

乳癌と Gonadal Hormone の関連性に関する研究

第 1 編

乳癌ラットの Gonadal Hormone について

岡山大学医学部第一外科教室 (主任：田中早苗教授)

庄 達 夫

(昭和51年9月14日受稿)

第一章 緒 言

乳癌とホルモンの関係、とくに estrogen の乳癌に及ぼす影響については、乳腺発育、乳癌の発生など、多くのことが知られている。

estrogen は正常乳腺の成長と分化に直接働くとともに大部分の自然発生乳癌や発癌物質により発生した実験乳癌の発生や発育に関与するが、estrogen は下垂体の存在のもとで乳腺およびその腫瘍に作用し、下垂体がない場合にはその作用を保持できないことが知られている^{1,2)}

私は estrogen と関係の深い gonadal hormone 系として、黄体化ホルモン LH、卵胞刺激ホルモン FSH をとりあげ、これらが乳癌とどのような関連をもつかについて血中濃度、腫瘍へのとりこみ、さらには放出ホルモン (LH-RH) による LH、FSH の動態など、DMBA ラット乳癌を用いて研究を行った。

第2章 実験方法

実験動物、および実験材料

日本クレアより購入した sprague Dawley 系 (SD 系) 成熟雌ラット、生後55日、150g 前後のものを用いた。

7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) は Sigma より購入した。LH-RH は 100 μg/vial (第一製薬) を使用した。

National Institute of Arthritis, Metabolism & Digestive Diseases より NIAMDD-Rat LH-I-4, NIAMD-Rat FSH-I-3, NIAMDD-Anti-Rat LH-Serum-S-3, NIAMD-Anti-Rat FSH-

Serum-6, NIAMDD-Rat LH-RP-I, NIAMD-Rat FSH-RP-I の提供を受け、実験に供した。

¹²⁵I ラベリングは第一ラジオアイソトープ研究所において、放射能濃度 LH 0.004 mCi/ml, FSH 0.01 mCi/ml のものを作成した。実験に供したその他の試薬は全て試薬特級を使用した。

2. DMBA 乳癌の作成

Huggins 原法に従って³⁾ S-D 系雌ラットに、DMBA 10mg/ml オリーブ油に溶解し、2週間々隔で2回、経胃的に投与した。購入直後はラットの生活環境が安定しないため、7~10日間飼育し、体重が約200g に増加した頃に DMBA 投与を行った。

DMBA 投与後早期死亡率は約20%で、腫瘍は DMBA 投与後約2ヶ月頃より6ヶ月頃にわたり発生をみるが発生率は約90%であった。

3. 卵巣切除、副腎切除ラットの作成

腫瘍発生後、腫瘍径約1~2cmのもの3~10匹を1群とし、それと同系、同日生まれの DMBA 投与を行わない雌ラットを対照として用いた。

ラットは次の4群に分けた。①未処置群 (DMBA ラット乳癌13匹、対照群17匹)、②両側卵巣切除群 (DMBA ラット乳癌5匹、対照群10匹)、③両側卵巣・副腎切除群 (DMBA 乳癌ラット5匹、対照群6匹)、④両側副腎切除対照群 (対照群7匹)

切除術は12時間絶食後、午前9~10時の間にエーテル麻酔下で行った。副腎切除ラットは実験に供したのち、剖検により補副腎のないことを確かめた。

4. estradiol, cortisol

両側副腎切除後は cortisol を早朝1回、0.5mg/day 皮下注射を行い生命を維持した。LH、FSH に対する cortisol の量的な影響を観察するため、両側

卵巣・副腎剔除群 8 匹に早朝 1 回 2 mg/day 皮下注射を 7 日間行った。

両側卵巣・副腎剔除ラット (6 匹を 1 群とした) に対し, estradiol 0.1 μ g, 1 μ g 早朝 1 日 1 回投与し, 7 日間続けた後同様の観察を行った。

5. LH-RH の投与

この実験では卵巣・副腎剔除で estradiol 投与により著明な変化をみとめ, 副腎剔除のみを行ったものでは, 卵巣剔除群よりも変化にとぼしかったため, LH-RH の影響は以下の 3 群についてのみ検索を行った。

1) 両側卵巣・副腎剔除後 estradiol 0.1 μ g 7 日間投与

2) 両側卵巣・副腎剔除後 estradiol 1 μ g 7 日間投与

3) 両側副腎剔除 (卵巣剔除を行わない)

以上の 3 群に LH-RH 2 μ g を皮下注射し, 1 時間後に採血した。副腎剔除後は cortisol 0.5 mg 連日投与し, estradiol は早朝 1 日 1 回 7 日間投与した。

6. 125 I-LH, FSH の投与

NIAMD-Rat- 125 I-LH-1-4, NIAMD-Rat- 125 I-FSH-1-3 を生理的食塩水で溶解し, ラット 1 匹当り LH 499,500 cpm, FSH 303,920 cpm を腹腔内へ注入した。

腹腔内注入後 15 分, 30 分, 45 分, 60 分に尾切除し採血した。ついで 500 ml の生理的食塩水にヘパリンを加え灌流脱血したのち, 各臓器を剔出, 秤量後各臓器中の放射能を測定した。

7. 採 血

採血は腫瘍, 卵巣・副腎剔除前, 腫瘍剔出後 1 日目, 卵巣剔除後 21 日目, 副腎剔除後 7 日目に行った。LH, FSH の日内変動を考慮して, 午前 9~10 時頃に行い, vaginal smear を観察することによって Proestrus 期を除外した。採血は尾切除, または大腿静脈から行い, 採血後は直ちに 2,000 \times g で 5 分間冷却遠心分離した。

8. 腫瘍の剔出

1) DMBA ラット乳癌腫瘍, 2) DMBA 乳癌を有すラットの卵巣剔除, または卵巣・副腎剔除後 10 日目に剔出した腫瘍, 3) DMBA 乳癌ラットに estradiol 50 μ g 皮下注射, 3 時間後剔出した腫瘍を用いた。

腫瘍は Komatsu Electronics Model MB 20 ミクロトームで -20°C にて 20~30 μ の slice とし, slice 重量の倍量の生理的食塩水を加え, Polytron

で 1 分間 homogenate した後, 2,000 \times g 5 分間冷却遠心分離した。

実験に供した血清, 腫瘍上清ともすべて測定日まで, -20°C に凍結保存した。

9. LH, FSH の測定

1) 標準 LH, FSH 溶液の調製

標準 Rat LH, FSH の vial に緩衝液 (1% bovine serum albumin を含む Phosphosaline) を加えて溶解する。この溶液の濃度は約 9 μ g/ml である。さらに緩衝液を用いて倍数希釈を行い 9 μ g/ml ~ 0.035 μ g/ml まで 9 種類の濃度と, 緩衝液のみを入れた LH, FSH 濃度ゼロのものを用意し, 標準曲線の作成に用いた。

2) 測定操作法

測定は少なくとも duplicate で行う。

①倍数希釈で調製した標準 Rat-LH, FSH 溶液を 100 μ l ずつ標準溶液用試験管にとる。

②被検血清 100 μ l を未知検体用試験管にとる。

③ Rat- 125 I-LH, FSH 溶液 100 μ l を各試験管に加える。

④ Rat-LH, FSH 抗血清 200 μ l を各試験管に加える。

⑤緩衝液 400 μ l を各試験管に加える。

⑥各試験管を軽く攪拌後, 試験管に栓をして 4°C で 5 日間 incubate する。

⑦第 2 抗体 100 μ l を各試験管に加える。

⑧各試験管を軽く攪拌後, 試験管に栓をして 4°C で 2 日間 incubate する。

⑨ 2000 \times g で 30 分間 4°C で遠心分離し, アスピレーターを用いて上清吸引除去する。

⑩ Well 型 Scintillation counter (Aloka Universal Scaler Model TDC 5) で各試験管の放射能を 1 分間測定し, 自然計数率を差し引く。

3) 結果の計算

①各々 duplicate で行った結果の計数率を算出す。
Total count : T
ゼロサンプル計数率 : B_0 とすると B_0/T は 25% 以上となる。

② LH, FSH ゼロサンプル (標準 LH, FSH 濃度 0) の計数率 (B_0) に対する標準 LH, FSH の計数率 (B) の比 (B/B_0) を計算する。

$$B/B_0\% = \frac{\text{標準 LH, FSH の計数率}}{\text{ゼロサンプルの計数率}} \times 100$$

③片対数グラフ用紙を用いて標準曲線を作成する。単位は mIU/ml である。

④被検血清についても B/B₀ % を算出し、標準曲線より LH, FSH を読みとる。

⑤測定された被検血清の同一グループは、mean ± standard error として統計学的処理を行う。

第3章 実験成績

1. 正常雌ラットの血清 LH, FSH (図1, 2)

対照として無処置のラット血清中の LH は 200 ± 39 ng/ml, FSH は 210 ± 36 ng/ml である。これが両側卵巣切除後3週間では LH 310 ± 71 ng/ml, FSH 360 ± 47 ng/ml と両者ともに有意の差 ($P < 0.05$) で上昇した。

卵巣切除後に両側の副腎切除を加えたラットに cortisol 0.5 mg/day, 1週間投与した群では、LH

図1 正常雌 Rat の血清 LH

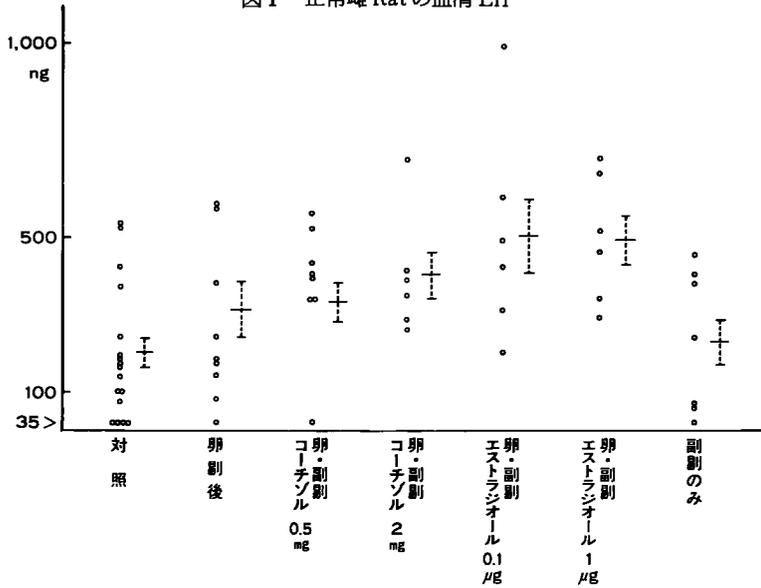
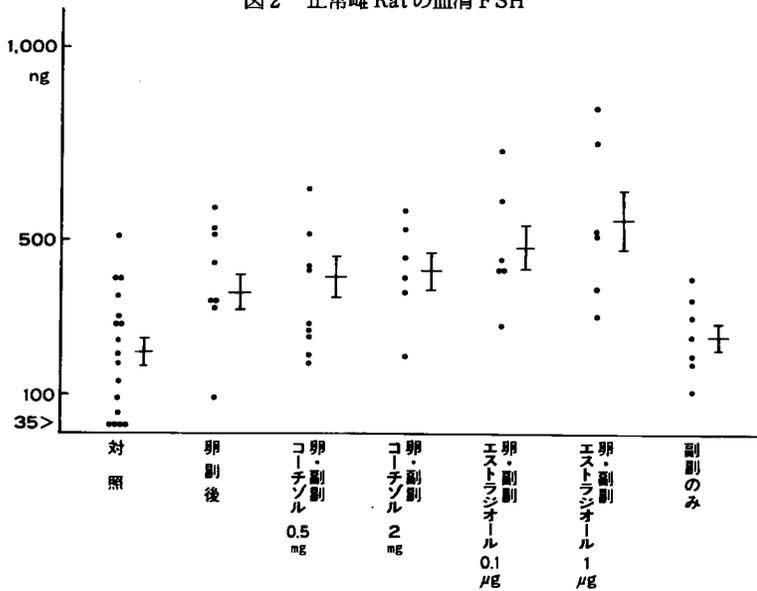


図2 正常雌 Rat の血清 FSH



330±55ng/ml, FSH 400±57ng/mlと無処置のラットに比べ著しく上昇し, また, 卵巣切除のみ加えたものよりもわずかに上昇している。

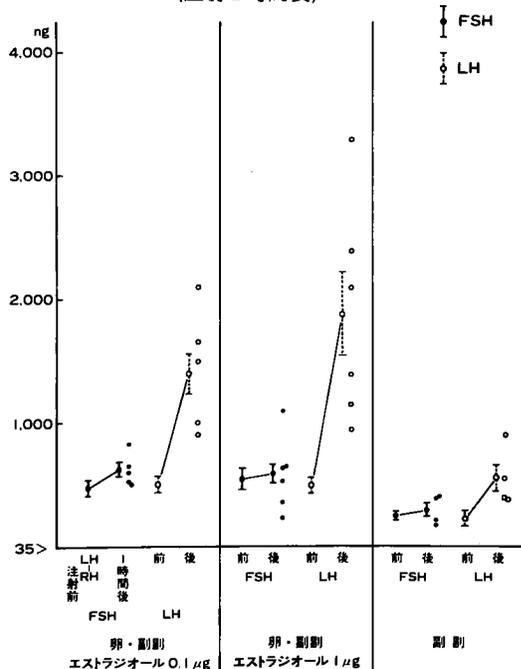
卵巣・副腎切除後に cortisol 投与量によって, LH, FSH の変動を観察するため cortisol を0.5mg, 2mg 投与の2グループについて測定したが, 0.5mg 投与群は LH 330±55ng/ml, FSH 400±57ng/ml 2mg 投与群は LH 330±55ng/ml, FSH 420±50ng/ml と LH, FSH ともに cortisol 2mg 投与群がわずかに高い値をみとめたが, ともに有意の差はなかった。

卵巣・副腎切除ラットに estradiol 0.1μg, 1μg を7日間連日投与した2群の LH, FSH 観察を行った。LH は estradiol 0.1μg 投与群で500±95ng/ml, 1μg 投与群では490±62ng/ml と1μg 投与群がわずかに低値を示した。FSH についてみると, estradiol 1μg, 0.1μg 投与群ともに, 投与しないものより上昇した。

副腎切除ラット(卵巣切除は行わない)に cortisol 0.5mg/day 投与した血清中の LH は230±58ng/ml, FSH は250±35ng/ml でいずれも対照に比べやや高値を示すが有意の差ではない。

2. LH-RH の LH, FSH に対する影響

図3 LH・RH のRat血清 LH, FSH に対する影響 (注射1時間後)



両側の卵巣・副腎切除を行い, cortisol 0.5mg 連日投与後, estradiol 0.1μg 1週間連日投与した。このラットに対し LH-RH 2μg を皮下注射後1時間目の LH, FSH の変動をみたものが図3である。LH は前値500±95ng/ml であるが, LH-RH 投与後, 1400±166ng/ml と2.8倍上昇した。FSH は前値480±58ng/ml であるが投与後620±54ng/ml と1.3倍上昇した。

同じ両側卵巣・副腎切除群に estradiol 1μg 7日間投与した群の LH は LH-RH 投与前値490±62ng/ml に対し, 投与後1880±333ng/ml と約3.8倍も上昇した。しかし, FSH は前値550±78ng/ml, 投与後590±72ng/ml とほとんど変化がみられなかった。

両側の副腎切除のみ行ったものの LH は LH-RH 投与前値230±58ng/ml, 投与後570±98ng/ml と2.5倍上昇した。FSH は投与前値が250±35ng/ml, 投与後は300±53ng/ml とわずかに上昇した。しかし, 卵巣・副腎切除群に比べ副腎切除群は余り上昇しなかった。

3. DMBA 乳癌ラット血清および組織中の LH, FSH (図4)

DMBA 乳癌ラットの血清 LH は210±49ng/ml で対照の LH 200±39ng/ml に比べ差がない。FSH は240±48ng/ml で対照の FSH 210±36ng/ml に比べやや高値であるが有意差ではない。DMBA 乳癌切除後の血清 LH は180±46ng/ml と剔出前に比べやや低い値となり, FSH も210±36ng/ml と剔出前より低値となるがいずれも有意差ではない。

DMBA 乳癌ラットの両側卵巣切除後10日目の血清 LH 280±61ng/ml, FSH 300±61ng/ml で卵巣切除前に比べ上昇する。両側卵巣・副腎切除後10日目の血清 LH 270±96ng/ml, FSH 330±82ng/ml で卵巣切除群に比べ差はない。

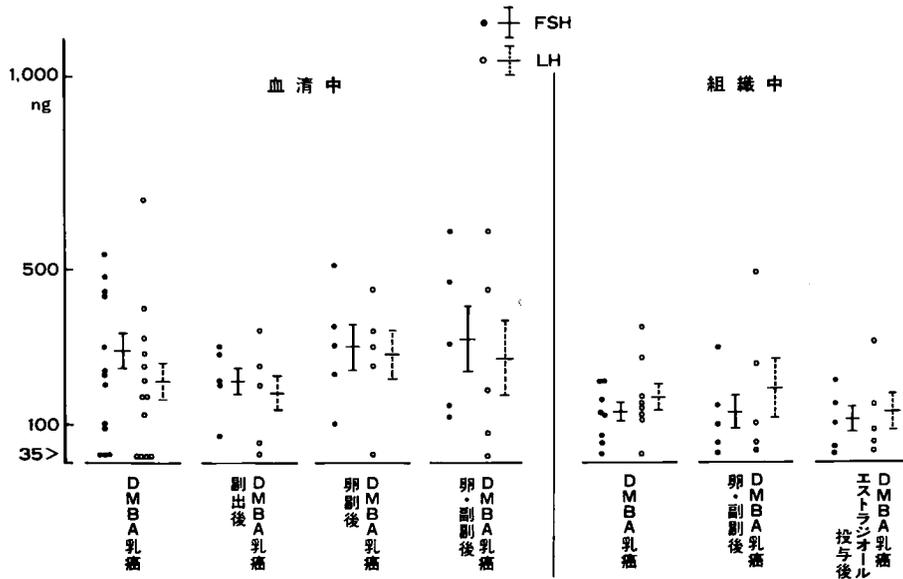
DMBA 乳癌組織中の LH 170±33ng/ml, FSH 130±24ng/ml である。卵巣・副腎切除後の DMBA 乳癌組織中の LH 190±76ng/ml, FSH 130±43ng/ml で卵巣・副腎切除による, DMBA 乳癌組織中の LH, FSH に影響はみられない。DMBA 乳癌を有すラットに estradiol 50μg 投与後の組織中の LH 130±45ng/ml, FSH 110±31ng/ml で, estradiol 投与によりわずかに減少している。

4. 臓器中の ¹²⁵I-LH, FSH の分布

1) ¹²⁵I-LH のラット血中濃度の経時的変化

腹腔内に投与された ¹²⁵I-LH の血中濃度は15分後

図4 DMBA 乳癌ラット血清および組織中の FSH, LH



は1808cpm/mlであるが、30分後1367cpm/ml、45分後1050cpm/ml、60分後は930cpm/mlとすみやかに低下し、60分後は15分値の約1/2に減少した。

2) ¹²⁵I-LH, FSHの各臓器への分布(投与後1時間)

1) において¹²⁵I-LHは投与1時間後にはしだいに血中より消退することがわかったため、1時間目の各臓器における¹²⁵Iの分布状態を表1に示した。数値は臓器1g中、血液1ml中のcpmに換算した。

¹²⁵I-LH, FSHは腎臓に最も高く、ついで肝臓に多い。子宮、筋に比べ卵巣、副腎、脾はやや高い。

3) DMBA 乳癌組織中の¹²⁵I-LH, FSH(表1)

DMBA 乳癌腫瘍中の¹²⁵I-LHの測定値は1250cpm/gでこれは血液、子宮、筋中等よりも多い。¹²⁵I-FSHを投与した癌腫を2個もつラットでは1個に1189cpm/g、他の1個で1836と異なる取り込みがみられた。前者は血中濃度とほぼ同値であり、後者は卵巣とほぼ同値である。

第4章 考 按

LH, FSHは分子量25,000~40,000の糖蛋白であり、両側卵巣切除をうけた婦人、閉経後婦人の尿中に大量排泄されることが知られている。このgonadotropinは卵巣でのsex hormone産生の調節センターであり、卵巣性女性ホルモンの発癌過程におい

てgonadotropinが重要な役割を演ずると考えられている。

閉経前婦人では少量のgonadotropinが卵巣での

表1 ¹²⁵I-LH, FSHのラット臓器への分布(臓器は投与後60分)

		¹²⁵ I-LH	¹²⁵ I-FSH
血 液	15分	1,808	—
	30分	1,367	—
	45分	1,050	—
	60分	930	1,030
腎		18,450	18,946
肝		8,840	7,053
卵 巣		1,580	1,536
子 宮		810	474
副 腎		1,100	—
脾		1,080	1,202
筋		780	431
DMBA 乳癌		1,250	1,189 1,838

臓器 cpm/g
血液 cpm/ml

ステロイド化の調節を行っているが、卵巣切除後や閉経後婦人では、大量のgonadotropinが副腎皮質にどのような働きをしているのか、未だ知られていない。

大量に産生された活性estrogen, androgenによってgonadotropinが抑制されることが知られて

おり、ホルモン製剤の臨床効果と gonadotropin 産生抑制能について関係があると考えられている。しかし、乳癌の治療に有効なホルモン製剤が必ずしも gonadotropin 産生に対して有効に働かないという現象は十分に説明されていない。尿中 gonadotropin の測定によって乳癌患者のホルモン環境を予知することがある程度可能で、その結果が期待されたが、過去における多くの報告は生物学的活性を利用した nonspecific な測定法が多いため、不正確でありやや信頼性にとぼしいようである。蛋白性ホルモンに対する Radioimmunoassay の開発にともない、LH、FSH 測定も Reichert^{4,5)} 等の報告がなされ、この方面での研究が急速な進展をみるに至った。

私は Radioimmunoassay 法により、NIAMD より Rat LH、FSH の提供をうけ、外科的ホルモン療法、ホルモン投与等によって乳癌患者における LH、FSH の変化について観察を行った。正常ラットの血清 LH は (図 1)、卵巣切除、卵巣・副腎切除群に estradiol を投与するとさらに高値を示してくる。FSH (図 2) も同様の結果で、卵巣切除のみの場合、卵巣副腎切除の場合とはともに副腎切除のみを行ったものよりも高値を示し、LH、FSH の上昇は卵巣性 estrogen が副腎性のホルモン効果よりも、より強く作用することを示唆している。

卵巣・副腎切除後 estrogen 投与により、減少すると考えられる LH、FSH は逆に増加しているが、この現象は sterile rat にみられる stimulatory feedback あるいは Positive feedback と呼ばれる現象で福島⁶⁾、川上⁷⁾、Mallampati⁸⁾ 等により報告されている。Mallampati⁸⁾ 等は estradiol 0.05 $\mu\text{g}/\text{day}$ 以下の投与で血清 LH は増加し、それ以上では減少するとしており、この研究で用いた 0.1 μg 、1 μg は LH、FSH に対して十分な抑制量と考えられる。彼らは stimulatory feedback は sterile rat にしばしばみられる現象として下垂体機能とあわせて分析を行っており、乳癌治療を考える場合、LH、FSH 高値のものにホルモン療法が有効であるという「最低の予知法としての LH、FSH 定量の意義」を複雑化する 1 因子として考えなければならない現象であろう。

DMBA 乳癌ラット (図 4) の血清 LH、FSH とともに対照と比べ差がない。DMBA 乳癌切除後 LH、FSH とともにやや下降するが有意差はない。卵巣切除、卵巣・副腎切除についてみると DMBA 乳癌ラット血清 LH、FSH は対照ラットの卵巣切除、卵巣

・副腎切除に比し低値である。このことは担癌ラットでは下垂体に対する feedback cycle の反応性が正常のものよりもやや低くなっていることを推察させる。組織中の LH、FSH 量は血清中のものよりも低値であり、無処置の DMBA 乳癌組織中の LH、FSH 値と処置群の間に差はみられない。

LH-RH の影響については、ホルモン処置に最も強く影響をうけた卵巣・副腎切除後 estradiol 投与群と、反応のとぼしかった副腎切除のみ行った群について検索を行った。その結果 LH の上昇がとくに著明で、stimulatory feedback に類似した影響を強くうけていると考えられる。estradiol 投与群ではさらに強く反応を示し、LH-RH の刺激効果は stimulatory feedback 効果と相乗しうるものようである。FSH は LH-RH に反応が低く副腎切除のみの群でも卵巣・副腎切除群の約 1/3 の値であった。

LH、FSH は卵巣に特異的な親和性があり、receptor の存在が考えられているが、¹²⁵I-LH、¹²⁵I-FSH を投与し、その臓器分布を観察すると (表 1)、排泄臓器である腎・肝は別として卵巣と DMBA 乳癌組織はほぼ同値の取り込みがみられ、この値は血中の 60 分値よりも高く、DMBA 乳癌組織は卵巣と同程度の LH、FSH 親和性を示唆していることは興味深い。しかしながら腫瘍組織中での LH、FSH の定量値では血中の LH、FSH 値よりも低く、また卵巣切除、卵巣・副腎切除による LH、FSH の変動も少なく、DMBA 乳癌組織に対する親和性に関してはやや疑問がある様にも思われる。LH、FSH の receptor の存在は明らかではなく、Tanizawa⁹⁾、尾崎¹⁰⁾ 等は肝、腎には 1 時間後多量に放出され、その後はゆるやかなカーブをたどると報告しており、同様の結果を観察した。彼らは LH、FSH は卵巣の蛋白合成にとくに働くと報告しており、細道¹¹⁾ 等は ¹²⁵I-LH の uptake は高く、¹²⁵I-albumin は低いこと、さらに、estradiol と協調して LH の取り込みが高くなることを報告しており、long feedback^{12,13)} と stimulatory feedback の 2 つの存在を説明したものと考えられる。

第 5 章 結 論

正常ラットおよび DMBA ラット乳癌の血中、組織中の LH、FSH について、NIAMD ラット LH、FSH を用いて Radioimmunoassay 法により測定し、DMBA 乳癌と下垂体 gonadotropin の関連性について

て観察を行った。

1) 正常ラットの血清 LH, FSH は両側卵巣剔除, 両側卵巣・副腎剔除により上昇し, 卵巣剔除後に estradiol を投与すると高値を示し, stimulatory feedback の状態が観察された。副腎剔除のみでは卵巣剔除のものよりも上昇が少なく, 血清の LH, FSH の変動に対しては卵巣性の estrogen の方がより大きな影響力をもつことを示した。

2) DMBA 乳癌の血清 LH, FSH ともに対照ラットの値と差がない。DMBA 乳癌剔除後にやや下降し, 卵巣剔除, あるいは卵巣・副腎剔除後の LH, FSH は正常ラット卵巣剔除, 卵巣・副腎剔除群に比べやや低値を示した。

3) DMBA 乳癌組織中の LH, FSH は全体として血清の値よりも低く, 無処置の DMBA 乳癌組織

の値と処置群の間には有意の差がみられなかった。

4) LH-RH の影響をみると, 卵巣・副腎剔除後 estradiol を投与した群で LH の上昇が著明である。副腎剔除のみでは LH-RH の反応が低い。

5) ^{125}I -LH, ^{125}I -FSH の臓器分布をみると, 排泄組織である腎, 肝に高く, DMBA 乳癌は卵巣とほぼ同じ取り込みがみられ, 血液, 筋肉中よりも高い値を示し, 組織親和性があることを推察させる。

NIAMD-Rat LH, FSH RIA Kit を提供下さったカリフォルニア大学 A. F. Parlow 博士に深謝する。

稿を終るにあたり, 御指導, 御校閲を賜った, 田中早苗教授, 山本泰久講師に深謝する。

第 6 章 文 献

- 1) Welsch, C. W., and Meites, J., *Cancer*, **23**:601, 1969.
- 2) Meites, J., Lu, K. H., Wuttke, W., Welsch, C. W., Hasegawa, H., and Quadri, S. K., *Recent Prog. Hormone Res.*, **28**:471, 1972.
- 3) Huggins, C., Morii, S., Lorraine, C. G., *Ann. Surg.*, **154** (Suppl.) :315, 1961.
- 4) Reichert, L. E., *Endocrinol.*, **75**:815, 1964.
- 5) Midgley, A. R., Jr., *J. Clin. Endocr.*, **26**:1375, 1966
- 6) 福島峰子, 一関和子, 村田純治, 高梨利一郎, *ホルモンと臨床*, **24**:507, 1976.
- 7) 川上正澄, 貴邑富久子, 坂西晴三, 吉岡英子, *ホルモンと臨床*, **24**:479, 1976.
- 8) Mallampati, R. S., and Johnson, D. C., J., *Endocr.*, **59**:209, 1973.
- 9) Tanizawa, O., Kobayashi, Y., Fukada, N., Ueda, G. and Kurachi, K., *Med. J. Osaka Univ.*, **24**:129, 1973.
- 10) 尾崎公己, 倉智敬一, *日本内分泌学会雑誌*, **47**:226, 1971.
- 11) 細道太郎, 吉田裕, 一戸喜兵衛, *日本産科婦人科学会雑誌*, **26**:1367, 1974.
- 12) Barraclough, C. A. and Haller, E. W., *Endocrinology*, **86**:542, 1970.
- 13) Aiyer, M. S. and Frink, G., J. *Endocr.*, **62**:553, 1974.

Studies on the relationship between breast cancer and gonadal hormones**Part I. On gonadal hormones in the DMBA-induced rat breast cancer****by****Tatuo SHO****Department of Surgery, Okayam University Medical School**

Gonadotropin was assessed using radioimmunoassay on the rat sera of DMBA-induced breast cancer and tissue obtained from DMBA-induced rat breast cancer.

In the above materials, there were no significant differences in the amount observed between control group and nontreated groups, ovariectomized and adrenalectomized animals. After removal of the both ovaries and adrenal glands, the rats were given estradiol followed by lutenizing hormone-releasing hormone. In these treated animals' sera, the level of lutenizing hormone was elevated markedly. Concerning the organ uptake of ^{125}I -lutenizing and follicle stimulating hormones after their intraperitoneal injections, one found the highest distribution of these hormones in the kidney and liver and in lesser degree, in the DMBA-induced rat breast cancer tissue and ovary.