

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

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 西川 秋佳

平成 14 年 6 月 30 日

目 次

I. 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 1
西川秋佳	
II. 分担研究報告書	
1. 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 16
西川秋佳	
2. 食品中内分泌かく乱物質等の乳腺発がん修飾作用に関する研究 30
広瀬雅雄	
3. 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 41
津田洋幸	
4. 子宮腫瘍誘発モデルにおける植物エストロジェンの影響に関する研究 47
三森国敏	
5. 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研究 51
今井田克己	
6. 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 59
田中卓二	
7. 食品中内分泌かく乱物質等の主要臓器に対する発がん修飾作用に関する研究 62
鰐淵英機	
8. 内分泌かく乱物質による細胞増殖の分子メカニズムに関する研究 73
藤本成明	
9. 食品中内分泌かく乱物質による細胞増殖制御機構の解明に関する研究 83
酒井敏行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 86
IV. 研究成果の刊行物・別刷 92

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

平成 13 年度総括研究報告書

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、atrazine および arctiin 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 誘発マウス子宮発がんモデル、DMAB 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 2 段階の用量で、atrazine を 500、50 および 5 ppm の 3 段階の用量で、arctiin を 40、200 および 1000 ppm の用量で混餌投与した。その結果、atrazine は既報どおりに正常 SD ラットにおいて、nonylphenol および atrazine は *c-Ha-ras* 導入ラットにおいて乳腺腫瘍の発生を促進するか、または促進する傾向を示した。また、多臓器中期発がん性試験法において、atrazine は弱い肝発がん促進作用を有する可能性が示された。しかし、atrazine による乳腺腫瘍の発生促進は、プロラクチンを介するラットに特異的な現象とも考えられており、肝発がん促進作用も内分泌かく乱作用と関連しないものと考えられた。本年度に開始した arctiin の実験はいずれも完了していないが、現在までのところ投与に伴う腫瘍発生への影響は観察されていない。一方、前立腺発がん過程ではエストロゲンがテストステロンに対し相乗作用を示すが、そこにはエストロゲン受容体 α の発現増強が関与していることが示唆された。また、G2/M 期停止、アポトーシス誘導や DNA 修復に関与することが報告されている *gadd45* 遺伝子が genistein 処理により誘導されることを見出し、その誘導は *gadd45* のプロモーター領域を介するものであ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 香川医科大学・教授
田中卓二 金沢医科大学・教授
鰐淵英機 大阪市立大学医学部・助教授
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

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* 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。

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 13 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である genistein、nonylphenol および atrazine に加えて、リグナン類に属する arctiin の影響について各種実験モデルを用いて検討した。

また、内分泌かく乱と発がんメカニズムとの関連を追究するため、エストロゲン受容体 α および細胞周期関連遺伝子の発現調節についてさらに検討を加えた。

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 および 250 ppm の二段階の用量で、atrazine および arctiin をそれぞれ 5、50、500 ppm および 40、200、1000 ppm の三段階の用量で、大豆成分無添加の基礎飼料 CRF・1 に混じて長期間与えた。

【実験 1 (甲状腺発がんモデル)】 F344 雄ラットに DHPN を 2800 mg/kg の用量で単回皮下投与し、1 週間後から 0、5、50 または 500 ppm の用量で atrazine を混餌投与した。実験開始 24 週後に、臓器重量測定、血清ホルモン値測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験 2 (乳腺発がんモデル)】 SD 系雌ラットに DMBA (50 mg/kg 体重) を 1 回胃内強制投与した。乳腺腫瘍の発生を週 1 回触診により観察し、腫瘍発生頻度が 50% に達した 19 週の時点で卵巣を摘出した。腫瘍の発生が見られたラットと見られなかったラットの 2 群に分け、0、5、50 または 500 ppm の用量で atrazine の混餌投与を行った。乳腺腫瘍の発生頻度、発生部位、個数および大きさを経時的に観察し、実験開始後 53 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 (乳腺発がんモデル)】 SD 系雌ラットに DMBA (50 mg/kg 体重) を 1 回胃内強制投与した。腫瘍発生頻度が 50% に達した時点で卵巣を摘出し、腫瘍の発生が見られたラットと見られなかったラットの 2 群に分け、それぞれに 0、40、200 または 1000 ppm の arctiin の混餌投与を 32 から 40 週間行い、乳腺腫瘍の発生状況を観察した。

【実験 4 (乳腺発がんモデル)】 50 日齢の *c-Ha-ras* 導入ラットに DMBA を胃内投与し、翌日より nonylphenol を 0、25、

250 ppm、atrazine を 5、50、500 ppm、arctiin を 40、200、1000 ppm の用量でそれぞれ基礎食中に加えて、雌は 8 週、雄は 20 週まで投与し、ポストイニシエーション期に投与した物質の発がん修飾作用の有無と程度を検討した。動物はエーテル深麻酔下にて瀉血致死後全皮膚を剥離して臓側より乳腺腫瘍を摘出して組織学的診断を行った。

【実験 5 (子宮発がんモデル)】 雌 ICR マウスに生理食塩水で溶解した ENU 50 mg/kg を経膈的に単回子宮腔内投与 (0.1 mL/head) し、イニシエーション処置とした。その 1 週間後から第 1 群に 5 ppm、第 2 群には 50 ppm、第 3 群には 500 ppm の atrazine を、また第 4 群には陽性対照として ethinylestradiol (EE) の 2.5 ppm をそれぞれ基礎飼料に混じて 26 週間にわたり投与した。また、第 5 群には基礎飼料を与えた ENU 単独投与群を陰性対照として設けた。

【実験 6 (子宮発がんモデル)】 実験 5 と同様の ENU 誘発 ICR マウスモデルで、第 1 群に 40 ppm、第 2 群に 200 ppm、第 3 群に 1000 ppm の arctiin 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 7 (前立腺発がんモデル)】 F344 雄ラットを 4 群に分け、第 1-3 群には 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。実験開始 20 週目より 2 群には nonylphenol を 2000、250 または 25 ppm の濃度で基礎食に混じて 40 週間投与した。同様に、3 群には 250 または 25 ppm の genistein を、4 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性病変の発生に及ぼす影響を検討した。

【実験 8 (前立腺発がんモデル)】 F344 雄ラットに PhIP を 100 mg/kg 体重の用量で週 1 回ずつ強制胃内投与し、20 週間後から、atrazine を 500、50、5 ppm の濃度で基礎食に混じて経口投与する実験系を用いて、atrazine の前立腺がん修飾

作用の有無を検討した。

【実験 9 (卵巣発がんモデル)】 雌性 SD ラットを 6 群に分け、第 1 群： DMBA、第 2 群： DMBA → 5 ppm atrazine、第 3 群： DMBA → 50 ppm atrazine、第 4 群： DMBA → 500 ppm atrazine、第 5 群： 500 ppm atrazine、第 6 群： 無処置対照群とした。卵巣がんは DMBA を 0.5% の濃度でオリーブ油に懸濁し、麻酔下で開腹後、左卵巣内に 0.01 ml 注入して誘発し、atrazine は DMBA 投与の 1 週間後から 50 週間、混餌投与した。

【実験 10 (多臓器発がんモデル)】 F344 系雄ラットを 8 群に分け、第 1-5 群に実験開始日に DEN を体重 1kg 当たり 100 mg 腹腔内投与、MNU を第 2、5、8、11 日にそれぞれ体重 1 kg 当たり 20 mg 腹腔内投与、DMH を第 14、17、20、23 日にそれぞれ体重 1 kg 当たり 40 mg 腹腔内投与、それらと平行して第 1-2 週に BBN を 0.05% の濃度で飲水投与、第 3-4 週に DHPN を 0.1% の濃度で飲水投与し、イニシエーション処置とした。実験開始後 5 週目から atrazine を 5 ppm、50 ppm、500 ppm の濃度で第 2-4 群にそれぞれ 26 週間混餌投与、第 1 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。第 5 群は無処置群とした。実験開始後 30 週間後に全生存例を麻酔下で脱血致死させ、主要臓器を摘出し病理組織学的に検索した。

【実験 11 (多臓器発がんモデル)】 同様のラット多臓器中期発がん性試験法を用い、arctiin についても、0.1%、0.02%、0.004% の濃度で混餌投与する実験を開始した。

<II. 内分泌かく乱に関連する発がん修飾機構の検討>

【実験 12 (卵巣ラットにおける estradiol の影響)】 卵巣摘除を施した 6 週齢の F344 雌ラットを 6 群に分け、第 1-4 群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 β -estradiol 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33週後に、臓器重量測定、血清ホルモン値測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験13(去勢ラットにおける estradiol の影響)】 精巣摘除した6週齢のF344雄ラットを6群に分け、第1-4群に甲状腺発がんイニシエーション処置として、DHPNを2600 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33週後に、臓器重量測定、血清ホルモン値測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験14(下垂体細胞の増殖に対する atrazine の影響)】 5週齢の雌F344ラットに、下垂体細胞MtT/E-2を 3×10^5 /部位で移植した。atrazineは5、50、500 ppmで上記飼料に混餌し自由摂取させた。陽性コントロール群には1.0 mgのエストロゲンを含んだペレットを皮下に投与した。実験終了は、移植腫瘍群については生着径が20 mm程度になった時点で、その他は4週間後とした。血清および下垂体組織を直ちに凍結保存した。

【実験15(前立腺エストロゲン受容体発現に対する影響)】 雄F344ラットを用いて、基礎的検討実験として、1、4、9週齢時に去勢およびテストステロンペレット投与を1週間行った。次いで、5齢時にホルモンペレット(T, 10 mg; E 2.5 mg)を1週間、または6週齢時にホルモンペレット(T, 50 mg; E, 2.5 mg)を4週間皮下投与した。実験終了時、血清および腹側前立腺組織をとり直ちに凍結保存した。ER mRNAレベルはCompetitive RT-PCRにより定量した。MtT/E-2細胞培養はペニシリン/ストレプトマイシン含有のDEM/F12混合培地 + 2.5% + 7.5% HSにて行った。アッセイ前にはそれぞれDC処理血清を含むフェノールレ

ッド(●)の培地に交換した。細胞増殖測定は改良型のMTTアッセイであるCell Counting Kitを用いた。

【実験16(リグナン類のエストロゲン活性)】 リグナン類3物質(arctiin, sesamin および nordihydroguaiaretic acid)について、エストロゲン応答性増殖アッセイ、エストロゲン依存性転写レポーターアッセイおよびエストロゲン受容体に対する結合アッセイを実施した。

【実験17(genistein 処理による細胞増殖/細胞周期への影響)】 ヒト前立腺癌由来 p53 遺伝子変異細胞株 DU145 を用いて、genistein 処理にともなう変化を検討した。 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 個のDU145細胞を播種し、24時間後に終濃度10~50 μ Mのgenistein、溶媒0.1% DMSOを加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。その後72時間までの細胞を計測、回収しエタノール固定した。エタノール固定された細胞はRNase処理した後 propidium iodide で染色し、FACS Calibur および ModFit を用いて細胞周期を解析した。Probeはヒト *gadd45* cDNAをBcaBEST Labelling Kitによりランダム標識を行い調製した。*gadd45* 遺伝子プロモーター活性化への影響は、 1×10^5 個のDU145細胞を播種し、24時間後にDEAE-Dextran法によりtransfectionを行った。用いたReporter plasmidは、ヒト *gadd45* 遺伝子プロモーター領域にルシフェラーゼをreporter 遺伝子として組み込んだものであり、ルシフェラーゼ測定はルシフェラーゼアッセイキットを用いて実施した。

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 (甲状腺発がんモデル)】甲状腺および下垂体を含めて、諸臓器の相対重量には有意な群間差を認めなかった。DHPN + atrazine 500 ppm 群では、DHPN 単独群に比較して T_4 が有意に低下した以外には、血清甲状腺関連ホルモンに及ぼす DHPN または atrazine 投与の影響は認められなかった。病理組織学的検索の結果、atrazine 投与に起因する腫瘍性病変の発生増加は甲状腺を含めたいずれの臓器にも観察されなかった。

【実験2 (乳腺発がんモデル)】生存率、最終体重および臓器重量に、atrazine 投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。atrazine 投与開始時に腫瘍の認められた群では、最終剖検時における退縮腫瘍数、腫瘍の発生頻度および発生個数に各群間の差は認められなかった。しかし、atrazine の 50 および 500 ppm 群では最終屠殺時には対照群に見られない大きさの腫瘍が散見され、両群とも平均値では対照群の約 2 倍の値を示した。投与開始時に腫瘍が認められなかった群では、最終屠殺時には 500 ppm 群で腺癌の発生が有意に増加した ($P < 0.05$)。同様に腫瘍体積も 50 および 500 ppm 群では対照群に見られない大きな腫瘍が観察され、最終屠殺時の平均値は対照群に比較して 50 ppm 群では約 7 倍 ($P < 0.05$)、500 ppm 群で約 5 倍の値を示した。

【実験3 (乳腺発がんモデル)】DMBA 投与後 12 週が経過し、乳腺腫瘍の発生率が約 30% である。現在、経過観察中である。

【実験4 (乳腺発がんモデル)】雌の乳腺腫瘍(腺腫 + 腺癌)の個数/ラットは、25 ppm の nonylphenol 投与群において、増加傾向を示し、雄の乳腺肉腫は有意に増加 ($P < 0.05$) した。5 ppm と 50 ppm の atrazine 投与群において、雌の乳腺腫

瘍(腺腫 + 腺癌)は増加傾向を示したが、雄では差は無かった。雌の腺癌の頻度は、5 ppm と 50 ppm の atrazine 投与群で有意に増加した。屠殺時の血清中の両物質の濃度を LC-MS 測定したが検出限界以下であった。Arctiin 投与では、肉眼的に差異は観察されなかった(標本作製中)。

【実験5 (子宮発がんモデル)】EE 群では投与初期から実験終了時まで体重増加抑制が認められたが、atrazine の全投与群では対照群である ENU 単独投与群との間に差は認められなかった。解剖時における子宮重量には、ENU 単独投与群と atrazine 群との間に差はなかった。一方、EE 群では子宮重量は有意に高値を示した。子宮増殖性病変の発生には、atrazine 群と対照群との間に差は認められなかったものの、EE 群では異型的過形成(第 1~3 群, 0%; 第 4 群, 12%) および腺癌(第 1~3 群, 0%; 第 4 群, 29%) の発生が対照群に比し高率に認められた。

【実験6 (子宮発がんモデル)】現在投与実験を継続している。これまでのところ arctiin 投与群では死亡動物数、体重、接種量において対照群である ENU 単独群との間に差は認められていない。

【実験7 (前立腺発がんモデル)】精巣重量と肛門挙筋に統計学的有意差はみられず、血中 testosterone 値にも有意差を認めなかったことから、nonylphenol と genistein によるラットでの内分泌かく乱の影響は明らかではなかった。前立腺の前がん病変と考えられる prostate intraductal neoplasia を Simple と Severe に分類し、腺癌を併せて、それぞれの発生頻度ならびにラット一匹あたりの発生個数を比較したが、いずれも群間で有意差は見られなかった。さらに、精囊の腫瘍性病変についても、前がん病変である異型性過形成と腺癌の発生頻度ならびにラット一匹あたりの発生個数を群間で比較したが、いずれにも統計学的に有意差を認めなかった。

【実験8 (前立腺発がんモデル)】動物実験は終了した。体重は PhIP 投与により減

少したものの、その投与終了後徐々に回復した。atrazine 投与による影響はいずれの濃度の投与群でも認めなかった。現在、病理組織学的な詳細な検討を行っている。

【実験 9 (卵巣発がんモデル)】 実験終了時の平均体重には各群間に有意差はなかった。平均肝重量は、DMBA → 500 ppm atrazine 群で DMBA 群に比べ有意に高かった ($P<0.02$) が、子宮重量および卵巣重量には各群間に有意差はなかった。実験終了時の左卵巣腫瘍 (腺癌) の発生頻度は、DMBA → atrazine 投与群で DMBA 群に比べ低い傾向にあったが有意差をみなかった。その他、各群に自然発症腫瘍として乳腺腫瘍や皮下腫瘍が散発的に発生したが、atrazine 投与による発生率への影響はなかった。

【実験 10 (多臓器発がんモデル)】 イニシエーション群において諸臓器に腫瘍を認めたが、発生頻度には各群間の有意差は認められなかった。しかしながら、前がん病変の指標である GST-P 陽性肝細胞巢の数および面積が atrazine の濃度依存性に増加する傾向がみられ、atrazine 500 ppm 群ではその単位面積あたりの数が対照群に比較し有意に増加した。

【実験 11 (多臓器発がんモデル)】 同様のラット多臓器中期発がん性試験法において、arctiin の影響を検討する動物実験が現在進行中である。

<II. 内分泌かく乱に関連する発がん修飾機構の検討>

【実験 12 (卵摘ラットにおける estradiol の影響)】 体重増加は、DHPN 投与の有無に関わらず、EB 処置によって有意に ($P<0.01$)抑制された。下垂体相対重量は DHPN 投与に関わらず 0.1 mg の 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 投与群において、EB の用量相関性に増加し、0.02 mg 以上の EB 併用投与群では DHPN 単独群に比し有意に ($P<0.01$) 増加した。肝臓、腎臓およ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。血清 T_4 は DHPN 単独群に比較して、0.02 mg 以上の EB 併用投与で有意に ($P<0.01$)低下した。しかし、血清 TSH は EB 併用投与の用量に相関した増加傾向を示すも、各群間に統計学的有意差を認めなかった。病理組織学的検索の結果、DHPN + EB 0.1mg 群に甲状腺濾胞腺腫、DHPN + EB 0.02mg 群に甲状腺 C 細胞腺腫、DHPN 単独群に C 細胞過形成を一例ずつ認めたほかに腫瘍性病変は観察されなかった。

【実験 13 (去勢ラットにおける estradiol の影響)】 体重増加は DHPN 処置の有無に関わらず、0.02 mg 以上の EB 処置によって有意に ($P<0.05$)抑制された。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 併用投与で有意に ($P<0.01$) 増加した。肝臓およ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、0.1 mg 投与により有意に ($P<0.01$)増加した。血清 T_4 および TSH は DHPN 単独群に比較して、EB 併用投与の用量に相関した有意な ($P<0.05$ または $P<0.01$)低下および増加を示し、0.004 mg 群から統計学的に有意であった。病理組織学的検索の結果、DHPN + EB 0.1 mg 群で甲状腺濾胞上皮の増殖性病変が 20%程度に発生したが、DHPN + EB 0.004 mg 群でも一例に甲状腺濾胞腺癌が認められた。

【実験 14 (下垂体細胞の増殖に対する atrazine の影響)】 エストロゲン応答性増殖をする下垂体細胞株 MtT/E-2 に対して、atrazine は細胞増殖を活性化せず、また *in vivo* 移植下垂体細胞腫瘍形成に影響しなかった。一方、正常雌ラットに atrazine を投与した場合には、500 ppm 群において有意な血中プロラクチン値、血中エストラジール値上昇が観察され、下垂体重量も有意に増加した。

【実験 15 (前立腺エストロゲン受容体発現に対する影響)】 2、4、9 週齢におい

て、去勢1週間でエストロゲン受容体 α mRNAのレベルは有意に増加、一方でエストロゲン受容体 β のレベルは激減した。また5週齢の去勢ラットにテストステロンをi.p.投与した後、経時的に受容体mRNAを測定したところ、エストロゲン受容体 β は、24時間以内に有意に上昇し、また α 型は48時間に有意に低下した。テストステロン10 mgの1週間投与は、エストロゲン受容体 α および β mRNAレベルに有意に影響しなかった。さらに、エストロゲンとの同時投与でも、有意な変化は観察されなかった。高用量(テストステロン50 mg)、4週間投与の検討でも、テストステロン単独は、エストロゲン受容体レベルに有意に作用しなかった。しかし、エストロゲンとの同時投与では、 α 型受容体mRNAが有意に上昇した。

【実験16(リグナン類のエストロゲン活性)】 nordihydroguaiaretic acidは、 10^{-6} Mで有意なエストロゲン活性を示したが、arctiinおよびsesaminは 10^{-4} Mまでの濃度において全てのアッセイで陰性であった。

【実験17(genistein処理による細胞増殖/細胞周期への影響)】 DU145細胞では20 μ Mのgenistein濃度で中程度の増殖抑制が認められ、50、100 μ Mのgenistein濃度で著明な増殖抑制が認められた。上記実験においてgenistein処理により細胞増殖の顕著な抑制が認められたことから、ゲニステインの細胞増殖抑制作用が、細胞周期のどの位置において働いているかを検討した結果、DU145細胞では、50 μ M genistein処理後24時間で顕著なG2/M期における細胞周期の停止が認められた。G2/M期停止、DNA修復、アポトーシス誘導に関与する遺伝子であるgadd45遺伝子の発現が、genisteinによるG2/M期における細胞周期の停止に関与していると推測し、Northern blottingによりそのmRNA発現を検討した結果、細胞周期抑制が認められた濃度である50 μ Mで発現の誘導が認められ、その誘導の開始はgenistein投与6時間後より始まり、時間依存的に増強した。genisteinに

よるgadd45遺伝子の誘導が、そのプロモーター領域の活性化か否かを検討するために、gadd45遺伝子プロモーターを用いたプロモーター解析を実施した結果、gadd45遺伝子プロモーターはgenistein処理により活性化されることが明らかとなった。

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、植物エストロゲンgenistein、界面活性剤分解生成物nonylphenol、有機塩素系除草剤atrazineおよびリグナン類arctiin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。

甲状腺発がんに関与する影響については、平成11-12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影響を及ぼさないことを既に報告した。今年度はさらに、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、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にもかかわらず、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既に報告した。今年度はさらに長期間にわたる低用量での影響を検討するため、卵巣摘除ラットにDHPN処置し、EBを32週間持続投与した結果、DHPN + EB 0.1mg群に甲状腺濾胞腺腫、DHPN + EB 0.02mg群に甲状腺C細胞腺腫、DHPN単独群にC細胞過形成を一例ずつ認めたほかに腫瘍性病変は観察されなかった。また、精巣摘除ラットに同様の条件でEBを32週間持続投与した結果、DHPN + EB 0.1 mg群で甲状腺濾胞上皮の増殖性病変が20%程度に発生したが、DHPN + EB 0.004 mg群でも一例に甲状腺濾胞腺癌が認められた。したがって、低用量のエストロゲン処置でも、長期間

の曝露では、特に内因性エストロゲン活性の乏しい個体の甲状腺発がんを促進する可能性が示された。

乳腺発がんおよび影響に関しては、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、genistein 及び nonylphenol は低用量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ているが、atrazine は50 ppm以上の投与で、乳腺腫瘍の発生および増殖を促進した。一方、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トランスジェニックラットで評価した結果、nonylphenol 投与は低用量(25 ppm)で雌の乳腺上皮性腫瘍の発生を増加させる傾向を示し、雄の乳腺肉腫を増加させた。また、atrazine は5 ppmと50 ppmの投与で、腺癌の発生頻度および多発性を有意に増加させた。したがって、nonylphenol と atrazine は、本実験に関する限り、低用量域で乳腺発がんを促進する可能性が示された。しかし、卵摘したSDラットに atrazine を投与すると血中プロラクチン濃度が上昇することが報告されており、atrazine はエストロゲン受容体に親和性を持たないことから、視床下部-下垂体系による中枢性の内分泌環境の制御を攪乱して乳腺腫瘍の発生を増加させると考えられている。レセルピンやドーパミンアンタゴニストを長期間ラットに投与すると下垂体からのプロラクチン分泌を促進し乳腺腫瘍を誘発することが知られているが、プロラクチンを介した乳腺腫瘍の発生はラットに特異的な事象でありヒトには外挿されないと考えられている。

子宮発がんおよび影響に関しては、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 および nonylphenol

は子宮発がん修飾作用を示さなかった。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を混餌投与した結果、EEでは子宮の腫瘍性病変の発生が有意に増加したが、atrazine の影響はみられなかった。したがって、これら3つの物質には明らかな子宮発がん促進作用のないことが明らかとなった。

前立腺発がんおよび影響に関しては、DMABを用いるラット前立腺発がんモデルにおいて、genistein 及び nonylphenol はラット前立腺発がんの修飾作用を示さなかった。また、PhIPを用いるラット前立腺がんモデルにおいて、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を終了し、現在病理組織学的に検討中である。したがって、これら3つの物質には前立腺発がんおよび明らかな影響は現在までのところ認められていない。

卵巣発がんおよび影響に関しては、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むしろ抑制的に働くことが判明した。また、このモデルを用いて atrazine の発がん修飾効果を検討した結果、何ら影響は認められなかった。したがって、これら3つの物質には明らかな卵巣発がん促進作用のないことが明らかとなった。

ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、atrazine の発がん修飾作用を検討した結果、前がん病変の指標であるGST-P陽性肝細胞巢の数および面積が atrazine の濃度依存性に増加する傾向がみられ、atrazine 500 ppm群では有意な増加を示した。したがって、ラット多臓器中期発がん性試験法において、atrazine は弱い肝発がん促進作用を有することが示されたが、内分泌かく乱作用とは異なるメカニズムが示唆される。

このように、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、atrazine および arctiin の修飾作用を検討した結果、

既に昨年度報告したようにラット多臓器中期発がん性試験法で genistein および nonylphenol が肺腫瘍の発生を増加させた他に、atrazine および nonylphenol が *c-Ha-ras* 導入または非導入ラットにおける乳腺発がんを促進し、atrazine がラット多臓器中期発がん性試験法において弱い肝発がん促進作用を示した。atrazine による乳腺腫瘍の発生促進はこれまでの実験データに符合するが、プロラクチンを介するラットに特異的な現象とも考えられており、ヒトでのリスク評価に必ずしも適用できない可能性が高い。また、肺発がんと同様に肝発がんの促進も内分泌かく乱作用と関連しないものと考えられた。いずれにしても、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、肺および肝臓を標的とする動物モデルでの検証実験を継続中である。

また、内分泌かく乱に関連する発がん修飾機構を追究するため、以下の実験を実施した。

性腺摘除ラットに DHPN 処置し、EB を 32 週間持続投与した結果、雌では高用量 (0.1 mg) 群に甲状腺濾胞腺腫が 1 例(10%)に認められたのみであるが、雄では高用量(0.1 mg)および低用量(0.004 mg)群でそれぞれ 2 例(20%)および 1 例(10%)に濾胞腺癌が発生した。既に報告したように、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にもかかわらず、DHPN 誘発甲状腺発がんにはほとんど影響を及ぼさなかったが、低用量のエストロゲン処置でもさらに長期間の曝露では特に内因性エストロゲン産生能の乏しい個体の甲状腺発がんを促進する可能性が示された。

エストロゲン応答性増殖をする下垂体細胞株 MtT/E-2 に対して、atrazine は細胞増殖を活性化せず、また *in vivo* 移植下垂体細胞腫瘍形成に影響しなかった。一方、正常雌ラットに atrazine を投与した場合には、500 ppm 群において有意な血

中プロラクチン値、血中エストラジール値上昇が観察され、下垂体重量も有意に増加した。リグナン類のうち、arctiin および sesamin は 10^{-4} M までの濃度において、エストロゲン応答性増殖、エストロゲン依存性転写およびエストロゲン受容体結合に関するアッセイで陰性であったが、nordihydroguaiaretic acid は 10^{-6} M で有意なエストロゲン活性を示した。また、前立腺発がん過程ではエストロゲンがテストステロンに対し相乗作用を示すが、そこにはエストロゲン受容体 α の発現増強が関与していることが示唆された。

前立腺癌細胞 DU145 を用いて検討した結果、G2/M 期停止、アポトーシス誘導や DNA 修復に関与することが報告されている *gadd45* 遺伝子が genistein 処理により誘導されることを見出し、その誘導は *gadd45* のプロモーター領域を介するものであることが明らかとなった。これらの遺伝子レベルでの新知見は、内分泌かく乱に伴う発がん修飾機構を追究する上で、今後重要な情報を提供するものと期待される。

E. 結論

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、植物エストロゲン genistein、界面活性剤分解生成物 nonylphenol、有機塩素系除草剤 atrazine およびリグナン類 arctiin 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。その結果、既に昨年度報告したようにラット多臓器中期発がん性試験法で genistein および nonylphenol が肺腫瘍の発生を増加させた以外に、atrazine および nonylphenol が *c-Ha-ras* 導入または非導入ラットにおける乳腺発がんを促進し、atrazine がラット多臓器中期発がん性試験法において弱い肝発がん促進作用を示した。しかし、atrazine による乳腺腫瘍の発生促進は、ヒトでのリスク評価に必ずしも適用できない可能性が高く、肝発がんの促進も内分泌かく乱作用と関連しないものと考えられた。

その他に、低用量エストロゲンの長期曝露は内因性エストロゲン産生能の乏しい個体の甲状腺発がんを促進する可能性、リグナン類 *nordihydroguaiaretic acid* は有意なエストロゲン活性を示すこと、前立腺発がん過程でテストステロンがエストロゲン受容体 α の発現増強を介して相乗作用を示す可能性、*genistein* は G2/M 期停止、アポトーシス誘導や DNA 修復に関与する *gadd45* 遺伝子を誘導することなどを明らかにした。

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., 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.
- 2) 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.
- 3) Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., Mitsumori, K. Environmental agents, endocrine disrupting chemicals and rat thyroid carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* 14: 71-77, 2001.
- 4) Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Nakamura, A., Tsuda, T., Katsumata, T., Nishikawa, A., Hirose, M. A repeated 28 days oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.* 75: 513-521, 2001.
- 5) Okazaki, K., Imazawa, T., Nakamura, H., Furukawa, F., Nishikawa, A., Hirose, M. A repeated 28 days oral dose toxicity study of 17α -methyltestosterone in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.* 75: 635-642, 2002.
- 6) Kimoto, N., Hirose, M., Futakuchi, M., Iwata, T., Kasai, M. and Shirai, T. Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 168, 15-21, 2001.
- 7) Ueda, M., Mitsumori, K., Onodera, H., Takagi, H., Yasuhara, K., Takizawa, T., Hirose, M. Lack of modifying effects of bisphenol A and roasted soybean (Kinako) on *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous *p53* deficient CBA mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 14, 129-134, 2001.
- 8) Takagi, H., Mitsumori, K., Onodera, H., Nasu, M., Tamura, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Hirose, M. Modifying effects of endocrine disrupting chemicals on *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosoamine and sulfadimethoxine-induced thyroid carcinogenesis in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 14, 121-128, 2001.
- 9) Tsuda, H., Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Naito, A., 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.*, 477: 173-182, 2001.
- 10) Toriyama-Baba, H., Iigo, M., Asamoto, M., Iwahori, Y., Park, C. B., Han, B. S., Takasuka, N.,

- Kakizoe, T., Ishikawa, C., Yazawa, K., Araki, E., Tsuda, H. Organotropic chemopreventive effects of *n*-3 unsaturated fatty acids in a rat multi-organ carcinogenesis model. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92:1175-1183, 2001.
- 11) Asamoto, M., Ota, T., Toriyama-Baba, H., Hokaiwado, N., Naito, A. and Tsuda, H. Mammary carcinomas induced in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats are estrogen-independent, but responsive to α -limonene treatment. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 32-35, 2002.
- 12) Takasuka, N., Naito, A., Fukamachi, K., Murakoshi, M., Nishino, H. and Tsuda, H. Modifying effects of carotenoids in a rat multi-organ carcinogenesis model. inhibition in the liver but promotion of lung tumor development. *Proc. Japan Acad.*, 78: 33-38, 2002.
- 13) Han, B. S., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ohnishi, T., Maeda, M., Yamasaki, T. and Tsuda, H. Inhibitory effects of 17 β -estradiol and 4-*n*-octylphenol on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mammary tumor development in human *c-Ha-ras* proto-oncogene transgenic rats. *Carcinogenesis*, in press.
- 14) Watanabe, T., Kashida, Y., Yasuhara, K., Koujitani, T., Hirose, M. and Mitsumori, K.: Rapid induction of uterine endometrial proliferative lesions in transgenic mice carrying human prototype *c-Ha-ras* gene (rasH2 mice) given a single intraperitoneal injection of N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Lett.*, in press.
- 15) Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 171: 17-25, 2001.
- 16) Imaida, K., Sano, M., Tamano, S., Asamoto, M., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T. Organ dependent enhancement of rat 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) carcinogenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): positive effects on the intestine but not the prostate. *Carcinogenesis*. 22: 1295-1299, 2001.
- 17) Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.M., Takahashi, S., Ikeda, Y., Imaida, K., Shirai, T. Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent. *Cancer Res.* 61: 4693-4700, 2001.
- 18) Imaida, K., Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H., Shirai, T. Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 22: 467-472, 2001.
- 19) Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.M., Imaida, K., Shirai, T. Frequent *c-Ha-ras* gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Cancer Lett.* 163: 187-190, 2001.
- 20) Vinh, P.Q., Tanaka, T., et al.: Chemopreventive effects of a flavonoid antioxidant silymarin on *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 42-49, 2002.
- 21) Yanaida, Y., Tanaka, T., et al.:

- Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis*, in press, 2002.
- 22) Tanaka, T., et al.: Inhibitory effects of estrogenic compounds, 4-nonylphenol and genistein, on 7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, in press.
- 23) Kohno, H., Tanaka, T., et al.: Lack of modifying effects of 4-n-octylphenol on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in rats. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, in press.
- 24) Masuda, C., Wanibuchi, H., Otori, K., Wei, M., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S., Funae, Y. and Fukushima, S.: Presence of a no-observed effect level for enhancing effects of development of the α -isomer of benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatic foci in rats. *Cancer Lett.*, 163, 179-185, 2001.
- 25) Iwai, S., Wei, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Tanaka, R., Matsunaga, S., Yoshitaka, A., Seki, S. and Fukushima, S.: Possible prevention by abieslactone of development of diethylnitrosamine-initiated GST-P positive foci in the rat liver. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 21, 223-229, 2001.
- 26) Morimura, K., Hori, T., Kaneko, M., Nishikawa, T., Nishikawa, A., Wanibuchi, H., Takada, N., Osugi, H. and Fukushima, S.: Promotion of chemically induced rat esophageal tumorigenesis with post-initiation ethanol modification. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 21, 295-301, 2001.
- 27) Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Imaoka, S., Ogawa, M., Masuda, C., Morimura, K., Funae, Y. and Fukushima, S.: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21^{WAF1/Cip1}, cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis*, 23, 341-349, 2002.
- 28) Maruyama, S., Fujimoto, N., Asano, K., Ito A. Suppression by estrogen receptor beta of AP-1 mediated transactivation through estrogen receptor alpha. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 78, 177-184, 2001.
- 29) Yin, H., Fujimoto, N., Maruyama, S., Asano, K. Strain difference in regulation of pituitary tumor transforming gene (*PTTG*) in estrogen induced pituitary tumorigenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.* 92, 1034-1040, 2001.
- 30) Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takagi, H., Hirose, M. Dose-threshold for thyroid tumor-promoting effects of orally administered kojic acid in rats after initiation with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *J. Toxicol. Sci.* 26, 85-94, 2001.
- 31) Nitta, Y., Endo, S., Fujimoto, N., Kamiya, K., Hoshi, M. Age-dependent exposure to radioactive iodine (¹³¹I) in the thyroid and total body of newborn, pubertal and adult Fischer 344 rats. *J. Radiat. Res.* 42, 143-155, 2001.
2. 学会発表
- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 岡崎和志, 西川秋佳, 池田尚子, 孫 和永, 中村英明, 山岸 恵, 広瀬雅雄: ラット DHPN 甲状腺発がんに対する脱脂大豆投与の影響 第 17 回日本毒性病理学会総会 (2001. 1)
 - 4) Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., Nakamura, A., Tsuda, T., Katsumata, T., Nishikawa, A., Hirose, M.: A repeated 28 days oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals 第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2001.6)
 - 5) 西川秋佳, 孫 和永, 山岸 恵, 岡崎和志, 今沢孝喜, 古川文夫, 広瀬雅雄: カフェインと甲状腺刺激要因によるラット甲状腺発がんの相乗的促進 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 6) 上田 誠, 仁保直子, 小野寺博志, 瀧澤保, 渋谷 淳, 今井俊夫, 広瀬雅雄: Genistein の DMBA 誘発ラット乳腺腫瘍に対する修飾作用, 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 7) 上田 誠, 仁保直子, 今井俊夫, 小野寺博志, 瀧澤保, 渋谷 淳, 広瀬雅雄: Nonylphenol の DMH-DMBA 誘発ラット乳腺および大腸腫瘍に対する修飾作用, 第 18 回日本毒性病理学会 (2002. 1)
 - 8) 大西隆仁, 鳥山一馬場弘靖, 内藤暁宏, 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 NMBA による食道発がん感受性と遺伝子発現の解析, 第 90 回日本病理学会 (2001. 4)
 - 9) 松岡洋一郎, 鳥山一馬場弘靖, 津田洋幸, 川口博明, 吉田浩己, 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 90 回日本病理学会 (2001. 4)
 - 10) 関根一則, 飯郷正明, 藤田健一, 韓範錫, 鳥山一馬場弘靖, 大澤俊彦, 津田洋幸, テトラヒドロクロルミン (THC) による PhIP 誘導発がんへの影響, 第 8 回日本がん予防研究会 (2001. 7)
 - 11) 松岡洋一郎, 川口博明, 馬場弘靖, 吉田浩己, 津田洋幸, ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析, 第 20 回分子病理学研究会 (2001. 7)
 - 12) 津田洋幸, Ras 発がんの検証・守る・作る, 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 13) 鳥山一馬場弘靖, 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経胎盤発がん感受性, 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 14) 松岡洋一郎, 川口博明, 馬場弘靖, 吉田浩己, 津田洋幸, ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析, 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 15) 大西隆仁, 上田しのぶ, 内藤暁宏, 泉啓介, 津田洋幸, ヒトプロト型 c-Ha-ras transgenic rat (Tg) に対する発がん感受性試験, 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 16) 関根一則, 飯郷正明, 藤田健一, 早澤宏紀, 津田洋幸, ウシラクトフェリン (bLF) による PhIP 誘発前立腺発がんの抑制効果, 第 60 回日本癌学会総会, 横浜市, (2001. 9)
 - 17) 内藤暁宏, 上田しのぶ, 津田洋幸, c-Ha-ras transgenic rat 由来乳腺腫瘍細胞の確立と形質の解析, 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 18) 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における導入遺伝子 H-ras による膜タンパク NLRR-3 の遺伝子発現制御, 第 60 回日本癌学会総会 (2001. 9)
 - 19) Maeda, M., Uehara, N., Degawa, M., Sato, K., Kunimoto, T., Takasuka, N., Sato, N., Tsuda, H., HICAs

- combination exposure does not always enhance carcinogenic potential in rat liver and colon. Implications of molecular associations as possible mechanisms. 8th International Conference on Environmental Mutagens, (2001. 10)
- 20) Tsuda, H., Ohnichi, T., Toriyama·Baba, H., Matsuoka, Y., Naito, A., Han, B. S., Asamoto, M., Ochiya, T., Terada, M., Izumi, K. Possible application of human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats to medium-term screening assays for environmental carcinogens. 8th International Conference on Environmental Mutagens, (2001. 10)
- 21) 松岡洋一郎、川口博明、鳥山一馬場弘靖、吉田浩己、津田洋幸、ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの乳腺発がん高感受性の機序解析、第 18 回日本疾患モデル学会、(2001. 11)
- 22) 松岡洋一郎、川口博明、鳥山一馬場弘靖、深町勝巳、吉田浩己、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットの発がん感受性とその機序の解析、第 18 回日本毒性病理学会、(2002. 1)
- 23) 大西隆仁、上田しのぶ、内藤暁宏、泉啓介、津田洋幸、ヒトプロト型 c-Ha-ras transgenic rat(Tg)の発がん物質中期検索モデルへの応用、第 18 回日本毒性病理学会、(2002. 1)
- 24) 鳥山一馬場弘靖、内藤暁宏、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 F344 ラットの発がん感受性、第 18 回日本毒性病理学会、(2002. 1)
- 25) 深町勝巳、韓範錫、高須賀信夫、津田洋幸、ヒト c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける Nonylphenol の乳腺発癌への影響、第 18 回日本毒性病理学会、(2002. 1)
- 26) 松岡洋一郎、川口博明、鳥山一馬場弘靖、深町勝巳、吉田浩己、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の機序解析、第 91 回日本病理学会、(2002. 3)
- 27) 渡邊隆夫、三森国敏、上田誠、小野寺博志、広瀬雅雄：ENU 子宮内投与 ICR マウスにおけるアトラジンの子宮腫瘍修飾作用、第 18 回日本毒性病理学会 (2002. 1)
- 28) 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、加国雅和、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 90 回日本病理学会総会、(2001. 4)
- 29) 三橋 誠、鰐淵英機、清家則孝、福島昭治：F344 ラットを用いた atrazine の多臓器発癌作用の検討。第 8 回日本がん予防研究会、(2001. 7)
- 30) 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、森川剛志、星 学、福島昭治：内分泌攪乱化学物質であるノニルフェノール及びゲニステインの肺発癌促進作用。第 60 回日本癌学会総会、(2001. 9)
- 31) 三橋 誠、鰐淵英機、土井賢一郎、魏民、森村圭一朗、村井 隆、福島昭治：F344 ラット諸臓器における atrazine の発癌修飾作用。第 60 回日本癌学会総会、(2001. 9)
- 32) 三橋 誠、鰐淵英機、土井賢一郎、魏民、森村圭一朗、福島昭治：Atrazine の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌検査法による検討。第 18 回日本毒性病理学会、(2002. 1)
- 33) 三橋 誠、鰐淵英機、土井賢一郎、魏民、清家則孝、福島昭治：Atrazine の発癌修飾作用：ラット多臓器中期発癌発癌性試験法による検討。第 91 回日本病理学会総会、(2002. 3)
- 34) Fujimoto, N., Yin, H., Maruyama, S., Asano, K., Ito, A. Estrogen dependent tumorigenesis and the regulation of PTTG in the rat pituitary gland. 5th Joint Conference of AACR and JCA, Maui, HI, U.S.A., 2001 (Proceedings A-93)
- 35) 浅野耕助、藤本成明、丸山聡、碓井亞

- ラットエストロゲン受容体 β の発現機構の解析 第74回日本内分泌学会学術総会, 2001 (日本内分泌学会雑誌、77、100、2001).
- 36) 丸山聡、藤本成明、浅野耕助、碓井亞ラット前立腺におけるエストロゲンレセプター α 、 β の発現 第74回日本内分泌学会学術総会、2001 (日本内分泌学会雑誌、77、164、2001).
- 37) 藤本成明、丸山聡 ノニルフェノールおよびアトラジン経口投与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60回日本癌学会総会、2001 (日本癌学会総会記事、68、2001)
- 38) 佐能正剛、杉原数美、北村繁幸、藤本成明、太田茂 スチルベン誘導体のエストロゲン作用と代謝活性化及び構造活性相関 フォーラム 2001：衛生薬学環境トキシコロジー、(抄録集 04-1)
- 39) 佐能正剛、杉原数美、北村繁幸、吉原新一、藤本成明、渡邊敦光、太田茂 スチルベン誘導体のエストロゲン作用における構造活性相関ならびにその生殖器への影響 環境ホルモン学会第4回研究発表会 2001 (要旨集 PB-21)
- 40) 鈴木智晴、北村繁幸、太田茂、藤本成明 環境中からの抗アンドロゲン物質のスクリーニング 環境ホルモン学会第4回研究発表会 2001 (要旨集 PB-17)

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

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

平成 13 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： 昨年度までの研究期間において、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明らかにしてきた。今年度は農薬の 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 24 週間混餌投与した結果、病理組織学的に atrazine の投与に起因する甲状腺腫瘍の発生増加は観察されなかった。この成績は、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可能性を示す。一方、エストロゲン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 -estradiol 3-benzoate を 32 週間皮下埋植した結果、病理組織学的に雌では甲状腺濾胞腺腫が 0.1 mg 群に観察されたのみであったが、雄では明らかな用量相関性はないものの甲状腺濾胞腺腫が 0.004 mg 群の一例に観察された。このことは、低用量のエストロゲンでも、長期間の曝露では内因性エストロゲン活性の乏しい個体の甲状腺発がんを促進する可能性を示唆する。

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を明らかにし、ヒトがんに及ぼす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、昨年度までの研究期間において、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。さらに、二段階ラット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同時処置した結果、著明な発がん促進効果が認められた。

今年度は、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) を長期間皮下埋植し、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病理組織学的に検討した。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、内分泌かく乱作用を有する食品中の汚染物質 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病理組織学的に検討した。

B. 研究方法

<I. ラット甲状腺発がんおよび atrazine の影響>

【実験 1】 Fig. 1 に示すように、6 週齢の F344 雄ラット 120 匹を 6 群に分け、第 1 群～第 4 群 (各群 20 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 を混餌投与した。DHPN 処置をしなかった第 5 群には 500 ppm の atrazine のみを混餌投与し、第 6 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、血清ホルモン値測定および病理組織学的検索を実施した。

<II. 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 2】 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 33 週後に、臓器重量測定、血清ホルモン値測定および病理組織学的検索を実施した。

【実験 3】 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 2600 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 33 週後に、臓器重量測定、血清ホルモン値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. ラット甲状腺発がんおよび atrazine の影響>

【実験1】 Table 1 に示すように、体重増加は atrazine の用量に相関して抑制される傾向を示したが、各群間に統計学的有意差は認められなかった。甲状腺および下垂体を含めて、諸臓器の相対重量には有意な群間差を認めなかった (Table 1)。Table 2 に、血清 T_3 、 T_4 および TSH の測定データを示す。DHPN + atrazine 500 ppm 群 (第1群) では、DHPN 単独群 (第4群) に比較して T_4 が有意に低下した以外には、血清甲状腺関連ホルモンに及ぼす DHPN または atrazine 投与の影響は認められなかった。病理組織学的検索の結果、atrazine の投与に起因する腫瘍性病変の発生増加は甲状腺を含めたいずれの臓器にも観察されなかった。

<II. 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2】 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 投与の有無に関わらず EB 処置によって有意に ($p < 0.01$) 抑制された (Table 3)。下垂体相対重量は DHPN 投与に関わらず 0.1 mg の EB 処置によって高度に ($p < 0.01$) 増加した (Table 3)。甲状腺相対重量は DHPN 投与群において、EB の用量相関性に増加し、0.02 mg 以上の EB 併用投与群では DHPN 単独群に比し有意に ($p < 0.01$) 増加した (Table 3)。肝相対重量および腎相対重量は、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。子宮相対重量も同様に、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。

Table 4 に、血清 T_3 、 T_4 および TSH の測定データを示す。血清 T_3 については、DHPN 単独群に比較して、DHPN + EB 0.1 mg 群で有意な ($p < 0.05$) 上昇がみられた以外に各群間に統計学的有意差を認めなかった。血清 T_4 は DHPN 単独群に比較して、0.02 mg 以上の EB 併用投与で有意に ($p < 0.01$) 低下した。しかし、血清 TSH は EB 併用投与の用量に相関した増加傾向を示すも、各群間に統計学的有意差を認めなかった。病理組織学的検索の結果、DHPN + EB 0.1 mg 群に甲状腺濾胞腺腫、DHPN + EB 0.02 mg 群に甲状腺 C 細胞腺腫、DHPN 単独群に C 細胞過形成を一例ずつ認めたほかに腫瘍性病変は観察されなかった (Table 5)。

【実験3】 摂餌量は EB 処置でやや増加したが、各群間に有意差はなく、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 または 0.02 mg の EB 処置によって有意に ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) 抑制された (Table 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 (Table 6)。甲状腺相対重量は DHPN 処置群において、0.1 mg の EB 併用投与で有意に ($p < 0.01$) 増加した (Table 6)。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。Table 7 に、血清 T_3 、 T_4 および TSH の測定データを示す。血清 T_3 については、DHPN 単独群に比較して、DHPN + EB 0.02 mg 群で有意な ($p < 0.01$) 上昇がみられた以外に各群間に統計学的有意差を認めなかった。血清 T_4 および TSH は DHPN 単独群に比較して、EB 併用投与の用量に相関した有意な ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) 低下および増加傾向を示し、0.004 mg 群から統計学的に有意であった。病理組織学的検