

食品中の内分泌攪乱物質等の主要臓器に対する発がん修飾作用に関する研究

分担研究者 鰐淵 英機 大阪市立大学医学部講師

研究要旨：ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、ノニルフェノールおよびゲニステインの発がん修飾作用を検討した。ノニルフェノールおよびゲニステインはラットの体重には影響を及ぼさなかったが、ノニルフェノールにより肛門挙筋球海綿体の重量が影響を受け、有意に減少した。現在実験継続中である。

#### A. 研究目的

食品中の内分泌攪乱物質の主要な臓器における発がん修飾作用をラット多臓器中期発がん性試験法を用いて検討する。発がんリスクに対する評価は一臓器に対するのみでは不十分で、主要な臓器に対して同時に評価する必要がある。ラット多臓器中期発がん性試験法を用いると多種類の発がん物質によるイニシエーションの後、被検物質を投与することにより主要臓器に対する発癌修飾作用を検討でき、発がんリスク評価として有用である。ノニルフェノールは内分泌攪乱化学物質であるとの疑いもたれている。また、ゲニステインは大豆などに多く含まれ、植物由来の内分泌攪乱化学物質である。そこで、ラット多臓器中期発がん性試験法を用いて、これらを経口投与し、主要臓器における発がん修飾作用を検討

する。

#### B. 研究方法

6週齢の F344Du/ Crj 系雄ラット 124 匹を 8 群に分け、第 1～第 5 群（各群 20 匹ずつ）に実験開始日に diethylnitrosamine を体重 1kg 当たり 100mg 腹腔内投与、N-methylnitrosourea を第 2、第 5、第 8、第 11 日にそれぞれ体重 1kg 当たり 20mg 腹腔内投与、dimethylhydrazine を第 14、第 17、第 20、第 23 日にそれぞれ体重 1kg 当たり 40mg 腹腔内投与、それらと平行して第 1～第 2 週に N-butyl-(4-hydroxybutyl)nitrosamine を 0.05% の濃度で飲料水投与、第 3～第 4 週に 2,2-hydroxy-di-n-propylnitrosamine を 0.1% の濃度で飲料水投与しイニシエーション処置と

した。実験開始後5週目から内分泌攪乱物質のノニルフェノールを第1群と第2群にそれぞれ29週間250ppm、25ppmで混餌投与、同様に第3群と第4群にはゲニステインをそれぞれ29週間250ppm、25ppmで混餌投与した。第5群には同様のイニシエーション処置後、通常の粉末飼料を与えた。また併置対照群として第6～第7群(各群8匹ずつ)にはイニシエーション処置を行わず、5週目からそれぞれ、ノニルフェノールを250ppm、ゲニステインを250ppmで混餌投与した。第8群(8匹)は無処置群とした。実験開始後33週間後に全生存例をエーテル麻酔下で脱血致死させ、主要臓器を摘出し病理組織学的に検索した。

### C. 研究結果

第2群の一例が発癌物質の腹腔内投与中に動脈の穿刺により死亡した。

同群の1例で実験開始後17週目から血便が出現、さらにもう1例で22週目から歩行困難と羸瘦が出現したため、それぞれ実験開始後25週、22週で切迫屠殺した。その結果それぞれ直腸と頭蓋底に腫瘍を認めた。第5群の1例が30週目に頬部の腫瘍で死亡した。第3群の1例が32週で死亡、血性胸水約20mlと左腎に腫瘍を認めた。第6群の1例が9週目に死亡したが原因は不明であった。

全生存例において体重推移はイニシエーション群間、非イニシエーション群間において有意差は認められなかった(Fig.2)。食餌摂取量、飲水量では非イニシエーション群がイニシエーション群に比べて増加する傾向が見られた(Fig.3、Fig.4)。臓器重量では肝、腎、精巣でイニシエーション群間で有意差は認められなかった(Table 1)。アンドロゲンの影響を受けると言われている肛門挙筋球海綿体の重量において第1群、第2群が第5群に比べて有意に減少していた。イニシエーション群において肝、腎、膀胱に腫瘍を認めたが発生頻度に有意差は認められなかった(Table 2)。また第1群と第3群において精巣腫瘍が1例ずつ、第4群で脾臓に腫瘍が認められた。現在、他臓器を含め組織学的に検索中である。

### D. 考察

現在、病理組織学的に検索中であり、最終的な結果はまだ出されていないが、少なくとも体重に関して、ゲニステイン、ノニルフェノール群ともに影響を及ぼさなかった。しかし、ノニルフェノール群で肛門挙筋球海綿体の重量が影響を受け、有意に減少した。このことは、投与されたノニルフェノールがラットの内分泌の影響を受ける臓器に充分作用する量であったことを示している。

また、内分泌攪乱化学物質のヒト発

がんおよびその影響を明かにすることは極めて重要で、本研究においてノニルフェノールおよびゲニステインの作用を明かにすることにより、内分泌攪乱物質のヒトへのリスクアセスメントに対する科学的な情報の一端を与えることができよう。

#### E. 結論

ラット多臓器中期発がん性試験法をもちいて、ノニルフェノール、ゲニステインの発がん修飾作用を検討した。現在、実験継続中である。

#### F. 研究発表

##### (論文発表)

1. Fukushima, S., Wanibuchi, H., Yamamoto, S.: Urinary bladder cancer. In: Carcinogenicity. (eds.) Kitchin, K.T., Marcel Dekker, Inc., pp.627-652, 1999.

2. 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.

3. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Lee, C.C.R., Nakajima, K., Yano, Y., Taniyama, T., Otani, S., Shimizu, Y.,

Fukushima, S.: Lack of inhibitory effects of the Ju-myio protein on development of glutathione S-transferase placental form-positive foci in the male F344 rat liver., J. Toxicol. Sci., 24, 27-31, 1999.

4. Romanenko, A., Lee, C.C.R., Yamamoto, S., Hori, T., Wanibuchi, H., Zamarin, W., Vinnichenko, W., Vozianov, A., Fukushima, S.: Urinary bladder lesions after the chernobyl accident: immunohistochemical assessment of p53, proliferating cell nuclear antigen, cyclin D1 and p21<sup>WAF1/Cip1</sup>., Jpn. J. Cancer Res., 90, 144-153, 1999.

5. 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., Cancer Lett., 135, 137-144, 1999.

6. Morimura, K., Yamamoto, S., Murai, T., Mori, S., Chen, T., Wanibuchi, H., Fukushima, S.: LOH and mutational analysis of p53 alleles in mouse urinary bladder carcinomas induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine.,

- Carcinogenesis, 20, 715-718, 1999.
7. 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.
  8. Youssef, E.M., Wanibuchi, H., Mori, S., Salim, E.I., Hayashi, S., Fukushima, S.: Elevation of urinary enzyme levels in rat bladder carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 20, 1247-1252, 1999.
  9. Ichihara, T., Wanibuchi, H., Taniyama, T., Okai, Y., Yano, Y., Otani, S., Imaoka, S., Funae, Y., Fukushima, S.: Inhibition of liver glutathione *S*-transferase placental form-positive foci development in the rat hepatocarcinogenesis by *Porphyra tenera* (Asakusa-nori)., *Cancer Lett.*, 141, 211-218, 1999.
  10. Yamamoto, S., Romanenko, A., Wei, M., Masuda, C., Zamarin, W., Vinnichenko, W., Voizianov, A., Lee, C.C.R., Morimura, K., Wanibuchi, H., Tada, M., Fukushima, S.: Specific *p53* gene mutations in urinary bladder epithelium after the Chernobyl accident., *Cancer Res.*, 59, 3606-3609, 1999.
  11. Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Loss of heterozygosity in (Lewis × F344)F<sub>1</sub> 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.
  12. 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.
  13. Wei, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Li, W., Fukushima, S.: Urinary bladder carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats., *Carcinogenesis*, 20, 1873-1876, 1999.
  14. Lee, C.C.R., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Hirose, M., Hayashi,

- Y., Fukushima, S. : Case Report; Molecular cytogenetic identification of *cyclin D1* gene amplification in a renal pelvic tumor attributed to phenacetin abuse., *Pathology International*, 49, 648- 652, 1999.
15. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Morimura, K., Mori, S., Makino, S., Nomura, T., Fukushima, S.: Low-dose-dependent carcinogenic potential of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in the immunodeficient (SCID) mouse colon., *Nutrition and Cancer*, 34, 220-228, 1999.
16. 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.
17. Chen, T., Na, Y., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Lee, C.C.R., Fukushima, S.: Differences of promoting activity and loss of heterozygosity between dimethylarsinic acid and sodium L-ascorbate in F1 rat urinary bladder carcinogenesis. In: *Arsenic exposure and health effects.* (eds.) Chappell, W.R., Abernathy, C.O., Calderon, R.L., pp.263-266, 1999.
18. 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.
19. 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.
20. Taniyama, T., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yano, Y., Otani, S., Nishizawa, Y., Morii, H., Fukushima, S.: Chemopreventive effect of 24R,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in *N,N'*-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 21, 173-178, 2000.
21. Salim, E.I., Wanibuchi, H., Morimura, K., Kim, S., Yano, Y.,

Yamamoto, S., Fukushima, S.:  
Inhibitory effects of 1,3-  
diaminopropane, an ornithine  
decarboxylase inhibitor, on rat  
two-stage urinary bladder  
carcinogenesis initiated by *N*-  
butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)  
nitrosamine., *Carcinogenesis*, 21,  
195-203, 2000.

(学会発表)

1. 榊田周佳、鰐渕英機、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  
性病理解学会, 1 月 28-29 日, 水戸, 1999  
(第 15 回日本毒性病理解学会講演要旨  
集 P-39, p.47)

2. 西川隆之、鰐渕英機、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)

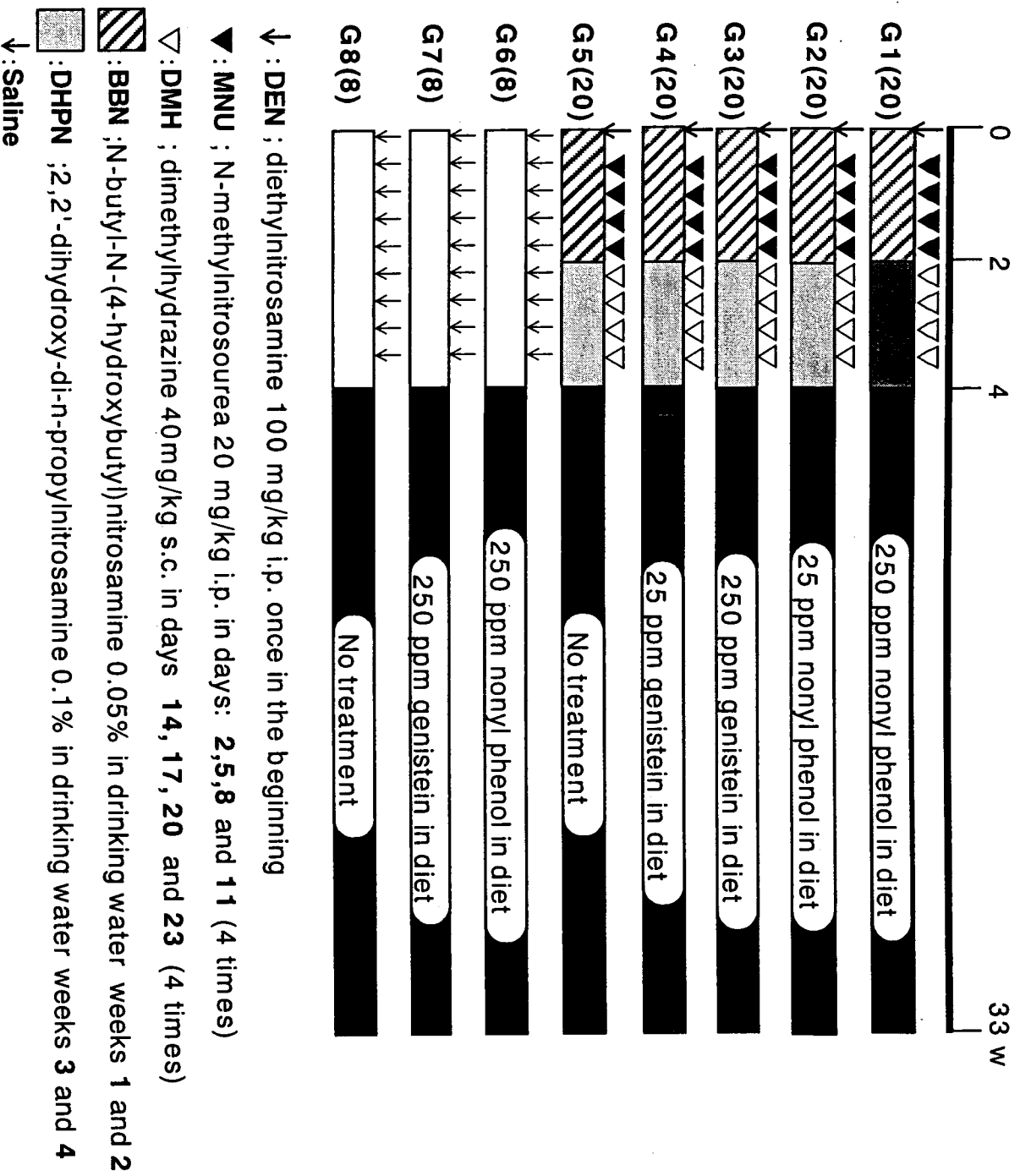


Fig. 1 実験デザイン

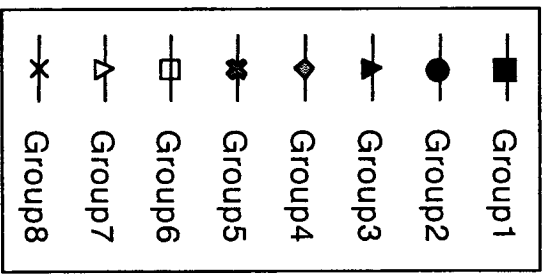
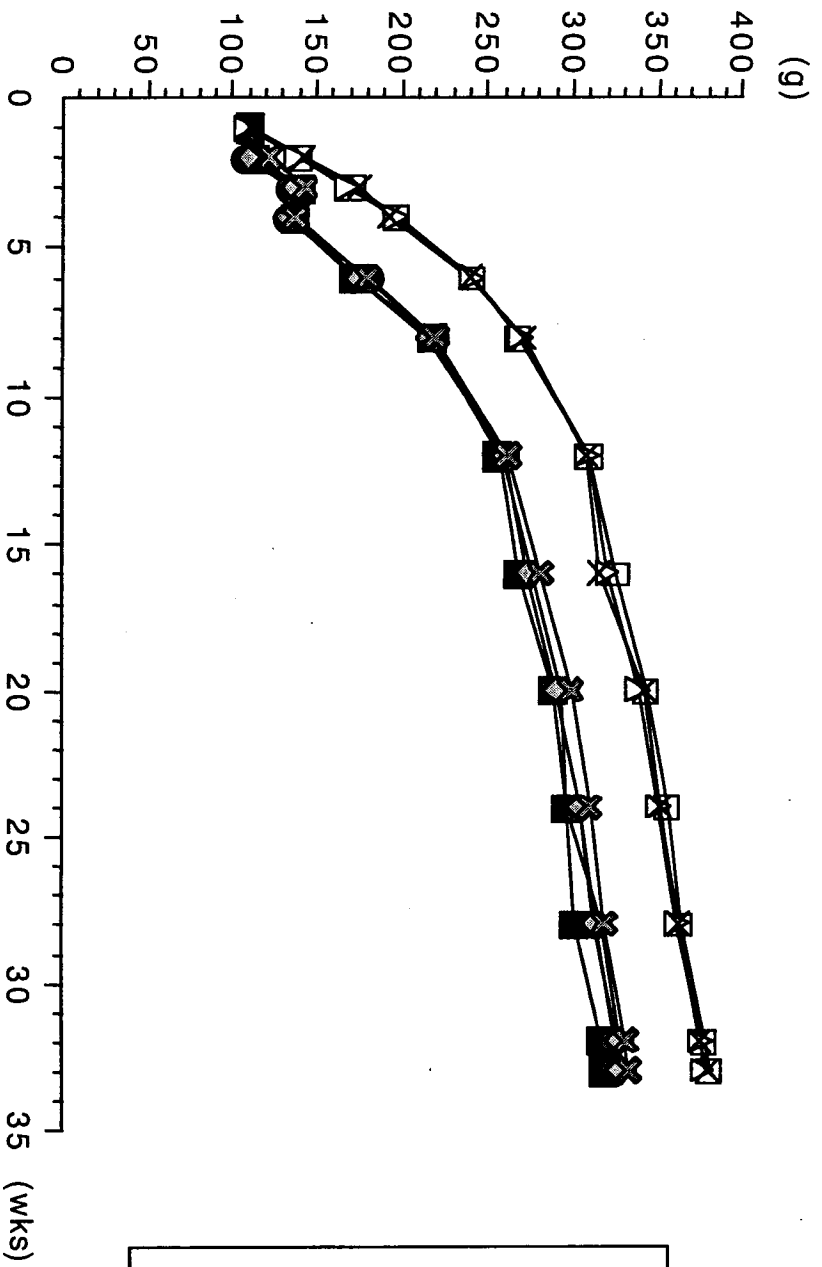


Fig. 2 Growth curves



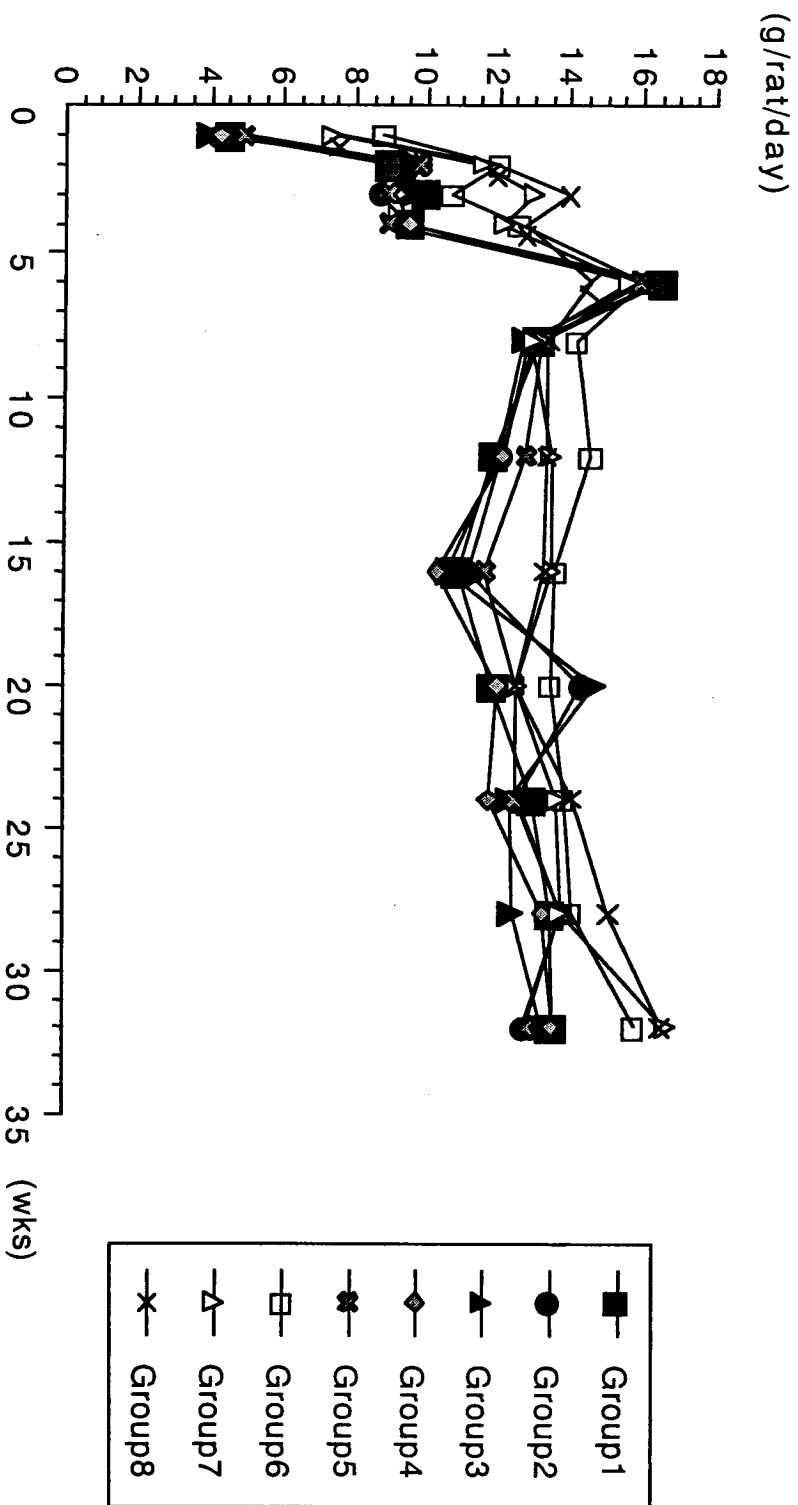


Fig.3 Food consumption curves

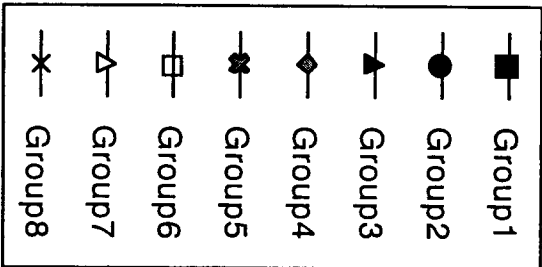
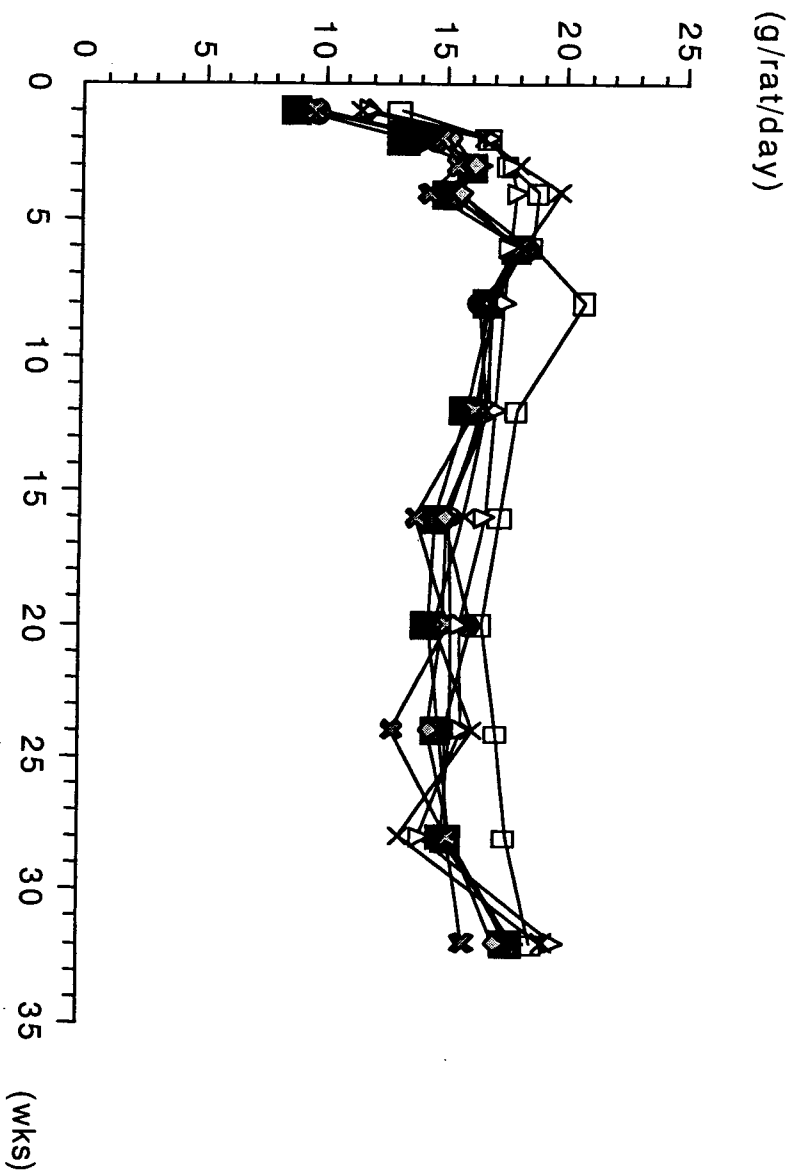


Fig.4 Water consumption curves

Table.1 Final Body Weight and Organ Weight

Group	Treatment		Effective No. of Animal	Final Body Weight (g)	Organ Weight (g)	
	DMBDD	Food			Liver	Muscles Levator Ani
1	+	Nonylphenol 250ppm	20	320.1 ± 18.1	9.04 ± 0.93	
2	+	Nonylphenol 25ppm	17	326.0 ± 34.3	8.97 ± 1.39	
3	+	Genistein 250ppm	19	329.8 ± 16.1	8.72 ± 0.79	
4	+	Genistein 25ppm	20	327.6 ± 16.1	9.08 ± 0.96	
5	+	Control diet	19	333.6 ± 23.8	9.17 ± 1.29	
6	-	Nonylphenol 250ppm	7	382.4 ± 16.5	10.76 ± 1.13	
7	-	Genistein 250ppm	8	377.2 ± 25.5	9.44 ± 1.18	
8	-	Control diet	8	380.4 ± 16.9	9.30 ± 1.41	

Group	Treatment		Kidney	Organ Weight (g)	
	DMBDD	Food		Testis	Muscles Levator Ani
1	+	Nonylphenol 250ppm	2.06 ± 0.34	2.38 ± 0.48	0.74 ± 0.07
2	+	Nonylphenol 25ppm	2.03 ± 0.25	2.63 ± 0.39	0.75 ± 0.12
3	+	Genistein 250ppm	2.05 ± 0.23	2.64 ± 0.29	0.79 ± 0.04
4	+	Genistein 25ppm	2.07 ± 0.57	2.73 ± 0.27	0.81 ± 0.05
5	+	Control diet	2.08 ± 0.32	2.48 ± 0.45	0.81 ± 0.06
6	-	Nonylphenol 250ppm	2.06 ± 0.20	3.26 ± 0.13	0.92 ± 0.06
7	-	Genistein 250ppm	2.00 ± 0.14	3.18 ± 0.31	0.94 ± 0.08
8	-	Control diet	2.03 ± 0.11	3.28 ± 0.14	0.93 ± 0.07

Table 2 Incidences of Mass Lesions

Group No.	Treatment		Effective No. of Animal	Lesions(%)			
	DMBDD	Food		Liver	Kidney	Bladder	
1	+	Nonylphenol 250ppm	20	1 (5.0)	9 (45.0)	9 (45.0)	
2	+	Nonylphenol 25ppm	17	2 (11.8)	11 (64.7)	9 (52.9)	
3	+	Genistein 250ppm	19	0 (0)	8 (42.1)	9 (47.4)	
4	+	Genistein 25ppm	20	2 (10.0)	8 (40.0)	11 (55.0)	
5	+	Control diet	19	0 (0)	10 (52.6)	8 (42.1)	
6	-	Nonylphenol 250ppm	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
7	-	Genistein 250ppm	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
8	-	Control diet	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	