

# エストロゲン誘発ラットプロラクチン産生下垂体腫瘍に対するブモクリプチンおよびタモキシフェンの抗腫瘍効果

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9163">http://hdl.handle.net/2297/9163</a>

## エストロゲン誘発ラットプロラクチン産生下垂体腫瘍に対する ブロモクリプチンおよびタモキシフェンの抗腫瘍効果

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

浜 田 秀 剛

エストロゲン投与によって誘発したラットプロラクチン (prolactin, PRL) 産生下垂体腫瘍に対して、ブロモクリプチンおよびタモキシフェンを投与し、両者の PRL 産生下垂体腫瘍に対する分泌および増殖抑制効果を、下垂体重量、血清 PRL 値および組織学的所見について比較検討した。7~8 週齢のウィスター (Wistar) 系の雌ラットにエストロゲン 2.5mg を週 1 回投与した結果、下垂体重量および血清 PRL 値は著明に増加し、エストロゲンを計 6 回投与した時点で組織学的にほとんどの下垂体が PRL 細胞となったので、この時点でラット下垂体 PRL 産生腫瘍のモデルが誘発されたものとみなした。同様の方法でエストロゲンを 10 回投与したラットに対して、ブロモクリプチン、タモキシフェンを各々 1 回 0.5mg ずつ 3 週間にわたって筋肉内に隔日投与した。その結果、ブロモクリプチンはエストロゲンを連続投与したラットの下垂体重量および血中 PRL 濃度を低下せしめ、電子顕微鏡 (電顕) 的には細胞内分泌顆粒の増加と細胞内小器官の退縮を来たした。細胞内分泌顆粒の増加はブロモクリプチンによる PRL の放出障害を意味しており、細胞内小器官の退縮はその二次的結果と考えられた。タモキシフェンの下垂体重量に及ぼす効果はブロモクリプチンと同等であったが、血中 PRL 濃度に及ぼす効果はブロモクリプチンより小さく、タモキシフェンは腫瘍増殖抑制により強く作用すると考えられた。電顕的には細胞内分泌顆粒の増加は、タモキシフェンにも一部 PRL 放出抑制作用があることが推測された。ブロモクリプチンとタモキシフェンの併用投与と、ブロモクリプチン単独投与との間には有意差は認められなかった。以上より、本実験モデルにおいては PRL 産生下垂体腫瘍の分泌および増殖に対して、ブロモクリプチンおよびタモキシフェンの抑制的効果が確認された。本実験モデルは PRL 産生下垂体腫瘍の病態生理を研究する上で有用と考えられた。

**Key words** estrogen, prolactin, pituitary adenoma, bromocriptine, tamoxifen

コンピュータ断層撮影 (computed tomography, CT) や核磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging, MRI) をはじめとした放射線学的診断機器の発達とラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay, RIA) 法による内分泌学的検査法の普及により、微小腺腫を含めた下垂体腺腫の診断が容易となった。さらに内分泌学的手法により、下垂体におけるホルモンの分泌動態が解明され、腺腫が産生するホルモンの種類に基づいて下垂体腺腫の機能的分類が行われるようになり、腺腫に対する治療法は多様化しつつある。下垂体腺腫に対する治療の原則は手術による腺腫の摘出であるが、ブロモクリプチン (bromocriptine, 2-bromo- $\alpha$ -ergocriptine) の出現により、プロラクチン (prolactin, PRL) 産生下垂体腺腫に対する治療法は大きく変化した。ブロモクリプチンは麦角アルカロイドより誘導されたドーパミン (dopamine, DA) 作動薬であり<sup>1)</sup>、下垂体腺腫を含めた種々の原因による高 PRL 血症に対して、その血清 PRL 値を低下させることが知られている<sup>2)</sup>。現在 PRL 産生腺腫の治療として、主に微小腺腫を中心に多くの症例でブロモクリプチンの単独投与が行われている。また、手術症例においても術前に腫

瘍縮小効果を期待して投与されたり、術後に血清 PRL 値が正常化しない場合にも投与されている。しかし、ブロモクリプチン単独投与では血清 PRL 値の正常化が得られない症例や、嘔吐や起立性低血圧などの副作用により十分な投与量を維持できない症例を経験することがある。これらの症例において、エストロゲン受容体拮抗薬であるタモキシフェン [trans-1-(p- $\beta$ -dimethylaminoethoxyphenyl)-1, 2-diphenylbut-1-ene] をブロモクリプチンに併用することにより、良好な治療結果が得られたとする報告<sup>3-7)</sup>が散見されるが、症例数も少なく一般的な治療法として確立されるには至っていない。

一方、Clifton ら<sup>8)</sup>および Furth ら<sup>9)</sup>による報告以来、ラットにエストロゲンを連続投与することにより下垂体腫瘍が誘発されることが知られているが、どの時期に自律性を獲得した腺腫となり得るかは不明である<sup>10)11)</sup>。

本研究では、ラットにエストロゲンを投与することによって PRL 産生下垂体腫瘍を誘発し、ブロモクリプチン、タモキシフェンの単独ならびに併用投与を行い、その抗腫瘍効果について検討した。

平成 7 年 6 月 23 日受付、平成 7 年 9 月 28 日受理

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotrophic hormone; DA, dopamine; FSH, follicle-stimulating hormone; GH, growth hormone; LH, lutenizing hormone; PAP, peroxidase-antiperoxidase; PRL, prolactin; RIA, radioimmunoassay; TRH, thyrotropin releasing hormone; TSH, thyroid-stimulating hormone; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

## 対象および方法

### I. 対象

体重 150~200g (7~8 週齢) のウィスター (Wistar) 系の雌ラット95匹を使用した。

### II. 実験方法

#### 1. PRL 産生下垂体腫瘍の誘発

投与するエストロゲン製剤として、ジプロピオン酸エストラジオール (estradiol dipropionate, 商品名: オバホルモンデポー) (帝国臓器, 東京) を使用した。ラットに週 1 回本剤を 2.5mg 筋肉内に投与した。エストロゲンの投与回数によって、未投与の正常対象群を E 0 群 (n=9), 2 回投与したものを E 2 群 (n=9), 4 回投与したものを E 4 群 (n=9), 6 回投与したものを E 6 群 (n=8), 8 回投与したものを E 8 群 (n=8), 10 回投与したものを E 10 群 (n=9) とした。E 0 群以外は、いずれの群も最後のエストロゲン投与後 1 週間経過した時点で、以下の方法で血液ならびに下垂体標本を採取した。

#### 2. 血清 PRL 値測定法

各群の実験期間終了後、ラットをペントバルビタール 30mg/kg の腹腔内注入麻酔下に開胸し、左心室を穿刺して約 3ml 採血した。採血の時間帯は PRL の日内変動を考慮し午前 9 時から午前 12 時の間とした。採取した血液を遠心分離法で血清を分離し、ウサギの抗ラット PRL 抗体を用いて、血清 PRL 値を RIA 法にて測定した (エスアールエル, 東京)。

#### 3. 下垂体重量の測定および病理組織学的検索

光学顕微鏡 (光顕) 標本は採血後、直ちに左心室より、約 100cmH<sub>2</sub>O の圧にて生理食塩液で約 5 分間灌流し、その後 3.7% 中性緩衝ホルマリンにて 20 分間灌流固定後、脳下垂体を摘出した。摘出した下垂体の湿重量を直ちに計測し、さらに 3.7% 中性緩衝ホルマリンにて固定した。型通りパラフィンに包埋した後、薄切薄片を作製し HE 染色と免疫組織学的染色を施した。免疫組織学的染色はペルオキシダーゼ-アンチペルオキシダーゼ (peroxidase-antiperoxidase, PAP) 法にて行った。パラフィン包埋した切片をキシレン-アルコール系列で脱パラフィン後、0.3% 過酸化水素水含有メタノールを 30 分間、正常羊血清を 10 分間作用させた後、一次抗体を 30 分間作用させた。一次抗体として、ラットの PRL, 成長ホルモン (growth hormone, GH), 副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH), 甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone, TSH), 黄体化ホルモン (lutening hormone, LH), 卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) それぞれに対するウサギの抗体を使用した。次いで二次抗体として抗家兎 IgG 羊抗血清を 20 分間作用させ、更に PAP 複合体を 40 分間作用させた。一次抗体はすべて UCB-Bioproducts (Braine-l'Alleud, Belgium) より、二次抗体および PAP 複合体は DAKO (Santa Barbara, California, USA) より各々市販されているものを用いた。最後にジアミノベンチジンにて発色反応させ、ヘマトキシリンにて後染色を行った。

電子顕微鏡 (電顕) 標本は 2.5% グルタルアルデヒドにて灌流固定後、同液で前固定 2 時間、1% 四酸化オスミウムにて後固定をし、エタノール系列で脱水後エポン包埋を行った。これを超薄切し、ウラニウム・鉛二重染色を施し、日本電子 JEM100-B (東京) にて超微形態の観察を行った。

#### 4. エストロゲン投与中止後の変化

エストロゲンを 4 回投与した後 4 週間放置した群を E4N4 群 (n=9), 8 回投与した後 4 週間放置した群を E8N4 群 (n=8) とし、誘発実験と同様に血清 PRL 値, 下垂体重量の測定および病理組織学的検索を行った。

#### 5. 誘発腫瘍に対するプロモクリプチンおよびタモキシフェンの影響

エストロゲンを 8 回投与した日から、プロモクリプチンおよびタモキシフェンの投与を開始した。投与期間を 3 週間とし、この間もエストロゲンの週 1 回の投与を続け、最終的にエストロゲンの投与回数が E 10 群と同じになるようにした。

プロモクリプチン治療群 (Br 群, n=9) には、持続性 DA 作用薬であるメシル酸プロモクリプチン (bromocriptine mesilate, 商品名: パーロデル) (Sandoz, Basel, Switzerland) を投与した。メシル酸プロモクリプチンは原末を同量の酒石酸と混和し、温浴中で 70% エタノールを滴下して溶解した後、生理

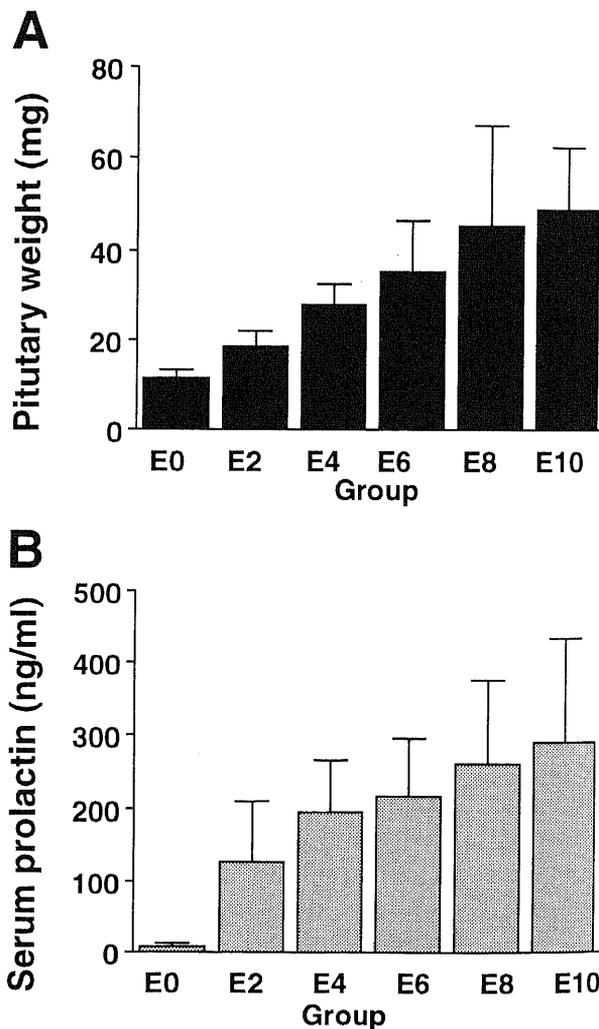


Fig. 1. Changes of weight of pituitary glands (A) and serum prolactin concentration (B) of rats after estrogen administration. Estrogen was administered intramuscularly in a dose of 2.5 mg, once a week: E0, no administration; E2, 2 times; E4, 4 times; E6, 6 times; E8, 8 times; E10, 10 times.

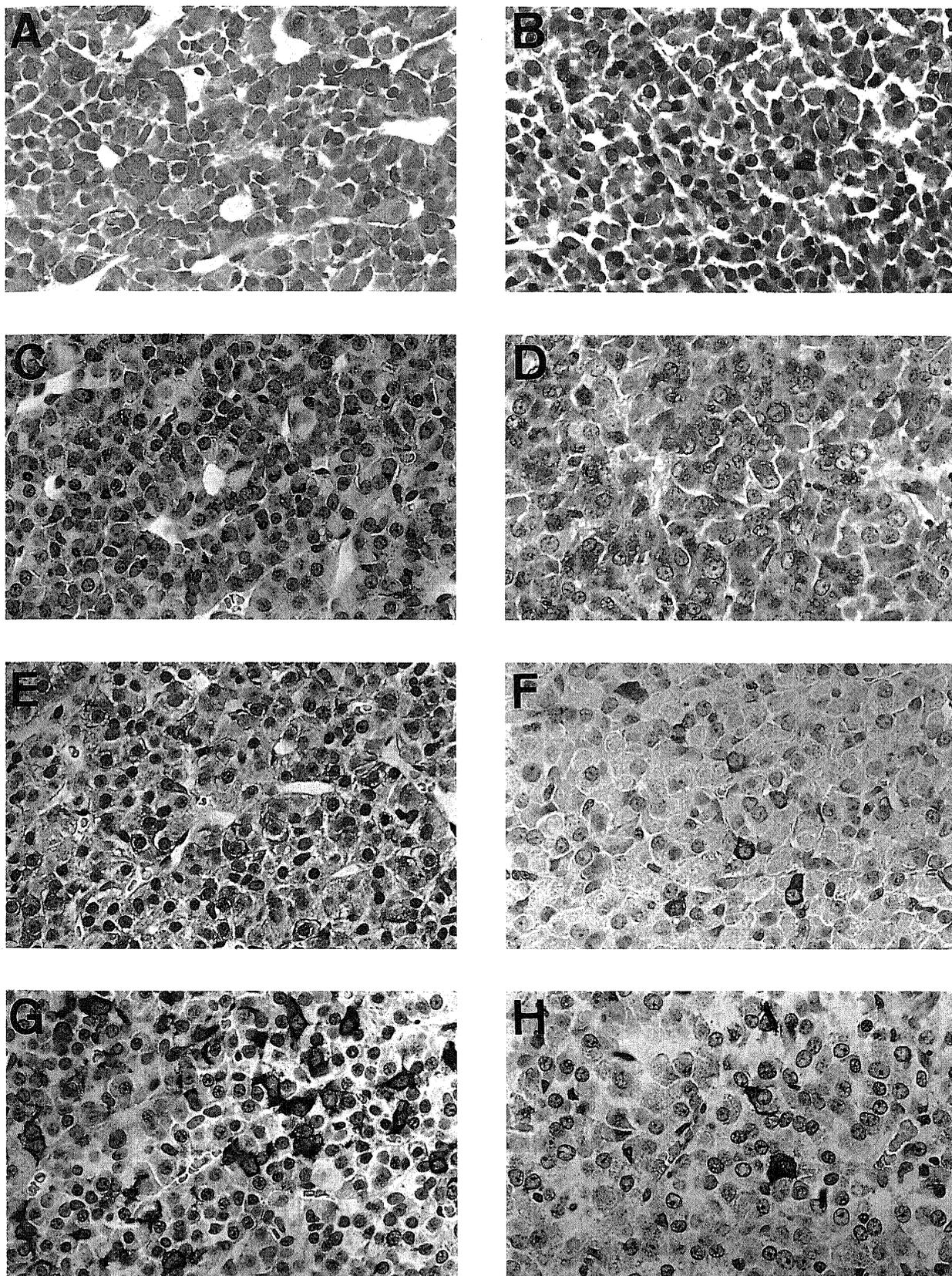


Fig. 2. Representative histologies of pituitary glands of control rats (A, C, E, G) and those of rats administered 10 times of estrogen in a dose of 2.5 mg, once a week (B, D, F, H): In the pituitary gland of the estrogen-administered rats, cellularity is increased (B) and the sinusoid-like structure found in the normal rats (A) is disappeared (B). ( $\times 360$ . Hematoxylin and eosin stain). Immunohistochemically, PRL-positive cells are remarkably increased (C, D), and both GH- (E, F) and ACTH-positive cells (G, H) are remarkably decreased in the pituitary gland of the estrogen-administered rats in contrast with normal rats. ( $\times 360$ ).

食塩液にて 2.5mg/ml に調整した。1 回投与量を 0.5mg とし、筋肉内に隔日投与した。

タモキシフェン治療群 (T 群, n=8) には、エストロゲン受容体拮抗薬であるクエン酸タモキシフェン (tamoxifen citrate, 商品名: ノルバデックス) (I.C.I., Macclesfield, Cheshire, England) を投与した。クエン酸タモキシフェンは、原末をゴマ油に溶解し、2.5mg/ml の濃度に調整した。1 回投与量を 0.5mg とし、筋肉内に隔日投与した。

上記 2 剤の併用治療群 (BrT 群, n=6) には、メシル酸プロモクリプチン 0.5mg, クエン酸タモキシフェン 0.5mg を筋肉内に隔日投与した。

各群の治療実験終了後、誘発実験と同様にして血清 PRL 値、下垂体重量の測定および病理組織学滴検索を行った。

#### 6. 統計学的検査法

下垂体重量および血清 PRL 値は全て平均値±標準偏差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) で示した。各群間の差の検定には Mann-Whitney の U 検定を用い、危険率 5% 以下をもって有意とした。

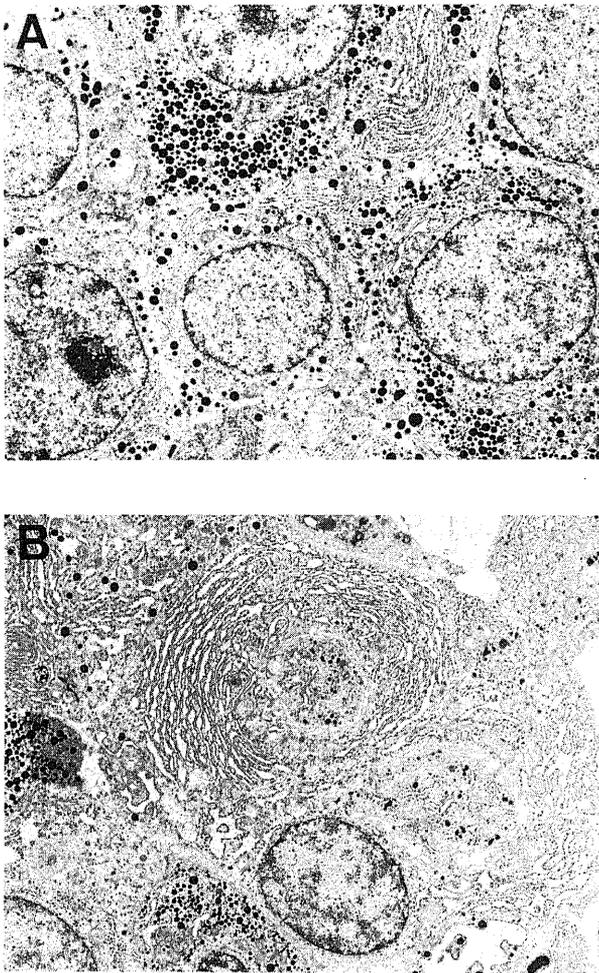


Fig. 3. Electron micrographs of PRL cells of normal rat (A) and those of rat administered 10 times of estrogen in a dose of 2.5 mg, once a week (B). By estrogen administration, the size and number of the secretory granules are markedly reduced in spite of well developed rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. ( $\times 3500$ ).

## 成 績

### 1. エストロゲン投与後の下垂体の変化および血清 PRL 値の変動

エストロゲンの連続投与によって、ラット下垂体前葉はエストロゲンの投与回数が増加するにしたがって肉眼的に腫大したが、後葉部分の大きさは変化しなかった。下垂体重量はエストロゲンの投与回数を増すにつれて増加した (図 1A)。血清 PRL 値は E 0 群から E 2 群にかけては急激に増加したが、その後は緩やかな増加傾向を示した (図 1B)。

HE 染色では、正常対象群である E 0 群の下垂体は多数の嫌色素性細胞と血管周囲に分布する好酸性細胞よりなり、更に腺組織に特徴的な類洞様構造が認められた (図 2A)。これに対し

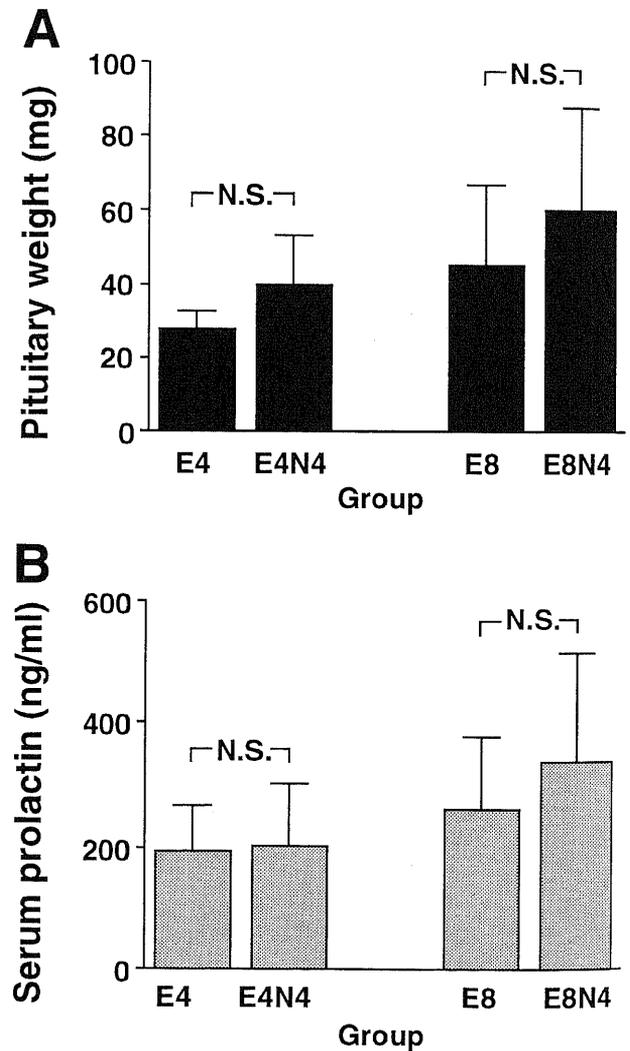


Fig. 4. Changes of weight of pituitary glands (A) and serum prolactin concentration (B) of rats after cessation of estrogen administration. In group E4, estrogen was administered 4 times, in group E4N4, 4 times followed by resting for 4 weeks, in group E8, 8 times, and in group E8N4, 8 times followed by resting for 4 weeks respectively. N. S., not significant.

E10群では、細胞密度が増加し、大部分が嫌色素性細胞で構成されており、類洞様構造は消失していた(図2B)。細胞密度の増加および類洞様構造の乱れはE4群ですでに認められており、その後エストロゲンの投与回数が増すにつれてその傾向が強くなった。

酵素抗体法による顕微鏡観察では、E0群においてPRL陽性細胞、GH陽性細胞、ACTH陽性細胞が種々の割合で分布していた。PRL陽性細胞においてはPRL陽性の部分が胞体の一極に偏在していた(図2C, E, G)。エストロゲンの投与回数が増加するにしたがいPRL陽性細胞が増加し、E10群ではその構成細胞のほとんどがPRL陽性となり、GH陽性細胞、ACTH陽性細胞は著明に減少した。PRL陽性細胞においてはPRLが拡大した胞体全体に陽性を示した(図2D, F, H)。一方E0群にお

いては、LH陽性細胞、FSH陽性細胞、TSH陽性細胞が認められたが、E4群ではほとんど認められなくなり、E6群で完全に消失した。

電顕的には、E0群では、分泌顆粒の大きさ、形態および電子密度が異なる複数の種類の分泌細胞が混在していた(図3A)。これに対して、E10群では200~300nmの不整形の分泌顆粒を有する細胞が多くを占め、分泌顆粒は比較的少なく、粗面小胞体およびゴルジ装置が層状あるいは渦巻状に著明に発達していた(図3B)。

## II. エストロゲン投与中止後の変化

下垂体重量は、E4群に比しE4N4群では、有意差はないものの増加傾向を示した。E8N4群でも、下垂体重量はE8群に比し有意差はないものの増加傾向を示した(図4A)。血清PRL値はE4N4群とE4群では有意差はなかった。E8N4群ではE8群に比し有意差はないものの増加傾向を示した(図4B)。

顕微鏡的にはE4群、E4N4群ともにHE染色で細胞密度の増加、類洞様構造の乱れなどE10群とほぼ同様の所見を示し、両群間に差異は認められなかった。酵素抗体法においても、両群ともにPRLの局在はE10群と同様に胞体全体にひろがっていた。電顕的には両群とも分泌顆粒の減少、細胞内小器官の発達など共通の所見が見られた。同様に、E8群とE8N4群の比較においても、顕微鏡所見、電顕所見ともに両群間の差異は認められなかった。

## III. プロモクリプチン投与による変化

下垂体重量はE10群に比して、Br群では有意に減少しており、血清PRL値もE10群に比して、Br群では有意に低下していた(図5A, B)。

顕微鏡的にはHE染色でBr群ではE10群に比若干細胞数が減少し、血管腔の拡大が認められた(図6A)。酵素抗体法では、E10群と同様にほとんどの細胞がPRL陽性となったが、胞体部分の縮小ともないPRL陽性部分の縮小が認められた(図6C)。電顕的には粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内小器官がE10群と比較して退縮しており、分泌顆粒は逆にその数を増し、個々の大きさも350~900nmと増大していた(図7A)。

## IV. タモキシフェン投与による変化

T群では、下垂体重量はE10群に比して有意に減少していたが、Br群とは有意差はなかった(図5A)。血清PRL値はE10群に比し有意に低下していたが、Br群より有意に高かった(図5B)。

顕微鏡的には、HE染色で細胞数の減少および血管腔の拡大、免疫染色でPRL陽性部分の縮小が認められ、Br群の所見と明らかな違いはなかった(図6B, D)。電顕的には、細胞内小器官の退縮、分泌顆粒の増加と増大傾向が認められ、Br群と同様の所見が認められた(図7B)。

## V. プロモクリプチンとタモキシフェンの併用投与による変化

BrT群では、下垂体重量がE10群に比し有意に低下していたが、Br群、T群とはいずれも有意差が認められなかった(図5A)。血清PRL値はE10群およびT群に比し有意に低下していたが、Br群とは有意差が認められなかった(図5B)。

顕微鏡的には、HE染色で細胞数の減少および血管腔の拡大、免疫染色でPRL陽性部分の縮小が認められ、電顕的には、細胞内小器官の退縮、分泌顆粒の増加と増大傾向が認められ、Br群と同様の所見が認められた。

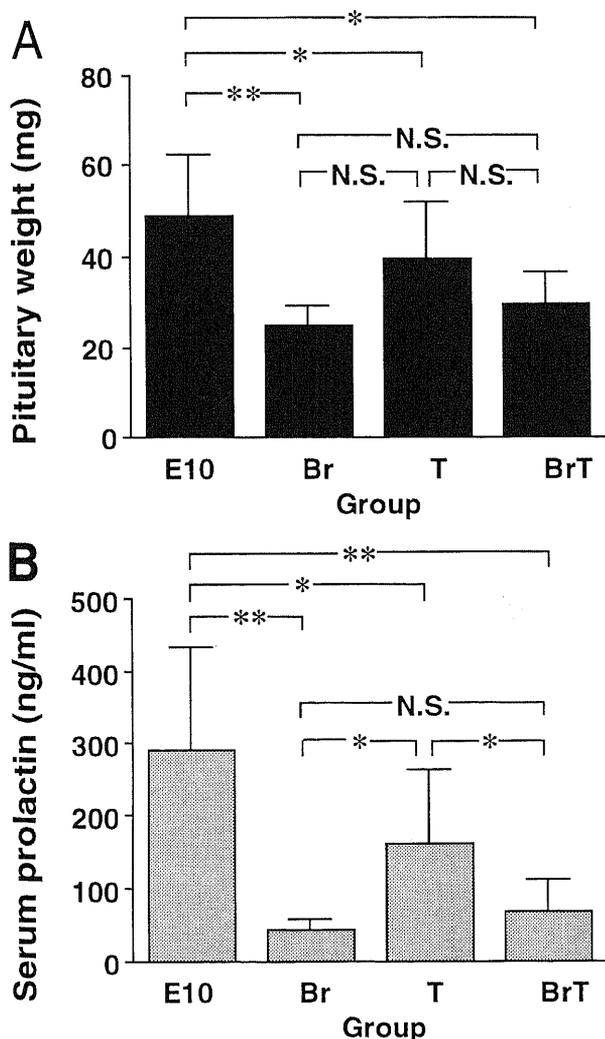


Fig. 5. Changes of weight of pituitary glands (A) and serum prolactin concentration (B) of rats after treatment by bromocriptine or tamoxifen for the last three weeks of ten weeks of estrogen administration: E10, estrogen was administered 10 times; Br, treated by bromocriptine; T, treated by tamoxifen; BrT, treated by both bromocriptine and tamoxifen. N.S., not significant. \* $<0.05$ . \*\* $<0.01$ .

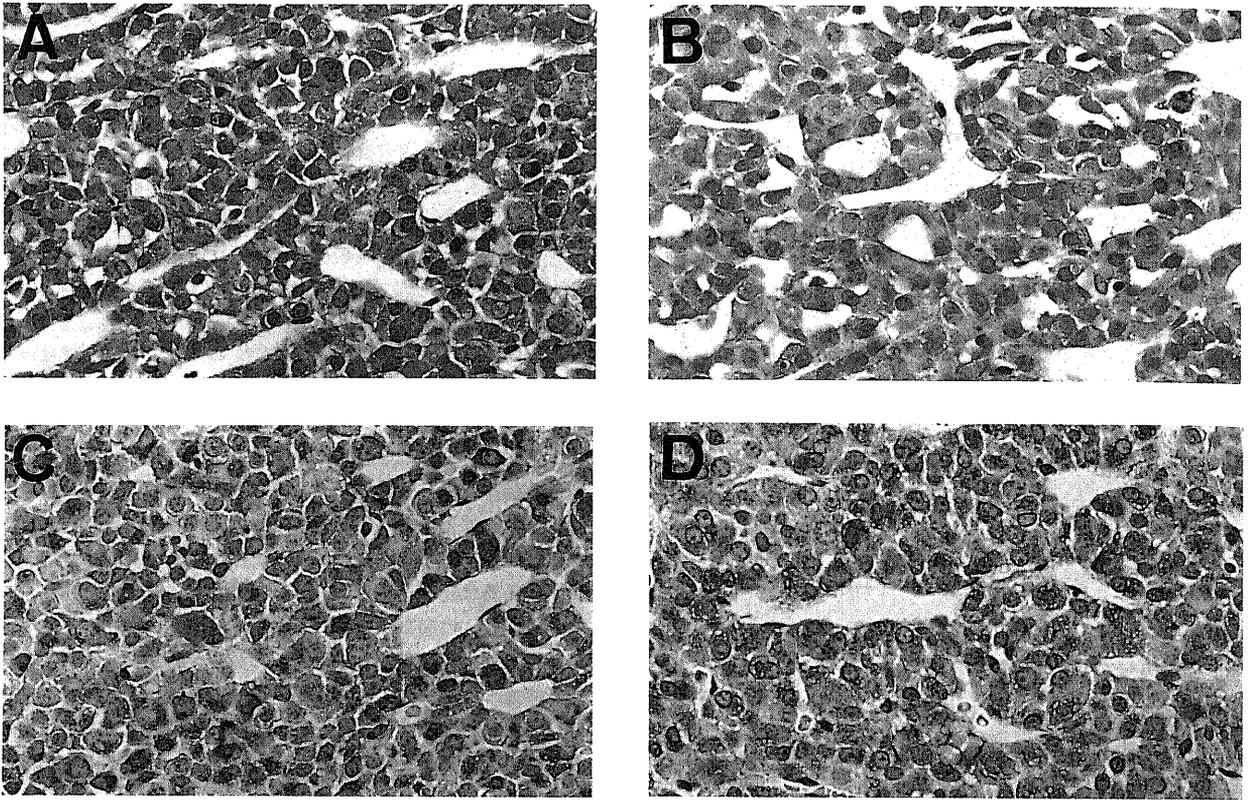


Fig. 6. Histologies of rat pituitary glands treated by bromocriptine (A, C) and by tamoxifen (B, D). Cellular size and PRL-positive areas of tumor cells are reduced by the treatment either with bromocriptine or with tamoxifen. ( $\times 360$ . A and B; stained with hematoxylin and eosin: C and D; stained with anti-PRL antibody).

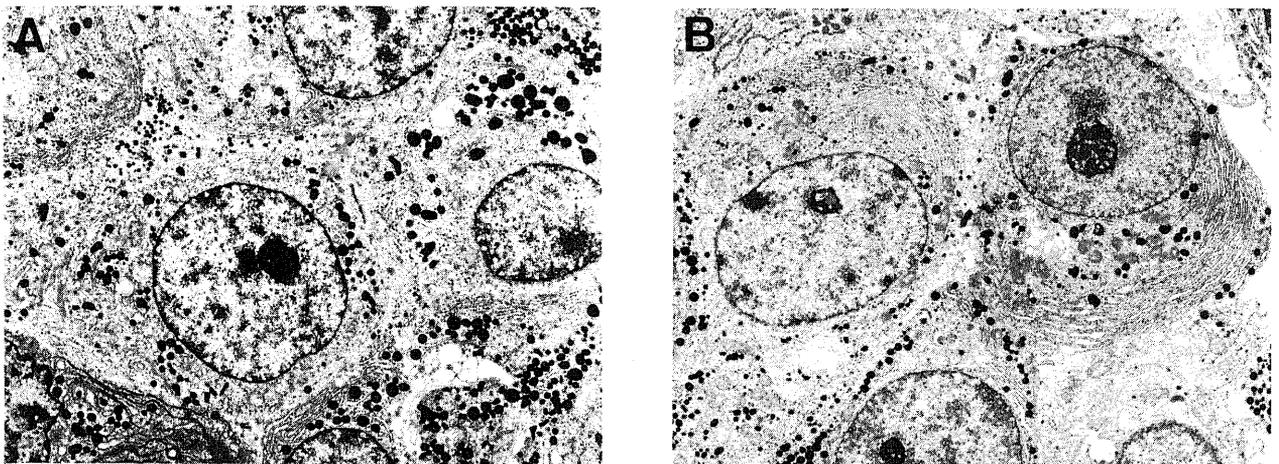


Fig. 7. Electron micrographs of rat pituitary glands treated by bromocriptine (A) and by tamoxifen (B). Both the size and the number of electron-dense secretory granules of PRL cells of the treated rats are increased, however, other organelles are reduced, in contrast with those of the estrogen-treated rats. ( $\times 3500$ ).

### 考 察

エストロゲンをラットに投与することにより、下垂体に PRL 産生腫瘍が誘発されることはよく知られている<sup>8)</sup>。エストロゲンは拡散によって標的細胞内に入り、細胞質エストロゲン受容体に結合してエストロゲン-エストロゲン受容体複合体となり、これが核内に移行しクロマチンの特定の部位と結合した

後、蛋白質合成を経てその作用を発揮する<sup>12)13)</sup>。視床下部-下垂体系に対してエストロゲンは以下のごとく作用すると考えられている。1) PRL 細胞に直接作用し、PRL 合成および分泌や細胞増殖を促進する<sup>14)</sup>。2) PRL 放出抑制因子とされる DA の取り込みを抑制する<sup>15)</sup>。3) PRL 細胞の DA に対する感受性を低下させる<sup>16)</sup>。4) PRL 放出因子である甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (thyrotropin releasing hormone, TRH) の受容体の

感受性を増強させる<sup>10</sup>。5) 視床下部正中隆起の DA を減少させることにより、下垂体 PRL 細胞への DA 伝達を障害する<sup>17</sup>。以上の機序によって、エストロゲンを連続投与したラットでは下垂体前葉が腫大し、血清 PRL 値が増加し、ついには PRL 産生下垂体腫瘍が誘発されると考えられる。しかし、エストロゲン投与開始後、どの時点で PRL 産生腫瘍が誘発されたかと判定するかについては一定の見解は得られていない。青木<sup>17</sup>はエストラジオールを隔週で1回10mg ずつ投与することにより下垂体は腫大するが、30mg 以上になった下垂体について種々の細胞よりなるものを過形成、単一の細胞よりなるものを腺腫としている。また Hori ら<sup>18</sup>はエストラジオールを1週間に1回2.5mg を7回投与した結果、下垂体重量が100mg に達し、この時点で下垂体腺腫のモデルが形成されたと考えている。一方、寺本<sup>19</sup>はエストラジオール2.5mg を週1回投与することにより、8週目には嫌色素性腺腫が誘発されたことを組織学的に確認している。本研究においては、エストロゲン未投与のE0群で平均11.3mg であった下垂体重量が、エストロゲンの投与回数が増加するにしたがって漸増し、エストロゲン2.5mg を10回投与したE10群で平均48.8mg と増加した。しかし、この10週間の観察では、下垂体重量が急速に増加したり、増加傾向が停止したりするようなことはなく、下垂体重量の変化からは腫瘍の完成時期を正確に判断することはできなかった。一方、血清 PRL 値はE0群で平均7.1ng/ml であったものが、エストロゲン2回投与のE2群で平均126.4ng/ml と急激に増加した後、増加傾向は緩徐となり、E10群で平均291.0ng/ml に達した。このことはエストロゲンを2回投与した時点で、ラット下垂体の PRL 分泌能がエストロゲン未投与群とは全く異なる性質を獲得したことを示している。しかし、組織学的には、エストロゲンを2回投与した時点では、ラット下垂体前葉における変化は軽微であり、HE 染色では個々の細胞の大きさや染色性に変化はなく、類洞様構造も保たれており、免疫染色では PRL 以外の前葉ホルモン細胞が依然多く認められた。エストロゲンの投与回数の増加にしたがい、HE 染色では下垂体前葉の個々の細胞が腫大し、本来下垂体前葉に認められる類洞様構造が消失した。免疫染色ではエストロゲンの投与回数が増加するとともに PRL 陽性細胞の占める割合が増加し、他のホルモン産生細胞の割合は減少した。エストロゲン2.5mg を6回投与した時点では、GH、ACTH 陽性細胞は著明に減少し、LH、FSH、TSH 陽性細胞は全く消失した。電顕的には、エストロゲン2.5mg を2回投与した時点で、粗面小胞体やゴルジ装置の著明な発達と細胞内分泌顆粒の減少が認められた。この変化は PRL 細胞の旺盛なホルモン分泌を反映し、血清 PRL 値の急激な上昇と相関した。エストロゲンで誘発されたラット下垂体前葉における以上の光顕的ならびに電顕的所見は、ヒトの PRL 産生腺腫の組織像と極めて類似している<sup>20,21</sup>。以上より、どの時点で組織学的に PRL 産生腫瘍が形成されるかを正確に判断することは困難であるが、本モデルではエストロゲン2.5mg を6回投与した時点でほぼ単一種類の PRL 産生細胞からなる組織が得られた。

一方、エストロゲンで誘発された PRL 産生腫瘍がエストロゲン依存性<sup>22,23</sup>であるか、非依存性<sup>24,25</sup>であるかは重要な問題である。非依存性であれば、腫瘍は自律性を獲得したことになる。本研究ではエストロゲンを4回および8回投与した後4週間は下垂体重量が低下せず、血清 PRL 値が高値を維持してお

り、組織学的にも中止後の変化が見られなかった。したがってエストロゲンにより誘発された本腫瘍モデルは腺腫としての性格を有すると考えられた。

プロモクリプチンは麦角アルカロイドの誘導体であり、DA 作動薬として Flückiger らによって開発された<sup>26</sup>。内服投与後は主として小腸で吸収され、視床下部-下垂体系の DA 受容体に作用し、PRL 分泌を選択的に抑制することが知られている。現在、種々の原因による高 PRL 血症の治療に広く用いられ、良好な成績を治めている<sup>27</sup>。PRL 産生腫瘍に対してはこれを縮小させるだけでなく、時に消失させることが報告されており<sup>28</sup>、臨床的には、手術前後の補助療法にとどまらず、単独の治療法として使用されることも少なくない。プロモクリプチンの PRL 産生腫瘍に及ぼす効果の発現機序について以下のことが考えられている。1) プロモクリプチンが PRL の放出を抑制し<sup>29</sup>、その結果細胞内に PRL が貯留することにより細胞内でネガティブフィードバックが働き、DNA の合成、ひいては PRL 細胞の分裂を抑制する<sup>29,30</sup>。2) PRL の細胞内輸送に関与するとされる細胞内微細管をプロモクリプチンが減少させることにより PRL 分泌を抑制する<sup>31</sup>。3) プロモクリプチンが分泌顆粒内の組成を変え、顆粒内の PRL 含有量を低下させることにより、PRL 分泌量を低下させる<sup>32</sup>。4) プロモクリプチンが PRL 合成に必要な DNA から mRNA への転写の過程を直接阻害し<sup>33-35</sup>、ひいては一連の PRL の合成分泌に至る過程を障害し、粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内小器官が退縮することによって、PRL 細胞の縮小をきたす<sup>36</sup>。本研究において、プロモクリプチンの治療を受けたラットは、未治療のラットに比べ、下垂体重量および血清 PRL 値とも有意に低下した。その下垂体前葉細胞は光顕上胞体の縮小傾向が認められ、電顕的には分泌顆粒の増加と拡大融合傾向および粗面小胞体、ゴルジ装置の退縮が認められた。分泌顆粒の増加と拡大融合傾向は、プロモクリプチンによって PRL の放出障害が起こっていることを示していると考えられる。一方光顕上の胞体の縮小と電顕上の細胞内小器官の退縮は、PRL の放出障害によって二次的に PRL の合成が障害されたことを示していると考えられるが、今回の結果だけでは、プロモクリプチンが直接 PRL の合成を障害していると言う可能性も否定はできない。

タモキシフェンは I.C.I. で開発された薬剤であり、強力な抗エストロゲン作用を示すと同時に部分的にエストロゲン様作用を示す<sup>37,38</sup>。タモキシフェンは当初排卵誘発剤として開発されたが、その後、乳癌患者に対する効果が注目されその補助療法として広く用いられている<sup>39</sup>。タモキシフェンの抗エストロゲン作用発現は、まず、エストロゲン受容体との結合の時点でエストロゲンと競合し、タモキシフェン-エストロゲン受容体複合体を形成することで始まる。次に、この複合体は核内に運ばれて長時間停滞し、エストロゲン-エストロゲン受容体複合体がクロマチンと結合するのを阻害する<sup>40</sup>。さらにタモキシフェン-エストロゲン受容体複合体が核内に長時間とどまることによって、一旦細胞質から複合体の形で核内へ移動したエストロゲン受容体が再び細胞質へ補充されるのを阻害し、その結果エストロゲン受容体を実質的に減少させる<sup>41</sup>。このようにタモキシフェンの抗エストロゲン作用は受容体を介して発現するとされている。一方、エストロゲン受容体はヒト乳癌のほか、ラット下垂体<sup>42</sup>やヒト下垂体腺腫にも存在し、ヒト下垂体腺腫では PRL 産生腺腫で最も高値で、GH 産生腺腫、非機能性腺腫の順

に少なくなる<sup>43)</sup>。タモキシフェンはラットの下垂体培養細胞の PRL 分泌を抑制し<sup>44)</sup>、移植されたエストロゲン誘発ラット下垂体腺腫においてプロモクリプチンの PRL 分泌抑制作用を増強する<sup>45)46)</sup>ことが報告されている。ヒト下垂体腺腫においてはタモキシフェンの単独投与による奏功例は報告されていないが、プロモクリプチンとの併用投与によってプロモクリプチンの PRL 分泌抑制効果および腫瘍縮小効果が増強され<sup>3)4)6)7)</sup>、副作用が軽減された<sup>5)</sup>と報告されている。プロモクリプチンとの作用機序の違いについては、菅沼ら<sup>47)</sup>が、エストロゲン誘発ラット下垂体腺腫において、DNA 合成を抑制する効果はプロモクリプチンよりタモキシフェンが有意に高く、血清 PRL 値を減少させる効果はプロモクリプチンの方が高かったと報告している。本研究においても、タモキシフェン投与によって下垂体重量は有意に減少し、かつ血清 PRL 値も有意に低下し、エストロゲン誘発ラット下垂体腺腫に対するタモキシフェンの抑制効果が示された。プロモクリプチンと比較すると、下垂体重量を減少させる効果は両者の間で有意差は認められず、血清 PRL 値を低下させる効果はプロモクリプチンが有意に高かった。すなわちプロモクリプチンが PRL 分泌抑制により強く作用するのに対し、タモキシフェンは細胞増殖抑制により強く作用することを示している。したがってプロモクリプチンが主に PRL 放出障害を介して間接的に DNA の合成を抑制するのに対し、タモキシフェンは抗エストロゲンにより直接 DNA の合成を抑制していると考えられた。

一方、ラット PRL 産生腫瘍のタモキシフェンによる組織学的変化については僅かに大塚<sup>48)</sup>の報告があるのみである。彼はこの研究の中で、ラットにエストロゲンを投与して PRL 産生腫瘍を誘発し、タモキシフェンを投与した結果、電顕的には下垂体における変化は認められなかったと述べている。本研究では、タモキシフェンを投与したラット下垂体において、電顕的に分泌顆粒の増加や分泌顆粒の融合傾向および細胞内小器官の退縮が見られ、プロモクリプチンを投与したときのラット下垂体の所見と類似していた。粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内小器官の退縮は、タモキシフェンの DNA 合成抑制に基づく変化として解釈できるが、細胞内分泌顆粒の増加と増大傾向については、DNA 合成抑制という機序では説明できない。すなわちタモキシフェンにもプロモクリプチンと同様に PRL 放出抑制効果の存在することを示唆している。以上より、タモキシフェンは抗エストロゲン作用により DNA 合成を障害する作用と、抗エストロゲン作用とは別に PRL の放出を抑制する作用を有すると考えられた。

プロモクリプチンとタモキシフェンを併用投与した場合の効果については、de Quijada ら<sup>45)46)</sup>は、移植されたエストロゲン誘発ラット下垂体腺腫において、タモキシフェンがプロモクリプチンの PRL 分泌抑制作用を増強したと報告している。本研究においてタモキシフェンとプロモクリプチンを併用投与したラットにおいては、下垂体重量、血清 PRL 値および組織学的所見にはプロモクリプチン単独投与との差は認められず、タモキシフェンがプロモクリプチンの PRL 分泌抑制効果や腫瘍縮小効果には影響しない結果となった。de Quijada らがエストロゲン誘発ラット下垂体腺腫を培養して、さらにこれを他のラットに移植した上で実験をしているのに対し、今回の実験ではラットに大量のエストロゲンを連続投与した状態で実験しているため、生理的狀態に比べラットのエストロゲン血中濃度は著

明に上昇していたと考えられる。タモキシフェンとエストロゲンの拮抗作用は互いの血中濃度で規定されるものと予想されるから、本実験モデルではタモキシフェンの血中濃度が相対的に低くなり、タモキシフェンの抗エストロゲン作用およびプロモクリプチンの効果を増強する作用が十分に発揮されなかった可能性がある。タモキシフェンとエストロゲン受容体との結合能はエストロゲンとエストロゲン受容体の結合能の 0.2~10%と低い<sup>49)49)</sup>、タモキシフェンの血中濃度がエストロゲンに比べて十分に高ければエストロゲンとエストロゲン受容体との結合を阻害できるはずである。臨床的に通常の投与量(1日 20mg)でのタモキシフェンの血中濃度は、閉経前女性の血中エストロゲン濃度の 1000 倍ほど高いとされる<sup>50)</sup>。したがって臨床で実際にタモキシフェンが投与された場合、エストロゲンに対する競合的阻害が十分に起こっているものと考えられ、本研究で得られた結果以上にタモキシフェンの PRL 産生腫瘍に対する抗腫瘍効果が得られる可能性は否定できない。

## 結 論

ラットにエストロゲンを投与することにより、PRL 産生下垂体腫瘍を作製し、プロモクリプチンおよびタモキシフェンの抗腫瘍効果について検討した。

1. エストロゲン 2.5mg を週 1 回投与することにより、ラットの下垂体重量および血清 PRL 値は増加した。計 6 回投与した時点で下垂体前葉細胞のほとんどが PRL 産生細胞となり、ラット PRL 産生下垂体腫瘍のモデルが誘発されたものと推定された。

2. プロモクリプチンは下垂体重量、PRL 濃度ともに著明に低下せしめた。電顕的には細胞内分泌顆粒が著明に増加しており、プロモクリプチンが PRL の放出を抑制した結果分泌顆粒が細胞内に貯留したと考えられた。細胞内小器官の退縮はその二次的結果と考えられた。

3. タモキシフェンは下垂体重量、PRL 濃度ともに低下せしめたが、プロモクリプチンに比して PRL 濃度を低下させる効果よりも、下垂体重量を低下させる効果の方が強かった。電顕的には細胞内分泌顆粒の増加が認められ、タモキシフェンにも PRL 放出抑制作用があることが示唆された。

4. 本実験モデルでは、プロモクリプチンとタモキシフェンの併用投与と、プロモクリプチン単独投与との間には有意差は認められなかった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深謝致します。また、直接の御指導をいただきました石川県立中央病院黒田英一脳神経外科医長に厚く感謝の意を表します。さらに、多大なる御協力を頂きました立花 修助手をはじめとします金沢大学医学部脳神経外科学教室の諸先生ならびに今村明子文部技官に感謝致します。

## 文 献

- 1) Del Pozo, E. & Flückiger, E.: Pharmacological aspects of the prolactin inhibitor bromocriptine. In G. Tolis (ed.), *Clinical Neuroendocrinology: A Pathophysiological Approach*, 1st ed., p429-435, Raven Press, New York, 1979.
- 2) Imura, H., Kato, Y., Oseko, F., Motohashi, T., Kurachi, K., Aono, T., Kageyama, N. & Kuwayama,

- A.: Pharmacological treatment of hyperprolactinemia. In J. A. Linfoot (ed.), Recent Advance in the Diagnosis and Treatment of Pituitary Tumors. 1st ed., p355-363, Raven Press, New York, 1979.
- 3) Lamberts, S. W. J., de Quijada, M. & Klijn, J. G. M.: The effect of tamoxifen on GH and PRL secretion by human pituitary tumors. J. Endocrinol. Invest., 4, 343-347 (1980).
- 4) Lamberts, S. W. J., Verleun, T. & Oosteron, R.: Effect of tamoxifen administration on prolactin release by invasive prolactin-secreting pituitary adenomas. Neuroendocrinology, 34, 339-342 (1982).
- 5) Volker, W., Gehring, W. G., Berning, R., Schmidt, R. C., Schneider, J. & von zur Mühlen, A.: Impaired pituitary response to bromocriptine suppression: reversal after bromocriptine plus tamoxifen. Acta Endocrinologica, 101, 491-500 (1982).
- 6) Koizumi, K. & Aono, T.: Pregnancy after combined treatment with bromocriptine and tamoxifen in two patients with pituitary prolactinomas. Fertil. Steril., 46, 312-314 (1986).
- 7) 山下正文, 平川俊彦, 田代賀比古, 松田年浩, 岐部道広, 福島武雄, 朝長正道: 脳下垂体腺腫の Bromocriptine 療法に対する Tamoxifen の影響. 脳外, 15, 65-72 (1987).
- 8) Clifton, K. H. & Merer, R. K.: Mechanism of anterior pituitary tumor induction by estrogen. Anat. Rec., 125, 65-81 (1956).
- 9) Furth, J., Clifton, K. H., Gadsden, E. L. & Buffett, R. F.: Dependent and autonomous mammatrophic pituitary tumors in rats; their somatotrophic features. Cancer Res., 16, 608-616 (1956).
- 10) Kovacs, K., Ilse, G., Ryan, N., McComb, D. J., Horvath, E., Chen, H. J. & Walfish, P. G.: Pituitary prolactin cell hyperplasia. Horm. Res., 12, 87-95 (1980).
- 11) Lee, A. K., Delellis, R. A., Blount, M., Nunnemacher, G. & Wolfe, H. J.: Pituitary proliferative lesions in aging male Long-Evans rats. A model of mixed multiple endocrine neoplasia syndrome. Lab. Invest., 47, 595-602 (1982).
- 12) Toft, D. & Gorski, J.: A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55, 1574-1581 (1966).
- 13) O'Malley, B. W. & Means, A. R.: Female steroid hormones on target cell nuclei. The effects of steroid hormones on target cell nuclei are of major importance in the induction of new cell function. Science, 183, 610-620 (1974).
- 14) Lieberman, M. E., Mauer, R. A., Claude, P. & Gorski, J.: Prolactin synthesis in primary cultures of pituitary cells: regulation by estradiol. Mol. Cell Endocrinol., 25, 277-294 (1982).
- 15) Gudelsky, G. A., Nansel, D. D. & Porter, J. C.: Role of estrogen in the dopaminergic control of prolactin secretion. Endocrinology, 108, 440-444 (1981).
- 16) Raymond, V., Beaulieu, M., Labrie, F. & Boissier, J.: Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. Science, 200, 1173-1175 (1978).
- 17) 青木道男: 実験的 E<sub>2</sub> 誘発下垂体腺腫における dopamine neuron の組織化学的研究. 日外宝, 52, 655-669 (1983).
- 18) Hori, T., Numata, H., Hokama, Y., Muraoka, K., Saito, Y. & Kawamoto, K.: Effects of bromocriptine and radiation on the size and activity of estrogen-induced rat prolactinomas. Neurol. Med. Chir., 25, 9-14 (1985).
- 19) 寺本 明, 高倉今朋, 久保俊郎, 福島孝徳, 長村義之: Bromocriptine 投与に伴う Prolactinoma の病理学的変化—臨床的および実験的検討—. Functioning Pituitary Adenoma—Bromocriptine をめぐって— (佐野圭司監修), 第2回下垂体腫瘍 Workshop 講演集, 133-146 頁, 1981.
- 20) Kovacs, K., Horvath, E., Corenblum, B., Sirek, A. M. T., Penz, G. & Ezrin, C.: Pituitary chromophobe adenomas consisting of prolactin cells. A histologic, immunocytological and electron microscopic study. Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol., 366, 113-123 (1975).
- 21) Robert, F. & Hardy, J.: Prolactin-secreting adenomas. A light and electron microscopical study. Arch Pathol., 99, 625-633 (1975).
- 22) Watari, N. & Tsukagoshi, N.: Electron microscopic observation on the estrogen induced pituitary tumor. Gunma Symposium on Endocrinology: Proceedings, p297-312, 1968.
- 23) Treip, C. S.: The regression of oestradiol-induced pituitary tumours in the rat. J. Pathol., 141, 29-40 (1983).
- 24) Waelbroeck, C. & Potlviège, P.: Tumeurs hypophysaires induites par les oestrogènes chez le rat. I. Activité fonctionnelle, histologie et ultrastructure. Europ. J. Cancer, 5, 99-117 (1969).
- 25) Waelbroeck, C.: Tumeurs hypophysaires induites par les oestrogènes chez le rat. II. Etude cytogénétique. Europ. J. Cancer, 5, 119-127 (1969).
- 26) Flückiger, E. & Wagner, H.: 2-Br- $\alpha$ -ergokryptin, Beeinflussung von Fertilität bei der Ratte. Experientia, 243, 1130-1131 (1968).
- 27) Thorner, M. O., Flückiger, E. & Calne, D. B.: Bromocriptine. A Clinical and Pharmacological Review, 1st ed., p154-175, Raven Press, New York, 1980.
- 28) Gautivik, K. M., Hoyt, R. F. & Tashjian, A. H. Jr.: Effects of colchicine and 2-Br- $\alpha$ -ergocriptine-methanesulphonate (CB-154) on the release of prolactin and growth hormone by functional pituitary tumor cells in culture. J. Cell Physiol., 82, 401-470 (1973).
- 29) Lloyd, H. M., Meares, J. D. & Jacobi, J.: Effects of oestrogen and bromocriptine on *in vivo* secretion and mitosis in prolactin cells. Nature, 255, 497-498 (1975).
- 30) Davies, C., Jacobi, J., Lloyd, H. M. & Meares, J. D.: DNA synthesis and the secretion of prolactin and growth hormone by the pituitary gland of the male rat: effects of diethylstilbestrol and 2-bromo- $\alpha$ -ergocriptine methanesulphonate. J. Endocrinol., 61, 411-417 (1974).

- 31) 丹羽 潤, 水無瀬昂: エストロジェンで誘導したラットプロラクチン産生下垂体腺腫に対するプロモクリプチンの影響. 第1報 免疫組織化学・電子顕微鏡並びに定量的形態計測による解析. 札幌医誌, 54, 107-122 (1985).
- 32) 斎藤洋一, 小泉 清, 有田憲生, 早川 徹, 青野敏博, 松本圭史, 最上平太郎, 森 浩司: エストロジェン誘発ラット・プロラクチノーマに対するプロモクリプチンの抗腫瘍作用—電顕形態計測によるプロラクチン分泌動態の解析—. 脳神経, 39, 347-354 (1987).
- 33) 寺本 明, 高倉今朋, 福島孝徳, 長村義之: Bromocriptine 投与に伴う Prolactinoma の病理学的変化. 脳外, 10, 619-627 (1982).
- 34) Maurer, R. A.: Dopaminergic inhibition of prolactin synthesis and prolactin messenger RNA accumulation in cultured pituitary cells. J. Biol. Chem., 255, 8092-8097 (1980).
- 35) Maurer, R. A.: Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. Nature, 294, 94-97 (1981).
- 36) Hassoun, J., Jaquet, P., Devictor, B., Andonian, C., Grisoli, F., Gunz, G. & Toga, M.: Bromocriptine effects on cultured human prolactin-producing pituitary adenomas. In vitro ultrastructural, morphometric and immunoelectron microscopic studies. J. Clin. Endocrinol. Metab., 61, 686-692 (1985).
- 37) Harper, M. J. K. & Walpole, A. L.: Contrasting endocrine activities of *cis* and *trans* isomers in series of substituted triphenylethylene. Nature, 212, 87 (1966).
- 38) Harper, M. J. K. & Walpole, A. L.: A new derivative of triphenylethylene: Effect on implantation and mode of action in rats. J. Reprod. Fert., 13, 101-119 (1966).
- 39) Patterson, J., Furr, B., Wakeling, A. & Battersby, L.: The biology and physiology on 'Nolvadex' (tamoxifen) in the treatment of breast cancer. Breast Cancer Res. Treat., 2, 363-374 (1982).
- 40) Jordan, V. C.: Antiestrogenic and antitumor properties of tamoxifen in laboratory animals. Cancer Treat. Rep., 60, 1409-1419 (1976).
- 41) Horwitz, K. B. & McGuire, W. L.: Nuclear mechanisms of estrogen action. Effects of estradiol and antiestrogens on estrogen receptors and nuclear receptor processing. J. Biol. Chem., 253, 8185-8191 (1978).
- 42) Bowman, S. P., Leake, A. & Morris, I. D.: Hypothalamic, pituitary and uterine cytoplasmic and nuclear oestrogen receptors and their relationship to the serum concentration of tamoxifen and its metabolite, 4-hydroxy-tamoxifen, in the ovariectomized rat. J. Endocrinol., 94, 167-175 (1982).
- 43) Pichon, M. F., Bression, D., Peillon, F. & Milgrom, E.: Estrogen receptors in human pituitary adenomas. J. Clin. Endocrinol. Metab., 51, 897-902 (1980).
- 44) Nagy, I., Valdenegro, C. A. & MacLeod, R. M.: Effect of antiestrogens on pituitary prolactin production in normal and pituitary tumor-bearing rats. Neuroendocrinology, 30, 389-395 (1980).
- 45) de Quijada, M., Timmermans, H. A. T. & Lamberts, S. W. J.: Tamoxifen suppresses both the growth of prolactin-secreting pituitary tumours and normal prolactin synthesis in the rat. J. Endocrinol., 86, 109-116 (1980).
- 46) de Quijada, M., Timmermans, H. A. T., Lamberts, S. W. J. & MacLeod, R. M.: Tamoxifen enhances the sensitivities of dispersed prolactin-secreting pituitary tumor cells to dopamine and bromocriptine. Endocrinology, 106, 702-706 (1980).
- 47) 菅沼信彦, 妹尾久雄, 末田香里, 松井信夫: Estrogen 誘発ラット下垂体過形成, 高プロラクチン血症に対する Tamoxifen, Bromocriptine の作用. 環研年報, XXXV, 146-149 (1984).
- 48) 大塚良一: Estrogen 誘発ラット Prolactinoma の基礎的検討と各種薬剤に対する反応性に関する研究. 川崎医誌, 13, 1-13 (1987).
- 49) Tanaka, M., Abe, K. & Onami, T.: Tamoxifen in advanced breast cancer; response rate, effect on pituitary hormone reserve and binding affinity to estrogen receptor. Jap. J. Clin. Oncol., 8, 141-148 (1978).
- 50) 和田富雄, 小山博記, 日下部博: Tamoxifen の血中動態—ヒトにおける Tamoxifen ならびに主代謝物質の血中濃度とその推移—. 薬理と治療, 8, 415-422 (1980).

**Inhibitory Effect of Bromocriptine and Tamoxifen on Proliferation and Secretion of Estrogen-induced Prolactin Producing Pituitary Tumors in Rats** Yoshitaka Hamada, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 104, 611—621 (1995)

**Key words** estrogen, prolactin, pituitary adenoma, bromocriptine, tamoxifen

#### Abstract

The present study was performed to assess/understand the inhibitory effect of bromocriptine and tamoxifen on the proliferation and secretion of a prolactin (PRL)-producing pituitary tumor induced in rats by estrogen administration. In order to make an experimental model of PRL-producing tumor, estrogen was administered to 7 to 8 week-old Wistar female rats in a dose of 2.5 mg intramuscularly, once a week. At 2-week intervals, the weight of the pituitary gland and the serum level of PRL were measured, and the pituitaries were examined histologically, electromicroscopically, and immunohistochemically using antibodies against PRL, growth hormone and adrenocorticotrophic hormone. After the 6th administration of estrogen, all pituitary cells homogeneously changed to PRL cells histologically mimicking human PRL pituitary adenoma. Thus it was thought that PRL producing adenoma had been induced. Either bromocriptine or tamoxifen was administered to these estrogen-treated rats every two days in a dose of 0.5 mg intramuscularly. As a result, bromocriptine was found to be effective in reducing both the size of the pituitary and the serum level of PRL. Electron microscopy revealed that intracellular secretory granules were increased and intracellular organellae were reduced by bromocriptine. It was suggested that bromocriptine inhibited PRL releasing and secondarily reduced intracellular organellae. Tamoxifen showed a similar effect on the size of the pituitary as bromocriptine, although its effect on the serum level of PRL was smaller than bromocriptine, suggesting that tamoxifen better inhibited the cell growth of the tumor. There was no synergistic effect by combining bromocriptine and tamoxifen in this experimental model system. In summary, experimental rat PRL producing tumors were successfully induced by the administration of estrogen. Both bromocriptine and tamoxifen were effective in reducing the tumor size and serum PRL level. It is expected that this experimental model will be useful for further investigation of the pathophysiology of PRL producing adenomas.