乳癌に対する prolactin の意義に関する研究

第　1　編

乳癌患者と prolactin の関連性について

（この論文の要旨は第10回日本癌治療学会において報告した）

岡山大学医学部第1外科教室（主任：田中早苗教授）

岩　藤　真　治

（昭和50年11月4日受稿）

第1章　緒　　言

下垂体前葉より分泌される prolactin は乳腺発育，乳汁分泌などに重要なホルモンとして知られている．この prolactin はマウス，ラットなど実験動物における乳癌の発生に関与し，prolactin が欠如している場合は estradiol や発癌剤を投与しても乳癌の発生がみられないことが明らかになり[1,2]，乳癌と最も関連の深い重要なホルモンと考えられるようになった．

わたくしは乳癌組織に対し prolactin がどのような影響をおよぼすかを観察し，いささかの知見をえたのでここに報告する．

第2章　実験方法

1．実験材料

岡山大学第1外科において昭和44年から昭和47年までに乳癌根治術を行った切除腫瘍を用いた．

prolactin は帝国臓器より提供された bovine prolactin 純度45—50 IU/mg のものを用いた．prolactin の濃度を1/50，1/20，1/10，1/5，1/2，1，2，5，10，20，50 μg/0.5 ml とした．^{32}P - Na_2HPO_4 はダイナボットより購入，実験に供した．その他の試薬はすべて試薬特級を和光，片山，第一化学，生化学工業などより購入し使用した．

2．腫瘍切片への^{32}P-uptake

乳癌腫瘍は硬靭で均一な homogenate をえがたいので cryostat −20℃にて20−30μの slice としてその50 mg を用い，0.025 M KCl，0.005 M $MgCl_2$，0.25 M sucrose を含む0.05 M Tris-HCl buffer，pH 7.6，0.5 ml，^{32}P-Na_2HPO_4 1 μCi/0.1 ml，0.1 ml，0.6％ NaCl prolactin 溶液0.1 ml を加えて1時間37℃にて incubate する[3]．

3．nucleic acid の抽出

Schmidt-Thannhauser[4]，Schneider[5] の方法を modify して核酸抽出を行った．すなわち，10% $HClO_4$ 1 ml を加え酸可溶性物質を除き，2％ sodium acetate を含む90％ ethanol 3 ml で slice を洗浄し，さらに ethanol-ether（3：1 v/v）3 ml にて洗浄 lipids を除く．これらの操作はすべて常温にて行う．6％ $HClO_4$ 1 ml を加え90℃15分間煮沸し，核酸抽出を行い，この上清を counting vial にとる．この方法では RNA の損失が少ないとされている[6,7]．

4．放射能の判定

1 ml の抽出液に15 ml の dioxan-anisol-dimethoxyethane（6：1：1 v/v/v），2,5-diphenyl-oxazol，5 g/l，1,4-bis［2-（4-methyl-5-phenyl-oxazolyl）］benzene 0.5 g/l を含む）を加え，液体シンチレーションカウンター，Packard Tri-carb automatic control series 500にて測定する[8]．

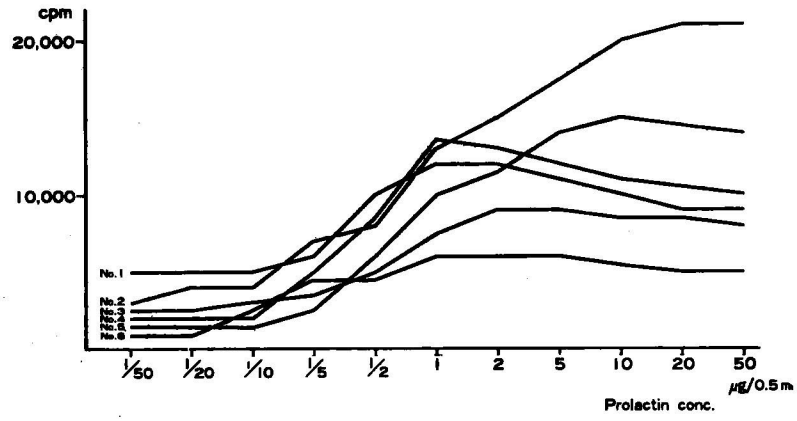
第3章　実験成績

1．prolactin 添加濃度の影響

incubate に用いる prolactin の濃度を決定するため，20例の乳腺組織を用い uptake におよぼす影響を観察した結果，uptake curve より1～2 μg/0.1 ml のものを反応溶液に加え incubate した場合に peak がえられることを確かめた．（図1）

生物学的活性を利用した反応であるため，3本の試験管を用い反応を行い（cpm 差が1本のみ大きい場合は除く）平均値をとった．control に対し，30％

図1 乳癌腫瘍に対する Prolactin 濃度と^{32}P-uptake



以上の^{32}P-uptakeがみられるものをprolactinに依存性があるものとした．30%を境としたのは生物学的活性による反応を応用したものであるから±10%の誤差を見込んで判定を行うためである．

2．prolactin依存症例の分布と予後

表1のごとくpremenopausalでprolactinに依存性のあるもの77例，ないもの30例，postmenopausalでprolactinに依存性のあるもの30例，ないもの34例となっている．prolactin-dependentな症例のなかで（Stageに関係なく）死亡したもの26/136（19.1%），premenopausal 16.9%，postmenopausal 22.0%であるに比し，prolactin-independentのものは24/64（37.5%），premenopausal 40%，postmenopausal 35.2%と約2倍の死亡率でprolactin-independentのものは予後が悪い．全再発例71例のうち再発生存例についてみるとprolactin-dependentのものは17/43(39.5%)，prolactin-independent 4/28（14.3%）となり，再発後の生存率に大きな差がみられる．このことは，prolactin-dependentのものは再発後も治療に反応して，長期生存が期待できることを示している．prolactin依存，非依存と閉経の関係は不明であり，また，閉経と予後との関係も不明で関連性はないように思われる．

3．Stageとprolactinと予後の関連について

表1 Prolactin依存性と予後

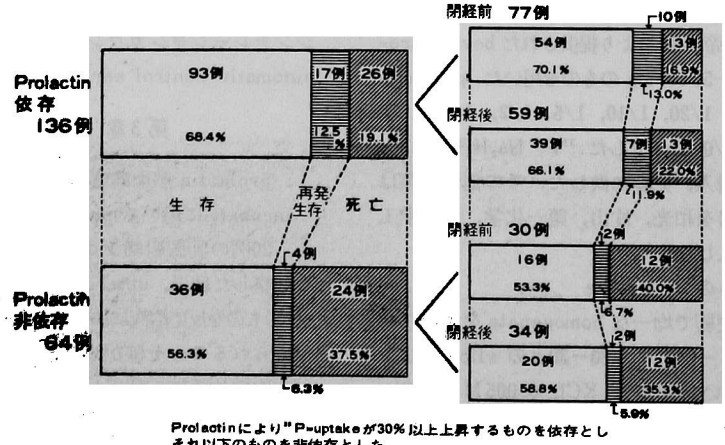


表2．Stage，ホルモン依存性と死亡率

stage	I	II	III	IV	secondary case	total
プロラクチン非依存	2/18	3/21	9/14	6/6	4/5	24/64 (37.5%)
プロラクチンステロイド・ホルモン依存	2/34	2/23	7/23	6/10	4/7	21/97 (21.6%)
プロラクチン依存	0/15	1/4	1/15	3/3	0/2	5/39 (12.8%)
total	4/67 (6.0%)	6/48 (12.5%)	17/52 (32.7%)	15/19 (78.9%)	8/14 (57.1%)	50/200 (25.0%)

表3．Stage，ホルモン依存性と再生存率

stage	I	II	III	IV	secondary case	total
プロラクチン非依存	1/3	1/4	1/10	0/6	1/5	4/28 (14.3%)
プロラクチンステロイド・ホルモン依存	2/4	2/4	2/9	3/9	3/7	12/33 (36.4%)
プロラクチン依存	1/1	0/1	2/3	0/3	2/2	5/10 (50.0%)
total	4/8 (50.0%)	3/9 (33.3%)	5/22 (22.7%)	3/18 (16.7%)	6/14 (42.9%)	21/71 (29.6%)

死亡率（表2）についてみると，Stage とともに死亡率は高くなり Stage IV が最も予後が悪い．また，prolactin に依存性のないものは37.5%と予後が悪い．prolactin-independent のものは Stage III で64.3%の死亡，Stage IV では全例死亡しており non-primary case でも5例中4例が死亡している．prolactin と steroid hormone に依存するものは21.6%，prolactin のみに依存するものは12.8%であり，この3群の間には有意の差で予後が良くなっているのは興味深い．prolactin のみに依存する症例の死亡例は未婚，未産婦が5例中4例であった．

再発後の生存についてみると表3のごとくで Stage 間の関係では Stage IV で最も悪い以外に有意の差はみられない．しかしながら，prolactin-independent のものは14.3%と予後不良で，再発後は治療に反応せず，治療効果を期待しがたいように考えられる．

考　案

乳癌にたいする prolactin の意義は，マウスなど実験動物において重要な関連性のあることが知られている．しかし，人間において prolactin は乳腺の発育，乳汁分泌などに関連があることは知られているが，乳癌と直接あるいは間接に関連のある実験的なデーターは知られていない．すなわち，動物実験では細胞培養とか，incubate 実験で prolactin と乳癌との関連性は認められているが，人乳癌との直接的な関連性についてはいまだ証明されていない．prolactin 定量技術の困難性はもとより，下垂体で生産分泌される機能的な面での複雑性も，この解明を困難にしている原因と考えられる．

ホルモン依存性に関して Huggins[9] は前立腺癌の観察治療より，ホルモン依存性癌という概念を提案し，ホルモンが除去されると癌細胞も正常細胞も萎縮するような場合 "ホルモン依存性癌" と定義している．Beatson[10] や Adair[11] の臨床的研究より，ラット，マウスなど実験乳癌の研究など数多くの研究から，乳癌の多くはホルモン依存性であることが知られ，とくに estrogen が注目されていることは衆知の事実である．

乳癌の依存性ホルモンを予知する方法としては尿中ホルモン定量法，血中ホルモン定量法，sex クロマチン法などがあるが，いずれも正確度という面では充分ではない．教室の山本[5] は乳癌組織を steroid hormone と共に incubate し，^{32}P の組織への取り

込みをみることによりホルモン依存性を決定し，ホルモン療法の指針を立てることに成功した．人乳癌にたいする prolactin の反応曲線を描き，最も適当と考えられる部分を適量とした．すなわち，1 μg の prolactin が0.5 ml の反応液中で50 mg の組織に接触し反応を起こすのに最も適当な量と考えられる．この量は血中に存在するよりもはるかに高い価であるが，乳腺 slice の接触面でのみ反応が起こるからである．steroid hormone の組織依存性検査に prolactin を加えることは非常に有意義で，prolactin によって^{32}P-uptake が高いものを prolactin に依存すると考えると prolactin の人乳癌にたいする種々な意義が steroid hormone との関連性において理解しやすいものとなるように考えられる．Huggins[12]らは乳癌のホルモン療法とその結果をみて，乳癌のホルモン依存性はまったく不明で，その作用機序はホルモンバランスの荒廃によるものとしか考えられないとのべているが，それは男女性ホルモンについてのみ考えた場合の結果についてであろう．すでに山本ら[13]が報告しているように乳癌ホルモン依存性はtestosterone, estradiol, cortisol, progesteroneだけでなく，この実験成績のごとく prolactin にも依存性のあることが容易に考えられる．これらの依存性の組み合せは依存性のみについても64種類にもおよぶわけで，当然のことながら治療にたいする反応も，複雑な現象として示されることは論をまたない．prolactin 依存群は再発が少なく，また再発した場合も治療に反応し，比較的長期生存しうることについて考えると，治療に反応せず死亡した症例が Stage IV に多く，また，妊娠・授乳を行っていない婦人に多かったことを考えあわせると，(1) prolactin は通常血中には少ない．(2) prolactin-inhibiting factor が出産・授乳を行った経験のある婦人には存在することが考えられる．(3)未産婦・授乳を行っていない婦人には prolactin-inhibiting factor がないなどの理由を考えさせるが，これらのことは prolactin 依存癌が存在する場合，血中 prolactin 値がどのように変化するのか prolactin の超微量の変化を知りえない現在では，理論的な推論を展開するにすぎない．

正常乳腺は prolactin に反応して発育し，増大し，乳汁の分泌も行うわけであるから，prolactin に反応を示す乳癌は，乳癌そのものもなお乳腺の性質をもっていると考えられ，これが他の steroid hormone と関連しホルモン療法に反応する1つの理由と考えられる．また，prolactin に反応しないものは乳癌でありながら，まったく乳腺の性質を失った独立した癌として存在することが，ホルモン療法に反応せず，その結果悪い予後を示すものと考えられる．

いずれにしても prolactin と共に incubate した組織が，^{32}P-uptake の高いグループは予後が良く，再発しても生存するものが多いのにたいし，prolactin に依存性のないものは予後が悪いことは事実である．

これらの結果は，prolactin の乳癌にたいする重要な意義を示すと共に，治療に際して prolactin 非依存の乳癌には術後の充分な制癌剤投与，照射など，補助療法の必要性を示唆するものであり，また，prolactin に依存性のあるものは再発に際して種々な治療を選びうる可能性とその治療効果を期待しうるものである．

結　論

人乳癌組織 slice，prolactin と^{32}P を incubate し核酸代謝にたいする prolactin の影響を観察した．

1．prolactin は人乳腺組織あるいは乳癌組織の核酸代謝を盛んにするが，in vitro での bovine prolactin (45～50 IU/mg) 濃度は 1 μg/0.5 ml/50 mg tissue が適当である．

2．prolactin で核酸代謝の高くなる prolactin 依存性乳癌は予後が良く，再発した場合も治療に反応し長期生存が期待できる．

3．prolactin 非依存性乳癌は，再発死が多く予後が悪い．

4．これらの結果から prolactin の生体内における機能と乳腺・乳癌にたいする役割について推論を加えた．

稿を終るにあたり，御指導，御校閲を賜った，田中早苗教授，山本泰久講師に深謝する．

参　考　文　献

1. Welsch, C. W., and Meites, J., Cancer, **23**：**601**, 1969
2. Meites, J., Lu, K. H., Wuttke, W., Welsch, C. W., Hasegawa, H., and Quadri, S. K., Recent Prog. Hormone Res., **28**：**471**, 1972
3. Yamamoto, Y., Gann, **60**：**23**, 1969
4. Schmidt, C., and Thannhauser, S. J., J. Biol. Chem., **161**：**293**, 1945
5. Schneider, W. C., J. Biol. Chem., **161**：**83**, 1945
6. Volkin, E., Khym, J. X., and Cohn, W. E., J. Am. Chem. Soc., **73**：**1533**, 1951
7. Steel, W. J., Okamura, N., and Busch, H., Biochim. Biophys. Acta, **87**：**490**, 1964
8. Davidson, J. D., and Feigelson, P., J. Intern. Appl. Radiation and Isotopes, **2**：**1**, 1957
9. Huggins, C., J. Urol., **68**：**875**, 1952
10. Beatson, G. T., Lancet, **2**：**104**, 1896
11. Adair, E. E., J. Am. Med. Ass., **140**：**1193**, 1949
12. Huggins, C., Endocrine Therapy in Malignant Disease. P 53—61, W. B. Saunders Company London, 1972
13. 山本泰久.,臨床外科　**26**：1955, 1971

The role of prolactin on breast cancer

Part 1. Relationship between prolactin-dependency and prognosis on human breast cancer

by

Masaharu IWADO

Department of Surgery, Okayama University Medical School

Prolactin-dependency was studied by incubation method of ^{32}P-uptake, and the relationship between prolactin-dependency and prognosis of human breast cancer was discussed. Prolactin dependent breast cancer patients have favorable prognosis, on the contrary, prolactin-independent ones poor prognosis. Prolactin-dependent breast cancer patients have long survival, even in the cases of recurrence.