

分担研究報告書

内分泌かく乱物質の発がんプロモーション作用の検討

分担研究者 名古屋市立大学 医学部 第一病理学教室 白井 智之 教授

研究要旨

ラット肝中期発がん性試験法を用いて、内分泌かく乱物質の発がんプロモーション作用の有無の検討を行っている。まず、その基礎的データを得ることを目的として、中期発がん性試験法の開始1週後に、雌雄のラットそれぞれに卵巣摘出、精巣摘出を行い、内在性ホルモンによる肝の前がん病変発生への影響を検討した。その結果、雌雄とも性腺摘出による変化は認められず、内在性の性ホルモンは肝の前がん病変の発生に影響しないものと考えられた。

A. 研究目的

環境中に存在する各種ホルモン様物質の中には、多くの内分泌かく乱物質が含まれている。これら内分泌かく乱物質による発がん性や発がん促進作用が危惧されているが、これらの発がんならびに発がんプロモーション作用のリスクを評価するには動物を用いたin vivoの検索系が不可欠である。しかも、数多く存在すると考えられているこれらの物質のリスク評価のためには、比較的短期間で、信頼されるデータを得ることのできる検索系を用いる必要がある。我々はラット肝中期発がん性試験法を開発してきたが、これはこのような目的のために適した検索系と考えられる。この肝中期発がん性試験法は、被験物質のプロモーション作用の用量相関性を検索するのに適していることや、少ない量の被験物質でも検索可能であり、低用量での評価も可能であることなど、この検索系は内分泌かく乱物質の発がん性や発がんプロモーション作用を検索する検索系として適していると考えられる。本年度は内在する性ホルモンがラット肝の前がん病変の発生に及ぼす影響を検索する目的で、雌雄ラットを用い、それぞれ卵巣摘出、精巣摘出を実験開始の早期に行い、ラット肝の前がん病変である胎盤型 glutathione S-transferase (GST-P) 陽性細胞巢の発生を検討した。

B. 研究方法

肝中期発がん性試験法は6週齢のF344雄ラットを用い、diethylnitrosamine (DEN, 200mg/kg) を、単回ip投与し、その2週間後より被験物質を6週間経口投与する。実験途中、実験開始3週目に、肝の2/3を部分切除し、肝臓の増殖を刺激する。実験は8週間で終了し、肝を摘出後、冷アセトンで固定し、発生した前がん病

変である胎盤型 Glutathione S transferase (GST-P) 陽性細胞巢を免疫組織学的に染色する。

このGST-P陽性細胞巢を指標として、画像処理装置により定量的に解析し、対照群の値と比較検討することにより、これら被験物質のリスク評価を行う試験法である。本年度はこの方法を応用し、6週齢の雌雄のラットを用い、DEN投与1週後に雌では卵巣摘出を、雄は精巣摘出を外科的に行う群、ならびにそれぞれsham手術を行う群を設け、いずれの群も実験開始3週目に2/3肝部分切除を行った。実験期間は8週間で終了し、血中の性ホルモンのレベル、体重、主要臓器の臓器重量を計測するとともに、肝の病理組織標本を作成し、GST-P抗体を用いた免疫染色を行った。肝の免疫組織標本は画像処理装置 (IPAP-Win) を用いて、肝切片の面積とGST-P陽性細胞巢の面積ならびに個数を計測し、肝の単位面積当りのGST-P陽性細胞巢の数ならびに個数を算出した (図1)。

C. 実験結果

体重は雌では卵巣の摘出した群で増加し、雄では精巣の摘出により逆に減少した (図2)。一方、肝の相対重量は雌雄とも、性腺の摘出によりともに減少した。臓器重量を見ると性腺の摘出により雄では前立腺ならびに精囊の著明な重量の減少がみられ、雌では子宮の著明に臓器重量が減少した。血中のホルモンレベルを見ると、性腺の摘出により雌のestradiolと雄のtestosteroneの減少が見られ、逆にLHの著明な増加が雌雄とも認められた (図3) 肝のGST-P陽性細胞巢の数および面積を計測した結果を表1と図4に示す。GST-P陽性細胞巢はその数、面積とも雄より雌の方が多く認められたが、性腺摘出による影響は認められなかった。

D. 考察

今回の実験結果から内在性の性ホルモンは肝の前がん病変である GST-P陽性細胞巢の発生に影響しないことが明らかとなった。このことは、内在するレベルでの性ホルモンは肝の発がんに影響しないものと考えられる。従って、この肝中期発がん性試験法で現在までに検索を終了したもののうち、内分泌かく乱物質とされている農薬 (Alachlor, Aldrin, DDT, Dieldrin, Permethrin, Trifluralin, Vinclozolin など) や DES など陽性を示した化合物の肝の前がん病変の発生 促進作用として、内分泌かく乱作用を経たものではないことが示唆された。

E. 結論

ラット肝中期発がん性試験法の開始1週後に、雌雄のラットそれぞれに卵巣摘出、精巣摘出を行い、内在性ホルモンによる肝の前がん病変発生への影響を検討した。その結果、雌雄とも性腺摘出による変化は認められず、内在性の性ホルモンは肝の前がん病変の発生に影響しないものと結論づけた。

F. 研究業績

M. Hirose, S. Fukushima, K. Imaida, N. Ito and T. Shirai : Modifying effects of phytic acid and γ -oryzanol on the promotion stage of rat carcinogenesis., *Anticancer Res.* 19: 3665-3670, 1999.

Y. Ikeda, S. Takahashi, J. Kimura, Y. M. Cho, K. Imaida, S. Shirai and T. Shirai : Anophthalmia in litters of female rats treated with the food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine., *Toxicol. Pathol.* 27: 628-631, 1999.

T. Shirai, L. Cui, S. Takahashi, M. Futakuchi, M. Asamoto, K. Kato and N. Ito : Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP) in the rat prostate and induction of invasive carcinomas by subsequent treatment with testosterone propionate., *Cancer Lett.* 143: 217-221, 1999.

T. Shirai, M. Hirose and N. Ito Medium-term bioassays in rats for rapid detection of the carcinogenic potential of chemicals. In: D. B. McGregor, J. M. Rice, S. Venitt (eds.), *The Use of Short- and Medium-term Tests for*

Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation, Vol. IARC Scientific Publications No. 146, pp. 251-272. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1999.

S. Iwasaki, K. Kato, T. Mori, S. Takahashi, M. Futakuchi and T. Shirai : Development of androgen-independent carcinomas from androgen-dependent preneoplastic lesions in the male accessory sex organs of rats treated with 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl and testosterone propionate., *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 23-30, 1999.

M. A. Moore, H. Tsuda, S. Tamano, A. Hagiwara, K. Imaida, T. Shirai and N. Ito : Marriage of medium-term liver model to surrogate markers - a practical approach for risk and benefit assessment., *Toxicol. Pathol.* 27: 237-242, 1999.

A. Hagiwara, T. Murai, H. Yoshino, H. Goshima, S. Mori, A. Takashima, T. Shirai and S. Fukushima : Hepatocarcinogenic activity of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats is not modified by sodium L-ascorbate., *Terato. Carcin. Mut.* 19: 33-42, 1999.

A. Hagiwara, P. Boonyaphiphat, H. Tanaka, M. Kawabe, S. Tamano, H. Kaneko, M. Matsui, M. Hirose, N. Ito and T. Shirai : Organ-dependent modifying effects of caffeine, and two naturally occurring antioxidants α -tocopherol and *n*-tritriacontane-16,18-dione, on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-induced mammary and colonic carcinogenesis in female F344 rats., *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 399-405, 1999.

W. Thamavit, T. Shirai and N. Ito Liver flukes and biliary cancer. In: J. Parsonnet (ed.) *Microbes and Malignancy Infection as a Cause of Human Cancers*, pp. 346-371. New York, Oxford: Oxford University Press, 1999.

K. Ogawa, H. Tsuda, T. Shirai, T. Ogiso, K. Wakabayashi, D. W. Dalgard, U. P. Thorgeirsson, S. S. Thorgeirsson, R. H. Adamson and T. Sugimura : Lack of Carcinogenicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in

cynomolgus monkeys., Jpn. J. Cancer Res. 90: 622-628, 1999.

T. Shirai : Commentary: Oncosis and apoptosis: Two faces of necrosis in a new proposal to clear up the confusion regarding cell death., Toxicol. Pathol. 27: 495-496, 1999.

M. Hirose, K. Hakoi, S. Takahashi, T. Hoshiya, K. Akagi, L. Cui, K. Saito, H. Kaneko and T. Shirai : Sequential morphological and biological changes in the glandular stomach induced by oral administration of catechol to male F344 rats., Toxicol. Pathol. 27: 448-455, 1999.

M. Sano, A. Hagiwara, S. Tamano, R. Hasegawa, K. Imaida, N. Ito and T. Shirai : Dose-dependent induction of carcinomas and glutathione S-transferase placental form negative eosinophilic foci in the rat liver by di(2-ethylhexyl)phthalate after diethylnitrosamine initiation., J. Toxicol. Sci. 24: 177-186, 1999.

M. Hirose, S. Takahashi, K. Ogawa, M. Futakuchi, T. Shirai, M. Shibutani, C. Uneyama, K. Toyoda and H. Iwata : Chemoprevention of heterocyclic amine-induced carcinogenesis by phenolic compounds in rats., Cancer Lett. 143: 173-178, 1999.

E. Okochi, N. Watanabe, Y. Shimada, S. Takahashi, K. Wakazono, T. Shirai, T. Sugimura, M. Nagao and T. Ushijima : Preferential induction of guanine deletion at 5'-GGGA-3' in rat mammary glands by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine., Carcinogenesis. 20: 1933-1938, 1999.

M. Futakuchi, M. Hirose, T. Ogiso, K. Kato, M. Sano, K. Ogawa and T. Shirai : Establishment of an *in vivo* highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model., Jpn. J. Cancer Res. 90: 1196-1202, 1999.

K. Ogawa, M. St. John, M. L. de Oliveira, L. Arnold, T. Shirai, T.-T. Sun and S. M. Cohen : Comparison of uroplakin expression during urothelial carcinogenesis induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats and mice., Toxicol. Pathol. 27: 645-651, 1999.

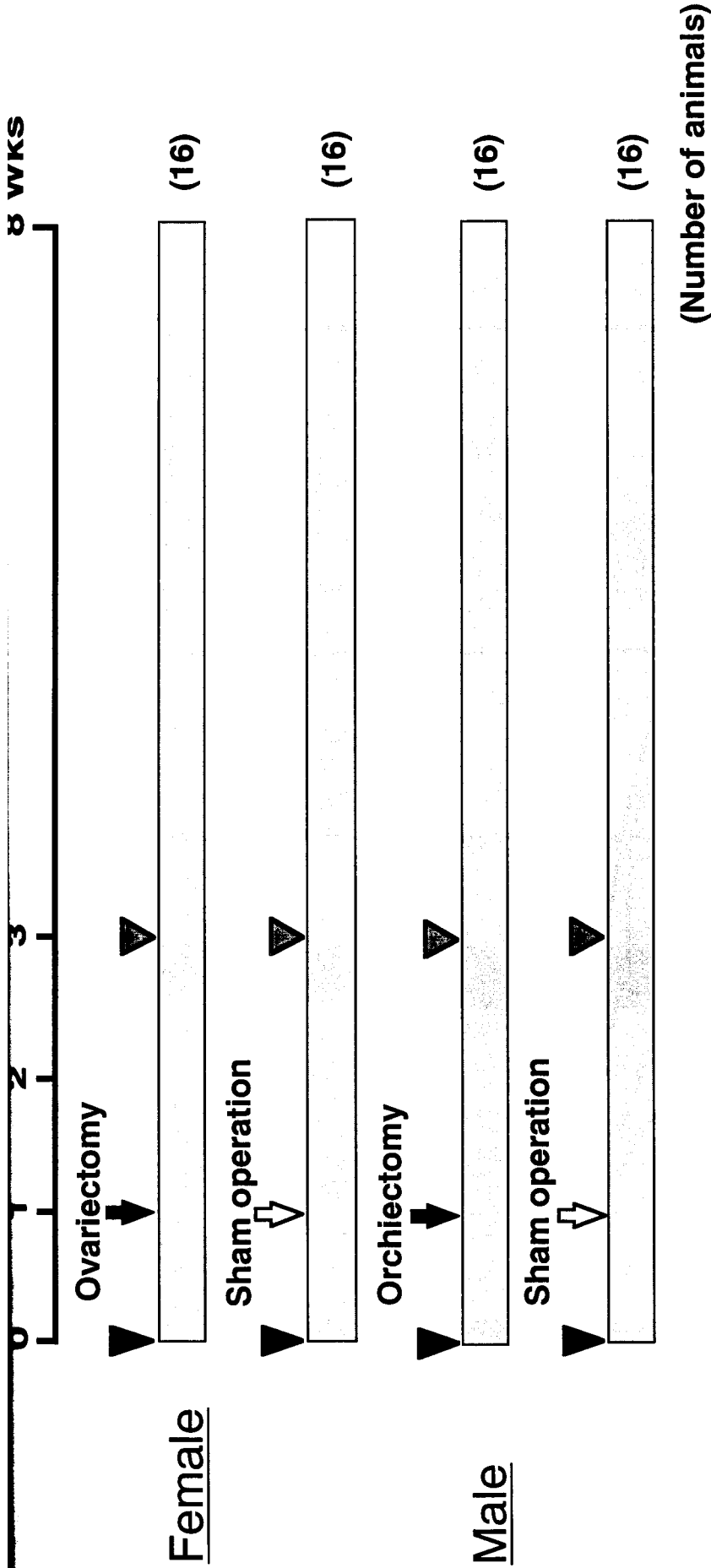
G. 知的所有権の取得状況

なし

表1

Quantitative analysis of the liver GST-P foci

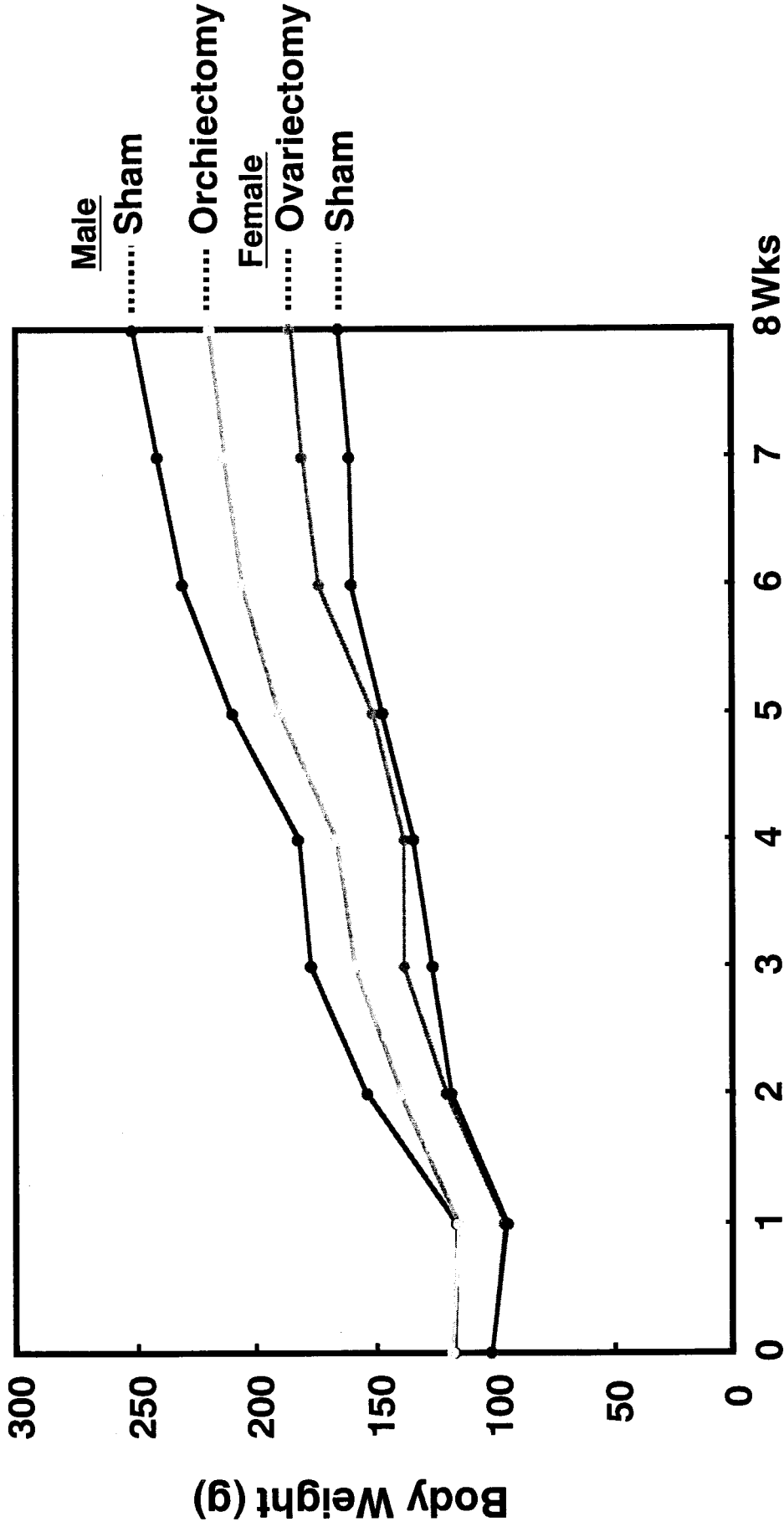
Sex	Treatment	No. of Rat	GST-P Positive Foci/ Total Area	
			Number (No. /cm ²)	Area (mm ² /cm ²)
F	DEN + Ovariectomy	13	13.86 ± 5.32	1.07 ± 0.48
F	DEN + Sham	12	10.91 ± 3.94	1.23 ± 0.42
M	DEN + Orchiectomy	14	8.58 ± 3.41	0.61 ± 0.33
M	DEN + Sham	15	8.38 ± 3.13	0.56 ± 0.22



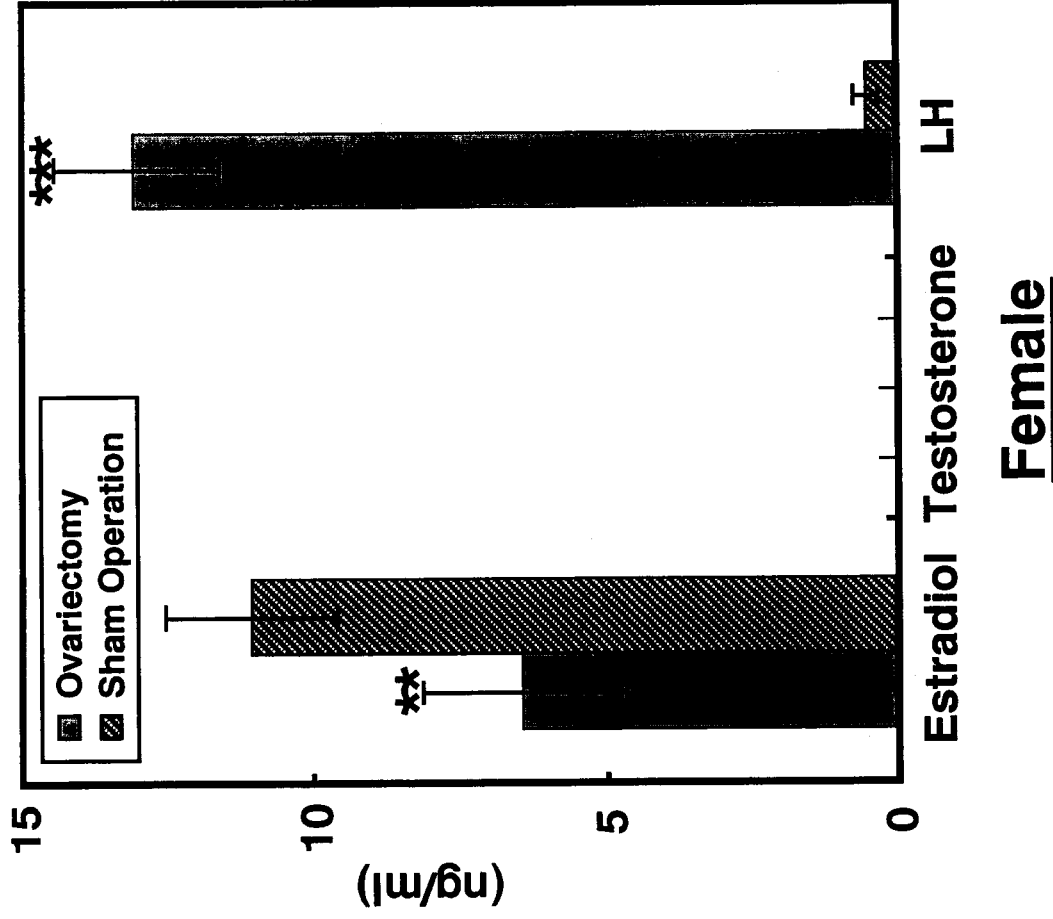
Animal: 6-week-old, male and female F344/DuCrj rats

- ▼ DEN, 200mg/kg, ip
- ▼ 2/3 Partial Hepatectomy

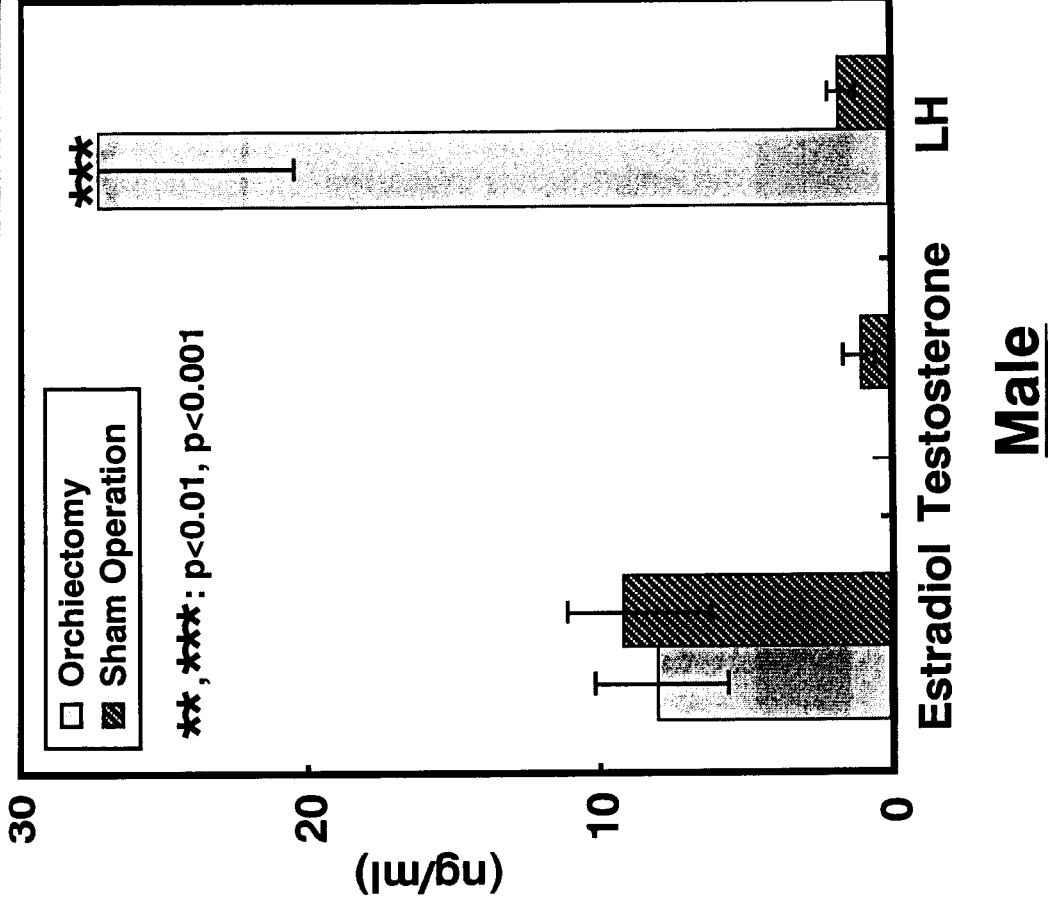
Effects of endogenous sex hormones in a rat medium-term liver bioassay for carcinogens



Growth curve

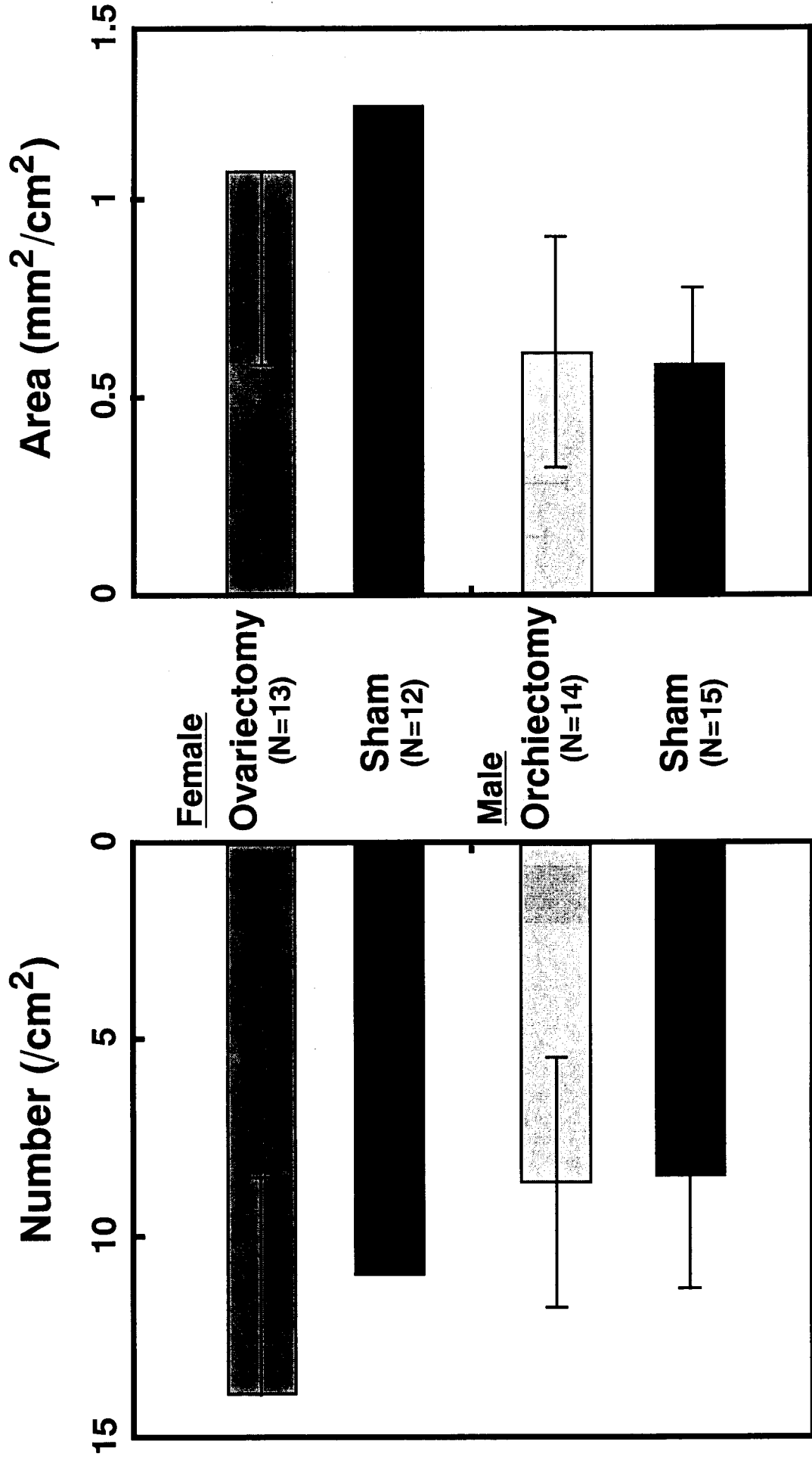


Female



Male

Serum sex hormonal levels in ovariectomized or orchidectomized rats



Quantitative analysis of liver GST-P⁺foci