

Fig. 2 新生児期にDESを暴露した雄ラットの成熟後の脳内アミン濃度の変化

## 17. トランスジェニックラットを用いた内分泌かく乱物質の検討

研究者 白井智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

### 研究要旨

短期間で高率に前立腺癌を発生するトランスジェニックラット (Tg ラット) を作製し、発生した前立腺病変はアンドロゲン依存性であることを報告してきた。本研究で アンドロゲン枯渇処置及び抗アンドロゲン剤投与により前立腺癌の退縮が高感度に示され、我々の Tg ラットは前立腺癌発生を指標とした内分泌かく乱作用の検出系として活用可能性があると示唆された。

#### A. 研究目的

前立腺癌の早期発生を目指して確立した probasin 遺伝子をプロモーターとする SV40T 抗原遺伝子遺伝子を導入したトランスジェニックラット (Tg ラット) は短期間で高率に前立腺癌を発生する。このラットに発生する前立腺癌は前立腺各葉に発生し、去勢により完全退縮を来すことからアンドロゲン依存性であることが明らかとなっている。導入遺伝子に用いた probasin は前立腺に特異的に発現しており、その発現はアンドロゲンと亜鉛によって調整されている。従ってアンドロゲンレベルの変化に極めて敏感であることが示唆される。そこでこのラットの前立腺癌発生を指標にして内分泌かく乱作用の検出系として利用可能かどうかを検討した。

#### B. 研究方法

浸潤癌がまだ高頻度にみられない 15 週時点および浸潤癌がほぼ全例に観察される 35 週時点からアンドロゲン枯渇処置 (外科的去勢、エストロゲン皮下埋植) を行い、50 週齢で屠殺解剖した。また 10 週齢の Tg ラットに作用機構が異なる 2 種類の抗アンドロゲン剤 (finasteride 及び flutamide) を 7 週間投与後、屠殺解剖検し、前立腺癌の発生がどのように変化するかを病理組織学的に検討した。併せて血中のテストステロン濃度も測定し

た。

(倫理面への配慮)

動物実験については、名古屋市立大学動物実験委員会の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護を十分配慮しおこなった。

#### C. 研究結果

いずれのアンドロゲン枯渇処置群においても処置開始時期および処置期間に関わらず癌病巣の高度な退縮が認められ、また抗アンドロゲン剤投与群においても、Tg ラットの前立腺癌発生が部分的ではあるが、有意に抑制された。特に  $5\alpha$ -reductase の阻害剤である finasteride では用量相関をもって前立腺癌の発生が抑制された。SV40T antigen 及び androgen receptors の発現は退縮部位に一致して減弱しており、これにより局所的な androgen 濃度の減少を反映している可能性が示唆された。

#### D. 考察

以上より、このモデルは前立腺癌の発生と指標にして比較的早期に個体レベルでの抗アンドロゲン作用の検出に有効であることが示された。

#### E. 結論

我々の Tg ラットは内分泌かく乱作用

の検出系としての活用が期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 2) 雑誌

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-trimethylhydroquinone after initiation with 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Carcinogenesis*, 23(2): 283-287, 2002.

Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., Imai, T., Shirai, T. : Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Environ. Mol. Mutagen.*, 39: 271-278, 2002.

Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Shirai, T. : Effects of genetic background on prostate and taste bud carcinogenesis due to SV40 T antigen expression under probasin gene promoter control. *Carcinogenesis*, 23(3): 463-467, 2002.

Futakuchi, M., Cheng, J. L., Hirose, M., Kimoto, N., Cho, Y.-M., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., Shirai, T. : Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP). *Cancer Lett.*, 178: 131-139, 2002.

Shirai, T., Kato, K., Futakuchi, M., Takahashi, S., Suzuki, S., Imaida, K., Asamoto, M. : Organ differences in the enhancing potential of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine on carcinogenicity in the prostate, colon and pancreas. *Mutation Res.*, 506-507: 129-136, 2002.

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.

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.

Mori, T., Imaida, K., Tamano, S., Sano, M., Takahashi, S., Asamoto, M., Takeshita, M., Ueda, H., Shirai, T. : Beef tallow, but not perilla or corn oil, promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92: 1026-1033, 2001.

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.

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

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.

Kato, K., Takahashi, S., Cui, L., Toda, T., Suzuki, S., Futakuchi, M., Sugiura, S., Shirai, T. : Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 786-791, 2000.

Akaza, H., Tsukamoto, S., Morita, T., Yamauchi, A., Onozawa, M., Shimazui, T., Ideyama, Y., Shirai, T. : Promoting effects of antiandrogenic agents on rat ventral prostate carcinogenesis induced by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB). *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 3: 115-119, 2000.

## 2. 学会発表

曹永晩、朝元誠人、鈴木周五、外岩戸尚美、小川久美子、白井智之、Probasin プロモーター/SV40T 抗原発現遺伝子導入ラットにおける抗アンドロゲン剤による前立腺癌発生の抑制、第 61 回日本癌学会総会、東京、2002 年 10 月 1-3 日。(日本癌学会総会記事、P. 50)

竹下文隆、今井田克己、小川久美子、橋熊真悟、曹永晩、加藤浩司、白井智之、DMAB ラット前立腺癌に対する Nonylphenol と Genistein の影響、第 61 回日本癌学会総会、東京、2002 年 10 月 1-3 日。(日本癌学会総会記事、P. 359)

朝元誠人、外岩戸尚美、曹永晩、白井智之、トランスジェニックラットを用いた前立腺および肝臓がん研究、第 18 回日本毒性病理学会、東京、2002 年 1 月 24、25 日。(第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集、P. 36)

曹永晩、朝元誠人、鈴木周五、外岩戸尚美、高橋智、白井智之、遺伝子プロモーター/SV40T 抗原発現遺伝子導入ラットにおけるエストロゲン投与による前立腺癌病変の検討、第 18 回日本毒性病理学会、東京、2002 年 1 月 24、25 日。(第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集、P. 52)

竹下文隆、小川久美子、今井田克己、二口充、白井智之、DMAB ラット前立腺癌に対する Nonylphenol と Genistein の影響、第 18 回日本毒性病理学会、東京、2002 年 1 月 24、25 日。(第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集、P. 93)

二口充、朝元誠人、今井田克己、高橋智、彦坂敦也、曹永晩、加藤俊男、白井智之、PhIP ラット前立腺癌における PIN から Carcinoma への進展に関わる因子の追究、第 60 回日本癌学会総会、横浜、2001 年 9 月 26-28 日。(日本癌学会総会記事、P. 283)

葛谷和也、朝元誠人、二口充、今井田克己、杉浦諭、小川久美子、白井智之、イソフラボンを豊富に含む大豆胚芽熱水抽

出物の多臓器発癌修飾効果、第 17 回日本毒性病理学会、淡路、2001 年 1 月 25、26 日。(第 17 回日本毒性病理学会講演要旨集、P. 44)

曹永晩、高橋智、外岩戸尚美、鈴木周五、今井田克己、朝元誠人、白井智之、Probasin 遺伝子プロモーター/SV40T 抗原発現遺伝子導入ラットにおける前立腺癌の経時的検討、第 17 回日本毒性病理学会、淡路、2001 年 1 月 25、26 日。(第 17 回日本毒性病理学会講演要旨集、P. 56)

吉野裕子、河部真弓、市原敏夫、宮下嘉代子、佐野真士、萩原昭裕、今井田克己、白井智之、ビスフェノール A の妊娠期・授乳期曝露による児の雄性生殖器への影響、第 17 回日本毒性病理学会、淡路、2001 年 1 月 25、26 日。(第 17 回日本毒性病理学会講演要旨集、P. 64)

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 18. 内分泌かく乱化学物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する 鋭敏なモデルの開発に関する研究

研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部長

### 研究要旨

内分泌かく乱化学物質のラット乳幼児期暴露による甲状腺、乳腺をはじめとした主要臓器における発がん感受性の変化を検出することを目的として、出生直後から離乳後の計6週間にわたり0.2及び1.0ppmの濃度で ethinyl estradiol (EE) を飼料に混じて母動物および児動物に与えた後、児に対して *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) および 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を投与し、増殖性病変の発生状況を検索する実験を行っている。雄については、食道腫瘍の発生により生存率が低下したことから、発がん物質処置後13週で屠殺した。肉眼的には甲状腺の結節がEEの0, 0.2及び1.0ppmで各々9/12 (75), 13/20 (65)及び8/15例 (53%)でみられ、現在病理組織標本を作製中である。雌については実験を継続中である。

### A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質 (EDCs) の甲状腺発がん修飾作用を鋭敏に検索する試験系はまだ確立されておらず、早急にその試験系の確立が望まれている。これまでに、DHPN でイニシエーションを行った後 EDCs と抗甲状腺剤である sulfadimethoxine (SDM) を組み合わせて投与するラットモデルについて検討し、更に SDM 以外の抗甲状腺剤として propylthiouracil, 過塩素酸カリウム, イオパノ酸, 低ヨード食についても追加検討を行い、最適な組み合わせを選びモデルの確立を行った。今年度は、乳幼児期に EDCs の暴露を受けた際の甲状腺及び乳腺発がん感受性に対する影響については不明であることから、現在 EE を乳幼児期に投与した場合の発がん感受性の変化について検討を行っている。

### B. 研究方法

F344 妊娠雌ラット 15 匹を 3 群に分け、出産直後より、ethinyl estradiol (EE) を 0, 0.2 及び 1.0 ppm 濃度で餌に混じて投与した。生後 3 週で児動物を離乳すると同時に、児動物にも同様に 3 週間にわたり EE を混餌投与した。その後生後 6 週より *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を 0.2% 濃度で 8 週間飲水に混じ、更に生後 7 週時に 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) を 50 mg/kg 体重の用量で強制経口投与した。発がん物質処置終了後は、毎週 1 回、胸・腹部の触診を行い、触知可能な腫瘍の発生の有無を観察するとともに、腫瘍が触知された際にはその発生部位及び大きさを記録した。雄群については、イニシエーション終了後 13 週で屠殺し、甲状腺、肝臓、腎臓、肺、乳腺及び食道を中心に病理組織標本を作製中である。雌群については、発がん物

質処置終了後 17 週目 (2003 年 2 月 5 日現在)であり、実験を継続している。

(倫理面への配慮)

動物の取扱いは、国立医薬品食品衛生研究所の規定に基づいて行っている。なお、屠殺はエーテル深麻酔下、動脈からの脱血により行い、動物へ苦痛を与えないよう留意する。

## B. 研究結果

乳幼児期に EE を投与することにより、雌雄とも生存率に対する影響はみられなかったが (Fig. 1)、体重については増加抑制を示した (Fig 2)。特に雄においてその傾向が強く、EE 0.2ppm 群では発がん物質処置終了前週まで、EE 1.0ppm 群ではその後も EE 0ppm 群に比較して有意な低体重が持続した。雄については、発がん物質処置終了後 13 週時の死亡/切迫屠殺率が EE 0, 0.2, 1.0ppm の各群で 33, 45, 44%に達したため、全例を屠殺した。死亡/切迫屠殺の主な原因は、食道における結節/腫瘍の発生による摂食障害であった。雌については剖検終了時まで、いずれの動物についても触知可能な腫瘍の発生はみられなかった。死亡/切迫屠殺例を含む雄の剖検所見を Table 1 にまとめた。肉眼的には甲状腺の結節が EE の 0, 0.2 及び 1.0ppm で各々 9/12 (75), 13/20 (65)及び 8/15 例 (53%)でみられた。

雌の発がん物質処置終了後 16 週までの触知可能な腫瘍の発生頻度は、EE 0, 0.2, 1.0ppm の各群で 3/18 (17), 9/19 (47), 12/19 (63%) であり、EE 投与群で高い傾向がみられた。触知可能な腫瘍の発生頻度、個数及び大きさの推移を Fig. 3 にまとめた。腫瘍の大きさには EE 投与による影響はみられなかったが、発生頻度及び個数については EE 投与により明らかに増加する傾向がみられた。

## D. 考察

乳幼児期に EDCs の暴露を受けた際の影響について、ラットモデルにおいて性成熟が遅延することが報告されている (Stocker TE et al., 2000; Laws SC et al., 2000)。発がんに対する影響については、植物性ホルモンが乳腺発がんを抑制する等の報告がみられるが (Cotrone MC et al., 2002)、他の臓器については不明な点が多い。また、bisphenol A の胎児期暴露は、兎動物の DHPN による甲状腺、肺、食道、肝発がんに影響を及ぼさないという報告もある (Takashima Y et al., 2001)。本研究では、乳幼児期に EDCs の暴露を受けた際の甲状腺、乳腺をはじめとした主要臓器における発がん感受性を検出することを目的として、EE を乳幼児期に投与した場合の発がん感受性について検討を行っている。

雌については、剖検時に甲状腺の結節が EE の 0, 0.2 及び 1.0ppm で各々 75, 70 及び 53%の頻度でみられ、EE 投与による明らかな影響は認められなかった。今後、病理組織学的検査結果を加えて詳細な評価を進める。雌については乳幼児期に EE を投与することにより、触知可能な腫瘍の発生頻度及び発生個数が増加する傾向が認められている。しかしながら、最終的には剖検により皮下組織の肉眼的観察を行った後、病理組織学的診断を加えた総合的な評価が必要である。

## E. 結論

触診による乳腺腫瘍の経時的観察結果より、雌ラットの乳幼児期に EE を投与することにより触知可能な腫瘍の発生頻度及び発生個数が増加する傾向が認められている。今後甲状腺に対する発がん修飾作用を含め、病理組織学的検討を加えた総合的な評価を進める。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takagi H, Mitsumori K, Onodera H, Nasu M, Tamura T, Yasuhara K, Takegawa K, Hirose M. Improvement of a two-stage carcinogenesis model to detect modifying effects of endocrine disrupting chemicals on thyroid carcinogenesis in rats. *Cancer Lett*, 178: 1-9, 2002.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願，登録状況

なし。



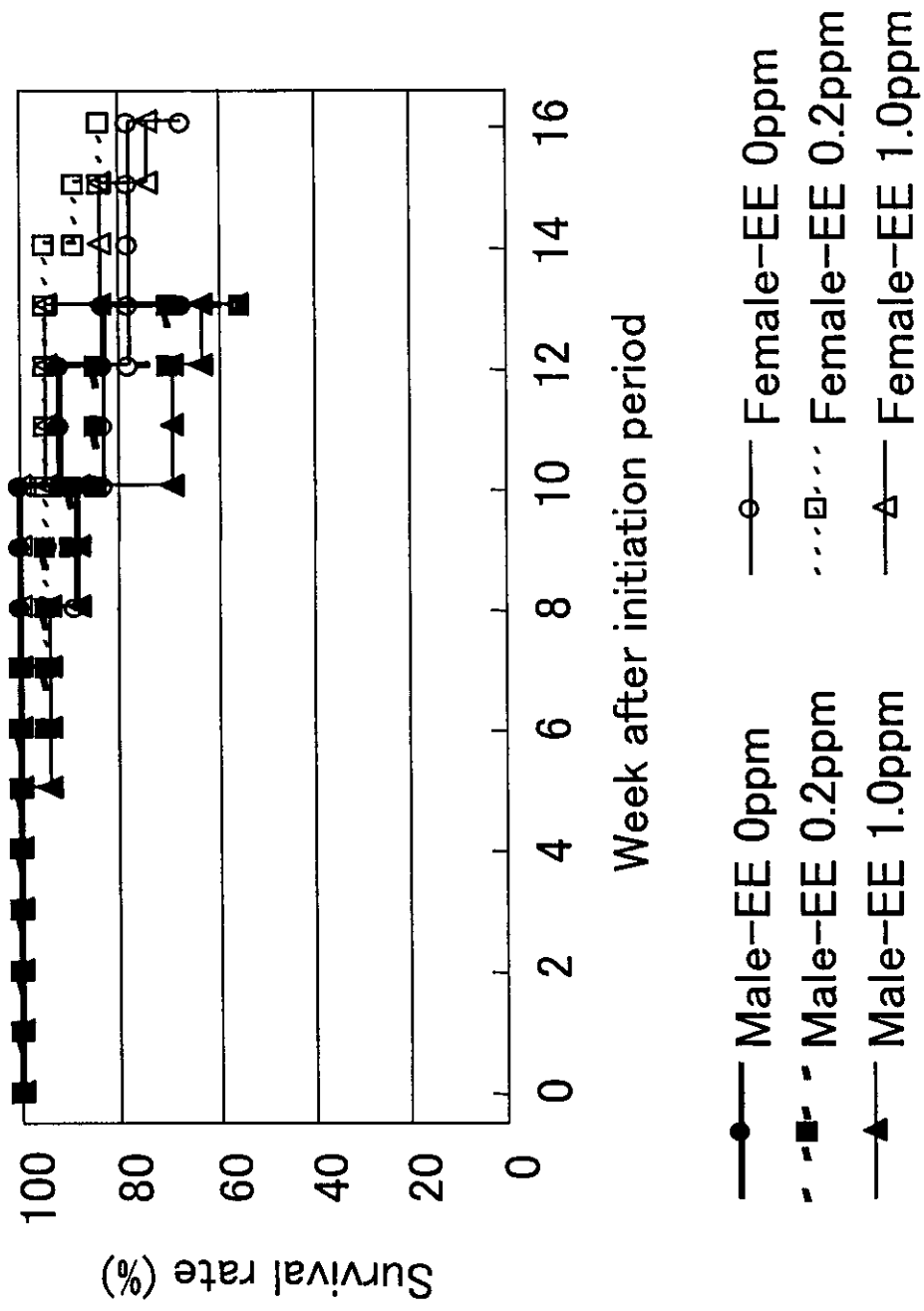


Fig. 1 Survival rates of rats initiated with DHPN and DMBA following ethinyl estradiol (EE) treatment

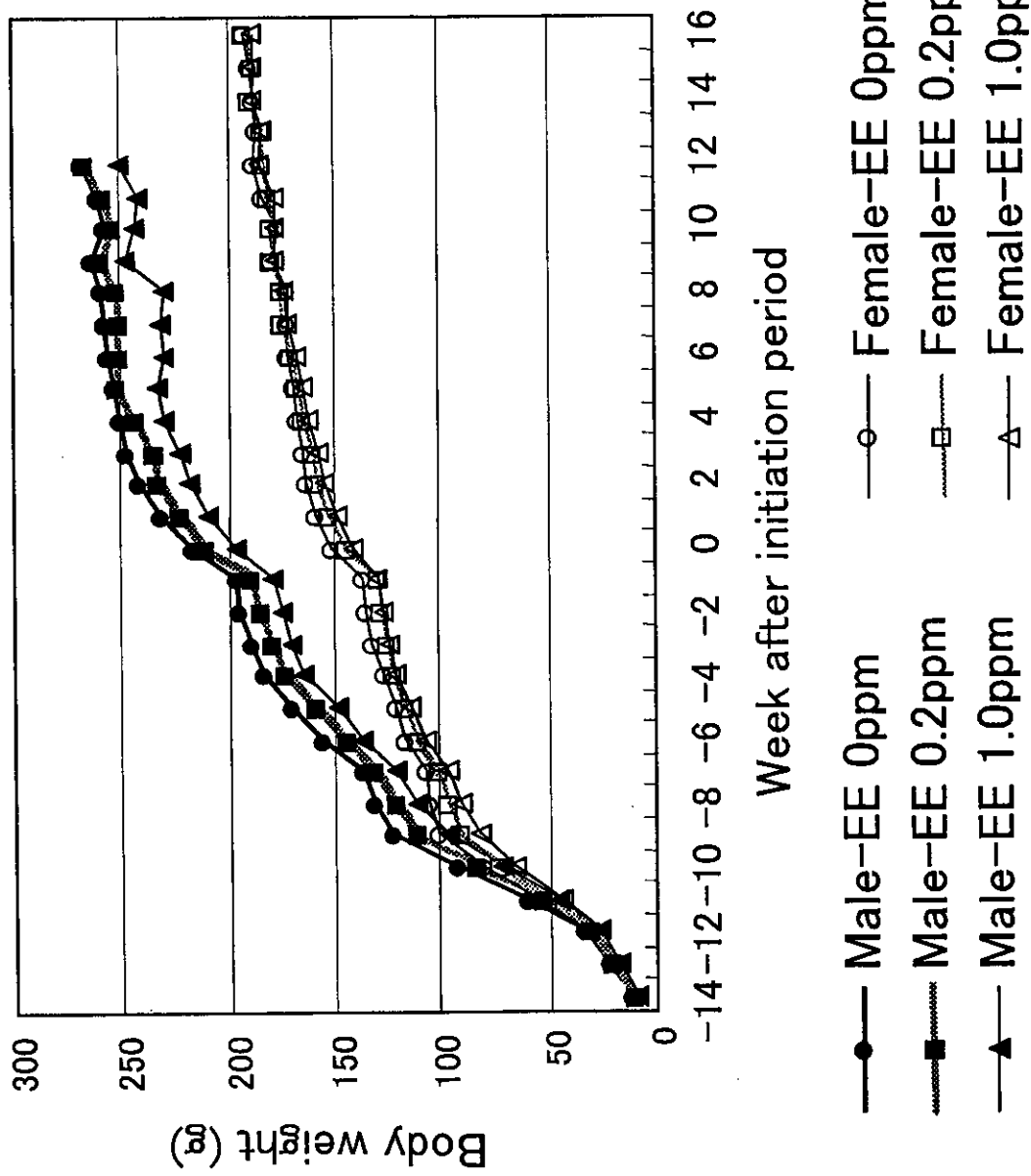
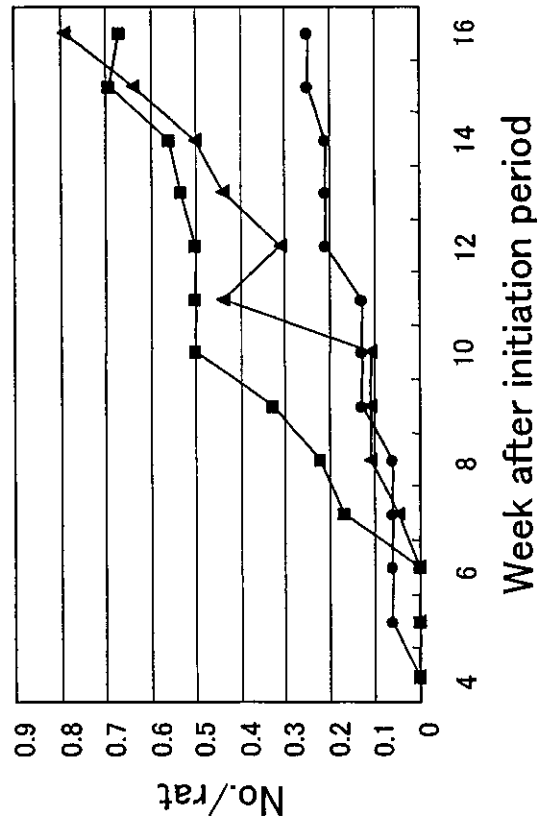
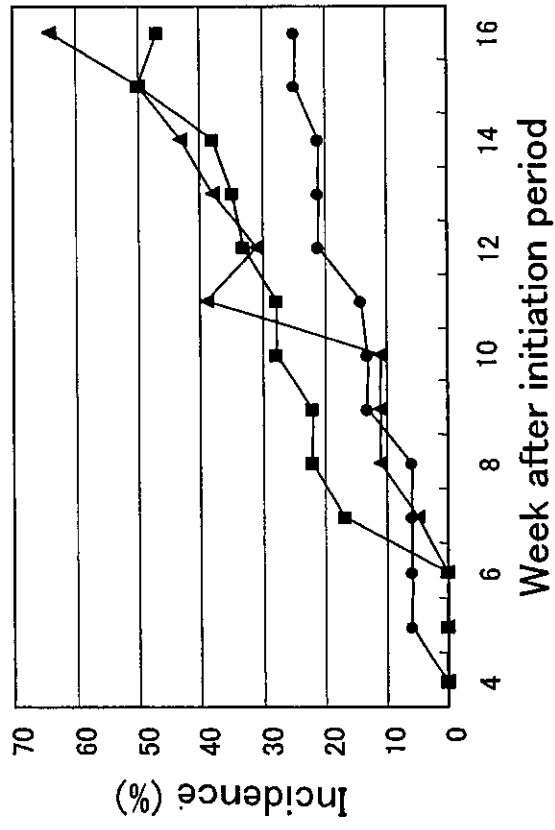


Fig. 2 Body weight curves of rats initiated with DHPN and DMBA following ethinyl estradiol (EE) treatment



● Female-EE 0ppm  
 ■ Female-EE 0.2ppm  
 ▲ Female-EE 1.0ppm

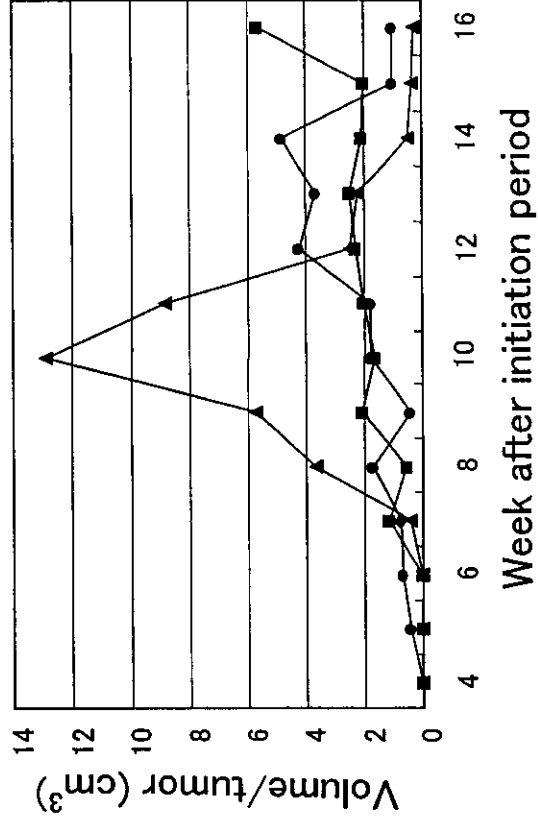


Fig. 3 Incidence, Multiplicity and volume of palpable tumors in female rats initiated with DHPN and DMBA following ethinyl estradiol (EE) treatment

**Table 1 Macroscopic findings in male rats initiated with DHPN and DMBA following ethinyl estradiol (EE) treatment**

Organ	Finding	Treatment		
		0	0.2	1.0
Thyroids	Nodule/Mass	9/12 (75)	13/20 (65)	8/15 (53)
Esophagus	Nodule/Mass	12/12 (100)	20/20 (100)	16/16 (100)
Lungs	Spot/Nodule	12/12 (100)	20/20 (100)	16/16 (100)
Liver	Spot/Nodule	4/12 (33)	11/20 (55)	9/16 (56)
Kidneys	Spot/Nodule	2/12 (17)	9/20 (45)	8/16 (50)
Bladder	Nodule	1/12 (8)	5/20 (25)	3/16 (19)
Thymus	Enlargement	0/12 (0)	1/20 (5)	3/16 (19)
Zymbal gl.	Mass	0/12 (0)	2/20 (10)	2/16 (13)

( ): %

## 19. 内分泌かく乱物質の乳腺発がん及ぼす影響の検討

研究者 長村 義之 東海大学医学部 総合診療学系病理診断学部門 教授・副医学部長

### 研究要旨

7,12-Dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)投与によるラット乳腺発がんモデルを用いて誘発した乳腺腫瘍について、病理組織学および免疫組織化学的に検索し、ラット自然発生乳腺腫瘍と比較した。DMBA 誘発乳腺腫瘍では、腫瘍細胞にエストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ )の発現が低下した。ラット乳腺組織における化学発がんでは、遺伝子の変異のみではなく、エストロゲン等の乳腺増殖刺激が必要と考えられるため、現在、DMBA 投与後卵巣摘出ラットを用いて、エストロゲンの乳腺発がん及ぼす影響を検討中である。

### A. 研究目的

内分泌かく乱物質の多くはエストロゲン作用を有することが広く知られている。我々は DMBA 投与後卵巣摘出によるラット乳腺発がんモデルを用いて、乳腺腫瘍化の過程の中で内分泌かく乱物質の及ぼす影響を病理組織学、免疫組織化学、その他種々の方法を用いて検討する。

### B. 研究方法

予備実験として、代表的な乳腺発がんの実験モデルであるラット DMBA 投与化学発がんモデルを用いて、乳腺腫瘍を誘発し、ラットにおける自然発生乳腺腫瘍との病理組織形態像、エストロゲンレセプター発現、および細胞増殖活性の差異を比較検討した。7 週齢の雌性 Sprague-Dawley 系ラットに DMBA を 20 mg/animal/week で合計 3 回投与した。その後、通常飼育を行い、乳腺腫瘍が発生した個体について解剖し、病理組織標本を作製して組織学的検査を行った。また、ER $\alpha$ 、エストロゲンレセプター $\beta$  (ER $\beta$ )および細胞増殖マーカーである Ki-67 抗原 (MIB-5)について免疫組織化学的検索を行った。なお、比較対照として、同系ラットを無処置で 1~2 年飼育し発生した乳腺腫瘍を材料として用いた。

これらの実験結果を踏まえ、DMBA による前処置を行ったラットに卵巣摘出を実施し、さらに低濃度および高濃度のエストラジオールを反復投与し、発生する乳腺腫瘍への影響を検索する実験を進行中である。また、この他にエストラジオ

ールとフラボノイドの相互作用を研究するため、食餌中にケルセチンを添加した実験を計画中である。

### C. 研究結果

今回用いたラットの自然発生乳腺腫瘍では、腺管細胞由来と考えられる大型の腫瘍細胞から構成され、腺管癌と診断した。DMBA 誘発乳腺腫瘍でも腺管癌の組織形態像を示したが、自然発生腫瘍と比較して異型性の強い腫瘍細胞から構成されていたが、細胞の大きさは自然発生乳腺腫瘍と比較して小型であった。ER $\alpha$ は、今回用いた自然発生乳腺腫瘍では腫瘍細胞に明らかな陽性像が認められたが、DMBA 誘発乳腺腫瘍ではほとんどの腫瘍細胞で陰性であった。一方、ER $\beta$ は、自然発生乳腺腫瘍、DMBA 誘発乳腺腫瘍ともに弱陽性を示し、両者に明らかな差は認められなかった。Ki-67 抗原による細胞増殖活性は、DMBA 誘発乳腺腫瘍よりも自然発生腫瘍の方が高頻度に陽性細胞が認められた。

### D. 考察

昨年度の検索により、正常ラット乳腺の導管および terminal end bud (TEB)では、ER $\alpha$ は明らかに陽性であり、ER $\beta$ は弱陽性であったことから、ER の発現は、自然発生乳腺腫瘍では正常乳腺組織の状態が維持されているものが多いと考えられる。一方、DMBA 誘発乳腺腫瘍では、異形度が自然発生腫瘍よりも高く、ER $\alpha$ の発現は明らかに弱くなっていた。また、

昨年度の検索により、低用量のエストラジオールを投与したラット乳腺では、組織形態像も正常乳腺組織と大差なく、ER $\alpha$ の発現も維持されていたが、高用量のエストラジオールを投与したラット乳腺では、腺房が顕著に発達し、腺房細胞でのER $\alpha$ の発現は非常に弱かった。BarbacidらのMNU投与による誘発乳腺腫瘍では、化学発がん物質により遺伝子(例えば*ras*)の変異が生じててもエストロゲン除去(抗エストロゲン剤投与+卵巣摘除)により乳腺増殖を阻害すると乳腺腫瘍は発生せず、これらにエストロゲンを投与すると再び乳腺腫瘍が発生することを報告している。このことから、乳腺の化学発がんには遺伝子変異と乳腺増殖刺激の両者が必要と考えられる。したがって、今回の実験のDMBA誘発乳腺腫瘍においてER $\alpha$ の発現が低下した原因として、持続的なエストロゲン刺激の関与が考えられる。

したがって、現在進行中の本実験では、DMBA投与後卵巣摘出ラットを用い、反復投与するエストラジオールの用量を変えて実施しているが、この実験によりエストラジオールの用量に乳腺腫瘍の発生頻度、組織形態像、ERの発現等に差異がみられることが予想され、このモデルを用いることでエストロゲン作用を有する内分泌かく乱物質が乳腺発がん及ぼす影響を評価することができるか否かを検証する。

なお、Ki-67抗原は、正常ラット乳腺の導管で弱陽性、TEBで顕著な陽性を示し、自然発症乳腺腫瘍でも顕著な陽性像が認められたが、DMBA誘発乳腺腫瘍では弱陽性であった。ラット乳腺腫瘍では、初期の小さな腫瘍では高い細胞増殖活性がみられるが、ある程度の大きさになると細胞増殖活性が低下することが知られている。今回のDMBA誘発乳腺腫瘍は肉眼的に十分な大きさになった腫瘍を用いたため、この点については単純に増殖活性が低下したとすることができず、腫瘍細胞の増殖ステージを考慮した標本の採取が必要と考えられる。

## E. 結論

DMBA誘発ラット乳腺腫瘍と今回用いた自然発生腫瘍では、ERの発現に差が生じていることが示され、DMBA誘発ラット乳腺腫瘍はER $\alpha$ の発現においてヒトの悪性乳腺腫瘍と類似していることがわかった。今後の検索において、現在進行中の実験が、エストロゲン作用を有する内分泌かく乱物質の暴露が乳腺発がん及ぼす影響を評価できる実験系か否かを検証する。

### 報告書(2000-2002)

乳腺細胞は、エストロゲン(E2)とプロラクチン(PRL)の影響を受け、増殖分泌することが良く知られている。また、内分泌攪乱化学物質の多くのものが、エストロゲン作用を有するところから、本班研究においては、エストロゲンが乳腺細胞の性格にどのような影響を与えるかの検討をした。

1. ラット乳腺において、乳腺細胞はエストロゲンレセプター(ER) $\alpha$ を発現している。E2大量投与により乳腺は腺房化しER $\alpha$ が減弱した。E2はER $\alpha$ をdownregulateしている可能性が示唆された。

2. ヒト乳癌由来細胞MCF-7でも、ERの発現は減弱し、逆にER拮抗剤Tamoxifen(Tam)では増強した。これらの事実は、エストロゲンそのものが乳腺細胞および乳癌細胞のERを変化させエストロゲンに対する反応性を変化させている可能性が考えられた。

3. ラット乳細胞では、RT-PCRおよびIn situ RT-PCRの技術を用いて、PRL、E2に反応して変動するPRL-receptor(R)を検出した。このことは、ラット乳腺はエストロゲンおよびプロラクチンの環境のもとに生理的機能を営み、それら内分泌物質の環境変化は乳腺細胞の増殖分泌などの動的変動を惹起する可能性を示唆した。

4. ヒト乳癌では、その予後因子および治

療への指針としてERおよび癌遺伝子HER2が注目されている。HER2の発現は、予後不良因子として、また抗体療法のターゲット蛋白として重要であり、ERは予後良好因子、および内分泌療法のターゲット蛋白として日常良く用いられる。我々はこれまで、ヒト乳癌におけるERの定量的判定基準の設定を試みてきている。

5. ラット乳腺におけるDMBA発癌において、エストロゲンが発癌と促進するか否かの課題に向け実験計画を作成した。その

F. 健康危険情報  
無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 書籍
  - ① 監修／井上達、編集／今井清、長村義之、加藤正信、菅野純：「内分泌攪乱物質の生物試験研究法」シュプリンガー・フェアラーク東京、2000
  - 2) 雑誌
    - ② Satoh F, Umemura S, Osamura RY : Immunohistochemical analysis of GCDFP-15 and GCDFP-24 in mammary and non-mammary tissue, Breast cancer, 7, 49-55, 2000
    - ③ 岩崎俊基、梅村しのぶ、小泉治子、長村義之：妊娠および授乳ラット乳腺における PRL mRNA の発現および調整について乳癌基礎研究, 9, 20-24, 2000
    - ④ Hua Shu Jin, Umemura S, Iwasaka T, Osamura RY : Alterations of myoepithelial cells in the rat mammary gland during pregnancy, lactation and involution, and after estradiol treatment, Pathology international, 50, 384-391, 2000
    - ⑤ Iwasaka T, Umemura S, Miyajima K, Shoda T, Takahashi A, Kakimoto K, Koizumi H, Miyakawa Y, Osamura RY : Lack of prolactin (PRL) mRNA expression in estrogen-treated rat mammary glands, J Toxicol Pathol, 13, 151-157, 2000
    - ⑥ Osamura RY, Iwasaka T, Umemura S :

準備としてDMBA誘発乳癌におけるERの動態を観察し、癌細胞ではER<sub>L</sub>が減弱していることを見出した。

以上より、エストロゲン様作用を有する内分泌攪乱化学物質が、乳腺細胞を取り巻く環境変化を惹起し、そのER、PRL-Rなどの動態に変化をきたす可能性が示唆された。これらの基礎的知見を基盤としてエストロゲンの乳癌誘発における作用・影響を引き続き検討中である。

Endocrin System and Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), J Toxicol Pathol 2001, 14, 59-64, 2001

- ⑦ 岩坂俊基、梅村しのぶ、柿本恒知、竹腰進、小泉治子、長村義之：ラット正常及び腫瘍乳腺における PRL-R mRNA 発現と調節について：laser capture microdissection を用いた検討、乳癌基礎研究, 10, 1-6, 2001
  - ⑧ Umemura S, Sakamoto G, Sasano H, Tsuda H, Akiyama F, Kurosumi M, Tokuda Y, Watanabe T, Toi M, Hasegawa T, Osamura RY : Evaluation of HER2 Status: For the Treatment of Metastatic Breast Cancer by Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody (Trastuzumab) (Pathological Committee for Optimal Use of Trastuzumab), Breast Cancer, 8, (4) 316-320, 2001
  - ⑨ 梅村しのぶ、関戸康友、伊藤仁、熊木伸枝、徳田裕、田島知郎、長村義之：ホルモンレセプターの免疫組織学的評価について、乳癌の臨床, 17 (5) 502-503, 2002
  - ⑩ Tsuda H, Sasano H, Akiyama F, Kurosumi M, Hasegawa T, Osamura RY, Sakamoto G : Evaluation of interobserver agreement in scoring immunohistochemical results of HER-2/neu (c-erbB-2) expression detected by Herceptest, Nichirei polyclonal antibody, CB11 and TAB250 in breast carcinoma, Pathology International, 52, 126-134, 2002
2. 学会発表
- ① 岩坂俊基、梅村しのぶ、柿本恒知、小

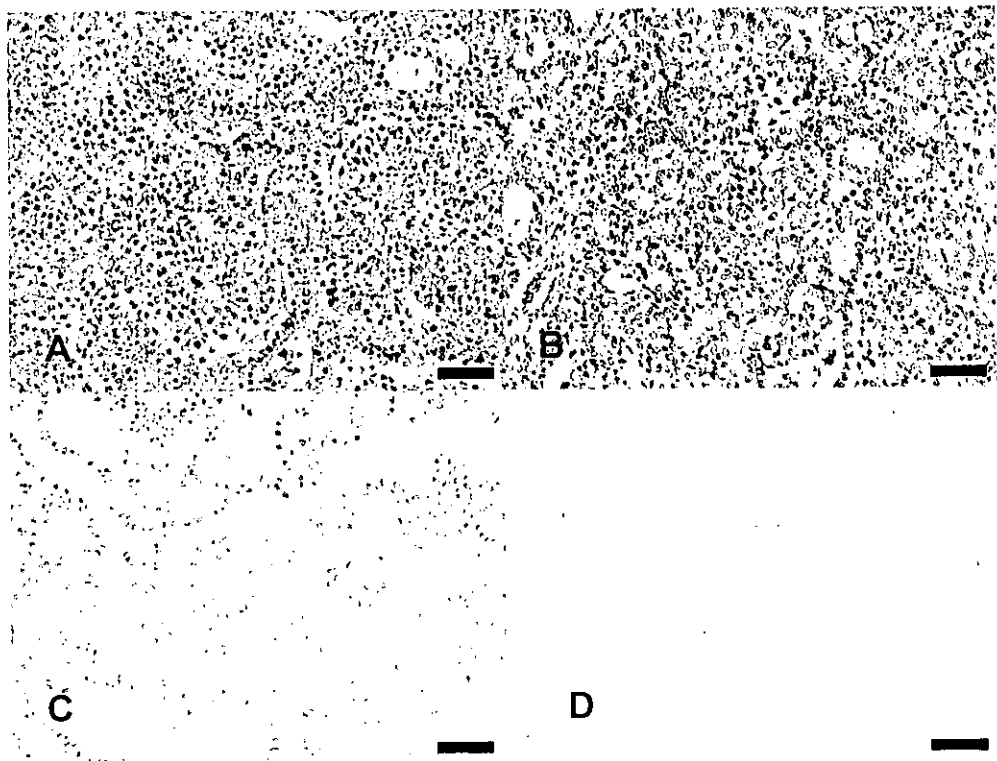
- 泉治子、長村義之：ラット正常及び腫瘍乳腺における PRL-R mRNA 発現と調節について laser capture microdissection を用いた検討, 第 10 回乳癌基礎研究会, 2000. 8. 25
- ② 岩坂俊基、梅村しのぶ、美谷島克宏、正田俊之、高橋明美、柿本恒知、小泉治子、宮川義史、長村義之：ラット乳腺腫瘍 (fibroadenoma) における形態、血中ホルモンおよびプロラクチンレセプター (PRL-R) mRNAs の関連について-非腫瘍部乳腺との比較-, 第 17 回日本毒性病理学会, 2001. 1. 26
- ③ 関戸康友、梅村しのぶ、長村義之：再発転移乳癌に対する Trastumab (Herceptin) 投与例の組織学的変化について, 第 90 回日本病理学会総会, 2001. 4. 5
- ④ 岩坂俊基、梅村しのぶ、竹腰進、柿本恒知、小泉直子、長村義之：ラット正常および腫瘍乳腺におけるプロラクチン・レセプター (PRL-R) mRNA の発現について, 第 90 回日本病理学会総会, 2001. 4. 5
- ⑤ 関戸康友、梅村しのぶ、長村義之：乳癌の原発・再発巣における HER2 過剰発現の差異についての検討, 第 90 回日本病理学会総会, 2001. 4. 5
- ⑥ 長村義之：Detection of the HER2 alteration, correlation of IHC and FISH with clinical outcome in patients treated with Herceptin, 第 10 回日本乳癌学会総会 2002. 7. 5-6
- ⑦ 梅村しのぶ、関戸康友、伊藤仁、熊木伸枝、徳田裕、田島知郎、長村義之：ホルモンレセプターの免疫組織学的評価について, 第 10 回日本乳癌学会総会, 2002. 7. 5-6
- ⑧ 関戸康友、梅村しのぶ、長村義之、鈴木育宏、斉藤雄紀、徳田裕、田島知郎：乳癌の原発/再発巣における HER2 過剰発現および p 5 3 発現の差異についての検討, 第 10 回日本乳癌学会総会, 2002. 7. 5-6
- ⑨ 関戸康友、梅村しのぶ、長村義之：乳癌の原発/再発巣における HER2 過剰発現および p 5 3 発現の差異についての検討, 第 12 回乳癌基礎研究会, 2002. 7. 27
- ⑩ Sekido Y, Umemura S, Osamura RY : Comparative Analysis of HER2 expression in the Primary and Metastatic/Recurrent Breast Cancer, 6th Joint Meeting of the JSHC & HCS, 2002
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
無し。



参考データ: 今回の検索結果

	DMBA 誘発乳腺腫瘍		自然発生乳腺腫瘍	
	No. 16	No. 23	No. 1	No. 2
組織像	腺管癌	腺管癌/腺房癌	腺管癌	腺管癌(および腺房腺腫*)
	小型細胞主体	小型細胞主体	大型細胞主体	大型細胞主体
	異型性強	異型性強	異型性中等度	異型性中等度
ERα	-/+	-	++	++
ERβ	-/+	+	-/+	-/+
Ki-67	-	-/+	+ / ++	++

\*結果は、腺管癌の部分のみを評価した



A : 自然発生乳腺腫瘍の組織像, B : DMBA 誘発乳腺腫瘍の組織像, C : 自然発生乳腺腫瘍の ER $\alpha$ , D : DMBA 誘発乳腺腫瘍の ER $\alpha$ , Bars = 50  $\mu$ m.

## 20. 内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期曝露が 雌性生殖器に与える影響に関する研究

研究者 吉田 緑 財団法人 佐々木研究所病理部 研究員

### 研究要旨

エストロゲン様作用を有する *p-tert* octylphenol(OP)の生後 15 日齢までのラット新生仔期大量曝露は、視床下部・下垂体・性腺制御系をエストロゲン様に作用して不可逆的に変化させた結果、性成熟前より雌性生殖器の発育・分化を重篤な障害すると同時に、子宮および膣へも直接的な影響を及ぼす。一方、生後 5 日齢までの曝露では性成熟後に異常が発現する遅延型の影響を示した。曝露時期は異なるが両群の動物は長期にわたる持続発情を示し、子宮癌発生を増強させた。しかし OP 大量曝露は卵巣へ直接的な影響を与えなかった。また、ヒト曝露量を含む低用量の bisphenol A(BPA)のラット経胎盤・授乳曝露は雌性生殖器の発育・分化、性周期および子宮発癌へ影響を与えなかった。

#### A. 研究目的

今年度は以下の 3 点について検討した。

##### 1. 新生児期の曝露期間の長さが雌性生殖器に及ぼす影響

前年度までの研究において、エストロゲン様作用を有する *p-tert* octylphenol(OP)のラット新生仔期大量曝露は、視床下部を障害した結果、視床下部・下垂体・性腺系を介して生殖器系臓器への間接的な影響を与えるだけでなく、子宮および膣へも直接的な影響を与え、子宮癌を誘発する可能性が示唆された。しかし、新生児期の曝露期間の長さによる影響の違いについては知見が得られていない。今年度は、高用量の OP 新生児期曝露期間の長さがラット雌性生殖器に与える影響について検索した。観察項目としては、前年度同様、出生後から性成熟期を経て 15 ヶ月齢まで持続的に形態学および内分泌学的側面より検索するとともに、子宮発癌修飾作用についても観察した。

##### 2. 新生児期曝露が卵巣に及ぼす影響

さらに、前年度までの研究において OP など内分泌かく乱化学物質の子宮および膣に対する直接作用は確認されたが、卵巣への直接作用については確定していない。そこで今年度は OP 大量曝露による卵巣への影響について検索した。

##### 3. 低用量曝露が雌性生殖器に及ぼす影響

またいずれの内分泌かく乱化学物質につい

ても最終的にヒトが曝露される可能性のある低用量での評価が必要である。そこで、今年度はヒトが曝露される可能性のある低用量の胎仔期および新生仔期曝露がラットの雌性生殖器へ及ぼす影響について検討した。内分泌かく乱化学物質としては、OP と同様、代表的なエストロゲン様物質である bisphenol A(BPA)を用いて、母ラットを介した胎児期・新生児期曝露の雌性生殖器への影響を検索した。OP 大量曝露による典型例の結果において変化が観察された項目を、雌性生殖器への影響を検出する指標とし、観察期間についても出生後より性成熟期を経て 15 ヶ月齢まで長期間にわたり観察を行った。また子宮発癌への修飾作用についても検討した。

#### B. 研究方法

以下の 1~3 の実験において子宮癌好発系の Crj:Donryu ラットを用いた。

##### 1. 新生児期の曝露期間の長さが雌性生殖器に及ぼす影響。

生後 24 時間以内の雌新生児ラットの背部に OP100mg/kg を 5 日齢(PNDs1-5 群)または 15 日齢(PNDs1-15 群)まで隔日に皮下投与した。本投与量は成熟および新生児ラットに明らかなエストロゲン様作用を示す用量である。性成熟前の雌性生殖器系の発育・分化に対する OP の影響を観察するために経時的に動物を剖検し、性腺刺激ホルモン(卵胞刺激ホルモン FSH、黄体形成ホルモン LH)、子宮腺の形成、子宮

のエストロゲンレセプターの発現、子宮重量、膣開口などの内分泌学および形態学的検索を行った。性周期は膣開口後、全実験期間にわたって観察した。子宮発癌への修飾作用を検討するために、PNDs1-5 および PNDs1-15 群ともに 11 週齢にて *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) を子宮腔内に投与して 15 ヶ月齢まで観察し、子宮の増殖性病変について形態学的に検索した。

## 2. 新生児期曝露が卵巣に及ぼす影響

卵巣への影響を検索するために、1. と同様の処置を行ったラットを用いて、卵巣交換、卵巣の形態および繁殖に対する卵の機能について検索した。卵巣交換実験では、初回排卵前の 30 日齢ラットの両側卵巣を摘出し、同群および異なる群の卵巣摘出動物の頸背部皮下に移植した。移植後、13 週齢まで性周期を経時的に観察し各群の非移植動物と比較した。また、14 週齢では正常性周期(発情期の午前中)および持続発情を示す動物の一部について、排卵数、卵巣の重量および卵胞数・黄体数など卵巣の形態について検索した。生後 12 週齢では、対照群と正常性周期を示す PNDs1-5 群の一部の動物を用いて無処置雄ラットと交配させ、着床数、子宮重量、胎児数、胎児体重を観察した。

## 3. 低用量曝露が雌性生殖器に及ぼす影響

食用缶中に溶出する可能性のある投与量を基に換算した用量である 0.006mg/kg を含む低用量の BPA(0, 0.006 および 6mg/kg) を妊娠 2 日目から離乳前日まで母ラットに強制経口投与した。児ラットの雌性生殖器への影響を検出するために、OP の新生児期大量曝露実験で観察された各項目を指標として用いて性成熟までの発育・分化および長期に亘る性周期について検索した。ENNG 誘発子宮発癌への修飾作用についても 15 ヶ月齢まで観察し、子宮の増殖性病変について形態学的に検索した。また、母動物から児への移行を検索するために、母ラットの血清、母乳および児ラットの血清および肝臓中の BPA 濃度を測定した。さらに環境中 BPA として流水中、給水タンク内飲料水および餌中の BPA 濃度も測定した。

倫理面への配慮

本実験は「動物の保護及び管理に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」の主旨およびおよび WHO(World Health Organization:世界保健機構)の医学研究顧問委員会の勧告に基づき CIOMS(The Council for International Organization of Medical Sciences:国際医科学関係組織協議会)が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に沿って実施した。

## C. 研究成果

### 1. 新生児期の曝露期間の長さが雌性生殖器に及ぼす影響。

PNDs1-15 群では前年度報告したように、性成熟前の検査において、性腺刺激ホルモン測定値の低値、子宮腺の形成抑制、免疫組織化学染色による子宮被覆、腺上皮および間質のエストロゲンレセプター発現および細胞増殖活性の異常あるいは膣開口の早期化など各項目に変化が観察されたが、PNDs1-5 群ではいずれの項目も対照群と同様で異常は認められなかった(図 1)。性周期においても PNDs1-15 群では膣開口後全例が速やかに持続発情となったが、PNDs1-5 群では大多数の動物が膣開口後正常な性周期を示した。しかし、同群では対照群より早期に持続発情となり、5 ヶ月齢では対照群より 6 ヶ月間早く全例が持続発情となった(図 2)。子宮癌の発生について PNDs1-15 群では、発生頻度は対照群と同程度であったが、中・低分化型あるいは遠隔転移等の悪性型が有意に増加した。一方 PNDs1-5 群では対照群と同程度の子宮内に留まる分化型の内膜腺癌が有意に増加した(表 1)。

### 2. 新生児期曝露が卵巣に及ぼす影響

卵巣交換後 1~2 週間はいずれの群においても移植の影響により不規則な性周期を示した。対照群同士あるいは対照群に PNDs1-5 群および 1-15 群の卵巣交換個体では、8 週齢以降大部分が正常性周期を示した(図 3)。PNDs1-5 群の個体に対照群あるいは PNDs1-5 群の卵巣を移植した群では生後 8 週齢以降大部分が正常性周期であったが、非移植群と同様、漸次持続発情が増加した(図 4)。PNDs1-15 群に対照群および PNDs1-15 群の卵巣を移植した個体では非移植群と同様、い