

食品中内分泌かく乱物質等の甲状腺発がん修飾作用に関する研究
分担研究者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部室長

研究要旨： 大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの機序について検討した結果、大豆粉末の過剰摂取はヨード欠乏と特異的に相乗作用してラットの甲状腺を増殖させること、フェノバルビタールやスルファジメトキシムなど他の甲状腺腫瘍プロモーターとの相乗効果を示さないこと、ヨード欠乏との相乗作用は 20%を超える高濃度でのみ発現することおよび大豆イソフラボン自体にはヨード欠乏との顕著な甲状腺増殖作用がないことを明らかにした。また、食品中に存在する天然および合成の内分泌かく乱物質として genistein および nonylphenol を取り上げ、同一条件により諸臓器の発がんおよび影響を検討する本研究班全体のプロジェクトの一環として、甲状腺における発がん修飾作用を検討した。DHPN 誘発ラット 2 段階甲状腺発がんモデルのポストイニシエーション期に、genistein および nonylphenol を 250 ppm と 25 ppm の二段階の用量で混餌投与した結果、両物質ともに甲状腺発がん過程に影響を及ぼさなかった。同様に、大豆イソフラボンを 0.2% および 0.04% の用量で混餌投与した結果、甲状腺発がん過程への影響はなかった。以上の成績は、食品中に存在する濃度レベルの大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol は甲状腺発がん促進作用を有さないことを示唆する。

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の働きを示すが、逆にホルモンに対して拮抗的に働くこともあり、その作用は複雑である。日常ヒトが摂取している食品中には多くの phytoestrogen が存在しており、その毒性や催奇形性に加えて発がん修飾作用を詳細に検討することはこれら物質の安全性評価上益々重要となってきた。実験的に、植物中および合成のエストロゲンはラットの乳腺発がんを促進したり逆に抑制することが報告されている。一方、過剰の大豆摂取はラット甲状腺発がんを促進することが知られており、大豆に含まれるイソフラボンに phytoestrogen の作用があることとの関連が示唆されているが、その作用機序は十分に解明されているとは言えない。

このように、内分泌環境のかく乱は発がんの重要な修飾要因と考えられるが、食品中の内分泌かく乱物質の中でその発がん修飾作用が証明されている物質は少数にすぎない。本研究班全体の目的は、食品中に含まれる内分泌かく乱物質による内分泌器官その他の臓器に対する発がん修飾作用を総合的に比較検討し、さらにその修飾機構がホルモン作用に基づくものか、ある

いはそれ以外の作用によるものかを明らかにし、ヒト発がんへの危険度評価を行うことにある。食品中に存在するホルモン活性物質による発がん修飾の影響を明らかにすることは食品衛生上急務であり、その成果によりヒトがんの予防・阻止のための基礎的資料を得ることができる。平成 11 年度では、大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がん機序を追究するとともに、食品中に存在する天然および合成の内分泌かく乱物質として genistein および nonylphenol を取り上げ、同一投与条件により諸臓器の発がんおよび影響を検討する本研究班全体のプロジェクトの一環として、甲状腺における発がん修飾作用についてラット 2 段階発がんモデルを用いて検討した。

B. 研究方法

<I. 大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの機序に関する検討>

実験 1： 4 週齢の F344 雌ラット 40 匹を 4 群に分け (Fig. 1)、第 1 群にはカゼイン中に含まれる可能性のあるヨードの影響を除外するために蛋白成分を 20% グルテンとした基本食 AIN-93G を、第 2 群にはさらにそれにヨードを添加

しない餌を10週間まで与えた。第3群には蛋白成分をカゼインから20%脱脂大豆とした基本食AIN-93Gを、第4群にはさらにそのヨード欠乏食を同期間与えた。実験開始から5および10週後に血清ホルモン値の定量、臓器重量の測定および病理組織学的検索を実施した。

実験2：6週齢のF344雌ラット20匹を4群に分け (Fig. 2)、第1群には20%グルテンに置換した基本食AIN-93Gを、第2群にはさらにそのヨード欠乏食を5週間与えた。第3群および第4群にはヨード欠乏に加え、それぞれ5.0%および25%脱脂大豆食を同期間与えた。投与終了後、血清ホルモン値定量、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

実験3：6週齢のF344雌ラット30匹を6群に分け (Fig. 3)、第1、3、5群には20%グルテンに置換した基本食AIN-93Gを、第2、4、6群には20%脱脂大豆に置換した基本食を5週間与えた。第3、4群にはさらに0.025%のsulfadimethoxine (SDM)を、第5、6群には0.05% phnobarbital (PB)を併用投与した。投与終了後、血清ホルモン値定量、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

実験4：6週齢のF344雌ラット25匹を5群に分け (Fig. 4)、20%グルテン (第1群)、ヨード欠乏 + 20%グルテン (第2群)、ヨード欠乏 + 20%脱脂大豆 (第3群)、ヨード欠乏 + 0.2%大豆イソフラボン (第4群) およびヨード欠乏 + 0.04%大豆イソフラボン (第5群) とした基本食AIN-93Gを5週間与えた。投与終了後、血清ホルモン値定量、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

<II. 大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol の甲状腺発がん修飾に関する検討>

実験5：5週齢のF344雄ラット105匹を14群に分け、第1群~第7群 (各群10匹) に甲状腺発がんイニシエーション処置として、*N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を2800 mg/kgの用量で単回皮下投与後、1000 ppmのSDMを飲水投与 (第1群)、250 ppm (第2群) または25 ppm (第3群)のgenisteinを混餌投与、250 ppm (第4群) または25 ppm (第5群)のnonylphenolを混餌投与、400 ppmの大豆イソフラボンを混餌投与 (第6群) し、第7群には基本食CRF-1のみを与えた。なお、大豆イソフラボンの影響

を除外するため、通常は添加する大豆成分をCRF-1に加えなかった。第8群~第14群 (各群5匹) はDHPN投与をせずに、第1群~第7群と同様に処置した。実験開始12週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

実験6：5週齢時に卵巣摘除を施した6週齢のF344雌ラット90匹を9群に分け、第1群~第8群 (各群10匹) に甲状腺発がんイニシエーション処置として、DHPNを2400 mg/kgの用量で単回皮下投与後、1000 ppmのSDMを飲水投与 (第1群)、250 ppm (第2群) または25 ppm (第3群)のgenisteinを混餌投与、250 ppm (第4群) または25 ppm (第5群)のnonylphenolを混餌投与、400 ppmの大豆イソフラボンを混餌投与 (第6群)、0.5 mgの β -estradiol 3-benzoateを皮下埋植 (第7群) し、第8群には大豆成分を添加しない基本食CRF-1のみを与えた。第9群 (10匹) は無処置対照群とした。実験開始12週後に、臓器重量測定および病理組織学的検索を実施した。

倫理面への配慮として、動物愛護の観点から、必要最小限の動物数を用いるよう十分な検討と準備を行った。動物飼育は摂氏23度前後、湿度約60%に保たれた施設内にて、飲料水・飼料を適正に投与した。屠殺はエーテル深麻酔下、腹部大動脈から脱血し、動物に対する苦痛を可能な限り少なくした。

C. 研究結果

<I. 大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの機序に関する検討>

実験1：10週時において、甲状腺相対重量は第1群 (対照群) に比して第2群 (ヨード欠乏群) および第4群 (ヨード欠乏 + 脱脂大豆群) で有意に増加し、特に第4群では第1群に比べて約10倍、第2群に比べても約5倍の著明な増加を示した (Fig. 5)。下垂体相対重量は第1群に比して第3群 (脱脂大豆群) および第4群において軽度ではあるが有意に増加した (Fig. 5)。血清T4レベルは第1群に比して第2群および第4群で有意に減少したが、第3群ではむしろ増加傾向を示した (Fig. 6)。一方、血清TSHレベルは第1群に比して第3群および第4群で有意に増加し、特に第4群では第1群の約29倍、第3群の約21倍に増加した (Fig. 6)。病理組織学的に、第4群においてのみ顕著な甲状腺濾胞上

皮の過形成が観察された。なお、第3群および第4群の下垂体の電子顕微鏡観察において、滑面小胞体の拡張や分泌顆粒の増加などの超微形態学的変化が認められた。

実験2： 甲状腺相対重量は第1群（対照群）に比して第2群および第3群では2倍程度に増加し、第4群（25%大豆併用投与群）では約6倍に増加した（Fig. 7、）。血清T4レベルは第1群に比して第2群～第4群で有意に減少し、なかでも第4群では第2群に比べても有意に減少した（Fig. 8）。血清TSHレベルは第1群に比して第2群～第4群で有意に増加し、特に第4群では第1群の約9倍に増加した（Fig. 8）。第4群においてのみ顕著な甲状腺濾胞上皮の過形成が観察された。

実験3： 甲状腺相対重量は第1群（対照群）に比して第3群（SDM投与群）および第4群（SDM+大豆併用投与群）で増加したが、その増加率は第3群よりも第4群のほうがむしろ小さかった（Fig. 9）。SDM投与により血清T4レベルが減少し、血清TSHレベルが増加したが、それらの変動はいずれも20%脱脂大豆の併用投与でむしろ軽減された（Fig. 10）。PBの投与でも、程度はやや軽度であるもののSDMと同様な傾向がみられ、いずれも脱脂大豆の併用投与で軽減された（Fig. 9およびFig. 10）。

実験4： 甲状腺相対重量は第1群（対照群）に比して第2群～第5群（ヨード欠乏群）で増加したが、第3群（20%脱脂大豆併用群）のみが第2群（ヨード欠乏単独群）に比べても有意な増加を示し、第4群および第5群（イソフラボン併用群）ではその効果がみられなかった（Fig. 11）。ヨード欠乏により血清T4レベルの減少と血清TSHレベルの増加がみられ、大豆併用投与はそれらの変動を増強したが、イソフラボン併用投与による増強は認められなかった（Fig. 12）。同様に、第3群では高度の甲状腺濾胞上皮の過形成が観察されたが、第4群および第5群においては明らかな病変発生の増強効果は認められなかった。

<II. 大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol の甲状腺発がん修飾に関する検討 >

実験5： 摂餌量は各群間に差異はなく、被験物質の摂取量は投与量によく相関した（Table 1）。体重増加はDHPN 処置に関わらずSDM投

与によって有意に抑制され、第14群（無処置群）に比し第3群（DHPN+25 ppm genistein）および第4群（DHPN+250 ppm nonylphenol）で低下したが、第7群（DHPN単独群）との有意差はなかった（Fig. 13 および Table 2）。甲状腺相対重量は第7群に比し第1群（DHPN+SDM群）で、第14群に比し第8群（SDM群）で有意に増加し、甲状腺増殖性病変の発生もそれに一致して認められた（Fig. 14 および Table 2）。しかし、genistein、nonylphenol またはイソフラボンの投与は、甲状腺相対重量の変動および増殖性病変の発生に影響を及ぼさなかった（Fig. 14 および Table 2）。DHPN+SDM群のみに甲状腺濾胞上皮の増殖性病変として、過形成（100%）、腺腫（100%）および腺癌（70%）が発生した。

実験6： 摂餌量は各群間に差異はなく、被験物質の摂取量は投与量によく相関した（Table 3）。体重増加は第8群（DHPN単独群）または第9群（無処置群）に比し、第1群（DHPN+SDM群）および第7群（DHPN+ β -estradiol 3-benzoate群）で有意に抑制されたが、その他の群間に有意差はなかった（Fig. 15 および Table 4）。甲状腺相対重量は第8群または第9群に比し第1群で有意に増加し、第7群でも増加傾向を示したが、統計学的有意差はなかった（Fig. 16 および Table 4）。下垂体、肝臓、腎臓および子宮の相対重量は第8群および第9群に比し第1群で有意に増加した（Table 4）。しかし、genistein、nonylphenol またはイソフラボンの投与は、甲状腺を含めた諸臓器の相対重量変動および増殖性病変発生に影響を及ぼさなかった（Fig. 16 および Table 4）。第1群のみに甲状腺濾胞上皮の増殖性病変として、過形成（100%）、腺腫（100%）および腺癌（20%）が発生した。また、第7群のみに下垂体腺腫、肝細胞肥大、腎尿細管硝子の変性、脾頭毛細血管拡張、子宮内膜扁平上皮化生および膈上皮角化が観察された。

D. 考察

今回の実験成績から、大豆粉末の過剰摂取はヨード欠乏と相乗作用してラットのことが確認されたが、フェノバルビタールやスルファジメトキシンなど他の甲状腺腫瘍プロモーターとの相乗効果を示さないこと、ヨード欠乏との相乗作用は20%を超える高濃度でのみ発現することが明らかとなった。ヨード欠乏、フェノバルビタールおよびスルファジメトキシンはそれぞれ

異なる機序によって血中の甲状腺ホルモンレベルを低下させるが、結果として下垂体-甲状腺ネガティブフィードバック機構を介して血中TSHレベルが増加し、増加したTSHの刺激によって甲状腺濾胞上皮が刺激される過程は共通と考えられており、大豆の過剰摂取がヨード欠乏とのみ特異的に相乗作用を示す理由については今後さらに追究する必要がある。ただし、今回の実験で大豆投与が直接的に下垂体に影響する可能性が示されたことは、ヨード欠乏との特異性を考察する上で重要な点と思われる。ヨード欠乏の条件下で大豆の摂取が甲状腺濾胞上皮を増殖させた事実は、特にヨード欠乏地域における大豆食品摂取の安全性評価にとって重要な知見であるが、20%を超える大量摂取でのみ観察される事象であることが判明した。すなわち閾値の存在する可能性が強く示唆されることから、たとえヨード欠乏地域においてもそれを超える大量摂取でなければ大豆食品摂取はあまり問題とならないと思われる。また、今回の実験成績において、20%の大豆粉中に含まれる濃度の5倍量である0.2%大豆イソフラボンを投与してもヨード欠乏との相乗作用は認められず、甲状腺増殖作用に関与する大豆成分はむしろイソフラボンではない可能性が示された。ただし、今回使用したイソフラボン配糖体ではなくアグリコンであり、配糖体の大豆イソフラボンを用いた実験によって同様な結果となるかどうかを確認する必要がある。

さらに、雄ラットおよび卵巣摘除雌ラットを用いて、大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol の甲状腺発がんおよび修飾影響について検討した結果、いずれにも顕著な影響は認められなかった。陽性対照物質として用いたスルファジメトキシンが高度の甲状腺発がん促進効果を示したことから、今回が使用したDHPN誘発ラット2段階甲状腺発がんモデルの有意性は明らかであり、環境レベルあるいはそれ以上の投与で、大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol は甲状腺発がんを促進しないことが判明した。なお、卵巣摘除雌ラットにおいて、合成エストロゲン β -estradiol 3-benzoate は下垂体腺腫の誘発をはじめ諸臓器に対して著明なエストロゲン作用を示したが、今回の条件下では甲状腺発がんにはほとんど影響を及ぼさなかった。したがって、エストロゲン様作用に

基づく甲状腺発がん促進効果は、あるとしてもあまり強いものではないものと考えられた。

E. 結論

大豆粉末の過剰摂取はヨード欠乏と特異的に相乗作用してラットの甲状腺を増殖させること、ヨード欠乏との相乗作用は高濃度でのみ発現することおよび大豆イソフラボン自体にはヨード欠乏との相乗作用がないことを明らかにした。また、genistein および nonylphenol は甲状腺発がん促進作用を有さない可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ikeda, T, Nishikawa, A, Imazawa, T, Kimura, S, Hirose, M: Dramatic synergism between excess soybean intake and iodine deficiency on the development of rat thyroid hyperplasia. *Carcinogenesis* 21: 707-713, 2000.

2. 学会発表

1) 池田尚子、西川秋佳、今沢孝喜、宮内慎、中村英明、木村修一、広瀬雅雄：ヨード欠乏と大豆摂取による相乗的甲状腺増殖効果の閾値の検討。第58回癌学会総会。広島、1999。
2) 西川秋佳、池田尚子、今沢孝喜、宮内慎、中村英明、木村修一、広瀬雅雄：大豆摂取とヨード欠乏との特異的相乗的甲状腺増殖作用。第58回癌学会総会。広島、1999。

3) Ikeda, T, Nishikawa, A, Imazawa, T, Nakamura, H, Miyauchi, M, Son, H-Y, Nakanishi, Y, Inage, H, Kimura, S, Hirose, M: Mechanistic insights into synergistic effects of soybean with iodine deficiency regarding induction of thyroid hyperplasia in rats. 2nd International Conference on Food Factors. Chemistry and Health Promotion. Kyoto, 1999.

4) Nishikawa, A, Ikeda, T, Nakamura, H, Miyauchi, M, Imazawa, T, Son, H-Y, Furukawa, F, Kimura, S, Hirose, M: Dramatic synergism of excess soybean intake with iodine deficiency on the development of rat thyroid proliferative lesions. 39th Annual Meeting of Society of Toxicology. Philadelphia, 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