高コレステロール食飼育のマウス前立腺におよぼす影響

—組織学的ならびに生化学的検討—

金沢大学医学部泌尿器科学教室 長 野 賢 一
(主任: 久住治男教授)

THE EFFECT OF CHOLESTEROL-RICH DIET ON THE MOUSE PROSTATE

—Histological and Chemical Study—

Ken-ichi Nagano

Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director: Prof. Haruo Hisazumi, M.D.)

The long-term effects of a cholesterol-rich diet (1% cholesterol) on the prostate and prostatic urethra of the mouse were investigated in 5 groups: non-treated, testosterone-treated, diethylstilbestrol-treated, castrated and saponin-treated groups. Cholesterol contents in the prostate were also evaluated.

In the non-treated group, the cholesterol-rich diet caused an increase in the weight and a papillary or cribriform hyperplasia of the acinar secretory cells in the ventral prostate. This hyperplasia was similar to the change of glandular epithelial cells observed in the testosterone-treated mice fed a standard diet. Hyperplasia caused by the cholesterol-rich diet was also found in the testosterone- and diethylstilbestrol-treated groups, but not in the castrated or saponin-treated groups.

As regards to the prostatic urethra, the cholesterol-rich diet caused dilatation of the lumen of the urethra and round dilatation of the duct in the ventral prostate. But, no remarkable change was found in the epithelium of the duct.

In the non-treated group, an increase in the total cholesterol content of the ventral prostate was obtained by the cholesterol-rich diet. However, there was no difference in the cholesterol content per unit tissue weight.

要旨: マウスの前立腺および前立腺部尿道における長期間の高 cholesterol 食 (1% cholesterol) 飼育の影響を, 無処置群, testosterone 投与群, diethylstilbestrol 投与群, 去勢群, および saponin 投与群の 5 群において組織学的検討を行った。また, 前立腺の cholesterol 含有量も測定した。その結果, 無処置群では高 cholesterol 食飼育によって, 前立腺腹葉の重量は増加し, 腺上皮細胞には乳頭状および篩状の過形成が認められた。この過形成は普通食飼育下での testosterone 投与群に認められた腺上皮細胞の変化とほぼ同様の所見であった。また, 高 cholesterol 食飼育時にみられるこの腺上皮細胞の過形成は testosterone 投与群および diethylstilbestrol 投与群においても認められた。しかし, 去勢群および saponin 投与群では認められなかった。

前立腺部尿道では, 無処置群, testosterone 投与群, diethylstilbestrol 投与群に高 cholesterol 食飼育下で尿道内腔の拡大と前立腺腹葉集合管の類円型拡大を認めたが, 集合管上皮細胞に著変は認められなかった。

無処置群では高 cholesterol 食飼育によって血清 cholesterol は有意に上昇した。また, 前立腺腹葉 cholesterol 含有量は総含有量として増加を認めたが, 単位組織重量当りの含有量では差をみなかった。

結 言

肝や消化管の cholesterol 代謝については, ヒトあるいは動物において多くの研究がなされてきたが, 前立腺に関しては最近までほとんど注目されなかった。

1942年, Swyer¹⁾は, 前立腺組織の cholesterol 代謝に関連し, ヒト前立腺肥大症の腺腫部は正常前立腺に比し約 2 倍の cholesterol 含有量を有すると報告している。この報告に続いて, イヌ²⁾, ハムスター³⁾あるいは

Table 1 Presentation of examined mice

Group	Treatment	No. of examined mice	
		Histological	Chemical
A	stand-A non-treated	9	7
	cho-A	9	7
B	stand-B testosterone 1mg/2w x 15	5	6
	cho-B administrated	5	6
C	stand-C diethylstilbestrol 1.25mg	5	7
	cho-C pellet implanted	5	7
D	stand-D castrated	4	4
	cho-D	3	3
E	stand-E 1% saponin 0/5ml/2w x 15	4	6
	cho-E administrated	4	6

Each group are fed on a standard diet(stand) or 1% cholesterol-rich diet(cho) for 30 weeks.

ヒト⁴⁾の腫大前立腺に対し血清 cholesterol 低下作用薬剤は縮小効果を有することが確認されている。最近では、ラット前立腺における cholesterol 代謝の日内変動や, cholesterol 合成に対する androgen の調節作用に関する研究が行われ, 前立腺には肝とは異なる調節機序があると報告されている^{5)~7)}。Schaffner⁸⁾は、これらの前立腺の cholesterol 代謝に関する研究成果の検討を行い, 前立腺肥大症や前立腺癌の発育と共に, その腺性部組織 cholesterol 含有量が増加するのではないかと考えている。

これまでの前立腺 cholesterol 代謝に関連した実験的, 臨床的研究では, 血清 cholesterol 低下作用を有する polyene macrolide 系薬剤投与時の前立腺の縮小効果あるいは前立腺の cholesterol 合成能に関してよく検討されている。しかし, 高 cholesterol 血症時の前立腺 cholesterol 代謝に関する実験的研究としては, Schaffner ら⁹⁾と宮尾¹⁰⁾の報告をみるのみであり, しかも, いずれの報告も高 cholesterol 血症時における前立腺の組織学的変化についての検討はなされていない。そこで著者は, 長期にわたる高 cholesterol 食(以下 cho 食と略す)飼育によってマウスに高 cholesterol 血症を作成し, 前立腺に与える影響を組織学的に検討すると共に, 前立腺組織の cholesterol 含有量を生化学的に測定した。

前立腺肥大症の動物実験モデルとして未だヒト前立腺肥大症と同様の組織像を作成した報告はない¹¹⁾¹²⁾とされているが, マウスにおいては, 前立腺の腫大と共にヒトと同様の排尿障害を認めたとする報告が散見される^{13)~15)}。そこで, これらの報告より, 女性ホルモンである diethylstilbestrol を投与した Fingerhut ら¹⁴⁾の実験と, 赤血球細胞膜 cholesterol との結合による溶血作用¹⁶⁾や消化管内 cholesterol との結合による cholesterol 吸収阻害によって血清 cholesterol 低下作用¹⁷⁾を示す saponin を投与した Sato¹⁵⁾の実験を, 前述の著者の実験に導入併施した。さらに, 前立腺の発育や機能を促進する testosterone 投与時, あるいは前立腺の萎縮をきたす去勢時においても, cho 食飼育のマウス前立腺に与える影響を組織学的ならびに生化学的に検討した。

実験材料および実験方法

1) 実験動物

実験動物は体重25~35g の 8 週齢雄性 ddY 系マウスを使用した。飼料は普通食(MF 固型飼料:オリエンタル酵母工業)とこれに 1%cholesterol (和光純薬工

業)を加えた cho 食を用い, 水と共に随意摂取させた。マウス搬入後, 普通食飼育群(以下 stand 群と略す)と cho 食飼育群 (以下 cho 群と略す) に大別し, さらに両飼育食につき 1 週後より以下の 5 群に分けて検討を行った (Table 1)。

A 群: 以下の B~E 群の対照とし, 全く無処置にて飼育した。

B 群: testosterone propionate (Enarmon®, 帝國臓器) 1mg を 2 週毎に15回マウス背部皮下に注射した。

C 群: diethylstilbestrol diphosphate (Honvan®, 杏林薬品)1.25mg を含む pellet を作製し, エーテル麻醉を施し背部皮下に埋没した¹⁴⁾。

D 群: エーテル麻醉下に去勢術を施行した。

E 群: saponin weiβ rein (Merck) を生理食塩水で 0.1%に溶解し, その0.5ml を 2 週毎に15回背部皮下に注射した¹⁵⁾。

実験開始30週目に体重測定後屠殺し, 以下の組織学的ならびに生化学的検討を行った。

2) 組織学的検討

マウスを頸椎脱臼にて屠殺し下腹部正中切開にて開腹後, 前立腺, 精囊腺, 凝固腺などの副性器と膀胱を, 前立腺部尿道と共に一塊にして摘出した。肝も摘出した。これらの組織を10%ホルマリンにて固定した後, 4~5μ のパラフィン切片を作製し hematoxylin-eosin 染色を施した。前立腺は Fig. 1 のごとく前立腺部尿道矢状面に対し垂直方向に横断して標本作製した。組織学的検討は前立腺腹葉の腺房と集合管, ならびにその集合管開口部の前立腺部尿道を中心に比較検討した。

3) 生化学的検討

各群につき、エーテル麻酔下に眼静脈叢より約1ml採血後、前立腺腹葉、肝を摘出し各々の湿重量を測定した。これらの3検体の cholesterol 含有量は以下の方法で測定した。

血液は血清分離を行い検体とした。前立腺腹葉と肝の脂質抽出は以下の方法で行った¹⁸⁾¹⁹⁾。すなわち、chloroform, methylalcohol (2:1 V/V) 抽出液15ml

Fig. 1 A photograph showing the ventral prostate and prostatic urethra of a non-treated mouse sectioned along a plane perpendicular to the prostatic segment of the urethra (hematoxylin and eosin, ×10)
Two club-shaped lobes of the ventral prostate (VP) in an adult male mouse are attached to the ventrolateral sides of the urethra (U). Each lobe consists of several compound tubuloalveolar glands (Ta) draining into the urethra through several ducts (D).

に、前立腺は全てを、肝はその700~800mgを加え、ガラス製ホモジナイザー (Omega electric, type SM-3) を用い2,000回転にて3分間 homogenization した。これに抽出液10mlと0.05%希硫酸5mlを加え、10回転倒をくり返した後10分間放置した。ついで2,000回転にて15分間遠沈し、下層に全脂質を移行させた。これを rotary evaporator (Yamato, model RE-46) にて乾固し、isopropylalcohol を前立腺には1ml、肝には2mlそれぞれ添加溶解し検体とした。3検体の cholesterol の定量は cholesterol B-test Wako ①, ② (和光純薬工業) を用いて比色定量した。この測定値より各々の単位組織重量当りの cholesterol 含有量を算出した。また、前立腺においては総 cholesterol 含有量も検討した。なお、去勢した D 群の前立腺腹葉は著しく萎縮していたため、重量および cholesterol 含有量測定を行わなかった。

推計学的検討は Student の t 検定を行い、必要に応じて Welch の t 検定を用いた。

実験成績

1) 前立腺腹葉の重量

前立腺腹葉重量は Table 2 に示すごとく、A, B, C 群では普通食飼育に比し cho 食飼育により有意の重量増加が認められた。また、普通食飼育下では A 群に比して B 群で有意の重量増加が認められたが、cho 食飼育下では A 群と B 群の間に有意差は認められなかった。C 群では各飼育食の A 群との間に有意差は認められなかった。E 群では普通食飼育下で A 群との間に有意差は認められなかったが、cho 食飼育下で A 群との間に有意の重量減少が認められた。

2) 肝の重量

肝重量は Table 3 に示すごとく、A, B, C, D 4 群においては普通食飼育に比し cho 食飼育により有意の重量増加が認められた。普通食飼育下では A 群に比

Table 2 Effect of cholesterol-rich diet on the weight of the ventral prostate*

Group	standard diet	cholesterol-rich diet	significance p value
A	28.5 ± 2.8 (n=7)	43.2 ± 9.6 (n=7)	<0.01
B	33.5 ± 3.3 (n=6) ^a	43.4 ± 7.6 (n=6)	<0.05
C	31.5 ± 3.7 (n=7)	51.2 ± 16.0 (n=7)	<0.01
E	29.8 ± 5.6 (n=6)	26.0 ± 3.3 (n=6) ^b	N.S.

* : All values are expressed as mean±S.D. in terms of mg.

Significance : p value

a<0.05 : compared to respective group stand-A

b<0.001 : compared to respective group cho-A

Table 3 Effect of cholesterol-rich diet on the weight of the liver in each group*

Group	standard diet	cholesterol-rich diet	significance p value
A	1879 ± 208 (n=5)	2668 ± 378 (n=5)	< 0.01
B	1759 ± 67 (n=6)	2739 ± 337 (n=6)	< 0.001
C	1765 ± 57 (n=7)	2880 ± 481 (n=7)	< 0.001
D	1743 ± 295 (n=4)	3170 ± 352 (n=3)	< 0.001
E	2518 ± 497 (n=6) ^a	2534 ± 164 (n=6)	N.S.

* All values are expressed as mean±S.D. in terms of mg.

Significance : p value

a<0.05 : compared to respective group stand-A

し E 群で重量の増加が認められたが, cho 食飼育下では A 群と E 群の間に有意差は認められなかった。

3) 前立腺腹葉の組織学的所見

stand-A 群の前立腺腹葉は尿道の腹側に位置し, 左右の 2 葉よりなる複合管状胞状腺 (compound tubuloalveolar gland) の形をなしていた。組織学的には Fig. 2a に示すように, 前立腺腹葉の尖部から両葉の内側にかけて腺上皮細胞の二次ヒダ形成が認められ, 同部の上皮細胞は高円柱状で, 核は基底膜側に位置し, 核上部に明域が認められ, この部位では分泌が営まれていると考えられた。これに続く集合管内腔には好酸性の均一または顆粒状の分泌物が認められ, 上皮の二次ヒダがごく一部にみられるのみで, 上皮細胞は低円柱状で明域も認められなかった点より同部には分泌能はないと考えられた。これに対し cho-A 群 (Fig. 2b) では尖部から内側部の腹葉に腺上皮細胞の過形成と腺腔の拡大が認められ, 立方状の腺上皮細胞が多層化し, 細胞密度は高く, 腺腔に向かって乳頭状あるいは篩状の増殖形態を呈していた。このような過形成像は stand-A 群の腺房においてもごく一部に認められたが, cho-A 群では明らかに広汎で, その程度も高度であった。また, cho-A 群の腺房内腔には好酸性分泌物が stand-A 群に比してやや多い傾向にあった。集合管上皮細胞には両 A 群間に差を認めなかった。間質組織では cho-A 群に若干の血管増生が認められた。

stand-B 群 (Fig. 2c) では, stand-A 群に比して腺腔はやや拡大し, 二次ヒダの増加, 上皮細胞の高さの増大, 核の大型化および広い明域をもつ細胞の増加が認められた。さらに, 一部には乳頭状あるいは篩状の細胞増殖巣も認められた。しかし, stand-B 群のこの過形成の程度は cho-A 群のそれに比べて明らかに低く,

尖部を中心とする限局性的変化として認められた。一方, cho-B 群 (Fig. 2d) でも cho-A 群と同様腺房の拡大と腺上皮細胞の過形成が認められ, その程度は cho-A 群に比して cho-B 群で増強していた。また, 両飼育食 B 群では細胞の増加に加えて過分泌が認められたのに対し, cho-A 群では細胞の増加が主変化として認められ, 分泌の程度はあまり強くないと考えられた。集合管上皮細胞には両飼育食 B 群間に差異が認められなかった。しかし, 同部の二次ヒダ形成は cho-B 群に多く認められ, 結合織の血管増生も増強していた。

C 群では, 普通食飼育下で Fig. 2e に示すように, 二次ヒダの増加および腺房と集合管の拡大がみられ, 内腔に多量の分泌物が認められた。同群の腺上皮細胞に過形成は認められなかったが, その分泌能は亢進していると考えられた。cho-C 群 (Fig. 2f) においても腺房と集合管の拡大および多量の分泌物が認められ, やはり過分泌の状態と考えられた。また, cho-A 群, cho-B 群と同様 C 群でも腺上皮細胞の過形成が認められたが, 領域としては狭かった。集合管上皮細胞には両飼育食 C 群に著変なく, 間質の変化も A, B 群と同様 cho 群に血管増生が認められた。

D 群では, 両飼育食群共にほぼ同様の組織像を呈し (Fig. 2g, Fig. 2h), 腺房および集合管は著しく縮小し, 腺上皮細胞の著明な萎縮が認められた。しかし, 腺腔内にはなお分泌物が少量認められた。また, 間質結合織は増加し, 小円形細胞浸潤巣が認められた。

stand-E 群においては Fig. 2i に示すように, 腺房の減少, 腺上皮細胞の立方化および二次ヒダ形成の減少が認められ, 内腔の分泌物は stand-A 群と同程度に認められた。また, 間質組織の増生と線維化も認められた。cho-E 群の前立腺腹葉もこれと同所見を呈し, 腺上皮細胞の過形成は認められなかった (Fig. 2j)。

Fig. 2a~2j Photomicrographs of the mouse ventral prostate
(hematoxylin and eosin, $\times 100$)

a ; Group stand-A : Control picture.

b ; Group cho-A : The papillary or cribriform hyperplasia of acinar secretory epithelial cells are found.

c ; Group stand-B : High columnar cells and mild hyperplasia of epithelial cells are found.

d ; Group cho-B : Papillary or cribriform hyperplasia are markedly observed.

e ; Group stand-C : Dilatation of acinus and increase of epithelial infolding are showed.

f ; Group cho-C : Papillary or cribriform hyperplasia are slightly found in small area.

g

h

g and h; Group stand-D and Group cho-D: Epithelial cells are atrophied and hyperplasia is not found.

i

j

i and j; Group stand-E and Group cho-E: Epithelial cells are atrophied and small round cells are found, and hyperplasia is not found.

4) 前立腺部尿道の組織学的所見

輪状尿道筋を貫いた前立腺腹葉の集合管とその周囲組織を中心に組織学的検討を行った。その結果、普通食飼育下ではA群とB、C群間に差異は認められなかった。ただしB群には尿道筋の肥大が認められた。cho食飼育下では、A、B、C3群はほぼ同様の組織像を呈した。すなわち、尿道内腔は拡張し分泌物で充填され、尿道全体の増大傾向が認められ、また、前立腺腹葉集合管は類円型に拡大していたが、同部の上皮細胞には各々の普通食群と比較して差異が認められなかった。さらにこれら3群の間質結合組織あるいは尿道周囲の腺組織にも著しい差は認められなかった。これに対し、stand-D群では尿道周囲に小円形細胞浸潤を伴う尿道炎の所見がみられ尿道内腔の狭小化が認められた。cho-D群、cho-E群の前立腺部尿道には、各々

の普通食群と同様の組織学的所見が認められ、cho食飼育による影響は認められなかった。なお、stand-E群では10例中6例、cho-E群では10例中7例に1ml以上の膀胱内尿量が認められた。

5) 肝の組織学的所見

肝の組織学的所見としては、cho-A群において、ほとんどの肝細胞にmicrovascularあるいはmacrovascular typeの脂肪変性が認められ、脂肪肉芽腫も散見され、典型的な脂肪肝を呈した。B、C、D群のcho食飼育群も同様の脂肪肝を呈した。stand-E群では、類洞に好中球、大食細胞が目立ち、これらの細胞浸潤を伴った巣状肝細胞壊死が散見された。cho-E群では、肝細胞に軽度の脂肪変性が認められたが、脂肪肉芽腫は認められず、巣状肝細胞壊死も稀にみるのみであった。

6) 血清 cholesterol 値

Table 4 に示すごとく、A 群で cho 食飼育により血清 cholesterol の有意な上昇が認められ、高 cholesterol 血症の状態と考えられた。同様の高 cholesterol 血症は B, C, E 群でも認められた。また、各飼育食の A 群との比較では普通食飼育下で D 群に、cho 食飼育下

で C, D 群に血清 cholesterol の有意の上昇が認められた。

7) 前立腺腹葉および肝の cholesterol 含有量
前立腺腹葉100g 当りの cholesterol 含有量については、Table 5a に示すように stand-A 群と cho-A 群の含有量に有意差は認められず、B, E 群でもこれと同様

Table 4 Effect of cholesterol-rich diet on the level of serum cholesterol in each group*

Group	standard diet	cholesterol-rich diet	significance p value
A	175±27 (n=5)	231±12 (n=5)	<0.01
B	169±25 (n=6)	217±19 (n=6)	<0.01
C	189±27 (n=7)	249±9 (n=7) ^b	<0.001
D	233±40 (n=4) ^a	265±15 (n=3) ^b	N.S.
E	165±17 (n=6)	241±33 (n=6)	<0.001

* All values are expressed as mean±S.D. in terms of mg per dl.
Significance : p value
a<0.05 : compared to respective group stand-A
b<0.05 : compared to respective group cho-A

Table 5a Effect of cholesterol-rich diet on the contents of cholesterol in the ventral prostate in each group*

Group	standard diet	cholesterol-rich diet	significance p value
A	576±114 (n=5)	582±25 (n=5)	N.S.
B	657±64 (n=6)	629±112 (n=6)	N.S.
C	789±103 (n=7) ^a	640±111 (n=7)	<0.05
E	564±157 (n=6)	684±70 (n=6) ^b	N.S.

* All values are expressed as mean±S.D. in terms of mg per 100g tissue weight.
Significance : p value
a<0.01 : compared to respective group stand-A
b<0.05 : compared to respective group cho-A

Table 5b Effect of cholesterol-rich diet on the total contents of cholesterol in the ventral prostate in each group*

Group	standard diet	cholesterol-rich diet	significance p value
A	171±42 (n=5)	312±53 (n=5)	<0.01
B	218±29 (n=6)	258±48 (n=6)	N.S.
C	235±29 (n=7) ^a	341±91 (n=7)	<0.02
E	152±39 (n=6)	196±34 (n=6) ^b	N.S.

* All values are expressed as mean±S.D. in terms of g
Significance : p value
a<0.02 : compared to respective group stand-A
b<0.01 : compared to respective group cho-A

Table 6 Effect of cholesterol-rich diet on the contents of cholesterol in the liver in each group*

Group	standard diet	cholesterol-rich diet	significance p value
A	694±55 (n=5)	1195±104 (n=5)	<0.001
B	607±41 (n=6) ^a	1051±78 (n=6) ^c	<0.001
C	628±67 (n=7)	1012±180 (n=7)	<0.001
D	473±62 (n=4) ^b	684±137 (n=3) ^d	<0.05
E	550±36 (n=6) ^b	604±54 (n=6) ^d	N.S.

* All values are expressed as mean±S.D. in terms of mg per 100g tissue weight.

Significance : p value

a<0.05, b<0.001 : compared to respective group stand-A

c<0.01, d<0.001 : compared to respective group cho-A

であった。しかし、C群ではcho食飼育によって含有量の有意な減少が認められた。各飼育食のA群との比較では、普通食飼育下でC群に、cho食飼育下でE群に有意な含有量の増加が認められた。

前立腺腹葉のcholesterol総含有量はTable 5bに示すように、cho-A群はstand-A群に比して有意な総含有量の増加を示し、C群においてもcho-C群に有意の増加が認められた。しかし、stand-B群とcho-B群の間には有意差が認められなかった。また、各飼育食A群の総含有量との比較では、stand-C群において有意の増加が、cho-E群において有意の減少が認められた。

肝100g当りのcholesterol含有量はTable 6に示すように、E群を除く他の4群でstand群に比しcho群の有意な含有量の増加が認められた。また、B, D, E群ではいずれの飼育食下でも各々のA群との比較で有意な含有量の減少が認められた。

考 察

著者の実験結果のごとく、cho食飼育によりマウス前立腺腹葉に腺上皮細胞の過形成を認めたとする報告は他にない。また、食餌中の脂質と前立腺の組織学的所見の関係を検討した報告は、伊東²⁰⁾の1編をみるのみである。伊東は、cholesterolを主成分とする「ラノリン」添加飼料を用いて家兎を飼育し、40日目には前立腺小葉上皮細胞は軽度から中等度に肥大しているが、70日目には萎縮した上皮細胞が多くなり、120日後には上皮細胞の萎縮が著明で間質の増殖が認められたと述べている。つまり、著者の結果とは異なるが、cholesterol添加食飼育により家兎の前立腺上皮細胞にも影響が認められることを検討した報告と考えられた。

動物の前立腺はandrogen依存性臓器であり、著者のstand-B群でも、stand-A群に比して前立腺重量は有意に増加し、組織学的に腺上皮細胞の過形成と分泌能亢進が認められた。このtestosterone投与による過形成とcho-A群に認められた過形成は、両者共に篩状、乳頭状の形態を呈する腺上皮細胞の増殖像として認められ類似した所見であった。しかし、過形成の程度はcho-A群により顕著であり、また、stand-B群には細胞増加に加えて過分泌の所見が認められたのに対し、cho-A群には細胞増加が主変化として認められ、分泌物はstand-A群に比してやや増加している程度で過分泌とは言えないと考えられた。

cho-B群の前立腺上皮細胞の過形成がcho-A群の過形成に比して増強していたことより、cho食飼育によって認められる前立腺上皮細胞の過形成発現に対し、testosteroneは相乗的に作用していると考えられた。しかし、普通食飼育時に認められたtestosterone投与による前立腺重量の有意な増加は、cho食飼育時に認められず、また、testosteroneの前立腺上皮細胞に与える組織学的効果も、cho食飼育時には普通食飼育時ほど顕著に認められなかったことより、cho食飼育時にはtestosteroneの前立腺重量や前立腺上皮細胞に対する効果が減弱されるものと考えられた。

testosteroneの前立腺に対する反応は血清cholesterol低下により影響を受け、Syngnalら²¹⁾は、前立腺のtestosterone依存性増殖が干渉され、Yamanakaら²²⁾は、前立腺重量に対する反応が減弱されると述べている。著者の実験でもtestosteroneの前立腺に対する反応がcho食飼育により減弱していたことより、Mannら²³⁾が述べているごとの、栄養状態の変化によるnormal hormone-target interactionの障害が

cho 食飼育により生じたのではないかと考えられた。

雄性動物に女性ホルモンを投与すると、前立腺は萎縮し、重量の減少、間質組織の増殖が生じるとされ²⁴⁾²⁵⁾、前立腺腹葉で最も著しいとされている²⁶⁾。しかしながら、女性ホルモン投与によって前立腺はかえって腫大するとの報告もあり¹³⁾¹⁴⁾²⁷⁾、前立腺肥大症発生病因との関連性が論じられている¹¹⁾¹²⁾²⁸⁾。著者が追試した Fingerhut ら¹⁴⁾の報告は、マウスに diethylstilbestrol を投与し、前立腺と膀胱頸部に特徴的な nodular hyperplasia と glandular hyperplasia が認められ、膀胱の拡大と水腎水尿管を併発すると述べている。しかし、Caine ら²⁹⁾の追試報告では、前立腺は過形成というより萎縮所見を呈したと述べられており、著者の成績でも増殖所見は得られず、腺房の拡大と二次ヒダ形成の増加が認められ、前立腺重量も対照の stand-A 群と差が認められなかった。女性ホルモン投与により腺房の嚢胞状拡大と上皮細胞の扁平上皮化生がみられる¹³⁾²⁷⁾²⁹⁾とされているが、扁平上皮化生は認められなかった。また、cho 食飼育下でも Fingerhut ら¹⁴⁾と同様の組織学的所見は得られなかった。しかし、A、B 群と同じく cho-C 群においても腺上皮細胞の乳頭状、篩状の過形成が認められ、しかも、cho-C 群では cho-A 群程の顕著な腺上皮細胞の過形成が認められなかったことより、cho 食飼育時に認められる過形成に対して diethylstilbestrol は抑制的に作用していると考えられた。また、stand-C 群に認められた前立腺の所見は cho 食飼育にても変化しなかったことより、diethylstilbestrol の前立腺への作用に与える cho 食の影響は認められないと考えられた。

去勢した場合、前立腺は数週以内に著明に萎縮するとされ²⁴⁾²⁶⁾、著者の D 群でも前立腺は著しく萎縮し、その程度は cho 食飼育時にも同様であった。両飼育食 D 群の前立腺腺房内には少量の分泌物が認められ、腺上皮細胞に分泌機能が残存していると考えられたが、cho-D 群に腺上皮細胞の過形成は認められなかった。以上の結果より、去勢による前立腺腹葉の萎縮性変化は cho 食飼育によって影響されないと考えられた。また、cho 食飼育によって認められる腺上皮細胞の過形成は、去勢時にはその強大な前立腺上皮細胞に対する萎縮作用のために発現されないと考えられ、睾丸機能の存在がこの過形成発現に重要な意味をなしていると考えられた。

Sato¹⁵⁾は saponin をマウスに投与し、前立腺腹葉は 3～4 倍に腫大して follicular proliferation を呈する

と述べている。しかし、著者の stand-E 群では、前立腺腹葉重量において stand-A 群と差を認めず、前立腺上皮細胞にも増殖性変化は認められず、むしろ萎縮性変化が認められた。cho-E 群でも stand-E 群と同様の前立腺の組織所見が得られ、去勢群と同じく腺上皮細胞の過形成は認められなかった。すなわち、saponin 投与によっても、cho 食飼育による前立腺上皮細胞の過形成は抑制されると考えられた。

saponin は血液毒として知られ、赤血球の細胞膜 cholesterol と親和性を有し¹⁶⁾溶血作用を示す。また、複合配糖体である saponin の糖成分組成は各社製剤により若干異なり³⁰⁾、その作用の型や程度も種々の製剤で異なる³¹⁾とされているが、細胞膜 cholesterol に対する interaction 作用を有する点では共通している³¹⁾。著者の E 群の前立腺上皮細胞においても、その細胞膜 cholesterol と saponin の interaction 作用により腺上皮細胞の障害が生じ、組織学的には腺上皮細胞の立方化という萎縮性変化として認められ、腺上皮細胞の過形成発現が抑制されたのではないかと考えられた。また、stand-E 群の肝には好中球や大食細胞の浸潤を伴った巣状肝細胞壊死が認められ、saponin による変化と考えられたが、cho-E 群ではこの変化は軽減し、しかも cho-A 群の様な高度の脂肪肝は認められなかった。すなわち、saponin 投与により、肝においても前立腺腹葉と同じく cho 食飼育の与える影響が組織学的に抑制されることを示していると考えられた。また、肝に与える saponin の効果は、cho 食飼育により軽減されたが、前立腺腹葉では影響されないと考えられた。

前立腺肥大症の発生部位として、前立腺部尿道の粘膜腺とその周囲の粘膜下腺が注目を集めている³²⁾³³⁾。著者の追試した Fingerhut ら¹⁴⁾の報告は、膀胱頸部や尿道に fibromuscular nodule が生じ尿道を閉塞すると述べており、また Sato¹⁵⁾は、尿道周囲の pars medianus に fibroadenomatous proliferation が発生し尿道を閉塞すると述べている。しかし、著者の結果では、stand-C 群は対照である stand-A 群と同様の前立腺部尿道所見を呈した。また、stand-E 群では排尿障害による膀胱容量の増大が認められたが、前立腺部尿道には炎症所見のみ認められ、それによる尿道狭窄が排尿障害の原因と考えられた。

Ichihara ら³⁴⁾、Zuckerman ら³⁵⁾は前立腺腹葉集合管や前立腺部尿道に男性ホルモンの影響はみられないとしており、著者の stand-B 群でも同様であった。また、Deming ら³²⁾は去勢によって尿道全体の縮小と尿道内

径の減少を生ずるが、粘膜下腺には変化がみられないとしており、著者の stand-D 群でも同様の結果が得られた。期待した結果を C, D 群で認めることはできなかったが、得られた結果より、前立腺部尿道には cho 食飼育下においても testosterone および diethylstilbestrol の影響が認められず、また、cho 食飼育によって認められる尿道近傍の前立腺腹葉集合管の拡大も、これら性ホルモンの影響を受けないと考えられた。去勢による前立腺部尿道の変化も cho 食飼育によって影響されないと考えられたが、cho-A 群にみられた前立腺腹葉集合管の拡大が認められなかったことより、この変化は去勢により認められなくなると考えられた。E 群の前立腺部尿道にも cho 食飼育の与える影響は認められなかった。

動物を cho 食で飼育すると、高 cholesterol 血症、高 cholesterol 肝、atherosclerosis など組織内に cholesterol の増量あるいは蓄積する現象を導くことができるとされている³⁶⁾。著者の実験でも cho-A 群で明らかにしたごとく、1% cholesterol 添加食飼育により、血清および肝の cholesterol 含有量は有意に増加し、肝には著明な脂肪変性が認められ、この現象を導き得たと考えられた。

Fillios³⁷⁾は、女性ホルモン投与と去勢はラットの血清 cholesterol を上昇させ、男性ホルモン投与ではその逆であると述べ、また、cho 食飼育による血清 cholesterol 上昇反応は男性ホルモン投与にて減弱し、女性ホルモン投与にて増強すると報告している。著者の成績でも、有意差の認められないものもあるが、その傾向がうかがわれた。saponin は、経口投与により cho 食飼育サルの血清 cholesterol 上昇反応を阻害するとされ、これは saponin が腸管からの cholesterol 吸収を阻害するためと述べられている¹⁷⁾。しかし、著者の E 群では、普通食飼育下で血清 cholesterol 値に変化を認めず、cho 食飼育下では有意な血清 cholesterol の上昇を認め、しかも、cho-A 群と差を認めなかった。このことより、普通食飼育下でも cho 食飼育下でも、皮下投与された saponin は cho 食飼育によって導かれる血清 cholesterol 上昇反応に影響をおよぼさないと考えられた。

cho 食飼育により、前立腺腹葉の単位組織重量当り cholesterol 含有量には有意な増加が認められなかったが、前立腺の cholesterol 総含有量としては有意な増加が得られたことより、前立腺全体としての cholesterol の増量を導き得たと考えられた。これには前立腺

重量の有意な増加が関与していると考えられ、Wang ら³⁾のハムスターにおける candididin 投与による逆の低 cholesterol 血症状態でも、ハムスター前立腺の重量と cholesterol 総含有量の減少をみるが、単位組織重量当りの cholesterol 含有量には差を認めなかったと述べられている。また、生体中の cholesterol には遊離型とエステル型の2種類があり、前立腺では大部分が遊離型でエステル型は肝と異なり少ないとされ⁸⁾³⁸⁾、著者の実験において肝のような cholesterol の蓄積増量する現象を前立腺で認めることができなかったのは、前立腺自身の分泌物排泄機能と関係する結果と考えられた。

ラット前立腺における cholesterol 合成は androgen 依存性であり、去勢によって減少し、testosterone 投与によって増大するとされ⁵⁾⁶⁾、肝とは逆の cholesterol 合成調節機序があるとされている⁶⁾⁷⁾。さらに、Singhal ら⁵⁾は、ラット前立腺の cholesterol 含有量も去勢によって低下し、それに testosterone を投与すると再び増大すると述べている。しかし、著者の cholesterol 含有量の検討では、普通食飼育下の testosterone 投与により肝で減少が認められたが、前立腺腹葉では stand-A 群と差が認められなかった。また、cho 食飼育下でも前立腺の cholesterol 含有量に対する testosterone 投与の影響は認められなかった。diethylstilbestrol 投与は、肝に影響を与えなかったが、前立腺 cholesterol 含有量の増加をきたした。これは前立腺腺房内の分泌物増加による結果と思われるが、cho 食飼育では増加が認められなかった。また、去勢時の肝 cholesterol 含有量は著明に減少していた。著者の実験が長期間にわたって検討されたためか、Singhal ら⁵⁾の結果と異なるが、性ホルモンは前立腺 cholesterol 含有量に対し少なくとも肝とは異なる反応を示すと考えられた。

一方、saponin については、肝 cholesterol 含有量に対し減少効果を示したが、前立腺のそれに対しては単位組織重量当りで増加を、総含有量で減少を示し、一定の効果を認めることはできなかった。Ikehara ら³⁹⁾は saponin をラットの腹腔内に投与し、肝の cholesterol 含有量が減少すると述べ、また、高脂肪食飼育ラットの肝における cholesterol 合成能の negative feed back は saponin 投与によって抑制されると報告している。このように、saponin が肝の cholesterol 代謝に影響することは明らかであるが、前立腺における報告はなく、著者の cholesterol 含有量の検討でも

saponin の前立腺に与える影響を見出すことはできなかった。

本来、前立腺は外分泌腺としての機能を有しており、その分泌液中の脂質成分に占める cholesterol の量は多く³⁸⁾、ヒト精液中の cholesterol のほとんどは前立腺由来とされている⁴⁰⁾。前立腺組織中の cholesterol は前立腺で合成されたものがほとんどであるとの報告⁷⁾もあるが、宮尾¹⁰⁾は、C¹⁴で標識された血中 cholesterol がイヌの前立腺分泌液中に排泄されることを明らかにし、分泌液中の cholesterol は血中由来のものが大部分を占めると報告している。また、宮尾¹⁰⁾は、ラットに高 cholesterol 血症を生じせしめ、ある時期までは前立腺組織中の cholesterol 含有量と血清 cholesterol は同じような増加を示すとも述べている。血清 cholesterol の変動によって前立腺分泌液中の cholesterol がどのような変化をするかは不明であるが、宮尾¹⁰⁾の報告は、血清 cholesterol の変動により前立腺の cholesterol 代謝が影響を受け、外分泌腺としての前立腺機能に変化が生ずる可能性を示唆しているものと考えられた。

低 cholesterol 血症時の前立腺の変化を最初に報告したのは Gordon ら²⁾である。彼らは前立腺肥大症のイヌに対し低 cholesterol 血症作用を有する candidin を経口投与し、前立腺の大きさの減少と、組織学的な乳頭状形態の消失をみたし述べ、この薬剤による血清 cholesterol 低下と関連した変化であろうとしている。その後、ヒト⁴⁾あるいは動物³⁾²¹⁾に candidin 等の polyene macrolide 系薬剤投与がなされ、同様の前立腺縮小効果が確認されている。polyene macrolide 系薬剤は sterol あるいは sterol を含む生体膜と特異的親和性がある⁴¹⁾とされているが、経口投与された場合は腸管からはほとんど吸収されず、消化管内での polyene macrolide と cholesterol の interaction によって cholesterol の吸収を阻害し、血清 cholesterol 低下作用を示すとされている。このことは、この薬剤による前立腺の縮小効果は、前立腺への直接効果というより、二次的な血清 cholesterol の低下と関連した変化ではないかということを考えさせる。著者の逆の高 cholesterol 血症時の実験では、前立腺腹葉の重量増加と腺上皮細胞の過形成が認められたことより、血清 cholesterol の変動と前立腺における組織学的変化に関連性があるのではないかということを、著者の実験結果は逆の面より示唆しているものと考えられた。

前立腺における cholesterol 代謝に関する研究は、

前立腺肥大症や前立腺癌の病因との関連性から非常に興味深い、いまだ充分には解明されていない。今後の研究成果が期待される。

結 語

30週間の普通食および高 cholesterol 食飼育時におけるマウスの前立腺腹葉および前立腺部尿道を、無処置群(A群)、testosterone 投与群(B群)、diethylstilbestrol 投与群(C群)、去勢群(D群)および saponin 投与群(E群)の5群において組織学的に比較し、高 cholesterol 食飼育の与える影響を検討した。また、D群を除く他の4群の前立腺腹葉 cholesterol 含有量も検討した。結果は以下のごとくである。

1. A群の前立腺腹葉重量は、高 cholesterol 食飼育によって有意に増加し、B群、C群でも同様の結果が得られた。E群では両飼育食群に差が認められなかった。

2. A群では、高 cholesterol 食飼育により前立腺腹葉腺上皮細胞の乳頭状および篩状の増殖形態を呈する過形成が認められた。この過形成はB群、C群の高 cholesterol 食飼育時にも認められ、その程度はA群に比してB群で増強し、C群で減弱していた。D群、E群の高 cholesterol 食飼育時にはこの過形成は認められなかった。

3. 普通食B群の前立腺腹葉においても腺上皮細胞の乳頭状あるいは篩状の過形成が認められたが、同群ではこの増殖所見と共に分泌物の増加が認められたのに対し、高 cholesterol 食A群では増殖所見が主であり、分泌物は普通食A群に比してやや増加している程度であった。

4. 高 cholesterol 食A群の前立腺部尿道には、尿道内腔の拡張と前立腺腹葉集合管の拡大が認められ、B群、およびC群でも同様の所見が認められ、その程度はA群と差をみなかった。D群およびE群には高 cholesterol 食飼育にてこの所見は認められなかった。

5. A群では、高 cholesterol 食飼育によって血清および肝の単位組織重量当り cholesterol 含有量の有意な増加が認められたが、前立腺腹葉の単位組織重量当り cholesterol 含有量に普通食A群と差が認められなかった。B群、E群の前立腺腹葉でも同様の結果が得られたが、C群では高 cholesterol 食飼育によって前立腺の単位組織重量当り cholesterol 含有量の有意な減少が認められた。

6. 前立腺腹葉の cholesterol 総含有量における検討では、A群で高 cholesterol 食飼育により有意の増加が認められた。C群でも同様の有意な増加が認めら

れたが、B群およびE群では両飼育食群に差が認められなかった。

以上のごとく、長期間の高 cholesterol 食飼育によりマウス前立腺腹葉の腺上皮細胞は過形成を呈し、その発現は男性ホルモンに依存していると考えられる結果が得られた。この結果は、前立腺上皮細胞の過形成を呈する疾患、特に前立腺肥大症の cholesterol 代謝において、食餌中の cholesterol の影響の重要性を示唆しているものと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った恩師久住治男教授ならびに黒田恭一名誉教授に深く感謝の意を表します。また、病理組織学的検討に際し御指導を賜った本学第一病理学教室中西巧夫教授に深く感謝の意を表します。さらに、本研究に御教示、御協力頂いた当教室諸兄各位ならびに田中耕一文部技官に謝意を表します。

文 献

- 1) Swyer, G.I.M.: The cholesterol content of normal and enlarged prostates. *Cancer Res.*, 2, 372—375, 1942.
- 2) Gordon, H.W. and Schaffner, C.P.: The effect of polyene macrolides on the prostate gland and canine prostatic hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 60, 1201—1208, 1968.
- 3) Wang, G.M. and Schaffner, C.P.: Effect of candididin and colestipol on the testes and prostate glands of BIO 87.20 hamsters. *Invest. Urol.*, 14, 66—71, 1976.
- 4) Keshin, J.G.: Effect of candididin on the human benign hypertrophied prostate gland. *Inter. Surg.*, 58, 116—122, 1973.
- 5) Singhal, A.K., Bonner, D.P. and Schaffner, C.P.: Kinetics of testosterone induced-cholesterol synthesis in rat ventral prostate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 159, 1—5, 1978.
- 6) 長船匡男, 宇佐見道之, 三木恒治, 中野悦次, 松田稔, 古武敏彦, 園田孝夫, 和田文雄: ラット前立腺におけるコレステロール合成とその調節. *日泌尿会誌*, 71, 437—448, 1980.
- 7) 田近栄司: ラット前立腺における 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 活性についての研究(第I報). *日泌尿会誌*, 72, 212—220, 1981.
- 8) Schaffner, C.P.: Prostatic cholesterol metabolism: Regulation and alteration. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 75A, 279—324, 1981.
- 9) Schaffner, C.P., Brill, D.R., Singhal, A.K., Bonner, D.P., Goldstein, N.I. and Wang, G.M.: Absence of cholesterologenesis regulation in the liver and prostate of the BIO 87.20 hamster. *Lipids*, 16, 835—840, 1981.
- 10) 宮尾尚敬: 雄性副性器と脂質. I. 前立性分泌液並びに組織の cholesterol 及び磷脂質について. *泌尿紀要*, 11, 1197—1202, 1965.
- 11) Scott, W.W.: What makes the prostate grow. *J. Urol.*, 70, 477—488, 1953.
- 12) Walsh, P.C.: Experimental approaches to benign prostatic hypertrophy: Animal models utilizing the dog, rat, and mouse. in *Benign Prostatic Hyperplasia*, p. 215—222, Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, 1976.
- 13) Burrows, H. and Kennaway, N.M.: On some effects produced by applying oestrin to the skin of mice. *Amer. J. Cancer*, 20, 48—57, 1934.
- 14) Fingerhut, B. and Veenema, R.J.: Histology and radioautography of induced benign enlargement of the mouse prostate. *Invest. Urol.*, 4, 112—124, 1966.
- 15) Sato, K.: Experimental research regarding pathology of the prostatic hypertrophy. *Acta Pathologica Japonica*, 6, 145—150, 1956.
- 16) Shang, S., Bernheimer, A.W., Grushoff, P.S. and Kim, K.-S.: Evidence for membrane cholesterol as the common binding site for cereolysin, streptolysin O and saponin. *Molecul. Cell. Biochem.*, 3, 179—186, 1974.
- 17) Malinow, M.R., McLaughlin, P., Kohler, G.O. and Livingston, A.L.: Prevention of elevated cholesterolemia in monkeys by alfalfa saponins. *Steroids*, 29, 105—110, 1977.
- 18) Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S.: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497—509, 1957.
- 19) 伊藤朋文: 肥満時の脂肪肝に関する実験的研究. *名市大医誌*, 19, 434—453, 1968.
- 20) 伊東裕善: 「ラノリン」添加食餌飼養家兎各内分泌臓器ノ形態学的変化ニ及ボス「雄性ホルモン」ノ影響ニ関スル研究. 第7編. *攝護腺. 日泌尿会誌*, 32, 346—355, 1942.
- 21) Singhal, A.K., Brill, D.R. and Schaffner, C.P.: Effect of clofibrate on cholesterol and DNA synthesis in rat ventral prostate. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 160, 405—409, 1979.
- 22) Yamanaka, H., Shimazaki, J., Koya, A., Mayuzumi, T., Imai, K., Ito, Y. and Shida, K.: Effect of hypolipidemia on testosterone-stimulated prostatic growth in castrated rats. *Endocrinol. Japon.*, 24, 213—217, 1977.
- 23) Mann, T., Rowson, L.E.A., Short, R.V. and Skinner, J.D.: The relationship between nutrition and androgenic activity in pubescent twin

- calves, and the effect of orchitis. *J. Endocr.*, **38**, 455—468, 1967.
- 24) 富重栄一：長期間の去勢，女性ホルモン投与の雄ラットの成長および性腺におよぼす影響に関する研究。鹿大医誌，**18**，739—782，1967.
 - 25) Woodruff, M.W. and Umiker, W.O.: The effect of estrogen and androgen on the rat prostate gland and testes. *J. Urol.*, **84**, 162—166, 1960.
 - 26) 中山恵夫：合成発情物質大量投与の雄性動物臓器に及ぼす影響。日泌尿会誌，**42**，339—355，1951.
 - 27) Berg, O.A.: Effect of stilboesterol on the prostate gland in normal puppies and adult dogs. *Acta Endocrinol.*, **27**, 155—169, 1958.
 - 28) Tveter, K.J.: Some aspects of the pathogenesis of prostatic hyperplasia. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.*, **248**, 167—174, 1974.
 - 29) Caine, M. and Superstine, E.: Effect of hydroxyprogesterone caproate on experimental benign prostatic obstruction in the mouse. *Israel J. Med. Sci.*, **9**, 1559—1564, 1973.
 - 30) 那須 毅：膜形成脂質異常栄養症の病理。日本医師会雑誌，**83**，4—19，1980.
 - 31) Gestetner, B., Assa, Y., Henis, Y., Tencer, Y., Rotman, M., Birk, Y. and Bondi, A.: Interaction of lucerne saponins with sterols. *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 181—187, 1972.
 - 32) Deming, C.L., Jenkins, R.H. and Van Wagenen, G.: Further studies in the endocrinological relationships of prostatic hypertrophy: The effect of castration on the sub-urethral glands in the posterior urethra of the rat. *J. Urol.*, **34**, 678—685, 1935.
 - 33) Franks, L.M.: Benign nodular hyperplasia of the prostate: A review. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, **14**, 92—106, 1954.
 - 34) Ichihara, I., Kallio, M. and Pelliniemi, L.J.: Light and electron microscopy of the ducts and their subepithelial tissue in the rat ventral prostate. *Cell Tiss. Res.*, **192**, 381—390, 1978.
 - 35) Zuckerman, S. and Parkes, A.S.: Effect of sex hormones on the prostate of monkeys. *Lancet*, **1**, 242—247, 1936.
 - 36) Cook, R.P., Kliman, A. and Fieser, L.F.: The absorption and metabolism of cholesterol and its main companions in the rabbit—With observations on the atherogenic nature of the sterols. *Arch. Biophys. Biochem.*, **52**, 439—450, 1954.
 - 37) Fillios, L.C.: The gonadal regulation of cholesteremia in the rat. *Endocrinology*, **60**, 22—27, 1957.
 - 38) Scott, W.W.: The lipids of the prostatic fluid, seminal plasma and enlarged prostate gland of man. *J. Urol.*, **53**, 712—718, 1945.
 - 39) Ikehara, M., Shibata, Y., Higashi, T., Sanada, S. and Shoji, J.: Effect of ginseng saponins on cholesterol metabolism. III. Effect of ginsenoside-Rb₁ on cholesterol synthesis in rats fed on high-fat diet. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 2844—2849, 1978.
 - 40) Eliasson, R.: Cholesterol in human semen. *Biochem. J.*, **98**, 242—243, 1966.
 - 41) Schaffner, C.P.: The biochemical implications of polyene macrolide-sterol interaction. *Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today*, 393—399, 1972.

(1985年8月5日受付，特別掲載)