

論 文 要 旨

Effects of neonatally-administered 17β -estradiol on induction of mammary carcinomas by 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene in female rats

(新生仔期 17β -estradiol 投与の雌ラットにおける 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene による乳癌誘発への影響について)

船戸 護

(緒言)

日本において乳癌は激増中で、増加要因を明らかにすることは極めて重要な緊急課題である。世界的規模で自然界でおこっている生物の生殖異常(不能)現象は、性ホルモン作用を有する内分泌かく乱化学物質の複合汚染の影響、特に胎生期及び新生仔期の生殖機構への障害の結果と推察されている。

乳癌の発生と進展には性ホルモンが極めて重大な影響を与えることは疫学、実験病理学的にも知られているが、新生仔期における性ホルモンの乳癌発生への関与についてはまだ十分に検討されていない。

本研究は、性腺刺激機構及び乳腺における機能分化と形態形成の臨界期の新生仔期における性ホルモンの 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) による乳癌の誘発への影響を検討した。

(方法)

I. DMBA による乳癌の誘発への新生仔期エストロゲン 1 回皮下投与の影響について

生後 24 時間以内の近交系雌 Sprague-Dawley (SD) ラットへ 17β -estradiol (E_2) (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μg) を 1 回皮下投与し、生後 50 日目に DMBA (10 mg) を 1 回経口投与し、触診による乳癌発生を長期間観察した。生後 215~238 日目に屠殺し、乳腺腫瘍及び卵巣をホルマリン固定後、H.E.染色し、鏡検した。

II. 新生仔期エストロゲン 1 回皮下投与の乳腺への影響

生後 24 時間以内の近交系雌 SD ラットへ E_2 (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μg) を 1 回皮下投与し、生後 50 日目に解剖し、乳腺を摘出後、24 時間ホルマリン固定し、カルミン染色により whole mount 標本作製後、実体顕微鏡下で Terminal end buds (TEBs) をカウントした。また、これらのラットの卵巣も鏡検した。

(結果)

I. 1000 μg 群では、乳癌発生率及び個数ともに対照群よりも有意に減少した。10 μg 群では対照群と比較して乳癌個数の有意な増加が認められた。

1. 0.1, 1, 10 及び 100 μg 群の黄体形成ラットでは、対照群と比較して乳癌発生率に顕著な差はみられなかったが、1000 μg 群の発生率は 0%であった。乳癌個数は 10 μg 群の生後 200 及び 250 日目、100 μg 群の生後 200 日目で対照群より有意に増加した。

2. 0.1, 1, 10 及び 100 μg 群の黄体無形成ラットでは、1000 μg 群と比較した場合、乳癌発生率の有意な増加が認められた。乳癌個数は 1000 μg 群の生後 150 及び 250 日目で 0.1 μg 群より有意に減少した。

3. 長期観察では、黄体は 0.1, 1, 10 及び 100 μg 群でそれぞれ 79, 80, 74 及び 55%認められたが、1000 μg 群では観察されなかった。また、1000 μg 群では卵巣重量は顕著に減少した。

II. E_2 の 0.1, 1, 10, 100 及び 1000 μg の投与後、生後 50 日目で屠殺した例では、黄体は 100 μg 群までの全例で認められたが、1000 μg 群ではいずれのラットにも黄体は観察されなかった。生後 50 日目屠殺例における whole mount 標本の観察では、対照群と比較して 10 μg 群で顕著な TEBs の増加、1000 μg 群で顕著な TEBs の減少が認められた。

(考察)

新生仔期の 100 μg 以下の E_2 投与群では、屠殺時には一部のラットでは黄体を認めなかったが、生後 50 日目では全例に黄体を認めた。一方、1000 μg E_2 投与群では生後 50 日目、屠殺時にも全例に黄体はなく、屠殺時の卵巢重量は有意な低値であった。これらのことは、いままでの研究報告によれば、大量の E_2 が視床下部の性腺刺激機構を障害した結果と考えられる。新生仔期の大量の testosterone propionate も視床下部で estrogen に変わり、視床下部の性腺刺激機構を障害し、卵巢は黄体無形成となる。我々は新生仔期雌ラットに testosterone propionate を 1.25 mg 投与し、黄体無形成ラットの生後 50 日目に DMBA 20 mg を経口投与し、乳癌の発生を観察した結果、誘発される乳癌腫瘍の個数は著明に減少した。このラットに progesterone を追加投与した結果、乳癌の腫瘍が急激に形成された。これらの結果より、DMBA で誘発された乳癌は、その progression の過程で長期間 progesterone が低値であった場合、乳癌の腫瘍形成は抑制されると考えられる。従って、本研究における E_2 の 1000 μg 投与群で乳癌の誘発が著明に抑制された原因の 1 つは、乳癌の progression の過程における黄体無形成による progesterone の低下の結果と推察される。0.1、1、10、100 μg E_2 投与ラットでは、生後 50 日目に屠殺した群の全例に黄体が認められたので、DMBA の発癌刺激が加わった時期には生理的な量の estrogen だけでなく progesterone が存在していたことが考えられる。すなわち、これらの群では発癌刺激が加わった時期に progesterone が存在し、その後の progression の過程で progesterone が長期間存在した結果、乳癌は進展し腫瘍を形成したと考えられた。

新生仔期 E_2 投与群の生後 50 日目における乳腺の TEBs の数は、1000 μg 投与群では有意に減少し、10 μg 群では有意に増加していた。増殖期の上皮細胞を有し、大半が未分化で終末管構造の TEBs は、発癌性化学物質の標的部である。ラットにおける乳癌の発生は、発癌刺激を受けた際の乳腺における TEBs の密度と関連する。卵巢ホルモンによる刺激により、TEBs は alveolar buds (ABs) あるいは lobules (LOBs) 等の成熟した構造へ分化すれば、発癌刺激に対する感受性は低くなる。1000 μg 群における TEBs 数の減少は、大量の E_2 投与により新生仔期の乳腺が急激に分化した結果である。したがって、1000 μg 投与群での乳癌の発生低下は、本群にみられた TEBs 数減少も一因と考えられる。10 μg 投与群での乳癌の増加は、TEBs の数の増加によると推察された。

以上の結果から、新生仔期における E_2 は直接性腺刺激機構に作用し、その結果、内分泌機構を変えて DMBA より誘発された乳癌の progression に影響を及ぼすだけでなく、乳腺に直接作用し、乳腺、特に TEBs を発育・分化させ、乳癌の initiation へも影響することが明らかとなった。これらの実験結果より、今後は現存しているエストロゲン作用を有する内分泌かく乱物質の新生仔期における乳癌発生への影響も検索し、ヒト乳癌の発生に関与しているかどうかの検討が求められている。

(In Vivo, Vol. 20, No.1, 2006 年掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	医論第1419号	氏名	船戸 護
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	愛甲 孝	堂地 勉

Effects of neonatally-administered 17 β -estradiol on induction of mammary carcinomas by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in female rats

(新生仔期 17 β -estradiol 投与の雌ラットにおける 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene による乳癌誘発への影響について)

乳癌の発生と進展には性ホルモンが極めて重大な影響を与えることは疫学、実験病理学的にも知られているが、新生仔期における性ホルモンの乳癌発生への関与についてはまだ十分に検討されていない。今回の研究は、視床下部の性腺刺激機構及び乳腺の機能分化と形態形成が進行する新生仔期における性ホルモンの 7, 12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) による乳癌の誘発への影響を明らかにすることを目的としている。

本研究では、生後 24 時間以内の近交系雌 Sprague-Dawley (SD) ラットへ 17 β -estradiol (E₂) (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ g) を 1 回皮下投与し、生後 50 日目に DMBA (10 mg) を 1 回経口投与し、触診による乳癌発生を長期間観察するとともに、生後 215~238 日目で屠殺し、乳腺腫瘍及び卵巣をホルマリン固定後、H.E. 染色し、組織学的に検索している。さらに、生後 24 時間以内の近交系雌 SD ラットへ同用量の E₂ を 1 回皮下投与し、生後 50 日目に屠殺し、乳腺の whole mount 標本で terminal end buds (TEBs) の性状と、卵巣の黄体の有無について検索している。

本研究で得られた実験結果は次の 5 点である。

1. 新生仔期 1000 μ g 投与群では、乳癌発生率及び個数ともに新生仔無処置対照群よりも有意に減少した。10 μ g 投与群では対照群と比較して乳癌個数の有意な増加が認められた。
2. 0.1, 1, 10 及び 100 μ g 投与群で黄体の形成があったラットでは、対照群と比較して乳癌発生率に顕著な差はみられなかったが、乳癌個数は 10 μ g 投与群の生後 200 及び 250 日目、100 μ g 投与群の生後 200 日目で対照群より有意に増加した。
3. 1000 μ g 投与群では、0.1, 1, 10 及び 100 μ g 投与群で黄体が無形成であったラットと比較した場合、乳癌発生率は有意に減少した。乳癌個数は 1000 μ g 投与群の生後 150 及び 250 日目で 0.1 μ g 投与群より有意に減少した。
4. 長期観察では、黄体は 0.1, 1, 10 及び 100 μ g 投与群でそれぞれ 79, 80, 74 及び 55% のラットに認められたが、1000 μ g 投与群では観察されなかった。また、1000 μ g 投与群では卵巣重量は顕著に減少した。
5. 新生仔期 E₂ の 0, 0.1, 1, 10, 100 及び 1000 μ g 投与ラットの生後 50 日目では、卵巣の黄体は 0, 0.1, 1, 10 及び 100 μ g 投与群では全例に認められたが、1000 μ g 投与群ではいずれのラットにも黄体は観察されなかった。生後 50 日目屠殺例における whole mount 標本の観察では、対照群と比較して 10 μ g 投与群で顕著な TEBs の増加、1000 μ g 投与群で顕著な TEBs の減少が認められた。

以上により、新生仔期における E₂ は視床下部の性腺刺激機構に作用し、その結果、内分泌機構を変えて DMBA 誘発乳癌の progression に影響を及ぼすだけでなく、乳腺に直接作用し、乳腺、特に TEBs を発育・分化させ、DMBA への発癌感受性を変えることにより乳癌の initiation へも影響することが明らかとなった。

本研究は、新生仔期性ホルモンと乳癌発生についていくつかの基礎知見を提供し、乳癌の発生と進展に新しい視点を与えた。従って、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第1419号	氏名	船戸 護
審査委員	主査	米澤 傑	
	副査	愛甲 孝	堂地 勉

主査および副査の3名は、平成18年2月15日、学位請求者 船戸 護に面接し、学位請求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。

質疑1. 新生仔期17 β -estradiol (E₂)の発癌率に対する影響は用量依存的に影響すると考えられるか。

(応答) E₂の0.1~10投与 μ gまでは有意差はみられなかったが、100 μ g投与群では、乳癌発生率は対照群と比較して若干減少していますが、黄体形成ラットにおける生後200日目の乳癌個数は対照群と比較して有意に増加しています。1000 μ g投与群では発生率は著明に減少しています。乳癌のprogressionの過程におけるprogesteroneの有無と、本群の生後50日目におけるterminal end buds (TEBs)の数が乳癌の発生に関与すると推察しています。

質疑2. E₂0.1、1 μ g投与群の黄体無形成ラットで乳癌発生率が100%みられた原因は何か。

(応答) 長期観察後屠殺時の卵巣では黄体が無形成であったが、DMBAを投与した生後50日は全例に黄体形成があることより、乳癌のprogressionの時期には、progesteroneが存在していたと考えられます。従って、乳癌が発生し腫瘍を形成したものと思われれます。また、これらの群における黄体無形成ラットは極めて匹数が低く、匹数を増やした場合、若干異なる結果となる可能性もあると思われれます。

質疑3. 今回は、adenocarcinomaのみを評価しているが、当然、乳腺症等の他の所見も得られたのではないか。

(応答) 腺癌の他、乳腺症、過形成、耳道腺癌あるいは脂腺上皮腫等もみられました。乳腺症も鏡検し、腺房型腺症や線維性腺症に組織分類しましたが、今回は腺癌に絞り報告しました。

質疑4. DMBA以外の他の乳癌発癌物質もホルモン依存的であるか。

(応答) HugginsやRussoらの文献にも多くの発癌物質よりラットに誘発される乳癌の多くはホルモン依存的であることが記載されています。

質疑5. 雄ラットにおいても同条件で同様な現象が認められるのか。

(応答) 雄ラットにおいては、多量のDMBAを頻回投与すれば乳癌を誘発することができます。DMBA誘発雄乳癌に対する去勢の影響は認められなかったため、androgen依存性ではないことは判明しています。雄におけるDMBA誘発乳癌は去勢後の低用量のE₂(0.01mg)とprogesteroneの投与で顕著に増加しましたが、高用量(0.1、1mg)のE₂投与では、わずかに増加するのみでした。従って、適量のエストロゲンは雄乳癌のinitiationに影響を及ぼすことが推察されます。

質疑6. 今回は生後50日目におけるDMBA乳癌誘発に着目しているが、それ以前の発癌刺激に対する影響はどのように考えるか。

(応答) 生後14、21、35及び50日目におけるwhole mount標本でTEBsを観察した結果、生後50日目以前は発癌化学物質に対する感受性は低いものと推察されます。

質疑7. TEBs、alveolar buds、lobulesについて、乳癌の発生部位はどれであるか。

(応答) 増殖期の上皮細胞を有し、大半が未分化で終末管構造のTEBsは発癌化学物質の標的部位であり、ラットにおける発癌率は発癌刺激を受けた際の乳腺におけるTEBsの密度と関連することが知られています。卵巣ホルモンの刺激により、TEBsはalveolar budsあるいはlobules等の成熟した構造へ分化すれば発癌刺激による感受性は低くなりますが、やはりこれらの部位においても発癌の可能性は否定出来ないと思います。

質疑8. 近年、乳癌が急増している理由は何か。

(応答) 世界的に自然界でおこっている生物の生殖異常現象は、性ホルモン作用を有する内分泌かく乱化学物質の複合汚染の影響、特に、胎生期及び新生仔期の生殖機構への障害も原因の1つと推察されています。また、伴侶動物として知られていますイヌやネコはヒトと生活環境を共有していますため、ヒト疾患のモニターとして活用されてきております。近年、イヌ・ネコの寿命が延長したため、乳腺腫瘍は発生頻度が高い。その原因は生活習慣が近似していることが挙げられ、食物・飲み水等の環境からの内分泌かく乱化学物質の複合汚染の影響が指摘されています。このように、乳癌の激増の要因は、内分泌かく乱化学物質の影響が関与していると推測されています。

質疑 9. 乳癌と共に、前立腺癌等は確かに増加しているが、一方で、胃癌などは減少している。これらの関連性についてどう考えるか。

(応答) 癌は生活習慣病であり、性ホルモン作用を有する内分泌かく乱化学物質の汚染の結果、ホルモン依存性の癌が増加している可能性が考えられます。減少している癌は生活環境と生活習慣の改善が関与していると思います。

質疑 10. 乳癌の発生に関する観察は、屠殺後の乳腺腫瘍の鏡検に委ねたのか。

(応答) 新生仔期内エストロゲン 1 回皮下投与後、触診による乳癌発生を長期間観察し、最終的に鏡検で確認してデータとしてまとめました。

質疑 11. 生後 50 日目で DMBA を投与した理由は何か。

(応答) 乳腺の発育・分化は生後 30~42 日齢で始まる性周期で調整されます。乳腺の機能分化と形態形成が進行する生後 50 日に投与しました。また、Russo らの文献にも、雌ラットへの DMBA 投与は、完全な内分泌機構を有する未経産幼若期への投与が最も乳癌を発現することも記載されています。

質疑 12. ラットの生後 50 日目はヒトでいう思春期に相当するののか。

(応答) そのように考えています。

質疑 13. 大量の E₂ 投与により DMBA 誘発乳癌の発生が抑制された理由は何か。

(応答) 新生仔期における E₂ は、視床下部の腺刺激機構に作用し、その結果、排卵が起こらず、卵巣は黄体無形成となります。DMBA により誘発された乳癌の progression の過程において progesterone 量が低下したことが原因の一つと考えました。さらに、乳腺に直接作用し、乳腺、特に TEBs を発育・分化させ、DMBA への感受性が低下、すなわち、乳癌の initiation 過程で抑制されたものと考えています。

質疑 14. 卵巣重量の低値は下垂体障害の影響と考えられるののか。

(応答) 大量の E₂ が、視床下部の性腺刺激機構を障害した結果で、黄体無形成によるものと考えています。

質疑 15. 新生仔期の E₂ に対する感受性は、生後 0、1、2、3 日目で違いはあるののか。

(応答) 今回の実験では生後 0 日目に投与して、生後 1~3 日目の投与は検討していませんが、以前の実験結果により、生後 3 日目までは感受性が高いものと推察しています。

質疑 16. 新生仔期における E₂ 投与と成熟ラットにおける E₂ 投与では、誘発される乳癌の組織学的あるいは形態学的な相違は認められるか。

(応答) 内分泌の状態により誘発される乳癌は淘汰されますので、生物学的特性はあります。また、形態的に変化することも予想されます。

質疑 17. Huggins 乳癌は浸潤増殖するものの、転移はしない理由は何か。

(応答) Huggins 乳癌は、卵巣ホルモン依存性である等、分化傾向の強い癌であることが要因であると推察しています。

質疑 18. DMBA 誘発乳癌はヒト乳癌の何に該当するか。

(応答) ヒトでは分化傾向の強い、早期の癌に相当します。

質疑 19. ヒト乳癌の場合も、癌は TEBs に発生するののか。

(応答) ヒトも同様と考えられています。

質疑 20. 日系 2 世 (ハワイ) の乳癌発生率増加は何故か。

(応答) 生活環境と生活スタイルの違いによると思われる。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人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。