

精巣に及ぼす影響及び発がんに及ぼす影響

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、Styrene dimer および Styrene trimer 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。また Bisphenol A の経胎盤あるいは授乳曝露による新生児マウスの精巣に及ぼす影響について検討した。Styrene monomer の低用量経口投与は肝発がんに影響を及ぼさなかった。Styrene dimer、Styrene trimer の肝発がん性については検討中である。また、Bisphenol A の 400mg/kg 経口投与は離乳後の新生児マウス体重の低値をもたらした。現在実験継続中である。

A. 研究目的

ポリスチレン中には Styrene monomer、Styrene dimer および styrene trimer が存在しており内分泌攪乱化学物質であるとの疑いがもたれている。そこで、これらのヒト曝露レベルを考慮した低用量をラットに経口投与し、肝発がんならびにその修飾作用を検討する。さらに精巣および精巣上体の精子数についても検討する。また、ポリカーボネートに存在する Bisphenol A を母マウスに投与し、経胎盤あるいは授乳により曝露された出生児の精巣に対する影響を検討する。

B. 研究方法

【実験 1】6 週齢 F344 雄ラットに、Diethylnitrosamine (DEN) を 200mg/kg の用量で 1 回腹腔内に投与し、肝発癌に対するイニシエーション処置とした。その 2 週間後より被験物質である Styrene monomer をヒト曝露量を考慮し、0.0006, 0.006 および 0.6mg/kg/day の用量で 6 週間（6 日/週）強制経口投与し、実験開始 8 週間後に屠殺剖検した。対照群には同様に DEN を処置した後、同期間に溶媒であるコーンオイルを強制経口投与した。なお、実験開始 3 週間後に、全動物に対し 2/3 肝部分切除術を施行した。肝臓の前がん病変のマーカである胎盤型 glutathione S-transferase

(GST-P)陽性細胞巢を免疫組織学的に染色し、その個数および面積をイメージアナライザーを用いて計測し、それらを定量的に解析した。精巣および精巣上体の精子数測定についても行った。

【実験2】実験1と同様の方法を用いてStyrene dimerおよびStyrene trimerの低用量におけるラット肝発がんおよび影響を検討した。Styrene dimerおよびStyrene trimerはそれぞれ0.0006, 0.006および0.6 mg/kg/dayの用量投与した。また、DENを処置しない群をもうけStyrene dimerおよびStyrene trimerをそれぞれ0.6 mg/kg/dayの用量で投与した。対照群には溶媒であるコーンオイルを強制経口投与した。なお、精巣および精巣上体の精子数測定はDENを処置しない群についておこなった。

【実験3】11週齢のCrj:CD-1(ICR)マウスを交配させ、妊娠を確認した雌動物に妊娠0日から出生児の離乳までの間、bisphenol Aを0, 0.05, 50および400 mg/kg/dayの用量で連日強制経口投与した。分娩22日後に雄児動物を離乳し、各群25匹ずつ確保した。児動物は10週齢時に屠殺剖検し、肉眼的病理学的検査を実施し、精巣および精巣上体

の精子数測定をおこなう。また、その他の生殖器系器官・組織についてホルマリン固定をおこなう。

C. 研究結果

【実験1】Styrene monomer投与群は体重、肝重量に関し、対照群との間に差を認めなかった。肝GST-P陽性細胞巢の個数および面積はStyrene monomer投与において対照群との間に差を認めなかった(表1)。精巣および精巣上体の精子数についても差を認めなかった(表2)。

【実験2】Styrene dimerおよびStyrene trimer投与群は体重に関し、対照群との間に差を認めなかった。精巣および精巣上体の精子数についても差を認めなかった。現在、肝GST-P陽性細胞巢について検索中である。

【実験3】Bisphenol A投与群において母獣の体重、分娩児数に対照群との間に差を認めなかった。離乳後の児動物の体重は400 mg/kg群で低値を示した。現在、児動物の観察は7週齢を経過中である。

D. 考察

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

ヒトが曝露されるレベルでの Styrene monomer は GST-P 陽性細胞巢の発現に影響を与えなかった。このことから、Styrene monomer の高用量投与は肝発がんを抑制することが強く示唆されたのに反し（平成 10 年度発表）、ヒト曝露レベルを考慮したその低用量投与は肝発がん性に何ら影響を及ぼさないと結論された。また本投与量において精子数に影響が認められなかったことより、Styrene monomer は精子形成能に影響しないことが示された。さらに Styrene dimer および Styrene trimer はいずれにおいても精子数に影響を及ぼさなかった。現在、Styrene dimer および Styrene trimer の肝発がんに関与する影響について検索中である。

さらに、Bisphenol A の経胎盤あるいは経授乳曝露における精巣、前立腺およびその他の生殖器系臓器における影響については現在検索中である。

E. 展望

Styrene monomer はヒトが曝露されるレベルでは肝発がんに関与する影響を及ぼさないことが明らかとなった。今後、ヒトがより曝露されると考えられる Styrene dimer および Styrene trimer の肝発がん作用に

ついて早急に結論を出す必要がある。

また、内分泌攪乱化学物質の胎児期および授乳期曝露による成長期への影響を明かにすることは極めて重要で、本研究において Bisphenol A の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。

F. 結論

Styrene monomer のラットへの低用量経口投与は肝発がんに関与を及ぼさなかった。Styrene dimer および trimer のそれについては現在検討中である。さらに、Bisphenol A, 400mg/kg の強制経口投与による経胎盤、授乳曝露は離乳後の新生児マウス体重の低値をもたらした。現在、実験継続中である。

G. 研究発表

（論文発表）

1. Fukushima, S., Wanibuchi, H., Yamamoto, S.: Urinary bladder cancer. In: Carcinogenicity. (eds.) Kitchin, K.T., Marcel Dekker, Inc., pp.627-652, 1999.
2. Chen, T.-X., Wanibuchi, H., Murai, T., Kitano, M., Yamamoto, S., 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.
3. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Lee,

- C.C.R., Nakajima, K., Yano, Y., Taniyama, T., Otani, S., Shimizu, Y., Fukushima, S.: Lack of inhibitory effects of the Ju-myo protein on development of glutathione S-transferase placental form-positive foci in the male F344 rat liver., *J. Toxicol. Sci.*, 24, 27-31, 1999.
4. Higashi, S., Murai, T., Mori, S., Kamoto, T., Yoshitomi, M., Arakawa, Y., Makino S., Fukushima, S., Yoshida, O., Hiai, H.: Host genes affecting survival period of chemically induced bladder cancer in mice., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124, 670-676, 1998.
5. Romanenko, A., Lee, C.C.R., Yamamoto, S., Hori, T., Wanibuchi, H., Zaporin, W., Vinnichenko, W., Voizianov, A., Fukushima, S.: Urinary bladder lesions after the chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21^{WAF1/Cip1}., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 144-153, 1999.
6. Yamamoto, S., Min, W., Lee, C.C.R., Salim, E.I., Wanibuchi, H., Sukata, T., 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.
7. Morimura, K., Yamamoto, S., Murai, T., Mori, S., Chen, T., Wanibuchi, H., 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.
8. Hagiwara, A., Murai, T., Yoshino, H., Goshima, H., Mori, S., Takashima, A., Shirai, T., 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.
9. Lee, C.C.R., 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.
10. Morimura, K., Salim, E.I., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., 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.
11. Youssef, E.M., Wanibuchi, H., Mori, S., Salim, E.I., Hayashi, S., Fukushima, S.: Elevation of urinary enzyme levels in rat bladder carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 20, 1247-1252, 1999.
12. Otori, K., Sugiyama, K., Fukushima, S., Esumi, H.: Expression of the cyclin D1 gene in rat colorectal aberrant crypt foci and tumors induced by azoxymethane., *Cancer Lett.*, 140, 99-104, 1999.
13. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Taniyama, T., Okai, Y., Yano, Y., Otani, S., Imaoka, S., Funae, Y., Fukushima, S.: Inhibition of liver glutathione S-transferase placental form-positive foci development in the rat hepatocarcinogenesis by *Porphyra tenera* (Asakusa-nori)., *Cancer Lett.*, 141, 211-218, 1999.
14. Yamamoto, S., Romanenko, A., Wei, M., Masuda, C., Zaporin, W., Vinnichenko, W., Voizianov, A., Lee, C.C.R., Morimura, K., Wanibuchi, H.,

- Tada, M., Fukushima, S.: Specific *p53* gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident., *Cancer Res.*, 59, 3606-3609, 1999.
15. Oliveira, S.V., de Camargo, J.L.V., Cardoso, P.R., Padovani, C.R., Fukushima, S.: Effects of uracil calculi on cell growth and apoptosis in the BBN-initiated wistar rat urinary bladder mucosa., *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.*, 19, 293-303, 1999.
16. Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Loss of heterozygosity in (Lewis×F344)F₁ rat urinary bladder tumors induced with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine followed by dimethylarsinic acid or sodium L-ascorbate., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 818-823, 1999.
17. Lee, C.C.R., Ichihara, T., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Sugimura, K., Wada, S., Kishimoto, T., Fukushima, S.: Reduced expression of the CDK inhibitor p27KIP1 in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of p21WAF1/Cip1 and p53., *Carcinogenesis*, 20, 1697-1708, 1999.
18. Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W., Fukushima, S.: Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats., *Carcinogenesis*, 20, 1873-1876, 1999.
19. Lee, C.C.R., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Hirose, M., Hayashi, Y., Fukushima, S.: Case Report; Molecular cytogenetic identification of *cyclin D1* gene amplification in a renal pelvic tumor attributed to phenacetin abuse., *Pathology International*, 49, 648-652, 1999.
20. Fukushima, S.: Low-dose carcinogenicity of a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline:relevance to risk assessment., *Cancer Lett.*, 143, 157-159, 1999.
21. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Mori, S., Makino, S., Nomura, T., Fukushima, S.: Low-dose-dependent carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the immunodeficient (SCID) mouse colon., *Nutrition and Cancer*, 34, 220-228, 1999.
22. Chen, T., Wanibuchi, H., Wei, M., Morimura, K., Yamamoto, S., Hayashi, S., Fukushima, S.: Concentration dependent promoting effects of sodium L-ascorbate with the same total dose in a rat two-stage urinary bladder carcinogenesis., *Cancer Lett.*, 146, 67-71, 1999.
23. Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Differences of promoting activity and loss of heterozygosity between dimethylarsinic acid and sodium L-ascorbate in F₁ rat urinary bladder carcinogenesis. In: *Arsenic exposure and health effects.* (eds.) Chappell, W.R., Abernathy, C.O., Calderon, R.L., pp.263-266, 1999.
24. Hagiwara, A., Miyata, E., Tamano, S., Sano, M., Masuda, C., Funae, Y., Ito, N., Fukushima, S., Shirai T.: Non-carcinogenicity, but dose-related increase in preneoplastic hepatocellular lesions, in a two-year feeding study of phenobarbital sodium in male F344 rats., *Food and Chem. Toxicol.*, 37, 869-879, 1999.
25. Sukata, T., Ozaki, K., Uwagawa, S., Seki, T., Wanibuchi, H., Yamamoto, S.,

Okuno, Y., Fukushima, S.: Organ-specific, carcinogen-induced increases in cell proliferation in *p53*-deficient Mice., *Cancer Res.*, 60, 74-79, 2000.

26. Yamamoto, S., Tada, M., Lee, C.C.R., Masuda, C., Wanibuchi, H., Yoshimura, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T., Fukushima, S.: *p53* status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast *p53* functional assay in combination with *p53* immunohistochemistry., *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 181-189, 2000.

27. Taniyama, T., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yano, Y., Otani, S., Nishizawa, Y., Morii, H., Fukushima, S.:

Chemopreventive effect of 24*R*,25-dihydroxyvitamin D₃ in *N,N*-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 21, 173-178, 2000.

28. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Kim, S., Yano, Y., Yamamoto, S., Fukushima, S.: Inhibitory effects of 1,3-diaminopropane, an ornithine decarboxylase inhibitor, on rat two-stage urinary bladder carcinogenesis initiated by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine., *Carcinogenesis*, 21, 195-203, 2000.

(学会発表)

1. 榊田周佳、鰐淵英機、市原敏夫、須方督夫、福島昭治：ラット肝中期発癌試験法（伊東法）を用いた α -benzene hexachloride (α -BHC)の発癌修飾作用の検討。第15回日本毒性病理学会，1月28-29日，水戸，1999（第15回日本毒性病理学会講

演要旨集 P-39, p.47)

2. 西川隆之、鰐淵英機、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，9月28-10月1日，広島，1999（日本癌学会総会記事 1263, p.424)

表 1. styrene monomer 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 ²	面積 (mm ²)/cm ²
1	+	STYRENE MONOMER	0	16	8.41±2.50	0.74±0.28
2	+	STYRENE MONOMER	0.0006	16	8.35±2.23	0.80±0.30
3	+	STYRENE MONOMER	0.006	16	8.65±2.08	0.67±0.23
4	+	STYRENE MONOMER	0.6	16	9.03±2.60	0.84±0.44

表 2. styrene monomer の精子数に及ぼす影響

群	処置		用量 (mg/kg)	有効動物数	精子数 (×10 ⁷ /ml)	
	DEN	被験物質			精巢	精巢上体
1	+	STYRENE MONOMER	0	8	2.38±0.31	2.61±0.26
2	+	STYRENE MONOMER	0.0006	8	2.23±0.41	2.54±0.44
3	+	STYRENE MONOMER	0.006	8	2.33±0.22	2.69±0.47
4	+	STYRENE MONOMER	0.6	8	2.10±0.27	2.38±0.17