

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  
主任研究者 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： 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、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用を同一の投与条件で検討する実験を開始し、一部実験を終了した。実験モデルとして、DHPN 誘発ラット甲状腺発がんモデル、DMBA 誘発ラット乳腺発がんモデル、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子導入ラットにおける DMBA 誘発乳腺発がんモデル、*p53* 遺伝子欠損マウスにおける ENU 誘発子宮発がんモデル、DMAB 誘発ラット前立腺発がんモデル、DMBA 誘発ラット卵巣発がんモデルおよびラット多臓器中期発がん検索モデルを用いて、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。その結果、genistein は乳腺腫瘍の促進または抑制という相反する傾向を示しているが、いずれも組織学的検索は終了していない。その他の臓器に対する genistein の影響は今のところ認められていない。また、nonylphenol は現在までのところ諸臓器の発がん過程に影響を及ぼしていない。

内分泌かく乱物質の作用機構に関連するその他の主な実績として、大豆粉末は低ヨード食と特異的に作用してラットの甲状腺を増殖させ、フェノバルビタール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、低ヨード食との相乗作用には閾値があることおよび大豆イソフラボン自体には顕著な甲状腺増殖作用がないことを明らかにした。*p53* 欠損マウスに ENU を一回腹腔内投与し、1 週間後から内分泌かく乱物質とされるビスフェノール A および大豆粉末を 26 週間混餌投与した結果、子宮、肺などに対する発がん修飾作用はみられなかった。天然物質である morin や chalcone の植物性エストロゲン様作用について、ヒト乳がん培養細胞 MCF-7 を用いて調べた結果、morin には nonylphenol よりも弱い MCF-7 細胞の増殖活性があるが、chalcone には増殖活性がないことを明らかにした。また、genistein はがん細胞の増殖を抑制し、その作用は細胞周期の G<sub>2</sub>/M 期であることを明らかにした。さらに、ラット下垂体でのがん遺伝子 *pttg* はエストロゲンにより発現調節されており、その応答性の差が下垂体の腫瘍化に関連していることを示唆する知見を得た。

分担研究者

広瀬雅雄 国立医薬品食品衛生研究所・部長  
津田洋幸 国立がんセンター研究所・部長  
三森国敏 国立医薬品食品衛生研究所・室長  
今井田克己 名古屋市立大学医学部・助教授  
田中卓二 金沢医科大学・教授  
鰐淵英機 大阪市立大学医学部・講師  
藤本成明 広島大学原爆放射能医学研究所・  
助教授  
酒井敏行 京都府立医科大学・教授

雑である。したがって、ホルモン依存性癌に対する修飾作用を検討することは、これら物質の安全性評価上重要である。また最近、外因性内分泌かく乱物質と子宮内膜症発症との関連性、子宮内膜症を母地とした卵巣がんの発生などが指摘されており、ホルモン活性物質による健康影響が危惧されている。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、発がん修飾を詳細に検討することは益々重要となってきた。実験的に、合成エストロゲンはマウス乳腺に発がん性を示すが、ラットでは乳腺発がんを促進あるいは抑制することが知られている。一方、植物中のエストロゲンは乳腺発がんを抑制するが、過剰の大豆摂取はラット甲状腺

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拮抗的に働くこともあり、その作用は複

発がんを促進する。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。その理由の一つは被験物質の内分泌・生殖器官における発がん修飾を低用量でも確実に検出し得る高感度の動物モデルがなかったことによる。しかし、すでに確立されているラットの前立腺がんモデルや甲状腺がんモデルに加えて、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 導入ラットや *p53* 欠損マウスはそれぞれ乳腺や子宮の発がん高感受性形質を有し、中期検索モデルとしての有用性が期待されている。本研究ではまた、内分泌かく乱化学物質のリスク評価における卵巣がんモデル、卵巣・下垂体摘除ラット、ラット多臓器中期発がん性試験法などの有用性についても検討する。さらに、内分泌かく乱物質による増殖・細胞周期関連遺伝子の発現調節を分子生物学的に追究する。

本研究の目的は、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。1999年度は、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、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用について各種実験モデルを用いて検討した。

## B. 研究方法

<I. genistein および nonylphenol の諸臓器の発がんに関与する影響に関する検討>

以下の実験モデルにおいて、genistein および nonylphenol を 250 ppm と 25 ppm の二段階の用量で同一の条件により混餌投与した。Genistein は Chang らの方法に従って合成し(純度 97%以上)、nonylphenol は東京化成工業(東京)より購入した。大豆イソフラボン類の影響を避けるため、基礎食には大豆成分を除いて調製した CRF-1 (オリエンタル酵母、東京)を用

いた。

[ラット甲状腺発がんモデル] 実験 1 : 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 2 : 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  $\beta$ -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。

[ラット乳腺発がんモデル] 雌の SD ラットに 100 mg/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  $\beta$ -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。

[ヒトプロト型 *c-Ha-ras* 遺伝子導入ラットにおける乳腺発がんモデル] 食品中の内分泌かく乱

物質等の発がん修飾作用を評価する *in vivo* 実験系を確立するために、津田らが作成した乳腺発がん高感受性のヒト正常型 *c-Ha-ras* トランスジェニック(Tg)ラットを用いて、陽性対照の 17  $\beta$ -estradiol (E2) と、被験物質の genistein の発がん修飾作用を検討した。方法は、50 日齢の雌雄の Tg ラットに DMBA を 25 mg/kg 胃内投与し、翌日および 60 日目に E2 を一匹あたり 0、0.01、0.1 および 1 mg の用量で背部皮下に挿入し 12 週にて終了した。雄は 18 週でペレットを追加し 20 週にて終了した。DMBA 処置後、翌日より genistein を 0、25 および 250 ppm にて基礎食に加えて雌は 12 週まで、雄は 20 週まで投与した。

[*p53* 遺伝子欠損マウスにおける子宮発がんモデル] *p53* 遺伝子の片側アレルをノックアウト(KO)した CBA マウス(オリエンタル酵母)及びその同腹仔の野生型マウス(Wild)に *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) 120 mg/kg を一回腹腔内投与し、1 週後から内分泌かく乱物質と報告されている 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。

[ラット前立腺発がんモデル] 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB)を用いたラット前立腺発がんモデルを用いて、nonylphenol、genistein の長期実験を現在進行中である。この長期試験の基礎的なデータを得る目的で、短期間の試験を行った。10 週齢の F344 雄ラットを用い、nonylphenol を 2000, 250, 25 ppm の濃度で粉末基礎飼料に混じて 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。

[ラット卵巣発がんモデル] エストロゲン様作用を持つ nonylphenol、genistein の DMBA 誘発ラット卵巣発がんに対する影響を検討する目的で動物実験を開始した。総計 145 匹の雄性 F344 ラットを使用し、以下の 8 群に分けた。第 1 群 (20 匹) : DMBA (0.5%の濃度でオリブ油に懸濁し、左卵巣内に 0.01 ml 注入) →250 ppm nonylphenol、第 2 群 (20 匹) : DMBA →25 ppm nonylphenol、第 3 群 (20 匹) : DMBA →250 ppm genistein、第 4 群 (20 匹) : DMBA →25 ppm genistein、第 5 群 (20 匹) : DMBA、第 6 群 (15 匹) : 250 ppm nonylphenol、第 7 群 (15 匹) : 250 ppm genistein、第 7 群 (15

匹) : 無処置対照群。被験物質は DMBA の最終投与の 1 週後から 50 週間、混餌投与し、その発がんに及ぼす影響を検討した。

[ラット多臓器中期発がん検索モデル] 6 週齢の雄性 F344 ラットを用いて最初の 4 週間に 5 種類の発がん物質(diethylnitrosamine, DMH, *N*-methyl-*N*-nitrosourea, *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, DHPN)で主要臓器にイニシエーション処置をし、その後内分泌かく乱物質である genistein 250, 25 ppm および nonylphenol 250, 25 ppm を 30 週まで投与した。動物は実験開始 30 週後に屠殺し、主要臓器を病理組織学的に解析した。対照群としてイニシエーションだけの群およびイニシエーションなしで genistein、nonylphenol のみの群も設けた。

<II. 内分泌かく乱による発がん修飾の作用機構等に関する検討>

[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、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、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、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、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。

[内分泌かく乱物質の細胞増殖や細胞周期に及ぼす影響に関する検討] 実験1：nonylphenolとgenisteinについて、ヒト乳がん細胞株MCF-7、ヒト大腸がん細胞株CACO-2の増殖や細胞周期に及ぼす影響を検討した。実験2：エストロゲン応答性ラット下垂体腫瘍増殖に及ぼす内分泌かく乱物質等の作用を検討した。また、エストロゲン受容体調節は内分泌かく乱物質の主な作用点の一つであるので、その調節のメカニズムについて検討した。実験3：豆類等から日常的に摂取されているフラボノイドであるgenisteinが内分泌かく乱物質であることに着目し、それらによる発がん修飾を細胞増殖制御機構の観点から検討した。

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。各研究者所属施設の実験動物取り扱い(倫理)規定を遵守して飼育、実験を行った。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。大きな腫瘍等が発生した場合にはそれ以上苦痛を与えないように速やかに屠殺した。詳細な解剖により動物から得られた情報を可能な限り利用した。

## C. 研究結果

### <I. genistein および nonylphenol の諸臓器の発がんおよび非ylphenol の諸臓器の発がんに関する検討>

[ラット甲状腺発がんモデル] 実験1：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。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+25ppm genistein)および第4群(DHPN+250ppm nonylphenol)で低下したが、第7群

(DHPN単独群)との有意差はなかった。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。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。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2：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。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+ $\beta$ -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。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。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。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。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、腎尿細管硝子的変性、脾島毛細血管拡張、子宮内膜扁平上皮化生および腔上皮角化が観察された。

[ラット乳腺発がんモデル] 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nonylphenolによる影響は認められていない。

[ヒトプロト型*c-Ha-ras*遺伝子導入ラットにおける乳腺発がんモデル] E2では乳腺腫瘍の個数は雌雄とも用量に相関した減少がみられた(傾

向検定で有意)。野生型でも弱い抑制傾向がみられた。genistein でも、雌 Tg で用量に相関した有意の抑制がみられた (傾向検定で有意)。野生型でも同様の抑制傾向がみられた。したがって、このラットを用いた乳腺発がんモデルはエストロゲン作用物質の発がん修飾作用の *in vivo* アッセイ系として応用出来ることが明らかとなった。genistein は E2 より弱い、同様に抑制作用を示した。この結果がエストロゲン作用に起因するかについては、今後他のいくつかの環境内分泌かく乱物質について検証する必要がある。

[p53 遺伝子欠損マウスにおける子宮発がんモデル] 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。p53KO マウスの繁殖成績が悪いため、当初予定していた genistein ないし nonylphenol の実験は次年度に延期した。

[ラット前立腺発がんモデル] 2000 ppm 投与群では体重の増加抑制がみられた。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、群間の差はなかった。肝重量では1日後の2000 ppm 群と5週後の250および25 ppm 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, 2000 ppm のいずれの群も対照群より有意な減少が見られ、特に腹葉前立腺での相対重量の減少が認められた。短期の試験において nonylphenol 投与によりラット前立腺相対重量が抑制されることを明らかにした。

[ラット卵巣発がんモデル] 現在、実験開始後約26週を経過し、実験は順調に経過している。一方、nonylphenol は  $10^{-6}$  mol の濃度に、genistein は  $10^{-7}$  mol の濃度に MCF-7 増殖活性のピークがあった。MCF-7 の細胞周期に対して、nonylphenol は影響を与えなかったが、genistein は  $10^{-4}$  mol の濃度で G<sub>2</sub>/M arrest を惹起した。また、nonylphenol、genistein は CACO-2 細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、genistein は  $10^{-4}$  ~  $10^{-6}$  mol の濃度で G<sub>2</sub>/M arrest を惹起した。

[ラット多臓器中期発がん検索モデル] 現在、

実験が終了し、病理組織学的に検索中である。実験終了時の体重はイニシエーション群間では有意な差は認めなかった。

## <II. 内分泌かく乱による発がん修飾の作用機構等に関する検討>

[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。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。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。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。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。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。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。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。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。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。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。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。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。

[内分泌かく乱物質の細胞増殖や細胞周期に及ぼす影響に関する検討] 実験1：nonylphenolは $10^6$  molの濃度に、genisteinは $10^7$  molの濃度にMCF-7増殖活性のピークがあった。MCF-7の細胞周期に対して、nonylphenolは影響を与えなかったが、genisteinは $10^4$  molの濃度で $G_2/M$  arrestを惹起した。また、nonylphenol、genisteinはCACO-2細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、genisteinは $10^4 \sim 10^6$  molの濃度で $G_2/M$  arrestを惹起した。実験2：ラット下垂体においてがん遺伝子*pttg*はエストロゲンによる発現調節の応答性の差が下垂体腫瘍化に関連していることが示唆され、genisteinとnonylphenolは下垂体細胞の増殖促進作用を示した。現在、この細胞を用いた移植腫瘍モデルで*in vivo*での作用を検討中である。また、ラット下垂体および腫瘍での $\alpha$ 型エストロゲン受容体の発現は主に“B”プロモーターにより調節されていることが明らかになった。下垂体腫瘍では甲状腺ホルモンにより受容体が増加し、また増殖が促進されるが、このときのエストロゲン受容体mRNA調節も“B”領域を介することが明らかになった。実験3：*in vitro*の実験系において、genistein投与はがん細胞の増殖に対して抑制的に働くことが判明した。さらに、その細胞増殖の停止は、MG63細胞においては $G_2/M$ 期において、MCF-7細胞においては $G_1$ 期及び $G_2/M$ 期で認められたことから、genisteinの作用は $G_2/M$ 期の制御機構に何らかの影響を与えると考えられた。

#### D. 考察

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、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用を同一

の投与条件で検討する実験を開始し、一部実験を終了した。今回の実験成績から、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 $\beta$ -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。

また、genisteinはDMBA誘発乳腺発がんモデルの肉眼所見において、野生型SDラットでは促進、ヒトプロト型*c-Ha-ras*遺伝子導入SDラットでは抑制という相反する傾向を示しており、興味深い成績が得られているが、いずれも組織学的検索は終了していない。その他の臓器に対するgenisteinの影響は今のところ認められていない。また、nonylphenolは現在までのところ諸臓器の発がん過程に影響を及ぼしていない。

さらに、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は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。

その他に、*p53*欠損マウスにENUを一回腹腔内投与し、1週後から内分泌かく乱物質とされるビスフェノールAおよび大豆粉末を26週間混餌投与した結果、標的臓器である子宮、肺などに対する発がん修飾作用を示さないことが明らかにされた。また、天然物質であるmorinやchalconeの植物性エストロゲン様作用について、ヒト乳がん培養細胞MCF-7を用いて調べた結果、morinにはnonylphenolよりも弱いMCF-7細胞の増殖活性があるが、chalconeには増殖活性がないことが明らかにされた。さらに、genisteinはがん細胞の増殖を抑制し、その作用は細胞周期のG<sub>2</sub>/M期であること、ラット下垂体でのがん遺伝子*pttg*はエストロゲンにより発現調節されており、その応答性の差が下垂体の腫瘍化に関連していることを示唆する知見が得られた。

## E. 結論

食品中の内分泌かく乱物質として、genisteinおよびnonylphenolを取り上げ、甲状腺、乳腺、子宮、前立腺、卵巣ないし多臓器における発がん修飾作用を同一の投与条件で検討した結果、両物質ともにDHPN誘発ラット甲状腺発がんに対する影響は認められなかった。genisteinは

肉眼的に乳腺腫瘍の促進または抑制という相反する傾向を示しており、病理組織学的検索結果が待たれる。他の実験はまだ完了していないが、今のところgenisteinまたはnonylphenolによる他臓器の発がん過程に影響を及ぼしていない。

また、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。

## 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) Tanaka, T, Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Ushida, J., Honjo, S., Hara, A., Tsuda, H. and Mori, H. Modifying effects of a flavonoid morin on azoxymethane-induced large bowel tumorigenesis in rats. *Carcinogenesis*, 20(8): 1477-1484 (1999).
- 3) Kawabata, K., Tanaka, T, Honjo, S., Kakumoto, M., Hara, A., Makita, H., Tatematsu, N., Ushida, J., Tsuda, H. and Mori, H. Chemopreventive effect of dietary flavonoid morin on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Int. J. Cancer*, 83: 381-386 (1999).
- 4) Kensler, T. W., Tsuda, H. and Wogan, G.N. United States-Japan workshop on new rodent models for the analysis and prevention of carcinogenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8: 1033-1037 (1999).
- 5) Asamoto, M., Ochiya, T., Toriyama-Baba, H., Ota, T., Sekiya, T., Terada, M. and Tsuda, H. Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogenes are highly susceptible to N-Methyl-N-nitrosourea mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(2): 243-249 (2000).
- 6) Ota, T., Asamoto, M., Toriyama-Baba, H., Ochiya, T., Akaza, H., Sekiya, T., Terada, M. and Tsuda, H. Transgenic rats carrying



- copies of human c-Ha-ras proto-oncogene exhibit enhanced susceptibility to N-butyl-N(4-hydroxybutyl)nitrosamine bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis*, in press. (2000).
- 7) 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.
  - 8) 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 phenolphthalein. *Cancer Letters* in press.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) Hirose, M., Fukushima, S., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T. : Modifying effects of phytic acid and  $\gamma$ -oryzanol on the promotion stage of rat carcinogenesis. *Anticancer Res.* 19: 3665-3670, 1999.
  - 13) 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.
  - 14) Chen, T.-X., Wanibuchi, H., Murai, T., Kitano, M., Yamamoto, S., Fukushima, S.: Promotion by sodium L-ascorbate in rat two-stage urinary bladder carcinogenesis is dependent on the interval of administration., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 16-22, 1999.
  - 15) Yamamoto, S., Min, W., Lee, C.C.R., Salim, E.I., Wanibuchi, H., Sukata, T., Fukushima, S.: Enhancement of urinary bladder carcinogenesis in nullizygous *p53*-deficient mice by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine., *Caner Lett.*, 135, 137-144, 1999.
  - 16) Morimura, K., Salim, E.I., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Fukushima, S.: Dose-dependent induction of aberrant crypt foci in the colons but no neoplastic lesions in the livers of heterozygous *p53*-deficient mice treated with low dose 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline., *Cancer Lett.*, 138, 81-85, 1999.
  - 17) Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Loss of heterozygosity in (Lewis  $\times$  F344)F1 rat urinary bladder tumors induced with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine followed by dimethylarsinic acid or sodium L-ascorbate., *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 818-823, 1999.
  - 18) Lee, C.C.R., Ichihara, T., Yamamoto, S., Wanibuchi, H., Sugimura, K., Wada, S., Kishimoto, T., Fukushima, S.: Reduced expression of the CDK inhibitor *p27KIP1* in rat two-stage bladder carcinogenesis and its association with expression profiles of *p21WAF1/Cip1* and *p53*. *Carcinogenesis*, 20, 1697-1708, 1999.
  - 19) Chen, T., Wanibuchi, H., Wei, M., Morimura, K., Yamamoto, S., Hayashi, S., Fukushima, S : Concentration dependent



- promoting effects of sodium *L*-ascorbate with the same total dose in a rat two-stage urinary bladder carcinogenesis., *Cancer Lett.*, 146, 67-71, 1999.
- 20) Sukata, T., Ozaki, K., Uwagawa, S., Seki, T., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Okuno, Y., Fukushima, S.: Organ-specific, carcinogen-induced increases in cell proliferation in *p53*-deficient Mice., *Cancer Res.*, 60, 74-79, 2000.
  - 21) Yamamoto, S., Tada, M., Lee, C.C.R., Masuda, C., Wanibuchi, H., Yoshimura, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T., Fukushima, S.: *p53* status in multiple human urothelial cancers: assessment for clonality by the yeast *p53* functional assay in combination with *p53* immunohistochemistry., *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 181-189, 2000.
  - 22) Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito A Establishment of an estrogen responsive rat pituitary cell sub-line MtT/E-2. *Endocrine J.* 46, 389-396 (1999)
  - 23) Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K., Takahashi, M.: Inhibition of thyroid iodine uptake and organification in rats treated with kojic acid. *Toxicol. Sci.* 47. 170-175 (1999)
  - 24) Maruyama, S., Fujimoto, N., Ito A.: Growth stimulation of a rat pituitary cell line MtT/E-2 by environmental estrogens in vitro and in vivo. *Endocrine J.* 46, 531-538 (1999)
  - 25) Fujimoto, N., Onodera, H., Mitsumori, K., Tamura, T., Maruyama, Ito A.: Changes in thyroid function during development of thyroid hyperplasia induced by Kojic acid in F344 rats. *Carcinogenesis* 20, 1567-1571 (1999).
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. 2<sup>nd</sup> 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. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology. Philadelphia, 2000.
  - 5) 小野寺博志、三森国敏、高木久宜、安原加壽雄、糀谷高敏、田村啓、広瀬雅雄：*p53*ノックアウト(ヘド欠損) 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)
  - 6) 津田洋幸、ヒト正常型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットの発がん感受性の特質と遺伝子変異、第14回発癌病理研究会、軽井沢(1999年)
  - 7) 鳥山弘靖、山本扶美、内藤暁宏、落谷孝広、津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットの乳腺発がんにおける初期変化、第58回日本癌学会総会、広島(1999年)
  - 8) 内藤暁宏、鳥山一馬場弘靖、竹下文隆、朝元誠人、落谷孝広、津田洋幸、ヒトプロト型 *c-Ha-ras* トランスジェニックラットにおける自然発生腫瘍の頻度と *ras* 遺伝子の突然変異、第58回日本癌学会総会、広島(1999年)
  - 9) 榊田周佳、鰐淵英機、市原敏夫、須方督夫、福島昭治：ラット肝中期発癌試験法(伊東法)を用いた  $\alpha$ -benzene hexachloride ( $\alpha$ -BHC) の発癌修飾作用の検討。第15回日本毒性病理学会、1月28-29日、水戸、1999 (第15回日本毒性病理学会講演要旨集 P-39, p.47)
  - 10) 西川隆之、鰐淵英機、森村圭一朗、魏 民、榊田周佳、北野光昭、須方督夫、福島昭治：

ラット肝中期発癌試験（伊東法）を用いた dieldrin の発癌修飾作用．第 58 回日本癌学会総会，9 月 28-10 月 1 日，広島，1999（日本癌学会総会記事 1263, p.424）

- 11) 藤本成明,丸山聡,伊藤明弘：内分泌かく乱物質によるラット下垂体腫瘍細胞株 MtT/E-2 の増殖.第 72 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 123, 1999) .
- 12) 藤本成明：下垂体.シンポジウム I「内分泌臓器の毒性変化と内分泌攪乱化学物質」第 16 回日本毒性病理学会, 岐阜, 2000. (講演要旨集, 7, 2000) .
- 13) 丸山聡,藤本成明,碓井亞,伊藤明弘：内分泌かく乱物質によるエストロゲン応答性転写活性化－ERE 応答と AP-1 応答の比較検討.第 72 回日本内分泌学会学術総会, 横浜, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 198, 1999) .
- 14) 丸山聡,藤本成明,伊藤明弘,浅野耕助,碓井亞：ヒト前立腺癌におけるエストロゲン受容体  $\alpha$ . $\beta$ mRNA の発現.第 58 回日本癌学会総会, 広島, 1999. (日本癌学会総会記事, 58, 665, 1999) .
- 15) 丸山聡,藤本成明,浅野耕助,碓井亞,伊藤明弘：内分泌攪乱物質による AP-1 を介するエストロゲン応答性転写活性化. 第 7 回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会, 東京, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 367, 1999) .
- 16) 浅野耕助,藤本成明,丸山聡,碓井亞,伊藤明弘：ラット下垂体のエストロゲン受容体調節における 2 種のプロモーターの関与について. 第 7 回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会, 東京, 1999. (日本内分泌学会雑誌, 75, 367, 1999) .
- 17) 浅野耕助,藤本成明,丸山聡,碓井亞,伊藤明弘：ラット下垂体のエストロゲン受容体調節における 2 種のプロモーターの関与について. ホルモントランスミッター研究会, 広島, 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