

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の研究

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。その結果、ノニルフェノールおよびゲニステインはラット肺腫瘍の発生頻度を対照群に比較し有意に増加させた。また、細胞増殖能のマーカである BrdU Index はこれらにおいて増加するとともに、酸化 DNA 傷害のマーカである

8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)の形成の増加が、ノニルフェノールおよびゲニステイン投与肺組織において認められた。さらに、大腸においては、非腫瘍部の BrdU Index がノニルフェノールおよびゲニステイン投与において増加する傾向が見られた。一方、肝における前がん病変のマーカである glutathione-S-transferase placental type (GST-P) foci の形成は、ノニルフェノールおよびゲニステイン投与により有意に抑制された。

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がもたれている。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した。

B. 研究方法

6週齢の F344Du/Crj 系雄ラット 124 匹を 8 群に分け、Fig. 1 に示すデザインで動物実験を施行した。すなわち、第 1～第 5 群(各群 20 匹ずつ)に実験開始日に diethylnitrosamine 100mg/kg b.w.を腹腔内投与、N-methylnitrosourea を第 2、第 5、第 8、第 11 日に 20mg/kg b.w.の用量で腹腔内投与、dimethylhydrazine を第 14、第 17、第 20、第 23 日に 40mg/kg b.w.を腹腔内投与、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(DHPN)を 0.1%の濃度で飲料水投与しイニシエーション処置(DMBDD)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。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。また、前立腺の重量も第 1 群と第 4 群で対照群の第 5 群に比較し有意に減少していた (Table

2)。しかし、非イニシエーション群において、ノニルフェノールを 250ppm、ゲニステインを 250ppm で混餌投与した群ではこれらの重量に、対照群との間に有意な差は認められなかった。腫瘍の発生に関しては、イニシエーション群において肺の腫瘍発生がノニルフェノール、ゲニステイン投与群で対照群に比較し有意に増加した (Table 3)。肺腫瘍のラット 1 匹あたりの発生個数は Table 4 の通りで、ゲニステイン 250ppm 群で肺腺腫が有意に増加していた。それ以外の臓器では、腫瘍を認めたが、発生頻度に対照群と有意な差は認められなかった (Table 5)。肺組織の非腫瘍部における細胞増殖能の指標である BrdU labeling index がノニルフェノール、ゲニステイン投与群で対照群に比較し、有意に増加していた (Fig. 3)。また、大腸においてもノニルフェノール、ゲニステイン投与群で腫瘍発生が有意差はないものの対照群に比較し増加傾向が見られ (Table 5)、また、BrdU labeling index は対照群に比較し、有意に増加していた (Fig. 4)。一方、肝の前がん病変の指標である glutathione-S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢はノニルフェノール、ゲニステイン投与した群で対照群に比し、有意にその数および面積が減少していた (Fig. 5)。また、肺発がん促進作用の機序解明のために、DHPN でイニシエーション後ノニルフェノールとゲニステインを 4 週間投与した肺組織の酸化ストレスの指標である 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) を検索したところ、これらの群で対照群に比し、8-OHdG の形成が上昇していた。

D. 考察

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。

一方、イニシエート群においてノニルフェノールおよびゲニステイン投与した群で肛門拳筋球海綿体および前立腺の重量が影響を受け、有意に減少したが、これには用量相関は見られず、非イニシエート群でのノニルフェノールおよびゲニステイン投与した群でこれらの重量が影響を受けていないことより、ゲニステイン、ノニルフェノールの直接的な内分泌攪乱作用ではないと判断された。今回、ゲニステイン、ノニルフェノールがイニシエート群において肺腫瘍の発生頻度を増加させ、ラット肺発がんを促進したと判断された。また、有意差はないものの大腸腫瘍の発生頻度も増加させ、大腸発がんも促進させることが疑われた。これらには、細胞増殖の亢進が見られ、促進の機序の一因と考えられた。さらに、肺における8-OHdG 形成の増加から酸化ストレスの関与が疑われた。内分泌攪乱化学物質のヒト発がんに及ぼす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結果、これらはラットの肺および大腸発がんを促進することが明らかになった。

F. 研究発表

(論文発表)

1. 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.

2. 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.

3. Taniyama, T., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Yano, Y., Otani, S., Nishizawa, Y., Morii, H., Fukushima, S.: Chemopreventive effect of 24*R*,25-dihydroxyvitamin D₃ in *N,N*-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis., *Carcinogenesis*, 21, 173-178, 2000.

4. 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.

5. Fukushima, S. and Wanibuchi, H.: Prevention of urinary bladder cancer: The interface between experimental and human studies. *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 1, 15-33, 2000.

6. Li, W., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Wei, M., Yamamoto, S., Nishino, H. and Fukushima, S.: Inhibition by ginseng of 1,2-dimethylhydrazine induction of aberrant crypt foci in the rat colon. *Nutrition and Cancer*, 36, 66-73, 2000.

7. Takaba, K., Saeki, K., Suzuki, K.,

- Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Significant overexpression of metallothionein and cyclin D1 and apoptosis in the early process of rat urinary bladder carcinogenesis induced by treatment with *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine or sodium L-ascorbate. *Carcinogenesis*, 21, 691-700, 2000.
8. Romanenko, A., Morimura, K., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Kinoshita, A., Kaneko, M., Vozianov, A. and Fukushima, S.: Increased oxidative stress with gene alteration in urinary bladder urothelium after the chernobyl accident. *Int. J. Cancer*, 86, 790-798, 2000.
9. Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Yamamoto, S., Hakoi, K., Nakae, D., Konishi, Y. and Fukushima, S.: Lack of promoting potential of dimethylarsinic acid in the kidney of male NCI-Black reiter rats. *J. Toxicol. Pathol*, 13, 87-91, 2000.
10. Morikawa, T., Wanibuchi, H., Morimura, K., Ogawa, M. and Fukushima, S.: Promotion of skin carcinogenesis by dimethylarsinic acid in *keratin (K6) / ODC* transgenic mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 579-581, 2000.
11. Masuda, C., Wanibuchi, H., Sekine, K., Yano, Y., Otani, S., Kishimoto, T., Tsuda, H. and Fukushima, S.: Chemopreventive effects of bovine lactoferrin on *N*-Butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine-induced rat bladder carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 582-588, 2000.
12. Kitano, M., Wanibuchi, H., Kikuzaki, H., Nakatani, N., Imaoka, S., Funae, Y., Hayashi, S. and Fukushima, S.: Chemopreventive effects of Coumapherine from pepper on the initiation stage of chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 674-680, 2000.
13. Vijayaraghavan, M., Wanibuchi, H., Takada, N., Yano, Y., Otani, S., Yamamoto, S. and Fukushima, S.: Inhibitory effects of S-methylcysteine and cysteine on the promoting potential of sodium phenobarbital on rat liver carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 91, 780-785, 2000.
14. Kitano, M., Wanibuchi, H., Morimura, K., Sukata, T., Shizusawa, M. and Fukushima, S.: Morphological changes in silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) related to proliferative activity in glutathione S-transferase placental form (GST-P) positive foci of rat liver. *J. Toxicol. Pathol.*, 13, p.261-264, 2000.
15. Murai, T., Mori, S., Hosono, M., Iwakura, Y., Oohara, T., Makino, S., Takeda, R., Koide, A., Mori, Y., Wanibuchi, H. and Fukushima, S.: Differences among three sister strains of NON/Shi mice in sensitivity to urinary tract carcinogenesis by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *J. Toxicol. Pathol.*, 13, p.225-229, 2000.
16. Wei, M., Wanibucchi, H., Yamamoto, S., Iwai, S., Morimura, K., Nomura, T., Takayama, R. and Fukushima, S.: Chemopreventive effects of S-methylcysteine on rat hepatocarcinogenesis induced by concurrent administration of sodium nitrite and morpholine. *Cancer Lett.*, 161, p.97-103, 2000.

(学会発表)

1. 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、加国雅和、星学、土井賢一郎、須方督夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討 第7回日本がん予防研究会、7月14-15日、兵庫県淡路、2000.
2. 清家則孝、鰐淵英機、西川隆之、小川元女、加国雅和、須方督夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討 第59回日本癌学会総会、10月4-6日、横浜、2000.
3. 清家則孝、鰐淵英機、三橋誠、小川元女、市原敏夫、福島昭治：内分泌攪乱化学物質の発癌修飾作用：ラット多臓器発癌モデルによる検討 第17回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、兵庫県淡路、2001.
4. Seike, N., Wanibuchi, H., Nishikawa, T., Ogawa, M., Kaneko, M., Fukushima, S.: Modifying effects of endocrine disrupting chemicals on multiorgan carcinogenesis in F344 rats. 92nd Annual meeting of American Association for Cancer Research. March 24-28, 2001, New Orleans, LA, USA.