

論 文 要 旨

Effects of Neonatally Administered Low-dose Diethylstilbestrol on the Induction of Mammary Carcinomas and Dysplasias Induced by 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene in Female Rats.

新生仔期に低用量 diethylstilbestrol(DES)暴露を受けた雌ラット乳腺における 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene(DMBA)誘発乳癌への影響

吉川 剛

【序論および目的】

There is evidence that many environmental endocrine disruptors act like sex hormones, particularly during the perinatal or neonatal period, directly or indirectly affecting reproduction.

In this study, a relatively low dose of diethylstilbestrol (DES) was continuously administered to neonatal female rats at a critical period of morphogenesis and functional development of the mammary glands to investigate its effect on mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA).

【材料および方法】

Animals.

The animals were inbred Sprague-Dawley (SD) female rats.

Study design.

Experiment A: The rats were subcutaneously administered DES at 1 µg/rat for 0-14, 0-5 and 6-14 days after birth. The rats in control group were administered sesame oil for 0-14 days after birth. All rats were given DMBA (10 mg) at 50 days after birth. All DMBA-administered animals were examined by palpation to detect mammary tumors. At 368 days after birth, all surviving animals underwent necropsy. All mammary tumors and residual mammary glands were examined histopathologically.

Experiment B: All rats underwent same treatment of Experiment A. At 100 days after birth (without administration of DMBA), rats underwent necropsy. Blood sampling was conducted for determination of serum 17β-estradiol (E₂) and progesterone (P) levels in each group.

【結 果】

All rats administered DES showed persistent estrus and anovulatory ovaries.

In rats administered DES during 0-14 days after birth, neither mammary carcinomas (MCs) nor mammary dysplasias (MDs) was observed, and serum levels of both estrogen and progesterone strongly decreased at 100

days after birth.

In rats administered DES during 0-5 days after birth, the incidence and number of MCs significantly decreased while the number of MDs slightly increased.

In rats administered DES during 6-14 days after birth, the incidence of MCs was equal to the control while the incidence and number of MDs significantly increased.

【結論及び考察】

The present study revealed that the continuous administration of DES resulting in rats with early opening of the vagina and persistent estrus (PE) or without corpus lutea (CL) due to disturbance of the gonadotropin-secreting system in the hypothalamus.

Literature review showed that the administration of DMBA at 50 days after birth resulted in a significant decrease in the number of induced MCs in androgenized female rats, and that an additional administration of progesterone to these rats showed rapid tumorigenesis of MCs. From these results, it was considered that the tumorigenesis of MCs in androgenized female rats was suppressed by a long-term decrease in progesterone during the progression period.

In the present study, the continuous administration of DES during 0-14 days after birth induced the strong disturbance of the gonadotropin-secreting system and the depletion of serum E₂ and P, resulting in strong inhibition of the initiation and progression of MCs and MDs. It was suggested that the continuous administration of DES during 0-5 days after birth inhibited the induction of MCs, probably due to the decrease of serum E₂ and P levels while promoting the induction of MDs, probably due to hormonal conditions with relative excess of estrogen. Moreover, it was considered that the continuous administration of DES during 6-14 days after birth showed no inhibition of MCs, probably due to existence of the same serum E₂ and P levels as the control.

It was speculated that the continuous administration of DES during 0-5, 6-14 days after birth promoted the incidence of MDs; particularly the continuous administration of DES during 6-14 days after birth increased the incidence of both fibrotic adenosis (FA) and gross cysts (GC), probably due to hormonal conditions with relative excess of estrogen and active lactation in the residual mammary glands.

In conclusion, these results suggest that neonatal exposure periods and doses of endocrine disruptors such as DES could affect the incidence and progression of MCs and MDs.

論文審査の要旨

報告番号	総論第	8号	学位申請者	吉川 剛
審査委員	主査	堂地 勉	学位	博士(医学)
	副査	米澤 傑	副査	橋口 照人
	副査	堀内 正久	副査	東 美智代

Effects of Neonatally Administered Low-dose Diethylstilbestrol on the Induction of Mammary Carcinomas and Dysplasias Induced by 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene in Female Rats.

(新生仔期雌ラットにおける低用量 DES 投与による 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracene 誘発乳腺癌及び mammary dysplasia への影響)

【目的】新生仔期の内分泌攪乱物質への暴露は視床下部-下垂体-性腺の発育に重大な影響を及ぼす。またホルモン環境の違いが乳腺腫瘍の発生、進展へ影響することが知られている。学位申請者らは新生仔期雌ラットに内分泌攪乱物質である Diethylstilbestrol (DES) 1 μ g を乳腺発達の臨界期である生後 0~14 日の間に連続投与することにより 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)誘発乳癌あるいは mammary dysplasia の発生へ及ぼす影響を検討した。

【材料及び方法】生後 0 日目の Sprague-Dawley 雌ラットを用い、DES 1 μ g を生後 0-14 日目、0-5 日間及び 6-14 日間の投与群に分けて連続皮下投与を行なった。対照群は 0-14 日間に sesame oil を連続皮下投与した。全ての動物へ生後 50 日目に DMBA 10mg を経口投与し、毎週 1 回乳腺腫瘍の観察を行ない、生後 368 日目に麻酔下にて放血後剖検を実施した。また 100 日目に血中エストロゲンとプロゲステロン濃度を測定した。

【結果】DES 投与群の全例の動物に早期陰開口、剖検時卵巣及び子宮重量の減少が観察された。0-14 日投与群では乳癌及び mammary dysplasia のいずれも発生がみられなかった。0-5 日投与群では乳癌の発生率の低下がみられ、mammary dysplasia の発生が対照群と同程度に観察された。6-14 日投与群では乳癌の発生率は対照群と同等で、mammary dysplasia の発生率の増加がみられた。また生後 100 日目の血清中エストロゲン及びプロゲステロンレベルは 0-14 日投与群で激減、0-5 日投与群で減少、6-14 日投与群では対照群と同等のレベルであった。DES 投与群の乳腺に非腫瘍性病変として 0-14 及び 0-5 日投与群で好酸性細胞への置換がみられ、6-14 日投与群では乳汁分泌の亢進がみられた。

【考察】DES 1 μ g の連続投与により全投与群に内分泌攪乱が引き起こされ、その程度は投与時期により異なった。0-14 日投与群では内分泌攪乱の影響が最も強く血清中エストロゲン及びプロゲステロンの激減により乳癌及び mammary dysplasia の発生は全く観察されなかった。0-5 日投与群では 0-14 日投与群より内分泌攪乱の影響は弱いものの血中ホルモンレベルの減少がみられ、乳癌の発生率の低下がみられた。一方、0-5 日投与群ではプロゲステロンに対するエストロゲン比が高く、血清中ホルモンレベルは低いもののエストロゲン優位状態にあり mammary dysplasia の発生を引き起こしたものと考えられた。6-14 日投与群では内分泌攪乱の影響は最も弱く、血清中ホルモンレベルは対照群と同程度であり乳癌の発生率に変化はみられなかった。非腫瘍性病変として 6-14 日投与群では、エストロゲン過剰時に観察される乳汁分泌の亢進がみられた。

本研究は新生仔期雌ラットに内分泌攪乱物質である DES を乳腺発達の臨界期に連続投与すると、容易に性腺刺激機構の攪乱を引き起こし、DMBA 誘発 mammary dysplasia の発生を促進あるいは乳癌を抑制することを示唆している。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第	8号	学位申請者	吉川 剛
審査委員	主査	堂地 勉	学位	博士 (医学)
	副査	米澤 傑	副査	橋口 照人
	副査	堀内 正久	副査	東 美智代

主査および副査の5名は、平成24年9月26日、学位申請者 吉川 剛 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 生後100日と生後368日で剖検を実施しているがその理由は何か。また、生後100日目では病理組織学的検査は実施していないが、後の検索のために採血の他に臓器などの保存を行っておくべきではなかったか。

(回答) 生後368日目まで乳腺腫瘍発生を観察するのが本研究の主実験であるが、生後100日目の血清ホルモン状態を検査するために剖検を実施し全採血を行った。また、実験動物を用いた貴重な実験であり、生後100日においても血清や臓器の保存はすべきであったと考える。

質問2) 乳腺組織以外に異常はみられなかったのか。

(回答) 剖検時に卵巣及び子宮の萎縮がみられたが、病理組織学的にこれらに腫瘍発生はみられなかった。

質問3) ヒトの場合は Diethylstilbestrol (DES) は単独で子宮に影響するのか。

(回答) ヒトではそのような報告がある。実験動物においてもマウスの子宮や膈に、ラットでは乳腺、肝臓及び下垂体に腫瘍発生の報告がある。

質問4) DES 1 μ g を生後0日目に単回投与すると50日頃に Terminal end buds (TEBs) 数が増加するという報告があるが、DES 1 μ g を生後0-14あるいは0-5日間連続投与すると TEB が早期成熟し50日目に TEBs 数が減少する理由はなぜか。

(回答) DES 1 μ g を連続投与することによる総暴露量が増加したことと、投与時期の違いによるものと考えられる。特に生後6-14日で腫瘍発生の抑制がみられないことより、生後0-5日に DES へ暴露されると TEBs は早期成熟を起こし TEBs 数は減少することが推察される。

質問5) TEBs はラット乳癌の発生母地といわれているが、組織化学的にエストロゲンレセプター (ER) やプロゲステロンレセプター (PgR) が強く発現している組織とってよいか？

(回答) TEBs は ER と PgR 陽性の細胞が観察される。

質問6) DES は非常に強いエストロゲン作用を持つが、実験系としてエストロゲン (17 β -estradiol) ではないのか。

(回答) エストロゲンを新生仔期に連続投与した研究報告は無いが、雌ラットへ生後0日目に単回投与し50日目の TEBs 数と乳癌の発生率との関連を調べた研究では、1000 μ g 投与群で TEBs 数と乳癌発生率が減少した報告がある。本実験では既知の内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) である DES を選択した。

質問7) Huggins 乳癌について、DMBA が乳腺をターゲットとする理由はなにか。また DMBA は経口投与しているが胃や腸に癌は発生しないのか。

(回答) DMBA は乳腺上皮細胞の DNA 合成が盛んな TEBs に取り込まれて DNA-DMBA 付加体を形成する。また DMBA

投与によってラットの前胃に扁平上皮乳頭腫、小腸および大腸に腺腫、あるいは白血病が発生することが知られている。

質問 8) 生後 1 日目の腔開口の確認方法はどのように行うのか。

(回答) 肉眼的あるいはルーペを用いて観察した。

質問 9) 親マウスから新生仔マウスを一旦ケージから放し、又戻すと親が仔を攻撃することがある。ラットではそのようなことは無いのか。

(回答) 本実験ではみられなかった。

質問 10) Table2 について DES 投与群の体重が増えているがその理由は何か。

(回答) ラットでは卵巣摘出などにより血中エストロゲン量が低下すると体脂肪が溜まりやすく体重が増加する。ヒトの閉経後のアロマトーゼ活性亢進と同様の機序と考えられている。従って、エストロゲン濃度が低下している 0-14、0-5 日投与群の動物は体脂肪の増加により体重が増加したのと考えられる。

質問 11) 論文中に 0-5 日投与群で mammary dysplasia の発生率が促進したとあるが、それはどのような理由か。

(回答) 0-5 日投与群では血清中エストロゲンおよびプロゲステロンのレベルの減少により乳癌の発生率が減少したが、本投与群ではプロゲステロンに対するエストロゲン比が高くなっておりエストロゲン優位状態となっている。この優位状態は mammary dysplasia を発生させることを吉田らは既に報告しており、同様の機序が考えられる。

質問 12) ラットで生後 0-5 日目はヒトでどの年齢に相当するのか。

(回答) ラットの生後 0-5 日間というのはヒトの幼少期にあたると思われる。

質問 13) DMBA 誘発乳癌は浸潤はするが転移はまれと言われているが、そのメカニズムは検討したのか。

(回答) DMBA 誘発乳癌をラットに移植継代していくと転移することが経験上分かっているが、詳細な機序解明にはいたっていない。また、文献的にはエストロゲンの大量投与で転移したという報告があるが、ホルモンレセプターを欠きその形態は spindle なものであり、本来の DMBA 誘発腫瘍と形質が異なるものと推察されている。

質問 14) DMBA は発癌剤だが、ホルモン作用もあるのか。

(回答) ホルモン作用はない。

質問 15) 2009 年に川口らが同様の論文を発表しているが、今回とその論文の内容の違いはなにか。

(回答) 川口らの研究では本研究と同様の実験デザインで DES の投与量を 10 μ g と比較的高用量に設定している。その研究では DES の 0-5 日投与群においてもエストロゲンおよびプロゲステロンが激減し乳癌および mammary dysplasia の発生はなかったという点が論文の骨子である。

質問 16) 対照群の動物における 100 日の採血ポイントは性周期と一致させて実施しているのか。

(回答) ラットの性周期は四日半で 4 つの性周期 (前発情期、発情期、発情後期、休止期) に区分されており、それぞれの性周期の各ホルモンレベルを求めたが、これらの平均値を今回の対照群の値とした。

質問 17) 腔開口が早期であることと TEB の早期早熟は同じ事象なのか。

(回答) すべての投与群で早期腔開口が観察されたが、乳癌の発生率と TEBs 数の関連の考察において、6-14 日投与群では TEBs の早期成熟は引き起こされていないと考えられるため、同じ事象とは考えていない。

質問 18) DES 投与の翌日の卵巣あるいは子宮の重量は変化するのか。

(回答) DES 投与翌日に剖検を実施していないので詳細は不明であったが、今後の検討課題とする。

質問 19) 新生子期の雄ラットに DES を投与するとどのような変化が生じるのか。

(回答) ラットにおいては精巣下降日齢の延長、精子数の減少および精細管の萎縮が起こる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。