

スチレン等内分泌かく乱物質の発がん性と閾値に関する調査研究

分担研究者 福島昭治 大阪市立大学医学部教授

研究要旨

Styrene monomer, Bisphenol A および Dieldrin のラット肝発がん性に及ぼす影響を検討した。Styrene monomer は高用量経口投与により肝発がん性を示さず、むしろ抑制作用を発揮することが明らかとなった。今後、Styrene monomer のヒト曝露レベルでの検討が必要である。一方、Bisphenol A の高用量投与は肝発がん性を示さなかった。さらに Dieldrin の高用量投与は肝発がん性を発揮したが、低用量では何ら作用を示さず、無作用量の存在が強く示唆された。

A. 研究目的

Styrene, Bisphenol A および Dieldrin の肝発がん性の有無を中期肝発がん性試験法 (伊東法) を用いて検討する。さらに、発がん性のある化学物質についてはその閾値の存在を検討する。

B. 研究方法

【実験 1】各群 16 匹の 6 週齢 F344 雄ラットに Diethylnitrosamine (DEN) を 200 mg/kg の用量で 1 回腹腔内に投与し、肝発がんに対するイニシエーション処置を行った。その 2 週間後より Styrene monomer の 250 および 1000 mg/kg/day を、また Bisphenol A の 40 および 160 mg/kg/day を 6 週間 (6 日/週)、胃内投与した。対照群には溶媒であるコーン油、または 0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水溶液を同様に投与した。さらに、各群 8 匹には DEN 無処置で Styrene monomer の 1000 mg/kg/day, Bisphenol A の 160 mg/kg/day 及びそれらの対照群にはそれぞれの溶媒を同様に投与した。なお、実験開

始 3 週間後には、肝細胞の増殖を促進させるために、全動物に 2/3 肝部分切除術を施行した。実験開始 8 週間後にエーテル麻酔下にて屠殺、剖検し、ホルマリン固定後、肝臓の胎盤型 Glutathione S transferase (GST-P) を免疫組織化学的に染色した。さらに前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の個数および面積をイメージアナライザーを用いて測定し、それらを定量的に解析した。

【実験 2】実験 1 と同様の方法を用いて Styrene monomer の低用量におけるラット肝発がん性に及ぼす影響を検討した。投与用量は 0.0006, 0.006 および 0.6 mg/kg/day で、胃内投与した。

【実験 3】実験 1 と同様の方法を用いて、Dieldrin の高用量および低用量におけるラット肝発がん性について検討した。投与量はヒト曝露量を考慮し、0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.3, 10, 33 および 100 ppm (飼料中用量) であった。

【実験 4】Dieldrin 低用量域での肝発がん反応を再確認するために、実験 1 と同様の方法を用いて Dieldrin の投与量を 0, 0.15, 0.3, 0.625, 1.25, 2.5 および 5 ppm (飼料中用量) として、再実験した。

[略語]

DEN, diethylnitrosamine

GST-P, 胎盤型 glutathione S transferase

### C. 研究結果と考察

【実験1】Styrene monomer では、体重増加の著明な抑制、軽度な肝臓重量の増加を認めた。肝 GST-P 陽性細胞巢の個数および面積の低値を 1000 mg/kg 群で、個数の低値を 250mg/kg 群で観察した(表1)。

Bisphenol A 投与群では、体重増加の抑制がみられた。肝 GST-P 陽性細胞巢の定量値に関しては対照群と比較して差を認めなかった(表1)。

【実験2】現在、実験開始後、6週目であり、体重増加に関し、対照群と投与群との間に差を全く認めていない。

【実験3】10 ppm 以上では対照群と比較し、肝の GST-P 陽性細胞巢発生の増加が認められた。低用量の 1.0 ppm では GST-P 陽性細胞巢定量値の減少傾向を、0.3 ppm では逆に増加傾向を示した。

【実験4】肝 GST-P 陽性細胞巢の発生は Dieldrin の 0.3 ppm を頂点として、逆 U 字型に増加・減少傾向を示した。

ラット肝の前がん病変のマーカーである GST-P 陽性細胞巢の定量的変動を指標として化学物質のラット肝発がん性を予測する本試験法により、Styrene monomer は投与用量と関連した GST-P 陽性細胞巢の発生抑制を示した。このことは高用量の Styrene monomer は肝発がんを抑制することを強く示唆している。現在、ヒトが曝露されるレベルでの低用量域での作用を詳細に検討中である。また Bisphenol A については対照群と差を認めなかったことから、長期投与によっても肝発がん性は示さないと結論された。

さらに、Dieldrin の肝発がん性に関しては、高用量では GST-P 陽性細胞巢の発生を増加させたが、低用量域では無処置対照群と差はなく、Dieldrin の発がん作用には無作用量が存在することが強く示唆された。しかし、GST-P 値に対する低用量の反応曲線は統計学的に有意差はな

いものの、逆 U 字型を示し、低用量反応曲線は一様ではないことが判明した。

### D. 今後の展望

Styrene monomer は高用量とはいえ、ラット肝発がん抑制作用を発揮した。今後、ヒトが曝露されるレベルでの作用を確認するとともに、その作用機序を明らかにする必要がある。

また、Dieldrin の低用量域での肝発がん反応曲線の解析結果は発がん性の実際上の閾値論に基づくリスクマネジメントに大いに貢献すると考えられる。今後、他の化学物質についても低用量域の発がん反応を追究する必要がある。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Chen, T., Yamamoto, S., Gen, H., Murai, T., Mori, S., Oohara, T., Makino, S., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Infrequent involvement of microsatellite instability in urinary bladder carcinomas of the NON/Shi mouse treated with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer Lett.*, 123, 41-45, 1998.
2. Fukushima, S.: Carcinogenesis, Urinary Tract, Rat. In: *Monographs on Pathology of Laboratory Animals; Urinary System*, Second Edition. (eds.) T.C. Jones, G.C. Hard, U. Mohr., Springer, pp375-381, 1998.
3. Ogawa, K., Iwasaki, S., Esumi, H., Fukushima, S. and Shirai, T.: Modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) of 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)-induced rat pancreatic and intestinal tumorigenesis. *Cancer Lett.*, 124, 31-37, 1998.
4. Hori, T., Wanibuchi, H., Yano, Y., Otani, S., Nishikawa, A., Osugi, H., Kinoshita, H. and Fukushima, S.: Epithelial cell proliferation in the digestive tract induced

- by space restriction and water-immersion stress. *Cancer Lett.*, 125, 141-148, 1998.
5. Takada, N., Yano, Y., Otori, K., Otani, S., Nomura, S., Kitamura, Y. and Fukushima, S.: Expression and localization of ornithine decarboxylase in reversible papillomatosis induced by uracil in rat bladder. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 377-384, 1998.
6. Yamachika, T., Nakanishi, H., Inada, K., Tsukamoto, T., Shimizu, N., Kobayashi, K., Fukushima, S. and Tatematsu, M.: *N*-Methyl-*N*-nitrosourea concentration - dependent, rather than total intake - dependent, induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 385-391, 1998.
7. Lee, C.C.R., Masuda, C., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Ikemoto, S., Sugimura, K., Nakatani, T., Wada, S., Kishimoto, T., and Fukushima, S.: Assessment of cell cycle-related elements p53, p21WAF1/Cip1, cyclin D1 and PCNA in a mixed transitional cell carcinoma and adenocarcinoma of the renal pelvis: a case report. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 28, 227-232, 1998.
8. Mori, S., Murai, T., Hosono, M., Yamashita, H., Oohara, T., Makino, S., Doteuchi, M. and Fukushima, S.: F344/Shi rats bearing type b catalase-1 locus are sensitive to sodium L-ascorbate promotion of two-stage urinary bladder carcinogenesis. *Teratoge. Carcinoge. Mutage.*, 18, 27-33, 1998.
9. Fukushima, S., Hori, T. and Takada, N.: The inhibitory effects of organosulfur compounds on chemical carcinogenesis of rats. In: *Cancer and Nutrition*. (eds.) K.N. Prasad and W.C. Cole, IOS Press, pp157-165, 1998.
10. Yamamoto, S., Tatematsu, M., Yamamoto, M., Fukami, H. and Fukushima, S.: Clonal analysis of urothelial carcinomas in C3H/HeN <—> BALB/c chimeric mice treated with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Carcinogenesis*, 19, 855-860, 1998.
11. Yoshida, K., Inoue, Y., Kuroda, K., Chen, T., Wanibuchi, H., Fukushima, S. and Endo, G.: Urinary excretion of arsenic metabolites after long-term oral administration of various arsenic compounds to rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 54, 179-192, 1998.
12. Kitano, M., Ichihara, T., Matsuda, T., Wanibuchi, H., Tamano, S., Hagiwara, A., Imaoka, S., Funae, Y., Shirai, T. and Fukushima, S.: Presence of a threshold for promoting effects of phenobarbital on diethylnitrosamine-induced hepatic foci in the rat. *Carcinogenesis*, 19, 1475-1480, 1998.
13. Chen, T., Yamamoto, S., Kitano, M., Murai, T., Wanibuchi, H., Matsukuma, S., Nakatsuru, Y., Ishikawa, T. and Fukushima, S.: Possible rare involvement of  $\alpha$ -Methylguanine formation as a significant mutational factor in mouse urinary bladder carcinogenesis models. *Teratoge. Carcinoge. Mutage.*, 18, 101-110, 1998.
14. Ozaki, K., Sukata, T., Yamamoto, S., Uwagawa, S., Seki, T., Kawasaki, H., Yoshitake, A., Wanibuchi, H., Koide, A., Mori, Y. and Fukushima, S.: High susceptibility of *p53* (+/-) knockout mice in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine urinary bladder carcinogenesis and lack of frequent mutation in residual allele. *Cancer Res.*, 58, 3806-3811, 1998.
15. Otori, K., Konishi, M., Sugiyama, K.,

- Hasebe, T., Shimoda, T., Kikuchi-Yanoshita, R., Mukai, K., Fukushima, S., Miyaki, M. and Esumi, H.: Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer*, 83, 896-900, 1998.
16. Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E. I., Yamamoto, S., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S.: Promotion of NCI-Black-Reiter male rat bladder carcinogenesis by dimethylarsinic acid an organic arsenic compound. *Cancer Lett.*, 134, 29-36, 1998.
17. Fukushima, S., Wanibuchi, H. and Yamamoto, S.: Urinary bladder cancer. In: *Carcinogenicity*. (eds.) Kitchin, K. T., Marcel Dekker, Inc., pp.627-652, 1999.
18. Chen, T.-X., Wanibuchi, H., Murai, T., Kitano, M., Yamamoto, S. and Fukushima, S.: Promotion by sodium L-ascorbate in rat two-stage urinary bladder carcinogenesis is dependent on the interval of administration. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 16-22, 1999.
19. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Lee, C.C.R., Nakajima, K., Yano, Y., Taniyama, T., Otani, S., Shimizu, Y. and Fukushima, S.: Lack of inhibitory effects of the Ju-myb protein on development of glutathione S-transferase placental form-positive foci in the male F344 rat liver. *J. Toxicol. Sci.*, 24, 27-31, 1999.
20. Romanenko, A., Lee, C.C.R., Yamamoto, S., Hori, T., Wanibuchi, H., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Urinary bladder lesions after the chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21WAF1/Cip1. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 144-153, 1999.
21. Yamamoto, S., Min, W., Lee, C.C.R., Salim, E.I., Wanibuchi, H., Sukata, T. and Fukushima, S.: Enhancement of urinary bladder carcinogenesis in nullizygous *p53*-deficient mice by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Cancer Lett.*, 135, 137-144, 1999.
22. Morimura, K., Yamamoto, S., Murai, T., Mori, S., Chen, T., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: LOH and mutational analysis of *p53* alleles in mouse urinary bladder carcinomas induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Carcinogenesis*, 20, 715-718, 1999.
23. Hagiwara, A., Murai, T., Yoshio, H., Goshima, H., Mori, S., Takashima, A., Shirai, T. and Fukushima, S.: Hepatocarcinogenic activity of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in rats is not modified by sodium L-ascorbate. *Terato. Carcino. Mut.*, 19, 33-42, 1999.
24. Lee, C.C.R. and Fukushima, S.: Alterations in cyclin D1, p53, and the cell cycle related elements: Implications for distinct genetic pathways of urinary bladder carcinogenesis. *Urol. Oncol.*, 4, 58-72, 1999.
25. Morimura, K., Salim, E. I., Yamamoto, S., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Dose-dependent induction of aberrant crypt foci in the colons but no neoplastic lesions in the livers of heterozygous *p53*-deficient mice treated with low dose 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline. *Cancer Lett.*, 138, 81-85, 1999.
26. Youssef, E.M., Wanibuchi, H., Mori, S., Salim, E. I., Hayashi, S. and Fukushima, S.: Elevation of urinary enzyme levels in rat

bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20, 1247-1252, 1999.

27. Fukushima, S., Murai, T.: Calculi, precipitates and microcrystalluria associated with irritation and cell proliferation as a mechanism of urinary bladder carcinogenesis in rats and mice. In: *Species Differences in Thyroid, Kidney and Urinary Bladder Carcinogenesis* (IARC scientific publications. No. 147), in press.

28. Yamamoto, S., Romanenko, A., Wei, M., Masuda, C., Zaparin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A., Lee, C.C.R., Morimura, K., Wanibuchi, H., Tada, M. and Fukushima, S.: Specific *p53* gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident. *Cancer Res.*, in press.

29. Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W. and Fukushima, S.: Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats. *Carcinogenesis*, in press.

## 2. 学会発表

1. 榊田周佳, 鱒淵英機, 山本晋史, 今岡進, 船江良彦, 須方督夫, 福島昭治, 「ラット肝中期発癌性試験法(伊東法)を用いた $\alpha$ -benzene hexachloride ( $\alpha$ -BHC)の発癌修飾作用の検討」第57回日本癌学会総会(横浜)1998

2. 西川隆之, 鱒淵英機, 森村圭一朗, 魏民, 榊田周佳, 北野光昭, 須方督夫, 福島昭治, 「ラット肝中期発癌試験(伊東法)を用いたdieldrinの発癌修飾作用」第58回日本癌学会総会(広島)1999(発表予定)

表1. styren monomerおよびbisphenolAのラット肝GST-P陽性細胞巢の発生に及ぼす影響

群	処置		用量 (mg/kg)	有効動物数	GST-P陽性細胞巢	
	DEN	被験物質			数/cm <sup>2</sup>	面積(mm <sup>2</sup> )/cm <sup>2</sup>
1	+	コーン油	0	16	6.02 ± 1.60	0.42 ± 0.17
2	+	styrene M.	250	15	3.32 ± 2.06**	0.37 ± 0.42
3	+	styrene M.	1000	16	1.53 ± 0.89**	0.10 ± 0.08**
4	+	0.5% CM C	0	15	5.48 ± 1.99	0.43 ± 0.17
5	+	bisphenolA	40	15	4.86 ± 2.40	0.39 ± 0.18
6	+	bisphenolA	160	13	5.20 ± 1.65	0.42 ± 0.14
7	-	コーン油	0	8	0	0
8	-	styrene M.	1000	6	0	0
9	-	0.5% CM C	0	8	0	0
10	-	bisphenolA	160	8	0	0

\*\* P < 0.01 (第1群と比較)