrogen receptor, Hormonal therapy

1896年 Beatson¹⁾が末期乳癌患者に対して初めて卵巣摘除術を施行し効果を収めて以来, 乳癌はホルモン依存性腫瘍として認識され, 本疾患の治療として内分泌療法が手術, 放射線および化学療法等と並び, 重要な位置を占めている。即ち, 主に進行乳癌あるいは再発乳癌を対象として男性ホルモンや大量の女性ホルモン投与による内科的内分泌療法, あるいは卵巣, 副腎, 下垂体摘除術等による外科的内分泌療法が施行されて

いる。しかし, これらの内分泌療法の効果は過去の多数の報告から, 乳癌全体の約 30% であることが明らかとなり²⁾, 残りの約 70% の無効例に対しては無意味な外科的浸襲や副作用を与えていたことになる。従って, 乳癌の内分泌療法の効果を予測することが今世紀初めからの懸案であり, その予測方法として種々の試みが成されてきた。近年, Jensen ら³⁾が子宮などのエストロゲン (Estrogen) 標的臓器にエストロゲンレセプタ

Variation of Estrogen Receptor (ER) Values and Distributions of ER Positive Cells following Change of Hormonal Status in DMBA-induced Rat Mammary Cancer. Akira Matsuba, Department of Surgery (II), (Director: Prof. I. Miyazaki), School of Medicine, Kanazawa University.

ー (Estrogen receptor, 以下 ER と略) が存在することを発見し, 更にホルモン依存性の乳癌組織内での存在も確認されるに至った⁵⁾⁶⁾. この ER 測定⁷⁾が内分泌療法の効果を予測し得る定量性および再現性の高い方法として評価され⁸⁾, 最近広く臨床に応用されている. しかしながら, ヒト乳癌全体の ER 陽性率は 50~60% であり, また ER 陽性乳癌の内分泌療法有効例はその約 60% に過ぎず, 残りの約 40% が無効例であることも判明してきた²⁾⁹⁾. この原因として乳癌細胞の細胞質に ER が存在してもエストロゲンの細胞内でのホルモン作用発現迄の過程に障害があれば腫瘍はホルモン非依存性の状態となっていることが考えられる¹⁰⁾¹¹⁾. その為, 更にエストロゲン作用発現の marker としてプロゲステロンレセプター (Progesterone receptor, 以下 PgR と略)^{12~14)}や核内の ER の測定¹⁵⁾¹⁶⁾へと発展している. しかし, これらの方法による陽性例にも依然 20~30% の内分泌療法無効例が存在し, 前述の障害以外に低濃度のエストロゲン環境でも増殖し得る ER 陽性乳癌が存在する可能性も考えられている¹⁷⁾¹⁸⁾.

一方, ER 陽性乳癌はその自然経過中, ER が保持されることが一般的に認められているが¹⁹⁾, ER 陽性乳癌が内分泌療法後, ER 陰性へと変化し得ることが臨床^{20)~22)}並びに動物実験^{23)~26)}に於いて明らかとなってきた. この現象は ER 陽性乳癌にも内分泌療法無効例が存在する理由の一つと考えられると共に, 一旦内分泌療法に奏効し退縮した乳癌の多くがその後ホルモン非依存性となり再発する原因であると考えられる. 従って, この ER 陽性乳癌が ER 陰性化する機序を解明することは臨床上也重要な課題であると考えられる.

そこで著者はラット乳癌をモデルとして内分泌環境の変化に伴う乳癌 ER の変動を検討し, 更に著者の考案した凍結組織切片による³H-エストロジオール (³H-estradiol) オートラジオグラフィを用いて ER 陽性細胞の組織内分布状態を検討し, ER 陽性乳癌の ER 陰性化の機序および内分泌療法効果について解明を試み, いくつかの興味ある知見を得たのでここに報告する.

材料および方法

I. ラット乳癌作成

Sprague Dawley 系雌性ラット (生後 48 日, 体重 150 g 前後) に対し, 発癌剤としてゴマ油 1 ml に溶解した 7, 12-ジメチルベンズアントラセン (7, 12-dimethylbenz(a)anthracene, 以下 DMBA と略) 10 mg を 2 週間隔で 2 回, 計 20 mg をアトムチューブ 6 号にてラット胃内へ強制投与した. 投与終了後 4 週以降毎週 1 回視触診を行い, 発生してきた腫瘍の最大径を経時的に測定した.

II. 卵摘およびエストラジオール (Estradiol) 投与と腫瘍部分切除

1. 卵摘と初回腫瘍切除

腫瘍の最大径が約 2 cm に達した時点でエーテル (Ether) 麻酔下, 無菌操作により, 約 1/3 の腫瘍部分切除と両側の卵巣摘除術を施行した.

2. 卵摘後 1 週の腫瘍部分切除

次に, 卵摘後 1 週で初回と同一腫瘍の部分切除 (半切除) を行った.

3. 卵摘効果判定と卵摘後 10 週の腫瘍切除

卵摘後 10 週で腫瘍に対する卵摘効果を, ①卵摘有効群 (卵摘後 3 週以上にわたり腫瘍径が縮小し, その後も増大傾向のないもの) ②卵摘中間群 (卵摘後 3 週以上腫瘍径が縮小するが, その後 10 週以内に再増大するもの) ③卵摘無効群 (卵摘後も縮小傾向がないかあるいは, 3 週以内に再増大するもの) の 3 群に分けて判定すると共に, 腫瘍が残存しているものに対し更に腫瘍部分切除を行った.

4. エストラジオール投与と腫瘍切除

卵摘後 10 週より, 持続性エストラジオールであるプロギノンデポ (Progynon - Depot, Schering 社) を 10 μ g 週 1 回, 4 週間皮下注にて投与し, 投与終了後 1 週 (卵摘後 14 週) および 10 週 (卵摘後 23 週) で同様に腫瘍部分切除を行った.

尚, 初回以降の腫瘍部分切除はいずれも腫瘍の切除痕を避けて行い, また腫瘍切離端は圧迫止血を充分に行い, 血腫形成や縫合糸などの異物を残さぬように配慮した.

以上の初回, 卵摘後 1 週および 10 週の各段階で得られた腫瘍組織を直ちに超低温冷蔵庫 (Tabai Pluto freezer PF 11) にて -80°C で凍結保存し, ER 測定および³H-エストラジオールオートラジオグラフィに供した. また腫瘍の一部を 10% ホルマリン (Formalin) に固定した後, H & E 染色組織標本を作製して乳癌であることを確認した. 尚, 一部の腫瘍にみられた線維線腫等はこの実験系から除外した.

III. デキストランチャーコール (Dextran-coated charcoal, 以下 DCC と略) 法による ER 測定 (図 1)

得られた腫瘍の細胞質 ER を以下の方法で測定, 算出した.

1. Cytosol の調整

-80°C 下に凍結保存した腫瘍組織約 0.5 g を切出しナイフで細切後, 4 倍量の TED-緩衝液 [10 mM トリス塩酸 (Tris-HCl), 1.5 mM エチレンジアミン四酢酸 (Ethylenediamine tetraacetic acid), 0.5 mM Dithiothreitol, 250 mM サッカロース (Saccharose)],

pH 7.4]を加え、Polytron 型ホモジナイザー (Yamato ultradisperser model LK-11) で水冷しながら 15 秒間 3 回、各 30 秒間の休止期を置きホモジナイズした。このホモジネートを超遠心分離機 (Beckman, model L 3-50) で $105,000 \times g$, $2^\circ C$ 60 分間遠心し、得られた上清を細胞質分画 (Cytosol) とし、次の操作を移すと共に、一部を Lowry 法による蛋白定量に供した。

2. インキュベーション

各 9 本の小試験管に Cytosol $150 \mu l$ を入れ、そのうち 6 本に各種変化量 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 pmole) の 3H -エストラジオール ([2, 4, 6, 7- $H(N)$]-Estradiol, specific activity $101.7 Ci/mmole$, New England Nuclear 社) を添加し、更に TED-緩衝液を加えて全量を $200 \mu l$ とし混和後 $4^\circ C$ 12 時間インキュベーションした。また非特異的結合量を得る為に、残りの 3 本に各変化量 (0.25, 0.5, 1.0 pmole) の 3H -エストラジオールと共に各 1,000 倍量の非放射性 17β -エストラジオールを加え、更に対照 (DCC back ground, 以下 DCC. Bkg と略) として、Cytosol の代わりに同量の TED-緩衝液を用いた。

3. 調整液の 3H -エストラジオール濃度の算定

各試験管の混和液を $10 \mu l$ 採取し、その放射能を測定することにより真の 3H -エストラジオール濃度を算出した。

4. 遊離アイソトープの除去および放射能測定

インキュベーション後、各試験管に DCC 液 (2.5% (W/V) ノリット A (Norit A), 0.025% (W/V) デキストラン T-40 (Dextran T-40)/TED-緩衝液) $50 \mu l$ を加え氷水中で 20 分間強振後、 $2,000 \times g$, $4^\circ C$ 15 分間遠心分離し、その上清 $150 \mu l$ にシンチレーターとし

て Aquasol-2 (New England Nuclear 社) $10 ml$ を加えて混和後、液体シンチレーションカウンター (Aloka, LSC-671) にて 10 分間放射能を測定した。

5. Binding parameter の算定

液体シンチレーションカウンターで計測されたカウント数 (Counts per minute, 以下 CPM と略) を

$$\text{式: } \left[\frac{\text{CPM} - \text{DCC. Bkg}}{\text{Efficiency}} \times \frac{250}{150} \times \frac{1}{200} \times \frac{1}{101.7} \times \frac{1}{2.22} \right] \text{ (pmoles/ml)}$$

に代入し、エストロゲンの総結合量 (total bound, 以下 t.B と略) および非特異的結合量 (nonspecific bound, 以下 nsp. B と略) を得、各 3H -エストラジオール添加量を横軸、その時の結合量を縦軸に plot し、更に t. B と nsp. B の差 (t. B - nsp. B) を特異的結合量 (specific bound, 以下 sp. B と略) として同様に plot し、ER の飽和曲線を作成した (図 2)。次に Scatchard analysis により ER の最大結合部位数 (Number of binding sites, 以下 NBS と略) および解離定数 (Dissociation constant, 以下 Kd と略) を求めた。即ち、横軸に sp. B, 縦軸に sp. B と非結合量 (F) との比 (sp. B/F) を 5 point plot し、各点を結んだ直線と横軸との交点 A を NBS (femtomoles/ml = $10^{-12} M$)、またこれを直線と縦軸との交点 B で除した値 (A/B) を Kd とした (図 3)。更に NBS は Lowry 法で測定した Cytosol の蛋白量 (mg) 当たり換算し、femtomoles/mg cytosol protein (以下 fmol/mg p と略) で表わされた。この条件で NBS が 10.0 fmol/mg p 以上、Kd が $1.0 \times 10^{-9} M$ 以下の 2 つの基準を満たすものを ER 陽性、それ以外のものを ER 陰性と判定した。

IV. 凍結組織切片にたる 3H -エストラジオールオートラジオグラフィ

- 1) Mammary tumor stored at $-80^\circ C$
- ↓
- 2) Homogenization in TED-buffer
- ↓
- 3) Centrifugation at $105,000 \times g$ for 1 hr
- ↓
- 4) Mixing of supernatant (cytosol) with 3H -estradiol
- ↓
- 5) Incubation at $4^\circ C$ for 12 hr
- ↓
- 6) Adsorption of free 3H -estradiol by dextran coated charcoal (DCC)
- ↓
- 7) Centrifugation at $2,000 \times g$ for 15 min
- ↓
- 8) Counting of isotope of supernatant by liquid scintillation counter
- ↓
- 9) Calculation by Scatchard analysis

Fig. 1. Estrogen receptor (ER) assay (DCC method)

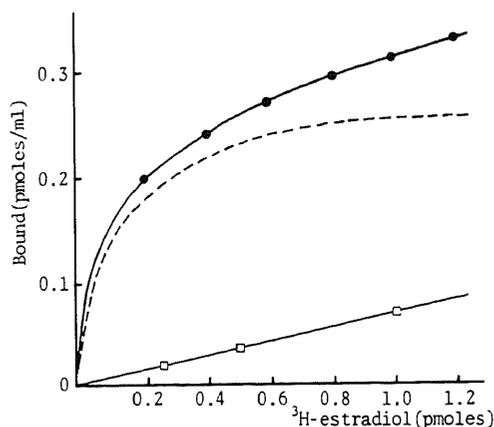


Fig. 2. ER saturation curve. ●—●, total bound estradiol (t.B); □—□, nonspecific bound estradiol (nsp. B); specific bound estradiol (sp. B); sp. B = t. B - nsp. B.

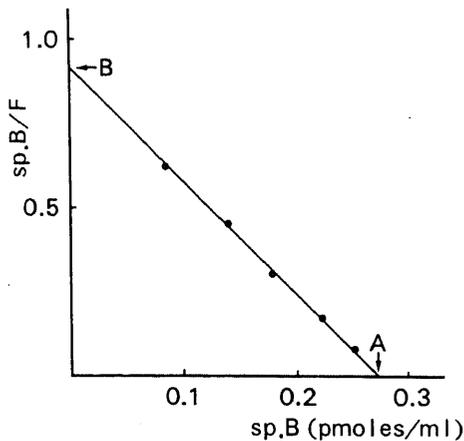


Fig. 3. Scatchard analysis for binding parameter. sp. B, specific bound estradiol; F, free ^3H -estradiol; A, Number of binding sites (NBS) = 0.27 pmoles/ml = 270 fmoles/ml = 270/(cytosol protein, mg/ml) fmoles/mg cytosol protein; A/B, Dissociation constant (Kd) = $270/0.9 \times 10^{-12} \text{M} = 3.00 \times 10^{-10} \text{M}$.

DCC法によるER測定と同様な原理を用いた凍結組織切片上での ^3H -エストラジオールオートラジオグラフィを考案し、H & E染色組織切片上ER陽性細胞の可視化を行った(図4)。

1. 凍結組織切片の作製

凍結保存した腫瘍組織をCriostat (Tissue - Tek II, Miles社)にて厚さ約 $5 \mu\text{m}$ に薄切りし、脱脂処理したスライドガラスに貼布し直ちに次のインキュベーションに移した。

2. インキュベーション

$10 \mu\text{Ci/ml}$ ($1.0 \times 10^{-7} \text{M}$)の ^3H -エストラジオール含有 0.1M リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline, 以下PBSと略)溶液pH 7.4を調整し、これをピペットでスライドガラス上に貼布した組織切片に滴下し、湿潤容器内で室温、1時間インキュベーションを行った。尚、DCC法と同じく対照として、 ^3H -エストラジオールと共にその1,000倍量の非放射性 17β -エストラジオールを添加した溶液を作製し、同様な操作を行った。

3. 洗浄および固定

インキュベーション終了後、冷却した 0.01M PBSをピペットでスライドガラス上に数分間静かに滴下し、更に同液中に3分間浸して軽く振盪し洗浄を行った。次いで、95%エタノール(Ethanol)中に2分間浸し固定後、乾燥した。

4. オートラジオグラフィ (dipping法)

感光乳剤(Sakura NR-M2)を蒸留水で2倍に希釈し 40°C に加熱した。組織切片の貼布されたスライドガラスをこの乳剤中に静かに浸して引き上げ、室温で1時間乾燥後、シリカゲル(Silicagel)と共に暗箱内に入れ、 4°C 、4週間の露出を行った。

5. 現像、定着、染色

露出の終了したスライドガラスはSakura Conidol-Xで 20°C 、5分間現像し、Sakura Conifixで10分間

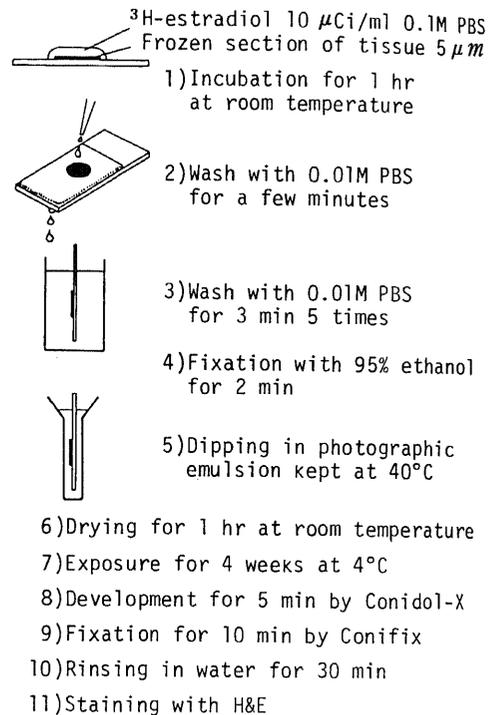


Fig. 4. Procedure of ^3H -estradiol autoradiography with frozen section in vitro.

定着、更に30分間水洗後、H & E染色(後染色)を行った。以上のオートラジオグラフィのdipping法より現像、定着迄の過程は全て暗室内、安全光下で行った。

6. 判定方法

^3H -エストラジオールオートラジオグラフィによる組織切片を検鏡すると、腫瘍細胞に種々の程度の銀粒子の集積像が認められた。即ち、銀粒子が高密度に集積し、弱拡大で一つの黒点集団として観察される銀粒子強集積細胞と、弱拡大では観察されず強拡大で初めて銀粒子の集積が観察される銀粒子弱集積細胞の2者が認められた。前者の銀粒子強集積細胞の黒点は対照の

非放射性 17β-エストラジオールで block されることから ER への特異的な結合であり、ER 強陽性細胞と考えられた。更に後者の銀粒子弱集積細胞を対照の同一部位と比較すると種々の差が認められたが、対照の2倍以上の銀粒子数を有するものを ER 弱陽性細胞、それ以下あるいは差の認められないものを ER 陰性細胞と判定した。

次にこれらの ER 陽性(強陽性および弱陽性)細胞の分布状態を下記の基準に従って分類した。

- 1) ER 強陽性細胞分布について
- (+): ER 強陽性細胞が 10 個以上の集団を形成し組織切片上、広汎に分布するもの。
 - (+): ER 強陽性細胞が 5~10 個の小集団を形成し、組織切片上、散在するもの。
 - (±): 少数の ER 強陽性細胞が組織切片上、孤立性に存在するもの。
 - (-): ER 強陽性細胞が組織切片上、認められないもの。
- 2) ER 弱陽性細胞分布について。
- (+): ER 弱陽性細胞が組織切片上、広汎に認められるもの。
 - (-): ER 弱陽性細胞が殆んど認められないもの。

成 績

1. DCC 法による腫瘍の ER [NBS]

1. 初回腫瘍の ER と卵摘効果

DCC 法によって測定した初回腫瘍 156 例の ER の内訳は、ER 陽性が 128 例(82%)、ER 陰性が 28 例(18%)であった。これらの腫瘍の卵摘効果は、ER 陽性腫瘍で有効群 70%、中間群 26%、無効群 4%に対し、ER 陰性腫瘍で有効群 18%、中間群 28%、無効群 54%であり、ER 陽性腫瘍で有効群が、ER 陰性腫瘍で無効群が有意に多く認められた(P<0.001) (表 1)。しかし、ER 陽性腫瘍にも 30%の中間群および無効群が認められ、ER 陽性腫瘍の各群の ER [NBS] の平均値 (Mean±S. E.) は有効群 33.7±2.2 fmol/mg p、中間群 33.2±3.4 fmol/mg p、無効群 21.1±2.3 fmol/mg p と無効群でやや低値の傾向を示したものの、有効群と中間群には

差がみられなかった。

2. 内分泌環境変化に伴う ER [NBS] の変動

1) 全腫瘍に於ける ER [NBS] の変動

卵摘およびその後のエストラジオール投与による腫瘍の ER [NBS] の推移を全腫瘍について検討した(図 5)。

初回腫瘍 156 例の ER [NBS] の平均値 (Mean±S. E.) は 29.1±1.9 fmol/mg p であり、ER 陽性腫瘍が 82%を占めた。しかし、卵摘後 1 週では、17.4±1.3 fmol/mg p (n=124) と有意な低下を示したが (P<0.01)、依然、ER 陽性が 64%を占めた。更に卵摘後 10 週では、卵摘有効群の腫瘍が殆んど消失し、ER を測定し得たものは中間群、無効群の腫瘍で占められることも原因してその ER [NBS] は 10.4±1.1 fmol/mg p (n=61) と更に低下する傾向を示し、ER 陽性が 28%と減少し、ER 陰性が 72%と多くを占めた。次にエストラジオール投与終了後 1 週(卵摘後 14 週)の ER [NBS] は 16.7±1.7 fmol/mg p (n=45) と、卵摘後 10 週と比較し有意な上昇を示し (P<0.05)、ER 陽性が 73%と再び多くを占めた。しかし、エストラジオール投与

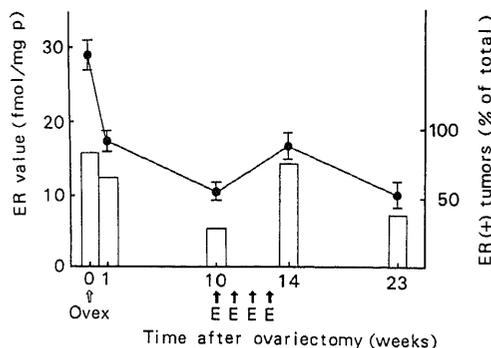


Fig. 5. Variation of ER values of tumors after ovariectomy and administration of estradiol. Ovex, Ovariectomy was done at 2 cm of tumor diameter; E, 10 μg of estradiol was administered by subcutaneous injection every week for 4 weeks from the 10th to 13th week after ovariectomy; ♦, Mean±S. E.; □, % of ER positive tumors.

Table 1. Correlation between ER status and response to ovariectomy in primary tumors

ER status	No. of tumors	No. (%) of tumors		
		Response to ovariectomy		
		Effective	Intermediate	Ineffective
(+)	128	90(70)*	33(26)	5(4)**
(-)	28	5(18)*	8(28)	15(54)**

*-, (p<0.001) ***-, (p<0.001)

終了後10週(卵摘後23週)では投与したエストラジオールの影響が消失し, ER[NBS]は 10.1 ± 1.6 fmol/mg p ($n=21$)と有意な再低下を示し($P<0.05$), ER陽性が35%と減少した。

2) 卵摘効果別にみた腫瘍ER [NBS] の変動

次に, これらのER[NBS]の推移を腫瘍の卵摘効果別に検討した(図6)。

i) 卵摘有効群

初回のER[NBS]の平均値(Mean \pm S. E.)は 32.6 ± 2.4 fmol/mg pであったが, 卵摘後1週では 21.0 ± 2.0 fmol/mg pと有意な低下を示した($P<0.01$)。卵摘後10週では本群の腫瘍の殆んどが消失あるいは高度の縮小のため, 腫瘍部分切除およびER測定を施行し得たものは少数例(6例)であったが, そのER[NBS]は 9.2 ± 2.6 fmol/mg pと更に低下する傾向にあった。次にエストラジオール投与後1週では, 視触診上殆んど消失したと思われた腫瘍にも再増大を示すものがみられ, ER [NBS] は 18.4 ± 2.2 fmol/mg pと上昇し, 更に投与後10週では 11.4 ± 3.8 fmol/mg pと再低下する傾向にあった。

ii) 卵摘中間群

初回のER [NBS] は 30.2 ± 3.4 fmol/mg pであり, 有効群との間に有意差はみられなかった。卵摘後1週では 13.9 ± 1.5 fmol/mg pと有効群と同様有意な低下を示し($P<0.01$), 有効群の卵摘後1週のER [NBS]と比較しても有意に低値を示した($P<0.05$)。卵摘後10週のER [NBS] は 13.1 ± 1.6 fmol/mg pと, 卵摘後1週とほぼ同レベルであった。しかし, エストラジオール投与後1週では 19.6 ± 2.3 fmol/mg pと有意な上昇を示し($P<0.05$), 更に投与10週では 10.9 ± 1.7 fmol/mg pと有意な再低下を示した($P<0.05$)。

iii) 卵摘無効群

初回 8.6 ± 1.6 fmol/mg p, 卵摘後1週 9.2 ± 1.8 fmol/mg p, 卵摘後10週 6.4 ± 1.0 fmol/mg p, エストラジオール投与後1週 7.1 ± 1.7 fmol/mg p, 投与後

10週 5.2 ± 1.9 fmol/mg pと全経過を通じてER [NBS]の変動はほとんどなく, 低値のまま経過した。

3) 内分泌環境変化に伴うER陽陰性の転換

ER陽性腫瘍は卵摘後10週迄に消失し, またER陰性腫瘍例は経過中に腫瘍死するものが多く, 従って, 初回よりエストラジオール投与後10週迄の全経過につ

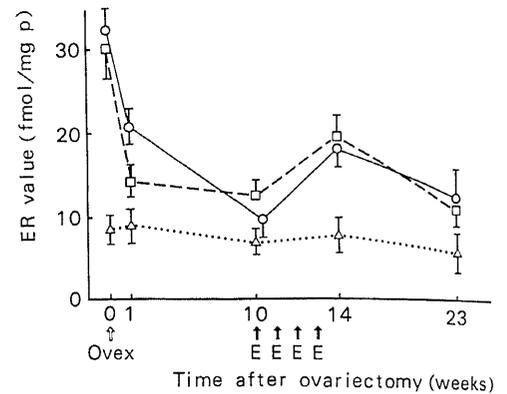


Fig. 6. Correlation between response to ovariectomy and variation of ER values of tumors. ○, Tumors with effective response to ovariectomy; □, Tumors with intermediate response to ovariectomy; △, Tumors with ineffective response to ovariectomy; †, Mean \pm S. E.

いて経時的に同一腫瘍のERを測定し得たものは比較的少数例であった。そこで同一腫瘍のERの変動を, 初回より卵摘後1週, 初回より卵摘後10週, および初回よりエストラジオール投与後10週迄の全経過の3者についてER陽陰性の面から検討した。

i) 初回より卵摘後1週のER陽陰性の転換

初回ER陽性腫瘍105例中80例(76%)が卵摘後1週もER陽性を維持したのに対して, 残りの25例(24%)はER陰性へと変化した。このER陽性持続群

Table 2. Correlation between change of ER status in 1 week after ovariectomy and response to ovariectomy

Primary		Ovex. 1 W*		No. (%) of tumors		
ER status	No. of tumors	ER status	No. of tumors	Response to ovariectomy		
				Effective	Intermediate	Ineffective
(+)	105	(+)	80	57 (71)	21 (26)	2 (3)
		(-)	25	13 (52)	12 (48)	0
(-)	25	(+)	2	1	0	1
		(-)	23	3 (12)	5 (22)	15 (65)

*Ovex. 1 W; 1 week after ovariectomy

と ER 陽性→陰性変化群について、その後の卵摘効果を比較検討すると、前者では有効群 71%、中間群 26%、無効群 3%であったのに対して、後者では有効群 52%、中間群 48%、無効群 0%であった。即ち、ER 陽性持続群に比して、ER 陽性→陰性変化群で卵摘中間群が有意に多く認められ (P<0.05)、卵摘中間群の腫瘍では卵摘後早期に ER 陽性から陰性への転換が起こることが示唆された (表 2)。

ii) 初回より卵摘後 10 週の ER 陽陰性の転換

初回 ER 陽性腫瘍のうち、卵摘後 10 週迄腫瘍が残存し、ER を測定し得たものは 42 例であったが、そのうち 27 例 (64%) は卵摘後 10 週で ER 陰性に変化し、これらの腫瘍の大部分は卵摘中間群であった。一方、初回 ER 陰性腫瘍の大部分は ER 陰性のまま経過し、わずかに 19 例中 2 例 (11%) のみが卵摘後 10 週で ER 陽性と判定された (表 3)。

iii) 全経過に於ける ER 陽陰性の転換

初回よりエストラジオール投与後 10 週迄の全経過に

わたり、経時的に ER を測定し得た同一腫瘍につき、ER の陽陰性の転換を検討した。

まず初回 ER 陽性腫瘍 16 例中 6 例 (38%) は卵摘後 10 週迄 ER 陽性のまま経過したが、残りの 10 例 (63%) は卵摘後 1 週あるいは 10 週で ER 陰性へと変化した。次にエストラジオール投与後 1 週ではこれら卵摘後 10 週迄に ER 陽性から陰性化した 10 例中 6 例 (60%) が再度 ER 陽性化を示し、更にエストラジオール投与後 10 週でこの 6 例中 5 例 (83%) は再度 ER 陰性化を示した。また初回よりエストラジオール投与後 1 週迄 ER 陽性を維持した 6 例中 3 例もエストラジオール投与後 10 週で ER 陰性へと変化した。一方、初回 ER 陰性腫瘍 3 例は卵摘やエストラジオール投与の影響を受けずに ER 陰性のまま推移した (表 4)。

II. ³H-エストラジオールオートラジオグラフィによる ER 陽性細胞の組織内分布

1. 初回腫瘍の ER 陽性細胞分布と ER [NBS] の関係

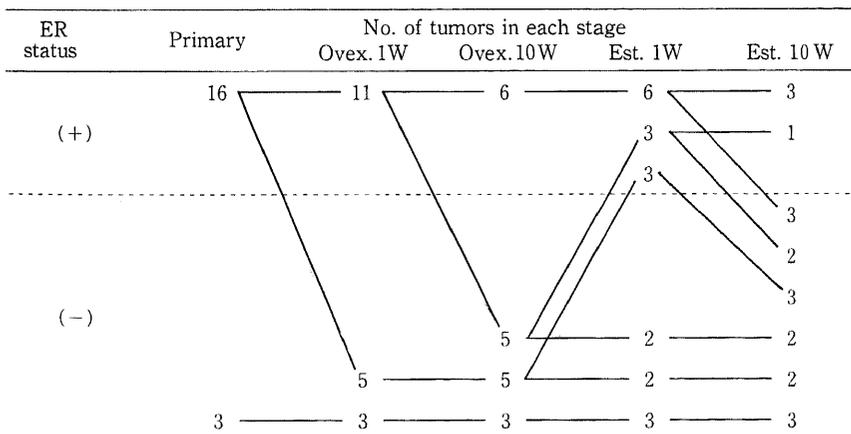
DCC 法によって測定される ER [NBS] は Cytosol の蛋白量当たりの ER 量であり、いわば組織中に含まれる ER の平均値である。しかし、³H-エストラジオールオートラジオグラフィによる組織切片を検鏡すると ER 陽性腫瘍では一般に ER 強陽性細胞が島状の集団を形成し、多中心性に観察された (写真 1)。また ER 弱陽性細胞は主に ER 強陽性細胞の近傍に多く観察され、更に腫瘍により ER 陰性細胞の混在が認められた (写真 2)。即ち、腫瘍組織内に ER 強陽性細胞、ER 弱陽性細胞、ER 陰性細胞が種々の割合で混在することが確認された。そこでこれらの ER 陽性細胞の分布状態と DCC

Table 3. Change of ER status in 10 weeks after ovariectomy

Primary		Ovex. 10W*	
ER status	No. of tumors	ER status	No. (%) of tumors
(+)	42	(+)	15 (36)
		(-)	27 (64)
(-)	19	(+)	2 (11)
		(-)	17 (89)

*Ovex. 10 W; 10 weeks after ovariectomy

Table 4. Change of ER status after ovariectomy and administration of estradiol



Ovex. 1 W, 1 week after ovariectomy; Ovex. 10 W, 10 weeks after ovariectomy; Est. 1 W, 1 week after administration of estradiol; Est. 10 W, 10 weeks after administration of estradiol.

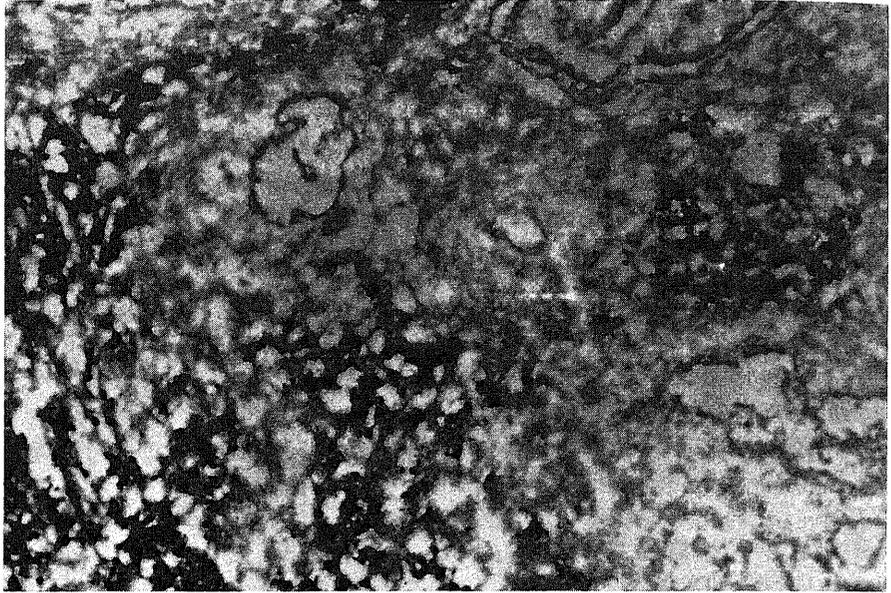


Photo.1. ^3H -estradiol autoradiogram of ER positive primary tumor, showing multicentric aggregation of ER positive cells with high radioactivity; $\times 60$.

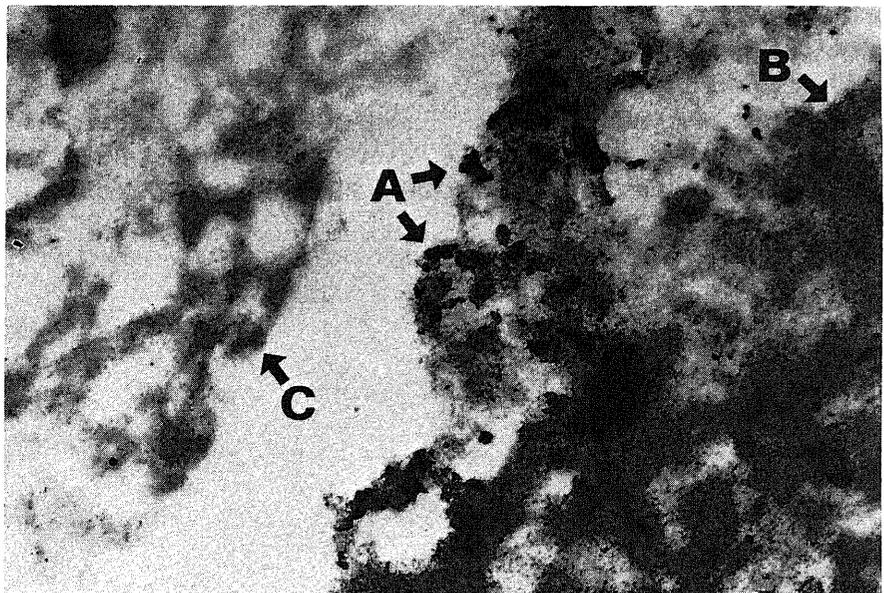


Photo.2. ^3H -estradiol autoradiogram of ER positive primary tumor. Tumor is composed of varying proportions of ER strongly positive cells (arrow A), ER weakly positive cells (arrow B) and ER negative cells (arrow C); $\times 200$. This tumor showed intermediate response to ovariectomy.

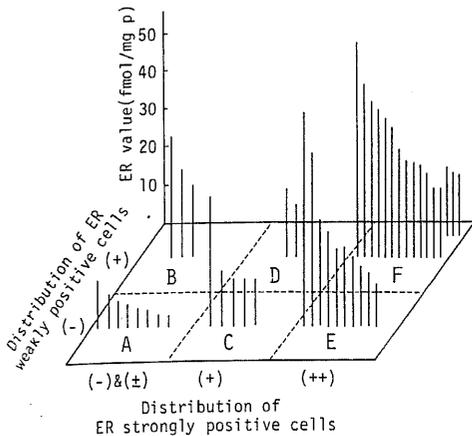


Fig. 7. Correlation between ER values and distribution of ER positive cells in primary tumors. ER values of each group are represented by length of bar; A - F, ($p < 0.01$).

法で測定された ER [NBS] の関係を検討した (図 7)。

ER 強陽性細胞分布 (++) - ER 弱陽性細胞分布 (+) 群 (F) の ER [NBS] の平均値 (Mean \pm S. E.) は 33.7 ± 3.3 fmol/mg p と最も高く, ER 強陽性細胞分布 (-) ~ (±) - ER 弱陽性細胞分布 (-) 群 (A) が 7.5 ± 1.2 fmol/mg p と最も低値を示し両群に有意差が認められ ($P < 0.01$), ER 陽性細胞分布と ER [NBS] はある程度相関する傾向が示唆されたが, その他の群および個々の腫瘍間では両者に必ずしも一致しないものも認められた。

2. 内分泌環境変化に伴う ER 陽性細胞の組織内分布の変動

1) 初回腫瘍の ER 陽性細胞分布状態と卵摘効果

腫瘍の卵摘効果別に ER 強陽性細胞および ER 弱陽性細胞の分布状態を検討した (表 5)。

まず, ER 強陽性細胞の組織内分布を検討すると, 卵摘有効群の腫瘍では ER 強陽性細胞分布 (++) 例が 24 例中 15 例 (63%) と多く, 無効群の腫瘍では 6 例全例が ER 強陽性細胞分布 (-) ~ (±) 例と差違がみられたが, 中間群の腫瘍ではその分布状態は様々で一定の傾向は認められなかった。一方 ER 弱陽性細胞の分布は有効群の腫瘍 24 例中 21 例 (88%) が (+) に対して, 中間群の腫瘍 14 例中 13 例 (93%) および無効群の腫瘍 6 例全例が (-) であった。従って有効群の腫瘍では ER 強陽性細胞と共に ER 弱陽性細胞の分布が重要と考えられた。

次に ER 強陽性細胞と ER 弱陽性細胞の分布を組合わせて腫瘍の卵摘効果を検討すると, ER 強陽性細胞分布 (+) ~ (++) - ER 弱陽性細胞分布 (+) 群の 18 例

中 17 例 (94%) が有効群であり, ER 強陽性細胞分布 (+) ~ (++) - ER 弱陽性細胞分布 (-) 群の 15 例中 11 例 (73%) が中間群, 更に ER 強陽性細胞分布 (-) ~ (±) - ER 弱陽性細胞分布 (-) 群の 8 例中 6 例 (75%) が無効群という結果が得られた (図 8)。即ち, ER 陽性 (強陽性および弱陽性) 細胞の分布状態と腫瘍の卵摘効果の間に高い一致率が認められ, 腫瘍組織中の ER 陽性細胞の分布状態を検索することが腫瘍の卵摘効果を予測する上に有用であることが示唆された。

2) 卵摘後 1 週に於ける腫瘍組織像と ER 陽性細胞分布状態

初回 ER 陽性で卵摘有効群の 6 例は卵摘後 1 週で組織学的に多発生の壊死あるいは嚢胞形成が認められた (写真 3 a)。 ^3H -エストラジオールオートラジオグラフィでは初回腫瘍にみられた ER 強陽性細胞の島状の集団はもはや認められず, ER 強陽性細胞は壊死および嚢胞等の変性組織周辺に局限して観察され (写真 3 b), 初回腫瘍の ER 強陽性細胞集団が卵摘により壊死に陥ったと考えられた。一方, 非変性組織には ER 強陽性細胞は殆んど認められず, 6 例中 5 例に ER 弱陽性細胞の分布が認められた (表 6)。

次に初回 ER 陽性で卵摘中間群の 4 例にも卵摘後 1 週で卵摘有効群と同様な組織学的変化および変性組織周辺の ER 強陽性細胞分布が認められたが, 非変性組織には ER 強陽性および弱陽性細胞は殆んど認められず, 4 例中 1 例のみに ER 弱陽性細胞分布がみられた。

初回 ER 陰性で卵摘無効群の 2 例では卵摘後 1 週も初回より組織学的変化はみられず, ER 強陽性および弱陽性細胞分布共に (-) であった。

3) 卵摘後 10 週に於ける ER 陽性細胞分布状態

初回 ER 陽性で卵摘中間群の腫瘍は卵摘後 10 週で組織学的にはもはや多発生の壊死や嚢胞形成は認められず間質の線維化が著明であった。 ^3H -エストラジオールオートラジオグラフィでは腫瘍組織の大部分が ER 陰性細胞で占められたが, 6 例中 5 例に少数の ER 強陽性細胞の残存が認められた (表 7, 写真 4)。

4) エストラジオール投与後 1 週に於ける ER 陽性細胞分布状態

同様に初回 ER 陽性で卵摘中間群の腫瘍について検討すると, エストラジオール投与後 1 週の ER 強陽性細胞分布は 6 例中 3 例が (++)、他の 3 例が (+) と全例が (+) 以上を示し, 卵摘後 10 週に比較して ER 強陽性細胞が増加する傾向が認められた。即ち, 卵摘後 10 週迄残存した少数の ER 強陽性細胞がエストラジオール投与により再増殖したと考えられた。一方, ER 強陽性細胞以外の組織の大部分は ER 陰性細胞で占められ, 6 例中 1 例のみに ER 弱陽性細胞分布 (+) 例がみられた

Table 5. Distribution of ER positive cells in primary tumors and response to ovariectomy

No.	ER*	Distribution of		Response to Ovex
		ER strongly positive cells	ER weakly positive cells	
1	62.2	(#)	(+)	Effective
2	52.4	(#)	(+)	"
3	45.5	(#)	(+)	"
4	43.2	(#)	(+)	"
5	40.5	(#)	(+)	"
6	37.5	(#)	(+)	"
7	31.6	(#)	(+)	"
8	28.6	(#)	(+)	"
9	27.6	(#)	(+)	"
10	24.6	(#)	(+)	"
11	20.9	(#)	(+)	"
12	20.9	(#)	(+)	"
13	20.8	(#)	(+)	"
14	19.6	(#)	(+)	"
15	18.0	(#)	(+)	"
16	31.6	(#)	(-)	"
17	23.3	(#)	(-)	"
18	21.1	(#)	(-)	"
19	12.8	(#)	(-)	"
20	18.0	(+)	(+)	"
21	13.6	(+)	(+)	"
22	35.7	(±)	(+)	"
23	21.1	(±)	(+)	"
24	26.1	(-)	(+)	"
25	63.0	(#)	(-)	Intermediate
26	50.5	(#)	(-)	"
27	27.6	(#)	(+)	"
28	23.8	(#)	(-)	"
29	17.6	(#)	(-)	"
30	16.5	(#)	(-)	"
31	15.3	(#)	(-)	"
32	37.8	(+)	(-)	"
33	29.1	(+)	(-)	"
34	14.9	(+)	(-)	"
35	14.5	(+)	(-)	"
36	14.3	(+)	(-)	"
37	14.3	(±)	(-)	"
38	10.0	(±)	(-)	"
39	8.1	(±)	(-)	Ineffective
40	6.9	(±)	(-)	"
41	3.9	(±)	(-)	"
42	6.3	(-)	(-)	"
43	5.7	(-)	(-)	"
44	4.6	(-)	(-)	"

* fmoles/mg protein
Ovex; ovariectomy

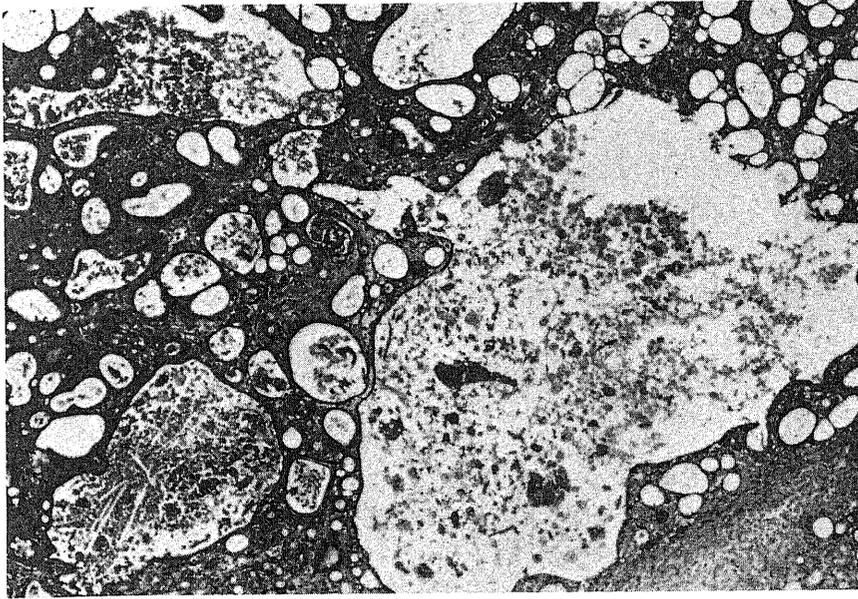


Photo. 3a. Histological view of tumor at the 1st week after ovariectomy. Note multiple necrosis and cyst formation; $\times 40$.

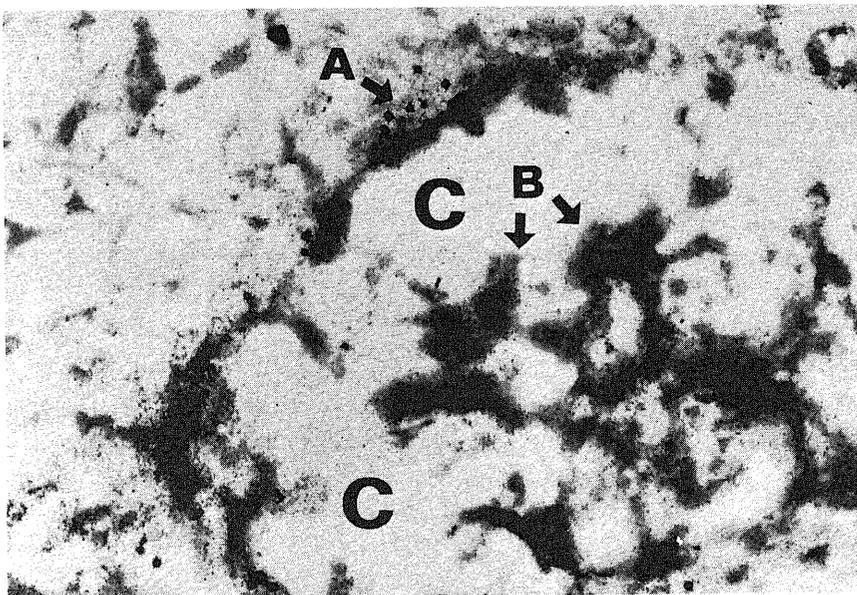


Photo. 3b. ^3H -estradiol autoradiogram of tumor at the 1st week after ovariectomy. ER positive cells are mainly located around degenerative tissue. A, ER strongly positive cells; B, ER weakly positive cells; C, cyst; $\times 300$.

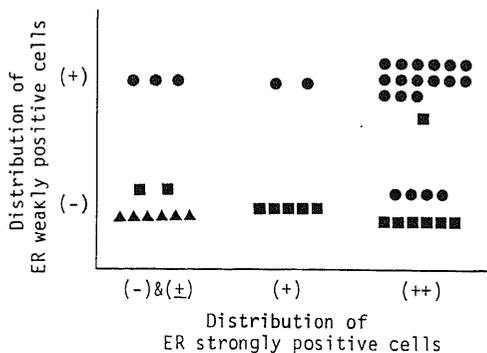


Fig. 8. Correlation between distribution of ER positive cells in primary tumors and response to ovariectomy. ●, Tumors with effective response to ovariectomy; ■, Tumors with intermediate response to ovariectomy; ▲, Tumors with ineffective response to ovariectomy.

Table 6. Distribution of ER positive cells in tumors at the 1st week after ovariectomy

No.	ER*	Distribution of		Response to Ovex
		ER strongly positive cells	ER weakly positive cells	
1	34.6	(#)	(+)	Effective
2	30.6	(+)	(+)	"
3	27.3	(+)	(+)	"
4	15.6	(+)	(+)	"
5	13.7	(#)	(-)	"
6	13.0	(+)	(+)	"
7	29.9	(#)	(-)	Intermediate
8	27.6	(#)	(+)	"
9	16.5	(+)	(-)	"
10	14.5	(+)	(-)	"
11	6.3	(-)	(-)	Ineffective
12	4.8	(-)	(-)	"

* fmoles/mg protein
Ovex; Ovariectomy

Table 7. Distribution of ER positive cells in tumors at the 10th week after ovariectomy

No.	ER*	Distribution of		Response to Ovex
		ER strongly positive cells	ER weakly positive cells	
1	31.8	(±)	(+)	Intermediate
2	15.2	(±)	(-)	"
3	14.8	(±)	(-)	"
4	9.8	(±)	(-)	"
5	7.9	(±)	(-)	"
6	6.9	(-)	(-)	"
7	7.6	(±)	(-)	Ineffective
8	0	(-)	(-)	"

* fmoles/mg protein
Ovex; Ovariectomy

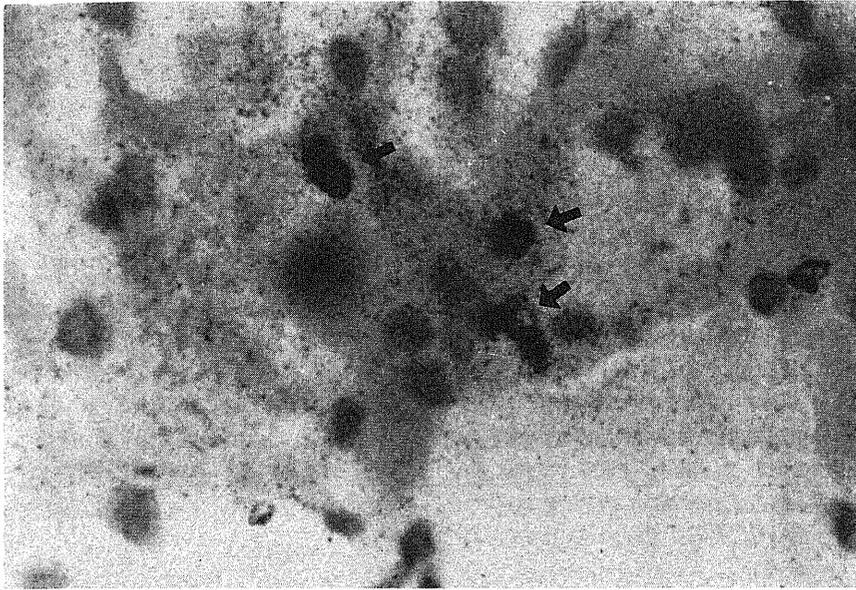


Photo. 4. ^3H - estradiol autoradiogram of tumor at the 10th week after ovariectomy, showing a small number of residual ER strongly positive cells (arrowed); $\times 400$.

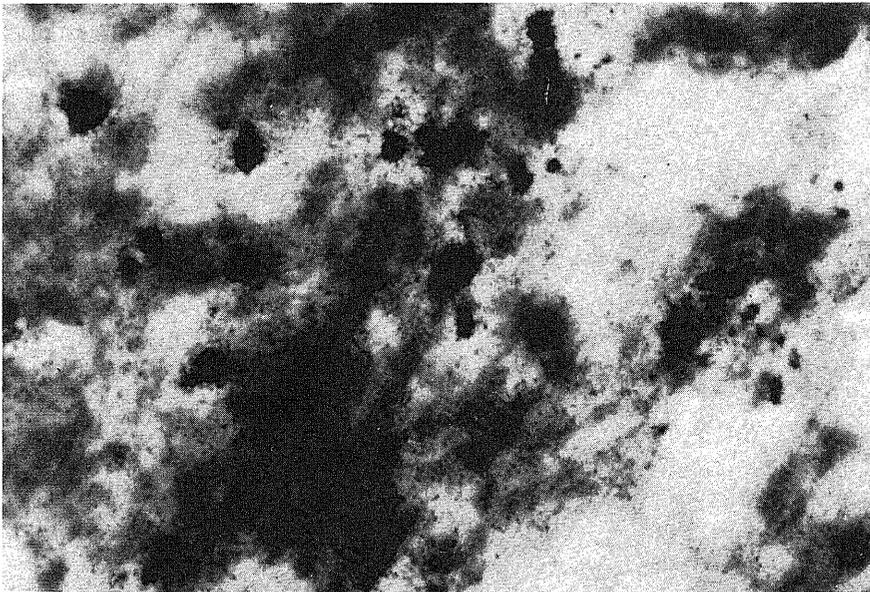


Photo. 5. ^3H - estradiol autoradiogram of tumor at the 1st week after administration of estradiol, showing increase of ER strongly positive cells; $\times 400$.

Table 8. Distribution of ER positive cells in tumors at the 1st week after administration of estradiol

No.	ER*	Distribution of		Response to Ovex
		ER strongly positive cells	ER weakly positive cells	
1	18.7	(+)	(-)	Effective
2	2.4	(-)	(-)	"
3	50.4	(#)	(+)	Intermediate
4	20.6	(#)	(-)	"
5	19.0	(#)	(-)	"
6	16.7	(+)	(-)	"
7	14.5	(+)	(-)	"
8	12.3	(+)	(-)	"

* fmoles/mg protein
Ovex; Ovariectomy

(表 8, 写真 5).

尚, 卵摘有効群の腫瘍の大部分は経過中に腫瘍が消失し, 卵摘無効群は腫瘍死する例が多い為, 卵摘後 10 週以降の両群の ER 陽性細胞分布状態については十分な検討をしえなかった。

考 察

乳癌は今日, ホルモン依存性腫瘍としてその発生と増殖にエストロゲン (Estrogen), プロジェステロン (Progesterone), コルチコステロイド (Corticosteroid), プロラクチン (Prolactin), アンドロゲン (Androgen) 等の種々のホルモンが関与することが知られている。その発端は, 1896 年に Beatson¹⁾ が末期乳癌症例に対して卵巣摘除術を施行し, その効果を報告したことにより始まり, その後, 1939 年 Ulrich³¹⁾ や Loeser³²⁾ が男性ホルモンの投与, 更に 1951 年 Huggins³³⁾ が両側副腎摘除術, 1953 年 Luft³⁴⁾ が下垂体摘除術を施行し³⁵⁾, 各々の乳癌に対する治療効果を報告している。現在, これらの外科的および内科的内分泌療法は手術療法, 放射線療法, 化学療法と共に乳癌の重要な治療法の一つとなっている。この内分泌療法は, 主に根治手術不能な進行乳癌や再発乳癌に対して, あるいは術後の再発防止の目的で行われているが, その治療効果は過去の多くの報告から全体の約 30% に過ぎず, 残る 70% に対しては殆んど無効であることが判明している。従ってこれら無効例に卵摘, 副腎, 下垂体摘除等の外科的浸襲を加えることや, 副作用を少なからず有する各種のホルモン剤を投与することは不合理であると思われる。そこで内分泌療法の治療効果を予測することが今

世紀初めよりの懸案となっており, 多くの研究がなされている。その結果, 近年 Jensen³⁶⁾ はエストロゲン標的臓器にエストロゲンに新和性の高い蛋白, エストロゲンレセプター (ER) が存在することを発見し, 更に Korenman³⁷⁾ や McGuire³⁸⁾ はヒト乳癌組織にも ER が存在することを確認している。この ER はエストロゲンの標的細胞での pathway を解明する鍵であると共に, ER の測定が乳癌のホルモン依存性を知る定量性および再現性の高い方法として評価され, 最近, 広く臨床に応用されるに至っている。しかしながら, ヒト乳癌の ER 陽性率は全体の 50~60% であり, 更に ER 陽性例の内分泌療法有効例は, 本邦および欧米の報告でその約 60% とされ²⁹⁾, 無作為に内分泌療法を行った場合の約 2 倍の有効率が得られたものの, 残りの 40% に無効例が存在する。現在, エストロゲンの標的細胞内での過程は次のように考えられている。即ち, 血中より細胞内に入ったエストロゲンは細胞質 ER と特異的に結合してエストロゲン・レセプター複合体を形成し, 更に活性化されて核内に移行する。この核内レセプターは次にクロマチンのアクセプターサイト (acceptor site) と結合して遺伝子活性化をもたらす, m-RNA を介して蛋白合成を営むとされている⁴⁾³⁶⁾。従って細胞質 ER はエストロゲンの作用発現に必須ではあるが, その後の過程に障害があれば, そのホルモン作用は発揮できず, たとえ ER 陽性腫瘍であってもホルモン非依存性の状態と考えられる。これらの因子を除外するため, エストロゲン作用発現の marker の一つである PgR の測定^{12)~14)}, あるいは核内 ER の測定¹⁵⁾¹⁶⁾ が試みられているが, これらの陽性例の内分泌療法の有効率は若干上

昇したものの、依然相当数 (20~30%) の無効例が存在している現状にある。著者の DMBA 誘発ラット乳癌を用いた実験成績でも初回 ER 陽性腫瘍の卵摘効果は有効例が 70% であり、他の 26% は中間例、4% は無効例であった。一方、ER 陰性腫瘍では、18% が有効例、28% が中間例、54% が無効例であった。ER 陰性腫瘍の有効例には、陽陰性判定の border line に近い例が多くみられたが、ER 陽性腫瘍の有効群と中間群は ER [NBS] に有意差を認めず、ER 陽性乳癌の内分泌療法の効果は必ずしも ER の絶対量に比例しないという臨床報告¹¹⁾に一致する結果であった。DCC 法によって測定される ER [NBS] は腫瘍組織のホモジネートから得られた細胞質分画の ER 量であり、いわば組織中に含まれる ER の平均値であると考えられる。しかし、同一腫瘍組織中の細胞の性格が均一でないということは、既に Fiedler²⁷⁾が B 16 メラノーマを用いた実験で報告しており、また飯野³⁸⁾はヒト乳癌腫瘍の組織採取部位による ER を検討し、部位により ER の判定および NBS が異なる腫瘍が少なくないことを報告し、その原因は腫瘍内の ER 陽性細胞密度の差にあることを示唆している。更に Lee³⁹⁾および Pertschuk⁴⁰⁾は蛍光法によりヒト乳癌の凍結組織切片上で ER 陽性細胞の可視化を行い、実際に ER 陽性細胞は組織中に均一ではなく、ER 陽性細胞と ER 陰性細胞が不規則に混在する“モザイク”を形成していることを明らかにしている。著者は、凍結組織切片を用いた³H-エストラジオールオートラジオグラフィを考案し、ER 陽性細胞の分布状態を検討したが、同様に ER 陽性(強陽性および弱陽性)細胞と ER 陰性細胞の混在が確認され、特に ER 陽性腫瘍中の ER 強陽性細胞集団は一般に不規則な島状の分布を示していた。この ER 陽性細胞の分布状態と DCC 法により測定した腫瘍の ER [NBS] の間にはある程度の相関がみられたが、個々の腫瘍により異なるものも認められた。これらの ER 陽性細胞の分布状態から卵摘効果を検討すると、ER 強陽性細胞分布(++) - ER 弱陽性細胞分布(+)例では 16 例中 15 例が有効例であり、ER 強陽性細胞分布(+) ~ (++) - ER 弱陽性細胞分布(-)例では 15 例中 11 例が中間例であり、更に ER 強陽性細胞分布(-) ~ (±) - ER 弱陽性細胞分布(-)例では 8 例中 6 例が無効例であった。これらのオートラジオグラフィの施行例は比較的少数であるが、DCC 法によって測定された ER [NBS] よりも卵摘効果を良く反映する傾向にあり、腫瘍組織中の ER 陽性細胞の分布状態を検索することが腫瘍の内分泌療法効果を予測する上にも有用であることが示唆され、今後更に検討を要すると考えられた。

一方、ER 陽性乳癌の大部分はその自然経過を通じて

ER を保持すると一般的に考えられているが¹⁹⁾、内分泌療法後の再発腫瘍に於いては ER 陽性乳癌が ER 陰性へと変換しホルモン非依存性となり得ることが、臨床^{20)~22)}および動物実験^{23)~26)}で次第に明らかとなっている。即ち、Kiang²¹⁾はヒト乳癌の ER を内分泌療法前後で測定し、ER 陽性乳癌の 11 例中 5 例が ER 陰性化し、他の 6 例も ER [NBS] が低下したと述べており、また木下²⁴⁾は DMBA 誘発ラット乳癌の卵摘後再発腫瘍では、5 例中 4 例が ER 陽性から ER 陰性に変化したと報告している。著者の実験成績でも卵摘有効群および中間群の腫瘍の ER [NBS] は初回腫瘍の ER [NBS] に比し有意な低下を示し、更に卵摘後 10 週では有効群の腫瘍は殆んど消失するが、初回 ER 陽性腫瘍の卵摘後 10 週の残存腫瘍では 42 例中 27 例 (64%) が ER 陰性へと変化した。従って、ER 陽性乳癌が卵摘等の内分泌療法により、ER 陰性化し得ることは諸家の報告および著者の実験から異論のない事実である。この腫瘍 ER の変化時期について、Vignor⁴²⁾は DMBA ラット乳癌を用いた実験で卵摘後 10 日間にわたり腫瘍 ER を経時的に測定し、その ER [NBS] は卵摘後 1 日目でピークに達した後、数日で急激に低下し、その後更に漸減すると述べ、また Tominaga²⁹⁾は ER 陽性ラット乳癌の 18 例中 17 例が卵摘後数日で ER 陰性化したと報告している。しかし、著者の実験では卵摘後 1 週で腫瘍の ER [NBS] の有意な低下が認められたが (P < 0.01)、初回 ER 陽性腫瘍 105 例中 80 例 (76%) は依然 ER 陽性のまま経過し、残りの 25 例 (24%) のみが ER 陰性へと変換し、しかもこの時期に於ける ER 陰性化例に卵摘中間群が多くなる傾向が認められた。

この ER 陽性腫瘍が内分泌療法後、ER 陰性化する現象は ER 陽性乳癌にも内分泌療法無効例が存在する理由の一つと考えられると共に、臨床的に一旦内分泌療法に奏効し退縮したヒト乳癌の多くが再発し、その後の内分泌療法が無効となる原因と考えられる。従って、ER 陽性腫瘍の ER 陰性化の機序を解明することは、臨床で極めて重要な問題と思われる。その機序として現在、① ER 陽性細胞が内分泌療法により ER 陰性細胞に転化する。② ER 陽性腫瘍内に ER 陽性細胞と ER 陰性細胞が混在し、内分泌療法により前者が死滅、後者が増殖し、腫瘍の ER は陰性となるという 2 つの考え方が存在するが⁴²⁾、諸家の一致した結論が得られていないのが現状である。即ち、前者に関して松本⁴⁴⁾はアンドロゲン (Androgen) 依存性マウス乳癌 SC 115 を用いた実験で男性ホルモン除去後再増殖したアンドロゲンレセプター (Androgen receptor, 以下 AR と略) 陰性の癌細胞は、AR 陽性細胞から転化 (transformation) したものであることを報告している。しかし、ヒト乳

癌の ER 陽性細胞に於いても通常, transformation という変化が起こりうるかどうかは疑問と思われる。一方, 後者に関しては前述の如くヒト乳癌組織中に ER 陽性細胞と ER 陰性細胞が混在することが蛍光法で既に示されており³⁹⁾⁽⁴¹⁾, ヒト乳癌にこの機序が成立し得る有力な根拠とされている。しかし, これら乳癌組織中の ER 陽性細胞の分布状態に関する報告は殆んどが初回腫瘍の所見に限られ, 内分泌療法後の ER 陽性細胞の分布状態については言及されていない。著者は, 凍結組織切片を用いた³H-エストラジオールオートラジオグラフィにより初回 ER 陽性ラット乳癌組織中に ER 強陽性および弱陽性細胞あるいは ER 陰性細胞が種々の割合で混在することを確認し, 更に卵摘後の ER 陽性細胞分布状態の変化についても検討を加えた。即ち, 初回 ER 陽性腫瘍にみられた島状に分布する ER 強陽性細胞集団は卵摘後 1 週でその殆んどが消失し, 組織学的にみられた壊死および囊胞等の変性組織周辺にのみ限局して ER 強陽性細胞が観察されることから, 初回の ER 強陽性細胞集団が卵摘より壊死を起こしたと考えられた。一方, 非変性組織は主に, 卵摘有効群では ER 弱陽性細胞, 中間群および無効群では ER 陰性細胞により占められていた。従って, 卵摘後 1 週で ER 強陽性細胞の大部分が死滅し, 腫瘍の縮小と共に腫瘍の ER [NBS] の急激な低下が認められるが, 卵摘有効群の腫瘍には ER 弱陽性細胞, 中間群および無効群の腫瘍には ER 陰性細胞が残存しており, その為, 初回に認められなかった有効群と中間群の ER [NBS] に卵摘後 1 週で有意差がみられてくると考えられた。有効群の腫瘍の ER 弱陽性細胞もその後漸次死滅し, 腫瘍の退縮, 消失に向うと考えられた。即ち有効群の腫瘍の大部分は卵摘後 10 週迄に消失し, 一部の残存した腫瘍の ER [NBS] は卵摘後 1 週より更に低値を示した。一方, 中間群および無効群の腫瘍の ER 陰性細胞はその後も増殖し, 腫瘍の再増大または増大をもたらす, その結果, 初回 ER 陽性腫瘍の ER 陰性化および再発が起こると考えられた。

しかし, 内分泌療法後も長期に ER を有し消失しない腫瘍が少なからず存在することは, 臨床例から認められており, 著者の実験でも初回 ER 陽性腫瘍の 42 例中 27 例 (64%) が卵摘後 10 週で ER 陰性化を示したが, 残りの 15 例 (36%) は ER 陽性のまま経過した。更に卵摘後 10 週迄に ER 陽性から陰性化した腫瘍に於いても組織中に少数の ER 強陽性細胞が残存していることが認められ, しかも, その後のエストラジオール投与により腫瘍の ER [NBS] が再上昇すると共に, これらの ER 強陽性細胞が増加する傾向が認められ, 卵摘後も長期にわたり残存した ER 強陽性細胞がエストラジオール投与により再増殖したと考えられた。この事実は,

ホルモン '非依存性' の ER 陽性腫瘍が存在する⁽⁴²⁾この他に極めて低濃度のエストロゲン環境に於いても生存し得るホルモン '依存性' の ER 陽性腫瘍の存在を示唆していると考えられ, 今後更に検討を要すると思われた。

結 論

DMBA 誘発ラット乳癌をモデルとして卵摘およびエストラジオール投与等の内分泌環境変化に伴う腫瘍の ER [NBS] 並びに ER 陽性細胞の組織内分布の変動を経時的に検討した。

1. 卵摘有効群および中間群の腫瘍の ER [NBS] は卵摘後 1 週で有意に低下 ($P < 0.01$), 卵摘後 10 週迄に初回 ER 陽性腫瘍 42 例中 27 例 (64%) が ER 陰性に変化した, その後のエストラジオール投与により腫瘍の ER [NBS] は再上昇を示した。しかし卵摘無効群の腫瘍の ER [NBS] はこれらの内分泌環境の変化に殆んど影響を受けず, 初回より低値のまま経過した。

2. 初回 ER 陽性, 卵摘有効群の腫瘍は主に ER 強陽性細胞および ER 弱陽性細胞から成り, 卵摘によりまず前者が死滅し, その後, 後者も漸次死滅して腫瘍の縮小, 消失に向う。また初回 ER 陽性, 卵摘中間群の腫瘍は ER 陽性 (強陽性および弱陽性) 細胞および ER 陰性細胞から成り, 前者は卵摘後死滅し一旦腫瘍の縮小をきたすが, 後者は卵摘後も増殖して腫瘍の再増大と共に腫瘍の ER 陽性→陰性化をもたらす。一方, 初回 ER 陰性, 卵摘無効群の腫瘍は大部分 ER 陰性細胞から成り, 内分泌環境の変化に影響を受けず増大する。

3. 卵摘後 ER 陽性→陰性化した卵摘中間群の腫瘍にも長期にわたり少数の ER 強陽性細胞の残存が観察され, これがエストラジオール投与により再増殖し腫瘍 ER [NBS] の上昇および ER 再陽性化をもたらす。

以上より, ER 陽性腫瘍は卵摘等の内分泌療法により ER 陽性細胞が壊死に陥るが, ER 陰性細胞が残存, 増殖する為腫瘍の ER 陰性化および再増大が起こることが明らかとなり, 更に乳癌に対する内分泌療法の効果予測手段として, ER 等のホルモンレセプターの量的な測定と共に ER 陽性細胞の組織内分布を検索することが有用と考えられた。

謝 辞

本論文の要旨の一部は, 第 40 回日本癌学会において発表された。稿を終るにあたり, 御指導, 御校閲を賜った金沢大学医学部外科学第二講座宮崎逸夫教授に深謝の意を表します。また直接御指導頂いた野口昌邦博士に謹んで感謝するとともに, 御協力頂いた同教室員の各位および中央検査部病理, 動物施設, RI センターの各位に御礼申し上げます。

文 献

- 1) **Beatson, G. T.**: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma. Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet*, ii, 104 - 107 (1896).
- 2) **野村雍夫**: 乳癌におけるホルモン依存性腫瘍と hormone receptor, 現代外科学大系, **77B**, 203 - 219 東京, 中山書店. 1977.
- 3) **Jensen, E. V., Jacobson, H. L.**: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progr. Hormone Res.*, **18**, 387 - 414 (1962).
- 4) **Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblut, P. W. & Desombre, E. R.**: A two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Prog. Nat. Acad. Sci.*, **59**, 632 - 638 (1968).
- 5) **Korenman, S. G. & Dukes, B. A.**: Specific estrogen binding by the cytoplasm of human breast cancers. *Br. J. Surg.*, **61**, 785 - 786 (1974).
- 6) **McGuire, W. L.**: Estrogen receptor in human breast cancer. *J. Clin. Invest.*, **52**, 73 - 77 (1973).
- 7) **E. O. R. T. C. Breast Cancer Coorporative Group**: Standards for the assessment of estrogen receptors in human breast cancer. *Europ. J. Cancer*, **9**, 379 - 381 (1973).
- 8) **Mobbs, B. G. & Johnson, I. E.**: Estrogen - binding in vitro by DMBA - induced rat mammary tumors. its relationship to hormone responsiveness. *Europ. J. Cancer*, **10**, 757 - 763 (1974).
- 9) **Nomura, Y., Kobayachi, S., Takatani, O., Matsumoto, K. & McGuire, W. L.**: Estrogen receptor and endocrine responsiveness in Japanese versus American breast cancer patients. *Cancer Res.*, **37**, 106 - 110 (1977).
- 10) **松本圭史, 虎頭廉, 中尾量保**: 乳癌における Estrogen receptor. *臨床科学*, **12**, 1123 - 1127 (1974).
- 11) **野村雍夫**: ヒト乳癌のホルモン依存性. 癌の臨床, **27**, 1679 - 1682 (1981).
- 12) **Horwitz, K. B. & McGuire, W. L.**: Predicting response to endocrine therapy in human breast cancer. A hypothesis. *Science*, **189**, 726 - 727 (1975).
- 13) **McGuire, W. L., Horwitz, K. B., Person, O. H. & Segaloff, A.**: Cancer status of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer*, **39**, 2934 - 2947 (1977).
- 14) **松本圭史**: 乳癌とホルモン受容体. ホルモンと臨床, **28**, 29 - 37 (1980).
- 15) **Boylan, E. S. & Wittliff, J. L.**: Specific estrogen binding in rat mammary tumors induced by 7, 12 - dimethylbenz (a) anthracene. *Cancer Res.*, **35**, 506 - 511 (1975).
- 16) **西村令喜, 赤木正信, 三隅厚信, 木村正治, 徳永孝生, 荒木啓介**: 人乳癌組織の核内 Estrogen receptor 測定の意義. 第 40 回癌学会総会記事, **284**, (1981).
- 17) **Nomura, Y., Abe, Y., Yamagata, J. & Takenaka, K.**: Possible retention of the estrogen binding capacity after endocrine ablation therapy in the rat and human breast cancer. *Gann*, **67**, 101 - 104 (1976).
- 18) **Zava, D. T., Chamness, G. C., Horwitz, K. B. & McGuire, W. L.**: Human breast cancer: Biological active estrogen receptor in the absence of estrogen?. *Science*, **196**, 663 - 664 (1977).
- 19) **Block, G. E., Jensen, E. V. & Polley, T. Z.**: The prediction of hormonal dependency of mammary cancer. *Ann. Surg.*, **182**, 342 - 352 (1975).
- 20) **Normura, Y., Yamagata, J. & Kondo, H.**: Significance of estrogen receptor assay in cytotoxic chemotherapy in relation to previous endocrine therapy of advanced breast cancer patients. *Gann*, **70**, 473 - 482 (1979).
- 21) **Kiang, D. T., Frenning, D. H., Goldman, A. I., Ascensao, V. F. & Kennedy, B. J.**: Estrogen receptors and responses chemotherapy and hormonal therapy in advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, **299**, 1330 - 1334 (1978).
- 22) **Singakowinta, A., Saunders, D. E., Brooks, S. C., Samal, B. & Vaitkevicius, V. K.**: Clinical application of estrogen receptor in breast cancer. *Cancer*, **46**, 2932 - 2938 (1980).
- 23) **Tominaga, T., Kitamura, M. & Tei, N.**: Effect of oophorectomy on estrogen receptors in rat mammary tumors induced by 7, 12 - dimethylbenz (a) anthracene. *Binken J.*, **20**, 143 - 145 (1977).
- 24) **木下元**: 乳癌のホルモン依存性に関する実験的研究. 十全医会誌, **89**, 453 - 467 (1980).
- 25) **野口昌邦, 木下元, 宮崎逸夫**: DMBA 誘発ラット乳癌のホルモン依存性に関する検討. 最新医学, **36**, 987 - 982 (1981).
- 26) **Turcot - Lelay, L. & Kelly, P. A.**: Characterization of estradiol, progesterone, and prolactin receptors in nitrosomethylurea - induced mammary tumors and effect of antiestrogen treatment on the

development and growth of these tumors. *Cancer Res.*, **40**, 3232 - 3240 (1980).

27) 加藤順三, 野村雅夫, 松本圭史, 小野内常子: エストロゲンの Radioreceptor 測定の実際, *日本臨床*, **34**, 66 - 73 (1976).

28) 松本圭史, 越智温夫: 乳癌とエストロゲンレセプター. *臨床医*, **3**, 100 - 101 (1977).

29) McGuire, W. L., Garza, M. & Chamness, G. C.: Evaluation of Estrogen receptor assays in human breast cancer tissue. *Cancer Res.*, **37**, 637 - 639 (1977).

30) Yamazaki, S.: Estrogen receptor in malignant and benign breast tumors and normal breast tissues of Japanese patients. *Jap. J. Clin. Oncol.*, **8**, 37 - 47 (1978).

31) Ulrich, P.: Cancer bilateral - inopérable a droite - de la glance mammire. *Soc. franc. de gynéc.*, **9**, 70 - 77 (1939).

32) Loeser, A. A.: Male hormone in treatment of cancer of breast. *Acta union internat. contre cancer*, **4**, 375 - 376 (1939).

33) Huggins, C. & Dao, T. L.: Adrenalectomy for mammary cancer. *Ann. Surg.*, **136**, 595 - 603 (1952).

34) Luft, R. & Olivecrona, H.: Experience with hypophysectomy in man. *J. Neurosurg.*, **10**, 301 - 306 (1953).

35) Fracchia, A. A., Farrow, J. H., Miller, T. R., Tollefsen, R. H., Greenberg, E. J. & Knapper, W. H.: Hypophysectomy as compared with adrenalectomy in the treatment of advanced carcinoma of the breast. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **241** - 247 (1971).

36) 加藤順三: 細胞内ホルモンレセプターの生化学.

エストロゲン. *総合臨床*, **23**, 1246 - 1256 (1974).

37) Fiedler, I. J.: Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, **38**, 2651 - 2660 (1978).

38) 飯野佑一, 遠藤敬一, 川井忠和, 平井利幸, 泉雄勝, 滝川映男: 大きな乳癌腫瘍内の採取部位の差による estrogen receptor の部位別変異について, *医学のあゆみ*, **112**, 381 - 383 (1980).

39) Lee, S. H.: Cytochemical study of estrogen receptor in human mammary cancer. *Am. J. Clin. Pathol.*, **70**, 197 - 203 (1978).

40) Pertschuk, L. P., Tobin, E. H., Brigati, D. J., Carter, A. C. & Degenshein, G. a.: Immunofluorescent detection of estrogen receptors in breast cancer. Comparison with dextran-coated charcoal and sucrose gradient assays. *Cancer*, **41**, 907 - 911 (1978).

41) Lee, S. H.: Cancer cell estrogen receptor of human mammary carcinoma. *Cancer*, **44**, 1 - 12 (1979).

42) Vignon, F. & Rochefort, H.: Regulation of estrogen receptors in ovarian-dependent rat mammary tumors. I. Effects of castration and prolactin. *Endocrinology*, **98**, 722 - 729 (1976).

富永健, 北村正次, 金子甫, 林和雄, 高橋勇, 伊藤一二, 斎藤妙子: 進行乳癌に対する卵巣・副腎摘出術の効果の多様性. *癌の臨床*, **26**, 344 - 347 (1980).

44) 松本圭史, 成田憲彦: シオノギ癌 115 (男性ホルモン依存性マウス乳癌) のホルモン依存性の変化. *癌の臨床*, **27**, 1683 - 1686 (1981).

45) 吉田浩己: 乳癌の発生とホルモン環境, *乳癌・内分泌療法*, 59 - 72 頁, 東京, 篠原出版, 1981.

Variation of Estrogen Receptor (ER) Values and Distributions of ER Positive Cells following Change of Hormonal Status in DMBA-induced Rat Mammary Cancer Akira Matsuba, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. *Juzen Med. Soc.*, **91**, 695 - 713 (1981)

Key words: Mammary cancer, Estrogen receptor, Hormonal therapy.

Abstract

The hormonal influence on the variation of estrogen receptor (ER) values and histological distributions of ER positive cells was studied in the 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced rat mammary cancer. Changes in the hormonal status were produced by ovariectomy

and subsequent administration of estradiol. Responses of tumors to ovariectomy were divided into three groups; effective, intermediate and ineffective group. ER values of tumors were determined by the dextran-coated charcoal (DCC) method and distributions of ER positive cells in tumors were analyzed with ^3H -estradiol autoradiography of the frozen section. In tumors resected on ovariectomy (initial tumor), the difference of ER values between the effective and intermediate groups was not found, but the distributions of ER positive cells in tumors were different between the two groups. Tumors of the effective group were mainly composed of ER strongly positive and weakly positive cells, whereas tumors of the intermediate group were composed of ER positive and negative cells. One week after ovariectomy, tumors of the effective and intermediate groups decreased significantly in ER values, showing multiple necroses and cysts. ER strongly positive cells were found only in the area near the degenerative tissues. This indicated that ovariectomy induced necrosis of ER strongly positive cells in tumors. Ten weeks after ovariectomy, almost all tumors of the effective group disappeared, but tumors of the intermediate group showed regrowth. ER values of these surviving tumors decreased further and 64% of the initial ER positive tumors became ER negative in 10 weeks after ovariectomy. These ER negative tumors were mainly composed of ER negative cells. Later than the 10th week after ovariectomy, the dose of $10\mu\text{g}$ of estradiol per week was administered by subcutaneous injection for 4 weeks. One week after the last administration of estradiol, ER values of the tumors significantly increased and distributions of ER strongly positive cells also increased. On the other hand, tumors of the ineffective group had low ER values and few ER positive cells. ER values of these tumors were not effected by ovariectomy or administration of estradiol.

These results suggest that ER positive tumors change to ER negative ones after ovariectomy because of reduction of ER positive cells. So investigation of ER positive cells in the tumor is useful in predicting the effect of hormonal treatment of the mammary cancer.