

副腎性アンドロゲン投与の高プロラクチン血症雌ラット乳腺腫瘍に及ぼす影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: female rat, dehydroepiandrosterone, breast cancer, hyperprolactinemia, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene 作成者: 川北, 寛志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8518

副腎性アンドロゲン投与の高プロラクチン血症 雌ラット乳腺腫瘍に及ぼす影響

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

川 北 寛 志

高プロラクチン (prolactin, PRL) 血症状態における7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン (7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA) 誘発乳腺腫瘍の発生と発育およびその組織型に及ぼすデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) の影響を検討した。ウィスター系雌ラットにピモジド (pimozide, PMZ) 溶液を55日齢以降連日自由経口摂取させて、高 PRL 血症状態とした。このラットの右第4乳腺組織内に2mgのDMBAを65日齢に局所投与した。66日齢以降5mgのデヒドロエピアンドロステロン・アセテート (DHA acetate, DHA-Ac) を週3回の割合で皮下投与して、乳腺腫瘍の発生とその発育速度を観察し、乳腺腫瘍径 (長径と短径の平均値) が50mmに達した時、または30mm以上でかつ潰瘍を伴う時に屠殺し組織学的観察および血中ホルモン値の測定を行なった。対照群およびDHA-Ac群で、DMBA投与後腫瘍径が5mmに達するのに要した日数すなわち腫瘍発生日は、それぞれ31.1±4.3日 (平均値±標準誤差), 39.8±6.4日と、DHA-Ac群では対照群に比し有意に遅延した。腫瘍径が10mmに増大した後その発育は緩徐になったが、その腫瘍発育停滞期間は、それぞれ71.2±19.5日, 73.6±23.5日、その後再び急速に増大しはじめた腫瘍増大開始日は、それぞれ102.3±19.5日, 114.2±21.2日と両群間に差はみられなかった。DMBA誘発乳腺腫瘍の組織構成比率をみると、腺癌は対照群とDHA-Ac群でそれぞれ52.0%, 4.3%, 肉腫は15.8%, 48.8%であり、DHA-Ac投与により有意の腺癌構成比率の減少と肉腫構成比率の増加がみられた。腺癌発生ラットの割合は、対照群とDHA-Ac群でそれぞれ100% (10匹中10匹, 10/10), 40% (4/10), 肉腫発生ラットの割合は、それぞれ80% (8/10), 100% (10/10)であり、DHA-Ac投与により腺癌発生ラットの割合に有意の低下がみられた。肉腫の組織構成比率と腫瘍の発育との相関を探索したところ、DHA-Ac群においては、腫瘍内に占める肉腫組織の構成比率が大きいものほど、腫瘍の発生日が遅い傾向にあった ($r=0.83$, $p<0.01$)。1日あたりの体重増加量は、DHA-Ac群では対照群に比し有意に低下していたが、腫瘍の組織構成比率との関連性はみられなかった。血中エストラジオール (estradiol-17 β , E₂) とテストステロン (testosterone, T) 濃度はともに対照群に比しDHA-Ac群で有意の上昇が認められた。また、血中 T/E₂比は、DHA-Ac群で対照群に比しやや高い傾向がみられたが、有意の上昇ではなかった。以上、今回の高PRL血症下のDMBA誘発乳腺腫瘍に関する実験で、DHA-Ac投与によって腺癌発生ラット割合の低下と腫瘍組織における腺癌構成比率の低下が認められたことから、DHA-Acは腺癌発生に対し抑制的に作用することが明らかとなった。

Key words female rat, dehydroepiandrosterone, breast cancer, hyperprolactinemia, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene

近年わが国の女性においては脂肪摂取量の過多、晩婚傾向、出産年齢の高齢化などにより、性器悪性腫瘍の構成比にも変化が生じてきている。子宮内膜癌は元来わが国ではきわめて少なく欧米の10分の1程度であったが、近年は欧米と同程度になってきており、また乳癌も同様に増加してきている。

子宮内膜と乳腺はともに性ホルモン依存性 (sex hormone dependent) の組織であり、思春期および更年期にみられる組織的变化も極めて類似している。いずれの組織もエストロゲン (estrogens, E) の増量とともに増殖・肥大し、Eの減少に従って萎縮する。また、子宮内膜および乳腺の腫瘍組織は一般的にEで増悪しプロゲステロゲン (progestogen) によって抑制されるため、臨床においては子宮内膜癌や乳癌の治療法の一つとしてプロゲステロゲン製剤が用いられている。

子宮頸癌や子宮内膜癌ではそれぞれに好発年齢があり、子宮頸癌は主に閉経前に、子宮内膜癌は閉経後に発生することが多いとされている¹⁾。これらの特徴はE、プロゲステロン (progesterone, P₄)、副腎性アンドロゲン (adrenal androgens) などの年齢推移による分泌動態の変化にも深く関連しているものと考えられている。副腎性アンドロゲンは両性的ホルモン (bisexual hormone) といわれ、女性ではその大部分が副腎から分泌されており、これらアンドロゲンは脂肪組織においてエストロン (estrone, E₁) に転換され²⁾、また卵巣ではテストステロン (testosterone, T) およびE₁とエストラジオール (estradiol-17 β , E₂) に転換される。閉経前後では排卵機能が低下するため卵巣由来のP₄は減少・消失し、E優位の状態いわゆる無抵抗E (unopposed E) の状態となり子宮内膜は過形成になる。これ

平成5年12月13日受付, 平成6年1月5日受理

Abbreviations: DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-Ac, dehydroepiandrosterone acetate; DHA-S, dehydroepiandrosterone sulfate; DMBA, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene; E, estrogens; E₁, estrone; E₂, estradiol-17 β ; PMZ, pimozide; PRL, prolactin; P₄, progesterone; SD, Sprague-Dawley; T, testosterone

らが子宮内膜肥厚症 (hyperplasia endometrii) の原因となり、子宮内膜の異型性を示す頻度も増大する。同様の変化は乳腺にもみられ、更年期に乳房痛などの症状になって現われる。また、乳腺はプロラクチン (prolactin, PRL) とも密接な関連性を有し、乳癌の発生段階や増殖過程における PRL の関与についても報告されている³⁴⁾。

われわれの教室では、子宮内膜およびその癌と性ホルモンとの関係について種々研究してきているが、本研究ではヒト副腎性アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) の女性性器癌に及ぼす影響を検討する目的で、ホルモン感受性の高い臓器として乳腺を選び、その腫瘍について雌ラットで研究した。まず、高 PRL 血症を起こすとされるピモジド (pimozide, PMZ) を投与した雌ラットに、癌原性多環式芳香族炭化水素である 7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン (7,12-dimethylbenz(a)anthracene, DMBA) を局所投与し乳腺腫瘍を誘発させ、さらにデヒドロエピアンドロステロン・アセテート (dehydroepiandrosterone acetate, DHA-Ac) を投与して、腫瘍の発育様式、組織型および血中性ステロイドホルモン動態に及ぼす影響について検索した。

材料および方法

1. 実験動物

実験には、北陸動物実験施設 (富山) より購入し当教室で継代飼育されたウィスター (Wistar) 系ラット (日本チャールズ・リバー、厚木) を用いた。80~120日齢の発情前期の陰スミアを呈する雌ラットを、成熟雄ラットのケージに一晚同居・自然交配させ、翌朝腔内に精子の有無を確認した後それぞれのケージ [35×30×16 (cm)] に戻し、経日的に腹部増大・分娩徴候の観察を行ない、仔が出生した日をもって1日齢とした。飼育条件としては、室温を23±2℃に保ち、人工照明は午前5時より午後

7時までの14時間とし、飼料 (オリエンタル NMF ラット繁殖用, オリエンタル酵母工業, 東京) と実験開始までは水道水を自由摂取させた。本実験のために準備したすべてのラットの体重測定を毎日行ない、膣開口後はラットの膣内容塗抹標本を毎朝9時に2週間観察し、順調な体重増加と規則的な性周期を維持しているもののみを実験に供した。

II. 実験方法

1. 使用した薬剤および投与方法

実験に使用した薬剤および投与方法は以下の通りである。

DHA 製剤は、帝国臓器製薬 (東京) 製の DHA-Ac で、50mg/ml の濃度で使用した。投与方法としては、27ゲージ針付微量注射器でラットの背部皮下に投与した。投与に際しては、針を刺入部位より約1cm皮下に通した後上記製剤を注入し、その後しばらく刺入部位を圧迫し漏れのないことを確認した。

PMZ 原末は、藤沢薬品工業 (大阪) より提供されたものを使用した。PMZ 溶液は、PMZ 原末 10mg を 0.1M 酒石酸 (和光純薬工業, 大阪) 50ml, ブドウ糖 (和光) 10g とともに水道水 950ml に溶解して作成した。PMZ 溶液は自由経口摂取とし、調合は投与直前に行ない、毎日溶液を交換した。

DMBA (和光) は、ゴマ油 (半井化学薬品, 京都) に溶解して 20mg/ml の溶液として使用した。投与方法は、ラットをエーテル麻酔下で手術台に仰臥位に固定し、右第4乳腺領域の皮膚に剃毛後約1cmの小切開を加え、直視下に右第4乳腺組織内に0.1mlのDMBA油溶液 (DMBA 2mg含有) を27ゲージ針付微量注射器にて局所投与した。その後切開創を絹糸で縫合閉鎖し、DMBA投与後3日目で抜糸した。

2. 実験群の作成

実験群として20匹の55日齢雌ラットを10匹づつに分け、1) 対照群 (DMBA+PMZ投与)、2) DHA-Ac群 (DMBA+PMZ+DHA-Ac投与) の2群とした。両群へのラットの組み分けには、群間における平均体重がほぼ一定になるように留意し

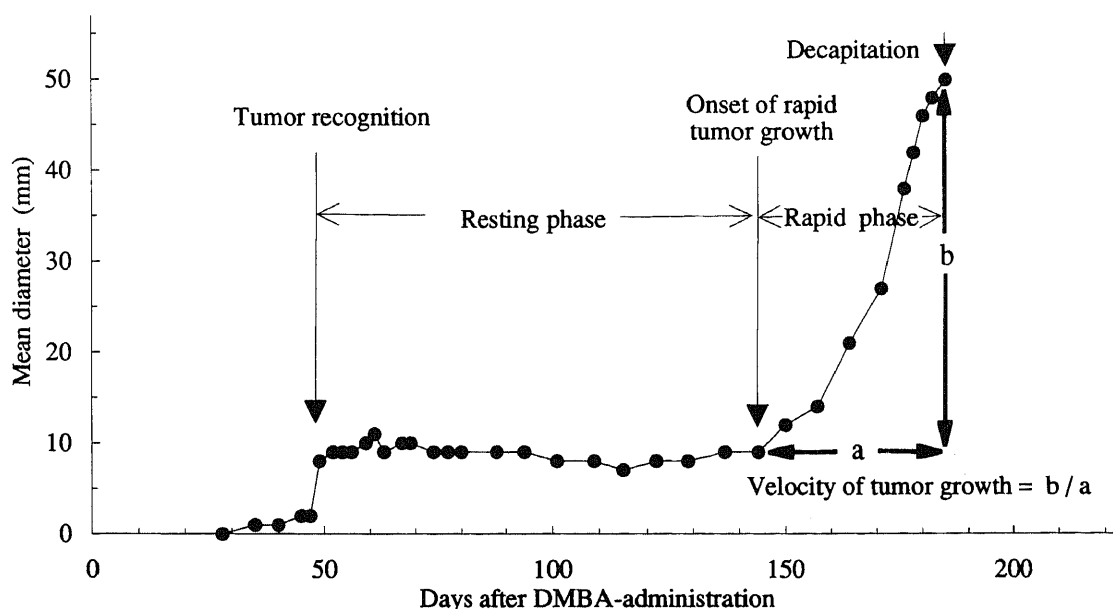


Fig. 1. Schematic representation of mammary tumor growth. Tumor recognition, the day when the palpable tumor was over 5 mm in mean diameter; the onset of rapid tumor growth, the first day when the palpable tumor grew at the rate of 5 mm in diameter per 2 weeks or more rapid; resting phase, period from tumor recognition to the onset of rapid tumor growth; rapid tumor growth phase, period between the onset of rapid tumor growth and the day of decapitation; a, duration of rapid tumor growth phase; b, the increase of tumor diameter during rapid tumor growth phase. DMBA, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene.

た。まず、55日齢より PMZ 溶液を飲用させ、65日齢に DMBA を局所投与した。DMBA 投与後より、対照群にはゴマ油 0.1ml を、DHA-Ac 群には 0.1ml の DHA-Ac 油溶液 (DHA-Ac 5mg 含有) を週 3 回の割合で投与した。

3. 腫瘍の計測と発育様式の経日的観察

DMBA 投与後、連日乳腺の観察を行なった。乳腺腫瘍の確認以後は皮膚表面から腫瘍の長径と短径とを測定し、その平均値を腫瘍径として腫瘍発育の指標とした。

腫瘍の発育に関しては、腫瘍径測定の後方視的 (retrospective) 検討から、次のように発育段階を規定してそれぞれの期間を算定した (図 1)。すなわち、DMBA 投与日より腫瘍径が 5mm を越えるまでに要した日数をもって腫瘍発生日 (tumor recognition) とした。腫瘍径が 10mm 前後で増大の一時的に停滞していた期間を発育停滞期 (resting phase)、その後腫瘍が急速に増大し始めた日を腫瘍増大開始日 (onset of rapid tumor growth)、また腫瘍増大開始日から断頭屠殺日までを腫瘍急速増大期 (rapid tumor growth phase) とし、腫瘍急速増大期における一日平均腫瘍径の増加量を腫瘍発育速度 (velocity of tumor growth) とした。なお、腫瘍増大開始日は、腫瘍径が測定毎に増加し、かつ 2 週間で 5mm 以上の増大を示した最初の測定日とした。また、腫瘍径が 50mm 以上になったとき、あるいは腫瘍径が 30mm 以上でかつ潰瘍を伴うときに断頭屠殺し、腫瘍を摘出した。

4. 組織学的観察

乳腺腫瘍を摘出した後、腫瘍塊をほぼ均等に分割し、約 100 個の数 mm 角のブロックを作成した。ついで、10% 緩衝ホルマリン (武藤科学薬品、東京) で 24 時間固定し、各ブロックより 1 枚のパラフィン切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin) 染色し、光顕的観察を行なった。それぞれの切片の組織型を腺癌、腺癌と肉腫の混合、肉腫、良性腫瘍と腫瘍様病変の 4 型に分類し、各ラットについてそれぞれの構成比率 (組織構成比率) を求めた。さらに、両実験群における組織構成比率の算定は、各ラットで求められた組織構成比率をそれぞれ平均して求めた。また、両実験群における腺癌または肉腫を有するラットの割合 (腺癌または肉腫発生ラット割合) をそれぞれ求め比較した。

5. 体重増加の比較

各ラットの体重測定は週に 3 回行ない、240 日齢まで継続した。55 日齢から 240 日齢までの 1 日当たりの平均体重増加量を求め、両群の体重増加について比較した。

6. 血中ホルモン測定法

採血は、腫瘍摘出前に断頭法により行なった。検体は、採血

後冷蔵庫内で 30 分静置した後 3000rpm で 30 分間遠心を行ない血清を分離し、血中ホルモン測定まで -80°C で保存した。なお、断頭屠殺は疼痛その他のストレスが加わらないように留意して、無麻酔下で行なった。

血中 E_2 の測定は、 E_2 キット「第一」(第一ラジオアイソトープ研究所、東京) で行ない、T の測定は、テストステロン「栄研」(栄研イムノケミカル研究所、東京) で行なった。

7. 統計学的検定

実験結果の統計学的検定は、独立 2 群の平均値の差の検定の場合は等分散検定の後、二標本 t 検定 (two sample t test) またはウェルチ法 (two sample t test with Welch's correction) により行なった。なお、測定値はすべて平均値 \pm 標準誤差で表示した。係数値の検定は Fisher の直接確率計算法を用いて行なった。相関関係の検討は、Pearson の相関係数・回帰分析を用いて行なった。いずれも 5% 未満の危険率をもって有意とした。

成 績

I. DMBA 誘発乳腺腫瘍の発育様式

対照群および DHA-Ac 群の腫瘍発生日、発育停滞期間、腫瘍増大開始日、腫瘍発育速度は、それぞれ次のごとくであった (表 1)。

1. 腫瘍発生日

腫瘍発生日は、対照群では 31.1 ± 4.3 日 ($n=10$)、DHA-Ac 群では 39.8 ± 6.4 日 ($n=10$) と、DHA-Ac 群において対照群に比し有意の延長を認めた ($p < 0.01$)。

2. 腫瘍発育停滞期間

腫瘍発育停滞期間は、対照群では 71.2 ± 19.5 日 ($n=10$)、DHA-Ac 群では 73.6 ± 23.5 日 ($n=10$) と、両群において有意差は認められなかった。

3. 腫瘍増大開始日

腫瘍増大開始日は、対照群では 102.3 ± 19.5 日 ($n=10$)、DHA-Ac 群では 114.2 ± 21.2 日 ($n=10$) と、両群において有意差は認められなかった。

4. 腫瘍発育速度

両群における腫瘍発育速度 (mm/日) は表 1 に示す通り、対照群では 0.91 ± 0.44 ($n=10$)、DHA-Ac 群では 0.95 ± 0.31 ($n=10$) と、両群間に有意差は認められなかった。

II. DMBA 誘発乳腺腫瘍の組織構成比率

DMBA 局所投与による誘発乳腺腫瘍の組織型は多彩で、腺癌、肉腫、線維腺腫、線維腫、腺症、線維症、嚢胞の組織像が、多様な組み合わせで各腫瘍内に混在してみられ、対照群および DHA-Ac 群の全例に腺癌・肉腫など悪性腫瘍の発生が認

Table 1. Effects of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) on the development and growth of DMBA induced mammary tumors

Group ^{a)}	Number of female rats examined	Day of tumor recognition	Resting phase of tumor growth (day)	Day of rapid tumor growth	Velocity of tumor growth (mm/day)
Control	10	31.1 ± 4.3	71.2 ± 19.5	102.3 ± 19.5	0.91 ± 0.44
DHA-Ac	10	$39.8 \pm 6.4^*$	73.6 ± 23.5	114.2 ± 21.2	0.95 ± 0.31

Results represent the mean \pm SEM. *, $p < 0.01$ vs. control group by Student's t test.

^{a)} Control group, administration of DMBA (2 mg) and PMZ (orally); DHA-Ac group, administration of DMBA, PMZ and DHA-Ac (5 mg).

められた。

腺癌にみられた特徴としては、肉眼的には境界が比較的明らかな小結節状を呈し弾力硬で剖面は淡赤色髄様であり、組織学的には管状腺癌(図2)、乳頭状腺癌、髄様癌、低分化型腺癌な

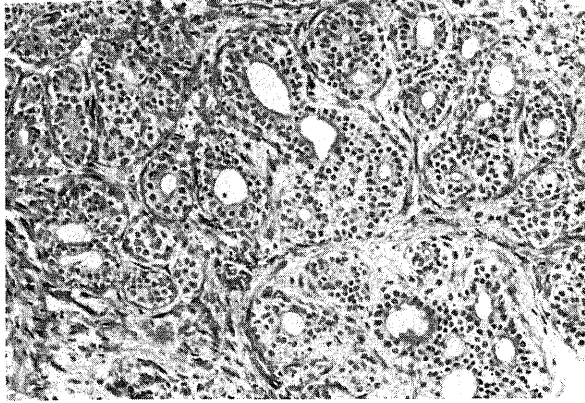


Fig. 2. Rat mammary adenocarcinoma induced by DMBA local administration. Tumor cells showed tubular pattern. Hematoxylin and eosin stain, $\times 128$.

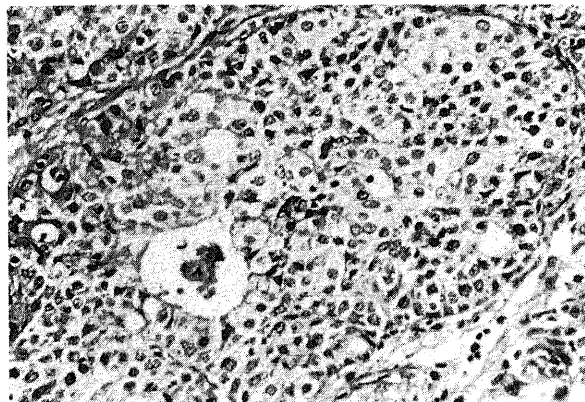


Fig. 3. Rat mammary adenocarcinoma induced by DMBA local administration. Tumor cells showed cribriform and medullary pattern. Hematoxylin and eosin stain, $\times 256$.

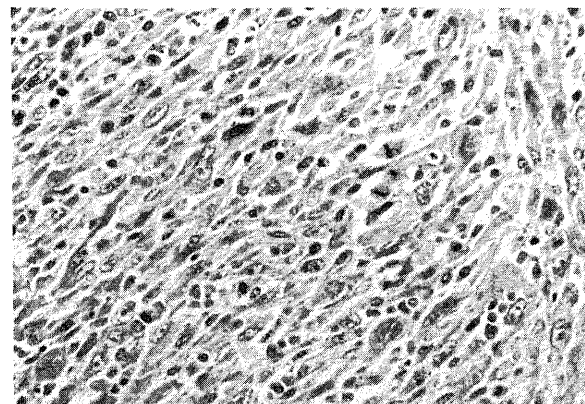


Fig. 4. Rat mammary sarcoma induced by DMBA local administration. Spindle shaped tumor cells showed storm-like pattern. Mitotic figures were also demonstrated. Hematoxylin and eosin stain, $\times 256$.

どの像を呈し、髄様癌では著明な篩状構造がみられた(図3)。稀に中心壊死を示したのもみられたが、周囲への破壊浸潤性増殖や遠隔転移はみられなかった。また、肉腫にみられた特徴

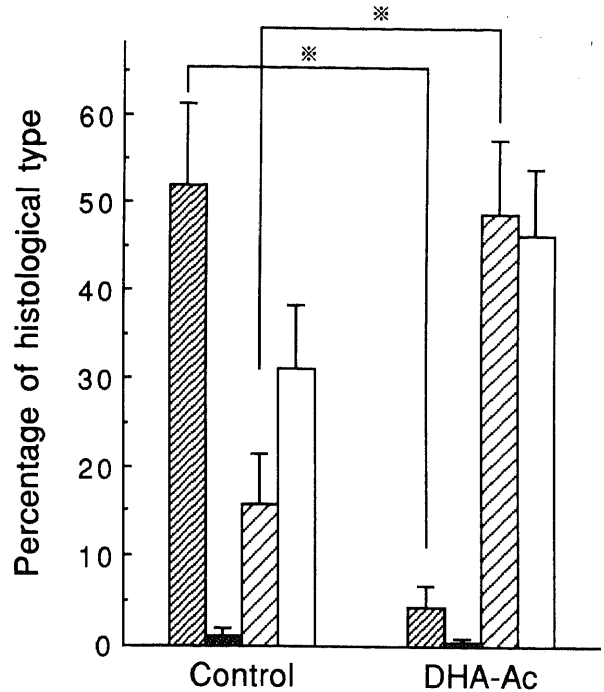


Fig. 5. Effects of DHA-Ac on the histological types of the pimozide (PMZ)-treated rat mammary tumors induced by DMBA local administration. Each column (▨, adenocarcinoma; ▩, mixed; ▧, sarcoma; □, benign and tumor like-change) represents the percentage of histological type (mean \pm SEM) in the control (n=10) and DHA-Ac group (n=10). ※, $p < 0.05$ vs the control group.

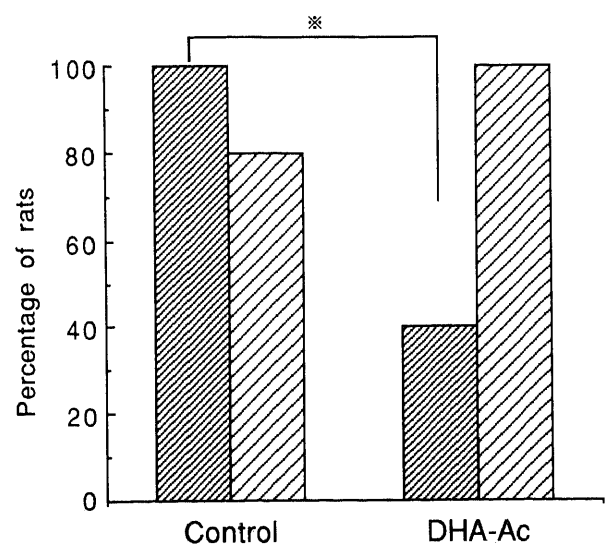


Fig. 6. Effects of DHA-Ac on the percentage of the PMZ-treated rats with adenocarcinoma and sarcoma induced by DMBA local administration. The percentage of rats with adenocarcinoma is reduced in the DHA-Ac group (n=10) compared with the control (n=10). ▨, adenocarcinoma; ▧, sarcoma. ※, $p < 0.05$ vs the control group.

としては、肉眼的に腺癌に比べやや灰白色で硬く周囲組織と癒着し、組織学的には種々の異型度を示す大小の紡錘形細胞が束状・渦状に集合配列していた(図4)。壊死傾向はみられず、周囲への浸潤性増殖を示すものの転移は認められなかった。

腫瘍組織に認められた腺癌、腺癌と肉腫の混合、肉腫、良性腫瘍と腫瘍様病変のそれぞれの構成比率(%)は、対照群(n=10)では 52.0±9.3, 1.2±0.7, 15.8±5.6, 31.0±7.2, DHA-Ac 群(n=10)では 4.3±2.5, 0.5±0.3, 48.8±8.4,

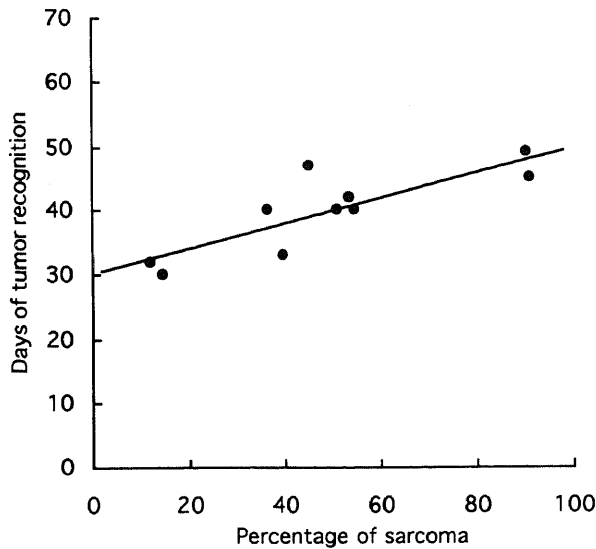


Fig. 7. Scattergram showing correlation between percentage of sarcoma and the days at tumor recognition in the DHA-Ac group. The regression line ($Y=0.2X+30.0$) was calculated for 10 rats examined ($r=0.83$, $p<0.01$).

46.4±7.6であった。DHA-Ac 群では、対照群に比し腺癌の構成比率に有意の減少が認められた ($p<0.05$) (図5)。

Ⅲ. 腺癌および肉腫発生ラットの割合

対照群(n=10)およびDHA-Ac 群(n=10)における腺癌発生

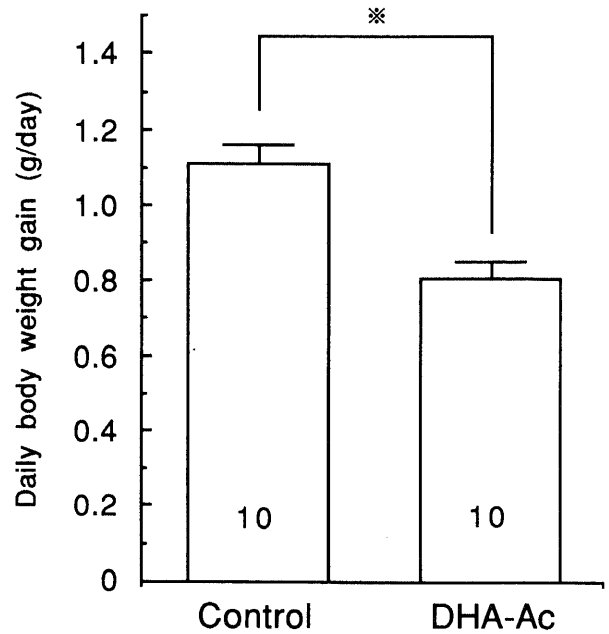


Fig. 8. Effects of DHA-Ac on the daily body weight gain of the PMZ-treated rat with mammary tumor induced by DMBA local administration. Each column represents the mean±SEM. Figures in columns indicate the number of rats examined. ※, $p<0.01$ compared by Student's t test.

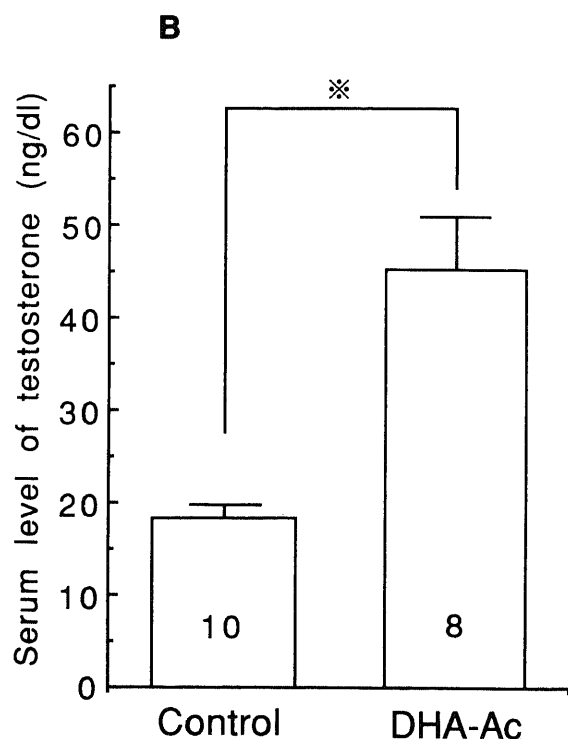
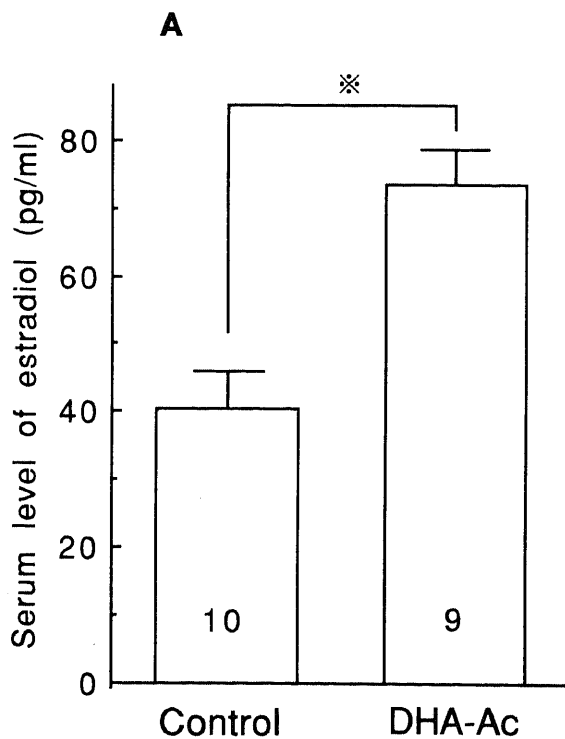


Fig. 9. Effects of DHA-Ac on serum estradiol (A) and testosterone levels (B) of the PMZ-treated rat with mammary tumor induced by DMBA local administration. Each column represents the mean±SEM. Figures in columns indicate the number of serum samples examined. ※, $p<0.01$ compared by Student's t test.

ラットの割合は、それぞれ100% (10匹中10匹, 10/10), 40% (4/10), 肉腫発生ラットの割合は、それぞれ 80% (8/10), 100% (10/10) であり, DHA-Ac 群では対照群に比し, 腺癌発生ラットの割合に有意の低下がみられた ($p < 0.05$) (図6).

IV. DMBA 誘発乳腺腫瘍の発育様式と組織構成比率

両実験群において, 乳腺腫瘍の発育様式と組織構成比率の相関を検索したところ, DHA-Ac 群で, 腫瘍内に占める肉腫組織の構成比率が大きいほど, 腫瘍発生日が遅い傾向にあった (相関係数, $r: r = +0.83, p < 0.01$) (図7). 一方, 腫瘍増大開始日, 発育停滞期間, 腫瘍発育速度には, 組織構成比率との相関は認められなかった.

V. 体重増加の推移

両群における体重増加量 (g/日) は, 図8に示す通り, 対照群では 1.11 ± 0.05 ($n=10$), DHA-Ac 群では 0.81 ± 0.04 ($n=10$) であり, DHA-Ac 群では対照群に比し有意に低値であった ($p < 0.01$). なお, 両群における体重増加量と腫瘍の組織構成比率との関連性はみられなかった.

VI. 血中ホルモン濃度

1. 血中 E_2 濃度

血中 E_2 濃度 (pg/ml) は図9に示す通り, DHA-Ac 群では 73.7 ± 4.8 ($n=9$) と, 対照群の 40.2 ± 5.7 ($n=10$) に比し有意の上昇が認められた ($p < 0.01$).

2. 血中 T 濃度

血中 T 濃度 (ng/dl) は図9に示す通り, DHA-Ac 群では 45.2 ± 5.7 ($n=8$) と, 対照群の 18.5 ± 1.2 ($n=10$) に比し有意の上昇が認められた ($p < 0.01$).

3. 血中 T/ E_2 比

血中 T/ E_2 比は図10に示す通り, DHA-Ac 群では 6.23 ± 0.60 ($n=8$) と, 対照群の 5.30 ± 0.57 ($n=10$) に比し高い傾向を示したが有意差は認められなかった.

考 察

DMBA は四環式芳香炭化水素系発癌物質の一つで, 皮膚, 乳腺, 子宮, 卵巣, 消化管, 脳, 尿路系・造血系臓器などの発癌実験に使用され, 経口または静脈内投与が一般におこなわれている. 乳癌を作製する実験系としては, DMBA をスプラッグ・ドーレイ (Sprague-Dawley, SD) 系雌ラットに投与する方法が代表的なものである. それによるものは Huggins 乳癌として知られており, 最も簡易かつ高能率的方法とされてきた⁹. しかし SD 系雌ラットでは, 加齢に伴い比較的高頻度に自然発生乳腺腫瘍がみられ, 得られた結果の解釈については注意を要する場合がある⁹. 一方, ウィスター系雌ラットでは乳腺腫瘍の自然発生は比較的少ないものの, 従来の経口・静脈内 DMBA 投与方法では発癌率が低い上に腫瘍発生までの期間も長く, また副腎皮質に出血性壊死がほとんど全例にみられ, さらに発癌率を上げるために投与量を増加すると急性中毒死が増えるという傾向がみられた⁷. 今回の実験で用いたのは, ウィスター系雌ラットの乳腺へ直視下に DMBA 油溶液を小用量 (2mg) 局所投与する方法で, 全例に腺癌や肉腫の腫瘍発生が認められ, また, 急性中毒死などはみられなかった. したがって, この方法は乳腺の発癌実験に有用であると考えられた.

DMBA によって誘発されたラット乳癌にもホルモン依存性がみられ, E, P, PRL などに対するレセプターの存在が明らかにされている⁸⁽⁹⁾. また, PRL と乳癌との関連については, PRL が DNA 合成能を亢進させ¹⁰, その分裂を促すことによって乳癌の発癌起始物質 (イニシエーター) や発癌促進物質 (プロモーター) としての作用を有するとされている¹¹. そのため, 高 PRL 血症下では実験的乳癌の発生率は上昇することが知られている¹².

ラットに高 PRL 血症状態を持続的に維持する方法として, 今回の実験では 10mg/l の濃度の PMZ 溶液を作成し, DMBA 投与10日前より自由経口摂取させる方法をとった. この方法は, 教室の村上¹³によれば, 血中 PRL 濃度を $200 \sim 300\text{ng/ml}$ と正常性周期における PRL サージの頂値よりもやや高いレベルを投与開始翌日より維持することが可能で, 高 PRL 血症誘発法として簡便で有用であるとしている.

ヒト副腎性アンドロゲンの主体を占める DHA とその硫酸抱合型であるデヒドロエピアンドロステロン・サルフェート (dehydroepiandrosterone-sulfate, DHA-S) の分泌動態については, われわれの教室でも, これまで富田¹⁴, 荒木¹⁵, Akasofu ら¹⁶⁽¹⁷⁾が詳細に検討してきた. 副腎性アンドロゲンの分泌異常は, 肥満¹⁸, 神経性食思不振症¹⁹, 高 PRL 血症²⁰, 多嚢胞性卵巣症候群²¹, 多毛症²²などによる性機能異常と密接な関連性が示唆される. また, 他にも DHA は多彩な生物学的作用を有し²³⁽²⁴⁾, 抗肥満作用²⁵⁽²⁶⁾, 乳癌における抗癌作用²⁷⁽²⁸⁾などが報告されている.

乳癌と副腎性アンドロゲンの関係については, 原発性乳癌患者の尿中 11-デオキシ-17-ケトステロイド (11-deoxy-17-ketosteroid) 値が低下しており²⁹, さらに, 臨床的に診断される以前から DHA の主な代謝産物である尿中のアンドロステロン

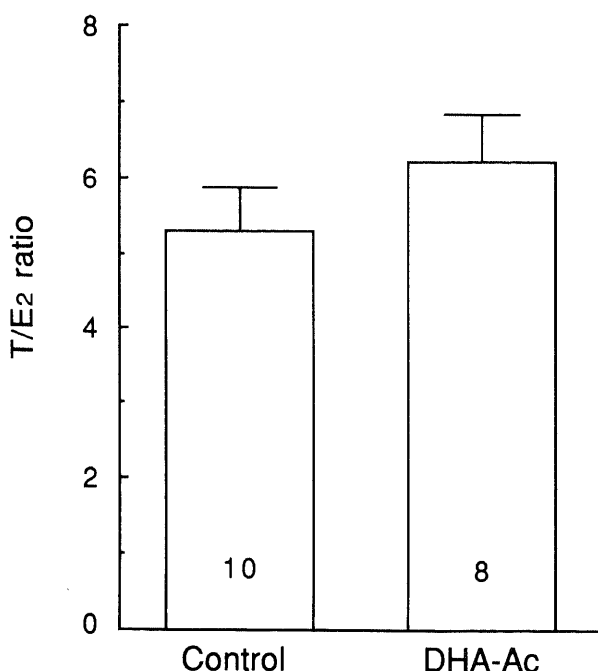


Fig. 10. Effects of DHA-Ac on the ratio of serum testosterone (T) level to serum estradiol (E_2) level of the PMZ-treated rat with mammary tumor induced by DMBA local administration. Each column represents the mean \pm SEM. Figures in columns indicate the number of serum samples examined.

(androsterone) 値とエチオコラノロン (etiocolanone) 値の低下が認められたという報告³⁰⁾や、進行乳癌患者では良性および原発性乳癌患者に比し DHA-S 値は有意に低下しているとの報告³¹⁾がみられ、両者には密接な関連性が示唆されている³²⁾。このようなことから、DHA の乳癌に対する抗癌作用が究明されてきており、DHA 長期間投与によりマウス自然発生乳癌の出現が阻止されたとの報告²⁷⁾もみられ、DHA は発癌起始 (イニシエーション) や³³⁾³⁴⁾ 発癌促進 (プロモーション) を³⁵⁾³⁶⁾ 阻害することにより抗腫瘍作用を示すものと観察されている。

今回の高 PRL 血症下における DMBA 誘発乳腺腫瘍において、対照群で100%であった腺癌発生ラットの割合が、DHA-Ac 投与によって40%に著減した。また、組織構成比率では、対照群で52.0%と優位であった腺癌の比率が、DHA-Ac 投与により4.3%と有意に減少した。DHA 投与により腺癌細胞の細胞増殖が抑制され細胞周期が第一間隙期で停止したとの報告がみられ³⁶⁾、DHA-Ac 投与による腺癌発生ラットの割合と腺癌構成比率の低下は、DHA-Ac が乳腺上皮に抑制的に作用し、腺癌発生を特異的に抑制したものと推察された。なお、今回の実験で肉腫の組織構成比率は、DHA-Ac 群では48.8%と対照群の15.8%に比し有意に増加していたが、肉腫発生ラットの割合は対照群で80%、DHA-Ac 群で100%と有意の差はみられなかった。この結果は、DHA-Ac が肉腫発生に促進的に作用したのではなく、腺癌発生が DHA-Ac 投与により抑制されたため肉腫構成比率が相対的に増加したものと考えられた。なお、DHA は間質の線維芽細胞に抑制的に作用するとされているが³⁷⁾、その肉腫に対する作用については十分に明らかになっていない。

DMBA 誘発乳腺腫瘍の発生・増大様式を両実験群において検討したところ、腫瘍増大開始日、発育停滞期間、腫瘍発育速度には両群間で明らかな相違はみられなかった。一方、腫瘍発生日は DHA-Ac 群で対照群に比し有意の延長がみられ、腫瘍内に占める肉腫組織の構成比率が大きいものほど、腫瘍の発生日が遅い傾向がみられた。このことは、腺癌の発生日が DHA-Ac 投与によって減少したことに起因する延長ではないかと推察された。なお、成績としては示さなかったが、予備実験で発育停滞期間相当時に穿刺吸引細胞診を腫瘍に行なったところ、すでに悪性細胞が確認されており、この発育停滞期間はあたかも生体が腫瘍の発育を阻止している期間のように思われた。

DHA-Ac 群の血中 E_2 および T 濃度には、対照群に比し有意の上昇がみられたが、これら性ステロイドの変化が腺癌の発生、増殖に及ぼす影響を考慮する必要がある。一般に E_2 は乳癌に対しては促進的に働くものとされており³⁸⁾、DHA-Ac 投与により上昇した E_2 が腺癌構成比率および腺癌発生ラット割合の低下をもたらしたものと考えるににくい。T に関しては、大量投与で乳癌に抑制効果が認められたとの報告³⁹⁾や、ヒト乳癌細胞において抗 E 作用を示したとの報告⁴⁰⁾がみられる。一方、T 投与により乳癌手術後生存率の改善は認められなかったという報告⁴¹⁾や、乳癌の発生と血中 T 濃度には相関がみられなかったという報告⁴²⁾もあり、T と乳癌との関連性についての定説はみられない。今回の結果を血中 E_2 と T 濃度の比から検討すると、T/ E_2 比の上昇、すなわち DHA-Ac 投与によってもたらされるアンドロゲン優位状態が、腺癌の発生を抑制した可能性も考えられる。また、今回の実験では血中 PRL 値の測定を行わな

かったが、DHA-Ac 群にみられた腺癌の抑制効果と血中 PRL 濃度との関連性については今後検討すべきことと考えられた。

DHA の長期間投与でみられる作用として抗肥満作用が報告されている。この作用は食欲減少によりもたらされるものではなく、投与中止により可逆的であるとされており²³⁾²⁶⁾、肝での脂肪合成の低下、基礎代謝率の亢進により発現するのではないかと推察されている^{43)~45)}。一方、DHA は生体において蛋白同化ステロイドとして作用しているとされている⁴⁶⁾。本実験では、対照群に比し DHA-Ac 群で有意の体重増加の抑制が認められたが、この結果は担癌ラットから得られたものであり、DHA-Ac の作用によるものか否かについてはさらに検討する必要があると思われる。

以上、今回の高 PRL 血症下の DMBA 誘発乳腺腫瘍に関する実験で、DHA-Ac 投与によって腺癌発生ラット割合の低下と腫瘍組織における腺癌構成比率の低下が認められたことから、DHA-Ac は腺癌発生に対し抑制的に作用するものと考えられた。

結 論

高 PRL 血症ウィスター系雌ラットにおける DMBA 誘発乳腺腫瘍に及ぼす DHA の影響を検索し、以下の結論を得た。

1. 高 PRL 血症下の DMBA 誘発乳腺腫瘍は特徴的な発育様式を示した。すなわち、腫瘍発生日以降一定期間の発育停滞が認められ、その後増大開始がみられた。DHA-Ac 群は対照群に比し、腫瘍発生日は有意に延長した。発育停滞期間、腫瘍増大開始日および腫瘍発育速度には両群間で差は認められなかった。

2. 対照群と DHA-Ac 群における腺癌の構成比率は、それぞれ52.0%、4.3%、肉腫の構成比率は15.8%、48.8%であり、DHA-Ac 投与により腺癌の組織構成比率の減少と肉腫の組織構成比率の増加がみられた。

3. 対照群と DHA-Ac 群における腺癌発生ラットの割合は、それぞれ 100% (10/10)、40% (4/10)、肉腫発生ラットの割合は 80% (8/10)、100% (10/10) と、DHA-Ac 投与により腺癌発生ラットの割合に有意の低下がみられた。

4. 体重の増加は、DHA-Ac 群では対照群に比し有意の低下を認めたが、腫瘍の組織構成比率との関連性はみられなかった。

5. DHA-Ac 群では対照群に比し、血中 E_2 濃度、T 濃度に有意の上昇がみられた。また、血中 T/ E_2 比は、DHA-Ac 群で高い傾向がみられたが、有意の上昇ではなかった。

以上の結果より、ヒト副腎性アンドロゲンである DHA は、高 PRL 血症下の DMBA 誘発乳腺腫瘍における腺癌発生に対して抑制的に作用することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり貴重な御助言を賜りました病理学第一講座中西功夫教授に深謝いたしますとともに、終始ご指導戴きました赤祖父一知助教授ならびに研究の遂行にご協力下さいました寺田督講師をはじめ教室員各位、穴田幸子、相川みち代、棚田留美子の各事務官に深く感謝致します。

文 献

- 1) 赤祖父一知, 西田悦郎: 産科・婦人科. 図説老年病医学

- 5 卷 (尾前照雄, 亀山正邦, 熊原雄一, 林 四郎, 原澤道美編), 第1版, 290-319 頁, 同朋社, 京都, 1985.
- 2) Nimrod, A. & Ryan, K. J.: Aromatization of androgens by human abdominal and breast fat tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **40**, 367-372 (1975).
- 3) Pearson, O. H., Llerena, O., Llerena, L., Molina, A. & Butler, T.: Prolactin-dependent rat mammary cancer: A model for man? *Trans. Assoc. Am. Physicians*, **82**, 225-238 (1969).
- 4) Nagasawa, H.: Prolactin and human breast cancer: a review. *Eur. J. Cancer*, **15**, 267-279 (1979).
- 5) Huggins, C., Grand, L. C. & Brillantes, F. P.: Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons, and its suppression. *Nature*, **189**, 204-207 (1961).
- 6) Davis, R. K., Stevenson, G. T. & Busch, K. A.: Tumor incidence in normal Sprague-Dawley female rats. *Cancer Res.*, **16**, 194-197 (1959).
- 7) 福西 亮: 乳腺. 化学物質と癌の発生 (小田嶋成和, 橋本嘉幸編), 第1版, 301-318頁, 学会出版センター, 東京, 1978.
- 8) DeSombre, E. R., Kledzik, G., Marshall, S. & Meites, J.: Estrogen and prolactin receptor concentrations in rat mammary tumors and response to endocrine ablation. *Cancer Res.*, **36**, 354-358 (1976).
- 9) Muldoon, T.: Prolactin mediation of estrogen-induced changes in mammary tissue estrogen and progesterone receptors. *Endocrinology*, **121**, 141-149 (1987).
- 10) Lupulescu, A.: Enhancement of epidermal carcinoma formation by prolactin in mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 1335-1346 (1985).
- 11) Welsch, C. W. & Nagasawa, H.: Prolactin and murine mammary tumorigenesis: A review. *Cancer Res.*, **37**, 951-963 (1977).
- 12) Nagasawa, H., Yanai, R. & Taniguchi, H.: Importance of mammary gland DNA synthesis on carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Res.*, **36**, 2223-2226 (1976).
- 13) 村上弘一: 雌ラットにおける血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究. 十全医会誌, **100**, 693-710 (1991).
- 14) 富田嘉昌: 女性における血中 11-deoxy-17-ketosteroid の動態に関する研究. 十全医会誌, **88**, 210-232 (1979).
- 15) 荒木克己: 女性における血中 Dehydroepiandrosterone の動態に関する研究. 十全医会誌, **89**, 852-876 (1980).
- 16) Akasofu, K., Tomita, Y., Araki, K., Shinohara, H., Seki, K., Yamashiro, G. & Nishida, E.: Effects of surgical stress concentrations of serum androgens in women. *Acta Obstet. Gynaecol. Jpn.*, **31**, 737-746 (1979).
- 17) Akasofu, K., Tomita, Y., Araki, K., Shinohara, H., Yamamoto, H. & Nishida, E.: Effects of dehydroepiandrosterone acetate administration on post-menopausal women with gynecological malignancies. *Acta Obstet. Gynaecol. Jpn.*, **29**, 1011-1020 (1977).
- 18) 赤祖父一知, 原田文典: 女性の肥満と内分泌. 日医新報, **3312**, 25-30 (1987).
- 19) Zumoff, B., Walsh, B. T., Katz, J. L., Levin, J., Rosenfeld, R. S., Kream, J. & Weiner, H.: Subnormal plasma dehydroepiandrosterone to cortisol ratio in anorexia nervosa: a second hormonal parameter of ontogenic regression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **56**, 668-672 (1983).
- 20) 富田嘉昌, 関久美子, 山城 玄, 荒木克己, 赤祖父一知: 高prolactin血症不妊患者の bromocriptine 療法時における血中 prolactin および副腎性 androgen の変動について. 日不妊会誌, **27**, 199-209 (1982).
- 21) 春日義生, 中村幸夫, 吉尾敬徳, 簡 邦彦, 片山恵利子, 飯塚理八: 多嚢胞性卵巣における steroidogenesis - 特に副腎皮質関与の有無についての検討 -. 日不妊会誌, **29**, 22-29 (1984).
- 22) 岩崎寛和, 白杵 葱: 多毛症とその治療. 産と婦, **48**, 1871-1879 (1981).
- 23) 西田悦郎: Dehydroepiandrosterone および gonadotropin 混合投与の両側副腎摘除ラット卵巣に及ぼす影響. 日産婦会誌, **18**, 383-392 (1966).
- 24) 西田悦郎: Dehydroepiandrosterone 投与の両側副腎摘除雌ラットの成長発育に及ぼす影響. 日内分泌会誌, **43**, 758-769 (1967).
- 25) Cleary, M. P., Shepherd, A., Zick, J. & Schwartz, A.: Effect of dehydroepiandrosterone on body weight and food intake in rats. *Nutr. Behav.*, **1**, 127-136 (1983).
- 26) Yen, T. T., Allan, J. A., Pearson, D. V., Acton, J. M. & Greenberg, M. M.: Prevention of obesity in Avy/a mice by dehydroepiandrosterone. *Lipids*, **12**, 409-413 (1977).
- 27) Schwartz, A. G.: Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (Avy/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. *Cancer Res.*, **39**, 1129-1132 (1979).
- 28) Schwartz, A. G., Pashko, L. & Whitcomb, J. M.: Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol. Pathol.*, **14**, 357-362 (1986).
- 29) Bulbrook, R. D., Hayward, J. L., Spicer, C. C. & Thomas, B. S.: Abnormal excretion of urinary steroids by women with early breast cancer. *Lancet*, **2**, 1238-1240 (1962).
- 30) Bulbrook, R. D., Hayward, J. L. & Spicer, C. C.: Relation between urinary androgen and corticoid excretion and subsequent breast cancer. *Lancet*, **2**, 395-398 (1971).
- 31) Brownsey, B., Cameron, E. H. D., Griffiths, K., Gleave, E. N., Forrest, A. P. M. & Campbell, H.: Plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in patients with benign and malignant breast disease. *Eur. J. Cancer*, **8**, 131-137 (1972).
- 32) Helzlsouer, K. J., Gordon, G. B., Alberg, A. J., Bush, T. L. & Comstock, G. W.: Relationship of prediagnostic serum levels of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate to the risk of developing premenopausal breast. *Cancer Res.*, **52**, 1-4 (1992).
- 33) Gordon G. B., Shantz, L. M. & Talalay, P.: Modulation of growth, differentiation and carcinogenesis by dehydroepiandrosterone. *Adv. Enzyme Regul.*, **26**, 355-382 (1987).

- 34) Henderson, E., Schwartz, A., Pashko, L., Abou-Gharbia, M. & Swern, D.: Dehydroepiandrosterone and 16 α -bromo-epiandrosterone: inhibitors of Epstein-Barr virus-induced transformation of human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 2, 683-686 (1981).
- 35) Pashko, L. L., Schwartz, A. G., Abou-Gharbia, M. & Swern, D.: Inhibition of DNA synthesis in mouse epidermis and breast epithelium by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Carcinogenesis*, 2, 717-721 (1981).
- 36) Schulz, S., Klann, R. C., Schonferd, S. & Nyce, W. J.: Mechanisms of cell growth inhibition and cell cycle arrest in human colonic adenocarcinoma cells by dehydroepiandrosterone: role of isoprenoid biosynthesis. *Cancer Res.*, 52, 1372-1376 (1992).
- 37) Saenger, P. & New, M.: Inhibitory action of dehydroepiandrosterone (DHEA) on fibroblast growth. *Experientia*, 33, 966-967 (1977).
- 38) Bern, H. A. & Nandi, S.: Recent studies of the hormonal influence in mouse mammary tumorigenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 2, 90-144 (1961).
- 39) Adair, F. E. & Herrmann, J. B.: The use of testosterone propionate in the treatment of advanced carcinoma of the breast. *Ann. Surg.*, 123, 1023-1024 (1946).
- 40) Karydas, I., Fentiman, I., Tong, D., Bulbrook, R. & Hayward, J.: Adjuvant androgen treatment of operable breast cancer: A 20 year analysis. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 13, 113-116 (1987).
- 41) MacIndoe, J. & Etre, L.: An antiestrogenic action of androgens in human breast cancer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 53, 836-842 (1981).
- 42) Wysowski, D., Comstock, G., Helsing, K. & Y Lau, H.: Sex hormone levels in serum in relation to the development of breast cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 125, 791-794 (1987).
- 43) Ziboh, V. A., Dreize, M. A. & Hsia, S. L.: Inhibition of lipid synthesis and glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat skin by dehydroepiandrosterone. *J. Lipid Res.*, 11, 346-354 (1970).
- 44) Cleary, M. P., Shepherd, A. & Jenks, B.: Effect of dehydroepiandrosterone on growth in lean and obese Zucker rats. *J. Nutr.*, 114, 1242-1251 (1984).
- 45) Tagliaferro, A. R., Davis, J. R., Truchon, S. & Hamont, N. V.: Effects of dehydroepiandrosterone acetate on metabolism, body weight and composition of male and female rats. *J. Nutr.*, 116, 1977-1983 (1986).

Effects of Adrenal Androgen on Mammary Tumor in Hyperprolactinemic Female Rat Hiroshi Kawakita, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 103, 134—143 (1994)

Key words female rat, dehydroepiandrosterone, breast cancer, hyperprolactinemia, 7,12-dimethylbenz(a)anthracene

Abstract

The present study was performed to investigate the effects of dehydroepiandrosterone (DHA) on the 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)-induced mammary tumor in hyperprolactinemic female Wistar rats. At day 65 of age, 2 mg of DMBA was injected into the right fourth mammary gland of pimozide-induced hyperprolactinemic rats. After DMBA-injection, 5 mg of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) was injected subcutaneously three times a week throughout the experiment. The development of mammary tumors was observed, and the size was measured everyday. When the tumor grew over 50 mm in mean diameter or over 30 mm with ulcer, the rat was decapitated and studied histologically. The trunk blood was collected and stored until assay. In the control and DHA-Ac groups, the tumor developed over 5 mm in mean diameter during 31.1 \pm 4.3 days (mean \pm SEM) and 39.8 \pm 6.4 days after DMBA-administration (defined as the day of tumor recognition). After the tumor had enlarged rapidly to about 10 mm in mean diameter, the growth rate of the tumor decreased or stopped (defined as the resting phase of tumor growth). Thereafter, the tumor enlarged rapidly again at 102.3 \pm 19.5 days in control group and 114.2 \pm 21.2 days in DHA-Ac group, respectively (defined as the day of rapid tumor growth). In the DHA-Ac group, the day of tumor recognition was significantly later than that of the control group. As for the histological type, the ratio of adenocarcinoma in the control and DHA-Ac groups was 52.0% and 4.3%, and the ratio of sarcoma was 15.8% and 48.8%, respectively. The DHA-Ac treatment decreased the percentage of adenocarcinoma and increased the percentage of sarcoma. The rate of rats with adenocarcinoma in the control and DHA-Ac groups was 100% and 40%, and the rate of rats with sarcoma was 80% and 100%, respectively. In the DHA-Ac group, the rate of rats with adenocarcinoma decreased significantly compared to that of the control group. A significant correlation ($r=0.83$) was observed between the percentage of sarcoma and the day of tumor recognition. In the DHA-Ac group, the daily body weight gain decreased significantly com-

pared to that of the control group. The serum levels of estradiol (E_2) and testosterone (T) in the DHA-Ac group also increased significantly. The ratio of T to E_2 in the DHA-Ac group increased slightly compared to that of control group. These results suggest that DHA-Ac suppresses the development of DMBA-induced mammary adenocarcinoma in the experimental hyperprolactinemic female Wistar rat.