

DMBA 誘発ラット乳癌に対する Leuprolide Acetate と 5'-Deoxy-5-Fluorouridine の併用療法に関する研究

太田喜久子

DMBA 誘発ラット乳癌に対し、抗エストロゲン剤である tamoxifen (TAM), LH-RH アゴニストである leuprolide acetate (TAP), 化学療法剤である 5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) を用い、化学療法と内分泌療法の併用効果について検討した。

腫瘍増殖抑制率は、TAP と 5'-DFUR の併用投与群が 73.7% と最も高く、ついで TAP 単独投与群の 65.7%, TAM と 5'-DFUR の併用投与群 58.0%, TAM 単独投与群 52.4%, 5'-DFUR 単独投与群 30.0% であった。TAP 単独投与群には、初期の治療効果が認められない症例があったにも拘わらず、TAP と 5'-DFUR 併用投与群では、治療直後より抑制効果がみられ、全例の腫瘍が治療前より縮小し、併用の効果が認められた。

Estrogen receptor (ER) と progesteron receptor (PgR) の治療後の値は、それぞれ TAM 単独投与群、TAP 単独投与群、TAM と 5'-DFUR 併用投与群、TAP と 5'-DFUR 併用投与群において、治療前と比して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

Mitotic index は治療前と比し、TAM 単独投与群、TAP 単独投与群、TAM と 5'-DFUR の併用投与群、TAP と 5'-DFUR の併用投与群において、治療後は有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

各治療群とも抗腫瘍効果の高いものに細胞の組織学的変化が多く認められた。TAM 単独投与群は空胞変性、5'-DFUR 単独投与群は巣状壊死、TAP 単独投与群は扁平上皮化生とそれぞれの治療群に特徴的な変化がみられた。TAP と 5'-DFUR の併用群の扁平上皮化生の出現頻度は TAP 単独群より高く、広範囲に出現する傾向がみられた。

本研究の結果から閉経前 ER 陽性乳癌に対し TAP と 5'-DFUR を併用した化学・内分泌療法が有用であることが示唆された。

(平成 6 年 2 月 26 日採用)

Effects of Chemo-Endocrine Therapy on DMBA-induced Rat Mammary Carcinomas : Combined Effects of Leuprolide Acetate and 5'-Deoxy-5-Fluorouridine

Kikuko Ota

Experimental chemo-endocrine therapy studies were conducted regarding the tumor effect, biochemical ER values using the DCC method, and histological changes, including the mitotic index, in the DMBA-induced rat mammary carcinomas.

The DMBA-induced rats were divided into six groups according to the drug administered: (1) a tamoxifen (TAM group), (2) a leuprolide acetate (TAP-144 group), (3) a 5'-deoxy-5'-fluorouridine (5'-DFUR group), (4) a TAM+5'-DFUR group, (5) a TAP-144+5'-DFUR group, and (6) a control group.

The antitumor effect was most remarkable in the TAP-144+5'-DFUR group with a response rate of 73.7%, followed by the TAP-144 group at 65.7%, the TAM+5'-DFUR group at 58.0%, the TAM group at 52.4% and the 5'-DFUR group at 30.0%.

After receiving treatment, biochemical ER and PgR values in the cancer cells decreased in the TAM group, TAP-144 group, TAM+5'-DFUR group and TAP-144+5'-DFUR group. The mitotic index decreased in the TAM group, TAP-144 group, TAM+5'-DFUR group and TAP-144+5'-DFUR group.

Histologically, vacuolization was characteristically observed in 50% of the TAM group, focal necrosis in 50% of the 5'-DFUR group, and squamous metaplasia in 40% of TAP-144 group.

The most significant effect against DMBA-induced rat mammary carcinomas was observed in the TAP-144+5'-DFUR group. Thus, chemo-endocrine therapy seems to be more effective than chemotherapy or endocrine therapy alone for the treatment of breast cancer. (Accepted on February 26, 1994) *Kawasaki Igakkaishi* 20(2): 85-100, 1994

Key Words ① Chemo-endocrine therapy
 ② Luteinizing hormone-releasing hormone agonists (LH-RH)
 ③ DMBA-induced rat mammary carcinoma
 ④ Leuprolide acetate ⑤ Breast cancer

緒 言

乳癌の多くはホルモン依存性の癌であり、その発生にはエストロゲンの存在が強く関与する。乳癌組織がホルモン依存性であるか否かは、癌細胞中にホルモンレセプターが存在するかどうかで判定される。これは、Jensenら¹⁾やO'Malleyら²⁾の研究により解明され、臨床的に広く普及されるようになった。つまり、癌細胞がエストロゲン依存性であるか否かは、癌細胞内の estrogen receptor (ER) を証明することにより判定され、ER に対する種々の測定法が開発されてきた³⁾⁻⁵⁾。しかし、ER 陽性と判定された乳癌組織内には、ホルモン依存性癌細胞と非依存性癌細胞が混在することが報告されている⁶⁾。さらに、乳癌の発育過程あるいは治療の過程で、ER

値が減少したり、陽性から陰性に転じたという報告もなされている⁷⁾⁻⁹⁾。したがって、ER 陽性乳癌に対する治療は、内分泌療法のみでは十分な効果が得られないことが考えられるため、抗癌剤を併用する化学・内分泌療法が行われている。しかし、現在臨床的に行われている種々の化学・内分泌療法の有用性については、必ずしも明かではない。そこで、ヒト乳癌に対する化学・内分泌療法の治療成績の向上を計る目的で、7,12-dimethyl-benz(α) anthracen, DMBA 誘発ラット乳癌モデルを用い、基礎的検討ならびに各種の治療法の効果について検討した。

実験材料および実験方法

I. DMBA 誘発ラット乳癌の基礎的検討

1) 対象

使用したラットは、日本クレア（株）より入手した Sprague-Dawley 系ラット 5 週齢雌 20 匹である。当大学実験動物飼育センターで all fresh open system, 室温 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 14 時間照明, オリエンタル酵母(株)MF 飼育用飼料ならびに飲用水の自由摂取の条件下で 1 週間飼育した後、以下の実験を行った。

2) DMBA 誘発ラット乳癌の作製

7,12-dimethyl-benz(α)anthracen (DMBA, Sigma 製)を胡麻油で溶解し, 7.5 mg/100 g 体重を胃内に tube を挿入して週 1 回, 2 週連続で計 2 回投与した (投与総量 15 mg/100 g 体重)。

3) DMBA 誘発ラット乳癌の組織・生化学的検討

ラット乳腺に触知し得る腫瘍が発現したものを発癌ラットとして, 発生した腫瘍の大きさを経皮的に測定し, 16 週目まで観定した後に屠殺し, 腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍を 2 分割し, 一方は, -80°C に冷凍し dextran coated charcoal 法 (DCC 法)³⁾ による生化学的 ER 値の測定に供した。ER の cut off 値は 10 fmol/mg protein とし, それ以上のものを陽性とした。

他方は, 10% 中性ホルマリンで 12~24 時間固定した後, hematoxylin-eosin 染色による薄切標本を作製して, 乳癌取扱規約¹⁰⁾ に従った組織分類を行った。

II. DMBA 誘発ラット乳癌に対する化学療法, 内分泌療法および併用療法の治療効果

1) 対象

対象として用いたラットおよび DMBA 誘発乳癌の作製は実験 I と同様である。DMBA 投与後 16 週までに腫瘍が発生し, その体積が $4 \sim 13 \text{ cm}^3$ に達した担癌ラット 60 匹を実験材料として用いた。また, 実験に用いた腫瘍は, 各ラットにつき最初に発現のみられたものを選択した。腫瘍体積が $4 \sim 13 \text{ cm}^3$ となった時点で腫瘍体積の 30~50% を生検した。生検した腫瘍を 2 分割し, 一方は ER 値および progesteron receptor (PgR) 値の測定に, 他方は組織学的検討に供した。なお, PgR の測定は DCC 法で行い, その cut off 値は 13 fmol/mg protein とし, それ以上のものを陽性とした。さらに, 腫瘍径が生検時とほぼ同等になった時点で各種の薬剤を用いた実験を開始した。

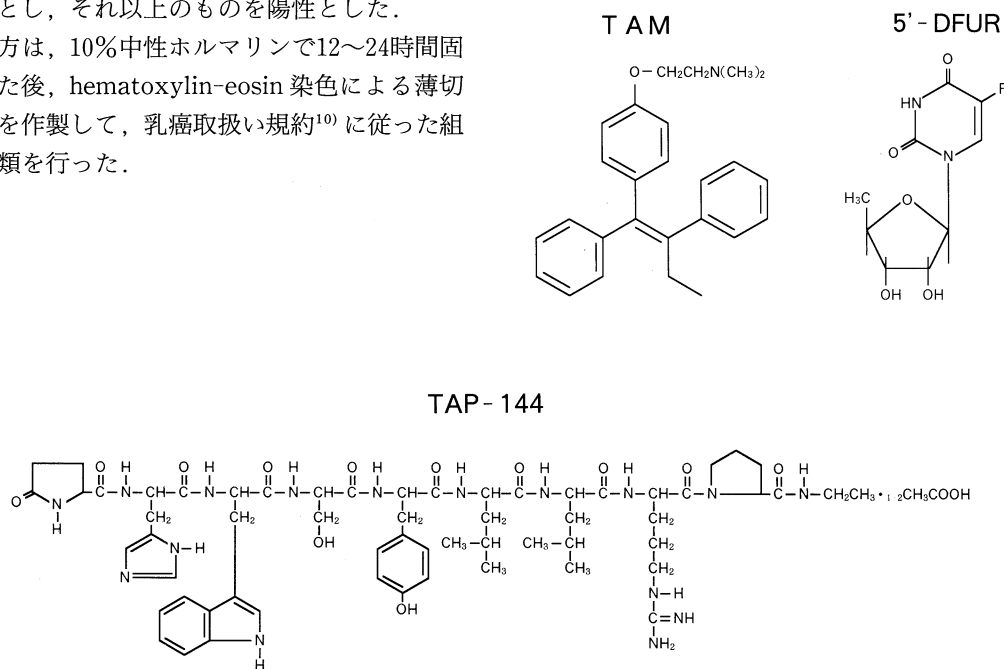


Fig. 1. Chemical formula of the agents

2) 各種薬剤の投与方法

内分泌療法剤として, tamoxifen (TAM) と leuprolide acetate (TAP-144) を, 化学療法剤として5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) を使用した(Fig. 1). これらの投与量および投与方法を Figure 2 に示す. 1群を各々10匹とし, 1薬剤を投与した単独群と, TAMと5'-DFUR, およびTAP-144と5'-DFURの2剤を同時投与した化学・内分泌併用群(以後それぞれTAM+5'-DFUR群とTAP+5'-DFUR群と略す)を設けた. また, コントロール群として生理的食塩水0.5 ml/100 gを経口投与した10匹を使用した. TAMは0.1 mg/100 gを, 5'-DFURは2.5 mg/100 gを連続14日間経口投与し, TAPは0.01 mg/100 gを第1日目のみ皮下注射した. TAM+5'-DFUR群では, それぞれの単独群と同量を14日間連続で経口投与し, TAP+5'-DFUR群では単独群と同量をTAPは第1日目のみ, 5'-DFURは連続14日間経口投与した.

3) 抗腫瘍効果の判定法

治療後, 第3, 7, 10日目に腫瘍の大きさを経

皮的に測定し, 15日目に屠殺し腫瘍を摘出した. 摘出した腫瘍を2分割し, 一方をER値とPgR値の測定に, 他方を組織学的検討に供した.

なお, 抗腫瘍効果の判定はGreanらの報告¹¹⁾に従って以下のように行った. すなわち, 腫瘍の最長径(L)とこれと直交する最大横径(W)を測定し, 推定腫瘍体積を $w=L \times W^2/2$ の式で算出した. 実験終了時の治療群の平均腫瘍体積をT, 実験終了時のコントロール群の平均腫瘍体積をCとし, 腫瘍抑制率(Inhibition Rate: I. R.) $= (1 - T/C) \times 100$ (%)を求め, I. R. が58%以上の場合に有効, 80%以上の場合に著効, 42%以下の場合に無効とした.

核分裂像の検討はHE標本で行った. 核分裂の個数は, 標本の最大割面を400倍で鏡検し, 10視野における核分裂の個数を数え, 1視野における平均値をmitotic indexとした.

なお統計学的な有意差検定は, Stunderd's *t*-testによった.

結 果

I. DMBA誘発ラット乳癌の基礎的検討

1. 腫瘍の発生

腫瘍は早いものでは, DMBA投与後3週目から触知可能となったが, 触知可能となるまでの平均期間は, 7.4週であった(Fig. 3). また, 全ラットの触知可能な腫瘍の発生率は, 70% (20匹中14匹)であった. 1個体の腫瘍発生個数は1個~6個であり, 平均2.5個で, 14匹の腫瘍個数は合計30個であった.

触知可能な腫瘍発現後の腫瘍の増殖曲線を Figure 4 に示した. 腫瘍が触知可能な大きさに達した後は指数関数的な増殖を示した. また, 10週

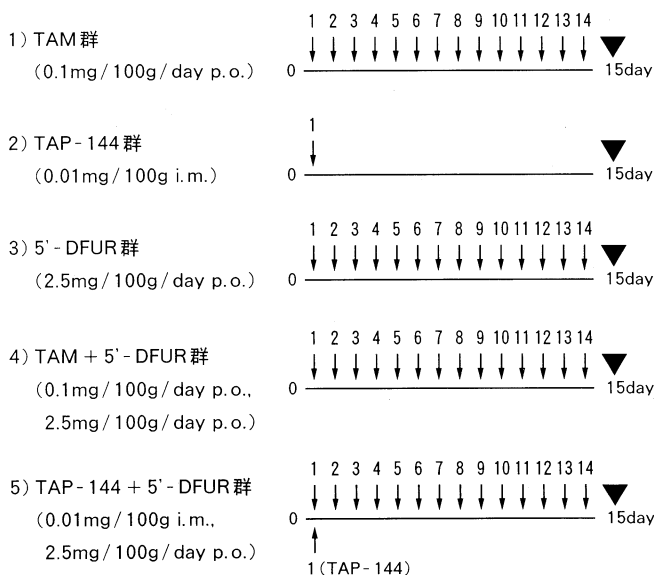


Fig. 2. Experimental studies of chemo-endocrine therapy in DMBA-induced rat mammary carcinoma

目の腫瘍体積は 37 ± 11 (mean \pm S.D.) cm^3 で、10週以後における増殖曲線はほぼ横這いとなった。

2. 腫瘍の生化学的および組織学的所見

1) 腫瘍の ER 値

腫瘍 30 個の組織内の ER 値は 28.5 ± 16.4 fmol/mg prot. で 30 腫瘍中 29 例 (97%) に ER 発生が認められた (Fig. 5).

2) 組織型

DMBA により誘発された腫瘍 30 個のうち、組織学的分類では、papillary type が 8 例 (26.7%)、tubular type が 9 例 (30.0%)、solid type が 10 例 (33.3%)、cribriform type が 3 例 (10.0%) に認められた。scirrhous type は 1 例も認められなかった (Table 1).

II. DMBA 誘発ラット乳癌に対する化学療法、内分泌療法および併用療法の治療効果

1. 60 腫瘍における治療前の組織・生化学的検討

本実験に用いた 60 腫瘍の組織型は、papillary type が 2 例 (3.0%)、tubular type が 25 例 (41.2%)、solid type が 33 例 (55.0%)、cribriform type が 3 例 (5.0%) 認められた。ER 値は 23.79 ± 13.5 fmol/mg prot. で 87% の陽性率であった。PgR 値は 30.7 ± 11.4 fmol/mg prot. で 85% の陽性率であった。組織型、ER 値、PgR 値は各治療群間に差が認められなかった。

2. 各治療群における腫瘍の増殖曲線

治療効果の経時的変化は、薬剤投与前の腫瘍体積に対する変化率で表わした (Fig. 6a-f)。コントロール群では、全

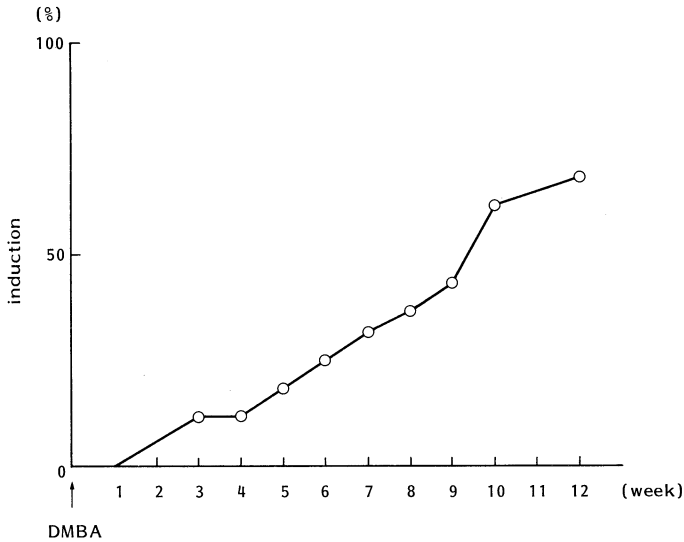


Fig. 3. Incidence of palpable tumor after administration of DMBA

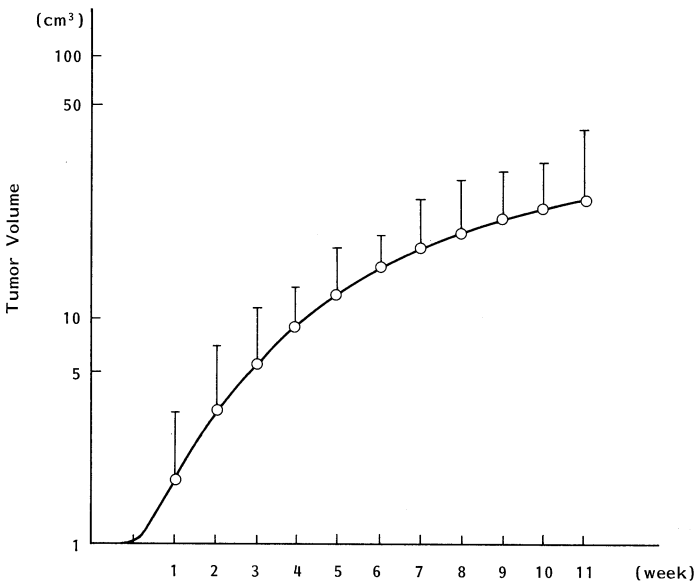


Fig. 4. Growth curve of DMBA-induced rat mammary carcinoma (n=20)

(fmol/mg prot.)

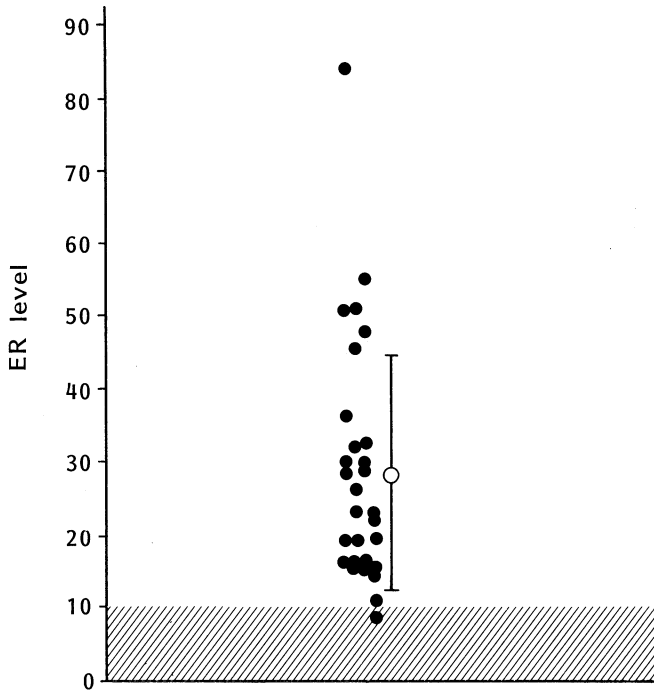


Fig. 5. ER values of DMBA-induced rat mammary carcinoma

Table 1. Histological classification of DMBA-induced rat mammary carcinoma

Histology	%	No. of rats
Papillary	26.7	8/30
Tubular	30.0	9/30
Solid	33.3	10/30
Cribriform	10.0	3/30

Table 2. Antitumor effects of chemo-endocrine therapy

Drug	I.R. (%)	response
TAM	52.4	negative
5'-DFUR	30.0	negative
TAP-144	65.7	positive
5'-DFUR+TAM	58.0	positive
5'-DFUR+TAP	73.7	positive

例腫瘍の増大が認められ、実験終了後の体積比は 3.32 ± 1.20 であった。TAM群は、早期に腫瘍の縮小がみられないものもあった。この群の実験終了後の体積比は 0.77 ± 0.68 でコントロール群と比し有意差がみられた ($p < 0.05$)。TAP群は、早期の治療効果がみられず、7日以降に

効果が現れてくるものがあったが、実験終了後の体積比は 0.53 ± 0.63 でコントロール群と比し有意差がみられた ($p < 0.05$)。5'-DFUR群は、治療直後より増殖が抑制されるものが多かった。10例中1例ではあるが、実験終了後の体積比が5.74とコントロール群と差がなく、全く効果の認められないものがあった。実験終了後の体積比は 1.46 ± 1.60 でコントロール群と比し有意差がみられた ($p < 0.05$)。TAM+5'-DFUR群は、治療直後より抑制効果がみられた。実験終了後の体積比は 0.78 ± 0.43 でコントロール群と比し有意差がみられた ($p < 0.05$)。TAP+5'-DFUR群は、治療直後より抑制効果がみられた。実験終了後の体積比は 0.53 ± 0.23 でコントロール群と比し有意差がみられた ($p < 0.05$)。

3. 腫瘍増殖抑制率 (Table 2)

腫瘍増殖抑制率 (Inhibition Rate: I.R.) を Table 2 に示す。腫瘍の増殖抑制率が58%以上の有効例は、TAP群、TAM+5'-DFUR群、TAP+5'-DFUR群に認められた。TAP+5'-DFUR群は他の群と比較して、I.R. が73.7%と最も高い有効率を示

した。

4. 治療前後のER値およびPgR値の変化 (Figs. 7, 8)

治療前後におけるER値は、コントロール群ではそれぞれ、 19.8 ± 11.7 fmol/mg prot. と 18.5 ± 12.6 fmol/mg prot. で、TAM群では

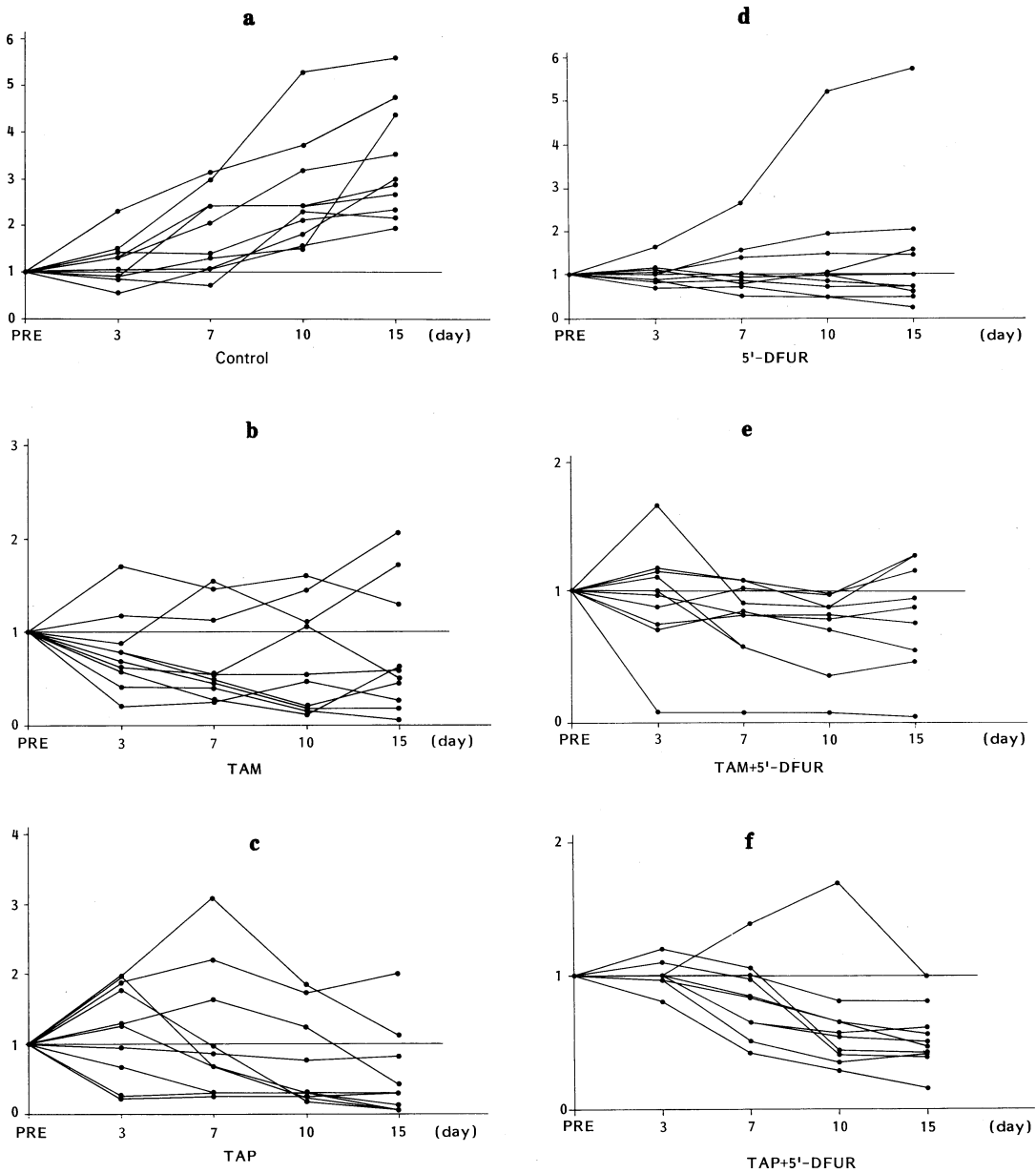


Fig. 6 a-f. Tumor growth curves after chemo-endocrine therapy

25.5±13.3と0, TAP 群では28.4±22.3と13.4±8.5, 5'-DFUR 群では47.3±36.2と22.4±20.5であった。また, TAM+5'-DFUR 群では22.0±15.4と0, TAP+5'-DFUR 群では, 27.0±15.4と6.2±3.7であった。すなわち, TAM 群, TAP 群, TAM+5'-DFUR 群, TAP+5'-DFUR 群は治療後のER 値は治療前

のそれに比して有意に低値であった(p<0.05)。治療前後におけるPgR 値は, コントロール群ではそれぞれ, 40.5±19.5 fmol/mg prot. と38.2±19.1 fmol/mg prot. で, TAM 群では28.1±13.3と16.3±10.1, TAP 群では, 30.7±14.0と3.6±3.5, 5'-DFUR 群では33.9±17.6と23.2±16.1であった。また,

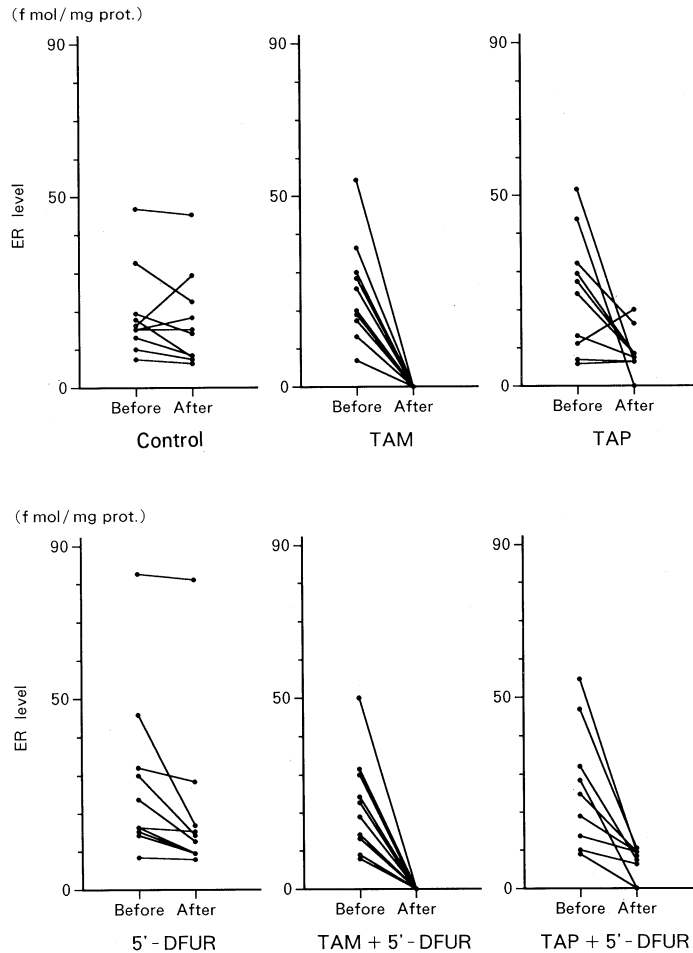


Fig. 7. ER values in DMBA-induced rat mammary carcinoma following chemo-endocrine therapy

TAM+5'-DFUR 群では 30.0 ± 12.7 と 13.0 ± 11.5 , TAP+5'-DFUR 群は、 33.3 ± 17.9 と 6.4 ± 4.7 であった。すなわち、TAM 群、TAP 群、TAM+5'-DFUR 群、TAP+5'-DFUR 群は治療後の PgR 値は治療前のそれに比して有意に低値であった ($p < 0.05$)。

5. 治療前後における癌細胞の変化と mitotic index (Fig. 9)

治療前後の mitotic index は、コントロール群ではそれぞれ、 2.3 ± 1.6 個/HPF と 5.6 ± 3.6 個/HPF であった。TAM 群では 2.7 ± 2.6 と 0.9 ± 0.7 , TAP 群では 2.1 ± 1.7 と 0.4 ± 0.3 , 5'-DFUR 群では 2.7 ± 2.4 と 2.1 ± 1.9 であった。ま

た、TAP+5'-DFUR 群では 2.2 ± 1.7 と 0.5 ± 0.3 , TAP+5'-DFUR 群では 2.0 ± 1.2 と 0.3 ± 0.2 であった。TAM 群、TAP 群、TAM+5'-DFUR 群、TAP+5'-DFUR 群は治療後の mitotic index 値は治療前のそれに比して有意に低値であった ($p < 0.05$)。

6. 治療前後における癌細胞の変化

癌細胞の変化と治療法とを比較した (Table 3)。TAM 群では空胞変性 (Fig. 10) が50%と多く、巣状壊死は33%、扁平上皮化生は10%にみられた。5'-DFUR 群では巣状壊死 (Fig. 11) が50%、扁平上皮化生は10%、空胞変性は10%にみられた。TAP 群では扁平上皮化生 (Fig.

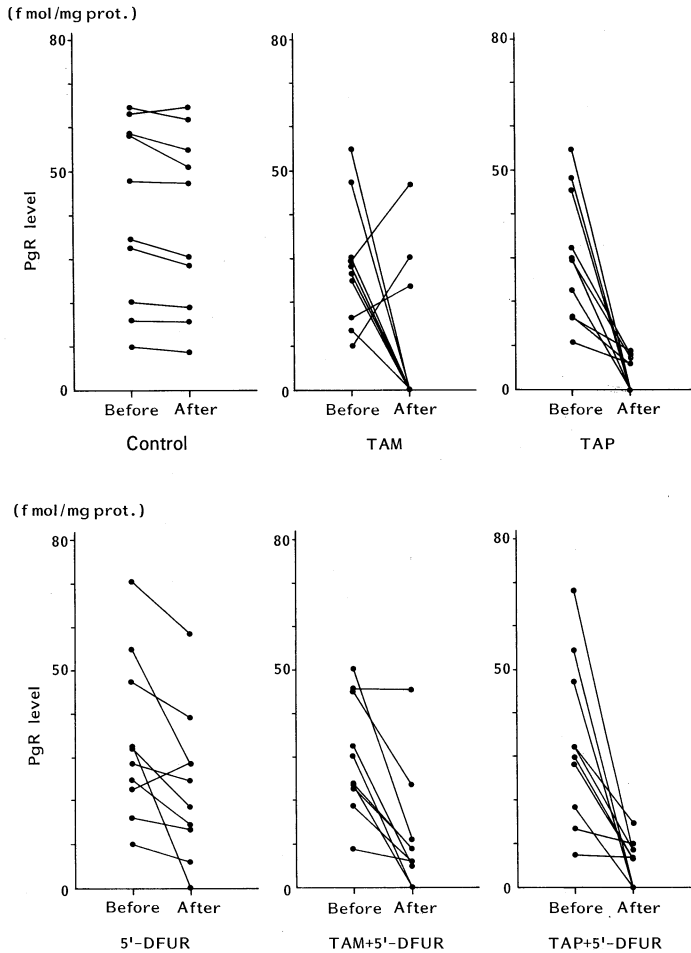


Fig. 8. PgR values in DMBA-induced rat mammary carcinoma after chemo-endocrine therapy

12) が40%，巢状壊死が33%みられたが，空胞変性はみられなかった．TAM+5'-DFUR 群では，巢状壊死は60%，空胞変性は10%にみられた．TAP+5'-DFUR 群は扁平上皮化生が70%，巢状壊死が30%にみられた．

考 察

乳癌に対する内分泌療法は，1896年の Beatson による卵巣摘除術に始まり，閉経前乳癌の内分泌療法的主流として使用されていた．しかし，抗エストロゲン剤 TAM が，1971年に開発されて以来その良好な治療効果と副作用が極めて少

ないことから，これが ER 陽性乳癌に対する内分泌療法の第一選択の治療剤となり現在に至っている．TAM は，非ステロイド系抗エストロゲン剤であり，主として乳癌細胞のエストロゲンレセプターに結合することにより抗腫瘍作用を發揮する¹²⁾．TAM は，ER 陽性乳癌では44~69%の高い奏効率を示すが，特に閉経後症例での奏効率が高いと報告されている．しかし，ER 陰性乳癌ではその奏効率は0~14%でほとんど効果が認められていない¹³⁾．一方，化学療法は ER 陰性乳癌にも有効であり，Cyclo-phosphamide, 5-fluorouracil (5-FU) およびその誘導体, Mitomycin C, Adriamycin あるいは

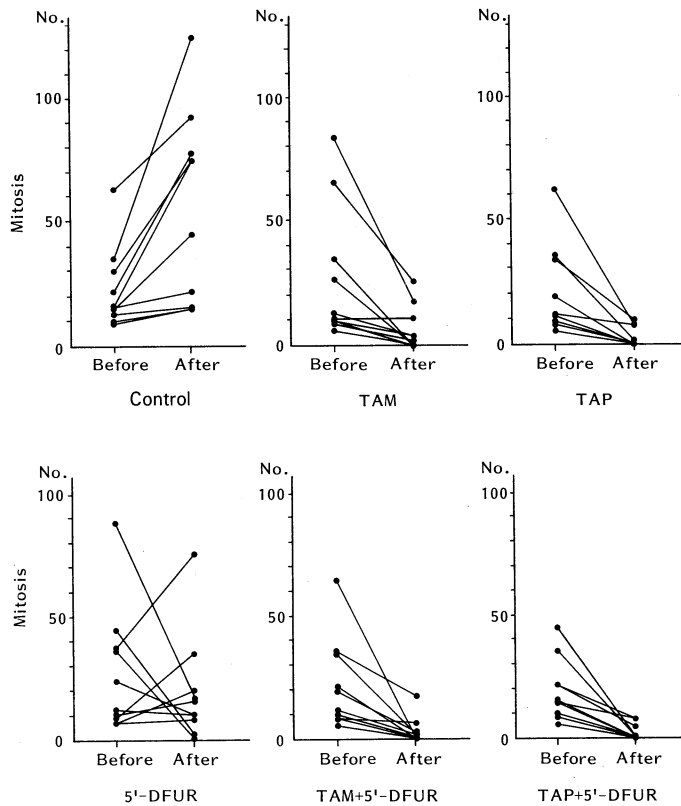


Fig. 9. The number of mitoses in DMBA-induced rat mammary carcinoma following chemo-endocrine therapy

Table 3. Characteristic histological findings after chemo-endocrine therapy

chemo-endocrine therapy	Histological change				
	TAM	TAP-144	5'-DFUR	TAM+5'-DFUR	TAP+5'-DFUR
Vacuolization	50% (5/10)	0% (0/10)	10% (1/10)	10% (1/10)	0% (0/10)
Focal necrosis	33% (3/10)	33% (3/10)	50% (5/10)	60% (6/10)	30% (3/10)
Squamous metaplasia	10% (1/10)	40% (4/10)	10% (1/10)	0% (0/10)	70% (7/10)

Methotrexateなどがその代表的なものである。

冒頭で述べたが、ERのモノクローナル抗体を用いた研究から、ER陽性と判定された乳癌組織内にも、ホルモン依存性の癌細胞と非依存性の癌細胞が混在することが明らかにされてきた⁶⁾。したがって、理論的にも、TAMによる内分泌単独療法よりも、抗癌剤を併用する化学・内分泌療法の方がより有用であると考えられるので、これを背景として治療効果の増強を目的とした化

学・内分泌療法が行われるようになってきた。しかし、臨床的研究の中には、従来の化学療法と内分泌療法の同時併用が有用ではなかったとの報告もみられるが^{14),15)}、これは、薬剤の選択が大きく関係しているためと考えられる。そこで著者は、新しく開発されたTAP-144と前述したTAMによる内分泌療法と5'-FU系抗癌剤5'-DFURに着目し、これらの併用による化学・内分泌療法の有用性を検討した。TAP-144は、

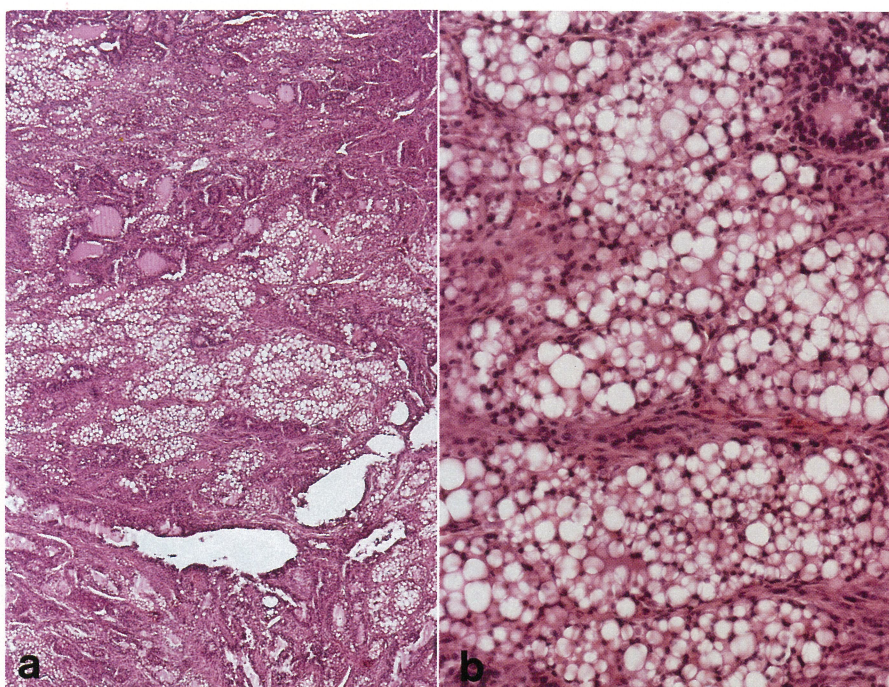


Fig. 10. Photomicrograph showing intracellular vacuolization in cytoplasm after administration of TAM (HE : a \times 100 b \times 400)

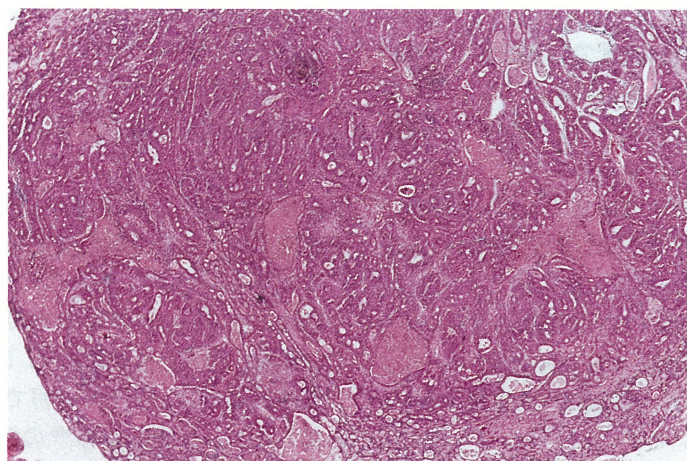


Fig. 11. Photomicrograph showing focal necrosis in glandular tissue after administration of 5'-DFUR (HE : \times 60)

LH-RH アゴニストであり、卵巣摘除術と同様の作用を示す薬剤であるとされている。この薬剤は、LH-RH 受容体の down regulation により下垂体細胞の反応を低下させ、コナドトロピン分泌を抑制し、性ホルモン分泌を抑制する作用を示すとされている¹⁶⁾。すなわち、本剤は下垂体

脱感作 (desensitisation) をおこし、黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度を低下させ、閉経前患者のプロゲステロンおよびエストラジオールの血漿値を3~4ヶ月以内に卵巣摘除後または閉経後の値にまで低下させる¹⁷⁾。したがって、閉経前乳癌のホルモン療法

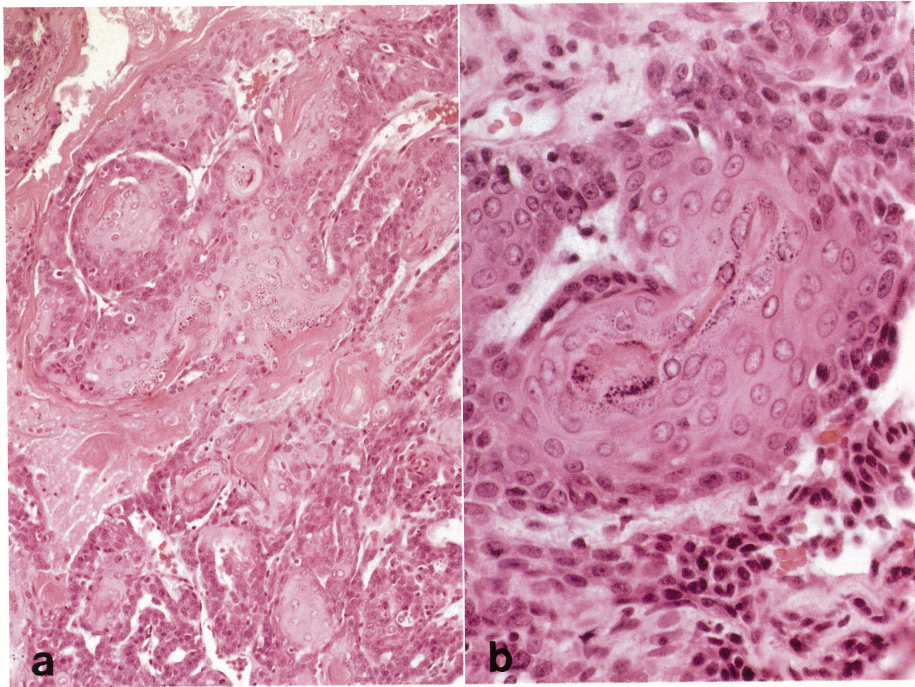


Fig. 12. Photmicrograph showing squamous metaplasia in glandular tissue after administration of TAP (HE: a×200 b×400)

剤として有用であり、欧米では1985年から臨床応用が開始されているが、わが国では、現在臨床第2相試験が行われているのが現状である。

一方、5'-DFURは、Cookら¹⁸⁾によって合成された比較的新しいフッ化ピリミジン誘導体である。従来のフッ化ピリミジン系薬剤が、主として肝臓で5-FUに変換されるのに対し、5'-DFURは、腫瘍組織内で比較的高い活性がみられる pyrimidine nucleoside phosphorylase によって5-FUに転換され、抗腫瘍性を発揮することが明らかにされている¹⁹⁾。

DMBA誘発ラット乳癌は、1961年 Hugging²⁰⁾が Sprague-Dawley系ラットに7,12-dimethylbenz (α) anthracen を経口的に投与して発癌させたことに始まる。1966年、Teller²¹⁾、Shimkin²²⁾らはDMBA誘発ラット乳癌が他の実験乳癌に比べてホルモン依存性が強い腫瘍であることを明らかにした。その後、DMBA誘発ラット乳癌はホルモン依存性に関してのみでなく、組織学的にもヒト乳癌に類似していること

が明らかとなった^{23),24)}。したがって、著者が使用したDMBA誘発ラット乳癌は閉経前のヒト乳癌の実験モデルとして十分な条件を有していると思われる。

Hugging²⁰⁾らはDMBAを投与すると24-61日の間にラットに全例乳癌を発生させることができると報告している。しかし、今回の実験では、16週までの乳癌の発生率は70%にとどまった。DMBA誘発ラット乳癌は、50日～100日の間に乳癌が発生し、4～6カ月で全例腫瘍は自然退縮したという Youngら²⁵⁾の報告があり、実験IIでは、腫瘍の自然退縮率が最も低いとされるDMBA投与後16週以内に発生した腫瘍を対象とした。

今回検討したDMBA誘発ラット乳癌は、30個の腫瘍のうち97%がER陽性であり、ホルモン依存性の腫瘍であることが確認された。組織学的特徴として、solid type, tubular typeが多く、scirrhous typeは認められなかった。scirrhous typeが認められないことや mitosisが多い

という事実はDMBA 誘発ラット乳癌がヒト乳癌と完全に一致するものではないことを意味している。各治療群における腫瘍体積は、コントロール群に比べて、有意に縮小した($p < 0.05$)。各治療群の増殖曲線の特徴をみると、TAM 群では、早期の治療効果のみられないものが存在した。TAP 群では、治療効果が7日以降に現れ、初期効果が認められないものが3例みられた。この現象の説明として、TAP-144は、投与初期に一過性にLH、FSHの過剰分泌を起こし、それに伴ってエストロゲンの過剰分泌を起こすと報告されており²⁶⁾、そのために、一時的に腫瘍の増大が起こったことも考えられる。一方、5'-DFUR 群は、治療直後より増殖が抑制されるものが多く、TAM や TAP と比べて増殖様式が全く異なっていた。しかし、全くの無効例が1例にみられた。TAM+5'-DFUR 群は、治療直後より抑制効果がみられ、全例縮小率が1.3以下であった。TAM 群の平均の縮小率は0.77であり、TAM+5'-DFUR 群のそれは0.78と差が認められず併用効果が明らかではなかった。その理由としてTAM には直接の殺細胞効果はなく、癌細胞をG₁ 早期にとどめて増殖を抑制するため、S 期の細胞数を減少させ、5'-DFUR の感受性を低下させた可能性が考えられる²⁷⁾。TAP+5'-DFUR 群はTAP 群と異なり、治療直後より抑制効果がみられ、全例が治療前より縮小化している(1.0以下)。これは、治療早期に5'-DFUR による腫瘍抑制が働いたために腫瘍の一時的増大が起こらなかったためと考えられる。

腫瘍増殖抑制率については、TAP+5'-DFUR 群が73.7%と最も高く、両者を併用する化学・内分泌療法の有用性が示された。

乳癌組織の生化学的ER 値の測定には、dextran coated charcoal (DCC) 法やenzyme immunoassay (EIA) が用いられている。EIA は、1980年Green らにより作製されたMCF-7 細胞の細胞質分画中のER に対するモノクローナル抗体を用いた測定法である。著者は、これらの2つの方法により、腫瘍のER の測定を試みたが、DCC 法では陽性と判定された検体がEIA で

はすべて陰性であった。EIA は、ラットER 抗体を用いた固相サンドイッチ法であるため本実験には不相当と考えられた。したがって、この結果より著者はDCC 法によるER 測定を行った。

TAM 群、TAP 群、TAM+5'-DFUR 群、TAP+5'-DFUR 群において、治療前と比べて治療後のER 値は有意に低下した。これらの群は内分泌療法が加味されており、そのために、ER 陽性癌細胞が減少したと考える。特に、TAP 群やTAP+5'-DFUR 群は抗腫瘍効果が高いためにER 陽性細胞数がより減少したと考えられる。TAM 投与時の腫瘍組織内のER は高濃度のTAM により占領されているため、DCC 法では、TAM を投与した群のER 値が実際より低く表れる可能性があるという報告がある²⁸⁾。このため著者は、エストロゲン依存性の指標であり、ER 値と正の相関があるといわれているProgesteron Receptor (PgR) も同時に測定した。その結果、TAM 群ではPgR 値も腫瘍の縮小率が高い7例は、0 fmol/mg protein となった。また腫瘍の増殖が抑制されなかった3例は、PgR 値が治療前と比し増加傾向を示した。TAM+5'-DFUR 群も有効例は、PgR 値の減少傾向がみられ、無効例では増加傾向がみられた。したがって、TAM 群もTAM+5'-DFUR 群も治療によりER 陽性癌細胞が減少したと考える。5'-DFUR 群では、治療後のER 値は減少傾向を示したが有意な低下を示さなかった。これは5'-DFUR の抗腫瘍効果が他の治療群に比して充分でなかったためと思われる。内分泌療法を行うことによりDMBA 誘発ラット乳癌では癌組織中のER 値は低下し、ER 陰性へと変化していく性質をもっていると思われた。これは、ER 陽性細胞が内分泌療法によく反応して死滅したためと思われる。しかし、治療により癌細胞の絶対数が減少し、線維芽細胞などの癌細胞以外のER 陰性細胞が相対的に増加し、その結果、癌組織のER 値が減少した可能性もある。

Mitotic index の変化を治療前後で比較した結果、コントロール群では有意にmiosis の増加

が認められた。5'-DFUR 群以外の治療群では mitosis は有意な減少を示した。5'-DFUR が無効であった1例は、治療後の mitosis の増加が認められたが、これは抗腫瘍効果が十分でなかったためと考えられる。TAM は癌細胞を G₁ 早期にとどめて増殖を抑制するため²⁷⁾ mitosis が減少したと思われる。

各治療群とも抗腫瘍効果の高いものに細胞の変化が多く、各治療群に特徴的な細胞変化がみられた。治療前後の癌細胞の変化を検討したところ TAM 群では空胞変性が特徴的に認められた。また、5'-DFUR 群では巣状壊死が、TAP 群では扁平上皮化生と巣状壊死が多く認められた。使用した薬剤によって治療後の細胞像に差が生じたのは、各薬剤の作用機序が異なるためと思われる。TAM 治療後に認められた空胞変性は、乳癌の特殊型である分泌癌の組織像と類似している。分泌癌^{29),30)} は若年者にみられる乳癌で、細胞内に空胞や顆粒を有し、ER は陰性である。実験腫瘍にみられた空胞変性が分泌癌と同じ発生メカニズムで生ずるという証拠はないが、その類似性は非常に興味深い所見であり、今後の研究に期待される。5'-DFUR 群で巣状壊死が認められたのは、同薬剤が内分泌療法と異なり、癌細胞に急速な殺細胞効果を与えたためと考えられる。TAP 群で扁平上皮化生が特徴的に認められた。Willis ら³¹⁾ は扁平上皮化生が乳癌の約 1% に認められると報告している。扁平上皮化生の原因は不明ではあるが、皮膚付属器腫瘍にみられる変化と同様に虚血状態により生ずる可能性がある³²⁾。また、Bonser³³⁾ らはエストロゲン過剰状態では扁平上皮化生や角化が起り易いと報告しており、TAP によるエストロゲンの分泌異常がなんらかの形で関与しているものと考えられる。

結 語

DMBA 誘発ラット乳癌を用いて LH-RH アゴニストである leuprolide acetate と 5-FU 系の抗癌剤である 5'-deoxy-5-fluorouridine の治療効果を検討した。

1. TAP+5'-DFUR 群の腫瘍増殖抑制率は 5 群間で最も高値であった。また、TAP 単独群で認められた治療初期の腫瘍増殖はみられず、全例に治療直後より増殖抑制効果が認められた。TAM+5'-DFUR 群と比較しても TAP+5'-DFUR の併用療法の有用性が示された。

2. TAM 群、TAP 群、TAM+5'-DFUR 群、TAP+5'-DFUR 群において、治療後の ER 値、PgR 値および mitotic index は治療前に比べて有意に低下し、治療効果の程度を反映した。

3. 各治療群とも抗腫瘍効果の高いものに細胞の変化が多く認められ、TAM 単独投与群は空胞変性、5'-DFUR 単独投与群は巣状壊死、TAP 単独投与群は扁平上皮化生とそれぞれの治療群に特徴的な変化がみられた。

4. 以上の成績から閉経前 ER 陽性乳癌に対し TAP と 5'-DFUR を併用した化学・内分泌療が極めて有用であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御検閲を賜りました川崎医科大学 内分泌・甲状腺外科教室 原田種一教授に深謝いたします。また、直接御指導を賜りました同教室 園尾博司助教授、病理学教室 真鍋俊明助教授に心から謝意を表します。また、御協力いただきました内分泌・甲状腺外科教室、病理学教室の諸兄に感謝致します。

本論文の要旨は、第1回日本乳癌学会総会(平成5年9月、東京)第52回日本癌学会(平成5年10月、仙台)において発表した。

文 献

- 1) Jensen EV, Block GE, Smith S, Kyser K, Desombre ER: Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. Nat. Cancer Inst. Monograph. 34: 55-70, 1971

- 2) O'Malley BW, Means AR : Female steroid hormones and target cell nuclei. *Science* 183 : 510—520, 1974
- 3) McGuire WL, Julian JA : Comparison of macromolecular binding of estradiol in hormone dependent and hormone independent rat mammary carcinoma. *Cancer Res.* 31 : 1440—1445, 1971
- 4) Green LG, Nolan C, Eugler JP, Jensen EV : Monoclonal antibodies to human estrogen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 5115—5119, 1980
- 5) Rasmussen BB : Immunohistochemical detection of estrogen receptors in paraffin sections from primary and metastatic breast cancer. *Path. Res. Pract.* 185 : 856—859, 1989
- 6) King WJ, Greene GL : Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in nuclei target cells. *Nature* 307 : 745—747, 1984
- 7) Kiang DT, Frenning DH, Goldman AI, Ascensao VF, Kennedy BJ : Estrogen receptors and response to chemotherapy and hormonal therapy in advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 299 : 1330—1334, 1987
- 8) Nomura Y, Yamagata J, Kondo H : Significance of estrogen receptor assay in cytotoxic chemotherapy in relation to previous endocrine therapy of advanced breast cancer. *Gann* 70 : 473—482, 1979
- 9) Nomura Y, Tashiro H, Shinozuka K : Changes of steroid hormone receptor content by chemotherapy and/or endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer* 55 : 546—551, 1985
- 10) 乳癌研究会編：乳癌取扱の規約，第11版，東京，金原出版。1992
- 11) Green RI, Coesy E : Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological system. *Cancer Chemotherapy. Rep. Part III*, 3 : 1—12, 1972
- 12) Furr JA, Jordon VC : The Pharmacology and clinical use of tamoxifen. *Pharmacol. Ther.* 25 : 127—205, 1984
- 13) 園尾博司，妹尾亘明：乳癌の内分泌療法。乳癌の臨床 1 : 165—179, 1986
- 14) Jardinal CG, Perry MC, Weinberg V : Chemoendocrine therapy vs chemotherapy for advanced breast cancer in postmenopausal women : Preliminary report of a randomized study. *Breast Cancer Research and Treatment* 3 : 360—372, 1983
- 15) Cocci G, Delisi V, Boni C : Chemotherapy versus combination of chemotherapy and endocrine therapy in advanced breast cancer. *Cancer* 51 : 581—592, 1983
- 16) Furr BJA, Woodburn JR : Luteinizing hormone-releasing hormone and its analogues : a review of biological properties and clinical uses. *J. Endocrinol. Invest.* 11 : 535—557, 1988
- 17) Nicholson RI, Walker KJ : Use of LH—RH agonists in the treatment of breast disease. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh.* 95B : 271—281, 1989
- 18) Cook AF, Holman MJ, Kramer MJ, Trown PW : Fluorinated pyrimidine nucleoside 3, synthesis and antitumor activity of a series of a 5'-deoxy-5-fluoropyrimidine nucleoside. *J. Med. Chem.* 22 : 1330—1335, 1979
- 19) Ishitsuka H, Miwa M, Takemoto K, Fukuoka K, Itoga A, Maruyama H : Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann* 71 : 112—123, 1980
- 20) Huggins C, Grand LC, Brillanters FP : Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. *Nature* 189 : 204—207, 1961
- 21) Teller MN, Stock CC, Stohr G, Merker PC, Kaufman RJ, Escher GC, Bowie M : Biologic characteristics and chemotherapy of 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene-induced tumors in rats. *Cancer Res.* 26 : 245—252, 1966
- 22) Shimkin MB, Gropper L, Thatcher D, Gruenstein M : Hormonal treatment of mammary tumors in rats induced by 3-methyl-cholanthrene (NSC-21970) and 7, 12-dimethyl-benz (α) anthracene (NSC-408823). *Cancer Res.* 27 : 1284—1286, 1967

- 23) Griswold DP, Jr. Green CH : Observation on the hormone sensitivity of 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene-induced mammary tumors in the Sprague-Dawley rat. *Cancer Res.* 30 : 819—826, 1970
- 24) Meites J : Relation of prolactin and estrogen to mammary tumorigenesis in the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* 48 : 1217—1224, 1972
- 25) Young S, Cowan DM : spontaneous regression on induced mammary tumors in rats. *Br. J. Cancer* 17 : 85—89, 1963
- 26) Nomura Y, Abe Y, Yamagata J, Takenaka K : Lack of correlation between the presence of estrogen receptor and histological type of mammary cancer induced by 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene. *Gann* 66 : 689—691, 1975
- 27) Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM : Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics : accumulation of cell in early G1 phase. *Cancer Res.* 43 : 3583—3585, 1983
- 28) Nicholson RI, Walker KJ : Use of LH-RH agonists in the treatment of breast disease. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* 95B : 271—281, 1989
- 29) Akhtar M, Robinson C, Ashraf AM, Godwin J : Secretory carcinoma of the breast in adults : Light and electron microscopic study of three cases with review of the literature. *Cancer* 51 : 2245—2254, 1983
- 30) Roth JA, Discafani C, O'Mally : Secretory breast carcinoma in man. *Am. J. Surg. Pathol.* 12 : 150—154, 1988
- 31) Willis RA : Epithelial tumors of the breast. *In Pathology of the tumors*, 4th ed. London, Butterworth. 1960, pp 208—256
- 32) Kohda M, Manabe T, Ueki H : Squamous island in eccrine neoplasms. *J. Dermatopathol.* 12 : 344—349, 1990
- 33) Bonser GM : Microscopical study of evolution of mouse mammary cancer : Effect of milk factor and comparison with human disease. *J. Path. Bact.* 57 : 413—422, 1945