

**Table 1 Survival rate, final body weights, and relative organ weights in atrazine-treated-ovariectomized rats**

DMBA	Presence of tumors at week 19	Dose (ppm)	Survival rate (%)	Final body weight (g)	Relative organ weight				
					Liver (g/g%)	Kidneys (g/g%)	Uterus (mg/g%)	Pituitary (mg/g%)	Adrenals (mg/g%)
(+)	(+)	0	7/18(39)	449±54	2.86±0.27	0.54±0.04	49.3±18.6	4.03±0.60	18.1±4.7
(+)	(+)	5	11/20(55)	460±80	2.64±0.24#	0.49±0.05#	57.8±46.8	3.97±0.95	17.7±9.2
(+)	(+)	50	9/18(50)	437±189	3.50±0.92	0.65±0.31	51.7±29.5	4.13±1.49	25.0±15.5
(+)	(+)	500	8/21(38)	464±76	2.92±0.27	0.49±0.06#	43.9±12.2	4.06±0.38	21.5±14.9
(+)	(-)	0	14/19(74)	390±74	4.10±4.63	0.87±0.98	95.9±149.3	4.62±0.96	17.1±8.0
(+)	(-)	5	16/19(84)	430±55	3.38±1.54	0.56±0.09	47.9±19.3	4.55±0.93	13.2±3.8
(+)	(-)	50	7/12(58)	441±62	3.20±0.51	0.60±0.11	83.2±95.0	4.29±0.73	13.8±4.7
(+)	(-)	500	19/19(100)*	391±34	3.30±0.41	0.63±0.06	50.5±14.4	5.16±0.90	16.7±4.6
(-)	(-)	0	8/8(100)	471±84	2.64±0.31	0.50±0.05	45.1±13.2	4.81±0.77	11.5±3.3
(-)	(-)	500	7/7(100)	450±103	2.90±0.35	0.55±0.07	45.6±13.8	4.70±0.66	11.3±2.4

\*: P<0.05 (Logrank test)

#: P<0.05 (t-test)

**Table 2 Regression rate, incidence, number and volume of DMBA-induced mammary tumors in atrazine-treated-ovariectomized rats at necropsy**

DMBA	Presence of tumors at week 19	Dose (ppm)	No. of rats	No. of regressed tumor after OVX (%)	Incidence (%)		Multiplicity (No./rat)	Volume (cm <sup>3</sup> /mass)	
					Total	Carcinoma			
(+)	(+)	0	18	21/35 (60)	13 (72)	5 (28)	11 (61)	1.7±1.5	19.1±32.3
(+)	(+)	5	20	27/47 (57)	16 (80)	7 (35)	13 (65)	1.8±1.4	17.3±33.9
(+)	(+)	50	18	27/40 (68)	17 (94)	10 (56)	10 (56)	1.3±0.8	34.2±82.7
(+)	(+)	500	21	22/44 (50)	15 (71)	7 (33)	13 (62)	1.6±1.4	37.1±61.8
(+)	(-)	0	19	-	5 (26)	3 (16)	2 (11)	0.3±0.6	2.8±2.3
(+)	(-)	5	19	-	2 (11)	1 (5)	2 (11)	0.2±0.5	15.0±25.3
(+)	(-)	50	12	-	5 (42)	1 (8)	4 (33)	0.6±0.8	20.1±24.3#
(+)	(-)	500	19	-	11 (58)*	4 (21)	8 (42)*	0.9±1.1	13.3±20.5
(-)	(-)	0	8	-	0	0	0	0	0
(-)	(-)	500	7	-	0	0	0	0	0

Benign: Fibroadenoma, adenoma

\*: P<0.05 (Fisher's exact probability test)

#: P<0.05 (Mann-Whitney's U test)

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

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 (Tg) を用いて評価した。被験物質として環境中に存在する洗剤由来の nonylphenol、除草剤の atrazine および食品中に存在する arctiin について調べた。方法は、50 日齢時に 7,12-dimethylbenz [a]anthracene (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 をそれぞれ基礎食中に加えて雌は 8 週、雄は 20 週まで投与した。野生型にも同様の実験を行った。その結果、Tg において乳腺腫瘍の発生は nonylphenol では雌の 10 ppm で腺腫+腺がん数の増加傾向、雄で乳腺部肉腫が 25 ppm で有意の増加、atrazine は雌で 10 ppm で腺腫+腺がん数の増加傾向、雄で乳腺部肉腫が 25 ppm で有意の増加がみられ、この発がん高感受性動物において両者の低用量域で促進する可能性が示された。しかし、実際にはヒトへにはあり得ない曝露量である。Arctiin については標本作製中である。

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。その理由は被験物質の発がん性を低用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内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による発がん修飾作用の有無を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

洗剤由来の nonylphenol、除草剤の atrazine および食品中に存在する arctiin について乳腺発がんに関与する影響を調べた。50 日齢時に 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 を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。

C. 研究結果

Nonylphenol 投与では、乳腺腫瘍（腺腫+腺がん）の個数/ラットは雌で 0 ppm で 5.80、25 ppm で 8.22、250 ppm で 4.50 であり、25ppm 投与で増加傾向がみられた。また雄では乳腺肉腫が 0 ppm で 0.11、25 ppm で 0.57、250 ppm で 0 であり 25 ppm で有意の増加 ( $P<0.05$ ) がみられた。Atrazine 投与では、乳腺腫瘍（腺腫+腺がん）は、雌で 0 ppm で 3.17、5 ppm で 7.83、50 ppm で 10.33、500 ppm で 6.00 であり、5 と 50 ppm で増加

傾向がみられたが、雄では差は無かった。腺がんの頻度では雌で 0 ppm で 3/6

(50%)、5 ppm で 6/6 (100%)、50 ppm で 6/6 (100%)、500 ppm で 6/7 (87.5%) であり、5 と 50 ppm で有意の増加がみられた。雄の乳腺上皮性腫瘍、肉腫にはいずれも差はなかった。屠殺時の両物質の血清中濃度を LC-MS で測定したが検出限界以下であった。Arctiin では、肉眼的に差異は観察されなかった(標本作製中)。以上から、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を用いて評価した結果、nonylphenol 投与では、低い用量の 25 ppm 投与群で雌で乳腺上皮腫瘍発生の増加傾向、雄で肉腫の増加がみられた。Atrazine 投与では、腺がんの頻度で 5 ppm と 50 ppm で有意の増加 ( $P < 0.05$ ) がみられ、数でも同様な傾向がみられた。したがって、nonylphenol と atrazine では本実験では低用量域で乳腺発がんを促進する可能性が示唆された。

#### 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いる。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検索でき得ると考えた。本研究によってエストロゲン作用物質の nonylphenol と atrazine は低用量域で乳腺発がんを促進したことは、発がん高感受性状態ではこのような物質は乳腺発がんを促進する可能性のあることが示唆された。しかし環境中のこれらの検出される濃度から較べるとおおきな乖離があり、この結果をヒトに外挿するにはさらに低用量域における研究が必要と考える。

#### E. 結論

本トランスジェニックラットの乳腺発がんは nonylphenol と atrazine の低用量域で乳腺発がんを促進する可能性が示唆

された。発がん高感受性状態ではこのような内分泌かく乱物質は乳腺発がんを促進する可能性が示されたが、環境中のこれらの検出される濃度から較べると何万倍も異なり、この結果をヒトに外挿するにはさらに低用量域にて検証する必要がある。

#### F. 健康危険情報

Nonylphenol と Atrazine の低用量域で乳腺発がんを促進する可能性が示されたが、環境中に検出される、ヒトが摂取すると考えられる量と較べると乖離は大きく、この結果を直接ヒトに外挿することは出来ない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tokuzen, R., Iwahori, Y., Asamoto, M., Iigo, M., Hasegawa, F., Satoh, T., Ishidate, M. Jr. and Tsuda, H. Establishment and characterization of three new rat renal cell carcinoma cell lines from *N*-methyl-*N*-hydroxyethylnitrosamine-induced basophilic cell tumors. *Pathol. International*, 51: 65-71 (2001).
- 2) 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).
- 3) Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Kitanaka, C., Kuchino, Y. and Tsuda, H. Rat neuronal leucine-rich repeat protein-3: cloning and regulation of the gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287: 257-263 (2001).
- 4) 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).
- 5) 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  $\alpha$ -limonene treatment. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 32-35 (2002).
- 6) 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).
- 7) Tsuda, H., Sekine, K., Fujita, K. and Iigo, M. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms - a review of experimental and clinical studies. *Biochem. Cell. Biol.*, 80: 131-136 (2002).
- 8) Han, B. S., Fukamachi, K., Takasuka, N., Ohnishi, T., Maeda, M., Yamasaki, T. and Tsuda, H. Inhibitory effects of  $17\beta$ -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*, inpress (2002).
- 9) Fujita, K., Ohnishi, T., Sekine, K., Iigo, M. and Tsuda, H. Down-regulation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx)-induced CYP1A2 expression is associated with bovine lactoferrin inhibition of MeIQx-induced liver and colon carcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: inpress (2002).
2. 学会発表
- 1) 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、東京、(2001 年 4 月)
- 2) 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、東京、(2001 年 4 月)
- 3) Tsuda, H., Iigo, M., Sekine, K., Tatematsu, M., Fukushima, S., Goldberg, G. S., Cancer chemoprevention by lactoferrin and analysis of the mechanisms. 5th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Banff, (May 2001)
- 4) Fujita, K., Sekine, K., Iigo, M., Tsuda, H., Possible involvement of Fas (CD95) in inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis by bovine lactoferrin in the rat. 5th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Banff, (May 2001)
- 5) Sekine, K., Fujita, K., Degawa, M., Harada, Y., Hayasawa, H., Tsuda, H., Preventive effects of bovine lactoferrin (bLF) on caffeine enhanced colon carcinogenesis in rats. 5th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function and Applications, Banff, (May 2001)
- 6) 糸戸一宏、落谷孝広、鳥山一馬場弘靖、木本重信、津田洋幸、寺田雅昭、ラット ES 細胞樹立に向けてのラット胚の凍結・保存・培養方法に関する検討、日本実験動物科学技術大会 2001、横浜市、(2001 年 5 月)
- 7) 飯郷正明、島村真里子、野本博、津田洋幸、ラクトフェリンによるマクロファージからのサイトカインの分泌と

- 発がん抑制、第8回日本がん予防研究会、名古屋市、(2001年7月)
- 8) 藤田健一、関根一則、飯郷正明、津田洋幸、ウシラクトフェリン(bLF)によるAOM投与ラット大腸におけるFas(CD95)の発現増加、第8回日本がん予防研究会、名古屋市、(2001年7月)
  - 9) Han, B. S., Takasuka, N., Takahashi, T., Tsuno, T., Taniguchi, H., Tsuda, H. Chemopreventive effects of 3-Ethyl (4-Geranyloxy-3-Methoxyphenyl)-2-propenoate (EGMP) and ferulic acid (FA) in mouse colon carcinogenesis, 第8回日本がん予防研究会、名古屋市、(2001年7月)
  - 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、テトラヒドロクルクミン(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、名古屋市、(2001年7月)
  - 11) 高須賀信夫、高橋徹行、馬場正樹、奥山徹、西野輔翼、津田洋幸、甘草成分IsoliquiritigeninのPGE2及びNO産生阻害作用、第8回日本がん予防研究会、名古屋市、(2001年7月)
  - 12) 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、仙北郡、(2001年7月)
  - 13) 藤田健一、関根一則、飯郷正明、津田洋幸、ウシラクトフェリンのラット大腸発がん抑制作用におけるFas(CD95)の関与、第16回発癌病理研究会、大津市、(2001年8月)
  - 14) 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、横浜市、(2001年9月)
  - 15) 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、横浜市、(2001年9月)
  - 16) 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、横浜市、(2001年9月)
  - 17) 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、横浜市、(2001年9月)
  - 18) 飯郷正明、佐藤淳、藤田健一、津田洋幸、インターフェロンガンマ欠損マウスにおけるラクトフェリンの肺転移抑制、第60回日本癌学会総会、横浜市、(2001年9月)
  - 19) 藤田健一、関根一則、飯郷正明、津田洋幸、ラクトフェリンによるラット大腸発がん抑制におけるアポトーシスの関与、第60回日本癌学会総会、横浜市、(2001年9月)
  - 20) 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年9月)
  - 21) 高須賀信夫、韓範錫、高橋徹行、築野卓夫、谷口久次、津田洋幸、米糖由来成分フェルラ酸及び3-Ethyl(4-Geranyloxy-3-Methoxyphenyl)-2-Propenoate(EGMP)のマウス大腸発がんに対する予防効果、第60回日本癌学会総会、横浜市、(2001年9月)
  - 22) 高橋徹行、高須賀信夫、馬場正樹、奥山徹、西野輔翼、津田洋幸、甘草成分IsoliquiritigeninのPGE2及びNO産生阻害作用、第60回日本癌学会総会、横浜市、(2001年9月)
  - 23) 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、横浜市、(2001年9月)
  - 24) 前田満和、上原宣昭、津田洋幸、水溶性フタロシアン錯体による多環式

- 芳香族発がん物質の除去、第 60 回日本癌学会総会、横浜市、(2001 年 9 月)
- 25) 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 NLRP-3 の遺伝子発現制御、第 60 回日本癌学会総会、横浜市、(2001 年 9 月)
- 26) 西川隆之、森村圭一郎、金子雅宏、小川元女、森川剛志、須方督夫、津田洋幸、NMBA ラット食道発癌モデルにおけるウシラクトフェリン(bLF)の影響、第 60 回日本癌学会総会、横浜市、(2001 年 9 月)
- 27) 塚本徹哉、野崎浩二、清水伸幸、稲田健一、田中晴就、曹雪源、上西紀夫、杉山敦、津田洋幸、関根一則、立松正衛、高濃度 NaCl 投与なし Lactoferrin 投与が Helicobacter pylori 感染スナネズミ腺胃発癌モデルに及ぼす影響、第 60 回日本癌学会総会、横浜市、(2001 年 9 月)
- 28) 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, Shizuoka-City, (Oct. 2001)
- 29) 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, Shizuoka-City, (Oct. 2001)
- 30) 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 18 回日本疾患モデル学会、名古屋市、(2001 年 11 月)
- 31) 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、東京、(2002 年 1 月)
- 32) 田中卓二、甲野裕之、津田洋幸、フェルラ酸誘導体 EGMP の 4-NQO 誘発ラット舌発がん抑制効果、第 18 回日本毒性病理学会、東京、(2002 年 1 月)
- 33) 高須賀信夫、韓範錫、高橋徹行、築野卓夫、谷口久次、津田洋幸、米糖由来成分フェルラ酸及び 3-Ethyl(4-Geranyloxy-3-Methoxyphenyl)-2-Propenoate(EGMP)のマウス大腸発がんに対する予防効果、第 18 回日本毒性病理学会、東京、(2002 年 1 月)
- 34) 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、東京、(2002 年 1 月)
- 35) 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、東京、(2002 年 1 月)
- 36) 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、東京、(2002 年 1 月)
- 37) 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、横浜市、(2002 年 3 月)
- 38) 内藤暁宏、上田しのぶ、津田洋幸、ラット実験肝発がんの悪性進展における TGF $\alpha$  の果たす役割、第 91 回日本病理学会、横浜市、(2002 年 3 月)

39) 飯郷正明、藤田健一、野本博、山本富美、津田洋幸、インターフェロンガンマ欠損マウスにおけるラクトフェリンの肺転移抑制及びIL-7の誘導、第122年会日本薬学会、千葉市、(2002年3月)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他



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 年度分担研究報告書

食品中内分泌攪乱化学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 東京農工大学家畜病理学教室教授

研究要旨： ICR 系雌マウスに ENU 50mg/kg を経腔的に単回子宮腔内投与し、1 週間後よりアトラジン（5, 50 及び 500 ppm）およびエチニールエストラジオール（2.5 ppm）を 26 週間混餌投与した。その結果、アトラジンのいずれの投与群においても ENU 単独群に比べ、子宮増殖性病変の発生頻度に差は認められなかった。一方、エチニールエストラジオール群では、子宮内膜の腺癌および異型過形成の発生が有意に増加した。現在、ICR 雌マウスに同様に ENU（50 mg/kg）を経腔的に直接子宮腔内に投与し、その後アルクチイン（40, 200, 1000 ppm）を 26 週間混餌投与し、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*-methyl-*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。昨年度は、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結果、これらの物質に何ら修飾作用はみられなかった。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。そこで、昨年度は、このモデルを用いて、ゲニステイン、ノニルフェノール及びメトキシクロールの子宮腫瘍修飾作用を検討した結果、ゲニステイン、ノニルフェノールには子宮修飾作用はなかったが、メトキシクロールではその子宮癌の発生が完全に抑制される成績を得た。今年度は、既に子宮発がんモデルとして既に報告されている ENU 子宮内投与モデルを用いて、雌 ICR マウスの子宮内に ENU (50 mg/kg) を直接注入し、イニシエーション処置した雌 ICR マウスモデルを用いてアトラジン及びアルクチインの子宮腫瘍に対する影響を検討した。

B. 研究方法

実験 1 では、雌 ICR マウス（日本 SLC）に生理食塩水で溶解した ENU（ナカライテスク）50 mg/kg を経腔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のアトラジンを、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 (Soybean free diet) に混じてこれらを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2では、同様のプロトコールで、第1群に40 ppm、第2群には200 ppm、第3群には1000 ppm のアルクチン含有飼料を、対照群には基礎飼料 (NIH 変型) を ENU 投与1週間後より26週間自由に与え、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第1群で100%、第2群および第3群で88%、第4群で100%であった。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、アトラジン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は ENU 単独投与群 (第5群) に比し、アトラジン群では絶対重量および相対重量ともに差は認められなかった。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は、アトラジン群では対照群との間に差は認められなかったものの、EE群では Atypical hyperplasia (第1~3群, 0%; 第4群, 12%) および Adenocarcinoma (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 (表1)。

実験2：現在投与実験を継続している。これまでのところアルクチン投与群では死亡動物数、体重、接餌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。

### D. 考察

雌ICRマウスに ENU 50mg/kg を経膈的に単回子宮腔内投与し、弱い抗エストロゲン作用を有するアトラジンの子宮発癌に対する修飾作用を検討した実験では、ENU+アトラジン群では子宮増殖性病変の発現は ENU 単独

投与群と同頻度であった。一方、陽性対照として設けた ENU+EE 群では Adenocarcinoma が29.4%に、Atypical hyperplasia が11.8%にそれぞれ誘発された。また、既に報告した、ENU でイニシエーションした p53(+/-)CBA マウスを用いた実験においても、アトラジンは子宮増殖性病変の発現に何ら修飾作用を及ぼさないことが示されていることから、強いエストロゲン作用を有する EE では ENU で誘発された子宮内膜や子宮腺の増殖性病変を増強するものの、弱い抗エストロゲン作用を有するアトラジンはそれらの増殖性病変に対して何ら修飾作用を示さないことから、弱い抗エストロゲン作用を有する内分泌攪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。

### E. 結論

ICR 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、アトラジンについて子宮発癌修飾作用を検索したが、アトラジンには子宮発癌修飾作用は認められなかった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

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.* 14: 129-134. 2001.

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.

#### 2. 学会発表

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 東京）

Table 1. Incidence (%) of uterine histopathological findings in ICR mice treated with atrazine for 26 weeks after ENU initiation

Group (Dose:ppm)	Mortality (%)	N	Final body weight (g)	Relative uterine weight (mg%)	Uterus (%)		
					Endometrial hyperplasia	Atypical hyperplasia	Adenocarcinoma
1 Atrazine (5)	100	17	54.7±7.1	572.4±390.5	35.3	0	0
2 Atrazine (50)	88	17	49.5±7.1	629.7±417.9	35.3	5.9	0
3 Atrazine (500)	88	17	47.1±7.5	590.2±275.1	11.8	0	0
4 EE (2.5)	100	17	35.6±7.5	509.0±222.7	41.2	11.8	29.4
5 Cont (0)	88	17	52.0±13.2	1206.3±509.4	41.2	0	0

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 香川医科大学 医学部 第一病理学 教授（9月1日より）  
（名古屋市立大学 医学部 第一病理学教室 助教授：8月31日まで）

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に、Nonylphenol および Genistein の長期実験を行い、両物質ともラット前立腺発がんの修飾作用を示さないことを明らかにした。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を終了し、現在病理組織学的検討を行っている。

#### 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や男性ホルモン様活性を示すことが疑われている。また、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も報告されており、このような内分泌かく乱作用の疑われている化学物質によるヒトの健康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、本研究では我々の開発したラット前立腺発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、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

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た。その実験デザインを図 1 に示す。6 週齢の F344 雄ラットを 4 群に分け、1-3 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 回づつ合計 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、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。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性病変の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 を用いたラット前

立腺発がん実験系は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、2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP) を用いることとし、100 mg/kg 体重の PhIP を週 1 回づつ 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ている (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ならびに香川医科大学医学部動物実験委員会の承認をそれぞれ得ており、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。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。

前立腺の腫瘍性病変のまとめを表 1、精囊の腫瘍性病変のまとめを表 2 に示す。前立腺ではその前がん病変と考えられる prostate intraductal neoplasia (PIN) を 'Simple' と 'Severe' に分類し、その他腺

がんならびにその両者をまとめ、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示したが、いずれの値も群間で有意差は見られず、Nonylphenol および Genistein いずれにも前立腺発がんの修飾作用を示さないことを明らかにした (表 1)。さらに、精囊の腫瘍性病変ではその前がん病変である異型性過形成 (Atypical hyperplasia) と腺がんおよびその両者いずれかの病変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、いずれの値も群間で統計学的に有意差は認めなかった。

2. Atrazine の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 (図 3)。また、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。

### 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 Genistein 投与群で高濃度投与群、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、Nonylphenol と Genistein 投与によるラットの内内分泌かく乱作用は明らかではなかった。また、前立腺および精囊の腫瘍性病変の発生頻度ならびにラット一匹あたりの発生個数で群間に差は見られず、Nonylphenol および Genistein は前立腺発がんの修飾作用を示さないことを明らかにした。

Atrazine に関しては現在病理組織学的な解析を行っており、その結果を見て最終的な結論を出したい。

### E. 結論

Nonylphenol および Genistein はラット前立腺発がんの修飾作用を示さない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. Futakuchi, M., Hirose, M., Imaida, K., Takahashi, S., Ogawa, K., Asamoto, M., Miki, T., Shirai, T. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine-induced colon carcinogenesis by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethyl hydroquinone after initiation with 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Carcinogenesis*. 23: 283-287, 2002.
2. Imaida, K., Kuzutani, K., Wang, J., Fujiwara, O., Ogiso, T., Kato, K., Shirai, T. Lack of promotion of 7,12-dimethylbenz [a]anthracene-initiated mouse skin carcinogenesis by 1.5 GHz electromagnetic near fields. *Carcinogenesis*. 22: 1837-1841, 2001.
3. Mori, T., Imaida, K., Tamano, S., Sano, M., Takahashi, S., Asamoto, M., Takeshita, M., Ueda, H., Shirai, T. Beef tallow and but not perilla or corn oil and promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Jpn J Cancer Res*. 92: 1026-1033, 2001.
4. 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 and purple corn color and 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.
5. 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.

6. 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.
7. Ogawa, K., Nakanishi, H., Takeshita, F., Futakuchi, M., Asamoto, M., Imaida, K., Tatematsu, M., Shirai, T. Establishment of rat hepatocellular carcinoma cell lines with differing metastatic potential in nude mice. *Int J Cancer*. 91: 797-802, 2001.
8. 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.
9. 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.

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

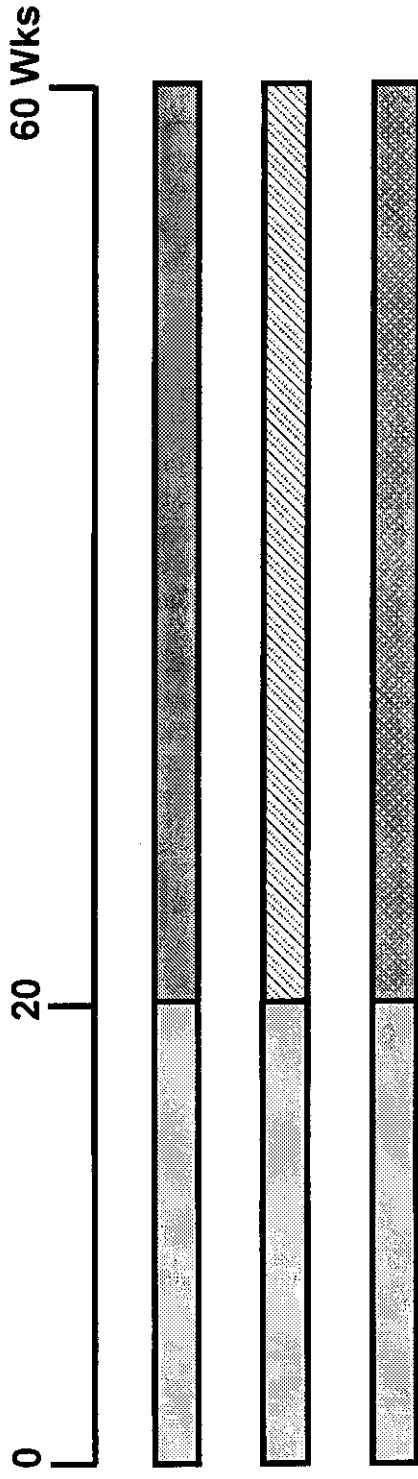
なし

##### 2. 実用新案登録





なし

##### 3. その他

なし

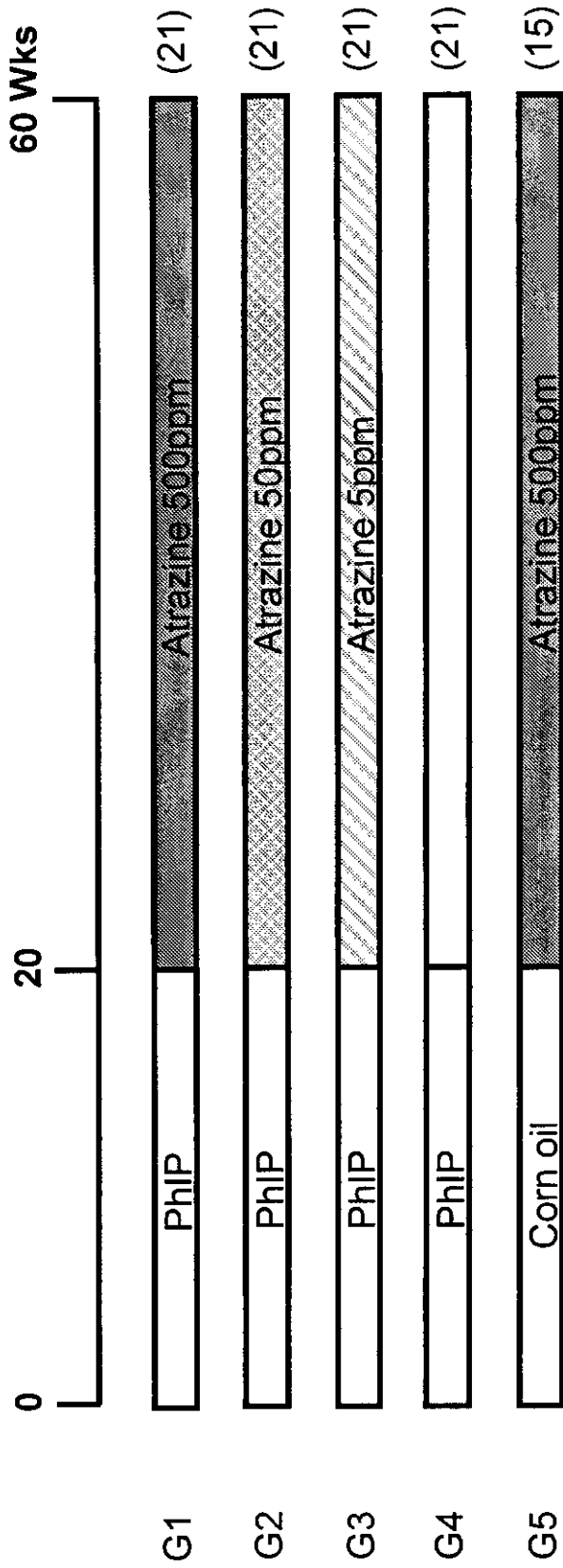


**Animals:** F344 male rats, 6 wks. of age

-  3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) 50 mg/kg b.w. sc biweekly (10 times)
-  Soybean free diet (Oriental Yeast, Co.)
-  Nonylphenol in diet at the level of 2000, 250 or 25ppm
-  Genistein in diet at the level of 250 or 25ppm

# Experimental design ( I )





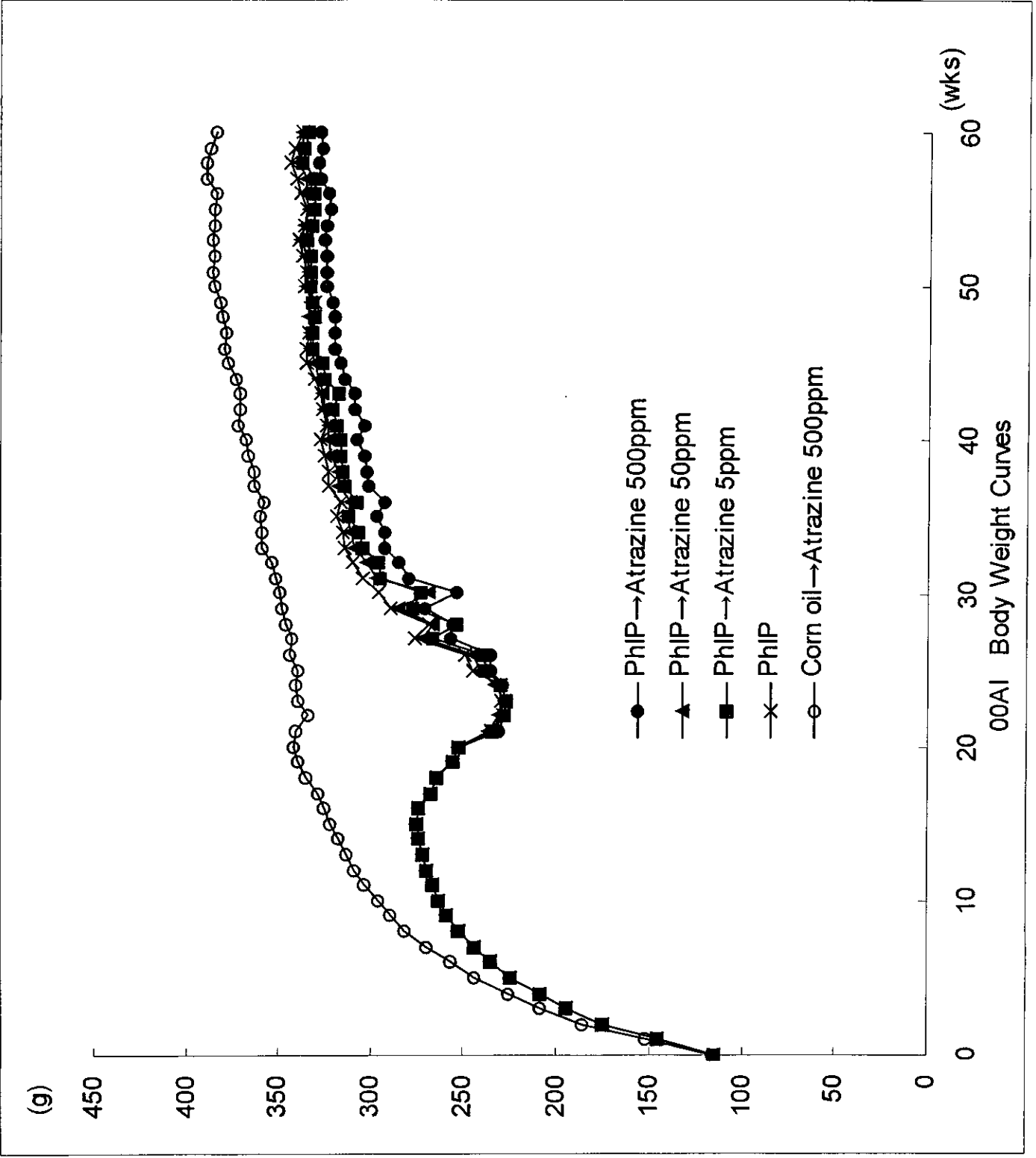
**Animals:** F344, male rats, 6-week-old

**PhIP :** 100mg/kg b.w., i.g., once a week

**Vehicle :** Corn oil, 5ml/kg b.w., i.g., once a week



# Experimental design ( II )



# Effects of nonylphenol or genistein on ventral prostate carcinogenesis induced by DMAB

Treatment	No. of rats	Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)						Adenocarcinoma		PIN and/or adenocarcinoma	
		Simple			Severe			Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)	Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)
		Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)	Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)	Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)				
Soybean free diet	12	10 ( 83 )	1.4 ± 1.0	5 ( 42 )	0.4 ± 0.5	6 ( 50 )	0.6 ± 0.7	11 ( 92 )	2.4 ± 1.4		
Nonylphenol, 25 ppm	7	7 ( 100 )	2.4 ± 1.0	1 ( 14 )	0.1 ± 0.4	2 ( 29 )	0.3 ± 0.5	7 ( 100 )	2.9 ± 1.2		
Nonylphenol, 250 ppm	16	13 ( 81 )	2.0 ± 1.7	6 ( 38 )	0.5 ± 0.7	9 ( 56 )	1.1 ± 1.3	14 ( 88 )	3.6 ± 2.1		
Nonylphenol, 2000 ppm	13	12 ( 92 )	2.7 ± 1.7	4 ( 31 )	0.5 ± 0.9	3 ( 23 )	0.2 ± 0.4	12 ( 92 )	3.4 ± 2.0		
Genistein, 25 ppm	12	8 ( 67 )	1.3 ± 1.4	5 ( 42 )	0.6 ± 0.9	4 ( 33 )	0.3 ± 0.5	11 ( 92 )	2.2 ± 2.2		
Genistein, 250 ppm	12	10 ( 83 )	1.8 ± 1.4	9 ( 75 )	0.8 ± 0.6	3 ( 25 )	0.3 ± 0.5	12 ( 100 )	2.8 ± 1.4		

No significant difference.

表2

## Effects of nonylphenol or genistein on seminal vesicle carcinogenesis induced by DMAB

Treatment	No. of rats	Atypical hyperplasias (AH)		Adenocarcinoma		AH and/or adenocarcinoma	
		Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)	Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)	Incidence(%)	Multiplicity (No./rat)
Soybean free diet	12	12 ( 100 )	4.5 ± 2.1	3 ( 25 )	0.3 ± 0.5	12 ( 100 )	4.8 ± 2.1
Nonylphenol, 25 ppm	7	7 ( 100 )	4.1 ± 1.8	0 ( 0 )	0.0 ± 0.0	7 ( 100 )	4.1 ± 1.8
Nonylphenol, 250 ppm	16	15 ( 94 )	4.6 ± 2.8	0 ( 0 )	0.0 ± 0.0	15 ( 94 )	4.6 ± 2.8
Nonylphenol, 2000 ppm	13	12 ( 92 )	4.1 ± 2.2	0 ( 0 )	0.0 ± 0.0	12 ( 92 )	4.1 ± 2.2
Genistein, 25 ppm	12	12 ( 100 )	5.8 ± 2.8	3 ( 25 )	0.3 ± 0.5	12 ( 100 )	6.1 ± 2.7
Genistein, 250 ppm	12	11 ( 92 )	5.3 ± 3.3	3 ( 25 )	0.3 ± 0.7	11 ( 92 )	5.7 ± 3.1

No significant difference.