

ラットを使った前立腺化学発癌における高脂肪食のプロモーター  
作用の検討および新たな前立腺化学発癌の試み

高井 計 弘

# ラットを使った前立腺化学発癌における高脂肪食のプロモーター作用の検討および新たな前立腺化学発癌の試み

高井計弘

## 緒言

前立腺癌は欧米男性においては大腸癌と並ぶ代表的な癌であり、これまでその発生は低いとされていた本邦においても最近増加の傾向にある。しかし、前立腺癌の病因にはなお不明ことが多い。前立腺癌の発癌過程を実験動物で検討できれば、ヒトの前立腺癌の発育、進展を考える上で多くの情報が得られるはずである。

ヒト前立腺癌の発育進展の解明に役立つ有用な動物モデルは、今まで確立されていなかった。しかし、Boslandらは、Wistarラットに50mg/Kgのcyproterone acetateを3週間連日経口摂取させ、続いて3日間の100mg/Kgのtestosterone propionate（以下TP）の筋注、及び50mg/KgのN-nitroso-N-methylurea（以下NMU）の静注を行い、79週までに25%の腺癌の発生をみたと報告した<sup>1)</sup>。また白井らは、0.75ppmのethinyl estradiol（以下EE）含有食を3週間摂取させ、その後2週間基本食に戻し、その変更後の3日目に50mg/Kgの3,2'-dimethyl-4-amino-biphenyl（以下DMAB）を筋注する操作を1コースとしてこれを合計10回繰り返して投与し、Fischer344ラットで、85.7%の顕微鏡的前立腺腺癌の発生を報告した<sup>2)</sup>。

今回この高率に前立腺腺癌を発生した白井らの実験方法を追試し、さらにヒトの疫学的調査から前立腺発癌過程においてプロモーター作用が疑われる高脂肪食を摂取させ、顕在癌への進展の有無を検討した（実験1）。

しかし、十分な前立腺癌の発生が得られなかったため、新たな前立腺発癌モデルを作製しようと、既報の我々の発癌実験の結果<sup>3)</sup>および実験1の結果を検討し、白井らの実験方法を一部修正し、以下の追加実験を行った。

動物はFischer344にかえて、C3H/Heマウス（実験2）、およびACI/Segラット（実験3）を使用した。ACI/Segラットは、高率に前立腺腺癌の自然発生を認め前立腺癌の疫学、病因の研究に役立つものとして最近注目を集めている<sup>4-7)</sup>。すなわちACI/Segラットは、24ヶ月までに、全体の35~45%に前癌病変の異型過形成がみら

れる<sup>7)</sup>。これらは、その後腺房、導管に浸潤する篩状腺癌に進行した。腫瘍は大きくなるにつれ、結節性となり、被膜や周囲組織にも浸潤した。33カ月までには全体の95~100%に前癌病変の異型過形成がみられ、全体の35~40%に浸潤癌がみられたという<sup>7)</sup>。このACI/Segラットに白井らの化学発癌操作を加えれば、より高率に、より短期間に、腺癌の発生を可能とする動物モデルの作製が可能になるのではないかと考えた。

上記の3実験の結果より、現時点では前立腺発癌モデルについてはなお改良が必要と思われる、今後の動物モデルの作成の方向づけを試みた。

## 実験

### ラットを使った前立腺化学発癌における 高脂肪食のプロモーター作用の検討

#### 実験 1: 材料と方法

動物は雄性Fischer344ラットを5週齢でCharles River社より購入した。実験開始は6週齢である。23 ° C、湿度50%、昼夜12時間毎の明暗調節の飼育室において金属ケージに5匹ずつ飼育した。体重測定、ケージ交換は2週間毎に行った。

化学薬品の入手先は、EEはSigma社（セントルイス、ミズーリ州、米国）より、DMABは松垣薬品（大阪）からである。基礎食のCE-2（固型食、粉末食）は、日本クレア社（東京）から入手した。正常量脂肪食（以下NF食）と高脂肪食（以下HF食）も日本クレア社で作製させた。CE-2固形食は無処置の期間中に摂取させた。実験群に以下で説明するEE食を与えている期間中は、コントロール群には代わりにCE-2の粉末食を与えた。

3mgのEEを、10mlのコーン油に溶解し、これを4kgのCE-2粉末食に混ぜ、最終濃度0.75ppmになるように調整した。EE食は攪拌器にて一晩攪拌後、4 ° Cの冷所保存とし、適時与えた。DMABは、コーン油に溶かし50mg/kgの量になるよう調整し皮下注した。

Chanらの組成に従いNF食とHF食を同一熱量下に、脂肪と炭水化物の割合のみ変えて、その他の成分比は同一になるよう重量を調整した<sup>9)</sup>（表1）。

すなわち糖と炭水化物の熱量は4.1kcal/g、脂肪の熱量は9.2kcal/gとした場合、NF食100gに対しHF食は75.1gとなる。蛋白、ビタミン、ミネラル、繊維は、NF食、HF食ともに同一熱量下では同一重量比になるよう調整した。食餌には十分な必須脂肪酸が含まれるようにした。食餌は毎月新しいものを注文し、4 ° Cの冷温室で保存した。



Constituent	Normal fat diet (NF)	High fat diet (HF)
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Dextrose	64.5	19.6
Corn oil	5.0	25.0
Cellulose	5.0	5.0
Vit. mix (AIN-76)	1.0	1.0
Min. mix (AIN-76)	4.0	4.0
Choline bitartrate	0.2	0.2
Total	100g	75g

表1：実験1の正常量脂肪食と高脂肪食の組成の内訳。Chanらの報告に従った。ビタミン、ミネラルはAmerican Institute of Nutrition(AIN)モデルを使用している。

実験計画を図1に示した。グループ1, 2, 3の発癌処理は、白井らの方法に従ったものである。すなわちE E食を3週間摂取させ、その後2週間は基本食に戻す。基本食に変更後の3日目にDMAB 50 mg/Kgを皮下注射した。これを10回繰り返して50週経過観察したものである。グループ1は、60週で屠殺した。グループ2は、E EとDMABで処理した後、50週より80週までNF食を摂取させた群であり、グループ3は、E EとDMABを投与後、50週から80週までHF食を摂取させた群である。グループ4, 5, 6は、白井らの発癌処理を行わない群である。グループ4は、60週で屠殺した群であり、グループ1のコントロール群である。グループ5は、50週から80週までNF食を摂取させたもので、グループ2のコントロール群である。グループ6は、50週から80週までHF食を摂取させたもので、グループ3のコントロール群である。NF食群、HF食群ともに摂取カロリーが同一になるよう食餌量を調整し与えた。グループ2, 3, 5, 6のラットは80週で屠殺した。

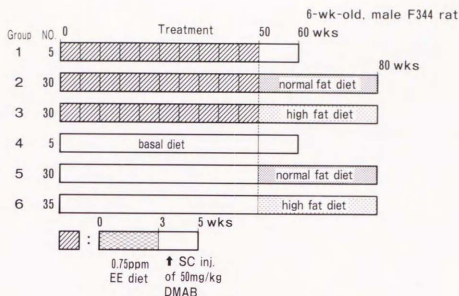


図1：実験1のスケジュール。グループ1，2，3には白井らの化学発癌操作を行い、グループ4，5，6は発癌操作を行わなかった。グループ2，5には50週から80週まで正常量脂肪食を、グループ3，6には高脂肪食を摂取させた。グループ1，4は60週、グループ2，3，5，6は80週で屠殺し、組織検索を行った。

屠殺後、前立腺、精のう腺、睪丸の重量を測定し、その組織/体重比を計算した。これらの臓器は15%ホルマリンで固定した。尿道を含め腹側葉、背側葉が観察できるよう前立腺の矢状面、横断面の標本作製し、Hematoxylin-Eosin(H・E)染色を行った。他臓器で肉眼的に異常病変が見られた場合には、その臓器も組織学的に検討した。組織の診断基準は伊東<sup>9)</sup>の組織所見を参照し、前報<sup>2)</sup>及び、白井らの基準<sup>10)</sup>に従った。すなわち、前立腺上皮が一層の円柱上皮で配列されている場合は正常とした。癌は核の大小不同、核の濃染性、極性の消失などが明瞭な腫瘍細胞から成り、構造的には不整な篩状構造をとり、充実性で1つ以上の腺房に浸潤する大きな増殖性病変とした。異型過形成は、癌細胞よりも細胞異型は弱いものの核の大小不同などが見られ、正常とは異なる細胞から成る小さな増殖性病

変で小葉構造には乱れがないものとした。単純性過形成は、構成する細胞には細胞異型はなく、腺房の上皮配列に軽度の乳頭状増殖性変化などをみたとした。有意差の検定はBonferronieの検定に従った<sup>11)</sup>。

# 実験1：結果

## <体重変化>

各群のラットの体重変化を図2に示した。50週までは、EE+DMAB投与群（グループ1，2，3）と無処置群（グループ4，5，6）で体重に有意の差がみられていた。しかし、EE+DMAB投与群でもEE+DMAB投与終了後は、NF食（グループ2），HF食（グループ3）群ともに体重増加がみられ、80週の屠殺時の、最終体重では、全群とも近似の値であった。

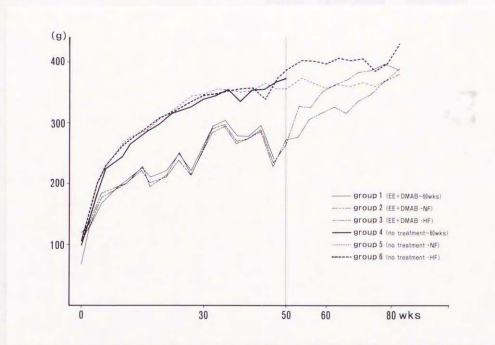


図2：実験1の体重変化表。EEとDMABを投与している50週までは、グループ1，2，3は非投与群のグループ4，5，6よりも有意に体重が低かった。しかし、投与終了後は、グループ2，3でも体重増加がみられ、最終体重は各群で有意の差はみられなかった。



< 前立腺の組織学的検索 >

各群の屠殺時の有効頭数、および腺癌、異型過形成の発生率を表2にまとめた。前立腺の顕在癌は認められず、全て顕微鏡的腺癌であった(図3, 4)。

EE + DMAB処置群(グループ1, 2, 3)と無処置群(グループ4, 5, 6)の比較では、異型過形成の発生率は各々19/60(31.7%), 6/66(9.1%)であり、腺癌の発生率は各々15/60(25.0%), 2/66(3.0%)であり、ともに有意の差でEE + DMAB処置群が高値であった。

Group (treatment)	Effective no. of animals	Incidence (%)	
		Atypical hyperplasia	Carcinoma
1 (EE+DMAB~60wks)	5	2/5 (40)	0
2 (EE+DMAB → NF)	26	4/26 (15.4)	9/26 (34.6)
3 (EE+DMAB → HF)	29	13/29 (44.8)	6/29 (20.7)
4 (no treatment~60wks)	5	1/5 (20)	0
5 (no treatment → NF)	29	4/29 (13.8)	0
6 (no treatment → HF)	32	1/32 (3.1)	2/32 (6.3)

表2: 実験1の60週での有効頭数、および腺癌、異型過形成の発生率。白井らの発癌操作を加えたグループ1, 2, 3は、非投与群のグループ4, 5, 6よりも有意の差で腺癌、異型過形成の発生率が高かった。グループ2と3の間では有意の差はみられなかった。

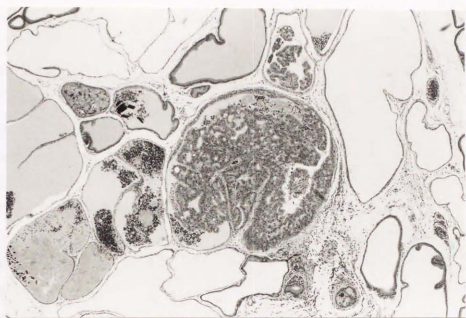


図3：実験1の前立腺腺癌組織像。篩状腺癌構造を示す。数個の腺房に増殖している。H・E染色、20倍。

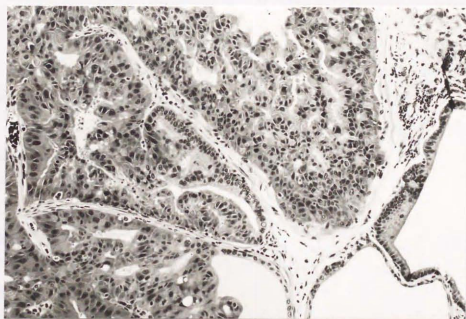


図4：実験1の前立腺腺癌組織像。核の大小不同性、核の濃染性、極性の消失が明瞭にみられる。構造的には不整な篩状腺癌である。H・E染色、40倍。

グループ1と4では、腺癌は両群ともみられなかったが、異型過形成は、各々40%，20%にみられた。

E E + DMAB処置群のNF（グループ2），HF（グループ3）による比較では、異型過形成の発生率は、各々4/26(15.4%)，13/29(44.8%)であり、腺癌の発生率は、9/26(34.6%)，6/29(20.7%)であった。すなわち、腺癌の発生数は、むしろ高脂肪食を摂取させたグループ3で有意に低値であった。しかし、異型過形成と腺癌の発生数を合計すると、全体の発生数は、グループ2では13/26(50%)、グループ3では19/29(65.5%)であり、両者に有意の差はみられなかった。グループ2の腺癌は全て腹側葉に存在していたが、グループ3では、腺癌は腹側葉、背側葉の両方で認められた。

発癌処理を行わず、実験期間中基本食を、引き続きNF食を摂取させたグループ5では、腺癌は1例もなく、異型過形成が、4/29(13.8%)に認められたのみであった。基本食摂取後HF食を摂取させたグループ6では、腺癌が2/32(6.3%)にみられ、異型過形成が1/32(3.1%)にみられた。

#### <組織/体重比>

体重、前立腺、精のう腺、睪丸の重量および各々の組織/体重比を表3に示した。

体重は、60週で屠殺したグループ1とグループ4では有意差はなかったが、グループ1は、80週で屠殺したグループ2，3，5および6に対し、有意に低値を示した（ $P<0.01$ ）。またグループ6は、グループ1，2，3，4および5の全てのグループに対し、有意に高値を示した（ $P<0.05$ ）。

前立腺、精のう腺は、重量および重量/体重比ともに、どの群においても有意の差はみられなかった。右睪丸は、重量/体重比において、グループ1はグループ2，3，4および6に対して有意に高値を示した（ $P<0.01$ ）。またグループ2はグループ4に対して有意

に低値を示した ( $P<0.05$ )。左睪丸は、重量/体重比においてグループ1はグループ2および6に対し、有意に高値を示した ( $P<0.01$ )。またグループ5は、グループ6に対し有意に高値を示した ( $P<0.01$ )。

Group	Weight								
	Prostate			Seminal Vesicle	Right Testis		Left Testis		
	body	actual	prostate/body	actual	seminal vesicle/body	actual	right testis/body	actual	left testis/body
	(g)	(g)	(10 <sup>-3</sup> )	(g)	(10 <sup>-3</sup> )	(g)	(10 <sup>-3</sup> )	(g)	(10 <sup>-3</sup> )
1	313 ± 14 <sup>*1</sup>	1.10 ± 0.23	3.49 ± 0.65	1.48 ± 0.17	4.71 ± 0.34	1.53 ± 0.06	4.89 ± 0.21 <sup>*3</sup>	1.57 ± 0.10	5.03 ± 0.46 <sup>*5</sup>
2	379 ± 27	1.22 ± 0.28	3.23 ± 0.76	1.64 ± 0.28	4.36 ± 0.81	1.42 ± 0.18	3.51 ± 0.69 <sup>*4</sup>	1.52 ± 0.10	3.97 ± 0.46
3	392 ± 44	1.41 ± 0.44	3.66 ± 1.20	1.82 ± 0.49	4.56 ± 1.46	1.43 ± 0.15	3.68 ± 0.44	1.57 ± 0.42	3.99 ± 1.11
4	367 ± 15	1.18 ± 0.12	3.21 ± 0.30	1.48 ± 0.17	4.02 ± 0.40	1.53 ± 0.07	4.16 ± 0.22	1.57 ± 0.10	4.28 ± 0.29
5	382 ± 33	1.31 ± 0.42	3.44 ± 1.06	1.62 ± 0.37	4.23 ± 0.89	1.63 ± 0.70	4.59 ± 2.03	1.67 ± 0.28	4.46 ± 0.85 <sup>*6</sup>
6	417 ± 32 <sup>*2</sup>	1.36 ± 0.30	3.30 ± 0.73	1.67 ± 0.33	4.01 ± 0.80	1.65 ± 0.59	3.97 ± 1.44	1.57 ± 0.22	3.76 ± 0.49
*1: P < 0.01 between group 1 and groups 2, 3, 5 and 6						*4: P < 0.05 between group 2 and 4			
*2: P < 0.05 between group 6 and groups 1, 2, 3, 4 and 5						*5: P < 0.01 between group 1 and groups 2 and 6			
*3: P < 0.01 between group 1 and groups 2, 3, 4 and 6						*6: P < 0.01 between group 5 and 6			

表3: 実験1の60週での体重、前立腺、精のう腺、睪丸の重量および各々の組織/体重比。前立腺、精のう腺の重量比については6群間で有意の差はみられなかった。

## 新たな前立腺化学発癌の試み

### 実験 2：材料と方法

動物は雄性 C3H/He マウスを 6 週齢で Charles River 社より購入した。実験開始は 7 週齢である。23° C，湿度 50%，昼夜 12 時間毎の明暗調節の条件下で、プラスチック製ケージに各 10 匹ずつ飼育した。床敷はウッド・チップを使用した。ケージ交換は毎週、体重測定は 2 週間毎に行った。

化学薬品の入手先は、Chlormadinone acetate (以下 CMA) は帝國臓器製薬 (東京)、TP は、持田製薬 (東京)、DMAB は松垣薬品 (大阪) である。

実験方法を図 5 に示した。第 1 群から第 7 群はコントロール群であり、第 8 群が、実験群である。

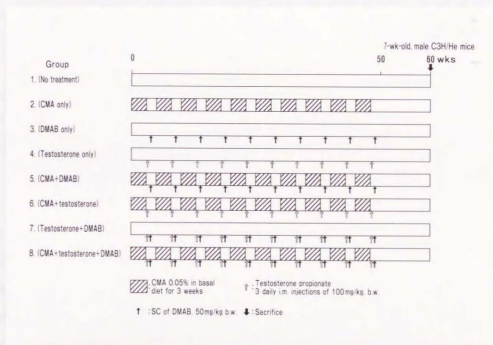


図 5：実験 2 のスケジュール。グループ 8 が、実験群で、グループ 1 から 7 は無処理および各操作のコントロール群である。60 週で組織検索を行った。



すなわち第1群は無処理群、第2群は、CMA単独群、第3群はDMAB単独群、第4群は、TP単独群、第5群はCMA+DMAB群、第6群はCMA+TP群、第7群はTP+DMAB群、第8群はCMA+TP+DMAB群である。CMA食は基本食のCE-2粉末食にCMAを0.05%の濃度で混ぜたものとし、これを3週間投与した。その後2週間は基本食に戻す。基本食に変更後の3日間連続50mg/mlの割合でコーン油に溶かしたTPを100mg/Kgとなるよう皮下注射した。その翌日50mg/Kgになるようコーン油に溶かしたDMABを皮下注射した。この発癌処理を1コースとして計10回施行した。50週から60週は基本食とした。60週にて屠殺し、組織学的検索を行った。組織学的検索方法、組織学的診断基準および統計学的解析方法は実験1と同様である。

#### 実験2：結果

60週時における各群の有効頭数、組織学的所見および前立腺重量の結果を表4にまとめた。コントロール群、実験群とも腺癌は認められず、単純性過形成(図6)、異型過形成(図7)までの変化であった。

Group(treatment)	Effective no. of animals	Incidence (%)		Weight	
		Simple hyperplasia	Atypical hyperplasia	Actual(g)	prostate/body( $\times 10^{-3}$ )
1.(No treatment)	11	0(0)* <sup>1)</sup>	0(0)	0.199 $\pm$ 0.027	5.28 $\pm$ 0.84* <sup>3)</sup>
2.(CMA only)	9	0(0)* <sup>1)</sup>	0(0)	0.186 $\pm$ 0.030	5.23 $\pm$ 0.87
3.(DMAB only)	8	2(25)	0(0)	0.222 $\pm$ 0.059	5.89 $\pm$ 1.46
4.(Testosterone only)	9	2(22)	2(22)	0.160 $\pm$ 0.30	4.54 $\pm$ 0.93* <sup>2)</sup>
5.(CMA+DMAB)	14	3(21)* <sup>1)</sup>	3(21)	0.192 $\pm$ 0.052	5.39 $\pm$ 1.29* <sup>3)</sup>
6.(CMA+testosterone)	13	1(8)* <sup>1)</sup>	0(0)	0.178 $\pm$ 0.034	4.95 $\pm$ 0.99* <sup>2)</sup>
7.(Testosterone+DMAB)	13	1(8)* <sup>1)</sup>	1(8)	0.184 $\pm$ 0.03	5.59 $\pm$ 0.98
8.(CMA+testosterone+DMAB)	64	35(55)	16(25)	0.250 $\pm$ 0.74	6.69 $\pm$ 1.87

\*<sup>1)</sup>P<0.05 between group 8  
and groups 1,2,5,6 and 7

\*<sup>2)</sup>P<0.01 between group 8  
and groups 4 and 6

\*\*<sup>3)</sup>P<0.05 between group 8  
and groups 1 and 5

表4（前出）：実験2の60週時での有効頭数、単純性過形成と異型過形成の発生率および前立腺重量と前立腺／体重比。前立腺腺癌の発生は認めなかった。実験群のグループ8は、コントロール群のグループ1，2，5，6，7よりも有意の差で高い単純性過形成の発生を認めた。異型過形成については、各群間で有意の差はみられなかった。

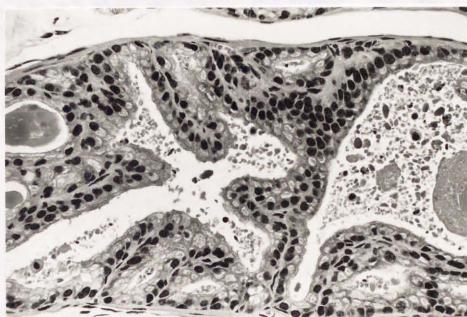


図6：実験2の前立腺単純性過形成組織像。上皮細胞に異型はなく、細胞は数層に、増殖配列している。構造異型はみられない。H.E染色，66倍。

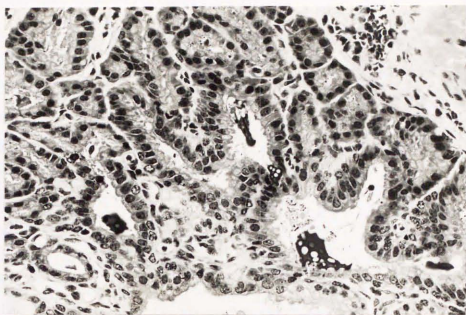


図7：実験2の前立腺異型過形成組織像。異型細胞が多層性に配列している。H,E, 66倍。

実験群では、コントロール群に対し、単純性過形成の発生率は、有意の差で高くみられたが、異型過形成では有意の差はみられず、T P単独群、CMA+DMAB群でも、その発生がみられた。

### 実験3：材料と方法

使用した動物はACI/Segラットで、入手先はHarlan Industries（カンバーランド，インディアナ州，米国）である。入荷時22週齢で実験開始は25週齢である。4匹ずつ金属ケージに分け、昼夜12時間毎、室温23°C、湿度50%の恒温状態とした。各々のラットは、右耳切り、左耳切り、両耳切り、耳切りなし、により個体識別をした。

実験計画と有効頭数を図8に示した。実験群1（以下実験群）は、ACI/Segラットに白井らの方法を行ったものである。実験群2はコントロール群であり、実験期間中基本食を摂取させ、DMABの代わりにコーン油の皮下注を行ったものである。

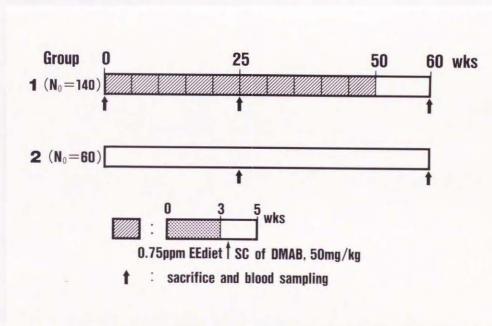


図8：実験3のスケジュール。グループ1に白井らの化学発癌操作を10回繰り返して行った。グループ2は無処置群である。初期病変を検索するため0週時にグループ1の10匹、25週時に両群のそれぞれ5匹を組織検索した。60週で全動物を屠殺し組織検索を行った。

血中テストステロンを実験開始時、実験開始後25週、実験終了時に測定した。採血方法は尾静脈採血とし、採血量は約0.5mlの血清を採取するため1mlとした。採血後の処理と保存方法は、室温で放置の後、遠心分離し、血清を $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、ラジオイムノアッセイ(以下RIA)法により測定した<sup>12)</sup>。採血は日内変動の影響を少なくするため午前10時より午前12時の間で行った。

初期病変をみるため実験開始時に1群の10匹を屠殺した。25週時に各群5匹ずつ屠殺した。60週で全動物を屠殺し、病理学的検索を行った。途中死亡の動物もでき得る限り、病理学的に検索した。組織学的検索法、組織学的診断基準および統計学的解析方法は実験1と同様である。

### 実験3：結果

#### <食餌摂取量と体重の変化>

1日の食餌摂取量の変化を図9に示した。

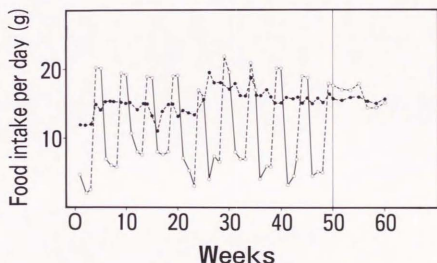


図9：実験3の1日食餌摂取量の推移。実験群1では、EEとDMABの副作用により、著明な摂取量の減少が繰り返り認められた。

○：実験群1、●：実験群2、

—：EE食、--：CE-2基本食



実験群ではEE食投与時の1日摂取量は3~8g/日で、基本食投与時の18~20g/日と大きな違いがみられた。この変化はEE食を投与中繰り返しまれた。コントロール群では平均15g/日であった。

体重の変化を図10に示した。20~25週は測定しなかった。

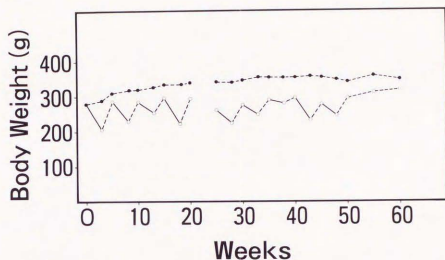


図10：実験3の体重変化表。実験群1では、EE食の投与中体重減少が認められたが、EE食からCE-2食に食餌を変更すると体重は回復、増加していた。その増減の変化が繰り返しまれた。

○：実験群1、●：実験群2，  
—：EE食、--：CE-2基本食

1日摂取量を反映して、実験群では、その体重に著明な変化がみられた。すなわち、EE食摂取時は、基本食摂取時よりも20~80gの体重差があったが、EE食に戻すと、元の体重に戻り、さらに体重増加がみられた。実験群の体重は実験期間を通じてコントロール群よりも体重が低かった。

実験群では30週までは死亡数は21匹であったが、その後毎週1～2匹が死亡し、最終有効頭数は74匹であった。途中死亡したもので死因が判明している動物の大半が、下顎（Zymbal gland）に発生した腫瘍や腹部、背部の皮下腫瘍によるものであり、前立腺癌によるものは1例もなかった。実験群では、合計24例の下顎腫瘍、8例の皮下腫瘍、6例の膀胱腫瘍をみたが、コントロール群では1例もなかった。その他の死亡は他動物の咬傷により個体の保存が十分でなく検討できなかった。コントロール群では、下顎腫瘍などによる死亡はなく、有効頭数は54匹であった。

<組織学的所見及び組織重量、組織重量／体重比>

実験開始時及び25週時では、前立腺に病変を認めたものはなかった。表5に60週時の組織学的検索結果を示した。

Group	Treatment	Effective No. of rats	No. (%) of rats with lesions in the ventral lobe of prostate gland		
			Simple Hyperplasia	Atypical Hyperplasia	Carcinoma
1	EE+DMAB	74	25 (33.8)*	17 (23.0)*	6 (8.1)
2	no treatment	54	6 (11.1)	2 (3.7)	2 (3.7)

\*:  $P < 0.01$  between group 1 and 2

表5：実験3の60週時の組織学的検査結果。実験群のグループ1は、コントロール群のグループ2よりも、単純性過形成と異型過形成の高率の発生を認めたが、腺癌については有意の差はみられなかった。

なお、これらの前立腺病変は、何例かでは、重複して観察された。たとえば1つのラットで、癌(図11)と異型過形成(図12)、他方のラットでは異型過形成と単純性過形成など、2種または、3種の病変が重複して観察された。この組織像より本検討でも単純性過形成から異型過形成さらに篩状腺癌への連続性進展が推測された。

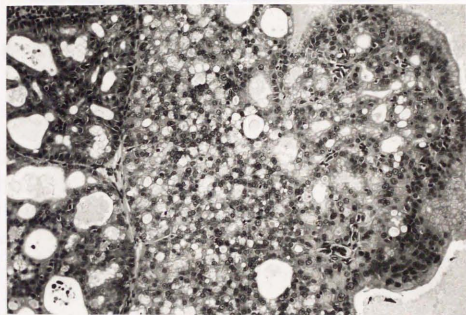


図11: 実験3の前立腺腺癌組織像。中心から右側にかけて図4よりも腺腔形成がより不鮮明な篩状腺癌を認める。左側の上下には、構築パターンの異なるやや分化度の高い癌組織を認める。  
H. E染色, 50倍。

実験群では、腺癌は6/74(8.1%)にみられ、コントロール群の2/54(3.7%)との間に有意の差はみられなかった。これら腺癌は全て顕微鏡的腺癌であった。病変は全て前立腺の腹側葉にみられ、側葉、背側葉には1例もみられなかった。精嚢腺には癌はみられなかった。



図12：実験3の異型過形成組織像。左側には、より異型が強く篩状腺癌に近い異型過形成像が、右側には、それよりも構造異型が弱く単純性過形成に近い異型過形成組織を認める。H E 染色、25倍。

異型過形成は、実験群(17/74; 23.0%)の方が、コントロール群(2/54; 3.7%)より有意に高い頻度でみられた( $P<0.01$ )。単純性過形成も実験群(25/74; 33.8%)の方が、コントロール群(6/54; 11.1%)よりも有意に高い頻度でみられた。

また、各群の体重、前立腺重量、前立腺重量/体重比、精のう腺、精のう腺/体重比を表6に示した。実験群とコントロール群の群全体の比較では、体重、前立腺は、コントロール群の方が有意に重かった( $P<0.01$ )。精のう腺は、実験群の方が、有意に重かった( $P<0.05$ )。

Group	Treatment	Effective no. of rats	weight			
			Body (g)	Prostate(g)	Prostate gland % of body weight	Seminal vesicle (g) Seminal vesicle % of body weight
1	EE+DMAB	74	332.5±41.0*	1.16±0.27*	3.64±0.83(10 <sup>-3</sup> )*	1.62±0.54** 4.99±1.66(10 <sup>-3</sup> )*
2	no treatment	54	350.1±33.7	1.42±0.32	4.10±1.09(10 <sup>-3</sup> )	1.40±0.44 3.99±1.37(10 <sup>-3</sup> )

\*: P<0.01 between group 1 and 2

\*\*: P<0.05 between group 1 and 2

表6：実験3の体重、前立腺重量、前立腺重量／体重比、精のう腺、精のう腺／体重比。グループ1は体重、前立腺重量が、グループ2に対し有意の差で低値であったが、精のう腺は有意の差で高値を示した。

血中テストステロン値を表7に示した。実験群と、コントロール群全体の比較では、実験開始時は、コントロール群の方が有意に高値を示し(P<0.01)、25週時と60週時では、実験群の方が有意に高い値を示した(P<0.01)。



Group	開始時	25 週 時	60 週 時
1 EE+DMAB	1.62 ± 0.88 *	2.86 ± 2.20 *	2.27 ± 1.68 *
2 no treatment	2.59 ± 1.95	1.94 ± 0.88	1.50 ± 1.41

\*:  $P < 0.01$  between group 1 and 2

表 7: 実験 3 の実験開始時、25週時、60週時の血中テストステロン値。開始時まではグループ 2 が、25週時、60週時ではグループ 2 が、25週時、60週時まではグループ 1 の方が有意の差で高値を示した。

## 考察

ヒトの疫学的調査から、高脂肪は、直腸癌や乳癌、前立腺癌の発癌に關与していると言われ<sup>13)</sup>、多くの動物実験でもその相関が証明されている。

1942年Tannenbaumは、DBAマウスに対し、コントロール群の6倍の脂肪を含む12%高脂肪食を与えたところ、高率の乳癌の発生をみたという<sup>14)</sup>。以来、多くの実験が行われ、乳癌、大腸癌においては高脂肪食の発癌のプロモーター作用が確認されている。これらをまとめると、以下の如くである<sup>8, 15-18)</sup>。

(1)化学発癌操作を行い、その後高脂肪食を摂取させた動物では、腫瘍の発生をみた動物の数および1匹あたりの腫瘍数ともに増加した。また腫瘍が発生するまでの期間も短縮されていた。

(2)化学発癌操作後に高脂肪食を与えた時のみ、プロモーター作用が認められ、その逆では認められなかった。

(3)飽和脂肪酸よりも不飽和脂肪酸の含量が多い方が腫瘍の発生が増加した。また十分な必須脂肪酸を含んだ条件下では特にリノレン酸、オレイン酸が発癌に大きな役割りを果たすと思われた。

以上のことが、前立腺癌にも当てはまるのかどうかを検討するため本実験1を行なった。

発癌操作を行ったグループ1, 2, 3と無処置群のグループ4, 5, 6の全体の比較では、異型過形成、腺癌の発生率ともに、2群間で有意の差がみられた。しかし、化学発癌操作群にしても白井らの報告よりも癌の発生は34.6%と低値であった。その原因としては、白井らも述べているようにEEとDMABによる体重抑制が考えられる<sup>19-21)</sup>。乳癌、大腸癌の動物実験でも、体重抑制は腫瘍の発生を抑えることが確認されている<sup>22)</sup>。

EEによる薬物的去勢は、前立腺に一旦萎縮をおこし、その投与中止によりリバウンド現象が起こり、前立腺を刺激すると考えられている<sup>2)</sup>。しかし、実はその刺激効果は不確実であり、むしろ完全な前立腺の萎縮を起こすこともあると思われる。本実験ではリバウ

ンド現象が起こったとしてもEE食の摂取量自体が少なかったため、十分に細胞増殖が得られなかったことも考えられる。

また80週の屠殺は、検討時期としては尚早であったのかもしれない。異型過形成までは多発性に高率に発生していたものの癌の発生率は低く、顕在癌もみられなかったことからそれが疑われる。

このため、本来の目的であるグループ2とグループ3との比較から前立腺発癌における高脂肪食の関与については結論は得られなかった。しかし、無処置群にもかかわらず、高脂肪食を投与したグループ6で、腺癌が2例(6.3%)にみられたことは、高脂肪食のco-carcinogenic作用を疑わせるものである。さらに、高脂肪食と前立腺発癌については検討すべきと思われる。

しかし、その前提である前立腺発癌モデルについては、現在最も有用と思われた白井らの方法を追試したが、その頻度は高率ではなかった。彼らのその後の追試でも、前立腺癌の発生率は全て58.6%以下に下降している<sup>19-21, 23)</sup>。このため、なお改良の余地があると思われる。

我々は以前、Boslandらの方法を一部修正し、CMAとTPでホルモン操作を行ったあと、NMUを投与した実験を行った<sup>3)</sup>。これでは、CMAとTPにより前立腺組織に萎縮と増殖の両方の変化が起きていることを確認できた。そのため実験2として、白井らの方法のうち、体重抑制の強いEEの投与の代わりに、CMAとTPによる操作を選んだ。またNMUでは、他臓器腫瘍の発生が多かったため<sup>3)</sup>、NMUよりも前立腺に特異的と思われたDMABは、そのまま使用した。また飼育の容易さから、より早期に、高率な癌の発生を得ることを目的とするために、動物はFisher344ラットではなく、C3H/Heマウスを使用した。

しかし、その実験系では、前立腺癌の発生は全く認めなかった。元来、げっ歯類における前立腺癌の発生は、非常に稀なものであるため、発癌処理を加えたことにより腺癌の発生をみた場合は、その発癌処理が十分有効であったことを示すとされている。実験2における発癌操作は、不十分なものと判断せざるを得なかった。

このため実験3として、再度白井らの方法に戻り、動物としてはACI/Segラットを使用した。ACI/Segラットは、1926年にCartisとBullockによりAugust血統系とCopenhagen血統系の交配により作られ、1951年Segalilofが純系としたものである<sup>7)</sup>。

ACI/Segラットに高率に微小前立腺腺癌が自然発生する原因の1つとして、前立腺が成熟重量に達するのに親にあたるCopenhagenラットでは8カ月であるのに対し、ACI/Segラットでは12カ月から18カ月と長期間を要することが挙げられている。血中テストステロンも、Copenhagenラットでは3カ月から8カ月の間に約3 ng/mlの最高値を示し、その後は減少し24カ月では約1 ng/mlであるのに対し、ACI/Segラットでは4カ月から24カ月まで3.5~4.0 ng/mlを示し、この間Copenhagenラットの1.5倍から3.5倍の血中テストステロン値を示したという<sup>7)</sup>。

つまりACI/Segラットにおいては、成熟臓器になるまでの細胞分裂の盛んな時期に、前立腺は高テストステロン環境下に置かれていると思われる。Nobleらは、ラットの皮下にTPのベレットを埋め込み、高率の前立腺腺癌の発生に成功し、テストステロンが前立腺腺癌の発癌過程においてpromotor作用を果たすことを証明した<sup>24)</sup>。すなわちACI/Segラットは、Nobleらの方法の自然の実験系とも考えることができる。

しかし、予想に反しACI/Segラットに白井らの化学発癌操作を加えても、前立腺腺癌の発生は8.1%と低く、全て微小癌であり顕在癌はみられなかった。その原因としては、実験1と同様の理由が推測される。すなわち実験3でもEE、DMABによる体重抑制が著明であり、これが実験群の死亡率が高い原因と思われた。さらに実験群では体重や前立腺、睪丸などの生殖器官の重量が有意に低かった。Söderkiviらは、前立腺腹側葉にはDMABを活性化し発癌作用を発現させる酵素があるという<sup>25)</sup>。前立腺重量の減少は、これら前立腺の酵素の減少をもたらし、DMABの発癌効果を抑えたのかもしれない。

白井らも追試で明らかにしているように<sup>21, 23)</sup>、EE投与により

有意に体重が減少するような実験条件は好ましくない。

Pollardらは薬物的去勢を行わず、testosteroneとNMUのみで10.6ヶ月の観察で9匹中6匹(66%)に顕在癌をみたと報告しており<sup>26)</sup>、実験1, 3の実験結果も合わせ、今後の方向としては薬物的去勢は必要ないと思われる。

またWardら<sup>6)</sup>およびSaksena and Lowの報告<sup>27)</sup>とは異なり、今回の我々の実験ではACI/Segラットの血中テストステロンが、両群とも実験期間を通じ全体に低値で、3ng/ml以上を示す動物は少なく大半が0.5~1.5ng/mlであったことである。その原因は、コントロール群でも、低値であったことより、発癌操作によるものではなく、血中テストステロンの測定法による可能性もある。血清分離までの処理に問題があって、その間にテストステロンが不活性化したのかもしれない。

ラットを個体識別し、無作為にグループ分けした0週時で既に、実験群とコントロール群で血中テストステロン値に有意の差が認められたことも予想外であった。ACI/Segラットが報告<sup>7)</sup>にあるようなホルモン学的にも完全な純系であったかどうかの問題もあるが、この点も不明である。

最終的にはラットは実験1よりも高齢の85週齢で屠殺したが、たとえ感受性の高い動物を使用したとしても、前立腺癌の顕在化をみるのには、早すぎたのかもしれない。今回の実験でACI/Segを生後25週齢と比較的高齢ラットを使用したのは、前報の結果で6週齢の早い時期に化学発癌操作を加えても、その4週後にはその影響が完全に消失していたことより<sup>3)</sup>、前立腺癌のような高齢で発癌する癌においては、早期からの操作は必要でないのではないかと考えたこと、ラットの輸入、入手の条件の制約からこの程度の週齢の動物しか揃った頭数を入手することが困難だったことなどが理由である。また観察期間は80週と短期でも、より高齢の時点で判断でき、病変がより明らかになるのではないかと考えた。さらにACI/Segラットは24ヶ月齢まで高いテストステロン値を示すという報告<sup>7)</sup>から、25週



からの投与でも高テストステロン環境下での化学発癌操作となり、我々の目的に合致すると思われたからである。その後白井らは5週齢、35週齢、65週齢と週齢が異なるラットを使用しても発癌率に差がなかったと報告していることから<sup>23)</sup>、この週齢の問題は影響は少ないと思われる。

以上より、前立腺腺癌の発生にはある程度以上の加齢が必要であり、単なる化学的発癌物質のみでは、高率でかつ短期の発生は得られないと思われた。今後の前立腺腺癌の誘発方法としては、薬物的去勢は行わずTPによるホルモン刺激を行い化学発癌物質を投与するという操作を繰り返すことが妥当と思われる。高率に前立腺腺癌、特に顕在癌を発生する動物モデルを確立するにはなお膨大な研究が必要と思われる。

#### まとめ

A: ラットを使った前立腺化学発癌における高脂肪食のプロモーター作用の検討

1) 高率に前立腺腺癌を発生する白井らの化学発癌操作を追試し、さらにヒトの疫学的調査から前立腺発癌過程においてプロモーター作用が疑われる高脂肪食を摂取させ、顕在癌への進展の有無を検討した。

2) 動物は5週齢雄性Fischer344ラットで、0.75ppmE食を3週間摂取させ、その後2週間基本食に戻した。基本食に変更後の3日目にDMAB 50mg/Kgを皮下注した。これを10回繰り返し、50週経過観察した。その後50週より80週までChanらの組成に従い、同一熱量下に脂肪と炭水化物の割合のみ変えて、その他の成分比は同一になるよう重量を調整したNF食(5%脂肪食)とHF食(25%脂肪食)を摂取させた。80週で屠殺し、前立腺の組織学的検索を行った。

3) 癌は核の大小不同、核の濃染性、極性の消失などが明瞭な腫瘍細胞から成り、構造的には不整な篩状構造をとり、充実性で1つ以上の腺房に浸潤する大きな増殖性病変とした。異型過形成は、癌細胞よりも細胞異型は弱いものの核の大小不同などが見られ、正常とは異なる細胞から成る小さな増殖性病変で、小葉構造には乱れがないものとした。単純性過形成は、構成する細胞には細胞異型はなく、腺房の上皮配列に軽度の乳頭状増殖性変化などをみたものとした。

4) 結果は、全て顕微鏡的腺癌で、顕在癌は認められなかった。化学発癌操作群と無処置群の比較では、異型過形成の発生率は各々19/60(31.7%)、6/66(9.1%)であり、腺癌の発生率は各々15/60(25.0%)、2/66(3.0%)であり、ともに化学発癌操作群が、有意に高値を示した。

化学発癌操作群のNF、HF食群による比較では、異型過形成の発生率は各々4/26(15.4%)、13/29(44.8%)であり、腺癌の発生率は9/26(34.6%)、6/29(20.7%)であった。異型過形成と腺癌の発生数を合計すると、全体の発生数はNF食では13/26(50%)、HF食では19/29(65.5%)であり、両者に有意の差はみられなかった。しかし、化学

発癌操作を行わずに H F 食を摂取させた群でも腺癌が 2/32(6.3%)にみられ、ラット前立腺発癌における高脂肪食の関与が疑われ、今後の検討が必要と思われる。

前立腺、精のう腺は、重量および重量/体重比とともに、どの群においても有意の差はみられなかった。

#### B. 新たな前立腺化学発癌の試み

1) A の実験で前立腺腺癌の発生率は最高 34.6% であり、なお改良の余地があると思われる。このため新たな前立腺化学発癌の試みとして、6 週齢雄性 C3H/He マウスに 0.05% CMA 食を 3 週間投与し、その後 2 週間基本食を投与した。基本食に変更後の 3 日間連続して T P 100mg/Kg を皮下注した。これを 1 コースとして計 10 回施行し、60 週にて屠殺し、前立腺の組織学的検索を行った。

2) 結果は、コントロール群、実験群とも腺癌は認められず、単純性過形成、異型過形成までの変化であった。実験群は、コントロール群に対し単純性過形成の発生率は有意に高値を示したが、異型過形成では有意差は示さなかった。

3) 次の実験として、高率に前立腺微小癌を自然発生する ACI/Seg ラットを使用し、これに実験 A の前述した白井らの化学発癌操作を行った。60 週で屠殺し、前立腺の組織学的検索を行った。

4) 結果は、実験群では腺癌は 6/74(8.1%) にみられ、コントロール群の 2/54(3.7%) との間に有意の差はみられなかった。全て顕微鏡的腺癌であった。異型過形成は、実験群(17/74; 23.0%)の方が、コントロール群(2/54; 3.7%) より有意に高い頻度でみられた。単純性過形成も実験群(25/74; 33.8%)の方が、コントロール群(6/54; 11.1%) よりも有意に高い頻度でみられた。

5) 以上より白井らの発癌操作は、体重抑制が強く、ある程度以上の発癌は得られるものの再現性は十分ではない。体重抑制を引き起こすと思われる薬物的去勢は必要ないと思われ、今後の前立腺腺癌の誘発方法としては、T P によるホルモン刺激を加え、化学発癌物

質を投与するという操作を繰り返すことが妥当と思われる。

また前立腺癌の発生にはある程度以上の加齢が必要であり、単なる化学発癌物質のみでは、高率でかつ短期の発生は得られないと思われた。

# 文献

1. Bosland, M.C., Priksen, M.K and Kroes, R.: Adenocarcinomas of the prostate induced by N-nitroso-N-methylurea in rats pretreated with cyproterone acetate and testosterone. *Cancer Lett.*, 18: 69-78, 1983.
2. Shirai, T., Fukushima, S., Ikawa, E., Tagawa, Y and Ito, N.: Induction of prostate carcinoma in situ at high incidence in F344 rats by a combination of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and ethinyl estradiol. *Cancer Res.*, 46: 6423-6426, 1986.
3. Takai, K., Kakizoe, T., Tobisu, K., Ohtani, M., Kishi, K., Sato, S and Aso, Y.: Sequential changes in the prostate of rats treated with chlormadinone acetate, testosterone and N-nitroso-N-methylurea. *J. Urol.*, 139: 1363-1366, 1988.
4. Shain, S.A., McCullough, B and Segaloff, A.: Spontaneous adenocarcinomas of the ventral prostate of aged AXC rats. *J Natl Cancer Inst.*, 55: 177-180, 1975.
5. Shain, S.A., McCullough, B., Nitchur, M and Boesel, R.W.: Prostate carcinogenesis in the AXC rats. *Oncology.*, 34: 114-122, 1977.
6. Ward, J.M., Reznik, G., Stinson, S.F., Lattuada, C.P., Long-fellow, D.G and Cameron, T.P.: Histogenesis and morphology of naturally occurring prostatic carcinoma in the ACI/seg Hap BR rat. *Lab. Invest.*, 43: 517-522, 1980.
7. Isaacs, J.T.: The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis. *Cancer Res.*, 44: 5785-5796, 1984.
8. Chan, P.C and Dao, T.L.: Enhancement of mammary carcinogenesis by a high-fat diet in Fischer, Long-Evans, and Sprague-Dawley rats. *Cancer Res.*, 41: 164-167, 1981.



9. 伊東 信行: 実験動物組織学. 第1版, ソフトサイエンス社, 東京, 1986.
10. Shirai, T., Sakata, T., Fukushima, S., Ikawa, E and Ito, N.: Rat prostate as one of the target organs for 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced carcinogenesis: Effects of dietary ethinyl estradiol and methyltestosterone. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76: 803-808, 1985.
11. Wallenstein, S., Zucker, C.L and Fleiss, J.L.: Some statistical methods useful in circulation research. *Circulation Res.*, 47: 1-9, 1980.
12. Fukuyama, S., Mayes, D.M and Nugent, C.A.: A radioimmunoassay for plasma testosterone. *Steroids.*, 16: 415-428, 1970.
13. Armstrong, B and Doll, R.: Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int. J. Cancer.*, 15: 617-631, 1975.
14. Tannenbaum, A.: The genesis and growth of tumors. III. Effects of a high fat diet. *Cancer Res.*, 2: 468-475, 1942.
15. Hopkins, J.G and Carroll, K.K.: Relationship between amount and type of dietary fat in 7,12-dimethyl beng [a] anthracene. *J Natl Cancer Inst.*, 62: 1009-1012, 1979.
16. Carroll, K.K and Khor, H.T.: Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Progr. Biochem. Pharmacol.*, 10: 308-353, 1975.
17. Chan, P., Ferguson, A.K and Dao, L.T.: Effects of different dietary fats on mammary carcinogenesis. *Cancer Res.*, 43: 1079-1083, 1983.
18. Welsh, W.C and Aylsworth, F.C.: Enhancement of murine mammary tumorigenesis by feeding high levels of dietary fat. A hormonal mechanism. *J Natl Cancer Inst.*, 70: 215-

- 221, 1983.
19. Ito, N., Shirai, T., Tagawa, Y., Nakamura, A and Fukushima, S.  
:Variation in tumor yeild in the prostate and other  
target organs of the rat in response to varied dosage  
and duration of administration of 3,2'-dimethyl-4-amino-  
biphenyl. *Cancer Res.*, 48: 4629-4632, 1988.
  20. Shirai, T., Nakamura, A., Fukushima, S., Wang, C.Y., Yamada, H  
and Ito, N.: Selective induction of prostate carcinomas  
in F344 rats treated with intraperitoneal injections  
of N-hydroxy-3,2'-dimethyl-4-aminobiphe-nyl. *Jpn.J.  
Cancer Res.*, 81:320-323, 1990.
  21. Shirai, T., Nakamura, A., Fukushima, S., Yamamoto, A., Tada, M  
and Ito, N.: Different carcinogenic responses in a variety  
of organs, including the prostate, of five different rat  
strains given 3,2'-dimethyl-4-amino-biphenyl. *Carcino-  
genesis.*, 11:793-797, 1990.
  22. Carroll, K.K.: Experimental evidence of dietary factors  
and hormone-dependent cancers. *Cancer Res.*, 35:3374-  
3382, 1975.
  23. Shirai, T., Nakamura, A., Fukushima, S., Takahashi, S., Ogawa, K  
and Ito, N.: Effects of age on multiple organ carcinogenes  
is induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl in rats,  
with particular reference to the prostate. *Jpn.J.Cancer  
Res.*, 80:312-316, 1989.
  24. Noble, R.L.: Prostate cancer of the Nb rat in relation to  
hormones. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 23: 113-159, 1982.
  25. Söderkivist, P., Busk, L., Toftgård, R and Gustafsson J-Å:  
Metabolic activation of promutagens, detectable in Ames'  
Salmonella assay, by 5000 x g supernatant of rat ventral  
prostate. *Chem.-Boil. Interact.*, 46: 151-163, 1983.

26. Pollard, M and Luckert, P.H.: Production of autochthonous prostate cancer in Lobund-Wistar rats by treatments with N-nitroso-N-methylurea and testosterone. J Natl Cancer Inst., 77: 583-586, 1986.
27. Saksena, S.K. and Lau, I.F.: Variations in serum androgens, estrogens, progestins, gonadotropins and prolactin levels in male rats from prepubertal to advanced age. Exp Aging Res., 5: 179-195, 1979.

