

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 農工大家畜病理学教室 教授

研究要旨：p53 遺伝子片側アレルをノックアウトした雌 CBA マウス[雌 p53 (+/-)CBA マウス]に ENU 120mg/kg を一回腹腔内投与し、1 週後からゲニステイン(25 および 250ppm)、ノニルフェノール(25 および 250ppm)、アトラジン(400ppm)を 26 週間混餌投与した。その結果、ゲニステイン、ノニルフェノールやアトラジンの投与群では ENU 単独群に比べ、子宮内膜肉腫の発生頻度に有意な差は認められなかった。また、我々は、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を導入したマウス(rasH2 マウス)に ENU を投与することにより肺腫瘍や子宮内膜異型過形成・癌の発生が増強することを見出したことから、この rasH2 マウスに ENU を投与し、一週間後よりゲニステイン(25 および 250ppm)、ノニルフェノール(25 および 250ppm)、メキシクロール(1000ppm)を 23~26 週間混餌投与した。その結果、ゲニステインの 250ppm 投与群で子宮腺癌が増加する傾向が認められ、メキシクロール投与群ではその子宮癌の発生は抑制された。現在、雌 ICR マウスに ENU(50mg/kg)を経膈的に直接子宮内に投与し、その後、アトラジン(5、50 および 500ppm)とエチニールエストラジオール(2.5ppm)を混餌投与し、子宮腫瘍に対する修飾作用を検討する実験を継続中である。

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出した。さらに、このモデルを用いて強いエストロゲン作用を有する ethinylestradiol(EE) と有機塩素系農薬の methoxychlor(MXC)の子宮腫瘍修飾作用を検討したところ、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、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報告した。さらに、同様の実験として、1%ビスフェノールAや20%大豆(きなこ)の子宮腫瘍修飾作用を検討したところ、これらの物質では子宮腫瘍に対する修飾作用は確認できなかった。本年度はこの ENU でイニシエーション処置した p53(+/-)CBA マウスモデルを用いてゲニステイン、ノニルフェノールそしてアトラジンの子宮腫瘍に対する影響を検討した。一方、供給者の都合により p53(+/-)CBA マウスの入手が不可能になった。このため、新たな子宮発がんモデルの確立も検討し、我々は、ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子を

導入したマウス(rasH2 マウス)に ENU を投与することにより肺腫瘍や子宮内膜異型過形成・癌の発生することを見出した。このような経緯から、rasH2 マウスに ENU を投与後、ゲニステイン、ノニルフェノールおよびメキシクロールを混餌投与し、誘発される子宮腫瘍に対するこれらの物質の修飾作用の検討も行なった。さらに、雌 ICR マウスの膈内に ENU(50mg/kg)を直接注入し、イニシエーション処置とした後、アトラジンと ethinylestradiol(EE)を混餌投与して子宮腫瘍に対するこれらの物質の修飾作用の有無を検索実験も開始した。

B.研究方法

実験 1-3: 実験1では、雌 p53 (+/-)CBA マウス[雌 p53 (+/-)CBA マウス:オリエンタル酵母]に生理食塩水に溶解した ENU (ナカライテスク) 120mg/kg を一回腹腔内投与し、その一週後から第1群に 25ppm ゲニステインを、第2群には 250ppm ゲニステインを基礎飼料(CRF-1)に混じてこれらを 26 週間にわたり投与した。実験2では、同様のプロトコルで、第1群に 25ppm ノニルフェノール含有飼料を、第2群には 250ppm ノニルフェノール含有飼料を、対照群には基礎飼料を ENU 投与1週間後より26週間自由に与えた。実験3では、同様のプロトコルで、400ないし 0ppm のアトラジンを ENU 投与1週間後よ

り基礎飼料に混じ、26週間自由に与えた。

実験4:雌 rasH2 マウス(実験動物中央研究所)に生理食塩水に溶解した ENU120mg/kg を一回腹腔内投与し、イニシエーション処置とした。その一週間後からゲニステインは25 および250ppm、ノニルフェノールは25 および250ppm、メキシクロールは1000ppmの濃度で基礎飼料(CRF-1 粉末)に混じ、23~26週間自由に与えた。

実験5:6週齢雌 ICR マウス(SLC)に生理食塩水で溶解した ENU50mg/kg を一回腹腔内に投与し、イニシエーション処置とした。その1週間後よりアトラジン5、50 および500ppmの濃度で粉末基礎飼料に混じて26週間投与した。また、陽性対照として ethinylestradiol(EE)の2.5ppmの投与群も設け、現在実験が進行中である。

C.研究結果

実験1:実験終了時の生存率は1群で50%、2群で86%、対照群では62%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重量は対照群に比し1、2群で有意の差は認められず、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群で71%、2群で33%と対照群の60%に比し2群で減少する傾向が認められた(表1)。

実験2:実験終了時の生存率は1群で80%、2群で70%、対照群で60%であった。ノニルフェノール投与群で最終体重の軽度な増加抑制傾向が認められたが、有意な差はなかった。子宮内膜肉腫の発生率は1群で63%、2群で71%と対照群の67%に比し有意差は認められなかった(表1)。

実験3:アトラジンを投与した群では最終生存率が56%と減少したが、体重増加抑制は認められなかった。子宮内膜肉腫の発生率は対照群の60%に比し33%と減少する傾向を示した(表1)。

実験4:最終生存率および最終体重においては群間に有意な差はみられなかった。子宮内膜腺癌の発生率は対照群で22.2%であったが、ゲニステイン250ppm投与群では57.1%と高率であった。しかし、メキシクロール投与群ではその発生は認められず、異型過形成も発生しなかった(表2)。

実験5:投与実験を継続している。

D.考察

p53(+/-)CBA マウスに ENU 120mg/kg を一回腹腔内投与し、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した実験では、ENU+EE 群では内膜肉腫が87%に誘発された。一方、ENU+MXC 群では内膜肉腫は ENU 単独群と同頻度であり、強いエストロゲン作用を有する EE で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 はそれらの増殖性病変に対して増強作用を示さないことを我々は既に報告した。今回の実験成績においてもゲニステイン、ノニルフェノール、アトラジンは ENU 誘発子宮腫瘍になら修飾作用を示さなかったことから、弱いエストロゲンあるいは抗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。

rasH2 マウスでは、ENU の単回腹腔内投与により、雄では肺と前胃腫瘍が高率に誘発され、雌ではこれらの腫瘍の他に、脾血管肉腫と子宮内膜異型過形成および内膜腺癌が誘発されることを我々は既に経験している。今回、この実験モデルを用いてゲニステイン、ノニルフェノールおよびメキシクロールを投与したところ、ゲニステインでは用量に相関して子宮内膜腺癌の発生が増加する傾向を示した。このゲニステインによる子宮内膜腺癌の増加傾向については、今後、誘発された子宮腫瘍の細胞増殖活性などを精査して本物質に真実の子宮癌促進作用があるか否かを確認すべきである。ノニルフェノールでは、対照群に比べ、やや高率に発生したものの用量相関性は認められなかったため、この物質には子宮癌を促進する作用はないものと推察される。一方、メキシクロールではその発生が抑制された。これは、肺腺癌の発生も対照群に比べ低かったことから、ENU によるイニシエーション作用がこの群においては強くなかった可能性が考えられ、更なる検討が必要である。

平成13年度では、ICRマウスを用いて、アトラジンやEEについての子宮発癌促進作用の有無を検索

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 ヘテロ欠損 CBA マウスに ENU でイニシエーション処置した子宮発癌モデルを用いて、ゲニステイン、ノニルフェノールとアトラジンについて子宮発癌修飾作用を検索したが、これらには子宮発癌修飾作用は認められなかった。

rasH2 マウスに p53 ヘテロ欠損 CBA マウスと同様の処置を施したところ、ゲニステイン投与で子宮内膜腺癌が用量に相関して増強する傾向がみられた。

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.: Rapid induction of Uterine tumors with p53 point mutations in heterozygous p53-deficient CBA mice given a single

intraperitoneal administration of N-ethyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis* 21: 1039-1042. 2000.

Mitsumori, K., Shimo, T., Onodera, H., Takagi, H., Yasuhara, K., Tamura, T., Aoki, Y., Nagata, O. and Hirose M.: Modifying effects of ethinylestradiol but not methoxychlor on N-ethyl-N-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous p53 deficient CBA mice. *Toxicol. Sci.* 58: 43-49. 2000.

Ueda, M., Mitsumori, K., Onodera, H., Takagi, H., Yasuhara, K., Takizawa, T. and Hirose, M.: Lack of modifying effects of bisphenol A and roasted/ground soybean (Kinako) on N-ethyl-N-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous p53 deficient CBA mice. *J. Toxicol. Pathol.* in press.

2. 学会発表

上田誠 三森国敏 小野寺博志 高木久宜 安原加壽雄 瀧澤保 広瀬雅雄: ENU誘発子宮癌 rasH2 マウスモデルにおける nonylphenol および ethinylestradiol 投与の影響、第 17 回日本毒性病理学会総会 (2001.1 淡路島)