

平成 12 年度厚生科学研究費補助金
生活安全総合研究事業報告

食品中内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用に
関する実験的研究 (H11-生活-018)

主任研究者 西川 秋 佳
国立医薬品食品衛生研究所病理部

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
平成 12 年度総括研究報告書

食品中内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用に関する実験的研究
主任研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨：食品中に存在する天然および合成の内分泌かく乱物質として、genistein、nonylphenol および atrazine を取り上げ、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用を同一の投与条件で検討する実験を開始し、一部実験を終了した。実験モデルとして、DHPN 誘発ラット甲状腺発がんモデル、DMBA 誘発ラット乳腺発がんモデル、DMBA 誘発 *c-Ha-ras* 導入ラット乳腺発がんモデル、ENU 誘発 *p53* 欠損マウス子宮発がんモデル、DMBA 誘発ラット前立腺発がんモデル、DMBA 誘発ラット卵巣発がんモデルおよびラット多臓器中期発がん検索モデルを用いて、genistein および nonylphenol を 250 ppm と 25 ppm の二段階の用量で、atrazine を 500 ppm、50 ppm および 5 ppm の三段階の用量で混餌投与した。その結果、ラット多臓器中期発がん性試験法において、genistein 及び nonylphenol の投与による肺腫瘍発生の促進がみられた。しかし、内分泌かく乱作用との関連は不明であり、さらなる検証を要するものと考えられた。その他の動物発がんモデルと被験物質との組み合わせの結果は、高用量の genistein が *rasH2* マウス子宮発がんに対して促進傾向を示した以外に、（現在まで）影響なしまたは抑制（傾向）を示すものであった。

一方、エストロゲン活性による甲状腺発がん促進作用は強いものではなく、長期間にわたる高濃度曝露を要するものと考えられた。また、genistein 及び nonylphenol はエストロゲン応答性細胞増殖活性を示すが、*in vivo* では高濃度でのみ促進作用を示すこと、genistein は *FADD* 遺伝子、*Pim-2* 遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。さらに、大豆摂取とヨード欠乏による甲状腺発がん機序の一部は、プロモーション作用として説明できることを明らかにした。

分担研究者

広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所・部長
津田洋幸 国立がんセンター研究所・部長
三森国敏 東京農工大学農学部・教授
今井田克己 名古屋市立大学医学部・助教授
田中卓二 金沢医科大学・教授
鱈渕英機 大阪市立大学医学部・講師
藤本成明 広島大学原爆放射能医学研究所・
助教授
酒井敏行 京都府立医科大学・教授

指摘されており、ホルモン活性物質による健康影響が危惧されている。日常ヒトが摂取している食品中には、多くの phytoestrogen が存在しており、その毒性や催奇形性に加えて、発がん修飾を詳細に検討することは益々重要となってきた。実験的に、合成エストロゲンはマウス乳腺に発がん性を示すが、ラットでは乳腺発がんを促進あるいは抑制することが知られている。一方、植物中のエストロゲンは乳腺発がんを抑制するが、過剰の大豆摂取はラット甲状腺発がんを促進する。このように、内分泌環境のかく乱は発がんの重要な修飾要因と考えられるが、食品中の内分泌かく乱物質の中でその発がん修飾作用が証明されている物質は少数にすぎない。その理由の一つは被験物質の内分泌・生殖器官における発がん修飾を低用量でも確実に検出し得る高感度の動物モデルがなかったことによる。しかし、すでに確立されているラットの前立腺がんモデルや甲状腺がんモデルに加えて、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 導入ラットや *p53*

A. 研究目的

環境中に存在する内分泌かく乱化学物質の多くは性ホルモンの働きを示すが、逆にホルモンに対し拮抗的に働くこともあり、その作用は複雑である。したがって、ホルモン依存性癌に対する修飾作用を検討することは、これら物質の安全性評価上重要である。また最近、外因性内分泌かく乱物質と子宮内膜症発症との関連性、子宮内膜症を母地とした卵巣がんの発生などが

欠損マウスはそれぞれ乳腺や子宮の発がん高感受性形質を有し、中期検索モデルとしての有用性が期待されている。本研究ではまた、内分泌かく乱化学物質のリスク評価における卵巣がんモデル、卵巣・下垂体摘除ラット、ラット多臓器中期発がん性試験法などの有用性についても検討する。さらに、内分泌かく乱物質による増殖・細胞周期関連遺伝子の発現調節を分子生物学的に追究する。

本研究の目的は、食品中に含まれる内分泌かく乱物質による内分泌器官その他の臓器に対する発がん修飾作用を総合的に比較検討し、さらにその修飾機構がホルモン作用に基づくものか、あるいはそれ以外の作用によるものかを明らかにし、ヒト発がんへの危険度評価を行うことにある。食品中に存在するホルモン活性物質による発がん修飾の影響を明らかにすることは食品衛生上急務であり、その成果によりヒトがんの予防・阻止のための基礎的資料を得ることができる。平成 11~12 年度は、食品中に存在する天然および合成の内分泌かく乱物質として genistein、nonylphenol および atrazine を取り上げ、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用について各種実験モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

<I. 各種動物モデルによる食品中内分泌かく乱物質の発がん修飾作用の検討>

各動物モデルにおいて、genistein または nonylphenol を 25 及び 250ppm の二段階の用量で、atrazine を 5、50 及び 500 ppm の三段階の用量で、基礎飼料 CRF-1 に混じて長期間与えた。なお、大豆イソフラボンの影響を除外するため、通常は添加する大豆成分を CRF-1 に加えなかった。

【実験 1】 6 週齢の F344 雄ラット 120 匹を 8 群に分け、第 1 群~第 4 群 (各群 20 匹) および第 5 群~第 6 群 (各群 10 匹) に、甲状腺発がんイニシエーション処置として、DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与し、1 週間後から 500 ppm (第 1 群)、50 ppm (第 2 群)、5 ppm (第 3 群) および 0 ppm (第 4 群) の用量の atrazine、500 ppm の atrazine と 5 ppm の tamoxifen (第 5 群) または 5 ppm の tamoxifen (第 6 群) を混餌投与した。DHPN 処置をしなかった第 7 群には 500 ppm の

atrazine のみを混餌投与し、第 8 群には CRF-1 のみを与えた。実験開始 24 週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験 2】 7 週齢の SD 系雌ラットに、50 mg/kg 体重の 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を 1 回胃内強制投与し、乳腺腫瘍の発生を週 1 回触診により観察した。腫瘍発生頻度が 50% に達した 12 週の時点で卵巣を摘出し、〔腫瘍(+)・卵摘(+)]、〔腫瘍(-)・卵摘(+)] の 2 群に分け、それぞれに基礎食、25 及び 250 ppm genistein の混餌投与を行った。また、DMBA を投与しないで卵摘と genistein 投与のみを行った対照群も設けた。経過中週 1 回乳腺腫瘍の発生頻度、発生部位、個数及び大きさを観察し、実験開始後 48 週ですべての動物を屠殺し、乳腺腫瘍を中心に病理組織学的に観察した。

【実験 3】 5 週齢の SD 系雌ラットに 40 mg/kg 体重の 1,2-dimethylhydrazine (DMH) を 2 日に 1 回、10 日間(計 5 回)皮下投与した後、50 mg/kg 体重の DMBA を 1 回胃内投与した。投与終了後から基礎食、25 及び 250 ppm nonylphenol 混餌投与を行った。発がん物質を投与しないで、基礎食あるいは nonylphenol のみを投与した対照群も設定した。乳腺腫瘍については実験 2 と同様な観察を実施し、38 週ですべての動物を屠殺し、乳腺腫瘍および大腸腫瘍を中心に病理学的に観察した。

【実験 4】 7 週齢の SD 系雌ラットに 50 mg/kg 体重の DMBA を 1 回胃内強制投与し、乳腺腫瘍の発生を週 1 回触診により観察した。腫瘍発生頻度が 50% に達した 19 週の時点で卵巣を摘出し、〔腫瘍(+)・卵摘(+)]、〔腫瘍(-)・卵摘(+)] の 2 群に分け、それぞれに基礎食、5、50 及び 500 ppm atrazine の混餌投与を行った。また、DMBA を投与しないで卵摘と atrazine 投与のみを行った対照群も設けた。乳腺腫瘍については実験 2 および 3 と同様な観察を実施しており、32 から 40 週で実験を終了する予定である。

【実験 5】 50 日齢の雌雄のヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子導入ラットに DMBA を 25 mg/kg 胃内投与し、翌日および 60 日目に陽性対照として 17 β -estradiol (E2) を一匹あたり 0、0.01、0.1 および 1 mg の用量で背部皮下に挿入し 12 週にて終了した。雄は 18 週で再度ベレットの挿入を行い 20 週にて終了した。Genistein の実験についても、50 日齢の雌雄ラットに DMBA

を 25 mg/kg 胃内投与し、翌日より genistein または nonylphenol を 0、25 および 250 ppm の用量にて基礎食に加えて雌は 12 週まで、雄は 20 週まで投与した。野生型にも感度の対照とした同様の実験を行った。

【実験 6】 雌 *p53*ヘテロ欠損 CBA マウスに生理食塩水に溶解した *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) 120 mg/kg を一回腹腔内投与し、その一週後から第 1 群に 25 ppm genistein を、第 2 群には 250 ppm genistein を基礎飼料 (CRF-1) に混じてこれらを 26 週間にわたり投与した。同様のプロトコールで、第 1 群に 25 ppm nonylphenol 含有飼料を、第 2 群には 250 ppm nonylphenol 含有飼料を、対照群には基礎飼料を ENU 投与 1 週間後より 26 週間自由に与えた。同様のプロトコールで、400 ないし 0 ppm の atrazine を ENU 投与 1 週間後より基礎飼料に混じ、26 週間自由に与えた。

【実験 7】 雌 *rasH2* マウスに生理食塩水に溶解した ENU 120 mg/kg を一回腹腔内投与し、イニシエーション処置とした。その一週後から genistein は 25 および 250 ppm、nonylphenol は 25 および 250 ppm、メトキシクロールは 1000 ppm の濃度で基礎飼料に混じ、23~26 週間自由に与えた。

【実験 8】 6 週齢雌 ICR マウスに生理食塩水で溶解した ENU 50 mg/kg を一回腹腔内に投与し、イニシエーション処置とした。その 1 週間後より atrazine を 5、50 および 500 ppm の濃度で基礎飼料に混じて 26 週間投与した。また、陽性対照として ethinylestradiol (EE) の 2.5 ppm の投与群も設け、現在実験が進行中である。

【実験 9】 6 週齢の F344 雄ラットを 7 群に分け、1~5 群には前立腺発がん物質である 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) を最初の 20 週間に体重 kg あたり 50 mg の投与量で 2 週間に 1 回ずつ合計 10 回皮下投与した。6、7 群は DMAB の溶媒のみを投与した。実験開始 20 週目より 2、3 群には nonylphenol をそれぞれ 250、25 ppm の濃度で基礎食に混じて 40 週間投与した。同様に、4、5 群には 250、25 ppm の genistein を、6、7 群には 250 ppm の nonylphenol と genistein をそれぞれ投与した。実験期間 60 週で屠殺剖検し、前立腺を中心にその腫瘍発生にこれらの物質が影響するかどうか検討した。

【実験 10】 6 週齢の F344 雄ラットに、100

mg/kg 体重の PhIP を週 1 回ずつ i.g. 投与し、20 週間の PhIP の投与後から、atrazine を 500、50、5 ppm の濃度で基礎食に混じて経口投与した。

【実験 11】 総計 145 匹の雌性 SD ラットを 8 群に分けた。実験群は第 1 群 (20 匹) : DMBA → 250 ppm nonylphenol、第 2 群 (20 匹) : DMBA → 25 ppm nonylphenol、第 3 群 (20 匹) : DMBA → 250 ppm genistein、第 4 群 (20 匹) : DMBA → 25 ppm genistein、第 5 群 (20 匹) : DMBA、第 6 群 (15 匹) : 250 ppm nonylphenol、第 7 群 (15 匹) : 250 ppm genistein、第 8 群 (15 匹) : 無処置対照群の計 8 群とした。卵巣がんは DMBA を 0.5% の濃度でオリーブ油に懸濁し、左卵巣内に 0.01 ml 注入して誘発した。被験物質は DMBA 投与の 1 週間後から 50 週間投与し、その発がんに及ぼす影響をみた。

【実験 12】 6 週齢の F344Du/Crj 系雄ラット 124 匹を 8 群に分け、第 1~第 5 群 (各群 20 匹ずつ) に実験開始日に diethylnitrosamine 100 mg/kg b.w. を腹腔内投与、*N*-methyl-*N*-nitrosourea を第 2、第 5、第 8、第 11 日に 20 mg/kg b.w. の用量で腹腔内投与、DMH 40 mg/kg bw を第 14、第 17、第 20、第 23 日に腹腔内投与、それらと平行して第 1~第 2 週に *N*-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine を 0.05% の濃度で飲料水投与、第 3~4 週に DHPN を 0.1% の濃度で飲料水投与しイニシエーション処置 (DMBDD) とした。実験開始後 5 週目から nonylphenol を第 1 群と第 2 群にそれぞれ 29 週間 250 ppm、25 ppm で混餌投与、同様に第 3 群と第 4 群には genistein をそれぞれ 29 週間 250 ppm、25 ppm で混餌投与した。第 5 群には同様のイニシエーション処置後、通常の粉末飼料を与えた。また併置対照群として第 6~7 群 (各群 8 匹ずつ) にはイニシエーション処置を行わず、5 週目からそれぞれ、nonylphenol を 250 ppm、genistein を 250 ppm で混餌投与した。第 8 群 (8 匹) は無処置群とした。実験開始後 33 週間後に、主要臓器を摘出し病理組織学的に検索した。

<II. 内分泌かく乱物質による発がん修飾機構に関する検討>

【実験 13】 5 週齢時に卵巣摘除を施した 6 週齢の F344 雌ラット 60 匹を 6 群に分け、第 1 群~第 4 群 (各群 10 匹) に甲状腺発がんイニシ

エーション処置として、*N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)を 2400 mg/kg の用量で単回皮下投与し、1週間後から β -estadiol 3-benzoate (EB)を 0.1 mg (第1群)、0.02 mg (第2群)、0.004 mg (第3群) および 0 mg (第4群) の用量で皮下埋植した。DHPN 処置をせずに、第5群には 0.1 mg の EB を皮下埋植し、第6群は無処置対照群とした。実験開始 36 週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験 14】 5 週齢時に精巣摘除した 6 週齢の F344 雄ラット 60 匹を 6 群に分け、第1群~第4群 (各群 10 匹) に甲状腺発がんイニシエーション処置として、DHPN を 2400 mg/kg の用量で単回皮下投与し、1週間後から EB を 0.1 mg (第1群)、0.02 mg (第2群)、0.004 mg (第3群) および 0 mg (第4群) の用量で皮下埋植した。DHPN 処置をせずに、第5群には 0.1 mg の EB を皮下埋植し、第6群は無処置対照群とした。実験開始 36 週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験 15】 雌雄の 6 週齢 F344 ラット各 40 匹を 4 群に分け、DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与した。1週間後から、第1群にはカゼイン中に含まれる可能性のあるヨードの影響を除外するために蛋白成分を 20 %グルテンとした基本食 AIN-93G を、第2群にはさらにそれにヨードを添加しない餌を 11 週間与えた。第3群には蛋白成分を 20 %脱脂大豆とした基本食 AIN-93G を、第4群にはさらにそのヨード欠乏食を同期間与えた。実験開始 12 週後に、血清ホルモン値の定量、臓器重量の測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験 16】 雌雄の 6 週齢 F344 ラット各 40 匹を 4 群に分け、DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与した。1週間後から、脱脂大豆を 20 % (第1群)、4% (第2群)、0.8% (第3群) および 0% (第4群) の用量で 11 週間混餌した。基本食として、蛋白成分をグルテンとした AIN-93G を用いた。実験開始 12 週後に、血清ホルモン値の定量、臓器重量の測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験 17】 卵巣を摘出した 5 週齢の F344 ラットに下垂体細胞 MtT/E-2 を 3×10^5 /部位で移植し、genistein および nonylphenol は 25、250 ppm で、atrazine は 5、50、500 ppm で基礎飼

料に混餌し自由摂取させた。コントロールとして 1.0 mg のエストロゲンを含んだコレステロールペレットを皮下投与した。移植腫瘍が生着し径が 20 mm 程度になった時点で、動物を屠殺し、血清および下垂体組織を直ちに凍結保存した。下垂体組織の全 RNA の抽出はアイソゲン試薬により行い、さらに DNase で処理した。一定量の全 RNA は MMLV-RT により cDNA 化し、PCR 反応の鋳型とした。*PTTG* プライマーとして、5'-ATGGCTACTCTGATCTTTGT および 5'-TTAAATATCTGCATCGTAAC を用いた。PCR に先立ち、サンプルと同時に competitor DNA の 0.3-10 fg を定量的に加えた。産物は 1.5% アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、画像解析して、competitor と目的産物の光学濃度の比率が 1:1 になる点を求めることで定量した。*PTTG* レポータープラスミッド作成のため、*PTTG* 構造遺伝子上流域-720~+16 内の 5 つの領域について PCR によりラットゲノム DNA から増幅し、TA-クローニングした。これをルシフェラーゼレポーター pGL3-basic に blunt ligation で導入した。エストロゲン応答性転写活性化のアッセイには、(ERE)₃-SV40-luc を用いた。また、ラット ER の 5' 上流域の B プロモーター(-2100~-3155)の解析もこの領域内のフラグメントを PCR クローニングして上記と同様にレポーターを作成した。細胞を 24 穴プレートに $4-8 \times 10^4$ / well で播き、24 時間後に TransFast transfection reagent を用いて全量で 0.8 μ g の DNA をトランスフェクションした。薬剤処理 24 時間後に細胞を溶解し、Dual luciferase assay substrates をそれぞれ加えた。発光測定は、Micro-beta scintillation counter により行った。

【実験 18】 ヒト骨肉腫由来の細胞株 MG63 細胞では 3×10^5 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 50 μ M の genistein あるいは溶媒として用いた DMSO 0.1%を加えた培地に交換した。ヒト乳癌由来の細胞株 MCF-7 細胞では 5×10^5 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 100 μ M の genistein あるいは DMSO 0.1%を加えた培地に交換した。そして薬剤添加 12 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間に細胞を回収した。Medium を除去し、PBS で洗浄した細胞を TNN buffer を加え溶解させ、細胞抽出液として、遠心処理によってその上清を回収し

た。この上清を、まず Protein A – Sepharose と反応させ、非特異的に Protein A – Sepharose に結合する画分を除去した。次に、cdc2 抗体と 4℃において一夜反応させ、さらに Protein A – Sepharose と反応させた後十分洗浄し、genistein 処理細胞及びコントロール細胞から免疫沈降サンプルとして cdc2 自身及びその形成複合体を回収した。この免疫沈降サンプルとヒストン H1 及び γ -³²P ATP を反応させた後の、ヒストン H1 に取り込まれた γ -³²P ATP の量が cdc2 活性であるため、電気泳動後のヒストン H1 バンドの比放射活性を測定した。

【実験 19】 MG63 細胞では 3×10^6 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 50 μ M の genistein あるいは DMSO 0.1%を加えた培地に交換した。MCF-7 細胞では 5×10^6 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 100 μ M の genistein あるいは DMSO 0.1%を加えた培地に交換した。薬剤添加 24 時間後に細胞を回収し、回収された細胞から、total RNA を調製した。Total RNA からさらに mRNA を調製し、cDNA アレイ法を実施した。Gene Navigator™ cDNA Array System を採用し、cDNA アレイとしては、ヒト癌関連遺伝子 177 種が解析可能な human cancer selected を採用した。

【実験 20】 MCF-7 細胞 2×10^4 個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 100 nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M の atrazine あるいは DMSO 0.1%を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして薬物添加後 24 時間毎に 96 時間後までの細胞数を計測した。

倫理面への配慮として、動物愛護の観点から、必要最小限の動物数を用いるよう十分な検討と準備を行った。動物飼育は 23℃前後、湿度約 60% 前後に保たれた施設内にて、飲料水・飼料を適正に投与した。各研究者所属施設の実験動物取り扱い（倫理）規定を遵守して飼育、実験を行った。屠殺はエーテル深麻酔下、腹部大動脈から脱血し、動物に対する苦痛を可能な限り少なくした。大きな腫瘍等が発生した場合にはそれ以上苦痛を与えないように速やかに屠殺した。詳細な解剖により動物から得られた情報を可能な限り利用した。

C. 研究結果

<I. 各種動物モデルによる食品中内分泌かく乱

物質の発がん修飾作用の検討>

【実験 1】 摂餌量は tamoxifen を投与した第 5 群および第 6 群において顕著に減少した。それに伴い、第 5 群および第 6 群に強い体重増加抑制がみられ ($p < 0.01$)、atrazine の 500 ppm 投与（第 1 群）でも軽度であるが有意な ($p < 0.01$) 体重増加抑制が認められた。体重増加抑制の程度は、第 5 群 (tamoxifen + atrazine 投与群) で最も高度であった。相対臓器重量は tamoxifen を投与した第 5 群および第 6 群で、有意な脳重量、腎重量および精巣重量の増加がみられ、第 5 群では精巣上体重量の増加が認められた。その他臓器の相対重量には有意な群間差を認めなかった。現在、病理組織学的に検索中である。

【実験 2】 12 週以後における乳腺腫瘍の推移は、腫瘍(+)・卵摘(+)群では 20 週ごろまでに 70~80%の腫瘍が消失したが、それ以降は各群とも増加に転じた。同様に腫瘍体積は 16 週目ごろまでは各群とも縮小するのが観察されたが以降は増加に転じ、統計学的に有意な差を示さなかった。腫瘍(-)・卵摘(+)群では 24 週頃から腫瘍の発生が散見されたが各群間でその発生状況に差は認められなかった。病理組織学的観察では乳腺腫瘍の発生頻度、多発性および悪性度に genistein 投与に起因する変化は認められなかった。

【実験 3】 乳腺腫瘍は DMBA-DMH 投与群では各群とも 5 週目ごろから観察されはじめ発生頻度および多発性については各群間で差は認められなかったが、nonylphenol の 25 ppm 投与群では腫瘍体積は増加し最終屠殺時には対照群の約 3 倍の値を示した。DMBA-DMH 非投与群では、nonylphenol の 25 ppm 投与群で乳腺腫瘍の発生頻度、多発性および腫瘍容積の増加が観察された。病理組織学的観察では DMBA-DMH 投与群では乳腺腫瘍の発生頻度、多発性および組織学的悪性度に各群間で差は認められなかった。大腸癌の発生状況については各群間で有意な差は認められなかった。DMBA-DMH 非投与群では nonylphenol の 25 ppm 投与群で乳腺腫瘍が 40%の動物に観察された。

【実験 4】 現在 23 週（卵摘後 4 週）経過中であるが、各処置群に体重の有意な変化はみられていない。また、腫瘍(+)・卵摘(+)群で、卵摘により腫瘍の発生頻度および多発性が減少しているが、現在のところ atrazine 投与による影響は

認められていない。腫瘍(-)・卵摘(+)群では、現在 0-10%程度の動物に腫瘍が発生しているが、やはり atrazine 投与による影響は認められていない。

【実験5】 E2投与では、乳腺腫瘍(腺腫+腺癌)の個数/ラットは、雌で0mgで7.5、0.01mgで5.8、0.1mgで1.8、1mgで0.5であり、用量に相関した減少がみられた(傾向検定で有意)。野生型でも弱い抑制傾向がみられた。また雄でも0mgで2.1、0.01mgで4.5、0.1mgで1.0、1mgで1.6であり抑制された(傾向検定で有意)。さらに genistein では、雌で0ppmで6.8、25ppmで4.8、250ppmで4.3であり、用量に相関した有意の抑制がみられた(傾向検定で有意)。野生型では0ppmで1.4、25ppmで0.8、250ppmで0であり、同様の抑制傾向がみられた。したがって genistein は乳腺発がんを抑制する事が明らかとなった。Nonylphenol についても同様のプロトコルで実験経過中である。

【実験6】 解剖時における子宮重量は対照群に比し1、2群で有意の差は認められず、相対重量においても同様であった。子宮内膜肉腫の発生率は1群で71%、2群で33%と対照群の60%に比し2群で減少する傾向が認められた。Nonylphenol投与実験終了時の生存率は1群で80%、2群で70%、対照群で60%であった。Nonylphenol投与群で最終体重の軽度な増加抑制傾向が認められたが、有意な差はなかった。子宮内膜肉腫の発生率は1群で63%、2群で71%と対照群の67%に比し有意差は認められなかった。Atrazineを投与した群では最終生存率が56%と減少したが、体重増加抑制は認められなかった。子宮内膜肉腫の発生率は対照群の60%に比し33%と減少する傾向を示した。

【実験7】 最終生存率および最終体重においては群間に有意な差はみられなかった。子宮内膜腺癌の発生率は対照群で22.2%であったが、genistein 250ppm投与群では57.1%と高率であった。しかし、メトキシクロール投与群ではその発生は認められず、異型過形成も発生しなかった。

【実験8】 投与実験を継続している。

【実験9】 精巣と肛門挙筋の相対重量に統計学的に有意な差はみられず、また血中のtestosterone値も各群で有意な差を認めなかったことから、今回の実験結果からはnonylphenol

とgenisteinによるラットへの内分泌かく乱の影響は明らかではなかった。実験40週から50週の間死亡、あるいは瀕死の状態で屠殺したラット6匹の前立腺腫瘍性病変として、腹葉前立腺に前がん病変と考えられる prostate intraductal neoplasia (PIN) が6例中2例に認められたものの、前立腺がんはみられなかった。また、精嚢には6例中5例に異形成を認めたが、がんの発生は認めなかった。現在、最終屠殺の前立腺病変の切り出し、ならびに臓器重量の測定と病理組織標本の作製を行っており、病理組織学的な詳細を検討してから最終的な判定を行なう予定である。

【実験10】 Atrazineの実験は現在PhIPの投与中であり、PhIP投与群が溶媒投与群より約10%の体重減少が見られているが、これは予想範囲内の変化であり、実験は現在まで順調に経過している。Atrazineの投与は実験開始20週後より開始する予定である。

【実験11】 卵巣重量は、250ppm genistein群で無処置対照群に比べ有意な(p<0.05)減少をみた。子宮重量は、DMBA →25ppm genistein群でDMBA群に比べ有意な(p<0.05)減少をみた。実験終了時の左卵巣腫瘍(腺がん)の発生頻度は、DMBA →250ppm nonylphenol群、DMBA →25ppm nonylphenol群、DMBA →250ppm genistein群、DMBA →25ppm genistein群でDMBA群に比べ有意に(p<0.05)減少していた。

【実験12】 アンドロゲンの影響を受けるとされる肛門挙筋球海綿体の重量は、第1群、第2群が対照群(第5群)に比べて有意に減少していた。また、前立腺の重量も第1群と第4群で第5群に比較し有意に減少していた。イニシエーション群において、肺の腫瘍発生がnonylphenol、genistein投与群で対照群に比較し有意に増加した。肺腫瘍のラット1匹あたりの発生個数は、genistein 250ppm群で肺腺腫が有意に増加していた。肺組織の非腫瘍部において、細胞増殖能の指標であるBrdU標識率がnonylphenol、genistein投与群で対照群に比較し、有意に増加していた。また、大腸においてもnonylphenol、genistein投与群で腫瘍発生が有意差はないものの対照群に比較し増加傾向が見られ、またBrdU標識率は対照群に比較し、有意に増加していた。一方、肝の前がん病変の指標であるGST-P陽性細胞巢はnonylphenol、

genistein 投与群で対照群に比し、有意にその数および面積が減少していた。また、肺発がん促進作用の機序解明のために、DHPN でイニシエーション後 nonylphenol と genistein を 4 週間投与した肺組織の酸化ストレスの指標である 8-OHdG を検索したところ、これらの群で対照群に比し、8-OHdG の生成が上昇していた。

<II. 内分泌かく乱物質による発がん修飾機構に関する検討>

【実験 13】下垂体相対重量は DHPN 処置に関わらず EB 処置によって高度に ($p < 0.01$) 増加した。甲状腺、肝臓、腎臓及び子宮の相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に増加し、0.1 mg 投与群では DHPN 単独群に比し有意に ($p < 0.01$) 増加した。肝臓、腎臓及び子宮の相対重量は、DHPN 非処置群においても 0.1 mg 投与により有意に ($p < 0.01$) 増加した。現在、病理組織学的に検索中である。

【実験 14】下垂体相対重量は DHPN 処置に関わらず、EB 処置によって高度に ($p < 0.01$) 増加した。甲状腺相対重量は DHPN 処置群において、0.1 mg の EB 投与で有意に ($p < 0.01$) 増加した。肝臓及び腎臓の相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に有意に ($p < 0.01$) 増加し、DHPN 非処置群においても、それぞれ 0.1 mg 及び 0.02 mg 以上で有意に ($p < 0.01$) 増加した。現在、病理組織学的に検索中である。

【実験 15】雌雄ともに、甲状腺相対重量は第 1 群 (対照群) に比して第 2 群 (ヨード欠乏群) で有意に ($p < 0.001$) 増加し、第 4 群 (25%大豆 + ヨード欠乏群) では第 2 群に比較してさらに強く増加した。雌雄ともに、血清 T4 レベルは第 1 群に比して第 2 群および第 4 群で有意に ($p < 0.01$) 減少し、逆に血清 TSH レベルは第 1 群に比して第 2 群および第 4 群で有意に ($p < 0.05$ および $p < 0.01$) 増加し、特に第 4 群では高度に増加した。病理組織学的に、甲状腺濾胞上皮の腫瘍性病変は、第 2 群および第 4 群においてのみ認められ、腺腫は雄の第 2 群および第 4 群でそれぞれ 62.5% および 100%、雌の第 2 群および第 4 群で 14.3% および 90%、腺癌は雄の第 2 群および第 4 群でそれぞれ 25% および 66.7%、雌の第 4 群で 40% に観察された。

【実験 16】雌雄ともに、甲状腺相対重量には第 1 群～第 4 群において有意な群間差はみられなかった。同様に、血清 T4 および TSH レベル

についても、雌雄ともに、有意な群間差はみられなかった。病理組織学的に、20%～0.8% の大豆投与は、ヨード正常下では甲状腺組織の顕著な増殖促進を示さなかった。

【実験 17】下垂体細胞株 MtT/E-2 の増殖試験では、genistein は 10^{-8} M で有意な増殖促進活性を示したのに対し、nonylphenol は 10^{-6} M で有意に促進した。また、atrazine は 10^{-4} M まで活性はなかった。さらに、(ERE)₃-SV40-luc レポーターによるエストロゲン依存性転写活性化のアッセイ結果は、増殖アッセイとよく一致した。MtT/E-2 腫瘍形成試験では、250 ppm までの nonylphenol および 500 ppm までの atrazine は移植下垂体細胞腫瘍形成に影響しなかったが、genistein の 250 ppm 群で有意な生着期間の短縮が見られた。エストロゲン群においては下垂体重量が増加し、過形成となったが、nonylphenol、genistein および atrazine のいずれも下垂体の重量に影響を与えなかった。また、下垂体の *PTTG*mRNA 発現にも影響は見られなかった。血中プロラクチンレベルは、エストロゲン群で有意に上昇していたが、他のいずれの群でも有意な増加は観察されなかった。*PTTG* 遺伝子上流域のプロモーター活性に関して、-542/+43 で最大の基本転写活性があることが示された。また、エストロゲン受容体の存在下でエストロゲン依存的なこのプロモーターの転写活性化作用が示された。さらに、その応答は受容体の α 型 β 型に特異性があった。ラットエストロゲン受容体 α 遺伝子上流域-3155/-2100 およびその部分配列をもつレポーターは、下垂体細胞および乳ガン細胞において基本転写活性化能を示すことが示された。また、その転写活性に対する nonylphenol、genistein および atrazine の作用を検討したが有意な影響は観察されなかった。

【実験 18】MCF-7 細胞では 100 μ M の genistein 処理で、12 時間後、48 時間後、72 時間後でコントロールに比べて *cdc2* 活性は約 20～30% 低下を示した。全般的に genistein 処理によって *cdc2* 活性は低下傾向を示した。しかし逆に、MG63 細胞では 50 μ M の genistein 処理で、12 時間後ではコントロールに比べて *cdc2* 活性は約 50% まで低下したものの、24 時間、48 時間、72 時間後では、コントロールより約 50% 増加していた。

【実験 19】 MCF-7 細胞における 100 μ M の genistein 処理細胞とコントロール細胞の mRNA 発現解析の結果、genistein 処理によって mRNA の発現が上昇していると認められた遺伝子としては、*p21*、*Pim-2* があり、逆に mRNA の発現が低下していると認められた遺伝子としては、*Bcl-x*、*PCNA*、*c-fos* が観察された。次に MG63 細胞における 100 μ M の genistein 処理細胞とコントロール細胞の mRNA 発現解析の結果、genistein 処理によって mRNA の発現が上昇していると認められた遺伝子としては、*c-jun*、*p16*、*FADD*、*Pim-2*、*p53* があり、逆に mRNA の発現が低下していると認められた遺伝子はなかった。

【実験 20】 MCF-7 細胞において、100 nM、1 μ M、10 μ M、100 μ M の atrazine は細胞増殖への影響を示さなかった。Atrazine 濃度 1 mM の場合も検討を行ったが、medium 中で atrazine が析出してしまい測定を継続することが不可能であった。

D. 考察

食品中に存在する天然および合成の内分泌かく乱物質として、genistein、nonylphenol 及び atrazine を取り上げ、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用を同一の投与条件で検討した。

甲状腺発がんおよび及ぼす影響に関しては、平成 11 年度において、食品レベルの数十倍以下程度の genistein および nonylphenol の摂取は、雄ラットおよび卵巣摘除ラットを用いた甲状腺発がんに対して促進影響を及ぼさないことを既に報告した。今年度は、食品レベル～数十倍程度の atrazine も甲状腺発がんに対して何ら促進影響を及ぼさないことを明らかにした。一方、平成 11 年度において、卵巣摘除ラットに対する合成エストロゲン EB の 11 週間持続投与は、下垂体腺腫の誘発をはじめ諸臓器に対して著明なエストロゲン作用を示したが、DHPN 誘発甲状腺発がんにはほとんど影響を及ぼさないことを報告した。今年度はさらに長期間にわたる影響を検討するため、卵巣摘除ラットに DHPN 処置し、EB を 35 週間持続投与した結果、高用量 (0.1 mg 皮下埋植) 群のみに甲状腺、肝臓、腎臓及び子宮の相対重量増加がみられた。また、精巣摘除ラットに同様の条件で EB を 35 週間持続投与した結果、高用量 (0.1 mg 皮下埋植) 群の

みに甲状腺、肝臓及び腎臓の相対重量増加がみられた。したがって、エストロゲン作用による甲状腺発がん促進効果は、長期間にわたる持続的曝露を必要とし、高用量群のみに発現する現象と考えられた。

乳腺発がんおよび及ぼす影響に関しては、卵巣摘除・非摘除 SD ラットを用いた DMBA 誘発乳腺発がんモデルにおいて、弱いエストロゲン活性を示す genistein 及び nonylphenol は低用量群で乳腺腫瘍の評価パラメーターを一部増加させたがその用量依存性は明確でなく、genistein の高用量群ではむしろ抑制する傾向が認められた。Atrazine については、乳腺発がんに対する明らかな影響は現在のところ認められていない。一方、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子導入 SD ラットを用いた DMBA 誘発乳腺発がんは、E2 によって抑制されることが明らかとなり、genistein は E2 より弱い、同様に抑制作用を示した。Genistein による抑制作用がエストロゲン作用に起因するかについては、今後検証する予定である。現在までのところ、nonylphenol 及び atrazine による本トランスジェニックラットの乳腺発がんに対する明らかな影響は認められていない。

子宮発がんおよび及ぼす影響に関しては、ENU 誘発 *p53* (+/-) マウス子宮がんモデルを用いて、genistein、nonylphenol 及び atrazine を 26 週間投与した結果、いずれの投与でも子宮内膜肉腫の発生頻度に有意な増加は認められなかった。また、ENU 誘発 *rasH2* マウス子宮がんモデルにおいて、genistein 250ppm 投与群で子宮腺癌が増加する傾向が認められたが、今後、誘発された子宮腫瘍の細胞増殖活性などを精査して本物質に真の子宮癌促進作用があるか否かを確認する予定である。さらに、雌 ICR マウスに ENU を経膈的に直接子宮内に投与した後、atrazine と EE を混餌投与し、子宮腫瘍の発生に対する修飾作用を検討する実験を継続中であるが、現在までのところ明らかな影響は認められていない。

前立腺発がんおよび及ぼす影響に関しては、genistein 及び nonylphenol の影響を DMAB を用いるラット前立腺発がんモデルで検討する長期実験を実施し、前立腺を中心に病理組織学的に詳細な検討を行っているが、明らかな影響は現在のところ認められていない。また、atrazine

の影響を PhIP を用いるラット前立腺がんモデルで検討する長期動物実験が現在進行中である。

卵巣発がんに及ぼす影響に関しては、DMBA 誘発ラット卵巣がんモデルを用いて、genistein 及び nonylphenol を 50 週間投与した結果、両者とも卵巣発がんに対して抑制的に働くことが判明した。その作用機構に関して、誘発腫瘍のエストロゲン、プロゲステロン受容体の有無と細胞増殖能の変化を免疫染色で検討している。また、このモデルを用いて atrazine の発がん修飾効果を検討する動物実験が進行中であるが、現在までのところ明らかな影響は認められていない。加えて、老化マウスを利用した新しい卵巣発がんモデルでこれら内分泌かく乱作用物質の卵巣発がん修飾効果を検討する予定である。

ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、genistein 及び nonylphenol の発がん修飾作用を検討した結果、ともに肺腫瘍の発生のみを対照群に比較し有意に増加させた。これに関連して、細胞増殖能のマーカである BrdU 標識率及び酸化的 DNA 傷害のマーカである 8-OHdG 形成の増加が genistein 及び nonylphenol 投与肺組織において認められた。一方、肝前がん病変のマーカである GST-P 陽性肝細胞巢の形成は、genistein 及び nonylphenol 投与により有意に抑制された。

以上より、各種動物発がんモデルを用いて、食品中内分泌かく乱物質とされる genistein、nonylphenol 及び atrazine の修飾作用を検討した結果、genistein 及び nonylphenol の投与による明らかな促進影響はラット多臓器中期発がん性試験法における肺腫瘍の発生増加のみであった。両物質の投与によって肺組織の細胞増殖能や酸化的 DNA 傷害に関連するマーカが上昇したが、内分泌かく乱作用との関連は不明であり、ラット多臓器中期発がん性試験法そのものがスクリーニング試験であることから、肺を標的する動物モデルでの検証が必要と考えられる。その他の動物発がんモデルと被験物質との組み合わせの結果は、高用量の genistein が *rasH2* マウス子宮発がんに対して促進傾向を示した以外に、(現在まで) 影響なしまたは抑制(傾向)を示すものであった。

大豆の過剰摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの作用機序に関して、平成 11 年度にはフェノバルビタールやスルファジメトキシ

など他の甲状腺腫瘍プロモーターとの相乗作用を示さないこと、ヨード欠乏との相乗作用は 20% を超える高用量でのみ発現することを明らかにしてきた。また、その相乗作用に閾値の存在する可能性、関与する大豆成分はイソフラボンではない可能性を示してきた。今年度は、DHPN 誘発二段階甲状腺発がんモデルを用いて、大豆摂取とヨード欠乏の影響を検討した結果、相乗的に強い甲状腺発がんプロモーション作用を示すこと、ヨード非欠乏下では大豆摂取の影響はみられないことを明らかにした。

内分泌かく乱物質による発がん修飾機構に関して、下垂体腫瘍モデルにおいて、genistein、nonylphenol 及び atrazine の作用を検討した結果、genistein 及び nonylphenol はエストロゲン応答性細胞増殖活性を示したが、*in vivo* での作用を移植腫瘍形成を指標にみると 250 ppm genistein のみが促進作用を示した。Atrazine は *in vivo*、*in vitro* とも作用を示さなかった。また、下垂体腫瘍増殖に関わるがん遺伝子である *PTTG* 及びエストロゲン受容体 α のプロモーターについて解析した結果、今回検討した物質はいずれもこれらの遺伝子発現に影響を与えないことが明らかとなった。さらに、genistein はがん細胞の増殖を細胞周期の G_2/M 期で抑制すること、cDNA アレイ法による解析において、genistein 投与により *FADD* 遺伝子、*Pim-2* 遺伝子の発現が誘導されていることが明らかとなった。一方、atrazine の細胞増殖への影響を検討したが、高濃度においても増殖に影響を与えないことが判明した。

E. 結論

食品中の内分泌かく乱物質として、genistein、nonylphenol 及び atrazine を取り上げ、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用を同一の投与条件で検討した結果、ラット多臓器中期発がん性試験法において、genistein 及び nonylphenol の投与による肺腫瘍発生の促進がみられた。しかし、内分泌かく乱作用との関連は不明であり、本試験法がスクリーニング試験であることから、結論には肺発がんモデルでの検証を要するものと考えられた。

一方、エストロゲン活性による発がん促進作用はあまり強いものではなく、長期間にわたる高濃度曝露を要するものと考えられた。また、

genistein 及び nonylphenol はエストロゲン応答性細胞増殖活性を示すが、*in vivo*では高濃度でのみ促進作用を示すこと、genistein は *FADD* 遺伝子、*Pim-2* 遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。さらに、大豆摂取とヨード欠乏による甲状腺発がん機序の一部は、プロモーション作用として説明できることを明らかにした。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Furukawa F, Hirose M. Lack of modification by environmental estrogenic compounds of thyroid carcinogenesis in ovariectomized rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 966-972, 2000.
- 2) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Furukawa F, Hirose M. Lack of modifying effects of environmental estrogenic compounds on the development of thyroid proliferative lesions in male rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 899-905, 2000.
- 3) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 103-108, 2001.
- 4) Ikeda T, Nishikawa A, Son H-Y, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 390-395, 2001.
- 5) Hirose M, Nishikawa A, Shibutani, M, Mitsumori K. Environmental agents, endocrine disrupting chemicals and rat thyroid carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* 14: 71-77, 2001.
- 6) Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T., Terada, M., Tsuda H. Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to *N*-methyl-*N*-nitrosourea mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21: 243-249, 2000.
- 7) Ota, T., Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Yamamoto, F., Matsuoka, Y., Ochiya, T., Sekiya, T., Terada, M., Akaza, H., Tsuda H. Transgenic rats carrying copies of the human c-Ha-ras proto-oncogene exhibit enhanced susceptibility to *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21: 1391-1396, 2000.
- 8) Tsuda H, Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T., Terada, M. High susceptibility or transgenic rats carrying the human c-Ha-ras proto-oncogene to chemically-induced mammary carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 9120: 1-10, 2001.
- 9) Mitsumori K, Onodera, H., Shimo, T., Yasuhara, K., Takagi, H., Koujitani, K., Hirose M, Maruyama, C. and Wakana, S.: Rapid induction of Uterine tumors with *p53* point mutations in heterozygous *p53*-deficient CBA mice given a single intraperitoneal administration of *N*-ethyl-*N*-nitrosourea. *Carcinogenesis* 21: 1039-1042. 2000.
- 10) Mitsumori K, Shimo, T., Onodera, H., Takagi, H., Yasuhara, K., Tamura, T., Aoki, Y., Nagata, O. and Hirose M: Modifying effects of ethinylestradiol but not methoxychlor on *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous *p53* deficient CBA mice. *Toxicol. Sci.* 58: 43-49. 2000.
- 11) Ueda, M., Mitsumori K, Onodera, H., Takagi, H., Yasuhara, K., Takizawa, T. and Hirose M: Lack of modifying effects of bisphenol A and roasted/ground soybean (Kinako) on *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous *p53* deficient CBA mice. *J. Toxicol. Pathol.* (in press)
- 12) Imaida K, Ogawa, K., Takahashi, S., Ito, T., Yamaguchi, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, K., Ito, N., Shirai, T.: Delay of DNA-adduct repair and severe toxicity in xeroderma pigmentosum group A gene (XPA) deficient mice treated

- with 2-amino-1-methyl- 6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhIP). *Cancer Lett.*, 150: 63-69, 2000.
- 13) Yaono, M., Tamano, S., Mori, T., Kato, K., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Lobe specific effects of testosterone and estrogen on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced rat prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 150: 33-40, 2000.
 - 14) Ito, N., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. *Mutation Res.*, 462: 209-217, 2000.
 - 15) Shirai, T., Takahashi, S., Cui, L., Futakuchi, M., Kato, K., Tamano, S., Imaida, K.: Experimental prostate carcinogenesis—rodent models. *Mutation Res.*, 462: 219-226, 2000.
 - 16) Kitano, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Sukata, T., Shizusawa, M. and Fukushima, S. : Morphological changes in silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) related to proliferative activity in glutathione *S*-transferase placental form (GST-P) positive foci of rat liver. *J. Toxicol. Pathol.*, 13: 261-264, 2000.
 - 17) Sugihara, K., Kitamura, S., Sanoh, S., Ohta, S., Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito, A. Metabolic activation of the proestrogens *trans*-stilbene and *trans*-stilbene oxide by rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167: 46-54, 2000.
 - 18) Maruyama, S., Fujimoto, N., Asano, K., Ito A., Usui, T. Expression of estrogen receptor α and β mRNAs in prostate cancers treated with leuprorelin acetate. *Euro Urol*, 38: 635-639, 2000.
 - 19) Fujimoto, N., Effects of endocrine disruptors on the pituitary gland. *J. Toxicol. Pathol.* (in press)
 - 20) 藤本成明：下垂体細胞を用いた試験系：今井他（編）内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法、シュプリンガーフェアラーク東京（2000）
2. 学会発表
- 1) 池田尚子, 西川秋佳, 孫 和永, 中村英明, 宮内 慎, 今沢孝喜, 木村修一, 広瀬雅雄: 大豆過剰摂取とヨード欠乏との相乗的甲状腺発がん促進効果、第 59 回日本癌学会 (2000. 10 横浜)
 - 2) 孫 和永, 西川秋佳, 池田尚子, 今沢孝喜, 中村英明, 古川文夫, 広瀬雅雄: 卵巣摘出ラットを用いた DHPN 甲状腺腫瘍誘発モデルにおける内分泌攪乱物質の影響、第 59 回
 - 3) Son, H-Y., Nisikawa, A., Yamagishi, M., Okazaki, K., Imazawa, T., Furukawa, F. and Hirose, M. : Synergistic effects of caffeine with iodine deficiency on the development of thyroid proliferative lesions in rats、第 17 回日本毒性病理学会 (2001. 1 淡路)
 - 4) Nishikawa, A., Ikeda, T., Son, H-Y., Imazawa, T., Kimura, S. and Hirose, M. : Synergistic promotion effects of excess soybean and deficient iodine on DHPN-induced thyroid tumorigenesis in rats. 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2001. 3 New Orleans)
 - 5) 高木久宜, 三森国敏, 小野寺博志, 安原加壽雄, 田村啓, 瀧澤保, 広瀬雅雄: ラット乳腺二段階発癌モデルを用いた内分泌攪乱化学物質の乳腺発癌修飾作用、第 59 回日本癌学会 (2000.10 横浜)
 - 6) 鳥山-馬場弘靖、山本扶美、大西隆仁、津田洋幸: ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける初期変化について、第 89 回日本病理学会 (2000. 4 大阪)
 - 7) 内藤暁宏、鳥山-馬場弘靖、朝元誠人、津田洋幸: ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける自然発生腫瘍の頻度と ras 遺伝子の突然変異、第 89 回日本病理学会総会 (2000. 4 大阪)
 - 8) 深町勝巳、高須賀信夫、松岡洋一郎、津田洋幸: ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける DMBA-TPA 皮膚塗布二段階発がんモデル、第 89 回日本病理学会 (2000. 4 大阪)
 - 9) 鳥山-馬場弘靖、山本扶美、大西隆仁、津田洋幸: ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける初期変化について、第 47 回日本実験動物学会 (2000. 4 徳島)
 - 10) 津田洋幸、深町勝巳、内藤暁宏、高須賀信夫、鳥山-馬場弘靖、松岡洋一郎: ヒト正常

- 型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いたがん化学予防物質の早期検索法の試み、第 7 回日本がん予防研究会 (2000. 7 淡路)
- 11) 内藤暁宏、鳥山-馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸：ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける大腸、前立腺、乳腺に対する発がん感受性の解析、第 7 回日本がん予防研究会 (2000. 7 淡路)
 - 12) 深町勝巳、松岡洋一郎、高須賀信夫、津田洋幸：ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラット(Hras128)における 17 β estradiol および 4-n-Octylphenol の乳腺発がんへの影響、第 7 回日本がん予防研究会 (2000. 7 淡路)
 - 13) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山-馬場弘靖、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離と機能解析、第 10 回乳癌基礎研究会 (2000. 8 倉敷)
 - 14) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山-馬場弘靖、北中千史、口野嘉幸、津田洋幸：ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離と機能解析、第 15 回発がん病理研究会 (2000. 8 穂高)
 - 15) 深町勝巳、松岡洋一郎、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離、第 59 回日本癌学会 (2000. 10 横浜)
 - 16) 内藤暁宏、鳥山-馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける乳腺部上皮・肉腫腫瘍の組織発生の解析、第 59 回日本癌学会 (2000. 10 横浜)
 - 17) 鳥山-馬場弘靖、太田智則、落谷孝広、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの MNU による膀胱発がん感受性について、第 59 回日本癌学会 (2000. 10 横浜)
 - 18) Tsuda, H. Establishment of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats for short-term screening of carcinogens and chemopreventive agents. XXIII International Congress of the International Academy of Pathology (2000. 10 Nagoya)
 - 19) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山-馬場弘靖、津田洋幸：ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離、第 53 回日本細胞生物学会 (2000. 10 福岡)
 - 20) 内藤暁宏、鳥山-馬場弘靖、大西隆仁、津田洋幸：雄ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける乳腺、大腸、前立腺発癌感受性の解析、第 17 回日本疾患モデル学会 (2000. 11 東京)
 - 21) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山-馬場弘靖、津田洋幸：ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラット由来腫瘍細胞に高発現する Ras の標的候補遺伝子 RNLRR-3 の単離、第 17 回日本疾患モデル学会 (2000. 11 東京)
 - 22) Tsuda, H. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats to short-term environmental carcinogen detection method. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP) (2000. 11 Pataya)
 - 23) 大西隆仁、韓範錫、津田洋幸：ヒトプロト型 c-Ha-ras transgenic (Hras128)ラットにおける乳癌非標的発がん物質による乳腺発がん、第 17 回日本毒性病理学会 (2001. 1 淡路)
 - 24) Han, B. S., Takasuka, N., Kunimoto, T., Takahashi, T., Tsuda, H. Inhibitory effect of genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced mammary tumor development in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats. 第 17 回日本毒性病理学会 (2001. 1 淡路)
 - 25) 鳥山-馬場弘靖、山本扶美、外岩戸尚美、津田洋幸：ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの経胎盤発がん感受性、第 17 回日本毒性病理学会 (2001. 1 淡路)
 - 26) 松岡洋一郎、鳥山-馬場弘靖、深町勝巳、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性についての解析、第 17 回日本毒性病理学会 (2001. 1 淡路)
 - 27) 田中卓二、甲野裕之：ノニルフェノール (NP)、ゲニスタイン (GS) のラット卵巣発がんに対する修飾効果、第 90 回日本病理学会 (2001. 4 東京)
 - 28) 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、

- 加国雅和、星学、土井賢一郎、須方督夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討、第7回日本がん予防研究会（2000.7 淡路）
- 29) 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、加国雅和、須方督夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討、第59回日本癌学会（2000.10 横浜）
- 30) 清家則孝、鰐淵英機、三橋誠、小川元女、市原敏夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討、第17回日本毒性病理学会（2001.1 淡路）
- 31) Seike, N., Wanibuchi, H., Nishikawa, T., Ogawa, M., Kaneko, M., Fukushima, S.: Modifying effects of endocrine disrupting chemicals on multiorgan carcinogenesis in F344 rats. 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2001.3 New Orleans)
- 32) 藤本成明, 丸山聡, 浅野耕助, 伊藤明弘：ラット下垂体における *pttg* のエストロゲンによる調節、第73回日本内分泌学会（2000 京都）
- 33) 浅野耕助, 藤本成明, 丸山聡, 碓井亜, 伊藤明弘：ラット下垂体のエストロゲン受容体調節における2種のプロモーターの関与について、第73回日本内分泌学会（2000 京都）
- 34) 丸山聡, 藤本成明, 浅野耕助, 碓井亜, 伊藤明弘：ヒト前立腺癌におけるエストロゲン受容体 α , β mRNAの発現、第88回日本泌尿器科学会（2000 札幌）
- 35) 藤本成明, 丸山聡, 伊藤明弘：エストロゲンによるラット下垂体腫瘍化と *pttg* 発現、第59回日本癌学会総会（2000.10 横浜）
- 36) 丸山聡, 藤本成明, 伊藤明弘, 浅野耕助, 碓井亜：前立腺のホルモン依存性増殖とエストロゲンレセプターの発現、第59回日本癌学会（2000.10 横浜）
- 37) Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito, A. Opposite roles of ER α and ER β on estrogen receptor - AP-1 mediated transactivation. Keystone Symposia (2000 Co)
- 38) Fujimoto N., Yin H., Maruyama S., Asano K., Ito A. Strain difference in estrogen regulation of *pttg* (pituitary tumor transforming gene) in the rat pituitary gland. International Congress of Endocrinology (2000 Sydney)
- 39) Maruyama S., Fujimoto N., Asano K., Ito A., Usui T. Regulation of estrogen receptor α and β in rat prostate (2000 Sydney)
- 40) 藤本成明, 殷 宏, 丸山聡, 伊藤明弘, 浅野耕助：ラット下垂体における *PTTG* (Pituitary Tumor Transforming Gene) のエストロゲン(E2)による調節、第23回日本分子生物学会（2000 神戸）
- 41) 藤本成明, 丸山聡, 浅野耕助, 伊藤明弘, 殷 宏：ゲニスタインおよびノニルフェノールによるエストロゲン応答性ラット下垂体腫瘍増殖作用、第17回日本毒性病理学会（2001 淡路）

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
平成 12 年度分担研究報告書

食品中内分泌かく乱物質等の甲状腺発がん修飾作用に関する研究
分担研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨： エストロゲン活性による甲状腺発がん促進作用の用量相関性を検討するため、去勢ラットを用いた二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、動物当たり 0.1 mg、0.02 mg および 0.004 mg の合成エストロゲン β -estardiol 3-benzoate を皮下埋植した結果、雌雄ともに 0.1 mg 群のみに有意な甲状腺重量の増加がみられた。このことは、極めて高濃度のエストロゲン曝露下においてのみ甲状腺発がんが促進されることを示唆する。一方、昨年度は食品中に存在する天然および合成の内分泌かく乱物質として、genistein および nonylphenol を取り上げ、環境濃度レベルでは甲状腺発がん修飾作用のないことを報告したが、今年度は atrazine を被験物質として、ラット二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、500 ppm、50 ppm および 5 ppm の3段階の用量で混餌投与した結果、現在までのところ、肉眼的に顕著な影響はみられていない。この成績は、大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol と同様に、食品中に存在する濃度レベルの atrazine は甲状腺発がんを促進しないことを示唆する。また、大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの機序について、二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、大豆摂取とヨード欠乏を組み合わせて与えた結果、大豆摂取はヨード欠乏と相乗的に作用して強く甲状腺発がんを促進した。この成績から、その発がん機序の少なくとも一部はプロモーション作用として説明できることが明らかとなった。

A. 研究目的

環境中に存在する内分泌かく乱化学物質の多くは性ホルモンの働きを示すが、逆にホルモンに対して拮抗的に働くこともあり、その作用は複雑である。ヒトが日常摂取している食品中には多くの phytoestrogen が存在しており、その毒性や催奇形性に加えて発がん修飾作用を詳細に検討することは、これら物質の安全性評価上益々重要となってきた。実験的に、植物中および合成のエストロゲンはラットの乳腺発がんを促進したり逆に抑制することが報告されている。一方、過剰の大豆摂取はラット甲状腺発がんを促進することが知られており、大豆に含まれるイソフラボンに phytoestrogen の作用があることとの関連が示唆されているが、その作用機序は十分に解明されているとは言えない。

このように、内分泌環境のかく乱は発がんの重要な修飾要因と考えられるが、食品中の内分泌かく乱物質の中でその発がん修飾作用が証明されている物質は少数にすぎない。本研究班の目的は、食品中に含まれる内分泌かく乱物質による内分泌器官その他の臓器に対する発がん修

飾作用を総合的に比較検討し、さらにその修飾機構がホルモン作用に基づくものか、あるいはそれ以外の作用によるものかを明らかにし、ヒト発がんへの危険度評価を行うことにある。食品中に存在するホルモン活性物質による発がん修飾の影響を明らかにすることは食品衛生上急務であり、その成果によりヒトがんの予防・阻止のための基礎的資料を得ることが期待できる。

そこで、平成 11 年度では、食品中に存在する天然および合成の内分泌かく乱物質として genistein および nonylphenol を取り上げ、同一投与条件により諸臓器の発がんおよび影響を検討する本研究班全体のプロジェクトの一環として、甲状腺における発がん修飾作用についてラット二段階発がんモデルを用いて検討した結果、両物質ともに食品中に存在する程度の低濃度では甲状腺発がんの促進作用を示さないことが明らかとなった。また、大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの機序について検討した結果、大豆粉末の過剰摂取はヨード欠乏と特異的に相乗作用してラットの甲状腺を増殖させること、フェノバルビタールやスルファ

ジメトキシシンなど他の甲状腺腫瘍プロモーターとの相乗効果を示さないこと、ヨード欠乏との相乗作用は 20%を超える高濃度でのみ発現することおよび大豆イソフラボン自体にはヨード欠乏との顕著な甲状腺増殖作用がないことを明らかにした。

平成 12 年度は、去勢ラットを用いた二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、 β -estradiol 3-benzoate (EB)を皮下埋植し、エストロゲンによる甲状腺発がん促進作用の用量反応性について検討した。また、同一投与条件により諸臓器の発がんおよび影響を検討する本研究班全体のプロジェクトの一環として、食品中の内分泌かく乱作用を有する汚染物質 atrazine を取り上げ、甲状腺発がんおよび修飾作用について、ラット二段階発がんモデルを用いて検討した。さらに、大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの作用機序を追究するため、二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、大豆摂取とヨード欠乏を組み合わせて与え、促進効果の有無について検討した。

B. 研究方法

<I. 去勢ラット甲状腺発がんおよび合成エストロゲンの影響>

実験 1： Fig. 1 に示すように、5 週齢時に卵巣摘除を施した 6 週齢の F344 雌ラット 60 匹を 6 群に分け、第 1 群～第 4 群（各群 10 匹）に甲状腺発がんイニシエーション処置として、*N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)を 2400 mg/kg の用量で単回皮下投与し、1 週間後から EB を 0.1 mg（第 1 群）、0.02 mg（第 2 群）、0.004 mg（第 3 群）および 0 mg（第 4 群）の用量で皮下埋植した。DHPN 処置をせずに、第 5 群には 0.1 mg の EB を皮下埋植し、第 6 群は無処置対照群とした。実験開始 36 週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

実験 2： Fig. 2 に示すように、5 週齢時に精巣摘除した 6 週齢の F344 雄ラット 60 匹を 6 群に分け、第 1 群～第 4 群（各群 10 匹）に甲状腺発がんイニシエーション処置として、DHPN を 2400 mg/kg の用量で単回皮下投与し、1 週間後から EB を 0.1 mg（第 1 群）、0.02 mg（第 2 群）、0.004 mg（第 3 群）および 0 mg（第 4 群）の用量で皮下埋植した。DHPN 処置をせずに、第 5 群には 0.1 mg の EB を皮下埋植し、第 6 群は無

処置対照群とした。実験開始 36 週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

<II. ラット甲状腺発がんおよび atrazine の影響>

実験 3： Fig. 3 に示すように、6 週齢の F344 雄ラット 120 匹を 8 群に分け、第 1 群～第 4 群（各群 20 匹）および第 5 群～第 6 群（各群 10 匹）に、甲状腺発がんイニシエーション処置として、DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与し、1 週間後から 500 ppm（第 1 群）、50 ppm（第 2 群）、5 ppm（第 3 群）および 0 ppm（第 4 群）の用量の atrazine、500 ppm の atrazine と 5 ppm の tamoxifen（第 5 群）または 5 ppm の tamoxifen（第 6 群）を混餌投与した。DHPN 処置をしなかった第 7 群には 500 ppm の atrazine のみを混餌投与し、第 8 群には基本食 CRF-1 のみを与えた。なお、大豆イソフラボンの影響を除外するため、通常は添加する大豆成分を CRF-1 に加えなかった。実験開始 24 週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

<III. ラット甲状腺発がんおよび大豆摂取とヨード欠乏の相互作用>

実験 4： Fig. 4 に示すように、雌雄の 6 週齢 F344 ラット各 40 匹を 4 群に分け、DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与した。1 週間後から、第 1 群にはカゼイン中に含まれる可能性のあるヨードの影響を除外するために蛋白成分を 20%グルテンとした基本食 AIN-93G を、第 2 群にはさらにそれにヨードを添加しない餌を 11 週間与えた。第 3 群には蛋白成分を 20%脱脂大豆とした基本食 AIN-93G を、第 4 群にはさらにそのヨード欠乏食を同期間与えた。実験開始 12 週後に、血清ホルモン値の定量、臓器重量の測定および病理組織学的検索を実施した。

実験 5： Fig. 5 に示すように、雌雄の 6 週齢 F344 ラット各 40 匹を 4 群に分け、DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与した。1 週間後から、脱脂大豆を 20%（第 1 群）、4%（第 2 群）、0.8%（第 3 群）および 0%（第 4 群）の用量で 11 週間混餌した。基本食として、蛋白成分をグルテンとした AIN-93G を用いた。実験開始 12 週後に、血清ホルモン値の定量、臓器重量の測定および病理組織学的検索を実施した。

倫理面への配慮として、動物愛護の観点から、

必要最小限の動物数を用いるよう十分な検討と準備を行った。動物飼育は摂氏 23 度前後、湿度約 60% に保たれた施設内にて、飲料水・飼料を適正に投与した。屠殺はエーテル深麻酔下、腹部大動脈から脱血し、動物に対する苦痛を可能な限り少なくした。

C. 研究結果

<I. 去勢ラット甲状腺発がんおよび合成エストロゲンの影響>

実験 1： 摂餌量は EB 処置でやや増加したが、各群間に顕著な差異はなく、被験物質の摂取量は投与量によく相関した。体重増加は、DHPN 処置の有無に関わらず EB 処置によって有意に ($p < 0.01$) 抑制された (Fig. 6)。下垂体相対重量は DHPN 処置に関わらず EB 処置によって高度に ($p < 0.01$) 増加した (Fig. 7)。Fig. 8 に示すように、甲状腺相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に増加し、0.1 mg 投与群では DHPN 単独群に比し有意に ($p < 0.01$) 増加した。肝相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に有意に ($p < 0.01$) 増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に ($p < 0.01$) 増加した。腎相対重量も同様に、DHPN 処置群において、EB の用量相関性に有意に ($p < 0.01$) 増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に ($p < 0.01$) 増加した。子宮相対重量も全く同様に、DHPN 処置群において、EB の用量相関性に高度に ($p < 0.01$) 増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により高度に ($p < 0.01$) 増加した。現在、病理組織学的に検索中である。

実験 2： 摂餌量は EB 処置でやや増加したが、各群間に差異はなく、被験物質の摂取量は投与量によく相関した。体重増加は、DHPN 処置の有無に関わらず、0.1 mg および 0.02 mg の EB 処置によって有意に ($p < 0.01$) 抑制された (Fig. 9)。下垂体相対重量は DHPN 処置に関わらず、EB 処置によって高度に ($p < 0.01$) 増加した (Fig. 10)。Fig. 11 に示すように、甲状腺相対重量は DHPN 処置群において、0.1 mg の EB 投与で有意に ($p < 0.01$) 増加した。肝相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に有意に ($p < 0.01$) 増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に ($p < 0.01$) 増加した。腎相対重量も同様に、DHPN 処置群において、EB の用量相関性に 0.02 mg 以上で有意に ($p < 0.01$) 増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に

($p < 0.01$) 増加した。現在、病理組織学的に検索中である。

<II. ラット甲状腺発がんおよび atrazine の影響>

実験 3： 摂餌量は tamoxifen を投与した第 5 群および第 6 群において顕著に減少した (Fig. 12)。それに伴い、第 5 群および第 6 群に強い体重増加抑制がみられ ($p < 0.01$)、atrazine の 500 ppm 投与 (第 1 群) でも軽度であるが有意な ($p < 0.01$) 体重増加抑制が認められた (Fig. 13)。体重増加抑制の程度は、第 5 群 (tamoxifen + atrazine 投与群) で最も高度であった。Table 1 に示すように、相対臓器重量は tamoxifen を投与した第 5 群および第 6 群で、有意な脳重量、腎重量および精巣重量の増加がみられ、第 5 群では精巣上体重量の増加が認められた。その他臓器の相対重量には有意な群間差を認めなかった。現在、病理組織学的に検索中である。

<III. ラット甲状腺発がんおよび大豆摂取とヨード欠乏の相互作用>

実験 4： 雌雄ともに、甲状腺相対重量は第 1 群 (対照群) に比して第 2 群 (ヨード欠乏群) で有意に ($p < 0.001$) 増加し、第 4 群 (25%大豆 + ヨード欠乏群) では第 2 群に比較してさらに強く増加した (Fig. 14)。雌雄ともに、血清 T4 レベルは第 1 群に比して第 2 群および第 4 群で有意に ($p < 0.01$) 減少し、逆に血清 TSH レベルは第 1 群に比して第 2 群および第 4 群で有意に ($p < 0.05$ および $p < 0.01$) 増加し、特に第 4 群では高度に増加した (Figs. 15 & 16)。病理組織学的に、甲状腺濾胞上皮の腫瘍性病変は、第 2 群および第 4 群においてのみ認められ、腺腫は雄の第 2 群および第 4 群でそれぞれ 62.5% および 100%、雌の第 2 群および第 4 群で 14.3% および 90%、腺癌は雄の第 2 群および第 4 群でそれぞれ 25% および 66.7%、雌の第 4 群で 40% に観察された (Table 2)。

実験 5： 雌雄ともに、甲状腺相対重量には第 1 群～第 4 群において有意な群間差はみられなかった (Fig. 17)。同様に、血清 T4 および TSH レベルについても、雌雄ともに、有意な群間差はみられなかった (Figs. 18 & 19)。病理組織学的に、20%～0.8% の大豆投与は、ヨード正常下では甲状腺組織の顕著な増殖促進を示さなかった。

D. 考察

レベルについても、雌雄ともに、有意な群間差はみられなかった(Figs. 18 & 19)。病理組織学的に、20%~0.8%の大豆投与は、ヨード正常下では甲状腺組織の顕著な増殖促進を示さなかった。

D. 考察

エストロゲン活性による甲状腺発がん促進の用量相関性を検討するため、雌雄の去勢ラットを用いた二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、動物当たり 0.1 mg、0.02 mg および 0.004 mg の合成エストロゲン EB を皮下埋植した結果、雌雄ともに最高用量の 0.1 mg 群のみに有意な甲状腺重量の増加がみられた。このことは、極めて高濃度のエストロゲン曝露下においてのみ甲状腺発がんが促進されることを示し、食品中に存在する程度の低い濃度の内分泌かく乱化学物質がエストロゲン活性によって甲状腺発がん促進作用を惹起する可能性は低いことを示唆する。観察期間を 12 週間とした昨年度の実験では、卵巣摘除ラットにおいて、合成エストロゲン EB は 0.5 mg の用量で下垂体腺腫の誘発をはじめ諸臓器に対して著明なエストロゲン作用を示したが、甲状腺発がんにはほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、観察期間を 36 週間とした今回の成績と考え合わせると、エストロゲン様作用に基づく甲状腺発がん促進効果は、あるとしてもあまり強いものではなく、長期間にわたる持続的な曝露を要するものと考えられる。

農薬として使用される atrazine はラットの乳腺発がんを促進する可能性が指摘されているが、抗エストロゲン作用をもち、標的細胞に対するエストロゲン刺激活性を抑制することが知られている。今年度は atrazine を被験物質として、DHPN 誘発ラット二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、500 ppm、50 ppm および 5 ppm の 3 段階の用量で混餌投与したが、現在までのところ甲状腺発がんに対する顕著な影響はみられていない。このことは、昨年度に同一の実験モデルを用いて実施した大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol と同様に、食品中に存在する濃度レベルの atrazine は甲状腺発がんを促進しないことを示唆する。現在実施している病理組織学的検索の結果により確定する予定である。

一方、昨年度の実験成績において、大豆粉末

の過剰摂取はヨード欠乏と相乗作用してラットの甲状腺濾胞上皮の増殖を誘発することが確認された。その作用機序を追究するため、二段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、大豆摂取とヨード欠乏を組み合わせるとした結果、大豆摂取はヨード欠乏と相乗的に作用して強く甲状腺発がんを促進することが明らかとなった。このことは、大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの一部は発がんプロモーションとして理解できることを示している。ヨードが欠乏していない条件では、二段階甲状腺発がんモデルにおいて、ポストイニシエーション期の大豆摂取は発がんに影響しないことから、大豆による甲状腺発がん促進作用にはヨード欠乏が必須であることを示唆する。ヨード欠乏の条件下で大豆の摂取が甲状腺発がんを促進した事実は、特にヨード欠乏地域における大豆食品摂取の安全性評価にとって重要な知見であるが、昨年度の成績では 20%を超える大量摂取でのみ観察される事象であることが判明しており、閾値の存在する可能性が強く示唆されることから、たとえヨード欠乏地域においても、それを超える大量摂取でなければ大豆食品摂取はあまり問題とならないと思われる。しかし、大豆の過剰摂取がヨード欠乏と特異的に相乗作用を示す機序については今後さらに追究する必要がある。

E. 結論

エストロゲン活性による甲状腺発がん促進作用はあまり強いものではなく、長期間にわたる高濃度曝露を要するものと考えられた。また、大豆摂取とヨード欠乏による甲状腺発がんの機序の一部は、プロモーション作用として説明できることを明らかにした。さらに、atrazine は甲状腺発がんを促進しない可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Furukawa F, Hirose M. Lack of modification by environmental estrogenic compounds of thyroid carcinogenesis in ovariectomized rats pretreated with *N*-bis(2-

hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). Jpn. J. Cancer Res. 91: 966-972, 2000.

2) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Furukawa F, Hirose M. Lack of modifying effects of environmental estrogenic compounds on the development of thyroid proliferative lesions in male rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). Jpn. J. Cancer Res. 91: 899-905, 2000.

3) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. Jpn. J. Cancer Res. 92: 103-108, 2001.

4) Ikeda T, Nishikawa A, Son H-Y, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation. Jpn. J. Cancer Res. 92: 390-395, 2001.

5) Hirose M, Nishikawa A, Shibutani, M, Mitsumori, K. Environmental agents, endocrine disrupting chemicals and rat thyroid carcinogenesis. J. Toxicol. Pathol. 14: 71-77, 2001.

2. 学会発表

1) 池田尚子, 西川秋佳, 孫 和永, 中村英明, 宮内 慎, 今沢孝喜, 木村修一, 広瀬雅雄: 大豆過剰摂取とヨード欠乏との相乗的甲状腺発がん促進効果 第59回日本癌学会総会(2000. 10)

2) 孫 和永, 西川秋佳, 池田尚子, 今沢孝喜, 中村英明, 古川文夫, 広瀬雅雄: 卵巣摘出ラットを用いた DHPN 甲状腺腫瘍誘発モデルにおける内分泌攪乱物質の影響 第59回日本癌学会総会 (2000. 10)

3) Son, H-Y., Nisikawa, A., Yamagishi, M., Okazaki, K., Imazawa, T., Furukawa, F. and Hirose, M. : Synergistic effects of caffeine with iodine deficiency on the development of thyroid proliferative lesions in rats. 第17回日本毒性病理学会 (2001. 1)

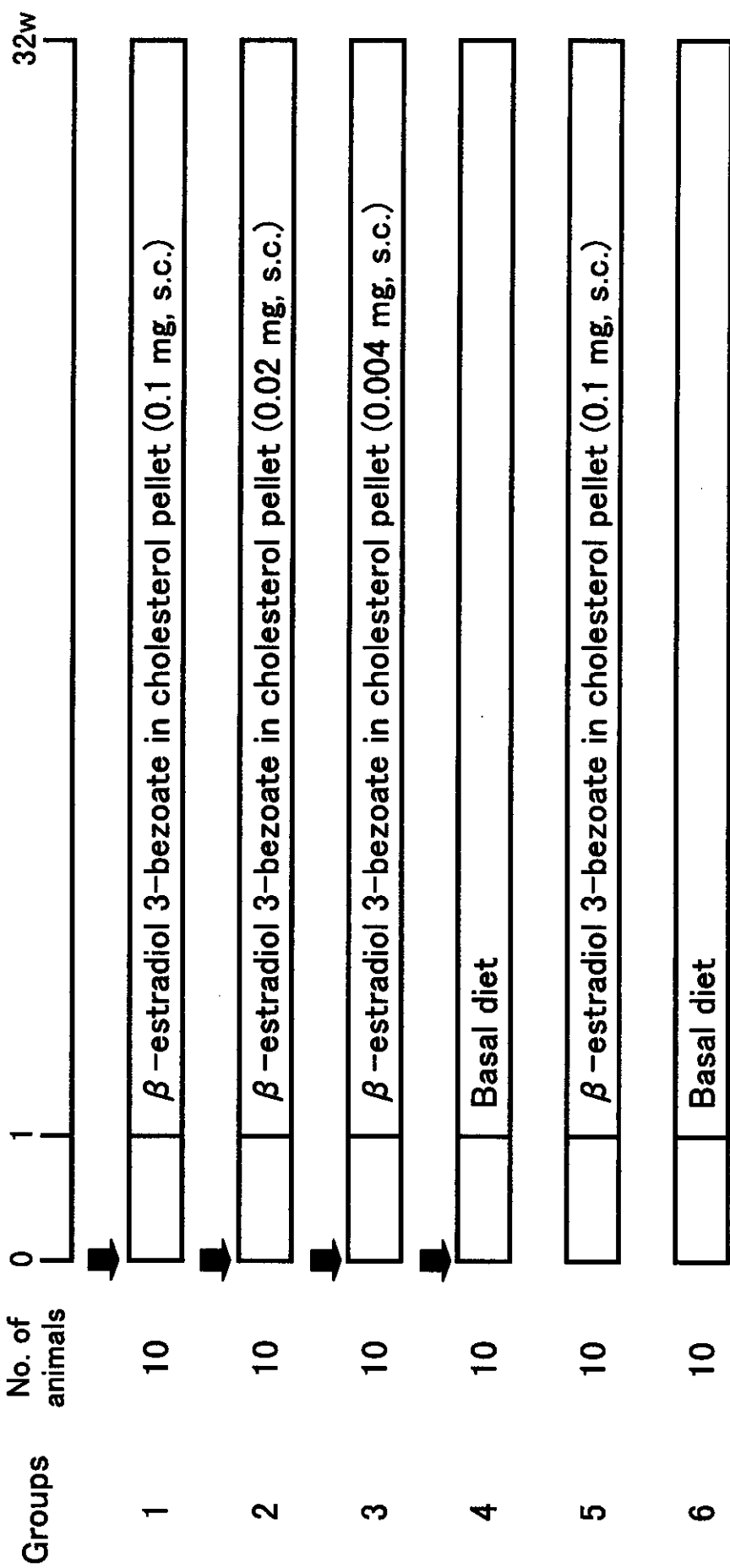
4) Nishikawa A., Ikeda, T., Son, H-Y., Imazawa, T., Kimura, S. and Hirose, M. : Synergistic promotion effects of excess soybean and deficient iodine on DHPN-

induced thyroid tumorigenesis in rats. 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2001. 3)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

OODV



↓: DHPN 2400 mg/kg, BW, s.c.

実験動物: F344雌性ラット、生後6週令

Fig.1 実験デザイン