

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

食品中内分泌かく乱物質等の子宮内膜発がん修飾作用に関する研究
分担研究者 三森 国敏 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：p53 遺伝子の片側アレルをノックアウトした CBA マウス(p53 (+/-)CBA マウス) に ENU 120mg/kg を一回腹腔内投与し、1 週間後から内分泌かく乱物質とみなされている 1%ビスフェノール A ないし 20%大豆 (きなこ) を 26 週間混餌投与した。その結果、ENU+ビスフェノール A および ENU +大豆群での体重は ENU 単独群と同様の体重増加を示し、最終体重では群間に差は見られなかった。子宮の絶対・相対重量は ENU+ビスフェノール A および ENU+大豆群で ENU 単独群に比し減少傾向を示したが、子宮内膜肉腫の発生頻度および PCNA 陽性細胞数においては群間に有意な差はみられなかった。p53(+/-)CBA マウスの繁殖成績が著しく低下し、十分な動物供給が得られなかったため、当初予定していたゲニステインないしノニルフェノールの実験は次年度に延期した。

A. 研究目的

実験的子宮発がんモデルの多くは、その誘発に 1 年以上を必要とするため、より短期間に発がんするモデルが不可欠である。我々は、既に、p53 遺伝子の片側アレルをノックアウトした CBA マウスに N-ethyl-N-nitrosourea(ENU)を一回腹腔内投与することにより、子宮腫瘍が 6 カ月以内に高率に誘発されることを見だしたことから、このモデルを用い、強いエストロゲン作用を有する ethinylestradiol(EE)および弱いエストロゲン作用を有する有機塩素系農薬の methoxychlor(MXC)の子宮発がんに対する修飾作用について検討した。その結果、EE は子宮内膜や子宮腺の増殖性病変の誘発を増強したが、MCX はそれら増殖性病変に対し増強作用を示さない成績が得られた。本年度は、このモデルを用いて、ゲニステインおよびノニルフェノールの子宮腫瘍に対する腫瘍修飾作用を検討する予定であったが、p53(+/-)CBA マウスの繁殖成績が著しく悪く供給が不十分であり、ゲニステインの入手に時間を要したことから、被験物質を弱いエストロゲン作用があるとされるビスフェノール A と植物由来でエストロゲン作用を有する大豆に変更してこれらの子宮腫瘍に対する腫瘍修飾作用を検討した。

B. 研究方法

雌 p53 (+/-)欠損 CBA マウス (p53 (+/-)CBA マウス

：オリエンタル酵母) に生理食塩水に溶解した N-ethyl-N-nitrosourea(ENU) (ナカライテスク) 120mg/kg を一回腹腔内投与し、その後から第 1 群には 1%ビスフェノール A (BpA) を第 2 群には 20%大豆 (きなこ) (SB)を基礎飼料 (CRF-1) に混じ、第 3 群には基礎飼料を 26 週間自由に与えた。投与終了後に全動物を殺処分し、子宮重量を測定した後、病理組織学的に観察し、各内分泌かく乱物質の子宮腫瘍誘発促進作用の有無を比較検討した。

C. 研究結果 (図 1)

実験終了時の生存率は 1 群で 86%、2 群で 71%、3 群では 100%であった。全ての群で実験終了時まで体重の増加抑制は認められなかった。解剖時における子宮実重量は 3 群に比し 1、2 群で低値を示したが、3 群でのばらつきが大きいため有意差は認めなかった。相対重量においても同様であった。子宮内膜肉腫の発生率は 1 群が 83%で 2、3 群では 100%と群間で差は認めなかった。発生した子宮内膜肉腫の細胞増殖活性を PCNA 免疫組織染色を施し検討した結果、各群間で増殖活性には差は認められなかった。

その他の腫瘍として、肺腫瘍が全ての群に認められたが、その発生頻度において群間に差はなかった。

D. 考察

p53 (+/-)CBA マウス及びその同腹仔の野生型マウス(p53(+/+)CBA マウス)に ENU 120mg/kg を一回腹腔内投与し、26 週後に殺処分したところ、ENU 投与 p53 (+/-)CBA マウスにおいて子宮内膜肉腫が p53(+/+)CBA マウス(20%)に比し、高率(90%)に誘発された。この p53 (+/-)CBA マウスにおける子宮腫瘍では p53 のコドン 135 に Ala →Val の変異を伴う点突然変異が全例に認められ、この突然変異が子宮腫瘍誘発に関与することを我々は既に報告した。さらに、強いエストロゲン作用を有する EE および、弱いエストロゲン作用を有する MXC の子宮発がんに対する修飾作用を検討するため、我々は、p53(+/+)マウスおよびその同腹仔の p53(+/+)マウスに ENU を 120mg/kg 体重を単回腹腔内投与し、その一週間後より第 1 群(10 匹)には基礎飼料を、第 2 群(15 匹)には 5ppm の EE を第 3 群(15 匹)には 2000ppm の MXC を基礎飼料に混じ、26 週間自由に与えた。p53(+/+)マウスも p53(+/-)マウスと同様の処置を行った。第 2 と 3 群では投与開始直後より体重の増加抑制が認められたため、投与開始 6 週目より EE と MXC の濃度を半量に減じ、26 週まで実験を継続した。その結果、p53(+/-)マウスの ENU 単独群では子宮内膜肉腫が 67%、ポリープが 22%発生したが、ENU+EE 群では内膜肉腫が 87%に誘発された。ENU+MXC 投与群では内膜肉腫は ENU 単独群と同頻度であった。p53(+/+)マウスでは ENU 単独群にポリープが 30%認められたのみであった。また、子宮内膜腺の明細胞からなる異型腺管が p53(+/-)と p53(+/+)マウスの ENU+EE 群に 53%発現し、p53(+/-)マウスでの半数には腺腫が随伴した。この実験成績より、強いエストロゲン作用を有する EE は子宮内膜や子宮腺の増殖性病変の誘発を増強するが、弱いエストロゲン作用を有する MXC はそれら増殖性病変に対し増強作用を示さないことを我々は報告した。今回の実験においても、ビスフェノール A および大豆は ENU 誘発子宮腫瘍になんら修飾作用を示さなかったことから、弱いエストロゲン作用を有する食品中に含まれる

内分泌かく乱物質には子宮発癌を増強する作用はないものと推察された。

p53(Exon5)遺伝子の片側アレルが欠損している p53(+/-)C57BL6 マウスは、米国タコニック・ファームで維持繁殖されている。一方、今回用いた p53 (+/-)CBA マウスは、p53 の Exon2 の片側アレルをロックアウトしたマウスを CBA マウスに戻し交配したものである。しかし、このヘテロ欠損マウス同士の交配による妊娠率は非常に悪く、最近出生率が著しく低くなったため、動物が予定通り供給できなくなった。このため、今年度予定していたゲニスティンないしノニルフェノールを用いた実験は実施することが出来なかった。平成 12 年度は同モデルを用いて、これらの物質についての子宮発がん促修飾作用の有無を検索するとともに、食品中に含まれるその他の内分泌かく乱物質についての子宮発がん修飾作用も検討する予定である。

E. 結論

p53 欠損 CBA マウスに ENU でイニシエーション処置した子宮発がんモデルを用いて、ビスフェノール A と大豆について子宮発がん修飾作用を検索したが、これらには子宮発がん修飾作用は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mitsumori, K., Onodera, H., Shimo, T., Yasuhara, K., Takagi, H., Koujitani, K., Hirose, M., Maruyama, C. and Wakana, S.: Induction of Uterine tumors with p53 point mutations in female p53 deficient CBA mice given a single administration of N-ethyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis in press.*

Koujitani, T., Yasuhara, K., Usui, T., Nomura, T., Onodera, H., Takagi, H., Hirose, M. and Mitsumori, K.: Lack of susceptibility of transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene (rasH2 mice) in a six-month carcinogenicity study of

Mitsumori, K.: Alternative model using rasH2 transgenic mice: Its usefulness, unsolved points and future studies required to be performed to improve the model. In: Assessment of Pharmaceuticals for Potential Human Carcinogenic Risk. Ed. by Lumley, C. and McAuslane, N. pp. 29-40. Center for Medicines Research International. East

Sussex. UK. 1999.

2. 学会発表

小野寺博志、三森国敏、高木久宜、安原加壽雄、糺谷高敏、田村啓、広瀬雅雄：p53 ノックアウト（ヘテロ欠損）CBA マウスを用いた ENU による二段階多臓器発がんモデルにおけるビスフェノール A、DDT、きなこの発がん修飾作用、第 16 回日本毒性病理学会総会（2000.1 岐阜）

Fig. 1. Survival rate and body and uterine weights, and incidence of proliferative lesions in p53(+/-)CBA mice given bisphenol A or soybean after ENU initiation

