

## 去勢ラットを用いた前立腺発癌における テストステロンのプロモーション作用の検討

白 須 宣 彦, 小 松 秀 樹, 上 野 精

山梨医科大学泌尿器科

**抄 録** : F 344系雄性ラットを用いて、プロモーション期にある前立腺に対して testosterone の投与が前立腺癌の発生、進展に及ぼす影響を検討した。11週齢で全ラットを去勢し、これを A~D の 4 群に分けた。去勢後 3 週間で A 群、B 群は testosterone propionate (TP) 25mg (平均体重  $227.5 \pm 21g$ ) を 3 日間連続皮下投与して前立腺上皮の増殖を促し、1 日おいて N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 10mg を静脈内に投与した。さらに A 群は MNU 投与 2 日後より 56 週にわたり testosterone enanthate (TE) 12.5 mg を 4 週間に 1 度皮下に投与した。C 群は TP および MNU は投与せず、A 群と同期間 TE を投与した。D 群は去勢のみとした。60 週で全群屠殺解剖し、病理組織学的に比較検討した。付属生殖器癌は A 群では 26 匹中 4 匹 (15%) : 前立腺癌 3 匹、精癌 1 匹に認めた。しかし、他の 3 群には付属生殖器癌は認めなかった。付属生殖器増殖性病変 (癌 + 過形成) は A 群では 7/26 (27%)、C 群では 1/8 (12%) に認めたが、B 群、D 群ではそれぞれ 24 匹、9 匹のいずれにも認めなかった (A 群、B 群間に  $p < 0.05$  で有意差あり)。プロモーション期の TE 投与は付属生殖器増殖性病変に促進的に働くと思われた。また A、B 両群には皮膚扁平上皮癌をそれぞれ 16/26 (62%)、13/24 (54%) にさらに小腸の腺癌をそれぞれ 8/26 (31%)、4/24 (17%) に認めた。

**キーワード** ラットのの前立腺癌, メチルニトロソウレア, テストステロン

### はじめに

前立腺癌死亡率は地域差が大きい。西欧では高くアジアでは低い<sup>1)</sup>。しかしながら、本邦における前立腺癌死亡率は、西欧に比べて低いものの、近年増加の一途をたどっている。また、アメリカ合衆国への日本人移民は日本在住の日本人に比べ、前立腺癌死亡率が高い<sup>2)</sup>。こうした死亡率の変化が起こるといことは環境因子が前立腺癌の発生進展に影響を及ぼしうることを意味する。かくして環境中の危険因子の同定が重要な意味をもつ<sup>3-5)</sup>。この危険因子の同定には、疫学的調査と動物を用いた発癌実験が不

可欠である。

過去の前立腺発癌実験としては 1, 2-benzopyrene や methylcholanthrene を前立腺に直接投与する化学発癌実験<sup>6,7)</sup>、前立腺への X 線照射による発癌実験が知られている<sup>8)</sup>。いずれも腫瘍がヒトにはまれな扁平上皮癌であったり、発生頻度が低いため、今日まで研究の継続に至っていない。

今日盛んに行われている性ホルモンを用いた発癌実験は、1977年に Noble が Nb ラットに testosterone propionate (TP) を投与することにより 18% に前立腺癌の発生を認めたことに始まる<sup>9)</sup>。その後、TP にプロモーター作用のあることの知見が Pollard らによっても報告された<sup>10)</sup>。しかし、彼らの実験はいずれも去勢を

受付：1994年 2月 2日

受理：1994年 4月 1日

行っていないため内因性 testosterone の影響の評価が難しい。

そこで、我々は前立腺発癌のプロモーション期における testosterone の影響を純粹にみるために、全群に去勢を行い内因性 testosterone を除いた状態で、TP を投与して前立腺上皮細胞の DNA 合成を高めておき、initiating factor である N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を投与し、promoting factor として testosterone enanthate (TE) を投与する実験を行った。

### 材料および方法

F344 系雄性ラット [チャールズリバー日本生物材料センター] 80匹を生後 6 週齢で購入した。このラットを温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ 、昼夜12時間サイクルの条件に調節した飼育室で 4 匹ずつ金属ケージに入れ、固形飼育料 [オリエンタル酵母 MF] と水道水を認意に投与して飼育し、11週齢時 (平均体重 $168\pm 14\text{g}$ ) より実験を開始した。全てのラットをエーテル麻酔

下に外科的去勢術を施行し、感染予防のためにペニシリン G カリウム [明治製菓] 2 万単位を注射した。これを A 群30匹、B 群30匹、C 群 9 匹、D 群 9 匹の 4 群に分けた (麻酔中に 2 匹死亡)。去勢術の 3 週後 (平均体重 $227.5\pm 21\text{g}$ ) に A 群は TP [帝国臓器製薬] 25 mg を連続 3 日間皮下に注射し、1 日おいて MNU [半井化学薬品] 10 mg を生理食塩水に溶解して尾静脈より静脈内に投与した。その 2 日後より TE [エナルモンデボ<sup>R</sup> 帝国臓器製薬] 12.5 mg を以後 4 週間おきに計14回皮下注投与した。B 群は TP、MNU 処置のみとし、TE の長期投与は行わなかった。C 群は TP、MNU は投与せず、TE の長期投与のみとした。D 群は去勢術のみの対照群とした (図 1)。体重減少が著しく、衰弱したものは順次屠殺解剖し、残りは実験開始後60週で全群屠殺解剖して、20%緩衝ホルマリン液 [武藤化学薬品] にて固定した。前立腺、精囊、凝固腺については 5 mm 毎の step section のそれぞれについて  $3\mu$  の薄切々片を作製し、ヘマトキシリン・エオジ

	0	5	10	20	30	40	50	60週
群	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
A群	☆ *↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
B群	☆ *							+
C群	☆ ↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
D群	☆							+

☆ : 去勢 (11週齢)

\* : プロピオン酸テストステロン25mg×3日 + MNU 10mg

↓ : エナント酸テストステロン12.5mg

+ : 屠殺

図 1. 実験のプロトコール.

ン染色の後、病理組織学的に検討した。他の臓器については肉眼的に観察された腫瘍についてのみ薄切々片を作製し、病理組織学的に検討した。なお MNU 投与直後に全身状態悪化により死亡した A 群 4 匹、B 群 6 匹、および感染症により死亡した C 群の 1 匹は検討の対象から除外した。本実験は山梨医科大学動物実験指針に沿って行い、統計処理方法は各群のラットの平均体重および付属生殖器重量の差については t 検定を、癌および過形成の発生頻度の差に

ついては  $\chi^2$  検定を用いて、 $P < 0.05$  を有意差判定基準値とした。

### 結 果

生後11週齢のラットの平均体重は $168 \pm 14$  g であった。その後の体重増加は実験開始32週では B 群で他の群より小さかったが ( $P < 0.05$ )、経時的増加は B 群においても観察された。しかし A 群では44週齢を、B 群では50週をピー

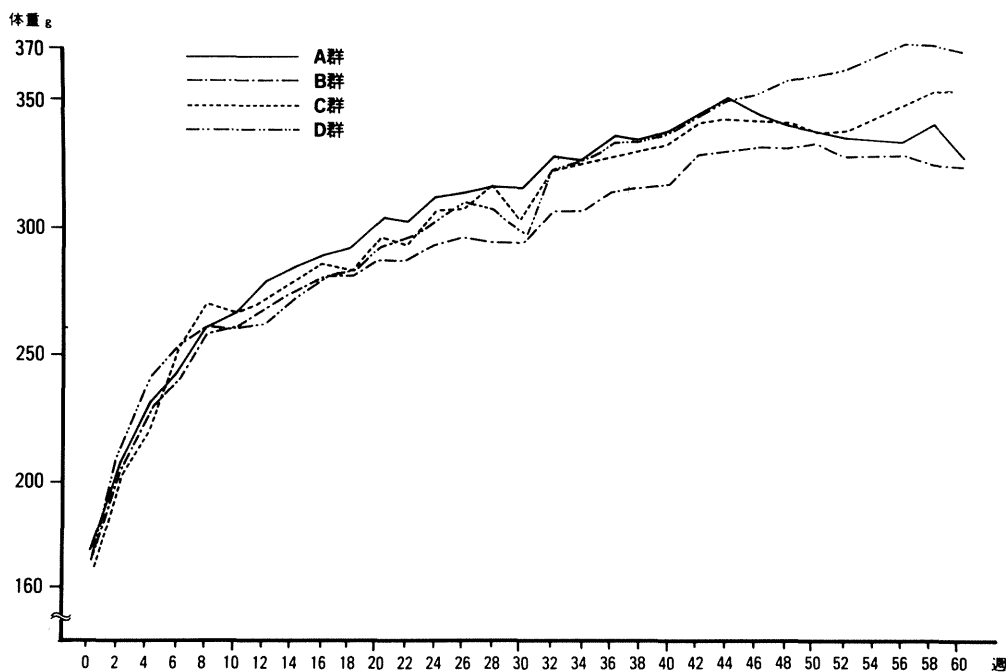


図2. ラット各群の平均体重の変化.

表1. 付属生殖器の増殖性病変の発生頻度

群	ラット数	付属生殖器 増殖性病変	癌				前立腺過形成
			前立腺腹葉	前立腺背側葉	精 囊	凝固腺	
A	26	7 (27%) *	0	3	1	0	3
B	24	0	0	0	0	0	0
C	8	1 (12%)	0	0	0	0	1
D	9	0	0	0	0	0	0

\* B 群との間で  $P < 0.05$  で有意差あり

クに徐々に体重減少がみられ、実験終了の60週にはMNUを投与したA群、B群と投与しなかったC群、D群の間には有意差 ( $P < 0.05$ ) がみられた (図2)。著しい体重減少をきたし、衰弱したものは60週に達しないものでも屠殺した。体重減少の主たる原因は皮膚と小腸の腫瘍であった。皮膚癌による衰弱のため初めて屠殺した35週以後のものを実験の検討対象とし、それ以前に死亡したラットは検討対象から除外した。

前立腺、精囊、凝固腺を含む付属生殖器の総重量は、A~D群でそれぞれ  $3.93 \pm 0.82$  g、 $0.65 \pm 0.22$  g、 $4.99 \pm 1.2$  g、 $0.54 \pm 0.14$  g でTEを投与した群としなかった群で有意差 ( $P < 0.001$ ) がみられた。肉眼的には付属生殖器に明かな腫瘍は認められなかった。付属性生殖器の組織学的検討結果を表1に示した。付属生殖器の増殖性変化はA群で26匹中7匹 (27%) に、C群で8匹中1匹 (12%) に

認められた。A群における増殖性病変の発生頻度はB群に比し有意に高かった ( $p < 0.05$ )。付属生殖器の癌に限ってみると、A群のみ4匹 (15%) に認められた。内訳は前立腺背側葉の微小癌 (図3) 3匹、精囊浸潤癌 (図4) 1匹であった。前立腺過形成はA群3匹、C群1匹に認められた (図5)。B、D両群に増殖性病変は全く認められず、むしろ低形成を示した (図6)。

各臓器の腫瘍の発生頻度は、A、B群に高率に悪性腫瘍の発生を認めたが、C、D群には全く腫瘍を認めなかった。発生した腫瘍は付属生殖器以外のものについてはいずれも腫瘍を形成していたものである。皮膚の扁平上皮癌がA群、B群でそれぞれ16匹 (62%)、13匹 (54%) と最も高率に認められた。皮膚癌の発生については、A、B両群ともC、D群の双方と有意差を認めた (A群  $P < 0.01$ 、B群  $P < 0.05$ )。小腸の腺癌もA、B群のみにそれぞれ8匹 (31%)、



図3. 前立腺背側葉の顕微鏡像 (A群)  
クロマチンに濃染された大小不同の核をもつ上皮細胞が不規則に配列し、腺房内に乳頭状に増殖している。微小腺癌 (H. & E.  $\times 200$ )。



図4. 精囊の顕微鏡像 (A群)  
異型性の強い細胞が多数の腺房に広がって増殖している。浸潤癌 (H. & E. × 100).

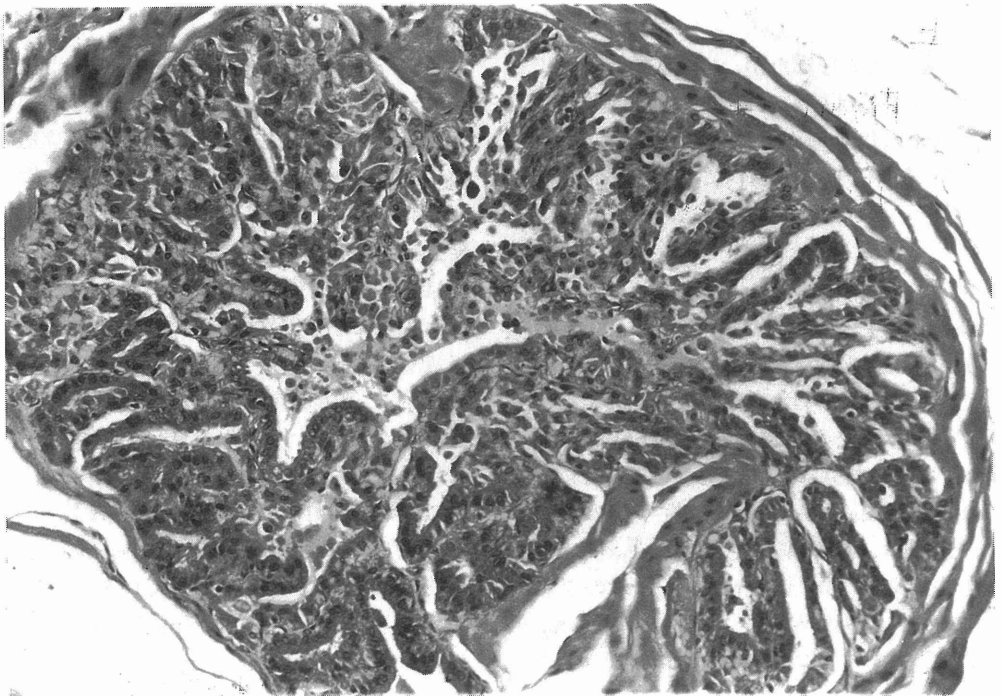


図5. 前立腺の顕微鏡像 (C群)  
腺房内に乳頭状に細胞増殖を示すが、細胞異型は認められない。過形成 (H. & E. × 200).

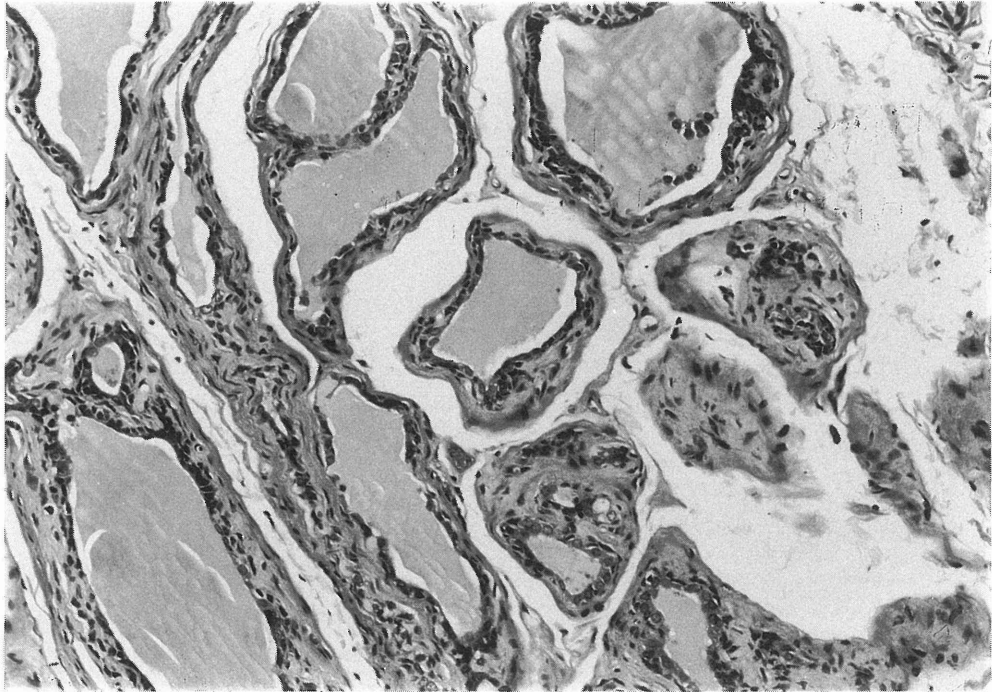


図6. 前立腺の顕微鏡像 (B群)  
各腺房が小さく数も減少しており、上皮細胞も小さい。低形成 (H. E. × 200)。

4匹 (17%) 認められたが、C、D群との間に統計学的有意差は得られなかった。ほかにはA群で歯牙の化骨腫が2匹 (8%) に、後腹膜の線維肉腫が1匹 (4%) に認められた。

### 考 察

BoslandらはWistarラットを用いてcyp-rotterone acetateによる化学的去勢後TPを投与して前立腺上皮のDNA合成を人工的に高め、強力な発癌物質であるMNUを投与することにより前立腺癌を発生させることに成功した<sup>11)</sup>。BoslandらはMNU投与後のプロモーション期には何も投与していない。我々はこの方法に変更を加えてtestosteroneのプロモーション作用を検討した。内因性testosteroneの影響を除くため、実験開始時に全ラットを外科的に去勢した。このため化学的去勢は行わなかった。去勢後3週間目にTPで3日間前

立腺上皮を刺激した後、MNUを投与した。プロモーション期にはTEを投与した。MNU投与後にTEを投与し続けた群にのみ前立腺と精嚢に癌を認めた。またこの群はMNU投与のみの群に比し、有意に付属生殖器増殖性病変の発生頻度が高かった。前立腺増殖性病変についてはTEは促進的に作用すると思われた。

しかしながら前立腺癌の発生頻度は、我々の当初の予想よりはるかに低く、発癌率7/20 (35%)、過形成率6/20 (30%)を示したBoslandらの成績と比較して低いものであった。この原因を考えるために今回の実験の個々の条件について検討してみると、前立腺上皮の細胞増殖を高めるためのTPはBoslandらは100mg/kgを連続3日間投与している<sup>11)</sup>。本実験での投与量は1匹当り25mgで、投与時の平均体重は $227.5 \pm 21$ gであり、Boslandらの投与量とほぼ同じである。

MNUの投与時期と投与量については、片山

らが外科的去勢ラットに TP 1.5 mg を連続10日間投与して DNA 合成の最も盛んな時期を同定したところ、3日目にピークを示したことを報告した<sup>12)</sup>。また、白井らも外科的あるいは化学的去勢ラットに300 ppm のメチルテストステロン含有飼料を投与したところ、細胞増殖は2～3日目にピークを示したことを報告した<sup>13)</sup>。この結果をもとに TP の連続3日間投与後に MNU を投与することにした。MNU は本実験では1匹あたり10mg を投与した。このときの平均体重は227.5±21g であり、換算すると44.3mg/kg となる。Bosland らの投与量は50mg/kg と著者らよりも多かったが<sup>11)</sup>、Pollard らの同様の実験では MNU 投与量は30mg/kg と少量であったにもかかわらず55～66%という高い前立腺癌発生率を示した<sup>14)</sup>。したがって MNU の投与量については問題ないと思われた。

プロモーション期の testosterone は Pollard からも投与している<sup>14)</sup>。彼らは TP の depot を皮下に植え込んだが、本実験では TE を皮下に注射した。TE は testosterone をエステル化したもので代謝を遅くして長時間の効果を示す。去勢ラットに TE 5mg を投与した実験では前立腺、精囊の重量は21日後にピークを示し、42日後にも効果を示している<sup>15)</sup>。今回は12.5mg を4週毎に投与しているので投与量としても十分であり、実際に前立腺、精囊の重量は TE を投与した A、C 群としなかった B、D 群とで有意差を認めた ( $p < 0.001$ )。TE の投与は TP の depot を植え込む方法よりも容易で確実であると思われる。

Bosland らや Pollard らの実験と我々の実験の重要な差は去勢方法の違いである。彼らは性ホルモンによる一時的な去勢を行っているが、我々は外科的去勢を施行した。

片山らは前立腺上皮の DNA 合成の盛んな生後3週齢の F344系ラットに3, 2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) 200 mg/kg ～ 1,600mg/kg を投与したところ、28.9%～66.7%に前立腺癌を認めた。これに対し生後48

時間の新生仔雄ラットを外科的に去勢し、10週齢より TP 1.5 mg を3日間連続投与した直後に DMAB 100mg/kg を投与するプロトコルを3週毎に計11回施行し、さらに3週毎に TP 1.5mg の3日間連続投与を6回繰り返した実験では癌が発生しなかったとして、発癌には精巣の存在が関与していると述べている<sup>12)</sup>。しかしこの実験では、両者の間で発癌物質の投与時期、投与回数が異なり比較することは不可能である。

また、白井らも F344系ラットを生後6週齢で外科的に去勢した後に DMAB 200mg/kg と methyltestosterone (MT) または TP を投与した発癌実験では、前立腺癌が認められなかったことを報告しているが<sup>16)</sup>、さらに彼らは ethynyl estradiol (EE) 含有飼料と基礎飼育料を3週対2週で間欠的に投与して一時的に去勢状態にしておいて、基礎飼料に戻した3日目に DMAB を投与した実験では21匹中18匹(85.7%)に前立腺癌を認めたことを報告した<sup>17)</sup>。彼らの実験も厳密な比較ではないため、testosterone 以外の精巣由来の factor が前立腺癌の発生に関連しているかどうかははっきりしない。

しかしながら、我々の実験と Bosland や Pollard らの実験の基本的な差は精巣の存在の有無にあることと、片山や白井らの実験を考慮すると前立腺発癌には精巣の存在が関与していることが示唆される。

もう一つの条件の違いとしてはラットの strain の差が考えられる。Bosland らや Pollard らは Wistar 系ラットに MNU を投与し、片山らや白井らは F344 系ラットに DMAB を投与しており、F 344系ラットと MNU の組合せは初めてであった。

本来今回の実験は前立腺発癌を目的としたものだった。しかし、目的とした前立腺癌以外に A、B 両群で皮膚、小腸に癌の発生をみた。特に皮膚癌の発生頻度が非常に高かった。この皮膚癌は明らかに MNU によるものでありプロモーション期の testosterone 投与には影響され

なかった。MNU 誘発皮膚癌については、hairless マウスに MNU を塗布したところ90%以上に皮膚癌を認めたとの報告がある<sup>18)</sup>。同様にラットに MNU を塗布した実験でも60%以上に皮膚癌を認めたとの報告もある<sup>19)</sup>。しかし、いずれの場合も MNU は数回にわたり皮膚に直接塗布したものであり、我々のように静脈内投与したものではなかった。F344系ラットに MNU を投与した実験をみると、Williamsらは乳癌を目的として MNU 50mg/kg を3回にわたり静脈内投与したところ50%に皮膚の扁平上皮癌を認めたことを報告した<sup>20)</sup>。今回我々の実験では F344系ラットへの MNU の静脈内投与は1回の投与で高頻度に皮膚癌の発生を認めた。これは皮膚癌の発癌実験として良い実験モデルとなりうる可能性を示唆する。

今回の我々の実験では前立腺癌の発生は計画段階での予想を下まわった。この原因として、精巣の存在が前立腺発癌に影響を及ぼしている可能性がある。今後さらに testosterone 以外に精巣由来の前立腺発癌因子があるとすればこれを同定する努力が必要となる。

稿を終えるに当たり、病理組織診断において、ご教示、ご助言頂いた川生 明教授に深く感謝致します。

本論文の要旨は第79回日本泌尿器科学会総会(1991年、金沢)において発表した。

## 文 献

- 1) Segi M, Tominaga S, Aoki K, Fujimoto I. Cancer mortality and morbidity statistics, Japan and the world. Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1981.
- 2) King H, Locke FB. Cancer mortality among U.S. Japanese in the united states. J Natl Cancer Inst 1980; **65**: 1141-1148.
- 3) Kolonel L, Winkelstein W. Cadmium and prostatic cancer. Lancet 1977; **2**: 566-567.
- 4) Andjelkovic D, Tanlbee J, Symons M, Williams T. Mortality of rubber workers with reference to work experience. J Occus Med 1977; **9**: 397-405.
- 5) Wynder EL. Dietary habits and cancer epidemiology. Cancer 1979; **43**: 1955-1961.
- 6) Moore RA, Melchionna R. Production of tumors of the prostate of the white rat with 1, 2-benzpyrene. Am J Cancer 1937; **30**: 731-739.
- 7) Dunnind WF, Curtis MR, Segaroff A. Methylcholanthrene squamous cell carcinoma of the rat prostate with skeletal metastases, and failure of the rat liver to response to the same carcinogen. Cancer Res 1946; **6**: 256-262.
- 8) Hirose F, Takizawa S, Watanabe H, Takeichi N. Development of adenocarcinoma of the prostate in ICR mice locally irradiated with X-rays. Gann 1976; **67**: 407-411.
- 9) Noble RL. The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. Cancer Res 1977; **37**: 1929-1933.
- 10) Pollard M, Luckert PH, Schmidt MA. Induction of adenocarcinomas in Lobund-Wistar rats by testosterone. The prostate 1982; **3**: 563-568.
- 11) Bosland MC, Prinsen MK, Kroses R. Adenocarcinomas of the prostate induced by N-nitroso-N-methylurea in rats pretreated with cyproterone acetate and testosterone. Cancer Lett 1983; **18**: 69-78.
- 12) 片山正一、北村 旦、松本圭史 ラット前立腺癌実験モデルの確立と発癌生におよぼすホルモンの影響。癌関係 基礎 1987; **2**: 8-16.
- 13) Shirai T, Ikawa E, Imaida K, Tagawa Y, Ito N. Proliferative response of rat accessory sex organs to dietary sex hormones after castration or initial dietary administration of estrogen. J Urol 1987; **138**: 216-218.
- 14) Pollard M, Luckert PH. Production of autochthonous prostate cancer in Lobund-Wistar rats by treatments with N-nitroso-N-methylurea and testosterone. J Natl Cancer Inst 1986; **77**: 583-587.
- 15) 志田圭三, 男性ホルモン療法について-特にデポ剤の効果-ホルモンと臨床 1955; **3**: 61-65.
- 16) Shirai T, Tagawa Y, Taguchi O, Ikawa E, Murai M, Fukushima S, Ito N. Low tumorigenic response to 3, 2'-dimethyl-4-amino-biphenyl administration in the prostate of rats castrated at birth. Jpn J Cancer Res (Gann) 1988; **79**: 1293-1296.
- 17) Shirai T, Tagawa Y, Fukushima S, Ito N. Induction of prostate carcinoma at high incidence in F344 rats by 3, 2'-dimethyl-4-amino-biphenyl. Cancer Lett, 1987; **35**: 7-13.
- 18) Epstein JH, and Francisco S. Photocarcinogenesis, skin cancer, and aging. J Am Acad



- Dermatol 1983; **9**: 487–501.
- 19) Zabezhinski MA, Pliss GB, Okulov VB, Petrov AS. Skin tumours induced by local and systemic action of N-Nitroso-compounds in rats. Arch Geschwulstforsch 1985; **55**: 117–122.
- 20) Williams JC, Gusterson B, Humphreys J, Monaghan P, Coombes RC, Rudland P, Neville AM. N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors. Hormone responsiveness but lack of spontaneous metastasis. J Natl Cancer Inst 1981; **66**: 147–155.

#### Promoting Effects of Testosterone on Prostatic Carcinogenesis in Castrated F344 Rats

Nobuhiko Shirasu, Hideki Komatu, and Akira Ueno

*Department of Urology, Yamanashi Medical College*

The effect of exogenous testosterone in promoting prostatic carcinogenesis was examined using castrated F344 rats. All rats were castrated at 11 weeks of age and were divided into 4 groups. Rats in groups A and B were treated by 3 daily subcutaneous injections of 25 mg of testosterone propionate (TP) 3 weeks after the castration. Two days after the last TP injection, 10 mg of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) was administered to each rat in these 2 groups. Two days after MNU treatment, testosterone enanthate (TE) administration was started in groups A and C. TE was injected subcutaneously at a dose of 12.5 mg for 56 weeks at intervals of 4 weeks. Rats in group D were control rats treated by castration only. All the rats were killed 60 weeks after the start of the experiment and examined histologically. Cancer in accessory sex organs was found only in group A at an incidence of 4/26 (15%); 3 prostatic cancer and 1 cancer of the seminal vesicle. Proliferative lesions (cancer+hyperplasia) of accessory sex organs developed in 7/26 (27%) in group A, 0/24 in group B, 1/8 (12%) in group C and 0/9 in group D ( $p < 0.05$  between group A and B). TE administration at the promotion stage appeared to increase the proliferative lesions in accessory sex organs. In groups A and B, squamous cell carcinoma of the skin was found at an incidence of 16/26 (62%) and 13/24 (54%), respectively, and adenocarcinoma of the small intestine at 8/26 (31%) and 4/24 (17%), respectively.

**Key words:** Prostatic cancer of rats, N-methyl-N-nitrosourea, Testosterone