

乳癌と Gonadal Hormone の関連性に関する研究

第 2 編

人乳癌の Gonadal Hormone について

(この論文の要旨は第50回中国・四国外科学会において報告した。)

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1章 緒 言

乳癌と gonadotropin の関連性については尿中 gonadal hormone の bioassay による報告¹⁾が数多くみられ、ホルモン療法によるその変化についても報告がみられるが^{2,3,4)}尿中ホルモンの bioassay は定量値がやや不正確であり、ホルモン療法による gonadal hormone の変化は疾患の進行過程における附随的な変化か、治療による変動が明らかでないことが多い。

私は第1編において DMBA 乳癌ラットを用いて血清中、腫瘍中の LH, FSH を Radioimmunoassay を用いて定量し、腫瘍による変動やホルモン投与による変化などについて報告した。

最近ペプチイドホルモン、蛋白性ホルモン等の Radioimmunoassay が臨床検査のレベルで開発され、bioassay よりもはるかに高い精度で血中ホルモン量を定量しうるようになった。

この研究においては人乳癌患者血清、外科的ホルモン療法を加えた進行、再発乳癌患者血清を用いて LH, FSH の定量を行い、乳癌との関連性について検討を加えた。

第2章 実験方法

1. 実験材料

1) 乳腺症患者血清

乳癌集団検診の際、臨床的に中等度以上の乳腺症と診断した乳腺症患者血清を用いた。

2) 乳癌患者血清

岡山大学医学部第一外科教室において、昭和47年

から昭和50年の間に取り扱った乳癌患者のうち、治療手術可能であった Stage I ~ II 症例、進行、再発乳癌の血清を用いた。また進行、再発乳癌に対して両側卵巢剔除術、両側卵巢副腎剔除術を施行した患者血清を用いた。

3) 対 照

対照婦人は、いずれも肝腎機能正常で、内分泌疾患の既応のない者を選んだ。閉経前の婦人は卵胞期、黄体期、排卵期と測定値に変動が認められるので、月経周期あるいは、基礎体温を参考とし、主として卵胞期の血清を乳癌疾患のものと比較している。測定値の日内変動を考慮して、採血は午前9時~10時に行った。採血後、直ちに、冷却遠心分離し、血清を測定日まで-20℃で凍結保存した。閉経前乳腺症、乳癌患者血清も同様に処理した。

4) Radioimmunoassay の試薬

LH, FSH 測定用の Radioimmunoassay Kit は第一ラジオアイソトープ研究所より購入した。

2. LH-RH の投与方法

放出ホルモンである LH-RH (100 μ g) は第一製薬株式会社より提供を受けた。正常乳腺の婦人を対照として、閉経前の婦人は卵胞期を選んで投与した。①閉経前の正常婦人と乳癌患者、②閉経後の正常婦人と乳癌患者、③乳癌術後両側卵巢剔除婦人、④両側卵巢副腎剔除患者の LH-RH に対する反応を比較するため LH-RH を投与した。朝食は絶食とし、午前9時に LH-RH 100 μ g を筋肉内注射し、その注射前、注射後15分、30分、60分、120分の採血を行った。

3. LH, FSH の測定

1) 標準 LH, FSH 溶液の調製

標準 LH, FSH に蒸留水を加えて 500 mIU/ml の LH, FSH 溶液とする。さらに緩衝液 (1% bovine serum albumin を含む phosphosaline) を用いて倍数希釈を行い 500 mIU/ml ~ 1.95 mIU/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、標準曲線を作成した。

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 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。

③ 125 I-LH, FSH 溶液 100 μ l を各試験管に加える。

④ LH, FSH 抗血清 100 μ l を各試験管に加える。

⑤ 緩衝液 500 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 $^{\circ}$ 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、試験管に栓をするかまたはパラフィルム等で覆いをして 4 $^{\circ}$ C で 1 日間放置する。

⑨ 2000 \times g で 30 分間遠心分離し、アスピレーターを用いて上清を吸引除去する。

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: Bo とすると Bo/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 (Bo) に対する標準 LH, FSH の計数率 (B) の比 (B/Bo%) を計算する。

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

③ 片対数グラフ用紙を用いて標準曲線を作成する。

④ 被検血清についても B/Bo% 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 \pm standard error として統計学的処理を行う。

第 3 章 実験成績

1) 対照の LH, FSH (図 1)

触診上正常乳腺の婦人を対照とした。卵胞期対照 17 名の LH 9.0 \pm 1.7 mIU/ml, FSH 6.7 \pm 1.1 mIU/ml である。黄体期対照 11 名の LH 8.7 \pm 1.5 mIU/ml, FSH 7.9 \pm 1.4 mIU/ml である。閉経期対照者 8 名の LH 24.4 \pm 2.8 mIU/ml, FSH 58.9 \pm 15.9 mIU/ml である。両側卵巣剔除婦人 (婦人科疾患のため、両側卵巣剔除を行った婦人) の LH 43.4 \pm 7.1 mIU/ml,

図 1 乳癌患者の FSH, LH

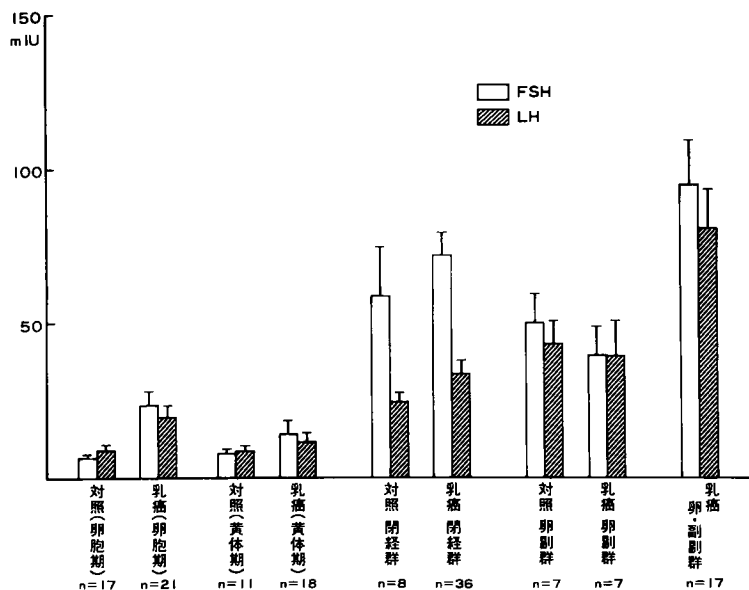
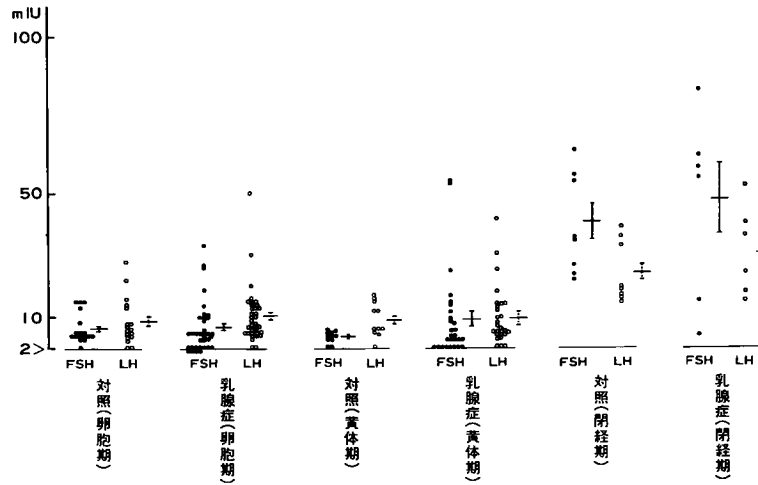


図2 乳腺症患者の血清 FSH, LH



FSH 50.1 ± 9.2 mIU/ml である。両側卵巣副腎切除婦人の対照はない。

2) 乳腺症の LH, FSH (図2)

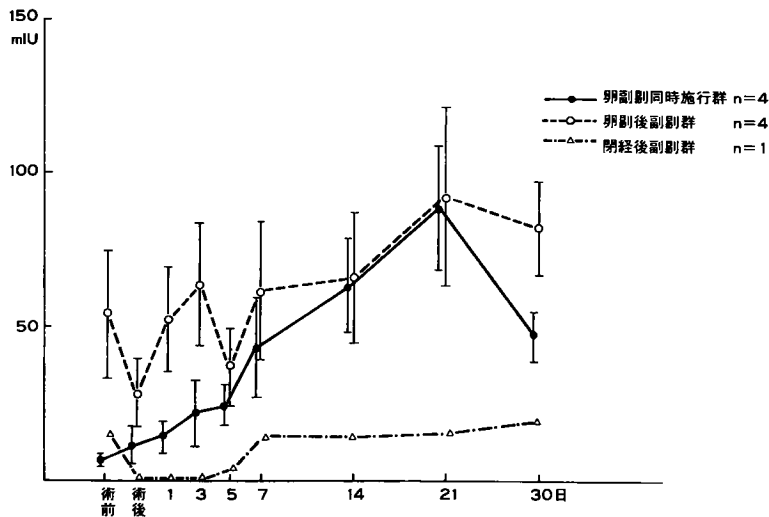
乳腺症婦人卵胞期35名の LH 10.6 ± 1.5 mIU/ml, FSH 7.1 ± 1.7 mIU/ml は対照に比べ LH, FSH ともに差が認められなかった。乳腺症婦人黄体期27名の LH 9.8 ± 1.8 mIU/ml, FSH 9.9 ± 2.6 mIU/ml で対照に比べ、FSH がわずかに高値をみとめた。乳腺症婦人閉経期 6 名の LH 30.7 ± 5.1 mIU/ml, FSH

47.8 ± 11.7 mIU/ml と高値を示すが対照と差は認められなかった。

3) 乳癌患者の血清 LH, FSH (図1, 2)

乳癌患者卵胞期21名の血清 LH 14.3 ± 4.0 mIU/ml, FSH 18.4 ± 4.5 mIU/ml は対照に比べ高値である。乳癌患者黄体期18名の LH 11.4 ± 3.1 mIU/ml, FSH 14.1 ± 4.4 mIU/ml も対照に比べ、高値を示している。しかし、卵胞期、黄体期ともに有意差ではない。閉経期乳癌患者の LH 33.6 ± 4.2 mIU/ml, FSH 72.1

図3 副剝後の血清 LH の変動



±7.1 mIU/ml は対照よりやや高い。進行, 再発乳癌のため, 両側卵巣切除を行った患者 7 名の LH 39.1 ± 11.3 mIU/ml, FSH 39.4 ± 9.3 mIU/ml は対照より, わずかに低値である。進行, 再発により, 両側卵巣および副腎切除乳癌患者は 7 名測定し, LH 80.2 ± 12.8 mIU/ml, FSH 94.6 ± 14.4 mIU/ml と高値を示した。これは同じ乳癌の閉経群, 卵巣切除群よりも高値となっている。

4) 副腎切除後の血清 LH, FSH の変動

図 3, 4 は再発, 進行乳癌のため, 両側副腎切除を施行し, その術前, 術後の経日的変動をみたものである。これは卵巣副腎切除同時施行群 4 名, 卵巣切除後数ヶ月~数年を経て, 再発のために両側副腎切除を行った患者 4 名, 閉経後再発のため, 両側副腎切除を行った患者 1 名であった。

両側卵巣副腎切除同時施行群は術前 LH 6.6 ± 1.6 mIU/ml, FSH 10.3 ± 2.8 mIU/ml で, 術直後より 1 週間目までは段階的に上昇し, 7 日目の LH 43.5 ± 16.4 mIU/ml, FSH 74.5 ± 24.3 mIU/ml は術前値に比べ有意差 ($P < 0.05$) で高くなり, 術後 1 ヶ月までゆるやかな上昇をみる。

両側卵巣切除後副腎切除群および, 閉経後副腎切除群は LH, FSH とともに術前より, すでに高く, 術後数日は下降するが, 1 ~ 2 週目で術前値に回復し, その後は術前値以上にならなかった。

2. LH-RH 投与の影響 (図 5, 6, 7)

1) 対 照

正常月経周期婦人の正常乳腺者を対照として 9 例に LH-RH 100 μg を筋注した。LH は注射前 6.2 ± 0.8 mIU/ml のものが, すぐに上昇し, 60 分後に 47 ± 9.2 mIU/ml と 7.6 倍の peak を示した。FSH についてみると注射前 7.5 ± 1.7 mIU/ml のものが注射後 30 分に peak を持ち 35.5 ± 5.6 mIU/ml と 4.7 倍に上昇し, 120 分では 14.5 ± 1.1 mIU/ml に下降した。

閉経婦人の正常乳腺者 8 名を対照とした。その注射前の LH は 24.4 ± 2.8 mIU/ml で 30 分後に peak となり約 4 倍の 97.1 ± 26.5 mIU/ml と上昇し, 120 分後は前値近くまで下降している。FSH は 58.9 ± 15.9 mIU/ml と前値が高く, 注射後 30 分で 123.9 ± 21.5 mIU/ml と約 2 倍に上昇して peak となり, 120 分後は前値近くまで下降している。

2) 乳癌患者

正常月経周期 (排卵期を除く) 乳癌患者 (図 5) の LH は LH-RH 投与前 6.1 ± 1.6 mIU/ml で peak は 30 分後にみられ, 投与前に比べ 11.3 倍の 68.9 ± 16.4 mIU/ml となり, 120 分後にはやや下降する山形の曲線を示した。しかし, FSH は前値が 8.4 ± 2.7 mIU/ml で, peak を持たず, 漸次上昇し, 120 分値で 21.3 ± 6.1 mIU/ml と最も高く, 遷延化の傾向を示している。

図 4 副別後の血清 FSH の変動

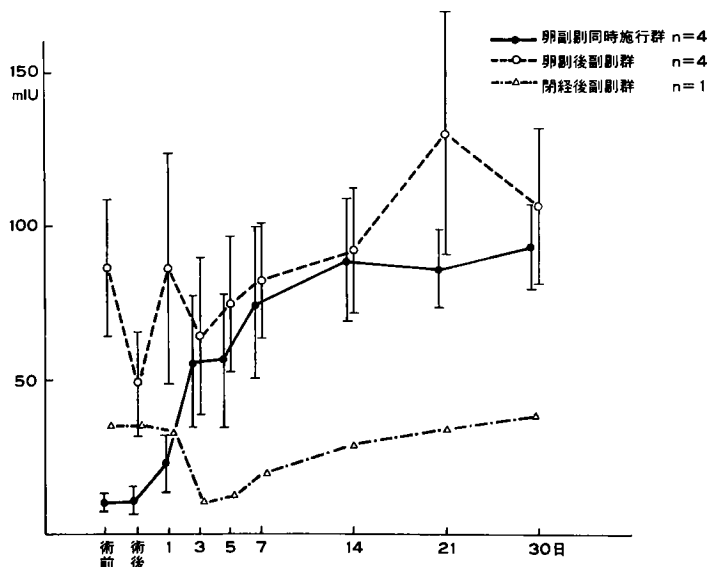


図5 FSH, LHに対するLH-RHの影響
(正常月経周期婦人)

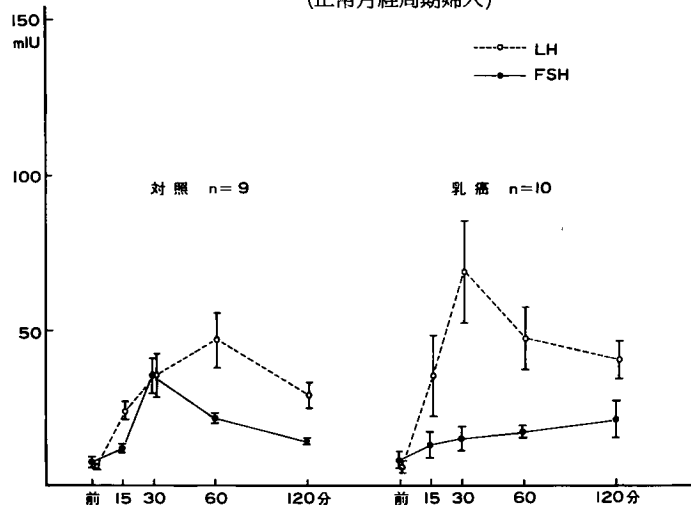
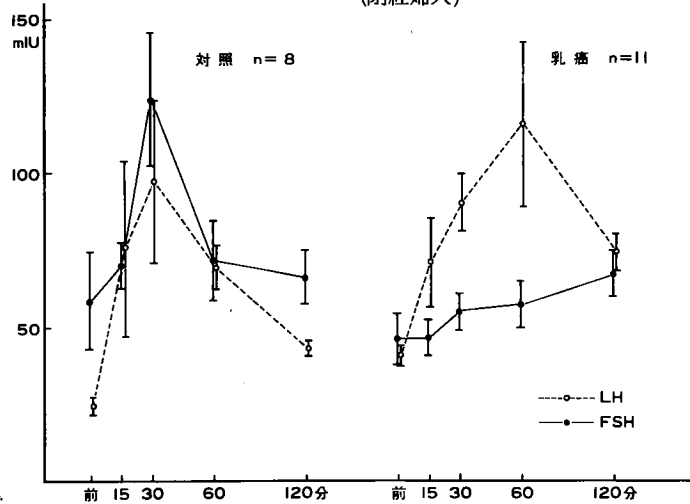


図6 FSH, LHに対するLH-RHの影響
(閉経婦人)



閉経乳癌患者(図6)のLHはLH-RH投与前40.5 ± 3.5 mIU/mlで60分後に2.8倍に上昇し, peak (115.0 ± 26.7 mIU/ml)となり, 120分で下降しはじめる。FSHは閉経前の乳癌と同様にpeakを作らず, 120分値が66.1 ± 8.7 mIU/mlと最も高く, 前値に比べ1.4倍に上昇し, 遷延化の傾向を示している。

乳癌卵巣剔除患者(図7)のLHは60分値が81.6 ± 5.5 mIU/mlで最も高く, 前値のほぼ3倍に上昇し, 120分値は余り下降しない。FSHは30分で72.4 ± 28.4 mIU/mlとなり, 低いpeakとなるが120分値

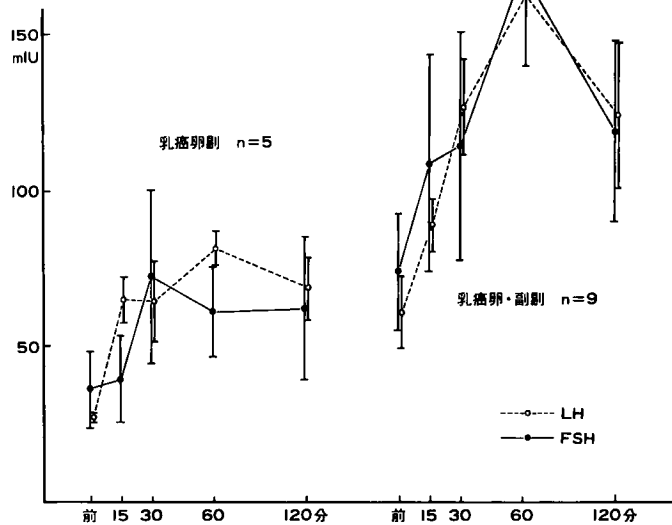
は余り下降せず, 山形のカーブを描かない。LH, FSHともにLH-RHに対する反応が弱く, 遷延化の傾向にある。

乳癌卵巣, 副腎剔除群は, ともに, LH-RH投与前から高値(LH 55.9 ± 6.4 mIU/ml, FSH 74.1 ± 18.9 mIU/ml)で, 60分にpeakを持ち急峻なカーブを描き, LH-RHによく反応している。

第4章 考 按

乳癌の発生や発育に対してホルモンの重要な役割

図7 FSH, LHに対するLH-RHの影響



が知られており、とくに進行、再発乳癌に対するホルモン療法が治療上重要な役割を占めているが、その理論的根拠については明らかでないことが多い。

乳腺疾患と gonadotropin の関連については尿中排泄量の bioassay による定量が行われ、その報告も数多くみられている。しかし、bioassay 法は実験方法からみて、やや不正確であり、手技的に困難な点が多い。

蛋白性ホルモンに対する Radioimmunoassay が開発されて以来、臨床検査レベルで正確に少量の gonadotropin 測定が可能となってきた。

乳腺症婦人の血清 gonadotropin についてみたものが図 2 である。正常月経周期婦人の卵胞期血清 LH 9.0 ± 1.7 mIU/ml, FSH 6.7 ± 1.1 mIU/ml, 黄体期 LH 8.7 ± 1.5 mIU/ml, FSH 3.9 ± 0.4 mIU/ml, 閉経婦人 LH 24.4 ± 2.8 mIU/ml, FSH 41.0 ± 5.9 mIU/ml は他の報告^{6,7,8,9} とほぼ同様の値である。乳腺症患者の血清は卵胞期ではほとんど差はみられないのに比べ黄体期では、FSH 9.9 ± 2.6 mIU/ml と対照に比べやや高く、LH はほとんど差がみられなかった。この値は有意差とは言いがたいが、乳腺症患者の愁訴が黄体期の後半から強いことと相まって興味深いことである。閉経後乳腺症でも LH, FSH は正常に比べやや高値をみとめた。

乳癌患者についてみると閉経前、後ともに LH, FSH は正常に比べやや高いが、FSH の方が著明である。卵胞期では正常値で、LH, FSH はほぼ同値

であるのに比べ、乳癌の場合やや高値となっていることは、乳腺症と異なり、閉経後の状態に近い傾向がみられるが、黄体期ではほとんど差がみられなかった。閉経後の LH, FSH は正常よりも乳癌でやや低くなっている。これを卵巣剔除群でみると LH, FSH の比が、対照群、乳癌の間で差がなく、閉経群とは異なった傾向がみられ、下垂体より FSH が LH に比べ強の状態で分泌されていたものが卵巣剔除により FSH, LH ともに同程度の強さとなり、副腎性 sex hormone の分泌をほぼ同様の強さで刺激産生分泌させることを想像させる。これら卵巣剔除群ならびに卵巣・副腎剔除群はともに、進行、再発乳癌症例であり治療に反応したグループである。

FSH は estrogen と協同して癌組織に働く可能性があることを第 1 編において述べたが、閉経後 FSH 高値の婦人に 0.5 mg 前後の estrogen 製剤投与を継続することは危険があるという結果を示唆している。Heller¹⁰ 等は stibesterol を投与し、尿中 gonadotropin の減少を観察し、0.5 mg/day では変化がなく、5 mg/day で減少すると報告している。また、1 mg/day を連用した場合も減少をみとめており、Smith, Albert¹¹ 等は 0.1 mg を持続投与すると gonadotropin は増量すると報告しており、閉経後婦人の estrogen 血中量が gonadotropin 刺激量に近い long feedback の状態にあることを示唆し、乳癌婦人では LH, FSH ともにやや高値である。中島¹² によると閉経後婦人の estradiol の血中濃度測定値は

不安定で“バラツキ”が多く、乳癌婦人の方が正常婦人と比べやや高値であったと報告し、estradiol だけで long feedback を説明することの困難性を示している。

副腎剔除施行群の LH, FSH を経日的に観察すると、卵巣・副腎剔除同時施行群の LH は 5 日目より、FSH は 3～5 日目より上昇し、14～21 日で最高となる。卵巣剔除後期間において副腎剔除を行ったグループの LH, FSH は術後 1 度下降した後上昇し、21 日で最高となる。閉経後卵巣副腎剔除例は治療に反応せず、予後不良であった 1 例であるが、術前値が低く、術後も LH, FSH の上昇をみなかった。

Loraine 等は閉経後乳癌で stibesterol 治療を行い、術前尿中 gonadotropin が高値のものはよく治療に反応し、治療開始後も有効例の平均値は、無効例に比べ、尿中 gonadotropin はきわめて高かったと報告している。また、Loraine 等は尿中 gonadotropin が 24 時間値で 55 U 以上の場合は、stibesterol に反応しないと推論し、このような特殊な gonadotropin 分泌をみる乳癌患者グループでは異なったホルモン産生の存在を推論している。図 3, 4 の症例でみると明らかなように、治療に早期より反応して血中 gonadotropin が上昇するグループは外科的ホルモン療法によく反応するものと考えられ、また、閉経後、卵巣剔除後でも副腎剔除を加えることにより、術前値より上昇するものは治療によく反応する最低の条件のように思われる。

この研究では short feedback について検索を行う症例をえていないが、ラットの実験でみられた short feedback と同様の現象が、人乳癌でも存在し、そのような症例では、ホルモン療法の適応を誤らなければ興味ある治療効果が期待できるものと考えられる。

LH-RH に対する血清 LH, FSH の変動をみると、閉経前正常婦人では FSH, 30 分, LH, 60 分で peak をみるのに対し、乳癌例では FSH の peak がみられず、LH は 30 分で peak を示している。LH-RH による反応としてみると、乳癌例は LH で早く反応し FSH には反応を示さない。閉経後正常婦人は、LH,

FSH とも 30 分で反応を示し peak を示すが、乳癌例では 60 分で LH の peak をみ、FSH では反応がみられない。閉経前後とも FSH の 120 分までの追跡では peak を示さないことが乳癌患者での LH-RH に対する反応性の特徴と思われ、gonadotropin 分泌機構の変化として注目に値する所見である。

乳癌卵巣剔除群の LH-RH に対する反応は高値であるが正常対照群のパターンに似ており、卵巣副腎剔除群では peak の出現がみられているが閉経後正常婦人のパターンに類似していることは治療の反応性と考えられ興味深い。

第 5 章 結 論

乳癌患者血清、外科的ホルモン療法を加えた進行、再発乳癌患者血清を用いて LH, FSH を Radioimmunoassay 法にて定量を行い、乳癌との関連性について検討した。

1) 乳腺症患者の閉経前後期とも正常婦人に比べ LH, FSH に差をみとめなかった。

2) 乳癌患者の LH, FSH は閉経前後期ともに対照よりやや高値となるが有意差ではない。進行、再発乳癌で両側卵巣剔除婦人の LH, FSH は対照婦人に比べやや高い。両側卵巣副腎剔除患者は乳癌の閉経群、卵巣剔除群よりも高値となる。

3) 両側副腎剔除群の LH, FSH の経日的変動は術直後より 7 日目まで急激に上昇し、術後 1 ヶ月まではゆるやかに上昇する。卵巣剔除後期間において副腎剔除を行った群、閉経後副腎剔除群では術前に比べ余り上昇しない。

4) 乳癌患者に対する LH-RH の影響は、閉経前後とも LH は対照に比べ差がなく、LH は閉経前後とも、LH-RH 投与後 120 分値までに peak を持たず遷延化の傾向にある。両側卵巣剔除群では LH, FSH ともやや遷延化の傾向にあり、両側卵巣・副腎剔除群では LH, FSH ともに LH-RH に強く反応する。

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) Marmorston, J., *Annals New York Academy of Sciences*, **125** : 959, 1966.
- 2) Loraine, J. A., and Bell, E. T., In "Hormonal Steroids", **2** : 281, 1965.
- 3) O'Connor, P. J., and Skinner, L. G., *Acta endocr.*, **45** : 623, 1964.
- 4) Douglas, M., Loraine, J. A., and Strong, J. A., *Proc. R. Soc. Med.*, **53** : 1, 1960.
- 5) Sagaloff, A., Gordon, D., Horwitt, B. N., Schlosser, J. V., and Murison, P. J., *Cancer*, **4** : 319, 1951.
- 6) Cargille, C. M., Ross, G. T., and Yoshimi, T., *J. Clin. Endocr.*, **29** : 12, 1969.
- 7) Saxena, B. B., Demura, H. Gandy, H. M., and Peterson, R. E., *J. Clin. Endocr.*, **28** : 519, 1968.
- 8) 青野敏博, 南川淳之祐, 河村憲一, 谷沢修, 倉智敬一, *日本産科婦人科学会雑誌*, **24** : 821, 1972.
- 9) 谷沢修, 青野敏博, 南川淳之祐, 三宅侃, 衣笠隆之, 角田真紀子, *ホルモンと臨床*, **22** : 1231, 1974.
- 10) Heller, C. G., Chandler, R. E., and Myers, G. B., *J. Clin. Endocr.*, **4** : 109, 1944.
- 11) Smith, R. A., and Albert, A., *Proc. Mayo Clin.*, **33** : 197, 1958.
- 12) 中島和雄, *岡山医学会雑誌*, **88** : 911, 1976.
- 13) Loraine, J. A., Strong, J. A., and Douglas, M., *Lancet*, **2** : 575, 1957.

Studies on the relationship between breast cancer and gonadal hormones

Part II. On gonadal hormones in the human breast cancer

by

Tatuo SHO

Department of Surgery, Okayam University Medical School

Gonadotropin was assessed using radioimmunoassay on sera from the patients with breast cancer.

Lutinizing and follicle stimulating hormones in the sera showed higher level in the breast cancer patients, who are in pre- and post-menopause, ovariectomized and adrenalectomized, than among control. Sequential changes of lutenizing and follicle stimulating hormones in the patients, who had bilateral adrenalectomies due to advanced and recurrent disease, were observed. The hormonal level rose rapidly until the 7th post-operative day, and then was kept rising gradually for one month after the operation. In patients with breast cancer, who are administered lutenizing hormone-releasing hormone, the level of follicle stimulating hormone in the sera elevated rather slowly and no marked peak as compared to healthy subjects.