

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

乳腺腫瘍の発生及び増殖に対する内分泌かく乱物質の影響を検討する目的で以下の実験を行った。雌の SD ラットに 50 mg/kg 体重の 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) を強制経口投与し、12 週まで観察した時点で腫瘍 (+)・卵摘 (+)、腫瘍 (-)・卵摘 (+) の各群に群分けし、それぞれ 0 (対照群)、25 および 250 ppm の Genistein (GS) を混餌投与した。48 週で全動物を屠殺し、乳腺腫瘍の発生頻度、個数および大きさについて検討した。その結果、腫瘍 (+)・卵摘 (+) 処置した GS の 25ppm 群では、腫瘍体積が対照群に比較して約 3 倍、250ppm 群では約 1/8 の値をそれぞれ示したがいずれも有意差は認められなかった。現在同様の実験系で 5、50 及び 500ppm の Atrazine(AT) を混餌投与した実験を行っているが、現時点で AT による影響は認められていない。また、DMBA と 1,2-dimethylhydrazine (DMH) で発がんイニシエーションを行った雌 SD ラットに nonylphenol (NP) を 25 ないし 250ppm、38 週間混餌投与し、乳腺腫瘍および大腸腫瘍の発現について検討した。さらに、イニシエーションを行わない対照群も設けた。イニシエーション処理群では、NP の 25ppm 投与群で対照群に比較して腫瘍体積がおおよそ 3 倍増加したが用量依存性は明確でなかった。非イニシエーション動物では NP の 25ppm 投与群で乳腺腫瘍の発生がおおよそ半数の動物に観察されたが用量依存性を欠く変化であった。

A. 研究目的

本実験は、植物性エストロジェンとして知られているイソフラボンの genistein (GS)、合成フェノール系でエストロジェン作用を持つ nonylphenol (NP) および有機塩素系農薬でエストロジェン作用を持つ Atrazine (AT) のラット乳腺発がんの発生あるいは増殖について実験的に検討し、これら弱いエストロジェン作用を持つ内分泌かく乱物質のヒト乳がん発生に対する危険度を評価するための資料とすることを目的としている。なお前年度は、今

回行う実験方法の妥当性を証明するため、強いエストロジェン作用を持つ β -estradiol 3-benzoate (EB) および弱いエストロジェン作用を持つ Methoxychlor (MXC) を投与 (EB は皮下埋植、MXC は混餌投与) し、EB は乳腺腫瘍の増殖および発生を促進するのに対し、MXC はこれらを抑制することを見出している。

B. 研究方法

【実験 1】7 週令の SD 系雌ラットに 50mg/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 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 250ppm genistein (GS) (日本理化学薬品株式会社) の混餌投与を行った。また、DMBA を投与しないで卵摘と GS 投与のみを行った対照群も設けた (図 1)。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 2】5 週令の SD 系雌ラットに 40mg/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、50mg/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 250ppm nonylphenol (NP) (東京化成株式会社) の混餌投与を行った。発がん物質を投与しないで、基礎食あるいは NP のみを投与した対照群も設定した (図 2)。乳腺腫瘍については実験 1 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 3】7 週令の SD 系雌ラットに 50mg/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 500ppm Atrazine (AT) (和光純薬株式会社) の混餌投与を行った。

また、DMBA を投与しないで卵摘と AT 投与のみを行った対照群も設けた (図 3)。乳腺腫瘍については実験 1 および 2 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。

(倫理面への配慮)

卵巣摘除術はエーテル麻酔下で、屠殺はエーテル麻酔下大動脈からの脱血により行い、動物に与える苦痛をできる限り少なくした。

C. 研究結果

【実験 1】最終体重に群間の差は認められなかった。(表 1)。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 から 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が、GS の 25ppm 群では最終屠殺時で対照群の約 3 倍、250ppm 群では対照群の約 1/8 倍の値をそれぞれ示した。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 (表 2、図 4-6)。剖検時、肝臓、腎臓、子宮、副腎の重量に GS 投与による影響は認められなかった (表 1)。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 GS 投与に起因する変化は認められなかった (表 3)。

【実験 2】最終体重は各群間で有意な差はみられなかった (表 4)。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、NP の 25ppm 投与群では腫瘍体積は増加し最終屠殺時には有意差は認められなかったものの対照分の約 3 倍の値を示した。DMBA-DMH 非投与群では、NP の 25ppm 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(表 5、図 7-9)。剖検時、肝臓、腎臓、卵巣、子宮、副腎の重量に NP 投与による変化は認められなかった(表 4)。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(表 5)。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(表 6)。DMBA-DMH 非投与群では NP の 25ppm 投与群で乳腺腫瘍が 40%の動物に観察された(表 5)。

【実験 3】

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 AT 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 AT 投与による影響は認められていない。

D. 考察

実験 1 では卵摘により内因性エストロジェンの影響を除去した状態で GS を投与した結果、投与開始時に腫瘍の認められた動物の低用量群で平均腫瘍体積の増

加傾向が、高用量群では減少傾向がそれぞれ認められた。また、投与開始時に腫瘍の認められなかった動物およびイニシエーション処理していない動物では GS による変化は認められなかった。GS は若齢期ラットの乳腺の発達および分化を促進して乳腺の化学発癌物質に対する感受性を減少させる他、乳腺腫瘍のプロモーション期に対しても抑制的に作用することが報告されているが、妊娠ラットへの投与によりその F1 では化学発癌物質による乳腺腫瘍の感受性を亢進させる可能性が報告されている。また卵巣摘出マウスに移植したヒト乳癌由来細胞(MCF-7)に対しエストロジェニックに作用してその増殖を促進する他、卵巣摘出したラットの大腿骨に対して低用量ではエストロジェニックに作用する一方、高用量ではそのような作用を示さないと報告されている。したがって今実験で認められた用量依存性を伴わない変化は、GS 投与によって誘発された変化である可能性を現時点で否定するのは尚早であろう。

実験 2 ではイニシエーション処理した動物の低用量群で乳腺腫瘍の体積の増加が観察された他、イニシエーション処理していない動物の低用量群でも乳腺腫瘍の発生頻度、多発性、体積の増加が観察された。NP は noble rat の乳腺に対して細胞増殖を促進するが、乳腺発癌との関連性について検討した報告は少なく、今実験でみられた用量依存性を伴わない変化はたして NP 投与に起因するか否か、今後慎重に検討する必要がある。

実験 3 では投与を開始後約 4 週間が経

過したが、AT による明らかな作用は現在のところ認められていない。AT は SD ラットを用いた 2 年間の発癌性試験では乳腺腫瘍発生頻度の増加することが報告されているが、F344 ラットではそのような変化は報告されていない。この理由の一つとして、AT は雌 SD ラットに対して特異的にその性周期を延長させ、相対的に内因性エストロゲン暴露時間を延長することで乳腺腫瘍の発生を促進させるものと考えられている。しかしながら AT 自身の乳腺腫瘍に対するプロモーションあるいはプログレッション作用についての検討はなされておらず、本実験によってこれらの点が解明されるものと期待される。

ある種の内分泌攪乱化学物質については低用量域でのみホルモン攪乱作用を発現し、高用量域では発現しないいわゆる「低用量仮説」が唱えられているが、本作用の再現性を疑問視する説もあり、現時点では本仮説の信憑性については不明な点が多い。今回実験 1 および実験 2 において GS および NP は上述した通り、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、これら物質が今回用いた DMBA 誘発乳腺発癌モデルにおいてなんらかの修飾作用を示す可能性は、今実験で得られたデータのみでは、現時点において完全に否定できないものと考えられる。

E. 結論

ラット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 GS および

NP 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、GS の高用量群ではむしろ抑制する傾向が認められた。AT 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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 回日本癌学会総会（2000.10 横浜）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

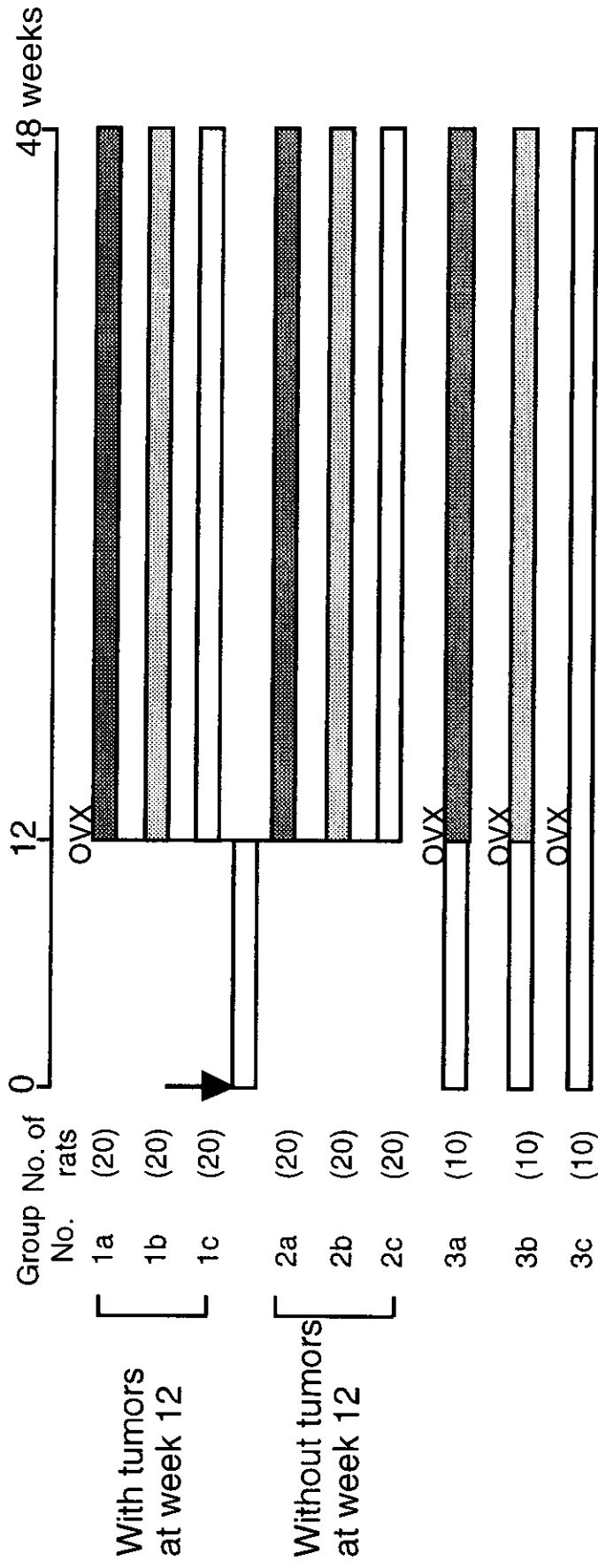
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



Animals: Virgin SD female rats, 7 weeks old

↓ : DMBA, 50 mg/kg b.w., i.g.

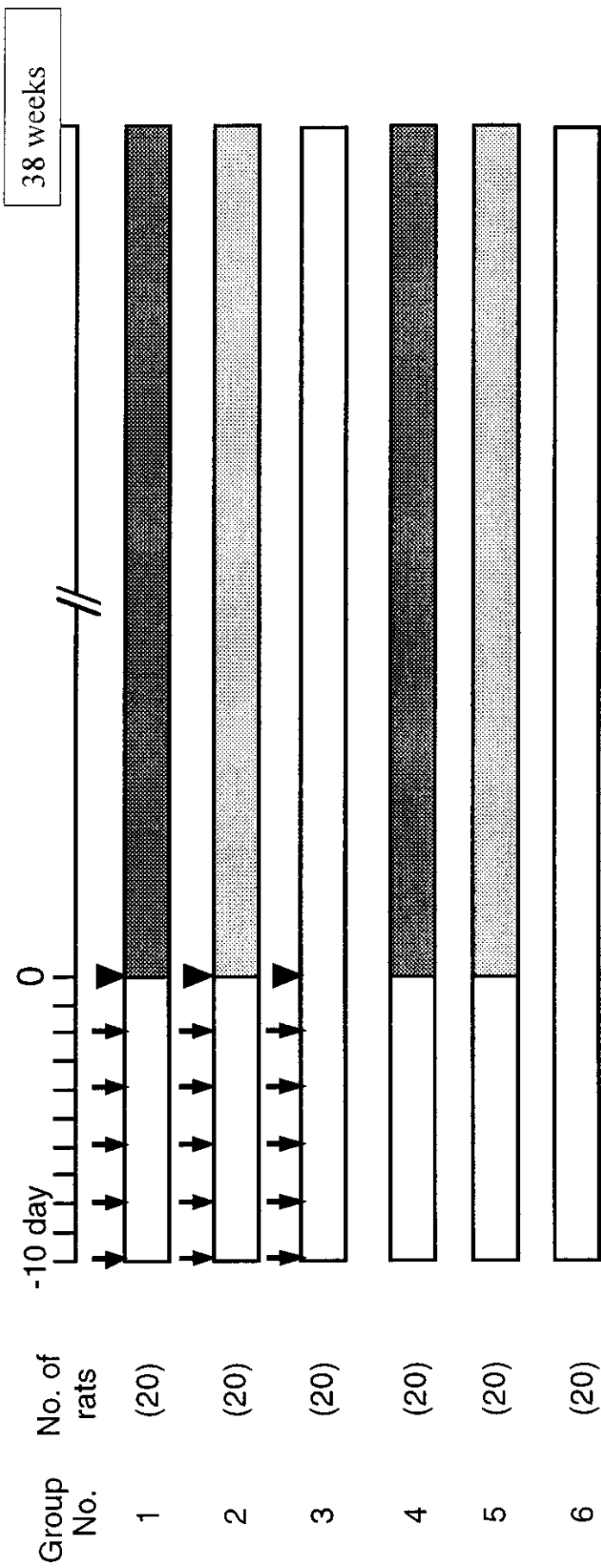
OVX : Ovariectomy

■ : Genistein, 250 ppm in diet

▨ : Genistein, 25 ppm in diet

□ : Basal diet (soybean free)

☒ 1 Experimental Protocol



Animals: Virgin SD female rats, 5 weeks old

↓ : DMH, 40 mg/kg b.w., s.c.

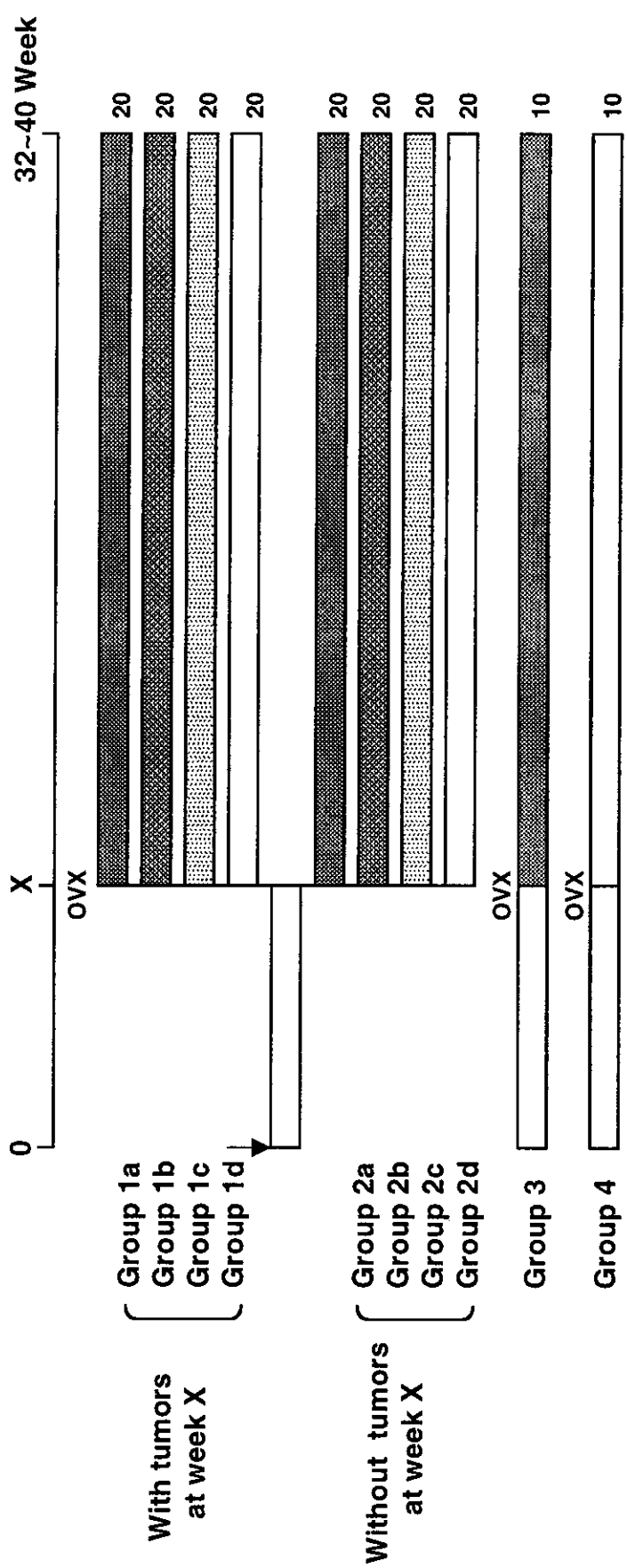
▼ : DMBA, 50 mg/kg b.w., i.g.

■ : Nonylphenol (NP), 250 ppm in diet

■ : Nonylphenol (NP), 25 ppm in diet

□ : Basal diet (soybean free)

Figure 2 Experimental Protocol



Animals : Virgin Sprague Dawley female rats, 7 weeks old

▼ : DMBA, 50mg/kg body weight, i.g.

X : Week when the incidence of palpable mammary tumors reached at 50%

OVX : Ovarectomy

Figure 3 Experimental Protocol

图 6 绝经后妇女在雌激素治疗中可触及肿瘤的体积 (mm³)

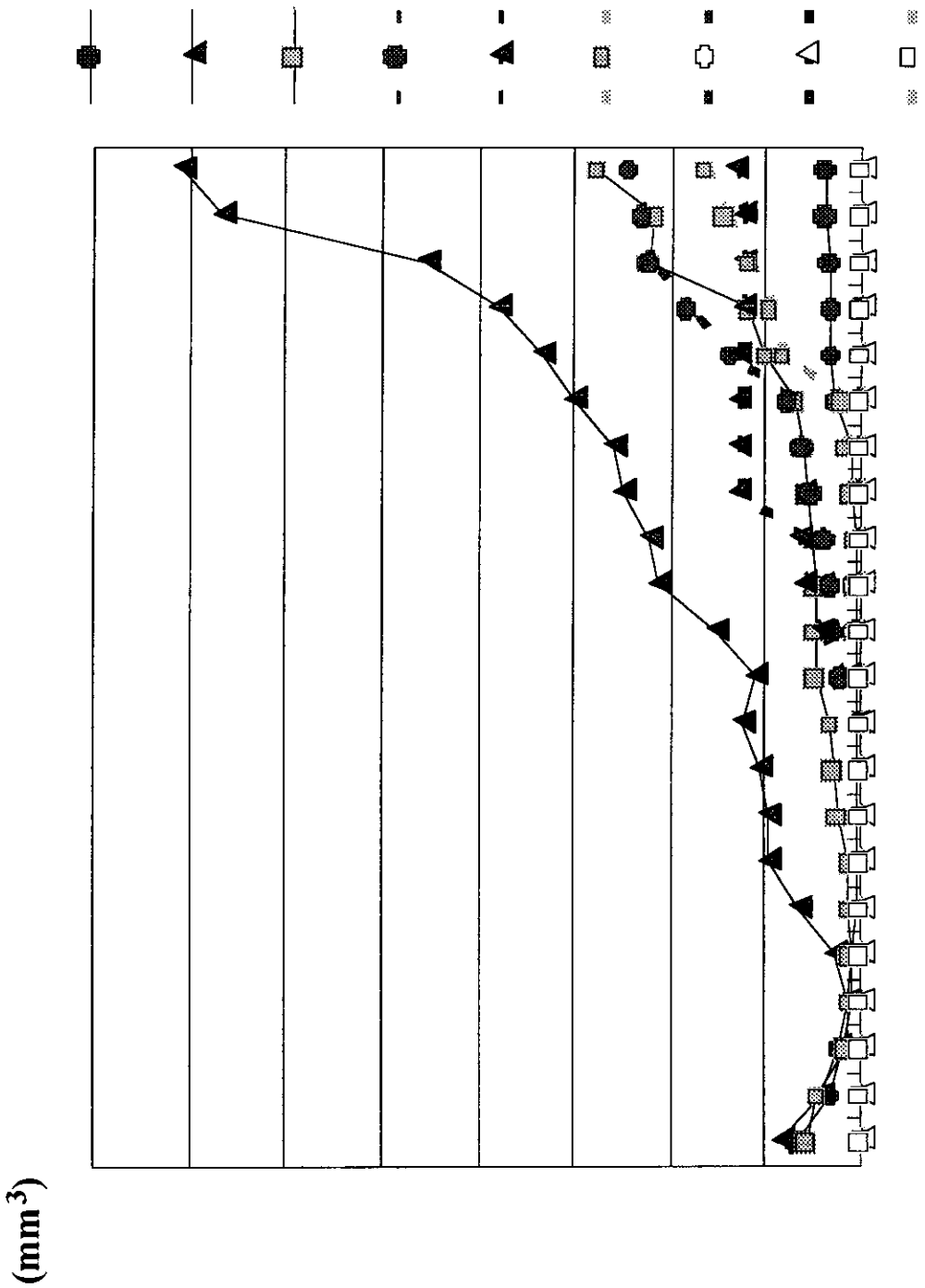


图 8 Multiplicity of palpable tumors in nonylphenol treated rats

No./rat

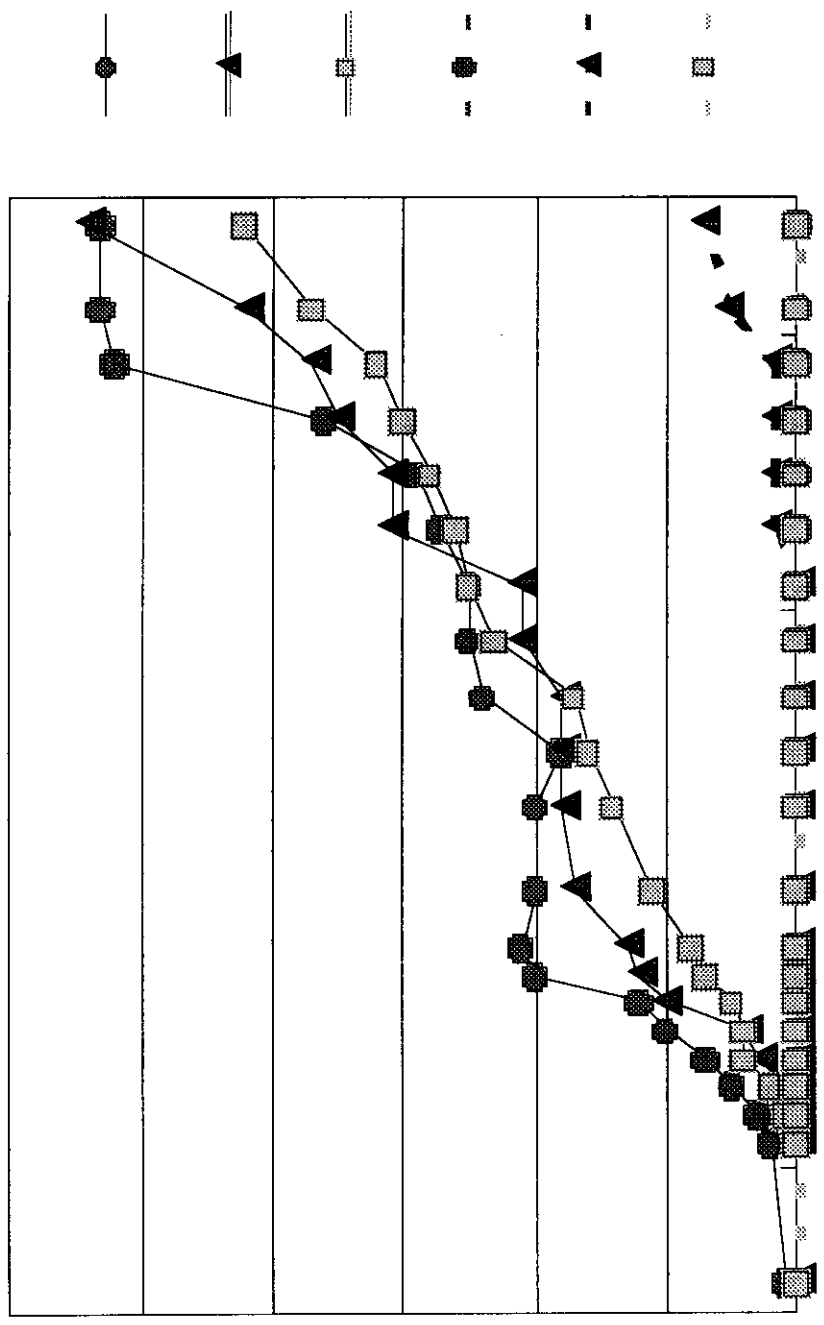


Figure 9 Volume of palpable tumors in nonylphenol treated rats
(mm³)

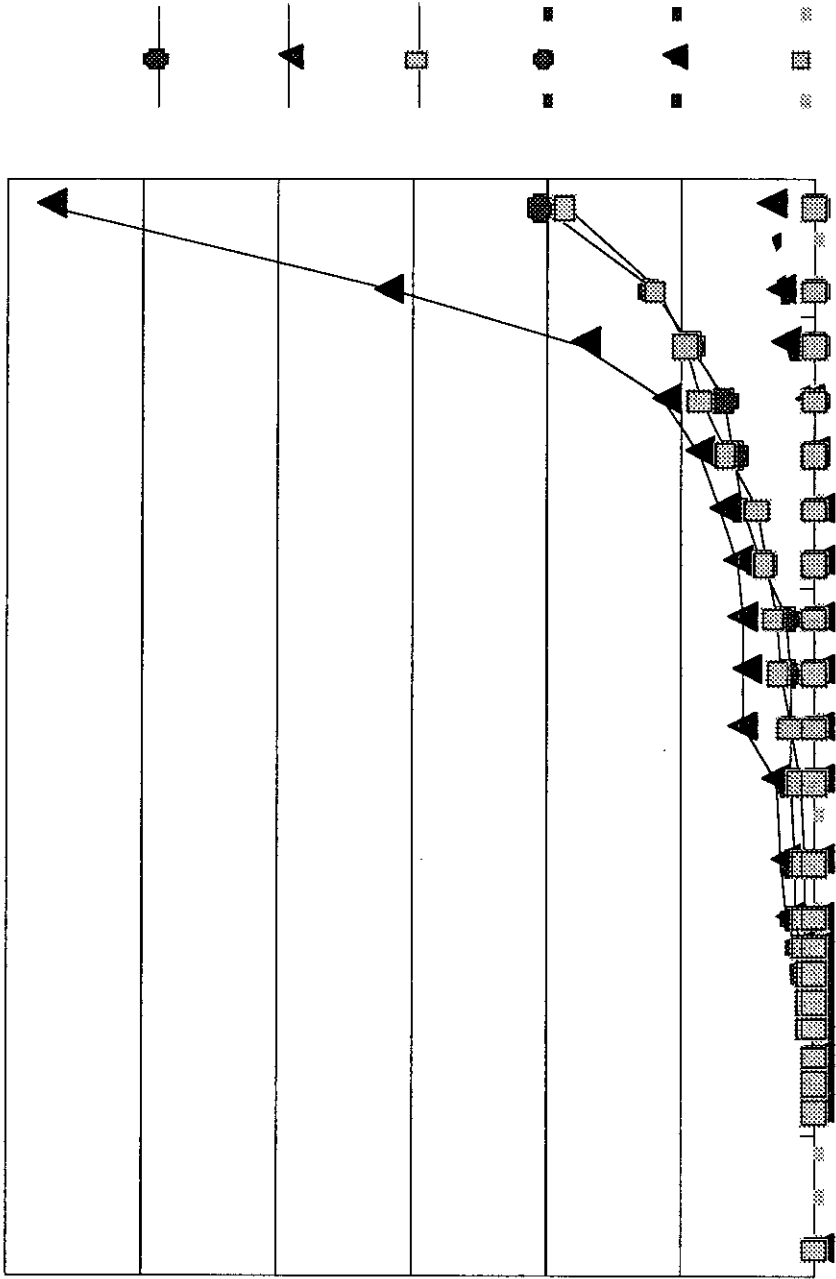


表 1 Final body weights and relative organ weights in genistein treated ovariectomized rats

DMBA	with tumor at week 12	Dose (ppm)	No. of rats	Final body weight (g)	Relative organ weight			
					Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Uterus (mg/g)	Adrenals (mg/100g)
(+)	(+)	0	20	429.1±35.0	24.1±3.8	5.0±0.5	0.4±0.1	17.9±9.1
(+)	(+)	25	21	408.3±47.1	27.1±6.1	5.4±1.0	0.4±0.3	17.5±5.8
(+)	(+)	250	21	435.1±65.3	23.5±4.4	5.0±0.9	0.4±0.3	17.7±12.2
(+)	(-)	0	18	452.6±43.9	22.6±3.4	4.8±0.5	0.4±0.1	13.4±3.9
(+)	(-)	25	18	422.8±69.0	22.9±3.5	5.2±0.9	0.4±0.1	15.0±6.0
(+)	(-)	250	18	446.6±50.0	22.9±3.7	4.8±0.7	0.4±0.3	13.9±4.6
(-)	(-)	0	10	460.4±51.1	22.3±3.0	4.9±0.5	0.6±0.6	12.3±3.0
(-)	(-)	25	9	428.1±73.4	22.7±4.5	5.3±1.0	1.2±0.9	14.9±4.1
(-)	(-)	250	9	448.0±74.3	21.4±2.6	4.9±0.5	0.8±0.5	12.9±2.3

表2 Regression rate, incidence, number and volume of DMBA-induced mammary tumors in genistein treated ovariectomized rats

DMBA	with tumor at week 12	Dose (ppm)	No. of rats	No. of regressed tumor after OVX (%)	Incidence (%)	Number (No./rat)	Volume (cm ³ /rat)
(+)	(+)	0	21	20/29 (69)	8 (38)	0.5±0.8	5.5±12.5
(+)	(+)	25	21	17/21 (71)	12 (57)	0.7±0.9	14.2±19.0
(+)	(+)	250	21	19/23 (81)	5 (25)	0.6±1.6	0.8±2.5
(+)	(-)	0	18	-	3 (17)	0.3±0.7	3.3±9.0
(+)	(-)	25	18	-	5 (28)	0.4±1.0	2.6±10.5
(+)	(-)	250	18	-	5 (28)	0.6±1.2	4.9±11.8
(-)	(-)	0	10	-	0	0	0
(-)	(-)	25	9	-	0	0	0
(-)	(-)	250	9	-	1 (11)	0.1±0.3	0.1±0.2

**表 3 Histopathological findings of DMBA-induced mammary tumors in
genistein treated ovariectomized rats**

DMBA	with tumor at week 12	Dose (ppm)	No. of rats	Benign		Carcinoma	
				Incidence (%)	No./rat	Incidence (%)	No./rat
(+)	(+)	0	21	2 (10)	0.1±0.3	7 (33)	0.4±0.6
(+)	(+)	25	21	2 (10)	0.1±0.3	11 (52)	0.6±0.7
(+)	(+)	250	21	1 (5)	0.1±0.2	4 (19)	0.5±1.6
(+)	(-)	0	18	1 (6)	0.1±0.2	4 (22)	0.2±0.7
(+)	(-)	25	18	2 (11)	0.1±0.3	3 (17)	0.3±1.0
(+)	(-)	250	18	1 (6)	0.1±0.5	5 (28)	0.5±0.9
(-)	(-)	0	10	0	0	0	0
(-)	(-)	25	9	0	0	0	0
(-)	(-)	250	9	0	0	1 (11)	0.1±0.3

Benign : Adenoma, Fibroadenoma, Fibroma

**表 4 Final body weights and relative organ weights in
nonylphenol treated rats**

DMBA- DMH	Dose (ppm)	No. of rats	Final body weight	Relative organ weight					
				Liver (mg/g)	Kidneys (mg/g)	Uterus (mg/g)	Ovaries (mg/100g)	Adrenals (mg/100g)	
(+)	0	20	323.1±43.4	31.4±5.8	7.6±2.3	2.0±0.8	59.5±14.5	22.3±6.3	
(+)	25	20	350.0±57.2	33.0±4.2	7.6±2.4	1.9±0.6	80.6±73.8	28.8±10.2	
(+)	250	20	346.6±56.9	30.0±8.6	7.5±14.6	2.0±0.7	60.0±5.8	23.6±7.5	
(-)	0	11	353.6±23.6	28.4±2.8	6.4±0.5	2.0±0.4	58.6±19.7	19.4±3.7	
(-)	25	11	360.8±39.7	28.0±4.7	6.1±0.8	2.0±0.7	62.9±16.4	18.9±7.5	
(-)	250	11	352.4±45.9	30.3±2.7	6.0±0.6	2.0±0.6	60.2±15.6	18.1±2.8	

表5 Incidence, volume, and histopathological findings of DMBA/DMH-induced mammary tumors in nonylphenol treated rats

DMBA-DMH	Dose (ppm)	No. of rats	Total		Benign		Carcinoma		Volume/rat (cm ³)
			Incidence (%)	No./rat	Incidence (%)	No./rat	Incidence (%)	No./rat	
(+)	0	20	19(95)	4.1±3.0	11(55)	0.9±1.4	19(95)	3.2±2.7	9.4±13.6
(+)	25	20	18(90)	6.0±5.7	13(65)	1.8±2.3	18(90)	4.2±4.0	28.4±57.3
(+)	250	20	19(95)	5.9±4.1	16(80)	1.8±1.7	16(80)	4.1±3.2	10.2±15.4
(-)	0	11	0	0	0	0	0	0	0
(-)	25	11	5(46) *	0.4±0.5**	4(45)	0.3±0.5*	1(9)	0.1±0.3	1.7±9.8
(-)	250	11	0	0	0	0	0	0	0

Benign : Adenoma, Fibroadenoma, Fibroma *:p<0.05, **:p<0.01

表6 Incidence, volume, and histopathological findings of DMBA/DMH-induced colon tumors in nonylphenol treated rats

DMBA- DMH	Dose (ppm)	No. of rats	Adenocarcinoma		
			Incidence (%)	No./rat	Volume/rat (mm ³)
(+)	0	20	8(40)	0.6±1.1	40.0±80.1
(+)	25	20	9(45)	1.2±1.5	45.0±114.5
(+)	250	20	5(25)	0.9±1.2	11.3±20.9
(-)	0	11	0	0	0
(-)	25	11	0	0	0
(-)	250	11	0	0	0

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

遺伝子改変動物を用いた内分泌かく乱物質の発がんリスク評価に関する研究

分担研究者 津田洋幸 国立がんセンター研究所 化学療法部 部長

研究要旨 内分泌かく乱物質の発がん修飾作用を乳腺発がん高感受性ヒトプロト型 c-Ha-ras トランスジェニックラットを用いて評価した。食品中のエストロゲン作用物質の genistein および環境中に存在する nonylphenol について検索した。陽性対照に 17β -estradiol (E2) を選んだ。50 日齢時に 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を胃内投与し、翌日より genistein または nonylphenol をそれぞれ 0、25 および 250ppm 基礎食中加えて雌は 12 週、雄は 20 週まで投与した。その結果、E2 は用量依存的に腫瘍発生の抑制作用を示し、genistein も程度は弱いと同様の抑制作用を示した。対照の野生型でも抑制傾向は見られたが有意では無かった。nonylphenol は現在実験経過中である。以上から、この動物において E2 と genistein は発がん抑制要因として作用した。またこのモデルがエストロゲン作用物質の中期評価系としてと有用である可能性が示された。

A. 研究目的

内分泌環境のかく乱物質への曝露は発がんの重要なリスク因子であるが、内分泌かく乱物質の発がん性あるいは発がん修飾作用の証明されている物質はごく少数にすぎない。その理由は被検物質の発がん性を低容量でも鋭敏に検出し得る *in vivo* 実験系がないことが一因である。本研究では、我々が作成した乳腺発がん高感受性トランスジェニックラットを用いて食品中の分泌かく乱物質等の乳腺に対する発がん・発がんプロモーションあるいは発がん抑制作用を明らかにし、さらに内分泌環境のかく乱物質の発がん修飾作用を確実に評価出来る鋭敏な実験系を確立することにある。

B. 研究方法

50 日齢の雌雄の Tg ラットに 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を 25mg/kg 胃内投与し、翌日および 60 日目に陽性対照として 17β -estradiol (E2) を一匹あたり 0、0.01、0.1 および 1mg 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 25mg/kg 胃内投与し、翌日より genistein または nonylphenol を 0、25 および 250ppm 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。

C. 研究結果

E2 投与では、乳腺腫瘍（腺腫+腺がん）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）。以上から、本トランスジェニックラットでは E2 は乳腺発がんを抑制することが明らかとなり、このラットはエストロゲン作用物質の *in vivo* アッセイ系として応用出来る可能性が見いだされた。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。