

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ールで実験経過中である。

#### D. 考察

我々の作成したヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットは生後 50 日齢雌に MNU や DMBA の 1 回投与後、僅か 8~12 週間で全例に乳がんが多発し発がん高感受性が極めて高いことが分かってきた。このラットを用いれば低用量であっても、比較的短期間に種々の物質の乳腺発がん修飾作用についてもを検索できると考えた。本研究によってエストロゲン作用物質の陽性対照として選んだ E2 は、本トランスジェニックラットの乳腺発がんを強力に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発がん修飾作用の *in vivo* アッセイ系として応用出来ることが明らかとなった。さらに被検物質の genistein は E2 より弱いと同様に抑制作用を示した。genistein はほかの実験系にて乳腺や他の臓器に発がん抑制作用を示すことが見いだされているが、この結果がエストロゲン作用に起因するかについては、今後他のいくつかの環境内分泌かく乱物質について検証が必要である。

#### E. 結論

本トランスジェニックラットの乳腺発がんは E2 によって抑制することが明らかとなり、この傾向は野生型でも見られたものの、程度は遙かに弱く有意ではなかった。したがってこのラットはエストロゲン作用物質の発がん修飾作用の *in vivo* アッセイ系として応用出来ることが明らかとなった。被検物質の genistein は E2 より弱い、同様に抑制作用を示した。Genistein によるこの結果がエストロゲン作用に起因するかについては、今後他のいくつかの環境内分泌かく乱物質について検証する予定である。

#### F. 健康危険情報

エストロゲンと genistein の乳腺発がん抑制作用が示された。前者は促進することが予測されたが逆の結果であった。野生型でも同様の結果であることから、高用量では乳腺発がんを抑制する可能性がある。

る。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Krutovskikh, V. K., Troyanovsky, S. M., Piccoli, C., Tsuda, H., Asamoto, M. and Yamasaki, H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth *in vivo*. *Oncogene*, 19: 505-513 (2000).
- 2) Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T., Terada, M. and Tsuda, H. Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to *N*-methyl-*N*-nitrosourea mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(2):243-249 (2000).
- 3) Ota, T., Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Yamamoto, F., Matsuoka, Y., Ochiya, T., Sekiya, T., Terada, M., Akaza, H. and 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(7):1391-1396 (2000).
- 4) Tsuda, H., Sekine, K., Takasuka, N., Toriyama-Baba, H. and Iigo, M. Prevention of colon carcinogenesis and carcinoma metastasis by orally administered bovine lactoferrin in animals. Flohé, L., Niki, E., Whelan, J. (eds.) In: *Bio Factors*, IOS Press, Amsterdam, vol: 12, pp: 83-88 (2000).
- 5) Tsuda, H., Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T. and Terada, M. High susceptibility of transgenic rats carrying the human c-Ha-ras proto-oncogene to chemically-induced mammary carcinogenesis. *Mut. Res.*, 9120: 1-10 (2001).

##### 2. 学会発表

- 1) 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 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)
- 2) 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、大阪、(2000 年 4 月)
- 3) 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 回日本病理学会総会、大阪、(2000 年 4 月)
  - 4) 鳥山一馬場弘靖、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総会、徳島、(2000 年 5 月)
  - 5) 津田洋幸、深町勝巳、内藤暁宏、高須賀信夫、鳥山一馬場弘靖、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、淡路島、(2000 年 7 月)
  - 6) 内藤暁宏、鳥山一馬場弘靖、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、淡路島、(2000 年 7 月)
  - 7) 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 $\beta$  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、淡路島、(2000 年 7 月)
  - 8) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、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、倉敷、(2000 年 8 月)
  - 9) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、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、穂高郡、(2000 年 8 月)
  - 10) 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 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
  - 11) 内藤暁宏、鳥山一馬場弘靖、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 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
  - 12) 鳥山一馬場弘靖、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 回日本癌学会総会、横浜、(2000 年 10 月)
  - 13) Tsuda, H. Establishment of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats for short-term screening of carcinogens and chemopreventive agents. International Congress of the International Academy of Pathology, Nagoya, (October 2000)
  - 14) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、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、福岡、(2000 年 10 月)
  - 15) 内藤暁宏、鳥山一馬場弘靖、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、東京、(2000 年 11 月)
  - 16) 松岡洋一郎、深町勝巳、鳥山一馬場弘靖、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、東京、(2000 年 11 月)
  - 17) 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), Pataya, (November 2000)
  - 18) 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、淡路島、  
(2001 年 1 月)

- 19) Han, B. S., Takasuka, N., Kunimoto, T.,  
Takahashi, T. and 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、  
淡路島、(2001 年 1 月)
- 20) 鳥山一馬場弘靖、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、淡路島、(2001  
年 1 月)
- 21) 松岡洋一郎、鳥山一馬場弘靖、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、  
淡路島、(2001 年 1 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

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）  
分担研究報告書

食品中内分泌かく乱物質等の子宮内膜発がん修飾作用に関する研究  
分担研究者 三森 国敏 農工大家畜病理学教室 教授

研究要旨：p53 遺伝子片側アレルをノックアウトした雌 CBA マウス[雌 p53 (+/-)CBA マウス]に ENU 120mg/kg を一回腹腔内投与し、1 週後からゲニステイン (25 および 250ppm)、ノニルフェノール (25 および 250ppm)、アトラジン (400ppm) を 26 週間混餌投与した。その結果、ゲニステイン、ノニルフェノールやアトラジンの投与群では ENU 単独群に比べ、子宮内膜肉腫の発生頻度に有意な差は認められなかった。また、我々は、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したマウス (rash2 マウス) に ENU を投与することにより肺腫瘍や子宮内膜異型過形成・癌の発生が増強することを見出したことから、この rash2 マウスに ENU を投与し、一週間後よりゲニステイン(25 および 250ppm)、ノニルフェノール(25 および 250ppm)、メトキシクロール(1000ppm)を 23~26 週間混餌投与した。その結果、ゲニステインの 250ppm 投与群で子宮腺癌が増加する傾向が認められ、メトキシクロール投与群ではその子宮癌の発生は抑制された。現在、雌 ICR マウスに ENU(50mg/kg)を経腔的に直接子宮内に投与し、その後、アトラジン(5、50 および 500ppm)とエチニールエストラジオール(2.5ppm)を混餌投与し、子宮腫瘍に対する修飾作用を検討する実験を継続中である。

#### A. 研究目的

実験的子宮発がんモデルの多くは、その誘発に 1 年以上を必要とするため、より短期間に発がんするモデルが不可欠である。我々は、既に、p53 遺伝子の片側アレルをノックアウトした CBA マウスに N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)を一回腹腔内投与することにより、子宮腫瘍が 6 カ月以内に高率に誘発されることを見出した。さらに、このモデルを用いて強いエストロゲン作用を有する ethinylestradiol(EE) と有機塩素系農薬の methoxychlor(MXC)の子宮腫瘍修飾作用を検討したところ、EE は子宮内膜や子宮腺の増殖性病変の誘発を増強したが、MXC はそれら増殖性病変に対し増強作用を示さないことを報告した。さらに、同様の実験として、1%ビスフェノールAや20%大豆(きなこ)の子宮腫瘍修飾作用を検討したところ、これらの物質では子宮腫瘍に対する修飾作用は確認できなかった。本年度はこの ENU でイニシエーション処置した p53(+/-)CBA マウスモデルを用いてゲニステイン、ノニルフェノールそしてアトラジンの子宮腫瘍に対する影響を検討した。一方、供給者の都合により p53(+/-)CBA マウスの入手が不可能になった。このため、新たな子

宮発癌モデルの確立も検討し、我々は、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したマウス (rash2 マウス) に ENU を投与することにより肺腫瘍や子宮内膜異型過形成・癌の発生することを見出した。このような経緯から、rash2 マウスに ENU を投与後、ゲニステイン、ノニルフェノールおよびメトキシクロールを混餌投与し、誘発される子宮腫瘍に対するこれらの物質の修飾作用の検討も行なった。さらに、雌 ICR マウスの腔内に ENU(50mg/kg)を直接注入し、イニシエーション処置とした後、アトラジンと ethinylestradiol(EE)を混餌投与して子宮腫瘍に対するこれらの物質の修飾作用の有無を検索実験も開始した。

#### B. 研究方法

実験 1-3：実験 1 では、雌 p53 (+/-)欠損 CBA マウス[p53 (+/-)CBA マウス：オリエンタル酵母]に生理食塩水に溶解した ENU (ナカライテスク) 120mg/kg を一回腹腔内投与し、その一週後から第 1 群に 25ppm ゲニステインを、第 2 群には 250ppm ゲニステインを基礎飼料 (CRF-1) に混じてこれらを 26 週間にわたり投与した。実験 2 では、同様のプロトコールで、第 1 群に 25ppm

ノニルフェノール含有飼料を、第2群には250ppmノニルフェノール含有飼料を、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。実験3では、同様のプロトコールで、400ないし0ppmのアトラジンを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4:雌 *rasH2* マウス(実験動物中央研究所)に生理食塩水に溶解したENU120mg/kgを一回腹腔内投与し、イニシエーション処置とした。その一週後からゲニステインは25および250ppm、ノニルフェノールは25および250ppm、メトキシクロールは1000ppmの濃度で基礎飼料(CRF-1粉末)に混じ、23~26週間自由に与えた。

実験5:6週齢雌ICRマウス(SLC)に生理食塩水で溶解したENU50mg/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週間後よりアトラジン5、50および500ppmの濃度で粉末基礎飼料に混じて26週間投与した。また、陽性対照としてethinylestradiol(EE)の2.5ppmの投与群も設け、現在実験が進行中である。

### C. 研究結果

実験1:実験終了時の生存率は1群で50%、2群で86%、対照群では62%であった。全ての群で実験終了時まで体重の増加抑制は認められなかった。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(表1)。

実験2: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。ノニルフェノール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(表1)。

実験3:アトラジン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(表

1)。

実験4: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、ゲニステイン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(表2)。

実験5:投与実験を継続している。

### D. 考察

p53 (+/-)CBAマウスにENU120mg/kgを一回腹腔内投与し、強いエストロゲン作用を有するEEおよび弱いエストロゲン作用を有するMXCの子宮がんに対する修飾作用を検討した実験では、ENU+EE群では内膜肉腫が87%に誘発された。一方、ENU+MXC群では内膜肉腫はENU単独群と同頻度であり、強いエストロゲン作用を有するEEでは子宮内膜や子宮腺の増殖性病変の誘発を増強するが、弱いエストロゲン作用を有するMXCはそれらの増殖性病変に対して増強作用を示さないことを我々は既に報告した。今回の実験成績においてもゲニステイン、ノニルフェノール、アトラジンはENU誘発子宮腫瘍になら修飾作用を示さなかったことから、弱いエストロゲンあるいは抗エストロゲン作用を有する食品中に含まれる内分泌かく乱物質には子宮発癌を増強する作用はないものと推察された。

*rasH2*マウスでは、ENUの単回腹腔内投与により、雄では肺と前胃腫瘍が高率に誘発され、雌ではこれらの腫瘍の他に、脾血管肉腫と子宮内膜異型過形成および内膜腺癌が誘発されることを我々は既に経験している。今回、この実験モデルを用いてゲニステイン、ノニルフェノールおよびメトキシクロールを投与したところ、ゲニステインでは用量に相関して子宮内膜腺癌の発生が増加する傾向を示した。このゲニステインによる子宮内膜腺癌の増加傾向については、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実の子宮癌促進作用があるか否かを確認すべきである。ノニルフェノール

ルでは、対照群に比べ、やや高率に発生したものの用量相関性は認められなかったので、この物質には子宮癌を促進する作用はないものと推察される。一方、メトキシクロールではその発生が抑制された。これは、肺腺腫の発生も対照群に比べ低かったことから、ENU によるイニシエーション作用がこの群においては強くなかった可能性が考えられ、更なる検討が必要である。

平成13年度では、ICR マウスを用いて、アトラジンや EE についての子宮発癌促進作用の有無を検索するとともに、食品中に含まれるその他の内分泌かく乱物質についての子宮発がん修飾作用も検討する予定である。

#### E. 結論

p53欠損CBA マウスにENUでイニシエーション処置した子宮発癌モデルを用いて、ゲニステイン、ノニルフェノールとアトラジンについて子宮発癌修飾作用を検索したが、これらには子宮発癌修飾作用は認められなかった。

rasH2 マウスにp53欠損CBA マウスと同様の処置を施したところ、ゲニステイン投与で子宮内膜腺癌が用量に相関して増強する傾向がみられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.

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.

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.

##### 2. 学会発表

上田誠、三森国敏、小野寺博志、高木久宜、安原加壽雄、瀧澤保、広瀬雅雄：ENU 誘発子宮癌 rasH2 マウスモデルにおける nonylphenol および ethinylestradiol 投与の影響、第17回日本毒性病理学会総会（2001.1 淡路島）

**Table 1. Incidence (%) of uterine histopathological findings in *p53*(+/-) CBA mice treated with genistein(Ge), nonylphenol(Np), or atrazine(Atr) for 26 weeks after ENU initiation**

Group (Dose: ppm)	Mor tality (%)	N	Final body weight (g)	Relative uterine weight (mg/g)	Uterus		
					Glandular hyperplasia	Atypical hyperplasia (basophilic type)	Stromal sarcoma
Cont. (0)	37.5	5	29.7±2.9	29.3±33.5	40.0	0	60.0
Ge (25)	50.0	7	29.9±5.1	38.2±54.6	28.6	7.3	71.4
Ge (250)	14.3	12	28.6±3.3	22.1±29.8	58.3	8.3	33.3
Cont. (0)	40.0	6	27.1±3.0	40.3±3.3	66.7	33.3	66.7
Np (25)	20.0	8	29.7±3.9	28.6±27.8	50.0	25.0	62.5
Np (250)	30.0	7	26.7±2.1	17.9±17.0	42.9	0	71.4
Cont. (0)	0	10	32.3±3.5	18.7±9.0	100.0	90.0	60.0
Atr (25)	43.8	9	30.1±3.8	11.9±4.4	100.0	88.9	33.3

(00DF/00EG/ADX)

**Table 2. Incidence (%) of histopathological findings in rasH2 mice treated with genistein(Ge), nonylphenol(Np), or methoxychlor(Me) for 26 weeks after ENU initiation**

Group (Dose: ppm)	Mor tality (%)	N	Final body weight (g)	Relative uterine weight (mg/g)	Uterus			Lung	
					Glandular hyperplasia	Atypical hyperplasia	Carcinoma	Adenoma	
Cont. (0)	40.0	9	24.6±3.2	7.9±3.6	66.7	33.3	22.2	46.7	
Ge (25)	46.7	8	24.5±2.3	7.4±3.2	75.0	37.5	37.5	62.5	
Ge (250)	6.7	14	24.0±2.0	8.0±2.3	57.1	14.3	57.1	57.1	
Np (25)	33.3	10	24.2±3.0	7.0±1.9	70.0	20.0	40.0	60.0	
Np (250)	15.0	17	26.8±4.0	8.1±4.6	70.6	29.4	29.4	76.5	
Me (1000)	20.0	12	21.1±1.1	6.6±1.0	41.7	0	0	25.0	



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

## 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

分担研究報告書（平成 12 年度）

### 食品中内分泌かく乱物質等の前立腺発がん修飾作用に関する実験的研究

分担研究者: 今井田克己 名古屋市立大学 医学部 第一病理学教室 助教授

#### 研究要旨

我々の開発してきたラット前立腺がんモデルを用いて、内分泌かく乱化学物質の前立腺発がん過程における修飾作用の検討を行っている。即ち、前立腺発がん物質である 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) を用いる前立腺発がんモデルで、Nonylphenol および Genistein の長期実験を行い、現在、前立腺を中心に、病理組織学的な詳細な検討を行っている。また、2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-*b*]pyridine (PhIP) を用いるラット前立腺がんモデルを用いて、Atrazine による前立腺発がん過程での修飾作用を検討する長期動物実験が現在進行中である。

#### 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様活性作用、すなわち女性ホルモン様活性を示したり、また男性ホルモン様活性を示すことが疑われている。さらに、その反対にそれぞれのホルモンに対して拮抗的に作用するものも存在することが明らかとなっており、このような物質によるヒトへの影響を検討する上で、ホルモン依存性がんに対する修飾作用を検討することはこれら化学物質のヒトへの安全性を検討する上で極めて重要であると考えられる。そこで、本研究では我々の教室で開発したラット前立腺がんモデルを用いて内分泌かく乱作用の疑われている化学物質を用いて、ラットの前立腺がんの発生過程でのこれら化学物質による修飾作用の有無を検討することをその目的としている。

#### B. 研究方法

##### 1. Nonylphenol ならびに Genistein の修飾作用

我々の開発したラット前立腺がんモデルを用いて、内分泌かく乱作用が懸念されている Nonylphenol および genistein の前立腺がんの修飾作用を検討している。その実験デザインを図 1 に示す。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 50mg の投与量で 2 週間に 1 回づつ合計 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 の濃度で大豆成分の含まれない基礎食に混じて 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。いずれの群も基礎食には大豆成分の含まれないものを用い、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の検討を行なった。

## 2. Atrazine の修飾作用

研究 1 の Nonylphenol および Genistein の実験で用いた DMAB の前立腺発がん実験系はラットの前立腺発がんに関しては優れた実験系であるが、前立腺腫瘍以外の神経系の腫瘍などが多発し、それが原因で死亡する動物も多く、十分な実験期間が確保されない問題点もあった。そこで、Atrazine の前立腺がん修飾作用の実験では発がん物質として DMAB ではなく、PhIP を用いることとし、100mg/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 の濃度で大豆成分の含まれない基礎食に混ぜて経口投与する実験系を用いて、動物実験は現在進行中である (図 2)。

### (倫理面への配慮)

本研究の開始にあたってはあらかじめその実験手技、倫理面での対応などを名古屋市立大学 医学部 動物実験委員会の承認を得ており、動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力避けるよう配慮に努めている。

## C. 研究結果

1. Nonylphenol および Genistein の実験では、Nonylphenol 25 ppm 群で最終的に生存率が約 40%と低く、250 ppm 群での約 70%と生存率に関しては投与濃度に相反す

る結果となった。Genistein の群では生存率に特定の群に異常な値は見られなかった。屠殺時の最終体重、屠殺時の精巣及び肛門挙筋の相対臓器重量を表 1 に示した。精巣重量と肛門挙筋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。

表 3 には実験 40 週から 50 週の間に死亡、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の結果を示した。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、精囊には 6 例中 5 例に異形成 (dysplasia) 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、Nonylphenol および Genistein のラット前立腺がんの発生過程におよぼす影響については病理組織学的な詳細な検討を行なってから、最終的な判定を行なう予定である。

2. 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。

## D. 考察

実験 1 において、内分泌かく乱作用が懸念されている Nonylphenol および Geni-

stein 投与群では高濃度投与群、低濃度投与群のいずれも、精巣重量と肛門挙筋の体重当りの相対重量に影響は見られなかった。特に、肛門挙筋の重量は体内の estrogen レベルを反映するといわれているが、いずれの化学物質の投与による影響はなかった。さらに、血中の testosterone レベルも投与による影響は認めず (表 1)、Nonylphenol と Genistein 投与によるラットの内分泌かく乱作用は明らかではなかった。

今回の実験で、Nonylphenol の低濃度投与群である 25 ppm での生存率が実験終了時には約 40% と低く、その高濃度投与群である 250 ppm 投与群より生存率が低い結果となった。死亡動物の多くは皮下の神経性腫瘍や Zymbal 腺腫瘍などの腫瘍による死亡が多く見られたが、なぜ、低用量群の方が生存率が低い結果となったのか現在までのところ明らかではない。この問題点を含め、最終的には病理組織学的検索結果を待って、考察したい。

#### E. 結論

現在、実験 1 では病理標本作成中であり、また、実験 2 では動物実験が進行中であるので、最終的な結論は現在までのところ得られていない。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.

2. 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.

3. Shirai, T., Imaida, K., Ito, N.: Prostate. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 270-274. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

4. Imaida, K., Shirai, T., Ito, N.: Degenerative Changes. In: M. Nagao, T. Sugimura (eds.), *Food Born Carcinogenesis*, pp. 275-284. Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Ltd, 2000.

5. Ito, N., Imaida, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats. *Mutation Res.*, 462: 209-217, 2000.

6. 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.

7. Imaida, K., Hagiwara, A., Yoshino, H., Tamano, S., Sano, M., Futakuchi,

M., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Inhibitory effects of low doses of melatonin on induction of preneoplastic liver lesions in a medium-term liver bioassay in F344 rats: relation to the influence of electromagnetic near field exposure. *Cancer Lett.*, 155: 105-114, 2000.

8. Takahashi, S., Ikeda, Y., Orita, S.-i., Sakakibara, M., Kimoto, N., Suzuki, S., Imaida, K., Shirai, T.: Enhancing effects of 2-amino-4,5-diphenylthiazole-induced polycystic kidneys on renal carcinogenesis in rats treated with dimethylnitrosamine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 167: 12-17, 2000.

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

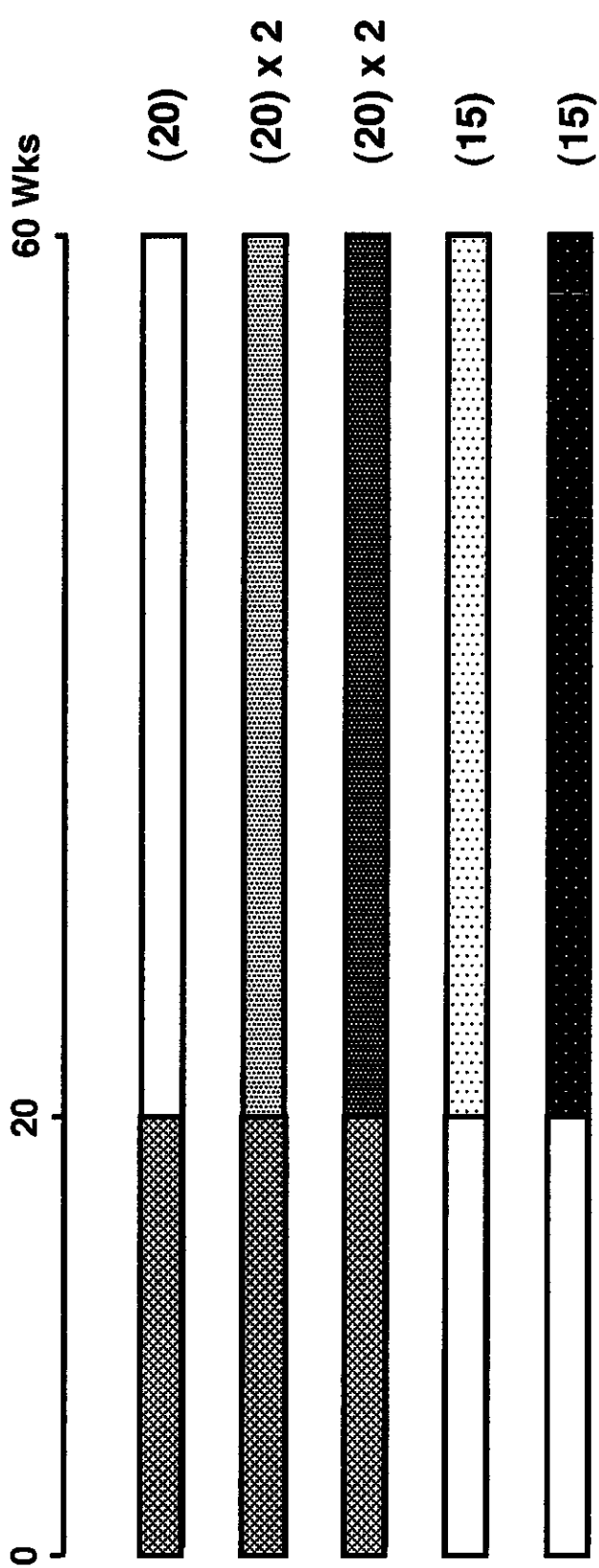
なし

##### 2. 実用新案登録


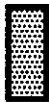
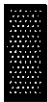
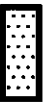

なし

##### 3. その他

なし

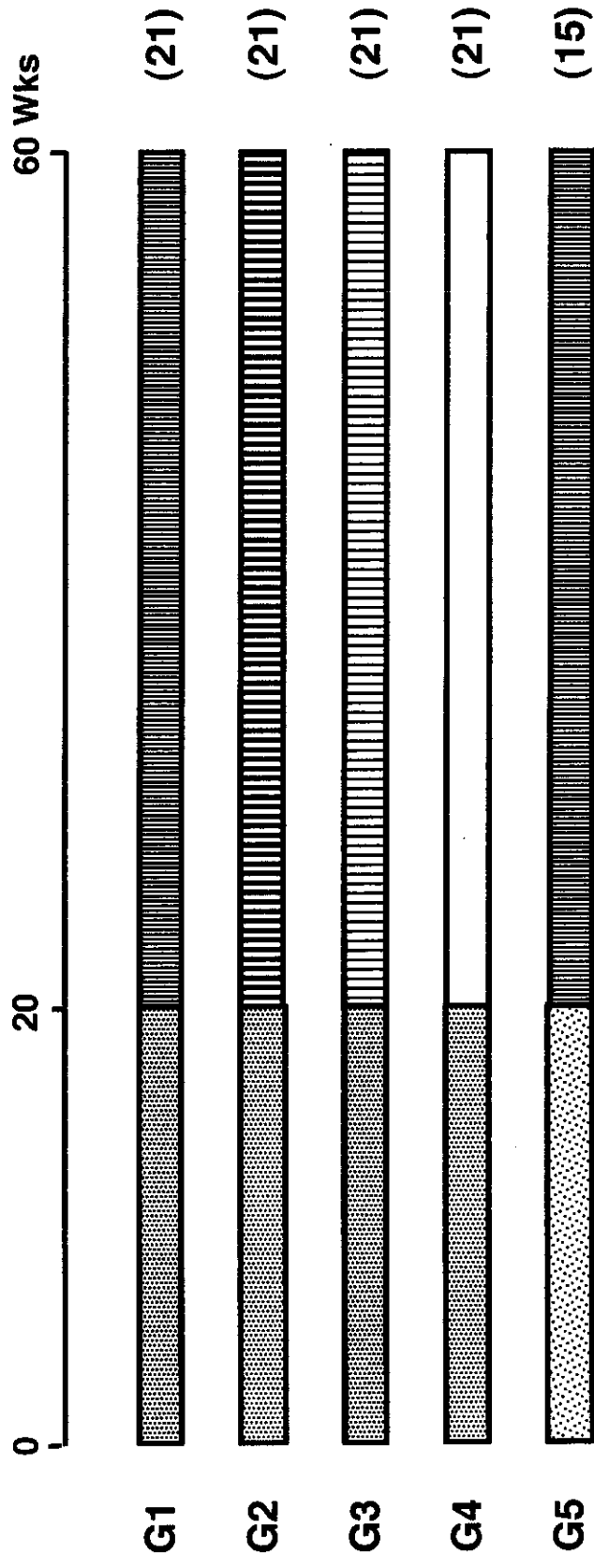


**Animals:** F344 male rats (No. of Rats)

-  DMAB 50 mg/kg b.w. sc biweekly (10 times)
-  Nonylphenol in diet at the levels of 250 and 25 ppm
-  Genistein in diet at the levels of 250 and 25 ppm
-  Nonylphenol 250 ppm
-  Genistein 250 ppm







**Basal diet:** Soybean free diet

# Experimental Design



(No. of Rats)

Animals : F344, male rats, 6-week-old

-  Phip : 100mg/kg b.w., i.g., once a week
-  Vehicle : Corn oil, 5ml/kg b.w., i.g., once a week
-  Atrazine 500ppm  Atrazine 5ppm in diet
-  Atrazine 50ppm
-  Basal diet: (Soybean free diet)

# Experimental Design (Atrazine Experiment)

# Final Body and Relative Organ Weight

Group	No. of rats	Body Weight (g)	Relative Organ Weight (/100g)	
			Testes	Musculi Levator ani
DMAB-Soybean free	12	392.5 ± 30.1	0.77 ± 0.07	0.23 ± 0.03
DMAB-Nonylphenol 250 ppm	16	395.5 ± 32.8	0.73 ± 0.06	0.20 ± 0.03
DMAB-Nonylphenol 25 ppm	8	403.1 ± 20.0	0.73 ± 0.09	0.20 ± 0.03
DMAB-Genistein 250 ppm	12	411.2 ± 24.7	0.74 ± 0.06	0.20 ± 0.03
DMAB-Genistein 25 ppm	12	384.0 ± 30.2	0.78 ± 0.09	0.20 ± 0.03
Control-Nonylphenol 250 ppm	15	422.4 ± 15.1	0.76 ± 0.05	0.21 ± 0.02
Control-Genistein 250 ppm	15	415.8 ± 33.4	0.77 ± 0.05	0.20 ± 0.02

## Serum Testosterone Levels

Group	No. of rats	Testosterone Levels (ng/ml)
DMAB-Soybean free	5	0.4 ± 0.2
DMAB-Nonylphenol 250 ppm	5	0.2 ± 0.1
DMAB-Nonylphenol 25 ppm	5	0.3 ± 0.3
DMAB-Genistein 250 ppm	5	0.5 ± 0.2
DMAB-Genistein 25 ppm	5	0.5 ± 0.3
Control-Nonylphenol 250 ppm	6	0.4 ± 0.1
Control-Genistein 250 ppm	6	0.2 ± 0.1



表3

**Incidences of Preneoplastic and Neoplastic Lesions of the Prostate and Seminal Vesicles in the Dead or Moribund Rats (40~50 Weeks)**

No. of rats	Prostate						Seminal Vesicles	
	Ventral		Dorsolateral		Anterior		Dysplasia	Carcinoma
	PIN	Carcinoma	PIN	Carcinoma	PIN	Carcinoma		
6	2/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	5/6	0/6

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）  
分担研究報告書

食品中内分泌かく乱物質等の卵巣発がん修飾作用に関する研究

分担研究者 田中 卓二 金沢医科大学教授

研究要旨 本分担研究では、環境中に存在する内分泌かく乱作用物質のうち nonylphenol (NP) とエストロゲン様作用を持つ植物性化合物 genistein (GS) の 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) 誘発卵巣発がんに対する修飾効果を知る目的で実験を行った。動物実験は総計 145 匹の雌性 SD ラットを使用し、実験期間は 51 週とした。卵巣がんは DMBA (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、被験物質の NP、GS は DMBA 投与の 1 週間後から 50 週間、混餌投与し、その発がんに及ぼす影響をみた。その結果、実験終了時の左卵巣腫瘍 (腺癌) の発生頻度は、DMBA → 250 ppm NP 群 : 1/20 (5%)、DMBA → 25 ppm NP 群 : 1/20 (5%)、DMBA → 250 ppm GS 群 : 0/20 (0%)、DMBA → 25 ppm GS 群 : 1/20 (5%)、DMBA 群 : 7/20 (35%)、250 ppm NP 群 : 0/20 (0%)、250 ppm GS 群 : 0/20 (0%)、無処置対照群 : 0/20 (0%) と、DMBA → 250 ppm NP 群、DMBA → 25 ppm NP 群、DMBA → 250 ppm GS 群、DMBA → 25 ppm GS 群で DMBA 群に比べ有意に減少していた ( $P < 0.05$ )。これらの結果から、NP、GS は DMBA 誘発ラット卵巣発がんに対して抑制的に働くことが判明した。

A. 研究目的

本分担研究では、環境中に存在する内分泌かく乱作用物質のうち nonylphenol (NP) とエストロゲン様作用を持つ植物性化合物 genistein (GS) について 7,12-dimethylbenz(a)anthracene(DMBA) 誘発ラット卵巣発がんモデルで発がん修飾作用を検討した。

B. 研究方法

動物実験は総計 145 匹の雌性 SD ラットを使用し、8 群に分けた。実験群は第 1 群 (20 匹) : DMBA → 250 ppm NP、第 2 群 (20 匹) : DMBA → 25 ppm NP、第 3 群 (20 匹) : DMBA → 250 ppm GS、第 4 群 (20 匹) : DMBA → 25 ppm GS、第 5 群 (20 匹) : DMBA、第 6 群 (15 匹) : 250 ppm NP、第 7 群 (15 匹) : 250 ppm GS、第 8 群 (15 匹) : 無処置対照群の計 8 群である。卵巣がんは DMBA (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、被験物質の NP、GS は DMBA 投与の 1 週間後から 50 週間、混餌投与し、その発がんに及ぼ

す影響をみた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては当大学動物実験委員会に許可を得、実験にあたっては実験動物取り扱い規則を遵守した。

C. 研究成果

実験終了時の平均体重 ( $\pm$ SD) は、DMBA → 250 ppm NP 群 : 340  $\pm$  35 g、DMBA → 25 ppm NP 群 : 355  $\pm$  50 g、DMBA → 250 ppm GS 群 : 327  $\pm$  44 g、DMBA → 25 ppm GS 群 : 318  $\pm$  33 g、DMBA 群 : 339  $\pm$  42 g、250 ppm NP 群 : 340  $\pm$  50 g、250 ppm GS 群 : 317  $\pm$  29 g、無処置対照群 : 335  $\pm$  17 g であり、250 ppm GS 群で無処置対照群に比べ有意な体重減少をみた ( $P < 0.05$ )。平均肝重量 ( $\pm$ SD) は、DMBA → 250 ppm NP 群 : 12.0  $\pm$  1.8 g、DMBA → 25 ppm NP 群 : 12.4  $\pm$  2.2 g、DMBA → 250 ppm GS 群 : 12.2  $\pm$  2.1 g、DMBA → 25 ppm GS 群 : 11.1  $\pm$  1.3 g、DMBA 群 : 12.2  $\pm$  1.8 g、250 ppm NP 群 : 11.8  $\pm$  2.6 g、250 ppm GS 群 : 11.4  $\pm$  1.5 g、無処置対照群 : 10.9  $\pm$

1.8 gで、各群間に有意な差はなかった。一方、卵巣重量(±SD)は、DMBA →250 ppm NP群: 154±20 mg、DMBA →25 ppm NP群: 156±28 mg、DMBA →250 ppm GS群: 149±16 mg、DMBA →25 ppm GS群: 148±16 mg、DMBA群: 145±13 mg、250 ppm NP群: 163±19 mg、250 ppm GS群: 157±12 mg、無処置対照群: 168±15 mgで、250 ppm GS群で無処置対照群に比べ有意な減少をみた(P<0.05)。子宮重量(±SD)は、DMBA →250 ppm NP群: 748±88 mg、DMBA →25 ppm NP群: 774±61 mg、DMBA →250 ppm GS群: 713±51 mg、DMBA →25 ppm GS群: 633±87 mg、DMBA群: 740±69 mg、250 ppm NP群: 741±88 mg、250 ppm GS群: 691±69 mg、無処置対照群: 731±97 mgと、DMBA →25 ppm GS群でDMBA群に比べ有意な減少をみた(P<0.05)。実験終了時の左卵巣腫瘍(腺がん)の発生頻度は、DMBA →250 ppm NP群: 1/20 (5%)、DMBA →25 ppm NP群: 1/20 (5%)、DMBA →250 ppm GS群: 0/20 (0%)、DMBA →25 ppm GS群: 1/20 (5%)、DMBA群: 7/20 (35%)、250 ppm NP群: 0/20 (0%)、250 ppm GS群: 0/20 (0%)、無処置対照群: 0/20 (0%)と、DMBA →250 ppm NP群、DMBA →25 ppm NP群、DMBA →250 ppm GS群、DMBA →25 ppm GS群でDMBA群に比べ有意に減少していた(P<0.05)。

#### D. 考察

これらの結果から、NP、GSはDMBA誘発ラット卵巣発がんに対して抑制的に働くことが判明したが、その作用機構に関しては不明である。現在、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ところである。また、このモデルを用いて農薬として使用されているatrazineとプラスチック可塑剤のフタル酸エステル(*n*-butyl benzyl phthalate)の発がん修飾効果を検討する動物実験が進行中である。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。

#### E. 結論

環境中に存在する内分泌かく乱作用物質NP、GSはDMBA誘発ラット卵巣発がんに対して抑制的に働くことが判明した。

#### F. 健康危険情報

本実験を実施した分担研究者を含む実験者及び動物の飼育管理を行った当大学動物実験施設スタッフの健康面に問題はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1. 発表論文

Tanaka, T., Kawabata, K., et al., Chemopreventive effect of bovine lactoferrin on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 25-33, 2000.

Tanaka, T., Kohno, H., et al., Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 21: 1183-1189, 2000.

Tanaka, T., Kohno, H., et al., Suppression of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by Mandarin juices rich in *b*-cryptoxanthin and hesperidin. *Int J Cancer*, 88: 146-150, 2000.

Kohno, H., Tanaka, T., et al., Modifying effect of tuna orbital oil rich in decosahexaenoic acid and vitamin D3 on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Oncol. Reports*, 7: 1069-1074, 2000.

Tanaka, T., Kohno, H., et al., Citrus limonoids obacunone and limonin inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *BioFactors*, 13: 213-218, 2000.

Tanaka, T., Kohno, H., et al., Suppressing effects of dietary supplementation of the organoselenium

1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and the citrus antioxidant auraptene on lung metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Res.*, 60: 3713-3716, 2000.

Tanaka, T., Maeda, M., et al., Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by citrus limonoids, obacunone and limonin. *Carcinogenesis*, 22: 193-198, 2001.

Tanaka, T., Shimizu, M., et al., Chemoprevention of azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci by dietary zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet*. *Life Sci.*, in press, 2001.

Kohno, H., Tanaka, T., et al., Dietary administration of citrus nobiletin inhibits

azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. Life Sci., in press, 2001.

Tanaka, T., Kohno, H., et al., Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  inhibit chemically-induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. Cancer Res., 61: in press, 2001.

Kohno, H., Tanaka, T., et al., Troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  inhibits chemically-induced aberrant crypt foci in rats. Jpn. J. Cancer Res., 92: in press, 2001.

## 2. 学会発表

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（東京）平成13年4月5-7日（発表予定）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし。

### 1. 実用新案登録

該当なし。

### 1. その他

該当なし。