

厚生科学研究費補助金（生活安全研究事業）

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トリアジン系除草剤 atrazine 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 104 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 atrazine は DMBA 投与の 1 週間から 50 週間、5、50 ないし 500 ppm の濃度で混餌投与し、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 群：9/20 (45%)、DMBA → 5 ppm atrazine 群：4/18 (22%)、DMBA → 50 ppm atrazine 群：5/18 (28%)、DMBA → 500 ppm atrazine 群：5/19 (26%)、500 ppm atrazine 群：0/12 (0%)、無処置対照群：0/12 (0%)と、各群間で有意差をみなかった。これらの結果から、atrazine は DMBA 誘発ラット卵巣発がんに対して何ら影響を示さないことが判明した。

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トリアジン系除草剤 atrazine の発がん修飾作用を知る目的で 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)誘発ラット卵巣発がんモデルを使用して検討した。

B. 研究方法

動物実験は総計 104 匹の雌性 SD ラットを使用し、6 群に分けた。実験群は第 1 群 (20 匹)：DMBA、第 2 群 (20 匹)：DMBA → 5 ppm atrazine、第 3 群 (20 匹)：DMBA → 50 ppm atrazine、第 4 群 (20 匹)：DMBA → 500 ppm atrazine、第 5 群 (12 匹)：500 ppm atrazine、第 6 群 (12 匹)：無処置対照群の計 6 群とした。卵巣がんは DMBA (0.5%の濃度でオリーブ油に懸濁し、ネンプタール投与による麻酔下で開腹後、左卵巣内に 0.01 ml 注入) して誘発し、被験物質の atrazine は DMBA 投与の 1 週間から 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。また、実験終了時には麻酔剤ネンプタールの過剰投与で犠牲死させ、動物に苦痛を与えないように配慮した。

C. 研究成果

DMBA を投与したラットのうち 5 匹 (DMBA → 500 ppm atrazine 群で 1 匹、DMBA → 50 ppm atrazine 群で 2 匹、DMBA → 5 ppm atrazine 群で 2 匹) は、術後早期 (1 週間以内) に肺炎で死亡した。実験期間中、体重増加は各群で順調に経過した。また、各群間の摂餌量に有意差はなかった。実験終了時の平均体重 (± SD) は、DMBA → 500 ppm atrazine 群：381 ± 49 g、DMBA → 50 ppm atrazine 群：368 ± 55 g、DMBA → 5 ppm atrazine 群：368 ±

60 g、DMBA 群：387 ± 56 g、500 ppm atrazine 群：355 ± 51 g、無処置対照群：367 ± 47 g であり、各群間に有意差はなかった。平均肝重量 (± SD) は、DMBA →500 ppm atrazine 群：14.6 ± 2.9 g、DMBA →50 ppm atrazine 群：12.4 ± 2.2 g、DMBA →5 ppm atrazine 群：13.2 ± 2.4 g、DMBA 群：13.3 ± 2.0 g、500 ppm atrazine 群：12.9 ± 2.5 g、無処置対照群：13.5 ± 2.2 g と、DMBA →500 ppm atrazine 群で DMBA 群に比べ有意に高かった

( $P < 0.02$ )。一方、子宮重量 (±SD) は、DMBA →500 ppm atrazine 群：727 ± 37 mg、DMBA →50 ppm atrazine 群：770 ± 51 mg、DMBA →5 ppm atrazine 群：760 ± 54 mg、DMBA 群：758 ± 63 mg、500 ppm atrazine 群：721 ± 51 mg、無処置対照群：747 ± 46 mg と各群間に有意差はなく、卵巢重量 (± SD) も、DMBA →500 ppm atrazine 群：156 ± 19 mg、DMBA →50 ppm atrazine 群：155 ± 22 mg、DMBA →5 ppm atrazine 群：159 ± 17 mg、DMBA 群：153 ± 25 mg、500 ppm atrazine 群：147 ± 25 mg、無処置対照群：141 ± 13 mg と各群間に有意差はなかった。実験終了時の左卵巢腫瘍 (腺がん) の発生頻度は、DMBA →500 ppm atrazine 群：5/19 (26%)、DMBA →50 ppm atrazine 群：5/18 (28%)、DMBA →5 ppm atrazine 群：4/18 (22%)、DMBA 群：9/20 (45%)、500 ppm atrazine 群：0/12 (0%)、無処置対照群：0/12 (0%) と DMBA 及び ATR 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。

#### D. 考察

これらの結果から、atrazine は DMBA 誘発ラット卵巢発がんに対して影響しないことが判明した。DMBA は発がん作用を発揮するのに代謝活性化を必要とする

が、ラット卵巢には代謝活性に必要な P450 (P450RAP など) や解毒酵素が存在しており、本分担研究の結果は atrazine がそのような酵素群に影響しないことを示唆している。最近、atrazine に genotoxicity はないこと、卵巢がんの発生率と atrazine 暴露量とは逆相関がみられることなどが報告されており、今回の実験結果はそのようなデータと矛盾しないものと考えられる。現在、誘発卵巢腫瘍のエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、BRCA-1、BRCA-2 の発現の変化を免疫組織化学的に検討しているところである。さらに、この卵巢発がんモデルを用いて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。

#### E. 結論

環境中に存在する内分泌かく乱作用物質でトリアジン系除草剤の atrazine は DMBA 誘発ラット卵巢発がんに対して影響を及ぼさないことが判明した。

#### 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., et al.: Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary non-nutritive compounds. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 2: 165-177, 2001

Tanaka, T., et al.: Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and  $\beta$  inhibit chemically-induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res.*, 61: 2424-2428, 2001.

Tanaka, T., et al.: Inhibition of azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats by citrus limonoids, obacunone and

limonin. *Carcinogenesis*, 22: 193-198, 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: 396-403, 2001.

Hosokawa, M., Tanaka, T., et al.: Synergistic effects of highly unsaturated fatty acid-containing phosphatidylethanolamine on differentiation of human leukemia HL-60 cells by dibutyryl cyclic adenosine monophosphate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 666-672, 2001.

Tanaka, T., et al.: Chemoprevention of azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci by dietary zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet*. *Life Sci.*, 69: 1935-1945, 2001.

Kohno, H., Tanaka, T., et al.: Dietary administration of citrus nobiletin inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Life Sci.*, 69: 901-913, 2001.

Kohno, H., Tanaka, T., et al.: Inhibitory effect of mandarin juice rich in  $\beta$ -cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice. *Cancer Lett.*, 174: 141-150, 2001.

Rahman, K.M.W., Tanaka, T., et al.: Effect of types and amount of dietary fat during the initiation phase of hepatocarcinogenesis. *Nutr. Cancer*, 39: 220-225, 2001.

Sugie, S., Tanaka, T., et al.: Suppressive effect of irsogladine maleate on *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)-initiated and glyoxal-promoted gastric carcinogenesis in rats. *Toxicology* 166: 53-61, 2001.

Suzui, M., Tanaka, T., et al.: Different mutation status of the  $\beta$ -catenin gene in carcinogen-induced colon, brain, and oral tumors in rats. *Mol.*

*Carcinogenesis*, 32: 206-212, 2001.

Yoshitani, S., Tanaka, T., et al.: Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary capsaicin and rotenone. *Int. J. Oncol.* 19: 929-939, 2001.

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.

Yanaiida, Y., Tanaka, T., et al.: Dietary silymarin suppresses 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in male F344 rats. *Carcinogenesis*, in press, 2002.

Kohno, H., Tanaka, T., et al.: Dietary conjugated linolenic acid inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 133-142, 2002.

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, 2002.

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, 2002.

2. 学会発表  
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし。
2. 実用新案登録  
該当なし。
3. その他  
該当なし。

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

食品中の内分泌攪乱物質等の主要臓器に対する発がん修飾作用の研究

分担研究者 鱒淵 英機 大阪市立大学医学部助教授

研究要旨： ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、アトラジンの発がん修飾作用を検討した。イニシエーション群各群において諸臓器に腫瘍を認めたが、発生頻度に有意差は認められなかった。しかしながら、肺の腫瘍は有意差はないもののアトラジンの濃度依存性にその数が増加する傾向が見られた。また、肝臓に関しては、前がん病変の指標である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P)陽性細胞巢の数および面積がアトラジンの濃度依存性に増加する傾向がみられ、アトラジン 500 ppm 群ではその単位面積あたりの数が対照群に比較し、有意に増加を示した。ラット多臓器中期発がん性試験法において、アトラジンは弱い肝発がん促進作用を有することが示された。

A. 研究目的

食品中の内分泌攪乱物質の主要な臓器における発がん修飾作用をラット多臓器中期発がん性試験法を用いて検討する。発がんリスクに対する評価は一臓器に対するのみでは不十分で、主要な臓器に対して同時に評価する必要がある。ラット多臓器中期発がん性試験法を用いると多種類の発がん物質によるイニシエーションの後、被験物質を投与することにより主要臓器に対する発癌修飾作用を検討でき、発がんリスク評価として有用である。アトラジンは水や液体肥料を担体として土壤中に広範囲に散布される除草剤である。近年、その内分泌攪乱作用に注目が集まっており、内因性のエストロゲンやプロラクチンを増加させることで加齢変化を促進させるのではないかとされている。疫学的にその曝露とヒトの卵巣腫瘍や前立腺癌、精巣腫瘍、白血病等の発癌リスクの上昇との関連が示唆されており、国際癌研究機関の作業グループは発癌物質の疑いが有る、と指摘している。一方、動物実験においてもラットで乳癌発生の増加が報告されているが、未だその発癌修飾作用についての実験的証明はされて

いない。今回、F344 ラットを用いた多臓器中期発癌試験を行い、アトラジンの諸臓器における発癌修飾作用について検討した。

B. 研究方法

6 週齢の F344Du/Crj 系雄ラット 124 匹を 8 群に分け、第 1～第 5 群（各群 20 匹ずつ）に実験開始日に diethylnitrosamine を体重 1kg 当たり 100 mg 腹腔内投与、N-methylnitrosourea を第 2、第 5、第 8、第 11 日にそれぞれ体重 1 kg 当たり 20 mg 腹腔内投与、dimethylhydrazine を第 14、第 17、第 20、第 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～第 2 週に N-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine を 0.05% の濃度で飲料水投与、第 3～第 4 週に 2,2-hydroxy-di-n-propylnitrosamine を 0.1% の濃度で飲料水投与しイニシエーション処置とした(Fig. 1)。実験開始後 5 週目から内分泌攪乱物質のアトラジンを第 2 群から第 4 群（各群 21 匹ずつ）にそれぞれ 26 週間 5 ppm、50 ppm、500 ppm の濃度で混餌投与、第 1 群（21 匹）は同様のイニシエーション処置後、通常の粉末飼料を

与えた。また併置対照群として第6群(9匹)にはイニシエーション処置を行わず、5週目からアトラジン500ppmで混餌投与した。第5群(9匹)は無処置群とした。実験開始後30週間後に全生存例をエーテル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。

また、リグナン類であるアルクチンについても同様の方法を用い、0.1%、0.02%、0.004%の濃度で混餌投与し、実験を開始した。

### C. 研究結果

最終体重はイニシエーション群間で第4群のアトラジン500ppm投与群が対照群に比べ有意に体重増加抑制がみられたが、非イニシエーション群間において有意差は認められなかった(Table 1)。臓器重量では精巣が、イニシエーション群間で第4群のアトラジン500ppm投与群が対照群に比べ有意に増加していたが非イニシエーション群間では、有意差は認められなかった(Table 1)。イニシエーション群各群において諸臓器に腫瘍を認めたが、発生頻度に有意差は認められなかった(Table 2~4)。しかしながら、肺の腫瘍は有意差はないもののアトラジンの濃度依存性にその数が増加する傾向が見られた(Table 5)。また、肝臓に関しては、前がん病変の指標である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P)陽性細胞巢の数および面積がアトラジンの濃度依存性に増加する傾向がみられ、アトラジン500ppm群ではその単位面積あたりの数が対照群に比較し、有意に増加を示した(Fig. 2)。また、非イニシエーション群においてもアトラジン500ppm群でわずかながら GST-P陽性細胞巢の発生が認められた。

また、アルクチンの実験は現在動物実験が進行中である。

### D. 考察

体重に関して、イニシエーション群でアトラジン500ppm群に対照群に比べ体重増加の抑制が見られたが、非イニシエーション群においては、体重差がなかつ

たことよりアトラジンの毒性は見られないと考えられた。今回、腫瘍の発生頻度に各群有意な差異は認めなかったが、肺に関しては有意差はないもののアトラジンの濃度依存性に腫瘍の数が増加する傾向が見られ、軽度の促進作用は否定できなかった。また、肝臓に関しては、前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢が濃度依存性に増加し、肝発がん促進作用が認められた。しかし、アトラジンは内分泌臓器の重量に影響を及ぼさなかったことより、これらの作用は内分泌攪乱作用とは別のアトラジン本来の作用と理解された。

今回、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、アトラジンに弱いながら肝発がん促進作用が認められた。このことを確認するために、さらにラット肝中期発がん性試験法で確認することが必要であろう。

内分泌攪乱化学物質のヒト発がんに及ぼす影響を明かにすることは極めて重要で、本研究においてアトラジンの発がん修飾作用を明かにすることにより、内分泌攪乱物質のヒトへのリスクアセスメントに対する科学的な情報の一端を与えることができよう。

### E. 結論

ラット多臓器中期発がん性試験法をもちいて、アトラジンの発がん修飾作用を検討した結果、アトラジンは弱い肝発がん促進作用を有することが示された。

### F. 研究発表

(論文発表)

1. 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  $\alpha$ -isomer of benzene hexachloride ( $\alpha$ -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatic foci in rats. *Cancer Lett.*, 163, 179-185, 2001.
2. Fukushima, S., Takada, N., Wanibuchi, H., Hori, T., Min, W. and Ogawa, M.: Suppression of chemical carcinogenesis by

- water-soluble organosulfur compounds. *J. Nutr.*, 131, 1049-1053, 2001.
3. 福島昭治、鰐淵英機、森村圭一郎: 実験的膀胱癌とその化学予防. *腎泌尿防医誌*. 9, 45-47, 2001.
  4. Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Karim, R., Yamamoto, S., Masuda, C., Nakae, D., Konishi, Y. and Fukushima, S.: Dimethylarsinic acid induces 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in the kidney of NCI-Black-Reiter rats. *Cancer Lett.*, 165, 11-17, 2001.
  5. 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. *Teratoge. Carcinoge. Mutage.*, 21, 223-229, 2001.
  6. Yoshida, K., Kuroda, K., Inoue, Y., Chen, H., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Metabolites of arsenobetaine in rats: does decomposition of arsenobetaine occur in mammals?+ *Applied Organometallic Chem.*, 15, 271-276, 2001.
  7. Yoshida, K., Kuroda, K., Inoue, Y., Chen, H., Date, Y., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Metabolites of dimethylarsinic acid in rats: production of unidentified metabolites in vivo. *Applied Organometallic Chem.*, 15, 539-547, 2001.
  8. Kuroda, K., Yoshida, K., Yasukawa, A., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Enteric bacteria may play a role in mammalian arsenic metabolism. *Applied Organometallic Chem.*, 15, 548-552, 2001.
  9. 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. *Teratoge. Carcinoge. Mutage.*, 21, 295-301, 2001.
  10. Mori, Y., Koide, A., Fuwa, K., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Lack of change in the levels of liver and kidney cytochrome P-450 isozymes in *p53 (+/-)* knockout mice treated with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Mutagenesis*, 16, 377-383, 2001.
  11. Fukushima, S., Wanibuchi, H., Wei, M., Salim, E.I. and Morimura, K.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid, an inorganic arsenic metabolite, in rodents. In: *Surgical pathology update 2001, 18th European congress of pathology*, (eds.) Hauptmann, S., Dietel, M., Sobrinho-Simões, M., ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, Germany, pp. 480-483, 2001.
  12. Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Zaporin, W., Vinnichenko, W., Kinoshita, A., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Correspondence re: W. Paile's Letter to the editor. *Cancer Res.*, 61, 6964-6965, 2001.
  13. Gen, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Wei, M., Mitsuhashi, M., Murai, T., Mori, S., Hosono, M., Oohara, T., Makino, S., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: *p53* and *H-ras* mutations and microsatellite instability in renal pelvic carcinomas of NON/Shi mice treated with *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine: Different genetic alteration from urinary bladder carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 1278-1283, 2001.
  14. Fukushima, S., Wanibuchi, H. and Li, W.: Inhibition by ginseng of colon carcinogenesis in rats. *Journal of Korean Medical Science*, 16 (Suppl), S75-80, 2001.
  15. Cohen, S. M., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Lower Urinary Tract. In: *Handbook of Toxicologic Pathology*. Second Edition. (eds.) Haschek, W. M.,

Rousseaux, C. G., Wallig, M. A.,  
Academic press, Vol. 2, pp. 337-362,  
2002.

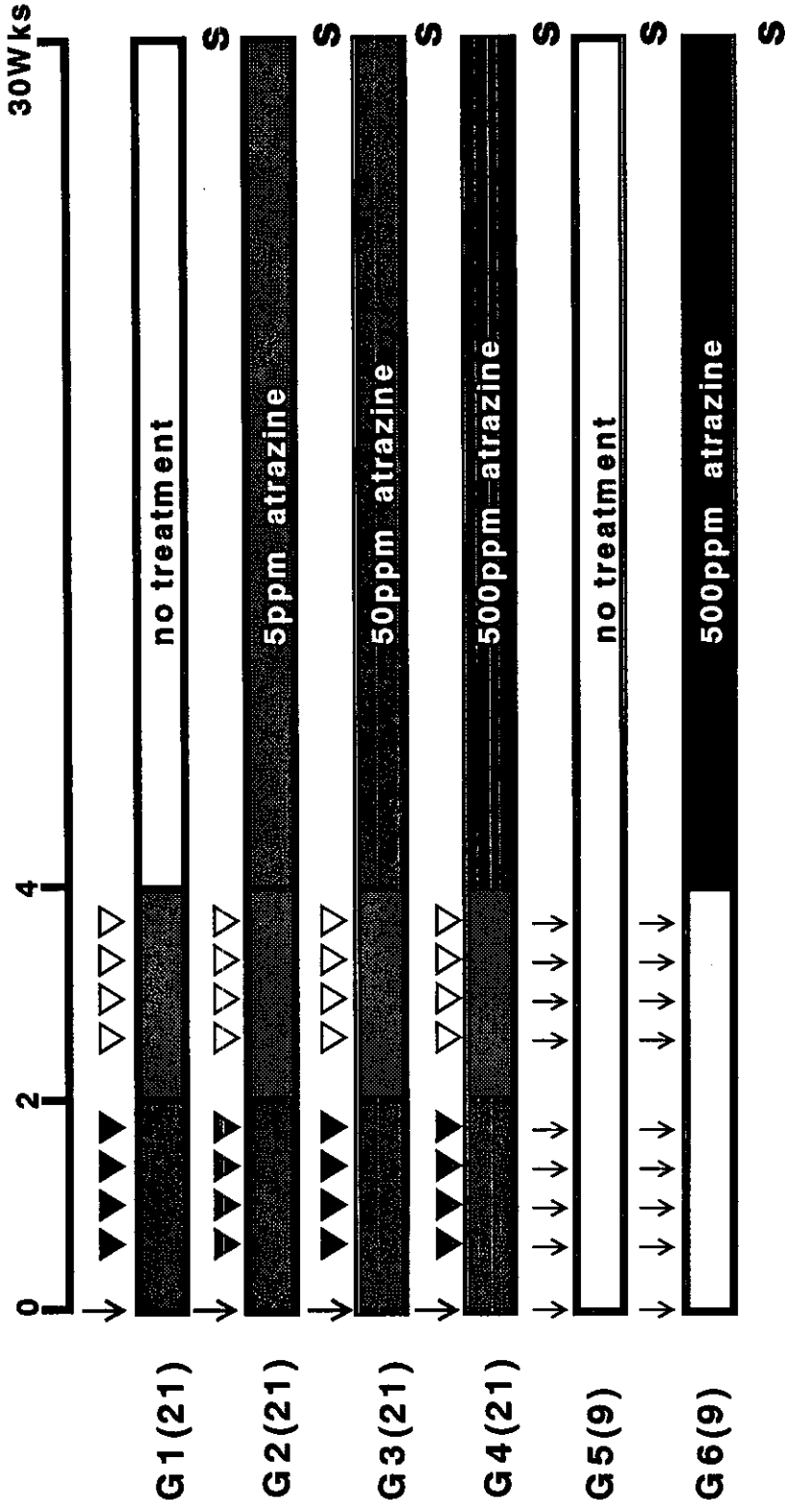
16. Seike N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Nishikawa, T., Kishida, H., Nakae, D., Hirata, K. and Fukushima, S.: Lack of promoting effect due to oral administration of dimethylarsinic acid on rat lung carcinogenesis initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer Lett.*, 175, 113-119, 2002.
17. 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<sup>WAF1/Cip1</sup>, cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis*, 23, 341-349, 2002.

(学会発表)

1. 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, 4月5-7日, 東京, 2001.
2. 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, 7月12-13日, 名古屋, 2001.

3. 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, 9月26-28日, 横浜, 2001.
4. 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, 9月26-28日, 横浜, 2001.
5. 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, 1月24-25日, 東京, 2002.
6. 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, 3月26-28日, 横浜, 2002.



Animal; F344 / DuCrj 102rats, 6weeks old male.

Diet and treatment; atrazine, mixed NIF pellet diet at 5, 50, and 500ppm.

▬ : BBN; N-n-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine 0.05% in drinking water for 2weeks.

▬ : DHPN; 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine 0.1% in drinking water for 2weeks.

↓ : DEN; diethylnitrosamine 100mg/kg i.p. once in the beginning.

▼ : MNU; N-methylnitrosourea 20mg/kg i.p. in days: 3,7,10 and 14(4times)

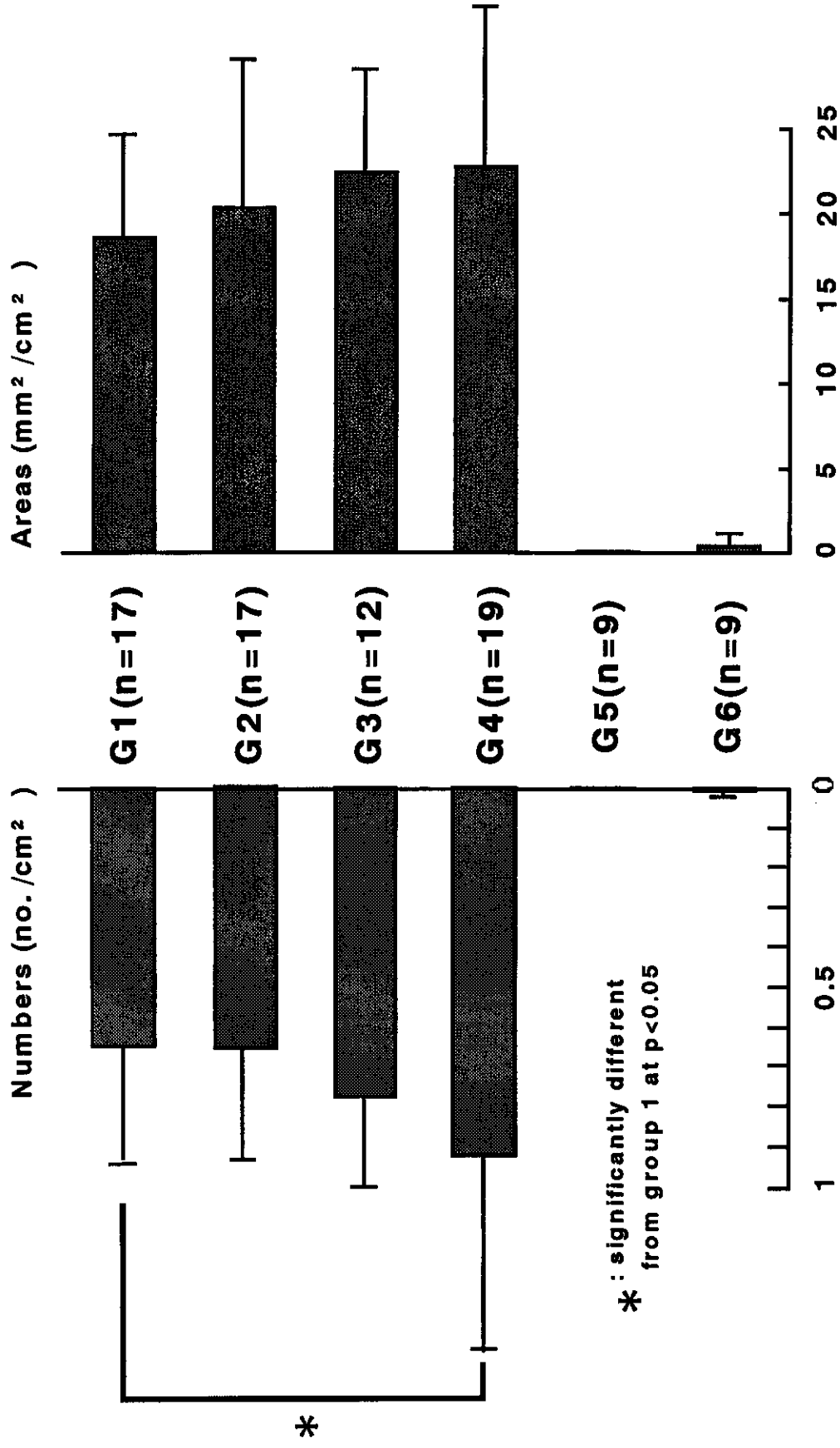
▽ : DMH; dimethylhydrazine 40mg/kg s.c. in days: 17, 21, 24 and 28 (4times)

↓ : Saline

S : sacrifice

Fig.1 Experimental Protocol





# Numbers and Areas of GST-P Positive Foci

## Table 1 Body and Organ Weights of Rats at Sacrifice

Group	Dose of DMBDD atrazine (ppm)	No. of rats	Body weight (g)	Relative organ weights (%)			
				Testes	Musculus levator ani	Kidneys	Liver
Group 1	+	20	341 ± 22	0.72 ± 0.17	0.23 ± 0.01	0.29 ± 0.07	2.8 ± 0.7
Group 2	+	21	330 ± 21	0.76 ± 0.06	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03	2.8 ± 0.2
Group 3	+	20	329 ± 19	0.71 ± 0.18	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.07	2.5 ± 0.6
Group 4	+	19	293 ± 25 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.07	2.8 ± 0.6
Group 5	-	9	404 ± 18	0.77 ± 0.05	0.21 ± 0.02	0.26 ± 0.02	2.8 ± 0.2
Group 6	-	9	361 ± 11	0.89 ± 0.06	0.24 ± 0.02	0.28 ± 0.02	2.9 ± 0.2

Values are mean ± SD    a : significantly different from group 1 at p < 0.05

**Table 2 Incidences of Neoplastic Lesions in Various Organs (1)**

	Group 1 (n=20)	Group 2 (n=21)	Group 3 (n=20)	Group 4 (n=19)	Group 5 (n=9)	Group 6 (n=9)
Dose of atrazine	0 ppm	5 ppm	50 ppm	500 ppm	0 ppm	500 ppm
DMBDD	+	+	+	+	-	-
<b>Kidney</b>						
nephroblastoma	10 (50)	10 (47)	4 (21)	4 (21)	0	0
<b>Colon</b>						
adenoma	1 (5)	1 (5)	0	1 (5)	0	0
adenocarcinoma	2 (10)	4 (19)	4 (21)	4 (21)	0	0
<b>Ileum</b>						
adenocarcinoma	0	0	0	1 (5)	0	0
<b>Tongue</b>						
verrucus carcinoma	1 (5)	0	0	0	0	0

( ); %

**Table 3 Incidences of Neoplastic Lesions in Various Organs (2)**

	Group 1 (n = 20)	Group 2 (n = 21)	Group 3 (n = 20)	Group 4 (n = 19)	Group 5 (n = 9)	Group 6 (n = 9)
Dose of atrazine	0 ppm	5 ppm	50 ppm	500 ppm	0 ppm	500 ppm
DMBDD	+	+	+	+	-	-
<b>Urinary Bladder</b>						
PN hyperplasia	1 (5)	1 (5)	0	3 (15)	0	0
papilloma	0	4 (19)	1 (5)	1 (5)	0	0
transitional cell carcinoma	0	0	1 (5)	0	0	0
<b>Thyroid gland</b>						
adenoma	0	3 (15)	2 (10)	0	0	0
carcinoma	0	2 (10)	1 (5)	0	0	0
<b>Liver</b>						
	0	0	0	0	0	0

( ) ; %

**Table 4 Incidences of Neoplastic Lesions in Various Organs (3)**

	Group 1 (n=20)	Group 2 (n=21)	Group 3 (n=20)	Group 4 (n=19)	Group 5 (n=9)	Group 6 (n=9)
Dose of atrazine	0 ppm	5 ppm	50 ppm	500 ppm	0 ppm	500 ppm
DMBDD	+	+	+	+	-	-
<b>Lung</b>						
hyperplasia	17(89)	19(90)	13(65)	17(89)	0	0
adenoma	8(40)	10(50)	11(55)	9(45)	0	0
adenocarcinoma	11(55)	15(75)	5(25)	12(63)	0	0
squamous cell carcinoma	2(10)	0	0	0	0	0
total	17(89)	19(90)	13(65)	17(89)	0	0
<b>osteosarcoma</b>	0	0	0	1(5)	0	0
<b>Muscle</b>						
leiomyosarcoma	0	0	0	1(5)	0	0
<b>Skin</b>						
verruca vulgaris	1(5)	0	0	0	0	0

( ); %

## Table 5 Multiplicities of the Tumors in Lung

	Group 1 (n=20)	Group 2 (n=21)	Group 3 (n=20)	Group 4 (n=19)	Group 5 (n=9)	Group 6 (n=9)
Dose of atrazine	0 ppm	5 ppm	50 ppm	500 ppm	0 ppm	500 ppm
DMBDD	+	+	+	+	-	-
adenoma	1.63 ± 0.70	1.72 ± 0.86	1.91 ± 1.08	2.33 ± 1.15	0	0
adenocarcinoma	1.72 ± 0.74	1.80 ± 1.11	2.80 ± 1.32	2.50 ± 1.12	0	0
squamous cell carcinoma	1.00 ± 0.00	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>2.26 ± 1.24</b>	<b>2.75 ± 1.29</b>	<b>3.08 ± 2.28</b>	<b>3.21 ± 1.93</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Values are mean ± SD

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

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

分担研究者 藤本成明 広島大学原爆放射能医学研究所助教授

**研究要旨：**下垂体腫瘍モデルにおいて、アトラジン(Atz)の作用を検討した結果、*in vitro*、*in vivo*ともに発癌修飾作用はみられなかった。また、前立腺での発癌修飾に関与すると考えられるエストロゲン受容体発現を解析し、テストステロンによる発現調節を明らかにした。前立腺発癌過程では、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 $\alpha$ の発現増強が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

本研究では、エストロゲン応答性増殖細胞であるラット下垂体腫瘍細胞を主なモデルとして、がん遺伝子 PTTG の発現調節機構およびエストロゲン受容体発現調節の解析を行い食品中内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用を明らかにしてきた。本年度は、

- 1) 食品中に潜在的に含まれる可能性のある内分泌かく乱物質としてアトラジン(Atz) の発がん修飾作用を、昨年度に引き続きラット下垂体および移植下垂体細胞モデルで検討した。
- 2) エストロゲン応答性のがん細胞では、受容体レベルが変化するとその応答性増殖が修飾をうける。従って、内分泌かく乱物質等による腫瘍増殖修飾の理解においても、エストロゲン受容体調節の機構を明らかにすることが重要である。ラット前立腺発癌過程では、エストロゲンがテストステロンに相乗的に作用をすることが示されてきた。そこで、ラット前立腺におけるエストロゲン受容体調節について解析をおこなった。

B. 材料と方法

試薬類

17 $\beta$  エストラジオール、OH-タモキシフェンは、Sigma Chemicals (St. Louis, MO, U.S.A.)からテストステロンは Wako Junyaku (Osaka)から購入した。*In vitro* 試験では、各試薬をエタノール溶液として調製保存した。

動物

移植実験においては4週令の雌F344ラットを、Charles River Japan (Atsugi)から購入した。飼育は、24 $\pm$ 4 $^{\circ}$ C、55 $\pm$ 5 $^{\circ}$ Cの恒温、恒湿、無窓の清潔な飼育室で12/12時間の明暗条件下で行った。NIH変形飼料および水道水を自由摂取とした。5週令時に下垂体細胞 MtT/E-2 を3 $\times$ 10<sup>5</sup>/部位で移植した。Atz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。

前立腺癌モデル実験には、雄F344ラットを購入し上記同条件で飼育した。ただし飼料は通常MF(オリエンタル酵母KK)とした。1) 基礎検討実験では、1, 4, 9週令の各ラットに去勢およびテストステロンペレット投与を1週間おこなった。2) 1週間投与実験では、5週令時にホルモンペレット(T, 10 mg; E 2.5 mg)を皮下投与した。3) 4週間投与実験では、6週令でホルモンペレット(T, 50 mg; E, 2.5 mg)を投与した。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。

細胞培養および増殖アッセイ

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(Sigma Chemicals) + 2.5% FBS (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA,

U.S.A.) + 7.5% HS(Gibco/Invitrogen)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 (Wakojunyaku)を用いた。

#### Competitive RT-PCR による ER および PTTG mRNA 定量

下垂体組織の全 RNA の抽出はアイソゲン試薬(Wakojunyaku)により行い、さらにそれを DNase (Promega, Madison, WI, USA) で処理した。一定量の全 RNA は、さらに MMLV-RT (Invitrogen) によって cDNA にされ、PCR 反応の鋳型とされた。ER  $\alpha$  用のプライマーは 5'-AATTCTGACAATCGACG CCA G (473-493) および 5'-GTGCTTCAAC ATTCTCCCTC CTC (794-816)、ER  $\beta$  用に、5'-TTCTTGGCAG CACCAGTAAC C (38-58) と 5'-TCCCTCTTTG CGTTTGGACT A (279-299) を用いた。また、PTTG プライマーは 5'-ATGGCTACTCTGATCTTTGT および 5'-TTAAATATCTGCATCGTAAC。PCR に先立ちサンプルと同時に、competiter DNA (上記プライマー配列を両端にもつ短い DNA 断片で、それぞれの大きさは 126bp、156bp および 421bp) の 0.1-10fg を定量的に加え PCR した。増幅は、Ex-Taq DNase polymerase (Takara, Tokyo)を用い、ER は 95°C、30 秒、57°C、15 秒、72°C、1 分の 30 サイクル、PTTG は 95°C、30 秒、53°C、20 秒、72°C、1 分の 30 サイクルで行った。産物は、1.5%アガロースゲルで泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、画像解析して、competiter と目的産物の光学濃度の比率が 1:1 になる点を求めることで定量した。

#### レポータープラスミッド

エストロゲン応答性転写活性化のアッセイには、(ERE)<sub>3</sub>-SV40-luc を用いた。コントロールに phRL-CMV (Promega)を用いた。

#### トランジェントトランスフェクション

細胞を、24 穴プレートに  $4-8 \times 10^4$  / well で播き、24 時間後に、TransFast transfection reagent (Promega) を用いて全量で 0.8  $\mu$ g の DNA をトランスフェクションした。薬剤処理 24 時間後に細胞を溶解し、Dual luciferase assay substrates (Promega) をそれぞれ加えた。発光測定は、Wallac Micro-Beta scintillation Counter (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA)により行った。

## C. 結果

1. *in vitro* および *in vivo* 下垂体細胞増殖アッセイ  
エストロゲン応答性増殖をする下垂体細胞株である MtT/E-2 による試験結果を Fig.1 にまとめた。Atz は、*in vitro* エストロゲン応答性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。

#### 2. 正常雌 F344 ラット下垂体系への Atz 作用

正常雌ラットに Atz を投与した場合には、500ppm 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(Table 1)。

#### 3. 前立腺エストロゲン受容体発現に対するテストステロンの作用

2, 4, 9 週の各齢において、去勢1週間(3, 5, 10 週齢)でエストロゲン受容体  $\alpha$  mRNA のレベルは有意に増加、一方でエストロゲン受容体  $\beta$  のレベルは激減した(Fig. 2A)。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  $\beta$  は、24 時間以内で有意な上昇をみ、また  $\alpha$  型は 48 時間で有意な低下をみた(Fig. 2B)。

#### 4. 前立腺エストロゲン受容体発現に対するテストステロンとエストロゲンの同時投与の作用

テストステロン 10mg の 1 週間投与は、エストロゲン受容体  $\alpha$  および  $\beta$  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(Fig. 3)。

高用量(テストステロン 50mg)、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、 $\alpha$  型受容体 mRNA の有意な上昇が観察された(Fig. 4)。

#### 5. Arctiin, Sesamin および NDGA

(nordihydro-guaiaretic acid) の *in vitro* エストロゲン活性

リグナン類 3 物質についての、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の結果を Fig.5 にまとめた。NDGA は、 $10^{-6}$ M で有意なエストロゲン活性を示したが、他の 2 物質は  $10^{-4}$ M までの濃度で全てのアッセイで陰性であった。

## D. 考察

本研究では、食品中内分泌かく乱物質による発がん修飾作用を検討する目的で、1) Atz のラット



下垂体および下垂体腫瘍形成に与える作用、2) 前立腺のエストロゲン受容体発現とそれに与えるテストステロンとエストロゲンの作用を検討した。

昨年度本研究で示した通りF344 ラットの下垂体は、エストロゲン作用をもつ内分泌かく乱物質の作用を解析するのによいモデルである。本研究では、昨年度に引き続き、我々が樹立したエストロゲン応答性の下垂体細胞株 MtT/E-2 の細胞増殖 (*in vitro* 試験) およびその移植腫瘍実験 (*in vivo* 試験) により、内分泌かく乱物質の腫瘍プロモーション過程に与える作用をみた。Atz は、*in vitro* において  $10^{-4}$ M まで、*in vivo* 試験でも 500ppm 経口投与まで無作用であった。Atz は、*in vivo* においては視床下部-下垂体-卵巣系に対し作用しプロラクチン分泌の促進作用があると報告されてきた。移植腫瘍実験では、全ての動物が卵巣摘出されているので、卵巣が関与した系は観察できない。そこで、正常動物に対して Atz の投与を行い血中プロラクチンの測定を行った。その結果、Atz の 4 週間投与で、血中プロラクチン値並びに血中エストラジオール値の上昇が観察された。後者は、性周期についてランダムサンプルであるためそれ自体有意な測定値とは言い難いが、下垂体重量も有意な増加をみていることは裏付けとなる。ラットにおける Atz によるプロラクチン上昇には系統差が報告されており、SD 系のラットでは明確に示されている反面、F344 ではみられないとされている。我々の今回のデータでは、F344 においても、おそらくエストラジオールの上昇を介してプロラクチンが上昇した。つまり、F344 系においても投与量と期間によっては Atz の内分泌かく乱作用が観察された。Atz は、プロラクチンの上昇を介して乳癌の促進要因となりうることが示されてきたが、ヒト乳癌においてはプロラクチンの役割は限定的であることから、ヒトでは危険因子とならないとされてきた。今回、血中エストラジオールの上昇が示されたことは、この論理を覆す可能性があり、この点についてはさらに検討が必要である。

我々は、エストロゲン反応性腫瘍増殖に関して、エストロゲン受容体発現量の変化が重要な修飾因子であることを示してきた。エストロゲン受容体は内分泌かく乱物質の主な作用点であるにも関わらず、それ自体の発現調節に関しては未だによく知られていないため、その解析は癌化の修飾作用の理解においても重要である。昨年度、下垂体モデルで、エストロゲン受容体発現について検討したのにつづき、本年度は、前立腺モデルに

おいて受容体発現と癌化修飾の可能性を検討した。ラット前立腺では、エストロゲンはテストステロンと同時に投与したとき前立腺成長を促進することが示されており、さらに Noble および F344 ラット発癌モデルにおいて、エストロゲンが相乗的に腫瘍形成を促進することが報告されてきた。また、ヒトでも BPH 発症が血中および尿中エストラジオール量と相関していることが示されてきた。しかし前立腺発癌へのエストロゲンの促進作用の機序は全く不明である。

ラットの前立腺は、エストロゲン受容体  $\beta$  が強発現している臓器として知られてきたが、若年時にはむしろ  $\alpha$  型が有意に発現しており、さらにその発現はテストステロンにより動的に調節されていることが明らかになった。すなわちテストステロンにより  $\beta$  型の発現が誘導され、逆に  $\alpha$  型受容体の発現は抑制される。次に大量テストステロン投与下でのエストロゲンの受容体 mRNA 量にあたる影響をみると、もともと強発現しているエストロゲン受容体  $\beta$  は有意に変化しなかったが、 $\alpha$  型受容体の上昇が観察された。実際ヒト前立腺癌の進展に伴ってエストロゲン受容体  $\alpha$  が発現することが報告されており、本結果も、エストロゲン同時投与による発癌修飾作用に、エストロゲン受容体  $\alpha$  の上昇が関与することを示唆した。

## E. 結論

1. 樹立下垂体細胞株による *in vitro* アッセイにおいて、Atz は  $10^{-4}$ M まで作用を示さなかった。また、去勢雌 F344 ラットで移植下垂体細胞の腫瘍形成を指標にした *in vivo* アッセイにおいても、Atz 5, 50, 500 ppm の経口投与は作用を示さなかった。しかし、正常雌 F344 ラットにおいては、Atz 500 ppm 群で、プロラクチン値の上昇が観察され、Atz の内分泌かく乱作用は視床下部-下垂体-卵巣系を介することが確認された。発癌修飾への可能性についてはさらなる検討が必要であろう。

2. ラットのの前立腺で、テストステロンによってエストロゲン受容体  $\beta$  の発現が誘導されており、逆に  $\alpha$  型受容体は抑制的に調節されていることが明らかになった。前立腺発癌過程においてはテストステロンがプロモーション作用をするが、同時投与されたエストロゲンも相乗的に癌化を促進する。このとき、エストロゲン受容体  $\alpha$  の発現上昇が示された。実際前立腺癌においては正常では発現していないエストロゲン受容体  $\alpha$  の発現上昇が報告されており、エストロゲンの発癌修飾作用においてもエストロゲン受容体  $\alpha$  の発現が関与することが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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(2), 85-94 (2001)
- 4) Nitta, Y., Endo, S., Fujimoto, N., Kamiya, K., Hoshi, M. Age-dependent exposure to radioactive iodine (<sup>131</sup>I) in the thyroid and total body of newborn, pubertal and adults Fischer 344 rats. *J. Radiat. Res.* 42, 143-155 (2001)

### 2. 学会発表

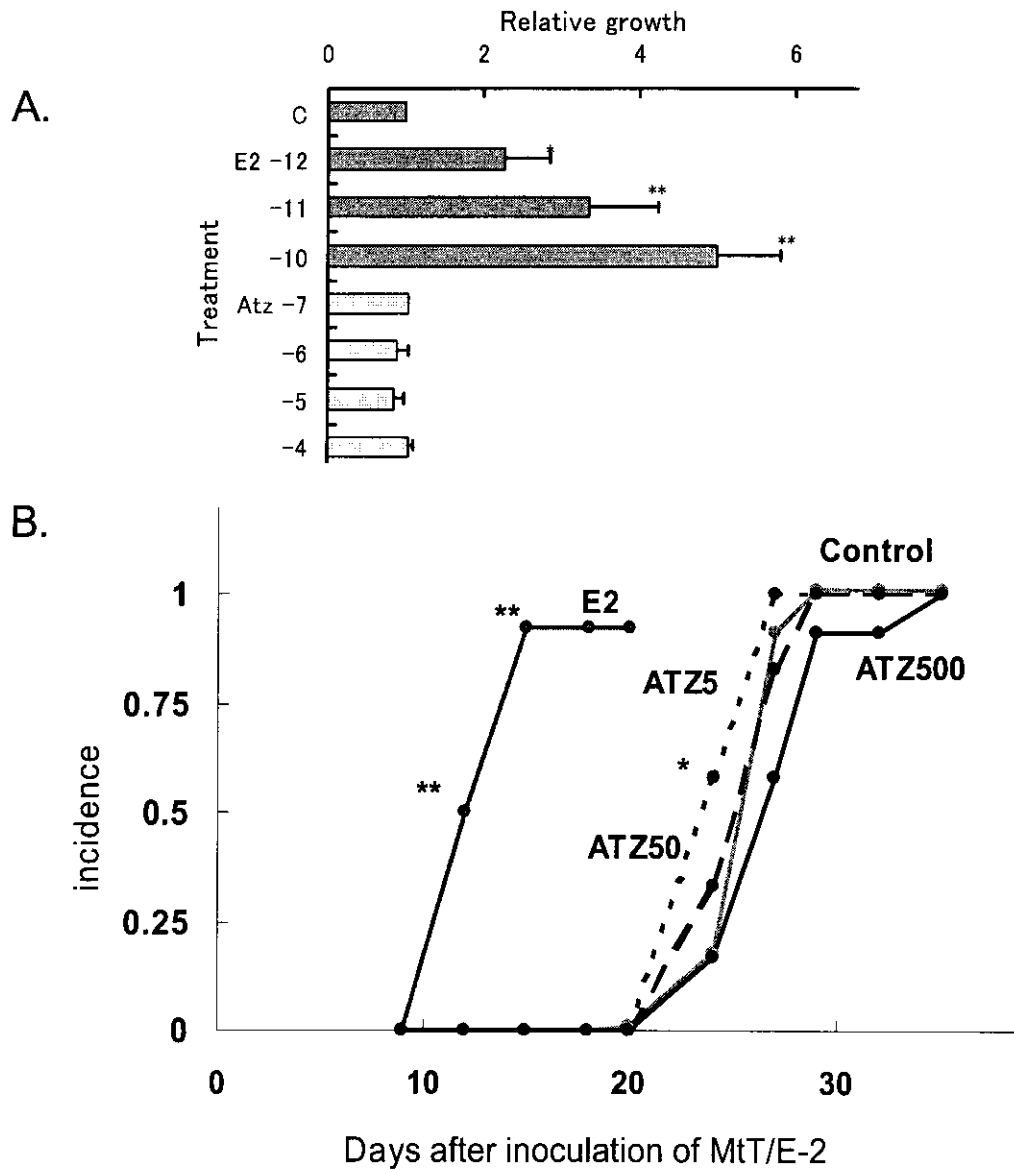
- 1) Fujimoto, N., Yin, H., Maruyama, S., Asano, K., Ito, A. Estrogen dependent tumorigenesis and the regulation of PTTG in the rat pituitary gland. 5<sup>th</sup> Joint conference of AACR and JCA, Maui, HI, U.S.A., 2001 (Proceedings A-93)
- 2) 浅野耕助、藤本成明、丸山聡、碓井亜 ラットエストロゲン受容体βの発現機構の解析 第74回日本内分泌学会学術総会、横浜、2001 (日本内分泌学会雑誌、77、100、2001).
- 3) 丸山聡、藤本成明、浅野耕助、碓井亜 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、横浜、2001 (日本内分泌学会雑誌、77、164、2001).

- 4) 藤本成明、丸山聡 ノニルフェノールおよびアトラン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、横浜、2001 (日本癌学会総会記事、68、2001)
- 5) 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、石川 (抄録集 04-1)
- 6) 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 筑波 2001 (要旨集 PB-21)
- 7) 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 筑波 2001 (要旨集 PB-17)

Table 1. Effects of Atz on pituitary weights, serum prolactin (PRL) and serum E2 levels in normal female F344 rats

	Pit.W. (mg $\pm$ SEM)	PRL (ng/ml)	E2(pg/ml)
C	6.3 $\pm$ 0.2	16 $\pm$ 3.2	43 $\pm$ 7.3
E2	11.5 $\pm$ 0.3**	124 $\pm$ 22.8*	99 $\pm$ 13.0**
Atz5	6.1 $\pm$ 0.3	14 $\pm$ 1.6	31 $\pm$ 3.5
Atz50	7.7 $\pm$ 0.6	18 $\pm$ 6.3	78 $\pm$ 8.3*
Atz500	7.8 $\pm$ 0.4*	52 $\pm$ 22.3*	66 $\pm$ 6.7*
Mean $\pm$ SEM (n=6)			

Fig.1 Effects of Atz on MtT/E-2 cell growth *in vitro* (A) and MtT/E-2 tumor formation in ovariectomized F344 rats (B)



	Pit.W. (mg ± SEM)	PTTG (fg/μg RNA)	Serum PRL (ng/ml)
C	6.8 ± 0.2	0.58 ± 0.10	7.4 ± 0.93
E2	11.5 ± 0.3**	0.69 ± 0.16	50.9 ± 7.54**
Atz5	6.9 ± 0.2	0.37 ± 0.08	9.2 ± 0.87
Atz50	7.1 ± 0.2	0.57 ± 0.24	8.5 ± 0.84
Atz500	7.1 ± 0.2	0.81 ± 0.20	6.6 ± 0.78

Mean ± SEM (n=6)