

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

分担研究者 広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

研究要旨

内分泌かく乱物質の乳腺腫瘍発生及び増殖に対する影響を検討する目的で以下の実験を行った。雌の SD ラットに 100mg/kg 体重の 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) を強制経口投与し、28 週まで観察した時点で腫瘍 (+)・卵摘 (+)、腫瘍 (-)・卵摘 (+)、腫瘍 (+)・卵摘 (-) の各群に群分けし、それぞれ 0.1% methoxychlor の混餌投与あるいは 0.5mg β -estradiol 3-benzoate (EB) の皮下埋植を行った。41 週で全動物を屠殺し、乳腺腫瘍の発生頻度、個数および大きさについて検討した。その結果、腫瘍の有無に関わらず EB は乳腺腫瘍の増殖、発生を促進し、逆に methoxychlor は抑制した。現在同様の実験系で 25 及び 250ppm の genistein を混餌投与した実験を行っているが、250ppm 群で腫瘍の大きさが増加する傾向を認めている。また、DMBA と 1,2-dimethylhydrazine (DMH) で発がんイニシエーションを行った雌 SD ラットに nonylphenol (NP) を 25 ないし 250ppm で混餌投与し、乳腺腫瘍の発現について経過観察中であるが、現時点で NP による影響は認められていない。

A. 研究目的

本実験は、植物性エストロゲンとして知られているフラボノイド系の genistein (GS)、および合成フェノール系でエストロゲン作用を持つ nonylphenol (NP) の、ラット乳腺発がんの発生あるいは増殖について実験的に検討し、これら内分泌かく乱物質の、ヒト乳がん発生に対する危険性を評価するための資料とすることを目的としている。なお、GS および NP の実験を行うに先立って、今回行う実験方法の妥当性を証明するため、強いエストロゲンである β -estradiol 3-benzoate (EB) を用いた実験も行った。

B. 研究方法

【実験 1】7 週令の SD 系雌ラット（日本チャールズリバー社）に、乳腺発がん物質として 100mg/kg 体重の 7,12-dibenz(a)anthracene (DMBA) を 1 回胃内強制投与し、乳腺腫瘍の発生を週 1 回触診により観察した。腫瘍発生頻度が 64% に達した 28 週の時点で、乳腺腫瘍を有し両側卵巢を摘出する群〔腫瘍 (+)・卵摘 (+)〕、乳腺腫瘍がなく、両側卵巢摘出を行う群〔腫瘍 (-)・卵摘 (+)〕、乳腺腫瘍があり両側卵巢摘出を行わない群〔腫瘍 (+)・卵摘 (-)〕の各群に群分けし、それぞれ基礎食のみ、0.1% methoxychlor (MXC) (Sigma-Aldrich) の混餌投与あるいは 0.5mg β -estradiol 3-benzoate (EB) (和光純薬工業) の皮下

埋植を行った（図 1）。経過中週 1 回乳腺腫瘍の発生頻度、発生部位、個数及び大きさを観察し、実験開始後 41 週ですべての動物を屠殺し、乳腺腫瘍を中心に病理学的に観察した。

【実験 2】7 週令の SD 系雌ラットに 50mg/kg 体重の DMBA を 1 回胃内強制投与し、乳腺腫瘍の発生を週 1 回触診により観察した。腫瘍発生頻度が 50%に達した 12 週の時点で〔腫瘍（+）・卵摘（+）〕、〔腫瘍（-）・卵摘（+）〕の 2 群に分け、それぞれに基礎食、25 及び 250ppm genistein (GS)（日本理化学薬品株式会社）の混餌投与を行った。また、DMBA を投与しないで卵摘と GS 投与のみを行った対照群も設けた（図 2）。乳腺腫瘍については週に 1 回触診により観察しており、40 週で実験を終了する予定である。

【実験 3】5 週令の SD 系雌ラットに 20mg/kg 体重の大腸発がん物質である 1,2-dimethylhydrazine (DMH)を 2 日に 1 回皮下投与した後、50mg/kg 体重の DMBA を 1 回胃内投与し、投与終了後から基礎食、25 及び 250ppm nonylphenol (NP)（東京化成株式会社）の混餌投与を行った。発がん物質を投与しないで、基礎食あるいは NP のみを投与した対照群も設定した（図 3）。乳腺腫瘍については同様な観察を行っており、40 週で実験を終了する予定である。

（倫理面への配慮）

卵巣摘除術、EB の皮下埋植はエーテル麻酔下で、屠殺はエーテル麻酔下大動脈からの脱血により行い、動物に与える苦痛をできる限り少なくした。

C. 研究結果

【実験 1】実験終了時に最終体重は、腫瘍（+）・卵摘（+）、腫瘍（-）・卵摘（+）、腫瘍（+）・卵摘（-）群いずれも EB あるいは MXC の投与で減少あるいは減少傾向を示した（図 4）。28 週以後における乳腺腫瘍の推移は、腫瘍（+）群では卵摘により腫瘍の増殖が全体に抑制される傾向が認められたが、EB を与えた群で腫瘍の大きさ及び 1 匹あたりの平均腫瘍個数（多発性）が基礎食群に比べ増加する傾向がみられた（図 5）。腫瘍（-）・卵摘（+）群でも EB 群で基礎食群より腫瘍発生頻度と多発性が増加した（図 6）。一方、MXC 投与では、全体に腫瘍の抑制傾向がみられ、特に腫瘍（+）・卵摘（-）群では多発性の減少が目立った（図 7）。病理組織学的観察は、ほぼ肉眼所見を反映していた。つまり良性あるいは悪性の乳腺腫瘍いずれかを有する動物の頻度及び多発性は、腫瘍（+）・卵摘（+）、腫瘍（-）・卵摘（+）群いずれも EB 投与により有意に増加した一方、腫瘍（+）・卵摘（-）群では MXC の投与により腫瘍発生個数の有意な減少が認められた（表 1）。

【実験 2】現在実験途中であるが、DMBA を投与した群間で経過中の体重に有意な差はみられていない。触診による乳腺腫瘍の観察では、腫瘍（+）・卵摘（+）群で、卵摘により発生頻度及び多発性が明らかに減少した。しかし GS 投与による影響は 27 週時点では認められてない。腫瘍（-）・卵摘（+）群では、現在 0-20% 程度の腫瘍発生頻度で

あり、やはり GS 投与による明らかな影響は認められていない（図 8、9）。

【実験 3】

現在 26 週経過中であるが、発がん物質でイニシエーションを行った群の間で体重に有意な変化はみられていない。また、乳腺腫瘍の発生頻度は各群 50-70%、多発性は 1 匹平均 0.8-1.3 個であり、NP 投与による影響はやはり明らかではない（図 10）。

D. 考察

実験 1 では卵摘により内因性エストロジェンの影響を除去した状態で EB を投与した結果、投与開始時に腫瘍の認められた動物で平均腫瘍径が増加し、乳腺腫瘍の平均個数も増加した。また、投与開始時に腫瘍の認められなかった群でも EB 投与により腫瘍発生頻度や多発性が明らかに増加した。しかし卵摘を行わない群では EB の影響は明らかではなく、従って、EB による乳腺腫瘍発生・増殖の増強作用はエストロジェンに参与していることが示唆される。一般にエストロジェンを投与すると下垂体前葉にプロラクチノーマが発生し、二次的に血清プロラクチン濃度が増加し、その結果乳腺腫瘍が増加する可能性も指摘されているが、本実験ではプロラクチノーマは卵摘を行わなかった群でも同様に認められていることから、プロラクチノーマの影響は少ないものと考えられる。一方、MXC は腫瘍（+）・卵摘（-）群でのみ腫瘍の多発性が有意に減少したが、これには栄養状態等ホルモン以外の要因も考慮する必要がある。

GE は乳腺発がんのプロモーション期において抑制することがすでに知られているが、この抑制がホルモンの影響であるのか、GE のもつそれ以外の生物学的活性によるものか明らかでない。現時点で GE による明らかな影響は認められていないが、本実験によりこれらの点も解明されることが期待される。NP については乳腺発がんに対する影響を検討する実験は行われていないが、現時点で結果からでは、少なくともエストロジェンを介した発がん修飾を示す可能性は少ないと考えられる。

E. 結論

強いエストロジェン活性を持つ EB は、本実験で用いたラット乳腺発がんモデルにおいて、エストロジェン作用に基づくと示唆される発がん促進作用を示したが、弱いエストロジェン活性を示す MXC は逆に抑制傾向を示した。MXC の結果はホルモン以外の要因による可能性がある。やはり弱いエストロジェン活性を示す GE と NP は現時点では乳腺発がんに対する明らかな影響は認められていない。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし