

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)  
平成 12 年度分担研究報告書

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: エストロゲン活性による甲状腺発がん促進作用の用量相関性を検討するため、去勢ラットを用いた二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、動物当たり 0.1 mg、0.02 mg および 0.004 mg の合成エストロゲン *-estadiol 3-benzoate* を皮下埋植した結果、雌雄ともに 0.1 mg 群のみに有意な甲状腺重量の増加がみられた。このことは、極めて高濃度のエストロゲン曝露下においてのみ甲状腺発がんが促進されることを示唆する。一方、昨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、環境濃度レベルでは甲状腺発がん修飾作用のないことを報告したが、今年度は *atrazine* を被験物質として、ラット二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、500 ppm、50 ppm および 5 ppm の3段階の用量で混餌投与した結果、現在までのところ、肉眼的に顕著な影響はみられていない。この成績は、大豆イソフラボン、*genistein* および *nonylphenol* と同様に、食品中に存在する濃度レベルの *atrazine* は甲状腺発がんを促進しないことを示唆する。また、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、二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、大豆摂取とヨード欠乏を組み合わせるとした結果、大豆摂取はヨード欠乏と相乗的に作用して強く甲状腺発がんを促進した。この成績から、その発がん機序の少なくとも一部はプロモーション作用として説明できることが明らかとなった。

#### 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。ヒトが日常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いる。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期待できる。

そこで、平成 11 年度では、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、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二段階発がんモデルを用いて検討した結果、両物質ともに食品中に存在する程度の低濃度では甲状腺発がんの促進作用を示さないことが明らかとなった。また、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ア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。

平成 12 年度は、去勢ラットを用いた二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、-estadiol 3-benzoate (EB)を皮下埋植し、エストロゲンによる甲状腺発がん促進作用の用量反応性について検討した。また、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、食品中の内分泌かく乱作用を有する汚染物質 atrazine を取り上げ、甲状腺発がんおよび修飾作用について、ラット二段階発がんモデルを用いて検討した。さらに、大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの作用機序を追究するため、二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、大豆摂取とヨード欠乏を組み合わせ与え、促進効果の有無について検討した。

## B. 研究方法

### <I. 去勢ラット甲状腺発がんおよび合成エストロゲンの影響>

実験1: Fig. 1 に示すように、5週齢時に卵巣摘除を施した6週齢のF344雌ラット60匹を6群に分け、第1群～第4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2400 mg/kgの用量で単回皮下投与し、1週間後からEBを0.1 mg(第1群)、0.02 mg(第2群)、0.004 mg(第3群)および0 mg(第4群)の用量で皮下埋植した。DHPN処置をせずに、第5群には0.1 mgのEBを皮下埋植し、第6群は無処置対照群とした。実験開始36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: Fig. 2 に示すように、5週齢時に精巣摘除した6週齢のF344雄ラット60匹を6群に分け、第1群～第4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し、1週間後からEBを0.1 mg(第1群)、0.02 mg(第2群)、0.004 mg(第3群)および0 mg(第4群)の用量で皮下埋植した。DHPN処置をせずに、第5群には0.1 mgのEBを皮下埋植し、第6群は無処置対照群とした。実験開始36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。

### <II. ラット甲状腺発がんおよび atrazine の影響>

実験3: Fig. 3 に示すように、6週齢のF344雄ラット120匹を8群に分け、第1群～第4群(各群20匹)および第5群～第6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2800

mg/kgの用量で単回皮下投与し、1週間後から500 ppm(第1群)、50 ppm(第2群)、5 ppm(第3群)および0 ppm(第4群)の用量の atrazine、500 ppmの atrazineと5 ppmの tamoxifen(第5群)または5 ppmの tamoxifen(第6群)を混餌投与した。DHPN処置をしなかった第7群には500 ppmの atrazineのみを混餌投与し、第8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。実験開始24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。

### <III. ラット甲状腺発がんおよび大豆摂取とヨード欠乏の相互作用>

実験4: Fig. 4 に示すように、雌雄の6週齢F344ラット各40匹を4群に分け、DHPNを2800 mg/kgの用量で単回皮下投与した。1週間後から、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11週間与えた。第3群には蛋白成分を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12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5: Fig. 5 に示すように、雌雄の6週齢F344ラット各40匹を4群に分け、DHPNを2800 mg/kgの用量で単回皮下投与した。1週間後から、脱脂大豆を20%(第1群)、4%(第2群)、0.8%(第3群)および0%(第4群)の用量で11週間混餌した。基本食として、蛋白成分をグルテンとしたAIN-93Gを用いた。実験開始12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。

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. 去勢ラット甲状腺発がんおよび合成エストロゲンの影響>

実験1: 摂餌量はEB処置でやや増加したが、各群間に顕著な差異はなく、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 処置の有無に関わらず EB 処置によって有意に( $p<0.01$ )抑制された(Fig. 6)。下垂体相対重量は DHPN 処置に関わらず EB 処置によって高度に( $p<0.01$ )増加した(Fig. 7)。Fig. 8 に示すように、甲状腺相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に増加し、0.1 mg 投与群では DHPN 単独群に比し有意に( $p<0.01$ )増加した。肝相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に有意に( $p<0.01$ )増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に( $p<0.01$ )増加した。腎相対重量も同様に、DHPN 処置群において、EB の用量相関性に有意に( $p<0.01$ )増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に( $p<0.01$ )増加した。子宮相対重量も全く同様に、DHPN 処置群において、EB の用量相関性に高度に( $p<0.01$ )増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により高度に( $p<0.01$ )増加した。現在、病理組織学的に検索中である。

実験2： 摂餌量は EB 処置でやや増加したが、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 処置の有無に関わらず、0.1 mg および 0.02 mg の EB 処置によって有意に( $p<0.01$ )抑制された(Fig. 9)。下垂体相対重量は DHPN 処置に関わらず、EB 処置によって高度に( $p<0.01$ )増加した(Fig. 10)。Fig. 11 に示すように、甲状腺相対重量は DHPN 処置群において、0.1 mg の EB 投与で有意に( $p<0.01$ )増加した。肝相対重量は DHPN 処置群において、EB の用量相関性に有意に( $p<0.01$ )増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に( $p<0.01$ )増加した。腎相対重量も同様に、DHPN 処置群において、EB の用量相関性に 0.02 mg 以上で有意に( $p<0.01$ )増加し、DHPN 非処置群においても、0.1 mg 投与により有意に( $p<0.01$ )増加した。現在、病理組織学的に検索中である。

## < II. ラット甲状腺発がんおよび atrazine の影響 >

実験3： 摂餌量は tamoxifen を投与した第5群および第6群において顕著に減少した(Fig. 12)。それに伴い、第5群および第6群に強い体重増加抑制がみられ( $p<0.01$ )、atrazine の 500 ppm 投与(第1群)でも軽度であるが有意な( $p<0.01$ )体重増加抑制が認められた(Fig. 13)。体重増加抑制の程度は、第5群(tamoxifen + atrazine 投与群)で最も高度であった。Table 1 に示すように、相対臓器重量は

tamoxifen を投与した第5群および第6群で、有意な脳重量、腎重量および精巣重量の増加がみられ、第5群では精巣上体重量の増加が認められた。その他臓器の相対重量には有意な群間差を認めなかった。現在、病理組織学的に検索中である。

## < III. ラット甲状腺発がんおよび大豆摂取とヨード欠乏の相互作用 >

実験4： 雌雄ともに、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)で有意に( $p<0.001$ )増加し、第4群(25%大豆 + ヨード欠乏群)では第2群に比較してさらに強く増加した(Fig. 14)。雌雄ともに、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( $p<0.01$ )減少し、逆に血清 TSH レベルは第1群に比して第2群および第4群で有意に( $p<0.05$  および  $p<0.01$ )増加し、特に第4群では高度に増加した(Figs. 15 & 16)。病理組織学的に、甲状腺濾胞上皮の腫瘍性病変は、第2群および第4群においてのみ認められ、腺腫は雄の第2群および第4群でそれぞれ 62.5%および 100%、雌の第2群および第4群で 14.3%および 90%、腺癌は雄の第2群および第4群でそれぞれ 25%および 66.7%、雌の第4群で 40%に観察された(Table 2)。

実験5： 雌雄ともに、甲状腺相対重量には第1群~第4群において有意な群間差はみられなかった(Fig. 17)。同様に、血清 T4 および TSH レベルについても、雌雄ともに、有意な群間差はみられなかった(Figs. 18 & 19)。病理組織学的に、20%~0.8%の大豆投与は、ヨード正常下では甲状腺組織の顕著な増殖促進を示さなかった。

## D. 考察

エストロゲン活性による甲状腺発がん促進の用量相関性を検討するため、雌雄の去勢ラットを用いた二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、動物当たり 0.1 mg、0.02 mg および 0.004 mg の合成エストロゲン EB を皮下埋植した結果、雌雄ともに最高用量の 0.1 mg 群のみに有意な甲状腺重量の増加がみられた。このことは、極めて高濃度のエストロゲン曝露下においてのみ甲状腺発がんが促進されることを示し、食品中に存在する程度の低い濃度の内分泌かく乱化学物質がエストロゲン活性によって甲状腺発がん促進作用を惹起する可能性は低いことを示唆する。観察期間を 12 週間とした昨年度の実験では、卵巣摘除ラットにおいて、合成エストロゲン EB は 0.5 mg の用量で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、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、観察期間を 36 週間とした今回の成績と考え合わせると、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く、長期間にわたる持続的な曝露を要するものと考えられる。

農薬として使用される atrazine はラットの乳腺発がんを促進する可能性が指摘されているが、抗エストロゲン作用をもち、標的細胞に対するエストロゲン刺激活性を抑制することが知られている。、今年度は atrazine を被験物質として、DHPN 誘発ラット二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、500 ppm、50 ppm および 5 ppm の3段階の用量で混餌投与したが、現在までのところ甲状腺発がんに対する顕著な影響はみられていない。このことは、昨年度に同一の実験モデルを用いて実施した大豆イソフラボン、genistein および nonylphenol と同様に、食品中に存在する濃度レベルの atrazine は甲状腺発がんを促進しないことを示唆する。現在実施している病理組織学的検索の結果により確定する予定である。

一方、昨年度の実験成績において、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甲状腺濾胞上皮の増殖を誘発することが確認された。その作用機序を追究するため、二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、大豆摂取とヨード欠乏を組み合わせるとした結果、大豆摂取はヨード欠乏と相乗的に作用して強く甲状腺発がんを促進することが明らかとなった。このことは、大豆摂取とヨード欠乏によるラット甲状腺発がんの一部は発がんプロモーションとして理解できることを示している。ヨードが欠乏していない条件では、二段階甲状腺発がんモデルにおいて、ポストイニシエーション期の大豆摂取は発がんに影響しないことから、大豆による甲状腺発がん促進作用にはヨード欠乏が必須であることを示唆する。ヨード欠乏の条件下で大豆の摂取が甲状腺発がんを促進した事実は、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、昨年度の成績では 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ており、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。しかし、大豆の過剰摂取がヨード欠乏と特異的に相乗作用を示す機序については今後さらに追究する必要がある。

## E. 結論

エストロゲン活性による甲状腺発がん促進作用はあまり強いものではなく、長期間にわたる高濃度曝露を要するものと考えられた。また、大豆摂取とヨード欠乏による甲状腺発がんの機序の一部は、プロモーション作用として説明できることを明らかにした。さらに、atrazine は甲状腺発がんを促進しない可能性が示された。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Furukawa F, Hirose M. Lack of modification by environmental estrogenic compounds of thyroid carcinogenesis in ovariectomized rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 966-972, 2000.
- 2) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Furukawa F, Hirose M. Lack of modifying effects of environmental estrogenic compounds on the development of thyroid proliferative lesions in male rats pretreated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN). *Jpn. J. Cancer Res.* 91: 899-905, 2000.
- 3) Son H-Y, Nishikawa A, Ikeda T, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 103-108, 2001.
- 4) Ikeda T, Nishikawa A, Son H-Y, Nakamura H, Miyauchi M, Imazawa T, Kimura S, Hirose M. Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 390-395, 2001.
- 5) Hirose M, Nishikawa A, Shibutani, M, Mitsumori, K. Environmental agents, endocrine disrupting chemicals and rat thyroid carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* 14: 71-77, 2001.

## 2. 学会発表

- 1) 池田尚子, 西川秋佳, 孫 和永, 中村英明, 宮内 慎, 今沢孝喜, 木村修一, 広瀬雅雄: 大豆過剰摂取とヨード欠乏との相乗的甲状腺発がん促進効果 第 59 回日本癌学会総会 (2000. 10)
- 2) 孫 和永, 西川秋佳, 池田尚子, 今沢孝喜, 中村英明, 古川文夫, 広瀬雅雄: 卵巣摘出ラットを用いた DHPN 甲状腺腫瘍誘発モデルにおける内分泌攪乱物質の影響 第 59 回日本癌学会総会 (2000. 10)
- 3) Son, H-Y., Nisikawa, A., Yamagishi, M., Okazaki, K., Imazawa, T., Furukawa, F. and Hirose, M.: Synergistic effects of caffeine with iodine deficiency on the development of thyroid proliferative lesions in rats. 第 17 回日本毒性病理学会 (2001. 1)
- 4) Nishikawa, A., Ikeda, T., Son, H-Y., Imazawa, T., Kimura, S. and Hirose, M.: Synergistic promotion effects of excess soybean and deficient iodine on DHPN-induced thyroid tumorigenesis in rats. 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (2001. 3)

## H. 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