

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：食品中内分泌かく乱物質等の前立腺発がん修飾作用に関する研究

分担研究者：今井田 克己 名古屋市立大学 医学部 第一病理学教室 助教授

研究要旨

DMAB を用いたラット前立腺がんモデルを用いて、Nonylphenol および Genistein の長期動物実験を現在進行中である。この長期実験の基礎的データを得る目的で、次のような短期間の実験を行った。10 週齢の F344 雄ラットを用い、Nonylphenol を 2000, 250, 25ppm の濃度で粉末飼料中に混じて 3 週間経口投与した。その投与終了 1 日後、1, 2, 3 および 5 週後に 3 から 5 匹を屠殺し、無処置対照群と比較検討した。その結果、2000ppm 投与群では体重の増加抑制が見られた。血中の Testosterone 値は投与終了 1 日後で、各群とも 2 週後、5 週後の値より低値を示したものの群間に有意差はなかった。肝重量では 2000ppm 投与群の 1 日後と 250 および 25ppm 投与群の 5 週後で相対肝重量の有意な増加が見られた。また、相対前立腺重量では 25, 250, 2000ppm 投与のいずれの群でも投与終了後 1 週間で対照群より有意な減少が認められた。本年度は短期間の実験において Nonylphenol 投与によりラット前立腺の相対重量が抑制されることを明らかにした。

A. 研究目的

環境中に存在する内分泌かく乱化学物質の多くは性ホルモンすなわち女性ホルモン様活性を示したり、また男性ホルモン様活性を示したりしている。さらに、その反対にそれぞれのホルモンに対し拮抗的に働くことも明らかとなっており、これらの物質の作用を検討する上でホルモン依存性がんに対する修飾作用を検討することはこれらの化学物質のヒトへの安全性を検討する上で極めて重要であると考えられる。そこで、本研究ではわれわれの教室で開発したラット前立腺がんモデルを用いて内分泌かく乱化学物質の前立腺がんの発生過程での修飾作用を検討することをその目的としている。

B. 研究方法

1. 長期動物実験

われわれの開発したラット前立腺がんモデルを用いて、内分泌かく乱物質である Nonylphenol および Genistein の前立腺発がんの修飾作用の検討を行っている。その実験デザインを図 1 に示す。6 週齢雄の F344 ラットを 7 群に分け、1 から 5 群には前立腺発がん物質である 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)を最初の 20 週間に体重 kg あたり 50mg の投与量で 2 週間に 1 回づつ合計 10 回皮下投与する。6, 7 群は DMAB の溶媒のみを投与する。実験開始 20 週目より 2, 3 群には Nonylphenol をそれぞれ 250, 25ppm の濃度で大豆成分の含まれないの基礎食に混じり 40 週間投与する。同様に 4, 5 群には 250, 25ppm

の Genistein を，6，7 群には 250ppm の Nonylphenol と Genistein をそれぞれ投与する．いずれの群も基礎食には大豆成分が含まれないものを用いる．

2. 短期動物実験

上記の長期前立腺がん実験の基礎的なデータを得る目的で，図 2 に示すように短期の実験を行う．10 週齢の雄 F344 を用い，Nonylphenol を 2000，250，25ppm の濃度で粉末飼料中に混じて 3 週間経口投与し，その投与終了後 1 日，1，2，3 および 5 週後に 3 から 5 匹の動物を屠殺する．そして体重，前立腺，精囊，肝臓の重量，血中 Testosterone 濃度を測定し，無処置対照群と比較検討する．特に，前立腺の重量は腹葉，背側葉，前葉にそれぞれ分け，各葉の臓器重量の変化を調べる．また，屠殺 1 時間前に BrdU を単回腹腔内投与し，前立腺組織での Labelling Index を検討する．

(論理面への配慮)

本研究の開始にあたってはあらかじめその実験手技，倫理面での対応など名古屋市立大学医学部の動物実験委員会の承認を得ており，動物の飼育ならびに屠殺にあたっては動物への苦痛を極力無くすよう配慮に努める．

C. 研究結果

1. 長期動物実験

現在，DMAB の 10 回の投与を終了し，Nonylphenol および Genistein の投与を開始している．体重は DMAB を投与した 1 から 5 群の体重が溶媒投与の 6，7 群の体重より減少しているもの，DMAB 投与に通常見られる範囲内の変化であり，22 週を経過した時点で，死亡ラットは見られず，順調に経過している．

2. 短期動物実験

実験期間中の体重の変化を見ると，2000ppm 投与群では体重増加の抑制が見られ，屠殺時の 2000ppm の濃度では Nonylphenol の毒性が現れたものと思われる．表 1 に投与終了後 1，14，35 日後の屠殺ラットの体重と血中 Testosterone 値を示す．2000ppm 投与群では体重の減少が確認されたが，血中の Testosterone 値はばらつきが大きく，投与濃度に相関した変化は明らかでなかった．相対肝重量の値を見ると，投与終了 1 日後の 2000ppm 投与群，5 週後の 2000 および 250ppm 投与群で相対肝重量の有意な増加が見られた．前立腺の相対重量では投与終了 1 週後の屠殺例で 25，250，2000ppm のいずれの投与群でも相対前立腺重量の減少が見られ，対照群と比較すると統計学的に有意な減少であった．前立腺重量を各葉ごとに検討すると前立腺腹葉での変化がもっとも大きく，投与終了 1 週後の Nonylphenol 投与群のいずれにも対照群より有意な減少が見られた (図 3)．前立腺組織の BrdU の Labelling Index に関しては現在検討中である．

D. 考察

内分泌かく乱物質である Nonylphenol および Genistein のラット前立腺発がん過程での発がん修飾作用の有無の検討を行っている．本年度行った短期の実験において，Nonylphenol の 2000ppm 投与は体重増加の減少が見られ，肝の相対重量の増加も伴っており，2000ppm の高濃度では Nonylphenol による毒性が現れたものと思われる．

投与終了 1 週後の前立腺の相対重量が減少することが確認された．血中の Testosterone 値には変化が見られなかったものの，前立腺重量の低下は高濃度 Nonylphenol による内分泌かく乱の可能性

を示すものの、前立腺の発がん過程での Nonylphenol の影響の有無に関しては長期実験の結果を待って最終的な判断をする予定である。

E. 結論

DMAB を用いたラット前立腺がんモデルを用いて、Nonylphenol および Genistein の長期動物実験を現在進行中である。短期間の実験では 10 週齢の F344 雄ラットを用い、Nonylphenol を 2000, 250, 25ppm の濃度で粉末飼料中に混じて 3 週間経口投与し、その投与終了 1 日後、1, 2, 3 および 5 週後に 3 から 5 匹を屠殺し、無処置対照群と比較検討した結果、肝重量では 1 日後の 2000ppm 投与群と 5 週後の 250 および 25ppm 投与群で相対肝重量の有意な増加が、また、相対前立腺重量では投与終了後 1 週間で 25, 250, 2000ppm 投与のいずれの群でも対照群より有意な減少が認められた。本年度は短期間の実験において Nonylphenol 投与によりラット前立腺の相対重量が抑制されることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

3. Ikeda, Y., Takahashi, S., Kimura, J., Cho, Y. M., Imaida, K., Shirai, S., Shirai, T.: 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.
4. Hirose, M., Fukushima, S., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.: Modifying effects of phytic acid and γ -oryzanol on the promotion stage of rat carcinogenesis. *Anticancer Res.* 19: 3665-3670, 1999.
5. Imaida, K., Ogawa, K., Takahashi, S., Ito, T., Yamaguchi, T., Yotsuka, Y., Wakabayashi, K., Tanaka, K., Ito, N., Shirai, T.: Delay of DNA-adduct repair and severe toxicity in xeroderma pigmentosum group A gene (XPA) deficient mice treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Cancer Lett.* 150: 63-69, 2000.

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

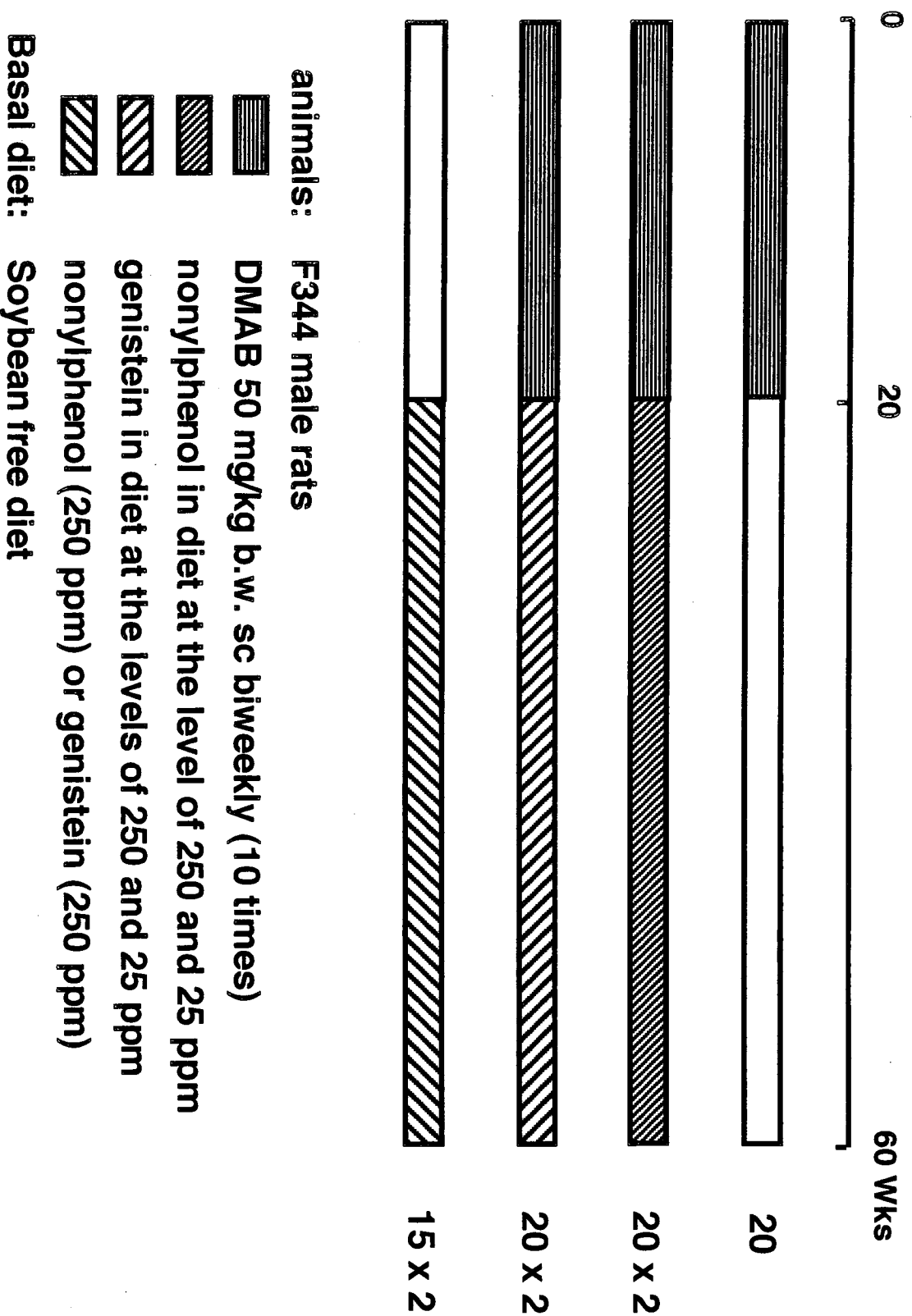
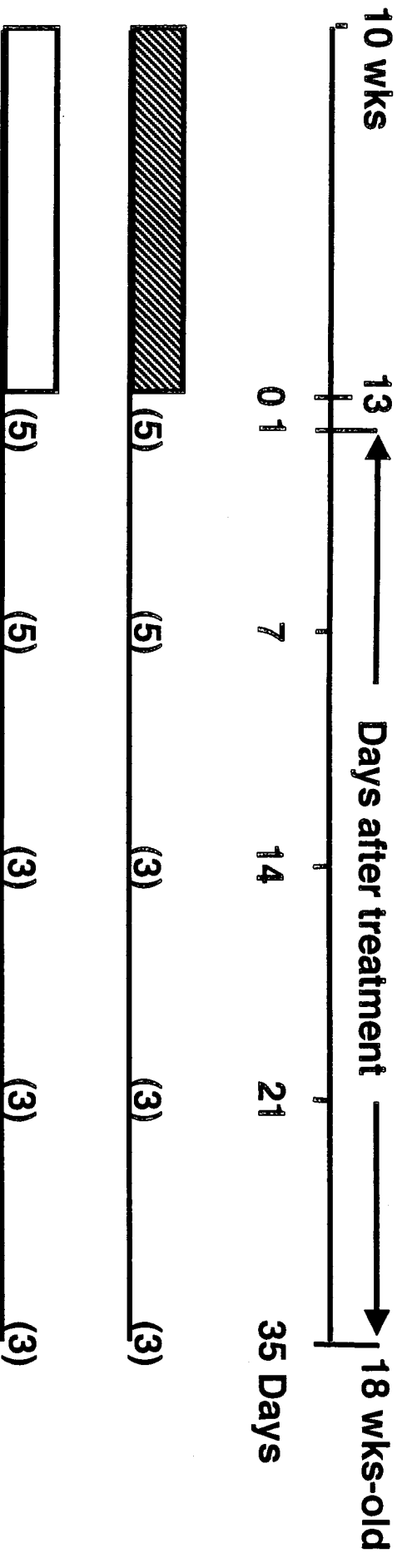


図1. 長期動物実験

Age of animals



animals: F344 male rats, 10-week-old

 **nonylphenol in diet at the level of 2000, 250 and 25 ppm**

End markers for research: body weights
organ weights
histomorphological alterations of the prostate complex
serum testosterone

図2. 短期動物実験

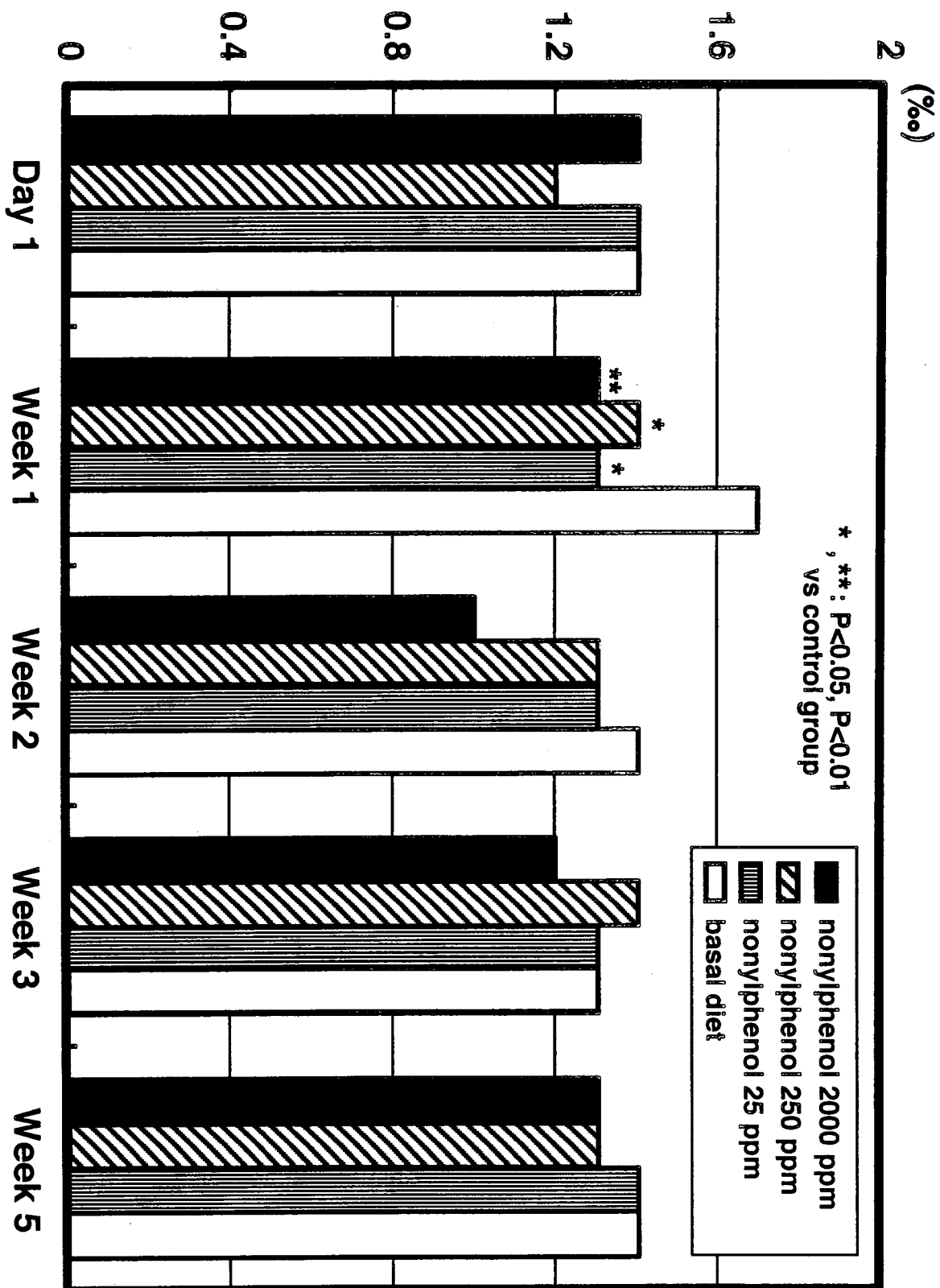


図3. 前立腺腹葉の相対重量 (短期実験)

表 1. Testosterone Level after Stopping Giving Nonylphenol

Treatment	Age (week)	No. of rat	Body weight (g)	Testosterone (ng/ml)
Day 1.				
nonylphenol 2000ppm	13	5	257.6 ± 9.8	0.5 ± 0.2
nonylphenol 250ppm	13	5	273.1 ± 11.2	0.6 ± 0.2
nonylphenol 25ppm	13	5	263.5 ± 10.3	0.4 ± 0.3
basal diet	13	5	268.0 ± 7.8	0.4 ± 0.2
Day 14.				
nonylphenol 2000ppm	15	3	296.3 ± 7.3	1 ± 0.5
nonylphenol 250ppm	15	3	300.3 ± 10.4	0.3 ± 0.1
nonylphenol 25ppm	15	3	293.0 ± 17.7	1.6 ± 1.0
basal diet	15	3	294.5 ± 15.1	1.2 ± 0.8
Day 35.				
nonylphenol 2000ppm	18	5	307.5 ± 21.3	0.7 ± 0.2
nonylphenol 250ppm	18	4	314.2 ± 10.4	1.0 ± 0.6
nonylphenol 25ppm	18	5	337.4 ± 3.4	1.1 ± 0.5
basal diet	18	4	325.7 ± 9.2	1.1 ± 1.1